

Carlos Alberto Bastos De Maria*

Departamento de Ciências Fisiológicas - Instituto Biomédico - Universidade do Rio de Janeiro (UNIRIO)

Ricardo Felipe Alves Moreira e Luiz Carlos Trugo

Departamento de Bioquímica - Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Recebido em 29/7/97; aceito em 13/7/98

VOLATILE COMPONENTS IN ROASTED COFFEE. PART I: HETEROCYCLIC COMPOUNDS.
A review of heterocyclic compounds in roasted coffee is presented. The contents, precursors and sensorial properties of furans, pyrroles, oxazoles, thiazoles, thiophenes, pyrazines and pyridines are discussed. The impact heterocyclic compounds of coffee aroma are described.

Keywords: heterocyclic compounds; aroma; roasted coffee.

INTRODUÇÃO

As sementes de café (café verde) e seus derivados manufaturados (café torrado e solúvel) são produtos importantes na pauta de exportação brasileira. O cultivo e a produção industrial geram empregos e divisas de tal envergadura que as tornam uma atividade fundamental do ponto de vista econômico. A partir do café torrado é produzida uma bebida que apresenta aroma e sabor bastante apreciados, ao ponto de a transformarem em uma das bebidas mais populares do planeta. Desses dois atributos fundamentais para a bebida, o aroma é sem dúvida o mais complexo e interessante, por isso tem sido alvo de estudos sistemáticos desde o início do século.

Os compostos voláteis que são responsáveis pelo aroma característico da bebida são produzidos durante a torrefação do café verde. Este último contém metoxi-pirazinas que lhe fornece o aroma característico, estas porém são geralmente degradadas no processo de torrefação. Portanto, os compostos voláteis característicos do café torrado normalmente não estão presentes na matriz original, e sim, são produzidos durante o processo tecnológico. O marco inicial para a pesquisa sistemática dos compostos do aroma do café foi o trabalho de Reichstein & Staundinger¹ que identificaram o 2-hidroxi-metil-furano como um componente de impacto para o aroma do café torrado. Com o advento da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) na década de 60, houve um grande avanço na identificação dos compostos voláteis do café torrado. Na atualidade cerca de mil componentes já foram detectados e alguns especialistas da área sugerem que dezenas de componentes ainda poderão vir a ser identificados. A partir da década de 80, o interesse maior passou a ser a determinação do potencial odorífero dos componentes voláteis para proceder-se a identificação daqueles que teriam maior impacto na constituição do aroma característico do café. Para isso, costuma-se usar substâncias padrões que são, então, submetidas a diluições sucessivas com o objetivo de se determinar o "threshold" (limiar de detecção - concentração mínima para que haja a percepção de algum aroma) e de se caracterizar o odor em cada diluição. Esse processo é realizado por meio de um dispositivo para sentido do odor que é acoplado ao CG.

Os heterocíclicos estão entre os compostos voláteis que mais têm merecido a atenção dos especialistas. Vários compostos heterocíclicos têm sido identificados no café torrado (Figura 1)²;

alguns destes parecem ter algum impacto positivo no aroma do café (Figura 2)³. Já outros compostos, ex. 2-hidroxi-metil-furano, estão associados ao amargor e ao odor de queimado identificados no café submetido a torrefação drástica². Ao lado de compostos heterocíclicos bastante estudados, ex. pirazinas, existem outros cujos dados ainda são escassos, ex. oxazóis.

O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão crítica

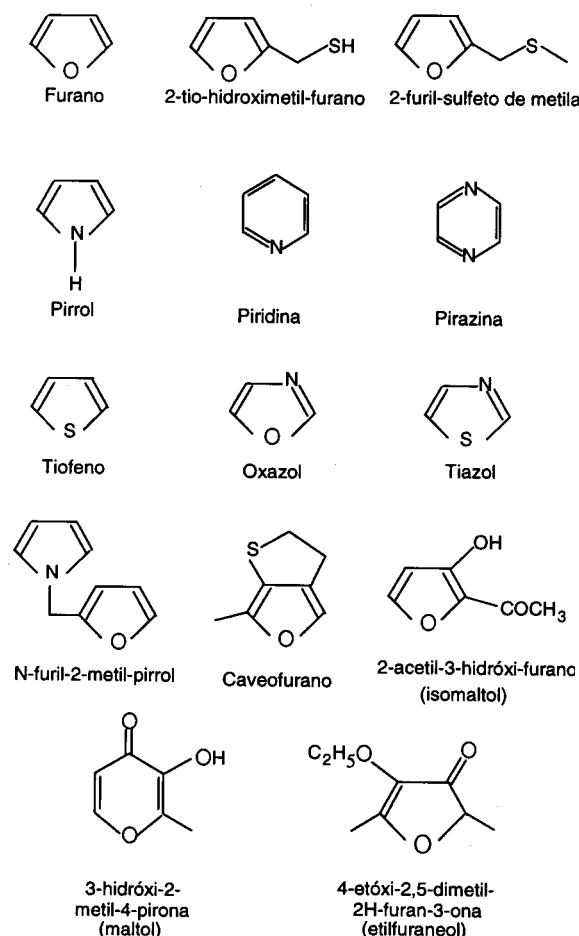
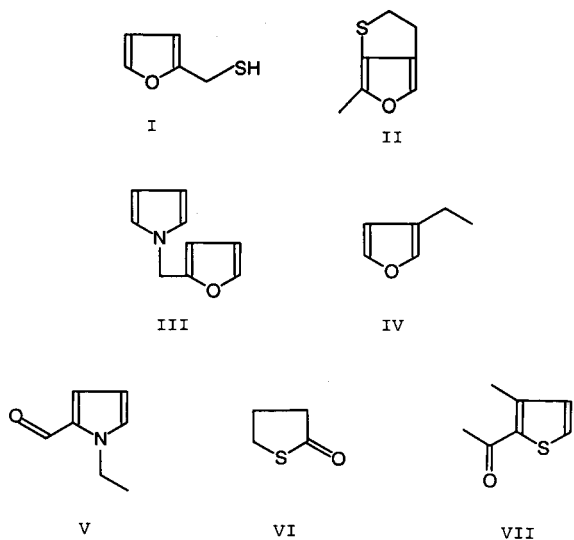


Figura 1. Estrutura de alguns compostos heterocíclicos encontrados no café torrado³.

* Envio de correspondência: Rua General Sampaio 71 apt. 802 bloco 1 CEP 20931-350, Rio de Janeiro



I = 2-tio-hidroximetil-furano
 II = caveofurano
 III = N-furil-2-metil-pirrol
 IV = 2-etil-furano
 V = N-etil-2-formil-pirrol
 VI = tiobutirrolactona
 VII = 2-acetil-3-metil-tiofeno

Figura 2. Estrutura de compostos heterocíclicos considerados de impacto para o aroma do café torrado⁴.

dos compostos heterocíclicos encontrados no café torrado abordando aspectos relacionados a distribuição quantitativa no café, a seus precursores e a sua importância sensorial.

