



Análise da Acumulação de Acrilamida Decorrente do Processo de Torra do Grão de Café Produzido na Serra da Gorongosa

ANDRÉ MATEUS SHIMURA
(Licenciado em Engenharia Química e Biológica)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica, na área de especialização de Bioprocessos

Orientadores:

Doutora Ana Isabel Faria Ribeiro
Doutora Magda Sofia de Carvalho Cardoso Nobre Semedo
Doutora Sónia Alexandra de Almeida Martins

Júri:

Presidente: Doutora Ana Maria Garcia Henriques Barreiros

Vogais:

Doutor João Miguel Alves da Silva
Doutor Nelson Alberto Frade da Silva
Doutora Sónia Alexandra de Almeida Martins

Dezembro 2024

Análise da Acumulação de Acrilamida Decorrente do Processo de Torra do Grão de Café Produzido na Serra da Gorongosa

ANDRÉ MATEUS SHIMURA
(Licenciatura em Engenharia Química e Biológica)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica, na área de especialização de Bioprocessos

Orientadores:

Doutora Ana Isabel Faria Ribeiro, ISA/UL
Doutora Magda Sofia de Carvalho Cardoso Nobre Semedo, ISEL/IPL
Doutora Sónia Alexandra de Almeida Martins, ISEL/IPL

Júri:

Presidente: Doutora Ana Maria Garcia Henriques Barreiros, ISEL/IPL
Vogais:
Doutor João Miguel Alves da Silva, ISEL/IPL
Doutor Nelson Alberto Frade da Silva, ISEL/IPL
Doutora Sónia Alexandra de Almeida Martins, ISEL/IPL

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Instituto Camões (Instituto da Cooperação e da Língua, I.P.) e à Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., através do projeto *Tricafé*, pelo financiamento deste estudo.

Ao Parque Nacional da Gorongosa e ao Instituto Superior de Agronomia, ao projeto IPL/2021/GoCoffee4H_ISEL, pelas amostras fornecidas, pela disponibilidade, confiança e ajuda, e pela oportunidade de participar num projeto tão interessante.

Às minhas orientadoras Professora Doutora Sónia Martins, Professora Doutora Magda Semedo e Professora Doutora Ana Ribeiro Barros pelo apoio e ajuda disponibilizada.

À responsável do pHarmaLab, Professora Doutora Alexandra Costa, pela disponibilização do laboratório e equipamentos essenciais para o desenvolvimento do trabalho.

Um especial obrigado ao Manel Verganista pelo apoio incondicional mesmo após ter saído do ISEL, pelas conversas no corredor, sabedoria e motivação para desvendar qualquer problema que me pudesse deparar. Não esquecendo das risadas proporcionadas pela sua característica forma de ser.

À minha família e aos meus amigos da vida João Bombas e Sérgio Alves por estarem sempre presentes, por acreditarem sempre em mim e darem-me força para continuar nas fases mais complicadas.

Ao Diogo Dias, Guilherme Vilela, António Vieira, Jaime Rego e Ricardo Ferreira por me terem acompanhado durante todo o percurso da faculdade, pelas festas e convívios memoráveis que me proporcionaram, como também pelas noitadas de estudo intensivas.

Não tenho como agradecer à Priscila Rocha por ser o pilar nestes últimos anos da minha vida, chamando-me sempre à razão, apoiando e nunca julgando as decisões e escolhas tomadas, por me ouvir e aturar nas piores fases e por me conseguir sempre elevar o ânimo qualquer fosse a situação.

Por fim, um grande obrigado a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

Declaração de integridade

Declaro que esta(e) dissertação / trabalho de projeto / relatório de estágio é o resultado da minha investigação pessoal e independente. O seu conteúdo é original e todas as fontes listadas nas referências bibliográficas foram consultadas e estão devidamente mencionadas no texto. Mais declaro que todas as referências científicas e técnicas relevantes para o desenvolvimento do trabalho estão devidamente citadas e constam das referências bibliográficas.

O autor

Andre' Mateus Shimura

Lisboa, 11 de Novembro de 2024

Resumo

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, e apesar do seu consumo se dever às suas propriedades organolépticas, apresenta também diversas propriedades benéficas para a saúde humana. Essas características advêm da presença de compostos bioativos que se acumulam durante a formação do grão de café, mas também no seu processamento. Porém, é também no processo de torra dos grãos verdes do café que são formados compostos prejudiciais para a saúde humana. Um desses compostos é a acrilamida, que é atualmente considerada pela Agência Internacional de Investigação sobre o Cancro (IARC) como provável carcinogénico para o Homem (grupo 2A).

O projeto Tricafé desenvolvido na Serra da Gorongosa em Moçambique, visa combater a desflorestação que se tem verificado na zona, tendo vindo a implementar medidas de gestão sustentável, das quais se destacam a plantação de cafeeiros num sistema agroflorestal.

Com o propósito de contribuir para a avaliação da qualidade do café produzido neste sistema agroflorestal, o presente trabalho focou-se no desenvolvimento de um método expedito de extração, deteção e quantificação de acrilamida após torra do grão verde de plantas *Coffea arabica* L.

O trabalho compreendeu o estudo de diferentes condições durante as etapas de extração, separação e deteção por HPLC-PDA e posteriormente por HPLC-MS. Os diversos métodos de extração e condições de análise cromatográfica testados neste trabalho, não permitiram a quantificação de acrilamida nos extratos de café torrado, o que se atribuiu à complexa matriz do café e às dificuldades inerentes à separação dos interferentes co-extraídos com a acrilamida.

Palavras-chave: Acrilamida, *Coffea arabica* L., HPLC-PDA, HPLC-ESI-MS, Projeto Tricafé

Abstract

Coffee is one of the most widely consumed beverages in the world, and despite its consumption being due to its organoleptic properties, it also has several health benefits for humans. These characteristics arise from bioactive compounds that are accumulated during the formation of the coffee bean, but also while it is being processed. Nevertheless, it is also during the roasting of green coffee beans that harmful compounds to human health are formed. One such compound is acrylamide, currently classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a probable human carcinogen (Group 2A).

The Tricafé project, developed in Mount Gorongosa in Mozambique, aims to combat the deforestation that has been taking place in the area and has been implementing sustainable management measures, including the cultivation of coffee crops in an agroforestry system.

In order to contribute to the quality assessment of the coffee beans produced within this agroforestry system, the present work focused on developing a rapid method for the extraction, detection and quantification of acrylamide in roasted coffee derived from green beans of *Coffea arabica* L. plants.

The work comprised the study of different conditions during the extraction, separation and detection stages by HPLC-PDA and subsequently by HPLC-MS. The diverse extraction methods and chromatographic analysis conditions attempted in this work did not allow acrylamide to be quantified in roasted coffee extracts. This can be attributed to the complex coffee matrix and the challenges in separating interferents co-extracted with acrylamide.

Keywords: Acrylamide, *Coffea arabica* L, HPLC-PDA, HPLC-ESI-MS, Tricafé Project

Divulgação Científica

Os resultados obtidos no presente trabalho foram divulgados nas seguintes comunicações:

- Shimura, A., Verganista, M., Ramalho, J.C., Ribeiro-Barros, A.I., Semedo, M., Martins, S., *Análise da Acumulação de Acrilamida no Grão de Café Torrado da Serra da Gorongosa*, 8ª Edição do Fórum de Engenharia Química e Biológica, Instituto Superior de Engenharias de Lisboa, 10 a 12 de maio de 2022, Lisboa, Portugal, Comunicação em painel
- Pimenta, S., Shimura, A., Barata, P. D., Semedo, M. C., Martins, S., Leitão A. E., Ramalho, J. C., Ribeiro-Barros, A. I., *Compounds related to the quality of coffee beans from Gorongosa, Mozambique*, Encontro Ciência '22, Centro de Congressos de Lisboa, 16 a 18 de maio de 2022, Lisboa, Portugal, Comunicação em painel
- Pimenta, S., Shimura, A., Barata, P. D., Semedo, M. C., Martins, S., Leitão, A. E., Ramalho, J. C., Ribeiro-Barros, A. I., *Quality assessment of coffee from Gorongosa: polysaccharides and acrylamide analysis*, 5th International Conference on Green Chemistry and Sustainable Engineering (GreenCHEM-22), Università degli Studi Niccolò Cusano, 20 a 22 de julho de 2022, Roma, Itália, Comunicação em painel
- Shimura, A., Ramalho, J.C., Ribeiro-Barros, A.I., Martins, S., Semedo, M., *Análise da Acumulação de Acrilamida no Grão de Café Torrado da Serra da Gorongosa*, 9ª Edição do Fórum de Engenharia Química e Biológica, Instituto Superior de Engenharias de Lisboa, 16 a 19 de maio de 2023, Lisboa, Portugal, Comunicação em painel

Lista de Abreviaturas e de Siglas

3-APA - 3-aminopropionamida
APCI - Ionização química a pressão atmosférica
ASE - Extração assistida por solvente
Asp - ácido aspártico
Asn - asparagina
BMDL10 - Limite de confiança inferior
CE - Eletroforese Capilar
CONTAM - Painel de Contaminantes da Cadeia Alimentar
EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
ESI - Ionização por Eletrospray
FAO - Organização das Nações Unidas para os Alimentação e Agricultura
FAPAS - Esquema de Avaliação de Desempenho de Análise de Alimentos
GC - Cromatografia Gasosa
GSH - Glutathione
GST - Glutathione-S-transferase
HMF - 5-hidroximetilfurfural
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IARC - Agência Internacional de Investigação sobre o Cancro
ISO - Organização Internacional de Normalização
JECFA - Comité FAO/OMS de peritos em aditivos alimentares
JPHC - Centro de Saúde Pública do Japão
LC - Cromatografia Líquida
LOD - Limite de Detecção
LOQ - Limite de Quantificação
m/z - Razão carga-massa
MS - Espectrometria de Massa
NOAEL - Níveis sem efeitos adversos observados
OMS - Organização Mundial de Saúde
PDA - Detetor de arranjo de díodos
PNG - Parque Nacional da Gorongosa
SIM - Monitorização seletiva de lão
SNFA - Agência Nacional Sueca de Alimentos
SPE - Extração em fase sólida
TIC - Cromatograma Total de Iões
TDI - Ingestão diária tolerável
tr - tempo de retenção

UPLC - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

WWF - Fundo Nacional para a Natureza

Índice

AGRADECIMENTOS	I
DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE	III
DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA	VII
LISTA DE ABREVIATURAS E DE SIGLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE TABELAS	XVII
1 ENQUADRAMENTO	1
2 INTRODUÇÃO	3
2.1 ACRILAMIDA	3
2.1.1 <i>Características Físico-Químicas</i>	4
2.1.2 <i>Processamento Térmico e Ingestão da Acrilamida</i>	5
2.1.3 <i>Metabolismo da Acrilamida</i>	9
2.1.4 <i>Aspetos toxicológicos da Acrilamida</i>	11
2.1.4.1 <i>Neurotoxicidade</i>	12
2.1.4.2 <i>Carcinogenicidade e Genotoxicidade</i>	12
2.1.4.3 <i>Toxicidade Reprodutiva</i>	14
2.2 CAFÉ	15
2.2.1. <i>Produção e Consumo de Café</i>	16
2.2.2. <i>Ingestão de Acrilamida Associada ao Consumo de Café</i>	17
2.2.3. <i>Preparação da Bebida</i>	18
2.2.4. <i>Espécies de Café e Origem</i>	19
2.2.5. <i>Planta do Café</i>	21
2.2.6. <i>Composição Química e Valor Nutricional do Grãos Verdes do Café</i>	22
2.2.7. <i>Colheita</i>	23
2.2.8. <i>Processamento Primário</i>	24
2.2.9. <i>Processo de Torra</i>	25
2.3. FORMAÇÃO DA ACRILAMIDA.....	31
2.4. PONTOS CRÍTICOS DE CONTROLO DA FORMAÇÃO DE ACRILAMIDA	35
2.4.1. <i>Espécies e Colheita do Grão</i>	36
2.4.2. <i>Tratamento Enzimático dos Grãos Verdes</i>	37
2.4.3. <i>Condições de Torrefação</i>	37
2.4.4. <i>Remoção da Acrilamida de Grãos de Café Torrados e Bebidas</i>	39
2.4.5. <i>Armazenamento</i>	39
2.5. ANÁLISE DA ACRILAMIDA NO CAFÉ.....	39
2.5.1. <i>Amostragem</i>	41

2.5.2.	<i>Padrão Interno</i>	42
2.5.3.	<i>Extração</i>	42
2.5.4.	<i>Etapa de Purificação</i>	43
2.5.5.	<i>Separação e Detecção da Acrilamida no Café</i>	43
2.6.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	48
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1.	AMOSTRAS.....	56
3.2.	REAGENTES E MATERIAIS	56
3.3.	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO	57
3.3.1.	<i>Preparação das Amostras</i>	57
3.3.1.1.	Extração da Acrilamida.....	57
A.	Método 1.....	57
B.	Método 2.....	59
C.	Método 3.....	59
D.	Método 4.....	60
3.3.2.	<i>Análise da Acrilamida</i>	61
3.3.2.1.	Identificação do Comprimento de Onda para a Detecção da Acrilamida	61
3.3.2.2.	Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC-PDA)	61
3.3.2.3.	Identificação e Quantificação da Acrilamida por HPLC-PDA.....	68
3.3.2.4.	Cromatografia Líquida de Alta Resolução Acoplada a Espectrometria de Massa (HPLC-MS)	68
3.3.3.5.	Identificação e Quantificação da Acrilamida por HPLC-MS.....	72
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1.	EXTRAÇÃO	74
4.2.	SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA PARA A DETECÇÃO DA ACRILAMIDA.....	75
4.3.	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HPLC-PDA	76
4.4.	CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA POR HPLC-PDA	90
4.5.	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HPLC-MS	90
4.6.	CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA POR HPLC-MS	110
5.	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	111
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

Índice de figuras

Figura 2.1: Estrutura química da acrilamida.	3
Figura 2.2: A acrilamida é metabolizada em glicidamida. Ambos os compostos são eletrofílicos e por isso têm a capacidade de produzir aductos com centros nucleofílicos (Nu) em proteínas. (adaptado de Törnqvist, 2005)	5
Figura 2.3: Esquema metabólico da acrilamida no organismo humano. (Peivasteh-Roudsari <i>et al.</i> , 2022).....	10
Figura 2.4: Esquema de desintoxicação da acrilamida no corpo humano. (adaptado de Rifai & Saleh, 2020)	11
Figura 2.5: Aparência e estrutura de uma cereja de café. 1 – Pele; 2 – Polpa (mesocarpo); 3 – Pergaminho (endocarpo); 4 – <i>Silverskin</i> ; 5 – semente; 6 – Caule. (Adaptado de Poltronieri & Rossi, 2016; Yusriah <i>et al.</i> , 2012).....	22
Figura 2.6: Cor do café durante a fase de secagem.(Farah, 2019).....	27
Figura 2.7: Cor dos grãos de café sob uma torra leve.(Farah, 2019).....	28
Figura 2.8: Variação do pH ao longo do tempo de torra.(Farah, 2019)	29
Figura 2.9: Potenciais vias para a formação da acrilamida durante o processamento do café. (a) Via da oxidação lipídica; (b) Via da degradação proteica e aminoacídica; (c) Via da reação de Maillard. (adaptado de Li <i>et al.</i> , 2023).....	33
Figura 2.10: Estratégias de mitigação da acrilamida no café.	36
Figura 2.11: Estrutura química da acrilamida deuterada.	42
Figura 2.12: Diagrama simplificado de um espectrómetro de massa típico. (Adaptado de Prasain, 2012)	44
Figura 2.13: Espectro dos iões produto da fragmentação da acrilamida e respetivos m/z. (adaptado de Riediker & Stadler, 2003).....	47
Figura 3.1: Amostras de café analisadas. (A) amostra comercial de café da Gorongosa torrado e moído; (B) amostra de café comercial instantâneo da DELTA Cafés; (C) amostra de café proveniente de cápsulas da Nespresso® Kazaar.....	56
Figura 3.2: Extratos obtidos após adição das soluções <i>Carrez</i> I e II e posterior centrifugação.	58
Figura 3.3: Secagem dos extratos com corrente de azoto.	58
Figura 3.4: Extração em fase sólida (SPE) com auxílio de uma bomba peristáltica.	59
Figura 4.1: Processo inicial de extração da acrilamida, verificando-se três fases: fase orgânica (fase superior), fase aquosa (fase intermédia, contendo acrilamida) e fase sólida (fase inferior).	74
Figura 4.2: Extratos aquosos purificados e diluídos, obtidos a partir das amostras: (A) Gorongosa, (B) DELTA e (C) Nespresso®.	75
Figura 4.3: Cromatogramas obtidos para uma solução de acrilamida de 500 µg/L a 200 nm (preto), 210 nm (azul) e 225 nm (verde).	75
Figura 4.4: Cromatogramas do extrato sem adição padrão do café da Gorongosa (preto) e do padrão de acrilamida 1000 µg/L (azul).	76

Figura 4.5: Cromatogramas do extrato da amostra de café da Gorongosa (verde) e de três soluções padrão de acrilamida: 100 (preto), 500 (azul-claro) e 2000 (azul-escuro) µg/L. .	77
Figura 4.6: Cromatogramas dos extratos do café da Gorongosa obtidos com água (vermelho) e metanol (preto); e com adição de 100 µL de padrão de 2000 µg/L de acrilamida aos extratos depois da extração, em água (azul escuro) e em metanol (azul claro). .	77
Figura 4.7: Cromatogramas do extrato aquoso da Gorongosa com adição de padrão de acrilamida 2000 µg/L (azul) e sem adição (preto) após extração em fase sólida (resinas Oasis HLB e Bond Elut-Accucacat). Cromatogramas das soluções padrão de 100 µg/L (azul claro) e 1000 µg/L (verde).	78
Figura 4.8: Cromatogramas do extrato do café da Gorongosa com e sem adição de padrão de acrilamida 2000 µg/L antes da extração (azul e preto, respectivamente) e após extração com 20 mL de água.	79
Figura 4.9: Cromatogramas do extrato do café da Gorongosa obtido com 20 mL de água: sem adição de padrão de acrilamida (verde), com adição de padrão 1000 µg/L antes da extração (preto) e adição de 20 µL da solução mãe (1 mg/mL) depois (azul claro), e do padrão de 100 µg/L (azul escuro).	79
Figura 4.10: Efeito da adição de padrão de acrilamida (2000 µg/L, $t_r = 8.9$ min) ao extrato de café da Gorongosa. Cromatogramas de: extrato com adição de padrão após extração (preto), extrato (verde) e padrão de 100 µg/L (azul).	80
Figura 4.11: Cromatograma do padrão de acrilamida 500 µg/L ($t_r = 9,038$ min, $A = 107587$ µV s) obtido em condições isocráticas.	81
Figura 4.12: Cromatograma do padrão de acrilamida 1000 µg/L ($t_r = 9,027$ min, $A = 213303$ µV s) obtido em condições isocráticas.	81
Figura 4.13: Cromatograma do padrão de acrilamida 500 µg/L obtido em condições de gradiente (tabela 3.4).	82
Figura 4.14: Cromatograma do padrão de acrilamida 1000 µg/L obtido em condições de gradiente	82
Figura 4.15: Cromatogramas dos padrões de acrilamida de 500 e 1000 µg/L ($t_r = 8,6$ min) obtidos em condições de gradiente (tabela 3.4).	83
Figura 4.16: Cromatogramas dos extratos de café da Gorongosa com adição do padrão de 1000 µg/L (preto) e sem (azul), obtidos em condições de gradiente (tabela 3.4).	83
Figura 4.17: Cromatogramas do padrão de acrilamida 1000 µg/L (verde) ($t_r = 8,824$ min) e dos extratos de café da Gorongosa com adição de padrão de 1000 µg/L (azul) e sem (preto).	84
Figura 4.18: Cromatogramas do padrão de acrilamida 1000 µg/L (vermelho, $t_r = 7,306$ min), do extrato do café da Gorongosa sem adição de padrão (azul) e com adição de padrão antes da extração (verde), e do extrato com adição de padrão somente no final da extração (preto).	85
Figura 4.19: Cromatogramas da amostra de café da Gorongosa com adição de padrão 1000 µg/L depois da extração num volume igual ao volume de amostra.	85

Figura 4.20: Cromatogramas do padrão de acrilamida 1000 µg/L obtidos nas seguintes condições: caudal de 0,5 mL/min a 25°C (verde); caudal de 0,4 mL/min a 30 °C (preto); caudal de 0,4 mL/min a 25 °C (azul).	87
Figura 4.21: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa obtidos nas seguintes condições: caudal de 0,5 mL/min a 25°C (verde); caudal de 0,4 mL/min a 30°C (preto); caudal de 0,4 mL/min a 25 °C (azul).	87
Figura 4.22: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa com adição de padrão de acrilamida 1000 µg/L antes da extração, obtidos nas seguintes condições: caudal de 0,5 mL/min a 25 °C (verde); caudal de 0,4 mL/min a 30 °C (preto); caudal de 0,4 mL/min a 25 °C (azul).	87
Figura 4.23: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa com adição de padrão de acrilamida 1000 µg/L depois da extração num volume igual ao volume de amostra, obtidos nas seguintes condições: caudal de 0,5 mL/min a 25 °C (verde); caudal de 0,4 mL/min a 30 °C (preto); caudal de 0,4 mL/min a 25 °C (azul).	88
Figura 4.24: Curva de calibração para as várias soluções padrão de acrilamida (50-2000 µg/L), eluição em gradiente e com detecção a 210 nm	90
Figura 4.25: Cromatogramas dos extratos de café da Gorongosa obtidos com (preto) e sem n-hexano (azul).	95
Figura 4.26: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa obtidos com diferentes concentrações iniciais de acetoneitrilo na fase móvel: 10% (V/V) (preto); 20% (V/V) (azul); 5% (V/V) (vermelho)	98
Figura 4.27: Cromatograma do SIR obtido com tensão de cone 20 V para o íão de m/z 44.	99
Figura 4.28: Cromatograma do SIR obtido com tensão de cone 20 V para o íão de m/z 55.	99
Figura 4.29: Cromatograma do SIR obtido com tensão de cone 20 V para o íão de m/z 72.	99
Figura 4.30: Espectro MS do padrão de acrilamida 100 µg/L, com identificação dos íões: $m/z = 71,96$ ($I = 769649,8$); $m/z = 54,92$ ($I = 271419,6$) e $m/z = 43,76$ ($I = 7186,67$).	100
Figura 4.31: Cromatograma do SIR para o íão de m/z 44 obtido para o extrato de café da Gorongosa.	101
Figura 4.32: Cromatograma do SIR para o íão de m/z 44 obtido para o padrão de acrilamida 100 µg/L.	101
Figura 4.33: Cromatograma do SIR para o íão de m/z 44 obtido para o padrão de acrilamida 2000 µg/L.	101
Figura 4.34: Cromatograma do SIR para o íão de m/z 55 obtido para o extrato de café da Gorongosa.	101
Figura 4.35: Cromatograma do SIR para o íão de m/z 55 obtido para o padrão de acrilamida 100 µg/L.	102
Figura 4.36: Cromatograma do SIR para o íão de m/z 55 obtido para o padrão de acrilamida 2000 µg/L.	102
Figura 4.37: Cromatograma do SIR para o íão de m/z 72 obtido para o extrato de café da Gorongosa.	102

Figura 4.38: Cromatograma do SIR para o íon de m/z 72 obtido para o padrão de acrilamida 100 $\mu\text{g/L}$.	102
Figura 4.39: Cromatograma do SIR para o íon de m/z 55 obtido para o padrão de acrilamida 2000 $\mu\text{g/L}$.	102
Figura 4.40: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa (verde), do extrato com adição de padrão de 100 $\mu\text{g/L}$ (azul) e do extrato com adição de padrão de 2000 $\mu\text{g/L}$ (preto).	103
Figura 4.41: Cromatograma do SIR para o íon de m/z 72 obtido para o extrato de café da Gorongosa com adição de padrão de 100 $\mu\text{g/L}$.	103
Figura 4.42: Cromatograma do SIR para o íon de m/z 44 obtido para o extrato de café da Gorongosa com adição de padrão de 2000 $\mu\text{g/L}$.	104
Figura 4.43: Cromatograma do SIR para o íon de m/z 55 obtido para o extrato de café da Gorongosa com adição de padrão de 2000 $\mu\text{g/L}$.	104
Figura 4.44: Cromatograma do SIR para o íon de m/z 72 obtido para o extrato de café da Gorongosa com adição de padrão de 2000 $\mu\text{g/L}$.	104
Figura 4.45: Cromatograma do SIR para o íon de m/z 58 obtido para a acrilamida deuterada (1000 $\mu\text{g/L}$).	104
Figura 4.46: Cromatograma do SIR para o íon de m/z 75 obtido para a acrilamida deuterada (1000 $\mu\text{g/L}$).	105
Figura 4.47: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa obtidos com fases móveis com 0,2 % (V/V) (vermelho) e 0,1% (V/V) (preto) de ácido fórmico; e do padrão (1000 $\mu\text{g/L}$) com fases móveis com 0,2 % (V/V) (azul) e 0,1% (V/V) (verde) de ácido fórmico.	105
Figura 4.48: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa obtidos com um caudal de 0,4 mL/min (azul), do extrato com adição de padrão interno 100 $\mu\text{g/L}$ antes da extração (verde), com adição de padrão (1000 $\mu\text{g/L}$) após extração (azul claro); e do padrão 1000 $\mu\text{g/L}$ (preto).	106
Figura 4.49: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa sem adição de acrilamida (verde), com adição de acrilamida deuterada (azul), e do padrão da acrilamida deuterada (1000 $\mu\text{g/L}$) (preto) obtidos com fase móvel com 10 % acetonitrilo (V/V) em 90 % (V/V) de água contendo 0,1 % de ácido fórmico (V/V).	107
Figura 4.50: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa com adição de acrilamida deuterada (preto), do extrato de café da Gorongosa sem adição de acrilamida (azul) e do padrão 1000 $\mu\text{g/L}$ (vermelho), obtidos com fase móvel com ácido fórmico 0,1 % (V/V) e metanol.	107
Figura 4.51: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa sem adição de acrilamida (azul), com adição de acrilamida deuterada 1000 $\mu\text{g/L}$ (verde), e do padrão da acrilamida deuterada (1000 $\mu\text{g/L}$) (preto), obtidos com fase móvel contendo 0,1% (V/V) de ácido acético.	108
Figura 4.52: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa sem adição de acrilamida (preto), com adição de água (verde), com adição de acrilamida deuterada 1000 $\mu\text{g/L}$ (azul claro), e do padrão da acrilamida deuterada (1000 $\mu\text{g/L}$) (vermelho), obtidos com fase móvel contendo 0,05 % (V/V) de ácido acético.	108

Figura 4.53: Cromatogramas obtidos com fase móvel com 0,05 % (V/V) de ácido acético para o extrato de café da Gorongosa com adição de água (preto), para o extrato com adição de acrilamida deuterada 1000 µg/L (castanho), e do padrão da acrilamida deuterada (1000 µg/L) (azul claro). Cromatogramas obtidos com fase móvel com 0,10 % (V/V) de ácido acético para o extrato de café da Gorongosa com adição de água (azul escuro), para o extrato com adição de acrilamida deuterada 1000 µg/L (verde), e do padrão da acrilamida deuterada (1000 µg/L) (vermelho).	109
Figura 4.54: Curva de calibração para as várias soluções padrão de acrilamida (0-10000 µg/L), obtidas em condições isocráticas e com detecção a 210 nm.....	110

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Principais propriedades da acrilamida. (adaptado de Robert & Brown, 1994)	4
Tabela 2.2: Teores médios de acrilamida nos principais grupos alimentares. (adaptado de Panel & Chain, 2015)	7
Tabela 2.3: Nível de acrilamida em vários alimentos presentes na dieta humana. (Comissão Europeia, 2017)	9
Tabela 2.4: Composição química dos grãos verdes do café. (Adaptado de Das, 2021)	23
Tabela 2.5- Classificação Agrtron do café torrado. (adaptado de Farah, 2019)	30
Tabela 3.1: Condições cromatográficas de análise de acrilamida por HPLC-PDA no Ensaio 1.	62
Tabela 3.2: Condições cromatográficas de análise de acrilamida por HPLC-PDA no Ensaio 2.	63
Tabela 3.3: Parâmetros de manutenção preventiva do sistema de HPLC aplicados no Ensaio 4.	64
Tabela 3.4: Condições cromatográficas de análise de acrilamida por HPLC-PDA no Ensaio 5	65
Tabela 3.5: Condições cromatográficas de análise de acrilamida por HPLC-PDA no Ensaio 6	66
Tabela 3.6: Condições cromatográficas de análise de acrilamida por HPLC-PDA no Ensaio 7.	67
Tabela 3.7: Condições cromatográficas de análise de acrilamida por HPLC-PDA no Ensaio 8	68
Tabela 3.8: Otimização de parâmetros do espectrômetro de massa	69
Tabela 3.9: Condições cromatográficas de análise de acrilamida por HPLC-ESI-MS no Ensaio 1	70
Tabela 3.10: Otimização de parâmetros do sistema HPLC-ESI-MS no ensaio 3	71
Tabela 3.11: Condições cromatográficas na análise de acrilamida por HPLC-ESI-MS – Ensaio 4	71
Tabela 3.12: Composição das diferentes fases móveis e respectivos caudais de funcionamento para análise da acrilamida por HPLC-MS no Ensaio-7	72
Tabela 4.1: Áreas dos picos e respectivos tempos de retenção da amostra de extrato de café da Gorongosa com adição de padrão (1000 µg/L) antes e depois da extração	86
Tabela 4.2: Áreas dos picos e respectivas massas de acrilamida por injeção (20 µL) do padrão de acrilamida 1000 µg/L e da amostra de extrato de café da Gorongosa com e sem adição de padrão, obtidas para diferentes caudais e temperaturas de coluna	89
Tabela 4.3: Resultados de detecção por PDA e QDA no sistema de HPLC-MS para a solução padrão de acrilamida 1000 µg/L e extratos de café da Gorongosa com e sem adição de padrão antes da extração (G.P.)	93
Tabela 4.4: Resultados de detecção por PDA e QDA no sistema de HPLC-MS para os extratos de café da Gorongosa com e sem adição de padrão ou solução mãe de acrilamida depois da extração	93
Tabela 4.5: Resultados de detecção por PDA e QDA no sistema de HPLC-MS para os extratos de café da Gorongosa com adição de padrão antes da extração e com e sem adição de padrão ou solução mãe de acrilamida depois da extração	94

Tabela 4.6: Resultados de detecção por PDA e QDA no sistema de HPLC-MS para as soluções padrão de acrilamida 2000 e 100 µg/L e extratos de café da Gorongosa com e sem adição de padrão - antes (AE) e depois da extração (DE).....	96
Tabela 4.7- Resultados de SIR e TIC obtidos por ESI-MS com diferentes tensões de cone para o padrão de acrilamida de 100 µg /L.....	98

1 Enquadramento

A desflorestação que se verifica nos países tropicais é das mais intensivas a nível mundial, com elevado impacto negativo na biodiversidade, no clima e na subsistência das populações locais. (Achard et al., 2014; Twongyirwe et al., 2018) O uso de sistemas agroflorestais é uma abordagem promissora para reconciliar a conservação da biodiversidade com o desenvolvimento local. (Jezeer et al., 2017)

A problemática da desflorestação tem vindo a afetar inclusive a Serra da Gorongosa, localizada no centro de Moçambique e que tem uma das maiores extensões de floresta montanhosa do país, acreditando-se que pode mesmo conduzir ao seu desaparecimento, devido à crescente procura de combustível lenhoso e à agricultura itinerante, entre outras atividades. Face a esta situação, o Parque Nacional da Gorongosa (PNG) desenvolveu medidas para uma gestão sustentável e duradoura, integrando a cogestão com as comunidades e implementando medidas ecologicamente sustentáveis, através de planos de uso e aproveitamento de terra, tendo em vista a restauração da biodiversidade, a garantia da segurança alimentar, bem como a resiliência contra as mudanças climáticas. (WWF Mozambique, 2016) Neste contexto, o PNG em parceria com o Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa (Portugal) e a Universidade Federal do Espírito Santo (Brasil) tem vindo a desenvolver o Projeto Tricafé, dando continuidade à atividade iniciada no âmbito do Projeto *Gorongosa National Parks' Coffee Agroforestry under Shade* (CAPS) (2012-2017), que visou a implementação de plantações de café com árvores de espécies nativas, conhecidas como café sombreado. O Projeto Tricafé tem como objetivo o reflorestamento de áreas que foram severamente devastadas, com a particularidade de contar com a colaboração extensiva dos agricultores locais. Adicionalmente, este projeto visa a comercialização a nível nacional e internacional do café produzido, com benefícios socioeconómicos para as comunidades, pelo facto do café ser uma das bebidas mais consumidas no mundo e pela previsão crescente da sua procura. (Lee et al., 2015; Samoggia & Riedel, 2018)

Cerca de 60 países tropicais e subtropicais produzem café extensivamente, adquirindo este produto, essencialmente na forma de bebida, uma elevada importância económica. (Esquivel & Jiménez, 2012) Depois da água, o café é a bebida mais consumida, sendo que em 2021/2022, cerca de 167,2 milhões de sacas de 60 kg de café foram produzidas mundialmente, com uma previsão de consumo crescente, estimando-se mesmo a possibilidade de exceder a produção em 3,1 milhões de sacas. (Price, 2023b)

O seu elevado consumo deve-se às propriedades sensoriais características, a que acrescem efeitos benéficos para a saúde, devido à presença de compostos bioativos que se desenvolvem durante o processamento dos grãos verdes, mais nomeadamente, na etapa de torra. Porém, é exatamente durante esta etapa que também há formação de compostos que apresentam potenciais propriedades carcinogénicas e, em alguns casos, mutagénicas. (Preedy, 2015) A acrilamida, inicialmente identificada nos alimentos em abril de 2002, por cientistas suecos, que relataram elevadas concentrações deste composto em determinados alimentos fritos, cozidos e torrados, tem sido classificada como um provável carcinogénico para os humanos (grupo 2A), pela Agência Internacional de Investigação sobre o Cancro. (Perera et al., 2021; Preedy, 2015)

Estas qualidades benéficas e prejudiciais para o consumidor são influenciadas pela composição química dos grãos verdes, que, conseqüentemente pode variar consoante as características genéticas das cultivares, condições edafoclimáticas, práticas agrícolas, técnicas de colheita e processamento pós colheita. (Bertrand et al., 2006; Leroy et al., 2006; Vaast et al., 2006) Com o intuito de atender aos parâmetros qualitativos exigidos no mercado internacional, estão em progresso estudos para averiguar as condições mais adequadas para obter um café de melhor qualidade, obrigando conseqüentemente a estudos ao nível da qualidade sensorial, como de bioquímica do café plantado. (Sualeh et al., 2014)

Deste modo, devido aos riscos associados ao consumo da acrilamida através dos alimentos, tornou-se premente o desenvolvimento métodos rápidos, sensíveis, precisos e baratos para a sua quantificação. Porém, esta tarefa nem sempre é fácil, e no caso do café em particular, a complexidade da matriz, devido à presença de interferentes co-extractáveis e apresentar supressão iónica, dificulta a análise de compostos de baixo peso molecular e em quantidades relativamente pequenas, como a acrilamida. (Preedy, 2015)

O presente trabalho tem como objetivo principal desenvolver de forma eficiente um método de extração, deteção e quantificação da acrilamida no café torrado obtido a partir de *Coffea arabica* L. produzido num sistema agroflorestal sustentável no Parque Nacional da Gorongosa (Moçambique).

2 Introdução

2.1 Acrilamida

A acrilamida despertou interesse pela capacidade de aumentar a solubilidade dos polímeros em água, bem como melhorar a sua adesão e promover ligações cruzadas entre estes. (Robert & Brown, 1994)

A acrilamida é comercializada desde meados de 1950, e na altura, a sua produção ocorria principalmente através da reação entre o acetonitrilo e o ácido sulfúrico hidratado, porém a formação de sulfatos e de outros subprodutos indesejados tornavam este método desvantajoso. Posteriormente, a hidratação catalítica de acetonitrilo num leito fixo de cobre a 85 °C permitiu a conversão direta em acrilamida, com produção mínima de subprodutos, passando este processo a ser utilizado a nível mundial. (Robert & Brown, 1994; Yamada & Kobayashi Michihiko, 1996)

Atualmente, a acrilamida é um monómero vinílico com elevada importância industrial (figura 2.1).

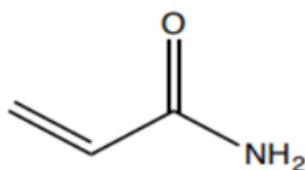


Figura 2.1: Estrutura química da acrilamida.

Este composto tem como principal aplicação a produção de polímeros, que forma inicialmente utilizados como floculantes e no auxílio à indústria do papel. Dentro dos polímeros de acrilamida, as poli(acrilamidas) suscitam um elevado interesse pela capacidade de tratamento de efluentes municipais e industriais, como também de água para consumo humano, e pela participação na recuperação de petróleo, entre outras aplicações. Usos adicionais incidem na indústria de mineração e noutras indústrias de

processamento, na estabilização de solos, na obtenção de polímeros para promover aderência, em géis de eletroforese e no revestimento para metais. A acrilamida também é utilizada diretamente como componente de sistemas de fotopolimerização, em adesivos e argamassas, e como agente de reticulação em polímeros de vinil. (Robert & Brown, 1994; Spencer & Schaumburg, 1974; Swaen et al., 2007)

Para além das aplicações industriais, as suas características genotóxicas, que foram reportadas em vários estudos e que serão adiante abordadas (Marsh et al., 2007; Robert & Brown, 1994), têm alertado a comunidade científica para os efeitos da exposição humana e animal a este composto. Acresce a evidência da sua acumulação em alimentos processados termicamente, que tem atraído maior atenção e preocupação a nível mundial. (Lineback et al., 2012)

2.1.1 Características Físico-Químicas

A acrilamida (C_3H_5NO), também conhecida por prop-2-enamida (nome IUPAC), amida acrílica e etileno carboxamida, é um composto sólido branco inodoro, de baixa massa molar e bastante polar. A tabela 2.1 apresenta as suas propriedades.

Tabela 2.1: Principais propriedades da acrilamida. (adaptado de Robert & Brown, 1994)

Massa Molar (g/mol)	Ponto de Fusão (°C)	Densidade a 30 °C (g/mL)	Pressão de Vapor a 25 °C (Pa)	Solubilidade a 30 °C (g/L)		
				Água	Metanol	Etanol
71,08	84,50	1,122	0,90	2155	1550	862

Este composto é estável à temperatura ambiente, porém quando aquecido até ao seu ponto de fusão, e até mesmo quando exposto a radiação ultravioleta, polimeriza. A sua decomposição térmica leva à formação de amoníaco, monóxido de carbono, dióxido de carbono e óxidos de azoto. A acrilamida possui uma estabilidade bastante elevada em soluções aquosas, que diminui na ausência de água e que é influenciada pelo pH e natureza da solução tampão.

Sendo um composto carbonilo insaturado com propriedades eletrofílicas, a acrilamida reage, via adição *Michael*, com grupos nucleofílicos, tais como aminos, carboxilatos, arilos e alquil hidroxilos, imidazóis e tióis presentes em macromoléculas, como proteínas e DNA; e esta reatividade é a base da sua toxicidade para os organismos. (Ou et al., 2020; Strocchi et al., 2022)

No caso das proteínas, os aminoácidos com cadeias laterais nucleofílicas reagem com a acrilamida, destacando-se a da cisteína (Cys) como a mais reativa, apesar de outros

nucleófilos como a lisina (Lys), arginina (Arg), serina (Ser) e glicina (Gly) originarem produtos de condensação similares. Em particular para a hemoglobina, foi descrito que a acrilamida tem a capacidade de se ligar covalentemente com o *N*-terminal da valina e formar aductos (figura 2.2). A estrutura da acrilamida permite que ocorra *in vivo* a oxigenação da ligação dupla, resultando na formação do seu epóxido, a glicidamida, que por sua vez também apresenta propriedades eletrofílicas (figura 2.2). Adicionalmente, aductos resultantes da reação da acrilamida com outras proteínas, como a albumina foram também reportados. (Ou et al., 2020; Strocchi et al., 2022)

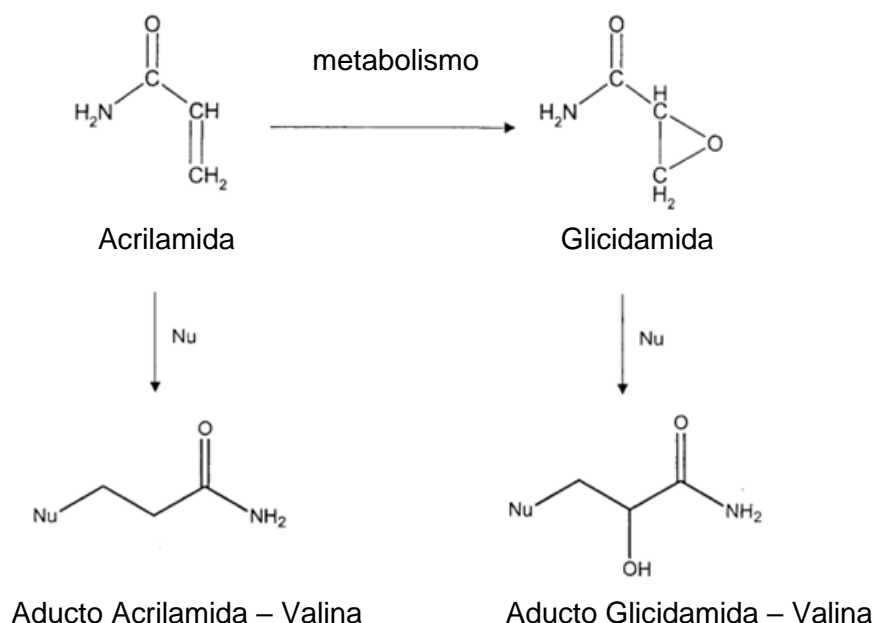


Figura 2.2: A acrilamida é metabolizada em glicidamida. Ambos os compostos são eletrofílicos e por isso têm a capacidade de produzir aductos com centros nucleofílicos (Nu) em proteínas. (adaptado de Törnqvist, 2005)

Quando se trata do DNA, as suas propriedades levam ao estabelecimento de ligações covalentes formando aductos. Apesar da acrilamida exibir maior reatividade para grupos sulfidrílo, a glicidamida é mais reativa para o DNA, formando aductos com os grupos amino presentes. (Törnqvist, 2005)

2.1.2 Processamento Térmico e Ingestão da Acrilamida

O processamento térmico dos alimentos mostrou-se vantajoso em vários níveis, incrementando a qualidade nutricional, garantindo segurança microbiológica, resultando em características sensoriais mais apelativas e na redução ou até mesmo na remoção

completa de certos compostos com potencial risco para a saúde do consumidor. Porém, é exatamente durante este tipo de processamento que ocorre a formação de compostos com propriedades carcinogênicas e genotóxicas como acrilamida, aminas, furanos, furfurais e cloropropanóis. (Deribew & Woldegiorgis, 2021)

As alterações decorrentes destes processamentos a altas temperaturas podem ser explicadas pela reação de Maillard. Esta reação foi proposta em 1912 (Zhang et al., 2009) e nomeada em homenagem ao químico francês Louis Maillard, contudo foi no ano de 1953 que o primeiro esquema coerente foi apresentado por Hodge. (Martins et al., 2000) Os produtos desta reação têm um papel fundamental em melhorar a aparência e as propriedades sensoriais dos alimentos, particularmente, no desenvolvimento de sabor, cor e aroma característicos de produtos como o café. A reação de Maillard é bastante complexa, sendo facilmente influenciada por vários fatores e conseqüentemente resultar em diferentes produtos ao longo do complexo reacional. A produção dos vários produtos irá ter influência ao nível nutricional do alimento, pela formação tanto de compostos tóxicos e mutagênicos como de produtos antioxidantes. (Martins et al., 2000)

A acrilamida está presente em grande parte dos alimentos consumidos diariamente, e a sua descoberta em alimentos foi reportada em abril de 2002, por cientistas da Agência Nacional Sueca de Alimentos (SNFA) e pela Universidade de Estocolmo, que verificaram concentrações moderadas e elevadas deste composto em determinados produtos fritos, cozidos e torrados. As concentrações determinadas em alimentos ricos em proteína foram de cerca 5-50 ppb, tendo sido mais elevadas (ca. 150-4000 ppb) em alimentos ricos em hidratos de carbono. Os alimentos com maiores conteúdos de acrilamida são especialmente batatas, café, e cereais, incluindo trigo, cevada e arroz. (Deribew & Woldegiorgis, 2021; Keramat et al., 2011; Tareke et al., 2002)

O nível de ingestão diária tolerável (TDI) foi estimado em 40 µg/kg de peso corporal para ausência de efeitos neurotóxicos e em 2,6 µg/kg de peso corporal/dia para evitar a carcinogenicidade em seres humanos. (Perera et al., 2021) Baseada em evidências neurológicas em animais, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), juntamente com a Organização Mundial da Saúde (OMS) de peritos em aditivos alimentares (JECFA) reportou que 0,67 e 1,88 mg/kg de peso corporal/dia eram níveis sem efeitos adversos observados (NOAEL) em ratos machos e fêmeas, respetivamente. Já em murganhos o valor é de 0,2 mg/kg de peso corporal/dia. No entanto, o NOAEL global para toxicidade reprodutiva e desenvolvimento foi de 2 mg/kg de peso corporal/dia para roedores. (Basaran & Faiz, 2022; Preedy, 2015; World Health Organization, 2011) O Painel de Contaminantes da Cadeia Alimentar (CONTAM) da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) propôs uma dose de

referência (limite de confiança inferior - BMDL₁₀) de 0,17 mg/kg de peso corporal/dia para efeitos neoplásicos em murganhos, um nível consideravelmente mais elevado em comparação com os geralmente ingeridos por humanos. (Panel & Chain, 2015) No que respeita à exposição humana, é notório também que os consumos médios dietéticos da acrilamida são relativamente maiores nas crianças, tendo em conta o elevado consumo de aperitivos e o facto de possuírem menor peso corporal. (Başaran & Aydın, 2022) Particularizando para o consumo de café, de acordo com um estudo da EFSA (Panel & Chain, 2015), os níveis de consumo mais elevados são observados na faixa etária de idosos e muito idosos, com medianas e percentis de 95 de consumo respetivamente de: 14-19 g de equivalente seco/dia e 37-43 g de equivalente seco/dia. Nos grupos de bebés e crianças, as medianas de consumo são inferiores a 0,1 g de equivalente seco/dia e os percentis de 95 inferiores a 5 g de equivalente seco/dia. Já nos adolescentes, a mediana de consumo é inferior a 2,7 g de equivalente seco/dia e o percentil de 95 inferior a 13 g de equivalente seco/dia.

