

**UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO
DOURO**

Melanoidinas das Infusões de Café Arábica vs Robusta. Caracterização Química

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Qualidade Alimentar

Cristiana Patrícia Carvalho Simões

Orientador: Professor Doutor Fernando Milheiro Nunes



Vila Real, 2016

**UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO
DOURO**

**Melanoidinas das Infusões de Café
Arábica vs Robusta. Caracterização
Química**

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Qualidade Alimentar

Cristiana Patrícia Carvalho Simões

Orientador: Professor Doutor Fernando Milheiro Nunes

Composição do Júri:

Vila Real, 2016

Este trabalho foi elaborado com vista à realização da dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Qualidade Alimentar da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais por toda a força, motivação e carinho que me deram ao longo deste trabalho.

À minha irmã pela amizade, carinho, força, pelos seus conselhos sempre úteis e pelas suas palavras reconfortantes.

Quero agradecer ao Professor Doutor Fernando Nunes por ter aceite ser meu orientador de dissertação, pela sua ajuda, disponibilidade, paciência, dedicação e, principalmente pelos conselhos e ensinamentos transmitidos.

Ao Sr. Carlos, técnico de laboratório, pela disponibilidade, simpatia e ensinamentos incutidos durante todo este trabalho.

Ao André Lemos, pela ajuda na execução do trabalho no laboratório e sobretudo pela boa disposição.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Sofia por toda a ajuda, força, incentivo.

Aos meus colegas e amigos do Mestrado em Biotecnologia e Qualidade Alimentar, pela amizade, por sempre acreditarem em mim e por todo o companheirismo.

Ao meu namorado João, por todo o apoio, amizade, companheirismo, afeição, por estar sempre comigo nos bons e maus momentos.

Resumo

A natureza química das melanoidinas embora não totalmente conhecida inclui polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos. Trabalhos anteriores demonstraram que os compostos fenólicos incorporados nas melanoidinas do café estão numa forma condensada e esterificada, com uma grande abundância de compostos fenólicos numa forma condensada, sendo a quantidade de compostos fenólicos incorporados dependente da quantidade de compostos fenólicos presentes no café. Tipicamente os cafés robusta apresentam uma quantidade de ácidos clorogénicos superiores aos cafés arábica e um menor conteúdo de sacarose. Neste trabalho foram selecionados dois cafés, um arábica e um robusta apresentando níveis de ácidos clorogénicos e de sacarose diferentes, e a incorporação de compostos fenólicos na melanoidinas dos dois cafés foi avaliada. Após a preparação das infusões de café, o material de alto peso molecular (HMWM) foi isolado por diálise. Os principais componentes presentes no HMWM foram os polissacarídeos, presentes em maior quantidade no café robusta (46.2g/100g) quando comparado com o café arábica (37.2g/100g), seguido pelo conteúdo de proteína (12%) não havendo diferenças significativas entre as duas espécies de café, e os compostos fenólicos incorporados no HMWM do café robusta foi significativamente superior ao incorporado no café arábica (8.9% e ~5.8%, respectivamente). A quantidade de ácido quínico recuperado por metanólise correspondeu a 2.27% para o café robusta e 0.92% para o café arábica. O café arábica apresentou um valor superior de material desconhecido (51,5%) quando comparado com o café robusta (41,5%), sendo que a cor recuperada no HMWM correspondeu a 45% e 56% da cor presente nos sólidos totais, apresentado um “melanoidin brwoning index” inferior (-31%) ao do café robusta. Os resultados obtidos suportam os resultados obtidos anteriormente de que quanto maior o conteúdo de ácidos clorogénicos presentes no café verde maior a quantidade de compostos fenólicos incorporados nas melanoidinas.

De forma a aprofundar a estrutura dos compostos fenólicos presentes nas melanoidinas de café foi aplicado a metanólise, método este capaz de hidrolisar ligações ester e glicosídicas. Os resultados obtidos permitiram demonstrar pela primeira vez a presença de quantidades significativas de compostos fenólicos ligados glicosidicamente às melanoidinas dos cafés (34% dos compostos fenólicos libertados por fusão alcalina), sendo estes libertados como ácido cafeico e ácido ferúlico intactos, confirmando os resultados previamente obtidos em estudos modelo. A quantidade de ácido quínico

libertado por metanólise é maior no café robusta quando comparada com o café arábica correspondente a 0,65 mol / mol em relação aos compostos fenólicos recuperados por metanólise para o café Robusta e 0,35 mol / mol para o café Arábica. Esta diferença de compostos fenólicos incorporados nas melanoidinas do café de ambas as espécies estão de acordo com a atividade antioxidante das melanoidinas de ambos os cafés e também com o seu valor de K_{mix} a 280 e 325 nm.

Os resultados obtidos neste trabalho são uma contribuição significativa para o entendimento do mecanismo de formação das melanoidinas do café e o seu possível impacto em termos de saúde do consumidor, dada a importância das melanoidinas para a actividade antioxidante das bebidas de café.

Palavras-chave: Café, café arábica, café robusta, melanoidinas, compostos fenólicos.

Abstract

The chemical nature of melanoidins although not fully known include polysaccharides, proteins and phenolic compounds. Previous work has shown that phenolic compounds incorporated into a coffee melanoidins are present in condensed and esterified forms, with a higher abundance of phenolic compounds in condensed form, and that the amount of phenolic compounds incorporated depend upon the amount of phenolic compounds present in coffee. Robusta coffees typically have a higher amount of chlorogenic acids when compared to Arabica coffees and a lower sucrose content. In this work we selected two coffees an arabica and a robusta coffee having typical levels of chlorogenic acids and of sucrose, and the incorporation of phenolic compounds into coffee melanoidins for the two coffees was evaluated. After preparation of coffee infusions, the high molecular weight material (HMWM) was isolated by dialysis. The major components present in the HMWM were polysaccharides, present in higher amounts in the robusta coffee (46.2g / 100g) when compared to Arabica coffee (37.2g / 100g), followed by protein (12%) with no significant differences between the two coffee species, and the amount of phenolic compounds incorporated into the robusta coffee HMWM was significantly higher when compared to arabica coffee (~ 8.9% and 5.8%, respectively). The amount of quinic acid recovered by methanolysis corresponded to 2.27% for robusta and 0.92% for Arabica coffees. Arabica coffee showed a higher amount of unknown material (51.5%) compared with the robusta coffee (41.5%), and the color recovered in the HMWM corresponded to 45% and 56% of the color of the total solids, presenting a “melanoidin browning index ” lower (-31%) than that of robusta coffee. These results support the previous results that the higher the content of chlorogenic acids present in green coffee the greater the amount of phenolic compound incorporated into melanoidins.

In order to deepen our understanding on the structure of phenolic compounds present in coffee melanoidins, methanolysis was applied to melanoidins. This method is capable of hydrolysing ester bonds and glycosidic bonds. The results allowed to demonstrate for the first time the presence of significant amounts of phenolic compounds glycosidically linked to coffee melanoidins (34% of phenolic compounds released by alkaline fusion), which are released as intact caffeic and ferulic acids, confirming the results previously obtained in model studies. The amount of quinic acid released by methanolysis in robusta coffee is greater compared with the corresponding arabica coffee corresponding to 0.65

mol / mol with respect to the phenolic compounds recovered by methanolysis for Robusta coffee and 0.35 mol / mol to Arabica. This difference of phenolic compounds incorporated in coffee melanoidins for both species are in accordance with their antioxidant activity, and also the value of KMIX 280 and 325 nm.

The results of this work are a significant contribution to the understanding of the formation mechanism of the coffee melanoidins and their possible impact on consumer health, given the importance of melanoidins to the antioxidant activity of coffee drinks.

Keywords: Coffee, arabica coffee, robusta coffee, melanoidins, phenolic compounds.

