



**Andreia Catarina**      **Mitigação da acrilamida em bolachas por adição de**  
**Maio Neto**              **compostos de café**





**Andreia Catarina**      **Mitigação da acrilamida em bolachas por adição de**  
**Maio Neto**              **compostos de café**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia - ramo Biotecnologia Alimentar (2ºciclo), realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Cláudia Pereira Passos, Estagiária de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.



Dedico este trabalho à minha família pelo seu apoio incondicional



## **O júri**

Presidente

**Professor. Doutor José António Teixeira Lopes da Silva**

Professor auxiliar do departamento de Química da Universidade de Aveiro

Orientador

**Professor Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva**

Professor associado com agregação no departamento de Química da Universidade de Aveiro (orientador)

Arguente

**Professor Doutor Fernando Jorge Andrade Gonçalves**

Professor adjunto no departamento das Indústrias Alimentares da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu



## **Agradecimentos**

Aos meus orientadores, Professor Doutor Manuel António Coimbra e Doutora Cláudia Pereira Passos, por todo o conhecimento transmitido, disponibilidade e paciência ao longo de todo o trabalho. O meu sincero obrigado.

Agradeço à professora Doutora Sílvia M.Rocha do departamento de Química da Universidade de Aveiro pelos conhecimentos transmitidos e ajuda na área da cromatografia em fase gasosa.

Agradeço à Doutora Elisabete Coelho pela sua ajuda e incentivo e a todos os meus colegas de laboratório em especial à Angélica, Élia, Lisete, Elisabete Correia, Sofia, Magda, Sílvia, Zélia, ao Mickael, Angelo, Richa, Quitério e Cappelle pelo acolhimento, apoio e boa disposição.

Aos meus amigos Rita, Catarina, Mónica, Diana Amorim, Ritinha, Márcio, Rute, Mauro, João Rocha, Ricardo, Filipa, Fábio e Mariana pelo apoio incansável e por todos os momentos que partilhámos e que tão bem fizeram!

À minha família, em especial aos meus pais e ao meu irmão que sempre me incentivaram. Os seus conselhos, carinho e inesgotável paciência nos momentos mais difíceis foram imprescindíveis.

And last but not least, ao Diogo, o meu grande apoio, confidente e que acreditou sempre em mim. Sem o seu carinho e a sua ajuda tudo seria muito mais difícil. Obrigada.



**Palavras-chave**

Acrilamida, Bolachas, Antioxidantes, Extratos de café, Ácidos clorogénicos, Melanoidinas

**Resumo**

A acrilamida é um composto com elevada toxicidade que se forma a partir da reação entre açúcares redutores e asparagina durante a confeitaria de alimentos a elevadas temperaturas. A incorporação de extratos vegetais com atividade antioxidante na massa de alimentos tem sido mencionada como uma estratégia para a redução do nível de acrilamida. O café é uma fonte rica em compostos com atividade antioxidante. Neste trabalho prepararam-se diversos extratos de café por precipitação em soluções de etanol, com diferentes composições em açúcares e ácidos clorogénicos (CGAs). O extrato solúvel em etanol (SnEt) foi o mais rico em CGAs e, conseqüentemente, apresentou maior atividade antioxidante do que o extrato insolúvel em etanol (PpEt). A incorporação destes extratos em bolachas, na proporção de 1, 5 e 10%, levou ao aumento da atividade antioxidante quando comparada com as bolachas controle. Este aumento foi proporcional ao conteúdo em CGAs livres. Os níveis de acrilamida das bolachas com 5% de PpEt diminuíram 29% em relação ao controle. Esta diminuição não se verificou nas bolachas com o extrato de SnEt, apesar do maior conteúdo em CGAs, possivelmente devido à presença em maior quantidade de açúcares redutores. O conteúdo em acrilamida foi determinado por LC-MS/MS, que pressupõe a extração, a concentração da amostra e a utilização de um padrão de acrilamida deuterada. O desenvolvimento da técnica de HS-SPME/GC-MS permitiu a proposta de um método simples e direto de análise da acrilamida em bolachas, utilizando como padrão a butiramida.



**Keywords**

Acrylamide, Cookies, Antioxidants, Coffee extracts, Chlorogenic acids, Melanoidins.

**Abstract**

Acrylamide is a highly toxic compound formed from the reaction between reducing sugars and asparagine during the confection of food at high temperatures. The incorporation of plant extracts with antioxidant activity in dough has been mentioned as a strategy for decreasing the level of acrylamide. Coffee is a rich source of compounds with antioxidant activity. In this work coffee extracts were prepared by precipitation in ethanol solutions, with different compositions in sugars and chlorogenic acids (CGAs). The ethanol soluble extract (SnEt) was the richest in CGA and therefore exhibited higher antioxidant activity than the insoluble ethanol extract (PpEt). The incorporation of these extracts into cookies dough, in the proportions of 1, 5 and 10%, led to increased antioxidant activity compared to control cookies. This increase was proportional to the content of free CGAs. The levels of acrylamide in cookies with 5% PpEt decreased by 29% compared to control cookies. This decrease was not observed in cookies with the SnEt extract despite the higher content in CGA, possibly due to the presence of higher quantities of reducing sugars. The acrylamide content was determined by LC-MS/MS, which involves the extraction, sample concentration and the use of deuterated acrylamide as a standard. The development of a HS-SPME-GC-MS-SIM methodology allowed the proposal of a simple and direct method for the analysis of acrylamide in cookies, using butyramide as a standard.



## Índice Geral

Índice Geral .....	i
Índice de Imagens.....	iii
Índice de Tabelas.....	v
Lista de abreviaturas e símbolos .....	vii
1. Introdução .....	1
1.1. A formação e consumo da acrilamida.....	1
1.2. Toxicidade da acrilamida e efeitos para a saúde.....	3
1.3. Mecanismos de formação da acrilamida.....	5
1.4. Fatores condicionantes da formação de acrilamida .....	9
1.4.1. Quantidade de asparagina .....	9
1.4.2. Quantidade de açúcares redutores e matriz do alimento.....	10
1.4.3. Efeito da temperatura, duração de confeção e atividade da água .....	10
1.4.4. Efeito do pH.....	11
1.5. Métodos de mitigação da acrilamida .....	11
1.5.1. Otimização do fator tempo-temperatura .....	11
1.5.2. Concentração dos precursores da reação .....	12
1.5.3. Aditivação.....	12
1.6. Compostos antioxidantes do café .....	13
1.7. Métodos analíticos de deteção e quantificação da acrilamida em alimentos.....	14
1.7.1. Microextração em fase sólida no espaço de cabeça ( <i>HS-SPME</i> ).....	15
1.7.2. Análise da acrilamida por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa ( <i>GC-MS</i> ).....	17
1.8. Âmbito do trabalho .....	17
2. Materiais e métodos .....	19
2.1. Preparação da bebida de café e extrato solúvel em água fria (Cs) .....	21
2.2. Fracionamento do extrato solúvel em água fria (Cs).....	21
2.3. Confeção de bolachas .....	22
2.4. Análise de açúcares neutros.....	23
2.5. Análise dos ácidos clorogénicos (CGAs) e cafeína .....	25
2.6. Determinação da atividade antioxidante pelo método de ABTS .....	26
2.6.1. Determinação nos extratos de café .....	26

2.6.2. Extração dos compostos antioxidantes das bolachas e determinação da sua atividade antioxidante.....	26
2.7. Quantificação da acrilamida em bolachas por cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massa com ionização por <i>electrospray</i> (LC/ESI-MS-MS).....	27
2.8. Quantificação da acrilamida em soluções modelo por cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID) .....	28
2.9. Desenvolvimento da metodologia para extração da acrilamida por microextração em fase sólida no espaço de cabeça (HS-SPME) em soluções modelo.....	29
2.10. Detecção e quantificação da acrilamida por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) .....	30
2.11. Extração por HS-SPME e detecção e quantificação da acrilamida em bolachas por GC-MS .....	31
3. Discussão de Resultados.....	33
3.1. Fracionamento da bebida de café instantâneo .....	35
3.2. Caracterização dos extratos dos extratos de café.....	36
3.2.1. Composição em açúcares, CGAs e cafeína .....	36
3.2.2. Avaliação da atividade antioxidante .....	37
3.3. Caracterização das bolachas .....	38
3.3.1. Parâmetros físicos das bolachas.....	38
3.3.2. Atividade antioxidante das bolachas.....	38
3.3.3. Quantificação da acrilamida .....	41
3.4. Desenvolvimento de uma metodologia para quantificação da acrilamida por cromatografia em fase gasosa .....	42
3.4.1. Detecção da acrilamida em soluções modelo por GC-FID .....	43
3.4.2. Extração da acrilamida por HS-SPME e quantificação em bolachas por GC-MS .....	43
4. Conclusão.....	47
5. Trabalho Futuro .....	51
6. Anexos .....	55
7. Referências.....	59

## Índice de Imagens

Figura 1 - Estrutura molecular da acrilamida (3). .....	1
Figura 2 – Estrutura molecular da glicidamida (9). .....	3
Figura 3 - Esquema metabólico pressuposto para a acrilamida e formação dos seus metabolitos (GSH – Glutathiona) [adaptado de (9)]. .....	4
Figura 4 – Relação entre a exposição humana à acrilamida e a quantidade de adutos na hemoglobina (19). .....	5
Figura 5- Mecanismo de formação da acrilamida a partir da reação de Maillard (24). .....	6
Figura 6- Estruturas químicas de compostos resultantes da degradação de açúcares na reacção de Maillard: (a) glioxal (25), (b) gliceraldeído (26) e (c) 2-desoxiglucose (27). .....	7
Figura 7 – Mecanismo de formação da acrilamida a partir de lípidos (33). .....	8
Figura 8 – Reação de descarboxilação da asparagina em 3-aminopropionamida com intervenção do piridoxal fostato como cofator [adaptado de (35)]. .....	8
Figura 9 – Formação da acrilamida a partir da glucose, com intervenção do amónio: 1 – formação da imina, 2 – tautomerização imina-enamina, 3 – desidratação, 4 – hidrólise e RA – reação retro-aldólica com formação de fragmentos carbonílicos [adaptado de (28)]. .....	9
Figura 10- Efeito do tempo de aquecimento na formação de acrilamida [adaptado de (32)]. ..	12
Figura 11 – Estruturas dos ácidos: 1 - quínico, 2 - cafeíco (2) e do ácido clorogénico 3- <i>O</i> -cafeoilquínico (3) (50). .....	13
Figura 12 – Estrutura do ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico (51). .....	13
Figura 13 – Design do suporte de SPME [adaptado de (62)]. .....	15
Figura 14 - Diagrama elucidativo da extração de compostos voláteis no espaço de cabeça [adaptado de (64)]. .....	16
Figura 15 – Diagrama de um GC-MS [adaptado de (66)]. .....	17
Figura 16 – Esquematização do processo de fracionamento da bebida de café instantâneo. ..	22
Figura 17 - Fornos usados para a confeção de bolachas: A – forno doméstico, B – forno industrial. ....	23
Figura 18 - Representação gráfica exemplificando a determinação do $Ec_{50}$ para o extrato SnEt.37	
Figura 19 – Variação do $Ec_{50}$ da atividade antioxidante das bolachas com a quantidade de extrato de café adicionado. ....	40
Figura 20 - Cromatograma da butiramida e acrilamida (10 $\mu$ g/frasco de SPME) obtidos em modo SIM (u.a. unidades arbitrárias). ....	44

Figura 21 - Espectros de massa da butiramida (BA) e acrilamida (AA) com uma concentração de 10 µg/frasco de SPME, adquiridos em modo SIM (u.a. unidades arbitrárias).....	45
Figura 22 - Curva de calibração externa obtida por GC-MS para a acrilamida.....	45
Figura 23 – Curva de calibração obtida por adição de padrão para a quantificação da acrilamida por GC-MS.....	46
Figura 24 – Representação gráfica exemplificando a determinação do EC <sub>50</sub> para oextrato PpEt.....	57

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Níveis de acrilamida em diferentes produtos alimentares [adaptado de (9)]. .....	1
Tabela 2 – Ingredientes e quantidades para confeccionar bolachas.....	22
Tabela 3 - Condições de operação no cromatógrafo e programa de temperaturas utilizado. ..	25
Tabela 4 – Condições de operação no cromatógrafo e programa de temperaturas utilizado...	29
Tabela 5 – Parâmetros experimentais testados para otimizar as condições de extração, detecção e quantificação da acrilamida, em soluções modelo. ....	29
Tabela 6 – Programa de temperaturas aplicado para análise no GC-MS.....	30
Tabela 7 - Fracionamento e caracterização dos extratos obtidos a partir do café instantâneo.	35
Tabela 8 -Parâmetros físicos das bolachas de controlo e enriquecidas com os extratos Cs, SnEt e PpEt em diferentes proporções confeccionadas num forno industrial. ....	38
Tabela 9 - Resultados das extrações sucessivas dos compostos antioxidantes de bolachas preparadas com 10% de SnEt.....	39
Tabela 10 – Caracterização das bolachas controlo e com adição de diferentes concentrações de extrato de café em termos de: atividade antioxidante, cafeína e acrilamida. ....	39
Tabela 11 - Níveis de acrilamida determinados em bolachas cuja formulação inclui frutose, obtidas sem extrato de café (controlo) e com a adição de extratos de café (1, 5 e 10%).....	42
Tabela 12 – Resultados para análise da acrilamida por GC-FID em soluções modelo de 2,5 mg/mL de acrilamida e butiramida. ....	43
Tabela 13 – Tabela resumo com as equações da reta para determinar o valor de EC <sub>50</sub> das bolachas.....	57



## Lista de abreviaturas e símbolos

<b>AA</b> - Acrilamida	<b>HPLC</b> – Cromatografia em fase líquida de alta eficiência
<b>ALARA</b> - As Low As Reasonably Achievable/”Tão baixo quanto possível”	<b>HS-SPME</b> – Microextração em fase sólida no espaço de cabeça
<b>a<sub>w</sub></b> - Atividade da água	<b>IARC</b> – International Agency for Research on Cancer/Agência internacional de pesquisa sobre o cancro
<b>BA</b> - Butiramida	<b>MS</b> – Espectrômetro de massa
<b>CAR</b> - Carboxeno	<b>m/z</b> – Razão massa/carga
<b>CGA</b> – Ácido clorogénico	<b>NOAEL</b> – No Observed Adverse Effect Level/Nível com efeito adverso não observado
<b>5-CQA</b> – Ácido 5-O-cafeoilquínico	<b>PA</b> - Poliacrilato
<b>Cs</b> – Sobrenadante de café instantâneo	<b>pCoQA</b> – Ácido <i>p</i> -cumaroilquínico
<b>CW</b> -Carbowax	<b>PDMS</b> - Polidimetilsiloxano
<b>diCQA</b> – Ácido dicafeoilquínico	<b>PpEt</b> – Fração insolúvel em EtOH
<b>DVB</b> - Divinilbenzeno	<b>SIM</b> – Monitorização de iões selecionados
<b>EtOH</b> - Etanol	<b>SnEt</b> – Fração solúvel em EtOH
<b>FQA</b> – Ácido feruloilquínico	
<b>η</b> - Rendimento	
<b>GC-FID</b> – Cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama	
<b>GC-MS</b> – Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa	
<b>GST</b> – Glutathione-S-Transferase	



# **1. Introdução**



## 1.1. A formação e consumo da acrilamida

A acrilamida (Figura 1) é um composto de elevada toxicidade, que se forma em alimentos processados termicamente, a partir de açúcares redutores e asparagina, pela reação de Maillard (1, 2).

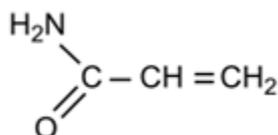


Figura 1 - Estrutura molecular da acrilamida (3).

A acrilamida é classificada como “possivelmente cancerígena em humanos” pela *International Agency for Research on Cancer (IARC)* desde 1994, pertencendo ao Grupo 2 A. Desta forma, a exposição à acrilamida deve ser mantida o mais baixo possível (4, 5).

Os produtos de panificação, cereais, batata e café são as fontes mais relevantes de formação de acrilamida (Tabela 1). As bolachas são um dos alimentos mais consumidos devido à sua qualidade nutricional, apresentam grande disponibilidade de sabores, são relativamente de baixo custo e estão prontas a ingerir (6, 7). Durante a sua confeção ocorrem reações de Maillard das quais resultam produtos com propriedades biológicas positivas como a atividade antioxidante, mas também se formam substâncias prejudiciais como a acrilamida, cuja quantidade máxima detetada é de 4200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  neste alimento (8, 9). Com o intuito de impedir ou inibir a formação destas substâncias procuram-se alternativas que passam pela modificação da composição da receita em termos de agentes de fermentação, açúcares e até mesmo condições de confeção (8)

**Tabela 1 – Níveis de acrilamida em diferentes produtos alimentares [adaptado de (9)].**

Produtos alimentares	Nível máximo de acrilamida detetado ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Bolachas	4200
Pão	2430
Cereais de pequeno-almoço	1600
Alimento para bebés à base de cereais	353
Café	1158
Batatas fritas (palito)	2668
Batatas fritas (“pála-pála”)	4180

A incorporação de extratos com atividade antioxidante à massa de bolachas é uma estratégia mencionada para a redução da formação de acrilamida, para além de um visível aumento da capacidade antioxidante nos alimentos (7, 10). Em relação às propriedades das bolachas, estas permaneceram estáveis com a adição destes extratos durante um período de cerca de seis semanas comparativamente com as bolachas do grupo de controlo onde a sua atividade antioxidante tendeu a diminuir (11). O aumento do prazo de validade é outro fator inerente da adição de compostos antioxidantes uma vez que previnem a oxidação de gorduras incluídas na formulação das bolachas, impedindo a deterioração do alimento e prolongando a aceitabilidade do produto por parte do consumidor (10, 11).