A EFSA foi também responsável pela compilação de resultados relativos ao conteúdo de acrilamida de vários géneros alimentares, tendo realizado uma ampla recolha de dados (desde 2010 a 2013) de vários países da União Europeia, o que possibilitou obter valores de concentração média de acrilamida em diversos alimentos, tal como se pode verificar na tabela 2.2. (Panel & Chain, 2015)

Tabela 2.2: Teores médios de acrilamida nos principais grupos alimentares. (adaptado de Panel & Chain, 2015)

Grupo Alimentar	Nº de amostras	Concentração média de acrilamida (µg/kg de alimento)
Batatas Fritas	1694	308
“Chips” de batatas fritas	34501	389
Pão fresco	543	42
Cereais de pequeno-almoço	1230	161
Biscoitos, bolachas e pão torrado	2065	265
Café	1457	522
Substitutos de café	88	1499
Comida para bebé	416	24
Comida processada à base de cereais	736	73

A divulgação destes resultados conduziu a uma preocupação extra com a saúde humana, face às propriedades carcinogénicas e neurotóxicas da acrilamida.

A formação deste contaminante químico ocorre em alimentos ricos em hidratos de carbono, sujeitos a temperaturas elevadas (superiores a 120°C), e resulta de reações entre açúcares redutores e aminoácidos (em particular a asparagina), presentes nos respetivos alimentos. (Mucci & Wilson, 2008) Apesar da acumulação deste composto nos alimentos ainda não ser bem compreendida, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), juntamente com a Organização Mundial da Saúde (OMS), concluíram que os efeitos relacionados com o consumo deste composto, ao nível da neuropatia e fertilidade, é de pelo menos 500 vezes superior à ingestão alimentar diária. Deste modo, o nível de acrilamida presente nos alimentos foi considerado seguro em termos de neuropatia e de fertilidade, porém como apresenta efeitos carcinogénicos em animais de laboratório, levantou preocupações em relação à carcinogenicidade humana, tendo sido por isso classificada como provável carcinogénico para os humanos (grupo 2A) pela Agência Internacional de Investigação sobre o Cancro (IARC). (Preedy, 2015)

Apesar de ainda não existir evidência concreta para a nocividade da acrilamida, a sua presença em alimentos consumidos mundialmente em larga escala, impeliu a Comissão Europeia a recomendar a monitorização e a estabelecer valores de referência nos grupos alimentares principais, produzidos e consumidos, em toda a União Europeia (tabela 2.3). Para o café, uma bebida muito consumida a nível global no quotidiano das pessoas, e um dos produtos com grande probabilidade de conter elevados níveis de acrilamida, os valores de referência não devem exceder 400, 850, 500 e 4000 µg/kg respetivamente, de café torrado moído, café instantâneo, substitutos de café à base de cereais e substitutos de café obtidos a partir de chicória. (Comissão Europeia, 2017) Neste contexto, tornou-se também de extrema importância o desenvolvimento de métodos de extração e quantificação de acrilamida nos alimentos.

Tabela 2.3: Níveis de referência de acrilamida em vários alimentos presentes na dieta humana. (Comissão Europeia, 2017)

Género alimentício	Nível de referência [µg/kg]
Batatas fritas (prontas a comer)	500
Batatas fritas de pacote fabricadas com batatas frescas e com massa de batata	750
Bolachas salgadas à base de batata	
Outros produtos de batata à base de massa de batata	
Pão fresco	
a) Pão à base de trigo	50
b) Pão fresco excluindo pão à base de trigo	100
Cereais para pequeno-almoço (exceto papas)	
— produtos à base de farelo e cereais integrais, grãos tufados pelo processo de <i>gun puffing</i>	300
— produtos à base de trigo e de centeio ⁽¹⁾	300
— produtos à base de milho, aveia, espelta, cevada e arroz ⁽¹⁾	150
Bolachas e <i>wafers</i>	350
Bolachas salgadas com exceção das bolachas à base de batata	400
Pão estaladiço (<i>knäckebrot</i>)	350
Pão-de-espécie	800
Produtos semelhantes aos outros produtos desta categoria	300
Café torrado	400
Café instantâneo (solúvel)	850
Sucedâneos do café	
a) Sucedâneos do café exclusivamente a partir de cereais	500
b) Sucedâneos do café obtidos a partir de uma mistura de cereais e chicória	(?)
c) Sucedâneos do café obtidos exclusivamente a partir de chicória	4 000
Alimentos para bebés, alimentos à base de cereais transformados destinados a lactentes e crianças pequenas, exceto bolachas e tostas ⁽²⁾	40
Bolachas e tostas para lactentes e crianças pequenas ⁽³⁾	150

⁽¹⁾ Cereais não integrais e/ou não à base de farelo. O cereal presente em maior quantidade determina a categoria.

⁽²⁾ O nível de referência a aplicar aos sucedâneos do café obtidos a partir de uma mistura de cereais e chicória tem em conta a proporção relativa destes ingredientes no produto final.

⁽³⁾ Conforme definidos no Regulamento (UE) n.º 609/2013.

2.1.3 Metabolismo da Acrilamida

No organismo, a acrilamida pode ser distribuída por mais do que uma via, nomeadamente através do sistema digestivo (ingestão de alimentos), através do sistema respiratório (principalmente em associação ao tabagismo) e por absorção dérmica (essencialmente por exposição ocupacional ou a cosméticos). (Semla et al., 2017)

O presente trabalho tem como foco principal a ingestão de acrilamida por consumo de alimentos, nomeadamente de café, não abordando as outras possíveis vias.

Após a ingestão, a absorção da acrilamida ocorre rapidamente, tal como a sua distribuição para todos os tecidos por circulação sistémica. Este composto pode ainda atravessar a placenta e ocorrer no leite materno (fig. 2.3).

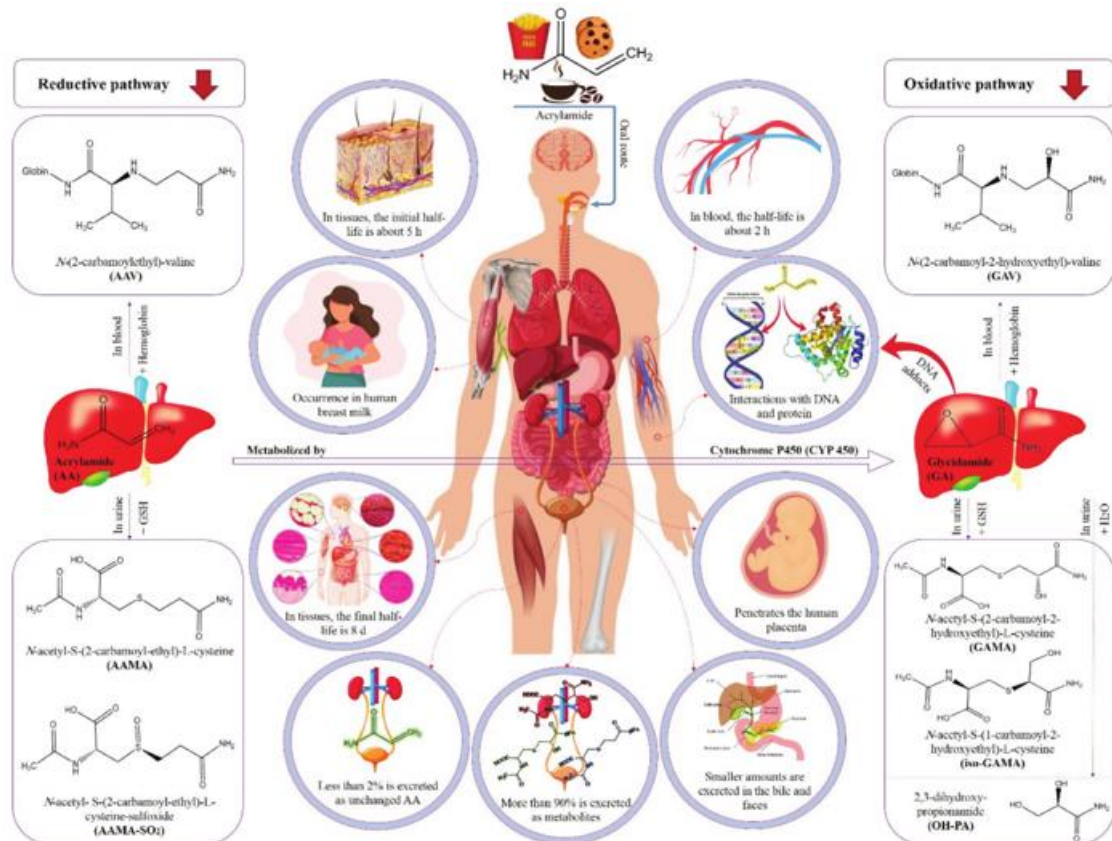


Figura 2.3: Esquema metabólico da acrilamida no organismo humano. (Peivasteh-Roudsari et al., 2022)

Apesar dos seus efeitos negativos, a acrilamida não demonstrou qualquer evidência de acumulação no organismo humano. No sangue, apresenta um tempo de meia-vida de aproximadamente duas horas. Já nos tecidos, o tempo de meia-vida é maior, onde a acrilamida total (composto ingerido e metabolitos) exhibe uma remoção biotápica, com aproximadamente tempos de meia-vida primária de 5 horas e terminal de 8 dias. (Erkekoğlu & Baydar, 2010) Como referido anteriormente, a acrilamida origina aductos covalentes com o DNA e proteínas, contudo também é convertida numa ampla gama de metabolitos, que serão posteriormente excretados na urina. (Obón-Santacana et al., 2016)

O metabolismo deste composto pode ocorrer por duas vias principais (figura 2.4). Numa via, a glutatona-S-transferase (GST) catalisa a conjugação da acrilamida com a N-acetil-S-(3-amino-3-oxopropil) cisteína. Noutra via, a acrilamida é convertida em glicidamida pela ação do sistema enzimático citocromo P450 (CYP450). A reatividade da glicidamida é relatada como sendo maior do que a da própria acrilamida, pelo que os aductos formados entre a hemoglobina e a glicidamida são biomarcadores usados para analisar a exposição à acrilamida. (Obón-Santacana et al., 2016; Rifai & Saleh, 2020)

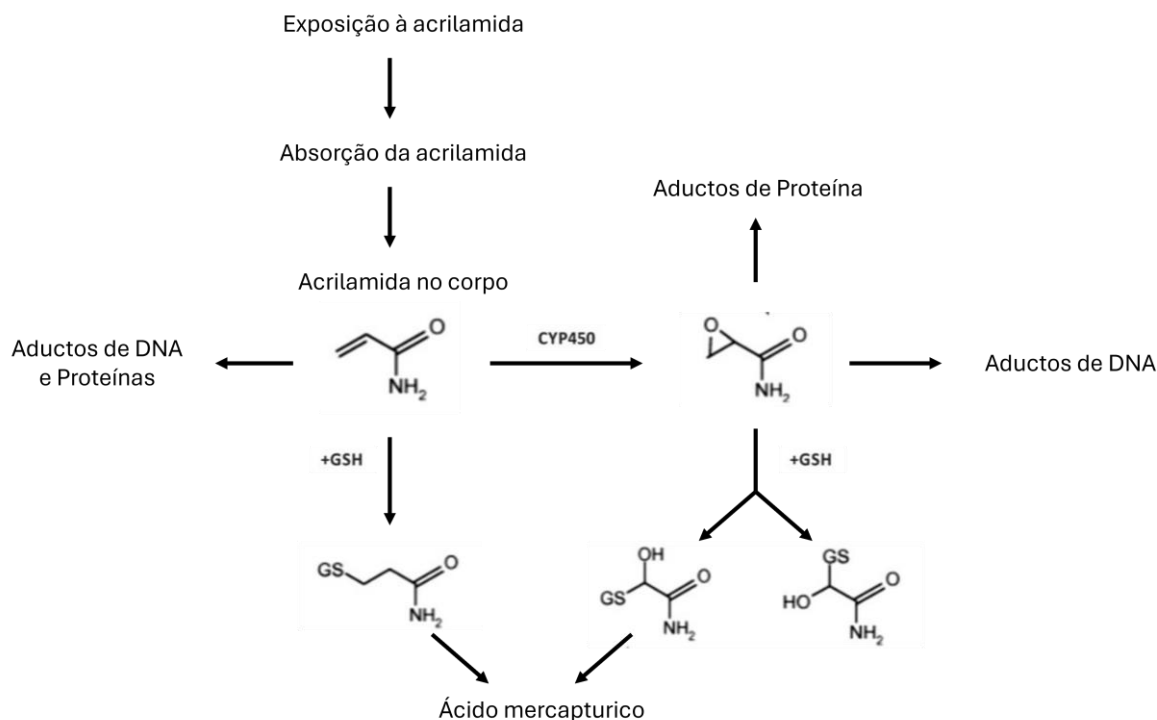


Figura 2.4: Esquema de desintoxicação da acrilamida no corpo humano. (adaptado de Rifai & Saleh, 2020)

A desintoxicação da acrilamida e da glicidamida pode ocorrer por conjugação com glutathiona (GSH), catalisada novamente por GST, originando aductos, que são rapidamente convertidos em sub-produtos de ácido mercaptúrico e posteriormente excretados na urina. (Rifai & Saleh, 2020)

Verificou-se também que cerca de 60 % da acrilamida é aparentemente excretada na urina num período de 24 h. Mais de 90 % da acrilamida absorvida é eliminada na forma de metabolitos e 2 % na sua forma não alterada; e que a excreção biliar e fecal ocorre em quantidades mínimas. (Erkekoğlu & Baydar, 2010)

2.1.4 Aspetos toxicológicos da Acrilamida

A exposição à acrilamida não provém somente dos alimentos cozinhados, podendo ocorrer também através do fumo do tabaco, por absorção dérmica e numa menor extensão, por consumo de água potável, devido ao uso de poliacrilamidas no seu tratamento. (Preedy, 2015; Rifai & Saleh, 2020) Desta forma, pelo facto de ser bastante reativa e poder atuar a vários níveis no organismo, é de elevada importância o estudo dos efeitos da acrilamida em relação à neurotoxicidade, carcinogenicidade, genotoxicidade e toxicidade reprodutiva.

2.1.4.1 Neurotoxicidade

A exposição a longo prazo à acrilamida pode causar danos nos sistemas nervosos central e periférico dos seres humanos, com degeneração dos nervos periféricos e dos terminais nervosos em certas regiões do cérebro (córtex cerebral, hipocampo e hipotálamo), originando disfunções ao nível da memória, aprendizagem e cognição. (Matoso et al., 2019; Nematollahi et al., 2020)

Com base em vários estudos, os investigadores acreditam que esta neurotoxicidade pode surgir essencialmente de três formas: (1) inibição direta da neurotransmissão, (2) alteração dos níveis de neurotransmissores e (3) supressão rápida do transporte axonal baseado na cinética. (Peivasteh-Roudsari et al., 2022) Os sintomas característicos incluem ataxia, perda de peso, inchaço distal, fraqueza dos músculos esqueléticos e degeneração de axónios nos sistemas nervosos central e periférico. (Rifai & Saleh, 2020) Sintomas graves do sistema nervoso central em relação à exposição aguda e subaguda a altas doses de acrilamida foram relatados, incluindo confusão, sonolência, desorientação, perda de memória e alucinações. Quanto à exposição prolongada, sintomas característicos de polineuropatia periférica podem surgir, como formigamento nos dedos, dormência dos membros inferiores, diminuição da sensação de picadas, diminuição da sensibilidade ao toque, perda da sensação de vibração e fraqueza ou ausência de reflexos tendinosos. (Zamani et al., 2017)

2.1.4.2 Carcinogenicidade e Genotoxicidade

A Agência Internacional de Investigação sobre o Cancro (IARC), baseada em inúmeros documentos relativos a testes carcinogénicos em animais de laboratório, designou a acrilamida como “provável carcinogénico para os humanos” (Grupo 2A). (Robert & Brown, 1994) Não foi classificada efetivamente como “carcinogénico para os humanos”, pois várias investigações epidemiológicas sobre exposição dietética e ocupacional da acrilamida não evidenciaram resultados carcinogénicos para humanos. (Rifai & Saleh, 2020)

Na realidade, nos dias de hoje, o mecanismo exato dos efeitos que a acrilamida pode causar em termos de carcinogenicidade ainda não está bem compreendido. A acrilamida que atua a vários níveis no organismo, pelo seu epóxido reativo, a glicidamida, forma aductos com o DNA e induz o desenvolvimento de tumores em roedores. Em humanos, verificou-se uma provável relação entre a exposição crónica da acrilamida com um maior risco de cancros do ovário e da mama, hiperplasia endometrial e cancro ginecológico. (Adani et al., 2020; Capuano & Fogliano, 2011; Obón-Santacana et al., 2016) No entanto, os dados ainda são limitados e, por isso, tornam a relação acrilamida-risco de cancro inconsistente. (Zhivagui et al., 2019)

Apesar dessa inconsistência, o provável mecanismo do carcinoma renal induzido pela acrilamida está relacionado com a genotoxicidade da glicidamida. Quando ingerida, a acrilamida é parcialmente metabolizada em glicidamida pela enzima CYP2E1, e são observados sinais de genotoxicidade em ratos, tais como mutações genéticas, anomalias cromossômicas e danos no DNA. (Ikeda, 2021) A conversão para o seu epóxido pode induzir mutações pontuais nas enzimas através da alquilação do DNA, levando à perturbação de diversas respostas fisiológicas. Acresce, que como referido (subcapítulo 2.1.1.) a acrilamida pode alterar as funções das proteínas ao ligar-se aos resíduos aminoácidos de cisteína. Além disso, atua como um aceitador de *Michael* para produzir aductos com grupos -SH, -OH e -NH₂ no DNA. (Adani et al., 2020; Pundir et al., 2019; Zhivagui et al., 2019) investigaram e identificaram um novo efeito mutagénico da acrilamida, através da atividade da glicidamida. Essa assinatura mutacional é encontrada em cerca de um terço de aproximadamente 1600 genomas de tumores correspondentes a 19 tipos de tumores humanos em 14 órgãos diferentes. O maior impacto incide em cancros do pulmão (88%), fígado (73%), rim (mais de 70%), ducto biliar (57%) e colo do útero (50%). (Zhivagui et al., 2019)

O Centro de Saúde Pública do Japão (JPHC) tem vindo a realizar diversos estudos sobre doenças relacionadas com o estilo de vida, incidindo também numa análise extensiva entre a relação da ingestão de acrilamida proveniente da dieta japonesa e o risco de cancro. De acordo com um questionário de hábitos alimentares, que inclui dados sobre a acrilamida em todos os alimentos japoneses, concluiu-se que na população desse país a ingestão dietética de acrilamida não estava associada ao risco de cancros do ovário, endométrio, ou da mama. (Kotemori et al., 2018b) De acordo com os dados do JPHC, a ingestão de acrilamida a partir de alimentos também não parece aumentar o risco de cancro do pulmão (Liu R., 2020), cancro do pâncreas (Kito K., 2020), malignidades hematológicas (Zha L., 2021), bem como os riscos de carcinomas de células renais, bexiga e próstata (Ikeda S., 2021; Jiang et al., 2020), tendo em conta que a ingestão dietética é relativamente baixa em comparação com as populações ocidentais. Outros estudos conduzidos na Suécia, nos EUA, no Reino Unido e nos Países Baixos evidenciaram também que a ingestão da acrilamida e o risco de cancro da mama eram independentes. (Kotemori et al., 2018a)

Uma revisão sistemática global mais recente mostrou que não existe uma associação dose-resposta entre a exposição dietética elevada à acrilamida e diferentes tipos de cancro em locais específicos na população em geral, pois o contacto com este provável carcinogénico acaba por ser mínimo (uma ingestão diária de 6,8-44,1 µg; correspondente a cerca de 0,7 µg/kg de peso corporal/dia), em comparação com os níveis tóxicos quando em estudos em animais (50 mg/kg de peso corporal/dia). (Filippini

et al., 2022) Atabati e colegas verificaram também um risco insignificante de cancro da mama decorrente da ingestão de acrilamida pelo café. (Atabati et al., 2020)

Com base em vários estudos, verifica-se então uma inconsistência para o efeito que a acrilamida pode causar no organismo. A ausência de consenso pode ser explicada por: (1) diferenças nos padrões alimentares nos diversos grupos etários, (2) impacto de agentes interferentes no metabolismo da acrilamida, como compostos antioxidantes presentes na matriz alimentar, que podem diminuir a sua toxicidade, (3) os hábitos alimentares em diferentes regiões geográficas e (4) a ausência de avaliação simultânea de outros carcinogénicos alimentares na matriz alimentar. (Atabati et al., 2020; Filippini et al., 2022)

2.1.4.3 Toxicidade Reprodutiva

Apesar de ainda não se compreender por completo os efeitos da acrilamida na reprodução humana, a literatura demonstrou que a exposição a elevadas quantidades deste composto tem impacto na capacidade reprodutora de animais. (Kumar et al., 2018) Vários parâmetros têm sido investigados, concluindo-se que pode afetar adversamente a capacidade reprodutora masculina. Isto porque, a glicidamida resultante da acrilamida, pode originar mutações induzidas em células germinativas e somáticas, e quando em curtos períodos de contacto com doses elevadas, é verificada uma ampla gama de toxicidade testicular em ratos machos. (Kalaivani et al., 2018; Recio et al., 2017)

Sendo um composto de baixo peso molecular, que se dissolve facilmente em água, a acrilamida pode atravessar a placenta e pode ocorrer no leite materno de animais e humanos, influenciando o desenvolvimento pré-natal e pós-natal. (Semla et al., 2017)

2.2 Café

O café é consumido por todo o mundo e grande parte dos países já desenvolveu os seus próprios hábitos de preparação e consumo. Pensa-se que a sua origem é proveniente da Etiópia, porém foi no Líbano, no século XV, que as primeiras evidências do café em forma de bebida e de planta foram relatadas. No século XVI, o café começou a difundir-se, e apesar de ter chegado à Europa, há somente umas centenas de anos atrás, o consumo desta bebida ocupa nos dias de hoje um papel importante nas culturas dos países europeus. (Nieber, 2017) O café é então conhecido pelas suas propriedades estimulantes e para se entender o impacto do seu consumo, que tem aumentado de forma muito significativa, têm sido conduzidos inúmeros estudos sobre a sua atividade fisiológica em vários órgãos e na saúde humana. Os assuntos mais investigados incluem efeitos em condições cardiovasculares, no cancro, como também nos sistemas nervoso e gastrointestinal. (Preedy, 2015)

A influência do café sobre o coração e o sistema vasomotor foram os primeiros efeitos fisiológicos a serem identificados e no início do século XXI tornou-se claro que o potencial antioxidante do café poderia contribuir para a prevenção de doenças cardiovasculares. (George et al., 2008; Preedy, 2015)

O avanço na medicina genética e molecular permitiu a realização de vários estudos, mostrando a complexidade dos mecanismos associados ao metabolismo dos compostos do café e ao aparecimento ou prevenção de cancro. Porém, ainda é incerta a relação do café com este tipo de patologias, tendo em conta que o seu consumo parece estar associado a um maior risco de certos cancros, mas também a um papel protetor para muitos outros. O efeito protetor está associado de imediato aos polifenóis com potencial anticarcinogénico, especialmente aos ácidos clorogénicos, enquanto o aumento do risco está relacionado com compostos, como a acrilamida, resultantes da reação de *Maillard* e da pirólise que ocorrem durante o processo de torra do grão do café. (Preedy, 2015)

Os estudos do efeito do café no sistema nervoso iniciaram-se em 1850, focando-se em dois temas principais: a ação direta do café em condições neurológicas e psicológicas, e a mediação, via sistema nervoso, da influência do café em diferentes órgãos. No final da década de 1990, métodos de análise espectral permitiram avaliar o aumento da atividade dos sistemas simpático e parassimpático, provocados pela cafeína. O café foi

então associado à redução do risco de doenças como Parkinson e Alzheimer. (George et al., 2008; Preedy, 2015)

Apesar das vantagens e desvantagens inerentes aos compostos presentes no café, o seu consumo deve-se essencialmente às suas propriedades sensoriais que são bastante apreciadas pelos consumidores. Deste modo, o café tornou-se a terceira bebida mais consumida no mundo (por mais de 1000 anos) e a seguir ao petróleo é o produto mais comercializado internacionalmente. (Li et al., 2023)

2.2.1. Produção e Consumo de Café

Atualmente, o café é considerado o produto tropical mais comercializado, envolvendo cerca de 25 milhões de famílias agrícolas, responsáveis por 80% da produção global. Este produto, sendo um dos mais consumidos mundialmente, é um dos bens de consumo mais negociado. Cerca de 60 países tropicais e subtropicais produzem café extensivamente, sendo os maiores produtores o Brasil, o Vietname e a Colômbia, enquanto o continente europeu e os EUA são os maiores consumidores e importadores. (Filete et al., 2022; Slavova & Georgieva, 2019)

A produção mundial de café diminuiu cerca de 1,4 % para 168,5 milhões de sacas no ano de 2021/2022, prejudicada pela produção bienal e condições meteorológicas adversas. (Price, 2023a)

No ano de 2022/2023 a produção global do café manteve-se praticamente inalterada, com um ligeiro decréscimo para 165,5 milhões de sacas (0,04 %). O café arábica permaneceu como o principal grão de café a ser produzido, representando 56,3 % da produção global, ou seja, registou um aumento de 0,5 pontos percentuais em relação ao ano anterior.

O principal contribuidor positivo em 2022/2023 foi o Brasil, com um aumento líquido de 2,4 milhões de sacas. O menor contribuidor foi o Vietnã com uma perda líquida de 2,2 milhões de sacas. (International Coffee Organization, 2023)

No que diz respeito ao consumo global de café no ano de 2022/2023 também houve um decréscimo, apesar de não muito acentuado, para 173,0 milhões de sacas (1,9 %) após ter registado uma expansão de 3,8 % em 2021/22, o ano com o aumento mais acentuado de 2000/01 (4,6 %). A taxa média de crescimento de longo prazo, entre 1990-2018, era de 2,3 %, porém devido à pandemia COVID-19, o consumo global sofreu uma redução significativa (taxa média de -0,4 %). Isto levou a uma procura reprimida estimada em 10,2 milhões de sacas, que somente em 2021/22 foi recuperada (6,4 milhões de sacas). Deste modo, um crescimento seria de se esperar no ano de 2022/23, porém, o elevado custo de vida e o rendimento reduzido disponível inverteu a tendência.

A América do Norte apresentou a maior queda no consumo, com uma redução de 2,0 milhões de sacas, diminuindo o seu impacto em 16,9 % no consumo global. A Europa também sofreu um declínio (3,8 %), mas houve registo de aumentos no resto do globo. A América do Sul apresentou a maior taxa de crescimento, com um aumento de 2,1 %, e a Ásia e Pacífico com o maior aumento absoluto, e influência no consumo global em 25,8 %. (International Coffee Organization, 2023)

Quando se analisa o consumo em países produtores verifica-se um aumento de 1,5 % (55,5 milhões de sacas) com o Brasil como o país mais influente. Já nos países não produtores o mesmo não se verifica, analisando-se um decréscimo em 4,0 %, uma perda líquida de 4,9 milhões de sacas. (International Coffee Organization, 2023)

2.2.2. Ingestão de Acrilamida Associada ao Consumo de Café

Além do sabor e aroma característicos apreciados pelos consumidores a nível mundial, o café mostrou apresentar efeitos benéficos, mas também prejudiciais para a saúde. A acrilamida e derivados de furano e furfural são compostos com efeitos negativos para o consumidor, e que se formam no grande complexo reacional que ocorre durante o processo de torra. Juntamente com produtos à base de batatas e cereais que estão presentes na dieta diária, o café contribui significativamente para a exposição à acrilamida. (Kocadağlı & Gökmen, 2022; Panel & Chain, 2015)

O seu consumo tem vindo a aumentar, mas obviamente o padrão de ingestão de café varia de região para região, notando-se que na América do Norte, os adultos consomem cerca de 2 chávenas por dia, enquanto em várias partes da Europa são consumidos pelo menos 4 chávenas por dia. (Ramirez-Villegas et al., 2012) Assim, 30 a 40 % da ingestão dietética de acrilamida na Noruega e na Suécia são atribuídos ao consumo de café em toda a população adulta, enquanto nos EUA e nos Países Baixos essa contribuição é estimada em 8 % e 13 %, respetivamente. (Bortolomeazzi et al., 2012) Estudos prévios mostraram que os valores para os conteúdos de acrilamida no café variam entre 135-1139 µg/kg para o pó de café torrado na Etiópia (Deribew & Woldegiorgis, 2021), enquanto, a análise de alimentos dinamarqueses relativos a contaminantes químicos reportou níveis médios mais elevados de 580 µg/kg e 275 µg/kg para o café instantâneo e café torrado moído, respetivamente. (Panel & Chain, 2015) Outro estudo, refere que na Polónia, a ingestão de acrilamida no café torrado representa 19 % e os conteúdos médios de acrilamida no grão de café comercializado nesse país variam entre 227 e 699 µg/kg. (Mojska et al., 2010)

Face ao consumo alargado do café torrado, os níveis de exposição à acrilamida variaram entre 0,003 e 0,171 µg/kg peso corporal/dia para consumidores regulares,

representando cerca de 0,5 % a 41,4 % da ingestão total do contaminante, dependendo do país em questão. Os níveis mais altos de exposição e com maior contribuição do café foram reportados para a Suécia e França, respetivamente. Já para consumidores assíduos, ou seja, indivíduos que consomem grandes quantidades de café ou quantidades normais, mas com alto teor do contaminante, a ingestão da acrilamida situou-se entre 0,059 e 0,456 µg/kg peso corporal/dia, contribuindo para uma exposição total de 14 % a 44,5 %, sendo a superior registada em França. (Preedy, 2015)

Quanto à quantidade de acrilamida ingerida por adolescentes através do café torrado, os níveis variaram de 0,000 a 0,012 µg/kg peso corporal/dia para consumidores habituais e conseqüentemente com uma percentagem de ingestão total a variar de 0 a 9 %. Os níveis de ingestão maiores são relatados para a Suécia e França, porém a percentagem de contribuição máxima foi observada no Brasil. Relativamente aos consumidores assíduos, a ingestão variou de 0,000 a 0,223 µg/kg peso corporal/dia, contribuindo o café até 17,5 % da exposição total, sendo máxima em França. (Preedy, 2015)

2.2.3. Preparação da Bebida

O café, seja ele verde ou torrado, para ser consumido necessita de ser moído. O objetivo principal do processo é aumentar a área específica de extração, ou seja, incrementar a interface água-sólido, facilitando assim a transferência de substâncias solúveis e emulsionáveis. (Illy, A & Viani, 2005)

Pelo facto de a acrilamida ser altamente solúvel em água, a sua extração é facilitada durante a preparação da bebida. (Strocchi et al., 2022) No entanto, o tipo de percolação (incluindo o método de preparação e o rácio café/água), como também a composição da mistura de café e a temperatura de torra, influenciam significativamente a quantidade de acrilamida presente no produto final. (Alves et al., 2007) Existem várias maneiras de preparar o café, usualmente baseadas em três processos diferentes: decocção (fervido, turco, vácuo e percolação), infusão (filtrado e *napolitana*) e à pressão (prensa francesa, *moka* e café expresso). A decocção ocorre quando parte do sólido solúvel é mantido em contacto com uma determinada quantidade de água, com uma temperatura apropriada e durante um período considerável, possibilitando assim o aumento da concentração de compostos solúveis no líquido. Bebidas mais concentradas são possíveis de obter através do aumento do tempo de contacto e da temperatura. (Preedy, 2015)

Por outro lado, a infusão consiste na passagem de um caudal de água quente por uma camada de material parcialmente solúvel, permitindo um curto tempo de contacto, que conseqüentemente origina um café mais suave do que os obtidos por decocção.

Geralmente, os níveis de acrilamida na preparação dos cafés mais comuns (como os de prensa francesa e filtrado) são entre 2 – 25 µg/L. (Preedy, 2015)

Comparativamente aos outros cafés, o processo para a obtenção do café expresso realiza uma extração incompleta da acrilamida, devido ao baixo tempo de contacto entre o café e a água. (Lantz et al., 2006) Neste processo, um determinado volume de água quente (20-50 mL, 90 ± 5 °C), sob elevada pressão (9 ± 2 atm), é percolado num curto período (30 ± 5 s) através dos grãos de café moídos (6,5 ± 1,5 g). Isto resulta num café concentrado com um sabor intenso, coberto por uma camada de creme e pronto a ser consumido. (Alves et al., 2007) Este tipo de café é altamente apreciado em países europeus como Portugal, Itália e França. Apesar da extração da acrilamida durante a preparação do café ser incompleta, os cafés expresso apresentam uma concentração mais elevada que os outros, devido ao maior rácio café/água usado (6,5 g/70 mL). Verificou-se que os níveis de acrilamida são normalmente entre 0,32-1,76 µg/chávena (30 mL), correspondendo a concentrações de 10,7-58,5 µg/L. (Alves et al., 2010; Soares et al., 2006) Recentemente, introduziram-se as cápsulas de café, que consistem numa forma fácil e simples de obter café expresso em máquinas específicas. Este café é altamente apreciado pelos consumidores, não se verificando mudança significativa nos níveis de acrilamida (33,4-55,3 µg/L), em comparação com a extração tradicional de café expresso. Também, para os cafés descafeinados foram detetados valores muito similares de acrilamida, pois o processo de descafeinação não influencia os precursores da acrilamida (açúcares redutores e asparagina) no grão de café verde. (Alves et al., 2010)

2.2.4. Espécies de Café e Origem

A produção de café tornou-se uma importante fonte de rendimento para muitos países em desenvolvimento das regiões tropicais das Américas Central e do Sul, África e Ásia. O café consumido mundialmente provém basicamente de duas espécies: *Coffea arabica* L. (café Arábica) e *Coffea canephora* (café Robusta). (Poltronieri & Rossi, 2016) O café Arábica é considerado de melhor qualidade, devido às propriedades da bebida final, nomeadamente às suas características aromáticas e baixo conteúdo de cafeína, comparativamente com o café Robusta, atingindo assim o Arábica, preços de mercado cerca de 30-40% mais elevados. (Mishra et al., 2011; Winston et al., 2005)

A planta do café faz parte do sub-reino *Angiospermae*, da família *Rubiaceae* (que tem cerca de 500 géneros e mais de 6000 espécies) e do género *Coffea*, que é o membro mais importante do ponto de vista económico dessa família. O género *Coffea* integra vários subgéneros, sendo o do café o *Eucoffea*. (Preedy, 2015)

O primeiro cafeeiro foi descoberto no século XVI, levando a uma investigação extensiva, especialmente na segunda metade do século XIX, que culminou com a identificação de uma grande variedade de novas espécies. Apesar das inúmeras plantas classificadas no género *Coffea*, o Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia (NCBI) dos EUA realizou um estudo intensivo de 25 espécies e confirmou que somente duas têm um impacto comercial significativo, nomeadamente, a *Coffea arabica* e a *Coffea canephora*, que representam cerca de 63% e 37%, respetivamente, da produção mundial. (Filete et al., 2022; Preedy, 2015) Obviamente, sendo espécies distintas, apresentam diferenças em vários aspetos, como na distribuição geográfica, características genéticas, fisiologia, composição química, atributos sensoriais, aplicações industriais, segmentos de mercado e preços. (Filete et al., 2022)

Todas as espécies de café são diploides, exceto *C. arabica* que é alotetraploidal, com origem provável da hibridação natural entre *C. canephora* e *C. eugenioides*, ou de ecótipos relacionados com estas duas espécies diploides. *C. arabica* é suscetível a muitas pragas e doenças, apresentando limitações ao nível da produção e produtividade. As suas plantas podem atingir 6 m de altura, crescem bem em altitudes elevadas e temperaturas amenas, entre 18-21 °C, sendo que a partir de 23 °C o fruto amadurece mais rápido, afetando negativamente a sua qualidade. Uma grande vantagem desta espécie é o facto de ser a única autofertilizável, e por isso mesmo também autopolinizável. (Mishra et al., 2011; Poltronieri & Rossi, 2016; Preedy, 2015) Apesar da *C. arabica* apresentar melhor qualidade sensorial, a popularidade e o consumo de *C. canephora* têm vindo a aumentar, devido à expansão em mercados de economia emergente, como na indústria de café solúvel, pois esta variedade apresenta um teor elevado de sólidos solúveis, e na composição de *blends* com café Arábica. Esta espécie tem características únicas e de grande potencial, possuindo a capacidade de economizar e aumentar o rendimento, balanceando o sabor e corpo da bebida. Também devido ao seu maior conteúdo em cafeína, tem uma maior resistência a pragas e insetos, sendo possível o seu crescimento em altitudes menores (100-600 m) e temperaturas mais altas (22-26 °C). (Filete et al., 2022; Pedroza da Silva et al., 2019; Poltronieri & Rossi, 2016) Comparativamente à Arábica, a espécie Robusta é mais vigorosa, apresentando maior produtividade e menor vulnerabilidade ao crescimento de bolores. (Winston et al., 2005) Relativamente ao aroma, a Robusta apresenta uma fragrância torrada terrosa e picante, enquanto a Arábica uma essência torrada doce e caramelizada. (Cong et al., 2020)

Por norma, o café preferido pelos consumidores é uma bebida em que se misturam as espécies Arábica e Robusta, com maior influência da primeira ao nível do aroma e da segunda relativamente ao sabor e textura. Também devido ao seu menor valor de

mercado, usa-se muito a espécie Robusta no preenchimento dos *blends* e para adicionar perfis fenólicos a alguns cafés de torra preta. (Sanz et al., 2002)

A composição do café e conseqüentemente os compostos formados durante o processamento do mesmo, são influenciados por vários fatores, desde as condições edafoclimáticas a que estão sujeitas as plantas, práticas agrícolas e até às condições de processamento e armazenamento do produto final.

2.2.5. Planta do Café

O crescimento da planta do café é altamente influenciado por alterações climáticas e as práticas de cultivo devem ser ajustadas às condições existentes, de forma que a qualidade e a produção não sejam comprometidas. Ramirez-Villegas (Ramirez-Villegas et al., 2012) estudou o impacto que estas alterações podem ter na agricultura Colombiana (um dos maiores produtores de café) e verificou que o aumento da pluviosidade pode ter um impacto na colheita de 80% e na terra cultivada de 60%. O calor é outro fator com impacto significativo, tal como se tem verificado na Etiópia. (Attribution-noncommercial, 2012; Poltronieri & Rossi, 2016)

O café é uma planta curta, que inicia a floração em condições de 8-11 h de luz diária. Tecnicamente, as flores formam-se em ramos com 1 ano que estão ligeiramente endurecidos e, de seguida, 6 h após floração, dá-se a polinização. O processo de fertilização é completo 24-48 h após a polinização. Posteriormente, um fruto desenvolve-se na forma de uma longa cereja de 10-15 mm contendo duas sementes. O fruto compreende: (1) a pele (exocarpo), sendo uma camada monocelular coberta por uma substância cerosa que protege o fruto. A mesma costuma ser vermelha, rosa-escura ou amarela; (2) a polpa (mesocarpo), composta por uma estrutura carnosa que, quando o fruto se encontra maduro, tem ainda uma camada pectinosa viscosa de mucilagem aderente ao endocarpo; (3) pergaminho (endocarpo), constituído por uma camada fina de polissacáridos; (4) pele de prata (*silverskin*), sendo uma camada fina protetora da semente, composta essencialmente por polissacáridos, maioritariamente celulose e hemicelulose, monossacáridos, proteínas, polifenóis, entre outros compostos menores; e (5) dois grãos ou sementes elípticas, que contêm o endosperma e embriões (Figura 2.5). (Preedy, 2015)

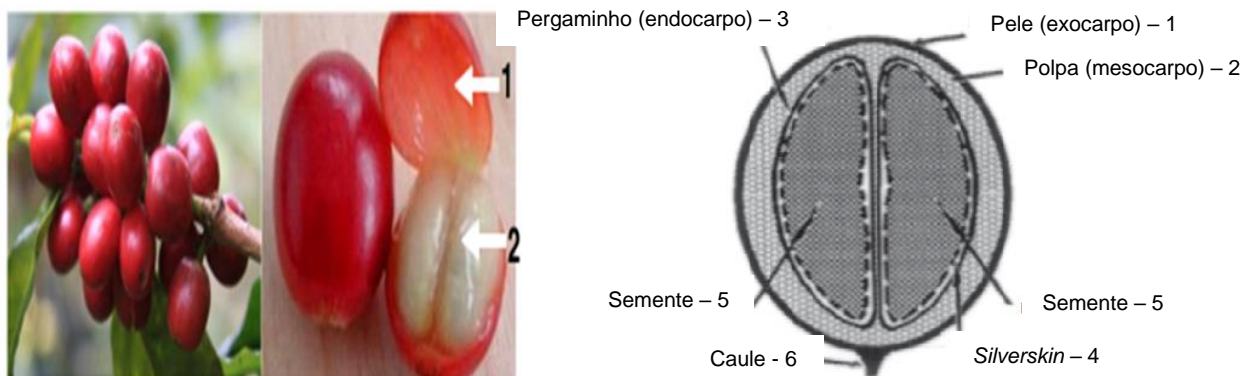


Figura 2.5: Aparência e estrutura de uma cereja de café. 1 – Pele; 2 – Polpa (mesocarpo); 3 – Pergaminho (endocarpo); 4 – *Silverskin*; 5 – semente; 6 – Caule. (Adaptado de Poltronieri & Rossi, 2016; Yusriah et al., 2012)

2.2.6. Composição Química e Valor Nutricional do Grãos Verdes do Café

Os grãos verdes são essencialmente constituídos por polissacáridos insolúveis, como a celulose e a hemicelulose (cerca de 50%). Os mesmos contêm também hidratos de carbono solúveis, como monossacáridos (frutose, glucose, galactose e arabinose), oligossacáridos (sacarose, rafinose e estaquiose), e alguns polímeros dos indicados anteriormente. Estes são de extrema importância pois auxiliam na ligação do aroma, estabilização da espuma, sedimentação, e na viscosidade do extrato. Conta-se com a presença também de ácidos alifáticos não-voláteis e ácidos voláteis. Adicionalmente, os óleos e ceras representam 8 a 18 % da massa seca, juntamente com proteínas e aminoácidos livres (9-12 %) e minerais (3-5 %).

A bebida do café é rica em substâncias biologicamente ativas como o ácido nicotínico, ácido quinolínico, trigonelina, ácido tânico, ácido pirogálico e cafeína.

