

**TÂNIA MARIA LEITE DA SILVEIRA**

**AMINAS BIOATIVAS LIVRES E CONJUGADAS NO CAFÉ  
SOLÚVEL: METODOLOGIA DE ANÁLISE E INFLUÊNCIA DO  
PROCESSAMENTO**

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

**TÂNIA MARIA LEITE DA SILVEIRA**

**AMINAS BIOATIVAS LIVRES E CONJUGADAS NO CAFÉ  
SOLÚVEL: METODOLOGIA DE ANÁLISE E INFLUÊNCIA DO  
PROCESSAMENTO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Maria Beatriz Abreu Glória

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

S587a Silveira, Tânia Maria Leite da  
Aminas bioativas livres e conjugadas no café solúvel: metodologia de análise e influência do processamento / Tânia Maria Leite da Silveira. – 2008.  
179f. : il.

Orientador: Prof. Maria Beatriz Abreu Glória  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais.  
Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Café – Qualidade - Teses. 2. Café – Processamento - Teses.  
3. Café – Pesquisa – Teses. I. Glória, Maria Beatriz Abreu. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia.

CDD 663.93

## DEDICATÓRIA

Ao Álisson, pelo amor que me incentiva sempre, pelo carinho, confiança e pelos sonhos e valores compartilhados. Obrigada pelo seu companheirismo.

A minha querida filhinha Catarina, razão da minha vida, pela alegria de viver e serenidade em todos os momentos.

Aos meus pais, Eduil e Maria Lúcia, que me ensinaram os caminhos da perseverança e da valorização do conhecimento.

Aos meus sogros Antônio e Mércia (*In Memória*), exemplos de dedicação profissional, pelo constante incentivo.

Às minhas irmãs, pelo apoio e carinho em todos os momentos.

À minha cunhada, meus cunhados e sobrinhos pela alegria e demonstrações de afeto sempre.

Aos tios Marco Antônio e Carmélia, pela disponibilidade, incentivo e cuidados com minha filhinha nas horas de minha ausência.

## AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre me guiou e norteou toda a minha trajetória na idealização deste sonho.

À minha orientadora, Maria Beatriz Abreu Glória, exemplo de caráter e dedicação profissional, pela confiança em meu trabalho, pela orientação e pelos preciosos ensinamentos durante todo percurso deste doutorado.

À FAPEMIG, pelo suporte financeiro para execução deste trabalho.

Ao professor Juan Cañellas Bosch Neto, do curso de Engenharia de Alimentos do Centro Universitário de Belo Horizonte – Unibh, pela ajuda e ensinamentos na execução dos ensaios de granulometria.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia e da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo aprendizado.

Às funcionárias da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pela atenção, esclarecimentos e auxílio.

À professora Adriana Farah do Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela colaboração no fornecimento de amostras de café.

À Companhia Iguaçu de Café Solúvel, ao Denisley G. Bassoli e Josiane Alessandra Vignoli pelo apoio e fornecimento de amostras de café.

Ao SINDICAFÉ-MG, na pessoa do biólogo Flávio Ricardo Campos da Silveira, pela contribuição no fornecimento de amostras de café.

Aos professores da minha banca de qualificação, Rosemary Gualberto F. A. Pereira, Fernão Castro Braga e David Lee Nelson, pelas sugestões e direcionamento do trabalho.

Ao aluno de iniciação científica Igor F. R. Ribeiro, pela dedicação e apoio em uma etapa deste trabalho.

Às alunas de iniciação científica Vivian Proença Lara e Rita Carolina Figueiredo Duarte pela disposição e valiosa contribuição com o desenvolvimento deste trabalho.

À Ana Amélia Paolucci Almeida pela incentivo, amizade, compartilhamento de conhecimentos e, acima de tudo, boas energias.

Às colegas Silvia Mendonça Vieira, Lúcia Peret de Almeida, Flávia Beatriz Custódio, Renata Adriana Labanca, pelas valiosas contribuições e boas risadas nos momentos de descontração.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos Giuliana, Cristina, Paula Santiago, Cyntia Karine, Flávia Vitorino, Tássia, Tarliane, Juliana, Ana Carolina, Warley, Bruno, Bruno da La Paula, Adriana, Aline, Priscila, pelos bons momentos de convívio no LBqA.

Aos colegas de trabalho do Centro Universitário de Belo Horizonte – Unibh, pelo incentivo.

Muito obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a idealização deste trabalho.

*“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de estar sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de ser interrompido antes de terminar”.*

(Fernando Sabino)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>13</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>15</b>
<b>RESUMO</b>	<b>16</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>21</b>
<b>1 CAFÉ SOLÚVEL .....</b>	<b>21</b>
1.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	21
1.2 CLASSIFICAÇÃO.....	23
1.3 PROCESSAMENTO .....	24
1.4 COMPOSIÇÃO .....	27
<b>2 AMINAS BIOATIVAS LIVRES.....</b>	<b>28</b>
2.1 ASPECTOS GERAIS.....	28
2.2 BIOSÍNTESE .....	30
2.3 FUNÇÕES.....	34
2.4 CATABOLISMO .....	36
2.5 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS .....	37
2.6 AMINAS LIVRES EM CAFÉ .....	39
<b>3 AMINAS BIOATIVAS CONJUGADAS .....</b>	<b>44</b>
3.1 ASPECTOS GERAIS.....	44
3.2 FORMAÇÃO .....	45
3.3 RELEVÂNCIA FISIOLÓGICA.....	47
3.4 AMINAS CONJUGADAS EM CAFÉ.....	49
<b>4 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE AMINAS EM CAFÉ.....</b>	<b>50</b>
<b>5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS .....</b>	<b>52</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>55</b>

<b>CAPÍTULO I – PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS EM AMOSTRAS DE CAFÉ SOLÚVEL COMERCIALIZADAS EM BELO HORIZONTE, MG</b>	<b>56</b>
RESUMO .....	56
I.1 INTRODUÇÃO.....	57
I.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	59
I.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	62
I.4 CONCLUSÕES.....	70
<b>CAPÍTULO II. OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE EXTRAÇÃO DAS AMINAS BIOATIVAS LIVRES DE CAFÉ CRÚ</b>	<b>71</b>
RESUMO .....	71
II.1 INTRODUÇÃO.....	72
II.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	74
II.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	78
ii.4 CONCLUSÕES.....	88
<b>CAPÍTULO III. OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ÁCIDA NA DETERMINAÇÃO DAS AMINAS CONJUGADAS EM CAFÉ</b>	<b>90</b>
RESUMO .....	90
III.1 INTRODUÇÃO.....	91
III.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	92
III.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	97
III.4 CONCLUSÕES.....	112
<b>CAPÍTULO IV. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA POR CLAE - PAR IÔNICO PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS LIVRES EM AMOSTRAS DE CAFÉ</b>	<b>113</b>
RESUMO .....	113
IV.1 INTRODUÇÃO .....	114

<b>IV.2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>115</b>
<b>IV.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>120</b>
<b>IV.4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>134</b>
<b>CAPÍTULO V. INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO DO CAFÉ SOLÚVEL NOS TEORES DE AMINAS BIOATIVAS LIVRES E CONJUGADAS</b>	<b>135</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>135</b>
<b>V.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>136</b>
<b>V.2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>138</b>
<b>V.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>142</b>
<b>V.5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>153</b>
<b>CONCLUSÕES INTEGRADAS</b>	<b>155</b>
<b>SUGESTÕES</b>	<b>157</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>158</b>
<b>ANEXO</b>	<b>172</b>

## LISTA DE TABELAS

[REVISÃO BIBLIOGRÁFICA]	
1.	Parâmetros físico-químicos de qualidade do café solúvel..... 27
2.	Composição química aproximada do café solúvel..... 28
3.	Teores de aminos bioativas livres em grãos de café arábica (cru e torrado)... 39
4.	Teores de aminos bioativas livres em grãos de café robusta (cru e torrado)... 40
5.	Teores de aminos bioativas livres em grãos de café arábica (cru e torrado) classificados como bebida mole e rio..... 42
6.	Teores de aminos bioativas livres em grãos de café arábica (cru e torrado) classificados como preto, verde, ardido e mistura pva ..... 43
7.	Teores de aminos bioativas conjugadas ácido solúveis (AS) e ácido insolúveis (AI) em grãos crus de café arábica e robusta ..... 49
8.	Variáveis utilizadas na hidrólise ácida em diferentes matrizes ..... 51
[CAPÍTULO I]	
I.1.	Teores de aminos bioativas livres no café solúvel..... 64
I.2.	Teores de serotonina, tiramina, cadaverina e total de aminos bioativas livres em 50 mL de bebida nas diferentes marcas dos café analisados..... 68
I.3.	Valores de pH e características de cor CIE $L^*a^*b^*$ das amostras de café solúvel regular, descafeinado e orgânico ..... 70
[CAPÍTULO II]	
II.1	Influência do ácido extrator na recuperação das aminos livres em amostras de café adicionadas de 1 e 10 mg de padrão por 100 g de amostra ..... 79
II.2	Eficiência dos extratores ácidos avaliados segundo os critérios do CODEX (1993) ..... 80
II.3	Porcentagem de retenção das partículas dos grãos de café após moagem nos moinhos de rolos e martelos ..... 83
II.4	Volume de extrato recuperado na extração das aminos ..... 84
II.5	Teores de aminos bioativas extraídos de grãos de café cru de diferentes tamanhos de partículas ..... 85
II.6	Teores de aminos bioativas em café cru extraídas por meio de uma ou três extrações sucessivas na presença ou não de repouso ..... 87
[CAPÍTULO III]	
III.1	Teores médios de aminos livres detectadas na amostra de café cru ..... 97
III.2	Aminos ácido solúveis detectadas após hidrólise por 24 h com HCl em diferentes concentrações ..... 98
III.3	Aminos ácido insolúveis detectadas após hidrólise com diferentes concentrações de HCl ..... 99
III.4	Influência da temperatura na hidrólise das aminos conjugadas ácido solúveis ..... 100
III.5	Influência da temperatura na hidrólise das aminos conjugadas ácido insolúveis ..... 101
III.6	Recuperação das aminos do padrão (10 µg/mL) durante hidrólises ácidas com HCl 9 mol/L e 12 mol/L ..... 109

[CAPÍTULO IV]	
<b>IV.1</b>	Equações de regressão linear, coeficientes de determinação e de correlação das curvas analíticas para cada amina determinada em três dias ..... <b>122</b>
<b>IV.2</b>	Limites de detecção e de quantificação do método para matriz café ..... <b>131</b>
<b>IV.3</b>	Percentuais de recuperação de aminas bioativas nas matrizes café cru, torrado e solúvel fortificadas com 0,1, 1 e 10 mg/100 g de padrão ..... <b>132</b>
[CAPÍTULO V]	
<b>V.1</b>	Teores médios de aminas bioativas livres em amostras coletadas em diferentes pontos do processamento do café solúvel ..... <b>142</b>
<b>V.2</b>	Perfil e teores de aminas conjugadas ácido solúveis em amostras coletadas durante o processamento do café solúvel ..... <b>147</b>
<b>V.3</b>	Teores de aminas ácido insolúveis em amostras coletadas durante o processamento do café solúvel ..... <b>149</b>
<b>V.4</b>	Características físico-químicas de amostras coletadas durante o processamento do café solúvel ..... <b>151</b>
<b>V.5</b>	Características de cor (CIE L*a*b*) de amostras coletadas durante o processamento do café solúvel ..... <b>153</b>

## LISTA DE FIGURAS

[REVISÃO BIBLIOGRÁFICA]	
1.	Exportações brasileiras de café solúvel em toneladas no período de 1994 a 2007 ..... 22
2.	Fluxograma da produção de café solúvel ..... 25
3.	Estruturas químicas de algumas aminas ..... 29
4.	Vias metabólicas para a formação de aminas biogênicas ..... 31
5.	Vias para a síntese de poliaminas ..... 33
6.	Estruturas químicas de algumas poliaminas conjugadas (amidas de ácidos hidroxicinâmicos (HCAAs) ..... 44
7.	Esquema da biossíntese da tiramina e serotonina conjugadas ..... 46
[CAPÍTULO I]	
I.1.	Ocorrências das aminas bioativas livres nas amostras analisadas ..... 62
I.2.	Contribuição de cada amina em relação ao teor total nos diferentes tipos de café solúvel ..... 65
I.3.	Teores de aminas bioativas nos diferentes tipos de café solúvel ..... 66
I.4.	Teores totais de aminas bioativas livres nas diferentes marcas de café solúvel: A) regular; B) descafeinado; C) orgânico. .... 67
[CAPÍTULO II]	
II.1	Moinhos utilizados na moagem dos grãos de café crus ..... 76
II.2	Medida do diâmetro dos grãos de café inteiros (Size Meter 1.1) ..... 82
II.3	Grãos de café inteiros e após uma moagem no moinho de rolos ..... 82
II.4	Grãos de café após duas moagem em moinho de rolos seguidas de moagem no moinho de martelos ..... 83
II.5	Influência dos procedimentos de extração sobre cada amina ..... 88
[CAPÍTULO III]	
III.1	Esquema geral da análise de aminas conjugadas ..... 94
III.2	Influência do tempo de hidrólise ácida a temperatura ambiente nas aminas ácido solúveis putrescina, espermidina e espermina de grãos crus de café..... 103
III.3	Influência do tempo de hidrólise ácida a 110 °C nas aminas ácido solúveis putrescina, espermidina e espermina de grãos crus de café..... 104
III.4	Influência do tempo de hidrólise ácida a temperatura ambiente nas aminas ácido insolúveis putrescina, espermidina e espermina de grãos crus de café... 106
III.5	Influência do tempo de hidrólise ácida a 110 °C nas aminas ácido insolúveis putrescina, espermidina e espermina de grãos crus de café ..... 107
III.6	Comportamento das aminas durante a reação de hidrólise..... 111
[CAPÍTULO IV]	
IV.1	Cromatogramas de uma solução padrão de 3 µg/mL das dez aminas (preto) e de amostras de cafés cru (vermelho), torrado (verde) e solúvel (azul) ..... 121
IV.2	Curvas de linearidade das aminas no solvente e na matriz café cru ..... 126
IV.3	Curvas de linearidade das aminas no solvente e na matriz café torrado ..... 128
IV.4	Curvas de linearidade das aminas no solvente e na matriz café solúvel ..... 129

## [CAPÍTULO V]

<b>V.1</b>	Fluxograma da produção de café solúvel com indicação dos pontos de coleta das amostras .....	<b>138</b>
<b>V.2</b>	Contribuição de cada amina ao teor total nas amostras de café analisadas coletadas em diferentes pontos do processamento do café solúvel .....	<b>143</b>
<b>V.3</b>	Aminas bioativas livres detectadas nas amostras de café coletadas em diferentes pontos do processamento do café solúvel .....	<b>144</b>
<b>V.4</b>	Contribuição de cada amina ácido solúvel ao teor total destas aminas .....	<b>147</b>
<b>V.5</b>	Comportamento das aminas ácido solúveis frente as diferentes etapas do processamento do café solúvel .....	<b>148</b>
<b>V.6</b>	Contribuição de cada amina ácido insolúvel ao teor total destas aminas .....	<b>150</b>
<b>V.7</b>	Comportamento das aminas ácido insolúveis frente as diferentes etapas do processamento do café solúvel .....	<b>150</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGM	Agmatina
AI	Aminas ácido insolúveis
AS	Aminas ácido solúveis
BEHPA	Bis-2-etilhexilfosfato
CAD	Cadaverina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAO	Diaminoxidase
EPD	Espermidina
EPM	Espermina
FEN	Feniletilamina
HCAA	Amida de ácido hidroxicinâmico
HIM	Histamina
MAO	Monoaminoxidase
ODC	Ornitina descarboxilase
PAO	Poliaminoxidase
PUT	Putrescina
SAMDC	S-Adenosil-L-metionina descarboxilase
SRT	Serotonina
TCA	Ácido tricloroacético
TIM	Tiramina
TRM	Triptamina

## RESUMO

O perfil e os teores de aminos bioativas livres em café solúvel, bem como a influência das etapas do processamento nos teores das aminos livres e conjugadas foram investigados. A metodologia para análise de aminos livres e conjugadas em café foi otimizada e o método CLAE-par iônico com derivação pós-coluna com OPA e detecção fluorimétrica para análise de aminos bioativas livres foi validado. Amostras de café solúvel regular, descafeinado e orgânico comercializadas em Belo Horizonte, MG foram analisadas em relação ao perfil e aos teores de aminos bioativas livres, pH e características de cor. Amostras de café foram coletadas em quatro etapas durante a produção do café solúvel. Foram pesquisadas dez aminos (putrescina, cadaverina, tiramina, histamina, serotonina, agmatina, espermidina, espermina, feniletilamina e triptamina). Dentre as dez aminos pesquisadas foram encontradas a putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, serotonina, agmatina, espermidina, espermina e feniletilamina. O teor total de aminos presente no café solúvel coletado no mercado variou de 0,28 a 2,76 mg/100 g. Os teores de tiramina e cadaverina foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre os três tipos de café solúvel analisados. Para um melhor rendimento na extração de aminos livres do grão cru, o procedimento deve ser conduzido com ácido tricloroacético (TCA) 5% (m/v) em três extrações sucessivas. A hidrólise das aminos conjugadas para liberação da sua forma livre deve ser executada com HCl 9 mol/L a 110 °C por 18 horas. Foi observado influência das etapas do processamento do café solúvel no perfil e teores das aminos livres e conjugadas. A torrefação diminuiu os teores das aminos, sendo que a putrescina, tiramina, espermidina, espermina e triptamina não foram detectadas no café torrado e a serotonina teve seus teores reduzidos. Observou-se a formação da agmatina durante a torrefação. Os teores totais das aminos aumentaram com a concentração do extrato do café. As aminos conjugadas ácido solúveis foram detectadas no café cru e em pequenas concentrações no café torrado. As aminos conjugadas ácido insolúveis foram detectadas apenas no café cru.

**Palavras-chave:** café, café solúvel; café descafeinado; café orgânico; aminos bioativas livres; aminos conjugadas, processamento.

## ABSTRACT

**Free and conjugated bioactive amines in instant coffee: the methodology of analysis and the influence of processing** - The profile and levels of free bioactive amines in instant coffee, as well as the influence of the processing on the levels of free and conjugated amines, were investigated. The method for analysis of free and conjugated amines in coffee beans was optimized, and the post-column derivatization and fluorimetric detection for the analysis of free bioactive amines by ion pair HPLC was validated. The profile and levels of the free bioactive amines, pH and color characteristics of regular, decaffeinated and regular organic coffee samples commercialized in Belo Horizonte, MG, were analyzed. Ten amines (putrescine, cadaverine, tyramine, histamine, serotonin, agmatine, spermidine, spermine, phenylethylamine and tryptamine) were determined. The total levels of amines in instant coffee ranged from 0.28 to 2.76 mg/100 g. Of the ten amines, putrescine, cadaverine, tyramine, histamine, serotonin, agmatine, spermidine, spermine and phenylethylamine were detected. The tyramine and cadaverine levels were significantly different ( $p < 0.05$ ) among the three types of instant coffee analyzed. The use of 5% (m/v) trichloroacetic acid with three successive extractions was the best procedure for extraction of free bioactive amines. The hydrolysis of the conjugated amines for the liberation of the free form should be executed with 9 mol/L HCl at 110 °C for 18 hours. The processing method influenced the profile and the levels of free and conjugated bioactive amines in instant coffee. Roasting decreased the levels of amines so that putrescine, tyramine, spermidine, spermine and tryptamine were not detected in roasted coffee. The serotonin levels were reduced during the roasting of the coffee. Agmatine formation was observed in the roasted coffee. The total levels of amines increased in the process of concentrating the coffee extract. The acid-soluble conjugated amines were detected in green coffee, and low levels were found in roasted coffee. The acid-insoluble conjugated amines were only detected in green coffee.

**Key Words:** instant coffee, decaffeinated coffee, organic coffee, free bioactive amines, conjugated bioactive amines.

## INTRODUÇÃO

O mercado de café solúvel no Brasil tem se desenvolvido muito nos últimos anos. Em 2002 o Brasil produziu cerca de 70 mil toneladas de café solúvel, das quais 86% foram destinadas ao mercado externo, sendo o maior exportador mundial de café solúvel, com uma participação de 48% no mercado internacional, seguido pela Colômbia (11%); Equador (8%) e Malásia (7,5%). O Brasil é também o segundo maior produtor mundial de café solúvel, responsável por 20% da produção total, precedido pelos Estados Unidos, com 30% (BNDES, 2003). Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Café Solúvel (ABICS) em 2007 a indústria brasileira de café solúvel exportou um volume de 75,4 mil toneladas, com uma receita de US\$ 434, 460 milhões. Em comparação com o ano anterior houve um aumento de 4,3% no volume e um incremento de 17,7 % no valor, efeito da forte elevação dos preços unitários do produto, em face da demanda aquecida no exterior e no consumo interno, que passaram de US\$ 5.634/ton em 2006 para US\$ 6.360/ton em 2007, um aumento de 12,9% (ABICS, 2008).

No processo de produção do café solúvel os grãos são torrados, moídos e submetidos à extração sob pressão em altas temperaturas (180 °C). O extrato é então desidratado em vaporizadores ou liofilizadores originando o café solúvel em pó ou granulado. A composição final do café solúvel dependerá, além das condições do processamento, das espécies e variedades de café utilizadas nos blends (NOGUEIRA & TRUGO, 2003).

Dentre os diversos tipos de substâncias biologicamente ativas presentes no café estão as aminas bioativas. As aminas são compostos orgânicos que podem estar naturalmente presentes nos alimentos ou ser formadas pela atividade enzimática da microbiota acompanhante, sendo classificadas como poliaminas e aminas biogênicas. As poliaminas espermidina e espermina estão amplamente distribuídas na natureza, em elevadas concentrações nas células e tem seu conteúdo aumentado em tecidos com altas taxas de crescimento (GLÓRIA, 2005).

As aminas bioativas participam de importantes processos fisiológicos no homem, animais e plantas: aceleram o processo metabólico ou a conversão enzimática; atuam como reserva de nitrogênio, como hormônios ou fatores de crescimento e são biomoduladoras (GLÓRIA, 2005). Algumas aminas desempenham papel de

neurotransmissores e de precursores de hormônios (NAGATSU, 1991). As poliaminas vêm sendo reportadas como importantes agentes antioxidantes presentes nos alimentos (SILLA-SANTOS, 1996). Nos vegetais, além das funções acima citadas, as poliaminas participam da floração e desenvolvimento do fruto, da resposta ao estresse e inibem a produção de etileno e a senescência (FLORES et al., 1989; GLÓRIA, 2003). A presença das aminas biogênicas histamina e serotonina em vegetais confere proteção ao tecido vegetal contra insetos e predadores (GLÓRIA, 2003).

O perfil e os teores de aminas bioativas em um determinado produto alimentício irão depender da espécie vegetal, das condições de cultivo, do processamento e ainda das condições higiênico-sanitárias durante o processamento e armazenamento. Alguns autores têm sugerido a utilização das aminas como parâmetro de qualidade, refletindo a má qualidade das matérias-primas utilizadas ou as condições higiênicas durante o processo de fabricação (DONHAUSER, 1993; LIMA & GLÓRIA, 1999).

As aminas podem estar presentes nas plantas na forma livre ou conjugada. A conjugação consiste em uma ligação covalente entre o grupo amina e o grupo carboxílico dos ácidos hidroxicinâmicos, sendo o derivado desta reação denominado amidas de ácido hidroxicinâmicos (HACCs) (FONTANIELLA et al., 2001; 2003). As aminas conjugadas têm sido associadas a processos de crescimento e desenvolvimento das plantas e a mecanismo de defesa contra patógenos (WALTERS, 2003). Alguns estudos têm reportado as HACCs como importante classe de compostos antioxidantes, agentes quimioterápicos e agentes anticolesterolêmicos (SON & LEWIS, 2002; CHOI et al, 2007).

Os relatos sobre a presença de aminas bioativas em café são poucos. AMORIM et al. (1977) e CIRILO et al. (2003) detectaram as aminas putrescina, espermidina e espermina em amostras de café verde, sendo que CIRILO et al. (2003) também detectaram serotonina (0,60 mg/100 g). CASAL et al. (2004) detectaram além das aminas já citadas a cadaverina e a tiramina. OLIVEIRA et al. (2005) encontraram a histamina e triptamina em amostras de café classificados como Rio que são considerados de baixa qualidade. Alguns autores também avaliaram aminas em café torrado e verificaram que a torrefação alterou o perfil e os teores de algumas aminas (AMORIM et al., 1977; CIRILO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005).

Apesar da grande importância do produto café para o Brasil e do vasto conhecimento científico sobre o mesmo, até o presente momento os relatos na literatura sobre o perfil e teores de aminas bioativas no café solúvel limitam-se aos

estudos realizados durante a execução deste trabalho. Os estudos realizados até então, concentraram-se no café em grãos, cru e torrado. Diante da importância que o café solúvel vem assumindo na economia brasileira, a execução de trabalhos sobre presença de aminos bioativas livres e conjugadas em café solúvel apresentará uma contribuição valiosa para a elaboração de um produto diferenciado, melhorando a sua competitividade no mercado mundial.

No presente trabalho, foram determinados o perfil e os teores de aminos livres e conjugadas no café solúvel. Considerando que as aminos bioativas podem estar presentes nos alimentos sob a forma livre ou conjugada e que as aminos conjugadas são analisadas em sua forma livre, a etapa de extração das aminos do café foi otimizada e a metodologia de análise de aminos bioativas por CLAE - par iônico foi validada. Foi otimizada também a etapa de hidrólise das aminos conjugadas para que as mesmas fossem posteriormente analisadas sob a forma livre. A influência das etapas do processamento no perfil e teores das aminos livres e conjugadas no café solúvel foi investigada em quatro diferentes pontos da linha de produção, sendo as amostras analisadas quanto às características físico-químicas e de cor e perfil e teores de aminos bioativas livres e conjugadas.

# REVISÃO DA LITERATURA

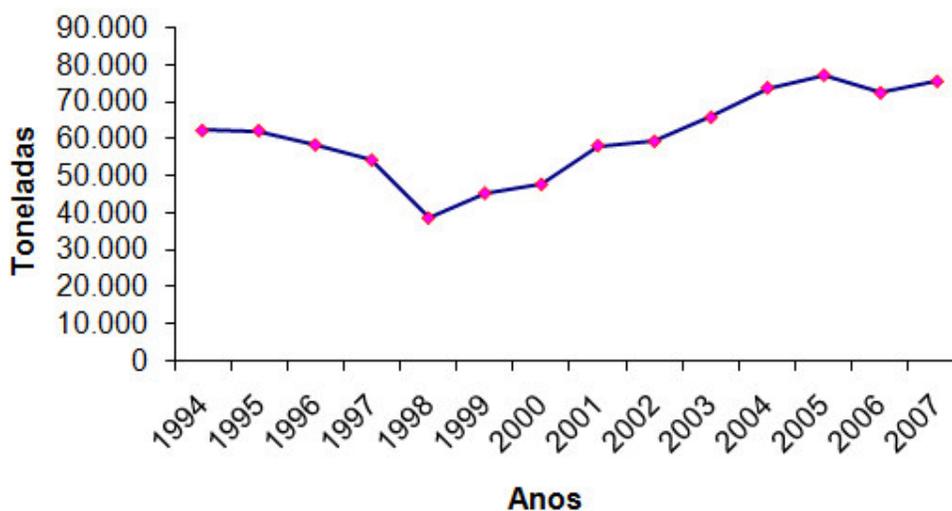
## 1 CAFÉ SOLÚVEL

Café solúvel é o produto resultante da desidratação do extrato aquoso obtido exclusivamente do café torrado, através de métodos físicos, utilizando água como único agente extrator (BRASIL, 2005). O café solúvel foi desenvolvido em 1901 pela empresa Japanese American Chemist de Chicago. Em 1906 o químico americano George Constant Washington, que morava na Guatemala, observou um pó fino no bico de sua chaleira de café, que parecia a condensação do vapor do café. Após alguns experimentos produziu a primeira massa de café solúvel, que foi denominada de “Red Coffee” (JAVACAFÉ, 2005).

A crise econômico-financeira dos últimos anos da década de 20 refletiu-se no Brasil na produção e comercialização de seu principal produto: o café. Para dar aproveitamento à produção excedente, o governo brasileiro encomendou à Nestlé em 1930 uma pesquisa que acabou conduzindo à tecnologia do café solúvel. O Nescafé foi lançado na Europa, nos EUA e na Argentina, em 1938. No Brasil, devido à forte pressão contrária dos produtores de café torrado e moído, só foi fabricado a partir de 1953 (RIC, 2005).

### 1.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Café Solúvel (ABICS), o Brasil produziu em 2002 cerca de 70 mil toneladas/ano de café solúvel, das quais 86% são destinadas ao mercado externo. As exportações brasileiras totalizaram 56.431 toneladas, gerando uma receita de US\$ 167 milhões (Figura 1). Os principais destinos foram os países da União Européia, com 18% do total exportado; Rússia, com 15%; Ucrânia, com 15%; Estados Unidos, com 15%; e Japão, com 10%. O Brasil é o maior exportador de café solúvel do mundo, com uma participação de 48% no mercado internacional, seguido pela Colômbia (11%); Equador (8%) e Malásia (7,5%). É o segundo maior produtor mundial de café solúvel, responsável por 20% da produção total, precedido pelos Estados Unidos, com 30% (BNDES, 2003).



**Figura 1** – Exportações brasileiras de café solúvel em toneladas no período de 1994 a 2007.

A exportação de café solúvel em 2004 alcançou recorde de 73,5 mil toneladas (cerca de 3,2 milhões de sacas) (Figura 1), com crescimento de 11,8% sobre o ano anterior (65,7 mil toneladas). Em termos de receita, houve aumento de 27,7%, de US\$ 225,5 milhões para US\$ 287,9 milhões. Segundo a ABICS, este fato ocorreu devido ao bom desempenho das exportações para a Rússia, com aumento de cerca de 74% sobre 2003, passando de 8,3 mil para 14,4 mil toneladas. Do total exportado em 2004, 1,6 milhões de sacas foram embarcadas sob a forma de produto com maior valor agregado. De acordo com dados fornecidos pelo CECAFÉ (2006), o volume das exportações de café solúvel em 2005 cresceu 4%, totalizando 77 mil toneladas (cerca de 3,3 milhões de sacas) de café solúvel. A receita cambial alcançou US\$ 331,1 milhões (alta de 15%) e o preço médio de exportação subiu 10,6%, de US\$ 3.918 em 2004 para US\$ 4.334 em 2005.

Já em 2006 houve uma queda na exportação brasileira de café solúvel. O volume estimado em toneladas para o referido ano era de 85.811 sendo o realizado de 72.300 toneladas (ABICS, 2007). Uma das causas para a diminuição do volume das exportações em 2006 foi a discriminação tarifária exercida pela União Européia sobre o café solúvel proveniente do Brasil, taxado em 9% enquanto se isentava o produto originário da América Latina (Colômbia) e África (MALTA, 2007).

Em 2007 a indústria brasileira de café solúvel exportou um volume de 75,4 mil toneladas, com uma receita de US\$ 434.460 milhões. Em comparação com o ano anterior houve um aumento de 4,3% no volume e um incremento de 17,7 %. Isso se deve à forte elevação dos preços unitários do produto, em face da demanda aquecida no exterior e no consumo interno, que passaram de US\$ 5.634/ton em 2006 para US\$ 6.360/ton em 2007, um aumento de 12,9% (ABICS, 2008). De acordo com MALTA (2008) a forte procura pelo café solúvel no mundo demonstra maior inclinação pelo consumo de um produto natural, de fácil e rápido preparo, que atenda melhor ao usuário de terceira idade e a mulher que trabalha fora, segmentos populacionais que estão em crescimento. Adicionado a essa tendência, nota-se o aumento de consumo da mistura do café solúvel com leite na população jovem, o que tem contribuído para o espantoso crescimento do consumo em países que ainda não são consumidores tradicionais de café. Estimou-se um aumento no consumo de café solúvel no mundo, em 2007, da ordem de 5%, índice bem maior do que o de consumo do café torrado e moído, forma tradicional de consumo de café, que cresce em média cerca de 1,5% ao ano no mundo.

As estimativas para 2008 apontam uma redução no volume exportado pelo Brasil de 5,2%, passando-se de 75.704 toneladas para 71.500. Porém os preços de venda deverão sofrer uma elevação pelo efeito de uma oferta apertada em relação à demanda, passando de US\$ 6.345/ton, verificado em 2007, para US\$ 6 800/ton. em 2008, um incremento de 7,2%. Em decorrência desse aumento dos preços a receita de 2008 experimentará um ligeiro aumento em relação a 2007, passando de US\$ 480.311 mil em 2007 para US\$ 486.200 mil em 2008 (ABICS, 2008). Mas, de acordo com MALTA (2008) este incremento nos preços, confrontado com um volume exportado inferior ao ano anterior, não será suficiente para permitir um aumento significativo na receita.

## **1.2 CLASSIFICAÇÃO**

O café solúvel é assim designado podendo ser seguido da classificação e/ou espécie que lhe deu origem. Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 1999), o café solúvel poderia ser classificado de acordo com o processo de desidratação e forma de

apresentação como café solúvel em pó, café solúvel granulado ou aglomerado e café solúvel liofilizado ou freeze-dried.

O café solúvel em pó ou spray dried é o produto obtido por processo no qual o extrato de café, no estado líquido, é pulverizado em atmosfera aquecida, para através da evaporação da água, formar partículas secas. O café solúvel granulado ou aglomerado é o produto obtido por processamento, no qual as partículas de café solúvel spray dried são fundidas para formar partículas maiores (grânulos). E o café solúvel liofilizado ou freeze-dried é o produto obtido por processamento no qual o café, no estado líquido, é congelado e a água é removida por sublimação, formando partículas secas de formas irregulares (VARNAM & SUTHERLAND, 1994).

Em 2005 a ANVISA publicou a Resolução Nº 277, de 22 de setembro que revogou a Portaria nº 130, de 19 de fevereiro de 1999 (BRASIL, 2005). Na RDC nº 277 de 2005, não consta a classificação do café solúvel, apenas define que a designação do café solúvel pode vir acompanhada das expressões relativas ao processo de obtenção do mesmo.

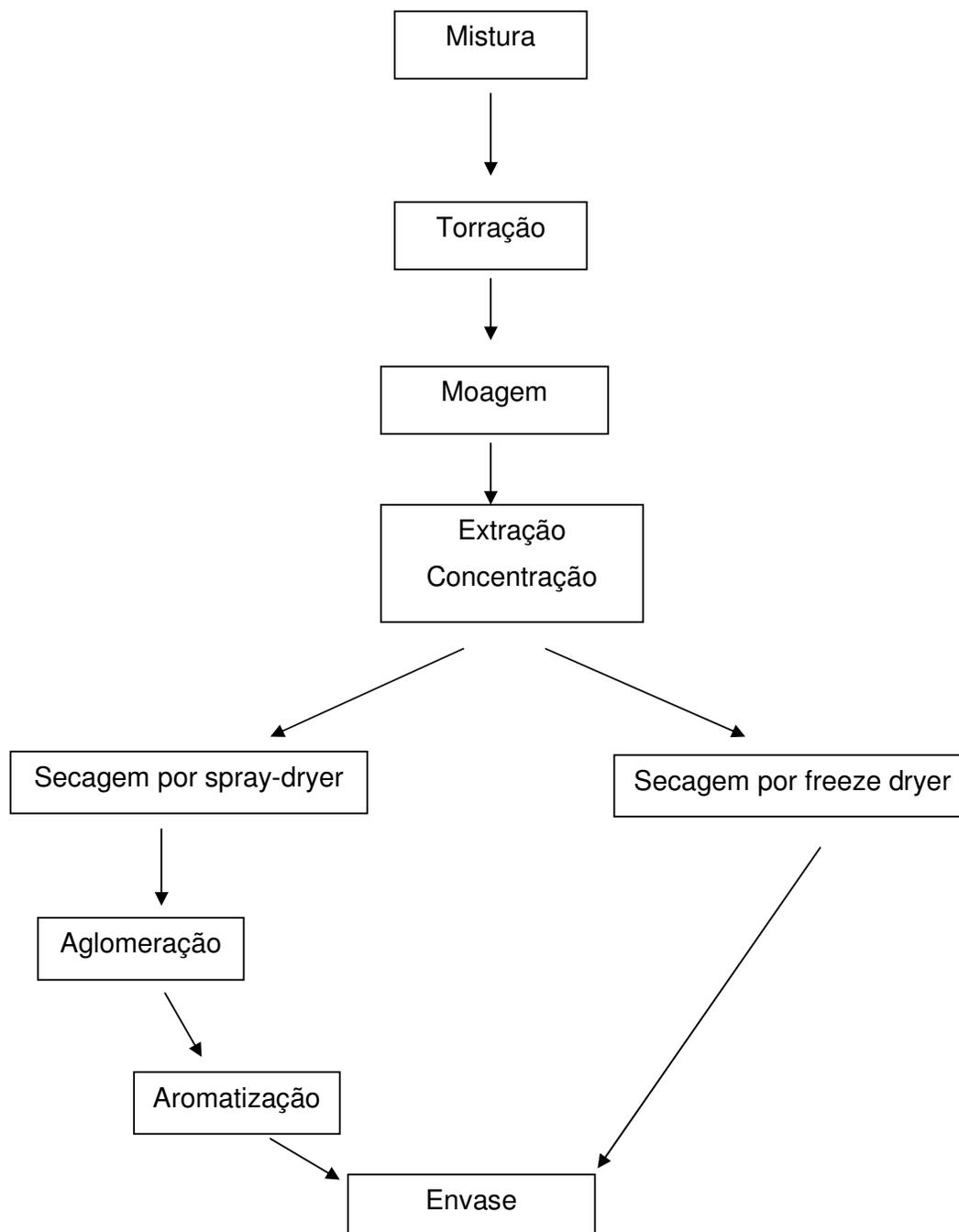
### 1.3 PROCESSAMENTO

O processamento do café solúvel envolve as etapas de seleção dos grãos, mistura, torração, moagem, extração, concentração, secagem por aspersão ou liofilização, aglomeração e envasamento (Figura 2) (SMITH, 1989; CLARKE, 2001).

As etapas do processamento do café solúvel estão descritas a seguir:

i. **seleção e mistura** – etapa na qual os grãos de café são selecionados e combinados adequadamente, para a elaboração da bebida na qualidade exigida para cada padrão.

A composição dos blends pode variar em função da espécie do café utilizado nesta etapa de seleção. No Brasil são cultivados o *Coffea arabica* e o *Coffea canephora Pierre* (conhecida como Robusta), assim as duas espécies podem fazer parte da composição dos blends. De acordo com MORGANO et al. (2002), na fabricação do café solúvel utiliza-se um maior percentual de café robusta, visto que a taxa de extração de sólidos no processo de fabricação deste tipo de bebida, e portanto o teor de sólidos solúveis é superior àquela obtida com utilização do café arábica.



**Figura 2** – Fluxograma da produção de café solúvel. Fonte: SMITH (1989).

ii. **torração** – etapa na qual se iniciam importantes transformações químicas. Ocorre perda de matéria seca do grão de café na forma de  $\text{CO}_2$  gasoso e outros produtos voláteis da pirólise. Muitos dos compostos formados durante a pirólise são importantes para determinar o aroma do café (VARNAM & SUTHERLAND, 1994). A cor dos grãos varia de acordo com o grau de torrefação do café. A primeira etapa do processo

consiste na eliminação da umidade, sendo que a torração começa quando a temperatura do grão de café alcança 180 a 230° C (CLARKE, 1989). O tempo de duração da torração pode variar de 5 a 30 minutos, o que vai depender do nível de torração desejado, das características físicas da matéria-prima, tipo e controle dos torrefadores (VARNAM & SUTHERLAND, 1994);

iii. **moagem** – etapa necessária para permitir uma rápida extração dos sólidos solúveis na etapa de extração. Para moer os grãos de café torrados empregam-se moinhos, sendo o mais utilizado o de rodas múltiplos. Este equipamento consiste de um grupo de 2 ou 4 pares de rolos por onde os grãos de café vão passando e reduzindo de tamanho progressivamente (VARNAM & SUTHERLAND, 1994);

iv. **extração** – constitui em um processo físico que consiste na transferência de massa dos compostos que podem difundir-se da fase sólida para a líquida. No processo de extração industrial utiliza-se uma bateria de percoladores em coluna nos quais os sólidos solúveis são extraídos do café moído com água à temperatura de 180 °C (CLARKE, 2001);

v. **concentração** – durante a concentração o extrato de café é desidratado mediante evaporação térmica, mas também pode ser usada a concentração por congelamento. Um problema importante que afeta todos os sistemas de evaporação térmica é a perda de substâncias voláteis que pode afetar o aroma e o sabor do café solúvel. Este problema pode ser solucionado extraindo-se e recuperando-se os compostos voláteis mediante condensação (VARNAM & SUTHERLAND, 1994);

vi. **secagem por aspersão (spray-dryer)** – o extrato concentrado é atomizado em forma de gotículas no topo de uma torre de secagem ao mesmo tempo em que é submetido a uma corrente de ar quente de aproximadamente 205 °C, provocando a evaporação da água (SMITH, 1989). O produto coletado na base dessa torre é o café solúvel em pó, que pode ser transformado em café aglomerado se submetido a uma etapa adicional de processamento;

vii. **secagem por liofilização (freeze-dryer)** – na secagem por liofilização o extrato é congelado a temperaturas inferiores a 30 °C negativos, sendo então triturado em moinhos especiais e conduzido à câmara de vácuo dentro de bandejas, sendo a água removida por sublimação (SMITH, 1989). O produto final é o café liofilizado;

viii. **aglomeração** – consiste na fusão das partículas do café para formar grânulos. Na aglomeração, as partículas do pó são umedecidas permitindo uma melhor aglomeração dos grãos que em seguida serão novamente secos (SMITH, 1989);

- ix. **aromatização** – etapa onde são incorporados ao café aromas que possam ter sido perdidos durante o processamento.
- x. **envase** – etapa na qual o café solúvel em pó, granulado ou liofilizado é acondicionado em embalagens próprias para preservar suas características durante a sua vida de prateleira.

## 1.4 COMPOSIÇÃO

Como relatado anteriormente, o café solúvel deverá ser produzido pela desidratação do extrato aquoso obtido exclusivamente do café torrado, utilizando apenas água como agente extrator. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005, fixou a identidade e as características mínimas de qualidade do café solúvel. De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2005), o café solúvel deverá atender aos requisitos específicos apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Parâmetros físico-químicos de qualidade do café solúvel

<b>Parâmetro</b>	<b>Limite Permitido (g/100 g)</b>
Umidade	Máximo 5,0
Cafeína: produtos descafeinados	Máximo 0,3

Fonte: Brasil (2005).

Dados sobre a composição do café solúvel são escassos. De acordo com NOGUEIRA & TRUGO (2003), a composição final do café solúvel depende das espécies e variedades do café utilizadas na formulação dos blends. As espécies arábica e robusta apresentam diferenças em sua composição, deste modo, a participação de cada uma dessas nos blends e as condições de processamento são determinantes da qualidade final do café solúvel.

Alguns dados sobre a composição do café solúvel estão demonstrados na Tabela 2.

**Tabela 2** – Composição química aproximada do café solúvel

<b>Componentes</b>	<b>Café solúvel em pó (g/100 g bs)</b>
Minerais	8,8 - 10,0
Cafeína	2,5 - 5,1
Lipídios	0,2 - 1,6
Ácidos clorogênicos totais	5,2 - 7,4
Oligossacarídeos	0,7- 5,2
Polissacarídeos totais	50,0 - 65,0
Proteínas	12,6 - 21,0

Fonte: SMITH (1989); USDA (2008); bs = base seca.

Em relação aos teores de umidade foram relatados valores médios de 3,43% (ALVES & BORDIN, 1998) e 3,45% (ALVES et al., 2000) para amostras de café solúvel aglomerado e de 2,74 % (ALVES et al., 2000) para café solúvel em pó.

## **2 AMINAS BIOATIVAS LIVRES**

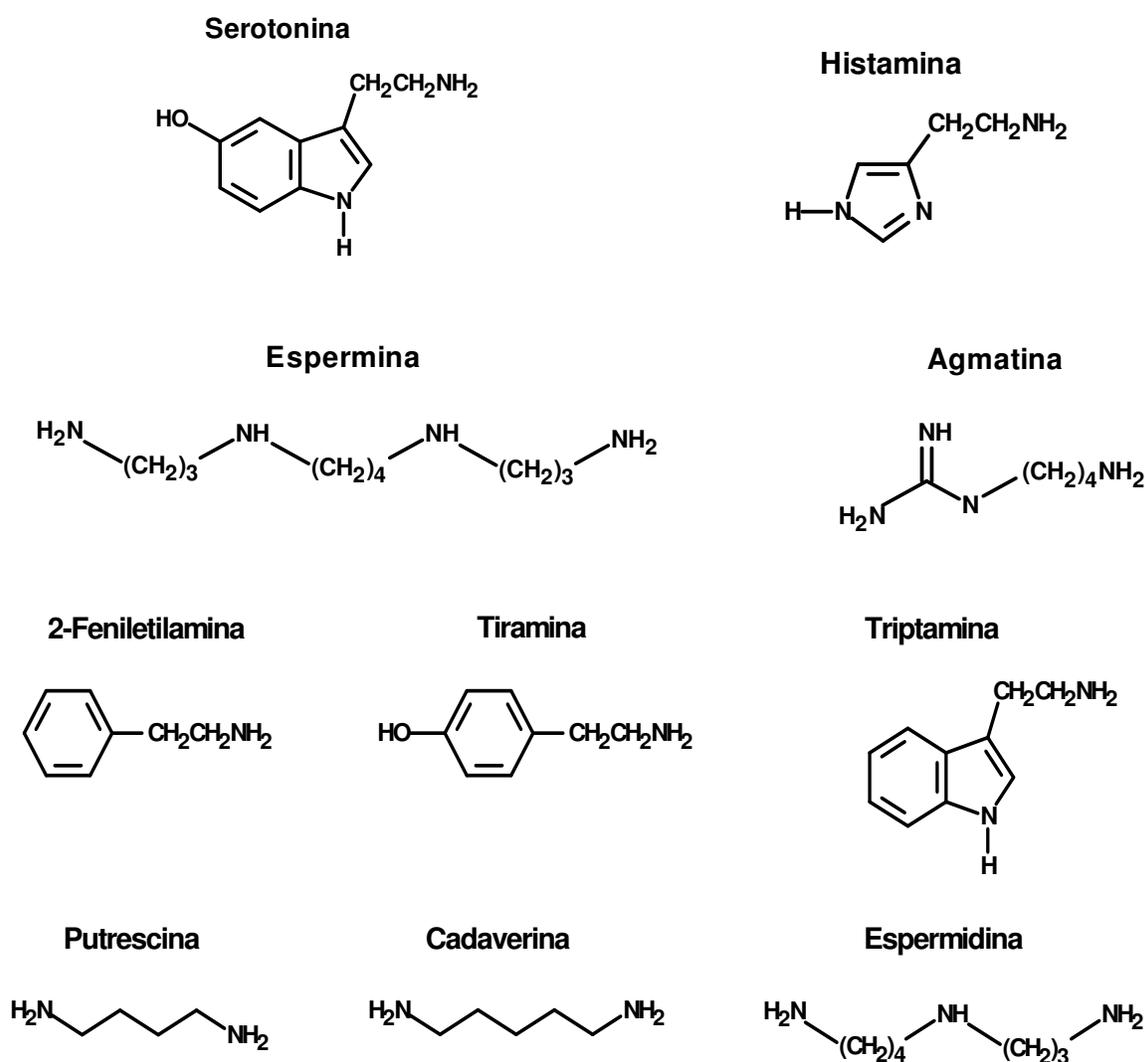
### **2.1 ASPECTOS GERAIS**

Aminas bioativas são compostos orgânicos nitrogenados, em que um, dois ou três átomos de hidrogênio da amônia foram substituídos por grupos alquila ou arila. São bases orgânicas alifáticas, alicíclicas ou heterocíclicas de baixo peso molecular que participam de processos metabólicos normais de animais, plantas e microrganismos (HALÁSZ et al., 1994; BARDÓCZ, 1995; SOUSADIAS & SMITH, 1995; SILLA-SANTOS, 1996).

