

# DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS COMO SEUS DERIVADOS ACILADOS EM GRÃOS DE CAFÉ VERDE POR CROMATOGRAFIA GASOSA DE ALTA RESOLUÇÃO (CGAR)<sup>1</sup>

**Aidene GODINHO - Bolsista do CBP&D-Café/EPAMIG, aidene@ig.com.br; Francisco Dias NOGUEIRA - EPAMIG; Vany FERRAZ - UFMG; Paulo Tácito Gontijo GUIMARÃES - EPAMIG; Francisca Alcivania de Melo SILVA - Bolsista do CBP&D/Café**

**RESUMO:** Um seletivo e sensível método cromatográfico para determinação de amins biogênicas (feniletilamina, putrescina, cadaverina, triptamina, spermidina e spermina) em grãos de café verde por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) foi desenvolvido usando a acilação como técnica de derivatização. Depois da extração com ácido trifluoroacético, as amins foram convertidas em seus derivados acilados. A acilação foi realizada em forno de microondas doméstico para reduzir o tempo de reação. O tempo total de derivatização e análise foi de dezesseis minutos. A metodologia desenvolvida, de extração e análise de amins biogênicas, é simples, rápida, de baixo custo e apresenta ótima resolução.

**PALAVRAS CHAVE:** Derivatização; acilação; CGAR; grãos de café verde; amins biogênicas.

**ABSTRACT:** A selective and sensitive chromatographic method which uses the acylation as derivation technique for the determination of biogenic amines (phenylethylamine, putrescine, cadaverine, tryptamine, spermidine and spermine) in green coffee grains by high resolution gas chromatography (HRGC) was developed. After the extraction of the sample with trifluoroacetic acid, the amines were converted into their acyl derivatives. The acylation was carried out in a domestic microwave oven to reduce the time of reaction. The total time of derivation and analysis was sixteen minutes. The methodology of extraction and analysis of biogenic amines developed is simple, fast, of low cost and presents great resolution.

**KEYWORDS:** Derivation; acylation; HRGC; green coffee grain; biogenic amines.

## INTRODUÇÃO

Amins biogênicas são compostos encontrados em plantas e em alimentos fermentados. Essas amins são bases orgânicas (alifáticas, alicíclicas ou heterocíclicas) de baixo peso molecular e são produzidas a partir de reações de descarboxilação de aminoácidos. De acordo com essas reações tirosina produz tiramina, histidina produz histamina e arginina conduz a putrescina, por meio de um estado intermediário representado pela ornitina. Cadaverina é derivado da lisina, triptamina do tryptofano e 2-phenylethylamina é derivado da phenylalanina. Putrescina é também um caminho metabólico intermediário que leva a spermidina e spermina. Embora muitas dessas substâncias estejam presentes na fisiologia humana, elas podem causar desnaturação ou efeitos tóxicos quando consumidas em grandes quantidades (Moret e Conte, 1996; Linhares et al., 1998). Admite-se que o aumento da concentração de algumas amins biogênicas (putrescina, spermina e spermidina) em plantas esteja relacionado com um balanço nutricional não adequado envolvendo nitrogênio e potássio. As causas deste aumento têm sido atribuídas à severa deficiência de potássio e ao regime nutricional que gera H<sup>+</sup> nos tecidos das plantas, incluindo absorção de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e exposição a SO<sub>2</sub> (Malavolta, 1976; Mengel e Kirkby, 1987). Em estudos mais recentes têm-se que o acúmulo de cloreto em folhas de citrus eleva o teor de putrescina e diminui o de spermina causando injúrias nas folhas e crescimento reduzido dos ramos. Observações semelhantes têm sido registradas em café (Bar et al., 1996).

Por outro lado, altas concentrações de algumas amins biogênicas (histamina, tiramina, triptamina, 2-feniletilamina e serotonina) em alimentos e bebidas alcoólicas podem gerar distúrbios fisiológicos no metabolismo humano, tais como, dor de cabeça, vômito, diarreia e rubor facial (Glória e Izquierdo Pulido, 1999). As análises de amins biogênicas tem sido feitas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa e detecção por ultravioleta (Moret e Conte, 1996; Muskiet et al., 1995), apesar da facilidade de amostragem o tempo de análise é muito longo, da ordem de 80 min. Por outro lado a cromatografia gasosa é uma técnica superior no que diz respeito a menores tempos de análise com alta resolução e possibilidade de acoplamento a espectrometria de massas (CG-EM). Entretanto essas amins não podem ser analisadas diretamente por CGAR já que não são voláteis, o que pode ser contornado pela preparação de seus derivados