FURANOS

Os furanos são compostos heterocíclicos encontrados em grande quantidade no café torrado e incluem funções como aldeídos, cetonas, ésteres, alcoóis, éteres, ácidos e tiois⁴. Cerca de cem furanos já foram identificados no café torrado (Tabela 1)⁴. Os alquil-furanos (metil-, etil-, butil-, pentil- e dimetil-furanos) foram identificados em vários trabalhos produzidos a partir da década de 30³⁻²⁰. Já os alquenil-furanos foram identificados em menor quantidade com predominância dos vinil-furanos^{13,14,16,20}. Os furanos com substituintes contendo oxigênio são comumente encontrados no café torrado. As furil-alcanonas e os furanos com função éter, bem como os furanaldeídos são encontrados em grande número^{10,12-17,19-25}. Os furanos com função álcool também são encontrados no café torrado^{12,13,16,17,19,26}, sendo o 2-hidroximetil-furano o principal componente desse grupo. Também foram identificados no café torrado alguns ésteres com anel furânico, como por exemplo, o acetato de furila^{17,19,26}. Alguns compostos contendo uma cetona ligada diretamente ao anel furânico (furanonas) foram descritos por vários autores^{10,12,13,16,17,20,25-29}. A presença de furanos condensados com pirazinas e pirróis no café torrado também é descrita na literatura^{10,13-15,18,28}. Alguns furanos são encontrados em grande quantidade no café torrado, sendo os mais abundantes o furil-2-metanol (90-135 mg/Kg de café torrado), 2-furfural (55-70 mg/Kg), 2-metil-tetraidro-3-furanona (10-16 mg/Kg), 2-acetil-furano (6-12 mg/Kg), acetato de furila (3,5-5,5 mg/Kg), 1-(2-furil)-3-propanona (2,5-4,0 mg/Kg)⁴. Um trabalho mais recente foi realizado para determinação quantitativa de compostos voláteis de impacto para o aroma dos cultivares de café arábica e robusta²⁹. Os seguintes furanos foram detectados: 4-hidroxi-2,5-dimetil-diidro-3-furanona (109 mg/Kg e 57 mg/Kg para arábica e robusta, respectivamente), 3-hidroxi-4,5-dimetil-pentaidro-2-furanona (1,47 mg/Kg e 0,63 mg/Kg), 5-etil-3-hidroxi-4-metil-diidro-2-furanona (0,16 mg/Kg e 0,085 mg/Kg), 5-etil-4-hidroxi-2-metil-diidro-3-furanona (17,3 mg/Kg e 14,3 mg/Kg).

Os furanos são oriundos principalmente da degradação de

Tabela 1. Quantidade de furanos e pirróis identificados no café torrado.

grupo / sub-grupo	furanos	pirróis
simples e hidrogenados	7	2
alquil-	26	32
alcoxi-	1	—
aril-	1	1
furil-alcanos	4	—
furil-alcenos	2	—
aldeídos	6	—
alquil-furil-	—	10
acil-	9	20
alcoóis	2	—
ácidos	1	—
ésteres	11	—
éteres	4	—
furil-nitrilas	1	—
furil-tiois	2	—
furil-tioéteres	15	—
furil-tioésteres	1	—
furil-tiocetonas	1	—
furil-tiofenóis	1	—
cetonas (mono- e di-)	15	2

Dados extraídos da literatura⁴.

glicídios presentes no café. Por outro lado, existem evidências de que os furanos também seriam formados na degradação de terpenos¹³. Alguns terpenos de alto peso molecular (ex. esqualeno) poderiam degradar-se para produzir furanos²¹. Entretanto, devido aos baixos teores de terpenos no café, estes devem participar de forma inexpressiva como precursores de furanos durante a torrefação.

O principal glicídio de baixa massa molecular presente no café verde é a sacarose, apresentando valores médios de 5-8% e 3-5% para café arábica e robusta, respectivamente³⁰⁻³⁵. Os monossacarídeos foram encontrados somente em quantidades diminutas nessa semente³⁰⁻³⁵. A sacarose é extensivamente degradada durante a torrefação do café. Somente foram encontrados de 3-4% do conteúdo original de sacarose no café que sofreu torrefação leve (205°C, 7 min), enquanto que no café submetido a torrefação média (205°C, 10 min) somente foi achado 1%³⁶. Sua degradação ocorre geralmente por pirólise (caramelização) e/ou por reação de "Maillard" (condensação da carbonila de um glicídio com um grupamento amino de um aminoácido). Recentemente, foi evidenciada a participação de polissacarídeos como precursores de furanos no café torrado³⁷. Os polissacarídeos representam cerca de 40-50% dos sólidos totais do café verde. Após algumas tentativas de identificação, foi proposta a presença de uma arabinogalactana, relativamente solúvel em água, uma manana e celulose³⁸⁻⁴¹. A partir do isolamento de uma fração do café verde rica em polissacarídeos, a qual foi submetida à torrefação, evidenciou-se uma perda considerável de arabinose e uma menor perda de galactose, sendo detectados alguns furanos após a torrefação desta fração³⁷. Foi sugerida, então, a participação da arabinogalactana como um polissacarídeo precursor de furanos no café³⁷.

Os furanos contribuem consideravelmente para as características sensoriais do café torrado. Já na década de 20, foi identificado o 2-tio-hidroximetil-furano como um dos compostos de impacto para o aroma do café¹. Foi demonstrado que 0,01-0,5 µg/l desse componente em água forneceu um aroma de café torrado fresco, enquanto que 1-10 µg/l produziu aroma de café torrado velho⁴². O limiar de detecção do 2-tio-hidroximetil-furano na água foi de 0,005 µg/l. Então, dependendo da concentração, o 2-tio-hidroximetil-furano pode ter qualidade sensorial boa ou ruim para o café torrado. A importância sensorial desse componente também tem sido demonstrada por

outros autores^{18,43,44}. O 5-metil-2-tio-hidroxi-metil-furano apresentou um limiar de detecção de 50 ng/l na água, liberando um odor característico de enxofre acima de 5000 ng/l⁴⁴. O conteúdo de 2-tio-hidroxi-metil-furano e de 5-metil-2-tio-hidroxi-metil-furano aumenta de 5 a 10 vezes durante a estocagem⁴⁴. O 2-metil-3-oxa-8-tiabicyclo[3.3.0]-1,4-octadieno (caveofurano) (Figura 1) também tem sido apontado como um componente de impacto para o aroma do café torrado⁴⁴. Esse composto foi responsável pelo leve aroma de café torrado na concentração de 10-100 µg/l em água. Os alquil-furanos também apresentam propriedades sensoriais que são importantes para a composição do aroma do café. O 2-etil-furano foi responsável pelo aroma de matéria queimada e pelo odor doce parecido com o aroma do café torrado⁴⁵. Já o furano e o 2-metil-furano forneceram um aroma similar ao do éter; o furfural um aroma de grama⁴⁶. As furanonas forneceram um aroma de caramelo e açúcar queimado⁴⁶. Recentemente, foi realizado um estudo para a identificação de compostos de impacto para o aroma das bebidas produzidas com café arábica e robusta. A percepção odorífera de caramelo foi mais intensa na bebida produzida com café arábica⁴⁷. Nesse trabalho, foi sugerido que as furanonas seriam os compostos voláteis responsáveis por esse aroma. Como os furanos são produzidos por pirólise de glicídios é comum a descrição do aroma de caramelo e açúcar queimado oriundo desses componentes. O 2-hidroxi-metil-furano está presente em grande quantidade no café submetido à torrefação muito forte (205°C, 19 min) e é um dos responsáveis pelo aroma amargo e de matéria queimada característicos desse café².

PIRRÓIS

Os pirróis foram identificados nos alimentos em meados da década de 60 sendo compostos característicos de alimentos processados termicamente⁴⁸. Cerca de setenta pirróis já foram identificados no café torrado (Tabela 1)⁴. Destes, cerca de trinta e dois componentes são alquil-pirróis. O metil-pirrol foi identificado por vários autores^{8,10,12,16,17,19,21,25,49}. Outros alquil-pirróis (ex. 2-etil-pirrol, 2,5-dimetil-pirrol) também foram identificados no café torrado^{13,49,50}. O pirrol foi encontrado em pequena quantidade^{12,49}. Os acetil-pirróis (ex. N-metil-2-acetil-pirrol, 2-acetil-pirrol)^{10,13,20,49} e dois alquil-formil-pirróis (1-metil-2-formil-pirrol, 1-etil-2-formil-pirrol)^{16,20} também foram identificados no café. Os furil-pirróis foram detectados no café torrado, porém em menor número quando comparados aos alquil- e acil-pirróis^{10,13,18}. Os pirróis encontrados em maior quantidade no café torrado são⁴: o N-furil-2-formil-pirrol (2,5-3,0 mg/Kg de café torrado) e o N-metil-2-acetil-pirrol (1,8-2,1 mg/Kg).