Índice

Agradecimentos	IV
Resumo	V
Abstract	VII
Índice de Figuras	XI
Índice de Tabelas	XIII
Lista de abreviaturas.....	XIV
1. Introdução	1
1.1 - O café.....	1
1.1.1 - A planta: classificação e origem	1
1.1.2 - A importância económica do café.....	2
1.1.3 - Espécies do café.....	3
1.1.3.1 - Café Arábica (<i>Coffea arabica</i> , L.)	3
1.1.3.2 - Café Robusta (<i>Coffea canephora</i> , L.)	3
1.2. O Café verde	4
1.2.1 - Composição química.....	4
1.2.1.1 - Hidratos de Carbono	5
1.2.1.2 - Proteínas.....	6
1.2.1.3 - Compostos fenólicos	7
1.3 - O café torrado	8
1.3.1 - Processo de torra	8
1.3.3 - Composição química.....	9
1.3.3.1 Hidratos de Carbono.....	9
1.3.3.2 Proteínas	10
1.3.3.3 Compostos Fenólicos	12
1.3.3.4 Melanoidinas	13
1.4 – Objectivos	16
Referências Bibliográficas	17
Coffee Melanoidins Formation in Arabica and Robusta Coffees: Incorporation of phenolic compounds during roasting (Paper to be submitted to publication)	22
1. Introduction	24
2. Materials and methods.....	25
2.1. Material	25
2.2. Roasting of Coffee Bean Sample	27

2.3. Chlorogenic Acid and Caffeine Content of Green and Roasted Coffees.....	27
2.4. Color of Roasted Coffee Powder.....	28
2.5. Preparation of Coffee Brews and Isolation of the High Molecular Weight Material (HMWM)	28
2.6. Characterization of Coffee Bean Samples and HMWM fractions	29
2.7. Spectroscopic Analysis	29
2.8. Antioxidant Activity.....	29
2.9. Adsorbed Phenolic Compounds	30
2.10. Alkaline Saponification.....	30
2.11. Alkaline Fusion	31
2.12. Methanolysis	32
2.13. Statistical Analysis	35
3. Results and Discussion	35
3.1. Chemical Composition of Green and Roasted Coffee	35
3.2. Chemical composition of the high molecular weight material of roasted coffee brews	39
4. Conclusions	49
References	50

Índice de Figuras

1. Introdução

Figura 1- Esquema da baga do café.....	2
Figura 2 – Estrutura dos polissacarídeos majoritários dos grãos de café verde: a) galactomananas; b) arabinogalactanas.....	5
Figura 3 – Estruturas dos: a) ácido quínico, b) formação dos derivados do ácido cinâmico: cafeico (R=OH), ferúlico (R=Ome) e p-cumárico (R=H).....	7
Figura 4 – Estrutura do ácido 5-cafeoilquínico	7
Figura 5 – Representação esquemática da estrutura das galactomananas das infusões de café Torrado.....	10
Figura 6 – Formação da 1,5-γ-quinolactona a partir do Ácido Clorogénico durante a Torra, e os dois maiores Ácidos Clorogénicos Lactonas no Café Torrado: 3-cafeoilquínico-1,5-γ-lactona (esquerda) e 4-cafeoilquínico-1,5-γ-lactona (direita)	13
Figura 7 - Ilustração da formação das melanoidinas do café	14

2. Coffee Melanoidins Formation in Arabica and Robusta Coffees: Incorporation of phenolic compounds during roasting (*Paper to be submitted to publication*)

Supplementary Figure S1 – Chromatograms of chlorogenic acid (325 nm) and caffeine (280 nm) for India (a and b, respectively) and Honduras (c and d, respectively) green coffees.....	27
Supplementary Figure S2 – Chromatogram of alkaline saponification (325 nm) for India coffee.	31
Supplementary Figure S3 - Chromatogram of alkaline fusion (280 nm) for India coffee.	32
Supplementary Figure S4 – Structure and mass spectra of standards after silylation released by methanolysis – a) Quinic acid derivative; b) p-Coumaric acid derivatives; c) Ferulic acid derivative and d) Caffeic acid derivative. e) Internal standard used (Veratric acid)	35

Figure 1 – Chemical composition of green and roasted coffee Honduras and India Coffees	37
Figure S6 – Chromatograms of a) products of hesperidin methanolysis after silylation and b) hesperetin after silylation.	42
Figure S7 – Chromatograms of a) products of narigin methanolysis after silylation and b) narigenin after silylation.....	43
Figure S8 – Chromatograms of products of ellagic acid methanolysis after silylation..	44
Figure 2 – GC-MS chromatogram of methanolysis products obtained for India HMWM a) total ion current and identification of the sugar components; b) extracted ion chromatograms showing the presence of quinic, ferulic and caffeic acids. IS – internal standard.....	45
Figure 3 - Profile of phenolic compounds present in the HMWM of (a) India (robusta) and (b) Honduras (arabica) coffees.	47

Índice de Tabelas

1. Introdução

Tabela 1 - Composição Média (% peso seco) dos Grãos de Café Verde Arábicas e Robustas	4
Tabela 2 – Composição do Café Torrado (para um grau médio de torra).....	9
Tabela 3 – Composição dos Grãos de Café Colombia após Hidrólise Ácida, antes e depois do Processo de Torra	11
Tabela 4 – Conteúdo de Ácidos Clorogénicos (%), em Função do Grau de Torra	12

2. Coffee Melanoidins Formation in Arabica and Robusta Coffees: Incorporation of phenolic compounds during roasting (*Paper to be submitted to publication*)

Supplementary Table S1 – Total Sugar Composition (Grams per 100 g, as is Basis) of Green and Roasted Coffees	38
Supplementary Table S2 – Chlorogenic Acid (CGA) Composition of Green and Roasted Coffees (Grams per 100 g, as is Basis).....	38
Supplementary Table S3 - Soluble Sugar, Caffeine, and Protein Contents (Grams per 100 g, as is Basis) of Green and Rosted Coffees.....	39
Supplementary Table S4 – Chromatic Properties of Roasted Coffee Powders.....	39
Supplementary Table S5 – Phenolic compounds released from HMWM (mmol/100g) 47	
Table 1 – Chemical Composition and Spectroscopic Properties of the High Molecular Weight Material Isolated from Honduras and India Roasted Coffee Infusions.	49

Lista de abreviaturas

ABTS – 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico)

AGPs – Ligações covalentes entre arabinogalactanas e proteínas.

CGA – Ácidos Clorogénicos

CQA – Ácidos cafeoilquínicos

HMWM – Material de Alto Peso Molecular

MBI – Melanoidin Browning Index

1. Introdução

1.1 - O café

1.1.1 - A planta: classificação e origem

O cafeeiro é um arbusto de dimensões reduzidas, originário de África e cultivado apenas nas regiões tropicais e subtropicais. A palavra café deriva do nome em latim do género a que pertence, *Coffea* L, um membro da família Rubiaceae. Apenas duas espécies têm importância económica: *Coffea arabica* L e *Coffea canephora* Pierre. As variedades Típica e a Bourbon são as mais conhecidas da *Coffea arabica* enquanto que a Robusta é a variedade mais conhecida da *Coffea canephora* cultivada em maior escala. O café arábica é produzido em grande escala nos países da América Central e do Sul enquanto que os países da África e do sudoeste asiático são os principais produtores de café robusta (Illy e Viani, 1995).

As sementes do cafeeiro são também designadas de grãos de café. Estas sementes estão envolvidas por uma polpa, que constitui uma baga e vai adquirindo um tom avermelhado à medida que amadurece. Pelo facto de ter este tom avermelhado é usualmente designada de cereja ou baga do café. Por baixo da casca vermelha, existe uma polpa carnuda péctico-gelatinosa, o mesocarpo, a que se segue uma camada viscosa, o endocarpo ou pergaminho (Figura 1). O conjunto destas 3 camadas constitui o pericarpo (Prodolliet, 1996). No interior de todas estas camadas existem geralmente duas sementes, os grãos de café propriamente ditos, que podem variar em tamanho, tonalidade, forma e densidade, de acordo com as condições de crescimento e o genótipo. A estrutura celular do grão de café é caracterizada por paredes muito grossas que tornam as sementes extremamente duras.