<sup>1</sup> Trabalho financiado pelo CONSÓRCIO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DO CAFÉ - CBP&D-Café

acilados (Malavolta, 1976). Como exemplo da aplicabilidade desta análise, foram analisadas algumas amostras de grãos de café verde, cultivar catuaí, colhidos na Fazenda Experimental da EPAMIG, no município de São Sebastião do Paraíso. O aumento do conteúdo de aminas biogênicas (principalmente putrescina, spermidina e spermina) no café pode ser decorrente de uma adubação nitrogenada desequilibrada e deficiência de potássio no cafeeiro, o que pode acarretar sintomas de queda de frutos, folhas e maior incidência de pragas e doenças influenciando diretamente na qualidade do café. Neste trabalho propôs-se um método para análise de seis aminas biogênicas (feniletilamina, putrescina, cadaverina, triptamina, spermidina e spermina) como seus derivados acilados por CGAR com tempo total de derivatização e análise de dezesseis minutos. Para diminuição do tempo de reação, a acilação foi realizada usando-se um forno de microondas doméstico.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Reagentes e solventes:** Todas as soluções foram preparadas com água ultra-pura gerada por um sistema milli-q (millipore). Foram utilizados 5 mL de solução de ácido trifluoroacético (5% v/v) e 500 µL de acetonitrila e anidrido trifluoroacético (1:1). Utilizaram-se 2 mg de uma mistura de padrões de aminas biogênicas (Sigma Chemical) (1,3 mg de feniletilamina, 1,4 mg de putrescina, 1,5 mg de cadaverina, 1,3 mg de triptamina, 1,4 mg de spermidina e 1,4 mg de spermina). **Preparação da amostra:** Uma alíquota de 2 g de café verde moído foi homogenizada em 5 mL de solução de ácido trifluoroacético (5% v/v) com ultra-som por 15 min. Depois de centrifugar a 2000g por 30 min, 100 µL do sobrenadante foram secos em uma linha de nitrogênio para derivatização. **Derivatização por acilação:** A derivatização de aminas biogênicas pode ser empregada em cromatografia gasosa não somente para reduzir a polaridade mas também para melhorar a volatilidade, seletividade, sensibilidade e separação dessas aminas. Acilação é uma das mais populares derivatizações para aminas primárias e secundárias. Anidridos acéticos, cloretos de acila, acilamidazoles e acilamidas tem sido usados como agentes acilantes (Malavolta 1976). Em um frasco de reação de 1 mL (supelco), contendo 2 mg de uma mistura padrão de aminas, colocou-se 250 µL de solução (1:1) acetonitrila/anidrido trifluoroacético. Essa mistura foi homogenizada em ultra-som por 5 min. O frasco fechado foi levado ao forno de microondas (Panasonic Júnior) na potência média (330 W) por 1 min. Os derivados acilados foram secos em uma linha de nitrogênio e retomados em seguida em 100 µL de acetonitrila. Depois de esfriado, uma alíquota de 2 µL da mistura foi injetada diretamente no cromatógrafo a gás. Para a amostra de café verde o mesmo procedimento foi utilizado partindo-se do extrato seco sob nitrogênio. **Cromatografia gasosa:** As análises foram feitas em um cromatógrafo a gás equipado com detector de chama de ionização (FID). Foi utilizada uma coluna capilar de sílica-fundida (SE-54, 30 m x 0,25 mm d.i). As condições de operação foram as seguintes: 120°C, 2 min, 12°C/min até 270°C; injetor e detector a 280°C.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos (Figura 1), mostram que a metodologia de análise utilizada apresenta ótima separação cromatográfica para as aminas em questão. De acordo com o cromatograma da mistura padrão de aminas percebe-se que a derivatização da spermina é menor que a das demais aminas. Vê-se no cromatograma da amostra de café que o pico relativo a spermina não aparece, ou seja, a quantidade de spermina presente em café verde é muito pequena. Além da boa separação a cromatografia gasosa apresenta outras vantagens: alto poder de resolução, alta sensibilidade, curto tempo de análise e baixo custo. A tabela 1 mostra a linearidade das curvas padrões de aminas biogênicas e a tabela 2 mostra o nível de aminas biogênicas em grãos de café verde.