Existem algumas bolachas no mercado internacional com propriedades antioxidantes como as Nutra-Cookie<sup>™</sup> com extratos de framboesa e as bolachas da marca Praeventia<sup>™</sup> que incluem compostos antioxidantes do gengibre. No entanto, nenhuma informação é dada quanto ao conteúdo em acrilamida (12, 13).

Os ingredientes para confeccionar as bolachas são o açúcar (sacarose, glucose ou frutose), farinha e manteiga, os quais podem contribuir como precursores para a formação de acrilamida (6).

Atualmente existe um produto denominado de PreventASe<sup>®</sup> que tem sido aplicado efetivamente em bolachas, biscoitos ou tostas com o intuito de diminuir a quantidade de acrilamida. Este produto tem como princípio ativo a enzima asparaginase proveniente do fungo *Aspergillus niger*, permitindo a hidrólise da asparagina em aspartato e amónia. Esta enzima mantém-se estável em contacto com os ingredientes usuais dos alimentos como óleos e gorduras, açúcares e temperos. As dosagens mais comuns situam-se entre 100 a 500 ppm por peso de farinha. Contudo, a sua utilização não tem sido muito aceite pelos produtores uma vez que é uma estratégia dispendiosa (14).

O consumo de acrilamida situa-se entre 0,3-0,6 µg/kg de peso corporal por dia (2). Este composto é polar e possui baixa massa molecular. A acrilamida é rapidamente absorvida e distribuída pelo organismo (15). No organismo, pode ocorrer a formação de um metabolito da acrilamida denominado glicidamida (Figura 2). Este composto é formado por epoxidação, sendo considerado como mutagénico e cancerígeno. No organismo verifica-se também a formação de adutos entre a acrilamida ou a glicidamida e a hemoglobina, os quais são utilizados para quantificar a exposição à acrilamida (3, 16).

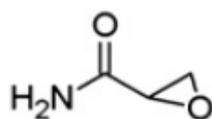
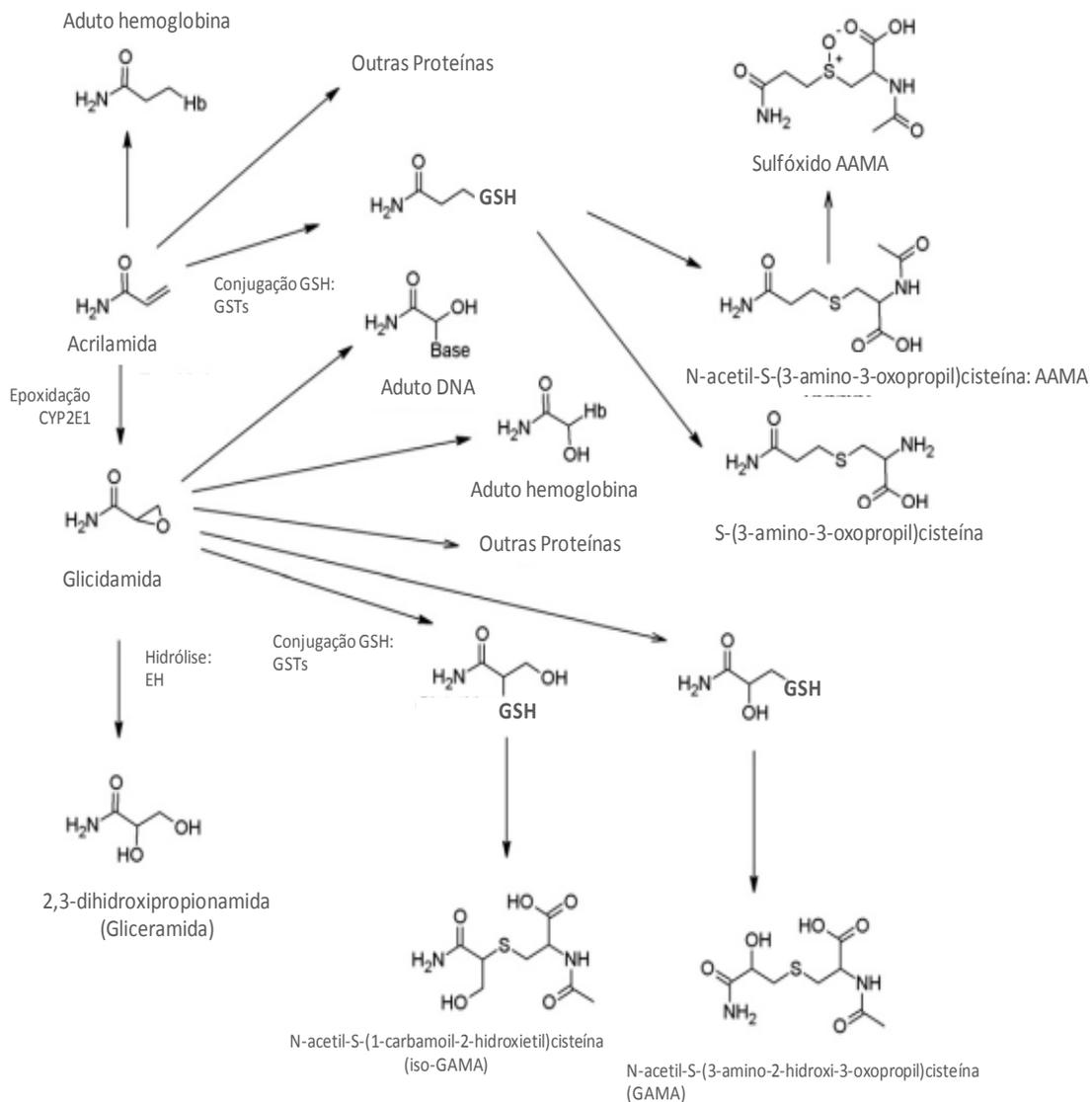


Figura 2 – Estrutura molecular da glicidamida (9).

## 1.2. Toxicidade da acrilamida e efeitos para a saúde

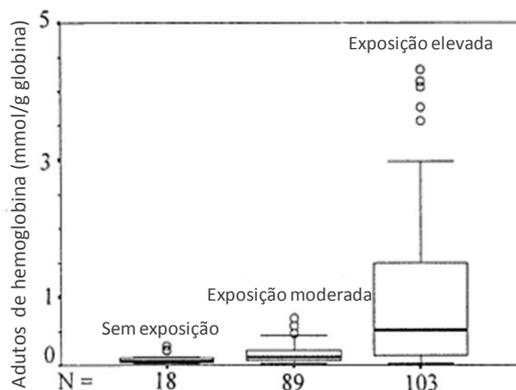
A acrilamida é um composto largamente estudado devido aos efeitos que pode induzir na saúde de indivíduos a ele expostos. A preocupação para os efeitos da acrilamida resultaram de conclusões retiradas a partir de investigações *in vitro* e *in vivo* que revelam potenciais efeitos neurotóxicos, mutagênicos e cancerígenos (2, 17).

Após a ingestão de produtos contendo acrilamida ou exposição à mesma, esta é rapidamente absorvida e distribuída por todo o organismo. A acrilamida pode ser oxidada pelo citocromo P450 (enzima CYP2E1) originando a glicidamida ou pode ligar-se à glutatona (GSH), originando uma série de compostos que são posteriormente excretados. A acrilamida e a glicidamida têm a capacidade de se ligarem covalentemente a locais nucleofílicos como é o caso dos grupos tiol e amina em proteínas e aos átomos de azoto em ácidos nucleicos, formando novos compostos. Como exemplo disto são os compostos formados com a hemoglobina no terminal amina do aminoácido valina e o qual é usado como biomarcador na avaliação da exposição à acrilamida (9). O sistema do citocromo P450 e a Glutathione-S-Transferase (GST) desempenham papéis importantes na desintoxicação de compostos estranhos ao organismo, resultando na excreção dos metabolitos através da urina (18). A Figura 3 apresenta uma visão geral sobre as principais vias metabólicas para a acrilamida.



**Figura 3 - Esquema metabólico pressuposto para a acrilamida e formação dos seus metabolitos (GSH – Glutationa) [adaptado de (9)].**

A partir de análises realizadas a indivíduos potencialmente expostos a materiais contendo acrilamida foi possível observar o aparecimento de adutos na hemoglobina. Estes adutos funcionam como biomarcadores de exposição à acrilamida, resultando em leves perturbações no sistema nervoso central (Figura 4) (19). No entanto, para determinar o possível efeito cancerígeno aqui decorrente seria necessário avaliar a sua exposição prolongada (16, 19).

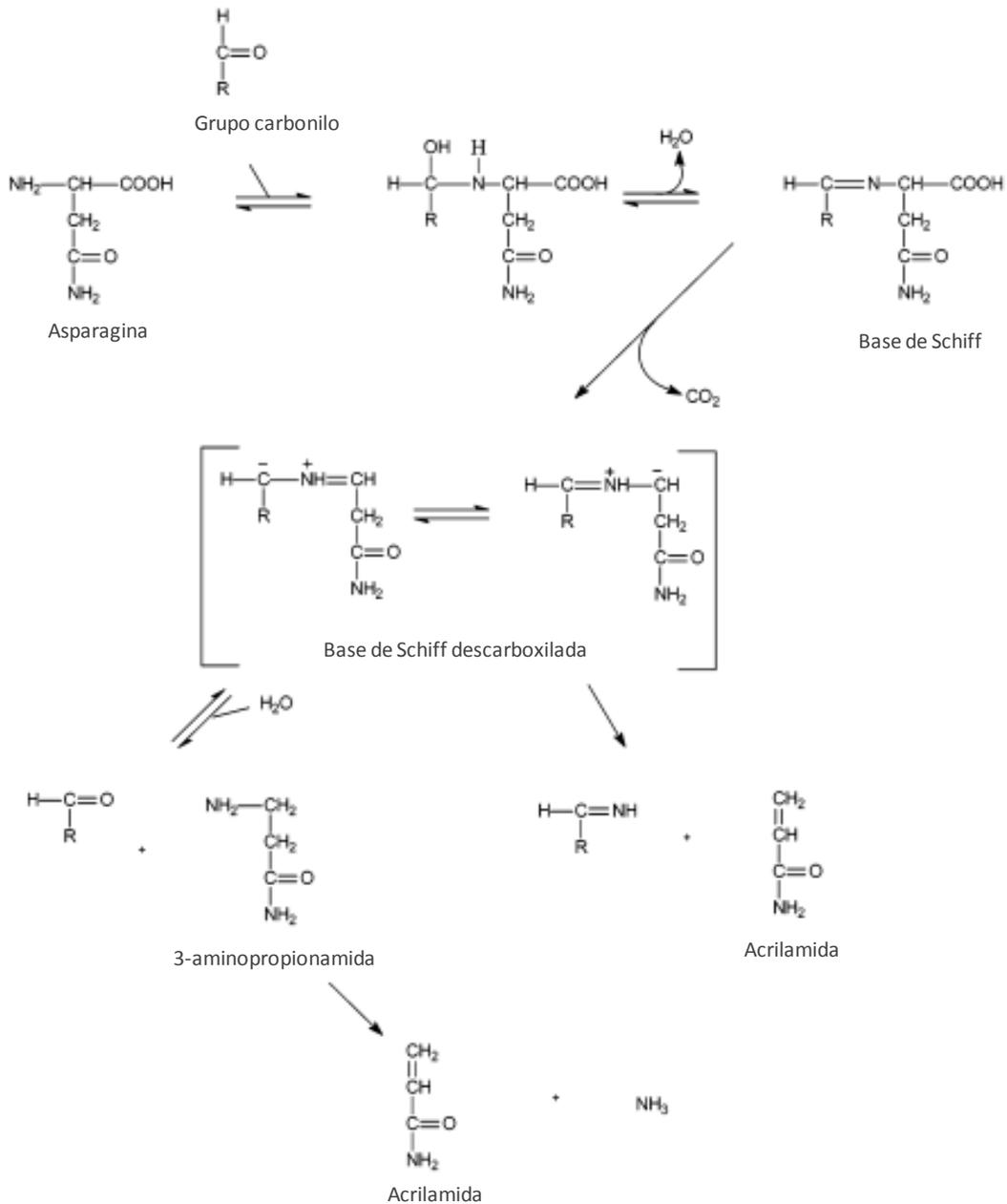


**Figura 4 – Relação entre a exposição humana à acrilamida e a quantidade de adutos na hemoglobina (19).**

Os danos neurotóxicos são apenas atingidos a partir de elevados níveis de acrilamida pois a taxa de *NOAEL* (*No Observed Adverse Effect Level*) é de 0,5 mg/kg de peso corporal, por dia. No entanto, os níveis de acrilamida nos alimentos devem ser mantidos o mais baixo possível, respeitando o princípio de *ALARA* (*As Low As Reasonably Achievable*) (20). Segundo os ensaios realizados com animais, estes são normalmente expostos a elevadas doses de acrilamida (até 2 mg/kg de peso corporal/dia) pelo que as conclusões retiradas não devem ser diretamente extrapoladas para a ingestão humana de acrilamida através dos alimentos (21).

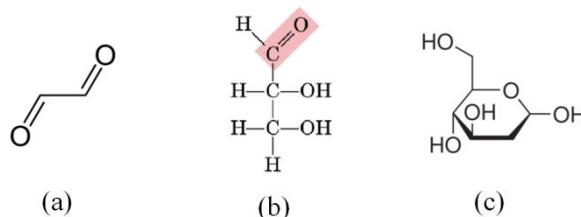
### 1.3. Mecanismos de formação da acrilamida

O primeiro passo para a formação de acrilamida é a reação entre o grupo amina da asparagina, na sua forma livre, e um grupo carbonilo, proveniente maioritariamente de açúcares redutores, originando uma base de Schiff. O composto formado sofre uma descarboxilação seguida de hidrólise para formar um importante precursor da acrilamida, a 3-aminopropionamida. Por outro lado, a base de Schiff descarboxilada pode sofrer eliminação  $\beta$ , libertando uma imina e dando origem à acrilamida (Figura 5) (22, 23).



**Figura 5- Mecanismo de formação da acrilamida a partir da reação de Maillard (24).**

No decurso normal da reação de Maillard, formam-se produtos resultantes da degradação de açúcares, como o glicoxal, gliceraldeído e 2-desoxiglicose (Figura 6).



**Figura 6- Estruturas químicas de compostos resultantes da degradação de açúcares na reação de Maillard: (a) glicoxal (25), (b) gliceraldeído (26) e (c) 2-desoxiglucose (27).**

Estes compostos carbonílicos são efetivos na reação com a asparagina e consequente formação da acrilamida, como verificado em sistemas modelo. Contudo, testando a 2-desoxiglucose, foi observado que a formação de acrilamida ocorre em menor quantidade. Isto verifica-se devido à ausência de um grupo hidroxilo adjacente ao grupo carbonilo na 2-desoxiglucose e como tal só é possível a formação da base de Schiff, não conseguindo sofrer os rearranjos de Amadori na reação de Maillard. Como consequência são formados compostos dicarbonílicos (24, 28). Segundo a literatura, os compostos com o grupo funcional carbonilo são necessários para a reação de formação da acrilamida, favorecendo-a, ao passo que os compostos dicarbonílicos intervêm em menor extensão nesta reação. De acordo com os ensaios realizados em laboratório, os compostos  $\alpha$ -hidroxi carbonilo como a glucose e frutose mostram ser os mais eficientes para a formação de acrilamida (24, 28, 29).

Os alimentos ricos em ambos os precursores são maioritariamente de origem vegetal, como os cereais (cevada, arroz e trigo), e não de origem animal, os quais não possuem tanta asparagina na forma livre (30). Deste modo, os alimentos ricos em proteínas como a carne e o peixe contêm menor teor de acrilamida comparavelmente aos resultados obtidos em cereais (31). O teor de acrilamida detetado nos alimentos deve ser considerado como um equilíbrio entre reações de formação e eliminação ou degradação (32).

Embora a acrilamida seja predominantemente formada pela reação de Maillard, entre o grupo amina da asparagina e um grupo carbonilo, existem outros mecanismos de formação. Um mecanismo hipoteticamente sugerido para a formação da acrilamida é através da acroleína. Este composto pode ser formado a partir da degradação de lípidos, isto é, a partir da degradação térmica do glicerol, proveniente do triacilglicerol. Por sua vez, a acroleína é oxidada a ácido acrílico o qual reage com o amoníaco proveniente da degradação de aminoácidos e/ou proteínas, resultando na formação de acrilamida (Figura 7). No entanto esta via necessita de ser melhor elucidada relativamente ao seu contributo para o conteúdo total de acrilamida nos alimentos (33, 34).

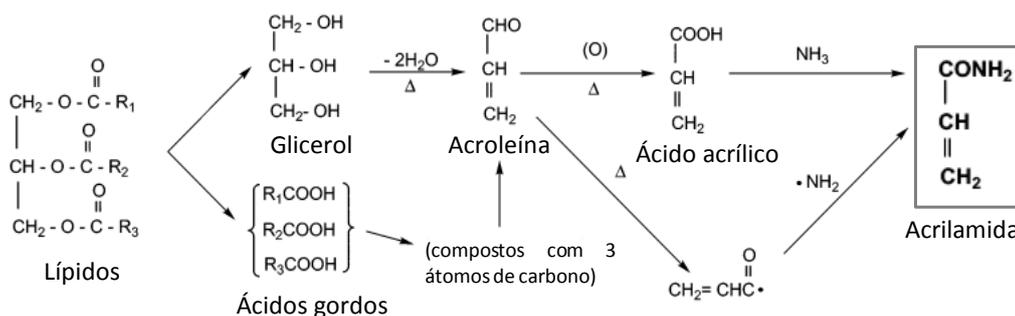


Figura 7 – Mecanismo de formação da acrilamida a partir de lípidos (33).