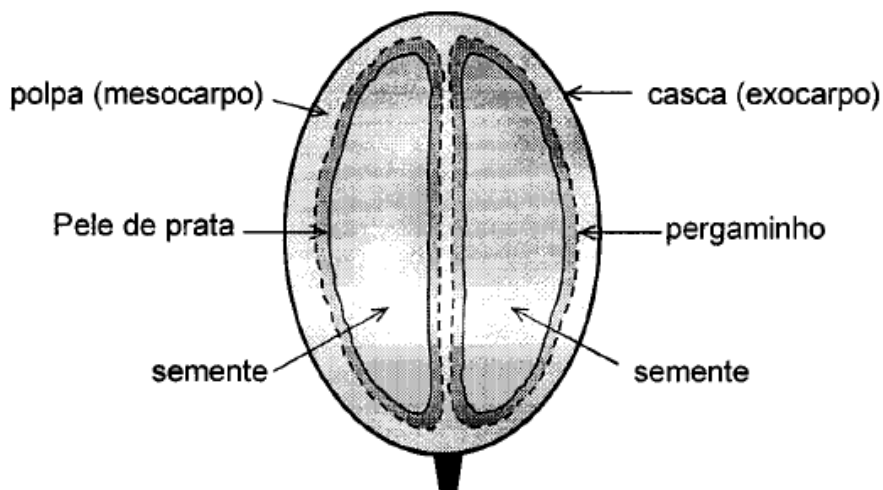


Figura 1- Esquema da bala do café (Casal, 2004)

1.1.2 - A importância econ mica do café

Os setores de produção e comercialização de café desempenham um papel muito importante na economia mundial. Embora o café não pertenc a ao grupo dos principais produtos agrícolas, como é o caso do trigo, arroz, óleos ou a  ar, com volumes de produção mundial muito superiores, o café ocupa um lugar com impacto no comércio internacional, encontrando-se em segundo lugar, depois do petróleo bruto (Casal, 2004). É ainda de salientar os seus efeitos fisiológicos e ainda o sabor e aroma agradáveis que fazem aumentar o seu consumo contínuo (Grembecka *et al.*, 2007).

A produção mundial ronda os 5 milhões de toneladas de café verde (Thorn, 1995), o que equivale a uma exportação de quase 90 milhões de "sacos", unidade em que este comércio é definido, e que corresponde a 60 kg. O café constitui uma importante fonte de rendimento para mais de 70 países. Portugal importa uma maior percentagem de café robusta, contrariamente a outros países, mas com uma tendência para diminuir com o passar dos anos. Angola tem sido o principal país fornecedor de café, mas actualmente o Brasil, a Indonésia e Timor Leste estão a assumir também um papel importante na exportação de café robusta (Casal, 2004).

1.1.3 - Espécies do café

1.1.3.1 - Café Arábica (*Coffea arabica*, L.)

Esta espécie, nas suas variedades e formas cultivadas, dá origem a cerca de 65-70% da produção mundial dos cafés comerciais. Tem origem nas zonas de montanha e terras altas da Abissínia, (mais de 1000 metros de altitude), onde cresce em estado semi-silvestre nos estratos inferiores da floresta (Cardoso, 1994; Ferrão, 2009).

As variedades mais conhecidas são Typica e Bourbon, mas, a partir delas, desenvolveram-se muitas linhagens e cultivares, tais como Caturra (Brasil, Colômbia), Mundo Novo (Brasil), Tico (América Central), San Ramon e Blue Mountain (Jamaica).

O cafeeiro Arábica em estado selvagem pode atingir 8-10 metros de altura (alturas inferiores em cultura) e os ramos são compridos, flexíveis e pendentes. Possui folhas ovaladas verde-escuras, sendo geneticamente diferente de outras espécies de café, pois tem quatro conjuntos de cromossomas em vez de dois, sendo alotetraplóide (44 cromossomas) autogâmico (auto-fértil) (Ferrão, 2009). O seu conteúdo de cafeína é menor que o da robusta, isto é cerca de 0,9% a 1,7% (Clifford, 1987).

A bebida de café Arábica é bastante perfumada, adocicada, com uma ligeira acidez e achocolatada (Ximenes, 2010).

1.1.3.2 - Café Robusta (*Coffea canephora*, L.)

O café produzido pela espécie *Coffea canephora*, também usualmente designado como café Robusta, produz um café de qualidade inferior ao Café arábica. É originário e cultivado na África ocidental e central, em toda região do sudeste da Ásia e no Brasil, onde ele é conhecido como variedade Conillon. O arbusto que produz o café robusta é relativamente pequeno e volumoso, pode atingir os 10 metros de altura.

Os seus frutos arredondados levam à volta de 11 meses para amadurecer. As sementes são de formato ovalado e menores que as do *Coffea arabica*. Contrariamente ao *coffea arabica*, a sua bebida é áspera, adstringente, pouco perfumados e mais amarga, com um creme castanho tendendo para o cinzento. Os sólidos oriundos desta espécie são muito mais solúveis em água do que os sólidos da espécie *Coffea arabica* (Ximenes, 2010).

1.2. O Café verde

1.2.1 - Composição química

O café verde tem na sua composição hidratos de carbono, proteínas, lípidos e minerais, à semelhança dos demais produtos de origem vegetal. Os componentes que efectivamente o caracterizam são, maioritariamente, a cafeína, os ácidos clorogénicos e a trigonelina (Clarke, 2003).

A composição química do café verde depende principalmente da espécie e da variedade em questão, e numa extensão menor, de outros factores, tais como, práticas agrícolas, grau de maturação e condições de armazenamento do grão. Visto a composição variar consoante a espécie é difícil apontar valores médios para cada tipo de café. Na tabela 1 encontra-se a composição média dos vários componentes químicos do café verde e as diferenças entre o café arábica e robusta (Macrae, 1985).

Tabela 1 - Composição Média (% peso seco) dos Grãos de Café Verde Arábicas e Robustas (Macrae. 1985).

Constituinte	Arábica	Robusta
Minerais	3,0-4,1	4,0-4,5
Cafeína	0,9-1,2	1,6-2,4
Trigonelina	1,0-1,2	0,6-0,75
Lípidos	12,0-18,0	9,0-13,0
Ácidos Clorogénicos	5,5-8,0	7,0-10,0
Totais		
Ácidos Alifáticos	1,5-2,0	1,5-2,0
Oligossacarídeos	6,0-8,0	5,0-7,0
Polissacarídeos Totais	50,0-55,0 ^a	37,0-47,0 ^a
Aminoácidos	2,0	2,0
Proteínas	11,0-13,0	11,0-13,0

^a Polissacarídeos brutos

1.2.1.1 - Hidratos de Carbono

O café verde tem na sua constituição hidratos de carbono, que podem ser subdivididos em polissacarídeos e em açúcares de baixo peso molecular, os quais incluem tri-, di- e monossacarídeos, podendo também ser divididos em açúcares redutores e açúcares não redutores. A quantidade de polissacarídeos dos grãos de café verde ronda os 50% do seu conteúdo, sendo as arabinogalactanas o grupo maioritário de polissacarídeos extratáveis com água quente dos grãos de café verde (Nunes e Coimbra, 2001; 2002).

A sacarose é o maior açúcar livre presente no café verde. Em média, os grãos de café verde arábicas contêm maior quantidade deste açúcar (5-8,5%) do que os robustas (2-5%) (Clarke e Vitzthum, 2001). Os polissacarídeos presentes nos grãos de café verde são predominantemente a celulose, as arabinogalactanas do tipo II e as galactomananas (Fisher *et al.*, 2001).