A denominação das aminas bioativas é função dos aminoácidos precursores. A histamina origina-se da histidina, a tiramina da tirosina e a triptamina do triptofano. A cadaverina e a putrescina foram encontradas em produtos em fase de decomposição ou putrefação. Já a espermina e espermidina foram isoladas pela primeira vez no fluido seminal (LIMA & GLÓRIA, 1999).

As aminas bioativas podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina, da estrutura química, da via biossintética e da função que exercem (SMITH, 1980-81; BARDÓCZ, 1995). Quanto ao número de grupamentos

amina na molécula, têm-se as monoaminas (tiramina e feniletilamina), as diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e agmatina) e as poliaminas (espermidina, espermina e agmatina). Com relação à estrutura química as aminas podem ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) e heterocíclicas (histamina e triptamina e serotonina) e em função do grupo químico como catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), indolaminas (serotonina) e como imidazolaminas (histamina) (Figura 3).



**Figura 3** – Estruturas químicas de algumas aminas bioativas.

Levando-se em consideração a via biossintética, as aminas podem ser classificadas em biogênicas, quando são formadas pela descarboxilação de aminoácidos por enzimas microbianas (histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina), e em naturais, cuja formação ocorre *in situ* nas células à medida que são requeridas (putrescina, agmatina, espermina, espermidina e histamina) (BARDÓCZ, 1995).

Com relação às funções que exercem as aminas bioativas são classificadas em moduladoras e promotoras do crescimento (espermidina e espermina), por atuarem no crescimento e manutenção do metabolismo celular, e em vasoativas e neuroativas (tiramina, histamina e serotonina) devido ao seu efeito nos sistemas vascular e neural (BARDÓCZ, 1995).

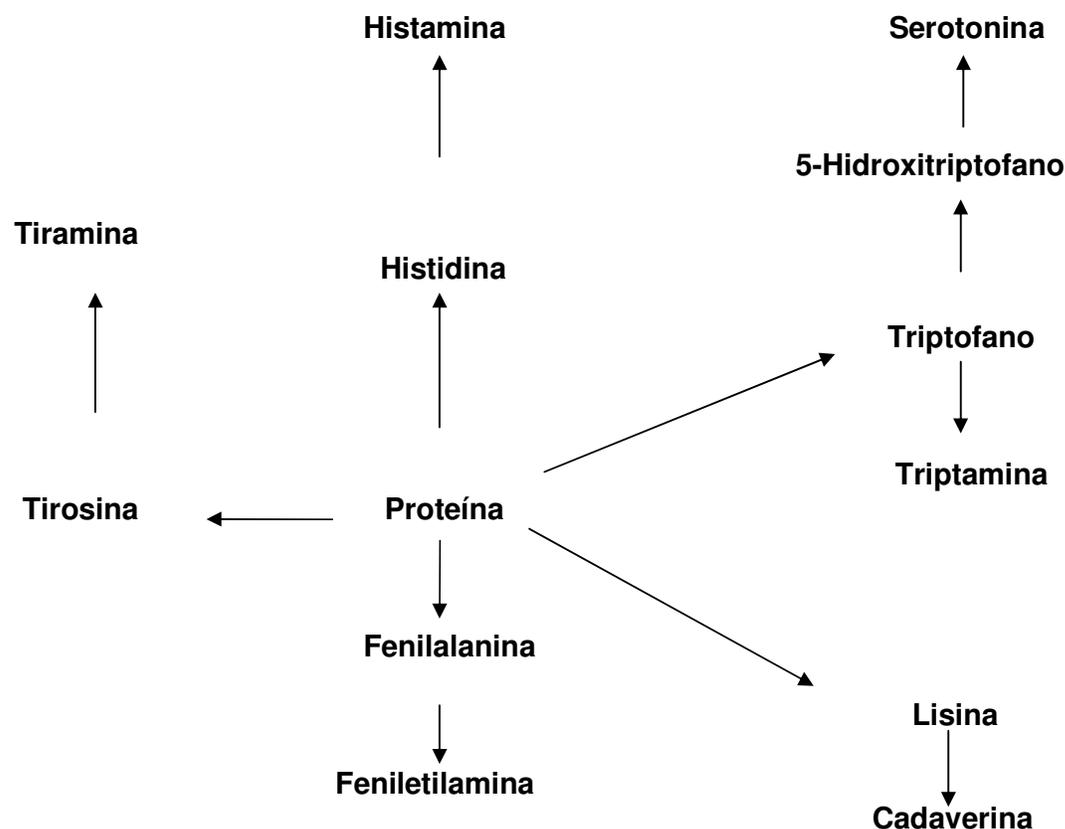
## 2.2 BIODOSSÍNTESE

A formação das aminas bioativas ocorre durante o metabolismo normal em todos os seres vivos. A principal via de formação é por meio da descarboxilação de aminoácidos, seja por hidrólise ou decomposição térmica de compostos nitrogenados (HALÁSZ et al., 1994; BARDÓCZ, 1995). Nos alimentos as aminas podem também ser produzidas pela quebra de aminoácidos, devido à ação de descarboxilases de origem microbiana, sendo que em algumas reações o cofator piridoxal fosfato é requerido (MAGA, 1978; CHANDER et al., 1989; EDMUNDS & EITENMILLER, 1992; HALÁSZ et al., 1994; SHALABY, 1996).

As aminas tiramina, histamina, triptamina, feniletilamina e cadaverina são formadas via descarboxilação dos aminoácidos tirosina, triptofano, histidina, fenilalanina e lisina (Figura 4) (HALÁSZ et al., 1994). Já na síntese da serotonina ou 5-hidroxitriptamina, o triptofano é convertido pela triptofano hidrolase em 5-hidroxitriptofano, que é descarboxilado pela aminoácido aromático descarboxilase (AADC) (NAGATSU, 1991).

A produção de aminas biogênicas resulta da presença de bactérias que são capazes de descarboxilar aminoácidos (SHALABY, 1996). Inúmeras espécies bacterianas são produtoras de aminas, principalmente representantes da família Enterobacteriaceae, particularmente os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella* e *Proteus* ao lado de espécies dos gêneros *Achromobacter*, *Lactobacillus*,

*Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Propionobacterium*, *Clostridium* (SHALABY, 1996; LIMA & GLÓRIA, 1999). *Enterococcus* e alguns lactobacilos apresentam grande capacidade de formação de tiramina (BOVER-CID & HOLZAPFEL, 1999).



**Figura 4** – Vias metabólicas para a formação de aminas biogênicas. Fonte: LIMA & GLÓRIA (1999).

Vários fatores podem influenciar a produção de aminas pelas bactérias. O pH do meio, a temperatura, a tensão de oxigênio, a presença de coenzimas e vitaminas, a concentração de aminoácidos livres e de carboidratos fermentáveis interferem na formação das aminas. Em meio ácido, pH 2,5 a 6,5, a produção de aminas é estimulada como um mecanismo de proteção da bactéria (LIMA & GLÓRIA, 1999), devido ao fato de que altas concentrações do íon  $H^+$  são prejudiciais ao microrganismo, fazendo com que este sintetize as enzimas descarboxilases (VOIG & EITENMILLER, 1977; HALÁSZ et al., 1994; SILLA-SANTOS, 1996). Como a formação das aminas

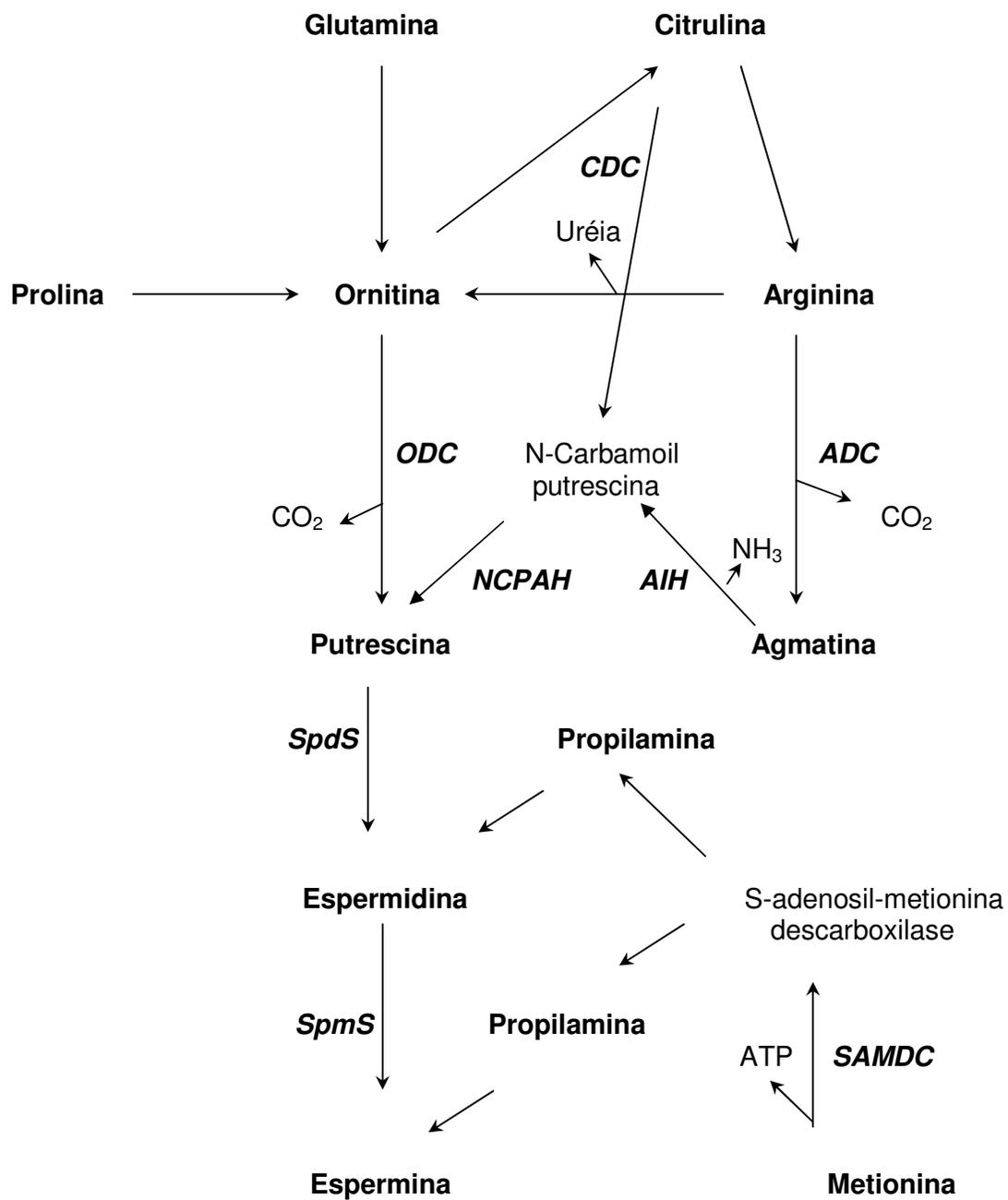
depende da ação de enzimas descarboxilantes, a temperatura interfere de forma significativa no processo. Em temperaturas inferiores a 30 °C as descarboxilases são mais ativas, a 40 °C são inativadas e na faixa de 0 a 10 °C a atividade dependerá da microbiota presente (HALÁSZ et al., 1994).

Os aminoácidos ornitina e arginina são os precursores das poliaminas, sendo a putrescina um composto intermediário obrigatório (Figura 5). Para formar a putrescina, a arginina é transformada em ornitina pela ação da enzima arginase e, em seguida, a ornitina sofre a ação da ornitina descarboxilase (ODC) formando a putrescina (HILLARY & PEGG, 2003). A via de formação da putrescina pode ser diferente entre os organismos vivos. Em animais e fungos é formada via descarboxilação da ornitina e em bactérias pode ser pela descarboxilação da arginina formando agmatina. Já em vegetais a formação pode ocorrer tanto via agmatina quanto via ornitina. Existe uma via adicional para a formação da putrescina a partir da citrulina (SMITH, 1985; FLORES et al., 1989; BARDOCZ, 1995; WALTERS, 2003).

Espermidina e espermina são formadas pela adição de um grupo aminopropil à putrescina e à espermidina, respectivamente. Estas reações são catalisadas pelas aminopropiltransferases espermidina-sintetase (EpdS, EC 2.5.1.16) e espermina-sintetase (EpmS, EC 2.5.1.22). O grupo aminopropil é derivado da metionina via S-adenosil-L-metionina (SAM) numa reação catalisada pela enzima SAMDC (EC 4.1.1.50). A 5'-metiltioadenosina, resultante da liberação do grupo aminopropil pela SAM é convertido em metilribose e em metionina, reciclando o grupo  $-SCH_3$  que garante a síntese de poliaminas (SMITH, 1985; FLORES et al., 1989; WALTERS, 2003).

A biossíntese de poliaminas é muito bem controlada por mecanismos complexos que previnem sua superprodução ou sua deficiência (OKAMOTO et al., 1997). As concentrações intracelulares de poliaminas são reguladas pela síntese *de novo*, conversão, degradação e também pela captação de poliaminas extracelulares. Os mecanismos reguladores preliminares são a síntese *de novo* pela via ODC, reconversão das poliaminas via rota de interconversão (espermina/espermidina N1-acetiltransferase e poliamina oxidase) e degradação oxidativa das poliaminas (DORHOUT et al., 1996; LÖSER, 2000).

Apesar de sua formação intracelular, a alimentação e as bactérias do trato intestinal também são uma importante fonte de poliaminas (LÖSER, 2000).



**Figura 5 – Vias para a síntese de poliaminas.** Fonte (GLÓRIA, 2003).  
 ODC= ornitina descarboxilase; ADC= arginina descarboxilase; CDC= citrulina descarboxilase; AIH= agmatina imino-hidrolase; SpmS= Espermina sintase; SpdS= Espermidina sintase; SAMDC= S-adenosilmetionina descarboxilase.

## 2.3 FUNÇÕES

Aminas bioativas participam de importantes processos fisiológicos no homem, animais e plantas: aceleram o processo metabólico ou a conversão enzimática; atuam como hormônios ou fatores de crescimento e são biomoduladoras (SMITH, 1980-81; NAGATSU, 1991; STRATTON et al., 1991). As aminas atuam como reserva de nitrogênio, substâncias naturais de crescimento dos microrganismos e vegetais e desenvolvem papel de neurotransmissores e de precursores de hormônios nas formas de vida mais evoluídas (NAGATSU, 1991). As poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) são indispensáveis às células vivas. De acordo com BARDÓCZ et al. (1993) e SILLAS-SANTOS (1996), as poliaminas são essenciais ao crescimento e metabolismo celular, sendo rapidamente requeridas em tecidos em crescimento. Interagem eletrostaticamente com várias macromoléculas, especialmente DNA, RNA e proteínas, estando envolvidas no estímulo e regulação de suas sínteses (LÖSER, 2000).

SOUSADIAS & SMITH (1995) e JEEVANANDAM et al. (1997), considerando o envolvimento das poliaminas nas etapas de síntese de DNA, RNA e proteínas, proliferação e crescimento celular, atuação hormonal e estabilização das funções dos cromossomos e membranas, constataram que as poliaminas agiam como promotoras de crescimento em concentrações não tóxicas.

De acordo com SILLA-SANTOS (1996) as poliaminas espermina, espermidina e a diamina putrescina inibem a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados e este efeito antioxidante é correlacionado com o grupo  $\text{NH}_3^+$  presente na estrutura química das poliaminas. Segundo DROLET et al. (1986) e BARDOCZ (1995), a espermina e a espermidina são eficientes estabilizadores de radicais livres *in vitro*. Desta forma, podem inibir a peroxidação lipídica e prevenir a senescência em vegetais. O radical hidroxil produzido pela reação de Fenton foi eficientemente inibido por espermina e espermidina.

As poliaminas interagem com componentes da membrana celular carregados negativamente, tais como fosfolípidos, sendo importantes na permeabilidade e estabilidade da membrana (DROLET et al., 1986; BARDOCZ, 1995; SILLA-SANTOS, 1996; LÖSER, 2000).

Diversos efeitos das poliaminas têm sido identificados na replicação celular, dentre eles, iniciação e controle da translação, estímulo da associação da subunidade

ribossomal, aumento da síntese de ácidos nucléicos e redução na taxa de degradação do RNA (BARDOCZ et al., 1993; 1995). Estimulam também a diferenciação celular e modulam vários sistemas de mensagem intracelular (LÖSER, 2000). A função mais importante das poliaminas, tanto em vegetais quanto em animais, que não pode ser feita por nenhuma outra molécula carregada positivamente, é atuar como segundo mensageiro, mediando a ação de todos os hormônios e fatores de crescimento conhecidos (BARDOCZ, 1995).

Pesquisas com plantas superiores sugerem que as poliaminas putrescina, espermidina e espermina estão naturalmente presentes em frutas e hortaliças. Desempenham um papel crítico em vários processos, dentre eles, formação das raízes, embriogênese somática, controle do pH intracelular, desenvolvimento de flores e frutos, resposta à condições de estresse como deficiência de potássio, choque osmótico, seca e infecções. Elas são também importantes na síntese de metabólitos secundários de interesse biológico como alcalóides (SMITH, 1985; FLORES et al., 1989; OHTA et al., 1993; WALTERS, 2003; MORET et al., 2005).

As poliaminas vêm sendo reportadas como agentes anti-senescência em frutas, tendo efeitos no aumento da firmeza, no retardamento das alterações na cor da fruta, na inibição da peroxidação lipídica e na diminuição nas taxas de emissão de etileno e respiração (PANDEY et al., 2000; VALERO et al., 2002). Estão associadas com a parede e com a membrana celular. Elas modulam a pectinesterase e se ligam à pectina, retardando o amolecimento do fruto e sua senescência (KRAMER et al., 1991). O efeito de enrijecimento promovido pelas poliaminas é similar ao efeito do cloreto de cálcio, e pode ser devido à habilidade das poliaminas de ligarem-se à parede celular e membranas celulares estabilizando-as ou tornando a parede celular menos acessível a enzimas que amolecem membranas (KRAMER et al., 1991; PONAPPA et al., 1993). Existe também a hipótese de que as poliaminas inibem as próprias enzimas que atacam a parede celular. KRAMER et al. (1991) demonstraram efeitos inibitórios das poliaminas sobre as poligalacturonases de maçãs. As propriedades anti-radicaís livres das poliaminas têm sido sugeridas como protetoras das membranas contra a peroxidação lipídica e estresse oxidativo (GONZALEZ-AGUIAR et al., 1998).

Em frutas, mudanças notáveis na biossíntese das poliaminas têm sido observadas em resposta a uma variedade de estresses, incluindo injúria pelo frio, danos mecânicos, deficiência de minerais, tensão de CO<sub>2</sub> e variações de temperatura e altitude (VALERO et al., 2002).

Estudos têm demonstrado que a putrescina pode acumular em plantas com deficiência de minerais durante o crescimento (SMITH, 1985). A deficiência de potássio e magnésio causou o acúmulo de putrescina em rabanete, ervilha, feijão e espinafre (BASSO & SMITH, 1974).

Em vegetais, a feniletilamina atua como substância protetora, repelente de insetos predadores e animais forrageiros e, por esta razão, pode ter significância na agricultura (SMITH, 1977). As aminas serotonina, triptamina, histamina, agmatina e cadaverina estão presentes em frutas. Estas aminas também tem um papel protetor contra predadores (BOUCHEREAU et al., 2000). Algumas aminas são importantes na síntese de metabólicos secundários, como nicotina e outros alcalóides. Triptamina e feniletilamina são precursores de substâncias de crescimento. Triptamina é precursora do ácido indolacético e dos alcalóides  $\beta$ -carbonila, hormônios de crescimento da planta (COUTTS et al., 1986).

## 2.4 CATABOLISMO

As aminas ingeridas são rapidamente metabolizadas no organismo por conjugação ou mediante reações de oxidação, por enzimas como a MAO (monoaminoxidase), DAO (diaminoxidase) e PAO (poliaminoxidase) (BARDOCZ, 1995). A degradação das poliaminas consiste em uma deaminação oxidativa do grupo amino primário da poliamina e seus derivados N-acetil. Esta reação é catalisada por enzimas aminoxidases (diaminoxidase e poliaminoxidase) em presença de íons cobre. Os aldeídos formados são oxidados pela aldeído-desidrogenase formando um composto ácido. A putrescina é convertida em ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), a espermidina em ácido 2-espermídico e a espermina em ácido 1-espermico. Em mamíferos a degradação das poliaminas também envolve a produção de 1,3-diaminopropano (DAP), N-acetil-1,3-DAP,  $\beta$ -alanina, 2-hidroxi-putrescina e álcoois (TETI et al., 2002). A ação da DAO sobre a putrescina produz 1-pirrolina, peróxido de hidrogênio e amônia. A degradação da espermidina e espermina pela PAO produz pirrolina, diaminopropano (DAP) e peróxido de hidrogênio. A histamina é convertida em metilhistamina pela ação da histamina N-metil-transferase (HMT) que, em seguida, é oxidada pela MAO. A histamina também pode ser desaminada pela DAO. A tiramina é oxidada pela MAO (LIMA & GLÓRIA, 1999).

## 2.5 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

Conforme relatado anteriormente as aminas presentes nos alimentos são metabolizadas no organismo por enzimas aminoxidasas, como as monoaminoxidasas (MAO), as diaminoxidasas (DAO) e poliaminoxidasas (PAO). Entretanto, a ingestão de grandes quantidades de aminas pode representar um perigo à saúde, podendo causar intoxicações em situações em que as aminoxidasas forem inibidas, ocorrerem efeitos sinérgicos ou potencializadores ou se houver deficiência genética (HALÁSZ et al., 1994).

A intoxicação alimentar mais freqüente causada por aminas envolve a histamina. Nestes casos tem sido observada diminuição da pressão sanguínea devido a vasodilatação, rubor da face e pescoço, cefaléia intensa e contínua, palpitação cardíaca, tontura, sensação de ardor na boca e garganta e dificuldade de engolir (SILVA & GLÓRIA, 2002). A ocorrência de um ou mais sintomas resulta da ingestão de alimentos que contêm elevados teores de histamina. Os surtos de intoxicação por histamina são relatados em maior freqüência após ingestão de peixes e queijos tendo sido também relatados casos de intoxicação após consumo de fígado e moela de frangos. De acordo com TAYLOR (1986), vários surtos de intoxicação têm sido registrados nos Estados Unidos, Japão, Inglaterra, França, Dinamarca, Canadá, Nova Zelândia, sendo mais implicados os peixes das famílias *Scombridae* (atum, bonito, cavala, listrado), *Scomberesocidae* (tiravira), *Clupeidae* (arenque, sardinha), dentre outros. Entretanto, os dados disponíveis são escassos e possivelmente não retratam a prevalência real.

Os efeitos toxicológicos da histamina dependem da concentração de histamina ingerida, atividade da aminoxidase e fisiologia intestinal individual. De acordo com STRATTON et al. (1991) e LIMA & GLÓRIA (1999), o efeito de algumas aminas no organismo pode ainda ser potencializado pela presença concomitante de outras aminas como putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina, feniletilamina, espermidina e espermina. Segundo CHU & BJELDANES (1983), a putrescina e a cadaverina podem potencializar a toxicidade da histamina por inibir as enzimas DAO e histaminametil-transferase (HMT), aumentando assim seu transporte através da parede gastrintestinal. A presença destas substâncias potencializadoras pode explicar porque, em alguns casos, peixes deteriorados são mais tóxicos que a mesma quantidade de histamina

quando ingerida sozinha (TAYLOR, 1986; SOARES & GLÓRIA, 1994; LIMA & GLÓRIA, 1999).

A tiramina é o segundo tipo de amina envolvida em intoxicações alimentares. Em concentrações elevadas pode causar dor de cabeça, enxaqueca, hemorragia intracraniana, febre, vômito, transpiração e aumento da pressão sangüínea (LIMA & GLÓRIA, 1999; SILVA & GLÓRIA, 2002). Farmacologicamente a tiramina atua através da liberação da noradrenalina estocada causando um aumento da pressão sanguínea. Os medicamentos inibidores da MAO aumentam a concentração da noradrenalina nas terminações nervosas potencializando a ação da tiramina.

Tem sido atribuído ao elevado teor de serotonina nos alimentos o aparecimento de transtornos intestinais, fibrose do miocárdio e enxaqueca (LIMA & GLÓRIA, 1999). A espermina possui toxicidade renal, e influi na coagulação e pressão sangüínea, na pulsação e na respiração (FUZIKAWA et al., 1999; LIMA & GLÓRIA, 1999).

A diamina putrescina e as poliaminas espermina e espermidina podem acelerar o crescimento de tumores. Assim sendo, recomenda-se uma dieta com teores reduzidos destas substâncias para pacientes em tratamento contra o câncer de forma a diminuir o crescimento e progresso do tumor (BARDÓCZ, 1995; LIMA & GLÓRIA, 1999). A putrescina, cadaverina, agmatina, espermidina e espermina podem também reagir com nitrito sob condições ácidas formando nitrosaminas heterocíclicas, nitrosopirrolidina e nitrosopiperidina (SILLAS-SANTOS, 1996). Sabe-se que as nitrosaminas são compostos cancerígenos, assim é importante prevenir o acúmulo de aminas capazes de formar nitrosaminas em alimentos (HALÁSZ et al., 1994; GLÓRIA & IZQUIERDO-PULIDO, 1999; LIMA & GLÓRIA, 1999).

A determinação da dose tóxica das aminas é difícil de ser estabelecida, pois depende das características individuais e da presença de outras aminas. Foi sugerido um limite para histamina de 10 mg/100 g de alimento em geral e de 2 mg/L de bebida alcoólica. Valores 3 mg/100 g para feniletilamina tem sido sugerido como tóxicos por HALÁSZ et al. (1994).

A dose tóxica da tiramina é de 10 a 80 mg/100 g de alimento. Entretanto, a ingestão de alimentos contendo 6 mg de tiramina pode causar enxaqueca e de 10 a 25 mg pode provocar crise hipertensiva e hemorragia intracraniano em indivíduos em tratamento com inibidores da MAO (HALÁSZ et al., 1994; LIMA & GLÓRIA, 1999).

## 2.6 AMINAS LIVRES EM CAFÉ

Existem poucos estudos sobre a presença de aminos bioativas em grãos de café verde e torrado, sendo que os dados disponíveis referem-se em sua maioria ao café da espécie *Coffea arabica*. Apenas dois trabalhos disponibilizaram dados sobre o perfil e teores de aminos bioativas em amostras de cafés da espécie *Coffea canephora* var. Robusta. CASAL et al. (2004) determinaram os teores de aminos bioativas livres em amostras de café robusta, cru e torrado, oriundas da África (Costa do Marfim, Uganda, Angola e Camerron) e Ásia (Vietnam e Índia). Já CASAL et al. (2005) avaliaram o efeito da torração nas poliaminas livres em amostras de café robusta oriundos apenas da Costa do Marfim. Não foram encontrados dados na literatura sobre o perfil e teores de aminos bioativas livres em amostras de café da espécie *Coffea canephora* (Robusta) de origem brasileira.

De acordo com as Tabelas 3 e 4, o perfil e os teores de aminos no café variou entre as diferentes amostras analisadas, ficando também evidente a influência do processo de torração na concentração das aminos no café.

**Tabela 3** - Teores de aminos bioativas livres em grãos de café arábica (cru e torrado)

Referência	Amostra	Teores de aminos bioativas (mg/100 g)						
		SPD	SPM	PUT	AGM	SRT	CAD	TIM
AMORIM et al. (1977)	Cru	1,56	0,81	4,26	—	—	—	—
	Torrado	nd	nd	0,2	—	—	—	—
CIRILO et al. (2003)	Cru	0,60	0,44	1,03	nd	1,13	nd	nd
	Torrado	0,12	nd	nd	0,12	0,16	nd	nd
CASAL et al. (2004)	Cru	0,9	0,55	4,79	nd	0,25	0,02	0,02
	Torrado	0,01	0,12	0,1	nd	0,23	nd	nd
OLIVEIRA (2004)	Cru	1,35	1,32	8,23	nd	nd	nd	nd
	Torrado	0,08	0,03	0,03	nd	nd	nd	nd
CASAL et al. (2005)	Cru	0,79	0,43	4,38	—	—	—	—
	Torrado	nd	nd	nd	—	—	—	—
VASCONCELOS et al. (2007)	Cru	2,01	2,29	7,65	nd	0,52	nd	nd
	Torrado	nd	nd	nd	nd	<0,37	nd	nd

nd - não detectado; — - não pesquisado; SPD: espermidina; SPM: espermina; PUT : putrescina; CAD: cadaverina; TIM: tiramina; SRT: serotonina; AGM: agmatina.

De acordo com CIRILO et al. (2003), o perfil e os teores de aminas em diferentes amostras de café verde podem variar com o tipo do café e condições de cultivo (tipo de solo, deficiência mineral, estresse e estágio de desenvolvimento da planta). A deficiência de potássio durante o desenvolvimento da planta causa acúmulo de putrescina nos grãos de café (CIRILO, 2001).

AMORIM et al. (1977) pesquisaram as aminas putrescina, espermidina e espermina em grãos de café arábica, bebidas mole e rio, antes e após o processo de torração a 240 °C por 10 (clara) e 12 minutos (escura). Nos grãos crus todas as três aminas pesquisadas foram detectadas, porém, após a torração por 10 minutos somente a putrescina foi detectada, sendo que nenhuma amina foi encontrada após 12 minutos de torração.

CIRILO et al. (2003) investigaram o perfil e teores de dez aminas bioativas em café verde e torrado da espécie arábica. Os grãos foram submetidos a dois graus de torração 300 °C por 6 minutos (americana) e 300 °C por 12 minutos (francesa). Nos grãos de café verde os autores encontraram as aminas putrescina, espermidina, espermina e serotonina, sendo esta última encontrada em maior concentração (1,13 mg/100 g). Após a torração, os teores de serotonina e espermidina diminuíram, sendo que a putrescina e a espermina não foram detectadas no café torrado. Um fato interessante observado neste trabalho foi a detecção de agmatina após 12 minutos de torração.

**Tabela 4** - Teores de aminas bioativas livres em grãos de café robusta (cru e torrado)

Referência	Amostra	Teores de aminas bioativas (mg/100 g)					
		SPD	SPM	PUT	SRT	CAD	TIM
CASAL et al. (2004)	Cru	0,83	0,60	1,11	0,21	0,04	0,31
	Torrado	0,01	0,18	0,13	0,33	nd	nd
CASAL et al. (2005)	Cru	0,74	0,43	1,43	—	—	—
	Torrado	nd	nd	nd	—	—	—

nd - não detectado; — não pesquisado; SPD: espermidina; SPM: espermina; PUT : putrescina; CAD: cadaverina; TIM: tiramina; SRT: serotonina; AGM: agmatina.

CASAL et al. (2004) avaliaram grãos de café arábica e robusta cru e torrado com relação aos teores de seis aminas bioativas livres (putrescina, cadaverina, serotonina, tiramina, espermidina e espermina). A putrescina foi a amina mais abundante em ambas as espécies, seguida da espermidina, espermina e serotonina. As aminas

cadaverina e tiramina foram detectadas em pequenas quantidades. Os teores de putrescina e tiramina foram significativamente diferentes entre as amostras de café arábica e robusta, sendo que a putrescina foi detectada em maior concentração no café arábica e a tiramina no café robusta. Os grãos de café foram submetidos ao processo de torração a 160-220 °C por 14 minutos. A torração alterou os teores das aminas, sendo que putrescina, cadaverina, tiramina, espermidina e espermina tiveram seus teores diminuídos. A serotonina manteve-se inalterada no café arábica, porém no café robusta os seus teores aumentaram com a torração.

CASAL et al. (2005) pesquisaram a presença de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) livres em amostras de café arábica e robusta. As amostras foram submetidas a diferentes graus de torração (140, 160, 180, 200, 220 e 240 °C) durante 15 minutos. A putrescina foi a amina mais abundante, seguida da espermidina e espermina, tanto no café arábica quanto no robusta crus. Durante a torração o comportamento das aminas foi semelhante com significativa redução em seus teores entre 180 e 240 °C. Entretanto, no café robusta a perda de putrescina iniciou-se a temperatura de 140 °C, enquanto que no arábica esta diferença nos teores foi observada somente a partir de 160 °C. A espermina apresentou um pequeno aumento em sua concentração na temperatura de 140 °C em relação ao teor no grão cru. Este fato sugere que esta amina foi liberada de sua forma conjugada, porém mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

A presença de aminas livres também foi avaliada em amostras de grãos de café classificados como bebidas de alta qualidade (bebida mole) e de baixa qualidade (bebida rio) (Tabela 5). AMORIM et al. (1977) pesquisaram apenas as poliaminas, espermidina e espermina e a diamina putrescina, tendo encontrado teores semelhantes destas aminas para os dois tipos de grãos avaliados. OLIVEIRA et al. (2005) detectaram cinco das dez aminas pesquisadas: espermidina, espermina, putrescina, histamina e triptamina. Os teores totais das aminas variaram entre as amostras de bebida mole e rio. A putrescina foi encontrada em teores significativamente maiores nos grãos de bebida rio. Histamina e triptamina foram detectadas em maiores quantidades nas amostras de café verde de baixa qualidade (bebida rio). Assim como ocorreram nos demais estudos, após a torração, houve diminuição significativa nos teores de aminas.

**Tabela 5** - Teores de aminas bioativas livres em grãos de café arabica (cru e torrado) classificados como bebida mole e rio

Referência	Amostra	Teores de aminas bioativas (mg/100 g)					
		SPD	SPM	PUT	HIM	TRM	
AMORIM et al. (1977)	Mole	Cru	1,63	0,83	4,35	—	—
		Torrado	nd	nd	0,18	—	—
	Rio	Cru	1,50	0,80	4,18	—	—
		Torrado	nd	nd	0,23	—	—
OLIVEIRA (2004)	Mole	Cru	1,13	1,16	6,62	0,04	nd
		Torrado	0,11	nd	nd	nd	nd
	Rio	Cru	1,36	1,37	9,85	0,15	0,30
		Torrado	0,05	nd	nd	nd	nd

nd - não detectado; --- não pesquisado; SPD: espermidina; SPM: espermina; PUT : putrescina; HIM: histamina; TRM: triptamina.

VASCONCELOS et al. (2007) submetem grãos de café, defeituosos e sadios, a diferentes graus de torração e os avaliou quanto aos teores de aminas livres. Os tipos de grãos analisados foram preto, verde, ardido, pva (mistura: preto, verde e ardido) e sadio, sendo utilizados os estágios de torração claro (200 °C/30 min), médio (200 °C/1 h) e escuro (200 °C/2 h). O perfil e teores das aminas encontradas nos grãos de café sadios (cru e torrado) estão apresentados na Tabela 3. Nos grãos defeituosos, além das aminas encontradas nos grãos sadios (espermidina, espermina, serotonina e putrescina), foram encontradas cadaverina, histamina e triptamina, porém com algumas variações entres os mesmos (Tabela 6).

A amina predominante em todos os tipos de grãos foi a putrescina. Dentre as três aminas encontradas apenas nos grãos defeituosos, a histamina e triptamina foram predominantes nos grãos defeituosos verdes. A cadaverina só foi encontrada nos grãos pretos, porém em baixas quantidades. A triptamina não foi encontrada nas amostras de grãos pretos. Nos grãos torrados, apenas a serotonina estava presente em baixas concentrações nas amostras submetidas a torração clara. As demais aminas foram degradadas durante os diferentes processos de torração.

Até o presente momento não foram encontrados dados na literatura sobre o perfil e teores de aminas bioativas em café solúvel. Em estudos preliminares realizados no laboratório de Bioquímica de Alimentos, FAFAR, UFMG, foram encontradas as aminas espermidina, espermina, putrescina, serotonina, cadaverina,

tiramina, histamina, agmatina e feniletilamina. Os teores totais variaram de 0,04 a 3,65 mg/100 g, sendo a serotonina predominante (46 %) seguida da cadaverina (17 %), espermidina (10 %), tiramina (8 %), putrescina (5 %), histamina e espermina (4 %) e agmatina e feniletilamina (3 %) (SILVEIRA & GLÓRIA, 2004).

**Tabela 6** - Teores de aminas bioativas livres em grãos de café arabica (cru e torrado) classificados como preto, verde, ardido e mistura pva

Amostra		Teores de aminas bioativas (mg/100 g)						
		SPD	SPM	PUT	SRT	CAD	HIM	TRM
Preto	Cru	0,42	<0,37	0,88	0,39	<0,37	0,44	nd
	Torrado	nd	nd	nd	<0,37	nd	nd	nd
Verde	Cru	1,59	1,89	5,39	0,42	nd	0,69	0,57
	Torrado	nd	nd	nd	<0,37	nd	nd	nd
Ardido	Cru	1,24	1,74	4,21	nd	nd	1,02	<0,37
	Torrado	nd	nd	nd	0,52	nd	nd	nd
PVA	Cru	1,80	1,77	6,52	<0,37	nd	0,64	0,46
	Torrado	nd	nd	nd	<0,37	nd	nd	nd

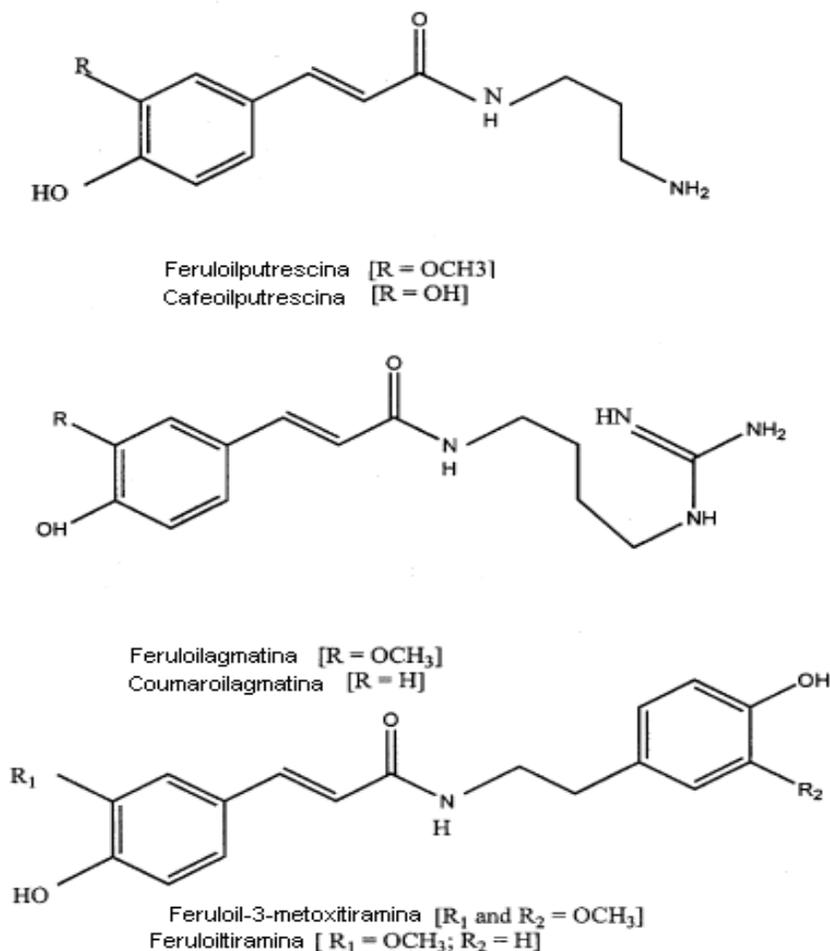
Fonte: VASCONCELOS (2005); nd - não detectado; SPD: espermidina; SPM: espermina; PUT: putrescina; SRT: serotonina; CAD: cadaverina; HIM: histamina; TRM: triptamina.

No processo de produção do café solúvel, os grãos de café são submetidos à torração. Desta forma o perfil e teores de aminas no café solúvel deveria ser semelhante ao do café torrado. Os resultados obtidos nos estudos preliminares demonstraram a presença de algumas aminas que não haviam sido detectadas nos estudos com café torrado, como tiramina e histamina. Estas aminas têm sido descritas na literatura como possíveis causadoras de efeitos tóxicos no homem. Além disto, outras podem afetar a qualidade sensorial da bebida café. Assim sendo, mais estudos são necessários para traçar o perfil das aminas em café solúvel verificando a possibilidade de minimizar os seus teores no produto final a fim de garantir uma melhor qualidade e maior segurança ao consumidor.

### 3 AMINAS BIOATIVAS CONJUGADAS

#### 3.1 ASPECTOS GERAIS

As aminas estão presentes nas plantas na forma livre ou conjugada a moléculas de baixo peso molecular (ácidos fenólicos) ou a macromoléculas (proteínas) (RODRIGUEZ et al., 2000; FONTANIELLA et al., 2001; FONTANIELLA et al., 2003). A conjugação aos ácidos fenólicos consiste em uma ligação covalente entre o grupo amina e o grupo carboxílico dos ácidos hidroxicinâmicos como os ácidos p-cumárico, ferúlico e caféico (FONTANIELLA et al., 2001). O resultado desta conjugação é conhecido como amidas de ácidos hidroxicinâmicos (HCAAs) (Figura 6) (WALTERS, 2003).



**Figura 6** – Estruturas químicas de algumas poliaminas conjugadas (amidas de ácidos hidroxicinâmicos (HCAAs)).

As poliaminas são normalmente conjugadas com ácidos hidroxicinâmicos como p-cumárico, ferúlico e caféico (MARTIN-TANGUY, 1997). As HCAAs básicas constituídas por aminas alifáticas como a putrescina, espermidina e espermina são hidrossolúveis enquanto que as HCAAs neutras, aquelas constituídas por aminas aromáticas como a tiramina, octopamina e triptamina, são insolúveis em água (FACCHINI et al., 2002).

Além das poliaminas outras aminas têm sido encontradas conjugadas aos ácidos fenólicos como a tiramina, cadaverina, serotonina, octopamina, triptamina, dopamina e noradrenalina (CASAL et al., 2004; KING & CALHOUN, 2005; KANG & BACK, 2006; LY et al., 2008).

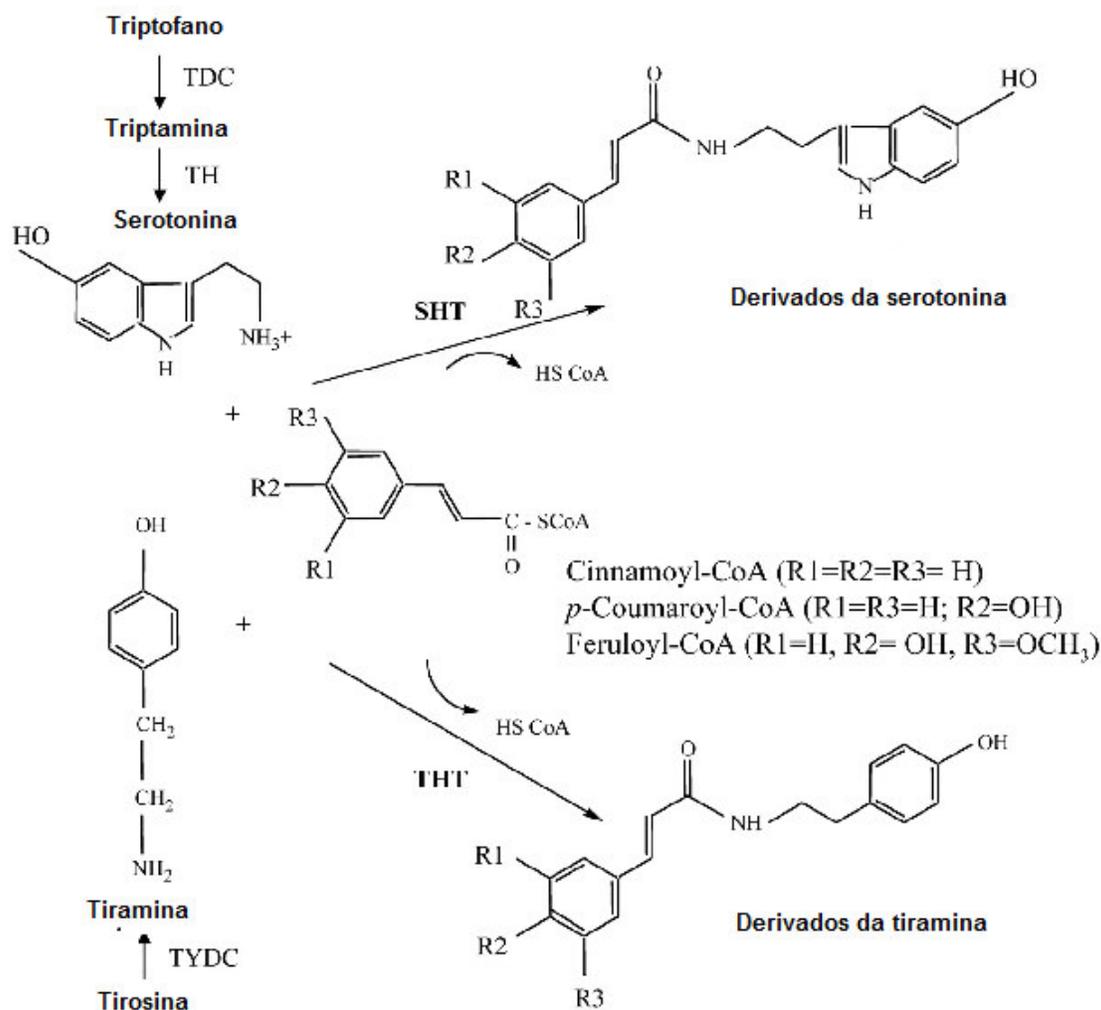
### **3.2 FORMAÇÃO**

Em plantas, as poliaminas são comumente conjugadas com ácidos hidroxicinâmicos, sendo que a proporção entre as formas livre e conjugada varia muito entre as diferentes espécies de plantas (TIBURCIO et al., 1997; BAGNI & TASSONI, 2001). A conjugação se dá por meio da formação de uma ligação amida, na qual ésteres de coenzima A (CoA) fornecem o grupo carboxil ativado. A putrescina e a espermidina são conjugadas por transferases, que diferem em sua especificidade para os derivados hidroxicinamoil-CoA. Desta forma, a enzima putrescina hidroxicinamoil transferase (PHT; EC 2.3.1. -) catalisa a transferência de ácidos hidroxicinâmicos entre a CoA e a putrescina. Assim, a reação entre cafeoil-CoA e a putrescina produz uma amida do ácido hidroxicinâmico denominada cafeoilputrescina (WALTERS, 2003). A putrescina pode formar monômeros ácido solúveis ou dímeros ácido insolúveis com os ácidos cumárico, caféico e ferúlico. Segundo BAGNI & TASSONI (2001) as poliaminas também podem se ligar a alguns componentes da parede celular, como a hemicelulose e a lignina.

De acordo com MARTIN-TANGUY et al. (1978), as poliaminas conjugadas com ácidos fenólicos estão presentes em um grande número de famílias de plantas, sendo o principal constituinte fenólico de órgãos reprodutivos e sementes de aproximadamente 20 espécies de plantas. A conjugação entre poliaminas e ácidos fenólicos tem sido observada em muitas plantas com flores (HENNION & TANGUY,

1999; FONTANIELLA et al., 2001). Estes compostos são acumulados após a indução floral, no ápice da floração (FONTANIELLA et al., 2001).

As aminas aromáticas como a tiramina, triptamina, serotonina e dopamina são conjugadas aos ácidos hidróxicinâmicos por meio da reação de condensação com hidroxicinamoil-CoA tioéster, que podem ser a cinamoil-CoA, *p*-cumaroil-CoA, cafeoil-CoA, feruloil-CoA e sinapoil-CoA. A biossíntese da tiramina conjugada é catalizada pela enzima tiramina-*N*-hidroxicinamoiltransferase (THT; EC 2.3.1.110) e a conjugação da serotonina é catalizada pela enzima serotonina-*N*-hidroxicinamoiltransferase (SHT) (Figura 7) (KANG et al., 2006).