A composição química dos grãos de café verdes Arabica e Robusta estão presentes na tabela 2.4. (Das, 2021)

Tabela 2.4: Composição química dos grãos verdes do café. (Adaptado de Das, 2021)

Composição	Arabica	Robusta
	(g/100 g)	
Polissacáridos	49,8	54,4
Sacarose	8,0	4,0
Açúcares redutores	0,1	0,4
Outros Açúcares	1,0	2,0
Lípidos	16,2	10,0
Proteínas	9,8	9,5
Aminoácidos	0,5	0,8
Ácidos alifáticos	1,1	0,2
Ácidos quínicos	0,4	0,4
Ácidos Clorogénicos	6,5	10
Cafeína	1,2	2,2
Trigonelina	1,0	0,7
Minerais	4,2	4,4
Aroma Volátil	Vestigial	Vestigial
Água	8 a 12	8 a 12

2.2.7. Colheita

O grau de maturação e o processo de colheita são cruciais para a qualidade final do café. Enquanto as cerejas de café (frutos maduros) tendem a produzir uma bebida de melhor qualidade, os frutos imaturos e/ou demasiado maduros dão origem a grãos defeituosos e de baixa qualidade. (Ribeiro, 2012)

O início da maturação ocorre pelo aumento da atividade respiratória e a síntese do etileno. Esta fase caracteriza-se pela mudança de cor verde para vermelho, proporcionado pelo metabolismo de açúcares e ácidos, a degradação da clorofila e síntese de pigmentos responsáveis pela mudança de cor do exocarpo. Para além disto, ocorre a síntese de compostos voláteis como aldeídos, ésteres, cetonas e álcoois, responsáveis pelo característico aroma do fruto maduro. (Pedroza da Silva et al., 2019)

Frequentemente, a planta do café apresenta frutos com diferentes estádios de maturação, pelo que se torna difícil decidir qual a melhor altura para a sua colheita. Quando não é obtida uma maturação uniforme, é aconselhável uma colheita seletiva, ou seja, fruto a fruto. Porém, idealmente deve ser iniciada quando existem no máximo 5% de frutos verdes, mas tendo em conta a influência climática, em anos onde a maturação ocorra de forma mais irregular, é aceitável um teor de frutos verdes de 20%. (Farah, 2019; Carvalho Júnior et al., 2003)

A colheita pode ocorrer de forma manual ou mecânica. A colheita manual pode ser realizada por escolha de cereja a cereja, ou então, por colheita de um ramo inteiro e

apanha tanto de frutos maduros, como imaturos ou demasiado maduros. Quanto ao procedimento mecânico, este ocorre por simplesmente abanar as árvores ou por descasque dos ramos com um aparelho similar a um pente flexível, ajustando parâmetros de vibração e velocidade. Mais recentemente, máquinas que distinguem frutos maduros dos imaturos pela cor têm sido também uma opção viável para obtenção de uma colheita de melhor qualidade. Comparativamente, o método manual é mais demorado e caro, porém é o que resulta em qualidade de colheita mais elevada. Os outros métodos tendem a produzir uma série de defeitos intrínsecos e extrínsecos que provêm de frutos com diferentes níveis de maturação, como os fermentados e os oxidados. Os defeitos intrínsecos, que são muito mais relevantes para a qualidade final da bebida, são por exemplo grãos imaturos, pretos, furados ou danificados por insetos. Os defeitos extrínsecos são pedras, cascas, galhos, etc., que são arrastados durante o processo. (Preedy, 2015)

Como referido, a colheita é uma operação com um peso significativo na qualidade final do café, mas também no custo total do processo, representando em média 30%. (Carvalho Júnior et al., 2003)

Para além do grau de maturação, são importantes outros fatores, como a garantia da ausência de contaminações por crescimento de microrganismos, especialmente de bolores, durante a colheita, mas também na secagem e armazenamento dos grãos, de forma que a qualidade final da bebida e a segurança da saúde dos consumidores seja assegurada. (Preedy, 2015)

2.2.8. Processamento Primário

Após a colheita, os frutos sofrem um processamento primário, que consiste na remoção da *silverskin*, pergaminho, mucilagem, polpa e por fim a pele de forma a obter o grão verde. (Bastian et al., 2021)

Para tal propósito, os cinco métodos mais comumente usados são: “seco ao natural” (o primeiro método utilizado), “naturalmente despulpado”, “mel”, “casca húmida” e “totalmente lavado”; estando a escolha do método diretamente relacionada com as características climáticas da região de produção.

De forma geral, os objetivos destes procedimentos são a remoção da mucilagem e redução do conteúdo de humidade dos grãos. (Poltronieri & Rossi, 2016) Tal como se tem descrito, são vários os fatores que afetam o desenvolvimento dos sabores característicos do café, pelo que a escolha do método primário a ser aplicado para a remoção das camadas externas do fruto maduro também vai ter influência significativa, apesar de ainda incerto o nível desse impacto.

Uma tonelada de cerejas Arábica rende cerca de 120 kg de mucilagem, dos quais cerca de 9 kg da massa seca representam açúcares, que têm um papel importante na fermentação do café como fonte de hidratos de carbono. Cerca de 35 % da massa seca englobam substâncias pectínicas, incluindo cadeias de ácido poligalacturónico unidas por ligações glicosídicas, que só são desagregadas por ação enzimática. Minerais como Ca, K e P estão também presentes. (Poltronieri & Rossi, 2016)

Por norma, na secagem do café pretende-se que o conteúdo de água atinja os 12 %, apesar deste conteúdo poder variar de acordo com a variedade do café e preferência do produtor. (Bastian et al., 2021)

O método “naturalmente despulpado” é o que recorre menos à fermentação, seguido do processo “mel”, com uma fermentação e acidez resultante mínima; de seguida, tem-se os métodos “lavados”, com fermentação controlada e mais acidez; e finalmente os métodos “naturais” com os maiores tempos de fermentação. De referir também os métodos que fazem a lavagem mecanicamente (sem uso de fermentação), permitem atingir parâmetros qualitativos comparáveis aos dos produtos fermentados. (*Processes*, 2024)

O método “natural” tende a originar compostos com um sabor mais ativo, providenciando um “corpo maior” (sensação de boca sedosa), menor acidez, e um espectro mais amplo de notas frutadas comparativamente com os cafés lavados. Por outro lado, os naturais têm menor qualidade em termos de limpeza e são mais vulneráveis a danos, devido à maior exposição a agentes externos. Por estes motivos, estes tipos de cafés são raros, porém quando executados da forma correta e com os cuidados necessários atingem uma excelente combinação de sabores, intensidade e corpo, capazes de satisfazer os palatos mais exigentes. (Poltronieri & Rossi, 2016; *Processes*, 2024)

É de notar que após este processamento, os grãos de café verde necessitam de um tratamento para inibir enzimas, deterioração por ação microbiana e oxidação lipídica. A presença de uma elevada quantidade de ácidos gordos insaturados e um conteúdo reduzido de água torna-os suscetíveis à oxidação lipídica e rancidez durante o armazenamento. Estas alterações são caracterizadas não só pelo odor, mas também por alteração do valor nutricional e produção de produtos oxidativos secundários que podem ser prejudiciais para a saúde humana. (Cong et al., 2020)

2.2.9. Processo de Torra

Quando se pensa no processo de torrefação, pensa-se que é um processo bem estabelecido e de fácil concessão, assumindo que basta simplesmente aplicar calor aos grãos de café verde. De forma simplista, o importante é de facto aplicar e controlar a temperatura no momento correto, e por sua vez parar o processo quando se

desenvolver por completo o aroma e a cor estiver homogeneamente distribuída todo o grão. (Illy, A & Viani, 2005)

O processamento térmico dos alimentos tem influência nas propriedades organolépticas, na preservação, na segurança microbiológica e também em alterações químicas e formação de novas moléculas. Algumas destas moléculas têm impacto positivo na saúde dos consumidores, enquanto outras apresentam propriedades carcinogénicas e, em alguns casos, mutagénicas. A acrilamida, alvo do estudo deste trabalho, forma-se no processo de torra dos grãos de café. (Bastian et al., 2021)

Este processo é considerado como a etapa mais importante para a qualidade final da bebida, que ocorre geralmente entre 200-230 °C com um tempo de duração entre os 12 e 20 minutos, sendo estes valores variáveis, dependendo do tipo de torra desejada (leve, média ou escura), o tipo de equipamento usado, tipo de café e composição. Tudo isto têm uma grande influência no desenvolvimento da complexa e característica qualidade sensorial da bebida, para a qual contribuem a cor, o aroma e o sabor. (Das, 2021; Strocchi et al., 2022)

Os grãos de café torrados são constituídos por hidratos de carbono, péptidos, ácidos de baixo peso molecular, cafeína, trigonelina, lípidos, melanoidinas, e mais de 900 compostos voláteis, que na sua maioria são formados durante a torra. Apesar da composição depender de vários fatores (como a espécie da planta, tempo e temperaturas de torra), a degradação de polissacáridos, oligossacáridos (especialmente sacarose), ácidos clorogénicos, e de trigonelina é normalmente observada neste processo. (Preedy, 2015) Para o caso dos ácidos clorogénicos, que representam um total de tipicamente 6,9 % dos grãos verdes, após uma torra leve a sua concentração diminuiu para 2,7 %, e após uma torra escura permanecem somente 0,2 %. (IARC, 1991) O processo de torra pode ser dividido em 4 estágios, a seguir enunciados.

- Secagem (até 150 °C)

Nesta primeira fase, o objetivo é evaporar a água presente nos grãos. A maioria da água é removida antes da temperatura atingir os 150 °C, permanecendo sempre uma pequena percentagem, mesmo após o processo de torra estar completo. A temperatura de ebulição da água aumenta, devido à pressão interna nos grãos, ou seja, quando o conteúdo húmido entra no estado de vapor e outros gases começam a surgir no interior do grão, a pressão interna fica extremamente elevada e conseqüentemente a temperatura de ebulição aumenta também. Após esta fase, os grãos perdem cerca de 8-10 % do seu peso original. (Farah, 2019)

Apesar de começarem a ocorrer certas reações de *Maillard* entre aminoácidos e açúcares redutores, (Martins et al., 2000) não se verificam reações químicas relevantes,

pois as temperaturas ainda são muito baixas. Porém, já é possível notar o desenvolvimento de certos aromas e uma ligeira cor (figura 2.6), isto devido aos compostos intermediários das reações de *Maillard* e, mais tarde, devido à formação de melanoidinas. (Hofmann et al., 1999)

Para além de reações importantes como isomerizações e lactonizações dos ácidos clorogénicos, a acrilamida é também um dos compostos que se começa a formar logo nesta etapa, atingindo concentrações máximas no início da torrefação, mas com decréscimo acentuado durante a progressão do processo. (Bastian et al., 2021; Illy, A & Viani, 2005)



Figura 2.6: Cor do café durante a fase de secagem. (Farah, 2019)

- Estágio Inicial de Torra (150-180 °C)

Após a secagem, as temperaturas continuam a subir e os grãos começam a ficar mais escuros (figura 2.7). Juntamente com as reações de *Maillard*, próximo de 160 °C iniciam-se reações de caramelização dos açúcares. A temperatura de caramelização depende da velocidade a que é realizado o aquecimento, ou seja, se se aumentar poucos graus por minuto, a transformação da sacarose (o açúcar mais importante presente no café) inicia-se a 160 °C, enquanto se o aumento da temperatura for mais rápido, a caramelização pode acontecer acima de 180 °C. (J. W. Lee et al., 2011)

É exatamente nesta fase em que os hidratos de carbono começam a ser degradados a ácidos carboxílicos, que o pH diminui, levando assim a um aumento da acidez. Outros compostos como a trigonelina e ácidos clorogénicos começam também a degradarem-se. (Farah et al., 2005)



Figura 2.7: Cor dos grãos de café sob uma torra leve.(Farah, 2019)

- Segundo estágio de Torra (180-230 °C)

A alteração da cor do café é mais evidente, adquirindo um tom cada vez mais escuro com o aumento da temperatura.

Durante todo o processo de torra, existem dois momentos onde os grãos quebram e emitem um som idêntico ao característico da formação das pipocas. O primeiro ocorre no início desta etapa, usualmente perto de 190 °C, dependendo do tipo de café. Esta quebra ocorre devido às reações químicas envolvidas, que produzem gases como dióxido de carbono, água e elementos orgânicos voláteis; e facilita a extração dos componentes solúveis durante a preparação da bebida. (Farah, 2019) Nesta fase, acima dos 200 °C, inicia-se a fase mais delicada do processo. As reações até então endotérmicas tornam-se exotérmicas, originando assim um aumento de temperatura mais rápido. (Das, 2021)

O processo de pirólise inicia-se também nesta fase. As reações de pirólise ocorrem quando substâncias orgânicas são aquecidas num ambiente de baixa concentração em oxigênio. (Fang et al., 2006)

As reações de caramelização continuam para o desenvolvimento do típico sabor doce e agradável da bebida, no entanto uma caramelização descontrolada pode produzir resultados amargos. Quanto mais escuro o grau de torra, mais amargo será o sabor final. O grau de torra não afeta somente a doçura do café, a acidez também é influenciada e apresenta características mais neutras consoante o grau de torra se torna mais escuro, devido aos ácidos que começam a degradar-se e volatilizam, tal como se pode verificar na figura 2.8. (Farah, 2019; Das, 2021)

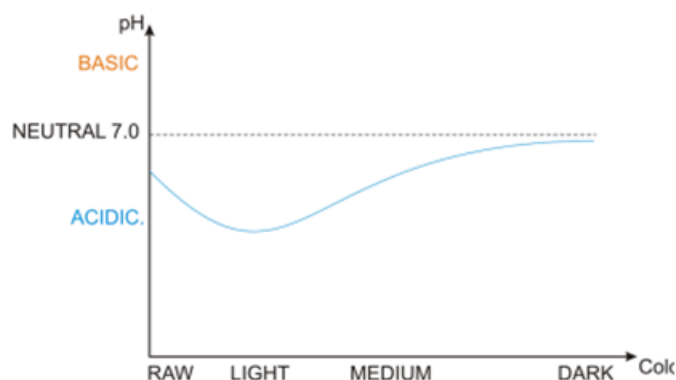


Figura 2.8: Variação do pH ao longo do tempo de torra. (Farah, 2019)

Uma série de reações estão envolvidas durante este processo, levando à decomposição de compostos maiores em mais pequenos, e conseqüentemente na libertação de dióxido de carbono e água. Para além disto, outros compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis são eliminados do grão, levando assim a uma perda extra de peso, relativamente à perda que ocorre durante a etapa de secagem (cerca de 4 a 6% dependente da cor final de torra). Todo este gás que força a sua saída dos grãos resulta no aumento do volume dos grãos, podendo estes atingir o dobro do volume, em casos de torra escura a 230 °C. Consoante as qualidades sensoriais pretendidas para o produto final, o processo pode terminar nesta etapa. (Farah, 2019)

Os cafés podem ser caracterizados como muito claros até muito escuros, sendo que o grau de torra é determinado usando simultaneamente dois sistemas. Ou seja, realiza-se o controlo da cor dos grãos após moagem através de colorímetros, porém, como a cor pode ser relativamente diferente de grão para grão e mudar rapidamente durante o processo, e como a moagem acaba também por demorar algum tempo, efetua-se também a monitorização pela temperatura dos grãos. Após a torrefação, a cor do café é verificada em laboratório e quando ocorre um desvio da cor desejada, o ponto de ajuste da temperatura final é reajustado no sistema de controlo para os lotes de torrefação seguintes. (Farah, 2019)

Durante muito tempo não existiu padronização para a escala de cores, no entanto em 1995, a Associação de Cafés Especiais da America criou um método de classificação de cor, o Sistema Agtron. Essencialmente, o número Agtron indica o grau de caramelização da sacarose (Tabela 2.5). A Agtron desenvolveu um espectro infravermelho para esta determinação e fabricou discos de cores diferentes de acordo com os padrões especificados na escala. Assim, padronizou-se o controlo de torra por meio de comparação visual usando um espectro infravermelho. (Farah, 2019; Santoso et al., 2021)

Tabela 2.5- Classificação Agtron do café torrado. (adaptado de Farah, 2019)

Classificação de torra	Número Agtron
Muito clara	100/95
Clara	90/85
Moderadamente clara	80/75
Clara médio	70/65
Médio	60/55
Moderadamente escuro	50/45
Escuro	40/35
Muito escuro	30/25

As torras que terminam neste segundo estágio são consideradas entre claras e médias escuras (números Agtron 90-45). (Farah, 2019)

Parâmetros físicos como a perda de peso, mudança de volume e densidade são usadas também para controlar a qualidade de torra. (Das, 2021)

- Terceiro estágio de Torra (acima de 230 °C)

A segunda quebra dos grãos verifica-se no início desta fase. Este tipo de fenómeno é resultante dos elevados picos de intensidade nas reações de pirólise, que nesta segunda quebra causam um dano severo às fibras celulósicas da parede externa das células do grão, tornando-as mais permeáveis. Desta forma, são potenciados os efeitos causados pela primeira quebra e a extração dos componentes solúveis é facilitada. O contínuo aumento do volume leva à inevitável migração dos óleos naturais do café para a sua superfície, óleos estes que transportam a maior parte do aroma característico da bebida. (Buffo & Cardelli-Freire, 2004) Simultaneamente, há também um aumento da libertação de componentes voláteis aromáticos e não aromáticos, porém cuidados extra são necessários nesta etapa, pois as degradações destes compostos voláteis modificam o característico aroma do café, como acontece em torras escuras. (Farah, 2019; Das, 2021)

A fase quando termina a torra vai influenciar efetivamente o tipo de café obtido. A popular torra francesa (Agtron 45-40) resulta em menor acidez que o americano e possui o sabor característico das torrefações escuras. A torra italiana, ainda mais escura (Agtron 40-35) é bastante oleosa, sem acidez e todo o sabor é ofuscado pela carbonização. (Farah, 2019)

Acima dos 250 °C, os compostos orgânicos encontram-se quase todos carbonizados, tornando a cor muito escura, a tender para o preto. Grãos carbonizados resultam num amargor indesejado e geralmente são prejudiciais para a saúde, uma vez que

provavelmente irão conter hidrocarbonetos aromáticos policíclicos carcinogénicos. Comparando com café torrado médio, o café torrado escuro exibe uma menor atividade de eliminação de radicais devido à degradação dos polifenóis, afetando assim a atividade antioxidante. (Farah, 2019; Das, 2021)

As diferentes etapas de torra aqui apresentadas requerem níveis específicos de energia para obtenção das diversas transformações químicas e físicas. Por sua vez, após a torra, deve ser realizado o arrefecimento rápido dos grãos para interromper imediatamente essas transformações. Para o arrefecimento da maioria do café torrado, usa-se água, porém empresas que produzem café especial tendem a usar ar frio, porque a água pode aumentar a humidade dos grãos e promover reações indesejadas. (Farah, 2019)

2.3. Formação da Acrilamida

O conhecimento do mecanismo reacional e das diversas variáveis que influenciam significativamente a formação da acrilamida, contribui não só para a compreensão da sua acumulação nos alimentos, mas também das estratégias de mitigação deste provável carcinogénico.

Os fatores que têm maior impacto na formação da acrilamida são as concentrações iniciais de aminoácidos (essencialmente asparagina) e de açúcares redutores, e obviamente o seu rácio, bem como a temperatura e duração do processo de torra, atividade da água e pH. A concentração de acrilamida nos alimentos é claramente dependente das suas taxas de formação e de eliminação, tendo em conta que a mesma não é o produto final da reação. (Stadler et al., 2002)

Os aminoácidos constituintes têm bastante influência na quantidade de acrilamida formada. Realizou-se um estudo, sujeitando individualmente 20 aminoácidos a 180 °C, durante 30 min, e verificou-se a formação de acrilamida a partir de metionina e asparagina. Quando, sob as mesmas condições, se introduziu uma quantidade equimolar de glucose, a concentração de acrilamida formada foi maior, pois outros aminoácidos e péptidos começaram também a reagir, como a glutatona e a cisteína. A asparagina, em particular, foi a que originou maiores quantidades do composto. (Stadler et al., 2002) As concentrações da asparagina livre nos grãos de café verde vão tipicamente de 0,2 a 10 g/kg, com valores relativamente maiores para cafés Robusta, razão pela qual este apresenta maiores conteúdos de acrilamida. (Preedy, 2015)

Como indicado, os aminoácidos e os açúcares são espécies que a sequência reacional principal. A asparagina é o aminoácido chave, e o tipo de açúcar, ou seja, se é mono- ou dissacárido (como glucose, frutose ou sacarose) também vai influenciar diretamente a formação do contaminante. (Balagiannis et al., 2019) Isto porque a reatividade dos

açúcares depende do comprimento da cadeia carbonada, ou seja, quanto mais pequena for, mais acrilamida é formada. Deste modo, pentoses são mais reativas do que hexoses e dissacáridos. (Laroque et al., 2008; Passos et al., 2018) Para além disto, as aldoses são mais reativas que as cetoses, e entre os açúcares isoméricos, as riboses são mais reativas do que as xiloses. (Perera et al., 2021)

Por norma, as batatas apresentam elevadas quantidades de asparagina e glutamina, porém, baixos conteúdos de açúcares redutores (Muttucumararu et al., 2014); os produtos de cereais costumam ser limitados em asparagina (Shewry et al., 2009); enquanto o café é rico tanto em asparagina como em sacarose, sendo esta última degradada em glucose e frutose durante o processo de torra. (Perera et al., 2021)

O conteúdo de água também tem uma forte influência na formação de acrilamida. Ou seja, caso a atividade da água esteja abaixo de 0,8, a formação do contaminante é favorecida, atingindo máximos para valores de 0,4. (Visvanathan, 2014) Contrariamente, se se aumentar a atividade da água, a acrilamida é eliminada de alimentos quentes, como biscoitos e batatas fritas. (De Vleeschouwer et al., 2007)

Outro fator importante é o pH do meio, verificando-se diminuição da formação da acrilamida em condições acídicas, devido à protonação do grupo α -amino da asparagina que, conseqüentemente, deixa de reagir. Como tal, a acidificação do sistema alimentar com ácidos orgânicos começou por se tornar uma opção de prevenção.

Apesar da relevância dos fatores até aqui enunciados, o mais importante é efetivamente a temperatura e concomitantemente o tempo do aquecimento, pois elevadas concentrações de acrilamida são produzidas nos estados iniciais da torra, atingindo o pico no momento onde a asparagina livre está prestes a ser esgotada. Porém, com a rápida diminuição e escassez do aminoácido, tendo em conta que somente reações de degradação de acrilamida passam a ocorrer, devido ao seu grupo vinil eletrofílico muito reativo, a concentração de acrilamida vai sendo reduzida drasticamente com o tempo de torra. Deste modo, relativamente à quantidade de acrilamida, é melhor o consumo de um café torrado mais escuro. (Preedy, 2015)

No café, a acrilamida pode ser produzida por diferentes vias (figura 2.9), uma vez que o grão verde contém vários precursores, sendo outros acumulados durante o processo de torra. Foram propostas para a sua formação três vias: oxidação lipídica (a), degradação de proteínas e de aminoácidos (b), e reação de *Maillard* (c). (Li et al., 2023)

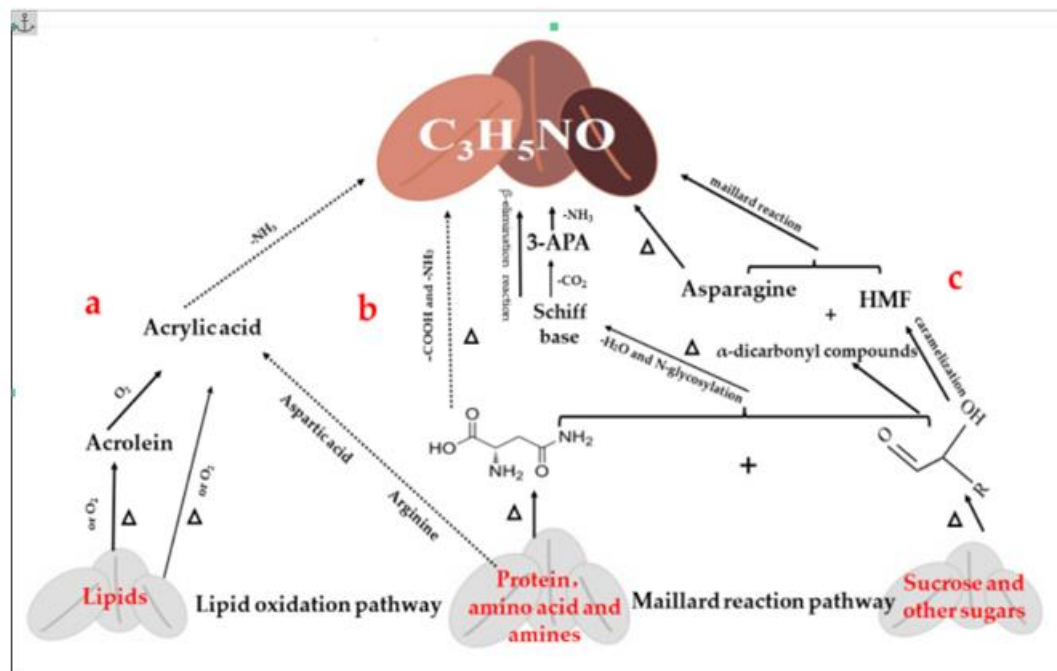


Figura 2.9: Potenciais vias para a formação da acrilamida durante o processamento do café. (a) Via da oxidação lipídica; (b) Via da degradação proteica e aminoacídica; (c) Via da reação de Maillard. (adaptado de Li et al., 2023)

A via principal é a de *Maillard* (figura 2.9 c), pelo que, a presença de compostos com grupos carbonilo é essencial para a conversão da asparagina em acrilamida, e apesar dos açúcares redutores existirem em pequenas quantidades no café, devido às elevadas temperaturas e oxidação lipídica, estes são as principais fontes para a obtenção destes compostos. Enquanto a glucose e a frutose são formadas por hidrólise da sacarose, o catião frutofuranosil e a glucose são obtidos por pirólise da sacarose, quando a água é limitada. O catião formado é imediatamente convertido em condições de aquecimento a seco em 5-hidroximetilfurfural (HMF), que por sua vez apresenta uma taxa de conversão da asparagina em acrilamida maior do que a da glucose. Também na presença de ácidos, nomeadamente, de ácidos clorogénicos na matriz do café, a acumulação da acrilamida aumenta, pois, a degradação da sacarose é acelerada e conseqüentemente mais HMF e compostos com grupos carbonilo são formados. (Kocadağlı & Gökmen, 2022; Preedy, 2015; Strocchi et al., 2022) Quando a glucose é aquecida, dá origem a compostos de furano no café, que por sua vez são também precursores da acrilamida. (Li et al., 2023)

Resumindo, sob altas temperaturas, o açúcar é descarboxilado pela via metabólica da oxazolidina-5-cetona de forma a produzir HMF. Após desaminação, condensação e hidrólise ocorre a formação da acrilamida. É de notar que o HMF também pode ser formado durante o processo de caramelização, através da eliminação de três moléculas de água da glucose. (Li et al., 2023)

Outro intermediário importante para a formação de acrilamida é a 3-aminopropionamida (3-APA), que ocorre na maioria dos produtos alimentares, a concentrações comparáveis ou até mesmo superiores à da acrilamida. (Lineback et al., 2012) Dependendo das condições empregues, a 3-APA origina elevados rendimentos de acrilamida, atingindo-se em produtos de café concentrações de 122 a 241 $\mu\text{g}/\text{kg}$. (Preedy, 2015) A instável base de Schiff, que resulta das reações térmicas de desidratação e condensação de N-glicação da asparagina e açúcares redutores, rearranja-se rapidamente para formar 3-APA, que após β -eliminação de descarboxilação origina a acrilamida. (Li et al., 2023)

O perfil lipídico tem um papel importante na qualidade final do café, não só por contribuir para a formação da acrilamida, mas também por conterem compostos de valor anti nutricional, mais nomeadamente dois diterpenos, o cafestol e o kahweol, que a longo prazo contribuem para um aumento nos valores de colesterol sérico dos consumidores. (Kitzberger et al., 2014; Sridevi et al., 2011) A formação da acrilamida por esta via, advém de um tratamento inapropriado durante o processamento e a torra e os cuidados relativos ao transporte e armazenamento, entre outros estágios que levam à oxidação lipídica. Mais nomeadamente, a acrilamida pode ser formada por uma reação de desidroxilação entre a acroleína e o ácido acrílico originado pela decomposição dos lípidos e dos aminoácidos existentes, ou a partir do amoníaco que se formou no processo de pirólise das proteínas. (figura 2.9 a) Adicionalmente, o ácido acrílico pode reagir também com o amoníaco para formar a acrilamida. Esta é uma via limitada pela reduzida libertação e captura de amoníaco livre no café, como também pelas elevadas temperaturas empregues durante o processo. (Li et al., 2023) Vários compostos com grupos carbonilo são também formados por oxidação dos lípidos. O óleo do café contém ácido linoleico (ca. de 40% dos ácidos gordos) que por oxidação dá origem a vários aldeídos, cetonas, e compostos α,β -insaturados com grupos carbonilo. Contrariamente ao efeito produzido pelos ácidos clorogénicos na sacarose, estes reduzem a formação da acrilamida, pois diminuem a oxidação dos lípidos. (Kocadağlı & Gökmen, 2022)

A temperatura tem efetivamente uma grande influência na formação da acrilamida, uma vez que também conduz à degradação das proteínas e conseqüente libertação de aminoácidos livres, como o ácido aspártico (figura 2.9 b). Posteriormente, este sofre uma descarboxilação e desaminação para então originar a acrilamida sob elevadas temperaturas. Paralelamente, estas condições levam os aminoácidos a participar nas reações de formação das melanoidinas, que contribuem para a cor preta do café, sabor, aroma e obviamente pelas suas propriedades benéficas (antioxidantes, anti-inflamatórias, entre outros) (Adriana Farah, 2019; Li et al., 2023) Verificou-se também, que os grupos amino nucleofílicos dos aminoácidos presentes na cadeia principal proteica das melanoidinas reagem com a acrilamida, via reação de adição de Michael,

modulando a reação de formação e eliminação da acrilamida durante a torra do café, pelo que são substâncias de mitigação da mesma. (Strocchi et al., 2022)

Assim, os principais precursores para a formação da acrilamida são a 3-APA, um produto de Amadori descarboxilado, ácido acrílico e acroleína. (Lineback et al., 2012; Matthäus et al., 2004; Stojanovska & Tomovska, 2015) Um estudo de monitorização de acrilamida marcada com ^{14}C durante o processo de torra e preparação da bebida, revelou que 25 % do ^{14}C foi volatilizado durante a torra, 25 % permaneceu no café moído após extração com água, e 50% foi transferido para a bebida. (Kocadağlı & Gökmen, 2022)

Como a acrilamida é facilmente dissolvida em água, é extraída praticamente na totalidade a partir do café torrado durante a preparação da bebida. A massa de acrilamida que passa para a bebida é dependente do volume de água usada, mas também do rácio café moído:quantidade de água usada, verificando-se valores de 25 $\mu\text{g/L}$ para cafés prontos a beber e filtrados, e de 10 $\mu\text{g/L}$ em café instantâneo. A quantidade de acrilamida em cafés prontos a beber é normalmente de 17 $\mu\text{g/kg}$. (Kocadağlı & Gökmen, 2022)

Contudo, existe controvérsia nos conteúdos de acrilamida no café, pois esta tem tendência a diminuir com o tempo e temperatura de armazenamento, por exemplo perdas de 40-60 % foram verificadas no café moído conservado à temperatura ambiente. Constatou-se, no entanto, que 90 % da acrilamida fica fortemente integrada na matriz do café, podendo estar agregada a compostos que são eluídos para a bebida, como compostos corantes. (Preedy, 2015)

2.4. Pontos Críticos de Controlo da Formação de Acrilamida

Devido aos efeitos negativos que a acrilamida pode causar na saúde humana, têm sido realizados esforços para modificar processos e/ou parâmetros, sem alterar o sabor, textura e aparência do café. Vários métodos têm sido desenvolvidos, apresentando-se a seguir algumas estratégias de mitigação (figura 2.10).



Figura 2.10: Estratégias de mitigação da acrilamida no café.

2.4.1. Espécies e Colheita do Grão

As duas espécies de café com maior relevância no mercado são *Coffea arabica* (de maior valor comercial) e *Coffea canephora* var. Robusta. Estas plantas produzem grãos com características químicas diversas, no que respeita a conteúdos de minerais, substâncias voláteis, ácidos clorogénicos, cafeína e asparagina, que evidentemente originam distintos perfis de sabor após torra. A escolha do tipo de café plantado influencia efetivamente os níveis de asparagina, tendo-se verificado que o Robusta produz até duas vezes mais acrilamida do que o Arábica, devido à presença de mais asparagina livre.

Os compostos que mais contribuem para a formação de acrilamida no café são a sacarose e a asparagina. A concentração de sacarose é normalmente maior no café Arábica, enquanto a concentração de asparagina livre é superior no Robusta, tendo sempre em atenção que estas concentrações variam significativamente com as práticas de cultivo e métodos de processamento.

O processo de colheita também é muito importante no que diz respeito à quantidade de asparagina presente no café. Grãos imaturos contêm maior conteúdo de asparagina, pelo que a sua rejeição nesta fase é bastante importante. (Li et al., 2023; Preedy, 2015) Tal como referido anteriormente, os processos de pós colheita têm uma influência significativa na qualidade do grão verde, sendo a maior diferença a nível químico entre os grãos que sofreram processos húmido e seco, o teor de sólidos solúveis, que são mais elevados nos sujeitos ao processo seco. Além disso, a composição de precursores

de sabor específicos e de baixo peso molecular, como hidratos de carbono e aminoácidos livres, também varia com o tipo de processamento. (Li et al., 2023)

2.4.2. Tratamento Enzimático dos Grãos Verdes

A formação da acrilamida pode ser limitada por dois tratamentos enzimáticos: i) com asparaginase (EC 3.5.1.1), que catalisa a hidrólise do Asn em Asp e amoníaco, através da hidrólise do grupo amida da cadeia lateral do Asn; (Corrêa et al., 2021) e ii) com acrilamidase (EC 3.5.1.4), que converte a acrilamida em ácido acrílico. (Cha, 2013)

O primeiro método enzimático tem como objetivo reduzir a concentração do precursor Asn livre no grão verde, porém os tratamentos preliminares realizados no grão, de forma a assegurar uma interação eficaz entre a solução enzimática e o aminoácido presente (distribuição homogênea da enzima ativa sobre o grão), tornam este método complexo de executar. Todavia, verifica-se com baixas concentrações de asparaginase uma redução de Asn de ca. 70-80 % e uma diminuição efetiva dos níveis de acrilamida após torra de 55-74 %.(Xu et al., 2016) Várias técnicas de pré-tratamento foram realizadas com o intuito de melhorar a interação entre a enzima e o substrato. Procedimentos como secagem, hidratação, pressurização, utilização de vapor, branqueamento e outros tipos de aquecimento, utilização de baixas pressões, redução do tamanho de partícula são exemplos que teoricamente auxiliam a mitigação, porém na prática não são aplicáveis a nível industrial e alteram as propriedades organolépticas do café. Navarini e colegas (Navarini et al., 2014) patentearam um método enzimático, com asparaginase (EC 3.5.1.1) e aspartase (EC 4.3.1.1) em solução, para a redução de acrilamida num extrato aquoso do grão verde. Foi possível concluir que Asn e Asp estão presentes em quantidades similares e que Asp também contribuiu para a formação da acrilamida, apesar de em quantidades menores comparativamente com Asn. Após tratamento enzimático, o extrato aquoso é reincorporado nos grãos de café antes da etapa da torra, obtendo-se uma diminuição de 70% sem alteração das propriedades organolépticas da bebida.

O segundo método que faz uso de acrilamidase permite reduzir os níveis de acrilamida pela sua conversão em amónia e ácido acrílico, no entanto, apesar deste último produto ser menos tóxico, é corrosivo para a pele e mucosas, e afeta o perfil sensorial da bebida. (Strocchi et al., 2022)

2.4.3. Condições de Torrefação

Durante a torra, vão ocorrendo tanto reações de formação como de degradação da acrilamida, sendo que no início do processo, as reações de formação são

predominantes, levando a concentrações de acrilamida superiores a 7 mg/kg. Porém, próximo do final do ciclo de torrefação, a taxa de degradação da acrilamida é maior, verificando-se um decréscimo rápido da mesma. (Preedy, 2015)

A otimização das condições de torra é um dos maiores focos para mitigação da acrilamida, contudo é de salientar, que a modificação das condições de torra é desafiante, pois as propriedades sensoriais do café não devem ser alteradas. (Strocchi et al., 2022)

Como já referido, o café de torra escura apresenta níveis de acrilamida menores devido ao prolongado tempo de torra e temperatura, porém isto leva também à formação de outros contaminantes como derivados de furano e furfural, e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, com especial atenção para o álcool furfurílico por também ser classificado pela IARC como possível carcinogénico para os humanos (grupo 2B). Deste modo, estratégias direcionadas ao grau de torra são arriscadas, pois este parâmetro está relacionado com preferências regionais ou pessoais e com produção de compostos indesejados. (Preedy, 2015)

Estudos realizados evidenciaram que uma alteração da temperatura para 168 °C, durante 22 minutos reduziu significativamente a acrilamida (1110 µg/kg) e resultou numa avaliação sensorial de positiva. (Madiah, 2013) Alternativamente, uma torrefação média sob pressão reduzida apresentou resultados satisfatórios, com uma redução de 50% de acrilamida comparativamente às condições tradicionais, com impacto mínimo nas propriedades sensoriais. Tal abordagem, apesar de positiva, não é de interesse geral, pois o café de torra média é comercializado somente nos mercados americanos e do norte da europa. (Strocchi et al., 2022)

Avaliou-se também o efeito do ar com diferentes caudais, níveis de humidade e temperatura. Concluiu-se que as concentrações de acrilamida diminuíram para uma redução do caudal de ar com temperaturas entre os 190-216 °C, e a humidade do ar foi aumentada quando em temperaturas mais elevadas (216 °C). Verificou-se uma quantidade baixa de acrilamida (0,0376 µg/g) a 203 °C, porém com deterioração moderada dos polifenóis. (Budryn et al., 2015)

O vapor saturado também promoveu uma redução de 10 % da concentração de acrilamida, mas com um impacto negativo no sabor e aroma do café. Já o vapor superaquecido resultou numa redução de 16 % para uma torra média; e 25 % para torra escura, mas ainda com impacto negativo, passando a apresentar (o café Robusta) sabor mais doce e acidez típica de citrinos. (Strocchi et al., 2022)

2.4.4. Remoção da Acrilamida de Grãos de Café Torrados e Bebidas

De forma a remover a acrilamida dos grãos de café torrado, recorreu-se ao uso de CO₂ supercrítico, com uma eficiência de remoção de 8-45%, após um período de extração de 525 min, que aumentou para 70 % após 22 h. A temperatura influenciou fortemente o processo, contrariamente à pressão que não exerceu qualquer impacto. Também o uso de etanol (até 9,5% m/m) levou a uma alteração na polaridade da mistura supercrítica, promovendo a extração da acrilamida. As melhores condições operacionais verificaram-se para 100 °C, 200 bar e 9,5 % m/m de etanol.(Banchemo et al., 2013)

A remoção da acrilamida também pode ser realizada diretamente da bebida usando enzimas bacterianas a temperaturas relativamente altas, porém, algumas limitações foram verificadas para o seu uso em operações em contínuo. (Strocchi et al., 2022)

2.4.5. Armazenamento

Vários estudos comprovaram que a acrilamida não é estável durante o armazenamento do café comercial na forma de grão ou moído. Cerca de 40-60 % da acrilamida é degradada, à temperatura ambiente, em períodos de 6-12 meses. Estudos de variação de temperatura (-18, +4, e +37 °C) realizados durante 12 meses em saco sob vácuo, demonstraram que a degradação tem relação direta com a temperatura, ou seja, as maiores taxas de degradação foram detetadas a temperaturas mais elevadas. (Preedy, 2015)

2.5. Análise da Acrilamida no Café

Tendo em conta a presença de acrilamida nos alimentos e as suas propriedades genotóxicas com atividades mutagénicas e carcinogénicas em múltiplos órgãos, tem-se verificado a necessidade de desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis, precisos e baratos para a sua quantificação. Obviamente, com o intuito de obter resultados precisos e reprodutíveis, a colheita da amostra e a preparação da mesma antes da análise instrumental devem ser conduzidas com a maior precisão possível. (Castle & Eriksson, 2005)

O desenvolvimento de um método em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) pode ser bastante trabalhoso, obrigando a várias otimizações até que a separação na coluna cromatográfica permita atingir os resultados desejados. A coluna cromatográfica vai ter assim um papel fundamental, e a sua escolha pode ser complexa, tendo em conta

a enorme variedade disponível tanto na base de sílica como nas características dos ligandos. (Kaurand et al., 2018)

Os três pontos críticos para o desenvolvimento de um método em HPLC envolvem: preparação da amostra (pH, tamanho e idade da amostra, conteúdo orgânico, desgaseificação); seleção das condições de análise (pH, caudal, temperatura, coluna e comprimento de onda de detecção); e padronização (método de integração, concentração padrão e correção do fator resposta). Também, o poder de resolução, seletividade e caudal são atributos chave para o desenvolvimento de um método cromatográfico.

A seletividade pode ser manipulada pela conjugação de diferentes fatores como a composição do solvente, tipo de fase estacionária, constituição da fase móvel, soluções tampão e pH. Este último parâmetro é muito importante para separar compostos ionizáveis, porque por exemplo, compostos ácidos são retidos a um pH baixo, enquanto compostos básicos ficam mais retidos a valores maiores de pH. (Kaurand et al., 2018)

Quando se pretende realizar a detecção e quantificação da acrilamida nos alimentos, deve-se ter sempre em conta os seguintes parâmetros do método analítico seguido: limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, recuperação, seletividade, exatidão e precisão. Nos vários grupos de alimentos mais propícios à formação de acrilamida, esta ocorre numa ampla gama de concentrações; e mais especificamente para o café, espera-se a capacidade de se conseguir detetar concentrações iguais ou inferiores a 10 µg/kg. (Castle & Eriksson, 2005)

Assim, desde 2002, que vários artigos têm sido publicados sobre métodos de detecção de acrilamida, e apesar de ainda não existir um método oficial adequado para a sua quantificação em alimentos, o Esquema de Avaliação de Desempenho de Análise de Alimentos (FAPAS) organiza frequentemente ensaios interlaboratoriais para avaliar a qualidade e validar métodos. Os resultados têm mostrado que as duas melhores abordagens para a acrilamida são através de HPLC acoplada a espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) e Cromatografia Gasosa (GC) do derivado mono- ou dibromo de acrilamida com ionização eletrónica e detecção por espectrometria de massa dos iões fragmentados. (Preedy, 2015) De referir, que em alimentos à base de amido, a valina proporciona a mesma transição MS/MS que a acrilamida após fragmentação na origem, porém no café torrado a valina não é considerada interferente, pois os aminoácidos livres são completamente degradados. No caso do café torrado, os compostos principais que vão interferir na análise são *N*-acetil- β -alanina, 3-APA e lactamida que produzem a mesma transição iónica por fragmentação na origem que a acrilamida. (Kocadağlı & Gökmen, 2022)

A seleção/desenvolvimento do método mais apropriado tem uma forte dependência do tipo de alimento a analisar (matriz da amostra), como a estrutura da acrilamida e as suas propriedades físico-químicas. A acrilamida é desprovida de grupos cromóforos suficientemente fortes (*i.e.*, ligações duplas ou triplas conjugadas, anéis aromáticos) e a ausência de fluorescência natural, impossibilita a sua deteção com radiação ultravioleta. (Preedy, 2015)

Tal como referido no parágrafo anterior, a matriz da amostra tem uma influência muito grande na deteção, sendo que dos vários alimentos já analisados, a matriz do café é considerada bastante complexa, devido à presença de interferentes co-extratáveis e apresentar supressão iónica. Por este motivo, há necessidade de aplicar uma etapa de limpeza da amostra, de forma a eliminar ou reduzir a presença dos interferentes e possibilitar a obtenção de resultados mais exatos. (Preedy, 2015)

A análise da acrilamida é assim peculiar e acresce que é extremamente difícil obter brancos, tendo em conta que em cada conjunto de amostras a analisar deve-se ter pelo menos um e preferencialmente mais brancos da amostra. Como alternativa, os mesmos devem ser o mais semelhante à amostra, como produtos não processados, ou então realizar o ensaio na ausência de qualquer amostra alimentar. (Castle & Eriksson, 2005) Abordagens de cromatografias líquida e gasosa de diluição isotópica, acopladas com detetores de espectroscopia de massa em *tandem*, são bastante recomendados para a deteção quantitativa da acrilamida. Outros métodos provêm da derivatização da acrilamida e/ou separação por GC. Métodos de cromatografia gasosa – espectrometria de massa (GC-MS) tem sido usados com bastante regularidade, porém os de GC baseados na derivatização proporcionam desvantagens, como o serem demorados e trabalhosos, com possibilidade de se perder analito, devido à instabilidade do derivado ou ocorrência de derivatização incompleta, e ainda obtenção de falsos positivos decorrentes da existência de reações colaterais ou dos interferentes dos reagentes da derivatização. (Preedy, 2015)

É de ter em atenção também que, qualquer contaminação irá comprometer os resultados e como tal é importante a seleção correta dos materiais a usar. Verificaram-se contaminações provenientes de filtros de seringa, usualmente utilizados antes de injeções em sistemas de LC-MS, apesar de incerta se a fonte de contaminação adveio realmente dos filtros ou da respetiva embalagem que podia conter poliacrilamidas. (Castle & Eriksson, 2005)

2.5.1. Amostragem

A acrilamida é um composto que se forma à superfície dos alimentos, que são praticamente sempre sólidos. A sua acumulação não ocorre de forma homogénea, como

é o caso das batatas fritas, em que se verificam maiores concentrações de acrilamida nas zonas mais escuras e nas extremidades do alimento. Deste modo, a amostra deve ser previa e corretamente homogeneizada para que análise seja fidedigna. (Castle & Eriksson, 2005)

2.5.2. Padrão Interno

Antes de se realizar a extração da acrilamida, é recomendado em muitos métodos publicados o uso de um padrão interno, sendo os dois mais utilizados, a acrilamida deuterada ($^2\text{H}_3$ – acrilamida) (figura 2.11) e a acrilamida marcada com carbono 13 ($^{13}\text{C}_3$ – acrilamida). A marcação tripla nos dois casos permite que as mesmas tenham uma massa iónica afastada o suficiente para a determinação da acrilamida por MS, no entanto a preferência recai na acrilamida marcada com carbono, que apesar de mais cara, permite evitar troca dos átomos de deutério. (Castle & Eriksson, 2005)

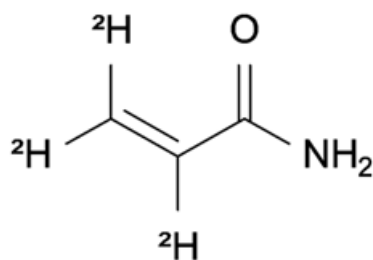


Figura 2.11: Estrutura química da acrilamida deuterada.