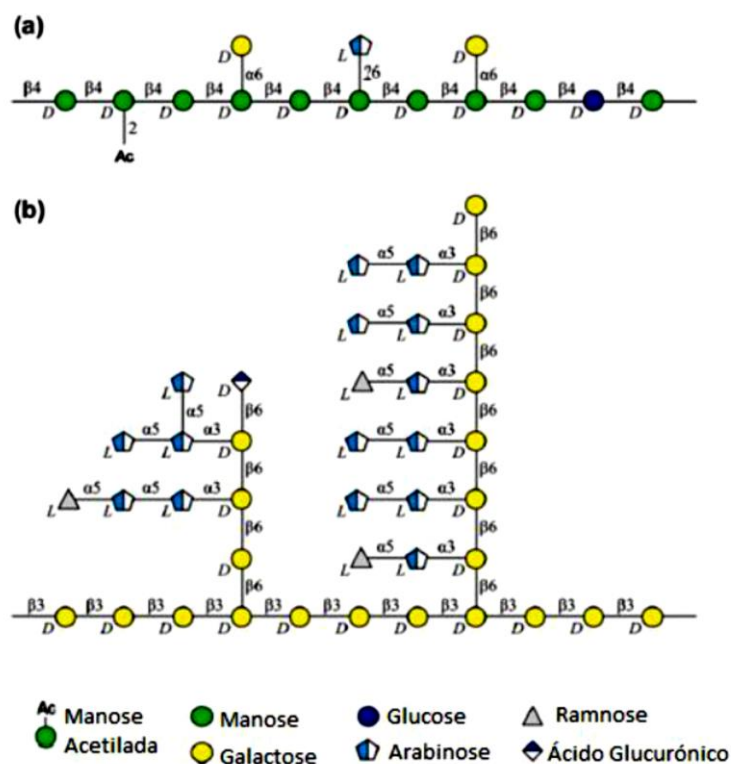


Figura 2 – Estrutura dos polissacarídeos maioritários dos grãos de café verde: a) galactomananas; b) arabinogalactanas

As arabinogalactanas são constituídas por uma cadeia principal de resíduos de galactose em ligações $\beta(1 \rightarrow 3)$, alguns dos quais são substituídos na posição O-6 com várias combinações de resíduos de galactose em ligação $\beta(1 \rightarrow 6)$. A estes resíduos de galactose encontram-se ligados pequenas cadeias de resíduos de α -L-arabinose, que

podem conter no terminal não redutor α -L-ramnose (Nunes *et al.*, 2008). Redgwell *et al.*, destacam ainda a formação de ligações covalentes entre arabinogalactanas e proteínas a que dão o nome de AGPs.

Os grãos de café verde são compostos por aproximadamente 15% de AGPs (Redgwell *et al.*, 2002). O conteúdo de proteína das AGPs do café verde varia entre 0,4 e 1,9% (Nunes *et al.*, 2008), sendo relativamente baixo quando comparado com outras AGPs.

As galactomananas nos grãos de café arábicas são formadas por cadeias lineares de resíduos de manose em ligações $\beta(1\rightarrow4)$, sendo alguns destes resíduos de manose substituídos na posição O-6 por resíduos de galactose em ligação α (Figura 2) (Bradbury e Halliday, 1990).

1.2.1.2 - Proteínas

As proteínas representam um dos constituintes mais importantes dos tecidos vegetais pois, em muitas sementes, representam a principal substância de reserva. No caso do grão de café, são a celulose e hemicelulose a desempenhar esse papel, contudo as proteínas acabam por ser importantes porque, durante o processo de torra, são sujeitas a transformações que promovem o aparecimento de novos compostos que poderão influenciar o sabor e aroma da bebida (Ferrão, 2009).

A percentagem de proteína em várias espécies de café verde pode variar entre 8-13% e estas proteínas podem ser divididas em solúveis em água (50%) e insolúveis (50%). (Coimbra *et al.*, 2011).

Quase todos os valores referenciados se baseiam na determinação do teor de azoto total que é multiplicado pelo factor 6,25, dando origem ao teor de “proteína bruta”, o que também engloba teores de azoto de compostos não proteicos (Marques, 2011).

As proteínas encontram-se predominantemente na forma livre no citoplasma ou ligadas a polissacarídeos nas paredes celulares, e consequentemente, os aminoácidos resultantes das hidrólises são uma medida verdadeira das proteínas presentes (Macrae, 1985). As proteínas do café verde, e em particular as proteínas de armazenamento 11S representam um importante reservatório de aminoácidos livres e peptídeos (Rogers, *et al.*, 1999).

1.2.1.3 - Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são um dos grupos de compostos que podem ser encontrados no café. Podem ser classificados pelo número e arranjo de átomos de carbono, contendo pelo menos um anel aromático, com um ou mais grupos hidroxilo ligados, sendo muitas vezes encontrados de forma conjugada com açúcares e ácidos orgânicos (Crozier *et al.*, 2009). Os ácidos clorogênicos são o principal grupo de compostos fenólicos presentes nos grãos de café verde e incluem diferentes grupos de compostos ou isômeros, formados por esterificação de uma molécula de ácido quínico e uma ou duas moléculas de ácido cafeico, ácido ferúlico e/ou ácido *p*-cumárico, que são derivados do ácido cinâmico (Figura 3).

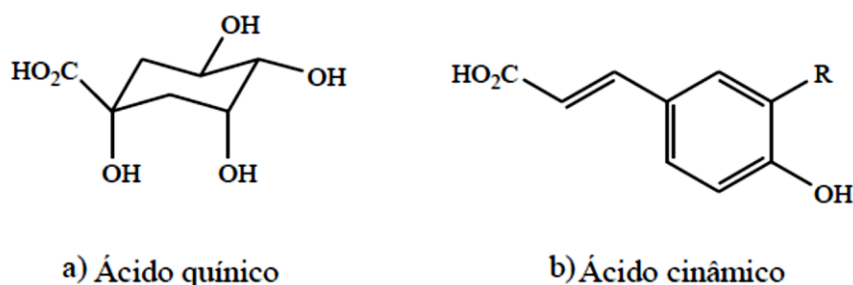


Figura 3 – Estruturas dos: a) ácido quínico, b) formação dos derivados do ácido cinâmico: cafeico (R=OH), ferúlico (R=Ome) e *p*-cumárico (R=H) (Perrone *et al.*, 2008)

Os principais grupos de ácidos clorogênicos presentes no café verde são: ácidos cafeoilquínicos (CQA), com 3 isômeros (3-, 4- e 5-CQA); dicafeoilquínicos (diCQA), com 3 isômeros (3,4-diCQA; 3,5-diCQA; 4,5-diCQA); ácidos feruilquínicos (FQA), com 3 isômeros (3-, 4- e 5-*p*CoQA) e seis misturas de diésteres do ácido cafeoil-feruil-quínico (FQA) (Clifford, 2003). O ácido 5-cafeoilquínico representado na figura 4 é o que se encontra em maior quantidade entre todos os ácidos clorogênicos do café.

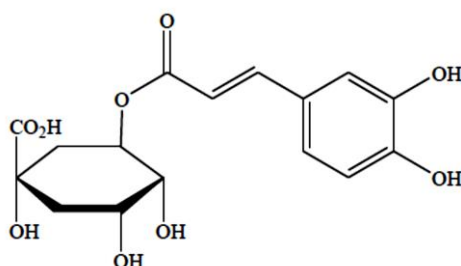


Figura 4 – Estrutura do ácido 5-cafeoilquínico

O conteúdo de ácidos clorogénicos dos grãos de café verde pode variar de acordo com as características genéticas – espécie e cultivar, grau de maturação, e menos importante, práticas culturais, clima e solo (Clifford, 1985).

Os compostos fenólicos apresentam propriedades benéficas à saúde, não só devido à sua elevada atividade antioxidante, mas também como agentes hepatoprotetores (Hemmerle *et al*, 1997), hipoglicemiantes e antivirais (Farah e Donangelo, 2006). A atividade antioxidante destes compostos está fortemente associada ao número e posição de grupos hidroxilo que possuem no seu anel aromático (Ozgen *et al*, 2006).

1.3 - O café torrado

1.3.1 - Processo de torra

Os principais atributos sensoriais que tornam o café tão apreciado em todo o mundo só se desenvolvem com a torra. Do ponto de vista técnico, a torra é uma operação complexa, em que há influência mútua de variadíssimos parâmetros (Casal, 2004).

Torrar a uma temperatura inicial de 100°C e uma temperatura final de 200°C causa alterações profundas nos grãos. As propriedades físicas e químicas dos grãos de café torrado são fortemente influenciadas pelas condições durante a torra, em particular pelo tempo e temperatura de torra, assim como pela quantidade de calor transferido. Estes aumentam de volume (50-80%) e alteram a sua estrutura e cor. O verde é substituído pela cor castanha, perde-se cerca de 11-20% do peso do grão, e forma-se o aroma típico dos grãos de café. Simultaneamente, a gravidade específica desce de 1,126-1,272 para 0,570-0,694, e por isso, o café torrado flutua na água e o café verde afunda. Os grãos duros e difíceis de quebrar tornam-se quebradiços e macios depois de torrados (Belitz *et al.*, 2004).