Os pirróis podem ser formados a partir da reação de "Maillard", da degradação de "Strecker", da pirólise de aminoácidos ou ainda da degradação da trigonelina⁵¹. Os aminoácidos são encontrados na forma livre ou ligados entre si formando as proteínas. A composição total de proteínas no café verde é cerca de 9-12%⁵². A composição total de proteínas no café torrado varia pouco em relação ao café verde, porém as propriedades físicas e químicas das proteínas são alteradas, reduzindo sensivelmente a solubilidade das mesmas em água^{53,54}. A composição de aminoácidos totais sofre modificações em consequência do processo de torrefação. Alguns aminoácidos (arginina, lisina, serina e treonina) são mais susceptíveis à torrefação^{54,55}. A quantidade de aminoácidos livres presentes no café verde é muito baixa, em torno de 0,4-3g%^{3,54}. Embora os aminoácidos livres representem uma pequena proporção do nitrogênio proteico, eles são precursores de aroma extremamente importantes, tendo uma participação marcante na qualidade do produto final⁵⁵. A trigonelina é uma base nitrogenada fortemente polar, achada em algumas espécies de frutos e sementes⁵⁶. A estrutura química da trigonelina é mostrada na Figura 3⁵². A degradação da trigonelina gera uma série de compostos voláteis. Alguns derivados do pirrol foram identificados

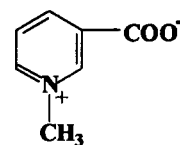


Figura 3. Estrutura química da trigonelina⁵².

por CG/EM após o aquecimento da trigonelina em um tubo selado (180-230°C por 15-16 min)⁵⁷. Por outro lado, poderiam ocorrer também reações secundárias entre a trigonelina e outros constituintes, particularmente com os glicídios que estão presentes em grandes quantidades no café.

Os acil-pirróis e os alquil-acil-pirróis são formados via reação de "Maillard"^{49,58}. Foi proposto um outro mecanismo no qual os alquil-acil-pirróis seriam formados a partir da reação do 2-acil-furano com α -aminoácidos⁵⁸. O carbono cinco do acil-furano sofreria um ataque nucleofílico pelo grupamento amino do α -aminoácido. Em seguida, ocorreria uma desidratação e uma descarboxilação para formação do alquil-acil-pirrol. A pirólise da serina e da treonina (hidroxi-aminoácidos) é uma outra via de formação de pirróis. A partir de sistemas de reação contendo aminoácidos e glicídios ou somente aminoácidos, verificou-se a formação de uma série de pirróis^{49,59}. Os furil-pirróis e os acil-pirróis foram encontrados somente no sistema de reação contendo hidroxi-aminoácidos e sacarose⁴⁹. Já o pirrol e os alquil-pirróis são formados via pirólise de hidroxi-aminoácidos⁴⁹. A formação do pirrol ocorreria pelo ataque nucleofílico da amônia a um aldeído gerado pela degradação da serina⁶⁰. Foi relatado, também, que os pirróis poderiam ser formados pela interação entre um aminoácido e a 3-deoxi-hexanona através da degradação de "Strecker" seguida de desidratação e fechamento do anel⁶¹. Recentemente, foi realizado um estudo com sistemas de reação constituídos por glicose, glicina marcada com N¹⁵ e um outro aminoácido proveniente do grupo formado por glutamina, ácido glutâmico, asparagina, ácido aspártico, lisina, arginina, fenilalanina e isoleucina⁵¹. Nesse trabalho, foi demonstrado que a glicina é superior aos demais aminoácidos estudados com relação à produção de pirróis através da reação de "Maillard". Em um outro estudo, com sistemas de reação contendo frações de baixa e alta massa molecular, isoladas do café verde e submetidas à torrefação, foi evidenciado que o pirrol e os alquil-pirróis seriam formados pela pirólise de aminoácidos ligados a proteínas e não por aminoácidos livres²².

Os pirróis apresentam propriedades sensoriais bem características. Foi constatado que os alquil- e acil-pirróis apresentaram um odor desagradável, porém os alquil-pirróis, em baixas concentrações, forneceram um aroma doce e levemente queimado⁶². Em outro estudo, verificou-se que os acil-pirróis foram responsáveis por um odor semelhante ao de pão, enquanto os furil-pirróis foram relacionados a algumas notas observadas no aroma de cogumelos⁶³. Já o 2-acetil-pirrol foi responsável pelo odor suave de caramelo identificado em carne bovina cozida⁶⁴. O N-furil-2-metil-pirrol foi relacionado a uma nota observada no aroma de café torrado velho e foi considerado como um componente de impacto para o aroma do café torrado⁶⁵. Outro componente considerado de grande importância para o café foi o N-etil-2-formil-pirrol, o qual foi responsável por uma nota observada no aroma de café torrado⁴⁵.

OXAZÓIS E TIAZÓIS

Os oxazóis são compostos heterocíclicos contendo um átomo de nitrogênio e um outro de oxigênio; já os tiazóis contêm um átomo de nitrogênio e um outro de enxofre (Figura 1). Cerca de vinte e nove oxazóis e vinte e sete tiazóis foram identificados no café torrado (Tabela 2)⁴. Os alquil-oxazóis (ex. 2,4-dimetil-oxazol e 4n-propil-2,5-dimetil-oxazol) foram detectados em

Tabela 2. Quantidade de oxazóis, tiazóis e tiofenos identificados no café torrado.

grupo / sub-grupo	oxazóis	benzo-oxazóis	tiazóis	tiofenos
simples e hidrogenados	1	—	1	1
alquil-	20	5	23	7
aril-	1	—	—	—
acil-	2	—	2	9
cetonas	—	—	—	5
alcoóis	—	—	—	1
ésteres	—	—	—	3
outros	—	—	—	5

Dados extraídos da literatura⁴

maior número^{2,13,66,67}, enquanto somente derivados como 1 aril-, 2 acil- e 5 benzo-oxazóis foram encontrados no café torrado⁴. Cerca de vinte e três alquil-tiazóis (ex. 4-etil-tiazol e 2,4,5-trimetil-tiazol) foram detectados no café torrado^{2,67}. Já os acil-tiazóis foram encontrados em menor número⁴. Até o momento, não existe qualquer referência na literatura sobre a quantidade de cada oxazol e tiazol no café torrado.

Apesar dos oxazóis serem formados exclusivamente por tratamento térmico, o mecanismo exato de formação desses compostos ainda não é conhecido⁵¹. Foi sugerido, inicialmente, que os hidroxil-aminoácidos seriam os precursores dos oxazóis identificados no café torrado⁶⁸. Hidroxil-aminoácidos sozinhos ou na presença de sacarose foram aquecidos em condições de tempo e temperatura similares às usadas na indústria de café⁶⁶. Devido a ausência de oxazóis na fração volátil gerada por aquecimento desses sistemas, foi sugerido, então, que os oxazóis não seriam formados por pirólise de hidroxil-aminoácidos. De acordo com um outro estudo, usando sistemas de reação contendo glicose e mais de um aminoácido, os oxazóis poderiam ser formados através da reação de "Maillard" e/ou pela degradação de "Strecker"⁵¹. Nesse trabalho, o oxazol mais abundante foi o 4,5-dimetil-oxazol. Segundo seus autores, existem dois possíveis caminhos para a formação desse composto (Figura 4)⁵¹: o primeiro seria a reação direta da glicina com o diacetil oriundo da glicose para formar uma base de "Schiff" instável. Em seguida, ocorreria uma descarboxilação com o fechamento do anel para produzir o oxazol em questão. O segundo e mais provável caminho, segundo os autores, seria a degradação de "Strecker" entre aminoácidos e o diacetil que renderia a 2-amino-3-butanona. O 4,5-dimetiloxazol seria produzido pela condensação desse último composto com o formaldeído.

As propriedades sensoriais dos oxazóis e tiazóis nos alimentos são descritas na literatura. Os oxazóis possuem um aroma doce e semelhante ao de nozes². Embora os oxazóis sejam compostos característicos de alimentos processados termicamente, nenhum deles têm sido associado a percepção de queimado⁷⁰. Já os tiazóis geralmente possuem um odor semelhante ao de vegetais, de carne, de matéria-torrada e de nozes⁶⁹. A presença de substituintes de cadeias laterais curtas na molécula do tiazol intensifica esses aromas. Até o momento, nenhum oxazol ou tiazol foi identificado como componente de impacto para o aroma do café.