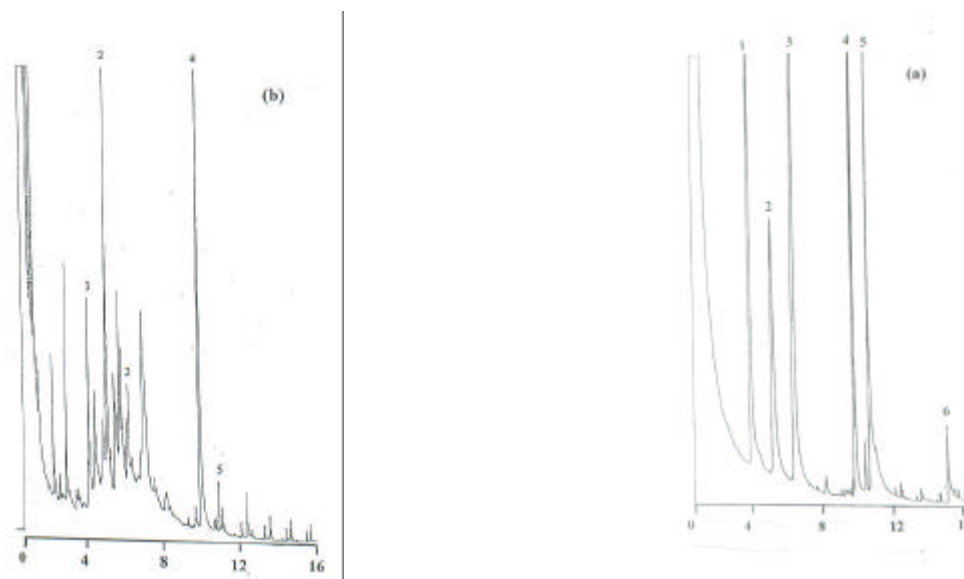


Figura 1 – (a) Cromatograma da mistura padrão de aminos: (1) feniletilamina, (2) putrescina, (3) cadaverina, (4) triptamina, (5) spermina e (6) spermidina; (b) Cromatograma de uma amostra de café verde (cultivar catuaí): (1) feniletilamina, (2) putrescina, (3) cadaverina, (4) triptamina, (5) spermina.

Tabela 1 – Linearidade das curvas padrões de aminos biogênicas

Aminos Biogênicas	Coeficientes de regressão linear *		Coeficiente de correlação $R^2$
	a	b	
Feniletilamina	143753	-65351	0,9744
Putrescina	36060	-22340	0,9743
Cadaverina	67128	-36669	0,9809
Triptamina	99119	-63109	0,9956
Spermidina	40528	-29168	0,9998
Spermina	72187	-6226	0,9995

$y = ax + b$ , onde  $y$  = pico relativo a área e  $x$  = concentração ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ).

Tabela 2 – Nível de aminos biogênicas em grãos de café verde

Amina Biogênica	Nível de aminos biogênicas (mg/Kg) em grãos de café verde
Triptamina	3113
Spermidina	2047
Putrescina	1655
Cadaverina	1423
Feniletilamina	1189
Spermina	<600

De acordo com os resultados da Tabela 2, a triptamina é a amina que aparece em maior quantidade em café verde seguida da spermidina > putrescina > cadaverina > feniletilamina > spermina.

## CONCLUSÕES

A análise de aminos biogênicas por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) associada à acilação no forno de microondas mostrou-se eficiente, rápida, com excelente resolução e baixo custo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Moret, S.; Conte, L. S.; High Performance Liquid Chromatographic Evaluation of Biogenic Amines in Foods; *J. Chromatogr. A*, 729(1996)363-369.

- Linares, R. M.; Ayala, J. H.; Afonso, A. M. and Díaz, V. G.; Rapid Microwave – Assisted Dansylation of Biogenic Amines Analysis by High Performance Liquid Chromatographic; *J. Chromatogr. A*, 808(1998)87-93.
- Van Eijk, H. M. H.; Rooyackers, D. R.; Deutz, N. E. P.; Automated Determination of Polyamines by High Performance Liquid Chromatographic with Simple Sample Preparation; *J. Chromatogr. A*, 730(1996)115-120.
- Vale, S. R. and Glória, M. B. A.; Determination of Biogenic Amines in Cheese; *J. AOAC International*, vol. 80, nº 5 (1997)1006-1012.
- Muskiet, F. A. J.; Dorhout, B.; Van Den Berg, G. A. and Hessels, J.; Investigation of Polyamine Metabolism by High Performance Liquid Chromatographic and Gas Chromatographic Profiling Methods; *J. Chromatogr. B*, 667 (1995) 189-198.
- Malavolta, E.; *Manual de Química Agrícola, Nutrição de Plantas e Fertilidade do Solo*; Editora Ceres-SP, (1976)528.
- Priebe, A.; Klein, H. and Jagger, H.; Role of Polyamines in SO<sub>2</sub> Polluted Pea Plants; *J. Exptl. Bot.*; 29(1978)1045-1050.
- Young, N. D. and Galston, A. W.; Putrescine in Acid Stress; *Plant. Physiol.*; 71(1984)767-771.
- Mengel, K. and Kirkby, E. A.; *Principles of Plant Nutrition*; 4<sup>th</sup> Edition, International Potash Institute (1987)427-453.
- Bar, Y.; Apelbaum, A.; Kafkafi, U.; Goren, R.; Polyamines in Chloride – Stressed Citrus Plants; *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 121(1996)507 – 513.
- Glória, M. B. A. and Izquierdo Pulido, M.; Levels and Significance of Biogenic Amines in Brazilian Beers; *J. Food Composition and Analysis*, 12(1999)129-136.

## **AVISO**

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS  
SEGUINTE ENDEREÇOS:

### **FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES**

Edifício Sede, s/nº. - Campus Universitário da UFV  
Viçosa - MG  
Cep: 36571-000  
Tels: (31) 3891-3204 / 3899-2485  
Fax : (31) 3891-3911

### **EMBRAPA CAFÉ**

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (Final)  
Edifício Sede da Embrapa - sala 321  
Brasília - DF  
Cep: 70770-901  
Tel: (61) 448-4378  
Fax: (61) 448-4425