O processo de torra é dividido em 4 fases principais (Belitz *et al.*, 2004) A secagem, desenvolvimento, decomposição e torra completa. As alterações iniciais ocorrem acima de uma temperatura de 50°C, a esta temperatura as proteínas dos tecidos celulares desnaturam e a água evapora. Acima dos 100°C ocorre o acastanhamento devido às pirolises dos compostos orgânicos e ocorre ainda o inchamento dos grãos e uma destilação seca inicial. Por volta dos 150°C dá-se a libertação dos produtos voláteis (água, CO₂, CO), fazendo aumentar o volume do grão. A fase de decomposição que começa a 180-200°C, é reconhecida pelo rebentamento dos grãos, formação de fumo azulado e libertação do aroma a café.

1.3.3 - Composição química

Os principais atributos sensoriais que tornam o café tão apreciado em todo o mundo só se desenvolvem com a torra. Do ponto de vista técnico, a torra é uma operação complexa, em que há influência mútua de variadíssimos parâmetros, como o tempo e a temperatura de torra dos grãos. Na tabela 4 podemos observar a composição média do café torrado, em função da variedade de café torrado e para um grau médio de torra (Belitz, 2004).

Tabela 2 – Composição do Café Torrado (para um grau médio de torra) (Belitz, 2004).

Componente	Conteúdo (%) ^a	
	Arábica	Robusta
Cafeína	1,3	2,4
Lípidos	17,0	11,0
Proteínas ^b	10,0	10,0
Hidratos de Carbono	38,0	41,5
Trigonelina, Niacina	1,0	7,0
Ácidos Alifáticos	2,4	2,5
Ácidos Clorogénicos	2,7	3,1
Componentes Voláteis	0,1	0,1
Minerais	4,5	4,7
Melanoidinas ^c	23,0	23,0

^a Baseado nos sólidos. O conteúdo de água varia entre 0,1 e 5%.

^b Calculado como a soma dos aminoácidos após hidrólise ácida.

^c Calculado por diferença.

1.3.3.1 Hidratos de Carbono

Após a torra, o conteúdo em polissacarídeos dos grãos de café torna-se mais extractável, isto devido provavelmente a alterações nas estruturas dos polímeros dado que os tornam mais solúveis. O conteúdo e a natureza dos polissacarídeos que são extraídos dos grãos de café após a torra são determinantes para as características das infusões de

café. Os polissacarídeos têm influência na retenção de substâncias voláteis (Maier, 1975), contribuem para a viscosidade da bebida (Ehlers, 1980), contribuem para o corpo das infusões de café (Illy e Viani, 1995) e para a estabilidade da espuma das infusões de café expresso (Nunes *et al.*, 1997).

A celulose e os polissacarídeos, como a manose, galactose e arabinose, são insolúveis, após a torra uma parte deles é degradada em fragmentos, tornando-se solúveis. A sacarose, presente no café verde é decomposta no café torrado até concentrações de 0,4-2,8%.

Os polissacarídeos maioritários das infusões de café torrado são as galactomananas que em conjunto com as arabinogalactanas, são os componentes maioritários do material extractável com água quente (Figura 5) (Nunes e Coimbra, 2001; 2002).

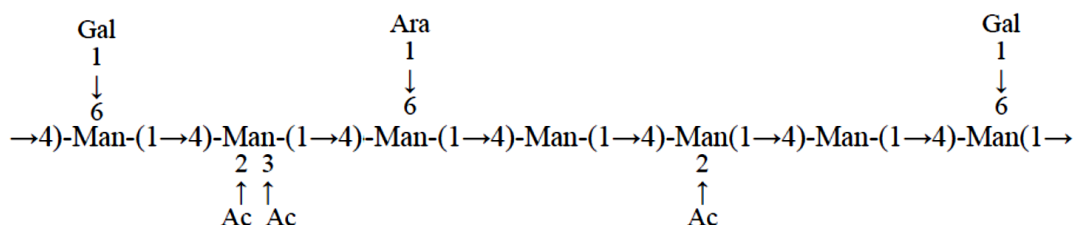


Figura 5 – Representação esquemática da estrutura das galactomananas das infusões de café Torrado.

1.3.3.2 Proteínas

As proteínas são degradadas durante o processo de torra, assim sendo há também uma diminuição da quantidade total de aminoácidos. As proteínas solúveis são constituídas por aproximadamente 85% de globulinas e algumas funcionam como proteínas de reserva 11S (Rogers *et al*, 1999). Na tabela 3 estão representadas as diferenças entre a composição de aminoácidos das proteínas antes e depois do processo de torra. A arginina, o ácido aspártico, a cisteína, a histidina, a serina, a treonina e a metionina são aminoácidos especialmente reactivos, e a sua quantidade diminui ligeiramente no café torrado, enquanto os aminoácidos estáveis, como a alanina, o ácido glutâmico e a leucina aumentam ligeiramente. Os aminoácidos livres ocorrem apenas em pequenas quantidades no café torrado (Belitz *et al.*, 2004).

Tabela 3 – Composição dos Grãos de Café Colombia após Hidrólise Ácida, antes e depois do Processo de Torra (Belitz et al., 2004).

Aminoácido	Café Verde (%)	Café Torrado (%) ^a
Alanina	4,75	5,52
Arginina	3,61	0
Ácido Aspártico	10,6	7,13
Cisteína	2,89	0,69
Ácido Glutâmico	19,8	23,2
Glicina	6,40	6,78
Histidina	2,79	1,61
Isoleucina	4,64	4,60
Leucina	8,77	10,3
Lisina	6,81	2,76
Metionina	1,44	1,26
Fenilalanina	5,78	6,32
Prolina	6,60	7,01
Serina	5,88	0,80
Treonina	3,82	1,38
Tirosina	3,61	4,35
Valina	8,05	8,05

^a A perda no processo de torra é cerca de 17,6%.

1.3.3.3 Compostos Fenólicos

Os ácidos clorogénicos desempenham um papel importante na formação da cor, sabor e aroma do café durante o processo de torra (Moreira *et al.*, 2000).

Durante o processamento do café, os ácidos clorogénicos podem ser parcialmente isomerizados, hidrolizados ou degradados a compostos de baixo peso molecular. As temperaturas elevadas observadas no processo de torra produzem também a formação de lactonas e a polimerização dos CGA com outros componentes do café para formar melanoidinas (Farah e Donangelo, 2006). Condições drásticas de torra podem produzir perdas de mais de 95% de ácidos clorogénicos, com uma perda de 8-10% por cada 1% de matéria seca perdida (Clifford, 2000). O conteúdo total de ácidos clorogénicos pode variar no café comercial entre 0,5 a 7%, dependendo do tipo de processamento, grau de torra (tabela 4), mistura e condições analíticas.

Tabela 4 – Conteúdo de Ácidos Clorogénicos (%), em Função do Grau de Torra (Farah *et al.*, 2005)

Cru/Grau de Torra	Arábica	Robusta
Cru	6,9	8,8
Clara	2,7	3,5
Média	2,2	2,1
Escura	0,2	0,2

De acordo com Leloup *et al.* (1995), durante a torra, o diCQA pode ser parcialmente hidrolisado em monoésteres e ácido cafeíco, o qual pode ser outra vez hidrolisado, descarboxilado e degradado numa série de fenólicos simples. A formação de ácidos clorogénicos lactonas ocorre depois de 6 a 7% de perda de peso (Farah *et al.*, 2005). Cerca de 7% dos ácidos clorogénicos no café arábica e 5,5% no café robusta, parece ser transformado em 1,5-quinolactonas durante o processo de torra (Figura 6).