TIOFENOS

Os tiofenos foram identificados em uma série de trabalhos publicados na literatura^{13,16,17,19,20,44,50,71,72}. Como exemplos

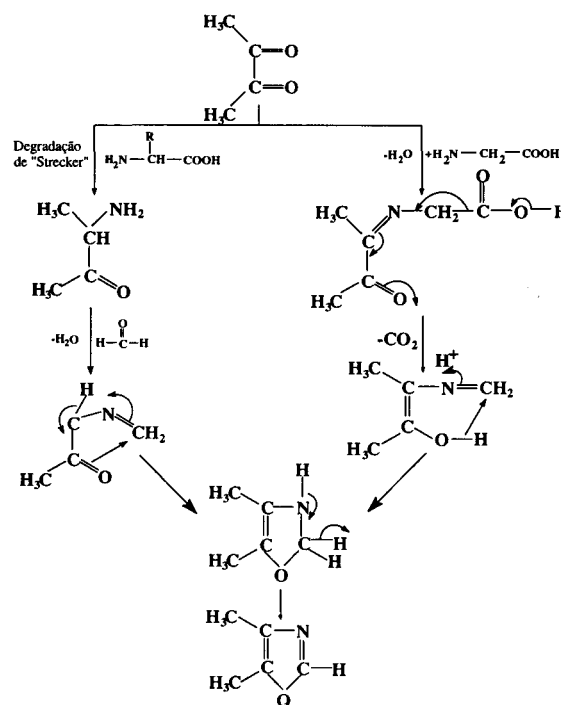


Figura 4. Possíveis vias de formação do 4,5-dimetil-oxazol⁵¹.

desses componentes podemos citar o 4-etil-2-metil-tiofeno, o benzo-tiofeno e o 2-acetil-tiofeno. Desse grupo de compostos contendo enxofre, o 2-acetil-tiofeno parece ser um dos majoritários em termos de quantidade (1,25 mg/Kg de café torrado)⁷¹. De acordo com dados da literatura, trinta e um tiofenos já foram identificados como componentes da fração volátil do café torrado⁷³, sendo que onze desses foram detectados exclusivamente nesse produto⁷⁴.

A formação dos tiofenos no café provavelmente está relacionada à presença de aminoácidos sulfurados. Esses aminoácidos sofrem degradação individual durante a torrefação e interagem com açúcares redutores e intermediários da reação de "Maillard", resultando na formação de uma ampla variedade de compostos voláteis sulfurados. Um estudo demonstrou que os tiofenos surgem, por exemplo, como um dos produtos da pirólise individual da cisteína⁷⁵.

O odor característico de cebola frita é relacionado aos dimetil-tiofenos⁷⁶. Esses compostos podem ser preparados aquecendo-se o *cis/trans* proprenil-propil-dissulfeto. Acredita-se que esse odor característico possa ser, na realidade, atribuído ao 2-(propilditio)-dimetil-tiofeno, como demonstrado recentemente^{77,78}. Foi relatado que o limite de detecção dos dimetil-tiofenos em água seria de 3-5 x 10⁶ ng/l⁷⁹. O limite de detecção em água estimado para o 2-(propilditio)-3,4-dimetil-tiofeno foi de 10-50 ng/l⁸⁰. Em um outro trabalho, foi atribuído aos

tiofenos um aroma de cebola, de mostarda e também um aroma sulfuroso, porém aos seus ésteres, aldeídos e cetonas foi atribuído um aroma doce, de mel, de caramelo⁶⁹. De modo geral, é sabido que o tiofeno apresenta um odor um tanto quanto semelhante ao do benzeno⁷⁶. Uma semelhança mais pronunciada foi observada entre o p-xileno e o 2,5-dimetil-tiofeno⁷⁶. Segundo dados da literatura, o 3-metil-2-acetil-tiofeno apresenta um aroma semelhante ao do café, sendo considerado um dos possíveis compostos voláteis de impacto para o aroma desse produto⁷⁴.

Os compostos voláteis contendo um átomo de enxofre, como por exemplo os tiofenos, aparentam possuir grande relevância para o aroma do café torrado². Infelizmente, esses compostos estão presentes em baixíssimas quantidades, dificultando o estudo quantitativo e a avaliação de suas propriedades sensoriais.

PIRAZINAS

As pirazinas são compostos aromáticos contendo dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 4 de um anel de seis membros. Esses compostos voláteis são característicos de alimentos submetidos a tratamento térmico, com exceção das metoxi-pirazinas, que são encontradas geralmente nos vegetais não processados. Isso ocorre, porque as metoxi-pirazinas são normalmente degradadas durante a torrefação do café verde.

Uma classificação genérica das pirazinas é apresentada na Tabela 3⁴. O conteúdo de alquil-pirazinas é proporcional ao grau de torrefação². Esse conteúdo aumenta, até um certo limite, à medida que a temperatura de torrefação aumenta. Quando essa torrefação é muito prolongada começa a ocorrer degradação dessas pirazinas. Geralmente maiores quantidades de pirazinas devem ser encontradas em cafés submetidos a torrefações leve e moderada. Recentemente, foi demonstrado que as razões entre a 2-metil-/2,5-dimetil-pirazina e a 2-metil-/2,6-dimetil-pirazina podem ser de grande utilidade para o monitoramento da torrefação do café⁸¹. Do grupo das alquil-pirazinas, destacam-se as metil- e dimetil-pirazinas, que segundo dados da literatura são as pirazinas majoritárias do café torrado⁸². A pirazina e as alquil-pirazinas foram identificadas em uma série de trabalhos produzidos a partir de meados da década de 60^{9,10,16,17,19,23,27,28,43,50,82-85}. As pirazinas tendo grupamento alquênico, as ciclo-pirazinas e as furil-pirazinas também foram descritas por vários autores^{15,27,28,43,83,84,86}. Atualmente, mais de oitenta pirazinas já foram identificadas como componentes da fração volátil do café torrado⁷³. As pirazinas encontradas em maior quantidade no café torrado são, em ordem decrescente⁷¹: metil-pirazina (60-80 mg/Kg de café torrado), 2,6-dimetil-pirazina (30-35 mg/Kg), 2,5-dimetil-pirazina (25-35 mg/Kg), 2-etil-pirazina (13,5-16,5 mg/Kg), trimetil-pirazina (8-10 mg/Kg), 2-etil-5-metil-pirazina (7,5-8,6 mg/Kg), pirazina (3,5-6,0 mg/Kg) e 2,3-dimetil-pirazina (3,0-4,5 mg/Kg).

Através de estudos com sistemas de reação descobriu-se que as pirazinas podem ser geradas diretamente por reação de "Maillard", por degradação de "Strecker" ou ainda por pirólise de hidroxil-aminos^{60,83,86,87}. Na reação de "Maillard" as maiores fontes de carbono para a formação das pirazinas são