Outro mecanismo descrito como uma hipótese para a formação de acrilamida refere-se à descarboxilação enzimática da asparagina, através de uma descarboxilase, originando 3-aminopropionamida. Posteriormente, após aquecimento, o composto sofre desaminação formando a acrilamida (Figura 8). Esta via necessita de ser melhor elucidada relativamente ao seu contributo para o conteúdo total de acrilamida nos alimentos (23, 24, 31).

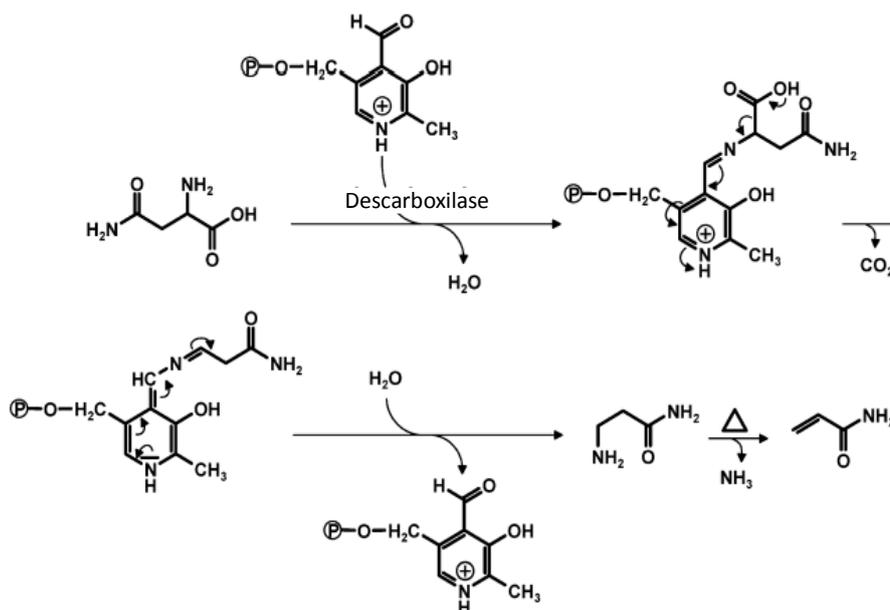
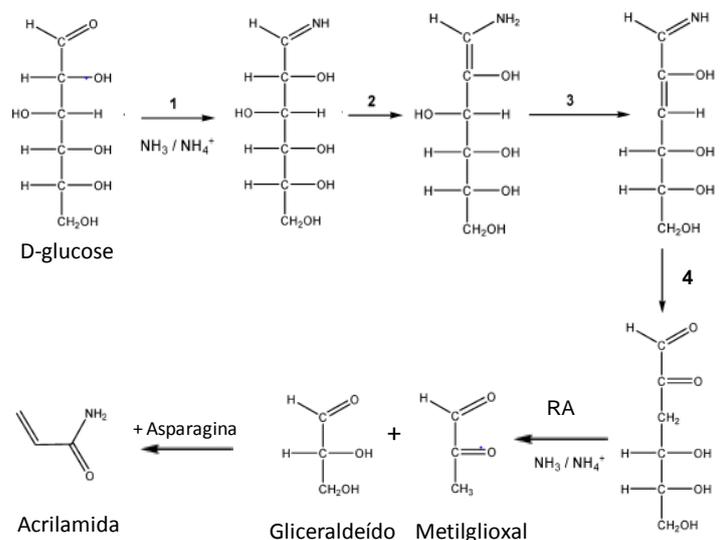


Figura 8 – Reação de descarboxilação da asparagina em 3-aminopropionamida com intervenção do piridoxal fostato como cofator [adaptado de (35)].

Na confeção de bolachas e produtos de panificação, são utilizados agentes de fermentação adicionados às farinhas como bicarbonato de amónio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), o qual potencia a formação de acrilamida. Segundo Amrein *et al.* (28), o amónio libertado reage rapidamente com o grupo carbonilo da glucose ou frutose formando uma imina. A imina formada prossegue uma série de reações originando compostos intermediários da reação de Maillard (glucosonas). Estes compostos podem sofrer reações retro-aldólicas resultando em

fragmentos carbonílicos reativos como o metilglioxal ou gliceraldeído, contribuindo para a formação de acrilamida (Figura 9). Assim, a redução da quantidade de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , ou a sua substituição, diminui a quantidade de acrilamida para quantidades vestigiais (28).



**Figura 9 – Formação da acrilamida a partir da glicose, com intervenção do amônio: 1 – formação da imina, 2 – tautomerização imina-enamina, 3 – desidratação, 4 – hidrólise e RA – reação retro-aldólica com formação de fragmentos carbonílicos [adaptado de (28)].**

A formação de acrilamida é influenciada por uma série de fatores relacionados quer com a composição do alimento quer com os parâmetros de confeção como se aborda no capítulo seguinte.

#### 1.4. Fatores condicionantes da formação de acrilamida

Como a acrilamida é maioritariamente formada através da reação de Maillard, a concentração dos precursores, a temperatura e duração de confeção, a humidade do alimento e a atividade da água ( $a_w$ ), assim como o pH podem afetar a formação de acrilamida dado que alguns deles intervêm diretamente na sua via de formação (2, 36).

##### 1.4.1. Quantidade de asparagina

Em alimentos derivados de cereais, o fator preponderante na formação de acrilamida é a quantidade de asparagina, pelo que o enriquecimento de cereais neste aminoácido conduz a uma maior quantidade no produto final (37). Efetivamente, a partir de ensaios onde se adicionou asparagina a uma farinha de trigo observou-se um aumento na quantidade de acrilamida formada (38). Também foi investigado o impacto da adição de uma mistura de aminoácidos contendo lisina, glicina, alanina e glutamina na formação de acrilamida. Esta

mistura de aminoácidos foi adicionada tanto a um modelo de estudo contendo glucose e asparagina como a preparações de amostras de batata, observando-se que tanto no ensaio modelo como nas amostras alimentares houve uma diminuição no conteúdo total de acrilamida. Isto ocorre devido às reações de competição dos aminoácidos pela reação de Maillard, com formação de pigmentos castanhos, ou devido a interações da acrilamida com grupos nucleofílicos dos aminoácidos (32, 34).

#### **1.4.2. Quantidade de açúcares redutores e matriz do alimento**

No que diz respeito aos açúcares redutores, os que intervêm na síntese da acrilamida por reação com a asparagina são maioritariamente a glucose e frutose (24, 39). Além destes açúcares, também a sacarose intervém na formação da acrilamida. Este dissacarídeo é hidrolisado por tratamento térmico nos monossacarídeos glucose e frutose (37). Segundo vários ensaios efetuados à mesma temperatura, a quantidade de acrilamida formada nos alimentos é proporcional à quantidade de glucose e frutose neles presente (40, 41). Comparando a reação na presença dos monossacarídeos glucose ou frutose em modelos experimentais de asparagina-açúcar, os resultados onde se utiliza frutose mostram valores mais elevados para a acrilamida comparativamente com os obtidos quando se utiliza a glucose (34, 37).

#### **1.4.3. Efeito da temperatura, duração de confeção e atividade da água**

O fator tempo-temperatura desempenha um papel importante para a formação de acrilamida no decorrer da confeção dos alimentos. A acrilamida começa a formar-se a partir de uma temperatura superior a 100°C, aumentando exponencialmente a sua quantidade ao longo do tempo até atingir um máximo de concentração. Normalmente, o conteúdo máximo de acrilamida é alcançado com temperaturas entre 180 a 200°C. Após atingir um máximo de concentração verifica-se um decréscimo no teor de acrilamida devido à exaustão de um dos precursores e/ou eliminação da acrilamida. Os mecanismos de eliminação da acrilamida não se encontram totalmente elucidados, necessitando de mais investigações. No entanto, uma vez que a acrilamida possui dois grupos funcionais, o grupo amida e um carbono vinílico, podem ocorrer adições nucleofílicas. Os grupos nucleofílicos como os grupos amina e tiol de aminoácidos ou proteínas ligam-se ao carbono vinílico da ligação dupla da acrilamida (reações de Michael). Por outro lado, o grupo amida da acrilamida pode sofrer reações de hidrólise, desidratação ou até condensação com aldeídos (9, 32).

Associado à temperatura está também o teor de humidade e atividade da água no alimento. A reação de Maillard, da qual decorre a formação de acrilamida, ocorre numa gama de atividade da água entre 0,5 e 0,7. Uma vez que os alimentos são submetidos a elevadas temperaturas aquando da confeção, a quantidade de água existente é reduzida devido à evaporação. No entanto, como a superfície do alimento está mais exposta ao calor, é nesta zona que se forma maior quantidade de acrilamida. O produto resultante da confeção a temperaturas excessivamente altas, embora tenha menor quantidade de acrilamida (resultante da degradação/eliminação), não é aceitável pelo consumidor por apresentar uma cor demasiado escura e propriedades sensoriais desagradáveis (42).

#### **1.4.4. Efeito do pH**

A reação de Maillard é dependente do valor de pH, uma vez que a reatividade do grupo amina do aminoácido é influenciado por este parâmetro. O pH ótimo para a formação da acrilamida situa-se entre 7 e 8. Nesta zona de pH predomina a forma não protonada do grupo amina da asparagina, considerada como a forma reativa. Com a diminuição do valor de pH, o equilíbrio do aminoácido desloca-se para a forma protonada e conseqüentemente torna-se menos reativo para reagir com o grupo carbonilo do açúcar (32, 43). A diminuição do pH é muitas vezes conseguida adicionando, por exemplo, ácido cítrico a alimentos antes de serem confeccionados (32).

### **1.5. Métodos de mitigação da acrilamida**

As formas mais comuns para mitigar o conteúdo de acrilamida nos alimentos passam essencialmente pela alteração de parâmetros como o binómio tempo – temperatura de confeção e adição de compostos que permitam diminuir os percursos da acrilamida.

#### **1.5.1. Otimização do fator tempo-temperatura**

O conteúdo de acrilamida formada num alimento durante o aquecimento aumenta com o tempo. Devido à sua degradação, existe um máximo a partir do qual se verifica uma diminuição (Figura 10). No entanto, tempos elevados de aquecimento levam normalmente à deterioração do alimento. Conseqüentemente, uma estratégia para mitigar a formação de acrilamida passa por otimizar o binómio tempo-temperatura de confeção do alimento (32).

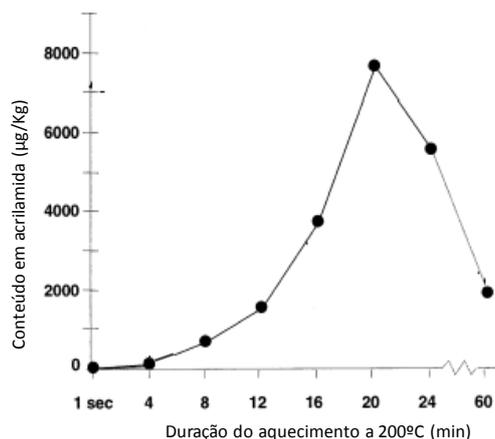


Figura 10- Efeito do tempo de aquecimento na formação de acrilamida [adaptado de (32)].

### 1.5.2. Concentração dos precursores da reação

A quantidade de acrilamida formada é dependente da quantidade dos precursores. Assim, reduzindo a quantidade de açúcares redutores, de asparagina ou de ambos irá promover o decréscimo na sua formação. No caso dos cereais, a seleção de cultivares que contém quantidades de asparagina mais baixas, resultam em produtos com uma quantidade de acrilamida inferior (36). Além desta hipótese, também é possível hidrolisar enzimaticamente a asparagina a ácido aspártico, antes da confeção dos alimentos. A utilização da enzima asparaginase, comercialmente disponível sob a designação de PreventASe<sup>®</sup>, é um método promissor na mitigação da acrilamida (19, 38).

### 1.5.3. Aditivção

A estratégia de mitigação da acrilamida que tem merecido especial atenção refere-se à adição de compostos antioxidantes na massa dos alimentos previamente à confeção. Os compostos antioxidantes protegem contra as possíveis modificações oxidativas nos alimentos (44). No entanto, os resultados apresentados para o efeito dos compostos antioxidantes na diminuição da acrilamida parecem ser controversos, apresentando alguma ambiguidade (10). Têm sido vários os compostos antioxidantes aplicados aos alimentos como os que se encontram presentes em folhas de bambu e extratos de chá verde, ricos em epicatequina, epicatequina-*O*-galato e epigallocatequina-3-galato, onde se refere o impedimento da oxidação da 3-aminopropionamida (45). O café é também uma fonte de compostos antioxidantes, os quais podem ser utilizados para a redução de acrilamida em alimentos (46).

## 1.6. Compostos antioxidantes do café

Os compostos antioxidantes do café são os ácidos clorogénicos (CGAs) e melanoidinas (47, 48). Os CGA são ésteres formados entre o ácido quínico e ácidos hidroxicinâmicos (ácido cafeíco, ferúlico e *p*-coumárico). Na Figura 11 estão representadas as estruturas dos ácidos quínico [1], cafeíco [2] e o clorogénico resultante, o ácido 3-*O*-cafeoilquínico [3] (47-49).

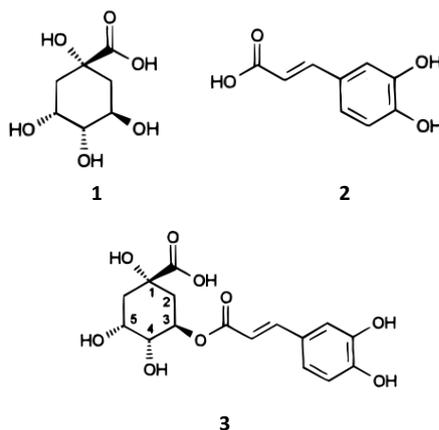


Figura 11 – Estruturas dos ácidos: 1 - quínico, 2 - cafeíco (2) e do ácido clorogénico 3-*O*-cafeoilquínico (3) (50).

O CGA mais comum presente no café é o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (5-CQA), onde o ácido cafeíco ocupa a posição 5 do anel do ácido quínico (Figura 12) (51).

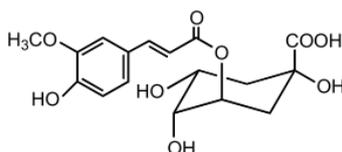


Figura 12 – Estrutura do ácido 5-*O*-cafeoilquínico (51).

Os CGAs derivados do ácido ferúlico designam-se por ácido feruloilquínico (FQA) e os derivados do ácido *p*-cumárico designam-se por ácido *p*-cumaroilquínico (*p*CoQA) (48).

O efeito antioxidante dos CGA deve-se à capacidade dos compostos doarem um átomo de hidrogénio do grupo hidroxilo, quebrando a cadeia de radicais. O conteúdo em CGA é diminuído durante o processamento térmico do café. Contudo, o desenvolvimento de outros compostos com atividade antioxidante, como as melanoidinas, mantém ou aumenta as propriedades antioxidantes do café (52).

As melanoidinas são formadas no processo de torra do café, decorrentes da reação de Maillard entre aminoácidos e açúcares redutores. Estes compostos, além de possuírem atividade anti-radicalar, possuem também uma capacidade quelante de metais, o que pode levar a um aumento da atividade antioxidante. As melanoidinas são compostos castanhos de elevado peso molecular cuja estrutura não se encontra completamente conhecida. As melanoidinas do café são constituídas por aminoácidos, polissacarídeos (arabinogalactanas e galactomananas), compostos fenólicos e material desconhecido (52-56).

As melanoidinas podem ser separadas dos CGAs recorrendo ao fracionamento por precipitação em etanol. As melanoidinas precipitam juntamente com os polissacarídeos quando as concentrações de etanol atingem 75-80%, ficando no sobrenadante os compostos de baixo peso molecular, nomeadamente, os açúcares redutores, os CGAs e a acrilamida (55).

### **1.7. Métodos analíticos de deteção e quantificação da acrilamida em alimentos**

A descoberta da acrilamida e o seu risco associado para a saúde humana levou ao desenvolvimento de metodologias específicas para a sua deteção e quantificação. Os métodos analíticos usados para detetar e quantificar a acrilamida em alimentos baseiam-se essencialmente em técnicas cromatográficas, onde se destacam a cromatografia em fase líquida de elevada eficiência (HPLC) e a cromatografia em fase gasosa (GC) (5). Não existe um método uniforme que seja aplicável a todos os produtos alimentares devido às características da matriz de cada um, o que dificulta a aplicação de um método global de análise. Por outro lado, as diferenças entre os procedimentos dizem respeito essencialmente ao modo de extração e preparação da amostra (36, 57).

A microextração em fase sólida no espaço de cabeça (HS-SPME) é uma técnica de extração e concentração de analitos que se baseia na sorção (absorção e/ou adsorção) dependendo da fase estacionária de uma fibra de sílica revestida por uma fase estacionária (58, 59). A técnica de SPME tem-se mostrado vantajosa relativamente a outras técnicas de extração tradicionais pelo facto de ser uma técnica de utilização simples, rápida, sensível e económica (60, 61). No entanto, esta técnica nunca foi aplicada à extração de acrilamida de matrizes alimentares.

### 1.7.1. Microextração em fase sólida no espaço de cabeça (*HS-SPME*)

O dispositivo de SPME consiste num suporte específico semelhante a uma seringa, do qual fazem parte um êmbolo e uma agulha. O êmbolo permite mover a fibra para dentro e fora da agulha. A agulha permite proteger a fibra quando esta não se encontra exposta. A Figura 13 mostra uma representação do dispositivo de SPME (62).