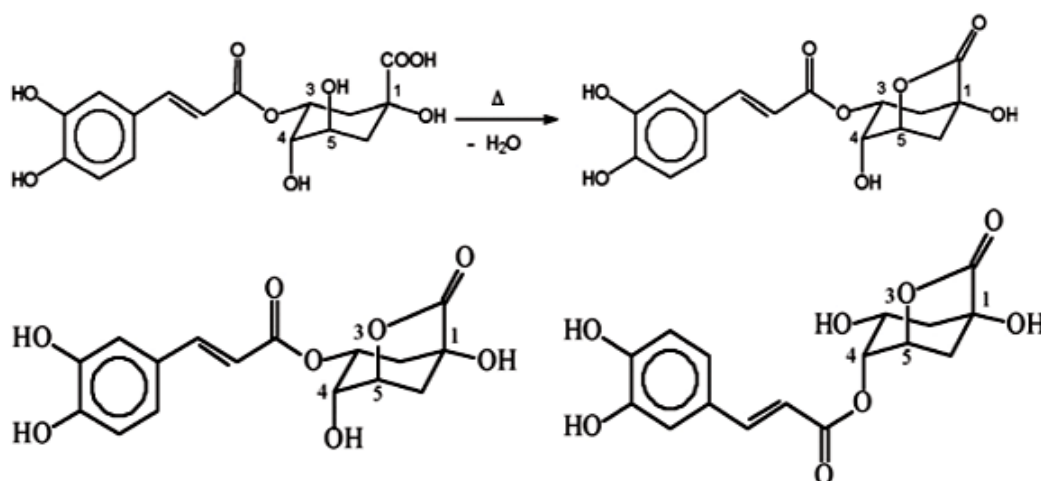


Figura 6 – Formação da 1,5- γ -quinolactona a partir do Ácido Clorogénico durante a Torra, e os dois maiores Ácidos Clorogénicos Lactonas no Café Torrado: 3-cafeoilquinico-1,5- γ -lactona (esquerda) e 4-cafeoilquinico-1,5- γ -lactona (direita) (Farah e Donangelo, 2006)

1.3.3.4 Melanoidinas

As melanoidinas são geralmente definidas como macromoléculas nitrogenadas de elevado peso molecular, de cor castanha, resultantes de reações de Maillard. Podem ser formadas por ciclização, desidratação, retroaldolização, rearranjos, isomerização, e condensação de produtos iniciais da reação de Maillard (Montavon, *et al.*, 2003; Martins, *et al.*, 2000).

As bebidas de café são uma das principais fontes de melanoidinas. Estas desempenham um papel importante no desenvolvimento do aroma durante o processo de torra (Ciori, 2002), e estão também presentes em outros produtos alimentares consumidos diariamente, como por exemplo, o cacau, o pão, o malte e o mel. Durante o processo de torra dos grãos de café verde, os polissacarídeos e as proteínas são degradados (Macrae *et al.*, 1985), e a reacção de Maillard toma lugar entre os grupos amina dos aminoácidos, peptídeos ou proteínas e os grupos carbonilo dos açúcares redutores, e após uma série de reacções são produzidos como produtos finais, compostos castanhos aromáticos, de alto peso molecular contendo azoto, solúveis em água, designados de melanoidinas (Friedman *et al.*, 1996).

Apesar de um grande número de estudos acerca da estrutura das melanoidinas ter sido realizado nos últimos anos, a estrutura química destas não foi ainda completamente elucidada, devido ao facto de não ser possível a separação das melanoidinas em moléculas com estrutura uniforme que permitia a sua caracterização. Contudo, a partir de sistemas

modelo foi possível criar diferentes propostas para a estrutura destas moléculas: 1) polímeros com unidades repetitivas de furanos e/ou pirróis unidos por reações de condensação; 2) proteínas modificadas, associadas a compostos de baixo peso molecular através do grupo ϵ -amino da lisina ou através do grupo guanidina da arginina; 3) polímeros resultantes da degradação de açúcares, por condensação aldólica, durante as fases iniciais das reações de Maillard (Nunes e Coimbra, 2010; Tressl *et al.*, 1998). A Figura 7 representa uma ilustração simplista da formação das melanoidinas do café uma vez que como referido anteriormente estes mecanismos de formação são ainda desconhecidos.

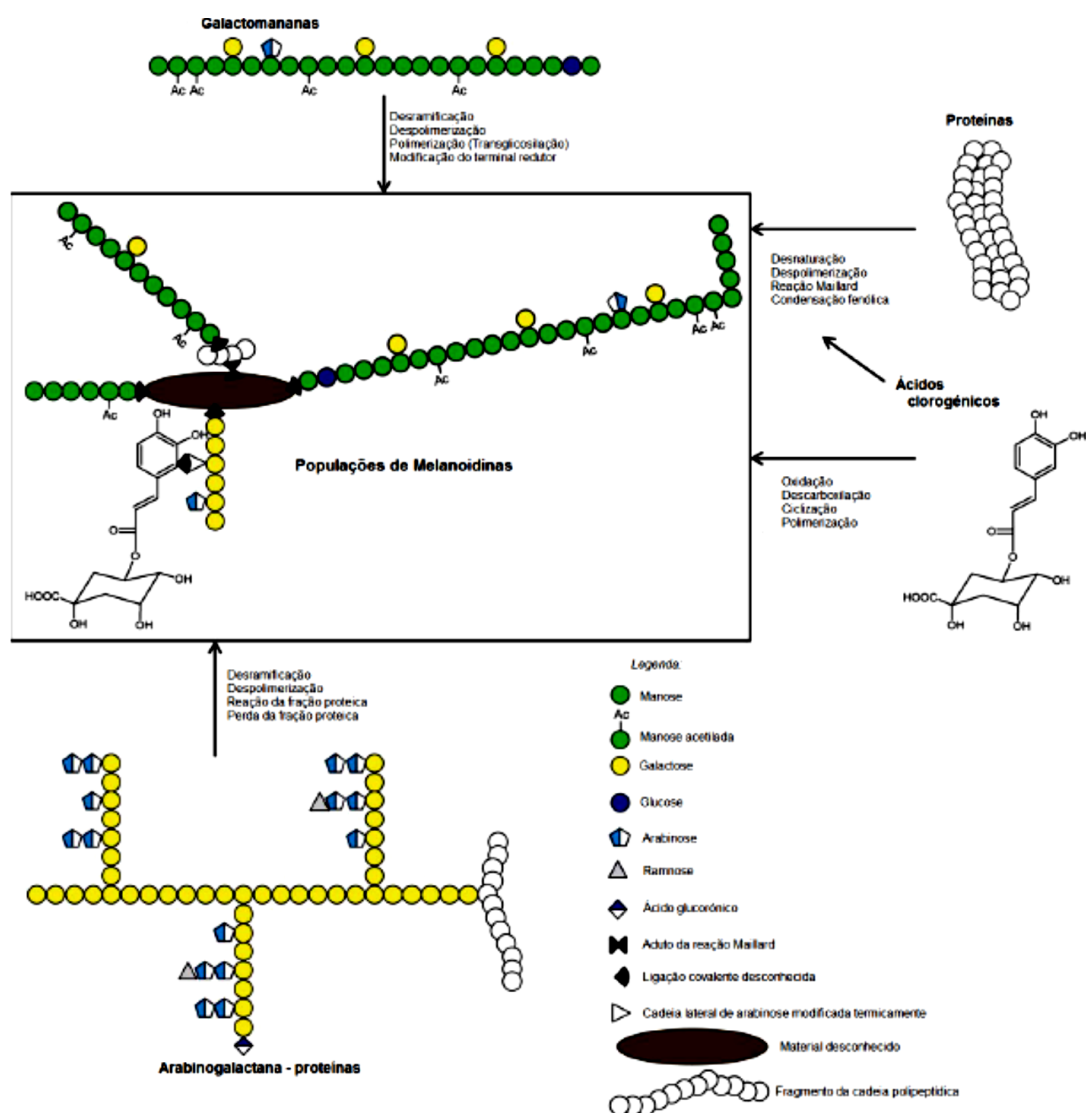


Figura 7 - Ilustração da formação das melanoidinas do café (Moreira et al., 2012).

As melanoidinas das infusões de café são na realidade uma mistura de melanoidinas com diferentes propriedades físico-químicas, podendo conter

galactomananas, arabinogalactanas, proteínas e compostos fenólicos condensados (Adams *et al.*, 2005).

As melanoidinas podem ser isoladas tendo por base o seu elevado peso molecular e a purificação de diferentes populações de melanoidinas é aperfeiçoada utilizando propriedades como a solubilidade, a carga, a capacidade quelante para iões metálicos e a hidrofobicidade. O material de alto peso molecular (HMWM) tem sido isolado através de membranas de diálise. Contudo, outros compostos de alto peso molecular, tais como polissacarídeos quimicamente modificados e proteínas são retidos juntamente com as melanoidinas. Com o intuito de obter uma fração de melanoidinas com diferentes composições em polissacarídeos, o material de alto peso molecular pode ser submetido ao procedimento de fracionamento em etanol.