2.5.3. Extração

A acrilamida é um composto solúvel em solventes polares como água, acetona e metanol. Por este motivo, tem-se verificado uma extração rápida, em apenas alguns minutos, com água à temperatura ambiente para vários tipos de matrizes, incluindo a do café. A proporção de água é usualmente 10 volumes para um volume de amostra, e como a acrilamida não apresenta propriedades fortemente ácidas nem básicas, não são necessários ajustes de pH. Apesar da água à temperatura ambiente originar bons rendimentos de extração, o uso de água quente para matrizes ricas em gorduras promove a dispersão e igualmente uma extração eficiente. Alternativamente, pode-se combinar água à temperatura ambiente com um solvente orgânico, como *n*-hexano, ciclohexano ou tolueno. Embora se possa aquecer a água para remover gorduras presentes na matriz, no caso da extração da acrilamida no café, não convém ultrapassar os 40 °C devido à instabilidade da acrilamida e também para controlar a formação de subprodutos. De forma a promover esta etapa, costuma-se usar equipamentos como agitadores ou banhos de ultrassons, e até mesmo acelerá-la com um solvente (extração

acelerada com solvente), ou utilizando fluidos supercríticos (extração com fluido supercrítico). Também o metanol tem atraído bastante interesse, tendo em conta que para além de extrair a acrilamida, precipita compostos co-extratáveis, que são posteriormente removidos. Outro fator importante neste processo, é que os grãos de café devem ser moídos até obtenção de partículas com dimensão inferior a 1 mm, de forma a aumentar o rendimento da extração.

Ao longo dos anos conseguiu-se comprovar que a extração da acrilamida é efetivamente completa. (Castle & Eriksson, 2005; Preedy, 2015)

2.5.4. Etapa de Purificação

Durante a preparação das amostras, os procedimentos para minimizar interferentes, que são extraídos do alimento concomitantemente com a acrilamida, podem ser variados, sendo um exemplo, a precipitação dos co-extratáveis com soluções Carrez (ferrocianeto de potássio (II) e sulfato (VI) de zinco (II)).

Para análises por LC-MS é também empregue a tecnologia de extração em fase sólida (SPE). Nesta etapa de limpeza, pode ser usado um cartucho SPE único ou múltiplo com diferentes fases estacionárias (sílica, polimérica, ou à base de carbono) ou então uma combinação destes (modo misto). São exemplos a Oasis HBL de poli(divinil-benzeno-co-N-vinilpirrolidona), possuindo uma fase estacionária hidrofílica/lipofílica que permite a remoção da maioria dos componentes da amostra e a Bond Elut AccuCAT de ácido benzeno sulfónico à base de sílica, esta de modo misto com sorvente excelente para trocas catiónica e aniónica. (Preedy, 2015)

2.5.5. Separação e Detecção da Acrilamida no Café

A aplicação de cromatografia líquida é frequente para determinação de acrilamida em poliacrilamidas, nos solos, alimentos, entre outros tipos de amostras. (Castle & Eriksson, 2005) Em particular, a sua deteção ocorre frequentemente por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a espectrometria de massa (MS). O sistema de cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa em *tandem* (LC-MS/MS) é conhecido por permitir a análise eficiente de compostos polares, como a acrilamida, que não são suficientemente voláteis de forma a serem quantificados diretamente por GC-MS. (Preedy, 2015) Apesar da deteção da acrilamida ser realizada a um comprimento de onda baixo, por norma entre 208 nm e 254 nm, esta gama de absorção é quase universal para uma grande maioria de moléculas insaturadas. (Tareke et al., 2002)

Para além da análise de acrilamida por LC-MS/MS ultrapassar a questão da baixa volatilidade do composto, permitindo a omissão da etapa demorada de derivatização necessária em GC, também se poder optar por realizar uma bromação em sistemas de cromatografia líquida, de forma a aumentar a sensibilidade e seletividade da deteção na presença de interferentes com características semelhantes, seja no tempo de retenção na coluna, como nas massas após fragmentação no sistema MS. (Castle & Eriksson, 2005; Preedy, 2015)

Um espectrómetro de massa geralmente inclui os seguintes componentes: uma entrada da amostra para introduzir o composto a ser analisado; uma fonte de ionização para gerar iões a partir da amostra; um ou mais analisadores de massa para separar os diferentes iões obtidos; um detetor para quantificar; e por último um sistema de processamento de dados que irá gerar um espectro de massa (figura 2.12). No entanto, existem equipamentos em que a entrada da amostra e a fonte de ionização são combinadas, assim como o analisador de massa e o detetor.

Desta forma, o equipamento garante os seguintes processos:

- I. obtenção na fonte de ionização de iões a partir da amostra;
- II. separação desses iões de acordo com a sua razão massa/carga (m/z) no analisador de massa;
- III. eventualmente, fragmentação dos iões seleccionados e análise dos fragmentos num segundo analisador;
- IV. detecção dos iões que emergem do último analisador e medição da sua abundância com o detetor, que os converte em sinais elétricos;
- V. processamento e transmissão dos sinais para o computador, e controlo do instrumento por *feedback*.

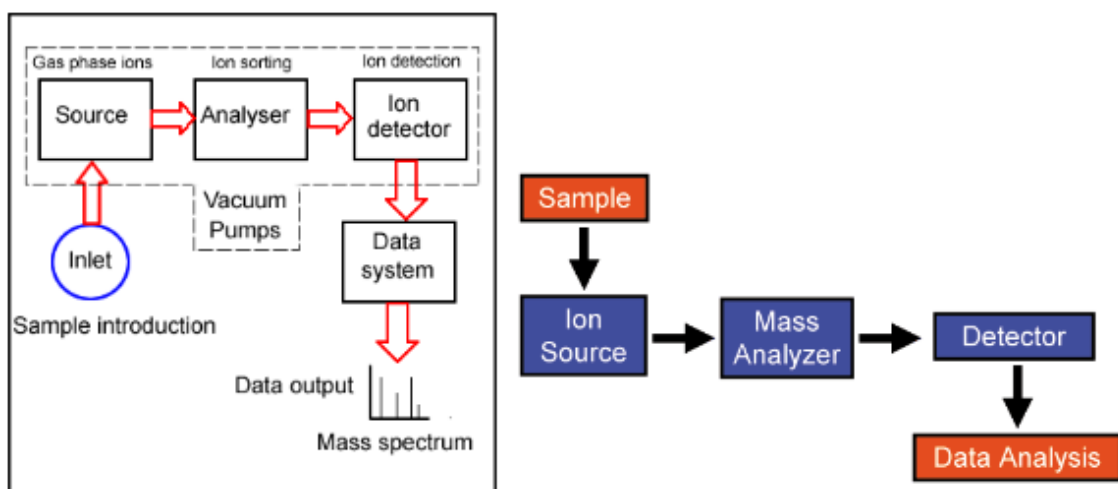


Figura 2.12: Diagrama simplificado de um espectrómetro de massa típico. (Adaptado de Prasain, 2012)

Existe uma variedade de técnicas de ionização, sendo umas muito energéticas e causam fragmentação extensiva, enquanto outras são mais suaves e só produzem íons da espécie molecular. A ionização por elétrons, a ionização química e a ionização por campo elétrico são técnicas apropriadas apenas para a ionização em fase gasosa, o que as torna restritas a compostos que sejam suficientemente voláteis e estáveis ao calor. No entanto, muitos compostos são termicamente instáveis ou têm baixa pressão de vapor, o que significa que suas moléculas precisam ser extraídas diretamente da fase condensada para a fase gasosa. (de Hoffmann & Stroobant, 2007)

Essas fontes diretas de íons podem estar em fase líquida ou sólida. No caso das fontes líquidas, o analito está dissolvido numa solução, que é nebulizada em forma de pequenas gotículas. Os íons são gerados sob pressão atmosférica e levados ao espectrómetro de massa por um sistema a vácuo. (de Hoffmann & Stroobant, 2007)

A maior parte das técnicas de ionização usadas em sistemas de LC-MS incluem ionização por *electrospray* (ESI), apesar de já se ter obtido bons resultados com ionização química a pressão atmosférica (APCI). Ambas as técnicas são de ionização suave, permitindo até a detecção de moléculas muito polares, cuja análise é difícil, e menos suscetíveis a supressão iônica. Porém, como a detecção é feita a baixos comprimentos de onda, a seletividade é reduzida para amostras como as de café. (Preedy, 2015)

As maiores vantagens das técnicas que usam uma fonte de ionização à pressão atmosférica são a simplicidade em acoplar com outras técnicas de separação, como o HPLC, e a amostra ser de fácil introdução no espectrómetro de massa, pois opera a pressão atmosférica fora do mesmo. O enorme interesse por ESI surgiu com a descoberta da possibilidade de se originar múltiplos íons carregados a partir de proteínas, permitindo a determinação da sua massa molecular. Inicialmente, este era um método empregue em análise de proteínas com massa molecular relativamente grande, porém, o seu uso alargou-se a outros polímeros e bio-polímeros, como também a moléculas polares pequenas. A sensibilidade pode ser aumentada com a redução do caudal, ocorrendo perda de sensibilidade para caudais acima de 0,5 mL/min. A redução do caudal permite a passagem de menores quantidades de analito e solução tampão na fonte, o que conseqüentemente, origina menos contaminações. Por sua vez, a redução do diâmetro da coluna possibilita obviamente um aumento da sensibilidade, pois concentra o analito na fase móvel. (de Hoffmann & Stroobant, 2007)

Uma vez que os íons estão na fase gasosa, estes são separados com base nas suas massas, que são então medidas. Essa medição é feita por analisadores específicos que calculam a relação m/z , onde m/z representa uma fração da massa do composto em análise. Diferentes tipos de analisadores de massa correspondem a uma ampla

variedade de fontes, e a separação dos iões de acordo com o m/z pode ser baseada em diferentes princípios. No entanto, todos os métodos têm em comum o uso de campos elétricos e magnéticos, que podem ser estáticos ou dinâmicos, aplicados de forma independente ou em conjunto. A maior diferença incide na forma como tais campos são empregues para alcançar a separação. (de Hoffmann & Stroobant, 2007)

Os analisadores de massa triplo-quadrupolo para sistemas de LC-MS são bastante dispendiosos, e apesar da utilização de um instrumento de estágio único permitir minimizar os custos, os mesmos não têm sensibilidade suficiente para análises de acrilamida em extratos aquosos de alimentos. Como a análise da acrilamida ocorre acoplada à espectrometria de massa, é aconselhável que ocorra em modo de monitorização de reação múltipla (MRM), pois oferece maior seletividade em relação ao modo de monitorização de ião único (SIM) aplicado num único quadrupolo, uma vez que a transição de um ião precursor para um ião produto é monitorizada. O produto é originado por colisão no segundo quadrupolo e monitorizado no terceiro. No entanto, existem formas de contornar e conseguir de certa forma um limite de deteção semelhante ao sistema LC-MS/MS. Como alternativas tem-se: a mudança para *electrospray* em modo SIM (Monitorização Seletiva de Ião); alteração do solvente orgânico, de forma a permitir concentrar a amostra e analisar em sistema de LC-APCI-MS; aplicação da técnica de extração assistida por solvente (ASE) e análise por LC-ESI-MS em modo positivo ou deteção UV; ou até mesmo, realização de derivatização com ácido 2-mercaptobenzóico, seguida de análise por LC-ESI-MS em modo positivo. A derivatização com ácido 2-mercaptobenzóico torna a molécula menos polar, aumentando assim a retenção na coluna e conseqüentemente a melhoria do potencial de separação, o que permite a análise sensível por LC-UV, ou até mesmo por LC-fluorescência, caso a derivatização ocorra com um nucleófilo de enxofre fluorescente. Apesar de existirem diversas estratégias para ultrapassar as limitações de um sistema LC-MS, a mais frequente é mesmo a utilização de LC-MS/MS em modo ESI positivo, que oferece melhor sensibilidade e mais fiabilidade na identificação de um analito como a acrilamida. (Castle & Eriksson, 2005)

Na figura 2.13 é possível visualizar os produtos obtidos após fragmentação da acrilamida. Os principais iões observados são os de m/z 72, correspondendo ao ião molecular protonado; m/z 55, associado à perda de NH_2 ; e m/z 27, que resulta da subsequente perda do CO. Para o ião m/z 44, o sistema costuma apresentar uma fraca resolução na análise de extratos alimentares. A transição de massa de elevada intensidade $72 > 55$ permite a quantificação da acrilamida, sendo as restantes transições usadas para confirmação. A transição de $75 > 58$ foi descrita para os isótopos marcados de acrilamida, D_3 -acrilamida e $^{13}\text{C}_3$ -acrilamida. (Riediker & Stadler, 2003a)

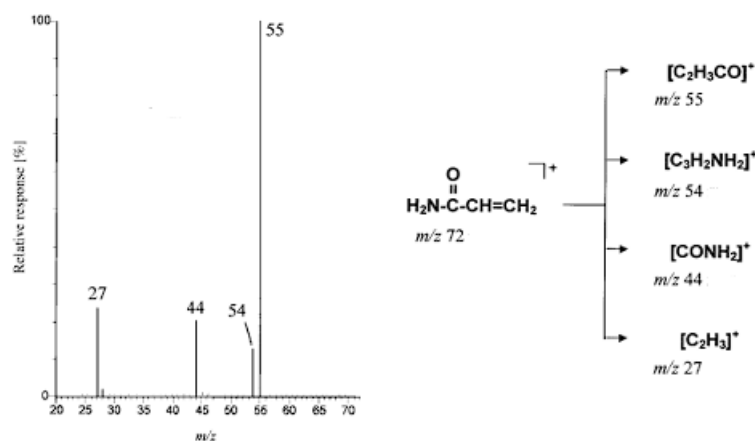


Figura 2.13: Espectro dos iões produto da fragmentação da acrilamida e respetivos m/z. (adaptado de Riediker & Stadler, 2003)

Para estes tipos de sistemas, a identificação da acrilamida vai incidir deste modo no tempo de retenção cromatográfico e na presença e abundância relativas dos iões característicos. Quanto ao tempo de retenção e à forma do suposto pico da acrilamida têm de corresponder ao de um padrão e espera-se que o rácio do tempo de retenção comparativamente com o de um padrão interno esteja dentro de 3%. Para estes sistemas de cromatografia líquida, as melhores retenções ocorrem com uma fase composta por carbono grafitico poroso, usando água como fase móvel. (Castle & Eriksson, 2005; Corporation, 2015)

Para uma identificação fidedigna, é importante, que os valores da abundância relativa sejam concordantes em +/- 10%. De acordo com a Decisão da Comissão Europeia 2002/657/CE (Comissão Europeia, 2002), a confirmação da presença de acrilamida em alimentos ocorre quando pelo menos duas respostas positivas de monitorização seletiva de iões (SIM) são obtidas, com uma tolerância aceitável de +/- 10-20% comparativamente com as razões obtidas a partir dos padrões. Porém, a análise do espectro de massa completo também é necessária para a identificação, esperando-se a obtenção de espectros idênticos para a amostra e para o padrão em 10 e 20 eV de energia de colisão. (Tareke et al., 2002)

Tipicamente, os valores de LOD são 3-20 µg/kg e de LOQ 10-50 µg/kg, sendo que a análise é linear na gama de 10-10000 µg/kg. (Castle & Eriksson, 2005) Concluiu-se também que melhorias significativas foram verificadas quando se realizou uma redução da quantidade de amostra aplicada nos cartuchos SPE e uma extração prévia com *n*-hexano, de forma a ultrapassar a rápida perda de desempenho do sistema após várias injeções e supressão iónica severa. (Preedy, 2015)

A cromatografia líquida é uma das técnicas de análise instrumental que tem sofrido rápidos progressos. (Guillarme et al., 2010) Como tal, com o intuito de melhorar ainda mais a sua resolução, com corridas cromatográficas mais rápidas e com melhor

sensibilidade, desenvolveu-se a cromatografia líquida de ultra *performance* (UPLC), que faz uso de colunas com menor tamanho de partícula (1-2 μm) sob pressões ainda maiores que a tradicional HPLC. Tal separação é possível através de uma coluna de fase reversa BEH C18 (150 mm x 2,1 mm; 1,7 μm). Nas colunas típicas de HPLC, ou seja, com diâmetro de partícula de 5 μm , a acrilamida pode sofrer uma fraca retenção e conseqüentemente, uma separação insuficiente, originando deformação dos picos. Outras vantagens de UPLC são o uso de caudais reduzidos (0,2 mL/min), menores volumes de amostra e a obtenção de cromatogramas com maior qualidade. Quanto às desvantagens, para além da necessidade de bombas que proporcionem muito maior pressão comparativamente aos sistemas de HPLC, os cromatogramas resultantes, devido à melhor resolução, contêm mais picos e conseqüentemente a sua interpretação é mais complexa. (Oracz et al., 2011)

Outras técnicas úteis para a determinação da acrilamida são a eletroforese capilar (CE) e métodos bioanalíticos como testes imunoenzimáticos e o uso de biossensores, que mostraram suficiente seletividade e sensibilidade. (Oracz et al., 2011)

2.6. Validação do Método

As técnicas de separação, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), têm vindo a destacar-se na área da química analítica pela capacidade de caracterizar qualitativa e quantitativamente diferentes tipos de amostras, tais como ambientais, farmacêuticas, biológicas e alimentares.

No desenvolvimento de um método analítico, é crucial a obtenção de informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, uma vez que dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Face ao exposto, o método deve sofrer uma avaliação denominada de validação. (Ribani et al., 2004) De acordo com a Organização Internacional de Normalização (ISO), o termo “validação” é definido como verificação da adequabilidade dos requisitos especificados para um uso pretendido. (Gupta & Kaur, 2018)

O grande benefício da validação de um método consiste em garantir um grau de confiança, não apenas a quem desenvolve, mas também para quem vai usufruir, e embora o processo de validação seja trabalhoso, demorado e envolva certos investimentos monetários, no final, permite uma melhor gestão de tempo, elimina repetições frustrantes e conseqüentemente, uma melhoria económica.

Tendo em vista a validação de um método de separação, os parâmetros analíticos usualmente avaliados encontram-se a seguir.

➤ Seletividade

A seletividade é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, o analito na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação na matriz complexa de uma amostra. O objetivo é obter uma seletividade tal, que o pico de resposta do sistema seja exclusivo do composto de interesse. Caso a seletividade não seja assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas. (Cassiano et al., 2009)

Este é um parâmetro essencial no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação, havendo necessidade de o reavaliar continuamente ao longo de todo o processo, pois algumas amostras podem sofrer degradação e gerar compostos novos que poderão ser co-eluídos com a substância de interesse.

As estratégias mais comuns de avaliação da seletividade de métodos cromatográficos realizam uma comparação da eluição sem interferentes entre a matriz com e sem analito, outras usam detetores modernos (como espectrômetros de massa) que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão, ou incluem até mesmo análises complementares com outra técnica cromatográfica, ou com métodos específicos para a estrutura da substância de interesse (como espectrometria de massa, espectroscopia no infravermelho ou bioensaios específicos). Porém, no caso particular da avaliação da acrilamida no café torrado, não sendo possível obter uma matriz isenta do composto de interesse, é usual realizar-se o método de adição padrão para determinação da seletividade. Neste caso, é obtida uma curva analítica com adição do analito à amostra, que é comparada com uma curva analítica sem a presença da matriz, e na eventualidade de apresentarem semelhanças, é possível afirmar que não há interferência significativa da matriz e deste modo considerar que o método é seletivo. (Ribani *et al.*, 2004)

➤ Linearidade e Gama de trabalho

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância a analisar, dentro de uma determinada gama de trabalho. Ela representa a capacidade de repetir um resultado consistente.

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida antecipadamente, pelo que deve ser determinada empiricamente através de uma curva analítica ou curva de calibração. Deste modo, analisa-se no mínimo 6 pontos, e mede-se os sinais para as respectivas massas ou concentrações conhecidas da espécie em questão. Os coeficientes da curva de calibração são obtidos através de uma regressão linear com os resultados anteriormente analisados, que para além da equação da reta que permite

quantificar o analito na amostra, fornece também o coeficiente de correlação entre os valores obtidos. O coeficiente de correlação deve estar o mais próximo de 1, para que a dispersão do conjunto dos pontos experimentais e a incerteza dos coeficientes de regressão estimados sejam menores. (Cassiano et al., 2009)

A regressão linear descrita pela equação $y = mx + b$ (sendo y o sinal, x a concentração, m o declive e o b a ordenada na origem) permite obter uma relação entre o sinal e a concentração do analito na amostra, porém a mesma só é válida para um determinado intervalo de concentrações da espécie medida. Este intervalo designa-se por gama de trabalho ou faixa linear dinâmica. Deste modo, apesar da perda de linearidade ser característica de cada técnica, a seleção dos pontos para a curva de calibração deve ser efetuada dentro da gama de trabalho.

Segundo a norma ISO 8466-1, são recomendados dez padrões distribuídos equitativamente na gama de concentrações. Para métodos que envolvam a realização de uma curva de calibração, a avaliação da melhor gama de trabalho é realizada pelo teste de homogeneidade das variâncias ao primeiro e ao último padrão da curva de calibração, segundo a equação 1, de forma a observar possíveis diferenças significativas nos limites da gama de trabalho. (Relacre, 2000)

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (1)$$

Sendo:

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i} \quad (2)$$

Para $i = 1$ e $i = 10$.

Para analisar as possíveis diferenças entre as variâncias, é efetuado o cálculo do valor teste PG , através das equações a) e b).

$$a) \quad PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}$$

$$b) \quad PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2}$$

Sendo a) quando $S_{10}^2 > S_1^2$; e b) quando $S_1^2 > S_{10}^2$.

A comparação é então efetuada com o valor da distribuição F de Snedecor/Fisher, para $n-1$ graus de liberdade e caso:

- $PG \leq F$: as diferenças de variâncias não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada;
- $PG > F$: as diferenças de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida, até que a diferença entre as variâncias relativas ao primeiro e último padrões permitam obter $PG \leq F$

Alternativamente também se pode verificar o coeficiente de correlação que deve ser superior a 0.995. (Relacre, 2000)

➤ Sensibilidade

A sensibilidade de um método analítico representa a capacidade de resposta a pequenas variações na concentração do analito, traduzindo-se pelo quociente entre a variação do sinal medido (Δy) e a variação da concentração do analito (Δc), tal como representado pela equação seguinte:

$$S = \frac{\Delta y}{\Delta c} \quad (3)$$

Este valor é coincidente com o valor do declive da reta de calibração, caso a mesma siga um modelo linear, e é relevante quando se pretende averiguar a sua evolução ao longo do tempo, comparar a sensibilidade entre vários métodos de análise do mesmo analito baseados em modelos lineares, ou quando se compara a sensibilidade para vários analitos. (Relacre, 2000)

➤ Limites analíticos

Em situações em que a amostra possui baixos conteúdos do componente a ser analisado ou quando se pretende avaliar uma propriedade específica (valores residuais), é crucial determinar o menor valor de concentração do componente que pode ser identificado e mensurado pelo método a ser validado. Estes cálculos incluem a determinação dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ).

O limite de detecção representa a concentração mínima do componente que pode ser identificado e diferenciado do branco (amostra com a mesma matriz, mas sem a presença do componente), com uma certeza estatística razoável, embora não necessariamente quantificado com exatidão. É importante destacar que uma leitura inferior ao LOD, não é indicadora da ausência do componente. Este parâmetro é

expresso em unidades de concentração e, mediante a utilização de uma reta de calibração, é calculado pela equação.

$$LOD = \frac{3.3 * S_{y/x}}{b} \quad (4)$$

sendo: $S_{y/x}$ o desvio padrão residual da curva de calibração; e b o declive da curva de calibração.

O limite de quantificação refere-se à concentração mínima do analito que pode ser quantificada com uma precisão e exatidão aceitáveis. Este parâmetro é crucial em ensaios quantitativos de compostos em baixas concentrações na matriz, sendo especialmente aplicado na análise de impurezas e/ou produtos de degradação.

$$LOQ = \frac{10 * S_{y/x}}{b} \quad (5)$$

sendo: $S_{y/x}$ o desvio padrão residual da curva de calibração; e b o declive da curva de calibração.

Na prática, o LOQ corresponde ao padrão de menor concentração. (RELACRE, 2000)

➤ Taxa de recuperação

A maior parte dos métodos analíticos apresenta perdas do analito de interesse durante a extração a partir de matrizes mais complexas, levando a resultados inferiores à concentração real presente na amostra original. Assim, avaliar a quantidade do componente que pode ser adicionada à amostra, extraída e quantificada torna-se um procedimento de validação muito importante.

Para avaliar a recuperação é importante fazer ensaios a três níveis de concentração: baixo, médio e alto, de acordo com a curva de calibração. Em métodos de matriz biológica este parâmetro deve ser avaliado com o auxílio de um padrão interno.

Obviamente que o objetivo é obter altos valores de recuperação, porém o mais importante é que a recuperação seja consistente, precisa e reprodutiva. (Cassiano et al., 2009)

Este parâmetro é calculado, em percentagem, através da equação seguinte.

$$Recuperação (\%) = \frac{(C_{fortificada} - C_{matriz})}{C_{adicionada}} \times 100 \quad (6)$$

sendo: $C_{fortificada}$ a concentração determinada na amostra fortificada; C_{matriz} a concentração determinada na amostra não fortificada; e $C_{adicionada}$ a concentração adicionada de analito.

➤ Precisão

Este parâmetro representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes repetidos em alíquotas da mesma amostra. A precisão avalia os possíveis erros sistemáticos e aleatórios, constituindo uma garantia da qualidade dos resultados.

A veracidade dos resultados é, geralmente, avaliada em condições de repetibilidade (precisão intra-dias) e precisão intermédia (precisão inter-dias), e expressa em termos de estimativa do desvio padrão (s) ou desvio padrão relativo ($DPR\%$).

$$s = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad (7)$$

$$DPR(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (8)$$

Onde x_i é o valor individual de uma determinação, \bar{x} é a média aritmética das determinações e N é o número de determinações.

É essencial que o método seja preciso, independentemente da concentração da amostra, sendo assim aconselhável analisar cada tipo de matriz de amostra, em separado, de modo a abranger por completo o intervalo de concentração do analito em estudo. (Cassiano et al., 2009)

A repetibilidade é uma medida de expressão da precisão de medições sucessivas sobre uma mesma amostra, efetuadas nas mesmas condições, em termos de analista, equipamento, reagentes e preferencialmente, no mesmo dia. Tal parâmetro é expresso em desvio padrão relativo, para cada nível de concentrações. Este parâmetro não deve ser confundido com a análise da precisão instrumental ou repetibilidade de injeções. (Cassiano et al., 2009)

A precisão intermédia representa a habilidade do método fornecer os mesmos resultados quando as análises são efetuadas no mesmo laboratório, mas em dias diferentes, diferentes analistas e diferentes equipamentos. Para esta avaliação aconselha-se um intervalo de pelo menos dois dias entre análises. A precisão intermédia é o parâmetro mais representativo da variabilidade dos resultados obtidos num laboratório e, por isso, a sua avaliação é bastante aconselhada. Este parâmetro é expresso através da estimativa do desvio padrão absoluto e do desvio padrão relativo. (Cassiano et al., 2009; Ribani et al., 2004)

➤ Robustez:

A robustez refere-se à habilidade de um método analítico de permanecer eficaz e consistente, mesmo quando ocorrem pequenas variações intencionais nos parâmetros.

Em métodos como HPLC, estes parâmetros podem incluir:

- Velocidade de fluxo da fase móvel;
- Temperatura da Coluna;
- Temperatura da amostra;
- pH da fase móvel;
- Composição da fase móvel

A robustez é essencial para que o método garanta resultados precisos e confiáveis, mesmo quando há variações normais nas condições operacionais. (Gurram et al., 2017)

➤ Exatidão:

Este parâmetro reflete a proximidade entre o valor medido e o valor real. O método é considerado exato caso uma amostra com um valor conhecido é analisada e o resultado obtido é o mesmo que o real. Este parâmetro é frequentemente usado para descrever somente erros sistemáticos, sendo melhor expresso com o desvio em percentagem *bias* do valor de referência. A exatidão deve ter em conta tanto os erros sistemáticos como os aleatórios (*bias*). (Cassiano et al., 2009; Gurram et al., 2017)

$$Exatidão (\%bias) = \left(\frac{x_i - x}{x} \right) \times 100 \quad (9)$$

Onde x_i é o valor de concentração experimental e o x é o valor de concentração nominal de determinação.

3. Materiais e Métodos

Tal como referido no capítulo 2.5.5, o procedimento estabelecido para a deteção e quantificação da acrilamida no café torrado realiza-se através de uma técnica de HPLC-MS/MS ou por GC-MS do derivado mono ou dibromo da acrilamida (European Standard, 2015; Kocadağlı & Gökmen, 2022; Preedy, 2015) O pré-tratamento da amostra, ou seja, o processo de derivatização incluído neste método é de difícil execução e demorado, pelo que se optou por um método sem esta etapa. Com o intuito de seguir um procedimento expedito, para além da etapa de derivatização, numa fase inicial deste trabalho, explorou-se o desenvolvimento de um método que permitisse a utilização de um equipamento mais simples, nomeadamente de HPLC-UV.

Assim, nesta fase, o método desenvolvido fundamentou-se em publicações que descrevem com sucesso a deteção e quantificação da acrilamida por HPLC-UV, em diversos géneros alimentares, como batatas fritas, biscoitos e café (Can & Arli, 2014; Wang et al., 2008, 2013) Os procedimentos reportados têm por base um pré-tratamento da amostra que consiste essencialmente na extração aquosa da acrilamida a partir da amostra em análise seguida de purificação. Apesar de Can & Arli (2014) terem detetado acrilamida em café torrado por HPLC-UV, não foi possível reproduzir estes resultados, devido à complexidade da matriz das amostras de café. Por estes motivos, e com base em estudos realizados por HPLC-MS (Pugajeva et al., 2015; Şenyuva & Gökmen, 2005), na segunda fase deste trabalho, foi desenvolvido um procedimento com base na norma EN 16618, que descreve uma análise por HPLC-ESI-MS (Norma Europeia - EN 16618, 2015). Em todos os procedimentos desenvolvidos a acrilamida foi separada numa coluna cromatográfica de fase reversa e detetada a vários comprimentos de onda, nomeadamente a 200, 210 e 225 nm.

3.1. Amostras

O café objeto deste estudo consistiu numa amostra comercial de café da Gorongosa torrado e moído (Figura 3.1 A), constituída na sua totalidade pela espécie *Coffea arabica* L. (café Arábica). Na fase final deste trabalho analisou-se ainda uma amostra comercial de café da Gorongosa torrado fornecida mais recentemente.

Paralelamente, foram realizados ensaios com café comercial instantâneo da DELTA Cafés (Figura 3.1 B), e de café proveniente de cápsulas da Nespresso® Kazaar (Figura 3.1 C), sendo este último constituído por uma mistura de café Arábica e Robusta (espécie *Coffea canephora*), de composição percentual desconhecida, mas segundo indicação do comerciante, composto maioritariamente por café Arábica.



Figura 3.1: Amostras de café analisadas. (A) amostra comercial de café da Gorongosa torrado e moído; (B) amostra de café comercial instantâneo da DELTA Cafés; (C) amostra de café proveniente de cápsulas da Nespresso® Kazaar.

3.2. Reagentes e Materiais

Os solventes de grau HPLC utilizados foram: Hexano e Acetonitrilo da Honeywell, Ácido Fórmico e Ácido Acético glacial da Carlo Erba, Metanol da Thermo Fischer Scientific.

A Acrilamida da VWR e a Acrilamida deuterada, o Sulfato de zinco, o Ferrocianato de Potássio e o Acetato de zinco da Merck. Os restantes reagentes foram fornecidos pela Sigma e pela Merck, tendo sido selecionados em qualidade e pureza de acordo com a sua aplicabilidade. Estes produtos foram usados diretamente como recebidos, sem tratamento prévio.

A água ultrapura utilizada foi purificada através de um sistema Direct-Q®5UV da Merck. As colunas de extração em fase sólida (SPE) Oasis HLB (30 mg, 1 mL), Oasis HLB (200 mg, 6 mL) foram adquiridas à Waters e as colunas Bond Ellut Accucat (200 mg, 3 mL) à Agilent Technologies.

Os filtros de seringa (0,45 µm de nylon) utilizados foram os da MILLEX® - HN.

As colunas de fase reversa C18 usadas foram a Alltima (5 µm; 4,6 x 250 mm) da Gace Alltech e a Inertsil ODS-3V (5 µm; 4,6 x 150 mm) da GL Sciences.

3.3. Desenvolvimento do Método Analítico

No desenvolvimento das metodologias analíticas, para a quantificação da acrilamida em amostras de café torrado, foram realizadas diversas experiências até se definirem os procedimentos de preparação das amostras e os procedimentos analíticos, que permitiram melhorar a detecção deste composto. Para tal, efetuaram-se diversos estudos, com diferentes solventes, colunas, temperaturas, fases móveis e caudais, que serão descritos neste subcapítulo.

Os estudos iniciais foram desenvolvidos por HPLC-UV - Waters 22695 com detetor PDA (*Photo Diode Array*, Waters Alliance 2998) e posteriormente por HPLC-MS (HPLC acoplado a um espectrómetro de massa Waters ACQUITY QDa), equipado com sonda ESI e um analisador quadrupolo simples, utilizando o software Waters Empower™ 3 para tratamentos dos resultados.

3.3.1. Preparação das Amostras

O processo de determinação da acrilamida nas amostras analisadas envolveu várias etapas fundamentais, nomeadamente, extração sólido-líquido, extração líquido-líquido, purificação/concentração e por fim a sua quantificação através de cromatografia líquida analítica.

Desta forma, foram testados diversos procedimentos para a extração da acrilamida, que se descrevem nesta seção.

Os métodos 1 e 2 foram somente aplicados ao café da Gorongosa inicialmente fornecido. O método 4, sendo o que apresentou melhores resultados de extração, foi aplicado às restantes amostras de café disponíveis.

3.3.1.1. Extração da Acrilamida

A. Método 1

Inicialmente, introduziu-se 1 g de café da Gorongosa em dois tubos de centrífuga de 50 mL, adicionando-se 10 mL e 9 mL de água ultrapura, respetivamente.

No tubo com menor volume de água, adicionou-se 1 mL da solução-padrão de acrilamida de 1000 µg/L (previamente preparada) para estudos de recuperação.

A extração teve início colocando os tubos num agitador com agitação orbital (Gallenkamp) a 150 rpm à temperatura ambiente, durante 30 min. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de uma solução *Carrez I* (hexacianoferrato (II) de potássio tri-hidratado 0,68 M) e 1 mL de uma solução *Carrez II* (sulfato de zinco hepta-hidratado 2 M), e após

centrifugação (Hermle Z383 K) a 8000 rpm durante 20 min a 5 °C, foi possível visualizar a precipitação de proteínas e lípidos presentes nos extratos (figura 3.2). O sobrenadante foi recolhido e transferido para outro tubo de centrífuga e seco sob uma corrente de azoto (figura 3.3) durante aproximadamente 3 h à temperatura de 40 °C.



Figura 3.2: Extratos obtidos após adição das soluções Carrez I e II e posterior centrifugação.



Figura 3.3: Secagem dos extratos com corrente de azoto.

De seguida, o resíduo foi redissolvido em 1 mL de água ultrapura com auxílio de um agitador vortex (Ika – Vortex 2). O extrato aquoso foi filtrado com um filtro de seringa de nylon (0,45 µm, MILLEX® - HN) para posterior análise por HPLC-UV. (Wang *et al.*, 2008, 2013)

B. Método 2

Com o intuito de concentrar o extrato a analisar, neste método fez-se uma alteração da razão amostra:solvente, reduzindo em 50 % o volume de extração, ou seja, a 1 g de café adicionou-se 5 mL de água ultrapura e para os estudos de recuperação adicionaram-se a 1 g de café, 4 mL de água e 1 mL de solução-padrão de acrilamida de 1000 µg/L. O restante procedimento foi o descrito anteriormente (Método 1).

Após a metodologia descrita, optou-se por introduzir uma etapa de extração em fase sólida (SPE). Em ensaios iniciais foi empregue uma coluna de SPE de poliamida e posteriormente, utilizaram-se colunas Oasis HLB (30 mg, 1 mL) e Bond Elut Accucat (200 mg, 3 mL). O condicionamento das colunas de SPE foi realizado com 3,5 mL de metanol seguido de 3,5 mL de água. Fez-se passar o extrato pela Oasis HLB e posteriormente pela Bond Elut Accucat, com o auxílio de uma bomba peristáltica (Gilson – Miniplus), figura 3.4, desprezando sempre as primeiras 10 gotas de forma a excluir qualquer vestígio do solvente de condicionamento. Todos os extratos foram recolhidos e armazenados a 4 °C. (Şenyuva & Gökmen, 2005; Wang *et al.*, 2008, 2013)

Posteriormente, o enchimento da Oasis HLB foi aumentado para 200 mg, 6 mL e os volumes totais dos solventes de condicionamento passaram a ser 7 mL.



Figura 3.4: Extração em fase sólida (SPE) com auxílio de uma bomba peristáltica.

C. Método 3

Paralelamente, realizou-se um método de extração semelhante ao descrito para o Método 1, utilizando metanol como solvente em substituição da água. (Şenyuva & Gökmen, 2005) No entanto, na etapa final não se realizou a secagem do extrato com

azoto e efetuou-se uma segunda etapa de extração através das colunas de SPE Oasis HLB e Bond Elut Accucat, conforme descrito no Método 2.

Neste método, de forma a obter-se um volume mais elevado de extrato final, aumentou-se a massa de amostra de café a analisar, mantendo a razão massa:solvente.

Somente no Ensaio 3_HPLC-PDA foi realizado a extração com metanol e não se secou a amostra. Nos restantes ensaios onde se seguiu este método, a extração ocorreu com água e a secagem com azoto foi também realizada.

D. Método 4

Este método teve por base o procedimento de extração descrito nas normas ISO 18862:2016 (E) e EN 16618:2015 (E), onde se utiliza *n*-hexano como solvente na fase inicial de extração, com o intuito de remover grande parte da matéria orgânica presente na matriz do café, tendo sido aplicado à amostra do café da Gorongosa, ao café instantâneo da DELTA e ao café de cápsulas Nespresso.

As extrações foram realizadas a partir de 2 g de café torrado da Gorongosa, com 2 mL de *n*-hexano juntamente com 20 mL de água ultrapura, com o intuito de remover compostos orgânicos insolúveis em água, com agitação vigorosa manual. Posteriormente, centrifugou-se (Hermle Z383K) a 8000 rpm durante 25 minutos a 4°C. Deste modo, foi possível identificar 3 fases (figura 4.1), tendo sido a fase intermédia (fase aquosa) recolhida (10 mL) e transferida para novos tubos de centrifuga, após nova centrifugação durante 15 min sob as mesmas condições.

Ao sobrenadante recolhido, adicionou-se 1 mL das soluções Carrez I e II, e centrifugou-se de novo, durante 10 min a 4000 rpm e 4 °C. Após recolha do sobrenadante, lavou-se o resíduo com 2 mL de água ultrapura e repetiu-se o último passo para posterior purificação por SPE, tal como descrito no Método 2.

O extrato recolhido foi filtrado num filtro de seringa de nylon (0,45 µm, MILLEX® - HN) e foi transferido para um balão volumétrico de 20 mL, perfazendo-se o volume com água ultrapura.

Para efeitos de estudo de recuperação, as extrações foram realizadas em paralelo com a adição de 100 µL de uma solução padrão interno de 10 µg/mL de acrilamida aquando da adição do *n*-hexano (o extrato final obtido pode ser observado na figura 4.2 A).

Para a extração da acrilamida a partir do café instantâneo da DELTA, todo o procedimento foi realizado de igual forma (o extrato final obtido para esta amostra pode ser observado na figura 4.2 B).

A extração da acrilamida do café de cápsula Nespresso®, inclui uma etapa inicial realizada numa máquina de café (*Nespresso KRUPS*), com água ultrapura, até se obter um volume final de 18 mL. Não foi necessária qualquer adição de volume extra de água, pois a percolação do café foi realizada com água quente. O restante procedimento foi idêntico ao anteriormente aplicado às amostras de café da Gorongosa e café instantâneo da DELTA (o extrato final obtido é visível na figura 4.2 C).

3.3.2. Análise da Acrilamida

Tal como descrito por diversos autores, muitas dificuldades foram encontradas devido à matriz complexa dos extratos de café, cujos interferentes são co-extraídos juntamente com a acrilamida. (Guenther *et al.*, 2007) Por este motivo, foi necessário ultrapassar múltiplos desafios e várias alterações, quer na extração, de forma a obter um extrato mais livre de interferentes, quer nas condições de eluição impostas no HPLC e nos parâmetros do MS, que foram estudadas e otimizadas para a obtenção de melhores resultados.

O desenvolvimento do método de análise começou pela tentativa de deteção da acrilamida através de um sistema de HPLC-UV, pelo que a parte inicial deste subcapítulo do desenvolvimento do método analítico incide exatamente neste assunto. De referir, que face às dificuldades encontradas, foi necessário o recurso posterior ao acoplamento de um espectrómetro de massa.

3.3.2.1. Identificação do Comprimento de Onda para a Deteção da Acrilamida

Uma vez que o método de deteção inicial selecionado foi o HPLC-UV, de forma a identificar o comprimento de onda de absorção máxima da acrilamida 500 µg/mL foi obtido um espectro de varrimento na gama de 200 a 600 nm (Espectrofotómetro UV-VIS VWR, UV-3100PC).

3.3.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC-PDA)

Como já indicado anteriormente, os estudos iniciais foram desenvolvidos num sistema cromatográfico de alta resolução da marca Waters 22695, equipado com bomba quaternária, forno de coluna, injetor automático e detetor PDA (*Photodiode Array Detector*, Waters Alliance 2998). O software de aquisição e tratamento dos dados foi o software Empower™ 3.

Os estudos de otimização do procedimento analítico serão descritos neste capítulo, e resultaram no estabelecimento das condições cromatográficas para a análise das soluções padrão e das amostras. Nesta fase do trabalho, foram realizados somente

ensaios com a amostra do café da Gorongosa inicialmente fornecida, que sofreu uma série de extrações (Métodos 1,2,3 e 4). Para o efeito, foram efetuados diversos ensaios cromatográficos, onde foram testadas 8 condições, descritas seguidamente.

Todas as fases móveis utilizadas no sistema de HPLC foram previamente desgaseificadas durante pelo menos 1 h. As soluções padrão e os extratos foram analisados em duplicado.

- **Ensaio 1_HPLC-PDA:**

As condições cromatográficas testadas por HPLC-PDA no primeiro ensaio estão indicadas na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Condições cromatográficas de análise de acrilamida por HPLC-PDA no Ensaio 1.

Parâmetros do Método Analítico	Condições do sistema		
Coluna (fase reversa)	Inertsil ODS-3V (5 µm; 4,6 x 150 mm)		
Fases Móveis (gradiente)	A: acetonitrilo: água (1:24) B: acetonitrilo		
Gradiente	Tempo (min)	A % (V/V)	B % (V/V)
	0	100	0
	10	100	0
	12	20	80
	17	20	80
	40	100	0
Fluxo	0,4 mL/min		
Volume de injeção	10 µL		
Deteção (comprimento de onda)	200, 210 e 250 nm		
Temperatura do forno da coluna	25 °C		
Temperatura das amostras	5 °C		
Tempo de corrida	40 min		

A amostra analisada através deste procedimento HPLC-PDA_Ensaio 1, foi extraída através do método de extração 1.

- **Ensaio 2_HPLC-PDA:**

Com base nos métodos descritos por Wang *et al.*, (2008, 2013) foram alteradas determinadas condições utilizadas no Ensaio 1, nomeadamente a coluna, o caudal e o sistema de eluição (tabela 3.2). A alteração da coluna teve por base o aumento de comprimento, mantendo-se a utilização de uma coluna de fase reversa C18, permitindo

aumentar o tempo de contacto dos interferentes com a fase estacionária e promovendo a eluição mais eficiente da acrilamida. O aumento do caudal e a mudança para uma eluição isocrática efetuou-se somente para rentabilizar o tempo de corrida e de aquisição dos resultados.

A amostra analisada neste ensaio cromatográfico foi obtida tendo em conta o método de extração 2, utilizando uma coluna SPE de poliamida.

Tabela 3.2: Condições cromatográficas de análise de acrilamida por HPLC-PDA no Ensaio 2.

Parâmetros do Método Analítico	Condições do sistema
Coluna (fase reversa)	Alltima C18 (5 µm; 4,6 x 250 mm)
Fase Móvel (isocrático)	acetoneitrilo: água (1:24)
Fluxo	0,4 mL/min
Volume de injeção	10 µL
Deteção (comprimento de onda)	200, 210 e 250 nm
Temperatura do forno da coluna	25 °C
Temperatura das amostras	5 °C
Tempo de corrida	10 e 20 min

- **Ensaio 3_HPLC-PDA:**

O ensaio 3 foi desenvolvido sob as mesmas condições do ensaio 2, alterando somente o tempo de corrida para 10 min. Esta diminuição teve por objetivo a obtenção mais rápida de resultados, tendo em conta que a acrilamida, sob estas condições, é eluída perto dos 8,5 min.