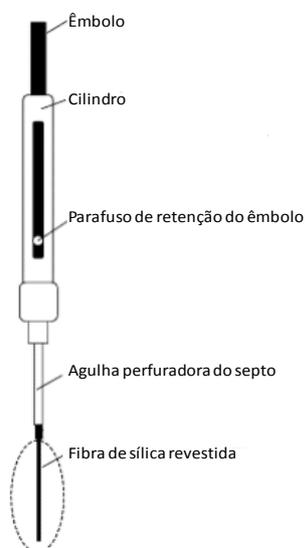
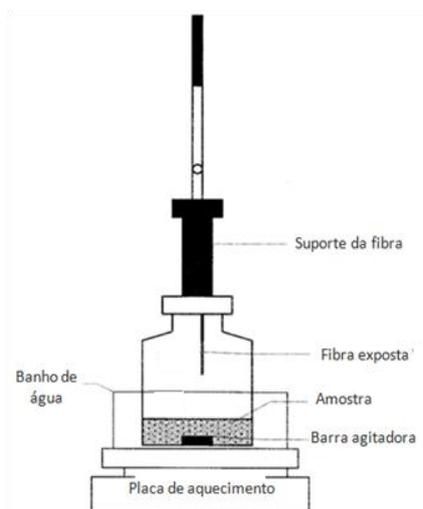


Figura 13 – Design do suporte de SPME [adaptado de (62)].

As fibras de SPME podem ser classificadas de acordo com o tipo de interação entre a fibra e os compostos (extração por absorção ou adsorção), polaridade e tamanho de exclusão. Na extração por absorção os analitos migram livremente dentro e fora da fibra e a sua capacidade para os reter depende da espessura do revestimento e do tamanho dos compostos. A extração por adsorção é realizada por interação física, aprisionando os compostos nos poros internos ou externos (63).

A extração no espaço de cabeça tem como princípio o transporte dos analitos da matriz para a fase gasosa que está em contacto com a fibra (Figura 14). Para promover o rápido transporte dos analitos é frequente agitar a amostra (58).



**Figura 14 - Diagrama elucidativo da extração de compostos voláteis no espaço de cabeça [adaptado de (64)].**

A técnica de SPME baseia-se no equilíbrio de partição dos analitos de interesse entre a fase estacionária polimérica da fibra e a matriz da amostra. A quantidade de analito extraído é determinada pelo coeficiente de distribuição do analito entre a fibra e a amostra (58).

A SPME é muito sensível às condições experimentais pois qualquer alteração nos parâmetros que afete o coeficiente de distribuição e a taxa de sorção irá influenciar a quantidade de composto extraído pela fibra e, conseqüentemente, a reprodutibilidade e sensibilidade (58-60).

Existe uma série de parâmetros no processo de SPME que influenciam a quantidade de analito extraído como a agitação da amostra, a adição de sal, o efeito da temperatura, tempo de exposição e volume de amostra. A agitação da amostra facilita a libertação de compostos voláteis, possibilitando o aumento da quantidade de compostos adsorvidos. A adição de sal (NaCl) à amostra provoca uma diminuição da solubilidade dos compostos hidrofóbicos na fase aquosa promovendo o efeito de “salting-out”. Com o aumento da temperatura provoca-se um aumento da volatilização dos compostos para o espaço de cabeça, no entanto a absorção dos mesmos à fibra é um processo exotérmico pelo que a temperatura a utilizar deve ser ideal para os compostos de interesse. Relativamente ao tempo de exposição, durações de exposição muito longas não aumentam a quantidade total de compostos voláteis absorvidos, uma vez que se trabalha na zona de equilíbrio. No entanto, no caso de compostos menos voláteis, estes necessitam de maiores tempos de exposição para atingir o equilíbrio. O volume da amostra também tem influência na quantificação uma vez que a quantidade de compostos voláteis absorvidos na fibra depende da concentração da amostra (58, 61).

A técnica de SPME é normalmente acoplada à cromatografia em fase gasosa (GC) (58-60). Os analitos extraídos por SPME são desorvidos da fibra no injetor do cromatógrafo. Após a desorção dos analitos, estes podem ser separados, identificados e quantificados recorrendo à cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).

### 1.7.2. Análise da acrilamida por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

O cromatógrafo de fase gasosa (GC) é constituído por um injetor, possui uma fase móvel (gás de arraste), uma coluna (também designada de fase estacionária) inserida no forno do equipamento e um detetor (Figura 15) (65).

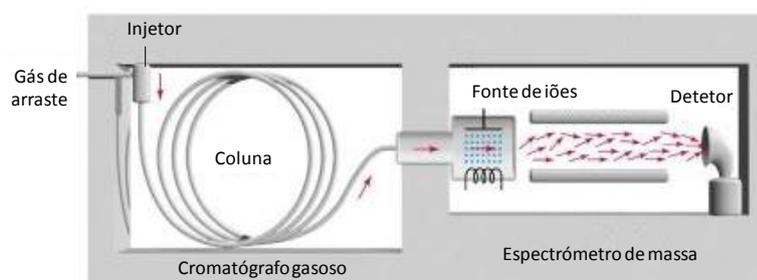


Figura 15 – Diagrama de um GC-MS [adaptado de (66)].

Os analitos desorvidos no injetor migram ao longo da coluna com auxílio de um gás de arraste (normalmente hélio) sendo separados por um programa de temperaturas. A separação dos analitos na coluna baseia-se nos seus pontos de ebulição e na afinidade para a coluna (fase estacionária) (65). Após a saída dos analitos da coluna, estes atingem o detetor. No caso do detetor ser um espectrómetro de massa (MS), é medida a razão massa/carga ( $m/z$ ) dos iões em fase gasosa e a sua abundância relativa (65).

O espectro de massa pode ser obtido em dois modos diferentes: em “full scan” ou em modo de “Monitorização de Iões Seleccionados ” (SIM). Em “full scan” o detetor faz o varrimento de todos os fragmentos, em modo “SIM” apenas são monitorizados alguns iões específicos, aumentando a sensibilidade do detetor (65).

## 1.8. Âmbito do trabalho

Os alimentos provenientes de cereais e ricos em açúcares redutores podem levar à formação de acrilamida. Simultaneamente, a presença de compostos antioxidantes está

associada a uma diminuição de acrilamida nestes produtos. As fontes alimentares de origem vegetal são ricas em compostos antioxidantes destacando-se neste trabalho os que fazem parte da constituição do café. Com a realização desta dissertação deseja-se estabelecer o comportamento existente entre bolachas enriquecidas com extratos de café, em quantidades controladas, e a capacidade antioxidante que estas possuem. Além disto também se pretende caracterizar os extratos adicionados com potencial atividade antioxidante e avaliar esta propriedade em bolachas contendo os extratos não só aquando da confeção mas também a longo prazo, durante o armazenamento.

O alerta para os efeitos tóxicos e possivelmente cancerígenos provenientes da ingestão de alimentos com acrilamida levou ao desenvolvimento de métodos analíticos que permitissem a sua deteção e quantificação. Os métodos analíticos mais usados dizem respeito ao HPLC e GC, ambos acoplados à espectrometria de massa. No entanto, antes de aplicar os referidos métodos é necessário efetuar um tratamento prévio da amostra que é longo e complexo. Deste modo, pretende-se desenvolver e otimizar um método rápido e simples de extração, deteção e quantificação da acrilamida presente em bolachas.

## **2. Materiais e métodos**



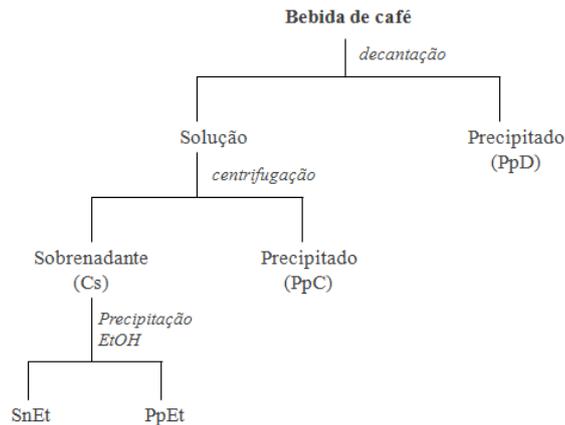
## **2.1. Preparação da bebida de café e extrato solúvel em água fria (Cs)**

De modo a obter os diversos extratos de café a incorporar nas bolachas começou-se por preparar a respetiva bebida de café. Para tal, 400 g de café solúvel (Delta<sup>®</sup>) foram dissolvidas em 1200 mL de água destilada quente (80°C), sob agitação. A bebida resultante foi deixada a arrefecer à temperatura ambiente e posteriormente armazenada na camara fria a 4°C (para permitir a precipitação do material de alto peso molecular). Após 48 h, a bebida foi decantada tendo-se recolhido separadamente o sobrenadante e o precipitado resultante da decantação (ppD) para posterior liofilização. A fração solúvel foi centrifugada a 15000 rpm (Sigma 3K30), 4°C durante 15 min, obtendo-se o sobrenadante, Cs, e o precipitado (PpC). Uma alíquota de 720 mL do sobrenadante Cs assim como o precipitado PpC foram liofilizados e armazenados num exsiccador à temperatura ambiente, até futuro tratamento.

## **2.2. Fracionamento do extrato solúvel em água fria (Cs)**

Uma alíquota de 400 mL do sobrenadante Cs preparado anteriormente foi fracionada recorrendo a uma precipitação etanólica de forma a obter frações ricas em ácidos clorogénicos e melanoidinas. Preparou-se uma solução a 25% (m/v) de extrato Cs em água destilada, a qual foi adicionada lentamente a 800 mL de etanol (96% PA, v/v) através de uma ampola de decantação até aproximadamente 75% etanol:água. Procedeu-se à decantação e filtração da solução, recolhendo-se uma fração solúvel em etanol (SnEt) e um precipitado (PpEt). A fração SnEt foi concentrada, lavada com água e liofilizada. A fração PpEt foi redissolvida em água destilada, lavada e liofilizada. Ambos os extratos SnEt e PpEt, após liofilização, foram armazenados à temperatura ambiente num exsiccador, para posterior análise e aplicação.

Na Figura 16 está resumido o processo de preparação dos extratos de café instantâneo.



**Figura 16 – Esquematização do processo de fracionamento da bebida de café instantâneo.**

### 2.3. Confeção de bolachas

As bolachas analisadas numa primeira parte deste trabalho foram confeccionadas no VÚP Food Institute em Bratislava. O procedimento usado para a confeção das bolachas foi adaptado de Morales *et al.*(8) cujos ingredientes estão descritos na Tabela 2.

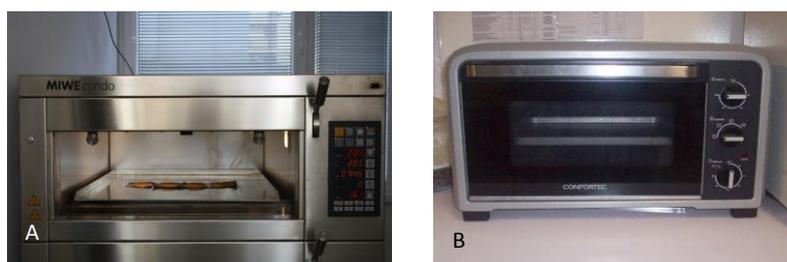
**Tabela 2 – Ingredientes e quantidades para confeccionar bolachas.**

<b>Categoria</b>	<b>Ingrediente</b>	<b>Quantidade (g)</b>
A	Manteiga	16,0
B	Sal	0,3
B	Leite em pó	0,4
B	Frutose	16,8
B	NaHCO <sub>3</sub>	0,4
C	Água destilada	9,3
C	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,2
D	Farinha de trigo	40,0

Colocaram-se os ingredientes da categoria A e B numa taça e misturou-se com a batedeira (Bosch, 450 W) no nível 4 durante 1 min. Esta operação foi repetida mais duas vezes. De seguida adicionaram-se os ingredientes da categoria C e misturou-se com a batedeira no nível 4 durante 30 s. Este processo foi repetido mais uma vez. Nos casos em que houve a adição de extratos de café, estes foram introduzidos nesta fase por dissolução em metade do volume de água. A quantidade adicionada (1, 2 ou 3%) teve como referência a quantidade de farinha usada. Por último, adicionaram-se os ingredientes da categoria D e misturou-se com a batedeira no nível 2, durante 10 s. Esta operação foi repetida mais duas vezes. Uniformizou-se a massa, estendeu-se, esticou-se com a ajuda de um rolo e aplicou-se o

molde de 6 cm de diâmetro para cortar a massa. As bolachas foram confeccionadas a 205°C durante 11 min, usando um forno do tipo industrial (Figura 17, A). Posteriormente foram preparadas bolachas nos nossos laboratórios usando a mesma formulação. Para a cozedura das bolachas foram usadas várias condições de tempo e temperatura, variando entre 160-200°C e 5-20 min, de modo a obter condições aceitáveis ao consumo e bolachas semelhantes às de Bratislava, usando um forno doméstico (Figura 17, B).

Os parâmetros físicos das bolachas como peso, altura e diâmetro foram medidos com auxílio de uma craveira.



**Figura 17 - Fornos usados para a confeção de bolachas: A – forno doméstico, B – forno industrial.**

#### **2.4. Análise de açúcares neutros**

Os extratos de café SnEt e PpEt foram submetidos a uma análise de açúcares neutros. Para tal, procedeu-se à hidrólise ácida dos polissacarídeos existentes nas amostras cujo procedimento foi adaptado de Selvendran *et al.*(67). Pesaram-se rigorosamente entre 1 a 2 mg de cada amostra para tubos de cultura, seguindo-se a adição de 200 µL de ácido sulfúrico a 72% (m/m) (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Fluka, 95-97%) e incubação à temperatura ambiente durante 3 h. Após terminado este período, adicionou-se 1 mL de água destilada perfazendo uma concentração final de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 2 M e efetuou-se a hidrólise durante 1 h num bloco de aquecimento a 120°C. Terminado este período de tempo, os tubos de cultura foram arrefecidos à temperatura ambiente. Procedeu-se à redução e acetilação dos açúcares presentes nas amostras a acetatos de alditol (68). Adicionaram-se 200 µL de padrão interno 2-desoxiglucose (Fluka, ≥98%) 1 mg/mL a cada amostra de onde foram transferidos 0,5 mL para novos tubos de cultura para proceder à neutralização da solução com 200 µL de amoníaco (NH<sub>3</sub>, Fluka) a 25% (m/m). De seguida procedeu-se à redução dos grupos carbonilos e formação dos alditóis através da adição de 100 µL de NaBH<sub>4</sub> (Riedel-de Haën) 15% (m/v) preparada na hora em NH<sub>3</sub> 3 M. Os tubos foram colocados no bloco de aquecimento a 30°C durante 1 h. Posteriormente os tubos foram arrefecidos num banho de gelo e adicionaram-se duas vezes 50 µL de ácido acético glacial para eliminar o excesso de NaBH<sub>4</sub>. Transferiram-se 300 µL de cada amostra para tubos

de sovirel e adicionaram-se 450  $\mu\text{L}$  de 1-metilimidazol (Sigma-Aldrich,  $\geq 99\%$ ) e 3 mL de anidrido acético (Fluka,  $\geq 99\%$ ) o qual reage com os alditóis formando os acetatos de alditol. Os tubos foram devidamente agitados e incubados no bloco de aquecimento a  $30^\circ\text{C}$  durante 30 min. De seguida, com os tubos colocados num banho de gelo, adicionaram-se 3 mL de água destilada de modo a remover o excesso de anidrido acético e 2,5 mL de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Sigma-Aldrich,  $\geq 99\%$ ). Procedeu-se à agitação e centrifugação (KUBOTA 2010) a 3000 rpm durante 30 s para promover a passagem dos acetatos de alditol para a fase orgânica (camada inferior). A fase aquosa (camada superior) foi aspirada por sucção com auxílio de uma pipeta de Pasteur. Voltou-se a adicionar 3 mL de água destilada e 2,5 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , agitaram-se os tubos, centrifugou-se e removeu-se a fase aquosa como descrito anteriormente. Este processo de lavagens foi repetido mais duas vezes para garantir a remoção completa do 1-metilimidazol. Finalmente, a fase orgânica das amostras foi transferida para tubos de *speedvac* para evaporar o  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a pressão reduzida no concentrador de amostras (Univapo 100H). Foi adicionada acetona anidra (2 x 1 mL, Sigma-Aldrich,  $\geq 99,5\%$ ) e evaporada como descrito anteriormente de modo a remover possíveis resíduos de água presentes nos acetatos de alditol. Após a evaporação estar concluída adicionaram-se 50  $\mu\text{L}$  de acetona anidra para dissolver os acetatos de alditol e analisá-los usando o cromatógrafo de fase gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID).

Os acetatos de alditol foram injetados e separados no cromatógrafo (Perkin Elmer – Clarus 400) equipado com uma coluna capilar DB-225 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,15  $\mu\text{m}$  de espessura) de média polaridade, composta por 50% cianopropilfenilo e 50% dimetilpolissiloxano. O gás de arraste utilizado foi o hidrogénio com uma velocidade de 1,7 mL/min. As condições de injeção e programa de temperaturas encontram-se apresentadas na Tabela 3. Os monossacarídeos presentes nas amostras de SnEt e PpEt foram quantificados por correlação com a área do padrão interno (2-desoxi-D-glucose) e as respetivas áreas dos açúcares.

**Tabela 3 - Condições de operação no cromatógrafo e programa de temperaturas utilizado.**

<b>Parâmetros do GC-FID</b>	
<b>Volume de injeção</b>	2 $\mu$ L
<b>Temperatura do injetor</b>	220°C
<b>Temperatura do detetor</b>	230°C
<b>Temperatura inicial</b>	200°C
<b>Rampa 1</b>	até 220°C, 40°C/min; isotérmica durante 7 min;
<b>Rampa 2</b>	até 230°C, 20°C/min; isotérmica durante 1 min.