**Figura 7** – Esquema da biossíntese da tiramina e serotonina conjugadas. (Fonte: KANG et al., 2006). THT = tiramina-*N*-hidroxicinamoiltransferase; SHT = serotonina-*N*-hidroxicinamoiltransferase.

### 3.3 RELEVÂNCIA FISIOLÓGICA

Muitos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de demonstrar o envolvimento direto das poliaminas conjugadas em diferentes funções biológicas em plantas, animais e seres humanos. As HCAAs têm sido associadas a processos de crescimento e desenvolvimento de plantas e iniciação da floração. Antes da floração as aminas conjugadas estão presentes em elevadas concentrações nas folhas das plantas. Durante a floração estas aminas desaparecem das folhas e migram para as flores se acumulando nesses órgãos (MARTIN-TANGUY, 1997). Após a fertilização ocorre uma elevação da concentração de aminas conjugadas nas sementes, que decresce com a germinação (FACCHINI et al., 2002).

Alguns estudos têm sugerido que as amidas de ácidos hidroxicinâmicos desempenham importante papel no mecanismo de defesa das plantas contra patógenos (SEN et al., 1994; WALTERS, 2003). De acordo com HENNION & TANGUY (1999), o aumento na concentração de aminas conjugadas em folhas de plantas é devido à presença de infecções virais e fúngicas, bem como, às mudanças ambientais severas como deficiência de minerais, hipóxia e poluentes ambientais.

LEGAZ et al. (1998) estudaram a relação entre a presença das poliaminas conjugadas e a sensibilidade da cana de açúcar a um tipo de infecção por fungo e observaram um aumento na concentração das poliaminas conjugadas ácido solúveis na cana de açúcar contaminada. As amidas conjugadas entre ácidos fenólicos e poliaminas têm sido descritas como fitoalexinas, que são sintetizadas por plantas superiores em resposta a infecções por vírus e fungos (FONTANIELLA et al., 2003). Segundo SEN et al. (1994) as poliaminas conjugadas aos ácidos fenólicos fortalecem a parede celular de alguns cereais contribuindo com o mecanismo de resistência ao ataque de insetos.

Um outro papel relevante das aminas conjugadas se refere à sua atividade antimicrobiana. YINGYONGNARONGKUL et al. (2006) sintetizaram amidas de ácidos hidroxicinâmicos e testaram sua atividade antimicrobiana frente a uma cepa de *Staphylococcus aureus* metilicina e vancomicina resistentes. Os autores demonstraram que a dihidrocafeoilputrescina e seus análogos apresentaram atividade antimicrobiana maior que os antibióticos vancina e a oxacilina frente a cepas de estafilococcus testadas.

A capacidade das HCAAs em inibir a produção de aflatoxina pelo *Aspergillus flavus* também foi testada por MELLON & MOREAU (2004). Os autores testaram uma mistura de diferuloilputrescina e *p*-cumaroilferuloilputrescina (85:15) e evidenciaram um nível de inibição de 93% da produção de aflatoxina, porém estes compostos não inibiram o crescimento do fungo.

Alguns estudos têm reportado as HCAAs como importante classe de compostos antioxidantes e agentes quimioterápicos (NAGATSU et al., 2000; PARK & SCHOENE, 2002). SON & LEWIS (2002) avaliaram a capacidade das amidas do ácido caféico em seqüestrar radicais livres e sua atividade antioxidante e concluíram que a atividade antioxidante destes compostos está relacionada à sua estrutura. As formas conjugadas do ácido caféico, como cafeoilfeniletilamina, cafeoiltiramina e cafeoldopamina, apresentaram maior atividade antioxidante. A atividade antioxidante das poliaminas também foi estudada por CHOI et al. (2007), que evidenciaram elevada atividade antioxidante dos compostos *N*-dicumaroilputrescina, *N,N*-diferuloilputrescina, *p*-cumaroil-*N*-feruloilputrescina. Estes autores também evidenciaram uma forte atividade antimelanogênica destes compostos, sugerindo que os mesmos poderiam ser utilizados como agentes antioxidantes naturais e agentes protetores da pele.

A capacidade das aminas conjugadas em inibir a síntese de melanina foi estudada por OKOMBI et al. (2006). Os autores avaliaram a atividade biológica de algumas HCAAs sobre os melanócitos humanos e evidenciaram que a *trans-N*-cafeoiltiramina, *N*-dihidrocafeoiltiramina e *trans-N*-dihidro-*p*-hidroxicinamoiltiramina apresentaram maior capacidade de inibição da formação de melanina.

O efeito anticolesterolêmico das aminas conjugadas também tem sido demonstrado. LEE et al. (2004) sintetizaram amidas do ácido hidroxicinâmico e testaram seu efeito inibidor na oxidação do colesterol LDL, sobre a atividade da acyl-CoA:colesterol acyltransferase-1 e -2 e sobre a diminuição do tamanho das partículas de HDL. Os autores concluíram que as aminas conjugadas possuem atividade antiaterosclerótica com forte inibição da oxidação do LDL, inibição do acúmulo de colesterol celular e rearranjo das partículas de HDL. KOYAMA et al. (2006) reportaram o efeito atenuante da *p*-cumaroilserotonina e da feruloilserotonina no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em ratos .

### 3.4 AMINAS CONJUGADAS EM CAFÉ

As aminos podem estar presentes nas plantas na forma livre ou conjugada. A maioria dos trabalhos descritos na literatura se refere às aminos livres (AMORIM et al., 1977; CIRILO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005, VASCONCELOS et al., 2007). Entretanto, recentemente, CASAL et al. (2004; 2005) relataram também a presença das aminos conjugadas no café.

Na tabela 7 estão apresentados o perfil e os teores de aminos bioativas conjugadas ácido solúveis (AS) e ácido insolúveis (AI) detectadas em amostras de café arábica e robusta. De acordo com os dados apresentados por CASAL et al. (2004), a putrescina foi a amina conjugada predominante em ambas as espécies de cafés analisadas, seguida da espermidina, espermina e serotonina. O café robusta apresentou maiores teores de tiramina conjugada em relação ao café arábica.

**Tabela 7** - Teores de aminos bioativas conjugadas ácido solúveis (AS) e ácido insolúveis (AI) em grãos crus de café arábica e robusta

Referência	Amostra	Teores de aminos bioativas (mg/100 g)											
		SPD		SPM		PUT		SRT		CAD		TIM	
		AS	AI	AS	AI	AS	AI	AS	AI	AS	AI	AS	AI
CASAL et al.	Arábica	0,35	0,05	0,20	0,58	0,37	0,29	0,08	nd	0,03	0,01	0,02	0,04
	Robusta	0,26	0,04	0,36	0,52	0,32	0,06	0,12	nd	0,04	0,01	0,24	0,09
2005	Arábica	0,10	0,04	0,34	0,14	0,39	0,17	—	—	—	—	—	—
	Robusta	0,12	0,04	0,30	0,31	0,26	0,13	—	—	—	—	—	—

nd - não detectado; --- não pesquisado; PUT : putrescina; CAD: cadaverina; TIM: tiramina; SRT: serotonina; AGM: agmatina; SPD: espermidina; SPM: espermina; AS: ácido solúveis; AI: ácido insolúveis.

Nos dados apresentados por CASAL et al. (2005), os teores de putrescina na forma conjugada (AS + AI) foram predominantes no café arábica, porém no café robusta foi a espermina. Os autores sugeriram que esta seja a forma predominante da espermina nos vegetais. Porém, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese. O efeito da torração nos teores das poliaminas conjugadas também foi avaliado por estes autores, que submeteram amostras de café arábica e robusta a diferentes graus de torração. Assim como as aminos livres, as conjugadas também tiveram seus teores diminuídos durante a torração. Apesar dos dados indicarem uma

diminuição nos teores das aminas durante a torração, o aumento da concentração de algumas aminas livres durante o processamento do café pode estar relacionado com a liberação de sua forma conjugada. Assim, faz-se necessário mais estudos sobre a influência da torração e do processamento no comportamento das aminas conjugadas.

## 4 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE AMINAS EM CAFÉ

Vários métodos têm sido desenvolvidos e propostos para isolar e quantificar aminas em alimentos, entre eles, a cromatografia de camada delgada (LAPAGUIMARÃES & PICKOVA, 2004), cromatografia a gás (BAKER et al., 1987; ANTOINE et al., 2002), cromatografia líquida de troca iônica (ZEE et al., 1981; STANDARA et al., 2000; REY & POHL, 2003), cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE (IZQUIERDO-PULIDO et al., 1993; VALE & GLÓRIA, 1997; NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000; TAMIN et al., 2002). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o método mais utilizado para a determinação de aminas bioativas livres e conjugadas em amostras de café (CASAL et al., 2002; CIRILO et al., 2003).

A metodologia para a análise de aminas envolve as seguintes etapas: extração, purificação, separação e quantificação. Dependendo da matriz, ou seja, o tipo do alimento a ser analisado, as etapas de extração e purificação podem sofrer alterações. Em alguns casos, é necessário ainda fazer uma derivação da amostra antes da etapa de separação ou de detecção (MORET & CONTE, 1996).

A extração consiste na retirada das aminas da matriz, sendo considerada crítica, pois sua eficiência depende do tipo e da natureza das aminas presentes e do alimento analisado (TAMIN et al., 2002). A extração de aminas pode ser realizada em meio aquoso, com água a temperatura ambiente ou aquecida, desta forma são extraídas apenas as aminas livres, ou em meio ácido, podendo ser utilizados os ácidos clorídrico (HCl), perclórico (HClO<sub>4</sub>) ou tricloroacético (TCA). Na extração ácida, algumas aminas ligadas a outros componentes da matriz também são extraídas, juntamente com as aminas livres (MORET & CONTE, 1996).

A extração de aminas livres em amostras de café é feita em meio ácido, sendo o ácido mais utilizado o TCA a 5% (m/v). CASAL et al. (2002) avaliaram a performance dos ácidos HCl (0,1 M), PCA (0,4 e 0,6 M) e TCA (5 e 10%) na etapa de extração de aminas em amostras de café. Os autores concluíram que o extrator mais eficiente foi o

TCA a 5%, visto que o HCl produziu um extrato muito turvo e com baixa resolução dos picos cromatográficos. Com ácido perclórico, os picos da histamina e tiramina se apresentaram de forma anormal e com muitas impurezas. Assim os autores concluíram que o melhor extrator seria o TCA 5% (m/v).

Para a determinação das aminas conjugadas, após a extração ácida, o extrato obtido é submetido a uma hidrólise ácida. Na análise de aminas conjugadas em amostras de café, CASAL et al. (2004, 2005) efetuaram a hidrólise com HCl 12 M a 110 °C por 18 h, porém outros autores utilizaram procedimentos diferentes (Tabela 8) em matrizes variadas.

Diante de diferentes condições de hidrólise disponíveis na literatura, estudos são necessários para otimização das condições de análises para determinação de aminas conjugadas em amostras de café.

**Tabela 8** – Variáveis utilizadas na hidrólise ácida em diferentes matrizes

Matriz	Hidrólise ácida			Referência
	Ácido	Tempo	Temp °C	
Café	HCl 12 M	18 h	110	Casal et al. (2004)
Laranja	HCl 6 N	20 h	110	Tassoni et al. (2004)
Alga	HCl 11 N	16 h	110	Lu & Hwang (2002)
Liquem <i>Evernia</i>	HCl 12 M	18 h	Amb	Fontaniella et al. (2001)
<i>prunastri</i>	HCl 12 M	18 h	110	
	Acético 1M	18 h	Amb	
	Acético 1M	18 h	110	
	Fórmico 90%	8 h	Amb	
	Fórmico 90%	8 h	110	
Planta <i>Lyallia</i>	HCl 6 N	10-16 h	110	Hennion & Martin-
<i>kerquelensis</i>				Tanguy (1999)
Caldo de cana	HCl 12 M	18 h	Amb	Rodriguez et al. (2000)
	HCl 12 N	18 h	Amb	Armas et al. (1999)

Após a etapa de extração, e posterior hidrólise para obtenção das aminas conjugadas, as substâncias interferentes podem ser removidas pela purificação do extrato com resinas de troca iônica ou catiônica ou partição líquido-líquido (COUTTS et

al., 1986; CASAL et al., 2002). O café é uma matriz complexa, e o extrato pode apresentar muitos interferentes. CASAL et al. (2002) testaram o método de partição líquido-líquido para a purificação dos extratos de café. Foram testados os solventes orgânicos: dietileter, butanol, butanol/clorofórmio e um par iônico BEHPA (bis-2-etilhexilfosfato). De acordo com os autores, para o extrato de café, o método de purificação mais eficiente foi a partição líquido-líquido com utilização do par iônico BEHPA, visto que o dietileter apresentou picos interferentes com a histamina e cadaverina. O procedimento realizado com o butanol e butanol/clorofórmio também apresentaram picos interferentes coincidindo com a histamina e a cadaverina. Alguns ajustes no gradiente foram testados, mas sem sucesso. O cromatograma dos extratos de café, após a purificação com par iônico BEHPA, apresentou picos com elevada pureza, um melhor resultado no teste de recuperação das aminas e nenhum pico interferente.

As aminas bioativas em café são separadas por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE (TAMIN et al., 2002) ou CLAE com par iônico (IZQUIERDO-PULIDO et al., 1993; VALE & GLÓRIA, 1997; NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000; CIRILO et al., 2003) com detecção espectrofotométrica ou espectrofluorimétrica após derivatização com cloreto de dansila (CASAL et al., 2002) ou *o*-ftalaldeído (CIRILO et al., 2003).

## 5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Validação de método analítico é o processo de demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido, sendo considerado um aspecto vital da garantia da qualidade analítica (BARROS, 2002). De acordo com a ANVISA (2003), a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

O objetivo da validação é demonstrar que um método analítico é adequado para o seu propósito. Desta forma a validação deve ser considerada quando se desenvolve ou efetua adaptações em metodologias já validadas, inclusão de novas técnicas de análise ou mesmo com o uso de equipamentos diferentes (BRITO et al., 2003). Os métodos normalizados, já são validados e não é necessário proceder ao processo completo de validação desde que não ocorram alterações significativas dos mesmos (BARROS, 2002). Porém, independente de quão adequado seja o desempenho de um

método em um estudo de validação já estabelecido, é necessário uma confirmação de que o método é válido quando aplicado em diferentes laboratórios, efetuando uma validação intralaboratorial (SOUZA et al., 2007).

O processo de validação consiste na determinação de parâmetros analíticos, também conhecidos como, parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho ou figuras analíticas de mérito (RIBANI et al., 2004). Os parâmetros analíticos normalmente utilizados para a validação de métodos são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (JENKE, 1996; BRITO et al., 2003; RIBANI et al, 2004; LIMA & FROTA, 2007).

As definições das figuras de mérito mais utilizadas em validação de métodos analíticos estão apresentadas a seguir:

**Especificidade** - é a habilidade de determinar com exatidão e especificamente a substância de interesse na presença de outros componentes tais como: impurezas, produtos de degradação e excipientes (BARROS, 2003). Um método pode ser considerado seletivo quando produz resposta para vários compostos químicos de uma matriz com características em comum (RIBANI et al., 2004).

**Linearidade e faixa de trabalho** - é a capacidade do método de gerar resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse, enquadrados em uma faixa analítica especificada (BRITO et al., 2003). A linearidade pode ser demonstrada pelo coeficiente de correlação da curva analítica, que não deve ser estatisticamente diferente de um, com a inclinação da reta diferente de zero.

A faixa de trabalho ou de aplicação corresponde ao intervalo de concentrações dos padrões (maior e menor nível) que possam ser determinadas com precisão e exatidão dentro da linearidade do método (BRITO et al., 2003).

**Exatidão** - é a proximidade entre a média de um conjunto de resultados obtidos experimentalmente, em relação ao valor verdadeiro ou de referência. A exatidão expressa a diferença entre o valor obtido e o valor real de um analito na matriz. É geralmente expressa na forma de tendência (bias), ou seja, o desvio (positivo ou negativo) da média de um resultado obtido em relação ao valor real (EURACHEM, 1998).

**Precisão** - é o grau de concordância de uma série de resultados obtidos de múltiplas análises, de uma mesma amostra homogênea. Usualmente é expressa como o desvio padrão, variância ou coeficiente de variação (CV) de diversas medidas. A precisão pode ser considerada no nível de repetibilidade, de precisão intermediária e de reprodutibilidade (CHASIN et al., 1998; BRITO et al., 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 (EURACHEM, 1998).

**Limite de detecção** - é a menor concentração do analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (INMETRO, 2003).

**Limite de quantificação** - é a menor quantidade da substância de interesse que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (INMETRO, 2003).

**Robustez** – é a medida da capacidade de permanecer inalterado sob pequenas, mas estudadas variações nos parâmetros do método e prover indicação da sua dependência durante o uso normal (BRITO et al., 2003). É a capacidade de permanência dos resultados diante de pequenas variações em parâmetros operacionais e ambientais (EURACHEM, 1998).

## OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral determinar o perfil e teores das aminos bioativas livres e conjugadas no café solúvel e verificar a influência do processamento no perfil e teores destas aminos.

Os objetivos específicos são:

- (i) determinar o perfil e teores de aminos bioativas livres no café solúvel disponível no mercado consumidor.
- (ii) otimizar e padronizar a etapa de extração das aminos livres do café cru;
- (iii) otimizar e padronizar a etapa de hidrólise das aminos conjugadas no café;
- (iv) acompanhar todo o processamento do café solúvel, desde a seleção dos grãos até o produto final, determinando o perfil e teores das aminos bioativas, livres e conjugadas, assim como outras características físico-químicas relevantes (umidade, pH, características de cor, atividade de água, cafeína);
- (v) avaliar a influência das etapas de processamento do café solúvel no perfil e teores das aminos livres e conjugadas e

# CAPÍTULO I – PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS EM AMOSTRAS DE CAFÉ SOLÚVEL COMERCIALIZADAS EM BELO HORIZONTE, MG

## RESUMO

O perfil e os teores de dez aminas bioativas livres, bem como o pH as características de cor foram determinados em amostras de café solúvel regular, descafeinado e orgânico, comercializadas em Belo Horizonte, MG, Brasil. As aminas putrescina, cadaverina, tiramina, histamina, serotonina, agmatina, espermidina, espermina, feniletilamina e triptamina foram extraídas com ácido tricloroacético e quantificadas por CLAE-par iônico, derivação pós-coluna com o-ftalaldeído e detecção fluorimétrica. Nove aminas foram detectadas: serotonina, cadaverina, tiramina, espermidina, putrescina, histamina, agmatina, feniletilamina e espermina. A triptamina não foi detectada em nenhuma amostra. Os teores totais de aminas variaram de 0,28 a 2,76 mg/100 g, sendo a serotonina predominante (36 %) seguida da cadaverina (24 %), tiramina (12 %), espermidina (10 %), putrescina (7 %), histamina e feniletilamina (4 %), agmatina (3%) e espermina (2 %). Os teores de tiramina foram significativamente maiores no café descafeinado. A cadaverina foi detectada em maiores concentrações nos café descafeinados e orgânico. Os teores de aminas variaram entre os lotes e entre as diferentes marcas analisadas. O pH variou de 4,86 a 5,15, com maiores valores para o café descafeinado. As características de cor variaram entre os tipos de cafés analisados. Foi observado correlação positiva entre o pH das amostras e os teores de tiramina e agmatina.

**Palavras-chave:** café solúvel, aminas bioativas, café descafeinado, café orgânico, pH, cor

## I.1 INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais consumidas em todo mundo devido seu sabor e aroma agradáveis e seus efeitos estimulantes. Além disso, recentemente, inúmeros benefícios à saúde humana têm sido atribuídos ao café (YEN et al., 2005; FARAH et al., 2006b) O café solúvel foi inventado em 1901, mas foi comercializado somente em 1938. O consumo de café solúvel vem aumentando significativamente por causa da facilidade com que é preparado e pela vida de prateleira prolongada (TRUGO & MACRAE, 1984; NOGUEIRA & TRUGO, 2003).

Nos últimos anos estudos sobre a composição do café aumentaram significativamente, com determinações principalmente de ácidos fenólicos e compostos nitrogenados como cafeína e trigonelina. Todavia, poucos estudos foram conduzidos sobre as aminas bioativas, que desempenham um importante papel no desenvolvimento das plantas e também na saúde humana. Nas plantas as aminas são requeridas no crescimento, no controle do pH intracelular, na resposta ao estresse e nos mecanismos de defesa contra patógenos, insetos e predadores (ELIASSEN et al., 2002; GLÓRIA, 2005; KALAC & KRAUSOVA, 2005). Com relação à saúde humana, estudos têm demonstrado que algumas aminas participam nos processos de desenvolvimento e crescimento celular, na resposta ao estresse, na inibição da peroxidação lipídica, na estabilização de membranas, na maturação do trato gastrointestinal, sendo que algumas aminas também são vasoativas e psicoativas (GLÓRIA, 2005; KALAC & KRAUSOVA, 2005).

Alguns estudos têm relatado a presença de aminas bioativas em café (AMORIM et al., 1977; CASAL et al., 2002; CIRILO et al., 2003; CASAL et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2007). De acordo com esses estudos, no café verde foram encontradas as aminas putrescina, espermidina e espermina. A putrescina foi a amina predominante, seguida da espermidina e da espermina. Outras aminas também foram relatadas no café verde, como a serotonina (CIRILO et al., 2003; CASAL et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2007), tiramina, histamina e cadaverina (CASAL et al., 2002; CASAL et al., 2004). Foram evidenciadas diferenças no perfil e nos teores de aminas em amostras de café de diferentes espécies (CASAL et al., 2004), origens (CASAL et al., 2002), práticas de cultivo (CIRILO et al., 2003), qualidade da bebida (AMORIM et al., 1977; OLIVEIRA et al., 2005) e dos grãos (VASCONCELOS et al.,

2007), bem como em diferentes métodos de extração das aminas da matriz (CASAL et al., 2004; 2005).

Estudos realizados por OLIVEIRA et al. (2005) indicaram que grãos de café que originavam bebidas de baixa qualidade (Rio) continham elevados teores de putrescina quando comparados com grãos classificados como de alta qualidade (Mole). Além disso, histamina e triptamina foram detectadas em grãos de café classificados como bebida de baixa qualidade. De acordo com VASCONCELOS et al. (2007), algumas aminas que não foram detectadas em grãos de café sadios foram encontradas em grãos de café defeituosos. A histamina foi detectada nos grãos preto, verde e ardido, a triptamina nos grãos verde e ardido e a cadaverina nos grãos pretos. Desta forma a presença de algumas aminas que não são comuns aos grãos verdes em amostras de café poderia indicar a presença de grãos defeituosos e, conseqüentemente, uma bebida de baixa qualidade.

Durante o processo de torração do café ocorre uma significativa diminuição nos teores de aminas. Elevadas temperaturas e o tempo utilizados na torração podem diminuir os teores das aminas ao ponto de algumas não serem detectadas (AMORIM et al., 1977; CIRILO et al., 2003; CASAL et al., 2004; 2005). Porém grão de café submetido à torração clara pode conter baixos teores de aminas (CIRILO et al., 2003; CASAL et al., 2004; 2005; VASCONCELOS et al., 2007). Além disso, durante a torração de grãos de café por 12 min a 300 °C, CIRILO et al. (2003) detectou a formação da agmatina. A formação da agmatina pode ter ocorrido pela descarboxilação da arginina ou pela liberação desta amina de sua forma conjugada (CIRILO et al., 2003; CASAL et al., 2005).

No processo de produção do café solúvel os grãos são torrados, moídos e submetidos à extração sob pressão em altas temperaturas (180°C). O extrato é então desidratado em vaporizadores ou liofilizadores originando o café solúvel em pó ou granulado. Desta forma a composição do café solúvel dependerá, além das condições do processamento, das espécies e variedades de café utilizadas nos blends (NOGUEIRA & TRUGO, 2003).

Devido à escassez de dados sobre o perfil e teores de aminas bioativas em café solúvel e a relevância destes compostos para a saúde humana, o presente trabalho teve como objetivo determinar o perfil e teores de aminas bioativas no café solúvel disponível no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG.

## I.2 MATERIAL E MÉTODOS

### I.2.1 MATERIAL

#### I.2.1.1 Amostra

Foram coletadas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, no período de julho de 2002 a dezembro de 2003, sessenta e oito amostras de café solúvel, sendo 39 regulares, 24 descafeinados e 5 orgânicos.

#### I.2.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados possuíam grau analítico, exceto o solvente usado no CLAE (acetonitrila), que era de grau cromatográfico. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). Os padrões de aminas bioativas (diidroclorato de putrescina - PUT, diidroclorato de cadaverina - CAD, diidroclorato de histamina - HIM, hidrocloreto de tiramina - TIM, tetraidroclorato de espermina - EPM, triidroclorato de espermidina - EPD, complexo sulfato creatinina agmatina - AGM, hidrocloreto de 2-feniletilamina - FEM, hidrocloreto de 5-hidroxitriptamina ou serotonina - SRT), foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). As fases móveis foram filtradas em membrana (47 mm de diâmetro e 0,45 µm de poro, Millipore Corp., Milford, MA, EUA) dos tipos HAWP e HVWP para reagentes aquosos e solventes orgânicos, respectivamente.

### I.2.2. MÉTODOS

As amostras coletadas foram analisadas quanto ao perfil e teores das aminas bioativas, pH e características de cor  $L^*$   $a^*$   $b^*$ . As aminas pesquisadas foram putrescina, cadaverina, tiramina, histamina, serotonina, agmatina, espermidina, espermina, feniletilamina e triptamina.

### I.2.2.1 Determinação de aminas bioativas

Para a determinação das aminas, o café solúvel (5 g) foi adicionado de 7 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5%. Em seguida foi agitado em mesa agitadora por 10 minutos, centrifugado a 11.180 *g* a 4 °C por 21 minutos e filtrado em papel de filtro qualitativo. A extração foi repetida mais duas vezes, com adição de 7 e 6 mL de TCA 5%; os extratos foram combinados e o volume final anotado.

Os extratos foram filtrados em membrana HAWP de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp. Milford, MA, EUA). As aminas foram determinadas por CLAE-par iônico, derivação pós-coluna com OPA, conforme metodologia descrita por CIRILO et al. (2003).

A análise cromatográfica foi efetuada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, modelo LC-10 AD, com a mistura à baixa pressão; conjunto de lavagem automática de pistão; injetor automático Shimadzu modelo SIL – 10 ADVP conectado a um detector espectrofluorimétrico modelo RF-551 a 340 nm de excitação e 445 nm de emissão e um controlador CBM-20 A (Shimadzu, Kyoto, Japão) 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, protegido da luz, de 2 m de comprimento e 0,25 cm de diâmetro conectado entre a câmara de mistura e o detector e a bomba LC-10 AD (Shimadzu, Kyoto, Japão).

Foi utilizada uma coluna µBondapak C18 em fase reversa 3,9 x 300 mm, 10 µm e pré-coluna µBondapak C18 (Waters, Milford, MA) e sistema gradiente de eluição em ambiente com temperatura controlada (20 ± 1 °C). As fases móveis foram: A - solução 0,2 M de acetato de sódio e 15 mM de octanosulfonato de sódio, pH 4,9 ajustado com ácido acético e B - acetonitrila. O fluxo de análise foi de 0,8 mL/min.

O reagente de derivação consistiu de 0,2 g de OPA dissolvido em 3 mL de metanol e 500 mL de uma solução de 25 g de ácido bórico e 22 g de KOH (pH 10,5), 1,5 mL de Brij-35 e 1,5 mL de mercaptanol. A solução derivante foi preparada diariamente, mantida ao abrigo da luz e bombeada à câmara de mistura a um fluxo de 0,4 mL/min.

A identificação das aminas foi feita por comparação do tempo de retenção das aminas na amostra em relação ao padrão e também pela adição de solução da amina

suspeita à amostra. O cálculo da concentração das aminas foi feito por interpolação nas respectivas curvas analíticas.

### **I.2.2.1 Determinação do pH**

O pH das amostras de café foi determinado por medida direta em pHmetro digital (DM20 Digimed, Santo Amaro, SP, Brasil) previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 à temperatura ambiente. O café solúvel (2 g) foi reconstituído em 100 ml de água (IAL, 2004).

### **I.2.2.2 Determinação das características de cor**

As características de cor foram determinadas usando o colorímetro ColorTec PCM (Accuracy Microsensor, Pittsford, EUA). Foram efetuadas medidas dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e cálculo dos valores de croma [ $c = (a^2 + b^2)^{1/2}$ ] e tonalidade [ $h = \arctg a/b$ ] em triplicata. Os valores  $c$  e  $h$  foram confirmados empregando-se o software Colorpro (COLORPRO, 2004).

### **I.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados obtidos durante a execução do experimento foram submetidos à análise de variância (média, desvio padrão e coeficiente de variação) - ANOVA, e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de significância utilizando-se o programa estatístico SIGMA STAT versão 2.0.

## I.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### I.3.1 Perfil de aminas bioativas livres no café solúvel

Novas das dez aminas investigadas foram detectadas nas amostras analisadas. A triptamina não foi detectada em nenhuma das amostras. A tiramina foi a amina prevalente, sendo detectada em todas as 68 amostras analisadas, seguida da cadaverina (88%), serotonina (72%), espermidina (65%), feniletilamina (57%), putrescina e histamina (54%) (Figura I.1). A Agmatina e espermina foram detectadas apenas e 29 e 18% das amostras, respectivamente.

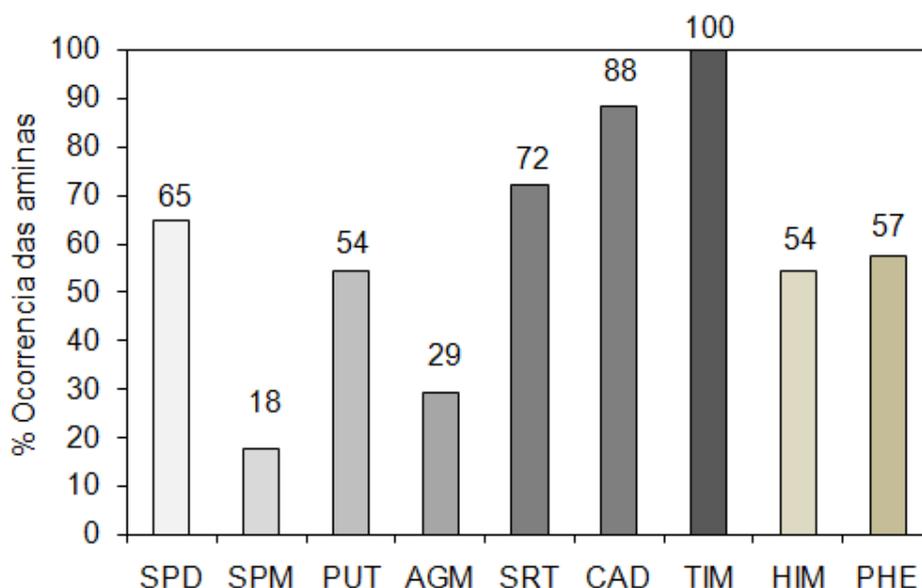


Figura I.1. Ocorrências das aminas bioativas livres nas amostras analisadas. SPD=espermidina; SPM=espermina; PUT=putrescina; AGM=agmatina; SRT=serotonina; CAD=cadaverina; TIM=tiramina; HIM=histamina; PHE=feniletilamina.

A presença da espermidina no café era esperada visto que esta amina está amplamente distribuída em plantas e desempenham um importante papel no processo de divisão e crescimento celular (FLORES et al., 1989; BARDOCZ, 1995; CIRILO et al., 2003). A putrescina por ser um precursor das aminas espermidina e espermina também era esperada (LIMA & GLÓRIA, 1999; WALTERS, 2003). A prevalência de

espermidina em relação à espermina está em acordo com VALERO et al. (2002) e KALAC et al. (2002) para diferentes vegetais. Algumas aminos identificadas no café solúvel já haviam sido previamente detectadas em amostras de café verde e torrado, com exceção da feniletilamina, que foi detectada em amostras de café pela primeira vez. A presença de muitas destas aminos foi relatada em grãos de café verde, dentre elas, a putrescina, a espermidina, a espermina e a serotonina (AMORIM et al., 1977; CIRILO et al., 2003; CASAL et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2007). Tiramina e cadaverina foram encontradas em baixas concentrações ( $\leq 0,31$  e  $\leq 0,04$  mg/100 g, respectivamente) em grãos de café verde da espécie *Coffea canephora* var. Robusta (CASAL et al., 2004). A agmatina foi detectada em amostras de café submetidas a elevadas temperaturas de torração (CIRILO et al., 2003). Além disso, histamina, triptamina e cadaverina foram detectadas em cafés classificados como bebida de baixa qualidade e em grãos de café defeituosos como preto, verde e ardido (OLIVEIRA et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2007).

Não foram encontrados dados na literatura sobre o perfil e teores de aminos bioativas em café solúvel. Todavia, como o extrato do café é obtido a partir do café torrado, o perfil de aminos presente no café solúvel deveria ser semelhante ao café torrado. Durante a torração muitas aminos livres são degradadas, assim o café torrado apresenta normalmente a serotonina que parece ser a amina mais resistente à torração. As aminos putrescina, espermidina e espermina podem ser detectadas em torrações mais brandas (clara), sendo que a agmatina pode ser formada durante processos de torração escura (AMORIM et al., 1977; CIRILO et al., 2003; CASAL et al., 2004). A presença de diferentes tipos de aminos no café solúvel poderia indicar que estas foram introduzidas durante o processamento, nas etapas de extração, concentração ou desidratação. Além disso, as aminos poderiam estar presentes no café torrado em sua forma conjugada e que foram hidrolisadas durante o processamento. Mais estudos são necessários para identificar a fonte destas aminos presentes no café solúvel.

### **I.3.2 Teores de aminos bioativas livres no café solúvel**

Os teores de aminos detectados nas amostras analisadas estão indicados na Tabela I.1. Os teores totais de aminos variaram de 0,28 a 2,76 mg/100 g. Teores médios elevados foram observados para as aminos serotonina, seguida da cadaverina,

tiramina e espermidina. Foi observada uma grande variação nos teores das aminas entre as amostras analisadas, como evidenciado pelo coeficiente de variação. Elevadas variações foram observadas para a espermina, a agmatina e a feniletilamina. Todavia pequenas variações foram encontradas para a tiramina, a cadaverina e a serotonina, que foram as aminas presentes em maiores quantidades.

As aminas serotonina, espermidina e putrescina foram detectadas em teores similares aos encontrados no café torrado como reportado por AMORIM et al. (1977), CIRILO et al. (2003), CASAL et al. (2004), VASCONCELOS et al. (2007). Porém cadaverina, tiramina, histamina e feniletilamina, que não tinham sido encontradas no café torrado, foram detectadas no café solúvel em teores significativos.

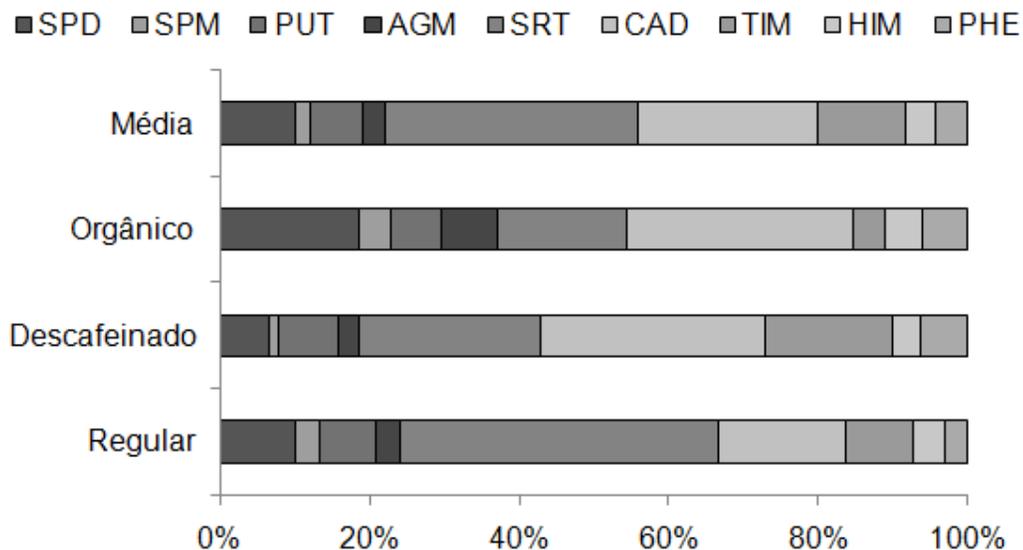
**Tabela I.1.** Teores de aminas bioativas em café solúvel

Aminas	Teores de aminas (mg/100 g)									
	SPD	SPM	PUT	AGM	SRT	CAD	TIM	HIM	PHE	Total
<b>n +</b>	44	12	37	20	49	60	68	37	39	68
<b>Mínimo</b>	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,28
<b>Máximo</b>	0,77	0,41	0,53	0,53	1,80	0,81	0,55	0,14	0,75	2,76
<b>Mediana</b>	0,06	0,00	0,04	0,00	0,36	0,27	0,11	0,04	0,04	1,01
<b>Média</b>	0,11	0,03	0,08	0,04	0,39	0,7	0,14	0,04	0,05	1,15
<b>CV (%)</b>	169	293	142	216	98	79	74	110	197	56

n+= número de amostras positivas; CV= coeficiente de variação; SPD=espermidina; SPM=espermina; PUT=putrescina; AGM=agmatina; SRT=serotonina; CAD=cadaverina; TIM=tiramina; HIM=histamina; PHE=feniletilamina.

### I.3.3 Perfil e teores de aminas livres em diferentes tipos de café solúvel

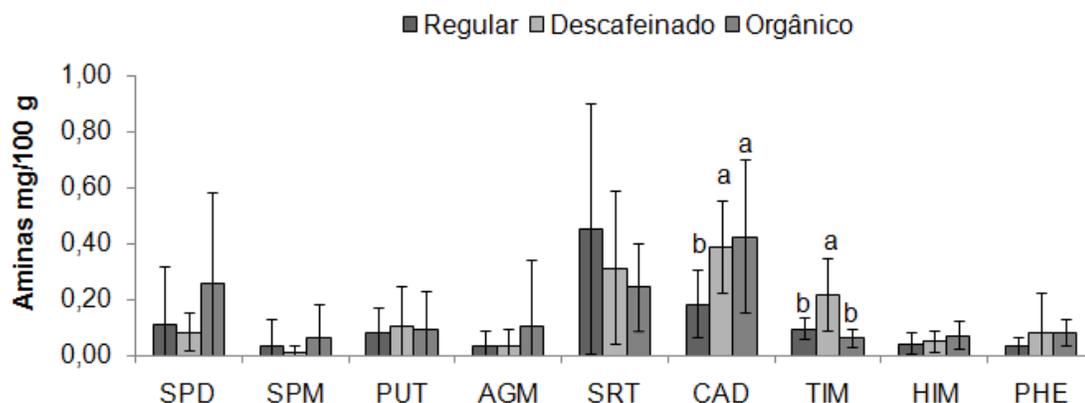
A contribuição de cada amina ao teor total para cada tipo de café solúvel variou significativamente (Figura I.2). Em média a amina que mais contribuiu com o teor total foi a tiramina, mas avaliando cada tipo de café separadamente foram observadas variações. No café solúvel regular a serotonina contribuiu mais com o teor total, seguida da cadaverina, espermidina e tiramina. No café descafeinado as aminas que mais contribuíram foram a cadaverina, a serotonina e a tiramina. No café orgânico a cadaverina também foi a amina que apresentou maior contribuição ao teor total, seguida da espermidina e serotonina.



**Figura 1.2.** Contribuição de cada amina em relação ao teor total nos diferentes tipos de café solúvel. SPD=espermidina; SPM=espermina; PUT=putrescina; AGM=agmatina; SRT=serotonina; CAD=cadaverina; TIM=tiramina; HIM=histamina; PHE=feniletilamina.

Os teores médios de cada amina detectada nos diferentes tipos de café solúvel analisadas estão indicados na Figura 1.3. As aminas encontradas em maiores teores foram a serotonina, a cadaverina, a tiramina e a espermidina. Foi observada diferença significativa nos teores de cadaverina e tiramina entre os três tipos de café solúvel. Elevados teores de cadaverina foram detectados nos cafés descafeinado e orgânico, enquanto que a quantidade de tiramina foi maior no café descafeinado.

De acordo com NOGUEIRA & TRUGO (2003), a composição do café solúvel pode variar durante o processamento e também com as espécies e variedades de café usadas nos blends. Nos grãos de café robusta foram observados elevados teores de tiramina (CASAL et al., 2004), assim o uso desta variedade de café em altas proporções nos blends poderia fornecer elevados teores de tiramina ao café solúvel. Os teores de cadaverina foram significativamente diferentes no café solúvel orgânico em relação ao café solúvel regular. Estes resultados sugerem que as práticas de cultivo orgânicas podem favorecer a formação e o acúmulo de cadaverina neste tipo de café.



**Figura I.3.** Teores de aminas bioativas nos diferentes tipos de café solúvel. Letras diferentes (a, b) para uma mesma amina são significativamente diferentes. Teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

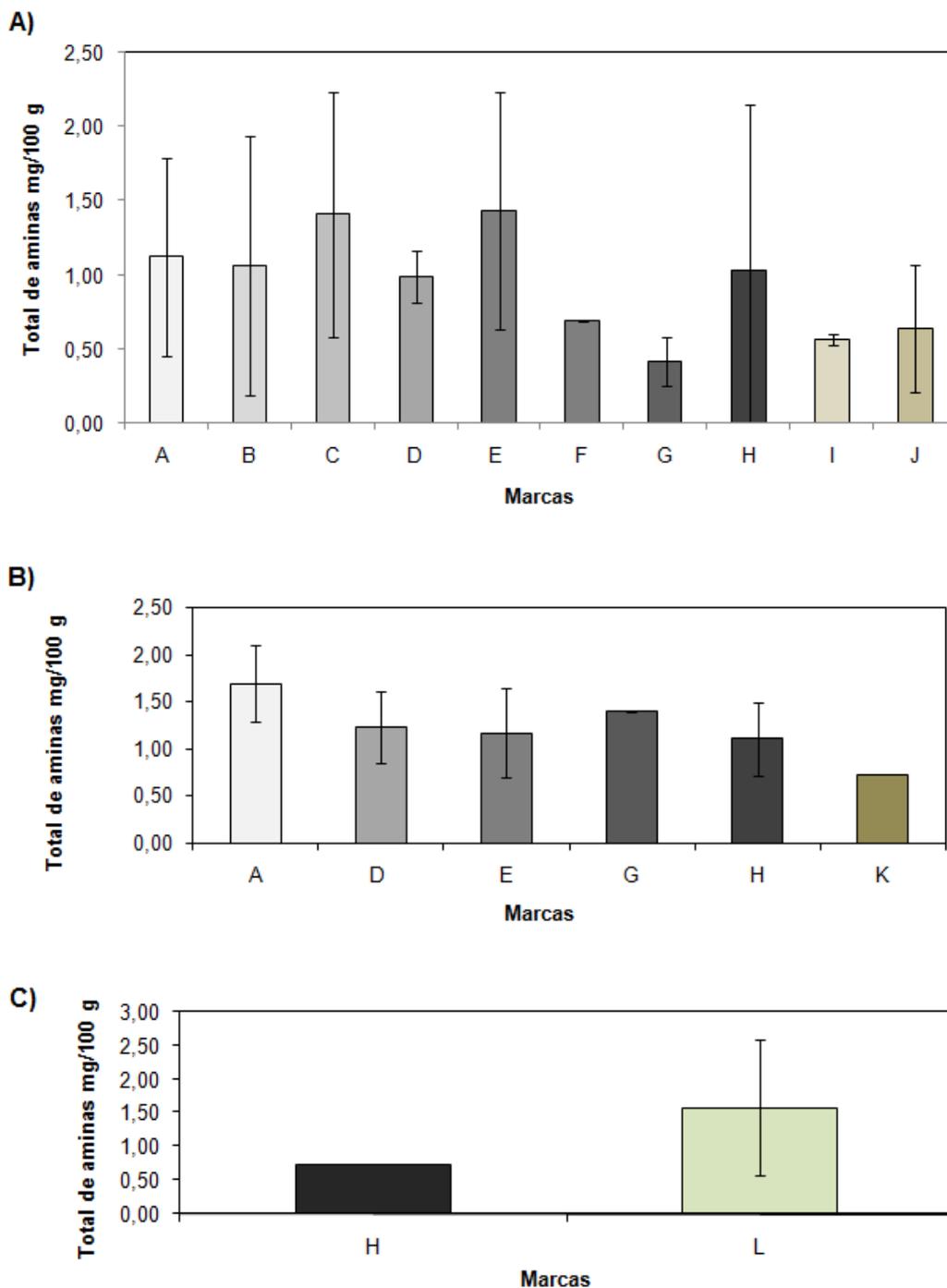
### I.3.4 Teores de aminas bioativas livres em diferentes marcas de café solúvel

Os teores totais de aminas nas diferentes marcas dos cafés regular, descafeinado e orgânico estão demonstrados na Figura I.4. Do total de 12 marcas incluídas neste estudo, dez produziam café solúvel regular, seis descafeinado e apenas uma marca produzia café orgânico. O teor total de aminas variou de 0,30 a 2,86 mg/100 g (média 1,07 mg/100 g) para o café solúvel regular; 0,38 a 2,51 mg/100 g (média 1,29 mg/100 g) para o descafeinado e 0,41 a 2,53 mg/100 g (média 1,41 mg/100 g) para o orgânico. Foi observada uma variação nos teores de aminas entre as marcas, mas esta diferença não foi estaticamente significativa ( $p > 0,05$ ), provavelmente devido a grande variação nos teores entre as amostras dos diferentes lotes de cada marca.

### I.3.5 Perfil e teores de aminas livres nos diferentes tipos de bebida café solúvel

A concentração das aminas serotonina, tiramina e cadaverina presentes em 50 mL de bebida para cada marca dos cafés analisados solúvel regular, descafeinado e orgânico está indicada na Tabela I.2. As bebidas foram preparadas de acordo com as instruções dos fabricantes, e não diferiram em relação à proporção de café utilizada no

preparo (2 g para 50 mL de bebida). Os teores destas aminos na bebida variaram amplamente.



**Figura I.4.** Teores totais de aminos bioativas livres nas diferentes marcas de café solúvel: A) regular; B) descafeinado; C) orgânico.

A serotonina apresentou teores que variaram de não detectados até 7,8  $\mu\text{g}$ , a tiramina de 0,0 a 4,9  $\mu\text{g}$  e a cadaverina de 0,2 a 6,0  $\mu\text{g}$ . A implicação dos níveis destas aminas na bebida café ainda não está bem estabelecida. Dados sobre a influência das aminas nas características sensoriais da bebida café são escassos. WANG et al. (1975) reportou que as poliaminas livres apresentam um odor desagradável, amoniacal, quase pútrido. Porém, o pH bem como outros componentes presentes no café pode desempenhar um papel na percepção das aminas.

**Tabela I.2.** Teores de serotonina, tiramina, cadaverina e total de aminas bioativas livres em 50 mL de bebida nas diferentes marcas dos café analisados.