Através deste ensaio foram analisadas as amostras obtidas pelo método de extração 2, utilizando uma combinação das SPE Oasis HLB (30 mg, 1 mL) e Bond Elut Accucat (200 mg, 3 mL). De forma a verificar o melhor solvente de extração para análise através deste ensaio 3, foi ainda avaliado o extrato obtido através do método de extração 3. Este ensaio cromatográfico permitiu também obter informação sobre o volume final de extrato necessário.

- **Ensaio 4_HPLC-PDA:**

O presente ensaio teve como objetivo verificar a influência de alguns parâmetros de manutenção preventiva do sistema de HPLC, nomeadamente o tempo de estabilização,

limpeza e calibração do detetor, bem como o tempo de corrida cromatográfica, na detecção da acrilamida.

A estabilização é essencial para uma boa resposta do sistema, permitindo a garantia da reprodutibilidade, precisão e confiabilidade dos resultados experimentais, e tornando-se assim uma etapa obrigatória antes de qualquer utilização. Os restantes parâmetros de manutenção devem ser controlados ocasionalmente. As condições utilizadas neste ensaio para os referidos parâmetros estão descritas na tabela 3.3.

As condições operacionais aqui aplicadas foram as apresentadas no ensaio 3, aumentando-se apenas o tempo de corrida para 30 min. As amostras analisadas foram obtidas através do método de extração 3.

Tabela 3.3: Parâmetros de manutenção preventiva do sistema de HPLC aplicados no Ensaio 4.

Parâmetros de manutenção preventiva	
Estabilização	1h com solvente de trabalho
Limpeza	Metanol, 1 mL/min, 1:30h
Fluxo e pressão	<i>Adjust Seals</i>
Detetor	Calibração Érbio

- **Ensaio 5_HPLC-PDA:**

Uma vez que nos ensaios anteriores se verificou a eluição de alguns compostos nas fases finais das corridas cromatográficas foi testada outra condição de eluição em gradiente, bem como o caudal a ser utilizado.

Neste ensaio, realizou-se um gradiente onde se diminuiu a progressão de acetonitrilo puro para 50 %, comparativamente ao gradiente realizado no ensaio 1, lo que levou a um aumento do tempo de corrida. As condições utilizadas neste ensaio estão descritas na tabela 3.4 e as amostras analisadas foram obtidas através do método de extração 3.

Tabela 3.4: Condições cromatográficas de análise de acrilamida por HPLC-PDA no Ensaio 5

Parâmetros do Método Analítico	Condições do sistema		
Coluna (fase reversa)	Alltima C18 (5 µm; 4,6 x 250 mm)		
Fases Móveis (gradiente)	A: acetonitrilo: água (1:24) B: acetonitrilo		
Gradiente	Tempo (min)	A % (V/V)	B % (V/V)
	0	100	0
	15	100	0
	20	50	50
	27	50	50
	32	100	0
	55	100	0
Fluxo	0,5 mL/min		
Volume de injeção	10 µL		
Deteção (comprimento de onda)	200, 210 e 250 nm		
Temperatura do forno da coluna	25 °C		
Temperatura das amostras	5 °C		
Tempo de corrida	55 min		

- **Ensaio 6_HPLC-PDA:**

Com o objetivo de promover uma melhor separação da acrilamida dos interferentes, neste ensaio cromatográfico, acidificou-se a fase móvel (10 % acetonitrilo em 90 % água) com ácido fórmico. (Wang *et al.*, 2013) Assim, este ensaio teve por base o ensaio 5, estando as condições descritas na tabela 3.5. A amostra foi extraída através do método de extração 3.

Tabela 3.5: Condições cromatográficas de análise de acrilamida por HPLC-PDA no Ensaio 6

Parâmetros do Método Analítico	Condições do sistema		
Coluna (fase reversa)	Alltima C18 (5 µm; 4,6 x 250 mm)		
Fases Móveis (gradiente)	A: 10% (V/V) acetonitrilo em 90% (V/V) água contendo 0,10% (V/V) ácido fórmico B: acetonitrilo		
Gradiente	Tempo (min)	A % (V/V)	B % (V/V)
	0	100	0
	15	100	0
	20	50	50
	27	50	50
	32	100	0
55	100	0	
Fluxo	0,5 mL/min		
Volume de injeção	10 µL		
Deteção (comprimento de onda)	200, 210 e 250 nm		
Temperatura do forno da coluna	25 °C		
Temperatura das amostras	5 °C		
Tempo de corrida	55 min		

- **Ensaio 7_HPLC-PDA:**

Através do ensaio cromatográfico anterior, verificou-se que a fase móvel acidificada proporcionou melhoria nos resultados, pelo que neste ensaio foram testados para a mesma fase móvel diferentes temperaturas (25 °C e 30 °C), gradiente, e consequentemente tempos da corrida cromatográfica (Tabela 3.6). A amostra analisada neste ensaio cromatográfico foi extraída através do método 3.

Tabela 3.6: Condições cromatográficas de análise de acrilamida por HPLC-PDA no Ensaio 7.

Parâmetros do Método Analítico	Condições do sistema		
Coluna (fase reversa)	Alltima C18 (5 µm; 4,6 x 250 mm)		
Fases Móveis (gradiente)	A: 10% (V/V) acetonitrilo em 90% (V/V) água contendo 0,10% (V/V) ácido fórmico B: acetonitrilo		
Gradiente	Tempo (min)	A % (V/V)	B % (V/V)
	0	100	0
	15	100	0
	17	20	80
	22	20	80
	24	100	0
40	100	0	
Fluxo	0,5 mL/min		
Volume de injeção	20 µL		
Deteção (comprimento de onda)	200, 210 e 250 nm		
Temperatura do forno da coluna	25 °C e 30 °C		
Temperatura das amostras	5 °C		
Tempo de corrida	40 min		

- **Ensaio 8_HPLC-PDA:**

Neste ensaio cromatográfico, à semelhança do ensaio 7 e com base no ensaio 6, utilizou-se uma fase móvel acidificada variando-se o caudal (0,4 mL/min) e o gradiente (Tabela 3.7).

Tabela 3.7: Condições cromatográficas de análise de acrilamida por HPLC-PDA no Ensaio 8

Parâmetros do Método Analítico	Condições do sistema		
Coluna (fase reversa)	Alltima C18 (5 µm; 4,6 x 250 mm)		
Fases Móveis (gradiente)	A: 10% (V/V) acetonitrilo em 90% (V/V) água contendo 0,10% (V/V) ácido fórmico B: acetonitrilo		
Gradiente	Tempo (min)	A % (V/V)	B % (V/V)
	0	100	0
	15	100	0
	20	50	50
	27	50	50
	55	100	0
Fluxo	0,4 mL/min		
Volume de injeção	20 µL		
Deteção (comprimento de onda)	200, 210 e 250 nm		
Temperatura do forno da coluna	25 °C		
Temperatura das amostras	5 °C		
Tempo de corrida	53 min		

3.3.2.3. Identificação e Quantificação da Acrilamida por HPLC-PDA

A identificação da acrilamida na amostra de café foi realizada por comparação com os tempos de retenção obtidos em idênticas condições experimentais para as soluções padrão. Para a quantificação recorreu-se a uma curva de calibração que expressa a relação entre a concentração das soluções padrão e as áreas dos respetivos picos no cromatograma.

A curva de calibração e a quantificação da acrilamida foram realizadas utilizando as condições cromatográficas do HPLC-PDA_Ensaio 5, descritas na tabela 3.4.

A partir de uma solução mãe de acrilamida (1mg/mL) foram preparadas em água ultrapura oito soluções padrão, com concentrações finais de: 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 e 2000 µg/L, para a construção da curva de calibração.

3.3.2.4. Cromatografia Líquida de Alta Resolução Acoplada a Espectrometria de Massa (HPLC-MS)

Como referido anteriormente, e devido à dificuldade de deteção de acrilamida nas amostras de café por HPLC-PDA, essencialmente atribuídas à matriz complexa dos extratos das amostras de café, houve necessidade de utilizar um sistema de HPLC-ESI-MS, de forma a tentar contornar os obstáculos mencionados.

Para o efeito, e à semelhança do desenvolvido para HPLC-PDA, foram definidos e testados diversos parâmetros operacionais do espectrómetro de massa, nomeadamente modo de ionização, temperatura de vaporização e voltagem do cone, e como consequência, houve necessidade de ajustar de novo alguns parâmetros no sistema do HPLC.

Nos ensaios de HPLC-ESI-MS, foi mantida uma voltagem capilar de 1,5 kV (o máximo que o equipamento utilizado permite), usando azoto como gás de nebulização, dessolvatação e de cone. Os resultados incidiram na deteção dos iões precursores e iões produto (m/z) da acrilamida por monitorização seletiva de ião (SIR) e *full scan* (TIC) da amostra.

Os ensaios de HPLC-ESI-MS realizados estão descritos de seguida.

- **Ensaio 1_HPLC-ESI-MS:**

Numa primeira abordagem, foram testados alguns parâmetros operacionais no espectrómetro de massa, nomeadamente a temperatura de vaporização, a voltagem do cone e consequentemente o caudal da fase móvel (tabela 3.8).

Tabela 3.8: Otimização de parâmetros do espectrómetro de massa

Parâmetros do Método Analítico	Condições do sistema
Modo de ionização	Positivo ou Negativo
Temperatura de vaporização	600, 400 e 300 °C
Caudal	0,5 e 0,2 mL/min
Tensão de cone	15 e 18 V
Ião precursor (m/z)	72
Ião produto (m/z)	55

Devido às propriedades da acrilamida, a temperatura de vaporização teve de ser diminuída para 300 °C, e de forma a não comprometer a sua ionização, aumentou-se o tempo de contacto com capilar de *electrospray*, diminuindo o caudal de funcionamento para 0,2 mL/min. Esta diminuição no caudal, levou ao acerto das condições de eluição em gradiente no HPLC adaptadas a partir das descritas por Wang *et al.* (2013), tal como indicado na tabela 3.9.

Estas condições foram aplicadas ao extrato obtido pelo método de extração 3.

Tabela 3.9: Condições cromatográficas de análise de acrilamida por HPLC-ESI-MS no Ensaio 1

Parâmetros do Método Analítico	Condições do sistema		
HPLC			
Coluna (fase reversa)	Alltima C18 (5 µm; 4,6 x 250 mm)		
Fases Móveis (gradiente)	A: 10% (V/V) acetonitrilo em 90% (V/V) água contendo 0,10% (V/V) ácido fórmico B: acetonitrilo		
Gradiente	Tempo (min)	A % (V/V)	B % (V/V)
	0	100	0
	30	100	0
	34	20	80
	44	20	80
	80	100	0
Fluxo	0,2 mL/min		
Volume de injeção	10 µL		
Deteção (comprimento de onda)	200, 210 e 250 nm		
Temperatura do forno da coluna	25 °C		
Temperatura das amostras	5 °C		
MS			
Temperatura de vaporização	300 °C		
Tensão de cone	18 V		
Modo de ionização	Positivo		

- **Ensaio 2_HPLC-ESI-MS:**

As condições operacionais no ensaio 2 foram iguais às descritas no ensaio 1, mas aplicadas a extrato obtido pelo método de extração 4.

- **Ensaio 3_HPLC-ESI-MS:**

Este ensaio teve por base as condições anteriormente descritas (Tabela 3.9), variando-se a concentração de acetonitrilo (5%, 10% e 20% (V/V)) da fase móvel, uma vez que a retenção dos compostos na coluna é afetada pela polaridade desta fase. Foram ainda testados outros parâmetros, nomeadamente a tensão de cone (18 e 20 V) e a temperatura de vaporização (300 e 350 °C), como indicado na tabela 3.10. Os extratos analisados foram de novo, os obtidos através do método de extração 4.

Tabela 3.10: Otimização de parâmetros do sistema HPLC-ESI-MS no ensaio 3

Parâmetros do Método Analítico	Condições do sistema
Fase móvel A (% acetonitrilo)	5, 10 e 20 %
Temperatura de vaporização	300 e 350 °C
Tensão de cone	18 e 20 V

- **Ensaio 4_HPLC-ESI-MS:**

Com base nos resultados obtidos no ensaio 3, este ensaio focou-se na composição da fase móvel, removendo o acetonitrilo e conseqüentemente com alteração da eluição para um sistema isocrático (tabela 3.11). Os extratos analisados foram mais uma vez, os obtidos através do método de extração 4.

Tabela 3.11: Condições cromatográficas na análise de acrilamida por HPLC-ESI-MS – Ensaio 4

Parâmetros do Método Analítico	Condições do sistema
HPLC	
Coluna (fase reversa)	Alltima C18 (5 µm; 4,6 x 250 mm)
Fase Móvel (Isocrático)	0,01 mM ácido acético em uma solução aquosa de 0,2% (V/V) de ácido fórmico
Fluxo	0,2 mL/min
Volume de injeção	10 µL
Deteção (comprimento de onda)	200, 210 e 250 nm
Temperatura do forno da coluna	25 °C
Temperatura das amostras	5 °C
Tempo de corrida	80 min
MS	
Temperatura de vaporização	300 °C
Tensão de cone	18 V
Modo de ionização	Positivo

Adicionalmente ainda se optou por adicionar à posteriori acrilamida deuterada para efeitos de qualidade e recuperação.

- **Ensaio 5_HPLC-ESI-MS:**

No Ensaio 5 de análise por HPLC-ESI-MS foram mantidas as condições do ensaio 4 (tabela 3.11), variando-se apenas a fase móvel para 0,01 mM de ácido acético numa solução aquosa de 0,1 % (V/V) de ácido fórmico.

- **Ensaio 6_HPLC-ESI-MS:**

No ensaio 6, foi aumentado o caudal para 0,4 mL/min tendo em conta as restantes condições indicadas no ensaio 4 (Tabela 3.11).

A partir dos resultados obtidos nos ensaios anteriores foi testada outra coluna de fase reversa Alltima C18 (5 µm; 4,6 x 250 mm) da Grace, de forma a verificar o bom funcionamento da mesma.

- **Ensaio 7_HPLC-ESI-MS:**

Neste ensaio comparativamente ao ensaio 4 (tabela 3.11), variou-se a composição da fase móvel e o caudal, conforme descrito na tabela seguinte.

Tabela 3.12: Composição das diferentes fases móveis e respetivos caudais de funcionamento para análise da acrilamida por HPLC-MS no Ensaio-7

Fase móvel	Fluxo (mL/min)
10% acetonitrilo (v/v) com 90% (v/v) de água contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico	0,2
0,1% (v/v) solução aquosa de ácido fórmico e metanol (97:3)	0,4
0,1% (v/v) ácido acético	0,2 e 0,3
0,05% (v/v) ácido acético	0,2 e 0,3

3.3.3.5. Identificação e Quantificação da Acrilamida por HPLC-MS

A identificação da acrilamida nas amostras de café foi realizada por comparação com os tempos de retenção obtidos em condições idênticas das soluções padrão. A quantificação não foi possível, porém uma curva de calibração foi construída para o caso de ser necessário. A curva de calibração expressa a relação entre a concentração das soluções padrão e as áreas dos respetivos picos no cromatograma.

A curva de calibração da acrilamida foi construída utilizando as últimas condições do HPLC-MS _Ensaio 7, descritas na tabela 3.12, ou seja, eluição em modo isocrático com

uma fase móvel de 0,05 % (v/v) de ácido acético em água, com um caudal de 0,3 mL/min e um volume de injeção de 20 µL. A temperatura da coluna Alltima C18 da Grace (5 µm, 250 mm x 4,6 mm), predefiniu-se para 30 °C.

Para o efeito, preparou-se uma solução mãe de acrilamida deuterada (1 mg/mL) que originou a solução de padrão interno 1 (10 µg/mL). A cada uma das soluções da curva de calibração adicionou-se 400 ng/mL da solução de padrão interno 1.

Para preparar as soluções da curva de calibração realizaram-se diluições sucessivas com água ultrapura de uma solução mãe de acrilamida (1 mg/mL) de modo a obter as seguintes concentrações finais: 0, 5, 10, 20, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 5000 e 10000 ng/mL.

4. Resultados e Discussão

4.1. Extração

A análise visual dos extratos obtidos pelos diferentes métodos descritos em 3.3.1.1 revelou uma diferença nítida no aspeto do extrato recuperado com *n*-hexano de acordo com o método 4, face aos restantes.

Após centrifugação, foi possível visualizar três fases bem distintas (figura 4.1), sendo a fase intermédia a de interesse (fase aquosa).

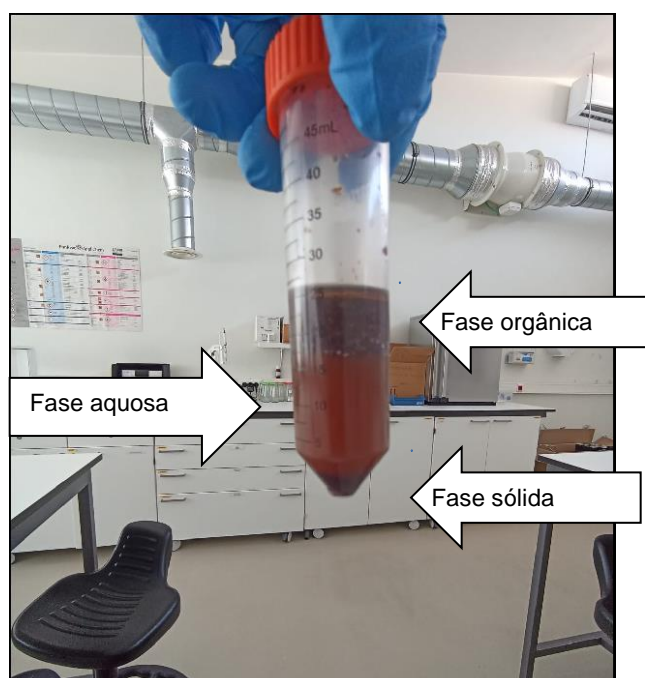


Figura 4.1: Processo inicial de extração da acrilamida, verificando-se três fases: fase orgânica (fase superior), fase aquosa (fase intermédia, contendo acrilamida) e fase sólida (fase inferior).

Posteriormente, o extrato final obtido a partir das SPE foi o que apresentou menor coloração em relação aos obtidos pelos outros métodos, apesar de se notar diferenças

entre os extratos das três amostras, da Gorongosa, da Delta e da Nespresso® (Figura 4.2).

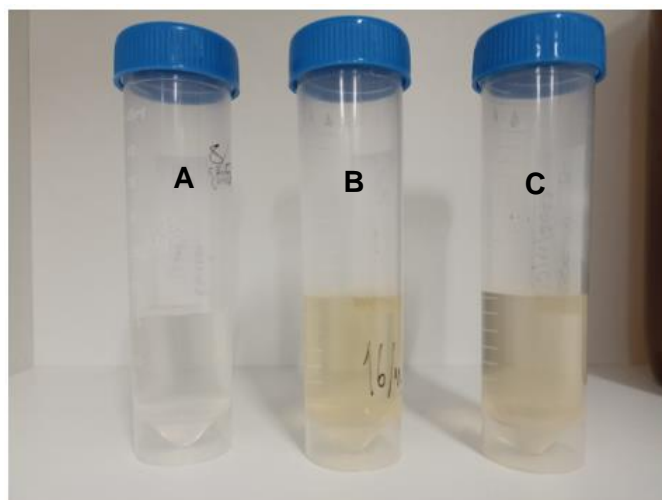


Figura 4.2: Extratos aquosos purificados e diluídos, obtidos a partir das amostras: (A) Gorongosa, (B) DELTA e (C) Nespresso®.

4.2. Seleção do Comprimento de Onda para a Detecção da Acrilamida

Os resultados mostram que quanto menor o comprimento de onda, melhor a detecção da acrilamida, verificando-se a 200 nm, absorvâncias mais elevadas (figura 4.3). Porém, como uma grande variedade de compostos absorve a este comprimento de onda, de forma a não comprometer os resultados, selecionou-se 210 nm para análise da acrilamida.

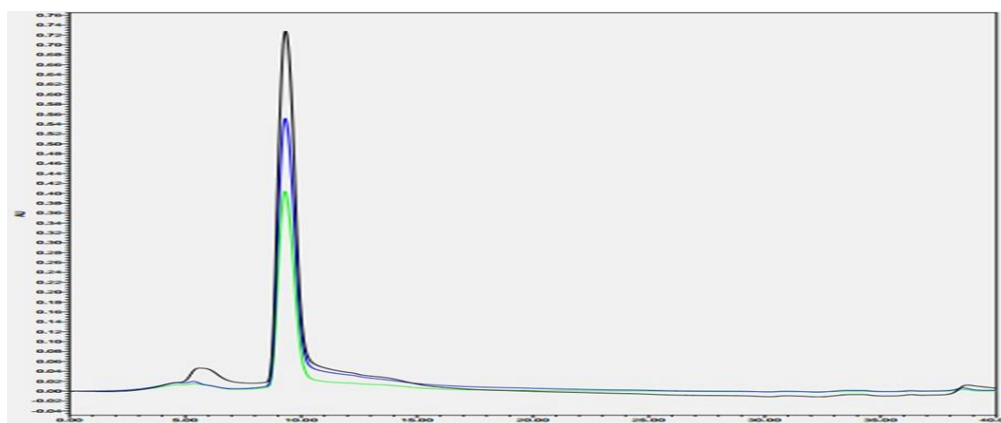


Figura 4.3: Cromatogramas obtidos para uma solução de acrilamida de 500 µg/L a 200 nm (preto), 210 nm (azul) e 225 nm (verde).

4.3. Otimização das Condições de HPLC-PDA

- **Ensaio 1_HPLC-PDA:**

Apesar dos extratos obtidos pelo método 1 mostrarem uma coloração forte (figura 3.2), realizou-se uma injeção de um desses extratos, nas condições apresentadas na Tabela 3.1, com o intuito de verificar o perfil do cromatograma resultante.

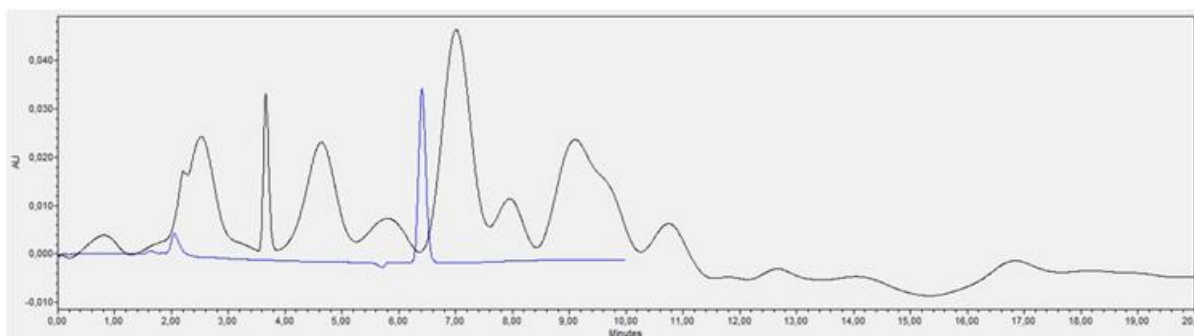


Figura 4.4: Cromatogramas do extrato sem adição padrão do café da Gorongosa (preto) e do padrão de acrilamida 1000 µg/L (azul).

Da análise da figura 4.4, é possível constatar que para o extrato, o pico da acrilamida não foi detetado, e que nas condições cromatográficas impostas, a acrilamida é eluída em modo isocrático, uma vez que o gradiente só se inicia aos 12 min. Face a estes resultados, seguiu-se a implementação do ensaio 2.

- **Ensaio 2_HPLC-PDA:**

Estes ensaios permitiram verificar que a adição de uma etapa de extração em fase sólida para amostras como o café torrado é essencial para assegurar a remoção de grande parte dos interferentes. Quando se usou previamente uma SPE de poliamida, nota-se nitidamente no cromatograma a redução do número de picos, face aos visualizados nos cromatogramas do ensaio anterior. Para se verificar o pico da acrilamida, injetaram-se no sistema os padrões 100, 500 e 2000 µg/L, para além do extrato do café da Gorongosa.

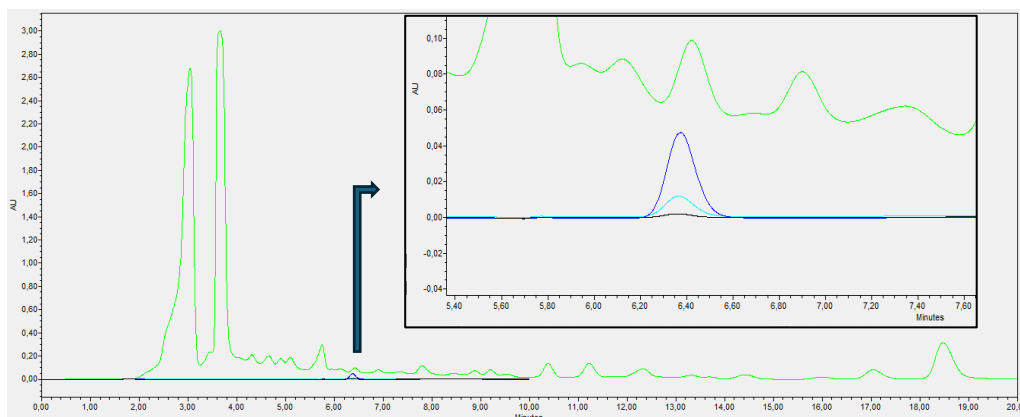


Figura 4.5: Cromatogramas do extrato da amostra de café da Gorongosa (verde) e de três soluções padrão de acrilamida: 100 (preto), 500 (azul-claro) e 2000 (azul-escuro) µg/L.

Os incrementos na altura e na área do pico da acrilamida com o aumento da concentração dos padrões, permitem a confirmação do seu tempo de retenção de 6,36 min, e, portanto, a sua identificação, comprovando uma boa resposta do sistema (figura 4.5). Contudo, a qualidade obtida para a linha de base no cromatograma da amostra não permite garantir resultados analíticos precisos.

- **Ensaio 3_HPLC-PDA:**

Apesar da acrilamida apresentar maior solubilidade em água do que noutros solventes, como extrações com metanol reportadas mostraram bons rendimentos (Şenyuva & Gökmen, 2005), optou-se pela sua utilização nos procedimentos descritos no método 3 (*vide* 3.3.1.1).

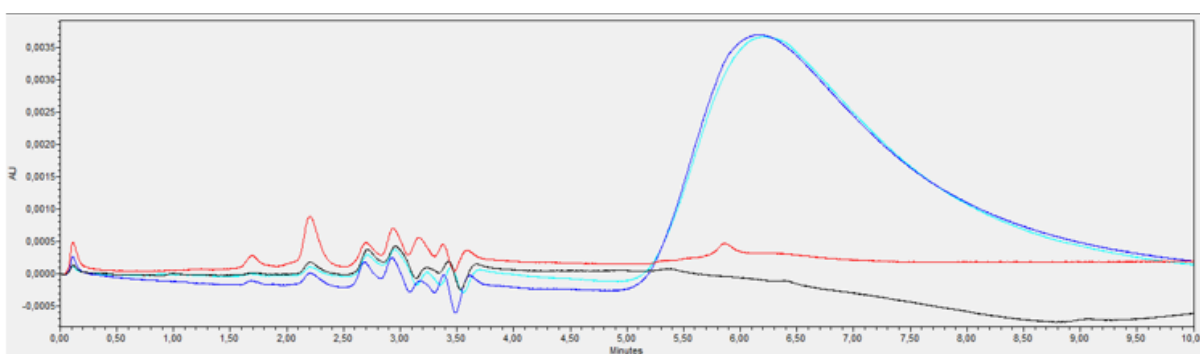


Figura 4.6: Cromatogramas dos extratos do café da Gorongosa obtidos com água (vermelho) e metanol (preto); e com adição de 100 µL de padrão de 2000 µg/L de acrilamida aos extratos depois da extração, em água (azul escuro) e em metanol (azul claro).

O extrato obtido com metanol e após purificação com as soluções *Carrez* I e II mostrou-se mais claro, porém depois de ser eluído das colunas SPE (Oasis HLB e Bond Elut

Accucat) apresentou turvação, o que se pode dever ao facto da amostra não ter sido seca com azoto. Apesar da amostra extraída com metanol não ter sido sujeita a secagem, o que compromete a comparação com o ensaio da amostra aquosa, deu-se continuidade às extrações com água, devido à elevada solubilidade da acrilamida neste solvente e por a fase móvel ser de base aquosa.

Tendo em vista a eliminação de interferentes, seleccionou-se posteriormente uma combinação de duas colunas SPE, uma Oasis HLB e outra Bond Elut-Accucat, para o tratamento da amostra antes da sua análise por HPLC-DAD (Wang et al., 2013). No entanto, o perfil atípico do cromatograma resultante, impossibilitou qualquer conclusão sobre o efeito da alteração realizada.

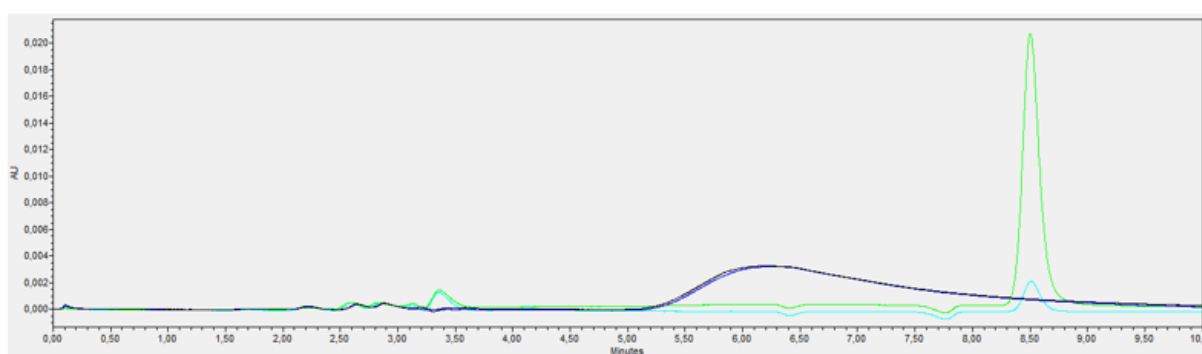


Figura 4.7: Cromatogramas do extrato aquoso da Gorongosa com adição de padrão de acrilamida 2000 µg/L (azul) e sem adição (preto) após extração em fase sólida (resinas Oasis HLB e Bond Elut-Accucat). Cromatogramas das soluções padrão de 100 µg/L (azul claro) e 1000 µg/L (verde).

Perante a suspeita que o comportamento inesperado verificado na figura 4.7 poderia estar relacionado com o volume reduzido obtido de extrato final e conseqüentemente aplicado no *vial* para injeção de 10 µL de amostra no sistema HPLC, foram realizadas injeções a partir de *vials* com volumes maiores de amostra (0,5 mL), tendo-se comprovado que efetivamente, volumes muito pequenos no *vial* afetam a eficácia da injeção e naturalmente os cromatogramas obtidos. Perante esta evidência, foram realizadas injeções a partir de um volume de 1 mL no *vial*.

Deste modo, numa nova extração (sem metanol), duplicou-se a massa inicial de café, adequando os volumes de solvente e restantes soluções no procedimento de extração. Os cromatogramas resultantes da análise da amostra de café da Gorongosa e desta amostra com adição de 100 µL de padrão 2000 µg/L, apesar de revelarem um perfil idêntico (figura 4.8), apresentaram linhas de base irregulares e díspares, impossibilitando a visualização do efeito da adição de padrão à amostra.

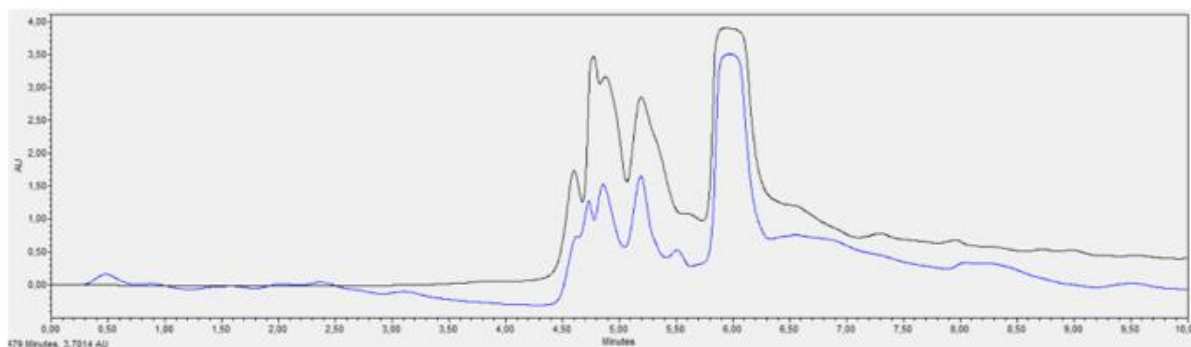


Figura 4.8: Cromatogramas do extrato do café da Gorongosa com e sem adição de padrão de acrilamida 2000 µg/L antes da extração (azul e preto, respetivamente).

- **Ensaio 4_HPLC-PDA:**

Após injeção do padrão de 1000 µg/L, verificou-se um cromatograma a decrescer para valores negativos, sugerindo que apesar dos solventes utilizados serem de grau HPLC, a estabilização do sistema não estava a ser feita devidamente, pelo que se executou posteriormente o procedimento de manutenção preventiva descrito na tabela 3.3.

Adicionalmente, face à possibilidade de o tempo de corrida para análise das amostras de 10 min ser curto e não permitir a eluição da coluna de todos os compostos presentes no extrato, comprometendo as injeções seguintes, estabeleceram-se as condições do ensaio 3 e aumentou-se o tempo de corrida para 30 min.

Nestas condições, injetaram-se o padrão de 100 µg/L, o extrato do café da Gorongosa, o mesmo extrato com adição de 1 mL padrão 1000 µg/L antes da extração e esse extrato com adição de 20 µL da solução mãe (1 mg/mL) após extração.

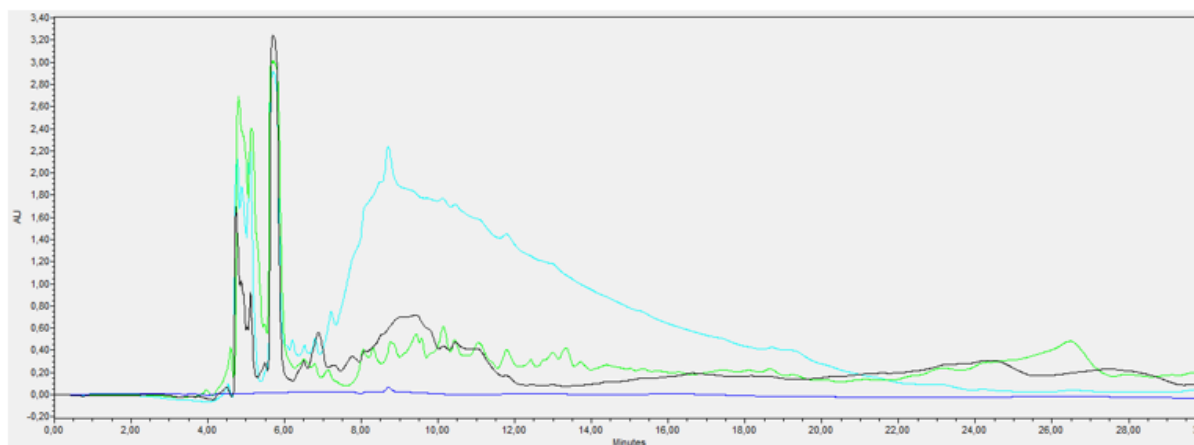


Figura 4.9: Cromatogramas do extrato do café da Gorongosa obtido com 20 mL de água: sem adição de padrão de acrilamida (verde), com adição de padrão 1000 µg/L antes da extração (preto) e adição de 20 µL da solução mãe (1 mg/mL) depois (azul claro), e do padrão de 100 µg/L (azul escuro).

A adição de uma concentração elevada de acrilamida permitiu verificar efetivamente o pico da acrilamida ($t_r = 8,8$ min), porém, os interferentes não possibilitaram obter um pico isolado e bem definido (figura 4.9). Apesar de comprovar a presença da acrilamida, o cromatograma resultante da análise do extrato com 20 μL da solução mãe apresenta uma resolução entre picos muito baixa.

Na sequência dos perfis cromatográficos obtidos, foi realizada uma limpeza ao sistema com metanol a um fluxo de 1 mL/min durante 1 hora, adicionalmente executou-se um *adjust seals* e uma calibração érbio do detetor, de forma a garantir a operacionalidade do sistema (tabela 3.3).

Este procedimento melhorou bastante os cromatogramas e o efeito da adição do padrão foi observado com sucesso (figura 4.10).

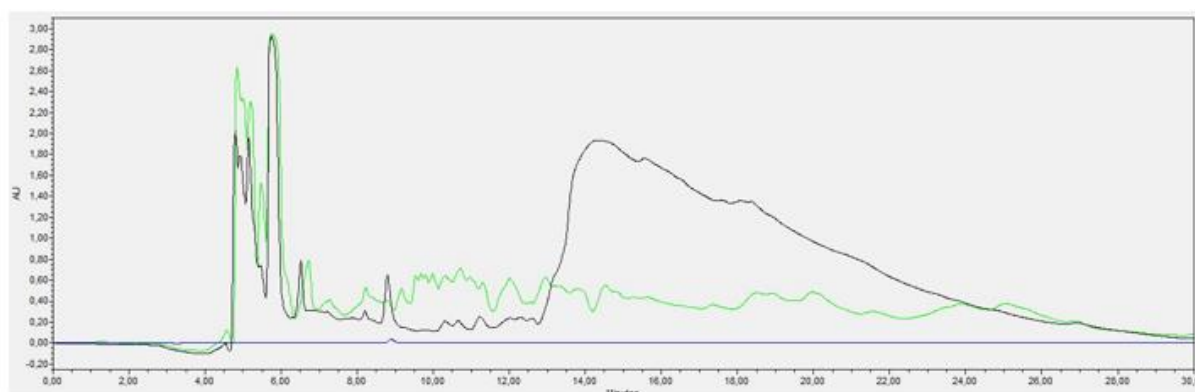


Figura 4.10: Efeito da adição de padrão de acrilamida (2000 $\mu\text{g/L}$, $t_r = 8.9$ min) ao extrato de café da Gorongosa. Cromatogramas de: extrato com adição de padrão após extração (preto), extrato (verde) e padrão de 100 $\mu\text{g/L}$ (azul).

A estabilização com o solvente de trabalho é de certa forma demorada, mas essencial para que a coluna fique saturada com o solvente, minimizando-se flutuações de pressão. Este procedimento também permite a estabilização da linha de base do detetor e conseqüentemente, a redução do ruído e melhoria da precisão na detecção. (Neue, 2002)

A estabilização é assim crucial para uma boa resposta do sistema, pelo que é uma etapa obrigatória antes de qualquer utilização. As restantes ações foram realizadas ocasionalmente e a limpeza do sistema foi necessária após várias injeções, tendo em conta o extrato complexo do café.

- **Ensaio 5_HPLC-PDA:**

Na possibilidade de interferentes não estarem a ser eluídos na fase final da corrida cromatográfica, alterou-se a polaridade da fase móvel ao longo do ensaio, com adição

de acetonitrilo puro ao sistema, tornando-a menos polar e conseqüentemente permitir a eluição de compostos que fiquem mais tempo retidos na fase reversa da coluna. Deste modo, com o intuito de prevenir contaminações dos ensaios seguintes implementou-se novamente uma eluição em gradiente.

De forma a ultrapassar os problemas identificados nas análises realizadas e desenvolver a melhor estratégia de otimização das condições cromatográficas, foram efetuadas injeções dos padrões de acrilamida 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g/L}$ nestas condições (tabela 3.4), alterando somente o tempo de corrida para 60 min. Nos cromatogramas obtidos, verificou-se uma diminuição da linha de base para valores negativos e uma ausência no incremento da área de pico da acrilamida com o aumento da concentração do padrão.

Tal incoerência nos resultados levou à mudança do equipamento HPLC, pois todo o procedimento de estabilização e funcionalidade do equipamento estava a ser realizado com o maior rigor.

Esta mudança levou a aplicação de todas as precauções da tabela 3.3.

Para verificar o desempenho do sistema, analisaram-se soluções padrão de 500 e 1000 $\mu\text{g/L}$ com eluição em modo isocrático da fase móvel A (acetonitrilo: água, 1:24) e durante 10 min (figuras 4.11 e 4.12).

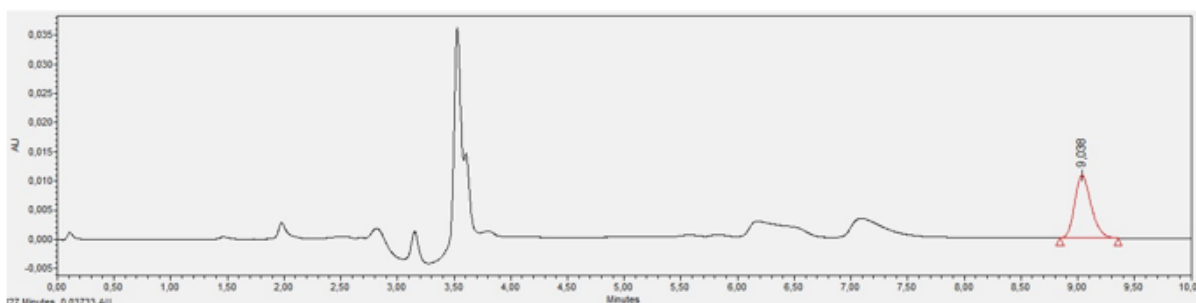


Figura 4.11: Cromatograma do padrão de acrilamida 500 $\mu\text{g/L}$ ($t_r = 9,038$ min, $A = 107587$ $\mu\text{V s}$) obtido em condições isocráticas.

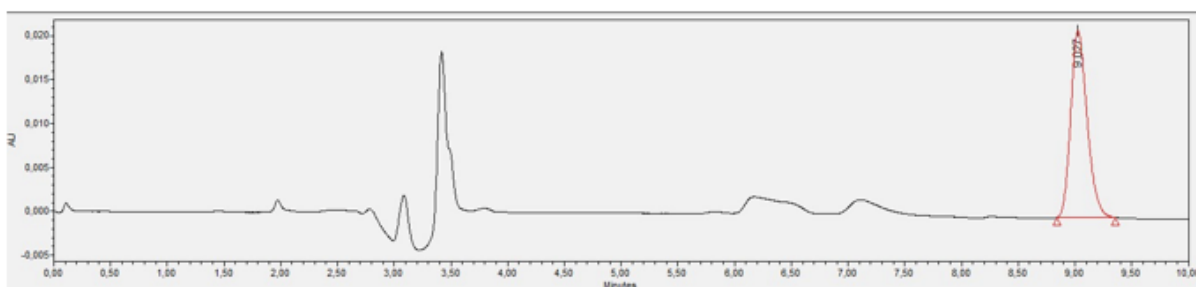


Figura 4.12: Cromatograma do padrão de acrilamida 1000 $\mu\text{g/L}$ ($t_r = 9,027$ min, $A = 213303$ $\mu\text{V s}$) obtido em condições isocráticas.

Os cromatogramas obtidos revelaram-se semelhantes, com a acrilamida a ser eluída próximo dos 9 min. A área do pico do padrão de 1000 $\mu\text{g/L}$ também mostrou ser sensivelmente o dobro da do pico detetado para o padrão de 500 $\mu\text{g/L}$, como expectável. Deste modo, testaram-se novamente as condições de eluição em gradiente (tabela 3.4). As figuras 4.13 e 4.14 mostram que a eluição em gradiente está a comprometer os resultados, mas tendo em conta a quantidade de interferentes que o extrato do café ainda apresenta, insistiu-se na eluição em gradiente de forma a descartar a possibilidade de estar a ocorrer contaminações entre injeções.

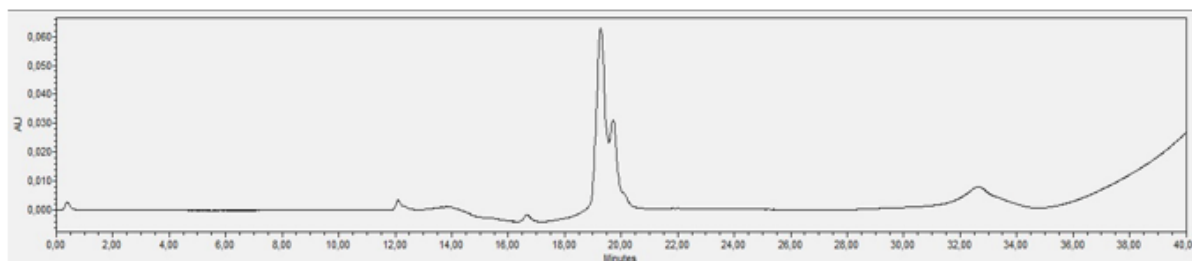


Figura 4.13: Cromatograma do padrão de acrilamida 500 $\mu\text{g/L}$ obtido em condições de gradiente (tabela 3.4).