## **2.5. Análise dos ácidos clorogénicos (CGAs) e cafeína**

A quantificação dos CGAs e cafeína foi feita em colaboração com a Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro e a metodologia usada foi adaptada de Farah *et al.*(69). Alíquotas de 10 g/L de cada extrato foram preparadas e caracterizadas relativamente ao seu conteúdo em CGAs e cafeína com recurso à cromatografia em fase líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), usando um sistema de distribuição de solvente Ultimate 3000 equipado com um detetor *diode array* PD-100 UV-VIS. A separação foi realizada por eluição de gradiente numa coluna C18 ACE 5 (5 Mm de tamanho de partícula, 250 mm x 4,6 mm, Advanced Chromatography Technologies, Scotland). As condições de análise foram as seguintes: o solvente A foi uma mistura de 95:5 água/ácido fórmico (v/v) e o solvente B foi metanol. Uma análise de gradiente linear foi usada durante um período total de corrida de 80 min: começando por 5% de solvente B durante 2 min, aumentando até 80% de solvente B durante 68 min e em seguida uma isocrática durante 8 min, diminuindo o solvente B para 5% durante 2 min e finalmente uma isocrática durante 5 min. O volume de amostra injetado foi de 50  $\mu$ L, o fluxo foi de 0,8 mL/min e a temperatura da coluna manteve-se a 30°C durante a corrida. O eluente foi continuamente monitorizado de 240 a 600 nm com um detetor fotodíodo *array*. A quantificação de todos os CGAs foi realizada a partir de uma curva padrão construída com o ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) e expressa em equivalentes de 5-CQA. A cafeína foi quantificada usando uma curva de calibração construída com recurso a cafeína pura.

## 2.6. Determinação da atividade antioxidante pelo método de ABTS

### 2.6.1. Determinação nos extratos de café

Para avaliar a atividade antioxidante dos extratos de café foi necessário proceder à extração dos compostos responsáveis pela sua atividade. Para isso pesaram-se 5 mg de cada extrato de café em tubos de cultura e adicionaram-se 5 mL de água destilada, obtendo-se uma solução de concentração 1 mg/mL. A partir desta solução prepararam-se soluções diluídas com fatores de diluição 2, 5, 10, 20, 30 e 50, para cada extrato a analisar. O método para avaliar a atividade antioxidante dos extratos de café foi adaptado de Dudonné *et al.* (70). Preparou-se uma solução de ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) 7 mM em persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ). Para isto foram pesadas 3,31 mg de  $K_2S_2O_8$  (Fluka,  $\geq 99\%$ ) e dissolvidas em 5 mL de água destilada. De seguida dissolveram-se 19,2 mg do reagente ABTS (Sigma-Aldrich,  $\geq 98\%$ ) na solução de persulfato de potássio produzindo o radical  $ABTS^{+\cdot}$ . A solução resultante foi armazenada num local escuro à temperatura ambiente, durante um período de 12 a 16 h.

Para proceder à análise espectrofotométrica diluíram-se 0,5 mL da solução de  $ABTS^{+\cdot}$  em 40 mL de etanol e mediu-se a absorvância a 734 nm no espectrofotómetro (Jenway 6405 UV/VIS). A concentração dessa solução foi ajustada de modo a que a absorvância se situe entre 0,700-0,800. Em células de volume reduzido, adicionou-se 1 mL de solução  $ABTS^{+\cdot}$  a 100  $\mu$ L de amostra, deixando reagir durante 15 min no escuro. Fizeram-se ensaios em branco para o método (1 mL de ABTS com 100  $\mu$ L de água destilada). A atividade antioxidante dos extratos de café foi expressa sob percentagem de inibição do radical  $ABTS^{+\cdot}$ , de acordo com a seguinte expressão:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{Abs(\text{inicial}) - Abs(\text{após 15 min})}{Abs(\text{inicial})} \times 100 \quad [\text{Equação 1}]$$

### 2.6.2. Extração dos compostos antioxidantes das bolachas e determinação da sua atividade antioxidante

O procedimento aplicado às bolachas foi adaptado de Morales *et al.* (8). Em primeiro lugar testaram-se dois solventes de extração (água e etanol) com o objetivo de identificar o solvente que extrai mais compostos. Realizaram-se 6 extrações para cada amostra, pensando-se 25, 50, 75, 100, 125 e 150 mg de bolacha enriquecida com um dos extratos de café para tubos de cultura, adicionaram-se 5 mL de água destilada para um ensaio e 5 mL de etanol para

outro ensaio. Agitou-se vigorosamente para promover a homogeneização e colocaram-se os tubos em banho a 40°C durante 1 h, com agitação magnética, para extrair o máximo de compostos antioxidantes. Terminada a incubação, os tubos foram centrifugados (KUBOTA 2010) a 4000 rpm durante 10 min e o sobrenadante foi filtrado com papel de filtro suspenso dentro de pipetas de Pasteur. Contudo o procedimento de extração sofreu uma otimização onde se testou a eficiência de 3 extrações sucessivas. A quantidade de bolacha a pesar foi ajustada e removeu-se o passo de incubação. Assim sendo, pesaram-se massas de 15, 25, 40, 50, 75 e 100 mg de cada tipo de bolacha e adicionou-se o mesmo volume de água destilada (5mL). Os tubos de cultura foram agitados manualmente, de forma vigorosa durante alguns min, à temperatura ambiente e de seguida foram centrifugados como anteriormente.

A atividade antioxidante das bolachas foi expressa sob percentagem de inibição do radical ABTS<sup>+</sup>, tal como nos extratos de café. A atividade antioxidante das bolachas foi monitorizada durante um período máximo de 15 semanas, de modo a concluir sobre a estabilidade da mesma ao longo do tempo.

## **2.7. Quantificação da acrilamida em bolachas por cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (LC/ESI-MS-MS)**

O desenvolvimento deste projeto ocorreu com a colaboração do VÚP Food Research Institute de Brastislava. Neste instituto a quantificação da acrilamida em alimentos foi feita por um procedimento devidamente implementado e validado. O procedimento detalhado encontra-se descrito por Ciesarová *et al.* (71) A extração foi realizada com ácido acético (0,2 mM) e a posterior pré-extração com acetato de etilo para evitar a perda de sinal cromatográfico devido à presença de sais no sistema, tendo sido adaptado de Gokmen *et al.* (72). A amostra homogenizada com ácido acético e acetato de etilo é centrifugada, adiciona-se padrão interno e as soluções Carrez I e II para precipitar material que poderia ser co-extraído. O procedimento é complexo passando por uma sequência de adição de acetato de etilo e evaporações até à *secura*. A análise da acrilamida foi efetuada por LC/ESI-MS-MS com um equipamento de HPLC série 1200 (Agilent Technologies) acoplado a um detetor triplo quadrupolo Agilent 6410 com ionização por *electrospray* (ESI).

## 2.8. Quantificação da acrilamida em soluções modelo por cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID)

O método para a extração da acrilamida utilizando soluções modelo foi adaptado de Jezussek *et al.* (73). Durante a concentração da acrilamida por evaporação do solvente de extração (água:1-propanol) ocorrem perdas da mesma. A inserção de um óleo durante o processo de evaporação permite a retenção da acrilamida minimizando as suas perdas.

Fizeram-se ensaios utilizando alíquotas de 5 ml de uma solução aquosa de acrilamida (Sigma-Aldrich,  $\geq 99\%$ ) 5 mg/ml. A cada uma destas alíquotas adicionou-se igual volume de 1-propanol (Lab-scan,  $\geq 99,5\%$ ) e 10 gotas de óleo vegetal (óleo de girassol Fula<sup>®</sup>). De seguida evaporou-se a solução num evaporador rotativo (Buchi, Rotavapor R-114) a 50°C. Ao resíduo de óleo resultante, adicionaram-se 5 mL de água destilada, promovendo a passagem da acrilamida para este solvente. Procedeu-se ao desengorduramento da amostra adicionando 5 mL de *n*-hexano o qual foi removido por aspiração. Este processo de lavagem foi repetido mais uma vez. Em vials de 7 mL colocou-se uma alíquota desta solução e adicionou-se o padrão interno (butiramida, Fluka,  $\geq 98\%$ ) dissolvido em acetona, perfazendo uma concentração de 2,5 mg/mL para ambos os compostos. A extração por microextração em fase sólida no espaço de cabeça (HS-SPME) ocorreu durante 60 min num banho termostaticado a 60°C. Este procedimento foi comparado com uma solução controlo contendo uma alíquota da solução aquosa de acrilamida e uma alíquota da solução de butiramida em acetona (Concentração<sub>final</sub>=2,5 mg/mL), sem a adição do óleo.

A fibra utilizada é revestida por três polímeros, nomeadamente, DVB/CAR/PDMS. Esta fibra combina os efeitos de adsorção e absorção da fase estacionária promovendo uma grande capacidade de retenção e, conseqüentemente, uma grande sensibilidade. Antes da sua utilização a fibra foi condicionada no injetor a 250°C durante 2 h de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, a fibra foi condicionada no injetor a 250°C durante 5 min.

A fibra com os compostos adsorvidos foi introduzida no injetor do cromatógrafo de gás para dessorção dos mesmos, onde permaneceu durante 3 minutos. O cromatógrafo utilizado Perkin Elmer – Clarus 400 possui um detetor de ionização de chama (FID) e está equipado com uma coluna capilar DB-FFAP (30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro, 0,25 µm de espessura e constituída por polietilenoglicol – ácido nitrotereftálico modificado). O gás de arraste utilizado foi o hidrogénio com uma velocidade de 1,7 mL/min. As condições usadas encontram-se apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4 – Condições de operação no cromatógrafo e programa de temperaturas utilizado.**

<b>Parâmetros do GC-FID</b>	
<b>Temperatura do injetor</b>	125°C
<b>Temperatura do detetor</b>	230°C
<b>Temperatura inicial</b>	75°C
<b>Rampa 1</b>	Isotérmica durante 1 min; até 165°C, 25°C/min; Isotérmica durante 2 min;
<b>Rampa 2</b>	até 230°C, 45°C/min; Isotérmica durante 4 min;

## **2.9. Desenvolvimento da metodologia para extração da acrilamida por microextração em fase sólida no espaço de cabeça (HS-SPME) em soluções modelo**

A metodologia de HS-SPME aplicada à extração da acrilamida foi adaptada de Rocha *et al.* (58) com o objetivo de desenvolver um método rápido e simples, eliminando os passos de concentração e purificação da amostra anteriormente descritos. Foram efetuados uma série de ensaios, variando alguns parâmetros experimentais. Utilizaram-se frascos de SPME 130 mL, onde a solução ocupa um terço do seu volume, isto é, 40,00 mL. Utilizaram-se barras magnéticas de tamanho adequado aos frascos (2 cm) e uma quantidade de sal de 5 g. O solvente de extração utilizado foi uma mistura água:1-propanol (50:50) e a extração decorreu durante 30 min no espaço de cabeça. O efeito da temperatura de extração (40°C e 60°C) também foi testado. Na Tabela 5 que se segue são apresentados, de um modo geral, os parâmetros experimentais que foram testados utilizando soluções modelo. O equipamento utilizado bem como os parâmetros de análise foram os mesmos do ponto anterior.

**Tabela 5 – Parâmetros experimentais testados para otimizar as condições de extração, detecção e quantificação da acrilamida, em soluções modelo.**

<b>Condições experimentais</b>	
<b>Frascos de SPME</b>	130 mL
<b>Quantidade de sal</b>	5, 6 e 14,4 g
<b>Solventes</b>	Acetona, acetona:água(25:75, 50:50, 75:25), Água:1-propanol (50:50)
<b>Padrão interno</b>	Butiramida
<b>Tempo de extração</b>	60 e 30 min
<b>Temperatura de extração</b>	40 e 60°C

## 2.10. Detecção e quantificação da acrilamida por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

No sentido de aumentar a sensibilidade da análise da acrilamida passou-se a efetuar a detecção utilizando o GC-MS uma vez que a quantidade de acrilamida que deverá existir numa bolacha é cerca de 13,6 µg, não sendo possível detetar estes valores por GC-FID.

De todas as condições experimentais testadas foram selecionados os seguintes parâmetros: frascos de SPME de 130 mL, 5 g de sal, água:1-propanol (50:50) como solvente de extração, tempo e temperatura de extração de 60 min e 40°C. Para além dos parâmetros testados anteriormente introduziu-se agora um passo de termostatização da amostra testando as temperaturas de 40 e 80°C por períodos de tempo de 15, 30 e 60 min. Testaram-se também quantidades de acrilamida e butiramida de 250, 25 e 2,5 µg/mL e períodos de extração no espaço de cabeça de 30 e 60 min. Terminado o período de exposição da fibra os compostos foram dessorvidos no injetor do cromatógrafo de gás. A separação e identificação da acrilamida e butiramida foram feitas utilizando o cromatógrafo Agilent Technologies 6890 Network GC System acoplado a um espectrómetro de massa Agilent 5973 Network Mass Selective Detector. O cromatógrafo estava equipado com uma coluna DB-FFAP, tal como anteriormente. O injetor e a linha de transferência estavam a 200°C e a injeção ocorreu em modo *splitless*. O gás de arraste utilizado foi o hélio com um fluxo de 1,7 mL/minuto e a pressão na cabeça da coluna foi de 3,53 psi. Aplicou-se solvente *delay* aos 2 min de corrida. O espectrómetro de massa operou com uma energia de impacto eletrónico (EI) de 70 eV. Nestas análises o modo de aquisição ocorreu em *full scan* e o programa de temperaturas aplicado encontra-se descrito na Tabela 6.

Tabela 6 – Programa de temperaturas aplicado para análise no GC-MS.

Parâmetros do GC-MS	
Temperatura do injetor	200°C
Temperatura inicial	60°C
Rampa 1	isotérmica durante 1 min até 120°C, 20°C/min (0 min)
Rampa 2	até 140°C, 2°C/min (0 min)
Rampa 3	até 230°C, 20°C/min isotérmica durante 2 min

Dado que a quantidade de acrilamida presente numa bolacha será inferior às concentrações analisadas anteriormente testou-se uma concentração de 0,25 µg/mL para a acrilamida e butiramida. Mantiveram-se todos os parâmetros de detecção usados até então variando apenas o modo de aquisição do cromatograma para SIM, monitorizando os iões de m/z 52, 55, 70, 71 para a acrilamida e os iões de m/z 59, 72 e 87 para a butiramida.

### **2.11. Extração por HS-SPME e detecção e quantificação da acrilamida em bolachas por GC-MS**

Após a detecção da acrilamida e butiramida em soluções modelo de concentrações 0,25 µg/mL testou-se o método de extração analisando amostras reais, ou seja, a bolacha diretamente. Para isto pesaram-se 5 g de sal para frascos de SPME de 130 mL, 8 g (bolacha inteira) e 4 g (meia bolacha) de bolacha macerada, colocou-se um agitador magnético de 4 cm e adicionou-se 20 mL de solução aquosa de butiramida, resultando numa concentração final de 0,25 µg/mL. As condições de extração da acrilamida para o solvente foram adaptadas de Jezussek *et al.*(73). Utilizou-se água para o efeito de “swelling” da amostra, colocou-se em ultrassons durante 15 min e adicionou-se 1-propanol para aumentar a extratibilidade da acrilamida para a mistura água:propanol. O frasco de SPME foi novamente colocado em ultrassons por mais 15 min. Após a preparação da amostra, esta foi termostatizada a 40±0,1°C durante 15 min sob agitação a 200 rpm e a extração por exposição da fibra no espaço de cabeça ocorreu durante 60 min. A análise cromatográfica ocorreu como descrito anteriormente, em modo SIM, usando o mesmo programa de temperaturas da Tabela 6.

De modo a construir uma curva de calibração para o método em questão e que permita quantificar a acrilamida presente em alimentos foram analisadas uma série de soluções modelo contendo uma quantidade fixa de padrão interno e variando na quantidade de acrilamida adicionada. A cada um dos frascos de SPME foram adicionados 200 µL de uma solução aquosa de butiramida 50 µg/mL, 20 mL de água destilada, 20 mL de 1-propanol e diferentes quantidades de uma solução aquosa de acrilamida 50 µg/mL, nomeadamente 0, 10, 20, 40, 100, 200, 400 e 1000 µL, de modo que na solução final a concentração da butiramida seja 0,25 µg/mL e a acrilamida varia entre 0,00 e 1,21 µg/mL. Os padrões foram termostatizados durante 15 min a 40°C e a extração ocorreu durante 60 min à mesma temperatura. Mantiveram-se os mesmos parâmetros de detecção como no ponto anterior.

Alternativamente, quantificou-se a acrilamida em bolachas pelo método de adição padrão. Para tal, pesaram-se 4 g de bolacha para cada frasco de SPME, adicionou-se o padrão

interno como anteriormente (200  $\mu\text{L}$  de butiramida 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e diferentes quantidades de acrilamida (0, 40, 100, 200, 400 e 600  $\mu\text{L}$  de acrilamida 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) cujas quantidades variam entre 0,0 e 30,0  $\mu\text{g}$ .

### **3. Discussão de Resultados**



### 3.1. Fracionamento da bebida de café instantâneo

Para a obtenção dos diversos extratos, 400 g de café instantâneo (Delta<sup>®</sup>) foram solubilizadas em água a ferver, sob agitação magnética. A solução resultante foi arrefecida a 4°C proporcionando a precipitação do material insolúvel em água fria. A Figura 16 (secção 2.2) mostra o esquema alusivo ao fracionamento do café instantâneo. Ao efetuar-se a decantação da solução recolheram-se 24,7 g de um precipitado, PpD (precipitado da decantação) que corresponde a 6% da massa de café solubilizada. O sobrenadante foi submetido a centrifugação para remover partículas em suspensão e como resultado obtiveram-se mais 36,8 g de precipitado, PpC, correspondente a 9% da massa de café inicial. Relativamente ao sobrenadante (Cs) resultante da centrifugação obtiveram-se 338,3 g, correspondendo a 85% da massa inicial (Tabela 7). O fracionamento da bebida de café instantâneo apresentou um rendimento de 100%, não se obtendo quaisquer perdas de material.