Tipos	Marcas	Serotonina ( $\mu\text{g}/50\text{ mL}$ )	Tiramina ( $\mu\text{g}/50\text{ mL}$ )	Cadaverina ( $\mu\text{g}/50\text{ mL}$ )	Total ( $\mu\text{g}/50\text{ mL}$ )
Regular	A	4,3	1,2	2,0	11,2
	B	3,7	0,6	2,6	10,6
	C	7,8	0,9	3,8	18,3
	D	6,5	1,0	0,6	9,9
	E	3,4	2,0	5,0	28,6
	F	1,7	1,7	1,7	6,9
	G	nd	2,2	2,2	5,5
	H	3,0	0,3	0,1	5,1
	I	4,0	0,9	1,3	5,6
	J	2,7	1,0	0,9	6,4
Descafeinado	A	5,5	1,9	6,0	16,9
	D	3,9	1,4	3,7	12,2
	E	2,6	2,0	3,3	23,0
	G	1,2	4,9	0,4	18,0
	H	0,5	3,7	2,4	5,5
	K	nd	1,3	4,4	7,2
Orgânico	H	1,7	0,3	0,9	4,0
	L	2,2	0,6	4,8	15,8

Os teores foram calculados pela média dos valores ( $n=5$ ) das aminas nos respectivos pós para preparo da bebida. nd = não detectado; Limite de determinação = 0,2  $\mu\text{g}/50\text{ mL}$  para tiramina e cadaverina e 0,4  $\mu\text{g}/50\text{ mL}$  para serotonina).

De acordo com ABIC (2008) o consumo de café em 2007 foi de aproximadamente 74 litros da bebida por habitante o que representa um consumo de 200 mL da bebida por dia. Considerando os dados apresentados na Tabela I.2 e a estimativa de consumo apresentada pela ABIC os teores de tiramina e serotonina consumidos diariamente por meio do consumo de café seria de 19,6 e 31,2 mg, respectivamente. Segundo HALÁSZ et al. (1994) e GLÓRIA (2005) somente elevadas concentrações de tiramina (10 mg/100 g de alimento) podem causar alterações na pressão arterial. Desta forma a concentração de tiramina no café solúvel não representa risco para o consumidor. Não foram encontrados dados na literatura sobre o os efeitos da serotonina presente na bebida café. Porém, segundo CASAL et al. (2004) devido ao seu papel psicoativo nos seres humanos, como mediador neuronal, sua presença no café esta poderia ser interessante.

### **I.3.6 pH e características de cor do café solúvel**

O pH e as características de cor CIE  $L^*a^*b^*$  das amostras de café solúvel analisadas estão indicados na Tabela I.3. O pH variou entre os diferentes tipos de café analisados, com valores significativamente mais baixos para o café orgânico em relação ao café regular e descafeinado. As características de cor também variaram significativamente entre os diferentes tipos de cafés. O café orgânico apresentou valores para as características de cor mais elevados, seguido do café descafeinado e do café solúvel regular. De acordo com BORGES et al. (2002) e FARAH et al. (2006a) a luminosidade (L) dos grãos de café apresenta correlação inversa com o grau de torração. Desta forma, os resultados sugerem que o café orgânico foi submetido a uma torração mais branda. Porém para o café solúvel esta correlação ainda não foi estabelecida e fatores como a utilização de CO<sub>2</sub>, para clareamento do café, durante o processamento podem interferir na coloração final do café solúvel.

Estudos de correlação entre os teores de amins bioativas detectadas nas amostras analisadas com o pH e as características de cor, indicaram uma correlação positiva entre a tiramina e a agmatina com o pH ( $R = 0,432$ ,  $P = 0,003$  e  $R = 0,293$ ,  $P = 0,048$ , respectivamente). Não foram observadas correlações entre as características de cor e os teores de amins.

**Tabela I.3.** Valores de pH e características de cor CIE  $L^*a^*b^*$  das amostras de café solúvel regular, descafeinado e orgânico

Característica	Valores médios $\pm$ dp / Tipos de café solúvel		
	Regular	Descafeinado	Orgânico
pH*	5,05 $\pm$ 0,07 b	5,15 $\pm$ 0,14 a	4,86 $\pm$ 0,04 c
<b>Características de cor **</b>			
L	14,61 $\pm$ 2,20 c	20,61 $\pm$ 4,69 b	33,48 $\pm$ 3,02 a
a	6,61 $\pm$ 2,03 b	7,91 $\pm$ 3,63 b	11,53 $\pm$ 4,01 a
b	3,73 $\pm$ 2,33 c	12,56 $\pm$ 8,03 b	33,51 $\pm$ 6,73 a
c	9,01 $\pm$ 5,15 c	15,35 $\pm$ 8,00 b	36,24 $\pm$ 3,99 a
H <sup>º</sup>	32,89 $\pm$ 17,47 b	54,03 $\pm$ 15,02 a	67,15 $\pm$ 9,28 a

\* Determinado na bebida. \*\* Determinado no café solúvel em pó. Valores médios com letras diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes (Teste de Duncan,  $p \leq 0,05$ ).

## I.4 CONCLUSÕES

O café solúvel coletado no mercado consumidor foi caracterizado pela presença das aminas serotonina, cadaverina, tiramina, espermidina, putrescina, histamina, agmatina, feniletilamina e espermina. A amina predominante foi a serotonina. Os teores de tiramina e cadaverina foram significativamente diferentes nos três tipos de cafés analisados. A tiramina foi detectada em maiores concentrações no café descafeinado e a cadaverina nos cafés descafeinado e orgânico. Os teores de aminas variaram entre as marcas e os diferentes lotes analisados.

O pH apresentou correlação significativa com as aminas tiramina e agmatina. As características de cor não apresentaram correlação com as aminas bioativas detectadas no café solúvel.

## CAPÍTULO II. OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE EXTRAÇÃO DAS AMINAS BIOATIVAS LIVRES DE CAFÉ CRÚ

### RESUMO

A extração é uma etapa muito importante na determinação de aminos bioativas em alimentos, pois dela depende a qualidade do resultado da análise. O objetivo do presente trabalho foi otimizar a etapa de extração das aminos bioativas livres de café cru, avaliando a influência dos parâmetros granulometria da amostra, ácido extrator e extrações consecutivas na recuperação das aminos da matriz café cru. Grãos de café robusta foram submetidos à moagem, classificação por tamanho de partícula e, em seguida, avaliados quanto aos teores de aminos. Foram testados os extratores ácido tricloroacético (TCA) a 5% m/v, HCl 1 mol/L e ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) 0,4 mol/L e os procedimentos com uma e três extrações consecutivas, seguidas ou não da etapa de repouso a 4 °C por 12 h. As aminos foram quantificadas por CLAE-par iônico, derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído e detecção fluorimétrica. A granulometria influenciou significativamente o volume recuperado do extrato, sendo que na extração de amostras com partículas de diâmetro médio (< 0,85 mm), o volume do extrato recuperado foi menor. A recuperação da maioria das aminos detectadas nos grãos de café cru não foi significativamente diferente para as partículas obtidas após moagem e separação nas peneiras 9, 20, 28 mesh (2,00; 0,85 e 0,60 mm de diâmetro, respectivamente). O extrator que proporcionou melhor recuperação das aminos foi o TCA 5%. A extração das aminos utilizando três extrações consecutivas foi significativamente mais eficiente na recuperação das aminos bioativas de café cru, não havendo necessidade de repouso sob refrigeração.

**Palavras-chave:** aminos bioativas, café cru, extração, granulometria.

## II.1 INTRODUÇÃO

A separação e quantificação de amins bioativas em alimentos pode ser feita por vários métodos, dentre eles, a cromatografia em camada delgada (LAPA-GUIMARÃES & PICKOVA, 2004), a cromatografia gasosa (BAKER et al., 1987; ANTOINE et al., 2002), a cromatografia em coluna de troca iônica (ZEE et al., 1981; STANDARA et al., 2000; REY & POHL, 2003), ou a cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE (IZQUIERDO-PULIDO et al., 1993; VALE & GLÓRIA, 1997; NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000; TAMIN et al., 2002), sendo esta última a mais eficiente.

Antes da separação e da quantificação, entretanto, as amins devem ser extraídas da matriz e, algumas vezes, o extrato deve ser purificado para eliminar interferentes. Dependendo da matriz, ou seja, do tipo de alimento a ser analisado, as etapas de extração e purificação podem sofrer alterações. Em alguns casos, é necessário ainda fazer uma derivatização da amostra antes da etapa de separação ou de detecção (MORET & CONTE, 1996).

A extração das amins consiste na retirada destas da matriz. Esta etapa é crítica, pois sua eficiência depende do tipo e da natureza das amins presentes e do alimento analisado (TAMIN et al., 2002). De acordo com a literatura, diferentes agentes extratores têm sido utilizados para extrair amins bioativas dos alimentos: água (INGLES et al., 1985), solventes orgânicos como etanol e metanol (SATO et al., 1970; AOAC, 1995) e ácidos como tricloroacético (TCA) (PATTONO et al., 2000; CASAL et al., 2004), clorídrico (HCl) (FONTANIELLA et al., 2001; CINQUINA et al., 2004) perclórico (HClO<sub>4</sub>) (CHIACCHIERINI, RESTUCCIA & VINCI, 2006; LAVIZZARI et al., 2006) e sulfosalicílico (POLLACK et al., 1992; BUTS et al., 1995). Em meio aquoso, com água a temperatura ambiente ou aquecida, são extraídas apenas as amins livres. Porém, na extração ácida, dependendo da concentração do ácido, algumas amins ligadas a outros componentes da matriz também são extraídas, juntamente com as amins livres (MORET & CONTE, 1996).

Durante a execução da etapa de extração dois parâmetros são importantes, dentre eles, o solvente usado para a extração, que está relacionado com a matriz a ser analisada, e a forma de preparo da amostra e o procedimento de extração (MORET & CONTE, 1996). O café possui uma grande variedade de compostos, constituindo, portanto, uma matriz complexa. Desta forma, uma etapa de extração apropriada é fundamental para obtenção de um bom resultado da análise.

Na determinação de aminos bioativas em amostras de café, a metodologia mais utilizada é a CLAE (CASAL et al., 2002). A etapa de extração assume importante papel na qualidade do resultado final. Os métodos descritos na literatura para a determinação de aminos em grãos de café utilizam diferentes procedimentos de extração, bem como uma diversidade de agentes extratores. De acordo com CASAL et al. (2002), na análise de aminos em amostras de café, a etapa de extração foi conduzida com uma única adição do agente extrator seguida de repouso a 4 °C por aproximadamente 12 h. Porém, na metodologia descrita por CIRILO et al. (2003), as aminos foram retiradas da matriz por meio de três extrações consecutivas sem a etapa de repouso sob refrigeração. Desta forma uma melhor avaliação dos procedimentos de extração para verificar a influência de extrações consecutivas e do repouso sob refrigeração na recuperação das aminos deve ser realizada.

Com relação ao agente extrator, o meio mais eficiente para a extração das aminos do café é o ácido, sendo o mais utilizado o TCA (CASAL et al., 2002; CIRILO et al., 2003). Um outro parâmetro importante que pode influenciar na etapa de extração das aminos em grãos de café e, conseqüentemente, em sua quantificação é a preparação da amostra. Esta etapa envolve os procedimentos de moagem dos grãos, que consiste na trituração dos mesmos para que sejam reduzidos a uma granulometria adequada para a extração das aminos. A redução do tamanho dos grãos de café pode facilitar a extração de solutos, devido ao aumento da área de contato disposta entre os grãos e o agente extrator (BRENNAN et al., 1998).

Diante da importância da etapa de extração na determinação das aminos bioativas, o presente estudo avaliou a eficiência de diferentes procedimentos de extração, dentre eles, o tipo de ácido extrator, o número de extrações sucessivas, e a granulometria do grão de café na recuperação das aminos bioativas em amostras de café cru.

## II.2 MATERIAL E MÉTODOS

### II.2.1 MATERIAL

#### II.2.1.1 Amostra

Para realização deste experimento foram utilizadas amostras de café cru em grãos da espécie robusta (*Coffea canephora* var. Robusta). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### II.2.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados possuíam grau analítico, exceto os solventes usados no CLAE (acetoneitrila), que eram de grau cromatográfico. As soluções foram preparadas com água ultrapura obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). Os padrões de aminas bioativas (diidrocloreto de putrescina (PUT), diidrocloreto de cadaverina (CAD), diidrocloreto de histamina (HIM), hidrocloreto de tiramina (TIM), tetraidrocloreto de espermina (EPM), triidrocloreto de espermidina (EPD), complexo sulfato creatinina agmatina (AGM), hidrocloreto de 2-feniletilamina (FEA), hidrocloreto de 5-hidroxitriptamina (serotonina – SRT), foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). As fases móveis foram filtradas em membrana de 47 mm de diâmetro e com tamanho do poro de 0,45 µm (Millipore Corp., Milford, MA, EUA), tipos HAWP e HVWP para solventes aquosos e orgânicos, respectivamente.

### II.2.2 MÉTODOS

#### II.2.2.1 Estudo da influência do ácido extrator na recuperação das aminas bioativas de café cru

Diferentes tipos de ácidos extratores, dentre eles o TCA, o ácido clorídrico e o ácido perclórico foram avaliados quanto à eficiência em recuperar aminas durante a etapa de extração de 10 aminas bioativas da matriz café cru. Todas as extrações foram conduzidas em triplicata, utilizando-se a matriz (café cru) sem e com adição de solução contendo 10 aminas de forma a se obter adição de 1 e 10 mg/100 g da amostra.

A eficiência da extração de aminas bioativas de café cru por cada solução ácida foi investigada adicionando-se 7 mL das soluções de TCA 5 g/100 mL (CIRILO et al., 2003), HCl 1,0 mol/L e ácido perclórico 0,4 mol/L (CASAL et al., 2002) a 5 g da amostra de café cru sem e com adição de solução de concentração conhecida de aminas. As amostras foram agitadas em mesa agitadora por 10 min e centrifugadas a 11.180 g a 4 °C por 21 min. Em seguida, foram filtradas em papel de filtro qualitativo. A extração foi repetida por mais duas vezes, com 7 e 6 mL e os filtrados foram combinados (CIRILO et al., 2003).

### **II.2.2.1 Estudo da influência da granulometria na extração de aminas bioativas de café cru**

Os grãos de café cru (250 g) foram submetidos a duas triturações em moinho de rolos (modelo C 60, CAMARGO, São Paulo, SP, Brasil) (Figura II.1A) a 283 rpm e, em seguida, foram triturados uma vez no moinho de martelos (Figura II.1B) a rotação de 3500 a 4000 rpm. Após a moagem pesou-se 100 gramas do material o qual foi submetido à peneiramento nos tamises de número 4, 8, 9, 20, 28, 32 e 60 mesh com abertura das malhas de 4,75; 2,36; 2,00; 0,85; 0,60; 0,50 e 0,25 mm, respectivamente.

Para o peneiramento foi utilizado um agitador de peneiras (Bertel Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil) com reostato na posição 5 por um tempo de 30 minutos. Cada fração da amostra retida nas diferentes peneiras foi recolhida, pesada para verificar a granulometria média do café após a moagem e, em seguida, submetida a extração de aminas bioativas.

Os grãos de café foram fotografados na entrada e saída de cada moinho. Por meio da imagem dos grãos de café determinou-se o diâmetro médio dos mesmos, com o software Size Meter 1.1 (Luis Henrique Castelan Carlson, LCP, UFSC, SC, Brasil).

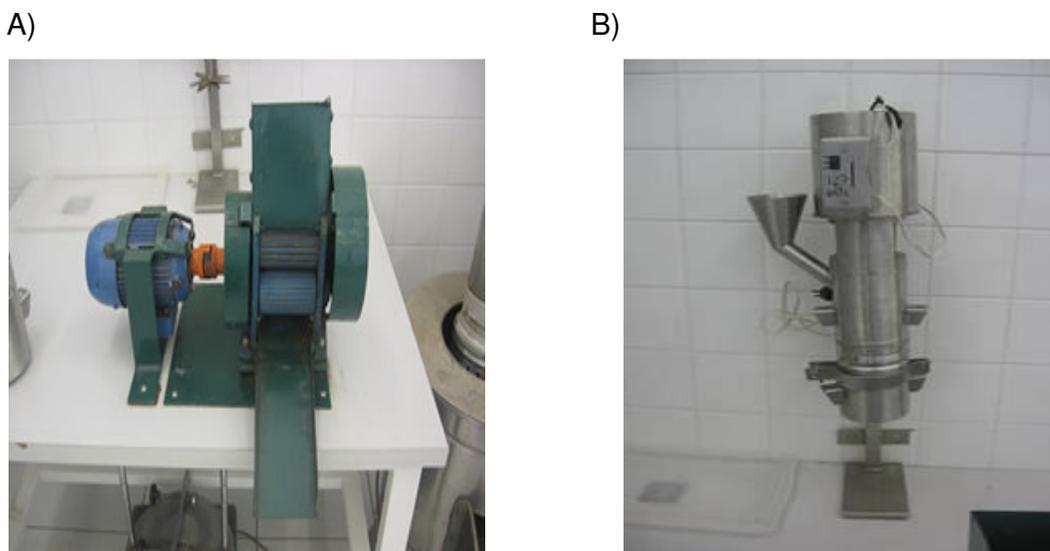
Após cada etapa de moagem, as partículas foram peneiradas e o diâmetro médio das partículas após o peneiramento foi calculado pela média geométrica das massas retidas e as aberturas das peneiras através da equação:

$$\text{Diâmetro médio} = (d1 \times d2)^{1/2}$$

sendo:

d1: diâmetro em mm da peneira com a maior massa retida, e

d2: diâmetro em mm da peneira com a segunda maior massa retida.



**Figura II.1** – Moinhos utilizados na moagem dos grãos de café crus.

A) Moinho de rolos; B) Moinho de martelos.

As partículas separadas por diferentes tamanhos foram submetidas à análise de aminas bioativas. As aminas foram extraídas com 7 mL de TCA 5%, agitadas em mesa agitadora por 10 min e centrifugadas a 11.180 *g* a 4 °C por 21 min. A extração foi repetida por mais duas vezes, com 7 e 6 mL e os filtrados foram combinados.

#### **II.2.2.2 Estudo da influência de extrações sucessivas e repouso sob refrigeração na recuperação de aminas bioativas de café cru**

As condições de extração otimizadas nas etapas anteriores foram adotadas para verificar a influência de extrações sucessivas e repouso sob refrigeração na recuperação de dez aminas bioativas em amostras de café cru. Foram testadas uma única extração e três extrações consecutivas, com e sem repouso a 4 °C por 12 h.

A amostra de café foi triturada e peneirada em tamises de 9 e 20 mesh e as partículas retidas na peneira de 20 mesh foram recolhidas. Em seguida 5 g da amostra foi adicionada de 30 mL de TCA 5%, agitada em mesa agitadora (Tecnal TE – 140, Piracicaba, SP) por 10 min, centrifugada a 11.180 *g* a 4 °C por 21 min e filtrada em papel de filtro qualitativo. O mesmo procedimento foi repetido porém, após a adição do

TCA 5%, a amostra foi mantida em repouso sob refrigeração a 4 °C por 12 h. O procedimento também foi conduzido por meio de três extrações consecutivas com e sem repouso a 4 °C por 12 h. Foram adicionados 10 mL de TCA 5% a 5 g de amostra de café cru. Em seguida foram agitadas, centrifugadas e filtradas em papel de filtro qualitativo como descrito acima. A extração foi repetida por mais duas vezes (com 10 mL cada) e os extratos foram combinados. As extrações foram realizadas em triplicata.

#### **II.2.2.4 Determinação de aminas bioativas por CLAE-par iônico**

Todos os extratos obtidos foram filtrados em membrana HAWP de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp. Milford, MA, EUA). As aminas foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência por par iônico, derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído (OPA) e detecção fluorimétrica, conforme metodologia descrita por CIRILO et al. (2003).

A análise cromatográfica foi efetuada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, modelo LC-10 AD, com a mistura à baixa pressão; conjunto de lavagem automática de pistão; injetor automático Shimadzu modelo SIL – 10 ADVP conectado a um detector espectrofluorimétrico modelo RF-10 AXL a 340 nm de excitação e 445 nm de emissão e um controlador CBM-20 A (Shimadzu, Kyoto, Japão) 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, protegido da luz, de 2 m de comprimento e 0,25 cm de diâmetro conectado entre a câmara de mistura e o detector e a bomba LC-10 AD (Shimadzu, Kyoto, Japão).

Foi utilizada uma coluna µBondapak C18 em fase reversa 3,9 x 300 mm, 10 µm e pré-coluna µBondapak C18 (Waters, Milford, MA) e sistema gradiente de eluição em ambiente com temperatura controlada ( $20 \pm 1$  °C). As fases móveis foram: A - solução 0,2 M de acetato de sódio e 15 mM de octanosulfonato de sódio, pH 4,9 ajustado com ácido acético e B - acetonitrila. O fluxo de análise foi de 0,8 mL/min.

O reagente de derivação consistiu de 0,2 g de OPA dissolvido em 3 mL de metanol e 500 mL de uma solução de 25 g de ácido bórico e 22 g de KOH (pH 10,5), 1,5 mL de Brij-35 e 1,5 mL de mercaptanol. A solução derivante foi preparada diariamente, mantida ao abrigo da luz e bombeada à câmara de mistura a um fluxo de 0,4 mL/min.

A identificação das aminas foi feita por comparação do tempo de retenção das aminas na amostra em relação ao padrão e também pela adição de solução da amina suspeita à amostra. O cálculo da concentração das aminas foi feito por interpolação nas respectivas curvas analíticas.

### **II.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados obtidos foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade SIGMA STAT 2.0 (Systat Software Inc, Richmond, CA, USA).

## **II.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **II.3.1 Influência do ácido extrator na recuperação das aminas bioativas de café cru**

Na tabela II.1 estão apresentados os percentuais de recuperação das dez amina bioativas livres extraídas com diferentes ácidos extratores do café cru, após adição de 1 e 10 mg de cada uma das aminas em 100 g da amostra.

Observou-se que o TCA foi o extrator mais eficiente para a extração de aminas livres em grãos de café. A recuperação média da agmatina (110 %) foi a maior, seguida da putrescina (96 %), espermina (93 %), espermidina (88 %) e tiramina (85 %). Estes resultados confirmam os dados obtidos por CASAL et al. (2002) que, após avaliarem a eficiência de diferentes extratores, indicaram o TCA como a melhor escolha para análise de aminas em café.

Avaliando-se a recuperação de cada amina separadamente, observa-se que a triptamina foi a amina que apresentou menor índice de recuperação, abaixo de 50% para os três extratores avaliados. Na extração com TCA, triptamina (25%), histamina (49%) e feniletilamina (53%) apresentaram os menores percentuais de recuperação. Já o ácido perclórico recuperou percentuais menores ainda, triptamina (11%), histamina (30%) e agmatina (31%). A agmatina apresentou 48% de recuperação na extração com HCl, enquanto que a triptamina não foi recuperada. Resultados semelhantes foram relatados por CASAL et al. (2002) para histamina com recuperações de 4% a 35%.

**Tabela II.1.** Influência do ácido extrator na recuperação das aminas livres em amostras de café adicionadas de 1 e 10 mg de padrão por 100 g de amostra

Aminas	% de Recuperação (% CV)		
	TCA 5% m/v	HCl 1 mol/L	HClO <sub>4</sub> 0,4 mol/L
<b>Putrescina</b>			
1 mg/100 g	100 (3) <b>c, x</b>	107 (3) <b>b, x</b>	116 (2) <b>a</b>
10 mg/100 g	91 (2) <b>b, y</b>	93 (5) <b>b, y</b>	125 (6) <b>a</b>
<b>Cadaverina</b>			
1 mg/100 g	115(2) <b>a</b>	48 (34) <b>c, y</b>	73 (4) <b>b</b>
10 mg/100 g	114 (5) <b>a</b>	80 (7) <b>b, x</b>	81 (8) <b>b</b>
<b>Histamina</b>			
1 mg/100 g	47 (7) <b>b</b>	96 (13) <b>a, y</b>	24 (9) <b>c, y</b>
10 mg/100 g	50 (8) <b>b</b>	149 (11) <b>a, x</b>	36 (2) <b>c, x</b>
<b>Tiramina</b>			
1 mg/ 100 g	80 (11) <b>a</b>	69 (5) <b>b, y</b>	75 (10) <b>a, b</b>
10 mg/100 g	90 (5) <b>a</b>	83 (5) <b>b, x</b>	78 (5) <b>b</b>
<b>Serotonina</b>			
1 mg/100 g	57(14) <b>y</b>	66 (24)	59 (18)
10 mg/100 g	92 (11) <b>a, x</b>	68 (8) <b>b</b>	84 (21) <b>a</b>
<b>Agmatina</b>			
1 mg/100 g	101 (10) <b>a, y</b>	50 (2) <b>b</b>	30 (4) <b>c</b>
10 mg/100 g	118 (2) <b>a, x</b>	47 (5) <b>b</b>	32 (8) <b>c</b>
<b>Espermidina</b>			
1 mg/100 g	84 (7)	86 (11)	81 (12)
10 mg/100 g	93 (14) <b>a</b>	76 (5) <b>b</b>	86 (15) <b>a, b</b>
<b>Espermina</b>			
1 mg/100 g	99 (6) <b>a</b>	76 (10) <b>b, y</b>	123 (18) <b>a</b>
10 mg/100 g	88 (11) <b>c</b>	158 (8) <b>a, x</b>	133 (5) <b>b</b>
<b>Feniletilamina</b>			
1 mg/100 g	46 (23) <b>c</b>	68 (7) <b>b</b>	83 (7) <b>a</b>
10 mg/100 g	61 (8) <b>b</b>	79 (17) <b>a</b>	74 (19) <b>b</b>
<b>Triptamina</b>			
1 mg/100 g	25 (7) <b>a</b>	0	0 <b>y</b>
10 mg/100 g	24 (5) <b>a</b>	0	11 (21) <b>b, x</b>

CV: coeficiente de variação; TCA: ácido tricloroacético; HCl: ácido clorídrico; HClO<sub>4</sub>: ácido perclórico. Valores com letras diferentes para cada linha (a-c) ou coluna (x-y) são significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ , teste de Duncan).

Para um método analítico quantitativo ser adequado, os percentuais de recuperação devem estar entre 80% e 110% e os coeficientes de variação não podem ser maiores do que 15% (CODEX, 1993). Levando-se em consideração esses critérios, nenhum dos extratores testados apresentou eficiência na extração das dez aminas simultaneamente. De acordo com os dados apresentados na Tabela II.2 o TCA recuperou um maior número de aminas, seguido do HClO<sub>4</sub> e HCl, confirmando a sua maior eficiência na extração das aminas do café.

**Tabela II.2.** Eficiência dos extratores ácidos avaliados segundo os critérios do CODEX (1993)

Concentração adicionada	Extratores		
	TCA 5% m/v	HCl 1 mol/L	HClO <sub>4</sub> 0,4 mol/L
1 mg/100 g	PUT, TIM, AGM, SPD, SPM	PUT, HIM, SPD	PUT, TIM, SRT, SPD, SPM, PHE
10 mg/100 g	PUT, TIM, SRT, AGM, SPD, SPM	PUT, CAD, TIM	CAD, SRT, SPD

PUT = putrescina; CAD = cadaverina; TIM = tiramina; HIM = histamina; SRT = serotonina; AGM = agmatina; SPD = espermidina; SPM = espermina; PHE = feniletilamina.

O ácido clorídrico tem sido citado na literatura como um bom extrator para diferentes matrizes, principalmente para queijo (INNOCENT et al., 2006; CUSTÓDIO et al., 2007). Porém alguns autores relataram que esse ácido originava um extrato muito turvo (ANTOLINI et al., 1999; CASAL et al. 2002). Esse fato também foi observado durante a execução deste experimento, sendo que o extrato obtido na extração com HCl apresentou elevada turbidez. CASAL et al. (2002), ao observarem a turbidez do extrato, descartaram o uso de HCl como um possível extrator de aminas em café. A eficiência do HCl na recuperação das aminas do café foi significativamente menor quando comparado com os ácidos tricloroacético e perclórico.

A eficiência do ácido perclórico na extração das aminas do café foi menor em relação ao ácido tricloroacético. As porcentagens de recuperação variaram de 81% a 86% para as aminas cadaverina, espermidina e feniletilamina. Esses resultados foram inferiores aos obtidos por CASAL et al. (2002) que relataram uma recuperação de 100% para a espermidina. O uso do ácido perclórico na extração de aminas já foi relatado em matrizes de origem vegetal (LAVIZZARI et al., 2006) com porcentagens de

recuperação que variaram de 87 a 110% (espinafre), 86 a 97% (banana) e 82 a 94% (batata). Porém seu uso é limitado por ser explosivo.

Avaliando-se a eficiência de extração dos ácidos testados em relação à concentração do padrão adicionado (Tabela II.1) observa-se que a concentração de padrão adicionada influenciou significativamente na recuperação de algumas aminas durante a extração. Essa influência foi maior na extração com HCl, seguido do TCA e HClO<sub>4</sub>. Para a maioria das aminas pesquisadas, as recuperações foram maiores nas amostras adicionadas de 10 mg de padrão por 100 g de amostra.

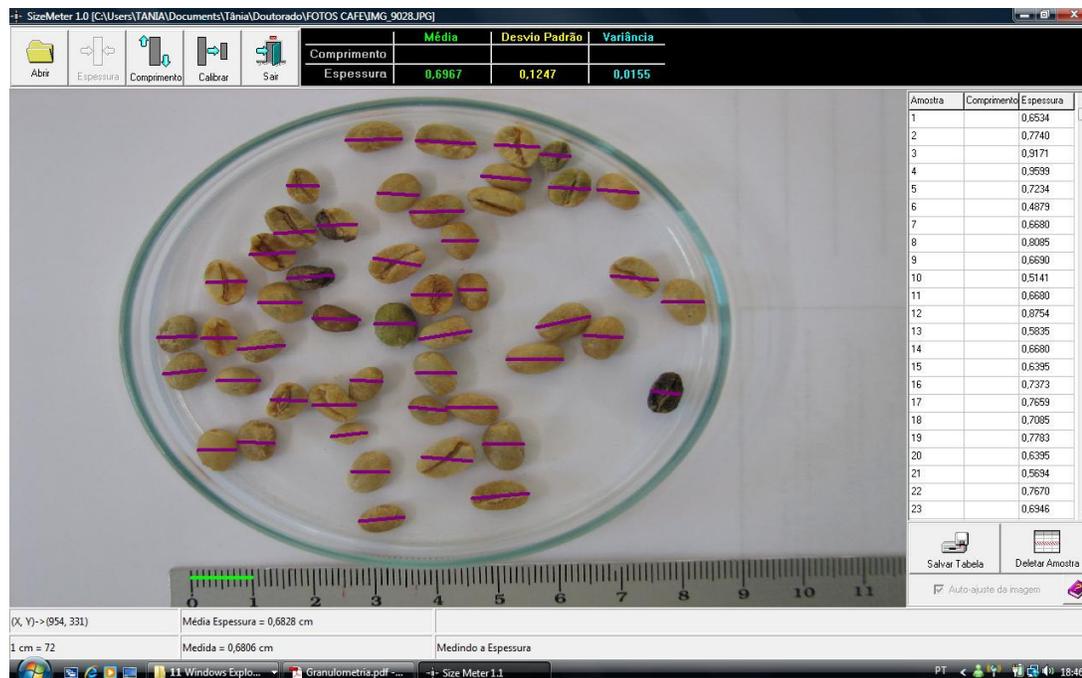
Nas amostras adicionadas de 1 mg/100 g de padrão de aminas, o HCl foi o extrator menos eficiente, exceto para a histamina (96%) e putrescina (107%). O ácido perclórico extraiu eficientemente a feniletilamina e espermidina (81 - 83%) e o TCA foi eficiente na extração da putrescina, tiramina, agmatina, espermidina e espermina (80 - 101%), a cadaverina foi recuperada em 116% e as demais abaixo de 80%.

Nas amostras adicionadas de 10 mg de padrão por 100 g de café, o ácido clorídrico foi eficiente apenas para putrescina, cadaverina e histamina com porcentagens de recuperação de 80% a 93%. O ácido perclórico recuperou eficientemente cadaverina (81%) e espermidina (86%), a serotonina também foi recuperada (84%), porém, o coeficiente de variação foi inadequado (21%). A eficiência na recuperação das aminas pelo ácido tricloroacético foi adequada para putrescina, tiramina, serotonina, espermidina e espermina (88 - 93%). As aminas cadaverina e agmatina foram recuperadas com porcentagens de 114 e 118%, respectivamente. CUSTÓDIO et al. (2007) observaram comportamento semelhante ao extraírem aminas de queijo ralado com TCA 5%.

### **II.3.2 Influência da granulometria na extração das aminas bioativas do café cru**

Durante a execução deste experimento, os grãos de café foram fotografados antes e após a moagem para inferir sobre o grau de redução do tamanho dos grãos de café. Desta forma, os grãos do café, ao entrarem na primeira moagem no moinho de rolos, apresentaram um diâmetro médio de 7,0 mm (Figura II.2). Os grãos de café foram moídos no moinho de rolos e no moinho de martelos. O moinho de martelos é muito utilizado para a redução do tamanho de partículas e produz um material mais fino que o moinho de rolos (BRENNAN, 1998). Nas Figuras I.3 e I.4, estão apresentadas as

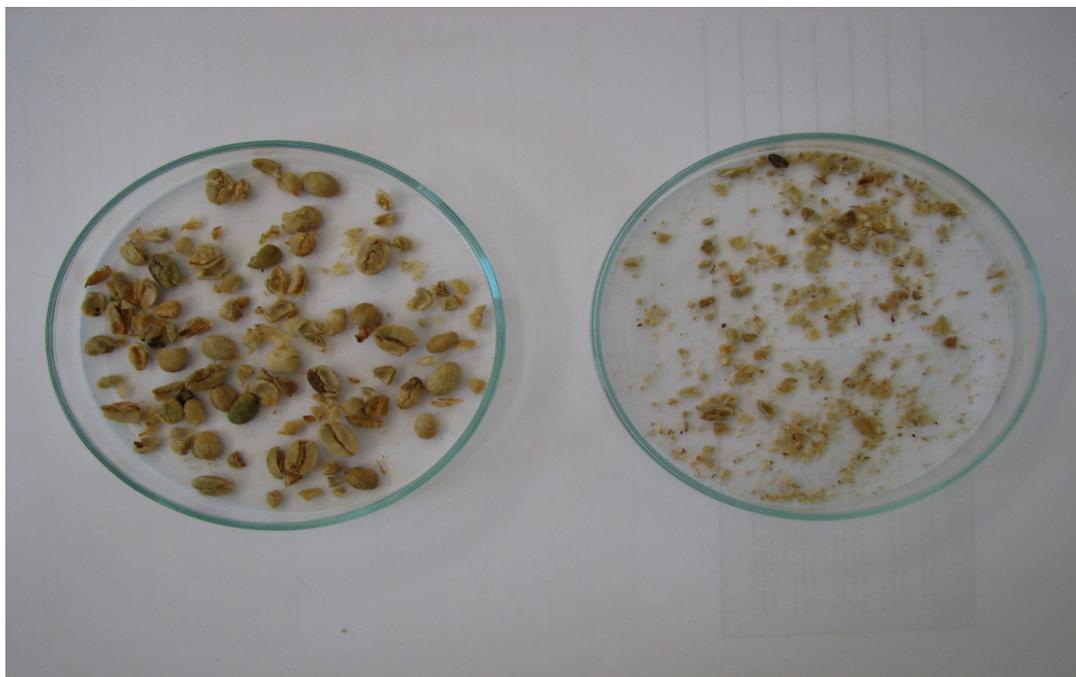
imagens do grão do café verde e as partículas trituradas após as três moagens feitas nos moinhos de rolos e de martelos.



**Figura II.2.** Medida do diâmetro dos grãos de café inteiros (Size Meter 1.1).



**Figura II.3.** Grãos de café inteiros e após uma moagem no moinho de rolos.



**Figura II.4.** Grãos de café após duas moagem em moinho de rolos seguida de uma moagem no moinho de martelos.

Na tabela II.3 estão apresentados os dados da análise granulométrica com as porcentagens de retenção das partículas dos grãos de café após duas moagens no moinho de rolos e uma no moinho de martelos.

**Tabela II.3.** Porcentagem de retenção das partículas dos grãos de café após moagem nos moinhos de rolos e martelos

Tamis (mesh)	Abertura (mm)	% de Retenção das partículas / Moinhos		
		Rolos		Martelos
		Uma vez	Duas vezes	
4	4,75	38,1	2,5	0,5
8	2,36	58,9	47,7	3,1
9	2,00	2,0	23,9	4,4
20	0,85	0,7	12,9	51,9
28	0,60	0,2	11,0	19,4
32	0,50	0,0	1,0	14,9
60	0,25	0,0	0,6	4,4
Fundo	0	0,0	0,5	1,4

Conforme relatado anteriormente, os grãos de café, ao entrarem na primeira trituração apresentaram um diâmetro médio de 7,0 mm. Após a análise granulométrica, os sistemas particulados apresentaram diâmetro médio de 3,3 mm e 2,1 mm para a primeira e segunda moagem no moinho de rolos, respectivamente, e de 0,7 mm após a moagem no moinho de martelos. Desta forma foi evidenciada uma redução de 2,1; 3,3 e 10 para os moinhos de rolos e martelos. Os dados obtidos estão semelhantes aos encontrados por CABRAL (2007) que, após submeter grãos de café com diâmetro médio de 7,5 mm a moagem no moinho de rolos, evidenciou uma redução de 3,4 vezes no tamanho de grãos do café.

O volume de extrato recuperado após a extração das aminas no café separado nas diferentes peneiras estão apresentados na Tabela II.4. A trituração dos grãos em tamanhos diferentes influenciou o volume do extrato recuperado. Para os grãos retidos nas peneiras de 28, 32 e 60 mesh, os quais apresentaram diâmetro das partículas menores que 0,85 mm, o volume recuperado foi significativamente menor em relação ao volume recuperado na extração das aminas do café moído cujo diâmetro das partículas está compreendido entre 4,75 a 0,85 mm. Para partículas retidas nas peneiras 9 e 20 mesh, com diâmetro compreendido entre 2,0 e 0,85 mm, o volume de extração recuperado foi significativamente menor em relação aos grãos retidos nas peneiras 4 e 8 mesh.

**Tabela II.4** – Volume de extrato recuperado na extração das aminas

Peneira			Extrato
Tyler (mesh)	ABNT (mesh)	Abertura da malha (mm)	Volume médio recuperado (mL)
4	4	4,75	13,6 ± 0,3 <b>a</b>
8	8	2,36	13,0 ± 0,1 <b>a</b>
9	10	2,00	11,2 ± 0,3 <b>b</b>
20	20	0,85	11,1 ± 0,5 <b>b</b>
28	30	0,60	7,3 ± 0,1 <b>c</b>
32	35	0,50	7,5 ± 0,2 <b>c</b>
60	60	0,25	7,4 ± 0,1 <b>c</b>

Valores com letras diferentes na mesma coluna a, b e c são diferentes (Teste de Duncan,  $p \leq 0,05$ ).

Baseado nestes resultados, quanto maior o grau de trituração dos grãos e, conseqüentemente, menor o tamanho das partículas, a recuperação do extrato não era eficiente. Na extração efetuada no café moído e retido nas peneiras 28, 32 e 60 mesh, ao adicionar a primeira porção do ácido no café, esta era totalmente incorporada nos grãos, desta forma não se conseguiu uma separação do ácido durante a centrifugação. Somente após a segunda adição do ácido e subsequente extração, o extrato foi separado e recuperado. Desta forma, para não prejudicar a eficiência da extração, um volume adicional do ácido extrator teve de ser adicionado.

Na tabela II.5 observa-se os teores das dez aminas pesquisadas nos grãos de café submetidos a moagem e separados por diferença de tamanho. Deve-se lembrar que quanto maior o mesh (quantidade de aberturas da malha do tamis por polegadas) menor é o tamanho das partículas.

**Tabela II.5** – Teores de aminas bioativas extraídos de grãos de café cru de diferentes tamanhos de partículas

Aminas	Teores de aminas (mg/100 g) (% CV) / Granulometria (mesh)						
	4	8	9	20	28	32	60
<b>Putrescina</b>	0,28 (9) c	0,53 (6) a	0,57 (9) a	0,57 (12) a	0,62 (5) a	0,63 (13) a	0,47 (2) b
<b>Tiramina</b>	0,28 (1) b	0,42 (6) a	0,53 (4) a	0,55 (12) a	0,55 (14) a	0,52 (12) a	0,54 (6) a
<b>Serotonina</b>	0,21 (8) c	0,24 (6) c	0,43 (8) b	0,41 (14) b	0,41 (15) b	0,66 (10) a	0,44 (7) b
<b>Espermidina</b>	0,13 (8) c	0,23 (9) c	0,31 (6) b	0,32 (14) b	0,31(15) b	0,50 (6) a	0,27 (13) b
<b>Espermina</b>	0,09 (12) b	0,15 (19) a	0,14 (18) a	0,15 (16) a	0,19 (32) a	0,11 (36) a	0,19 (29) a
<b>Feniletilamina</b>	0,09 (9) c	0,04 (27) c	0,06 (54) c	0,11(33) b	0,12 (56) b	0,22 (7) a	0,14 (55) b

CV: coeficiente de variação; nd: não detectado. Valores com letras diferentes em uma mesma linha são significativamente diferentes (Teste de Duncan,  $p \leq 0,05$ ).

Dentre as dez aminas pesquisadas no café foram detectadas seis. Estes resultados são similares aos reportados por CASAL et al. (2004), ou seja, a presença destas aminas já havia sido relatada em grãos de café cru. Nas partículas dos grãos retidos na peneira de 4 mesh (4,75 mm), cujo tamanho é maior em relação às demais peneiras, os teores recuperados foram significativamente menores para a maioria das aminas detectadas no café. Para as partículas retidas na peneira de 60 mesh (0,25 mm), esperava-se uma maior recuperação devido ao menor tamanho das mesmas e, conseqüente maior superfície de contato do solvente com as partículas. Entretanto, observou-se uma diferença significativa nos teores recuperados. Para duas das seis

aminas detectadas, os teores de aminas recuperados foram significativamente menores em relação aos encontrados na peneira de 32 mesh. Estes resultados sugerem que uma trituração excessiva, pode trazer efeitos deletérios na extração de aminas da matriz. O que pode ter sido ocasionado pela elevação da temperatura do grão durante a moagem no moinho de rolos e martelos.

De acordo com BRENNAN (1998), a redução de tamanho de uma matriz serve para auxiliar a extração do constituinte desejado, sendo que a velocidade de extração de um soluto cresce proporcionalmente com a área de contato disposta entre o sólido e o solvente. Entretanto, com os resultados apresentados na tabela II.4, verifica-se que para a extração das aminas do grão do café cru, o mesmo não deve ser reduzido em partículas de tamanhos inferiores a 0,50 mm, o que pode comprometer o rendimento da extração.

Nas partículas retidas nas peneiras 9, 20 e 32, os teores recuperados não sofreram interferência do tamanho das mesmas para a maioria das aminas detectadas no café. Os teores das aminas detectadas nas diferentes granulometrias avaliadas apresentaram coeficientes de variação adequados para a maioria das peneiras, de acordo com CODEX (1993), que estabelece um coeficiente de variação de no máximo 15 % para analitos de concentração acima de 0,01 mg/100 g da amostra. Exceto para a espermina e feniletilamina cuja % CV foi adequado somente para a peneira 4.

Baseado nestes resultados e levando em consideração o volume de extrato recuperado, a extração das aminas dos grãos de café cru deve ser conduzida com amostras submetidas a trituração e separação, com partículas apresentando diâmetro compreendido entre 2,00 a 0,85 mm, o que equivale a peneirar a amostra em peneiras de 9 a 20 mesh.

### **II.3.3 Influência de extrações sucessivas e repouso sob refrigeração na recuperação de aminas bioativas de café cru**

Os tipos e teores das aminas detectadas nas amostras de café submetidas a diferentes números de extração estão apresentados na Tabela II.6. Das nove aminas pesquisadas foram detectadas espermidina, espermina, putrescina, tiramina e serotonina, com teores totais que variaram de 0,39 a 1,23 mg/100 g de café. As aminas cadaverina, histamina, agmatina, feniletilamina e triptamina não foram

detectadas nas amostras analisadas. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores em que estas aminas não haviam sido detectadas em amostras de café robusta cru, ou foram detectadas em baixos teores (CASAL et al., 2004).

De acordo com os dados apresentados na Tabela II.6, apenas para os teores totais de aminas foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os procedimentos avaliados, sendo que três extrações sucessivas, após repouso a 4 °C por 12 h apresentou maior recuperação.

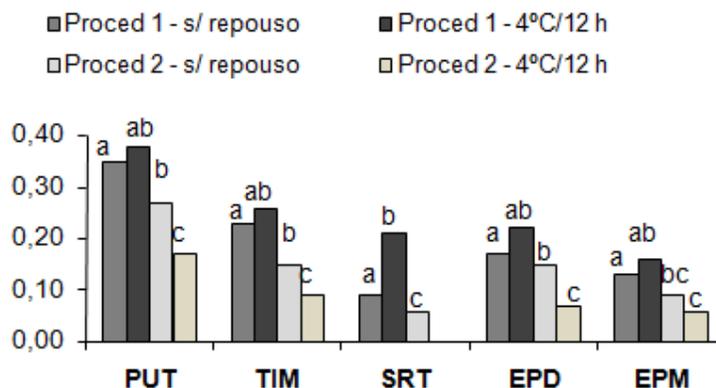
**Tabela II.6** – Teores de aminas bioativas em café cru extraídas por meio de uma ou três extrações sucessivas na presença ou não de repouso

Aminas	Teores de aminas em mg/100 g (% CV)			
	três extrações		uma extração	
	s/ repouso	4 °C/ 12 h	s/ repouso	4 °C/ 12 h
<b>Putrescina</b>	0,35 (3) <b>ab</b>	0,38 (13) <b>a</b>	0,17 (9) <b>c</b>	0,27 (20) <b>b</b>
<b>Tiramina</b>	0,23 (7) <b>a</b>	0,26 (2) <b>a</b>	0,09 (8) <b>c</b>	0,15 (13) <b>b</b>
<b>Serotonina</b>	0,09 (15) <b>b</b>	0,21 (7) <b>a</b>	nd	0,06 (18) <b>c</b>
<b>Espermidina</b>	0,17 (6) <b>ab</b>	0,22 (8) <b>a</b>	0,07 (26) <b>c</b>	0,15 (25) <b>b</b>
<b>Espermina</b>	0,13 (10) <b>ab</b>	0,16 (15) <b>a</b>	0,06 (14) <b>bc</b>	0,09 (24) <b>c</b>
<b>Total</b>	0,96 (6) <b>b</b>	1,23 (9) <b>a</b>	0,39 (10) <b>d</b>	0,68 (19) <b>c</b>

CV: coeficiente de variação. Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (Teste de Duncan,  $p \leq 0,05$ ).

Avaliando cada amina separadamente, as três extrações sucessivas forneceram valores significativamente maiores para putrescina, tiramina, espermidina e espermina. Entretanto, a etapa de repouso sob refrigeração não influenciou na recuperação destas aminas. Apenas para a serotonina os procedimentos avaliados apresentaram diferenças significativas, sendo que com uma única extração esta amina não foi detectada. A influência dos procedimentos avaliados sobre cada amina estão demonstrados na Figura II.5.

Os resultados obtidos estão em acordo com CUSTÓDIO et al. (2007), que avaliaram a influência de extrações consecutivas na determinação de aminas bioativas em amostras de queijo ralado. Os autores concluíram que, para uma melhor recuperação das aminas, a etapa de extração deve ser conduzida com três extrações consecutivas.



**Figura II.5.** Influência dos procedimentos de extração sobre a extração de cada amina. Proc 1 = 03 extrações; Proc 2 = 01 extração. PUT: putrescina; TIM: tiramina; ESD: espermidina; ESM: espermina

De acordo com o CODEX (1993), para métodos quantitativos com concentrações do analito acima de 0,01 mg/100 g, o coeficiente de variação deve ter valor máximo de 15%, desta forma os resultados obtidos estão de acordo com esta recomendação para o procedimento conduzido com três extrações sucessivas. O procedimento realizado com apenas uma extração, sem a etapa de repouso, apresentou coeficiente de variação acima de 15% para a espermidina. Para as aminas extraídas por meio de uma única extração, seguida de repouso sob refrigeração, este procedimento apresentou CV acima do estabelecido pelo CODEX (1993) para a maioria das aminas detectadas.