os produtos da degradação de carboidratos, enquanto que os aminoácidos funcionam basicamente como fontes de nitrogênio para esses compostos⁸². Um estudo foi realizado visando analisar o conteúdo total dos derivados de pirazina obtidos a partir de sistemas de reação contendo um aminoácido ou cloreto de amônio e a glicose ou a sacarose⁸². Foi constatado que o sistema contendo asparagina e glicose foi o que apresentou o maior rendimento. Nesse mesmo trabalho, também foi observado que a distribuição dos derivados de pirazina varia tanto do ponto de vista quantitativo como qualitativo, dependendo do sistema aminoácido/glicose empregado. Em um outro estudo, foi identificada uma série de derivados da pirazina em sistemas contendo hidroxil-aminos e sacarose⁸³. Foi evidenciado que em sistemas de reação contendo serina/frutose gerou-se uma maior quantidade de pirazinas do que em sistemas contendo serina/glicose⁶⁰, e, que, a quantidade e a variedade das pirazinas formadas depende da razão entre a quantidade de aminoácido e açúcar no sistema de reação⁸⁸. De acordo com este último estudo, um excesso de aminoácido em relação ao açúcar favorece a formação de compostos heterocíclicos contendo átomos de nitrogênio (ex. pirazinas). Na degradação de "Strecker" as α -dicetonas são as fontes de carbono das pirazinas e o nitrogênio continua sendo proveniente dos aminoácidos. Uma série de pirazinas foi identificada a partir de reações da alanina com α -dicetonas (ex. 2,3-butanodiona) por análise com CG/EM⁸⁹. Nesse estudo, foi sugerido que duas ou mais α -dicetonas poderiam interagir com um único aminoácido para formar uma variedade de alquil-pirazinas. A partir de uma investigação a respeito da reatividade de aminoácidos com α -dicarbonilas, foi determinado que os aminoácidos básicos e os hidroxil-aminos são os mais reativos⁹⁰. Na pirólise, os aminoácidos atuam tanto como fonte de carbono como de nitrogênio para a formação de pirazinas. Foi demonstrado que a pirólise individual de β -hidroxil-aminos (280°C e 360°C, em atmosfera de nitrogênio por 30 minutos), produziu alquil-pirazinas⁸⁷. Em outro estudo foram identificadas várias pirazinas a partir da pirólise individual de hidroxil-aminos a 200°C por 4 horas⁹¹. Nesse mesmo estudo a glicina, alanina, fenilalanina, β -alanina, leucina, isoleucina, valina, metionina, cistina, tirosina, histidina, prolina, hidroxil-prolina, triptofano, lisina, hidroxil-lisina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutâmico, adenina e adenosina foram aquecidas individualmente em condições similares às usadas na pirólise de hidroxil-aminos. Dessa vez, nem a pirazina e nem os seus derivados foram encontrados. Foi sugerido, também, que diferenças na composição das pirazinas poderiam ser obtidas aquecendo-se o mesmo aminoácido em diferentes condições. Com sistemas de reação contendo treonina, serina e sacarose, foi demonstrado que as alquil-pirazinas são geradas em maior quantidade no sistema serina/treonina (38%) do que no sistema serina/treonina/sacarose (32%)⁸⁶. Nesse trabalho, concluiu-se que muitos compostos voláteis foram oriundos da pirólise de hidroxil-aminos. Segundo esses mesmos autores, os hidroxil-aminos sofreriam descarboxilação e dimerização para formarem os compostos voláteis (Figura 5)¹⁶. Entretanto, algumas

Tabela 3. Quantidade de pirazinas e piridinas identificadas no café torrado.

grupo / sub-grupo	pirazinas	benzo-pirazinas (quinoxalinas)	piridinas	benzo-piridinas (quinolinas)
simples e hidrogenados	1	6	2	1
alquil-	34	4	6	3
alquil-furil-	12	—	—	—
acil-	7	—	3	—
alcoxi-	4	—	—	—
outros	13	1	1	—

Dados extraídos da literatura⁴

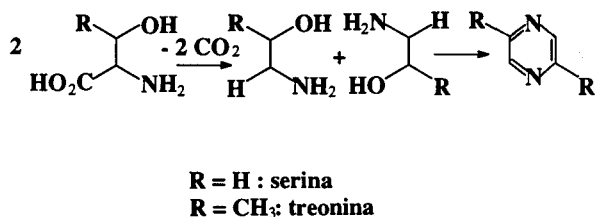


Figura 5. Formação de pirazinas via pirólise de hidroxí-aminoácidos¹⁶.

pirazinas de massa molecular mais alta foram encontradas na fração volátil do sistema contendo somente os hidroxí-aminoácidos. Isso seria uma indicação de que outras reações mais complexas poderiam estar ocorrendo. Trabalhos mais recentes realizados com frações de baixa e alta massa molecular, isoladas do café verde e submetidas à torrefação, tentaram esclarecer melhor as vias de formação das pirazinas nesse produto^{22,25}. Cerca de onze alquil-pirazinas foram encontradas na fração torrada de alta massa molecular, a qual foi composta basicamente por polissacarídeos e proteínas. Entretanto, nenhuma pirazina foi detectada na fração torrada de baixa massa molecular (sacarose, aminoácidos livres, etc). Sendo assim, foi concluído que os aminoácidos ligados a proteínas são importantes precursores de pirazinas. Como a treonina foi o aminoácido que sofreu maior degradação durante a torrefação, foi sugerido que as pirazinas poderiam ser, em parte, diretamente derivadas da degradação pirolítica de resíduos de treonina ligados a proteínas. A ausência de pirazinas na fração torrada de baixa massa molecular pode ser atribuída ao baixo conteúdo de hidroxí-aminoácidos livres. A pirólise dessa pequena quantidade de aminoácidos livres não produziria quantidade detectável de pirazinas pelos métodos empregados (CG e CG/EM). Além disso, como a relação sacarose/aminoácidos livres nessa fração do café é alta, a produção de pirazinas via reação de "Maillard" ou degradação de "Strecker" estaria seriamente prejudicada⁸⁸.

As pirazinas contribuem apreciavelmente para as características sensoriais dos alimentos. Esses componentes apresentam propriedades sensoriais bem peculiares, sendo considerados flavorizantes importantes para a indústria de produtos alimentícios⁹². As metoxi-pirazinas são odorantes potentes e estão amplamente distribuídas pelo reino vegetal, sendo responsáveis pelo odor peculiar de grama, de café verde, de ervilha, de batata e de outros vegetais crus^{93,94,95}. A 2-metil-6-etoxi-pirazina, por exemplo, é utilizada como um agente flavorizante do abacaxi⁹⁶. Em estudo recente, foi estabelecido que a isobutil-metoxi-pirazina apresenta um alto valor de odor ativo (VOA - concentração de um odorante dividida pelo seu limiar de detecção no mesmo meio) e está presente no café arábica torrado em uma concentração sete vezes superior ao do café robusta⁴⁷. Esse resultado é de certa forma surpreendente, já que as metoxi-pirazinas são normalmente degradadas durante a torrefação. Com isso, foi concluído que essa metoxi-pirazina pertence ao grupo de substâncias consideradas de impacto para o aroma do café arábica torrado moído. As alquil-pirazinas apresentam propriedades sensoriais bem variadas. Segundo dados da literatura, a pirazina pode ser relacionada tanto a um aroma semelhante ao de milho, como também a um odor doce extremamente forte^{97,98}. Já a 2-metil-pirazina foi relacionada a um odor de matéria queimada e de grama^{97,99}. As descrições odoríferas das dimetil-pirazinas variam bastante conforme a posição dos substituintes na molécula. Atribui-se a 2,3-dimetil-pirazina um aroma semelhante ao de óleo de linhaça⁹⁹. Já a 2,5-dimetil-pirazina apresentou um aroma semelhante ao de grama e de nozes^{97,100}, e um odor característico de éter foi descrito para a 2,6-dimetil-pirazina¹⁰¹. A 2-etil-pirazina foi responsável por odor semelhante ao de manteiga e de matéria torrada^{43,99}. Já a 2,3,5-trimetil-pirazina foi caracterizada como tendo aroma semelhante ao de nozes, de grama e de matéria

torrada^{10,97,100,102}. Da mesma forma que as dimetil-pirazinas, as etil-metil-pirazinas apresentaram aromas diferentes conforme a posição dos substituintes no anel da pirazina. Isso pode ser evidenciado pelos seguintes exemplos encontrados na literatura^{43,97,99}: a 2-etil-3-metil-pirazina forneceu um aroma semelhante ao de nozes, a 2-etil-5-metil-pirazina um odor de grama e a 2-etil-6-metil-pirazina foi relacionada ao odor de matéria torrada. Esse último odor, também foi relacionado à presença da 2-etil-3,6-dimetil-pirazina⁹⁷. Através de Análise por Diluição de Extrato de Aroma (AEDA) determinou-se que a 2-etil-3,5-dimetil-pirazina, a 2,3,5-trimetil-pirazina, a 2-vinil-5-metil-pirazina e a isopropenil-pirazina desempenham papel importante nos aromas do café torrado e da bebida de café^{43,102}. Nesses trabalhos, foi atribuído o odor característico de matéria torrada a essas substâncias. Por outro lado, a 2-etil-pirazina e a 2-etil-6-metil-pirazina não foram consideradas substâncias relevantes para o aroma do café torrado. A técnica de AEDA permite determinar o potencial odorífero de um determinado componente mediante diluições sucessivas de uma solução do mesmo. A caracterização odorífera das ciclo-pirazinas e das metil-tio-furil-pirazinas também está descrita na literatura^{98,103}. A 2-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta-pirazina e a 5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta-pirazina foram responsáveis por um aroma semelhante ao de terra e de batata¹⁰³. Já a 2-metil-3-tio-furil-pirazina e a 2-metil-5-tio-furil-pirazina foram responsáveis por um aroma semelhante ao de café torrado e ao de carne submetida à cocção⁹⁸.