**Tabela 7 - Fracionamento e caracterização dos extratos obtidos a partir do café instantâneo.**

	PpD	PpC	Cs	SnEt	PpEt
$\eta$ (% m/m <sub>café</sub> )	6	9	85	-	-
$\eta$ (% m/m <sub>Extrato Cs</sub> )	-	-	-	35	37
Total açúcares (%)	-	-	-	24,4	69,4
Açúcares (mol %)					
Rha	-	-	-	2,2	0,9
Ara	-	-	-	17,3	7,6
Man	-	-	-	36,3	26,0
Gal	-	-	-	38,3	64,0
Glc	-	-	-	5,9	1,3
Xyl	-	-	-	-	0,4
Total CGAs (g/100 g <sub>extrato</sub> )	-	-	0,83	1,15	0,22
CGAs (% m/m <sub>Extrato</sub> )					
3-CQA	-	-	0,17	0,24	0,04
3-CoCQA	-	-	0,05	0,08	0,02
5-CQA	-	-	0,46	0,63	0,12
4-CQA	-	-	0,05	0,08	0,01
5-CoCQA	-	-	0,08	0,11	0,02
Cafeína (g/100 g <sub>extrato</sub> )	-	-	1,04	1,59	0,12
Ec <sub>50</sub> (mg)	-	-	-	0,013	0,027

Os campos preenchidos com “-” não foram analisados.

O fracionamento do sobrenadante, Cs, por precipitação em 75% etanol, resultou na separação do material de elevada massa molecular originando uma fração insolúvel em etanol, PpEt, e uma fração solúvel, SnEt. Deste modo, obtiveram-se 148,1 g para a fração PpEt, que correspondem a 37% do extrato Cs, e 140,8 g para a fração SnEt, que correspondem a 35%

(Tabela 7). O rendimento da precipitação em etanol foi de 72%, verificando-se a ocorrência de perdas de material na separação de frações. Visualmente, verificou-se que o extrato SnEt era mais claro do que o extrato Cs e o extrato PpEt era mais escuro. Os extratos obtidos nesta precipitação, SnEt e PpEt, correspondem respectivamente a 30 e 31% da massa de café instantâneo inicialmente usada. Sendo os extratos SnEt e PpEt, obtidos a partir do Cs os maioritários, procedeu-se à sua caracterização química.

### **3.2. Caracterização dos extratos de café**

#### **3.2.1. Composição em açúcares, CGAs e cafeína**

Os extratos SnEt e PpEt foram submetidos a uma análise quantitativa dos açúcares neutros. O extrato SnEt apresentou uma composição de 38,3, 36,3 e 17,3% em galactose, manose e arabinose, respectivamente (Tabela 7). Os açúcares existentes na bebida de café são maioritariamente polissacarídeos, nomeadamente, arabinogalactanas e galactomananas que precipitam em soluções de 75% etanol:água (74). No entanto, o processo de torra resulta também na degradação de alguns polissacarídeos a oligossacarídeos e monossacarídeos, derivados das arabinogalactanas e galactomananas, que devido à sua baixa massa molecular não precipitam em 75% de etanol. O elevado conteúdo em arabinose, um açúcar muito lábil, pode ser identificativo desta despolimerização. No caso do extrato PpEt, a galactose e a manose são os açúcares neutros mais abundantes, com percentagens molares de 64,0 e 26,0%, respectivamente. Esta composição é representativa da presença de arabinogalactanas e galactomananas, polissacarídeos de maior massa molecular do que os encontrados no extrato SnEt. Comparando os dois extratos, verifica-se uma maior quantidade total de açúcares neutros no extrato PpEt (69,4%) quando comparado com o extrato SnEt (24,4%). Os compostos glicosídicos solúveis em etanol possuem geralmente massa molecular menor do que os que precipitam em etanol. Assim, pode-se inferir que o extrato SnEt possui maior quantidade de açúcares redutores (importantes precursores na formação de acrilamida) do que o extrato PpEt. O extrato SnEt possui ainda uma grande quantidade de material que não foi caracterizado. É possível que tal se deva à presença de sais minerais, constituintes da bebida de café instantâneo, e que não precipitam em soluções de etanol.

A análise por HPLC aos extratos SnEt, PpEt e Cs permitiu caracterizá-los quantitativamente em relação à sua composição em ácidos clorogénicos (CGAs) livres e cafeína, cujos resultados se encontram na Tabela 7. O extrato com maior conteúdo em CGAs é o extrato SnEt (1,15 g/100 g<sub>extrato</sub>), seguindo-se o Cs (0,83 g/100 g<sub>extrato</sub>) e o PpEt (0,22

g/100 g<sub>extrato</sub>). Estes resultados demonstram que o fracionamento por precipitação em etanol permite a separação dos CGAs, com enriquecimento destes compostos na fração SnEt e consequente empobrecimento na fração PpEt. O ácido 5-*O*-cafeoilquínico (5-CQA) é o CGA maioritário, representando entre 55 e 57% do total de CGAs em todos os extratos. Em relação ao conteúdo em cafeína, verifica-se que o extrato SnEt possui a maior quantidade de cafeína (1,59 g/100 g<sub>extrato</sub>), seguido do extrato Cs (1,04 g/100 g<sub>extrato</sub>) e do extrato PpEt (0,12 g/100 g<sub>extrato</sub>) (Tabela 7).

### 3.2.2. Avaliação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante dos extratos baseou-se na medição da percentagem de inibição do radical ABTS, a qual foi determinada através da quantidade de massa de extrato necessária para reduzir a absorvância da solução de ABTS para metade (EC<sub>50</sub>). Desta forma, quanto menor for o valor de EC<sub>50</sub>, maior será a atividade antioxidante do extrato. A determinação do EC<sub>50</sub> pressupõe a representação da percentagem de inibição em função de diferentes massas de extrato, tal como se encontra exemplificado na Figura 18.

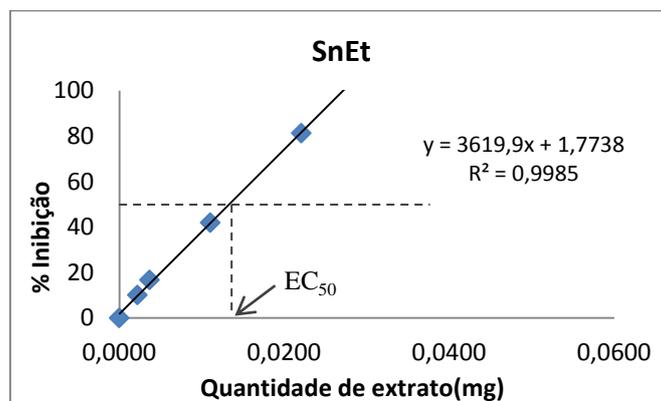


Figura 18 - Representação gráfica exemplificando a determinação do EC<sub>50</sub> para o extrato SnEt.

O extrato SnEt (EC<sub>50</sub>=0,013 mg) apresentou o dobro da atividade antioxidante do extrato PpEt (EC<sub>50</sub>=0,027 mg) (Tabela 7). O resultado observado pode ser relacionado com o facto do extrato SnEt ter 4 vezes mais CGAs livres do que o PpEt. No entanto, o facto do extrato SnEt apresentar apenas 2 vezes mais atividade antioxidante do que o PpEt pode ser justificado pela presença de CGAs ligados à estrutura das melanoidinas, que deverão existir em maior quantidade no extrato PpEt e que não são quantificados pelo método de HPLC utilizado. Além dos CGAs, também as melanoidinas e os compostos nitrogenados contribuem para a

atividade antioxidante da bebida de café instantâneo e, conseqüentemente, dos extratos obtidos a partir desta bebida.

### 3.3. Caracterização das bolachas

#### 3.3.1. Parâmetros físicos das bolachas

Na Tabela 8 estão apresentados os parâmetros físicos avaliados nas bolachas com e sem extratos de café confeccionadas num forno industrial a 205°C durante 11 min (confeção das bolachas no VÚP Food Institute – Bratislava). Observou-se em todos os casos um escurecimento da bolacha quando se adicionaram os extratos de café por comparação com as bolachas de controlo e que é proporcional ao aumento da quantidade de extrato adicionado. Como o extrato PpEt é o mais escuro, verificou-se que também as bolachas com PpEt são mais escuras. Não se observou uma alteração estatisticamente significativa no peso e no diâmetro das bolachas. Em contrapartida, verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa na altura das bolachas.

**Tabela 8 -Parâmetros físicos das bolachas de controlo e enriquecidas com os extratos Cs, SnEt e PpEt em diferentes proporções confeccionadas num forno industrial.**

Amostra	% Extrato	Peso (g)	Altura (mm)	Diâmetro (mm)	Cor
Controlo	0	12,93±0,48	7,27±0,34	67,52±1,18	
	1	13,25±0,26	7,01±0,14*	68,63±1,15	
	5	13,20±0,19	6,24±0,10*	69,55±1,19*	
Cs	10	13,26±0,31	6,32±0,26*	68,40±1,67	
	1	12,92±0,19	6,48±0,22*	68,62±2,11	
	5	12,82±0,49	6,18±0,40*	69,15±1,34*	
SnEt	10	13,04±0,18	5,66±0,13*	68,75±0,89	
	1	12,99±0,07	6,92±0,13*	69,38±1,19*	
	5	13,29±0,31	6,46±0,19*	68,15±1,44	
PpEt	10	13,65±0,06*	6,24±0,20*	68,49±1,35	

\*Significativamente diferente do controlo (P<0,05)

#### 3.3.2. Atividade antioxidante das bolachas

Para a determinação da atividade antioxidante das bolachas foi necessário escolher um solvente que permitisse a extração dos compostos com atividade antioxidante. De acordo com a bibliografia, para o método de ABTS podem ser utilizados água ou o etanol como solventes, podendo ser analisados compostos hidrofílicos e lipofílicos (70). De acordo com a Tabela 9, a

água parece proporcionar uma maior atividade antioxidante do que o etanol, para a primeira extração. No entanto, este resultado não é conclusivo uma vez que não foi possível efectuar réplicas para esta extração com água. A exposição da bolacha à água e ao etanol em extrações sucessivas mostra que a maior parte dos compostos com atividade antioxidante foi obtida na primeira extração. Este efeito é mais visível na água. Assim, optou-se pela água como solvente de extração utilizando-se apenas uma extração. Este método só quantifica a atividade antioxidante dos compostos que passam para o sobrenadante, tratando-se neste caso de compostos hidrofílicos, pelo que a atividade antioxidante dos compostos que ficam retidos na matriz não é estimada.

**Tabela 9 - Resultados das extrações sucessivas dos compostos antioxidantes de bolachas preparadas com 10% de SnEt.**

Amostra	Extração	EC <sub>50</sub> (mg de bolacha)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1 <sup>a</sup>	11,67
	2 <sup>a</sup>	81,87±19,08
	3 <sup>a</sup>	101,99±9,37
<b>EtOH</b>	1 <sup>a</sup>	20,48±1,09
	2 <sup>a</sup>	46,16±10,62
	3 <sup>a</sup>	65,99±38,78

A atividade antioxidante das bolachas enriquecidas com os extratos de café (Cs, SnEt e PpEt) foi efetuada, em primeiro lugar, uma a duas semanas após a sua confeção (t=[1-2]<sub>semanas</sub>) e repetida após oito a quinze semanas (t=[8-15]<sub>semanas</sub>) (Tabela 10).

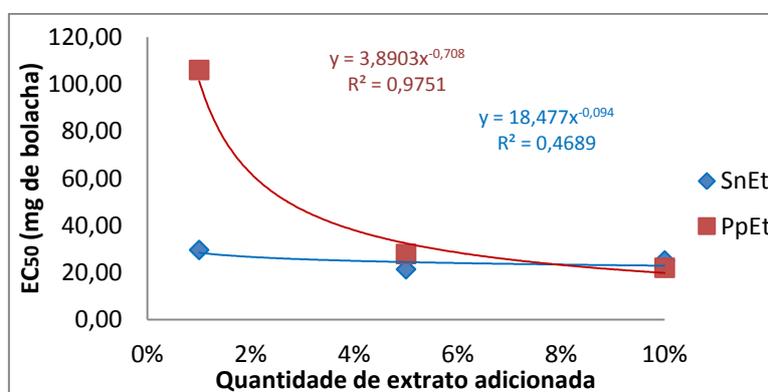
**Tabela 10 – Caracterização das bolachas controlo e com adição de diferentes concentrações de extrato de café em termos de: atividade antioxidante, cafeína e acrilamida.**

Bolachas	EC <sub>50</sub> (mg) t=[1-2] <sub>semanas</sub>	Diminuição EC <sub>50</sub> (%) <sup>*</sup>	EC <sub>50</sub> (mg) t=[8-15] <sub>semanas</sub>	Cafeína mg/bolacha	NºB <sup>**</sup>	Acrilamida (µg/kg <sub>bolacha</sub> )
<b>Controlo</b>	122,9	-	172,1±9,1	-	-	209±38
<b>Extrato (%)</b>						
<b>Cs</b>	1	-	90,1±2,7	0,69	54	203±5
	5	-	39,0±1,7	3,45	11	237±5
	10	-	19,4±0,3	6,9	5	191±4
<b>SnEt</b>	1	29,6	27,0±0,2	1,06	35	207±5
	5	21,4	24,8±1,4	5,31	7	274±3 <sup>***</sup>
	10	25,2	20,1±0,0	10,63	4	201±6
<b>PpEt</b>	1	106,1	76,6±2,3	0,08	467	211±9
	5	27,9	35,3±1,4	0,40	93	146±3 <sup>***</sup>
	10	22,06	20,9±1,1	0,80	47	194±4

<sup>\*</sup> Em relação ao valor do controlo. <sup>\*\*</sup> Número de bolachas equivalentes a 1 café (50 mL com 37,5 mg<sub>cafeína</sub>). <sup>\*\*\*</sup> Significativamente diferente do controlo (P<0,05)

As bolachas do grupo de controlo não têm adição de extratos de café, funcionando como referência para as análises seguintes. A adição dos extratos de café causou uma diminuição no valor de EC<sub>50</sub> da bolacha. A adição de 1% de extrato SnEt e PpEt conduziu a um aumento em 14 e 76% da atividade antioxidante das bolachas, respetivamente. Verifica-se assim que, tal como na análise aos extratos em que o extrato SnEt possuía maior atividade antioxidante quando comparado com o extrato PpEt, esta relação foi preservada durante a confeção das bolachas.

A adição de 5% de extrato provocou uma diminuição do Ec<sub>50</sub> em 83 e 77% respetivamente, para as bolachas com extrato SnEt e PpEt, comparativamente com o grupo de controlo. O aumento em cinco vezes na concentração de SnEt não se traduziu num aumento correspondente na atividade antioxidante, possivelmente pela formação de material insolúvel em água, proveniente da reação dos açúcares presentes no extrato SnEt e os CGAs. Este efeito pode explicar também a não alteração da atividade antioxidante das bolachas em que foram adicionados 10% de extratos SnEt e PpEt. Assim, todas as bolachas apresentam um valor máximo (1 e 5%, respetivamente para a adição de extrato SnEt e PpEt) a partir do qual não se verifica um aumento na atividade antioxidante das bolachas (Tabela 10 e Figura 19).



**Figura 19 – Variação do EC<sub>50</sub> da atividade antioxidante das bolachas com a quantidade de extrato de café adicionado.**

A análise à atividade antioxidante das bolachas ao fim de 8 a 15 semanas mostra que o valor de EC<sub>50</sub> para as bolachas controlo aumentou 40% (Tabela 10). No entanto, as bolachas em que se adicionaram extrato SnEt e PpEt apresentaram valores semelhantes entre as duas medições. Apesar da segunda análise não ter ocorrido num mesmo período de tempo, variando entre 8 e 15 semanas, verificou-se que a adição dos extratos em diferentes quantidades preservou a atividade antioxidante das bolachas. Tal efeito está de acordo com a adição de extratos vegetais de acácia-branca e uvas com efeito antioxidante, em bolachas (11).

A par da preservação da atividade antioxidante, o aumento do prazo de validade também é uma consequência da adição destes extratos, podendo eventualmente impedir a oxidação da matéria gorda (10, 11, 75).

Como a cafeína não é degradada durante o processamento térmico à temperatura de cozedura das bolachas, a adição dos extratos permite obter bolachas enriquecidas em cafeína. Tomando como exemplo o caso das bolachas com 1% de Cs, em que foram adicionados 0,4 g de extrato na massa de bolachas, resultando na confeção 6 bolachas, é possível estimar que uma bolacha com 1% de extrato Cs terá o equivalente a 0,69 mg de cafeína. Por analogia a um café expresso, que tem aproximadamente 37,5 mg de cafeína, seria necessário ingerir 54 bolachas Cs 1% (Tabela 10). Deste modo, a ingestão de 4 bolachas SnEt enriquecidas com 10% deste extrato permite obter o mesmo efeito de um café expresso. Em contrapartida, para obter tal efeito a partir de bolachas enriquecidas com o extrato 1% PpEt seria necessário ingerir 467 bolachas, dado que este extrato possui baixa quantidade de cafeína. Estes resultados mostram que, enquanto o extrato SnEt permite obter bolachas que poderão ser usadas para uma formulação energética, o extrato PpEt pode ser usado para uma formulação sem que seja necessário declarar a presença de cafeína.