## II.4 CONCLUSÕES

Maiores percentuais de recuperação de aminas bioativas foram obtidos após moagem e separação dos grãos de café nas peneiras de 9, 20, 28 mesh, não havendo diferença significativa entre elas. Desta forma, sugere-se que a extração das aminas bioativas do café seja conduzida com amostras submetidas à moagem e peneiramento em partículas de diâmetro entre 0,85 mm e 2,0 mm, o que corresponde a passar por peneiras de 9 e 20 mesh.

Uma quantidade maior de reagente extrator deve ser utilizada na extração para minimizar o efeito da absorção do extrator pelas partículas do grão.

Para uma recuperação mais eficiente das aminas na etapa de extração, a mesma deve ser conduzida com o ácido tricloroacético na concentração de 5% m/v, por meio de três extrações consecutivas, não havendo necessidade de repouso sob refrigeração antes da extração.

## CAPÍTULO III. OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ÁCIDA NA DETERMINAÇÃO DAS AMINAS CONJUGADAS EM CAFÉ

### RESUMO

Assim como a etapa de extração das aminas da matriz é importante na pesquisa de aminas bioativas livres a etapa de hidrólise também influencia de forma significativa os resultados, na determinação de aminas conjugadas do café. Com o objetivo de obter melhores condições de hidrólise das aminas conjugadas em amostras de café, os parâmetros concentração do ácido clorídrico, temperatura e tempo de reação foram testados. O ácido clorídrico foi avaliado nas concentrações de 1, 3, 6, 9 e 12 mol/L. As temperaturas e tempos das reações testadas foram ambiente e 110 °C e 16, 18, 20 e 24 h. A eficiência da etapa de hidrólise foi afetada pelos parâmetros avaliados. A hidrólise das aminas conjugadas foi significativamente mais eficiente quando conduzida com o ácido clorídrico nas concentrações de 9 e 12 mol/L. Porém a temperatura de 110 °C foi mais eficiente apenas para a putrescina. A duração da reação influenciou significativamente na etapa de hidrólise, sendo os melhores resultados obtidos com 18, 20 e 24 h de reação. A estabilidade de dez aminas livres frente a reação de hidrólise foi testada evidenciando instabilidade das aminas livres tiramina, histamina, serotonina e triptamina durante a reação de hidrólise.

**Palavras-chave:** café, aminas conjugadas, hidrólise ácida.

### III.1 INTRODUÇÃO

As aminas estão presentes nas plantas na forma livre ou conjugada a moléculas de baixo peso molecular (ácidos fenólicos) ou a macromoléculas (proteínas) (FONTANIELLA et al., 2001; FONTANIELLA et al., 2003). A conjugação das aminas com os ácidos fenólicos (p-cumárico, ferúlico e caféico) consiste em uma ligação covalente entre o grupo amina das aminas bioativas e o grupo carboxílico dos ácidos hidroxicinâmicos (HCAs). O resultado desta conjugação é conhecido como amidas de ácidos hidroxicinâmicos – HCAAs (WALTERS, 2003). As HCAAs básicas constituídas por aminas alifáticas como a putrescina, espermidina e espermina são hidrossolúveis enquanto que as HCAAs neutras, aquelas constituídas por aminas aromáticas como a tiramina, octopamina e triptamina, são insolúveis em água (FACCHINI et al., 2002).

Em plantas, as poliaminas são comumente conjugadas com ácidos hidroxicinâmicos como o ácido cumárico, ferúlico e caféico. A proporção entre as formas livre e conjugada varia muito entre as diferentes espécies de plantas (TIBURCIO et al., 1997; BAGNI & TASSONI, 2001). A conjugação se dá por meio da formação de uma ligação amida, na qual ésteres de coenzima A (COA) fornecem o grupo carboxil ativado. A putrescina e a espermidina são conjugadas por transferases, que diferem em sua especificidade para os derivados hidroxicinamoil-CoA. Desta forma, a enzima putrescina hidroxicinamoil transferase (PHT; EC 2.3.1.) catalisa a transferência de ácidos hidroxicinâmicos entre a CoA e a putrescina. Assim, a reação entre cafeoil-CoA e putrescina produz uma amida do ácido hidroxicinâmico denominada cafeoilputrescina (WALTERS, 2003). A putrescina normalmente forma monômeros com o ácido cumárico, caféico e ferúlico (BAGNI & TASSONI, 2001).

De acordo com MARTIN-TANGUY et al. (1978), as poliaminas conjugadas estão presentes em um grande número de famílias de plantas, sendo o principal constituinte fenólico de órgãos reprodutivos e sementes de aproximadamente 20 espécies de plantas. A conjugação entre poliaminas e ácidos fenólicos tem sido observada em muitas plantas com flores (HENNION & TANGUY, 1999; FONTANIELLA et al., 2001). Estes compostos são acumulados depois da indução floral, no ápice da floração (FONTANIELLA et al., 2001). De acordo com HENNION & TANGUY (1999), o aumento na concentração de aminas conjugadas em folhas de plantas é devido à presença de infecções virais e fúngicas, bem como, à mudanças ambientais severas como deficiência de minerais, hipóxia e poluentes ambientais.

De acordo com a literatura as aminas conjugadas são quantificadas em sua forma livre, após uma etapa de extração, pelo procedimento de hidrólise ácida (ARMAS et al., 1999; RODRIGUEZ et al., 2000; FONTANIELLA et al., 2003). Diferentes procedimentos de hidrólise têm sido empregados na determinação das aminas conjugadas, porém o mais utilizado é a hidrólise ácida, sendo o ácido clorídrico o reagente mais empregado. O ácido clorídrico tem sido utilizado em concentrações que variam de 6 a 12 mol/L, com aquecimento a 110 °C ou à temperatura ambiente por um tempo de 10 a 24 horas. Na análise de aminas conjugadas em amostras de café, CASAL et al. (2004, 2005) efetuaram a hidrólise com HCl 12 M a 110 °C por 18 h.

Diante de diferentes condições de hidrólise disponíveis na literatura, mais estudos são necessários para otimizar as condições de análises para determinação de aminas conjugadas em amostras de café. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estabelecer os parâmetros de hidrólise (concentração do ácido, tempo e temperatura) que promovam uma recuperação eficiente das aminas livres na determinação de aminas conjugadas.

## **III.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **III.2.1 MATERIAL**

#### **III.2.1.1 Amostra**

Para realização deste experimento foram utilizadas amostras de café cru em grão da espécie robusta (*Coffea canephora* var. Robusta). Todos os experimentos foram realizados com três repetições e as amostras analisadas em triplicata.

#### **III.2.1.2 Reagentes**

Os reagentes utilizados possuíam grau analítico, exceto os solventes usados no CLAE (acetonitrila), que eram de grau cromatográfico. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). Os padrões de aminas bioativas (diidrocloreto de putrescina (PUT), diidrocloreto de cadaverina (CAD), diidrocloreto de histamina (HIM), hidrocloreto de

tiramina (TIM), tetraidrocloreto de espermina (EPM), triidrocloreto de espermidina (EPD) complexo sulfato creatinina agmatina (AGM), hidrocloreto de 2-feniletilamina (FEA), hidrocloreto de 5-hidroxitriptamina (serotonina – SRT), foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). As fases móveis foram filtradas em membrana (47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho de poro, Millipore Corp., Milford, MA, EUA) HAWP e HVWP para reagentes aquosos e solventes orgânicos, respectivamente.

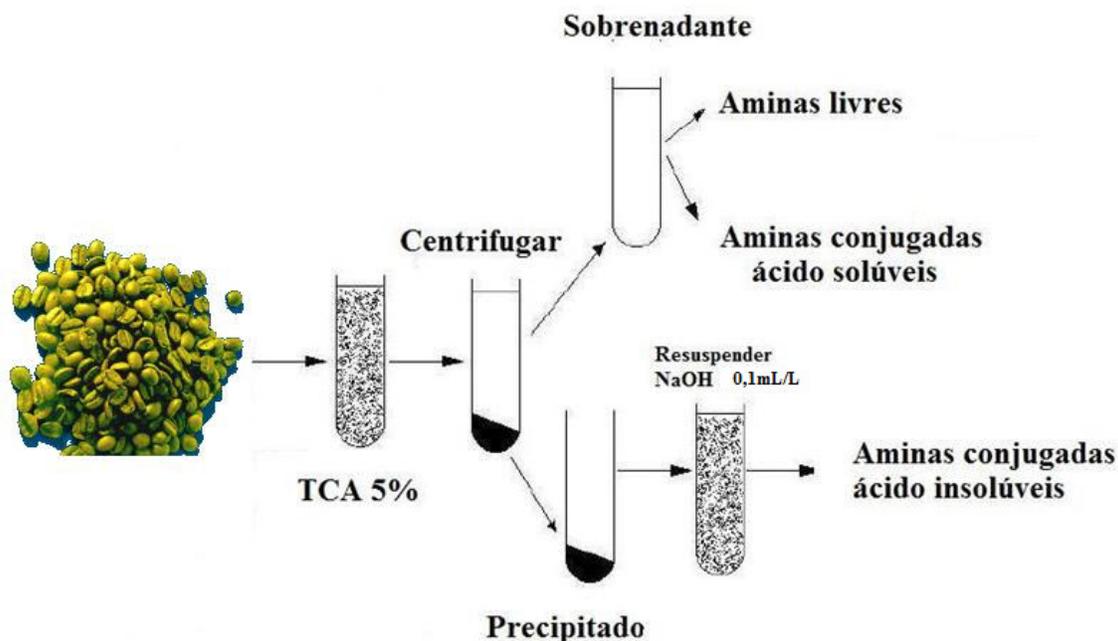
## **III.2.2 MÉTODOS**

### **III.2.2.1 Extração das aminas**

As aminas foram extraídas da matriz café conforme metodologia otimizada descrita no capítulo I. Os grãos de café foram triturados e separados em peneiras de 9 e 20 mesh, sendo as partículas retidas na peneira 20 mesh selecionada para análise.

Foram adicionados 10 mL de TCA 5% a 5 g de amostra de café cru. Em seguida foram agitados em mesa agitadora por 10 minutos, centrifugadas a 11.180 g a 4 °C por 21 minutos e filtradas em papel de filtro qualitativo. A extração foi repetida mais duas vezes, com adição de 10 e 10 mL de TCA 5%, os extratos foram combinados e o volume final anotado. O extrato foi filtrado em membrana HAWP de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro.

No extrato foram pesquisadas as aminas livres e as aminas conjugadas ácido solúveis. No resíduo obtido durante a extração foram pesquisadas as aminas conjugadas ácido insolúveis (Figura III.1).



**Figura III.1** – Esquema geral da análise de aminas conjugadas.

### III.2.2.2 Estudo da influência da concentração do ácido clorídrico na hidrólise das aminas conjugadas

Foram testadas cinco concentrações do ácido clorídrico: 1, 3, 6, 9 e 12 mol/L. O extrato e o resíduo sólido obtidos durante a extração das aminas dos grãos de café foram submetidos a hidrólise para liberação das aminas de sua forma conjugada.

Uma alíquota do sobrenadante obtido na etapa de extração das aminas do café (2 mL) foi adicionada de 2 mL de HCl nas concentrações descritas acima e submetido a hidrólise por 24 horas à temperatura ambiente. Ao término do tempo de hidrólise, o hidrolisado foi filtrado, concentrado a 40 °C sob corrente de ar e, em seguida, ressuspenso com 1 mL de TCA 5%. A amostra foi filtrada em membrana HAWP de 0,45 µm de tamanho de poro.

O resíduo obtido na etapa de extração foi adicionado de 20 mL de NaOH 0,1 mol/L. A uma alíquota do resíduo ressuspenso (2 mL) foi adicionado 2 mL de HCl nas concentrações de 1, 3, 6, 9 e 12 mol/L e hidrolisados a temperatura ambiente por 24 horas. O hidrolisado foi filtrado, concentrado a 40 °C sob corrente de ar e, em seguida,

ressuspendido com 1 mL de TCA 5%. A amostra foi filtrada em membrana HAWP de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamanho de poro.

### **III.2.2.3 Estudo da influência da temperatura na hidrólise das aminas conjugadas**

O procedimento descrito na etapa anterior foi modificado para verificar a influência da temperatura na hidrólise das aminas. O extrato e o resíduo obtidos na etapa de extração da matriz foram adicionados de HCl nas concentrações de 1, 3, 6, 9 e 12 mol/L e hidrolisados a temperatura de 110  $^{\circ}\text{C}$  por 24 horas em bloco de aquecimento (Dry Block TE-21, Tecnal, SP). O hidrolisado foi filtrado, concentrado a 40  $^{\circ}\text{C}$  sob corrente de ar e, em seguida, ressuspendido com 1 mL de TCA 5%. A amostra foi filtrada em membrana HAWP de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamanho do poro.

### **III.2.2.4 Estudo da influência do tempo na hidrólise das aminas conjugadas**

O extrato e o resíduo (2 mL) obtidos na etapa de extração das aminas da matriz foram adicionados de 2 mL de HCl nas concentrações de 6, 9 e 12 mol/L e foram hidrolisados à temperatura ambiente e a 110  $^{\circ}\text{C}$  por 16, 18, 20 e 24 horas para verificar a influência do tempo na hidrólise das aminas conjugadas ácido solúveis e ácido insolúveis de café.

### **III.2.2.5 Avaliação do comportamento das aminas livres frente a hidrólise ácida**

Uma solução padrão contendo dez aminas (putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, serotonina, agmatina, espermidina, espermina, feniletilamina e triptamina) na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  foi submetida à hidrólise ácida para verificar o comportamento de cada amina frente a reação de hidrólise.

A solução padrão de aminas (2 mL) foi adicionada de 2 mL de HCl nas concentrações de 9 e 12 mol/L e submetidas a hidrólise a temperatura de 110  $^{\circ}\text{C}$  por um período de 18, 20 e 24 horas. Os hidrolisados foram filtrados, concentrados a 40  $^{\circ}\text{C}$  sob corrente de ar e, em seguida, ressuspendido com 1 mL de TCA 5%. As amostras foram filtradas em membrana HAWP 0,45  $\mu\text{m}$  e injetadas no cromatógrafo líquido.

### III.2.2.5 Determinação de aminas bioativas por CLAE-par iônico

Todos os extratos obtidos foram filtrados em membrana HAWP de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp. Milford, MA, EUA). As aminas foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência por par iônico, derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído (OPA) e detecção fluorimétrica, conforme metodologia descrita por CIRILO et al. (2003).

A análise cromatográfica foi efetuada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, modelo LC-10 AD, com câmara de mistura à baixa pressão; conjunto de lavagem automática de pistão; injetor automático Shimadzu modelo SIL – 10 ADVP conectado a um detector espectrofluorimétrico modelo RF-10 AXL a 340 nm de excitação e 445 nm de emissão e um controlador CBM-20 A (Shimadzu, Kyoto, Japan) conectados 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, protegido da luz, de 2 m de comprimento e 0,25 cm de diâmetro conectado entre a câmara de mistura e o detector e a bomba LC-10 AD (Shimadzu, Kyoto, Japão).

Foi utilizada uma coluna µBondapak C18 em fase reversa 3,9 x 300 mm, 10 µm e pré-coluna µBondapak C18 (Waters, Milford, MA) e sistema gradiente de eluição em ambiente com temperatura controlada ( $20 \pm 1$  °C). As fases móveis foram: A - solução 0,2 M de acetato de sódio e 15 mM de octanosulfonato de sódio, pH 4,9 ajustado com ácido acético, B - acetonitrila. O fluxo de análise foi de 0,8 mL/min.

O reagente de derivação consistiu de 0,2 g de OPA dissolvido em 3 mL de metanol e 500 mL de uma solução de 25 g de ácido bórico e 22 g de KOH (pH 10,5), 1,5 mL de Brij-35 e 1,5 mL de mercaptanol. A solução derivante foi preparada diariamente, mantida ao abrigo da luz e bombeada à câmara de mistura a um fluxo de 0,4 mL/min.

A identificação das aminas foi feita por comparação do tempo de retenção das aminas na amostra em relação ao padrão e também pela adição de solução da amina suspeita à amostra. O cálculo da concentração das aminas foi feito por interpolação na curva analítica.

### III.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade SIGMA STAT 2.0 (Systat Software Inc, Richmond, CA, USA).

## III.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### III.3.1 Influência da concentração do ácido clorídrico na hidrólise das aminas conjugadas

Os tipos e teores das aminas livres detectadas no café cru antes do procedimento de hidrólise estão apresentados na Tabela III.1. As aminas livres detectadas na amostra de café foram putrescina, serotonina, espermidina e espermina, com teores que variaram de 0,12 mg/100 g para a serotonina a 6,61 mg/100 g para a putrescina. A putrescina foi a amina predominante, contribuindo com 88% do teor total de aminas, seguida da espermidina e espermina, que contribuíram com 5%, e da serotonina (2%).

**Tabela III.1.** Teores médios de aminas livres detectados nas amostras de café cru

<b>Aminas</b>	<b>Teores mg/100 g (% CV)</b>
<b>Putrescina</b>	6,61 (10)
<b>Serotonina</b>	0,12 (23)
<b>Espermidina</b>	0,39 (13)
<b>Espermina</b>	0,35 (15)
<b>TOTAL</b>	7,47 (12)

CV = coeficiente de variação.

### III.3.1.1 Aminas ácido solúveis

Os resultados obtidos no estudo da influência da concentração do ácido clorídrico na hidrólise das aminas conjugadas ácido solúveis (AS) estão indicados na Tabela III.2. Somente as poliaminas putrescina, espermidina e espermina foram detectadas nas amostras de café analisadas, após a hidrólise ácida. As demais aminas pesquisadas não foram detectadas.

**Tabela III.2.** Aminas ácido solúveis detectadas após hidrólise por 24 h com HCl em diferentes concentrações

Aminas (AS)	Teores em mg/100 g (% CV)/HCl (mol/L)				
	1	3	6	9	12
<b>Putrescina</b>	nd	nd	nd	2,79 (12) <b>a</b>	1,25 (3) <b>b</b>
<b>Espermidina</b>	0,24 (6) <b>b</b>	0,26 (21) <b>b</b>	0,26 (18) <b>b</b>	0,36 (13) <b>a</b>	0,26 (4) <b>b</b>
<b>Espermina</b>	0,24 (6)	0,25 (19)	0,25 (17)	0,22 (12)	0,24 (4)

AS: ácido solúveis. Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes. (Teste de Duncan,  $p \leq 0,05$ ).

Para a espermina, as diferentes concentrações do ácido clorídrico utilizadas na hidrólise não influenciaram na capacidade de liberação das mesmas de sua forma conjugada. Entretanto, a putrescina só foi liberada de sua forma conjugada ao ser submetida à hidrólise com HCl em concentrações mais elevadas de 9 mol/L e 12 mol/L. A hidrólise com HCl 9 mol/L foi significativamente mais eficiente para a putrescina e espermidina em comparação com a hidrólise conduzida com HCl 12 mol/L. Resultados similares foram encontrados por FONTANIELLA et al. (2001) ao avaliarem a eficiência de diferentes ácidos na hidrólise das aminas conjugadas em plantas (líquens). Os autores concluíram que a hidrólise da putrescina é mais eficiente quando conduzida com HCl em concentrações mais elevadas (12 mol/L).

A utilização do ácido clorídrico na hidrólise das aminas conjugadas tem sido relatada na literatura para a análise de diferentes matrizes de origem vegetal (RODRIGUEZ et al., 2000; FONTANIELLA et al., 2001; CASAL et al., 2004; TASSONI et al., 2004). Na maioria dos estudos a hidrólise foi conduzida com HCl na concentração de 12 mol/L, com a detecção das poliaminas putrescina, espermidina e espermina. Resultados discordantes com os encontrados nesses estudos foram

obtidos por TASSONI et al. (2004) que detectaram putrescina em amostras de laranja após hidrólise com HCl 6 mol/L.

### III.3.1.2 Aminas ácido insolúveis

Na Tabela III.3 estão indicadas as aminas ácido insolúveis (AI) detectadas nas amostras de café analisadas, após hidrólise com HCl em diferentes concentrações por 24 horas.

**Tabela III.3** – Aminas ácido insolúveis detectadas após hidrólise com HCl em diferentes concentrações

Aminas (AI)	Teores em mg/100 g (% CV)/hidrólise com HCl (mol/L)				
	1	3	6	9	12
<b>Putrescina</b>	nd	nd	nd	0,22 (12) <b>a</b>	0,08 (5) <b>b</b>
<b>Espermidina</b>	nd	nd	0,06 (15) <b>b</b>	0,16 (11) <b>a</b>	0,05 (8) <b>b</b>
<b>Espermina</b>	nd	nd	0,25 (13) <b>c</b>	0,58 (12) <b>a</b>	0,45 (10) <b>b</b>

AI: ácido insolúveis. Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes. (Teste de Duncan  $p \leq 0,05$ ).

Em relação às aminas conjugadas AI observa-se comportamento semelhante às aminas ácido solúveis, em relação à eficiência de extração das mesmas de sua forma conjugada. O ácido clorídrico em concentrações mais elevadas (9 e 12 mol/L) foi mais eficiente na hidrólise das aminas ácido insolúveis. As aminas espermidina e espermina foram detectadas após a hidrólise com HCl em concentrações a partir de 6 mol/L. Estes resultados condizem com TASSONI et al. (2004) que relataram a presença de espermidina ácido insolúvel após hidrólise com HCl 6 mol/L. CASAL et al. (2005) também relataram a presença das aminas ácido insolúveis putrescina, espermidina e espermina em amostras de café. O HCl 9 mol/L foi significativamente mais eficiente na hidrólise das aminas conjugadas ácido insolúveis, seguido do HCl 12 mol/L e do HCl 6 mol/L.

### III.3.2 Influência da temperatura na hidrólise das aminas conjugadas

#### III.3.2.1 Aminas ácido solúveis

Na Tabela III.4, pode-se observar a influência da temperatura na liberação das aminas ácido solúveis de suas formas conjugadas durante o procedimento de hidrólise. A temperatura de 110 °C foi significativamente mais eficiente na hidrólise para a putrescina. Na concentração do ácido de 6 mol/L, a putrescina só foi detectada na hidrólise a 110 °C. A temperatura não influenciou os teores de espermidina e espermina recuperados após a hidrólise, somente com a reação conduzida com HCl 6 mol/L. Dados semelhantes foram descritos por TASSONI et al. (2004), que também detectaram a presença de putrescina (ácido solúvel) em amostras de laranja submetidas à hidrólise ácida (HCl 6 mol/L) à temperatura de 110 °C por 20 horas.

**Tabela III.4** - Influência da temperatura na hidrólise das aminas conjugadas ácido solúveis

Aminas/ Temperatura	Aminas conjugadas ácido solúveis (mg/100 g) (% CV)/hidrólise HCl (mol/L)				
	1	3	6	9	12
<b>Putrescina</b>					
Ambiente/24 h	nd	nd	nd <b>y</b>	2,79 (12) <b>ay</b>	1,25 (3) <b>by</b>
110 °C/ 24 h	nd	nd	0,65 (31) <b>x</b>	3,33 (5) <b>ax</b>	1,98 (4) <b>bx</b>
<b>Espermidina</b>					
Ambiente/24 h	0,24 (6) <b>b</b>	0,26 (21) <b>b</b>	0,26 (18) <b>by</b>	0,36 (13) <b>a</b>	0,26 (4) <b>b</b>
110 °C/ 24 h	0,19 (15) <b>c</b>	0,30 (18) <b>b</b>	0,62 (12) <b>ax</b>	0,38 (6) <b>b</b>	0,22 (7) <b>c</b>
<b>Espermina</b>					
Ambiente/24 h	0,24 (6)	0,25 (19)	0,25 (17) <b>y</b>	0,22 (12)	0,24 (4)
110 °C/ 24 h	0,31(14) <b>b</b>	0,27 (25) <b>b</b>	0,44 (15) <b>ax</b>	0, 20 (3) <b>b</b>	0,26 (13) <b>b</b>

Valores com letras diferentes para cada linha (a-c) ou coluna (x-y) para a mesma amina são significativamente diferentes. (Teste de Duncan  $p \leq 0,05$ ).

FONTANIELLA et al. (2001) encontraram resultados semelhantes para a putrescina. Na hidrólise ácida com HCl 12 mol/L, os teores de putrescina foram significativamente maiores a 110 °C do que à temperatura ambiente. Já para a espermidina e espermina, os autores relataram uma menor eficiência na hidrólise conduzida à temperatura de 110 °C.

Comportamento semelhante pode ser observado para as aminas ácido insolúveis (Tabela III.5), para as quais a liberação da putrescina conjugada ácido insolúvel foi mais eficiente quando o procedimento de hidrólise foi conduzido a temperatura de 110 °C para as concentrações de 6, 9 e 12 mol/L de HCl.

### III.3.2.2 Aminas ácido insolúveis

A temperatura de hidrólise não influenciou a eficiência de recuperação das aminas ácido insolúveis espermidina e espermina. Os teores destas aminas foram semelhantes na hidrólise conduzida à temperatura ambiente quanto à 110 °C com HCl nas concentrações de 6, 9 e 12 mol/L. A espermidina já havia sido encontrada após hidrólise ácida com HCl 6 mol/L a 110 °C em amostras de laranjas (TASSONI et al., 2004). Diferentemente dos resultados anteriores, a espermina ácido insolúvel foi detectada durante a hidrólise com HCl 3 mol/L a 110 °C.

**Tabela III.5** - Influência da temperatura na hidrólise das aminas conjugadas ácido insolúveis

Aminas/ Temperatura	Aminas conjugadas ácido insolúveis (mg/100 g) (% CV)/hidrólise HCl (mol/L)				
	1	3	6	9	12
<b>Putrescina</b>					
Ambiente/24 h	nd	nd	nd y	0,22 (7) <b>ay</b>	0,08 (3) <b>by</b>
110 °C/24 h	nd	nd	0,15 (9) <b>cx</b>	0,44 (5) <b>ax</b>	0,28 (4) <b>bx</b>
<b>Espermidina</b>					
Ambiente/24 h	nd	nd	0,06 (15) <b>b</b>	0,16 (11) <b>a</b>	0,05 (8) <b>b</b>
110 °C/24 h	nd	nd	0,05 (18) <b>a</b>	0,18 (6) <b>a</b>	0,09 (7) <b>b</b>
<b>Espermina</b>					
Ambiente/24 h	nd	nd y	0,25 (13) <b>c</b>	0,58 (12) <b>a</b>	0,45 (10) <b>b</b>
110 °C/24 h	nd	0,27 (25) <b>bx</b>	0,30 (15) <b>b</b>	0,51 (3) <b>a</b>	0,41 (13) <b>b</b>

Valores com letras diferentes para cada linha (a-c) ou coluna (x-y) são significativamente diferentes. (Teste de Duncan  $p \leq 0,05$ ).

### III.3.3 Influência do tempo de reação na hidrólise das aminas conjugadas

#### III.3.3.1 Aminas ácido solúveis

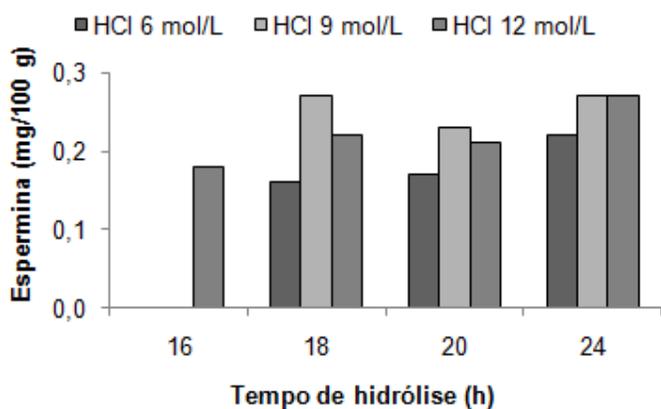
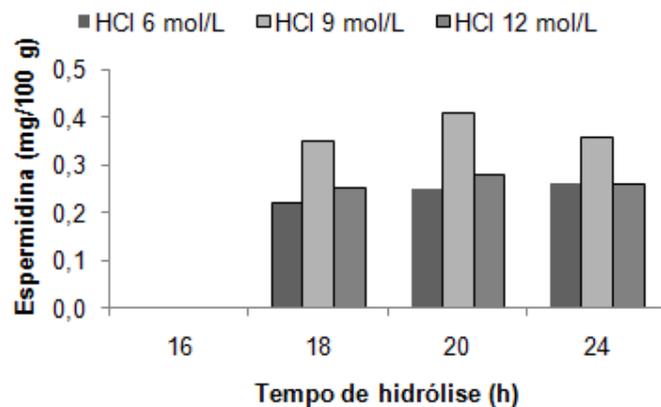
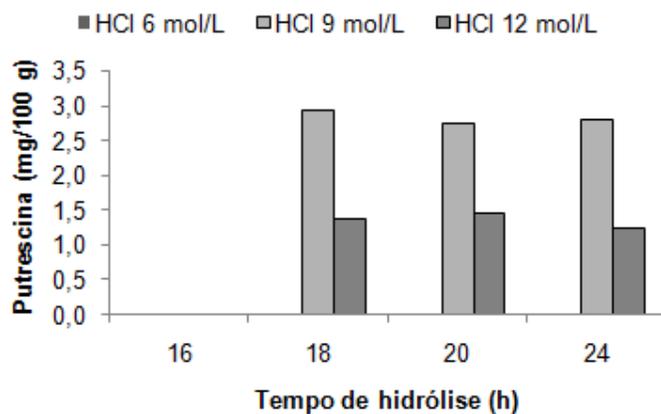
De acordo com os resultados obtidos nos estudos da influência da temperatura e da concentração do ácido clorídrico ideais para a hidrólise de uma maior quantidade de aminas conjugadas, o tempo de reação foi testado. Na Figura III.2 observa-se a influência do tempo da reação de hidrólise com HCl nas concentrações de 6, 9 e 12, a temperatura ambiente, na liberação das aminas ácido solúveis de sua forma conjugada.

Avaliando os dados apresentados, verifica-se que na hidrólise efetuada com HCl 6 mol/L, o período de 16 horas não foi suficiente para liberação das aminas de sua forma conjugada. A putrescina foi detectada apenas quando o tempo de reação alcançou 18 horas. Já a espermina foi detectada com 16 horas de reação com HCl na concentração de 12 mol/L. Os teores das aminas detectadas não foram significativamente diferentes ( $p \geq 0,05$ ) entre os tempos avaliados.

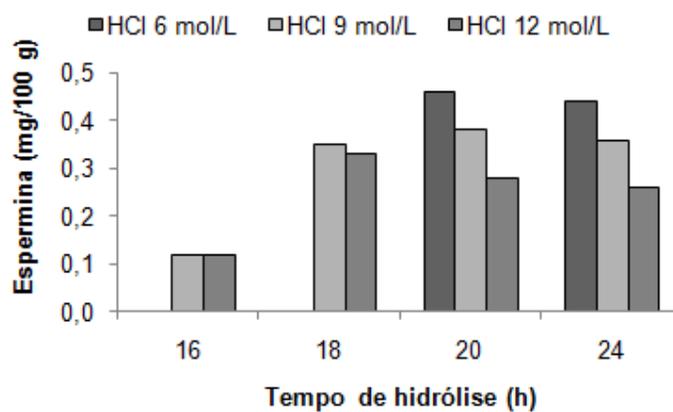
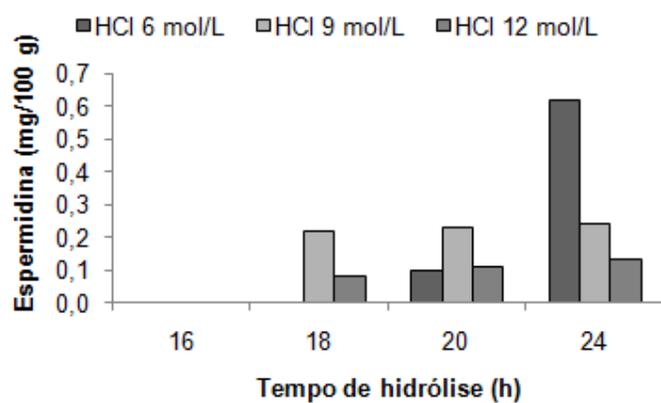
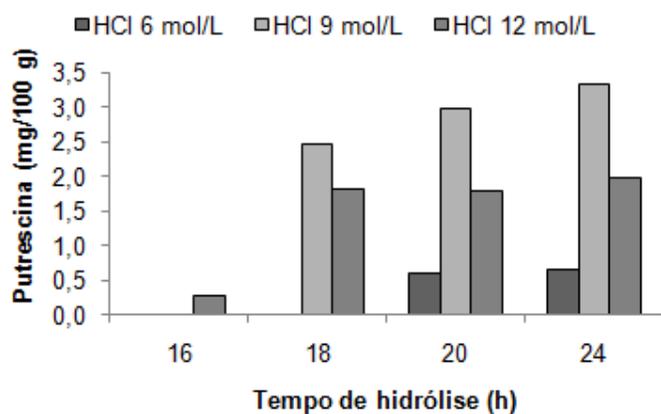
Na Figura III.3 são apresentados os dados obtidos na hidrólise das aminas conjugadas ácido solúveis com HCl nas concentrações de 6, 9 e 12 mol/L conduzida a temperatura de 110 °C em diferentes tempos de reação.

Observa-se que na hidrólise a 110 °C o tempo de reação exerceu influência sobre a eficiência da hidrólise. Para o procedimento realizado com HCl 6 mol/L a detecção das aminas ocorreu a partir de 20 h de reação. Este fato foi observado para as aminas putrescina, espermidina e espermina. Já na hidrólise executada com HCl 9 mol/L e 12 mol/L as aminas putrescina e espermina passaram a ser detectadas a partir de 16 horas de reação e a espermidina com 18 h.

Analisando os resultados para cada amina separadamente, a putrescina foi detectada a partir de 16 horas de hidrólise com HCl 12 mol/L e a partir de 18 h com HCl 9 mol/L. Porém o teor encontrado desta amina foi significativamente menor ( $p \leq 0,05$ ), com 16 h de reação em relação a 18, 20 e 24 h na hidrólise com HCl 12 mol/L. Nas demais concentrações de ácido, não foi observada diferença significativa entre os tempos de reação.



**Figura III.2** – Influência do tempo de hidrólise ácida à temperatura ambiente nas aminos ácido solúveis putrescina, espermidina e espermina de grãos crus de café.



**Figura III.3** – Influência do tempo de hidrólise ácida a 110 °C na extração das aminas ácido solúveis putrescina, espermidina e espermina de grãos crus de café.

Para a espermidina foi observada diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os tempos de reação apenas na hidrólise com HCl 6 mol/L, sendo que o teor desta amina na reação com 24 h de duração foi significativamente maior. A espermidina foi detectada com 16 horas de reação de hidrólise ácida com HCl 9 e 12 mol/L. Semelhante ao que foi observado para a putrescina, os teores de espermina foram significativamente menores ( $p \leq 0,05$ ) apenas para o tempo de reação de 16 horas.

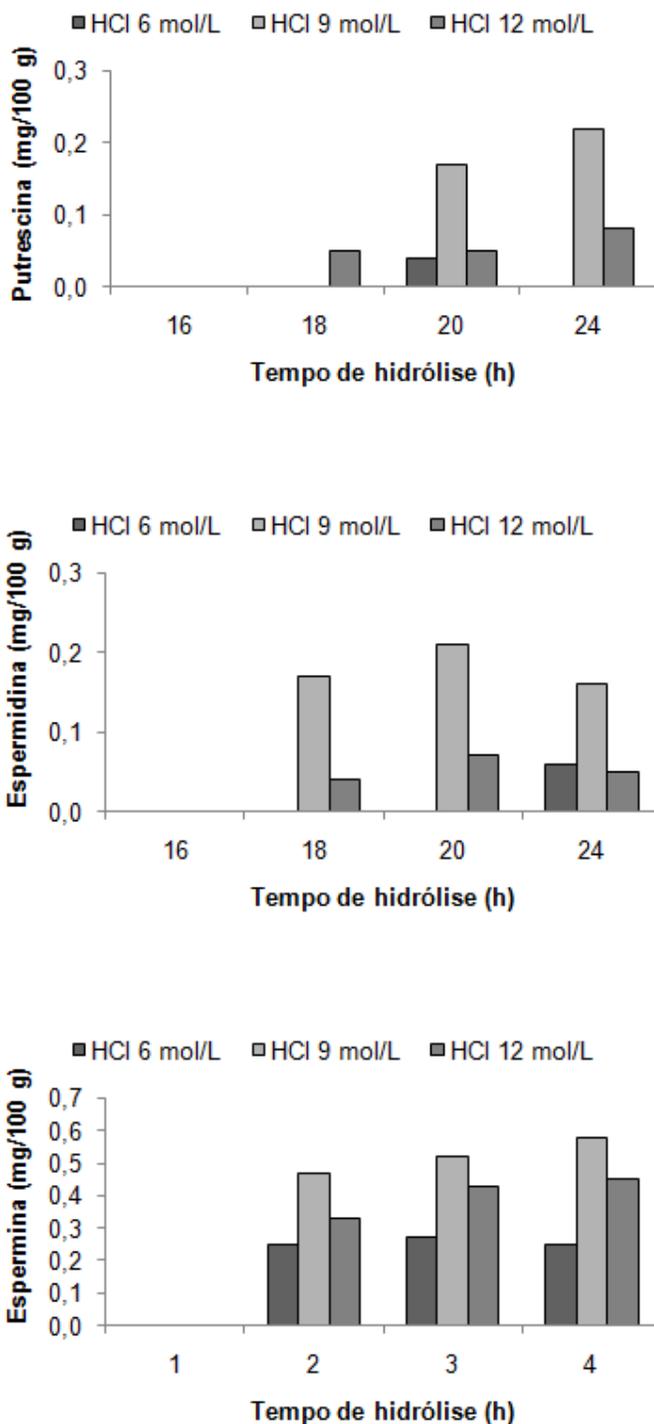
### **III.3.3.2 Aminas ácido insolúveis**

A eficiência da hidrólise ácida executada com HCl nas concentrações de 6, 9 e 12 mol/L à temperatura ambiente e a 110 °C, em relação ao tempo de reação também foram testadas para a liberação das aminas ácido insolúveis de sua forma conjugada.

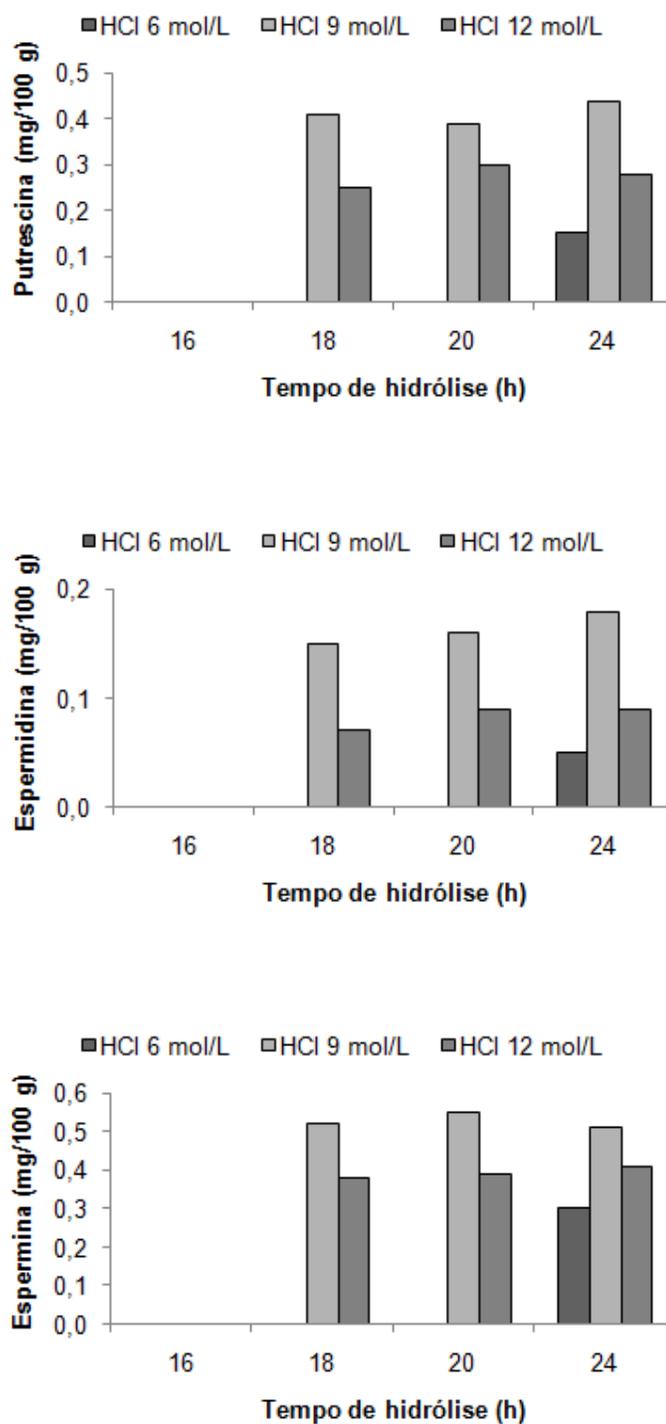
A influência do tempo na reação de hidrólise ácida à temperatura ambiente está demonstrada na Figura III.4. Observa-se que a hidrólise efetuada em 16 horas não foi suficiente para liberação das aminas da forma conjugada, mesmo em concentrações de HCl mais elevadas.

Avaliando a influência do tempo de reação nas diferentes concentrações de HCl para cada uma das aminas, observou-se que a putrescina só foi detectada a partir de 18 horas de reação para todas as concentrações testadas. Na concentração de HCl 6 mol/L foi detectada a putrescina após 20 h de reação, em baixos teores (0,04 mg/100 g), porém em 24 h esta amina não foi detectada.

A espermidina foi detectada a partir de 18 horas de reação para as concentrações do ácido de 9 e 12 mol/L. Na hidrólise feita com HCl 6 mol/L à temperatura ambiente esta amina só foi detectada a partir de 24 horas de reação. Não foi observada diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) nos teores desta amina nos diferentes tempos de reação avaliados.



**Figura III.4** – Influência do tempo de hidrólise ácida à temperatura ambiente na extração das aminas ácido insolúveis putrescina, espermidina e espermina de grãos crus de café.



**Figura III.5** – Influência do tempo de hidrólise ácida a 110 °C na extração das aminas conjugadas ácido insolúveis putrescina, espermidina e espermina de grãos crus de café.

O comportamento da espermina foi semelhante em todos os tempos avaliados, tendo sido detectada a partir de 18 horas de reação nas concentrações de 6, 9 e 12 mol/L. Assim como para as aminas putrescina e espermidina não foi observada diferença significativa nos teores de espermina nos diferentes tempos avaliados.

A influência do tempo na hidrólise a 110 °C das aminas conjugadas ácido insolúveis também foi avaliada e está indicada na Figura III.5. Semelhante ao que ocorreu na hidrólise à temperatura ambiente o tempo de reação de 16 horas não foi eficiente na hidrólise das aminas à temperatura de 110 °C.

Para concentrações de HCl de 6 mol/L, a hidrólise à temperatura de 110 °C só foi eficiente com 24 horas de reação. Porém, nas demais concentrações de HCl, as aminas putrescina, espermidina e espermina foram detectadas nas reações com duração de 18, 20 e 24 horas. Para todas as três aminas ácido insolúveis detectadas na amostra de café não foram observadas diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ) em seus teores nos diferentes tempos de reação avaliados.

Considerando os resultados relatados acima, tanto para as aminas ácido solúveis quanto para as ácido insolúveis, o tempo de hidrólise influenciou na liberação das aminas de sua forma conjugada no café. Recuperações mais eficientes foram obtidas com reações conduzidas por no mínimo 18 horas. Não foram encontrados dados na literatura sobre a influência do tempo da reação de hidrólise ácida com HCl na eficiência da liberação das aminas de sua forma conjugada, porém relatos na literatura apontam para a execução deste procedimento com tempos que variam de 18 a 20 horas em diferentes matrizes (RODRIGUEZ et al., 2000; FONTANIELLA et al., 2001; TASSONI et al., 2004). As aminas conjugadas têm sido determinadas em amostras de café por meio da reação de hidrólise com HCl 12 mol/L a 110 °C por 18 horas (CASAL et al., 2004; CASAL et al., 2005).

### **III.3.4 Influência da hidrólise ácida no perfil e teores das aminas livres**

Para inferir sobre a influência da hidrólise na determinação das aminas conjugadas, os teores de aminas livres antes e após a reação de hidrólise foram avaliados. Os percentuais de recuperação das aminas do padrão de 10 µg/mL, após serem submetidas à hidrólise com HCl nas concentrações de 9 e 12 mol/L por 18, 20 e 24 h estão demonstrados na Tabela III.6.

**Tabela III.6.** Recuperação das aminas livres de solução padrão (10 µg/mL) durante hidrólise ácida com HCL 9 e 12 mol/L

Aminas/hidrólise	% Recuperação (% CV)/tempo de reação (h)		
	18	20	24
<b>Putrescina</b>			
HCl 9 mol/L	89 (13)	93 (15)	92 (8)
HCl 12 mol/L	93 (11)	91(8)	92 (3)
<b>Cadaverina</b>			
HCl 9 mol/L	99 (13)	101 (12)	105 (13)
HCl 12 mol/L	95 (13)	98 (7)	105 (5)
<b>Histamina</b>			
HCl 9 mol/L	88 (2) x	88 (5) x	82 (7) x
HCl 12 mol/L	74 (4) <b>a y</b>	70 (5) <b>a y</b>	61 (5) <b>b y</b>
<b>Tiramina</b>			
HCl 9 mol/L	77 (16)	72 (15)	75 (15)
HCl 12 mol/L	81 (9)	82 (14)	73 (8)
<b>Serotonina</b>			
HCl 9 mol/L	33 (23) x	35 (15) x	12 (52) x
HCl 12 mol/L	12 (12) <b>a y</b>	2 (11) <b>b y</b>	1 (14) <b>b y</b>
<b>Agmatina</b>			
HCl 9 mol/L	95 (3)	96 (7)	80 (24)
HCl 12 mol/L	88 (13)	96 (12)	81 (3)
<b>Espermidina</b>			
HCl 9 mol/L	99 (16)	102 (11)	91 (22)
HCl 12 mol/L	103 (14)	96 (23)	95 (3)
<b>Espermina</b>			
HCl 9 mol/L	84 (3)	93 (9)	85 (25)
HCl 12 mol/L	81 (9)	83 (8)	88 (5)
<b>Feniletilamina</b>			
HCl 9 mol/L	87 (6)	80 (20)	82 (23)
HCl 12 mol/L	80 (13)	81 (12)	83 (5)
<b>Triptamina</b>			
HCl 9 mol/L	58 (16)	59 (4) x	49 (27)
HCl 12 mol/L	49 (5)	36 (21) y	37(40)

CV: coeficiente de variação. Valores com letras diferentes para cada linha (a-b) ou coluna para cada amina (x-y) são significativamente diferentes. (Teste de Duncan  $p \leq 0,05$ ).