Todos estes componentes podem aumentar a complexidade e a heterogeneidade das melanoidinas do café.

Têm sido utilizados dois procedimentos para descrever ou medir o grau de formação de melanoidinas. Em primeiro lugar, a quantidade de melanoidinas é determinada por diferença, o que significa que essa quantidade é medida pela percentagem de compostos que não podem ser contabilizados para a diferença (100% - % de compostos conhecidos), ou seja, subtraindo o material conhecido, tais como os polissacarídeos e as proteínas, ao total de material (Montavon, *et al.*, 2003). A cor castanha das melanoidinas pode também ser quantificada pela medição da cor dos produtos da reação de Maillard, através de medições espectrofotométricas. O K_{mix} é um parâmetro determinado tendo em conta a Lei de BeerLambert, $Abs = K_{mix}bc$, onde K_{mix} corresponde ao coeficiente de extinção ($L.g^{-1}.cm^{-1}$), b à dimensão da célula (cm) e c a concentração ($g.L^{-1}$).

Os K_{mix} são determinados tendo em conta os máximos de absorvância dos compostos presentes no café. O K_{mix} , é determinado a 280, 325 e 405 nm, sendo estes valores de comprimento de onda específicos para detetar a presença de diferentes compostos presentes na bebida de café. Assim, o K_{mix} 280nm permite detetar a presença de cafeína e de CGA, o K_{mix} 325nm permite detetar a presença de CGA, permitindo assim eliminar a interferência por parte da cafeína e o K_{mix} 405nm permite detetar a presença de melanoidinas [48-50]. O quociente entre o valor do K_{mix} 405nm e o total de material desconhecido é designado por “Melanoidin Browning Index” (MBI) (Montavon, *et al.*, 2003).

1.4 – Objectivos

As melanoidinas são um dos principais componentes do material de alto peso molecular das infusões de café torrado. Actualmente a sua estrutura ainda não é bem conhecida. A sua natureza química embora não totalmente conhecida, inclui polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos. Trabalhos anteriores demonstraram que os compostos fenólicos incorporados nas melanoidinas do café numa forma condensada, sendo a quantidade de compostos fenólicos incorporados dependente da quantidade de compostos fenólicos no café. Esta observação foi realizada utilizando o modelo no grão obtido por enriquecimento dum café arábica por uma mistura de compostos fenólicos extraídos do café. De forma a validar esta conclusão neste trabalho tem-se por objectivo comparar os níveis de compostos fenólicos condensados incorporados durante o processo de torra dum café arábica e de um café robusta, este ultimo contendo tipicamente valores superiores de compostos fenólicos. Será ainda objetivo obter mais informação estrutural dos compostos fenólicos incorporados no café através da utilização de técnicas de degradação de fenólicos condensados como aqueles utilizados para a caracterização da lenhina.

Referências Bibliográficas

- Adams, A., Borrelli, R. C., Fogliano, V., De Kimpe, N. (2005). Thermal degradation studies of food melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4136-4142.
- Belitz, H. D., Grosh, W., Schieberle, P. (2004). Coffee, Tea, Cocoa in *Food Chemistry*, Springer, 3ª Edição, 939-950.
- Bradbury, A. G. W., Halliday, D. J. (1990). Chemical structures of green coffee beans polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 389-392.
- Casal, S. I. P. (2004). Compostos nitrogenados do café – Desenvolvimento de metodologias analíticas e sua aplicação na discriminação de espécies e no controlo da intensidade da torra. Dissertação de doutoramento, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 7-20.
- Cardoso A.P.S. (1994). Café-Cultura e tecnologia primária. Instituto de Investigação Tropical, 169.
- Ciori, M. (2002). Antioxidative effect of Maillard reaction products in coffee brew. In *Melanoidins in Food and Health*, Fogliano, V., Henle, T., Eds., European Communities: Luxembourg, Vol. 3, 159-162.
- Clarke, R. J., Vitzthum, O. G. (2001). Coffee: recent developments, 1st ed. Blackwell Science, Oxford.
- Clarke, R.J., (2003). Green coffee, in *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, Caballero, B., Trugo, L., Fingias, P., Eds.; Academic Press, London, 1481-1487.
- Clifford, M. N. (1985). Chlorogenic acids. In: *Coffee. Vol 1. Chemistry*. Clarke, R. J., Macrae, R. (eds) Elsevier Applied Science Publications, London, UK.
- Clifford M.N. (1987). Chemical and physical aspects of green coffee products. In Clifford M.N., Wilson KC (editores) *Coffee, botany, biochemistry and production of beans and beverage*. Croom Helm e Methuen Inc, Nova Iorque, EUA, 305-374.
- Clifford, M. N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1033-1043.

- Clifford, M. N. (2003). Hierarchical Scheme for LC-MS in Identification of Chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2900-2911.
- Coimbra, M.A., Nunes, C., Cunha, P.R. and Guiné, R. (2011). Amino acid profile and Maillard compounds of sun-dried pears. Relation with the reddish Brown colour of the dried fruits. *European Food Research and Technology*, 233(4), 637-646.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nature Product Reports*, 26(8), 1001 – 1043.
- Ehlers, G.M. (1980). Possible applications of enzyme in coffee processing. In *Proceeding of 9th International Colloquium on the Chemistry of coffee*, ASIC: Paris, pp 267- 271.
- Farah, A., Monteiro, M. C, Trugo, L. C. (2005). Distribuição de ácidos clorogénicos nos principais defeitos do café. In: *Annals of the IV Simpósio de PNP&D Embrapa Café*, Londrina, P.R., Brazil.
- Farah, A., Donangelo, C. M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brasilian Journal of Plant Physiology*, 18, 23-36.
- Ferrão, J. (2009). O CAFÉ, A bebida negra dos sonhos claros, Lisboa, Chaves Ferreira Publicações.
- Fischer, M., Reiman, S., Trovato, V., Redgwell, R. J. (2001). Polysaccharides of green Arabica and Robusta coffee beans. *Carbohydrate Research*, 330, 93-101.
- Friedman, M. (1996). Food browning and its prevention: An overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 631-653.
- Grembecka, M., Malinowska, E., Szefer, P., (2007). Differentiation of market coffee and its infusions in view of their mineral composition. *Science of the Total Environment*, 383, 59-69.
- Hemmerle, H., Burger, H.J., Below, P., Schubert, G., Rippel, R., Schindler, P.W., Paulus, E., Herling, A. W. (1997). Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: Novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40(2), 137-145.

Illy, A.; Viani, R. (1995). Espresso Coffee- The Chemistry of Quality. Academic Press: London, capítulo 1,5-7.

Macrae, R. In Coffee Volume 1: Chemistry; Clarke, R. J.; Macrae, R. (1985). Eds.; Elsevier Applied Science Publishers Ltd.; London, UK

Maier, H.G. (1975). Linkage of flavour compounds to the coffee powder matrix (German). In Proceeding of 7th International colloquium on the Chemistry Coffee; ASIC: Paris, pp 211-219.

Marques, J. (2011). Transformações físico-químicas e sensoriais durante o envelhecimento de café torrado em grão. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, 17.

Martins, S., Jongen, W. M. F., Boekel, M., (2000). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology*, 11(9-10), 364-373.

Montavon, P., Mauron, A. F., Duruz, E., (2003). Changes in green coffee protein profiles during roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2335-2343.

Moreira, R. F. A., Trugo, L. C., Maria, C. A. B. (2000). Compostos Voláteis de café torrado. Parte II. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. *Quim. Nova* 23, 195-201.

Moreira, A. S. P., Nunes, F. M., Domingues, M. R., Coimbra, M. A. (2012). Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts. *Food & Function*.

Nunes, F. M., Coimbra, M. A., Duarte, A. C., Delgadillo, I. (1997). Foamability, foam stability and chemical composition of espresso coffee as affected by the degree of roast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3238-3243.

Nunes, F.M., Coimbra, M.A. (2001). Chemical Characterization of the High Molecular Weight Material Extracted with Hot Water from Green and Roasted Arabica Coffee, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1773-1782.

Nunes, F.M., Coimbra, M.A. (2002). Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted robusta coffee as affected by the degree of roast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7046-7052.