### 3.3.3. Quantificação da acrilamida

A Tabela 10 (página 39) mostra os resultados obtidos para a quantificação de acrilamida nas diversas bolachas com e sem extratos de café adicionados. Observou-se um valor na ordem dos 200  $\mu\text{g}$  de acrilamida por kg de bolacha, quer para as bolachas do grupo de controlo (209  $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{bolacha}}$ ) quer para a adição de 1% de Cs (203  $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{bolacha}}$ ), SnEt (207  $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{bolacha}}$ ) ou PpEt (210  $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{bolacha}}$ ). Com o aumento do extrato adicionado até 5%, verifica-se um aumento estatisticamente significativo (31%) quando comparado com o controlo para o extrato SnEt e uma diminuição (29%) com a adição do extrato PpEt. Estes resultados sugerem que a maior quantidade de açúcares redutores presentes no extrato SnEt pode estar a contribuir para a formação de acrilamida. No caso do extrato PpEt, os hidratos de carbono estão sob a forma de polissacarídeos, não contribuindo para a formação de acrilamida. Por outro lado, a presença de compostos antioxidantes leva à diminuição da formação de acrilamida possivelmente devido à inibição da oxidação lipídica, uma das vias possíveis para a formação de acrilamida como descrito por Kocadagli *et al.* (76). No entanto, aumentando a quantidade de extrato adicionado às bolachas para 10%, obtiveram-se valores próximos dos do controlo, para todos os extratos (Tabela 10), mostrando que a mitigação da

acrilamida pelos extratos de café poderá estar dependente da quantidade adicionada, tal como observado por Kotsiou *et al.* (7). Desta forma, parece ocorrer um balanço entre a formação de acrilamida e a sua eliminação. Alguns autores sugerem que a sua eliminação ocorre por degradação a temperaturas superiores a 220°C (10).

Além da quantificação da acrilamida em bolachas confeccionadas com sacarose também foram quantificados os níveis em bolachas cuja formulação incluiu frutose, um açúcar que tem sido descrito como mais reativo do que a sacarose para a formação de acrilamida (34). Comparando os resultados entre as bolachas confeccionadas com frutose e as bolachas confeccionadas com sacarose (Tabela 10 e 11) observa-se que a utilização de frutose levou a um aumento considerável dos níveis de acrilamida em todas as bolachas, obtendo-se um valor de 1718  $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{bolacha}}$  para o controlo, corroborando o que se encontra na literatura. A adição de extrato SnEt não originou um aumento significativo na quantidade de acrilamida nas bolachas em relação ao controlo. A adição de 5% de PpEt nas bolachas confeccionadas com frutose originou uma diminuição de 9%, um valor inferior ao verificado nas bolachas confeccionadas com sacarose (29%). Deste modo conclui-se que o efeito dos compostos antioxidantes do PpEt nos níveis de acrilamida, apesar de em valor absoluto ter levado a uma maior diminuição nas bolachas confeccionadas com frutose, a percentagem de diminuição de acrilamida foi mais acentuada nas bolachas confeccionadas com sacarose.

**Tabela 11 - Níveis de acrilamida determinados em bolachas cuja formulação inclui frutose, obtidas sem extrato de café (controlo) e com a adição de extratos de café (1, 5 e 10%).**

Amostra	(%) Extrato adicionado	Acrilamida ( $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{bolacha}}$ )
<b>Controlo</b>		1718±137
<b>SnEt</b>	1	1911±2
	5	1809±18
	10	1793±6
<b>PpEt</b>	5	1560±8*

\* Significativamente diferente do controlo (P<0,05)

### **3.4. Desenvolvimento de uma metodologia para quantificação da acrilamida por cromatografia em fase gasosa**

Com o objetivo de obter um método simples e direto de análise da acrilamida em bolachas, foi desenvolvida uma metodologia com base na microextração em fase sólida no espaço de cabeça (HS-SPME) e análise por cromatografia em fase gasosa (GC).

### 3.4.1. Detecção da acrilamida em soluções modelo por GC-FID

A análise por HS-SPME utilizando um cromatógrafo de gás com detetor de ionização por chama (GC-FID) de uma solução padrão de acrilamida, mostrou que esta metodologia permite a sua deteção (Tabela 12). No entanto, a utilização de uma solução de butiramida como padrão interno mostra variabilidade nos resultados, como se pode verificar entre as réplicas (ensaios A e B), efetuadas em dias diferentes. Como a concentração de acrilamida é geralmente baixa, é necessário proceder a um passo de concentração por evaporação do solvente na presença de um óleo vegetal. Este passo, no entanto, permite na mesma detetar a acrilamida presente na amostra (ensaio C).

**Tabela 12 – Resultados para análise da acrilamida por GC-FID em soluções modelo de 2,5 mg/mL de acrilamida e butiramida.**

Ensaio		Área Butiramida	Área Acrilamida	Razão entre áreas (AA/BA) <sup>a</sup>
A*	Controlo	142160	98217	0,69
B*	Controlo	121546	25688	0,21
C**	Teste evaporação	216185	48267	0,20

<sup>a</sup>) Acrilamida (AA), Butiramida (BA); <sup>\*</sup>) Solução controlo, sem concentração por evaporação da acrilamida;

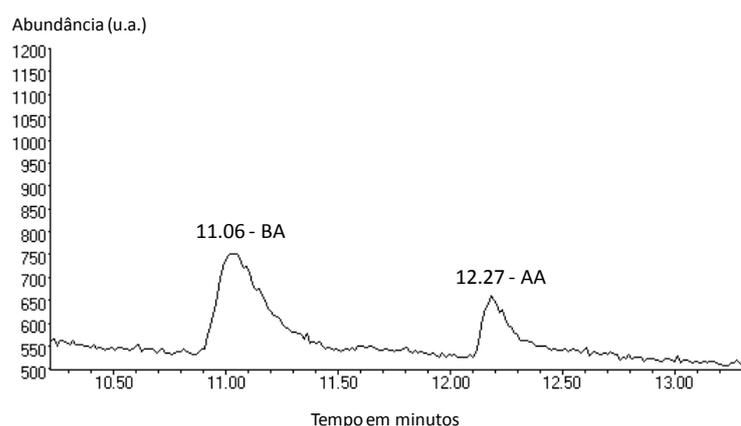
<sup>\*\*</sup>) Adição de óleo antes da evaporação

### 3.4.2. Extração da acrilamida por HS-SPME e quantificação em bolachas por GC-MS

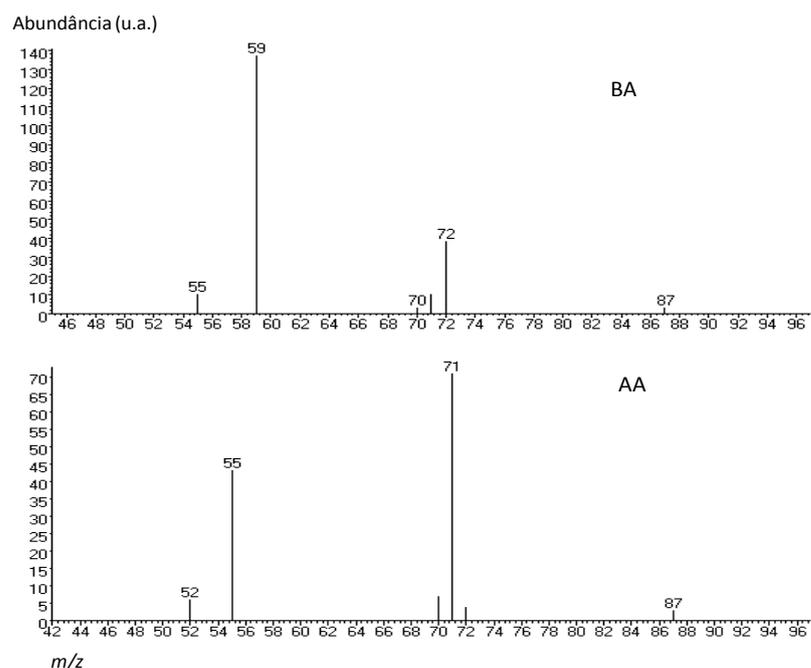
Para o estabelecimento da metodologia de extração utilizando HS-SPME foram feitas algumas experiências utilizando soluções padrão em que se testaram diferentes temperaturas de extração, tempos de extração, quantidade de NaCl para “salting-out”, diferentes solventes e diferentes volumes do frasco de SPME. Foi utilizada uma temperatura de extração de 40°C, com um tempo de extração de 60 min, com 5 g de NaCl, uma mistura água:1-propanol numa proporção de 50:50 como solvente de extração, num frasco de 130 mL, usando 40 mL de solução. A utilização de um frasco de 130 mL pressupõe a utilização de uma bolacha por ensaio, sem ser necessário o recurso a uma concentração prévia com solvente. Para mais fácil deteção da acrilamida em bolachas, utilizaram-se bolachas com frutose, com um valor de acrilamida próximo de 1700 µg/kg<sub>bolacha</sub>. Utilizando uma bolacha de 8 g, prevê-se um conteúdo em acrilamida de 13,6 µg. No entanto, como nestas condições a agitação da solução não é regular devido à grande quantidade de sólidos na solução de água-propanol, optou-se pela utilização de 4 g de bolacha, correspondendo a 6,8 µg por frasco de SPME. A agitação

deficiente pode ser explicada pela gelatinização do amido presente na bolacha. Quando a suspensão do amido em água é aquecida, a água penetra nos grânulos e estes incham consoante o aquecimento prossegue, alterando a estrutura dos grânulos. Na presença de uma quantidade suficiente de água, os grânulos acabam por rebentar obtendo-se uma dispersão viscosa que pode formar um gel ao fim de 60 min (77).

Utilizando a técnica de HS-SPME/GC-MS-SIM é possível quantificar a acrilamida, na ordem de grandeza anteriormente referida para as bolachas, em soluções modelo. Nas condições cromatográficas utilizadas, a butiramida (BA) tem um tempo de retenção de 11,06 min e a acrilamida (AA) tem um tempo de retenção de 12,27 min, o que permite a sua separação e por isso, a utilização da butiramida como padrão interno (Figura 20). Em modo SIM, a butiramida foi monitorizada pelos iões de  $m/z$  59, 72 e 87 e a acrilamida foi monitorizada utilizando os iões de  $m/z$  52, 55, 70, 71 (Figura 21).



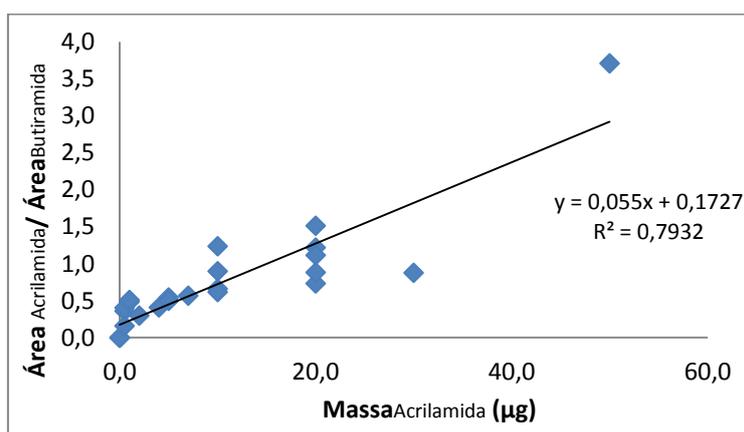
**Figura 20 - Cromatograma da butiramida e acrilamida (10 µg/frasco de SPME) obtidos em modo SIM (u.a. unidades arbitrárias).**



**Figura 21 - Espectros de massa da butiramida (BA) e acrilamida (AA) com uma concentração de 10 µg/frasco de SPME, adquiridos em modo SIM (u.a. unidades arbitrárias).**

Para quantificar a acrilamida em bolachas utilizaram-se dois processos: a) construindo uma curva de calibração externa com soluções modelo; b) construindo uma curva de calibração usando o método de adição padrão.

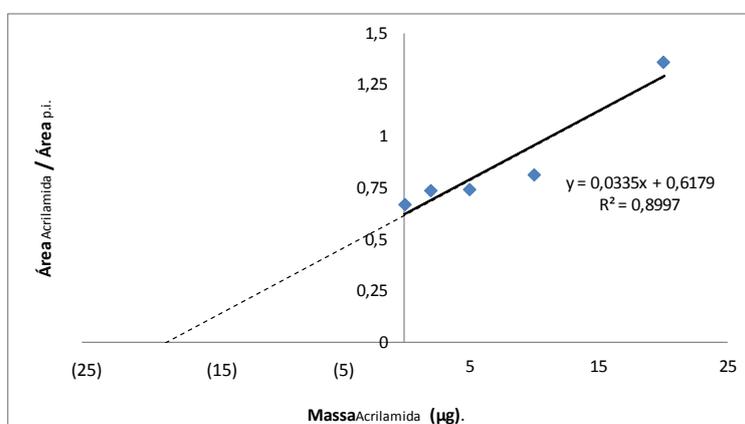
A Figura 22 mostra a curva de calibração externa obtida para a quantificação da acrilamida por GC-MS-SIM.



**Figura 22 - Curva de calibração externa obtida por GC-MS para a acrilamida.**

A Figura 22 mostra uma grande variabilidade entre réplicas. Tal variabilidade compromete a construção de uma curva de calibração viável. Logo, optou-se por usar o método da adição de padrão diretamente nas bolachas.

A Figura 23 mostra a curva de calibração obtida por adição de padrão para a quantificação da acrilamida, observando-se ainda alguma variabilidade. A quantidade de acrilamida determinada nas bolachas analisadas foi de 4461  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Este valor é 2,6 vezes mais elevado do que o obtido para as bolachas de frutose confeccionadas em Bratislava (1718  $\mu\text{g}_{\text{Acrilamida}}/\text{kg}_{\text{bolacha}}$ ). Este valor mais elevado pode ser justificado por condições de preparação diferentes, dado que as bolachas analisadas anteriormente foram preparadas num forno industrial com condições de temperatura mais bem definidas do que as utilizadas para estas bolachas, confeccionadas num mini-forno. Por outro lado, as diferenças observadas na quantificação da acrilamida também podem estar relacionadas com o método de extração e deteção aqui usado ou ainda relacionadas com a curva de calibração inadequada.



**Figura 23 – Curva de calibração obtida por adição de padrão para a quantificação da acrilamida por GC-MS.**

Posto isto, apesar do método parecer promissor relativamente à extração e deteção de acrilamida, é ainda necessário efetuar uma otimização que permita a sua quantificação e posterior validação e implementação do método.

## **4. Conclusão**



Atualmente existe uma preocupação cada vez mais crescente em reduzir o teor de acrilamida em alimentos processados termicamente, tais como as bolachas. Uma das hipóteses apontadas para a possível mitigação da acrilamida é a adição de compostos antioxidantes para evitar a formação de acrilamida durante o processamento térmico dos alimentos. Neste sentido, foram preparados extratos a partir de café instantâneo para serem adicionados às bolachas. Estes extratos são ricos em CGAs e melanoidinas, conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes. A partir de um extrato inicial (Cs) foram obtidos dois extratos por precipitação etanólica em proporções semelhantes: o extrato SnEt (sobrenadante em etanol) e o extrato PpEt (precipitado em etanol). O extrato PpEt possui uma maior quantidade total de açúcares neutros (69,4%) comparativamente com o extrato SnEt (24,4%). No entanto, o extrato SnEt apresenta maior proporção em açúcares redutores, o que faz com que este extrato promova a formação de acrilamida.

Relativamente à composição em ácidos clorogénicos livres, o extrato SnEt é o que possui maior quantidade destes compostos num total de 1149 mg<sub>CGA</sub>/100 g<sub>extrato</sub>, o que pode explicar a maior atividade antioxidante deste extrato. O CGA maioritário em todos os extratos é o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (5-CQA).

Foram preparadas bolachas sem e com a adição dos extratos de café preparados em quantidades de 1, 5 e 10% em relação ao conteúdo em farinha. A adição destes extratos de café teve um efeito na cor das bolachas confeccionadas, principalmente com a adição de PpEt (fração rica em melanoidinas, compostos castanhos de alto peso molecular). Verificou-se uma relação direta entre o escurecimento das bolachas e a percentagem de PpEt adicionado.

Foi avaliada a atividade antioxidante das bolachas sem e com extratos de café. Verificou-se que a adição destes extratos causou uma diminuição no valor de  $Ec_{50}$  da bolacha, ou seja, a adição dos extratos de café às bolachas conduz a um aumento da sua atividade antioxidante, que se mantém durante 15 semanas. Este efeito tem impacto na mitigação da acrilamida quando a quantidade de açúcares redutores é baixa como se verifica no extrato PpEt.

A quantificação da acrilamida em bolachas por HPLC-MS mostrou que a adição dos extratos resultou numa redução dos níveis de acrilamida em 29% nas bolachas com 5% de extrato PpEt (incluindo sacarose na sua formulação) e em 9% nas bolachas com 5% de PpEt (incluindo frutose na formulação). Para as restantes bolachas quer com sacarose quer com frutose os níveis de acrilamida mantiveram-se próximos dos de controlo devido a um balanço entre a formação e eliminação de acrilamida.

A segunda fase deste trabalho correspondeu à extração, deteção e quantificação da acrilamida em bolachas. Sabendo que as metodologias aplicadas para a extração da acrilamida

são morosas e incluem vários passos de extração, concentração e purificação, foi desenvolvido um novo método rápido de extração recorrendo ao HS-SPME com separação e posterior deteção por GC-MS-SIM. A quantificação da acrilamida em bolachas foi realizada com base numa curva de calibração construída pelo método de adição de padrão, a partir da qual foi determinada a quantidade de  $4611 \mu\text{g}_{\text{acrilamida}}/\text{kg}_{\text{bolacha}}$ .