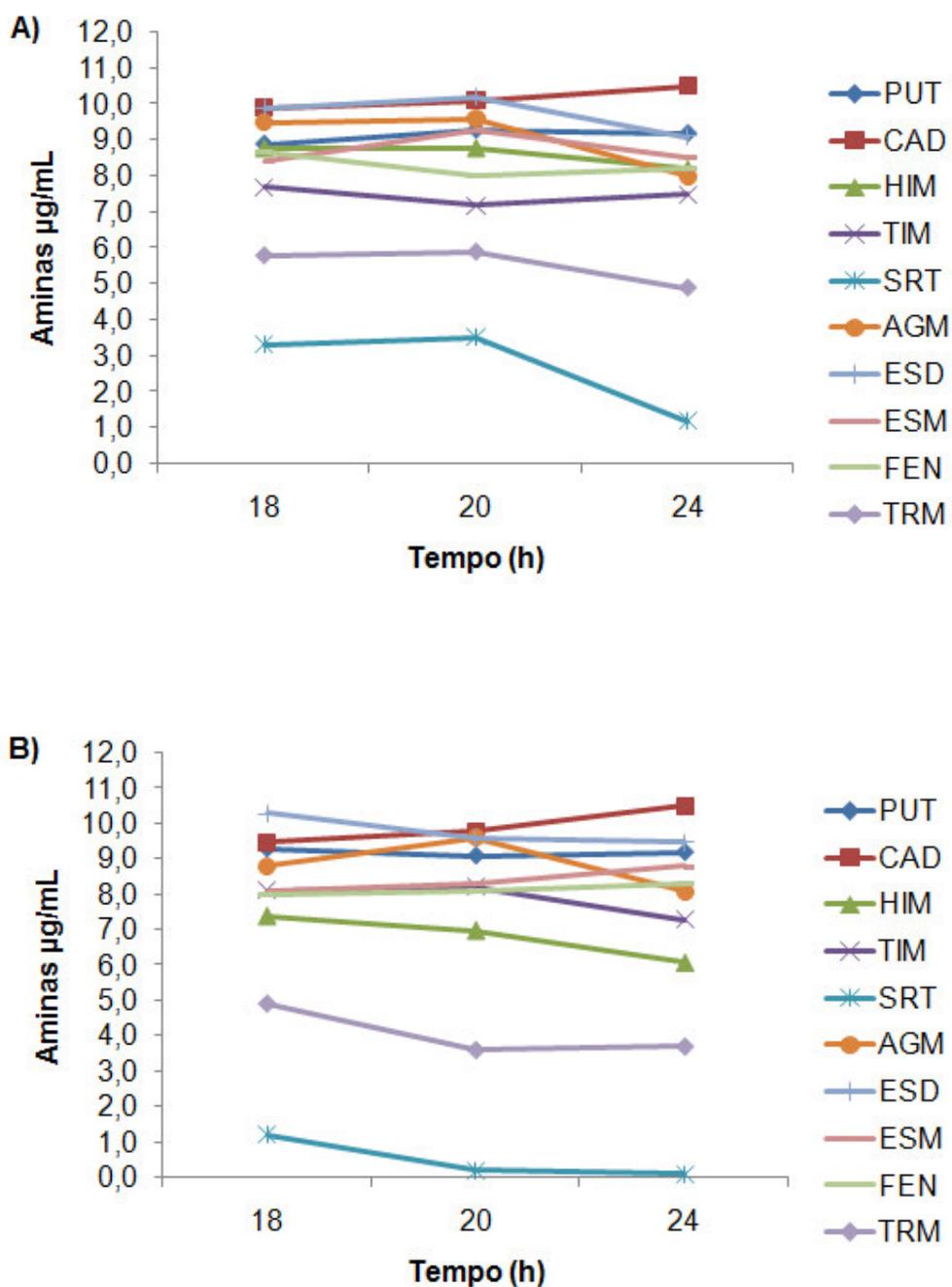
Sete das dez aminas contidas na solução padrão apresentaram porcentagem de recuperação satisfatória (acima de 80%), após a hidrólise. A concentração do ácido influenciou na recuperação das aminas livres. Os teores de histamina, serotonina e triptamina foram significativamente ( $p \leq 0,05$ ) menores após a hidrólise com HCl 12 mol/L.

Para o procedimento realizado com HCl 9 mol/L as aminas tiramina, serotonina e triptamina demonstraram uma redução em suas concentrações com coeficientes de recuperação variando de 12 a 77%. Comportamento semelhante foi observado durante a hidrólise com HCl 12 mol/L, sendo que as aminas histamina, serotonina e triptamina apresentaram recuperações médias de 68%, 5% e 41%, respectivamente. A serotonina foi a amina que apresentou menores coeficientes de recuperação, com percentuais variando de 1 a 72%.

O tempo da reação não influenciou a recuperação da maioria das aminas. Para a histamina, os índices de recuperação foram significativamente maiores ( $p \leq 0,05$ ) após 18 e 20 h de reação em comparação a 24 h. Este fato também foi observado para a serotonina que apresentou porcentagens de recuperação significativamente maiores ( $p \leq 0,05$ ) na reação com 18 h de duração em relação a 20 e 24 h. Estes resultados foram observados apenas na reação de hidrólise conduzida com HCl 12 mol/L.

Na Figura III.6 pode-se observar o comportamento das dez aminas contidas na solução padrão de 10 µg/mL submetida a hidrólise com HCl 9 e 12 mol/L à 110 °C por 18, 20 e 24 horas. A maioria das aminas se comportaram de maneira semelhante, não apresentando perdas durante a hidrólise. As aminas que demonstraram maior instabilidade após as 24 horas de reação de hidrólise foram a tiramina, serotonina e triptamina para o procedimento com HCl 9 mol/L e histamina, serotonina e triptamina ao serem submetidas a hidrólise com HCl 12 mol/L.

Considerando que a maioria dos relatos na literatura sobre a presença de aminas conjugadas em matrizes de origem vegetal evidenciam a presença das poliaminas putrescina, espermidina e espermina conjugadas e, analisando os resultados acima relatados, o procedimento de hidrólise ácida para a determinação de aminas conjugadas deve ser aplicado apenas para as aminas putrescina, cadaverina, agmatina, espermidina, espermina e feniletilamina. Desta forma sugere-se mais estudos para determinação das aminas tiramina, histamina e serotonina.



**Figura III.6.** Comportamento das aminas durante a reação de hidrólise. A) HCl 9 mol/L ; B) HCl 12 mol/L. PUT= putrescina; CAD= cadaverina; HIM= histamina; TIM= tiramina; SRT= serotonina; AGM= agmatina; ESD=espermidina; ESM= espermina; FEN= feniletilamina; TRM= triptamina.

### III.4 CONCLUSÕES

As aminas conjugadas encontradas no café foram as poliaminas putrescina, espermidina e espermina. A hidrólise para a determinação das aminas conjugadas em café foi otimizada.

A concentração do ácido clorídrico afetou de forma significativa a hidrólise das poliaminas conjugadas. Melhor eficiência foi observada com o ácido clorídrico na concentração de 9 mol/L. A temperatura de reação influenciou de forma significativa a reação de hidrólise apenas para a putrescina, sendo 110 °C significativamente mais eficiente. Enquanto que o tempo de reação foi mais eficiente em reações conduzidas por 18, 20 e 24 horas, tanto para as aminas ácido solúveis quanto para as aminas ácido insolúveis.

Desta forma a condição de hidrólise selecionada para a determinação de aminas conjugadas em amostras de café foi hidrólise com HCl 9 mol/L a 110 °C por 18 horas.

## **CAPÍTULO IV. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA POR CLAE - PAR IÔNICO PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS LIVRES EM AMOSTRAS DE CAFÉ**

### **RESUMO**

Para garantir maior confiabilidade nos resultados da análise de aminas bioativas em amostras de café, a metodologia CLAE-par iônico, derivação pós-coluna com OPA e detecção fluorimétrica foi validada para a determinação das aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, serotonina, agmatina, espermidina, espermina, feniletilamina e triptamina. Os parâmetros de desempenho do método avaliados foram: seletividade, linearidade, efeitos da matriz, exatidão e precisão e limites de detecção e quantificação. O método apresentou seletividade com boa resolução dos picos e tempos de retenção das aminas na amostra concordando com os das aminas da solução padrão. A curva analítica apresentou linearidade satisfatória na faixa de 0,5 a 15 µg/mL, com coeficientes de correlação maiores que 0,99 para todas as aminas. A matriz exerceu influência na linearidade da curva para a tiramina e triptamina no café torrado e para a tiramina, serotonina e triptamina no café solúvel. Os limites de detecção e quantificação do método foram de 0,04 µg/mL e de 0,1 mg/100 g, respectivamente, para todas as matrizes avaliadas. O método foi preciso na faixa de 0,1 a 10 mg/100 g. Os coeficientes de variação variaram de 2 a 15% para o café cru, 2 a 13% para o torrado e 2 a 15% para o café solúvel. A exatidão foi satisfatória para as aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, agmatina, espermidina e espermina na faixa de 0,1 a 10 mg/100 g com recuperações médias entre 80 a 110%.

**Palavras-chave:** validação, café, cromatografia líquida de alta eficiência, aminas bioativas

## IV.1 - INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um método analítico e a adaptação ou implementação de um método conhecido envolvem um processo de avaliação que estime a sua eficiência na rotina do laboratório. Esse processo é denominado de validação (BRITO et al., 2003).

Validação de método analítico é o processo de demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido, sendo considerado um aspecto vital da garantia da qualidade analítica (BARROS, 2002). De acordo com a ANVISA (2003), a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

O objetivo da validação consiste em demonstrar que um método analítico é adequado para o seu propósito. Desta forma, a validação deve ser considerada quando se desenvolve ou efetua adaptações em metodologias já validadas, inclusão de novas técnicas de análise ou mesmo com o uso de equipamentos diferentes (BRITO et al., 2003). Os métodos normalizados já são métodos validados e não é necessário proceder ao processo completo de validação desde que não ocorram alterações significativas dos mesmos (BARROS, 2002). Porém, independente de quão adequado for o desempenho de um método em um estudo de validação já estabelecido, é necessário uma confirmação de que o método é válido quando aplicado em diferentes laboratórios, efetuando uma validação intralaboratorial (SOUZA et al., 2007).

Sob uma visão geral, a validação de métodos analíticos pode ser dividida em dois tipos (RIBANI et al., 2005). O primeiro consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório usado para validar um método novo ou verificar a adequação de um método já validado, denominado "*in house validation*". O segundo tipo, denominado de validação completa ("*full validation*"), envolve o estabelecimento de todas as características de desempenho de um método analítico e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta quando executada em diferentes laboratórios.

O processo de validação consiste na determinação de parâmetros analíticos, também conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho ou figuras analíticas de mérito (RIBANI et al., 2004). Os parâmetros analíticos normalmente utilizados para a validação de métodos são: seletividade,

linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção, limite de quantificação e robustez (BRITO et al., 2003; LIMA & FROTA, 2007; RIBANI et al., 2007).

A metodologia de determinação de amins bioativas por cromatografia líquida por par-iônico, derivação pós-coluna com OPA e detecção fluorimétrica tem sido empregada na análise de diversos tipos de alimentos como bebidas alcoólicas, cafés, produtos cárneos, leite e derivados, vegetais e frutas (BUSTO et al., 1997; VALE & GLÓRIA, 1997; NOVELLA-RODRIGUEZ, et al., 2000; VIDAL-CAROU et al., 2003; ADÃO & GLÓRIA, 2005; LAVIZZARI et al., 2006; CIRILO et al., 2003; SILVEIRA et al., 2007 a). Relatos sobre os procedimentos de validação desta metodologia foram encontrados para as matrizes: queijo (VALE & GLÓRIA, 1997); espinafre, batata, banana, avelã e achocolatado (LAVIZZARI et al., 2006) e vinhos (PRESTE et al., 2007).

Neste contexto, considerando a importância do procedimento de validação do método analítico para a garantia da confiabilidade dos resultados, e a complexidade da matriz café, o objetivo deste trabalho foi validar (validação “*in house*”) a metodologia para a determinação de amins bioativas livres por CLAE par-iônico, derivação pós-coluna com OPA e detecção fluorimétrica para análise de café verde, café torrado e café solúvel.

## **IV.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **IV.2.1 MATERIAL**

#### **IV.2.1.1 Amostra**

Para realização da validação foram utilizadas amostras de café cru, café torrado e café solúvel.

#### IV.2.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados possuíam grau analítico, exceto os solventes usados no CLAE (acetonitrila), que eram de grau cromatográfico. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). Os padrões de aminas bioativas (diidrocloreto de putrescina - PUT, diidrocloreto de cadaverina - CAD, diidrocloreto de histamina - HIM, hidrocloreto de tiramina - TIM, tetraidrocloreto de espermina - EPM, triidrocloreto de espermidina - EPD, complexo sulfato creatinina agmatina - AGM, hidrocloreto de 2-feniletilamina - FEA, hidrocloreto de 5-hidroxitriptamina ou serotonina - SRT), foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). As fases móveis foram filtradas em membrana (47 mm de diâmetro e 0,45 µm de poro, Millipore Corp., Milford, MA, EUA) HAWP e HVWP para reagentes aquosos e solventes orgânicos, respectivamente.

#### IV.2.2 MÉTODOS

O procedimento utilizado para a validação do método consistiu na determinação de dez aminas bioativas livres por CLAE par iônico, derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído e detecção fluorimétrica a 340 nm de excitação e 445 nm de emissão. As aminas determinadas por esta metodologia foram putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, serotonina, agmatina, espermidina, espermina, feniletilamina e triptamina, de acordo com CIRILO et al. (2003).

A validação consistiu no estabelecimento dos parâmetros seletividade, linearidade, efeitos da matriz, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação.

##### IV.2.2.1 Procedimentos de validação

###### Seletividade

Extratos do café verde, torrado e solúvel foram fortificados com solução padrão contendo dez aminas bioativas nas concentrações de 0,5 , 3 e 6 µg/mL em três replicatas independentes para inferir sobre a interferência dos componentes da matriz na detecção das aminas bioativas.

**Linearidade**

Para a verificação da linearidade três curvas de calibração foram preparadas com a solução padrão contendo as dez aminas em seis concentrações diferentes (0,5; 3; 6; 9; 12 e 15 µg/mL). Cada ponto da curva foi analisado em triplicata em ordem aleatória. Em seguida foram construídos os gráficos da área do pico e a concentração das aminas por regressão linear, as equações das curvas analíticas e seus coeficientes de correlação, foram determinados.

**Efeitos da matriz**

O método de adição foi empregado para avaliação dos efeitos da matriz. Semelhante ao procedimento realizado para avaliar a linearidade, uma curva de calibração com seis concentrações diferentes (0,5; 3; 6; 9; 12 e 15 µg/mL) contendo as dez aminas, foi preparada com os extratos de café verde, torrado e solúvel. Cada ponto da curva foi analisado em triplicata em ordem aleatória. Em seguida foram construídos os gráficos relacionando as áreas dos picos e as respectivas concentrações e, por regressão linear, as equações das curvas analíticas e seus coeficientes de correlação, foram determinados.

**Limite de detecção**

Extratos dos cafés foram fortificados com padrão das dez aminas para obtenção de concentração correspondente a 0,5 µg/mL e analisados em dez replicatas. O limite de detecção foi calculado pelo desvio padrão das respostas multiplicado por 3 (INMETRO).

**Limite de quantificação**

O limite de quantificação foi determinado conforme descrito anteriormente para o limite de quantificação. Após a análise dos extratos dos cafés fortificados com padrão, o desvio padrão foi calculado e multiplicado por 10 para obtenção do limite de quantificação (INMETRO).

### **Exatidão e precisão**

A exatidão e precisão do método avaliado foram calculadas por meio da recuperação média (exatidão) e coeficientes de variação (precisão) dos resultados obtidos após análise de amostras de café verde, torrado e solúvel enriquecidas com três concentrações do padrão contendo as dez aminas. O enriquecimento foi feito para se obter amostras com concentrações correspondentes a 0,1; 1,0 e 10 mg/100 g da amostra, em triplicata.

### **IV.2.2.2 Preparo das soluções padrão**

As soluções padrão utilizadas durante o processo de validação foram preparadas de acordo com a instrução de trabalho (IT - 2) estabelecida pelo LBqA. Foram preparadas soluções estoques na concentração de 1 mg/mL de cada amina (putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, serotonina, agmatina, espermidina, espermina, feniletilamina e triptamina). A partir destas soluções foi preparada uma solução padrão de 100 µg/mL, contendo as dez aminas que, por meio de diluições subseqüentes, deram origem às soluções padrão de trabalho.

### **IV.2.2.3 Separação e determinação de aminas bioativas por CLAE-par iônico**

As aminas foram extraídas da matriz café conforme metodologia otimizada descrita no capítulo II. Os grãos de café verde e torrado foram triturados e separados por peneiras, sendo as partículas retidas em peneira de 20 mesh selecionada para análise.

Foram adicionados 10 mL de TCA 5% a 5 g dos cafés verde torrado e solúvel. Em seguida, foram agitados em mesa agitadora por 10 minutos, centrifugadas a 11.180 *g* a 4 °C por 21 minutos e filtradas em papel de filtro qualitativo. A extração foi repetida mais duas vezes, com adição de 10 mL de TCA 5% cada. Os extratos foram combinados e o volume final anotado.

Os extratos investigados foram filtrados em membrana HAWP de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp. Milford, MA, EUA). As aminas foram determinadas por CLAE-par iônico, derivação pós-coluna com OPA, conforme metodologia descrita por CIRILO et al. (2003).

A análise cromatográfica foi efetuada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, modelo LC-10 AD, com câmara de mistura à baixa pressão; conjunto de lavagem automática de pistão; injetor automático Shimadzu modelo SIL – 10 ADVP conectado a um detector espectrofluorimétrico modelo RF-10 AXL a 340 nm de excitação e 445 nm de emissão e um controlador CBM-20 A (Shimadzu, Kyoto, Japan) conectado 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, protegido da luz, de 2 m de comprimento e 0,25 de diâmetro conectado entre a câmara de mistura, o detector e a bomba LC-10 AD (Shimadzu, Kyoto, Japão).

Foi utilizada uma coluna  $\mu$ Bondapak C18 em fase reversa 3,9 x 300 mm, 10  $\mu$ m e pré-coluna  $\mu$ Bondapak C18 (Waters, Milford, MA) e sistema gradiente de eluição em ambiente com temperatura controlada ( $20 \pm 1$  °C). As fases móveis foram: A - solução 0,2 M de acetato de sódio e 15 mM de octanosulfonato de sódio, pH 4,9 ajustado com ácido acético, B - acetonitrila. O fluxo de análise foi de 0,8 mL/min.

O reagente de derivação consistiu de 0,2 g de OPA dissolvido em 3 mL de metanol e 500 mL de uma solução de 25 g de ácido bórico e 22 g de KOH (pH 10,5), 1,5 mL de Brij-35 e 1,5 mL de mercaptanol. A solução derivante foi preparada diariamente, mantida ao abrigo da luz e bombeada à câmara de mistura a um fluxo de 0,3 mL/min.

A identificação das aminas foi feita por comparação do tempo de retenção das aminas na amostra em relação ao padrão e também pela adição de solução da amina suspeita à amostra. O cálculo da concentração das aminas foi feito por interpolação na curva analítica.

## IV.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### IV.3.1 Parâmetros de validação para o café cru, torrado e solúvel

#### Seletividade

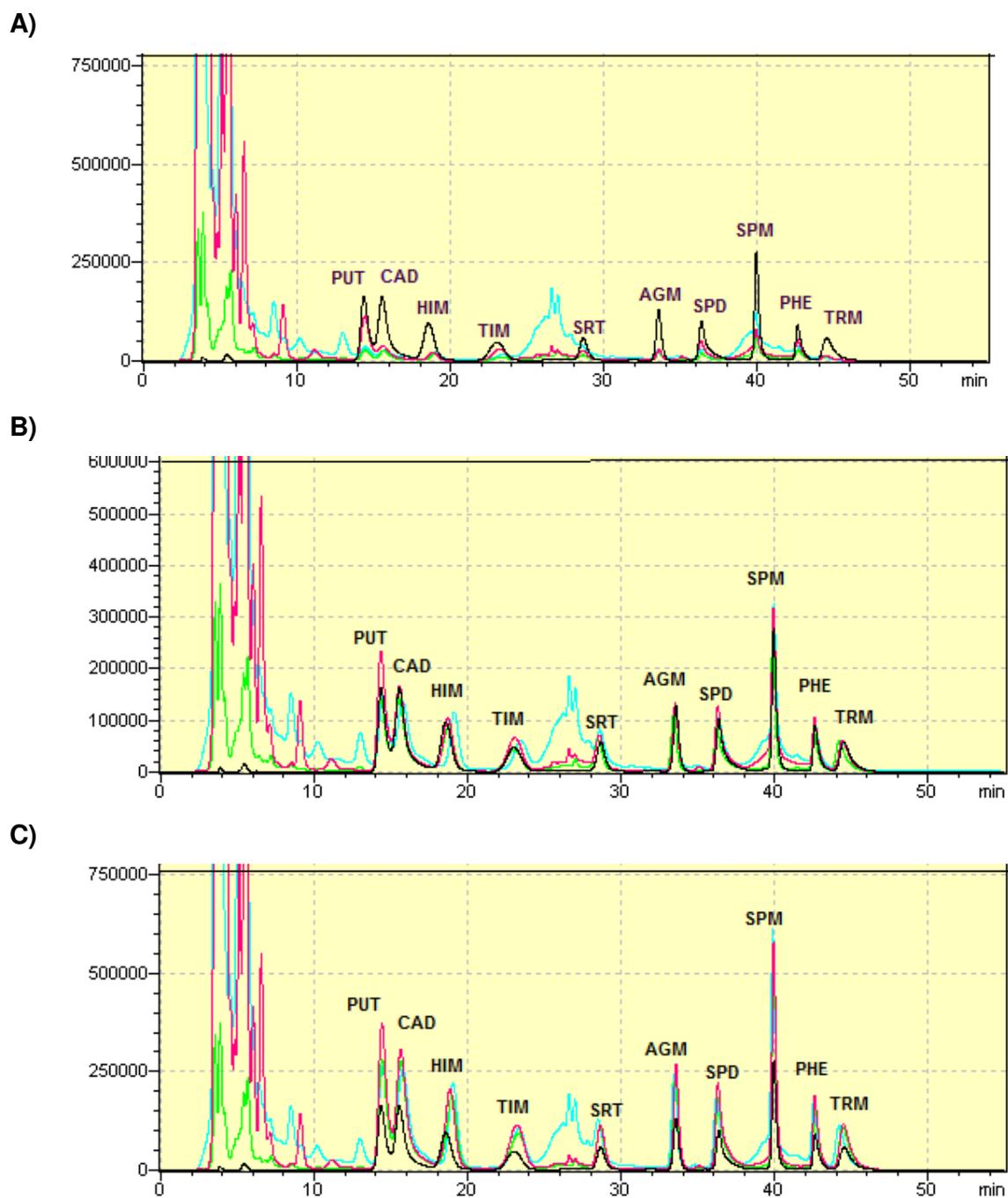
Na Figura IV.1 estão apresentados os cromatogramas obtidos na análise da solução padrão de 3 µg/mL das dez aminas e de cada amostra dos cafés cru, torrado e solúvel fortificados com soluções padrão nas concentrações de 0,5; 3 e 6 µg/mL. Os tempos de retenção médios foram  $14,38 \pm 0,07$  min para putrescina;  $15,63 \pm 0,12$  min para cadaverina;  $18,79 \pm 0,28$  min para histamina;  $23,12 \pm 0,29$  min para tiramina;  $28,55 \pm 0,07$  min para serotonina;  $33,48 \pm 0,08$  min para agmatina;  $36,27 \pm 0,07$  min para espermidina;  $39,90 \pm 0,03$  min para espermina;  $42,57 \pm 0,04$  min para feniletilamina; e  $44,33 \pm 0,14$  min para triptamina.

A avaliação dos cromatogramas mostrou que o método produz respostas para diferentes analitos presentes no café. Porém os picos relativos às dez aminas de interesse puderam ser distinguidos dos outros compostos detectados, mostrando boa resolução. Mostrou também que os tempos de retenção das aminas na amostra concordaram com os das aminas da solução padrão.

No café solúvel foi detectada uma maior quantidade de interferentes em relação aos cafés torrado e cru. Esse fato se deve, provavelmente, à concentração destas substâncias interferentes durante o processamento do café solúvel, que envolve a etapa de concentração do extrato do café.

#### Linearidade

Na Tabela IV.1 estão relacionadas as equações de regressão linear, e os coeficientes de determinação e de correlação para cada amina, obtidos a partir da construção das curvas analíticas. Para todas as aminas, o coeficiente de correlação ( $r$ ) foi maior que 0,99 em todas as três curvas analíticas.



**Figura IV.1** - Cromatogramas de uma solução padrão de 3  $\mu\text{g/mL}$  das dez aminas (preto) e de amostras dos cafés cru (vermelho), torrado (verde) e solúvel (azul). Amostras adicionadas de solução padrão de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  (A); solução padrão de 3,0  $\mu\text{g/mL}$  (B); solução padrão de 6,0  $\mu\text{g/mL}$  (C); PUT = putrescina; CAD = cadaverina; HIM = histamina; TIM = tiramina; SRT = serotonina; AGM = agmatina; SPD = espermidina; SPM = espermina; PHE = feniletilamina; TRM = triptamina.

**Tabela IV.1** – Equações de regressão linear e coeficientes de determinação e de correlação das curvas analíticas para cada amina determinada em três dias

Aminas	Equação	r <sup>2</sup>	r
<b>Putrescina</b>			
1º dia	$y = 1879202x - 14600$	0,996	0,997
2º dia	$y = 1020627x + 76145$	0,986	0,993
3º dia	$y = 1013600x - 76145$	0,986	0,993
<b>Cadaverina</b>			
1º dia	$y = 2098511x - 110278$	0,998	0,999
2º dia	$y = 1406496x + 267418$	0,985	0,992
3º dia	$y = 1332176x - 81952$	0,986	0,993
<b>Histamina</b>			
1º dia	$y = 1363327x - 178010$	0,998	0,999
2º dia	$y = 746185x + 119391$	0,986	0,993
3º dia	$y = 76086x - 86349$	0,984	0,992
<b>Tiramina</b>			
1º dia	$y = 1139937x - 168512$	0,997	0,998
2º dia	$y = 580787x + 72911$	0,988	0,994
3º dia	$y = 65092x - 65694$	0,980	0,990
<b>Serotonina</b>			
1º dia	$y = 629116x - 149355$	0,998	0,999
2º dia	$y = 359170x + 16502$	0,989	0,994
3º dia	$y = 33410x - 70530$	0,991	0,995
<b>Agmatina</b>			
1º dia	$y = 1002268x - 104173$	0,998	0,999
2º dia	$y = 571693x + 89411$	0,988	0,994
3º dia	$y = 56921x - 71546$	0,981	0,990
<b>Espermidina</b>			
1º dia	$y = 1179338x - 114497$	0,996	0,997
2º dia	$y = 740197x + 213838$	0,981	0,990
3º dia	$y = 72252x + 26741$	0,980	0,990
<b>Espermina</b>			
1º dia	$y = 1669277x - 153680$	0,998	0,999
2º dia	$y = 349050x + 19799$	0,987	0,993
3º dia	$y = 34164x - 79999$	0,986	0,993
<b>Feniletilamina</b>			
1º dia	$y = 530825x + 284779$	0,989	0,994
2º dia	$y = 915120x + 150186$	0,983	0,991
3º dia	$y = 93157x - 10586$	0,986	0,993
<b>Triptamina</b>			
1º dia	$y = 1010164x - 103711$	0,998	0,999
2º dia	$y = 513315x + 35102$	0,987	0,993
3º dia	$y = 47019x - 66413$	0,985	0,992

r<sup>2</sup> = Coeficiente de determinação; r = coeficiente de correlação.

Avaliando-se os resultados, observa-se que para a curva obtida no primeiro dia os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) para a maioria das aminas foi maior que 0,99, exceto para a feniletilamina ( $r^2 = 0,989$ ). Já para as demais curvas, os coeficientes de determinação apresentados estão abaixo de 0,99 e acima de 0,90, entre 0,981 a 0,989 para o segundo dia e 0,980 a 0,986 para o terceiro dia. Baseado nesses resultados foi selecionada a primeira curva analítica para determinação dos demais parâmetros de validação como efeito da matriz, exatidão e precisão.

Os dados obtidos na curva analítica demonstraram que há correlação linear significativa entre as concentrações das aminas na faixa de 0,5 a 15  $\mu\text{g/mL}$  e as respectivas áreas. Os coeficientes de correlação ( $r$ ) estão em conformidade com os critérios do INMETRO (2003) que recomendam valores maiores que 0,90 para os testes de linearidade.

A linearidade do método para determinação de dez aminas bioativas por CLAE par-iônico com detecção por fluorescência também foi estabelecida na faixa de 0,5 a 6  $\mu\text{g/mL}$  por VALE & GLÓRIA (1997). Porém a matriz utilizada foi queijo parmesão.

PRESTES et al. (2007) obtiveram linearidade deste método para ensaio de histamina em vinhos na faixa de 0,01 a 0,2  $\mu\text{g/mL}$ . LAVIZZARI et al. (2006) estabeleceram linearidade para doze aminas bioativas por CLAE com detecção fluorimétrica na faixa de 0,1 a 100  $\mu\text{g/mL}$  em diferentes matrizes (espinafre, nozes, banana, batata e achocolatado).

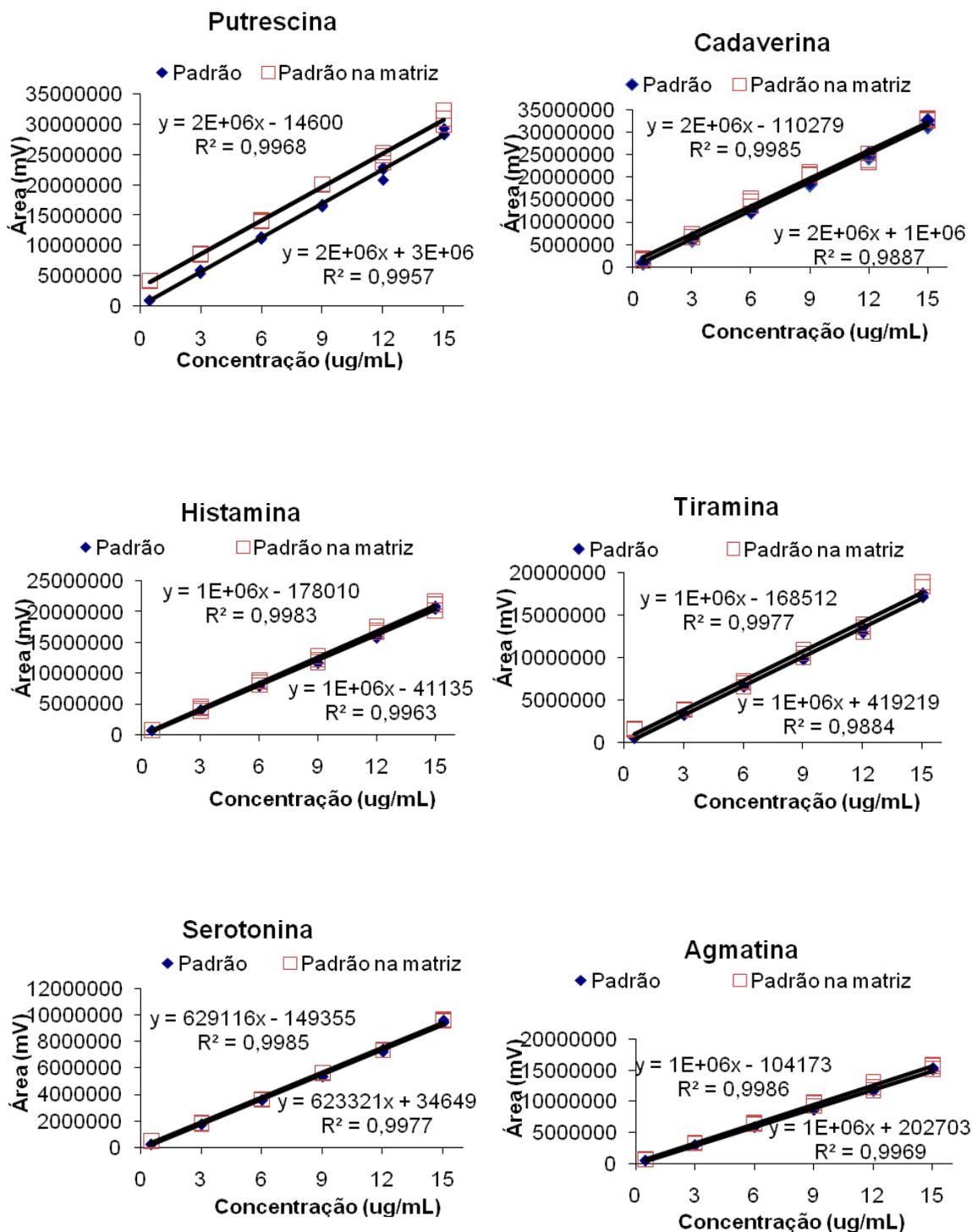
### **Efeitos da matriz**

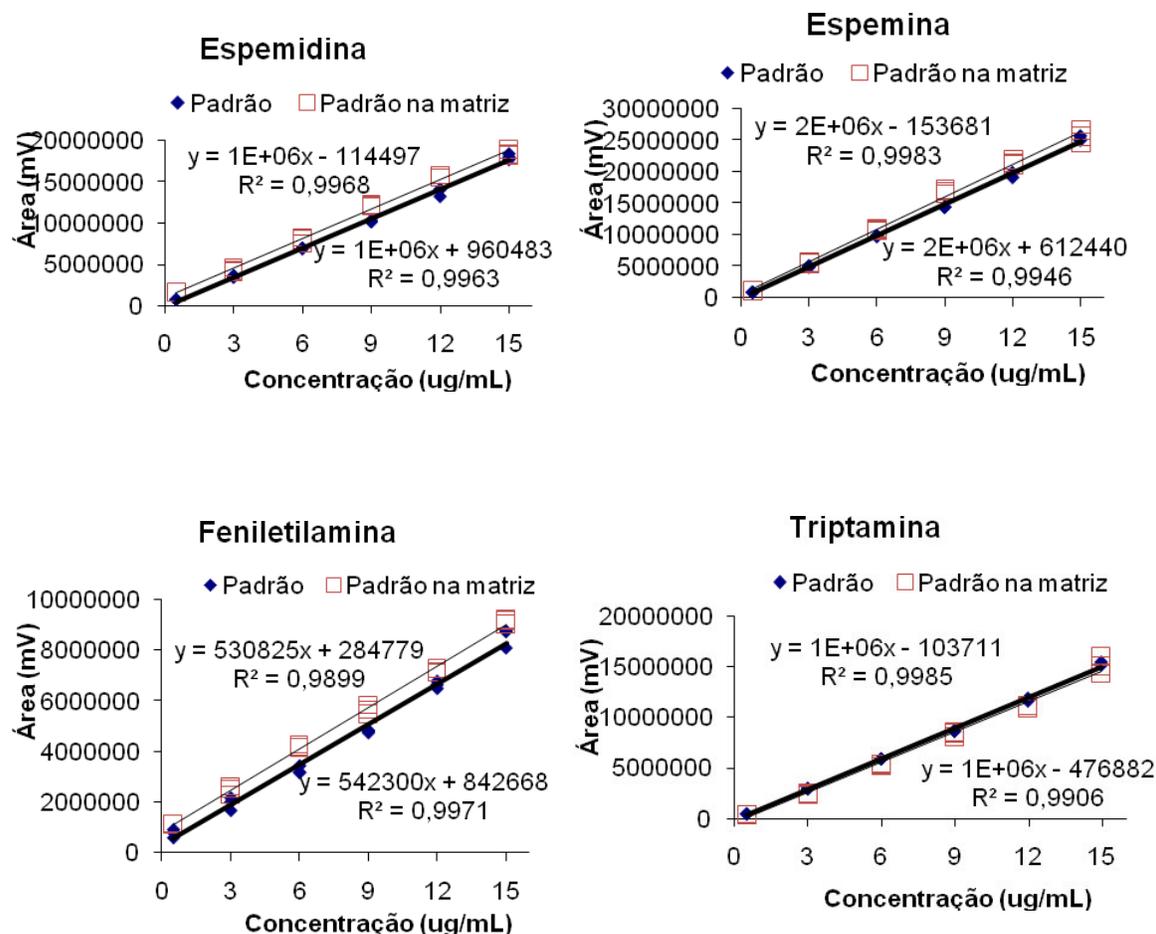
O método de adição do padrão utilizado para verificar a interferência da matriz na linearidade da curva analítica consiste na adição de padrão à amostra na mesma faixa de concentração utilizada para construir a curva analítica.

Os efeitos de cada uma das matrizes de café (cru, torrado e solúvel) na linearidade da curva analítica na faixa de 0,5 a 15  $\mu\text{g/mL}$  foram avaliados. Na Figura IV.2 estão demonstradas as curvas analíticas no solvente e na matriz café cru para todas as dez aminas.

Os resultados dos estudos do efeito da matriz café cru para avaliar se esta exerce influência na análise, mostraram que, ao se comparar as curvas de linearidade para os padrões no solvente e na matriz, os gráficos obtidos para todas as aminas a

matriz não apresentaram influência em relação à curva dos padrões no solvente, sendo possível visualizar que as curvas se sobrepuseram ou se apresentaram paralelas.





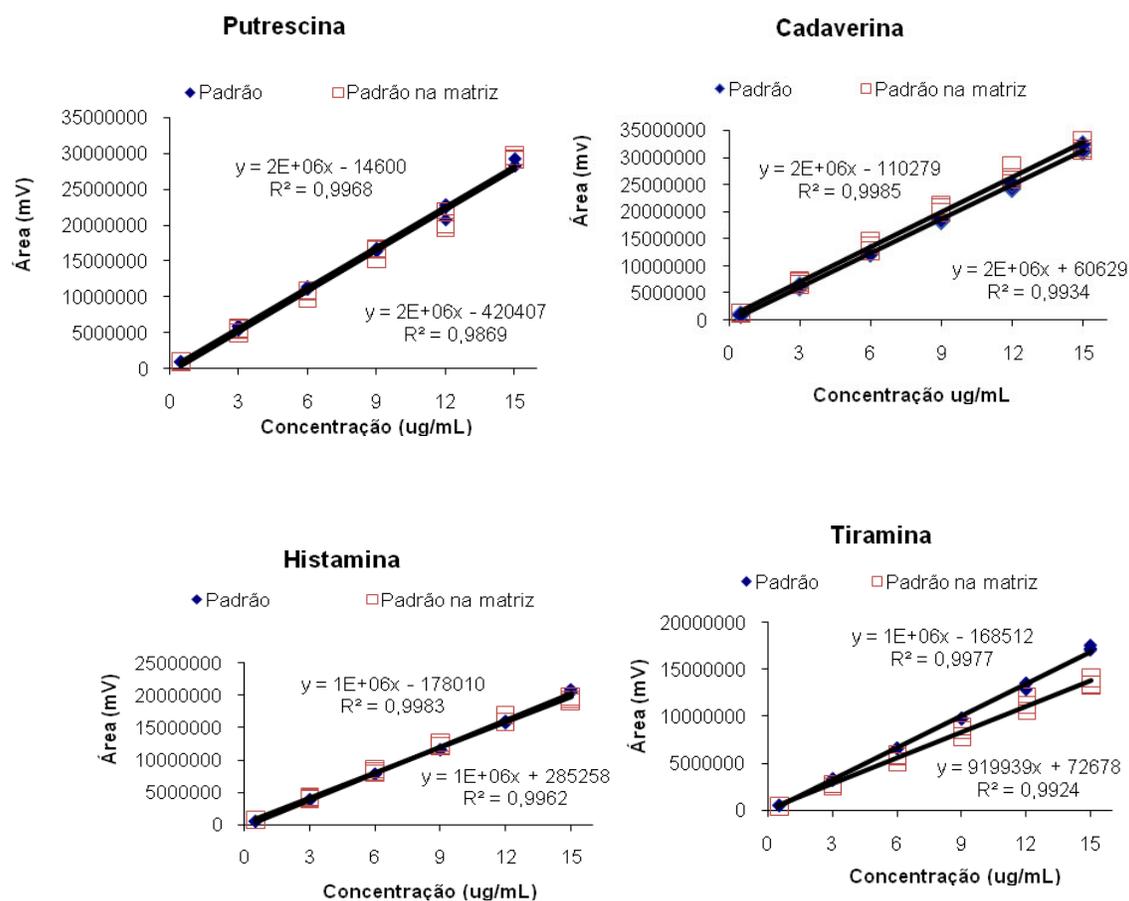
**Figura IV.2** – Curvas de linearidade das aminas no solvente e na matriz café cru. Equação acima da curva refere-se ao padrão; Equação abaixo da curva refere-se ao padrão na matriz.

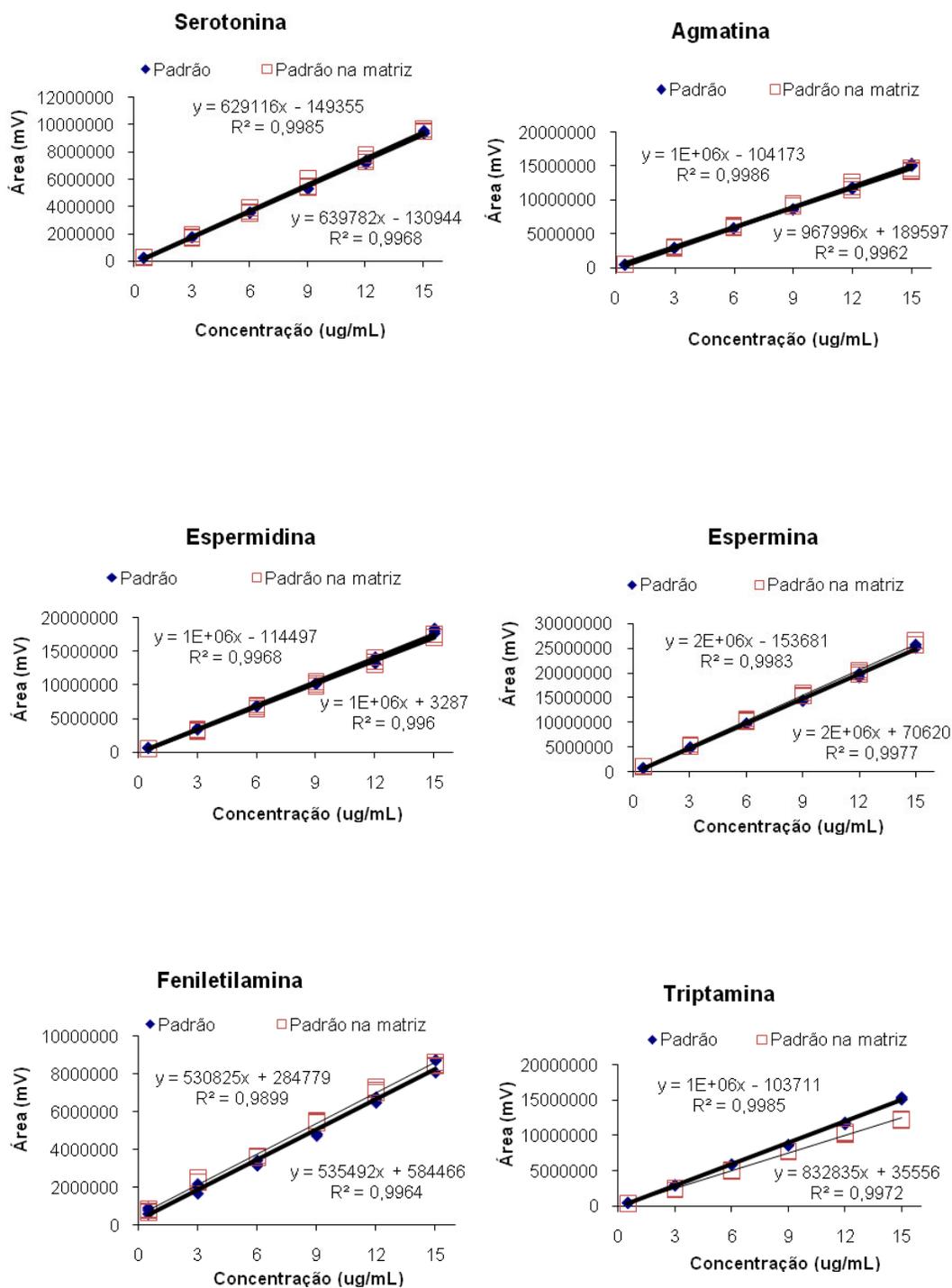
De acordo com RIBANI et al. (2003), um método é seletivo e a matriz não exerce influência na linearidade da curva analítica quando na comparação entre as curvas analíticas no solvente e na matriz, observa-se que ocorre uma sobreposição entre as retas ou as mesmas se posicionam paralelas. Ainda, segundo o mesmo autor, na determinação de analitos em que a matriz interfere na linearidade da curva analítica, esta deve ser construída na matriz.

O efeito da matriz café torrado na linearidade da curva analítica está demonstrado na Figura IV.3. Observa-se que, para a tiramina e triptamina as curvas analíticas no solvente e na matriz apresentaram um ângulo, o que demonstra que a matriz influenciou significativamente a curva analítica. Observa-se para estas aminas que a resposta do detector apresentou alterações em concentrações acima de 3  $\mu\text{g/mL}$

e, com o aumento da concentração do analito, as retas se distanciaram. Estes resultados demonstram que o café torrado apresenta substâncias capazes de modificar a resposta do detector no momento de detecção das amins tiramina e triptamina e, pelo perfil do gráfico, a resposta foi menor em relação ao padrão. Este fato pode estar relacionado com a mudança na composição química do café verde quando este é submetido ao processo de torração.

De acordo com MORAES & TRUGO (2001), a temperatura elevada durante a torração desencadeia reações complexas de desidratação, hidrólise, fracionamento e catálise, que liberam gases e formam princípios aromáticos, resultantes da transformação dos glicosídeos e outros compostos, que formarão as características específicas de bebida. Os produtos da torração são os açúcares caramelizados, ácido acético, aldeídos, cetonas, furfural, ésteres, ácidos graxos, amins, etc.

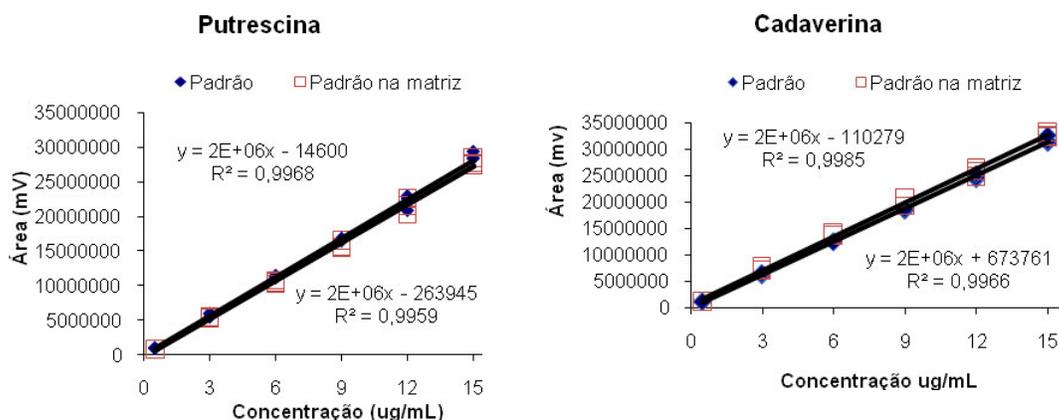


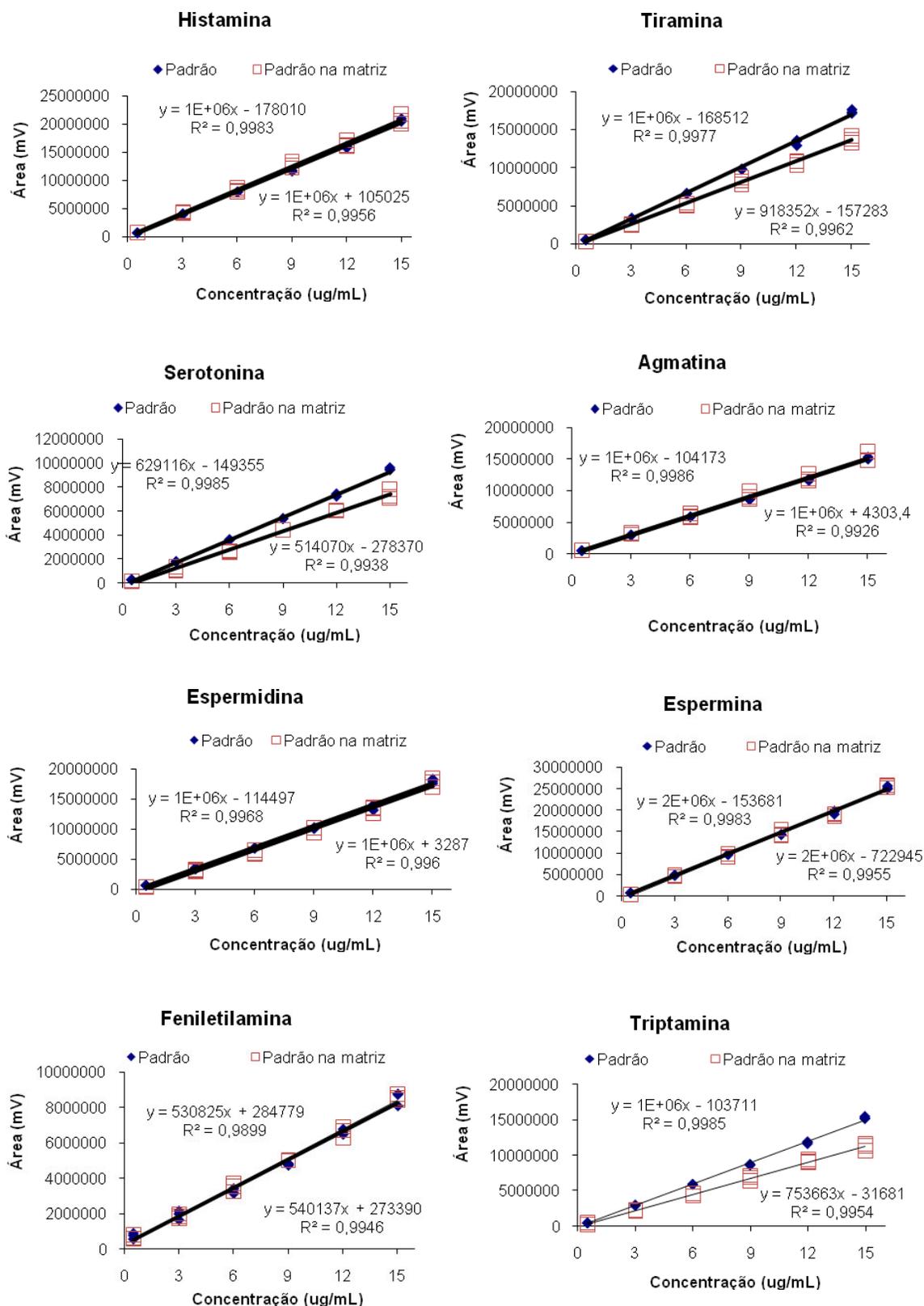


**Figura IV.3** – Curvas de linearidade das aminas no solvente e na matriz café torrado. Equação acima da curva refere-se ao padrão; Equação abaixo da curva refere-se ao padrão na matriz.