PIRIDINAS

Essas substâncias são encontradas em alimentos submetidos à atividade microbiana ou a tratamento térmico (ex.: café, bebidas alcoólicas, leite, carne)¹⁰⁴. Uma classificação genérica para as piridinas é apresentada na Tabela 3⁴. Segundo dados da literatura, a quantidade de piridinas no café torrado também depende do grau de torrefação¹⁰⁵. Entretanto, de modo contrário às pirazinas, as quantidades de piridinas são maiores no café submetido à torrefação forte. Com isso, seria razoável concluir que provavelmente as piridinas são mais resistentes à degradação térmica do que as pirazinas.

A presença da piridina na fração volátil do café torrado foi descrita em uma série de trabalhos^{10,12,16,17,19,23,66,71,84}. De acordo com um desses trabalhos, a piridina está presente em uma quantidade ao redor de 20 - 50 mg por Kg de café torrado⁷¹. Além da piridina, a presença de seis alquil-piridinas também já foi descrita na literatura^{12,66,84}. Um total de doze piridinas já foram identificadas no café torrado⁷³. As piridinas podem ser geradas por degradação térmica da trigonelina, por pirólise de aminoácidos, por degradação de "Strecker" ou ainda via reação de "Maillard"^{57,106,107,108}.

O conteúdo de trigonelina no café varia conforme o método empregado para análise e a espécie estudada. Segundo dados da literatura, o conteúdo dessa base nitrogenada pode variar de 0,3-0,9% no café robusta e de 0,6-1,2% no café arábica^{109,110,111,112,113}. A degradação térmica da trigonelina ocorre durante o processo de torrefação do café. O grau de degradação da trigonelina varia conforme o tempo e a temperatura de torrefação. A trigonelina foi aquecida a 210°C em tempos diferentes¹¹⁴. Cerca de 95% da trigonelina foi degradada no tempo de 20 minutos. Após 60 minutos foi detectada apenas uma quantidade residual de trigonelina. Somente 15% da trigonelina inicial permaneceu após o processo de torrefação a 230°C por 15 minutos¹¹⁵. A 180°C por 15 min, a perda observada foi muito pequena (2%), chegando a 60% com o aumento do tempo de torrefação para 45 min¹¹⁵. Existem trabalhos na literatura que relatam a possibilidade de determinação indireta do grau de torrefação de um café através de seu conteúdo residual de trigonelina^{116,117}. Essa correlação foi feita com base na razão entre o conteúdo de trigonelina e de ácido nicotínico. Uma vez

que o ácido nicotínico é um dos produtos da degradação térmica da trigonelina, essa razão diminui à medida que o grau de torrefação aumenta. A degradação da trigonelina gera compostos não-voláteis e voláteis. Quando a trigonelina foi aquecida em um tubo selado (180-230°C por 15-16 minutos) os principais componentes não-voláteis oriundos da degradação da trigonelina foram a niacinamida, o metil-nicotinato e a N-metil-nicotinamida⁵⁷. Nesse mesmo trabalho, determinou-se que a fração volátil obtida era composta majoritariamente por compostos que apresentavam um anel correspondente ao da piridina. De acordo com esses autores a piridina seria formada pela descarboxilação e desmetilação da trigonelina. Já as alquil-piridinas seriam originárias da recombinação dos intermediários formados durante a pirólise. Como já foi mencionado anteriormente, a pirólise de aminoácidos é uma outra via de formação das piridinas. Foi realizado um estudo com a valina, leucina, isoleucina e a alanina para avaliar a formação das piridinas pela decomposição térmica desses aminoácidos (220°C - 1h)^{106,107,108}. Os derivados da piridina foram detectados somente após a pirólise individual da alanina. A formação, por exemplo, da 2-metil-5-etil-piridina a partir da pirólise desse aminoácido é mostrada na Figura 6⁴⁹. Segundo esses autores, a pirólise da alanina gera o etanal e a condensação aldólica de duas moléculas dessa substância gera o crotonaldeído. A dimerização de duas moléculas de crotonaldeído em presença de amônia produz a 2-metil-5-etil-piridina (Figura 6a). Uma outra via de formação dessa alquil-piridina seria a formação de uma imina a partir da reação da amônia com o acetaldeído, seguida da trimerização dessa imina e fechamento do anel com perda simultânea da amônia (Figura 6b). A ausência de derivados de piridina após a pirólise dos demais aminoácidos mencionados, pode estar relacionada à estrutura ramificada da cadeia desses aminoácidos, o que tornaria difícil a condensação do tipo aldólica¹¹⁸. A pirólise de hidroxil-aminoácidos também seria responsável pela formação de piridinas no café torrado⁸⁶. Entretanto, os autores desse estudo não descreveram o caminho de formação das piridinas através da pirólise desse grupo de aminoácidos.

Os intermediários da degradação de "Strecker" são um aldeído de "Strecker" e uma aminocetona. A partir desses intermediários uma série de compostos voláteis são formados, inclusive algumas piridinas. Os produtos obtidos da reação

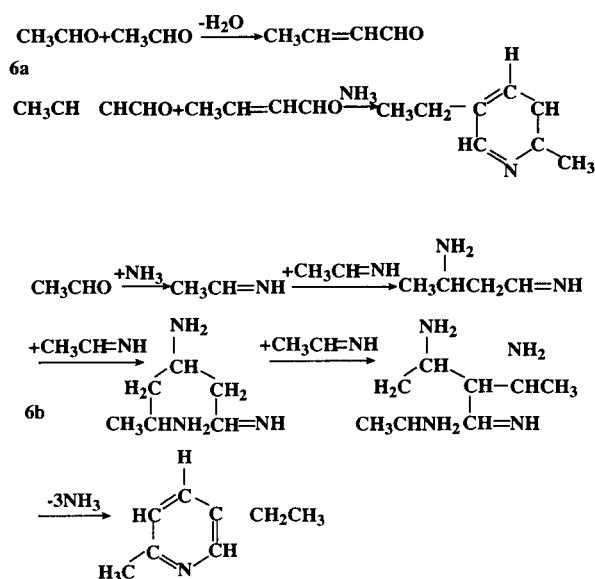


Figura 6. Formação de alquil-piridinas a partir da pirólise da alanina. 6a-Via condensação aldólica; 6b-Via reação da amônia com o acetaldeído⁴⁹.

entre a fenilalanina e a glicose, sob temperatura elevada, foram estudados (220°C, 10 minutos)¹⁵. Através desse estudo, os autores demonstraram que o principal produto de reação foi o aldeído fenilacético (aldeído de "Strecker"). Esse composto seria o principal precursor dos componentes voláteis característicos do sistema fenilalanina/glicose. No conjunto dos compostos voláteis oriundos desse sistema foram detectadas algumas piridinas (ex.:3-fenil-piridina). A 2-hidroxi-piridina foi encontrada entre os compostos voláteis identificados por CG/EM, provenientes da reação entre a asparagina e a glicose em autoclave a 150°C⁸⁸. Esses autores propuseram que essa piridina seria formada através da condensação do etanal com a formil-acetamida. Esse mesmo trabalho sugere ainda que as piridinas também poderiam ser formadas via reação de "Maillard". De acordo com os autores, ocorreria inicialmente uma condensação entre aldeídos com perda de moléculas de água e formação de carbonila α , β -insaturada. Em seguida, essas carbonilas sofreriam um ataque nucleofílico pela amônia, gerando derivados nitrogenados. Esses produtos seriam, então, submetidos a reações de desidratação e oxidação para formar alquil-piridinas. Foi sugerido que a disponibilidade de amônia seria o fator determinante para a formação das piridinas via reação de "Maillard"¹¹⁹. Entretanto, segundo um outro trabalho, os grupos α -amino dos aminoácidos apresentaram maior tendência para condensarem com compostos contendo carbonila através de uma única etapa do que sofrerem degradação formando amônia que mais tarde seria incorporada ao anel de piridina⁵¹. Vários derivados da piridina foram detectados em sistemas de reação contendo hidroxil-aminoácidos e sacarose⁶⁶. As acetil-piridinas foram consideradas os produtos característicos da torrefação nesse tipo de sistema.