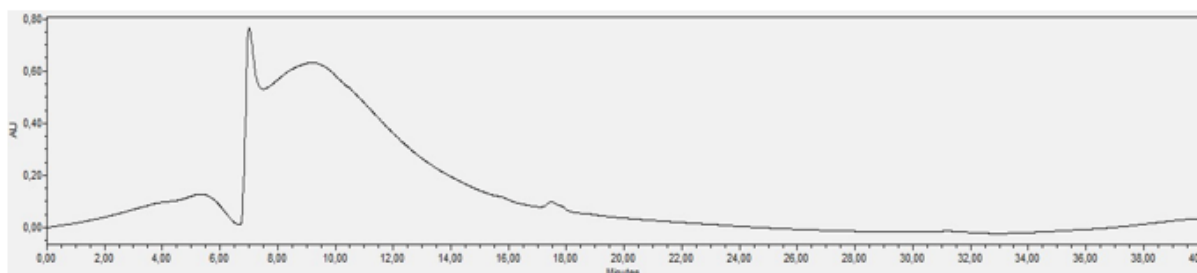


Figura 4.14: Cromatograma do padrão de acrilamida 1000 $\mu\text{g/L}$ obtido em condições de gradiente (tabela 3.4).

O efeito do caudal também foi analisado e injeções com um caudal de 0,5 mL/min, e consequente ajuste nas condições cromatográficas do gradiente, foram avaliadas. Em simultâneo, no gradiente imposto a progressão do acetonitrilo para 80% (tabela 3.1) fez-se diminuir para 50 % (tabela 3.2.), pois a variação inicial poderia estar a ser demasiado abrupta, podendo conduzir a flutuações na pressão do sistema, afetar demasiado a polaridade da fase móvel e comprometer a separação dos compostos.

Após nova limpeza do sistema, injetaram-se os padrões de acrilamida (500 $\mu\text{g/L}$ e 1000 $\mu\text{g/L}$) e o extrato de café da Gorongosa com e sem adição de padrão (1000 $\mu\text{g/L}$) antes da extração.

Obtidos os cromatogramas com triplicados muito idênticos, os dos padrões mostraram que a acrilamida é eluída exatamente aos 8,6 min (figura 4.15). O padrão de 500 $\mu\text{g/L}$

apresentou uma área de pico de 55032 $\mu\text{V s}$ e o padrão de 1000 $\mu\text{g/L}$ uma área de 114577 $\mu\text{V s}$.

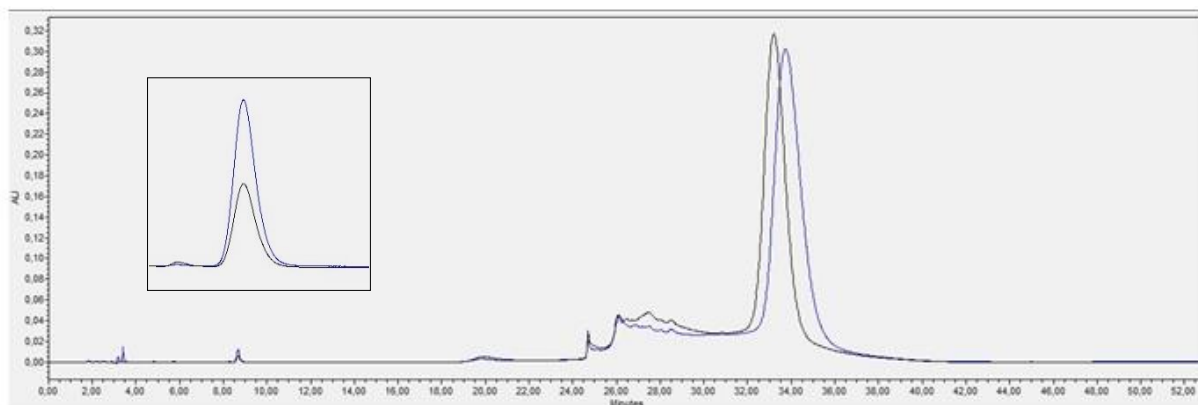


Figura 4.15: Cromatogramas dos padrões de acrilamida de 500 e 1000 $\mu\text{g/L}$ ($t_r = 8,6$ min) obtidos em condições de gradiente (tabela 3.4).

Relativamente ao cromatograma da amostra de café (figura 4.16), um pico no mesmo tempo de retenção é detetado, porém com desvio da linha de base, e com perfil diferente, apesar de parecido com o obtido para a amostra a que se adicionou padrão antes da extração. A adição de padrão de acrilamida à amostra permitiu a visualização de um pico melhor definido, com o mesmo tempo de retenção e menor área.

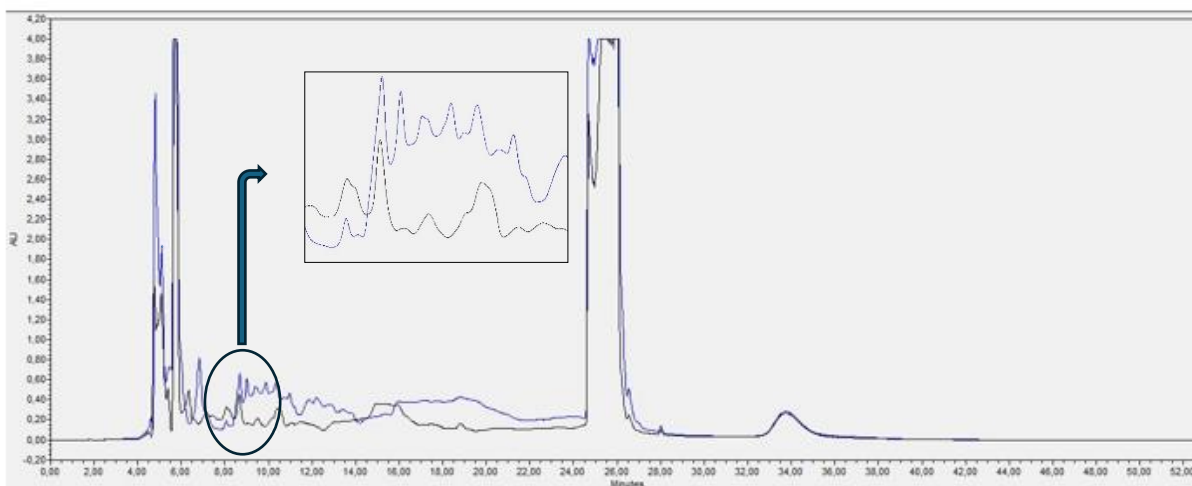


Figura 4.16: Cromatogramas dos extratos de café da Gorongosa com adição do padrão de 1000 $\mu\text{g/L}$ (preto) e sem (azul), obtidos em condições de gradiente (tabela 3.4).

No extrato do café sem adição de padrão, obteve-se para a acrilamida um tempo de retenção de 8,683 min e uma área de pico de 4499470 $\mu\text{V s}$, enquanto no extrato com

adição de padrão, a acrilamida foi eluída aos 8,654 min, com uma área de 2693636 $\mu\text{V s}$. As áreas de pico determinadas podem não estar diretamente relacionadas com a concentração da acrilamida, pois tal como é possível observar nos cromatogramas da figura 4.16, o pico do composto em análise não sai livre de interferentes, influenciando a sua quantificação.

Face a estes resultados, uma nova extração foi realizada com o objetivo de fazer mais ensaios e investigar a resposta do sistema. Os procedimentos de extração (método 3) e de análise (tabela 3.4.) foram mantidos nos ensaios com o padrão de 1000 $\mu\text{g/L}$ e com os extratos (figura 4.17).

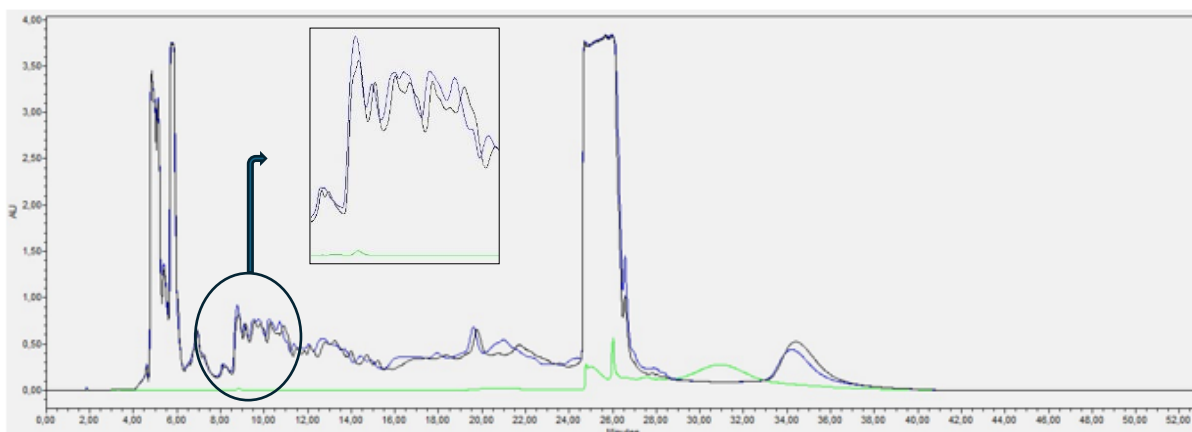


Figura 4.17: Cromatogramas do padrão de acrilamida 1000 $\mu\text{g/L}$ (verde) ($t_r = 8,824$ min) e dos extratos de café da Gorongosa com adição de padrão de 1000 $\mu\text{g/L}$ (azul) e sem (preto).

Um ligeiro desvio no tempo de retenção da acrilamida para 8,824 min foi verificado e analisando os cromatogramas dos extratos de café, que desta vez se revelaram idênticos, notou-se um aumento na altura do pico, com esse mesmo tempo de retenção, para o extrato onde se adicionou acrilamida antes da extração. Finalmente, o incremento do pico da acrilamida foi detetado, porém nestas condições, a acrilamida não foi eluída eficientemente e a inconsistência nos resultados alcançados até esta fase do trabalho não possibilitam qualquer conclusão sobre a presença e quantidade deste composto no café da Gorongosa.

- **Ensaio 6_HPLC-PDA:**

Este ensaio incidiu na alteração da composição da fase móvel, acidificando-a. Esta estratégia foi seguida devido à estabilidade da acrilamida nestas condições (Roach et al., 2003) e com a expectativa de outros compostos presentes no extrato de café diferirem no seu comportamento, podendo-se assim melhorar a resolução da

separação cromatográfica e conseqüentemente, viabilizando a quantificação do analito nos extratos.

Desta forma, foram analisados: a solução padrão de acrilamida de 1000 µg/L, o extrato do café da Gorongosa com e sem adição de padrão (1000 µg/L) antes da extração e por último, uma mistura de igual volume de extrato e padrão de 1000 µg/L (figuras 4.18 e 4.19).

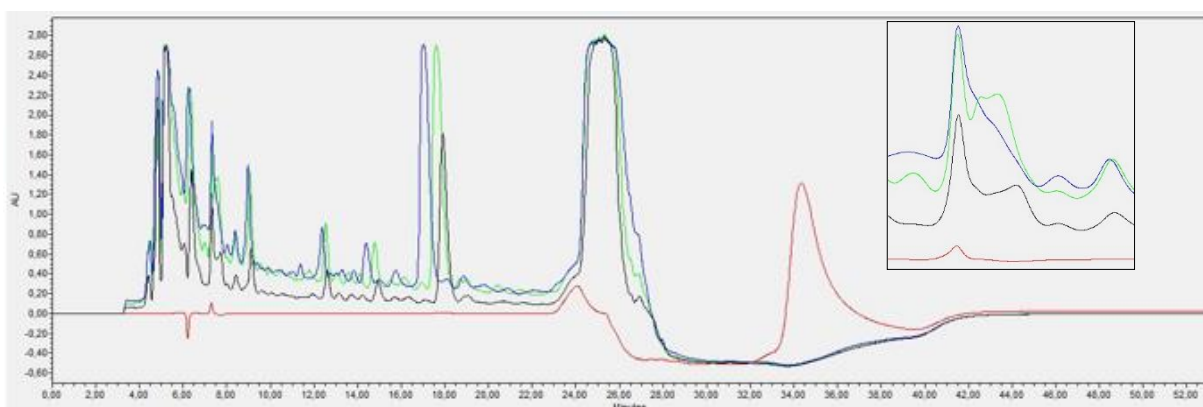


Figura 4.18: Cromatogramas do padrão de acrilamida 1000 µg/L (vermelho, $t_r = 7,306$ min), do extrato do café da Gorongosa sem adição de padrão (azul) e com adição de padrão antes da extração (verde), e do extrato com adição de padrão somente no final da extração (preto).

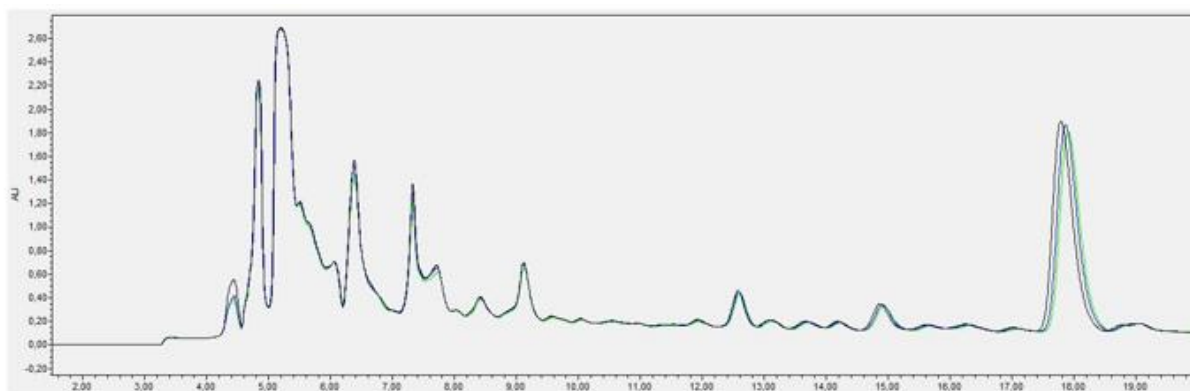


Figura 4.19: Cromatogramas da amostra de café da Gorongosa com adição de padrão 1000 µg/L depois da extração num volume igual ao volume de amostra.

Uma melhoria significativa foi verificada com a acidificação da fase móvel, que apesar de ainda não ter permitido a eluição da acrilamida livre de interferentes do extrato, resultou num aumento da resolução do seu pico com boa reprodutibilidade entre replicados (figura 4.19). De referir também, o incremento dos picos nos cromatogramas, que é corroborado com as áreas dos picos determinadas (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Áreas dos picos e respetivos tempos de retenção da amostra de extrato de café da Gorongosa com adição de padrão (1000 µg/L) antes e depois da extração.

Extrato	Área do pico (µV s)	Tempo de retenção (min)
Gorongosa	4486124	7,313
Gorongosa + Padrão (antes da extração)	4928453	7,311
Gorongosa + Padrão (após a extração)	5379199	7,318

A acidificação da fase móvel proporcionou efetivamente uma melhoria na separação dos componentes do café e com o intuito de se definir as condições mais adequadas, variou-se o gradiente do sistema eluente, e posteriormente a temperatura da coluna, tal como se pode verificar pelo ensaio 7.

- **Ensaio 7_HPLC-PDA:**

Estes ensaios foram realizados com caudais de 0,4 e 0,5 mL/min, tendo sido testadas para o caudal de 0,4 mL/min, temperaturas de coluna de 25 e 30 °C.

Nestas condições, injetaram-se o padrão de acrilamida (1000 µg/L), o extrato de café (Gorongosa), o extrato de café com adição de padrão antes da extração (Gorongosa + Padrão) e por último, uma mistura de igual volume de extrato e padrão de 1000 µg/L (Gorongosa + Padrão final).

Da análise das figuras 4.20 a 4.23, é possível verificar que o aumento da temperatura não promove a separação cromatográfica da acrilamida, enquanto a diminuição do caudal favorece.

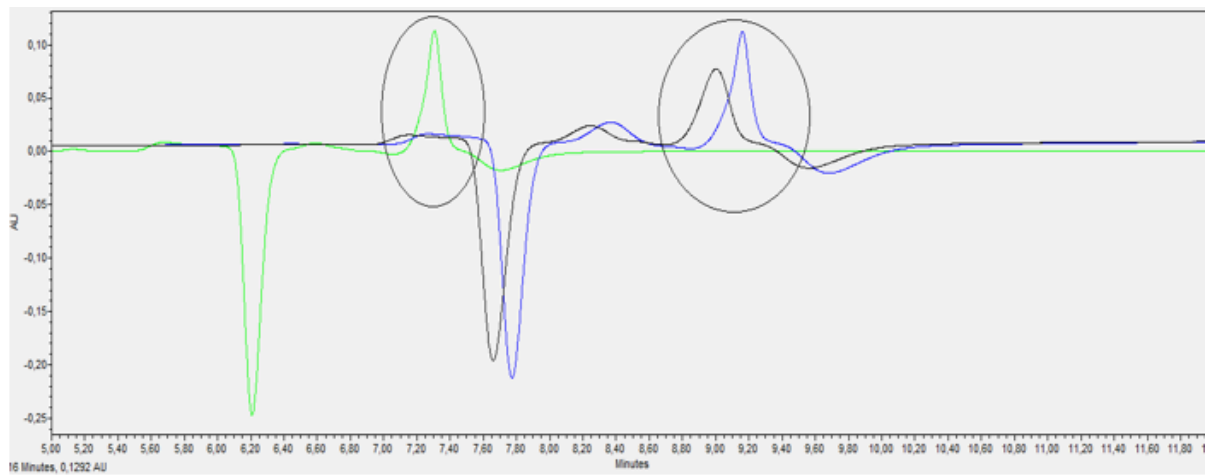


Figura 4.20: Cromatogramas do padrão de acrilamida 1000 µg/L obtidos nas seguintes condições: caudal de 0,5 mL/min a 25°C (verde); caudal de 0,4 mL/min a 30 °C (preto); caudal de 0,4 mL/min a 25 °C (azul).

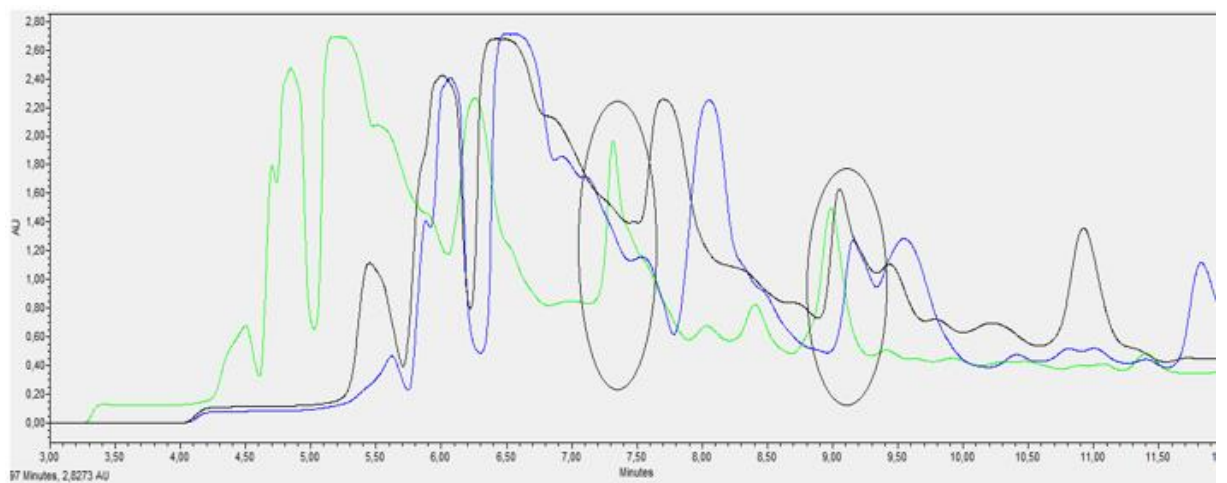


Figura 4.21: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa obtidos nas seguintes condições: caudal de 0,5 mL/min a 25°C (verde); caudal de 0,4 mL/min a 30°C (preto); caudal de 0,4 mL/min a 25 °C (azul).

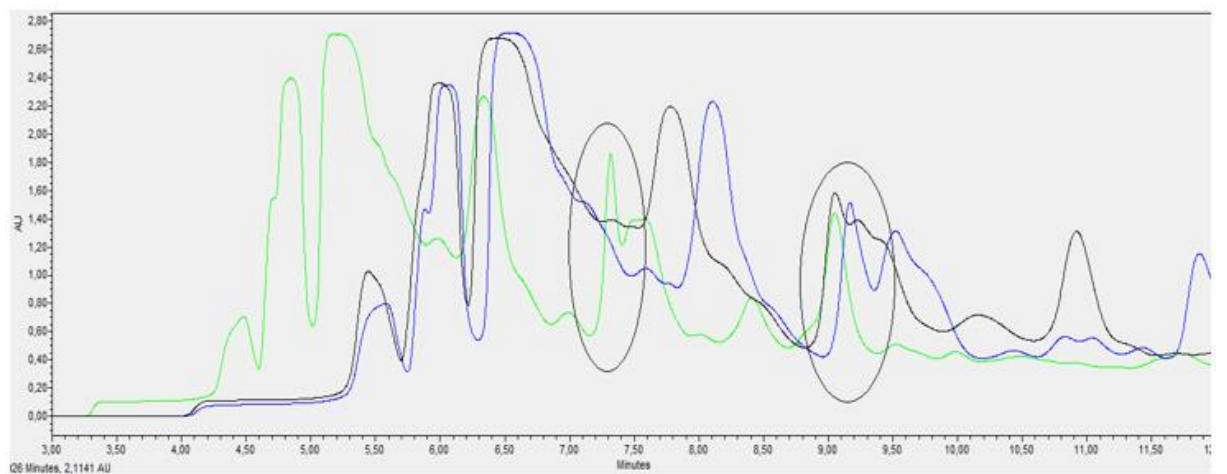


Figura 4.22: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa com adição de padrão de acrilamida 1000 µg/L antes da extração, obtidos nas seguintes condições: caudal de 0,5 mL/min a 25 °C (verde); caudal de 0,4 mL/min a 30 °C (preto); caudal de 0,4 mL/min a 25 °C (azul).

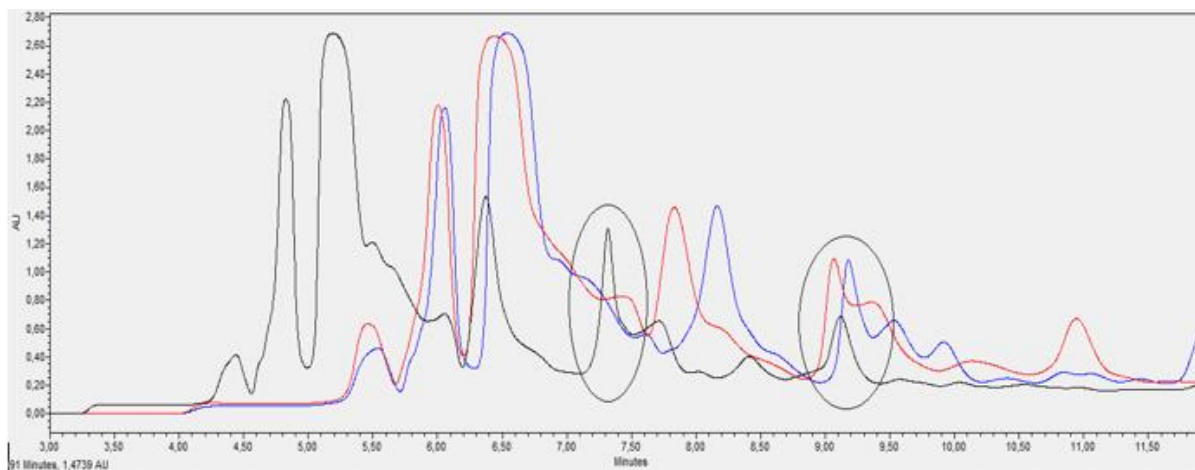


Figura 4.23: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa com adição de padrão de acrilamida 1000 $\mu\text{g/L}$ depois da extração num volume igual ao volume de amostra, obtidos nas seguintes condições: caudal de 0,5 mL/min a 25 °C (verde); caudal de 0,4 mL/min a 30 °C (preto); caudal de 0,4 mL/min a 25 °C (azul).

É de realçar, que foi realizada numa primeira análise, uma estimativa grosseira da massa de acrilamida nas amostras injetadas, tendo em consideração que cada *vial* continha 1mL, o volume injetado no sistema (20 μL), a concentração da solução padrão de acrilamida e as áreas dos picos obtidos para a solução padrão e amostras. Ou seja, conhecendo a concentração do padrão (1000 $\mu\text{g/L}$) e o volume injetado no sistema, para 0,02 μg de acrilamida, irá ter uma área de pico correspondente. Fazendo esta relação de massa injetada – área de pico, obtiveram-se os valores indicados na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Áreas dos picos e respectivas massas de acrilamida por injeção (20 µL) do padrão de acrilamida 1000 µg/L e da amostra de extrato de café da Gorongosa com e sem adição de padrão, obtidas para diferentes caudais e temperaturas de coluna

Caudal 0,5 mL/min a 25°C	Área (µV s)	Massa de acrilamida por injeção (µg)
Padrão 1000 µg/L	762550	0,020
Gorongosa	3596769	0,094
Gorongosa + Padrão	4708385	0,120
Gorongosa + Padrão final	4204689	0,110
Caudal 0,4 mL/min a 25°C	Área (µV s)	Massa de acrilamida por injeção (µg)
Padrão 1000 µg/L	721342	0,020
Gorongosa	5229342	0,145
Gorongosa + Padrão	8073765	0,220
Gorongosa + Padrão final	5848428	0,160
Caudal 0,4 mL/min a 30°C	Área (µV s)	Massa de acrilamida por injeção (µg)
Padrão 1000 µg/L	753083	0,020
Gorongosa	4522770	0,120
Gorongosa + Padrão	4445753	0,118
Gorongosa + Padrão final	4472246	0,119

Comparando as massas de acrilamida obtidas para as amostras “Gorongosa + Padrão” e “Gorongosa + Padrão final”, o expectável seria obter uma área de pico superior para a amostra em que é realizada a adição de padrão após extração, mesmo tendo em conta o fator de diluição de 2 associado à mistura da solução padrão com o extrato final. Quando as condições cromatográficas são alteradas, é natural a observação de alterações nos cromatogramas, porém as áreas dos picos obtidas para as amostras têm uma variação muito significativa. Acresce que esses valores são muito mais elevados do que os determinados para o padrão de acrilamida de 1000 µg/L, que corresponde ao segundo ponto de concentração mais elevada da curva de calibração realizada (figura 5.26). Estes resultados podem dever-se à separação ineficaz de um interferente do extrato de café, que inviabilizou a eluição da acrilamida na forma isolada.

Face ao exposto, a acidificação da fase móvel melhorou a resolução dos picos, apesar de incompleta para o pico da acrilamida.

4.4. Curva de Calibração obtida por HPLC-PDA

Tendo em vista a quantificação da acrilamida nas amostras, foi construída uma curva de calibração (figura 4.24), do tipo $y = mx + b$, com m a representar o declive e b a ordenada na origem, impondo as condições descritas em HPLC-PDA_Ensaio 5 (tabela 3.4).

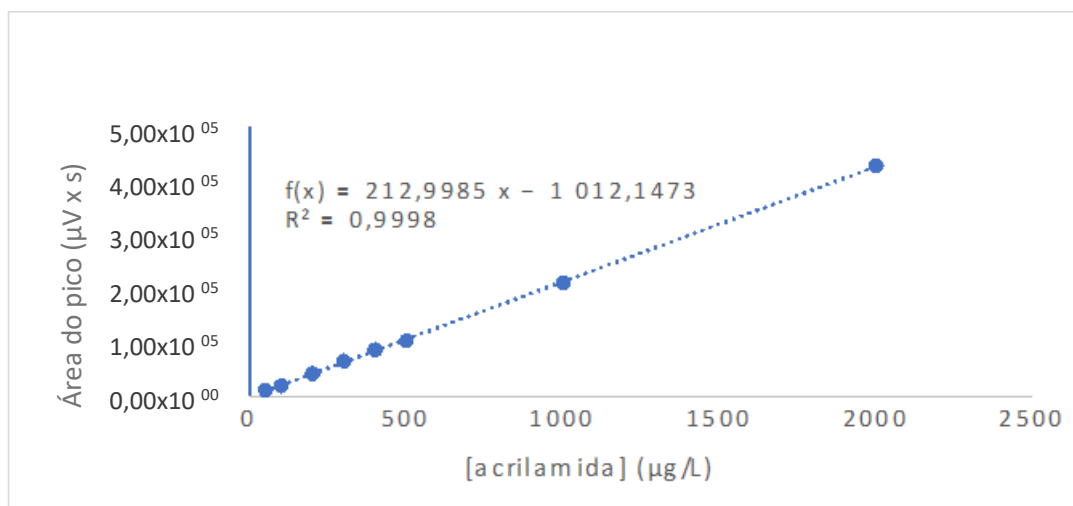


Figura 4.24: Curva de calibração para as várias soluções padrão de acrilamida (50-2000 µg/L), eluição em gradiente e com deteção a 210 nm

Da análise da figura anterior, é possível inferir que o método apresenta uma boa linearidade de resposta, com um R^2 de 0,9998.

A construção da curva de calibração permite determinar os limites analíticos, nomeadamente o LOD, pela equação 4, e o LOQ, através da equação 5. Deste modo, o limite de deteção corresponde a 33,67 µg/L, e o limite de quantificação a 102,04 µg/L.

No entanto, devido às dificuldades encontradas no desenvolvimento de um método de HPLC-UV para deteção e quantificação de acrilamida em amostras de café, optou-se por dar continuidade ao trabalho num sistema de HPLC acoplado a espectrometria de massa.

4.5. Otimização das Condições de HPLC-MS

A deteção da massa da acrilamida é um procedimento mais sensível e seletivo, e o seu acoplamento ao sistema de cromatografia líquida é aconselhado por alguns autores

para deteção e quantificação da acrilamida no café. (Andrzejewski et al., 2004; Kocadağlı & Gökmen, 2022; Li et al., 2023)

Face à inexistência de um sistema de HPLC-MS/MS nos laboratórios do ISEL, os ensaios foram conduzidos num equipamento de HPLC-MS

- **Ensaio 1_HPLC-ESI-MS:**

Este ensaio teve como principal objetivo a seleção e otimização das condições operacionais no espetrómetro de massa.

Devido às propriedades da acrilamida, as análises foram realizadas em modo de ionização positivo, ainda que não tenham sido detetados com sucesso os sinais dos iões com valores m/z de 72 (ião precursor) e 55 (ião produto). Deste modo, foram testadas alterações na voltagem de cone e na temperatura de vaporização.

A acrilamida apresenta uma decomposição térmica relativamente baixa (175-300 °C) (MERCK, 2004) embora esta possa ser superior em algumas partes do sistema que operam em vácuo. De forma a evitar essa decomposição, a temperatura de vaporização inicialmente utilizada de 600 °C foi reduzida para 400 °C. Nestas condições, o ião com razão m/z 72 foi detetado, mas o de 55 não, pelo que se diminuiu a temperatura até 300 °C. Esta redução acentuada, num sistema que trabalha a temperaturas muito mais elevadas, exigiu um decréscimo do caudal, de forma a aumentar o tempo de contacto com o vaporizador. Assim, o caudal foi modificado para 0,2 mL/min (com consequente ajuste do gradiente) e nestas condições foram detetados para o padrão de acrilamida os iões com m/z 72 e 55. Apesar desta alteração ter permitido essa deteção, a intensidade do sinal do ião com m/z 72 foi bastante mais elevada do que a do ião produto, indicando uma ionização incompleta do analito.

A voltagem de cone inicial de 10 V foi aumentada para 15 V, porém, somente com 18 V, foi possível a deteção em modo *full scan* dos iões com valores mais próximos dos m/z pretendidos, apesar do sinal do ião precursor (m/z 72) se mostrar sempre superior ao do ião produto (m/z 55).

No modo *full scan*, todos os iões formados na fonte são captados e detetados, enquanto no modo SIR (monitorização seletiva de ião) apenas os sinais dos iões com valores m/z específicos são analisados, sendo os dos restantes iões excluídos, o que proporciona uma análise mais seletiva e sensível. Assim, devido à sua sensibilidade, o modo SIR foi eleito para quantificar a acrilamida.

Foi selecionado um gradiente com passagem para 80 % de acetonitrilo, tendo em conta que este solvente não influencia o pico da acrilamida e assegura a remoção dos interferentes da coluna cromatográfica. É ainda de realçar que a acidificação da fase móvel é vantajosa no sistema de análise ESI, pois melhora a eficiência de ionização e permite alcançar uma sensibilidade adequada em espectrómetros de massa. (Riediker & Stadler, 2003b)

Deste modo, no sistema HPLC-MS foi realizada uma sequência de 9 injeções, das seguintes soluções:

(a) padrão de acrilamida 1000 µg/L

(b) extrato de café da Gorongosa

(c) extrato de café da Gorongosa com adição antes da extração de padrão de acrilamida 1000 µg/L (G.P.)

e das seguintes misturas:

(d) extrato de café da Gorongosa:água ultrapura (9:1)

(e) extrato de café da Gorongosa:solução padrão de acrilamida 1000 µg/L (9:1)

(f) extrato de café da Gorongosa:solução mãe de acrilamida (1 mg/mL) (9:1)

(g) G.P.:água ultrapura (9:1)

(h) G.P.:solução padrão de acrilamida 1000 µg/L (9:1)

(i) G.P.:solução mãe de acrilamida (1 mg/mL) (9:1)

As injeções foram realizadas em duplicado a partir do mesmo *vial*, contudo nem todos os cromatogramas apresentaram concordância entre duplicados, originando nalguns casos áreas de pico da acrilamida díspares. Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas seguintes.

Tabela 4.3: Resultados de detecção por PDA e QDA no sistema de HPLC-MS para a solução padrão de acrilamida 1000 µg/L e extratos de café da Gorongosa com e sem adição de padrão antes da extração (G.P.).

	PDA		QDA (SIR)	QDA (modo <i>Full scan</i>)			
	t_r (min)	Área (µV x s)	t_r (min)	m/z	Intensidade (u.a)	m/z	Intensidade (u.a)
(a) Padrão 1000 µg/L	18,790	1,42x 10 ⁶	19,3	71,96	3,44 x 10 ⁵	54,84	5,6 x 10 ⁴
	18,665	1,29x 10 ⁶	19,2	71,94	3,915x 10 ⁵	54,80	6,679x 10 ⁴
(b) Gorongosa	18,667	1,65x 10 ⁷	19,1	71,99	6,27x 10 ⁴	54,71	4,814x 10 ³
	18,634	2,62x 10 ⁷	19,1	71,82	4,797x 10 ⁴	54,57	1,488x 10 ⁴
(c) Gorongosa + Padrão (G.P.)	18,607	1,71x 10 ⁷	18,9	71,82	4,82x 10 ⁴	54,61	1,03x 10 ⁴
	18,555	1,34x 10 ⁷	18,8	71,83	6,47x 10 ⁴	54,72	3,936x 10 ³

Tabela 4.4: Resultados de detecção por PDA e QDA no sistema de HPLC-MS para os extratos de café da Gorongosa com e sem adição de padrão ou solução mãe de acrilamida depois da extração.

	PDA		QDA (SIR)	QDA (modo <i>Full scan</i>)			
	t_r (min)	Área (µV x s)	t_r (min)	m/z	Intensidade (u.a)	m/z	Intensidade (u.a)
(d) Gorongosa + água	18,644	2,58x 10 ⁷	19,1	71,93	6,84x 10 ⁴	54,77	9,917x 10 ³
	18,777	2,7x 10 ⁷	19,1	71,87	6,62x 10 ⁴	54,71	8,964x 10 ³
(e)	18,769	2,366x 10 ⁷	19,0	71,84	7,868x 10 ⁴	54,79	8,112x 10 ³

Gorongosa + padrão	18,733	2,788x 10 ⁷	19,0	71,95	8,712x 10 ⁴	54,76	1,7855x 10 ⁴
(f) Gorongosa + solução-mãe	18,711	3,887x 10 ⁷	18,9	71,93	4,39x 10 ⁶	54,86	7,29x 10 ⁵
	18,664	3,543x 10 ⁷	18,9	71,93	4,324x 10 ⁶	54,86	7,058x 10 ⁵

Tabela 4.5: Resultados de detecção por PDA e QDA no sistema de HPLC-MS para os extratos de café da Gorongosa com adição de padrão antes da extração e com e sem adição de padrão ou solução mãe de acrilamida depois da extração.

	PDA		QDA (SIR)	QDA (modo <i>Full scan</i>)			
	t _r (min)	Área (μV x s)	t _r (min)	m/z	Intensidade (u.a)	m/z	Intensidade (u.a)
(g) G.P + água	18,572	1,476x 10 ⁷	18,8	71,89	6,513x 10 ⁴	54,77	3,973x 10 ³
	18,539	1,47x 10 ⁷	18,8	71,93	7,465x 10 ⁴	54,95	1,053x 10 ³
(h) G.P + Padrão	18,512	1,508x 10 ⁷	18,7	71,88	6,335x 10 ⁴	54,83	5,631x 10 ³
	18,507	1,525x 10 ⁷	18,7	72,04	6,56x 10 ⁴	54,69	9,646x 10 ³
(i) G.P + solução-mãe	18,471	2,98x 10 ⁷	18,6	71,95	4,53x 10 ⁶	54,84	8,53x 10 ⁵
	18,441	2,849x 10 ⁷	18,5	71,94	4,77x 10 ⁶	54,87	7,418x 10 ⁵

Quanto aos dados fornecidos por MS, os sinais do ião de m/z 72 foram superiores aos sinais do ião de m/z 55 em todas as amostras. Outro aspeto importante é que, quando se comparam duas amostras diferentes, como por exemplo na tabela 4.3 a 1^a injeção da Gorongosa e da Gorongosa + Padrão, uma tem uma área de pico maior pelo detetor PDA, mas menor pelo QDA. O melhor resultado foi obtido quando se adicionou solução mãe ao *vial*, pois permitiu a obtenção de valores de m/z sempre próximos dos reais, de intensidades e áreas concordantes entre injeções, apresentou cromatogramas do SIR quase sem ruído e permitiu visualizar bem o pico da acrilamida no PDA. De referir que os tempos de retenção apresentados nas tabelas anteriores sugerem uma tendência decrescente com o decorrer das injeções, podendo isto dever-se a alterações na composição da fase móvel que devido ao tempo de utilização começou a sofrer modificação por evaporação. A temperatura também tem uma forte influência no tempo de retenção e quando se realiza muitas corridas contínuas sob as mesmas condições e

não se lava com um solvente orgânico, pode ocorrer deterioração da fase estacionária da coluna. (Neue, 2002)

• Ensaio 2_HPLC-ESI-MS:

Neste ensaio foi analisado o extrato de café da Gorongosa obtido com *n*-hexano, seguindo o procedimento do método 4 (*vide* 3.3.1.1).

O cromatograma desta amostra evidencia uma melhoria nítida comparativamente com o registado após a realização do método de extração 3 (figura 4.25). Porém, é de notar que permanece a co-eluição de um interferente da acrilamida.

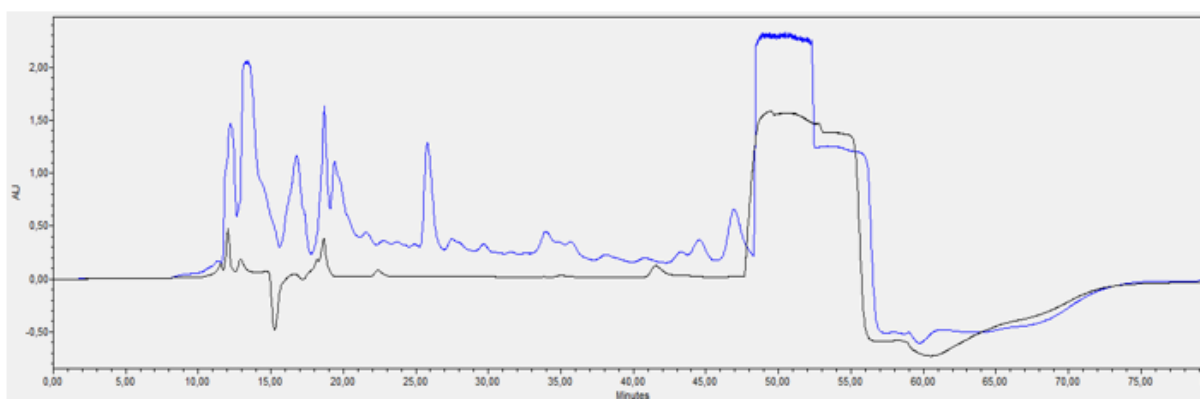


Figura 4.25: Cromatogramas dos extratos de café da Gorongosa obtidos com (preto) e sem *n*-hexano (azul).

Como se pode verificar, a utilização de *n*-hexano na fase inicial da extração contribuiu para a remoção de muitos compostos da matriz, possibilitando também a obtenção de uma linha de base estável e corretamente ajustada, o que permite uma quantificação mais precisa. De referir, no entanto, que o método de extração em questão inclui uma diluição do extrato eluído a partir das colunas SPE para um volume final de 20 mL, que eventualmente, pode ter contribuído para a qualidade do cromatograma.

A monitorização seletiva do ião (SIR) com m/z 44 foi também efetuada, com o intuito de tentar confirmar a presença da acrilamida, porém o seu sinal só foi visualizado quando adicionado o padrão de 2000 $\mu\text{g/L}$, evidência que corrobora a baixa resolução deste ião em extratos alimentares anteriormente descrita. (Riediker & Stadler, 2003a) Para o extrato de café sem adição de padrão, o ião com m/z 55 também não foi identificado no modo de aquisição SIR e no modo *full scan*, os valores m/z detetados foram distantes do esperado.

Nesta fase do trabalho, foram realizadas diversas análises das soluções listadas a seguir, que permitiram obter os resultados sumarizados na tabela 4.6:

(a) padrão de acrilamida 2000 µg/L

(b) padrão de acrilamida 100 µg/L

(c) extrato de café da Gorongosa: água ultrapura (19:1)

(d) extrato de café da Gorongosa: solução padrão de acrilamida 100 µg/mL (19:1)

(e) extrato de café da Gorongosa com adição antes da extração de padrão de acrilamida 100 µg/L

(f) extrato de café da Gorongosa: solução padrão de acrilamida 2000 µg/mL (19:1)

(g) extrato de café da Gorongosa com adição antes da extração de padrão de acrilamida 2000 µg/L

Tabela 4.6: Resultados de detecção por PDA e QDA no sistema de HPLC-MS para as soluções padrão de acrilamida 2000 e 100 µg/L e extratos de café da Gorongosa com e sem adição de padrão - antes (AE) e depois da extração (DE).

	PDA		QDA (SIR)					
	t _r (min)	Área (µV s)	m/z (44)		m/z (55)		m/z (72)	
			t _r (min)	Área (µV s)	t _r (min)	Área (µV s)	t _r (min)	Área (µV s)
(a) Padrão 2000 µg/L	18,098	3,21x10 ⁷	18,290	6,03x10 ⁵	18,287	1,86x10 ⁷	18,290	3,71x10 ⁸
(b) Padrão 100 µg/L	18,111	5,52x10 ⁶	18,286	7,29x10 ⁴	18,306	1,94x10 ⁶	18,292	3,77x10 ⁷
(c) Gor. + água	18,406	1,80x10 ⁶	2 picos com t _r > 19 min		n.d.		18,693	6,03x10 ⁴
(c) Gor. + água	18,160	9,22x10 ⁵	18,490	1,84x10 ⁴	n.d.		18,265	8,38x10 ⁴
(d) Gor. + 100 (DE)	18,430	1,78x10 ⁶	2 picos com t _r > 19 min		18,70	1,84x10 ⁵	18,693	1,55x10 ⁶
(e) Gor. + 100 (AE)	18,128	5,17x10 ⁵	18,515	2,66 x10 ⁴	n.d.		18,264	2,13x10 ⁶

(f) Gor. + 2000 (DE)	18,488	3,72x10 ⁶	18,763	4,55x10 ⁴	18,68	1,56x10 ⁶	18,696	2,87x10 ⁷
(g) Gor. + 2000 (AE)	18,084	1,76x10 ⁶	18,320	5,58x10 ⁴	18,27	9,86x10 ⁵	18,259	1,85x10 ⁷

n.d. – não detetado; as diferentes cores representam injeções com 24 h de intervalo.

Os cromatogramas do SIR de m/z 44 e 55 traçados para a amostra de café apresentaram muito ruído, dificultando a identificação dos picos, em particular do pico m/z 44, sendo a sua identificação facilitada, somente nos padrões ou quando se adicionou uma elevada quantidade de acrilamida ao extrato. Apesar de na tabela 4.6, as amostras c) e e) não apresentarem valores para o m/z 55, mas sim para o m/z 44, o tempo de retenção correspondente a este último apresenta-se diferente dos restantes, havendo assim a possibilidade do pico visualizado não ser do fragmento da acrilamida. Para as amostras analisadas 24 h mais tarde, verificou-se essencialmente uma diferença no tempo de retenção.

Este ensaio e os seguintes foram realizados de acordo com o método de extração 4 (vide 3.3.1.1).