Na Figura IV.4 estão apresentados os gráficos das curvas de linearidade das dez aminos no solvente e na matriz café solúvel. Assim como observado no café torrado, a matriz café solúvel exerceu influência na resposta do detector para as aminos tiramina e triptamina. Porém, nesta matriz além destas aminos, a serotonina também apresentou divergência entre as curvas no solvente e na matriz. Semelhante ao café torrado, as alterações foram evidenciadas acima da concentração de 3 µg/mL sendo que, com o aumento da concentração do analito, houve um aumento no ângulo entre as retas.

A mudança na resposta do detector para a serotonina na matriz café solúvel pode estar relacionada com a concentração desta amina durante a produção do café solúvel. De acordo com CLARKE (2001), no processamento do café solúvel, o extrato do café é submetido à concentração para retirada de parte da água (40%), para facilitar a secagem para obtenção do café solúvel. Desta forma, provavelmente, as substâncias interferentes na detecção da serotonina estavam presentes no café torrado em baixas quantidades e, com a concentração durante o processamento do café solúvel, estas foram capazes de alterar a resposta do detector para a serotonina.





**Figura IV.4** – Curvas de linearidade das aminas no solvente e na matriz café solúvel. Equação acima da curva refere-se ao padrão; Equação abaixo da curva refere-se ao padrão na matriz.

Baseado nos resultados acima relatados, sugere-se que, para a determinação das aminas tiramina e triptamina em café torrado e tiramina, serotonina e triptamina em café solúvel as curvas analíticas sejam preparadas com padrões inseridos na matriz.

### **Limite de detecção e de quantificação**

Os limites de detecção e quantificação do método para as matrizes de café cru, torrado e solúvel estão apresentados nas tabelas IV.2. Os limites de detecção do método variaram de 0,1 a 0,3  $\mu\text{g/mL}$  para o café cru e 0,1 a 0,4  $\mu\text{g/mL}$  para os cafés torrado e solúvel. Já os limites de quantificação do método variaram de 0,05 a 0,10  $\text{mg}/100\text{ g}$  para as três matrizes de café avaliadas.

Resultados semelhantes para a detecção de histamina em vinhos foram reportados por PRESTES et al. (2007), que obtiveram limites de detecção e quantificação de 0,25  $\mu\text{g/mL}$  e 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de vinho. Limites de quantificação próximos (0,07 a 0,14  $\text{mg}/100\text{ g}$ ) aos estabelecidos por este trabalho foram também publicados por VALE & GLÓRIA (1997) para as dez aminas pesquisadas. Limites inferiores aos alcançados neste processo de validação foram reportados por autores que adotaram como critério de avaliação deste parâmetro os dados de desvio-padrão da resposta e coeficiente angular. LAVIZZARI et al. (2006) estabeleceram limites de detecção de 0,05  $\mu\text{g/mL}$  para a histamina, tiramina, serotonina, triptamina, octopamina, putrescina, cadaverina e espermidina; 0,07  $\mu\text{g/mL}$  para feniletilamina e dopamina; e 0,14  $\mu\text{g/mL}$  para espermina, utilizando amostras brancas de espinafre, nozes, banana, batata e leite achocolatado. Em relação aos limites de quantificação, esses autores apresentaram valores de 0,02  $\text{mg}/100\text{ mL}$  para as aminas pesquisadas exceto para espermina que foi de 0,04  $\text{mg}/100\text{ mL}$ .

Os limites de detecção experimentais do método para as dez aminas foram estabelecidos como 0,3  $\mu\text{g/mL}$  para o café cru e 0,4  $\mu\text{g/mL}$  para café torrado e solúvel. Para o limite de quantificação foi estabelecido o valor de 0,1  $\text{mg}/100\text{ g}$  para as aminas determinadas nas três matrizes avaliadas.

**Tabela IV.2** – Limites de detecção e de quantificação do método para matriz café

Aminas	Limites de quantificação ( $\mu\text{g/mL}$ ) e detecção ( $\text{mg}/100\text{ g}$ )	
	LOD	LOQ
<b>Café cru</b>		
Putrescina	0,2	0,05
Cadaverina	0,1	0,05
Histamina	0,1	0,05
Tiramina	0,3	0,10
Serotonina	0,1	0,05
Agmatina	0,1	0,05
Espermidina	0,3	0,10
Espermina	0,1	0,05
Feniletilamina	0,1	0,05
Triptamina	0,1	0,05
<b>Café torrado</b>		
Putrescina	0,3	0,08
Cadaverina	0,2	0,07
Histamina	0,2	0,06
Tiramina	0,2	0,06
Serotonina	0,1	0,05
Agmatina	0,2	0,08
Espermidina	0,3	0,09
Espermina	0,1	0,05
Feniletilamina	0,4	0,10
Triptamina	0,2	0,07
<b>Café solúvel</b>		
Putrescina	0,3	0,10
Cadaverina	0,1	0,05
Histamina	0,3	0,08
Tiramina	0,4	0,10
Serotonina	0,1	0,05
Agmatina	0,1	0,05
Espermidina	0,1	0,05
Espermina	0,1	0,05
Feniletilamina	0,2	0,08
Triptamina	0,1	0,05

LOD = limite de detecção; LOQ = limite de quantificação.

### Exatidão e precisão

Na Tabela IV.3 estão indicados os percentuais médios de recuperação e os respectivos coeficientes de variação obtidos na pesquisa de dez aminas bioativas nas matrizes café cru, torrado e solúvel. Estão indicados, em negrito e itálico, as recuperações que não atenderam estas recomendações do CODEX (1993).

**Tabela IV.3** – Percentuais de recuperação durante a extração de aminas bioativas das matrizes café cru, torrado e solúvel fortificadas com 0,1; 1 e 10 mg/100 g de padrão

Aminas	% de Recuperação (% CV)/Café		
	Cru	Torrado	Solúvel
<b>Putrescina</b>			
0,1 mg/100 g	81 (13)	88 (9)	86 (11)
1 mg/100 g	104 (4)	110 (9)	98 (15)
10 mg/100 g	103 (6)	81 (11)	81 (14)
<b>Cadaverina</b>			
0,1 mg/100 g	80 (4)	80 (4)	81 (11)
1 mg/100 g	95 (5)	95 (5)	97 (5)
10 mg/100 g	109 (10)	105 (3)	87 (2)
<b>Histamina</b>			
0,1 mg/100 g	80 (2)	81 (5)	82 (4)
1 mg/100 g	80 (14)	89 (2)	80 (5)
10 mg/100 g	82 (2)	80 (3)	88 (1)
<b>Tiramina</b>			
0,1 mg/100 g	81 (2)	80 (9)	80 (9)
1 mg/100 g	87 (4)	81 (2)	110 (4)
10 mg/100 g	106 (15)	89 (4)	84 (4)
<b>Serotonina</b>			
0,1 mg/100 g	<b>78</b> (3)	80 (6)	85 (10)
1 mg/100 g	80 (10)	88 (13)	86 (2)
10 mg/100 g	91 (2)	84 (5)	93 (4)
<b>Agmatina</b>			
0,1 mg/100 g	80 (5)	93 (7)	97 (14)
1 mg/100 g	105 (2)	110 (3)	103 (2)
10 mg/100 g	102 (8)	105 (13)	94 (2)
<b>Espermidina</b>			
0,1 mg/100 g	89 (4)	102 (9)	100 (8)
1 mg/100 g	91 (2)	80 (5)	93 (2)
10 mg/100 g	98 (15)	110 (13)	80 (13)
<b>Espermina</b>			
0,1 mg/100 g	86 (6)	80 (7)	84 (15)
1 mg/100 g	80 (8)	81 (6)	93 (2)
10 mg/100 g	84 (4)	83 (5)	80 (13)
<b>Feniletilamina</b>			
0,1 mg/100 g	<b>77</b> (7)	83 (12)	<b>66</b> (7)
1mg/100 g	<b>75</b> (2)	80 (12)	88 (13)
10 mg/100 g	84 (4)	81 (12)	82 (11)
<b>Triptamina</b>			
0,1 mg/100 g	<b>61</b> (13)	<b>59</b> (2)	<b>52</b> (14)
1 mg/100 g	<b>79</b> (13)	<b>74</b> (2)	80 (12)
10 mg/100 g	<b>78</b> (7)	80 (3)	87 (7)
<b>Média Geral</b>			
0,1 mg/100 g	<b>79</b>	83	81
1 mg/100 g	88	89	93
10 mg/100 g	94	90	85

De acordo com o CODEX (1993), para métodos quantitativos e concentrações do analito maiores que 0,01 mg/100 g, a faixa de recuperação deve estar entre 80 a 110% com coeficiente de variação de no máximo 15%. Considerando estas recomendações verifica-se que as amins serotonina, feniletilamina e triptamina, para algumas concentrações e tipos de matriz café, não atenderam esta especificação.

As médias de recuperação durante a extração alcançadas para as amostras adicionadas de 0,1 mg/100 g variaram de 61 a 89% para o café cru, de 59 a 102% para o café torrado e de 52 a 100% para o café solúvel. Para amostras fortificadas com 1 mg/100 g, as porcentagens de recuperação foram 75 a 105% (café cru), 74 a 110% (café torrado) e 77 a 103% (café solúvel). Amostras fortificadas com 10 mg/100 g apresentaram recuperações de 78 a 109%, 80 a 110% e 80 a 94%, para as matrizes de café cru, torrado e solúvel, respectivamente.

Avaliando as recuperações médias de cada amina nas diferentes matrizes, com base nas recomendações do CODEX (1994) observa-se que no café cru, seis das dez amins determinadas apresentaram percentual de recuperação entre 80 e 115%, nos três níveis de adição. Para a serotonina, feniletilamina e triptamina recuperações médias inferiores a 80% foram observadas na faixa de 0,1 mg/100 g. A triptamina apresentou médias de recuperação abaixo de 80% em todos os níveis de fortificação estudados.

Médias de recuperação aceitáveis foram atingidas na faixa de 0,1 a 10 mg/110 g para a putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, serotonina, agmatina, espermidina, espermina e feniletilamina na matriz café torrado. Somente a triptamina apresentou médias de recuperação abaixo do recomendado pelo CODEX (1993) na faixa de 0,1 mg/100 g (59%) e 1 mg/100 g (74%).

No café solúvel, as médias de recuperação foram satisfatórias para todas as amins na faixa de 1 a 10 mg/100 g. Porém, na faixa de 0,1 mg/100 g, baixas porcentagens de recuperação foram alcançadas para feniletilamina (66%) e triptamina (52%).

A precisão do método alcançou resultados satisfatórios para todas as dez amins na faixa de 0,1 a 10 mg/100 g. Os coeficientes de variação dos resultados obtidos nos estudos de recuperação variaram de 2 a 15% para o café cru, 2 a 13% para o torrado e 2 a 15% para o café solúvel.

Considerando os resultados acima relatados, o método avaliado pode ser considerado preciso na faixa de 0,1 a 10 mg/100 g para a determinação das dez

aminas pesquisadas (putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, serotonina, agmatina, espermidina, espermina, feniletilamina e triptamina) em amostras de café. Porém, nesta mesma faixa o método avaliado apresentou exatidão satisfatória apenas para putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, agmatina, espermidina e espermina. Entretanto, o método foi considerado validado pois, de acordo com BRITO et al. (2003), um método pode ser considerado validado mesmo que alguns parâmetros não se enquadrem nos limites estabelecidos pela literatura. Porém os mesmos devem ser conhecidos e adequados aos objetivos do estudo a ser realizado.

#### **IV.4 CONCLUSÕES**

O método CLAE-par iônico, derivação pós-coluna com OPA e detecção fluorimétrica foi validado e apresentou boa seletividade e precisão para determinação das aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, serotonina, agmatina, espermidina, espermina, feniletilamina e triptamina em amostras de café. A exatidão do método foi satisfatória apenas para putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, agmatina, espermidina e espermina.

O tipo da matriz café afetou a linearidade da curva analítica. Desta forma, para a pesquisa das dez aminas nas diferentes matrizes de café, a curva analítica usada para cálculo dos teores de aminas livres deve ser construída em solvente para análise de café cru e na própria matriz para análise de café torrado e solúvel.

## **CAPÍTULO V. INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO DO CAFÉ SOLÚVEL NOS TEORES DE AMINAS BIOATIVAS LIVRES E CONJUGADAS**

### **RESUMO**

Amostras de café foram coletadas em quatro pontos diferentes da linha de produção do café solúvel em uma indústria em três dias diferentes, não consecutivos, e analisadas quanto ao pH, teor de umidade e de cafeína, atividade de água, características de cor (CIE L\*a\*b\*) e dez aminos bioativas livres e conjugadas. Dentre as dez aminos livres pesquisadas, foram detectadas a tiramina, agmatina, espermidina e espermina. Os teores totais de aminos variaram de 0,23 a 2,42 mg/100 g. O processamento influenciou significativamente os teores das aminos bioativas livres e conjugadas no café. As aminos conjugadas ácido solúveis e insolúveis foram detectadas apenas no café cru. A putrescina conjugada ácido solúvel foi detectada no café torrado, porém em baixos teores. No café solúvel não foram encontradas aminos conjugadas. Os teores de umidade variaram com valores de 11,20 g/100 g para o café cru, de 2,61 para o café torrado, 60,15 no extrato concentrado e 4,12 g/100 g para o café solúvel. O teor de cafeína variou de 2,2 a 4,0 g/100 g. A atividade de água variou de 0,69 no início do processamento a 0,20 no final. Os parâmetros de luminosidade (L\*) alteraram durante o processamento, evidenciando a influência do mesmo na cor do café solúvel. Não foram observadas diferenças significativas nas características físico-químicas entre os três lotes avaliados indicando padronização do processo tecnológico.

Palavras-chave: aminos bioativas livres, aminos conjugadas, processamento, café solúvel.

## V.1 INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais consumidas em todo mundo e é apreciada tanto pelo sabor e aroma, como também por seu efeito estimulante. O café solúvel é o produto resultante da desidratação do extrato aquoso obtido exclusivamente do café torrado, utilizando água como único extrator (BRASIL, 2005). O consumo do café solúvel vem aumentando nos últimos anos devido às vantagens desta bebida como facilidade de preparo e conveniência por apresentar vida de prateleira longa (ICO, 2006).

O processo de produção do café solúvel envolve as etapas de seleção dos grãos, torração, extração e concentração do extrato, finalizando com a desidratação para obtenção do produto solúvel (SMITH, 1989). Durante o processamento, os grãos são torrados, moídos e submetidos à extração sob pressão em altas temperaturas (180 °C). O extrato é então desidratado em vaporizadores ou liofilizadores originando o café solúvel em pó ou granulado. A composição do café solúvel dependerá, além das condições do processamento, das espécies e variedades de café utilizadas nos blends (NOGUEIRA & TRUGO, 2003).

Dentre os muitos compostos biologicamente ativos presentes no café estão as aminas bioativas. As aminas são compostos orgânicos que podem estar naturalmente presentes nos alimentos ou serem formadas pela atividade enzimática da microbiota acompanhante, sendo classificadas como poliaminas e aminas biogênicas. As poliaminas espermidina e espermina estão amplamente distribuídas na natureza, estão presentes em elevadas concentrações nas células e têm seu conteúdo aumentado em tecidos com altas taxas de crescimento. Desempenham importantes funções nos processos de crescimento, renovação e metabolismo das células vivas (BARDÓCZ, 1995; SILLA SANTOS, 1996, LIMA & GLÓRIA, 1999, KALAC & KRAUSOVÁ, 2005). Nos vegetais, além das funções acima citadas, as poliaminas participam da floração e desenvolvimento do fruto, da resposta ao estresse e inibem a produção de etileno e a senescência (FLORES et al., 1989; SIMON-SARKADI et al., 1994, GLÓRIA, 2003).

As aminas biogênicas cadaverina, tiramina, histamina, serotonina, agmatina, feniletilamina e triptamina também podem estar naturalmente presentes nos alimentos ou serem formadas pela descarboxilação de aminoácidos por enzimas microbianas ou por decomposição térmica (HALÁSZ et al., 1994; GLÓRIA, 2005; ÖNAL, 2007). A

presença de histamina e serotonina em vegetais confere proteção ao tecido vegetal contra insetos e predadores (GLÓRIA, 2003).

Os relatos sobre a presença de aminas bioativas em café citam a predominância das poliaminas. AMORIM et al. (1977) e CIRILO et al. (2003) detectaram as aminas putrescina, espermidina e espermina em amostras de café verde, sendo que CIRILO et al. (2003) também detectaram serotonina. CASAL et al. (2004) detectaram além das aminas já citadas, cadaverina e tiramina. Porém OLIVEIRA et al. (2005) ao investigarem a presença de aminas em cafés de alta e baixa qualidade encontraram a histamina e triptamina em amostras de café classificados como rio, que são considerados de baixa qualidade.

Alguns autores avaliaram aminas em café torrado e verificaram que a torração alterou o perfil e teores de algumas aminas (AMORIM et al., 1977; CIRILO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005). Estudos realizados por SILVEIRA et al. (2007 a) evidenciaram a presença das poliaminas putrescina, espermidina e espermina em amostras de café solúvel. Mas, além destas aminas, foram encontradas também a serotonina, tiramina, cadaverina, histamina e feniletilamina.

O perfil e os teores de aminas bioativas em um determinado produto alimentício irão depender da espécie vegetal, das condições de cultivo, do processamento e ainda das condições higiênico-sanitárias durante o processamento e armazenamento. Assim sendo, as aminas poderiam ser utilizadas como parâmetro de qualidade, refletindo a má qualidade das matérias-primas utilizadas ou as condições higiênicas durante o processo de fabricação (DONHAUSER, 1993; LIMA & GLÓRIA, 1999, MARTINEZ-VILLALUENGA, 2008). A presença de histamina e triptamina no café tem sido associada a baixa qualidade do mesmo (OLIVEIRA et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2007).

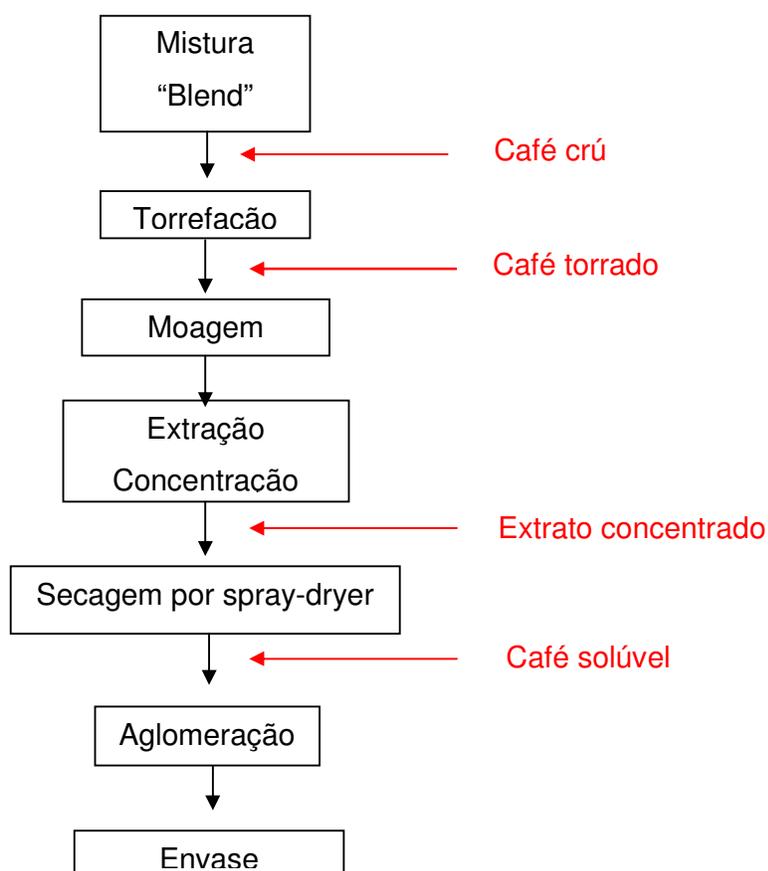
Diante da importância que o café solúvel vem assumindo na economia brasileira, e dos poucos relatos na literatura sobre a composição química do mesmo, o presente trabalho teve como objetivo investigar os tipos e teores de aminas bioativas no café solúvel, avaliar a influência das etapas do processamento no perfil e teores das aminas, bem como determinar as características físico-químicas como pH, umidade, atividade de água, teor de cafeína e características de cor do café solúvel.

## V.2 MATERIAL E MÉTODOS

### V.2.1 MATERIAL

#### V.2.1.1 Amostra

Para a execução deste trabalho, amostras de café foram coletadas durante o processamento do café solúvel em quatro pontos da linha de produção, em três dias distintos de coleta. De acordo com a Figura V.1, foram analisadas as amostras de café cru, café torrado, extrato concentrado de café e café solúvel. As amostras foram coletadas na Companhia Iguazu de café solúvel, localizada no município de Cornélio Procópio, PR.



**Figura V.1** – Fluxograma da produção de café solúvel com indicação dos pontos de coleta das amostras.

### V.2.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados possuíam grau analítico, exceto o solvente usado no CLAE (acetonitrila), que era de grau cromatográfico. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). Os padrões de amins bioativas (diidroclorato de putrescina - PUT, diidroclorato de cadaverina - CAD, diidroclorato de histamina - HIM, hidrocloreto de tiramina - TIM, tetraidroclorato de espermina - EPM, triidroclorato de espermidina - EPD, complexo sulfato creatinina agmatina - AGM, hidrocloreto de 2-feniletilamina - FEM, hidrocloreto de 5-hidroxitriptamina ou serotonina - SRT), foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). As fases móveis foram filtradas em membrana (47 mm de diâmetro e 0,45 µm de poro, Millipore Corp., Milford, MA, EUA) dos tipos HAWP e HVWP para reagentes aquosos e solventes orgânicos, respectivamente.

## V.2.2 MÉTODOS DE ANÁLISE

As amostras de café coletadas na indústria foram submetidas às análises de pH, cor, umidade, atividade de água e determinação dos teores de amins bioativas livres e conjugadas. Todas as análises foram executadas em triplicata.

### V.2.2.1 Determinação do pH

O pH das amostras de café foi determinado por medida direta em pHmetro digital (DM20 Digimed, Santo Amaro, SP, Brasil) previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 à temperatura ambiente. O café solúvel (2 g) foi reconstituído em 100 ml de água (IAL, 2004).

### V.2.2.2 Determinação das características de cor

As características de cor foram determinadas usando o colorímetro ColorTec PCM (Accuracy Microsensor, Pittsford, EUA). Foram efetuadas medidas dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e cálculo dos valores de croma [ $c = (a^2 + b^2)^{1/2}$ ] e tonalidade [ $h = \arctg a/b$ ] em triplicata. Os valores  $c$  e  $h$  foram confirmados empregando-se o software Colorpro (COLORPRO, 2004).

### **V.2.2.3 Determinação do teor de umidade**

O teor de água do café torrado e solúvel foi determinado pelo método de Karl Fisher segundo metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2004), utilizando titulador de Karl Fisher, marca Analyser, modelo KF-1000, Analyser Comércio e Indústria Ltda, São Paulo, SP, Brasil.

O teor de umidade do café cru foi determinado pelo método de secagem em estufa a  $105 \pm 2$  °C até peso constante (IAL, 2004).

### **V.2.2.4 Determinação da atividade de água**

A atividade de água foi determinada por leitura direta no equipamento da marca Testo, modelo 400, Testo do Brasil Instrumentos de Medição Ltda, Campinas, SP, Brasil.

### **V.2.2.5 Determinação do teor de cafeína**

O teor de cafeína das amostras de café foi determinado pelo método espectrofotométrico segundo metodologia descrita por IAL (2004).

### **V.2.2.6 SEPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS POR CLAE-PAR IÔNICO**

As aminas foram extraídas da matriz café conforme a metodologia otimizada descrita no capítulo I. Os grãos de café verde e torrado foram triturados e separados por peneiras, sendo as partículas retidas na peneira de 20 mesh.

Foram adicionados 10 mL de TCA 5% a 5 g da amostra (café cru, torrado, extrato e solúvel). Em seguida foram agitados em mesa agitadora por 10 minutos, centrifugadas a 11.180 g a 4 °C por 21 minutos e filtradas em papel de filtro qualitativo. A extração foi repetida mais duas vezes, com adição de 2 X 10 mL de TCA 5%; os extratos foram combinados e o volume final anotado.

Os extratos foram filtrados em membrana HAWP de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp. Milford, MA, EUA). As aminas foram determinadas por CLAE-par iônico, derivação pós-coluna com OPA, conforme metodologia descrita por CIRILO et al. (2003).

A análise cromatográfica foi efetuada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, modelo LC-10 AD, com câmara de mistura a baixa pressão;

conjunto de lavagem automática de pistão; injetor automático Shimadzu modelo SIL – 10 ADVP conectado a um detector espectrofluorimétrico modelo RF-10 AXL a 340 nm de excitação e 445 nm de emissão e um controlador CBM-20 A (Shimadzu, Kyoto, Japão) 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, protegido da luz, de 2 m de comprimento e 0,25 de diâmetro conectado entre a câmara de mistura e o detector e a bomba LC-10 AD (Shimadzu, Kyoto, Japão).

Foi utilizada uma coluna  $\mu$ Bondapak C18 em fase reversa 3,9 x 300 mm, 10  $\mu$ m e pré-coluna  $\mu$ Bondapak C18 (Waters, Milford, MA, EUA) e sistema gradiente de eluição em ambiente com temperatura controlada ( $20 \pm 1$  °C). As fases móveis foram: A - solução 0,2 M de acetato de sódio e 15 mM de octanosulfonato de sódio, pH 4,9 ajustado com ácido acético, B - acetonitrila. O fluxo de análise foi de 0,8 mL/min.

O reagente de derivação consistiu de 0,2 g de OPA dissolvido em 3 mL de metanol e 500 mL de uma solução de 25 g de ácido bórico e 22 g de KOH (pH 10,5), 1,5 mL de Brij-35 e 1,5 mL de mercaptanol. A solução derivante foi preparada diariamente, mantida ao abrigo da luz e bombeada à câmara de mistura a um fluxo de 0,4 mL/min.

A identificação das aminas foi feita por comparação do tempo de retenção das aminas na amostra em relação ao padrão e também pela adição de solução da amina suspeita à amostra. O cálculo da concentração das aminas foi feito por interpolação nas respectivas curvas analíticas.

### **V.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados obtidos durante a execução do experimento foram submetidos à análise de variância (média, desvio padrão e coeficiente de variação) - ANOVA, e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de significância utilizando-se o programa estatístico SIGMA STAT versão 2.0.

## V.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### V.3.1 Influência do processamento no perfil e teores de aminos bioativas livres

Das dez aminos pesquisadas, sete foram encontradas nas amostras de café cru, torrado e solúvel analisadas, dentre elas, putrescina, tiramina, serotonina, agmatina, espermidina, espermina e triptamina. Nenhuma das aminos estava presente em todas as amostras analisadas. A putrescina e a triptamina foram encontradas apenas no café cru correspondendo a 25% das amostras analisadas, já as demais aminos apareceram em 75% das amostras.

A presença de aminos bioativas livres em café já havia sido relatada na literatura. Algumas aminos encontradas neste estudo foram relatadas por diferentes autores em amostras de café verde (AMORIM et al. 1977; CIRILO et al, 2003; CASAL et al., 2004), torrado (CIRILO et al, 2003; CASAL et al., 2005) e solúvel (SILVEIRA et al., 2007a).

Os teores médios encontrados nos três lotes avaliados de cada amostra de café coletada em diferentes etapas do processamento do café solúvel estão indicados na Tabela V.1.

**Tabela V.1** – Teores médios de aminos bioativas livres em amostras coletadas em diferentes pontos do processamento do café solúvel

Café	Teores de aminos bioativas livres em mg/100 g * (% CV)							
	PUT	TIM	SRT	AGM	SPD	SPM	TRM	TOTAIS
<b>Crú</b>	1,00 (31)	0,34 (18) <b>a</b>	0,49 (17) <b>a</b>	nd	0,37 (18) <b>a</b>	0,15 (17) <b>b</b>	0,07 (18)	2,42 (16) <b>a</b>
<b>Torrado</b>	nd	nd	0,11 (8) <b>b</b>	0,13 (26)	nd	nd	nd	0,23 (15) <b>c</b>
<b>Extrato</b>	nd	0,30 (28) <b>a</b>	0,11 (16) <b>b</b>	0,17 (10)	0,12 (35) <b>b</b>	0,19 (16) <b>b</b>	nd	0,88 (21) <b>b</b>
<b>Solúvel</b>	nd	0,19 (20) <b>b</b>	nd	0,18 (25)	0,17 (18) <b>b</b>	0,31 (27) <b>a</b>	nd	0,85 (23) <b>b</b>

nd = não detectado (limite de detecção 0,04 mg/100 g). PUT = putrescina; TIM = tiramina; SRT = serotonina; AGM = agmatina; SPD = espermidina; SPM = espermina; TRM = triptamina

\* Valores expressos em base seca

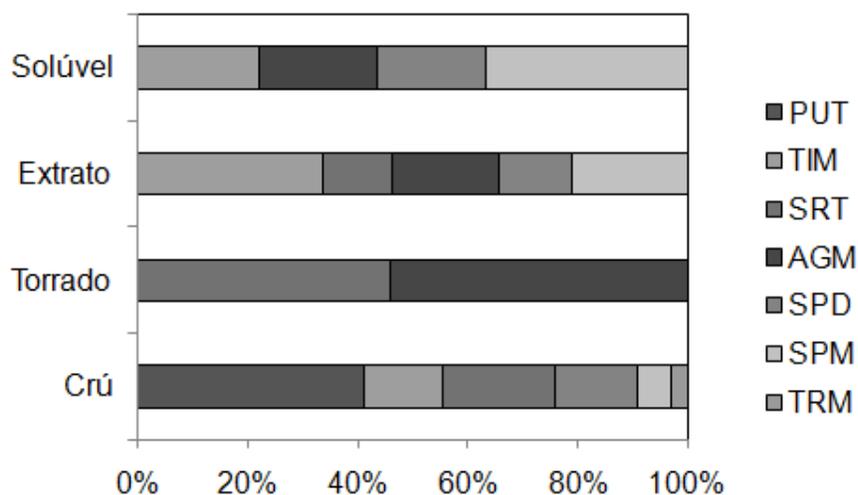
Valores médios com letras diferentes (a-b) na mesma coluna para cada tipo de café são estatisticamente diferentes.

Teste de Duncan (p<0,05).

Observa-se que uma maior quantidade de aminos livres foi detectada no café cru, seguido do extrato, café solúvel e torrado. Os teores totais médios de aminos

variaram de 2,42 mg/100 g no café cru, 0,23 mg/100 g no café torrado, 0,88 mg/100 g no extrato concentrado de café e 0,85 mg/100 g no café solúvel.

A contribuição percentual de cada uma das aminas ao teor total encontrado para as amostras das diferentes etapas do processamento está indicada na Figura V.2. No café cru a putrescina foi predominante contribuindo com 41%, seguida da serotonina (20%), espermidina (15%), tiramina (14%), espermina (6%) e triptamina (3%). Uma maior contribuição da putrescina ao teor total de aminas foi relatada na maioria dos estudos sobre café cru (AMORIM et al., 1977; CIRILO et al., 2003; CASAL et al., 2004; CASAL et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2006; SILVEIRA et al. (2007b). Outros estudos com amostras de origem vegetal como banana (ADÃO & GLÓRIA, 2005), molho de tomate (CHIACCHIERINI et al., 2006) e suco de laranja (VIEIRA et al., 2006), também apontaram a putrescina contribuindo em maiores percentuais. Acredita-se que pelo fato da putrescina ser um intermediário obrigatório na síntese das poliaminas, espermidina e espermina, esta se apresente em maiores proporções.

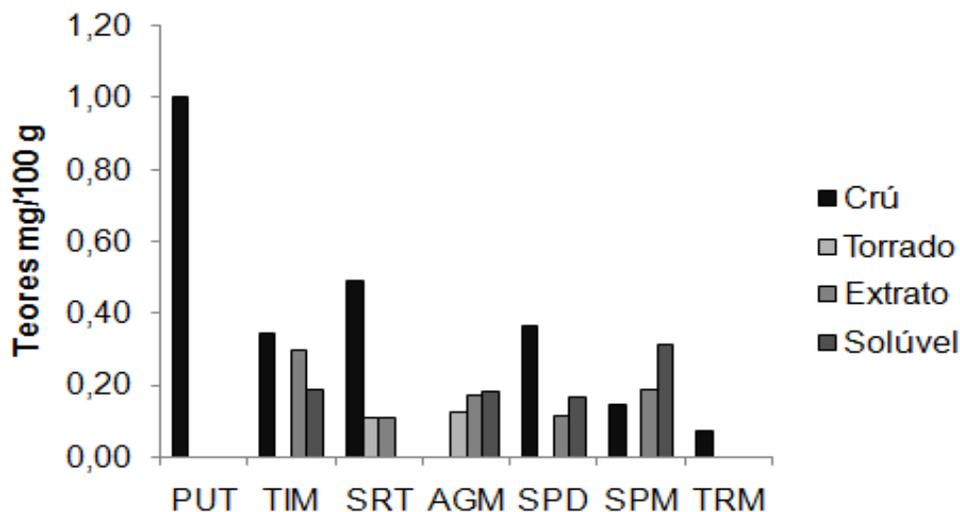


**Figura V.2** – Contribuição de cada amina ao teor total nas amostras de café coletadas em diferentes pontos do processamento do café solúvel. PUT = putrescina; TIM = tiramina; SRT = serotonina; AGM = agmatina; SPD = espermidina; SPM = espermina; TRM = triptamina

Nas amostras de café torrado foram encontradas apenas a agmatina e a serotonina com contribuições de 54 e 46%, respectivamente. No extrato de café e no café solúvel a maior contribuição foi da tiramina (34 – 22%), seguida da espermina (13

– 20%), agmatina (19 – 21%), e espermina (21 – 37%). A serotonina contribuiu com 13% no extrato de café e não foi detectada nas amostras de café solúvel.

A influência do processamento no perfil e teores das aminos bioativas nas amostras de café cru, café torrado, extrato concentrado do café e no café solúvel está demonstrado na Figura V.3. Observou-se que a etapa de torração alterou significativamente os teores de algumas aminos. As aminos putrescina, tiramina, espermidina, espermina e triptamina tiveram seus teores reduzidos ao ponto de não serem detectadas após a torração. Diminuições nos teores de aminos durante a torração do café também foram relatados por AMORIM et al. (1977), CIRILO et al. (2003), OLIVEIRA et al. (2005), CASAL et al. (2005), VASCONCELOS et al. (2006) e SILVEIRA et al. (2007 b). De acordo com estes autores, a taxa de redução nos teores das aminos está diretamente relacionada com o binômio tempo e temperatura de torração. CASAL et al. (2005) relataram 100% de redução nos teores de putrescina, espermidina e espermina em café submetido à torração a 240 °C por 15 minutos.



**Figura V.3** – Aminos bioativas livres detectadas nas amostras de café coletadas em diferentes pontos do processamento do café solúvel. PUT = putrescina; TIM = tiramina; SRT = serotonina; AGM = agmatina; SPD = espermidina; SPM = espermina; TRM = triptamina

O teor de serotonina foi reduzido em 80% após a torração. Dados similares foram encontrados por VASCONCELOS et al. (2006) que evidenciaram uma diminuição de 100% em amostras de grãos café defeituosos quando estes foram

submetidos a torração a 200 °C por 30 minutos. Por outro lado, CIRILO et al. (2003) observaram uma diminuição nos teores de serotonina após 6 minutos de torração à 300 °C e subsequente aumento após 12 minutos. Alguns autores reportaram que pode haver um aumento dos teores de serotonina durante processos térmicos devido à descarboxilação do 5-hidroxitriptofano (NAGATSU, 1991).

A agmatina foi detectada nas amostras de café somente após a torração, sugerindo que esta amina tenha sido formada durante a torração. Estes resultados estão de acordo com CIRILO et al. (2003) que evidenciaram a formação da agmatina durante a torração do café a 300 °C por 12 minutos. Segundo GLÓRIA (2005), a agmatina pode ser formada pela descarboxilação do aminoácido arginina ou ainda por decomposição térmica deste aminoácido. FELDMAN et al. (1969), ao avaliarem a influência de compostos não voláteis no flavor do café evidenciaram a presença de arginina em café verde (2,28 a 4,72 g/100 g) e que seus teores diminuíram durante a torração. Este fato reforça a hipótese da formação da agmatina durante a torração do café.

Após a torração, o café é moído e submetido à extração e concentração consecutiva. O teor total de aminas no extrato de café foi significativamente maior ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao café torrado. No extrato concentrado do café foi encontrado um maior número de aminas em relação ao café torrado. Este fato pode ser explicado pela concentração do extrato, o que fez com que algumas aminas que estavam presentes no café torrado em níveis não detectáveis pelo método de análise empregado, puderam ser detectadas no extrato após a sua concentração. Para as aminas serotonina e agmatina, que já haviam sido detectadas no café torrado, não foi observado um aumento significativo em seus teores após a concentração do extrato.

No café solúvel foram detectadas as aminas tiramina, agmatina, espermidina e espermina (Tabela V.I). Os teores encontrados foram de 0,19 mg/100 g para tiramina, 0,18 mg/100 g para agmatina, 0,17 mg/100 g para espermidina e 0,31 mg/100 g para espermina. Embora o teor total de aminas no café solúvel não tenha sido significativamente diferente, observou-se uma redução nos teores da tiramina e serotonina em relação aos teores encontrados no extrato concentrado, sendo que a serotonina não foi detectada. Este fato pode estar relacionado a uma perda destas aminas durante o processo de secagem do extrato concentrado que pode ser conduzido a elevadas temperaturas ( $\pm 100$  °C) na secagem por asperção.

Avaliando o perfil e teores de aminos bioativas livres presentes no café solúvel produzido a partir de blends elaborados utilizando-se 100% de café da espécie *Coffea canephora* var. robusta, observa-se que o café solúvel foi caracterizado pela presença das aminos espermidina, espermina, tiramina e agmatina. Comparando estes resultados com os dados relatados no capítulo I deste trabalho, observa-se que as amostras de café solúvel coletadas no mercado apresentaram perfil de aminos bioativas livres diferentes. Além das aminos acima citadas foram encontradas nas amostras de café solúvel coletadas no mercado consumidor a putrescina, serotonina, cadaverina, histamina e feniletilamina.

De acordo com NOGUEIRA & TRUGO (2003) um dos fatores que influenciam na composição final do café solúvel é o café utilizado na elaboração dos blends. Desta forma, a diferença no perfil de aminos bioativas encontrada nas amostras de café solúvel analisadas, pode estar relacionada com a utilização de diferentes espécies de café na formação dos blends, bem como a presença de grãos de café defeituosos e de baixa qualidade, visto que alguns autores têm relatado a presença da histamina em grãos defeituosos de café (OLIVEIRA et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2007).

Considerando que o perfil de aminos foi diferente para o café solúvel elaborado com 100% de café robusta, mais estudos são necessários para verificar a origem das aminos detectadas nas amostras de café solúvel analisadas no capítulo I. Assim a análise de aminos poderia ser utilizada como parâmetro de verificação da qualidade do café solúvel.

### **V.3.2 Influência do processamento no perfil e teores de aminos bioativas conjugadas**

#### **V.3.2.1 Perfil e teores de aminos ácido solúveis**

O perfil e teores das aminos conjugadas ácido solúveis detectadas nos cafés (cru, torrado, extrato e solúvel) ( $n = 3$ ) coletados em diferentes etapas do processamento do café solúvel estão indicados na Tabela V.2. Foram encontradas nas amostras de café cru as aminos conjugadas ácido solúveis putrescina, espermidina e espermina. Os teores totais variaram de 0,10 a 1,00 mg/100 g. A presença destas aminos em amostras de café já havia sido reportada por CASAL et al. (2004). Além

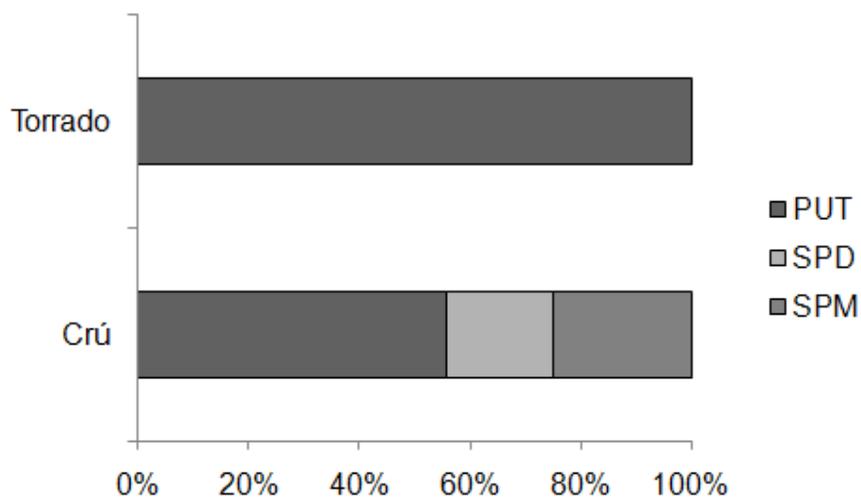
destas aminas estes autores encontraram a cadaverina, serotonina e tiramina ácido solúveis em concentrações que variaram de 0,02 a 0,37 mg/100 g de café.

**Tabela V.2** – Perfil e teores de aminas conjugadas ácido solúveis em amostras coletados durante o processamento do café solúvel

Tipos de café	Teores de aminas conjugadas ácido solúveis mg/100 g * (% CV)			
	PUT	SPD	SPM	TOTAIS
<b>Crú</b>	0,56 (43) <b>a</b>	0,19 (38) <b>a</b>	0,25 (18) <b>a</b>	1,00 (30) <b>a</b>
<b>Torrado</b>	0,10 (10) <b>b</b>	nd <b>b</b>	Nd <b>b</b>	0,10 (10) <b>b</b>

\* Valores expressos em base seca. CV = coeficiente de variação; PUT = putrescina; SPD = espermidina; SPM = espermina.

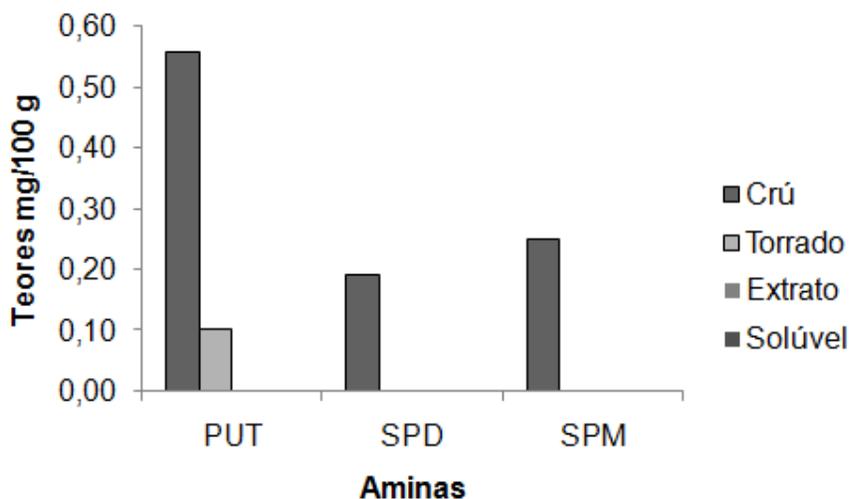
No café torrado, apenas a putrescina ácido solúvel foi detectada em teor médio de 0,10 mg/100 g de café. A amina ácido solúvel predominante no café cru foi a putrescina, contribuindo com 56% em relação ao teor total de aminas ácido solúveis. A espermina, segunda amina que mais contribuiu (25%), foi seguida da espermidina (19%) (Figura V.4).



**Figura V.4** – Contribuição de cada amina ácido solúvel ao teor total destas aminas.

Estes resultados são semelhantes aos reportados por CASAL et al. (2005) que evidenciaram uma predominância da putrescina ácido solúvel em amostras de café cru. Porém discordam de CASAL et al. (2004) que observaram uma maior predominância da espermina ácido solúvel em café cru. Relatos sobre a presença de aminos conjugadas ácido solúveis em amostras de origem vegetal tem sido encontrados na literatura, com predominância das poliaminas putrescina, espermidina e espermina (ARMAS et al., 1999; RODRIGUEZ et al., 2000; FONTANIELLA et al., 2001; TASSOMI et al., 2004).

O processamento influenciou de forma significativa os teores de aminos conjugadas ácido solúveis presentes nas amostras de café cru coletadas no início do processamento. Na Figura V.5, observa-se que no café cru foram encontradas as aminos ácido solúveis putrescina, espermidina e espermina. Porém, após a torração, a espermidina e a espermina não foram detectadas, indicando uma degradação das mesmas. Nas amostras de café após a torração apenas a putrescina foi encontrada mas em teores menores aos quantificados no café antes da torração. Foi observada uma redução de 82% nos teores da putrescina ácido solúvel após a torração.



**Figura V.5** – Comportamento das aminos ácido solúveis frente as diferentes etapas do processamento do café solúvel.

Resultados semelhantes foram relatados por CASAL et al. (2005) que, ao estudarem o efeito da torração no perfil e teores de aminos conjugadas no café, evidenciaram uma diminuição significativa nos teores das aminos putrescina,

espermidina e espermina no café torrado. Estes autores ainda concluíram que a degradação era maior quanto maior o tempo e a temperatura de torração.