As piridinas apresentam propriedades sensoriais peculiares, sendo associadas a um odor desagradável característico presente nos alimentos¹⁰⁴. Segundo dados da literatura, a piridina foi uma das responsáveis pelo odor desagradável do café torrado velho¹⁰⁵. Já a 2-metil-piridina foi responsável por uma sensação adstringente semelhante a de avelã e a 2,3-dimetil-piridina por um odor relacionado ao de borracha e de matéria queimada¹⁰⁴. As piridinas encontradas na fração volátil do café torrado têm recebido pouca atenção dos estudiosos da área de aroma e, sendo assim, há pouca informação disponível referente à contribuição das piridinas para o aroma final do café torrado.

REFERÊNCIAS

- Reichstein, T.; Staudinger, H.; In Holscher, W.; Vitzthum, O. G. and Steinhart, H.; *Café Cacao Thé* **1990**, *34*, 205.
- Dart, S. K.; Nursten, H. E. In *Coffee Chemistry (vol. 1)*; Clarke, R. J.; Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers; London, **1985**; p. 223.
- Clifford, M. N.; In *Coffee Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*; Clifford, M. N.; Willson, K. C., Eds.; Croom Helm; London, **1985**; p 305.
- Clarke, R. J.; *Ital. J. Food Sci.* **1990**, *2*, 79.
- Johnston, W.R.; Frey, C. N.; In *Agric. Food Chem.*; Merritt Jr, C.; Bazinet, M. L.; Sullivan, J. H.; Robertson, D. H.; **1963**, *11*, 152.
- Zlatkis, A.; Sivetz, M.; *Food Res.* **1960**, *25*, 395.
- Rhodes, J. W.; *Agric. Food Chem.* **1960**, *8*, 136.
- Merritt Jr, C.; Bazinet, M. L.; Sullivan, J. H.; Robertson, D. H.; *Agric. Food Chem.* **1963**, *11*, 152.
- Heins, J. T.; Maarse, H.; *J. Gas Chrom.* **1966**, *4*, 395.
- Gianturco, M. A.; Giammarino, A. S.; Friedel, P.; *Nature* **1966**, *210*, 1358.
- Reymond, D.; Mueggler-Chavan, F.; Viani, R.; Vuataz, L.; Egli, R.; *J. Gas Chrom.* **1966**, *4*, 28.
- Stoffelsma, J.; Sipma, G.; Kettenes, D. K.; Pypker, J.; *J. Agric. Food Chem.* **1968**, *16*, 1000.

13. Vitzthum, O. G.; Werkhoff, P.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1976**, *160*, 277.
14. Baltes, W.; Bochmann, G.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, *184*, 179.
15. Baltes, W.; Mevissen, L.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1988**, *187*, 209.
16. Shimoda, M.; Shibamoto, T.; *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 802.
17. Kallio, H.; Leino, M.; Koullias, K.; Kallio, S.; Kaitaranta, J.; *Food Chem.* **1990**, *36*, 135.
18. Holscher, W.; Steinhart, H.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *195*, 33.
19. Leino, M.; Kaitaranta, J.; Kallio, H.; *Food Chem.* **1992**, *43*, 35.
20. Stoll, M.; Winter, M.; Gautschi, F.; Flament, I.; Willhalm, B.; *Helv. Chim. Acta* **1967**, *50*, 628.
21. Gautschi, F.; Winter, M.; Flament, Y.; Willhalm, B.; Stoll, M. O.; *J. Agric. Food Chem.* **1967**, *15*, 15.
22. De Maria, C. A. B.; Trugo, L. C.; Aquino Neto, F. R.; Moreira, R. F. A.; Alviano, C. S.; *Food Chem.* **1996**, *55*, 203.
23. Guyot, B.; Cros, E.; Vincent, J. C.; *Café Cacao Thé* **1982**, *26*, 279.
24. Spadone, J. C.; Takeoka, G.; Liardon, R.; *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 226.
25. De Maria, C. A. B.; Trugo, L. C.; Aquino Neto, F. R.; Moreira, R. F. A.; Alviano, C. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 267.
26. Cros, E.; Fourny, G.; Guyot, B.; Rouly, M.; Vincent, J. C.; In *Coffee chemistry (vol. 1)*; Clarke, R. J.; Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers; London, 1985; p. 223.
27. Bondarovich, H. A.; Friedel, P.; Krampfl, V.; Renner, J. A.; Shephard, F. W.; Gianturco, M. A.; *J. Agric. Food Chem.* **1967**, *15*, 1093.
28. Friedel, P.; Krampfl, V.; Radford, T.; Renner, J. A.; Shephard, F. W.; Gianturco, M. A.; *J. Agric. Food Chem.* **1971**, *19*, 530.
29. Semmelroch, P.; Laskawy, G.; Blank, I.; Grosch, W.; *Flavour and Fragrance J.* **1995**, *10*, 1.
30. Wolfrom, M. L.; Plunkett, R. A.; Laver, M. L.; *Agric. Food Chem.* **1960**, *8*, 58.
31. Tressl, R.; Holzer, M.; Kamperschrder, H.; 10th Int. Scientific Colloquium on Coffee (Salvador); *Association Scientifique Internationale du Café* (Paris) 1982, p. 279.
32. Trugo, L. C.; Macrae, R.; 10th Int. Scientific Colloquium on Coffee (Salvador); *Association Scientifique Internationale du Café* (Paris) 1982, p. 115.
33. Silwar, R.; Lüllmann, C.; *Café Cacao Thé* **1988**, *32*, 319.
34. Barbiroli, G.; *Rassegna Chimica* **1965**, *17*, 261.
35. De Maria, C. A. B.; Trugo, L. C.; Aquino Neto, F. R.; Moreira, R. F. A.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **1994**, *29*, 559.
36. Trugo, L. C.; Macrae, R.; *Arch. Latinoamer. Nutr.* **1989**, *39*, 96.
37. De Maria, C. A. B.; Trugo, L. C.; Moreira, R. F. A.; Werneck C. C.; *Food Chem.* **1994**, *50*, 141.
38. Wolfrom, M. L.; Patin, D. L.; *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 4060.
39. Wolfrom, M. L.; Laver, M. L.; Patin, D. L.; *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 4533.
40. Wolfrom, M. L.; Patin, D. L.; *J. Agric. Food Chem.* **1964**, *12*, 376.
41. Bradbury, A. G. W.; Hallyday, Don J.; *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 389.
42. Guadagni, D. G.; Buttery, R. G.; Harris, J.; In *Coffee Chemistry (vol. 1)*; Clarke, R. J.; Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers; London, 1985; p. 262.
43. Holscher, W.; Vitzthum, O. G.; Steinhart, H.; *Café Cacao Thé* **1990**, *34*, 205.
44. Tressl, R.; Silwar, R.; *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 1078.
45. Vernin, G.; Vernin, G.; In *Coffee Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*; Clifford, M. N.; Willson, K. C.; Eds; Croom Helm, London, 1985, p. 305.
46. Hurrell, R. F.; In *Coffee Chemistry (vol. 1)*; Clarke, R. J.; Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers; London, 1985; p. 265.
47. Semmelroch, P.; Grosch, W.; *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 537.
48. Maga, J.; *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 691.
49. Baltes, W.; Bochmann, G.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, *184*, 478.
50. Wang, T. H.; Shanfield, H.; Zlatkis, A.; *Chromatographia* **1983**, *17*, 411.
51. Hwang, H-Ing.; Hartman, T. G.; Ho C-Tang; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2917.
52. Macrae, R.; In *Coffee Chemistry (vol. 1)*; Clarke, R.J.; Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers; London, 1985; p. 115.
53. Underwood, G. E.; Deatherage, F. E.; *Food Res.* **1952**, *17*, 419.
54. Feldman, J. R.; Ryder, W. S.; Kung, J. T.; *J. Agric. Food Chem.* **1969**, *17*, 733.
55. Macdonald, I. A.; Macrae, R.; 11th Int. Scientific Colloquium on Coffee (Lomé); *Association Scientifique Internationale du Café* (Paris) 1985, p. 333.
56. Budavary, S. (Ed.); *The Merck Index*. 11th Edition, Merck & Co., Rahway, New Jersey, 1989, 1525.
57. Viani, R.; Horman, I.; *J. Food Sci.* **1974**, *39*, 1216
58. Rizzi, G. P.; *J. Agric. Food Chem.* **1974**, *22*, 279.
59. Mevissen, L.; Baltes, W.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1983**, *176*, 206.
60. Reese, G.; Baltes, W.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *194*, 417.
61. Kato, H.; Fujimaki, M.; In Hwang, H-Ing.; Hartman, T.G. and Ho C-Tang; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2917.
62. Shigematsu, H.; Kurata, T.; Kato, H.; Fujimaki, M.; *Agric. Biol. Chem.* **1972**, *36*, 1631.
63. Tressl, R.; Grünwald, K. G.; Silwar, R.; In *Coffee Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*; Clifford, M. N.; Willson, K. C.; Eds; Croom Helm, London 1985, p. 371.
64. Watanabe, K.; Sato, Y.; *J. Agric. Food Chem.* **1972**, *20*, 174.
65. Tressl, R.; Grünwald, K. G.; Kamperschrder, H.; Silwar, R.; In *Coffee Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*; Clifford, M. N.; Willson, K. C., Eds; Croom Helm, London, 1985, p. 371.
66. Baltes, W.; Bochmann, G.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, *185*, 5.
67. Vitzthum, O. G.; Werkhoff, P.; *J. Food Sci.* **1974**, *39*, 1210.
68. Vitzthum, O. G.; Werkhoff, P.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1974**, *156*, 300.
69. Maga, J.; *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1975**, *6*, 153.
70. Maga, J.; *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1981**, *14*, 295.
71. Silwar, R.; Bendig, G.; Dommers, D.; *Lebensmittelchem. Gerichl. Chem.* **1986**, *40*, 84.
72. Boelens, M. H.; van Gemert, L. J.; *Perfumer & Flavorist* **1993**, *18*, 29.
73. Van Straten, S.; Maarse, M.; Visscher, C. A.; In Clarke, R. J.; *Ital. J. Food Sci.* **1990**, *2*, 79.
74. Vernin, G.; Vernin, G.; In *Coffee Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*; Clifford, M.N.; Willson, K. C.; Eds; Croom Helm, London, 1985, p. 347.
75. Tressl, R.; Engel, K-H & Helak, B.; In *Coffee Chemistry (vol. 1)*; Clarke, R. J.; Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers; London, 1985; p. 244.