- **Ensaio 3_HPLC-ESI-MS:**

A remoção de interferentes realizada durante a extração, leva a acreditar que as dificuldades inerentes à quantificação da acrilamida, mesmo nas amostras fortificadas, recaem nas condições cromatográficas selecionadas. Como a polaridade da fase móvel influi na retenção dos compostos na coluna cromatográfica, neste ensaio, variou-se nessa fase a concentração de acetonitrilo (5, 10 e 20 % (V/V)). No espectrómetro de massa foram também testadas diferentes condições de temperatura de vaporização (300 e 350 °C) e de tensão de cone (18 e 20 V).

Verificou-se que, como esperado, a variação da concentração de acetonitrilo afetou efetivamente o tempo de retenção, porém, sem a separação completa do interferente (figura 4.26), e que das concentrações de acetonitrilo testadas, a de 10 % (V/V) (já utilizada nos ensaios anteriores) foi a que permitiu obter a melhor resolução do pico da acrilamida.

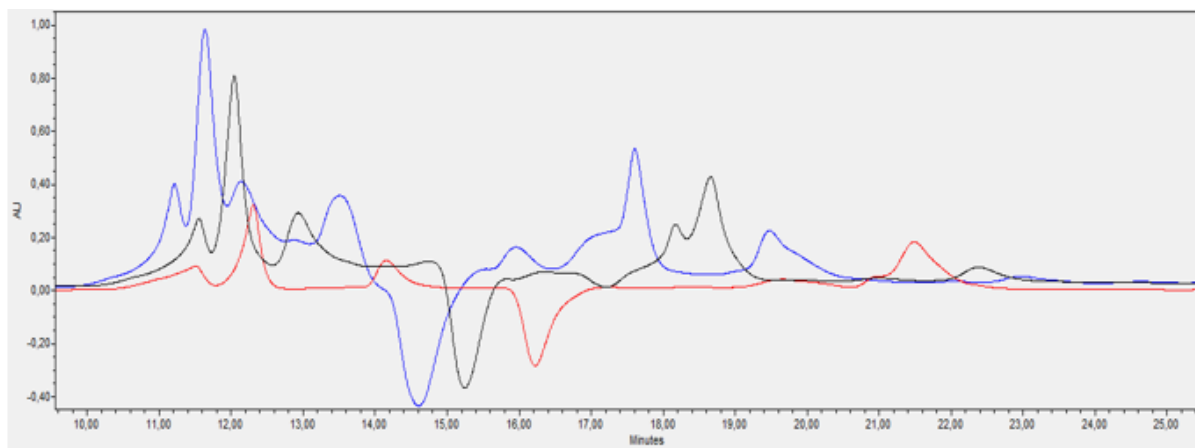


Figura 4.26: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa obtidos com diferentes concentrações iniciais de acetonitrilo na fase móvel: 10% (V/V) (preto); 20% (V/V) (azul); 5% (V/V) (vermelho)

Como a melhoria da separação do pico da acrilamida através da alteração da concentração do acetonitrilo na fase móvel não se concretizou, foi realizada uma injeção direta do padrão de 100 µg/L no espectrômetro de massa, ou seja, sem a coluna de trabalho instalada. Com o intuito de otimizar as condições no espectrômetro de massa, efetuaram-se injeções com temperatura de vaporização de 300 °C e tensões de cone de 18 V e 20 V, analisando-se tanto as áreas dos picos dos SIR característicos, como também a intensidade dos picos nos cromatogramas totais de íons (TIC) (tabela 4.7).

Tabela 4.7- Resultados de SIR e TIC obtidos por ESI-MS com diferentes tensões de cone para o padrão de acrilamida de 100 µg /L.

Tensão de Cone							
18 V				20 V			
SIR		TIC		SIR		TIC	
<i>m/z</i>	Área (µV x s)	<i>m/z</i>	Intensidade (u.a)	<i>m/z</i>	Área (µV x s)	<i>m/z</i>	Intensidade (u.a)
44	82802	44,04	18511,2	44	75460	43,76	7186,67
55	1046980	54,89	209478,1	55	1028440	54,92	271419,6
72	19184455	71,97	989605,4	72	22010075	71,96	769649,8

Relativamente aos resultados do SIR, as áreas dos picos determinadas foram semelhantes para as duas tensões de cone.

No modo *full scan*, com o aumento da tensão de cone para 20 V, embora se tenha obtido um *m/z* de 43,76, deslocado do valor do ião produto de 44, verificou-se um aumento da intensidade do pico referente a *m/z* 55 e um decréscimo na intensidade do pico relativo

a m/z 72, concluindo-se assim, que a ionização foi melhor para uma tensão de cone mais elevada. Apesar de se ter obtido com 18 V um m/z de 44,04, ou seja, muito próximo do valor real, a identificação deste ião é realizada apenas para confirmação da deteção do analito, pelo que foram selecionados os 20 V, por ter originado uma transição 72>55 com maior intensidade.

De notar, que os cromatogramas apresentaram bastante ruído, mas os picos característicos foram perceptíveis, como se pode verificar nas figuras 4.27 a 4.29.

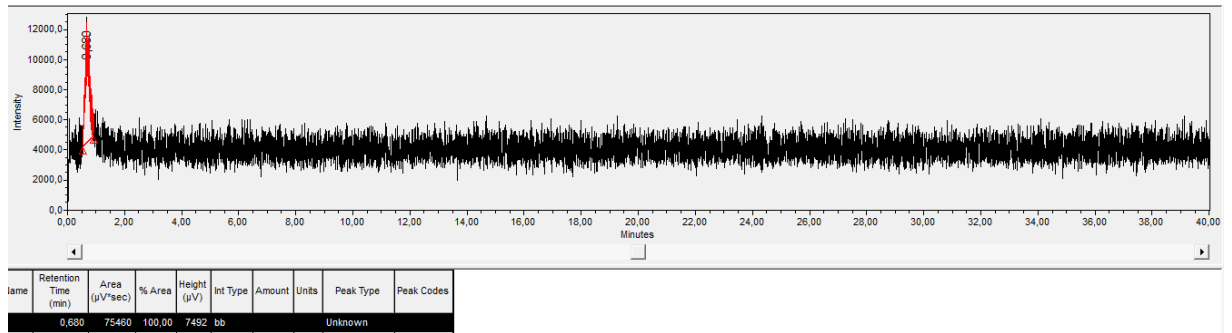


Figura 4.27: Cromatograma do SIR obtido com tensão de cone 20 V para o ião de m/z 44.

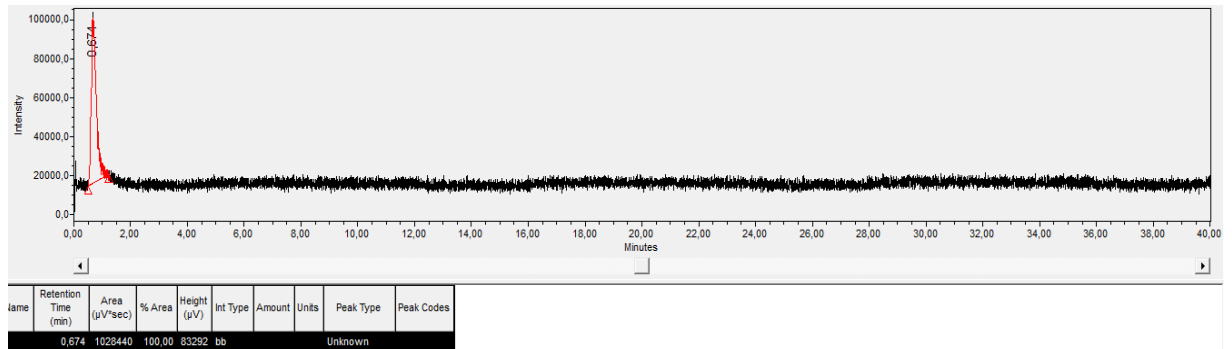


Figura 4.28: Cromatograma do SIR obtido com tensão de cone 20 V para o ião de m/z 55.

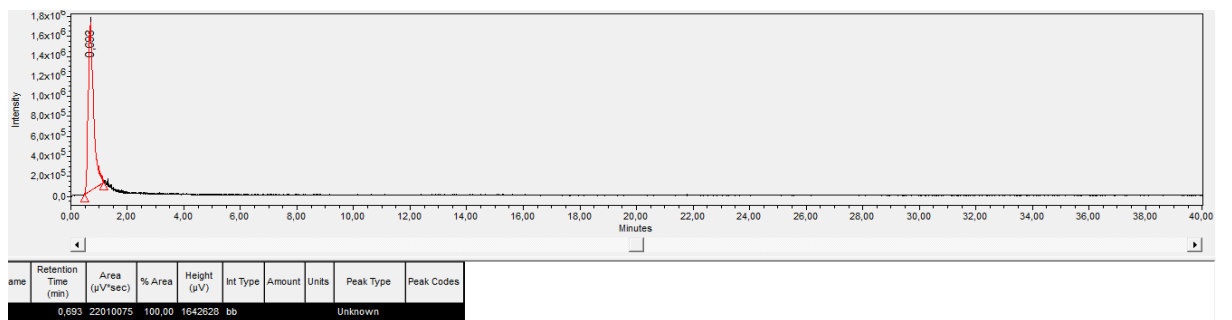


Figura 4.29: Cromatograma do SIR obtido com tensão de cone 20 V para o ião de m/z 72.

Na figura 4.30, é apresentado um exemplo de espectro obtido para a solução padrão de acrilamida 100 µg/L, com tensão de cone de 20 V e temperatura de vaporização de 300 °C.

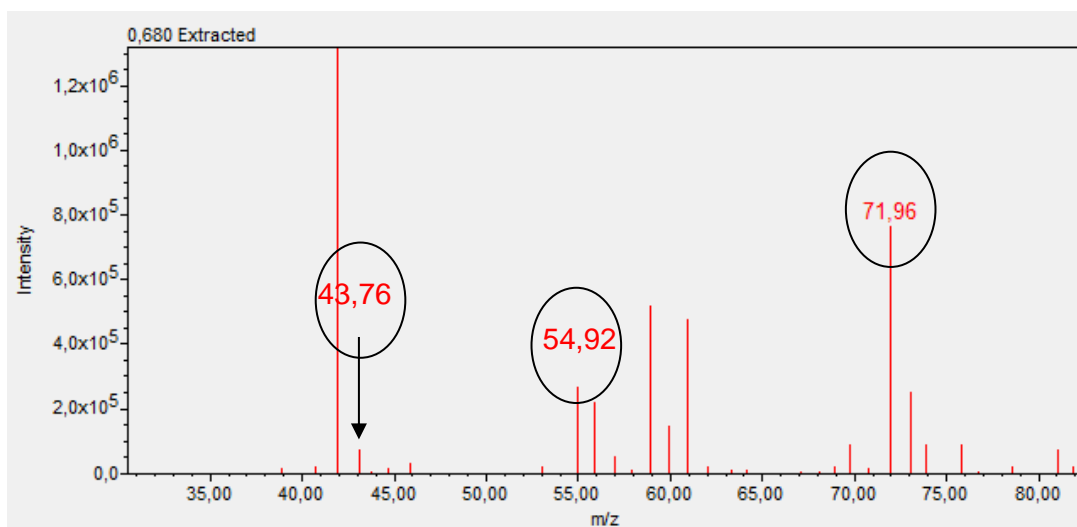


Figura 4.30: Espectro MS do padrão de acrilamida 100 µg/L, com identificação dos iões: $m/z = 71,96$ ($I = 769649,8$); $m/z = 54,92$ ($I = 271419,6$) e $m/z = 43,76$ ($I = 7186,67$).

No que respeita ao aumento da temperatura de vaporização para 350 °C, no cromatograma do ião com m/z 72, verificou-se um pico anómalo, pelo que os estudos prosseguiram a 300 °C.

- **Ensaio 4_HPLC-ESI-MS:**

Como a acidificação da fase móvel com ácido fórmico conduziu a uma melhoria nos resultados e a variação da concentração de acetonitrilo não teve o mesmo efeito, retirou-se o acetonitrilo por completo e adicionou-se à fase móvel ácido acético, de forma a obter a seguinte composição: 0,01 mM de ácido acético em solução aquosa de 0,2 % (V/V) de ácido fórmico.

Com a remoção do acetonitrilo do sistema, eliminou-se o gradiente, mas manteve-se o tempo de corrida de 80 min para evitar eventuais contaminações entre injeções.

Com esta alteração observaram-se aspetos positivos nas análises dos padrões de acrilamida (100 e 2000 µg/L), mas também negativos. Obteve-se, finalmente, o pico da acrilamida livre de interferentes, contudo, os cromatogramas evidenciaram ruído na linha de base. Ainda assim, obtido o pico da acrilamida bem resolvido, esperaram-se bons resultados de MS para os extratos de café.

Analisando mais detalhadamente os SIR para os iões característicos, verificou-se que o ião de m/z 44 não foi detetável no extrato de café e os cromatogramas, como referido para os padrões, revelaram ruído alto, obtendo-se um cromatograma aceitável somente para o padrão de concentração mais elevada (figuras 4.31 a 4.33).

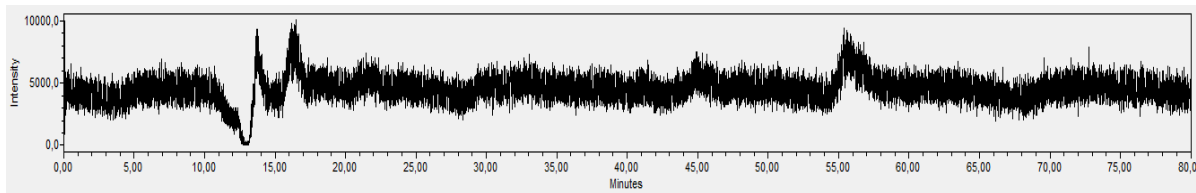


Figura 4.31: Cromatograma do SIR para o ião de m/z 44 obtido para o extrato de café da Gorongosa.

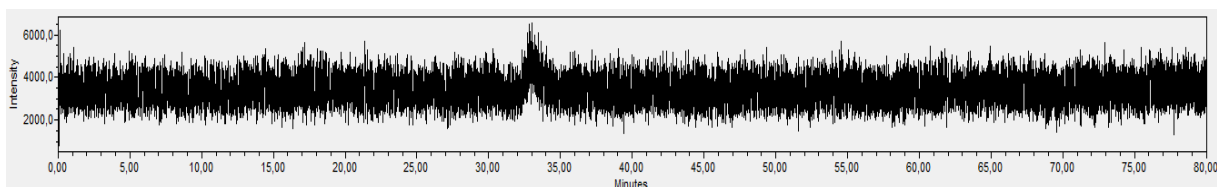


Figura 4.32: Cromatograma do SIR para o ião de m/z 44 obtido para o padrão de acrilamida 100 $\mu\text{g/L}$.

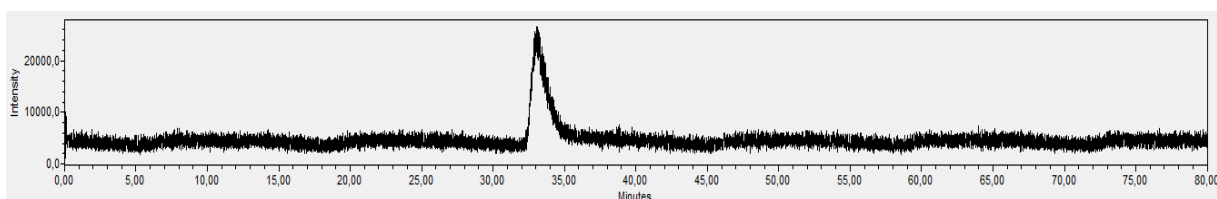


Figura 4.33: Cromatograma do SIR para o ião de m/z 44 obtido para o padrão de acrilamida 2000 $\mu\text{g/L}$.

Quanto à transição $72>55$, apresentou cromatogramas melhores para os padrões, face aos obtidos anteriormente, no entanto, essa transição também foi impercetível na amostra (figuras 4.34 a 4.36), o que numa primeira análise poderia sugerir inexistência de acrilamida no café da Gorongosa.

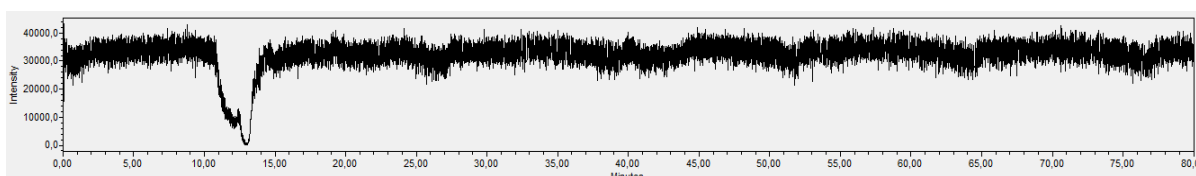


Figura 4.34: Cromatograma do SIR para o ião de m/z 55 obtido para o extrato de café da Gorongosa.

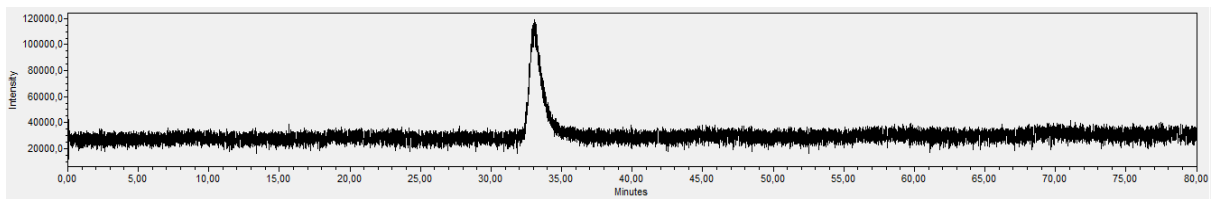


Figura 4.35: Cromatograma do SIR para o íon de m/z 55 obtido para o padrão de acrilamida 100 $\mu\text{g/L}$.

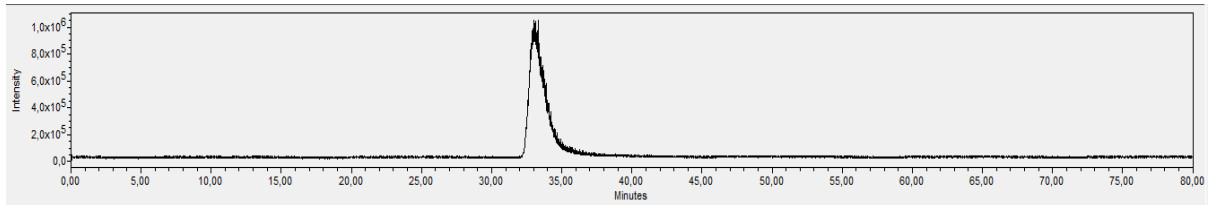


Figura 4.36: Cromatograma do SIR para o íon de m/z 55 obtido para o padrão de acrilamida 2000 $\mu\text{g/L}$.

Relativamente ao íon precursor m/z 72, os cromatogramas mostraram menos ruído e para o extrato de café parece existir um pico muito pequeno com o mesmo tempo de retenção dos picos obtidos para os padrões ($t_r = 32,78$ min) (figuras 4.37 a 4.39). Ainda assim, a sua análise tornou-se impossível.

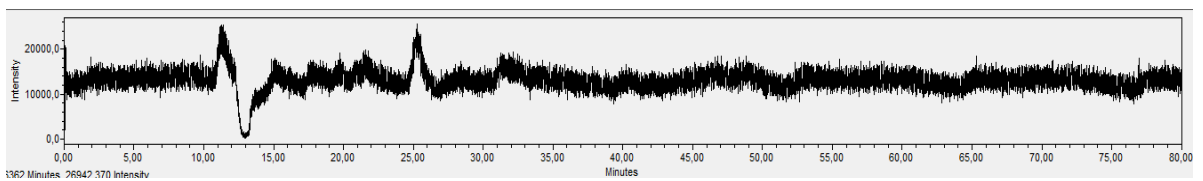


Figura 4.37: Cromatograma do SIR para o íon de m/z 72 obtido para o extrato de café da Gorongosa.

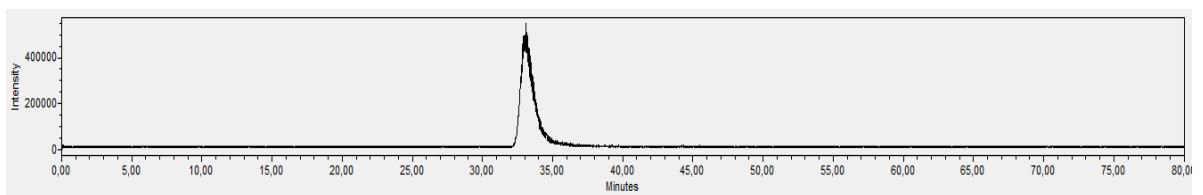


Figura 4.38: Cromatograma do SIR para o íon de m/z 72 obtido para o padrão de acrilamida 100 $\mu\text{g/L}$.

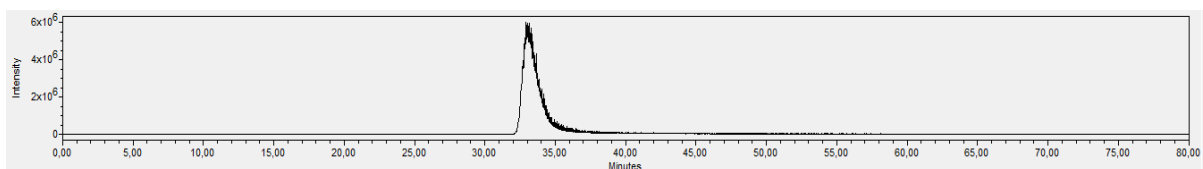


Figura 4.39: Cromatograma do SIR para o íon de m/z 72 obtido para o padrão de acrilamida 2000 $\mu\text{g/L}$.

Os extratos de café da Gorongosa foram também analisados com adição após extração de padrão de acrilamida de 100 ou 2000 $\mu\text{g/L}$, numa proporção de 9:1 (figura 4.40).

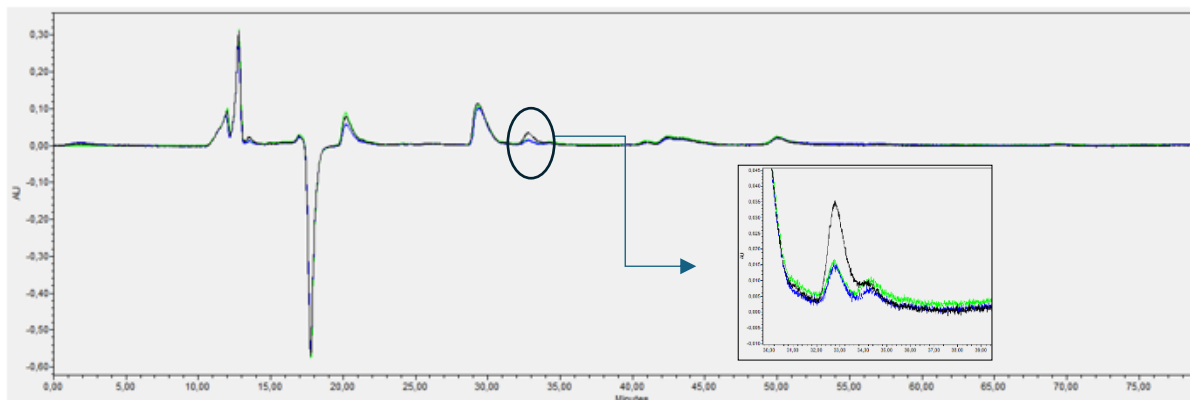


Figura 4.40: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa (verde), do extrato com adição de padrão de 100 $\mu\text{g/L}$ (azul) e do extrato com adição de padrão de 2000 $\mu\text{g/L}$ (preto).

A adição do padrão de 100 $\mu\text{g/L}$ não foi detetada, somente a adição do padrão de 2000 $\mu\text{g/L}$ contribuiu para um aumento notório da área do pico da acrilamida.

Na análise por espectrometria de massa da amostra fortificada com o padrão de 100 $\mu\text{g/L}$, não foi visualizado qualquer pico nos SIR dos iões de m/z 44 e 55, porém para o ião precursor foi possível verificar um pico, ainda que pequeno (figura 4.41).

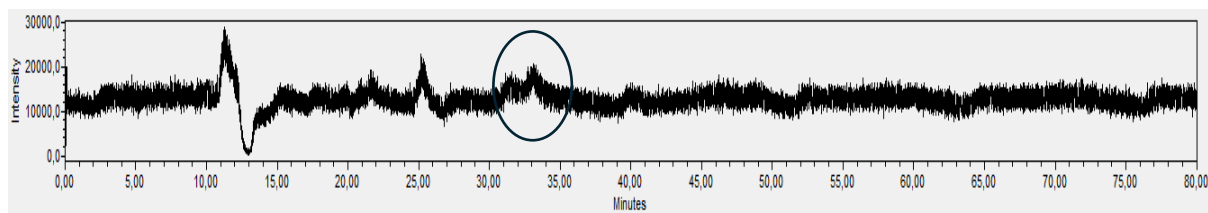


Figura 4.41: Cromatograma do SIR para o ião de m/z 72 obtido para o extrato de café da Gorongosa com adição de padrão de 100 $\mu\text{g/L}$.

Para a amostra suplementada com o padrão de 2000 $\mu\text{g/L}$, visualizaram-se picos bem definidos para os iões de m/z de 55 e 72 e um mais pequeno, de difícil análise para o de m/z 44 (figuras 4.42 a 4.44).

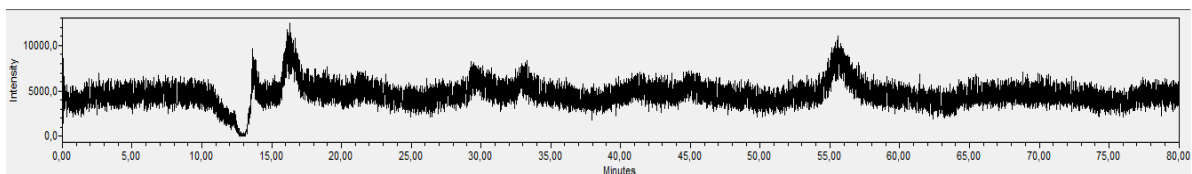


Figura 4.42: Cromatograma do SIR para o íon de m/z 44 obtido para o extrato de café da Gorongosa com adição de padrão de 2000 $\mu\text{g/L}$.

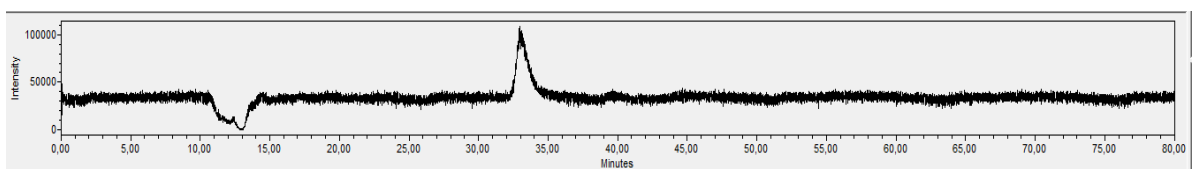


Figura 4.43: Cromatograma do SIR para o íon de m/z 55 obtido para o extrato de café da Gorongosa com adição de padrão de 2000 $\mu\text{g/L}$.

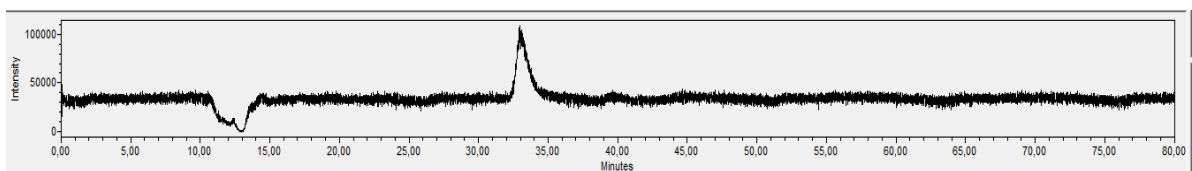


Figura 4.44: Cromatograma do SIR para o íon de m/z 72 obtido para o extrato de café da Gorongosa com adição de padrão de 2000 $\mu\text{g/L}$.

De forma, a melhorar a precisão das análises, foram também realizados ensaios com acrilamida deuterada, tendo em vista a sua utilização como padrão interno. Porém o elevado ruído dos cromatogramas com a fase móvel contendo ácido fórmico, conduziu a estudos de diferentes fases móveis e caudais.

Com as condições descritas na tabela 3.11 do Ensaio 4_HPLC-ESI-MS, a acrilamida deuterada numa concentração de 1000 $\mu\text{g/L}$ apresentou um tempo de retenção de 32,8 min, tendo sido possível verificar nitidamente os picos para os íões $m/z = 58$ e 75, apesar do ruído apresentado, como se pode visualizar nas figuras 4.45 e 4.46 respetivamente.

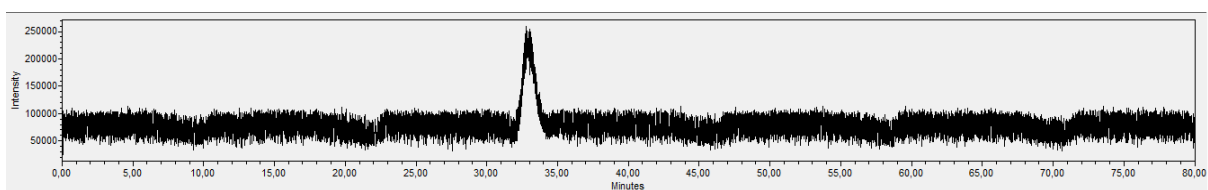


Figura 4.45: Cromatograma do SIR para o íon de m/z 58 obtido para a acrilamida deuterada (1000 $\mu\text{g/L}$).

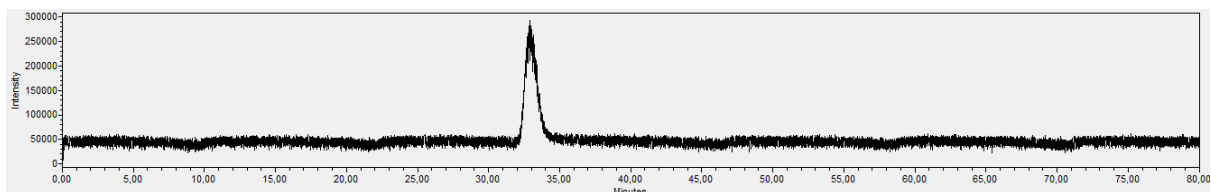


Figura 4.46: Cromatograma do SIR para o íão de m/z 75 obtido para a acrilamida deuterada (1000 $\mu\text{g/L}$).

- **Ensaio 5_HPLC-ESI-MS:**

Com o propósito de se obter menos ruído nos cromatogramas e uma separação do pico da acrilamida dos interferentes, numa primeira abordagem, reduziu-se para metade a concentração de ácido fórmico na fase móvel, obtendo-se a seguinte composição: 0,01 mM de ácido acético em solução aquosa de 0,1% (V/V) de ácido fórmico.

A redução de ácido fórmico minimizou bastante o ruído, porém o pico da acrilamida no extrato de café não saiu livre do interferente, obtendo-se um pico distorcido e com tempo de retenção afastado do obtido para o padrão (figura 4.47).

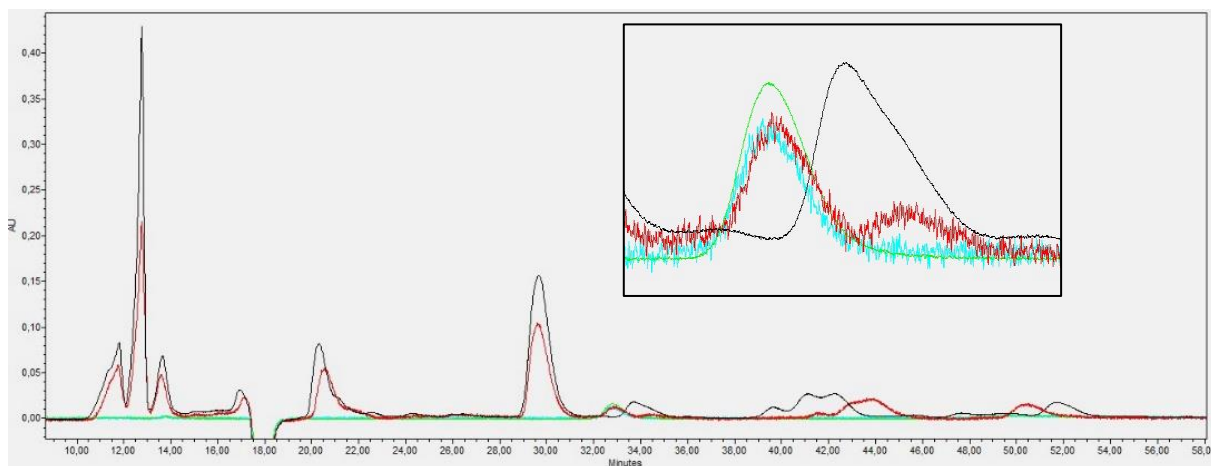


Figura 4.47: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa obtidos com fases móveis com 0,2 % (V/V) (vermelho) e 0,1% (V/V) (preto) de ácido fórmico; e do padrão (1000 $\mu\text{g/L}$) com fases móveis com 0,2 % (V/V) (azul) e 0,1% (V/V) (verde) de ácido fórmico.

- **Ensaio 6_HPLC-ESI-MS:**

Com o intuito de se analisar o efeito do caudal, neste ensaio foi imposto um caudal de 0,4 mL/min, mantendo-se a fase móvel de 0,01 mM de ácido acético e 0.2 % (v/v) de ácido fórmico (figura 4.48).

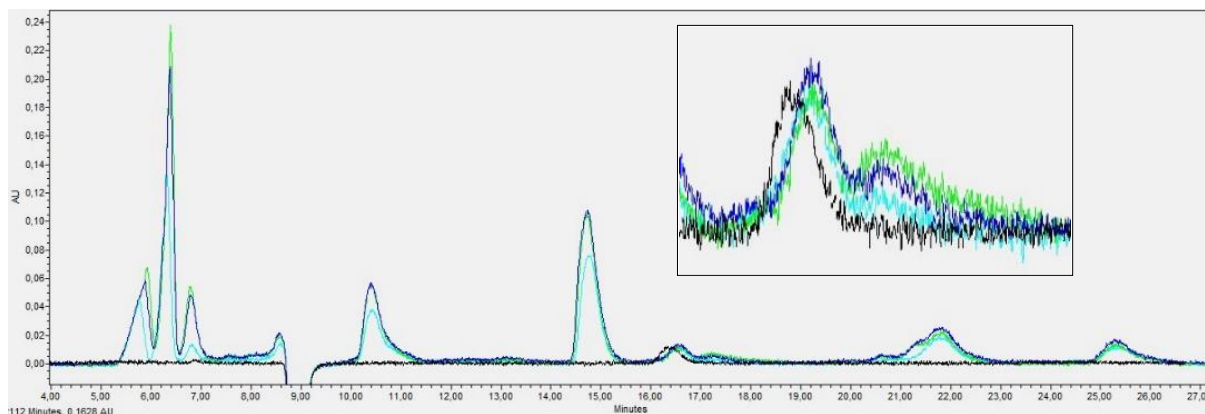


Figura 4.48: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa obtidos com um caudal de 0,4 mL/min (azul), do extrato com adição de padrão interno 100 µg/L antes da extração (verde), com adição de padrão (1000 µg/L) após extração (azul claro); e do padrão 1000 µg/L (preto).

A alteração do caudal não minimizou o ruído e voltou-se a verificar que nestas condições a acrilamida sai quase livre do interferente. O tempo de retenção obviamente reduziu bastante, porém como não foi possível verificar as transições de massa da acrilamida, somente no padrão deuterado, o aumento do caudal não se implementou nos ensaios seguintes.

Os resultados obtidos sugerem que o ruído nos cromatogramas possa ser devido à presença de ácidos, mas tal efeito pode também estar associado à coluna. Ou seja, após muitas utilizações sob várias condições e nestes ensaios, com fases móveis mais agressivas para a fase estacionária (apesar da coluna Alltima C18 ser compatível com soluções ácidas), a coluna pode sofrer desgaste e comprometer os resultados. Assim, utilizou-se outra coluna com o mesmo tipo de fase estacionária, que conduziu a resultados idênticos, confirmando assim as boas condições da Alltima C18.

- **Ensaio 7_HPLC-ESI-MS:**

Não tendo sido obtidos até esta fase resultados que permitissem detetar e quantificar a acrilamida nos extratos de café, repetiram-se, com condições otimizadas e na presença de acrilamida deuterada, ensaios com uma fase móvel idêntica a uma já usada, *i.e.*, 10 % (V/V) acetonitrilo em 90 % (V/V) de água contendo 0,1 % (v/v) de ácido fórmico. Através da adição de acrilamida deuterada (1000 µg/L) no *vial* contendo extrato de café da Gorongosa mesmo antes da injeção, e comparando o cromatograma obtido com o do padrão, foi possível verificar a presença de acrilamida na amostra. A mesma foi eluída muito próximo de outro interferente, pelo que estas condições não se adequam à separação eficiente da acrilamida no extrato de café (figura 4.49).

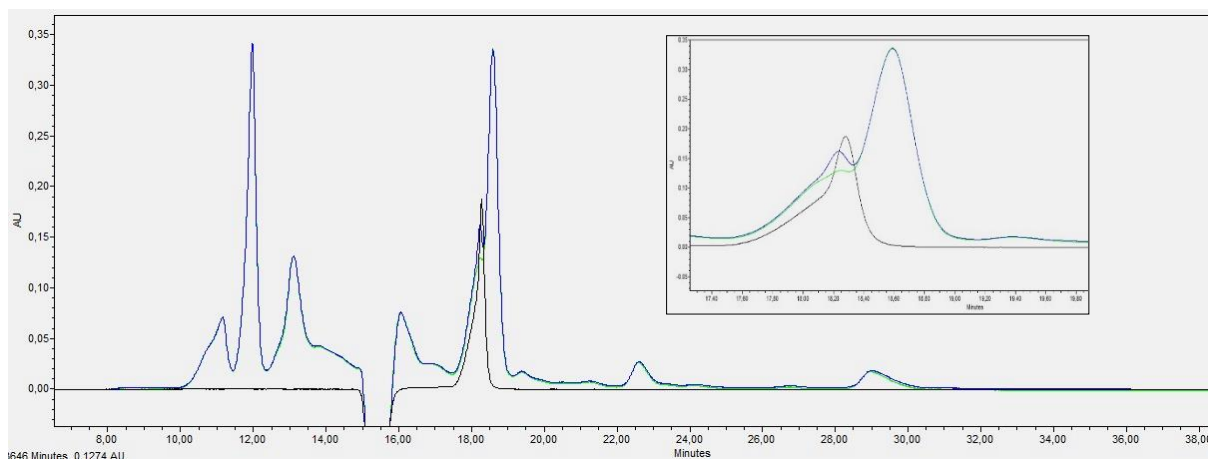


Figura 4.49: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa sem adição de acrilamida (verde), com adição de acrilamida deuterada (azul), e do padrão da acrilamida deuterada (1000 µg/L) (preto) obtidos com fase móvel com 10 % acetonitrilo (V/V) em 90 % (V/V) de água contendo 0,1 % de ácido fórmico (V/V).

Posteriormente, foi avaliada outra fase móvel de solução aquosa de ácido fórmico 0,1 % (V/V) e metanol (97:3). De forma a registar os resultados em menos tempo, o caudal foi aumentado para 0,4 mL/min e obtiveram-se os cromatogramas da figura 4.50.

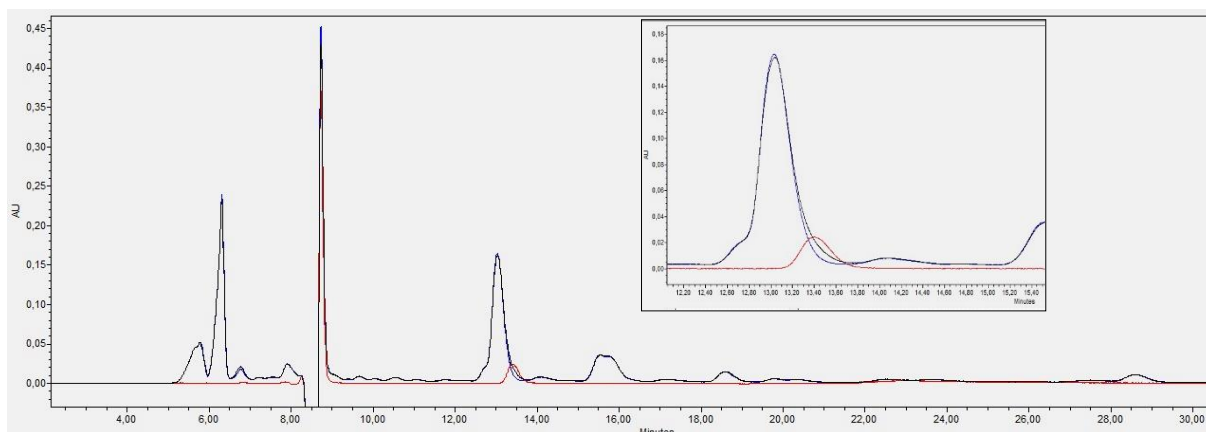


Figura 4.50: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa com adição de acrilamida deuterada (preto), do extrato de café da Gorongosa sem adição de acrilamida (azul) e do padrão 1000 µg/L (vermelho), obtidos com fase móvel com ácido fórmico 0,1 % (V/V) e metanol.

Nota-se que com adição de padrão ao extrato antes da injeção, na zona onde o pico da acrilamida deveria aparecer (por comparação com o cromatograma do padrão) existiu um incremento de área, mas irrelevante pois não permitiu verificar um pico livre para a acrilamida. Através da utilização desta fase móvel e da anterior, é possível concluir que o ruído é efetivamente provocado pelos ácidos empregues, mas que também são esses mesmos ácidos que permitem eluir a acrilamida livre.

Portanto, optou-se por realizar os ensaios seguintes com fase móvel contendo ácido, avaliando-se nesta fase, o efeito da concentração de ácido acético.

As fases móveis testadas foram de 0,1 % (V/V) e 0,05 % (V/V) de ácido acético com caudais de 0,2 e 0,3 mL/min.

Nos cromatogramas obtidos com a fase móvel de 0,1% (V/V) de ácido acético e caudal de 0,3 mL/min (figura 4.51), é visível o incremento do pico através da adição do padrão deuterado, comprovando a presença de acrilamida, porém o pico parece não ser somente devido à acrilamida, pois para além de se iniciar a um tempo de retenção ligeiramente inferior ao do padrão, o aumento da sua área não é uniforme.

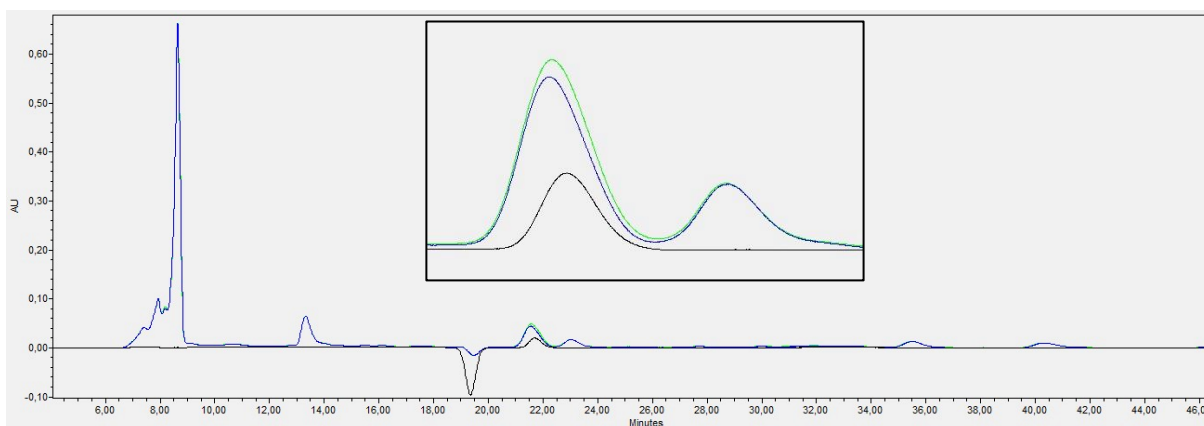


Figura 4.51: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa sem adição de acrilamida (azul), com adição de acrilamida deuterada 1000 µg/L (verde), e do padrão da acrilamida deuterada (1000 µg/L) (preto), obtidos com fase móvel contendo 0,1% (V/V) de ácido acético.

Para a fase móvel de 0,05 % (V/V) de ácido acético, a resolução dos cromatogramas também foi boa, apresentando ainda menos ruído, e notando-se um pico bastante pequeno relativo à acrilamida no extrato do café da Gorongosa (figura 4.52).