### V.3.2.1 Perfil e teores de aminos ácido insolúveis

Na Tabela V.3 estão demonstrados os teores médios das aminos conjugadas ácido insolúveis encontrados nas amostras de café obtidas de diferentes pontos do processamento do café solúvel. Semelhante às aminos ácido solúveis, apenas as poliaminas putrescina, espermidina e espermina ácido insolúveis foram detectadas e somente nas amostras de café cru coletadas no início do processamento. O teor total foi de 1,20 mg/100 g.

Diferente ao observado para as aminos ácido solúveis, a amina predominante entre as ácido insolúveis detectadas foi a espermina. A contribuição de cada amina ao teor total das aminos ácido insolúveis está indicada na Figura V.6. Como dito anteriormente, a espermina foi a amina predominante com 65%, seguida da putrescina com 19%, e da espermidina 16%. Estes resultados estão de acordo com CASAL et al. (2004) e (2005) que reportaram a predominância da espermina ácido insolúvel em amostras de café cru.

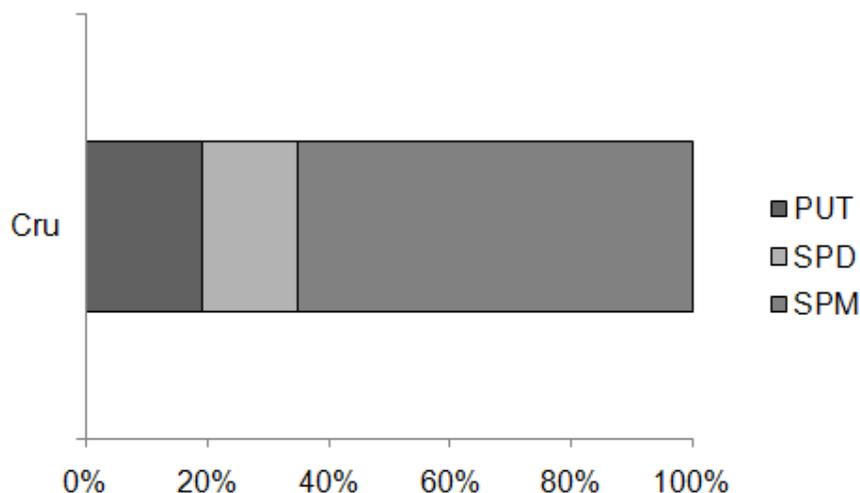
**Tabela V.3** - Teores de aminos ácido insolúveis em amostras coletadas durante o processamento do café solúvel

Aminos	Teores em mg/100 g * (% CV)/ Café
	CRU
<b>PUT</b>	0,23 (16)
<b>SPD</b>	0,19 (12)
<b>SPM</b>	0,78 (7)
<b>TOTAIS</b>	1,20 (11)

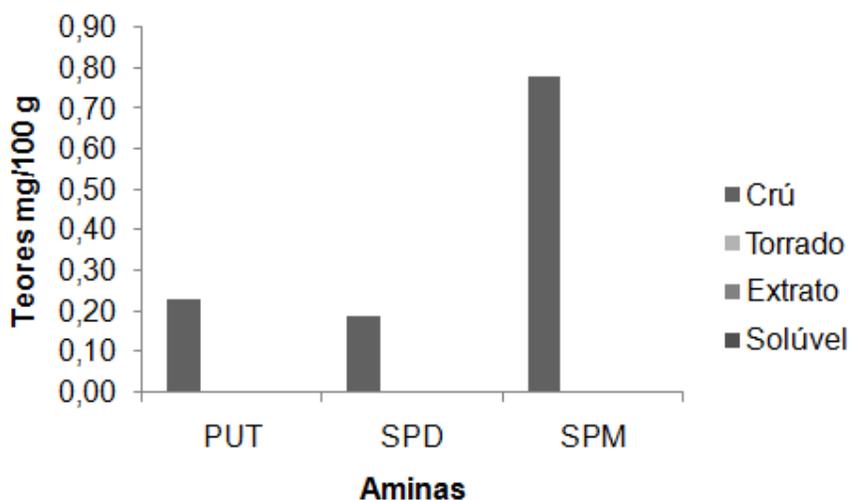
\* Valores expressos em base seca. CV = coeficiente de variação. PUT = putrescina; SPD = espermidina; SPM = espermina. DP = desvio padrão.

Da mesma forma que o processamento alterou os teores de aminos ácido solúveis presentes no café, este alterou também as aminos ácido insolúveis (Figura V.7). As aminos ácido insolúveis só foram detectadas nas amostras de café cru coletadas na etapa de mistura. Após a torração, as aminos ácido insolúveis não foram

detectadas, reforçando desta forma, as evidências da instabilidade destas amins frente ao processamento térmico.



**Figura V.6** – Contribuição de cada amina ácido insolúvel ao teor total destas amins.



**Figura V.7** - Comportamento das aminas ácido insolúveis frente às diferentes etapas do processamento do café solúvel.

Considerando os dados acima relatados sobre o perfil e teores das aminas bioativas livres e conjugadas no café cru, observa-se que as aminas putrescina, espermidina e espermina estavam presentes tanto na forma livre quanto na conjugada.

A espermidina estava presente em maior concentração na sua forma livre, enquanto que a espermina foi predominante na forma conjugada. Alguns estudos sobre o perfil de aminas livres no café demonstraram a predominância da espermidina em relação à espermina (CIRILO et al. 2003; CASAL et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2007). Desta forma os resultados acima reforçam a hipótese levantada por CASAL et al. (2005) que sugeriram que a forma predominante da espermina no café seja a conjugada.

### V.3.3 Características físico-químicas

#### V.3.3.1 pH, umidade, atividade de água e teores de cafeína

Os resultados obtidos com relação aos parâmetros físico-químicos determinados nas amostras de café coletadas durante o processamento do café solúvel estão apresentados na Tabela V.4. Os coeficientes de variação dos resultados obtidos nas análises dos três lotes coletados foram baixos ( $\leq 20\%$ ), evidenciando uma padronização e controle efetivo do processo tecnológico.

**Tabela V.4** – Características físico-químicas de amostras de café coletadas durante o processamento do café solúvel

Café	Parâmetros/ Valores médios (% CV)			
	pH	Umidade % m/m	Atividade de água	Cafeína % m/m*
<b>Cru</b>	nd	11,20 (5) <b>b</b>	0,68 (2) <b>a</b>	2,20 (20) <b>b</b>
<b>Torrado</b>	nd	2,61 (20) <b>d</b>	0,60 (2) <b>a</b>	2,67(11) <b>b</b>
<b>Extrato</b>	4,83 (1)	60,15 (1) <b>a</b>	nd	2,60 (8) <b>b</b>
<b>Solúvel</b>	4,83 (1)	4,12 (1) <b>c</b>	0,22 (4) <b>b</b>	4,00 (7) <b>a</b>

nd = não determinado.

\* Valores referentes a apenas uma determinação.

O café solúvel avaliado apresentou % de água média de 4,12 g/100 g. Estes valores estão de acordo com a legislação vigente a RDC Nº 277 de 22 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005), que estabelece a umidade do café solúvel em no máximo 5%.

A umidade média do café cru foi de 11,20 g/100 g, do café torrado de 2,61 g/100 g, 60,15 g/100 g para o extrato concentrado e 4,12 g/100 g para o café solúvel. O percentual de umidade encontrado nas amostras de café cru coincide com os comumente reportados na literatura (CLARKE, 1989; FRANÇA et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2007) que variaram de 8,5 a 13 g/100 g. Após a torração, o café apresentou uma redução no teor de umidade, o que era esperado devido à perda de massa dos grãos do café durante a torração. Os resultados de umidade do café torrado encontrados neste trabalho concordam com BELETZ & GROSH (1997). Segundo estes autores, a umidade dos grãos de café pode variar de 1,5 a 3,5 g/100 g.

Em relação à atividade de água das amostras de café observou-se que houve uma redução na atividade de água durante o processamento do café solúvel, sendo que, ao final do processamento, o café apresentou os menores teores de atividade de água, entre 0,20 a 0,23. Valores de atividade de água baixos são requeridos para o café solúvel, devido a influência da atividade de água nas características sensoriais do produto. Segundo ALVES & BORDIN (1998), alterações visuais no café solúvel, como aglomeração leve, foram evidenciadas com atividade de água de 0,43, aglomeração forte com  $A_w$  entre 0,51 a 0,63 e princípio de dissolução com  $A_w$  a partir de 0,67.

Não foi observado diferença significativa nos valores de pH entre as amostras analisadas. O valor médio do pH foi de 4,83 para o café coletado após a extração e concentração e para o café solúvel.

Os teores médios de cafeína nas amostras de café avaliadas foram de 2,20 g/100 g no café cru, 2,67 g/100 g no torrado, 2,60 g/100 g no extrato e 4,0 g/100 g no café solúvel. Dados similares sobre o teor de cafeína no café cru foram reportados por MACRAE (1989) com valores que variaram de 0,9 a 2,4 g/100 g. Os teores de cafeína encontrados neste trabalho para as amostras de café após a etapa de torração discordam de BRENELLI (2003) que observou teores médios de cafeína de 1,4 g/100 g de café torrado. FUJIOKA & SHIBAMOTO (2008) também reportaram valores de cafeína em café torrado entre 1,09 a 1,65 mg/100 g.

### **V.3.3.2 Características de cor**

As características de cor das amostras de café coletadas durante o processamento do café solúvel, investigadas neste estudo, estão indicadas na Tabela V.5. Das quatro amostras de café coletadas durante o processamento foram

submetidas a análise de cor o café torrado e o café solúvel. Nas amostras de café torrado foram observadas diferenças significativas para os valores de  $a^*$ ,  $b^*$  e croma. Para as amostras de café solúvel não foram observadas diferenças significativas entre os parâmetros avaliados.

**Tabela V.5** – Características de cor (CIE  $L^*a^*b^*$ ) de amostras coletadas durante o processamento do café solúvel

Cafés	Valores/Parâmetros de cor CIE $L^*a^*b^*$ (%CV)				
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	croma	hue*
<b>Torrado</b>	20,6 (10) <b>b</b>	5,7 (75) <b>b</b>	13,1(32) <b>b</b>	15,1(15) <b>b</b>	92,9 (3) <b>a</b>
<b>Solúvel</b>	32,2 (6) <b>a</b>	12,2 (8) <b>a</b>	31,5 (10) <b>a</b>	33,9 (9) <b>a</b>	68,6 (4) <b>b</b>

$L^*$  = luminosidade;  $h^*$  = tonalidade

Médias de triplicatas com letras diferentes na mesma coluna (a-b) são significativamente diferentes (Teste de Duncan,  $p \leq 0,05$ ).

Os valores de luminosidade ( $L^*$ ) encontrados para o café solúvel foram maiores que os obtidos para as amostras de café torrado. De acordo com BORGES et al. (2002), o parâmetro luminosidade relaciona-se ao grau de escurecimento do café, podendo variar de 0 (preto) a 100 (branco). Ainda, segundo estes autores, existe uma correlação significativa inversa entre a luminosidade e o grau de torração do café. Desta forma, os dados encontrados sugerem que as etapas do processamento após a torração alteraram a cor do café solúvel.

## V.5 CONCLUSÕES

As aminas bioativas livres presentes no café solúvel foram a tiramina, agmatina, espermidina e espermina. As etapas do processamento influenciaram significativamente os teores das aminas. A torração reduziu os teores de algumas aminas, mas também propiciou a formação da agmatina. A etapa de concentração do extrato de café contribuiu para um aumento nos teores das aminas. Já na etapa final do processamento do café solúvel, algumas aminas tiveram seus teores reduzidos novamente.

No café solúvel não foram encontradas amins conjugadas. Durante o processamento do café solúvel, houve alteração nos teores destas amins, que foram detectadas apenas no café cru coletado no início do processamento e em teores bem reduzidos no café torrado.

As características físico-químicas das amostras coletadas durante a produção do café solúvel foram afetadas de forma significativa pelas diferentes etapas do processamento, porém as alterações observadas são requeridas para padronização do processo tecnológico. Alterações nos parâmetros de cor durante o processamento do café solúvel evidenciaram uma interferência das etapas de extração e secagem na coloração final do café solúvel.

## CONCLUSÕES INTEGRADAS

As amostras de café solúvel coletadas no mercado consumidor caracterizaram-se pela presença das aminas bioativas livres putrescina, cadaverina, tiramina, serotonina, espermidina, espermina, sendo a putrescina a amina predominante. Os teores das aminas calculados em 50 mL da bebida não representam riscos para a saúde do consumidor mesmo considerando um consumo de 200 mL por dia, que é a quantidade estimativa de consumo diário da população brasileira.

Na determinação das aminas bioativas livres do café, para uma melhor extração das aminas da matriz, os grãos de café devem ser moídos e separados em peneiras de tamanhos de 9 a 20 mesh que corresponde a 2,0 a 0,85 mm de diâmetro. A extração deve ser conduzida com ácido tricloroacético a 5% (m/v) em três extrações consecutivas.

Para a quantificação das aminas conjugadas é necessário fazer uma hidrólise para posterior análise das aminas livres. A condição de hidrólise que apresentou melhor eficiência na liberação de um maior número de aminas conjugadas ácido, solúveis e ácido insolúveis do café foi conduzida com ácido clorídrico 9 mol/L a 110 °C por 18 horas.

A metodologia de determinação de aminas conjugadas baseada na hidrólise das mesmas e liberação de sua forma livre não é recomendada para a pesquisa de serotonina, pois esta amina apresentou grande instabilidade frente à reação de hidrólise.

A metodologia analítica para a determinação de aminas bioativas livres por CLAE-par iônico, derivação pós-coluna com OPA e detecção fluorimétrica foi validada para análise de amostras de cafés cru, torrado e solúvel. O método apresentou precisão, linearidade, limites de detecção e quantificação adequados para a análise dos diferentes tipos de cafés. Foi observado que a matriz café torrado influenciou na linearidade da curva analítica das aminas tiramina e triptamina. Interferências na curva analítica para as aminas serotonina, tiramina e triptamina também foram evidenciadas para a matriz café solúvel. Sugere-se que na determinação destas aminas nestas matrizes, a curva analítica seja preparada com padrões na matriz.

O café solúvel coletado durante o processamento foi caracterizado pela presença das aminas tiramina agmatina, espermidina e espermina. As etapas do

processamento do café solúvel influenciaram o perfil e os teores das aminas bioativas livres e conjugadas. Os teores das aminas livres reduziram de forma significativa após a torração dos grãos de café, sendo que o teor da serotonina foi reduzido em 80% e as demais aminas, putrescina, tiramina, espermidina, espermina e triptamina, que estavam presentes nos grãos crus não foram detectadas no café torrado. Foi observada a formação da agmatina durante a torração do café. A etapa de concentração do extrato do café contribuiu para um aumento nos teores de algumas aminas. A tiramina, a espermidina e a espermina que não foram detectadas após a torração tiveram seus teores aumentados na etapa de concentração do extrato de café.

No café solúvel não foram detectadas aminas conjugadas. O processamento afetou significativamente os teores das aminas conjugadas. As aminas conjugadas ácido solúveis putrescina, espermidina e espermina foram detectadas nos grãos de café cru. Após a torração houve uma diminuição significativa da putrescina e as demais aminas não foram detectadas. As aminas conjugadas ácido insolúveis putrescina, espermidina e espermina estavam presentes apenas nos grãos de café cru.

A umidade e a atividade de água sofreram alterações durante o processamento. Porém, estas são requeridas para a manutenção da qualidade do café solúvel. As características de cor também sofreram alterações durante o processamento, evidenciando uma diminuição da tonalidade escura do café solúvel. Pequenas variações nos resultados dos parâmetros físico-químicos analisados nos três lotes de produção do café solúvel sugerem controle efetivo e padronização no processo tecnológico da indústria produtora de café solúvel.

## SUGESTÕES

Considerando os resultados encontrados durante a execução deste trabalho e a importância do café no mercado mundial e também como alimento que pode contribuir para a saúde do consumidor, sugere-se como trabalhos futuros:

- Avaliar o perfil e teores de aminos bioativas no café *Coffea canephora* variedade robusta brasileiro;
- Estudar a influência grãos defeituosos de café e casca de café no perfil e teores de aminos bioativas no café solúvel para avaliar a utilização das aminos como parâmetro de identificação de possíveis fraudes no café solúvel;
- Verificar a influência das aminos bioativas no sabor e aroma da bebida café;
- Determinar os tipos e teores de ácidos hidroxinâmicos presentes no café e verificar quais ácidos fazem conjugação com as aminos presentes no café;
- Estudar a influência da conjugação das aminos com os compostos fenólicos na atividade antioxidante do café;
- Avaliar a biodisponibilidade das aminos presentes no café após a ingestão da bebida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABICS. Associação Brasileira das Indústrias de Café Solúvel. Análises econômicas. Dodirex 1-2007: desempenho 2006 e perspectivas 2007. Disponível em: <http://www.abics.org.br>. Acesso em: 19/outubro/2007.
- ABICS. Associação Brasileira das Indústrias de Café Solúvel. Análises econômicas. Dodirex 1-2008: desempenho 2007 e perspectivas 2008. Disponível em: <http://www.abics.org.br>. Acesso em: 30/junho /2008.
- ADÃO, R.C.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines and carbohydrate changes during ripening of 'Prata' banana (*Musa acuminata* X *M. Balbisiana*). *Food Chem.*, v. 90, n. 4, p. 705-711, 2005.
- ALVES, R.M.V.; BORDIN, R.M. Estimativa da vida útil de café solúvel por modelo matemático. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v.18, n.1, p. 19-24 ,1998.
- ALVES, R.M.V.; MILANEZ, C.R.; PADULA, M. Embalagens alternativas para café solúvel. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 20, n. 2, p. 204-211, 2000.
- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; CROCOMO, O.J.; TEIXEIRA, A.A. Polyamines in green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.*, v. 25, n. 4, p. 957–958, 1977.
- ANTOINE, F.R.; WEI, C.; OTWELL, W.S.; SIMS, C.A.; LITTELL, R.C.; HOGLE, A.D.; MARSHALL, M.R. Gas chromatographic analysis of histamine in mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*). *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, n. 17, p. 4754 – 4759, 2002.
- ANTOLINI, F.; FRANCIOSINI, S.; FLORIDI, A.L.; FLORIDI, A. An íon-pair HPLC method for the determination of histamine, tyramine, tryptamine,  $\beta$ -phenylethylamine and their amino acid precursors in cheeses for industrial purposes. *Ital. J. Food Sci.*, v. 11, p. 335-345, 1999.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução nº 899*, de 29 de maio de 2003.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *Official methods of analysis*. 16 ed. Washington: AOAC, 1995. Método 35.1.32.
- ARMAS, R.; MARTINEZ, M.; VICENTE, C.; LEGZ, M.E. Free and conjugated polyamines and phenols in raw and alkaline-clarified sugarcane juices. *J. Agric. Food Chem.*, v. 47, p. 3086-3092, 1999.

- BAGGIO, S.R.; BRAGAGNOLO, N. Validação da metodologia para determinação simultânea, por CLAE, de colesterol e óxidos de colesterol em produtos cárneos processados. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 24, n. 1, p. 64-70, 2004.
- BAGNI, N.; TASSONI, A. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids*, v. 20, p. 301-317, 2001.
- BAKER, G.B.; WONG, J.T.F.; COUTTS, R.T.; PASUTTO, F.M. Simultaneous extraction and quantitation of several bioactive amines in cheese and chocolate. *Chromatographia*, v. 19, p. 317-331, 1987.
- BARDÓCZ, S.; GRANT, G.; BROWN, D.S.; RALPH, A.; PUSZTAI, A. Polyamines in food: implications for growth and health. *J. Nutr. Biochem.*, v. 4, n. 2, p. 66-71, 1993.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 6, p. 341-346, 1995.
- BARROS, C.B. Validação de métodos analíticos. *Biológico*, v. 64, n. 2, p. 175-177, 2002.
- BASSO, L.C.; SMITH, T.A. Effect of mineral deficiency on amine formation in higher plants. *Phytochem.*, v. 13, p. 875-883, 1974.
- BELETZ, H.D.; GROSH, W. Química de los alimentos. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 1997. 1087 p.
- BNDES. Nestlé constrói, com apoio do BNDES, fábrica de café solúvel para exportação. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/noticias/not683.asp>. Acesso em 02/ março/ 2005.
- BORGES, M.L.A.; FRANÇA, A.S.; OLIVEIRA, L.S.; CORREA, P.C.; GLORIA, M.B.A. Estudo da variação da coloração de café arábica durante a torrefação em diferentes condições de aquecimento. *Rev. Bras. Armaz.* v. especial, n. 5, p. 3-8, 2002.
- BOUCHEREAU, A.; GUÉNOT, P.; LARHER, F. Analysis of amines in plant materials. *J. Chromatogr. B*, v. 747, p. 49-67, 2000.
- BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W.H. Improved screening for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* v. 53, p. 33-41, 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 130 de 19 de fevereiro de 1999. Aprova Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de café solúvel. Diário Oficial, Brasília, 25 fev. 1999.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução n° 277, de 22 de setembro de 2005. Aprova Regulamento técnico para café, cevada, chá erva-mate e produtos solúveis. Diário Oficial, Brasília, 23 set. 2005.
- BRENELLI, E.C.S. A extração de cafeína em bebidas estimulantes – uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. *Quim. Nova*, v. 26, n. 1, p. 136-138, 2003.
- BRENNAN, J.G.; BUTTERS, J.R.; COWELL, N.D.; LILLEY, A.E.V. Las Operaciones de la Ingeniería de los Alimentos. 3ª ed. Zaragoza: Acribia, 1998, 716 p.
- BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; SANTOS, T.C.R.; RIBEIRO, M.L. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. Meio Amb.*, v. 12, p. 155-168, 2002.
- BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. Meio Amb.*, v. 13, p. 129-146, 2003.
- BUSTO, O.; MIRACLE, M.; GUASH, J.; BORRULL, F. Determination of biogenic amines in wines by high-performance liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization. *J. Chromatogr. A*, v. 757, p. 311-318, 1997.
- CABRAL, V.L. *Tecnologia de moagem do café*. Belo Horizonte: Uni-bh. 2007. (Monografia, Graduação em Engenharia de Alimentos).
- CASAL, S.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; FERREIRA, M.A. Determination of biogenic amines in coffee by an optimized liquid chromatographic method. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, v. 25, n. 16, p. 2535-2549, 2002.
- CASAL, S.; MENDES, E.; ALVES, R.M.; ALVES, R.C.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; FERREIRA, M.A. Free and conjugated biogenic amines in green and roasted coffee beans. *J. Agric. Food Chem.* v. 52, p. 6188-6192, 2004.
- CASAL, S.; MENDES, E.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; FERREIRA, M.A. Roast effects on coffee free and conjugated polyamines. *E. J. Environ. Agric. Food Chem.*, v. 4, n. 5, p. 1063-1068, 2005.
- CECAFÉ. Conselho dos Exportadores de Café Verde. Disponível em: <http://www.cecafe.com.br>. Acesso em: 02/março/2006.
- CHANDER, H.; BATISH, V.K.; BABU, S.; SINGH, R.S. Factors affecting amine production by a selected strain of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Food Sci.*, v. 54, n. 4, p. 940-942, 1989.

- CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E.S.; RIBEIRO-NETO, L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVADOR, M.C.; FERNÍCOLA, N.A.G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Rev. Brasil. Toxicol.*, v. 11, n. 1, p. 1-6, 1998.
- CHIACCHIERINI, E.; RESTUCCIA, D.; VINCI, G. Evaluation of two different extraction methods for chromatographic determination of bioactive amines in tomato products. *Talanta*, v. 69, p. 548-555, 2006.
- CHOI, S.W.; LEE, S.K.; KIM, E.O.; OH, H.; YOON, K.S.; PARRIS, N.; HICKS, K.B.; MOREAU, R.A. Antioxidant and antimelanogenic activities of polyamine conjugated from corn bran and related hydroxycinnamic acids. *J. Agric. Food Chem.*, v. 55, p. 3920-3925, 2007.
- CHU, C.H.; BJELDANES, F.L. Effect of diamines, polyamines and tuna fish extracts on the binding of histamine to mucin in vitro. *J. Food. Sci.* v. 47, p. 79-88, 1981.
- CINQUINA, A.L.; CALÌ, A.; LONGO, F.; DE SANTIS, L.; SEVERONI, A.; ABBALLE, F. Determination of biogenic amines in fish tissues by ion-exchange chromatography with conductivity detection. *J. Chromatog. A*, v. 1032, p. 73-77, 2004.
- CIRILO, M.P.G. *Influência da adubação potássica e da torra nos teores de aminas bioativas em café*. Belo Horizonte: UFMG. 2001. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- 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 Chem.*, v. 82, p. 397-402, 2003.
- CLARKE, R.J. Roasting and grinding. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. *Coffee: technology*. London: Elsevier Applied Science, 1989 a. v. 2, p. 73-106.
- CLARKE, R.J. Water and mineral contents. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. *Coffee: Chemistry*. London: Elsevier Applied Science, 1989 b, v. 1, p. 42-82.
- CLARKE, R.J. Technology III: Instant coffee. In: CLARKE, R.J.; VITZTHUM, O.G. *Coffee recent developments*. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2001, p. 125-139.
- CODEX ALIMENTARIUS. Resíduos de medicamentos veterinários em los alimentos. 1<sup>a</sup> ed. Roma, 1993, v. 3.
- COUTTS, R.T.; GLEN, B.B.; PASUTTO, F.M. Foodstuffs as source of psychoactive amines and their precursors: content, significance and identification. *Adv. Drug Res.*, v.15, p. 169-233, 1986.

- CUSTÓDIO, F.B.; TAVARES, E.; GLÓRIA, M.B.A. Extraction of bioactive amines from grated parmesan cheese using acid, alkaline and organic solvents. *J. Food. Comp. Anal.*, v. 20, p. 280-288, 2007.
- DENOBILO, M.; NASCIMENTO, E.S. Validação de método para determinação de resíduos de antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev. Brasil. Ciênc. Farmac.*, v. 40, n. 2, p. 209-218, 2004.
- DONHAUSER, S.; WAGNER, D.; GEIGER, E. Biogenic amines: significance, occurrence and assessment. *Brauwelt. Int.* v. 11, p. 100-107, 1993.
- DORHOUT, B.; Van BEUSEKOM, M.; HUISMAN, M.; KINGMA, A.W.; De HOOG, E.; BOERSMA, E.R.; MUSKIET, F.A.J. Estimation of twenty-four hour polyamine intake from mature human milk. *J. Pediat. Gastroenterol. Nutrit.* v. 23, p. 298-302, 1996.
- DROLET, G.; DUMBROFF, B.E.; LEGGE, L.R.; THOMPSON, E.J. Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochem.*, v. 25, n. 2, p. 367-371, 1986.
- EDMUNDS, W.J.; EITENMILLER, R.R. Effect of storage time and temperature on histamine content and histidine decarboxylase activity of aquatic species. *J. Food Sci.*, v. 57, n. 2, p. 355-365, 1992.
- ELIASSEN, K.A.; REISTAD, R.; RISOEN, U.; RONNING, H.F. Dietary polyamines. *Food Chem.*, v. 78, p. 273-280, 2002.
- EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics*, 1<sup>a</sup> ed. Teddington: UK, 1998, 61 p.
- FACCHINI, P.J.; HAGEL, J.; ZULAK, K.G. Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry. *Canadian J. Bot.*, v. 80, p. 577-589, 2002.
- FARAH, A., MONTEIRO, M.C., CALADO, V., FRANCA, A.S., TRUGO, L.C. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chem.*, v. 98, p. 373-380, 2006a.
- FARAH, A., PAULIS, T., MOREIRA, D.P., TRUGO, L.C., MARTIN, P.R. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 374-381, 2006b.
- FELDMAN, J.R.; RYDER, W.S.; KUNG, J.T. Importance of nonvolatile compounds to the flavor of coffee. *J. Agric. Food Chem.*, v. 17, n. 4, p. 733-739, 1969.
- FLORES, H.E.; PROTACIO, C.M.; SIGNS, M. Primary and secondary metabolism of polyamines in plants. *Rec. Adv. Phytochem.*, v. 23, p. 329-393, 1989.

- FONTANIELLA, B.; MATEOS, J.L.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. Improvement of the analysis of dansylated derivatives of polyamines and their conjugates by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, v. 919, p. 283-288, 2001.
- FONTANIELLA, B.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E.; ARMAS, R.; RODRIGUEZ, C.W.; MARTINEZ, M.; PINON, D.; ACEVEDO, R.; SOLAS, M.T. Yellow leaf syndrome modifies the composition of sugarcane juices in polysaccharides, phenols and polyamines. *Plant Physiol. Biochem.*, v. 41, p. 1027-1036, 2003.
- FRANÇA, A.S.; MENDONÇA, J.C.F.; OLIVEIRA, S.D. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT*, v. 38, p. 709-715, 2005.
- FUJIOKA, K.; SHIBAMOTO, T. Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chem.*, v. 106, p. 217-221, 2008.
- FUZIKAWA, C.S.; HARA, C.; GLÓRIA, M.B.A.; ROCHA, F.L. IMAO e dieta – atualização e orientações práticas para o uso clínico. *J. Bras. Psiq.*, v. 48, n. 10, p. 453-460, 1999.
- GLÓRIA, M.B.A. Amines. In: CABALLERO, B.; TRUGO, L.; FINGLAS, P.M. (Eds). *Encyclopedia of food science and nutrition*. London: Academic Press.; 2003, p. 173-181.
- GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines. In: HUI, H., SHERKAT, F. (Eds). *Handbook of food science, technology and engineering*. London: CRC Press.; 2005, 3632 p.
- GLÓRIA, M.B.A.; IZQUIERDO-PULIDO, M. Levels and significance of biogenic amines in Brazilian beers. *J. Food Comp. Anal.*, v. 22, n. 4, 1999.
- GONZALEZ-AGUILAR, G.A.; ZACARIAS, L.; LAFUENTE, M.T. Ripening affects high-temperature-induced polyamines and their changes during cold storage of hibrid Fortune mandarins. *J. Agric. Food Chem.*, v. 46, n. 9, p. 3503-3508, 1998.
- HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 5, p. 42-49, 1994.
- HENNION, F.; MARTIN-TANGUY, J.M. Amine distribution and content in several parts of the subantarctic endemic species *Lyallia Kerguelensis* (Hestorellaceae). *Phytochem.*, v. 52, p. 247-251, 1999.
- HILLARY, A.R.; PEGG, A.E. Decarboxylases involved in polyamines biosynthesis and their inactivation by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1647, p. 161-166, 2003.

- IAL (Instituto Adolfo Lutz). *Métodos químicos e físicos para análises de alimentos*. 3 ed. v. 1. São Paulo: IAL, 1985. 533p.
- IAL (Instituto Adolfo Lutz). *Métodos químicos e físicos para análises de alimentos*. 4 ed. v. 1. São Paulo: IAL, 2004. 533p.
- ICO (International Coffee Organization). *Roasting/making coffee*. Disponível em: <http://www.ico.org>. Acesso em: 02/março/2007.
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. DOQ-CGCRE-008, Rio de Janeiro, 2003.
- INNOCENT, N.; BIASSUTTI, M.; PADOVESE, M.; MORET, S. Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivation of acid extract. *Food Chem.*, v. 101, p. 1285-1289, 2007.
- IZQUIERDO-PULIDO, M.L.; VIDAL-CAROU, M.C.; MARINÉ-FONT, A. Determination of biogenic amines in beers and their raw materials by ion-pair liquid chromatography with post column derivatization. *J.O.A.C. Int.*, v. 76, p. 1027-1032, 1993.
- JAVACAFÉ. *Coffee history*. Disponível em: <http://www.javacafe.com.br>. Acesso em: 02/março/2005.
- JEEVANANDAM, M.; HOLADAY, B.S.; BEGAY, C.K.; PETERSEN, S.R. Nutrition efficacy of a spermidine supplemented diet. *Nutrition*, v.13, n. 9, p. 788-794, 1997.
- JENKEN, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. General concepts and guidelines. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, v. 19, n. 5, p. 719-736, 1996.
- KALAC, P.; SVECOVA, S.; PELIKANOVA, T. Level of biogenic amines in typical vegetables products. *Food Chem.*, v. 77, p. 349-351, 2002.
- KALAC, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chem.*, v. 90, n. 1-2, p. 219-230, 2005.
- KANG, S.; BACK, K. Enriched production of N-hydroxycinnamic acid amides and biogenic amines in pepper (*Capsicum annuum*) flowers. *Sci. Horticult.*, v. 108, p. 337-341, 2006.

- KANG, S.; KANG, K.; CHUNG, G.C.; CHOI, D.; ISHIHARA, A.; LEE, D.S.; BACK, K. Functional analysis of the amine substrate specificity domain of pepper tyramine and serotonin N-hydroxycinnamoyltransferases. *Plant Physiol.*, v. 140, p. 704-715, 2006.
- KING, R.R.; CALHOUN, L.A. Characterization of cross-linked hydroxycinnamic acid amides isolated from potato common scab lesions. *Phytochem.*, v. 66, p. 2468-2473, 2005.
- KOYAMA, N.; KURIBAYASHI, K.; SEKI, T. Serotonin derivatives, major safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed antioxidants, inhibit low-density lipoprotein (LDL) oxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p.4970-4976, 2006.
- KRAMER, G.F.; WANG, C.Y.; CONWAY, W.S. Inhibition of softening by polyamine application in 'Golden Delicious' and 'McIntosh' apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, v. 116, p. 813-817, 1991.
- LANÇAS, F.M. *Validação de métodos cromatográficos de análise*. São Carlos: RIMA, 2004, 62p.
- LAPA-GUIMARÃES, J.; PICKOVA, J. New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *J. Chromatogr. A*, v. 1045, p. 223-232, 2004.
- LAVIZZARI, T.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; BOVER-CID, S.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1129, p. 67-72, 2006.
- LEE, S.; HAN, J.M.; KIM, H.; KIM, E.; JEONG, T.S.; LEE, W.S.; CHO, K.H. Synthesis of cinnamic acid derivatives and their inhibitory effects on LDL-oxidation, acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 and -2 activity, and decrease of HDL-particle size. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, v. 14, p. 4677-4681, 2004.
- LEGAZ, M.E.; ARMAS, R.; PINÓN, D.; VICENTE, C. Relationships between phenolics-conjugated polyamines and sensitivity of sugarcane to smut (*Ustilago scitaminea*). *J. Experim. Bot.*, v. 49, n. 327, p. 1723-1728, 1998.
- LIMA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas em alimentos. *Bol. SBCTA*, v. 33, n. 1, p. 70-79, 1999.

- LIMA, I.M.H.; FROTA, M.N. O enfoque da metrologia química em análises toxicológicas na atividade turfística: validação de método analítico para determinação de cafeína em matrizes biológicas. *Quim. Nova*, v. 30, n. 8, p. 1820-1829, 2007.
- LÖSER, C. Polyamines in human and animal milk. *British J. Nutr.*, v. 84, Suppl. 1, S55-S58, 2000.
- LU, H.Y.; HWANG, D.F. Polyamine profile in the paralytic shellfish poison-producing alga *Alexandrium minutum*. *J. Plant. Re.*, v. 24, n. 3, p. 275-279, 2002.
- LY, D.; KANG, K.; CHOI, J.; ISHIRAHA, A.; BACK, K.; LEE, S. HPLC analysis of serotonin, tryptamine, tyramine, and the hydroxycinnamic acid amides of serotonin and tyramine in food vegetables. *J. Med. Foods*, v.11, p. 385-389, 2008.
- MACRAE, R. Nitrogenous components. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. *Coffee Chemistry*. London: Elsevier Applied Science, 1989, p. 115-149.
- MALTA, M. *Dodirex 2-2007: reflexões sobre a economia cafeeira*. Disponível em: <http://www.abics.org.br>. Acesso em: 19/outubro/2007.
- MALTA, M. *Dodirex 1-2008: reflexões sobre a economia cafeeira*. Disponível em: <http://www.abics.org.br>. Acesso em: 30/junho/2008.
- MARTIN-TANGUY, J. Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiol. Plant.*, v. 100, p. 675-688, 1997.
- MARTIN-TANGUY, J.; CANNABE, F.; PERDRIZET, E.; MARTIN, C. The distribution of hydroxycinnamic acid amides in flowering plants. *Phytochem.*, v. 17, p. 1927-1928, 1978.
- MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; FRIAS, J.; GULEWICZ, P.; GULEWICZ, K.; VIDAL-VALVERDE, C. Food safety evaluation of broccoli and radish sprouts. *Food Chem. Toxicol.*, v. 46, p. 1635-1644, 2008.
- MELLON, J.E.; MOREAU, R.A. Inhibition of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* by diferuloylputrescine and p-coumaroylferuloylputrescine. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 6660-6663, 2004.
- MORAES, R.C.P.; TRUGO, L.C. Efeito da torração e da granulometria na composição química do café. In: *Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, 2, 2001, Vitória. p.1511-1517.
- MORET, S.; CONTE, L.S. High performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods: an analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *J. Chromatogr. A*, v. 729, p. 363-369, 1996.

- MORET, S.; SMELA, D.; POPULIN, T.; CONTE, L.S. A survey on free biogenic amines content of fresh and preserved vegetables. *Food Chem.*, v. 89, p. 355-361, 2005.
- MORGANO, M.A.; PAULUCI, L.F.; MANTOVANI, D.M.B.; MORY, E.E.M. Determinação de minerais em café cru. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, v. 22, n. 1, p. 19-23, 2002.
- NAGATSU, A.; ZHANG, H.L.; MIZUKAMI, H.; OKUYAMA H.; SAKAKIBARA, J.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. Tyrosinase inhibitory and anti-tumor promoting activities of compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius L.*) and cotton (*Gossypium hirsutum L.*) oil cakes. *Nat. Prod. Lett.*, v. 14, p. 153-158, 2000.
- NAGATSU, T. Application of high-performance liquid chromatography to the study of biogenic amine – related enzymes. *J. Chromatogr.*, v. 566, p. 287-307, 1991.
- NOGUEIRA, M.; TRUGO, L.C. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 23, n. 2, p. 296-299, 2003.
- NOVELLA-RODRÍGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines and polyamines in milks and cheeses by ion-pair high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, p. 5117-5123, 2000.
- OHTA, H.; YOZA, K.I.; TAKEDA, Y.; NOGATA, Y. Influence of storage temperature on the polyamine levels and ethylene production in broccoli (*Brassica oleracea*, Itálica Group). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 57, n. 5, p. 831-832, 1993.
- OKAMOTO, A.; SUGI, E.; KOIZUMI, Y.; YANAGIDA, F.; UKADA, S. Polyamine content of ordinary foodstuffs and various fermented foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 61, n. 9, p. 1582-1584, 1997.
- OKOMBI, S.; RIVAL, D.; BONNET, S.; MARIOTTE, A.M. PERRIER, E.; BOUMENDJEL, A. Analogues of N-hydroxycinnamoylphenalkylamides as inhibitors of human melanocyte-tyrosinase. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, v. 16, p. 2252-2255, 2006.
- OLIVEIRA, S.D. *Caracterização físico-química e teores de aminas bioativas em café cru e torrado*. Belo Horizonte: UFMG. 2004. 109 f. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- OLIVEIRA, S.D.; FRANCA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A.; BORGES, M.L.A. The effect of roasting on the presence of bioactive amines in coffees of different qualities. *Food Chem.*, v. 90, p. 287-291, 2005.
- ÖNAL, A. A review: current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem.*, v. 103, p. 1475-1486, 2007.

- PANDEY, S.; RANADE, S.A.; NAGAR, P.K.; KUMAR, N. Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *J. Biosc.*, v. 25, n. 3, p. 291-299, 2000.
- PARK, J.B.; SCHOENE, N. Synthesis and characterization of N-coumaroyltyramine as a potent phytochemical which arrests human transformed cells via inhibiting protein tyrosine kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 292, p. 1104-1110, 2002.
- PONAPPA, T.; SCHEERENS, J.C.; MILLER, A.R. Vacuum infiltration of polyamines increases firmness of strawberry slices under various storage conditions. *J. Food Sci.*, v. 58, p. 361-364, 1993.
- PRESTES, O.D.; PRESTA, M.A.; KOLBERG, D.I.S.; ZANRILLA, R. Desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação de histamina em vinhos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. *Quim. Nova*, v. 30, n. 1, p. 18-21, 2007.
- REY, M.; POHL, C. Novel cation-exchange column for the separation of hydrophobic and/or polyvalent amines. *J. Chromatogr. A*, v. 997, p. 199-206, 2003.
- RIBANI, M.; COLLINS, C.H.; BOTTOLI, C.B.G.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RIBANI, M.; COLLINS, C.H.; BOTTOLI, C.B.G. Validation of chromatographic methods: evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. *J. Chromatogr.*, v. 1156, p. 201-205, 2007.
- RIC (Rede Independência de Comunicação). *História da Nestlé*. Disponível em: [http://www.ric.com.br/historia\\_da\\_propaganda\\_nestle.asp](http://www.ric.com.br/historia_da_propaganda_nestle.asp). Acesso em: 02/março/2005.
- RODRIGUEZ, C.W.; ARMAS, R.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. Changes in free and conjugated polyamines during starvation of sugarcane juices as analyzed by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 881, p. 531-541, 2000.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 1998. 221p.
- SEN, A.; BERGVINSON, D.; MILLER, S.S.; ATKINSON, J.; FULCHER, R.G.; ARNASON, J.T. Distribution and microchemical detection of phenolic acids, flavonoids, and phenolic acid amides in maize kernels. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, p. 1879-1883, 1994.

- SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.*, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.
- SILLA SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 29, n. 2/3, p. 213-231, 1996.
- SILVA, C.M.G.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines in chicken breast and thigh after and during storage at  $4 \pm 1$  °C and in chicken-based meat products. *Food Chem.*, v. 78, p. 241-248, 2002.
- SILVEIRA, T.M.L.; GLÓRIA, M.B.A. Perfil e teores de aminos bioativas em café solúvel. In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004, Recife. *Anais*. Recife: SBCTA, 2004. v. 1, p. 1-4.
- SILVEIRA, T.M.L.; TAVARES, E.; GLÓRIA, M.B.A. Profile and levels of bioactive amines in instant coffee. *J. Food. Comp. Anal.*, v. 20, p.451-457, 2007a.
- SILVEIRA, T.M.L.; SILVA, T.M.; FARAH, A.; GLÓRIA, M.B.A. Aminos bioativas em café robusta submetidos a diferentes graus de torração – estudos preliminares. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. *Anais*. v.1, p.1-4, 2007b.
- SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W.H.; HALASZ, A. Biogenic amines content and microbial contamination of leafy vegetables during storage at 5 °C. *J. Food Biochem.*, v. 17, p. 407-417, 1994.
- SMITH, A.W. Introduction. In CLARKE, R.J.; MACRAE, R. *Coffee Chemistry*. London: Elsevier Applied Science, 1989, p. 1-41.
- SMITH, T.A. Tryptamine and related compounds in plants. *Phytochem.*, v. 16, p. 171-175, 1977.
- SMITH, T.A. Amines in food. *Food Chem.*, v. 6, p. 169-200, 1980-81.
- SMITH, T.A. Polyamines. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, v. 36, p. 117-143, 1985.
- SOARES, V.F.M.; GLÓRIA, M.B.A. Histamine level in canned fish available in the retail market of Belo Horizonte, MG, Brazil. *J. Food Comp. Anal.*, v. 7, p. 102-107, 1994.
- SON, S.; LEWIS, B.A. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 468-472, 2002.
- SOUSADIAS, M.G.; SMITH, T.K. Toxicity and growth-promoting potential of spermine when fed to chicks. *J. Animal Sci.*, v. 73, p. 2375-2381, 1995.

- SOUZA, S.V.C.; LIMA, J.A.; TEODORO, J.C.; JUNQUEIRA, R.G. Validação intralaboratorial de método quantitativo para determinação múltipla de resíduos de avermectinas em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, v. 27, n. 4, p. 823-836, 2007.
- STANDARA, S.; VESELÁ, M.; DRDÁK, M. Determination of biogenic amines in cheese by ion exchange chromatography. *Nahrung*, v. 44, n.1, p. 28-31, 2000.
- STRATTON, J.E.; HUTKINS, R.W.; TAYLOR, S.L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *J. Food Protec.*, v. 54, n. 6, p. 460-470, 1991.
- TANIM, N.M.; BENNETT, L.W.; SHELLEM, T.A.; DOERR, J.A. High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in poultry carcasses. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 5012-5015, 2002.
- TASSONI, A.; GERMANA, M.A.; BAGNI, N. Free and conjugated polyamines content in *Citrus sinensis* Osbeck, cultivar brasileiro N.L. 92, a navel orange, at different maturation stages. *Food Chem.*, v. 87, p. 537-541, 2004.
- TAYLOR, S.L. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Crit. Rev. Toxicol.*, v. 17, n. 2, p. 91-128, 1986.
- TETI, D.; VISALLI, M.; McNAIR, H. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *J. Chromatogr. B*, v. 781, p. 107-149, 2002.
- TIBURCIO, A.F.; ALTABELLA, T.; BORRELL, A.; MASGRAU, C. Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol. Plant.*, v. 100, p. 664-674, 1997.
- TRUGO, L.C.; MACRAE, R.; DICK, J. Determination of purine alkaloids and trigonelline in instant coffee and other beverages using high performance liquid chromatograph. *J. Sci. Food Agric.*, v. 34, p. 300-306, 1983.
- TRUGO, L.C., MACRAE, R. Chlorogenic acid composition of instant coffee. *Analyst*, v. 109, p. 263-270, 1984.
- USDA. UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE. National nutrient database for standar reference. Release 21. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>. Acesso em: 02/dezembro/2008.
- VALE, S.R.; GLÓRIA, M.B.A. Methodology for the determination of biogenic amines in cheese. *J. AOAC Int.*, v. 80, n. 5, p. 1006-1012, 1997.
- VALERO, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, D.; SERRANO, M. The role of polyamines in the improvement of shelf life of fruit. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 13, p. 228-234, 2002.

- VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. *Bebidas: tecnologia, química y microbiología*. Zaragoza: Editora Acribia S.A., 1994, 487 p.
- VASCONCELOS, A.L.S. Caracterização de grãos defeituosos de café quanto a aspectos físico-químicos e teores de aminas, para diversos graus de torração. Belo Horizonte: UFMG. 2005. 90 f. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- VASCONCELOS, A.L.S.; FRANCA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A.; MENDONÇA, J.C.F. A comparative study of chemical attributes and levels of amines in defective green and roasted coffee beans. *Food Chem.*, v. 101, p. 26-32, 2007.
- VIEIRA, S.M.; THEODORO, K.H.; GLÓRIA, M.B.A. Profile and levels of bioactive amines in orange juice and orange soft drink. *Food Chem.*, v. 100, p. 895-903, 2007.
- VOIG, M.N.; EITENMILLER, R.R. Production of tyrosine and histidine decarboxylase by dairy-related bacteria. *J. Food Protect.*, v. 40, n. 4, p. 241-245, 1977.
- WALTERS, D.R. Polyamines and plant disease. *Phytochem.*, v. 64, p. 97-107, 2003.
- WANG, L.C.; THOMAS, B.W.; WARNER, K.; WOLF, W.J.; KWOLEK, W.F. Apparent odor thresholds of polyamines in water and 2% soybean flour dispersions. *J. Food Sci.*, v. 40, p. 274-279, 1975.
- YEN, W.J., WANG, B.S., CHANG, L.W., DUH, P.D. Antioxidant properties of roasted coffee residues. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 2658-2663, 2005.
- YINGYONGNARONGKUL, B.; APIRATIKUL, N. AROONRERK, N.; SUKSAMRARN, A. Solid-phase synthesis and antibacterial activity of hydroxycinnamic acid amides and analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 16, p. 5870-5873, 2006.
- ZEE, J.A.; SIMARD, R.E.; L'HEUREUX, L. An automated method for the composite analysis of biogenic amines in cheese. *Leb. Wissens. Technol.*, v. 18, p. 245-248, 1985.

**ANEXO**