## **5. Trabalho Futuro**



Perante o trabalho realizado e os resultados apresentados nesta dissertação, deverão continuar a ser realizados ensaios para a mitigação da acrilamida em bolachas utilizando compostos castanhos de alto peso molecular e com atividade antioxidante.

Nesta dissertação foram criadas as condições para o desenvolvimento de um método rápido e simples de determinação da acrilamida em bolachas, recorrendo ao HS-SPME/GC-MS. No entanto, é necessário comparar os resultados obtidos por esta metodologia com os métodos já estabelecidos, como por exemplo, o LC-MS, de modo a poder implementar o método aqui proposto nos nossos laboratórios. Esta metodologia poderá também ser aplicada à análise de acrilamida em outros alimentos, como por exemplo pão, batatas fritas e cereais. Para amostras com quantidades inferiores de acrilamida poderá ser utilizado o GCxGC-ToFMS dado ser uma técnica mais sensível do que o GC-MS.



## **6. Anexos**



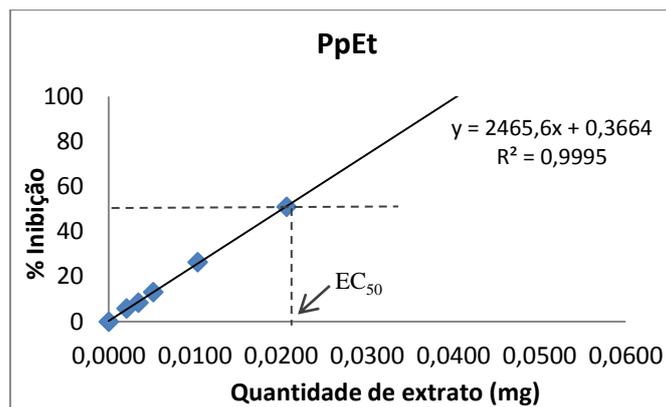


Figura 24 – Representação gráfica exemplificando a determinação do EC<sub>50</sub> para o extrato PpEt.

Tabela 13 – Tabela resumo com as equações da reta para determinar o valor de EC<sub>50</sub> das bolachas.

Extrato	Nº semanas até análise	Concentração extrato (%)	Equação da reta	EC <sub>50</sub> (mg)
Controlo	1	0	$y=0,4184x - 5,1082$	122,92
			$y=0,4560x - 2,031$	
	15		$y=0,3219x - 0,0468$	172,13±9,08
			$y=0,3006x + 0,7762$	
			$y=0,3526x - 0,3608$	
			$y=0,2098x + 1,3131$	
			$y=0,3086x - 1,7654$	
$y=0,2969x - 0,7474$				
SnEt	2	1	$y=0,3364x + 0,1713$	29,62
	1	5	$y=0,4068x + 6,4076$	21,43
	1	10	$y=0,192x + 0,6299$	25,16
	11	1	$y=1,6888x + 4,2266$	26,97±0,19
			$y=1,7775x + 2,3107$	
	9	5	$y=0,3749x + 1,6376$	24,83±1,38
			$y=0,4182x + 0,1202$	
	8	10	$y=0,486x + 1,0918$	20,12±0,01
$y=0,4919x + 0,529$				
PpEt	2	1	$y=0,0941x + 0,098$	106,06
	1	5	$y=0,3357x + 3,1557$	27,91
	1	10	$y=0,2365x - 2,1703$	22,06
	11	1	$y=0,5953x + 3,4703$	76,55±2,28
			$y=0,6332x + 2,5548$	
	9	5	$y=0,2874x + 0,6125$	35,34±1,37
			$y=0,2715x + 0,7116$	
	9	10	$y=0,4445x + 1,8054$	20,91±1,09
$y=0,4887x + 0,7848$				
Cs	12	1	$y=0,5144x + 2,6591$	90,13±2,68
			$y=0,5309x + 3,1548$	
	12	5	$y=1,103x + 5,6449$	39,03±1,68
			$y=1,1507x + 5,9202$	
	12	10	$y=2,291x + 5,9049$	19,44±0,27
			$y=2,2451x + 5,9202$	



## **7. Referências**



1. Amrein TM, Bachmann S, Noti A, Biedermann M, Barbosa MF, Biedermann-Brem S, Grob K, Keiser A, Realini P, Escher F, Amadó R. *Potential of acrylamide formation, sugars, and free asparagine in potatoes: a comparison of cultivars and farming systems*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003;51(18).5556-5560.
2. Claus A, Carle R, Schieber A. *Acrylamide in cereal products: A review*. Journal of Cereal Science. 2008;47(2).118-133.
3. Claeys WL, De Vleeschouwer K, Hendrickx ME. *Quantifying the formation of carcinogens during food processing: Acrylamide*. 2005;16(5).181-193.
4. IARC. *Acrylamide - IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Human*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1994.
5. Zhang Y, Zhang G. *Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods: Review and recent developments*. Journal of Chromatography A. 2005;1075(1-2).1-21.
6. Ajila CM, Leelavathi K, Prasada Rao UJS. *Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder*. Journal of Cereal Science. 2008;48(2).319-326.
7. Kotsiou K, Tasioula-Margari M, Kukurová K, Ciesarová Z. *Impact of oregano and virgin olive oil phenolic compounds on acrylamide content in a model system and fresh potatoes*. Food Chemistry. 2010;123(4).1149-1155.
8. Morales FJ, Martin S, Açar ÖÇ, Arribas-Lorenzo G, Gökmen V. *Antioxidant activity of cookies and its relationship with heat-processing contaminants: a risk/benefit approach*. European Food Research and Technology. 2009;228(3).345-354.
9. Capuano E, Fogliano V. *Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies*. LWT - Food Science and Technology. 2011;44(4).793-810.
10. Ciesarová Z, Suhaj M, Horváthová J. *Correlation between acrylamide contents and antioxidant capacities of spice extracts in a model potato matrix*. Journal of Food and Nutrition Research. 2008;47(1).1-5.
11. Reddy V, Urooj A, Kumar A. *Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application in biscuits*. Food Chemistry. 2005;90(1-2).317-321.
12. Sciences® V. *Nutra-Cookie™*. [2013]; Available from: [https://shayjordan.myvi.net/Resource/html/media/products/D1233US\\_SellSheet\\_Nutra-Cookie.pdf/usa/eng](https://shayjordan.myvi.net/Resource/html/media/products/D1233US_SellSheet_Nutra-Cookie.pdf/usa/eng).
13. Leclerc. *Praeventia™*. [2013]; Available from: <http://www.praeventia.ca/en/praeventia-cookies.php>.
14. DSM. *Bright Science. Brighter Living™*. [2013]; Available from: [http://www.dsm.com/en\\_US/foodandbeverages/public/home/downloads/0411020\\_DSMF\\_Praeventase\\_leaflet\\_EN\\_General\\_InformationLR.pdf](http://www.dsm.com/en_US/foodandbeverages/public/home/downloads/0411020_DSMF_Praeventase_leaflet_EN_General_InformationLR.pdf).
15. Schabacker J, Schwend T, Wink M. *Reduction of acrylamide uptake by dietary proteins in a Caco-2 gut model*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004;52(12).4021-4025.
16. Wilson KM, Rimm EB, Thompson KM, Mucci LA. *Dietary acrylamide and cancer risk in humans: a review*. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. 2006;1(1).19-27.
17. Doerge DR, Young JF, McDaniel LP, Twaddle NC, Churchwell MI. *Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in B6C3F(1) mice*. Toxicology and Applied Pharmacology. 2005;202(3).258-267.
18. Abramsson-Zetterberg L, Wong J, Ilback NG. *Acrylamide tissue distribution and genotoxic effects in a common viral infection in mice*. Toxicology. 2005;211(1-2).70-76.
19. Friedman M. *Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003;51(16).4504-4526.

20. EFSA. *Acrylamide Carcinogenicity: new evidence in relation to dietary exposure*. [Scientific Colloquium Summary Report]. 2008.
21. Mucci LA, Dickman PW, Steineck G, Adami HO, Augustsson K. *Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder: absence of an association in a population-based study in Sweden*. *British Journal of Cancer*. 2003;88(1):84-89.
22. Yaylayan VA, Locas CP, Wnorowski A, O'Brien J. The role of creatine in the generation of N-methylacrylamide: A new toxicant in cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(17):5559-5565.
23. Granvogl M, Jezussek M, Koehler P, Schieberle P. *Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes - A minor but potent precursor in acrylamide formation*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(15):4751-4757.
24. Zyzak DV, Sanders RA, Stojanovic M, Tallmadge DH, Eberhart BL, Ewald DK, Gruber DC, Morsch TR, Strothers MA, Rizzi GP, Villagran MD. *Acrylamide formation mechanism in heated foods*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51(16):4782-4787.
25. Kielhorn J. P-MC, Schmidt S., Mangelsdorf I. *Glyoxal*. Institute for Toxicology and Experimental Medicine, Hanover, Germany 2004:1-43.
26. Nelson David L. CMM. *Lenhinger, Principles of Biochemistry*. In: Press WHF, editor. 4th ed 2004. p. 238-272.
27. Aldrich. S. *2-Deoxyglucose*. [15-04-2013]; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d8375?lang=pt&region=PT>.
28. Amrein TM, Andres L, Manzardo GGG, Amado R. *Investigations on the promoting effect of ammonium hydrogencarbonate on the formation of acrylamide in model systems*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(26):10253-10261.
29. Yaylayan VA, Stadler RH. *Acrylamide formation in food: a mechanistic perspective*. *Journal of Aoac International*. 2005;88(1):262-267.
30. Samuelson G. *Acrylamide in food - an update*. *Scandinavian Journal of Nutrition/Naringsforskning*. 2002;46(4):157.
31. Vattem DA, Shetty K. *Acrylamide in food: a model for mechanism of formation and its reduction*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2003;4(3):331-338.
32. Rydberg P, Eriksson S, Tareke E, Karlsson P, Ehrenberg L, Tornqvist M. *Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51(24):7012-7018.
33. Yasuhara A, Tanaka Y, Hengel M, Shibamoto T. *Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51(14):3999-4003.
34. Becalski A, Lau BPY, Lewis D, Seaman SW. *Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51(3):802-808.
35. Granvogl M, Jezussek M, Koehler P, Schieberle P. *Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes-a minor but potent precursor in acrylamide formation*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(15):4751-4757.
36. Stadler RH, Scholz G. *Acrylamide: an update on current knowledge in analysis, levels in food, mechanisms of formation, and potential strategies of control*. *Nutrition Reviews*. 2004;62(12):449-467.
37. Taeymans D, Wood J, Ashby P, Blank I, Studer A, Stadler RH, Gonde P, Van Eijck P, Lalljie S, Lingnert H, Lindblom M, Matissek R, Muller D, Tallmadge D, O'Brien J, Thompson S, Silvani D, Whitmore T. *A review of acrylamide: An industry perspective on research, analysis, formation and control*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2004;44(5):323-347.

38. Surdyk N, Rosen J, Andersson R, Aman P. *Effects of asparagine, fructose, and baking conditions on acrylamide content in yeast-leavened wheat bread*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004;52(7).2047-2051.
39. Lingnert H, Grivas S, Jägerstad M, Skog K, Törnqvist M, Åman P. *Acrylamide in food: mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods*. Scandinavian Journal of Nutrition. 2002;46(4).159-172.
40. Chuda Y, Ono H, Yada H, Ohara-Takada A, Matsuura-Endo C, Mori M. *Effects of physiological changes in potato tubers (Solanum tuberosum L.) after low temperature storage on the level of acrylamide formed in potato chips*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 2003;67(5).1188-1190.
41. Biedermann-Brem S, Noti A, Grob K, Imhof D, Bazzocco D, Pfefferle A. *How much reducing sugar may potatoes contain to avoid excessive acrylamide formation during roasting and baking*. European Food Research and Technology. 2003;217(5).369-373.
42. Ahrne L, Andersson CG, Floberg P, Rosen J, Lingnert H. *Effect of crust temperature and water content on acrylamide formation during baking of white bread: steam and falling temperature baking*. Lwt-Food Science and Technology. 2007;40(10).1708-1715.
43. Claeys WL, De Vleeschouwer K, Hendrickx ME. *Quantifying the formation of carcinogens during food processing: acrylamide*. Trends in Food Science & Technology. 2005;16(5).181-193.
44. Budryn G, Zyzelewicz D, Nebesny E, Oracz J, Krysiak W. *Influence of addition of green tea and green coffee extracts on the properties of fine yeast pastry fried products*. Food Research International. 2013;50(1).149-160.
45. Bassama J, Brat P, Bohuon P, Boulanger R, Gunata Z. *Study of acrylamide mitigation in model system: effect of pure phenolic compounds*. Food Chemistry. 2010;123(2).558-562.
46. Bekedam EK, Schols HA, Van Boekel MAJS, Smit G. *Incorporation of chlorogenic acids in coffee brew melanoidins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008;56(6).2055-2063.
47. Vignoli JA, Bassoli DG, Benassi MT. *Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: the influence of processing conditions and raw material*. Food Chemistry. 2011;124(3).863-868.
48. Clifford MN. *Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism*. Journal of the Science of Food and Agriculture 2000;80(7).1033-1043.
49. Charurin P, Ames JM, Del Castillo MD. *Antioxidant activity of coffee model systems*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002;50(13).3751-3756.
50. Hemmerle H, Burger HJ, Below P, Schubert G, Rippel R, Schindler PW, Paulus E, Herling AW. *Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase*. Journal of Medicinal Chemistry. 1997;40(2).137-145.
51. Fujioka K, Shibamoto T. *Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees*. Food Chemistry. 2008;106(1).217-221.
52. Delgado-Andrade C, Morales FJ. *Unraveling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005;53(5).1403-1407.
53. Esquivel P, Jiménez VM. *Functional properties of coffee and coffee by-products*. Food Research International. 2012;46(2).488-495.
54. Bekedam EK, Schols HA, Van Boekel MAJS, Smit G. *High molecular weight melanoidins from coffee brew*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006;54(20).7658-7666.

55. Nunes FM, Coimbra MA. *Role of hydroxycinnamates in coffee melanoidin formation*. *Phytochemistry Reviews*. 2010;9(1).171-185.
56. Martins SIFS, Jongen WMF, Van Boekel MAJS. *A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling*. *Trends in Food Science and Technology*. 2000;11(9-10).364-373.
57. Wenzl T, de la Calle MB, Anklam E. *Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review*. *Food Additives and Contaminants*. 2003;20(10).885-902.
58. Rocha S, Ramalheira V, Barros A, Delgadillo I, Coimbra MA. *Headspace solid phase microextraction (SPME) analysis of flavor compounds in wines. Effect of the matrix volatile composition in the relative response factors in a wine model*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49(11).5142-5151.
59. Matich AJ, Rowan DD, Banks NH. *Solid phase microextraction for quantitative headspace sampling of apple volatiles*. *Analytical Chemistry*. 1996;68(23).4114-4118.
60. Vas G, Vekey K. *Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis*. *Journal of Mass Spectrometry*. 2004;39(3).233-254.
61. Pawliszyn J. *Theory of solid-phase microextraction*. *Journal of Chromatographic Science*. 2000;38(7).270-278.
62. Kumazawa T, Lee X-P, Sato K, Suzuki O. *Solid-phase microextraction and liquid chromatography/mass spectrometry in drug analysis*. *Analytica Chimica Acta*. 2003;492(1-2).49-67.
63. Shirey RE. *Optimization of extraction conditions and fiber selection for semivolatile analytes using solid-phase microextraction*. *Journal of Chromatographic Science*. 2000;38(7).279-288.
64. Jia MY, Zhang QH, Min DB. *Optimization of solid-phase microextraction analysis for headspace flavor compounds of orange juice*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998;46(7).2744-2747.
65. Kitson Fulton G. LBS, McEwen Charles N. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry. A practical guide*: Academic Press; 1996.
66. Araújo. LA. *Espectrometria de massas*.2009.
67. Selvendran RR, March JF, Ring SG. *Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber*. *Analytical Biochemistry*. 1979;96(2).282-292.
68. Coimbra MA, Waldron KW, Delgadillo I, Selvendran RR. *Effect of Processing on Cell Wall Polysaccharides of Green Table Olives*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996;44(8).2394-2401.
69. Farah A, De Paulis T, Trugo LC, Martin PR. *Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53(5).1505-1513.
70. Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon JM. *Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(5).1768-1774.
71. Ciesarova Z, Kukurova K, Bednarikova A, Morales FJ. *Effect of heat treatment and dough formulation on the formation of Maillard reaction products in fine bakery products - benefits and weak points*. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2009;48(1).20-30.
72. Gokmen V, Senyuva HZ. *A generic method for the determination of acrylamide in thermally processed foods*. *Journal of Chromatography A*. 2006;1120(1-2).194-198.
73. Jezussek M, Schieberle P. *A New LC/MS-Method for the Quantitation of Acrylamide Based on a Stable Isotope Dilution Assay and Derivatization with 2-Mercaptobenzoic Acid*.

- Comparison with Two GC/MS Methods.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003;51(27).7866-7871.
74. Nunes FM, Coimbra MA. *Melanoidins from coffee infusions. Fractionation, chemical characterization, and effect of the degree of roast.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2007;55(10).3967-3977.
75. Wang HY, Qian H, Yao WR. *Melanoidins produced by the Maillard reaction: structure and biological activity.* Food Chemistry. 2011;128(3).573-584.
76. Kocadagli T, Göncüoğlu N, Hamzalıoğlu A, Gökmen V. *In depth study of acrylamide formation in coffee during roasting: Role of sucrose decomposition and lipid oxidation.* Food and Function. 2012;3(9).970-975.
77. Zobel HF. *Starch crystal transformations and their industrial importance.* Starch-Starke. 1988;40(1).1-7.