76. Boelens, H.; Heydel, J.; In Boelens, M. H.; *Perfumer & Flavorist* **1993**, *18*, 29.
77. Kuo, M.-C.; Chien, M.; Ho, C. T.; In Boelens, M. H.; van Gemert, L. J.; *Perfumer & Flavorist* **1993**, *18*, 29.
78. Kuo, M.-C.; Ho, C.-T.; In Boelens, M. H.; van Gemert, L. J.; *Perfumer & Flavorist* **1993**, *18*, 29.
79. Galetto, W. G.; Hoffman, P. G.; *J. Agric. Food Chem.* **1970**, *24*, 852.
80. Boelens, M.; De Valois, P. J.; Van der Gen, A.; *J. Agric. Food Chem.* **1971**, *19*, 984.
81. Hashim, L.; Chaveron, H.; *Food Res. Int.* **1996**, *28*, 619.
82. Koehler, P. E.; Mason, M. E.; Newell, J. A.; *J. Agric. Food Chem.* **1969**, *17*, 393.
83. Baltes, W.; Bochmann, G.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, *184*, 485.
84. Goldman, I. M.; Seibl, J.; Flament, I.; Gautschi, F.; Winter, M.; Willhalm, B.; Stoll, M.; *Helv. Chim. Acta* **1967**, *69*, 694.
85. Koehler, P. E.; Mason, M. E.; Odell, G. V.; *J. Food Sci.* **1971**, *36*, 816.
86. Baltes, W.; Bochmann, G.; *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 340.
87. Kato, S.; Kurata, T.; Ishitsuka, R.; Fujimaki, M.; *Agric. Biol. Chem.* **1970**, *34*, 1826.
88. Bohnenstengel, C.; Baltes, W.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *194*, 366.
89. Rizzi, G. P.; *J. Agric. Food Chem.* **1972**, *20*, 1081.
90. Piloty, M.; Baltes, W.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1979**, *168*, 368.
91. Wang, P. S.; Odell, V.; *J. Agric. Food Chem.* **1973**, *21*, 868.
92. Maga, J.; *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1982**, *15*, 48.
93. Seifert, R. M.; Buttery, R. G.; Guadagni, D. G.; Black, D. R.; Harris, J. G.; *J. Agric. Food Chem.* **1972**, *20*, 135.
94. Murray, K. E.; Shipton, J.; Whitfield, F. B.; *Chem. Ind.* **1970**, p. 897.
95. Murray, K. E.; Whitfield, F. B.; *J. Sci. Food Agric.* **1975**, *26*, 973.
96. Kung, J. F.; Epstein, M. F.; *U.S. Patent* n° 3.803.331 April 9 **1974**; In Maga, J.; *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1982**, *15*, 48.
97. Boyko, A. L.; Morgan, M. E.; Libbey, L. M.; In Maga, J.; *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1982**, *15*, 48.
98. Calabretta, P. J.; In Maga, J.; *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1982**, *15*, 48.
99. Sizer, C. E.; Maga, J. A.; Lorenz, K.; In Maga, J.; *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1982**, *15*, 48.
100. Lin, S. S.; *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24*, 1252.
101. Oser, B.L.; Ford, R. A.; *Food Technol* **1978**, *32*, 60.
102. Blank, I.; Sen, A.; Grosch, W.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *195*, 239.
103. Coleman, E.C.; Ho, C.T.; In Maga, J.; *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1982**, *15*, 48.
104. Maga, J.; *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 895.
105. Sivetz, M.; Desrosier, N. W.; *Coffee Technology*, AVI Publishing Company, Inc., Connecticut, 1979, p. 256, 563.
106. Lien, Y. C.; Nawar, W. W.; *J. Food Sci.* **1974**, *39*, 911.
107. Lien, Y. C.; Nawar, W. W.; *J. Food Sci.* **1974**, *39*, 914.
108. Kato, S.; Kurata, T.; Fujimaki, M.; *Agric. Biol. Chem.* **1973**, *37*, 539.
109. Yeransian, J. A.; Kadin, H.; Borker, E.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1963**, *46*, 315.
110. Streuli, H.; 6th Int. Scientific Colloquium on Coffee (Bogotá); Association Scientifique Internationale du Café (Paris) 1973, p. 61.
111. Clifford, M. N.; *Process Biochem.* **1975**, p. 20.
112. Maier, H. G.; *Kaffee*; Paul Parey; Berlin, **1981**, p. 35.
113. Stenert, A.; Maier, H. G.; *Z. Lebens. Unters. Forsch.* **1993**, *196*, 430.
114. Taguchi, H.; Sakaguchi, M.; Shimabayashi, Y.; *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 3467.
115. Hughes, E. B.; Smith, R. F.; *J. Soc. Chem. Ind.* **1946**, *65*, 284.
116. Stennert, A.; Maier, H. G.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1996**, *202*, 45.
117. Kwasny, H.; *Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem.* **1978**, *32*, 36.
118. Layer, R. W.; *Chem. Rev.* **1962**, *63*, 489.
119. Baines, D. A.; Mlotkiewicz, J. A.; In Hwang, H-Ing.; Hartman, T. G.; Ho C-Tang; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2917.