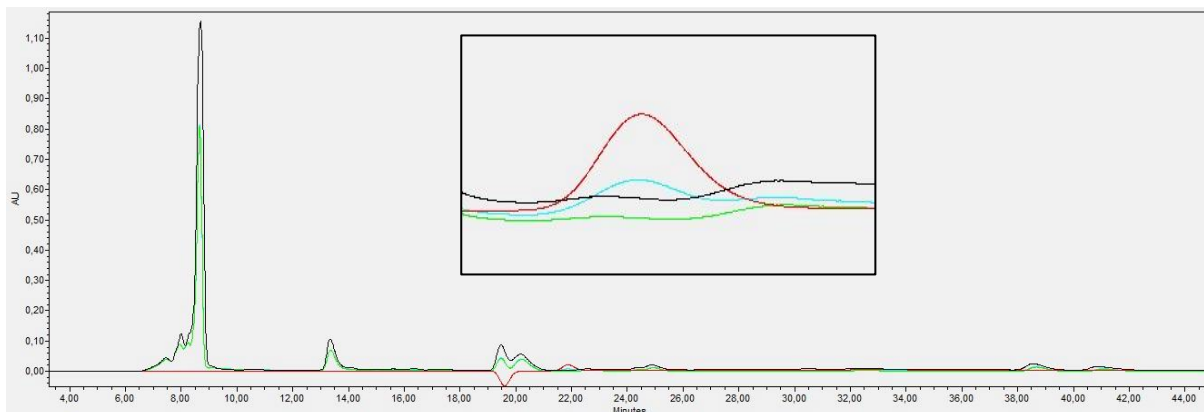


Figura 4.52: Cromatogramas do extrato de café da Gorongosa sem adição de acrilamida (preto), com adição de água (verde), com adição de acrilamida deuterada 1000 µg/L (azul claro), e do padrão da acrilamida deuterada (1000 µg/L) (vermelho), obtidos com fase móvel contendo 0,05 % (V/V) de ácido acético.

Na figura 4.52 não é bem visível o pico da acrilamida na amostra, porém pela figura 4.53, onde são comparados os cromatogramas registados para 0,1 % e 0,05 % (V/V) de ácido acético, é evidente um pico, apesar de bastante pequeno, para o extrato de café da Gorongosa.

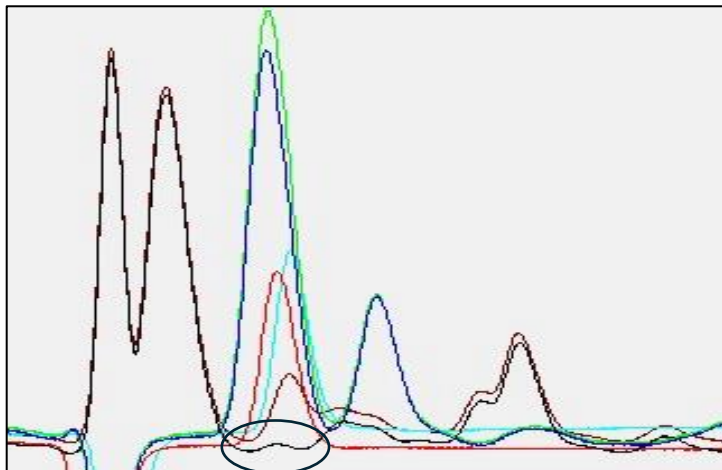


Figura 4.53: Cromatogramas obtidos com fase móvel com 0,05 % (V/V) de ácido acético para o extrato de café da Gorongosa com adição de água (preto), para o extrato com adição de acrilamida deuterada 1000 µg/L (castanho), e do padrão da acrilamida deuterada (1000 µg/L) (azul claro). Cromatogramas obtidos com fase móvel com 0,10 % (V/V) de ácido acético para o extrato de café da Gorongosa com adição de água (azul escuro), para o extrato com adição de acrilamida deuterada 1000 µg/L (verde), e do padrão da acrilamida deuterada (1000 µg/L) (vermelho).

Quando se utilizou a menor concentração de ácido acético foi visível um pico muito pequeno (o expectável) exatamente na mesma zona do padrão, contrariamente ao que se observou quando se usou 0,1 % (V/V) de ácido. Para além disto, uma minimização no ruído também foi obtida com a menor concentração de ácido.

Relativamente à variação do caudal, não se verificou alteração nos resultados e tendo em conta que o tempo de corrida cromatográfica também é um aspeto muito importante, optou-se pelo caudal de 0,3 mL/min. Assim, após análise dos resultados obtidos para os diversos ensaios realizados, selecionaram-se como condições mais adequadas para a separação da acrilamida, uma fase móvel com 0,05 % (V/V) de ácido acético e um caudal de 0,3 mL/min. No entanto, estas condições cromatográficas não permitiram detetar os iões característicos da acrilamida após ionização pelo sistema MS, o que resultou na incapacidade de prosseguir com a validação do método prevista e consequentemente com a determinação da concentração de acrilamida no café da Gorongosa.

4.6. Curva de Calibração obtida por HPLC-MS

No decorrer dos diversos ensaios no sistema HPLC-MS construiu-se uma curva de calibração, do tipo $y = mx + b$ com m a representar o declive e b a ordenada na origem, e que mostrou uma boa linearidade de resposta, com um R^2 de 0,9997 na gama estudada. A curva de calibração foi obtida nas condições descritas em HPLC-MS _Ensaio 7 (tabela 3.12).

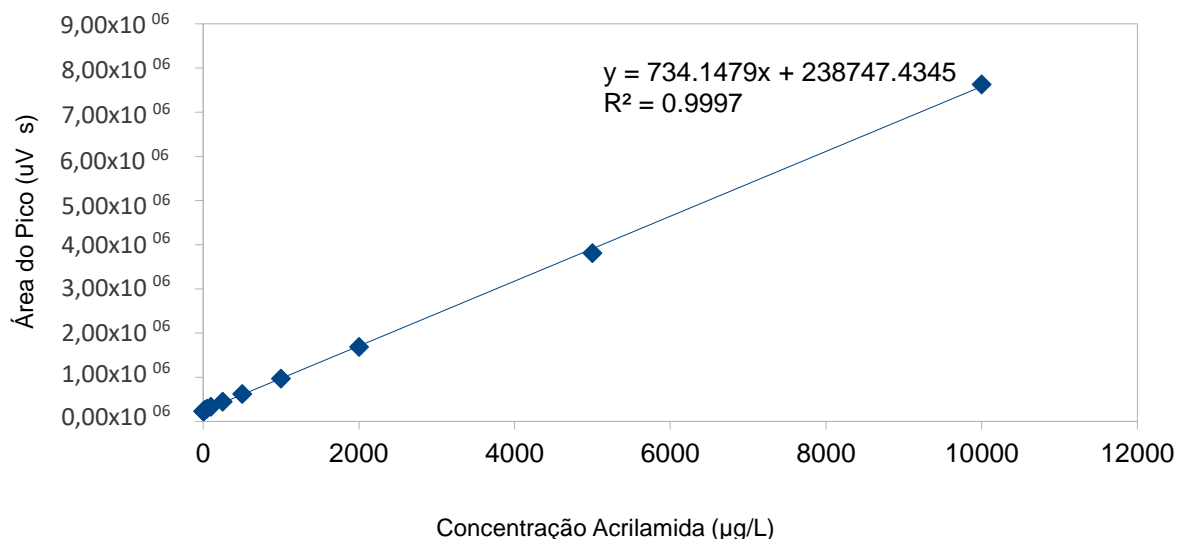


Figura 4.54: Curva de calibração para as várias soluções padrão de acrilamida (0-10000 µg/L), obtidas em condições isocráticas e com deteção a 210 nm.

Tal como realizado no sistema HPL-PDA, através da construção da curva de calibração determinaram-se os limites analíticos do sistema HPLC-MS. Nomeadamente o LOD, pela equação 4, e o LOQ, através da equação 5, correspondendo a, respetivamente, 165,61 µg/L e 501,84 µg/L.

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

O objetivo do presente trabalho incidiu no desenvolvimento de um método que permitisse a extração, deteção e quantificação por HPLC-PDA de acrilamida no café torrado da Gorongosa (Moçambique), de forma a contribuir para a avaliação da qualidade deste produto de elevado valor comercial.

No decorrer das etapas de extração da acrilamida a partir do grão, verificou-se a presença de uma grande variedade de compostos na matriz do café, que dificultaram seriamente os procedimentos de deteção, tornando-se crucial a purificação prévia dos extratos, realizada em várias etapas, com soluções *Carrez I* e *II* e em colunas SPE.

Os ensaios de extração foram desenvolvidos numa fase inicial com água, por ser efetivamente o solvente no qual a acrilamida apresenta maior solubilidade, pela sua compatibilidade com as fases móveis, maioritariamente aquosas, utilizadas em sistemas HPLC e claro, devido ao seu custo e abundância. Contudo, por não ser conclusivo que a água pura fosse efetivamente o melhor solvente para o efeito, foram desenvolvidos estudos preliminares com metanol, que seria interessante aprofundar, pois este solvente tem capacidade de precipitar proteínas e outros compostos orgânicos, para além de facilitar a etapa de evaporação. (Şenyuva & Gökmen, 2005) Outro solvente que poderia ser avaliado em extrações futuras, seria o acetonitrilo por ter sido incluído nalgumas fases móveis utilizadas no decorrer do trabalho. (Pugajeva et al., 2015) O *n*-hexano também empregue nas extrações, revelou-se mais eficaz que os solventes anteriores, proporcionando uma melhoria notória da qualidade dos cromatogramas e facilitar a identificação do pico da acrilamida.

Outro aspeto que se revelou importante, foi a diluição do extrato final, que resultou na eluição de menor número de compostos da coluna cromatográfica, apesar de resultar também na diluição indesejável do próprio analito, frequentemente presente em baixas concentrações. Dos métodos de extração testados, o 4 foi o selecionado, tendo-se obtido um extrato praticamente incolor para o café da Gorongosa.

No que diz respeito ao sistema cromatográfico, a coluna e a composição da fase móvel são os fatores que mais influenciam a separação da acrilamida dos restantes compostos co-extraídos. A maioria dos ensaios do presente trabalho foi realizada numa única coluna de fase reversa C18, pelo que seria importante confrontar os resultados obtidos com separações noutras colunas com fases estacionárias idênticas. Neste tipo de cromatografia, o uso de solventes orgânicos para a eluição de compostos polares é bastante frequente, porém a adição de um ácido orgânico à fase móvel permitiu uma melhor resolução do pico do analito e aumento da reprodutibilidade das corridas cromatográficas. Concluiu-se também que o incremento da temperatura do forno da coluna de 25 °C para 30 °C não teve influência na separação da acrilamida do interferente.

No entanto, devido às dificuldades encontradas no desenvolvimento de um método de HPLC-PDA para deteção e quantificação de acrilamida nas amostras de café, optou-se por dar continuidade ao trabalho num sistema de HPLC-ESI-MS.

A análise por MS, implicou a redução do caudal para 0,2 mL/min, porque a acrilamida apresenta uma decomposição térmica relativamente baixa, pelo que se optou por uma temperatura de vaporização de 300 °C, e para aumentar o tempo de contacto com o vaporizador, foi necessário diminuir o caudal do sistema. Relativamente à tensão de cone, foram testadas entre 10-20 V, concluindo-se que quanto maior, melhor a ionização da acrilamida. Outras dificuldades verificadas foram a inconsistência dos tempos de retenção em cromatogramas obtidos em condições iguais e o facto de não ser possível visualizar o incremento proporcional nas áreas dos picos nas amostras em que se adicionaram soluções padrão de acrilamida.

Das fases móveis testadas, verificou-se que as que continham na sua composição acetonitrilo e metanol não permitiram separar o interferente da acrilamida. As compostas por ácido fórmico e ácido acético resultaram numa melhor resolução dos picos cromatográficos, apesar do ruído exibido nos cromatogramas. A diminuição do ruído foi conseguida pela redução da concentração de ácido fórmico, no entanto a separação dos picos foi comprometida. Por fim, a seleção de uma fase móvel de ácido acético 0,05 % (V/V) permitiu a separação do interferente e uma redução do ruído do cromatograma.

Apesar dos cromatogramas dos extratos de café da Gorongosa terem revelado um pico com uma área muito pequena, não foi possível comprovar a presença da acrilamida na amostra, por não terem sido identificados os iões característicos da ionização da acrilamida. Desta forma, concluiu-se que o método desenvolvido não permitiu efetivamente quantificar a acrilamida no extrato de café torrado.

Segundo Desmarchelier *et al.* (2020) é possível que o interferente na amostra do café seja a *N*-acetil- β -alanina, e estes autores sugerem para a sua remoção um ajuste do pH da fase móvel e eluição em gradiente com água e metanol. Outro aspecto a avaliar, seria o efeito da diminuição do tamanho de partícula da resina da coluna na resolução do pico da acrilamida.

Uma outra estratégia para contornar a ausência de seletividade e sensibilidade do método para a acrilamida, seria a realização de uma derivatização com ácido 2-mercaptobenzóico, que alterando as características da acrilamida, melhoraria o potencial de separação. Esta abordagem não se realizou, pois, o objectivo proposto foi desenvolver um procedimento expedito, excluindo esta etapa demorada, à semelhança da análise de acrilamida realizada noutras amostra alimentares (Castle & Eriksson, 2005)

Com a implementação de um método validado, seria interessante confrontar os resultados obtidos com outras técnicas de análise, como eletroforese capilar (CE), métodos imunoenzimáticos e o uso de biossensores, que têm demonstrado seletividade e sensibilidade na determinação da acrilamida. (Oracz *et al.*, 2011)

Por fim, tendo em conta a influência das condições do tratamento do grão de café (processamento primário, torrefação e armazenamento) na concentração de acrilamida, seria importante confrontar os resultados da concentração de acrilamida determinada para as amostras com essas condições.

6. Referências Bibliográficas

- Achard, F., Beuchle, R., Mayaux, P., Stibig, H. J., Bodart, C., Brink, A., Carboni, S., Desclée, B., Donnay, F., Eva, H. D., Lupi, A., Raši, R., Seliger, R., & Simonetti, D. (2014). Determination of tropical deforestation rates and related carbon losses from 1990 to 2010. *Global Change Biology*, 20(8), 2540–2554. <https://doi.org/10.1111/gcb.12605>
- Adani, G., Filippini, T., Wise, L. A., Halldorsson, T. I., Blaha, L., & Vinceti, M. (2020). Dietary intake of acrylamide and risk of breast, endometrial, and ovarian cancers: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 29(6), 1095–1106. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-1628>
- Adriana Farah. (2019). Coffee: Production, Quality and Chemistry. In *Royal Society of Chemistry*.
- Alves, R. C., Casal, S., & Oliveira, B. P. P. (2007). Factors influencing the norharman and harman contents in espresso coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1832–1838. <https://doi.org/10.1021/jf063128u>
- Alves, R. C., Soares, C., Casal, S., Fernandes, J. O., & Oliveira, M. B. P. P. (2010). Acrylamide in espresso coffee: Influence of species, roast degree and brew length. *Food Chemistry*, 119(3), 929–934. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.051>
- Andrzejewski, D., Roach, J. A. G., Gay, M. L., & Musser, S. M. (2004). Analysis of Coffee for the Presence of Acrylamide by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1996–2002. <https://doi.org/10.1021/jf0349634>
- Atabati, H., Abouhamzeh, B., Abdollahifar, M. A., Sadat Javadinia, S., Gharibian Bajestani, S., Atamaleki, A., Raoofi, A., Fakhri, Y., Oliveira, C. A. F., & Mousavi Khaneghah, A. (2020). The association between high oral intake of acrylamide and risk of breast cancer: An updated systematic review and meta-analysis. *Trends in Food Science and Technology*, 100(April), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.006>

- Attribution-noncommercial, C. C., License, I., & Library, C. (2012). *CIAT Research Online - Accepted Manuscript Title: A Way Forward on Adaptation to Climate Change in Colombian Agriculture : Perspectives Towards Authors : 0–24*.
- Balagiannis, D. P., Mottram, D. S., Higley, J., Smith, G., Wedzicha, B. L., & Parker, J. K. (2019). Kinetic modelling of acrylamide formation during the finish-frying of french fries with variable maltose content. *Food Chemistry*, *284*(January), 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.075>
- Banchero, M., Pellegrino, G., & Manna, L. (2013). Supercritical fluid extraction as a potential mitigation strategy for the reduction of acrylamide level in coffee. *Journal of Food Engineering*, *115*(3), 292–297. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.10.045>
- Başaran, B., & Aydın, F. (2022). Determination of Acrylamide Levels in Infant Formulas and Baby Biscuits Sold in Turkey. *Letters in Applied NanoBioScience*, *11*(1), 3155–3165. <https://doi.org/10.33263/LIANBS111.31553165>
- Basaran, B., & Faiz, O. (2022). Determining the Levels of Acrylamide in Some Traditional Foods Unique to Turkey and Risk Assessment. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *21*(1). <https://doi.org/10.5812/ijpr.123948>
- Bastian, F., Hutabarat, O. S., Dirpan, A., Nainu, F., Harapan, H., Emran, T. Bin, & Simal-Gandara, J. (2021). From plantation to cup: Changes in bioactive compounds during coffee processing. In *Foods* (Vol. 10, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods10112827>
- Bertrand, B., Vaast, P., Alpizar, E., Etienne, H., Davrieux, F., & Charmetant, P. (2006). Comparison of bean biochemical composition and beverage quality of Arabica hybrids involving Sudanese-Ethiopian origins with traditional varieties at various elevations in Central America. *Tree Physiology*, *26*(9), 1239–1248. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.9.1239>
- Bortolomeazzi, R., Munari, M., Anese, M., & Verardo, G. (2012). Rapid mixed mode solid phase extraction method for the determination of acrylamide in roasted coffee by HPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, *135*(4), 2687–2693. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.057>
- Budryn, G., Nebesny, E., & Oracz, J. (2015). Correlation between the stability of chlorogenic acids, antioxidant activity and acrylamide content in coffee beans roasted in different conditions. *International Journal of Food Properties*, *18*(2), 290–302. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.805769>
- Buffo, R. A., & Cardelli-Freire, C. (2004). Coffee flavour: An overview. *Flavour and Fragrance Journal*, *19*(2), 99–104. <https://doi.org/10.1002/ffj.1325>

- Can, N. O., & Arli, G. (2014). Analysis of acrylamide in traditional and nontraditional foods in turkey using HPLC-DAD with SPE cleanup. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 37(6), 850–863. <https://doi.org/10.1080/10826076.2012.758148>
- Capuano, E., & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *Lwt*, 44(4), 793–810. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.002>
- Carvalho Júnior, C. DE, Meira Borém, F., F Alvarenga Pereira, R. G., & Moreira Silva, F. DA. (2003). *Influência de Diferentes Sistemas de Colheita na Qualidade do Café (Coffea arabica L.)*.
- Cassiano, N. M., Barreiro, J. C., Martins, L. R. R., Oliveira, R. V., & Cass, Q. B. (2009). *Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em. 32*.
- Castle, L., & Eriksson, S. (2005). Analytical methods used to measure acrylamide concentrations in foods. *Journal of AOAC International*, 88(1), 274–284. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.1.274>
- Cha, M. (2013). Enzymatic control of the acrylamide level in coffee. *European Food Research and Technology*, 236(3), 567–571. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-1927-8>
- Comissão Europeia. (2017). Regulamento (UE) 2017/2158. *Jornal Oficial Das Comunidades Europeia*, 2017(6), 24–44.
- Cong, S., Dong, W., Zhao, J., Hu, R., Long, Y., & Chi, X. (2020). Characterization of the lipid oxidation process of robusta green coffee beans and shelf life prediction during accelerated storage. *Molecules*, 25(5). <https://doi.org/10.3390/molecules25051157>
- Corporation, R. (2015). *Improve Acrylamide Analysis in Food with a Long-Lasting LC Column and a Cost-Effective Internal Standard*. www.restek.com
- Corrêa, C. L. O., das Mercedes Penha, E., dos Anjos, M. R., Pacheco, S., Freitas-Silva, O., Luna, A. S., & Gottschalk, L. M. F. (2021). Use of asparaginase for acrylamide mitigation in coffee and its influence on the content of caffeine, chlorogenic acid, and caffeic acid. *Food Chemistry*, 338. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128045>
- Das, S. (2021). Post-harvest processing of coffee: An overview. In *Coffee Science* (Vol. 16). Editora UFLA. <https://doi.org/10.25186/v16i.1976>
- de Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry Principles and Applications*.
- De Vleeschouwer, K., Van Der Plancken, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. E. (2007). Kinetics of acrylamide formation/elimination reactions as affected by water activity. *Biotechnology Progress*, 23(3), 722–728. <https://doi.org/10.1021/bp060389f>
- Deribew, H. A., & Woldegiorgis, A. Z. (2021). Acrylamide levels in coffee powder, potato chips and French fries in Addis Ababa city of Ethiopia. *Food Control*, 123(October 2020), 107727. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107727>

- Desmarchelier, A., Hamel, J., & Delatour, T. (2020). Sources of overestimation in the analysis of acrylamide-in coffee by liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1610. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460566>
- Erkekoğlu, P., & Baydar, T. (2010). Toxicity of acrylamide and evaluation of its exposure in baby foods. *Nutrition Research Reviews*, 23(2), 323–333. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000211>
- Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2), 488–495. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.028>
- European Standard. (2015). *Food analysis - Determination of acrylamide in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS)*. EN 16618.
- Fang, M. X., Shen, D. K., Li, Y. X., Yu, C. J., Luo, Z. Y., & Cen, K. F. (2006). Kinetic study on pyrolysis and combustion of wood under different oxygen concentrations by using TG-FTIR analysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 77(1). <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2005.12.010>
- Farah, A., De Paulis, T., Trugo, L. C., & Martin, P. R. (2005). Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5). <https://doi.org/10.1021/jf048701t>
- Filete, C. A., Moreira, T. R., dos Santos, A. R., dos Santos Gomes, W., Guarçoni, R. C., Moreli, A. P., Augusto, M. I., de Oliveira Abreu, R., Simmer, M. M. B., Caliman, A. D. C., Guimarães, C. V., da Silva Berilli, S., Ferrão, M. A. G., da Fonseca, A. F. A., Partelli, F. L., Berilli, A. P. C. G., da Silva Oliveira, E. C., & Pereira, L. L. (2022). The New Standpoints for the Terroir of Coffea canephora from Southwestern Brazil: Edaphic and Sensorial Perspective. *Agronomy*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/agronomy12081931>
- Filippini, T., Halldorsson, T. I., Capitão, C., Martins, R., Giannakou, K., Hogervorst, J., Vinceti, M., Åkesson, A., Leander, K., Katsonouri, A., Santos, O., Virgolino, A., & Laguzzi, F. (2022). Dietary Acrylamide Exposure and Risk of Site-Specific Cancer: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Epidemiological Studies. *Frontiers in Nutrition*, 9(April). <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.875607>
- George, S. E., Ramalakshmi, K., & Rao, L. J. M. (2008). A perception on health benefits of coffee. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 464–486. <https://doi.org/10.1080/10408390701522445>
- Guillarme, D., Ruta, J., Rudaz, S., & Veuthey, J. L. (2010). New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: A critical comparison of existing approaches. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Vol. 397, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3305-8>

- Gurram, I., Kavitha, M. V. S., Nagabhushnam, M. V., Bonthagara, B., & Reddy, D. N. (2017). Overview of validation, basic concepts and analytical method process validation. In *Indo American Journal Of Pharmaceutical Sciences*. <http://www.iajps.com>
- Hofmann, T., Bors, W., & Stettmaier, K. (1999). Studies on radical intermediates in the early stage of the nonenzymatic browning reaction of carbohydrates and amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(2), 379–390. <https://doi.org/10.1021/jf980626x>
- IARC. (1991). *Coffee, tea, mate, methylxanthines and methylglyoxal: Meeting: Papers*. IARC.
- Ikeda S., Sobue T., Kitamura T., Ishihara J., Kotemori A., Zha L., Liu R., Sawada N., Iwasaki M., Tsugane S. (2021). Dietary Acrylamide Intake and the Risks of Renal Cell, Prostate, and Bladder Cancers: A Japan Public Health Center-Based Prospective Study Sayaka. In *nutrients* (Vol. 450).
- Illy, A & Viani, R. (2005). Espresso coffee. In *Elsevier Academic Press* (Vol. 53, Issue 9).
- International Coffee Organization. (2023). *COFFEE DEVELOPMENT REPORT 2022-23 BEYOND COFFEE Towards a Circular Coffee Economy*.
- International Standard (ISO). (2016). *Coffee and coffee products-Determination of acrylamide-Methods using HPLC-MS/MS and GC-MS after derivatization*. www.iso.org/technical-standards
- Jezeer, R. E., Verweij, P. A., Santos, M. J., & Boot, R. G. A. (2017). Shaded Coffee and Cocoa – Double Dividend for Biodiversity and Small-scale Farmers. *Ecological Economics*, *140*, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2017.04.019>
- Jiang, F., Teng, M., Zhu, Y. X., & Li, Y. J. (2020). No association between dietary acrylamide and renal cell carcinoma: an updated meta-analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(7), 3071–3077. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10339>
- Kalaivani, M., Saleena, U. V., Kamath Katapadi, K. G., Praveen Kumar, Y., Nayak, D., & Nilima. (2018). Effect of acrylamide ingestion on reproductive organs of adult male wistar rats. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *12*(11). <https://doi.org/10.7860/JCDR/2018/38170.12364>
- Kaurand, A., Gupta, M., & Kaur, A. (2018). Amandeep Kaur and Monika Gupta., Development and Validation of Method by HPLC Techniques., *Indo Am. J. P. Sci*, *07*, 5. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1325897>
- Keramat, J., LeBail, A., Prost, C., & Soltanizadeh, N. (2011). Acrylamide in Foods: Chemistry and Analysis. A Review. *Food and Bioprocess Technology*, *4*(3), 340–363. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0470-x>
- Kito K., Ishihara J., Kotemori A., Zha L., Liu R., Sawada N., Iwasaki M., Sobue T., Tsugane S. (2020). Dietary Acrylamide Intake and Risk of Lung Cancer: The Japan Public Health Center Based Prospective Study. In *nutrients* (Vol. 12).

- Kitzberger, C. S. G., Scholz, M. B. dos S., & Benassi, M. de T. (2014). Bioactive compounds content in roasted coffee from traditional and modern *Coffea arabica* cultivars grown under the same edapho-climatic conditions. *Food Research International*, *61*, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.031>
- Kocadağlı, T., & Gökmen, V. (2022). Formation of acrylamide in coffee. *Current Opinion in Food Science*, *45*. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100842>
- Kotemori, A., Ishihara, J., Zha, L., Liu, R., Sawada, N., Iwasaki, M., Sobue, T., & Tsugane, S. (2018a). Dietary acrylamide intake and risk of breast cancer: The Japan Public Health Center-based Prospective Study. *Cancer Science*, *109*(3), 843–853. <https://doi.org/10.1111/cas.13496>
- Kotemori, A., Ishihara, J., Zha, L., Liu, R., Sawada, N., Iwasaki, M., Sobue, T., & Tsugane, S. (2018b). Dietary acrylamide intake and the risk of endometrial or ovarian cancers in Japanese women. *Cancer Science*, *109*(10), 3316–3325. <https://doi.org/10.1111/cas.13757>
- Kumar, J., Das, S., & Teoh, S. L. (2018). Dietary Acrylamide and the Risks of Developing Cancer: Facts to Ponder. *Frontiers in Nutrition*, *5*(February). <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00014>
- Lantz, I., Ternité, R., Wilkens, J., Hoenicke, K., Guenther, H., & Van Der Stegen, G. H. D. (2006). Studies on acrylamide levels in roasting, storage and brewing of coffee. *Molecular Nutrition and Food Research*, *50*(11), 1039–1046. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600069>
- Laroque, D., Inisan, C., Berger, C., Vouland, É., Dufossé, L., & Guérard, F. (2008). Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity. *Food Chemistry*, *111*(4), 1032–1042. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.033>
- Lee, J. W., Thomas, L. C., Jerrell, J., Feng, H., Cadwallader, K. R., & Schmidt, S. J. (2011). Investigation of thermal decomposition as the kinetic process that causes the loss of crystalline structure in sucrose using a chemical analysis approach (Part II). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(2), 702–712. <https://doi.org/10.1021/jf104235d>
- Lee, L. W., Cheong, M. W., Curran, P., Yu, B., & Liu, S. Q. (2015). Coffee fermentation and flavor - An intricate and delicate relationship. *Food Chemistry*, *185*, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.124>
- Leroy, T., Ribeyre, F., Bertrand, B., Charmetant, P., Dufour, M., Montagnon, C., Marraccini, P., & Pot, D. (2006). Genetics of coffee quality. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *18*(1), 229–242. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100016>
- Li, Z., Zhao, C., & Cao, C. (2023). Production and Inhibition of Acrylamide during Coffee Processing: A Literature Review. *Molecules*, *28*(8), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules28083476>

- Lineback, D. R., Coughlin, J. R., & Stadler, R. H. (2012). Acrylamide in foods: A review of the science and future considerations. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 15–35. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101114>
- Liu R., Zha L., Sobue T., Kitamura T., Ishihara J., Kotemori A., Ikeda S., Sawada N., Iwasaki M., Tsugane S. (2020). Dietary Acrylamide Intake and Risk of Lung Cancer: The Japan Public Health Center Based Prospective Study. In *nutrients* (Vol. 450).
- Madihah, K. (2013). Optimization of roasting conditions for high-quality Arabica coffee. In *International Food Research Journal* (Vol. 20, Issue 4).
- Marsh, G. M., Youk, A. O., Buchanich, J. M., Kant, I. J., & Swaen, G. (2007). Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: Updated follow up. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 49(1), 82–95. <https://doi.org/10.1097/JOM.0b013e31802db536>
- Martins, S. I. F. S., Jongen, W. M. F., & Van Boekel, M. A. J. S. (2000). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 11, Issues 9–10). [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00022-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00022-X)
- Matoso, V., Bargi-Souza, P., Ivanski, F., Romano, M. A., & Romano, R. M. (2019). Acrylamide: A review about its toxic effects in the light of Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) concept. *Food Chemistry*, 283(January), 422–430. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.054>
- Matthäus, B., Haase, N. U., & Vosmann, K. (2004). Factors affecting the concentration of acrylamide during deep-fat frying of potatoes. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(11), 793–801. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200400992>
- MERCK. (2004). *Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ*.
- Mishra, M. K., Suresh, N., Bhat, A. M., Suryaprakash, N., Kumar, S. S., Kumar, A., & Jayarama. (2011). Sagenetic molecular analysis of Coffea Arabica (Rubiaceae) hybrids using SRAP markers. *Revista de Biología Tropical*, 59(2), 607–617.
- Mojska, H., Gielecińska, I., Szponar, L., & Ołtarzewski, M. (2010). Estimation of the dietary acrylamide exposure of the Polish population. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8–9), 2090–2096. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.009>
- Mucci, L. A., & Wilson, K. M. (2008). Acrylamide intake through diet and human cancer risk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15). <https://doi.org/10.1021/jf703747b>
- Muttucumar, N., Keys, A. J., Parry, M. A. J., Powers, S. J., & Halford, N. G. (2014). Photosynthetic assimilation of ¹⁴C into amino acids in potato (*Solanum tuberosum*) and asparagine in the tubers. *Planta*, 239(1), 161–170. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1967-0>

- Navarini, L., Terra, D., Colombari, S., Lonzarich, V., & Liverani, F. S. (2014). Method for Reducing the Content of Acrylamide in a Roasted Coffee. *Us 2014/0193541 A1*, 1(19), 1–8.
- Nematollahi, A., Kamankesh, M., Hosseini, H., Ghasemi, J., Hosseini-Esfahani, F., Mohammadi, A., & Mousavi Khaneghah, A. (2020). Acrylamide content of collected food products from Tehran's market: a risk assessment study. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(24), 30558–30570. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09323-w>
- Neue, U. D. (2002). *HPLC Troubleshooting*.
- Nieber, K. (2017). The Impact of Coffee on Health. In *Planta Medica* (Vol. 83, Issue 16, pp. 1256–1263). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/s-0043-115007>
- Norma Europeia - EN 16618. (2015). *Food analysis - Determination of acrylamide in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS)*.
- Obón-Santacana, M., Lujan-Barroso, L., Travis, R. C., Freisling, H., Ferrari, P., Severi, G., Baglietto, L., Boutron-Ruault, M. C., Fortner, R. T., Ose, J., Boeing, H., Menéndez, V., Sánchez-Cantalejo, E., Chamosa, S., Huerta Castaño, J. M., Ardanaz, E., Khaw, K. T., Wareham, N., Merritt, M. A., ... Duell, E. J. (2016). Acrylamide and glycidamide hemoglobin adducts and epithelial ovarian cancer: A nested case-control study in nonsmoking postmenopausal women from the EPIC cohort. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 25(1), 127–134. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0822>
- Oracz, J., Nebesny, E., & Zyzelewicz, D. (2011). New trends in quantification of acrylamide in food products. *Talanta*, 86(1), 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.066>
- Ou, J., Zheng, J., Huang, J., Ho, C.-T., & Ou, S. (2020). Interaction of Acrylamide, Acrolein, and 5-Hydroxymethylfurfural with Amino Acids and DNA. *Cite This: J. Agric. Food Chem*, 68, 5039–5048. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01345>
- Panel, E., & Chain, F. (2015). Scientific Opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*, 13(6). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4104>
- Passos, C. P., Ferreira, S. S., Serôdio, A., Basil, E., Marková, L., Kukurová, K., Ciesarová, Z., & Coimbra, M. A. (2018). Pectic polysaccharides as an acrylamide mitigation strategy – Competition between reducing sugars and sugar acids. *Food Hydrocolloids*, 81, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.032>
- Pedroza da Silva, S., Lorena de Oliveira Melo, M., & Maria Tenório Elias, A. (2019). Identificação dos Principais Defeitos Intrínsecos e Extrínsecos para Fins de Classificação de Grão de Café (*Coffea arábica* L. e *Coffea conilon*) Distribuídos a Empresas do Agreste Pernambucano. In *DEMOCRATIZAÇÃO DO CONHECIMENTO E VALORIZAÇÃO PROFISSIONAL: CAMINHOS PARA DESENVOLVIMENTO*

- TECNOLÓGICO E SOCIAL*. Instituto Internacional Despertando Vocações. <https://doi.org/10.31692/2526-7701.IVCOINTERPDVAgro.2019.0092>
- Peivasteh-Roudsari, L., Karami, M., Barzegar-Bafrouei, R., Samiee, S., Karami, H., Tajdar-Oranj, B., Mahdavi, V., Alizadeh, A. M., Sadighara, P., Oliveri Conti, G., & Mousavi Khaneghah, A. (2022). Toxicity, metabolism, and mitigation strategies of acrylamide: a comprehensive review. *International Journal of Environmental Health Research*, 00(00), 1–29. <https://doi.org/10.1080/09603123.2022.2123907>
- Perera, D. N., Hewavitharana, G. G., & Navaratne, S. B. (2021). Comprehensive Study on the Acrylamide Content of High Thermally Processed Foods. *BioMed Research International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6258508>
- Poltronieri, P., & Rossi, F. (2016). Challenges in Specialty Coffee Processing and Quality Assurance. *Challenges*, 7(2), 19. <https://doi.org/10.3390/challe7020019>
- Prasain, J. K. (2012). *TANDEM MASS SPECTROMETRY-APPLICATIONS AND PRINCIPLES*. www.intechopen.com
- Preedy, V. R. (2015). *Coffee in Health and*.
- Price, G. C. (2023a). *Arabicas-Robusta price movements recouple in August – Robustas remain at near-record high* (Issue August).
- Price, G. C. (2023b). *I-CIP declined but regained momentum throughout January , closing in at 174 . 95 US cents / lb* (Issue January).
- Processes*. (2024). <https://www.cafeimports.com/europe/blog/processes/>
- Pugajeva, I., Jaunbergs, J., & Bartkevics, V. (2015). Development of a sensitive method for the determination of acrylamide in coffee using high-performance liquid chromatography coupled to a hybrid quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 32(2), 170–179. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.1000979>
- Pundir, C. S., Yadav, N., & Chhillar, A. K. (2019). Occurrence, synthesis, toxicity and detection methods for acrylamide determination in processed foods with special reference to biosensors: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 85(January), 211–225. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.01.003>
- Ramirez-Villegas, J., Salazar, M., Jarvis, A., & Navarro-Racines, C. E. (2012). A way forward on adaptation to climate change in Colombian agriculture: Perspectives towards 2050. *Climatic Change*, 115(3–4), 611–628. <https://doi.org/10.1007/s10584-012-0500-y>
- Recio, L., Friedman, M., Marroni, D., Maynor, T., & Chepelev, N. L. (2017). Impact of Acrylamide on Calcium Signaling and Cytoskeletal Filaments in Testes from F344 Rat. *International Journal of Toxicology*, 36(2), 124–132. <https://doi.org/10.1177/1091581817697696>

- Relacre. (2000). *Guia 13 VALIDAÇÃO ANÁLISE QUÍMICA - Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal*.
- Ribani, M., Grespan Bottoli, C. B., Collins, C. H., Fontes Jardim, I. C. S., & Costa Melo, L. F. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quimica Nova*, 27(5), 771–780. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>
- Ribeiro, V. (2012). *Desenvolvimento de um blend de café com potencial impacto positivo para a saúde pública* (Issue August).
- Riediker, S., & Stadler, R. H. (2003a). Analysis of acrylamide in food by isotope-dilution liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1020(1), 121–130. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00876-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00876-8)
- Riediker, S., & Stadler, R. H. (2003b). Analysis of acrylamide in food by isotope-dilution liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1020(1), 121–130. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00876-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00876-8)
- Rifai, L., & Saleh, F. A. (2020). A Review on Acrylamide in Food: Occurrence, Toxicity, and Mitigation Strategies. *International Journal of Toxicology*, 39(2), 93–102. <https://doi.org/10.1177/1091581820902405>
- Roach, J. A. G., Andrzejewski, D., Gay, M. L., Nortrup, D., & Musser, S. M. (2003). Rugged LC-MS/MS Survey Analysis for Acrylamide in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7547–7554. <https://doi.org/10.1021/jf0346354>
- Robert, B., & Brown, E. B. (1994). IARC monographs programme on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 60(1), 13–33.
- Samoggia, A., & Riedel, B. (2018). Coffee consumption and purchasing behavior review: Insights for further research. *Appetite*, 129(June), 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2018.07.002>
- Santoso, I., Mustaniroh, S. A., & Choirun, A. (2021). Methods for quality coffee roasting degree evaluation: A literature review on risk perspective. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 924(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/924/1/012058>
- Sanz, C., Maeztu, L., Jose Zapelena, M., Bello, J., & Cid, C. (2002). Profiles of volatile compounds and sensory analysis of three blends of coffee: Influence of different proportions of Arabica and Robusta and influence of roasting coffee with sugar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(8), 840–847. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1110>
- Semla, M., Goc, Z., Martiniaková, M., Omelka, R., & Formicki, G. (2017). Acrylamide: A common food toxin related to physiological functions and health. *Physiological Research*, 66(2), 205–217. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933381>

- Şenyuva, H. Z., & Gökmen, V. (2005). Study of acrylamide in coffee using an improved liquid chromatography mass spectrometry method: Investigation of colour changes and acrylamide formation in coffee during roasting. *Food Additives and Contaminants*, 22(3), 214–220. <https://doi.org/10.1080/02652030500109834>
- Shewry, P. R., Zhao, F. J., Gowa, G. B., Hawkins, N. D., Ward, J. L., Beale, M. H., Halford, N. G., Parry, M. A., & Abécassis, J. (2009). Sulphur nutrition differentially affects the distribution of asparagine in wheat grain. *Journal of Cereal Science*, 50(3), 407–409. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.07.001>
- Slavova, G., & Georgieva, V. (2019). World Production of Coffee Imports and Exports, Bulgaria and USA. In *Trakia Journal of Sciences* (Vol. 17, Issue Suppl.1). Trakia University. <https://doi.org/10.15547/tjs.2019.s.01.098>
- Soares, C., Cunha, S., & Fernandes, J. (2006). Determination of acrylamide in coffee and coffee products by GC-MS using an improved SPE clean-up. *Food Additives and Contaminants*, 23(12), 1276–1282. <https://doi.org/10.1080/02652030600889608>
- Spencer, P. S., & Schaumburg, H. H. (1974). A Review of Acrylamide Neurotoxicity Part I. Properties, Uses and Human Exposure. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 1(2), 143–150. <https://doi.org/10.1017/S0317167100019739>
- Sridevi, V., Giridhar, P., & Ravishankar, G. A. (2011). Evaluation of Roasting and Brewing effect on Antinutritional Diterpenes-Cafestol and Kahweol in Coffee Evaluation of Roasting and Brewing effect on Antinutritional Diterpenes-Cafestol and Kahweol in Coffee Evaluation of Roasting and Brewing effect on Antinutritional Diterpenes-Cafestol and Kahweol in Coffee. *Type: Double Blind Peer Reviewed International Research Journal Publisher: Global Journals Inc*, 11(5).
- Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P. A., Robert, M. C., & Riediker, S. (2002). Food chemistry: Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419(6906), 449–450. <https://doi.org/10.1038/419449a>
- Stojanovska, S., & Tomovska, J. (2015). Factors Influence to Formation of Acrylamide in Food. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 13(4), 10–15.
- Strocchi, G., Rubiolo, P., Cordero, C., Bicchi, C., & Liberto, E. (2022). Acrylamide in coffee: What is known and what still needs to be explored. A review. *Food Chemistry*, 393(September 2021), 133406. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133406>
- Sualeh, A., Mohammed, A., & Endris, S. (2014). Processing method, variety and roasting duration effect on physical quality attributes of roasted Arabica coffee beans. In *Sky Journal of Agricultural Research: Vol. 3 (5) (Issue June 2020)*.

- Swaen, G. M. H., Haidar, S., Burns, C. J., Bodner, K., Parsons, T., Collins, J. J., & Baase, C. (2007). Mortality study update of acrylamide workers. *Occupational and Environmental Medicine*, 64(6), 396–401. <https://doi.org/10.1136/oem.2006.030130>
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., & Törnqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4998–5006. <https://doi.org/10.1021/jf020302f>
- Törnqvist, M. (2005). Acrylamide in food: The discovery and its implications - A historical perspective. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 561, 1–19. https://doi.org/10.1007/0-387-24980-X_1
- Twongyirwe, R., Bithell, M., & Richards, K. S. (2018). Revisiting the drivers of deforestation in the tropics: Insights from local and key informant perceptions in western Uganda. *Journal of Rural Studies*, 63, 105–119. <https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2018.08.013>
- Vaast, P., Bertrand, B., Perriot, J. J., Guyot, B., & Génard, M. (2006). Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(2), 197–204. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2338>
- Visvanathan R, K. T. (2014). Acrylamide in Food Products: A Review. *Journal of Food Processing & Technology*, 05(07). <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000344>
- Wang, H., Feng, F., Guo, Y., Shuang, S., & Choi, M. M. F. (2013). HPLC-UV quantitative analysis of acrylamide in baked and deep-fried Chinese foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.02.006>
- Wang, H., Lee, A. W. M., Shuang, S., & Choi, M. M. F. (2008). SPE/HPLC/UV studies on acrylamide in deep-fried flour-based indigenous Chinese foods. *Microchemical Journal*, 89(2), 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2007.12.006>
- Winston, E., Laak, J. Op De, Marsh, T., Lempke, H., Chapman, K., Winston, L. E., Laak, J. Op De, Marsh, T., Lempke, H., & Chapman, K. (2005). *A rabica coffee manual for Lao-PDR*.
- World Health Organization. (2011). Evaluation of certain contaminants in food. *World Health Organization Technical Report Series*, 959.
- WWF Mozambique. (2016). *Construindo o futuro das áreas de conservação em Moçambique: Sumário*. 17. http://awsassets.wwfmz.panda.org/downloads/af_brochura_2017_wwf_web_1.pdf%0A <https://www.wwf.org.mz/documentos/relatorios/>
- Xu, F., Oruna-Concha, M. J., & Elmore, J. S. (2016). The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. In *Food Chemistry* (Vol. 210, pp. 163–171). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.105>

- Yamada, H., & Kobayashi Michihiko. (1996). *Nitrile Hydratase and Its Application to Industrial Production of Acrylamide*.
- Yusriah, L., Sapuan, S. M., Zainudin, E. S., & Jaafar, M. (2012). *Underutilized Malaysian Agro-wastes Fiber as Reinforcement in Polymer Composites: Potential and Challenges*. <https://www.researchgate.net/publication/259391830>
- Zamani, E., Shokrzadeh, M., Fallah, M., & Shaki, F. (2017). A review of acrylamide toxicity and its mechanism. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 3(1), 1–7. <https://doi.org/10.18869/acadpub.pbr.3.1.1>
- Zha L., Liu R., Sobue T., Kitamura T., Ishihara J., Kotemori A., Ikeda S., Sawada N., Iwasaki M., Tsugane S. (2021). Dietary Acrylamide Intake and the Risk of Hematological Malignancies: The Japan Public Health Center-Based Prospective Study. *Nutrients*, 13, 590.
- Zhang, Q., Ames, J. M., Smith, R. D., Baynes, J. W., & Metz, T. O. (2009). A Perspective on the Maillard Reaction and the Analysis of Protein Glycation by Mass Spectrometry: Probing the Pathogenesis of Chronic Disease. *Journal of Proteome Research*, 8(2), 754–769. <https://doi.org/10.1021/pr800858h>
- Zhivagui, M., Ng, A. W. T., Ardin, M., Churchwell, M. I., Pandey, M., Renard, C., Villar, S., Cahais, V., Robitaille, A., Bouaoun, L., Heguy, A., Guyton, K. Z., Stampfer, M. R., McKay, J., Hollstein, M., Olivier, M., Rozen, S. G., Beland, F. A., Korenjak, M., & Zavadil, J. (2019). Experimental and pan-cancer genome analyses reveal widespread contribution of acrylamide exposure to carcinogenesis in humans. *Genome Research*, 29(4), 521–531. <https://doi.org/10.1101/gr.242453.118>