Nunes, F. M., Reis, A., Silva, A. M. S., Domingues, M. R. M. And Coimbra, M, A., (2008). Rhamnoarabinosyl and rhamnoarabinoarabinosyl side chains as structural features of coffee arabinogalactans. *Phytochemistry*, 69(7), 1573-1585.

Nunes, F.M.; Coimbra, M.A., (2010). Role of hydroxycinnamates in coffee melanoidin formation. *Phytochemistry Reviews*, 9(1), 171-185.

Ozgen, M., Reese, R. N., Tulio, A. Z., Sheerens, J. C., Miller, A. R., (2006). Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1151-1157.

Perrone, D., Farah, A., Donangelo, C.M., de Paulis, T. and Martin, P.R., (2008.) Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffe cultivars. *Food Chemistry*, 106(2), 859-867.

Prodoliet, J., Authenticity of coffee, in Food Authentication, Ashurst, P. R., Dennis, M. J., (1996) eds., Blackie Academic and Professional/Chapman and Hall, London, U.K., 304-338.

Redgwell, Robert J.; Curti, Delphine; Fischer, Monica; Nicolas, Pierre; Fay, Laurent B. (2002). Coffee bean arabinogalactanas: acide polymers covalenty linked to protein. *Carbohydrate Research*, 337, 239-253.

Rogers, W. J., Bezard, G., Deshayes, A., Meyer, I., Petiard, V. And Marraccini, P., (1999) Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-tye storage protein from *Coffea arabica* endosperm. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(4), 261-272.

Thorn, J., (1998). O Guia do Café; Centralivros Lda., Portugal.

Tressl, R., Wondrak, G.T., Garbe, L.A., Kruger, R.P. and Rewicki, D., (1998). Pentoses and hexoses as sources of new melanoidin-like Maillard polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1765-1776.

Ximenes, M. (2010). A Tecnologia Pós-Colheita e Qualidade Física e Organoléptica do Café Arábica de Timor. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, 12-13.

Paper to be submitted to publication

Coffee Melanoidins Formation in Arabica and Robusta Coffees: Incorporation of phenolic compounds during roasting

Cristiana Simões^a, Ana S.P. Moreira^b, Rosário M. Domingues^b, Manuel A. Coimbra^b,
Fernando M. Nunes^a

^aCQ-VR, Chemistry Research Centre, Department of Chemistry, University of Trás-os-Montes e Alto Douro, 5001-801 Vila Real, Portugal

^bQOPNA, Department of Chemistry, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

Abstract

The amount of phenolic compounds incorporated in Robusta coffee melanoidins are significantly higher than that incorporated in Arabica coffee melanoidins. The phenolic compounds incorporated in both coffee melanoidins are mainly present in condensed form (~60%), glycosidically linked (~34%) and esterified (~6%). The glycosidically linked phenolic compounds present in coffee melanoidins are present as intact caffeic and ferulic acids being released after methanolysis of coffee melanoidins. Also significant amounts of quinic acid were released by methanolysis, 2.27% for Robusta and 0.92% for Arabica coffees, corresponding to 0.65 mol / mol with respect to the phenolic compounds recovered by methanolysis for Robusta coffee and 0.35 mol / mol to Arabica. The amount of phenolic compounds incorporated to coffee melanoidins account for ~6% and ~ 9% for arabica and robusta coffees respectively showing that after polysaccharides and protein, phenolic compounds are one of the main components of coffee melanoidins probably impacting on their reactivity and health benefits of coffee melanoidins.

Keywords: Coffee, Arabica coffee, robusta coffee, melanoidinas, phenolic compounds.

1. Introduction

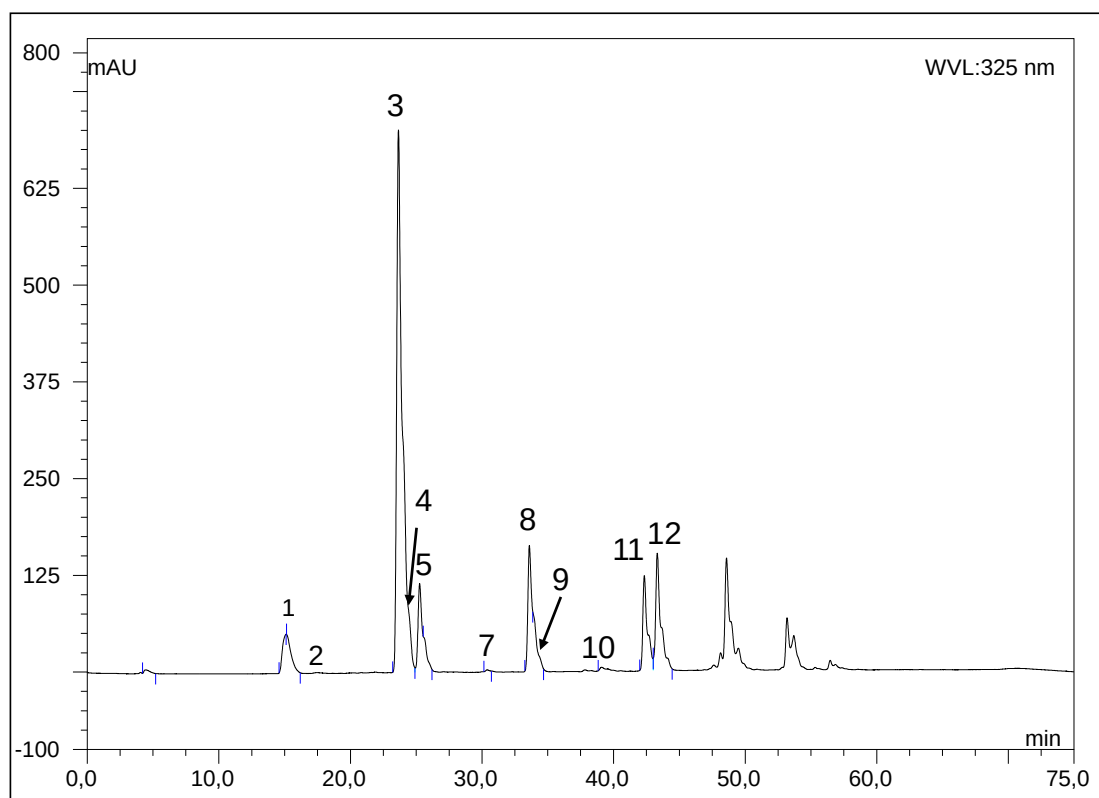
Coffee is one of the most consumed beverages in the world, being much appreciated by their organoleptic characteristics and stimulating power. The roasting of green coffee beans is an important step in coffee processing. During this process polysaccharides and proteins are degraded (Macrae, 1985), and Maillard reaction takes place between the amine groups of amino acids, peptides or proteins and the carbonyl groups of reducing sugars and after a series of reactions are produced as final products, brown aromatic compounds, high molecular weight nitrogen-containing water-soluble designated melanoidins (Friedman, 1996). Melanoidins are one of the main component of the high molecular weight material of coffee infusions (Moreira *et al.*, 2012) and present in other several heat-processed foods such as bread, malt and beef (Hofmann *et al.*, 1999; Ledl & Schleider 1990). Nevertheless their detailed structure is not yet available, but some important structural features have been elucidated in recent years as the presence of polysaccharides, proteins and phenolic compounds. Earlier works have shown that phenolic compounds are present in coffee melanoidins in esterified and in condensed structures (Nunes, Cruz & Coimbra, 2012; Coelho *et al.*, 2014) with a higher abundance of phenolic compounds in condensed structures. Model studies have shown that the amount of phenolic compounds incorporated into coffee melanoidins is dependent on the content of chlorogenic acids present in coffee beans (Coelho *et al.*, 2014) As the amount of chlorogenic acids in coffee Arabica and coffee Robusta is one of the main differences between these two types of coffees (Belitz *et al.*, 2004), it is expected that the amount of phenolic compounds incorporated into coffee melanoidins during roasting will be different for these two coffee varieties. In order to confirm this hypothesis the incorporation of phenolic compounds into coffee melanoidins during roasting of one arabica (Honduras) and one robusta (India) coffee roasted to the same medium degree of roasting (~8% roasting loss) were compared.

2. Materials and methods

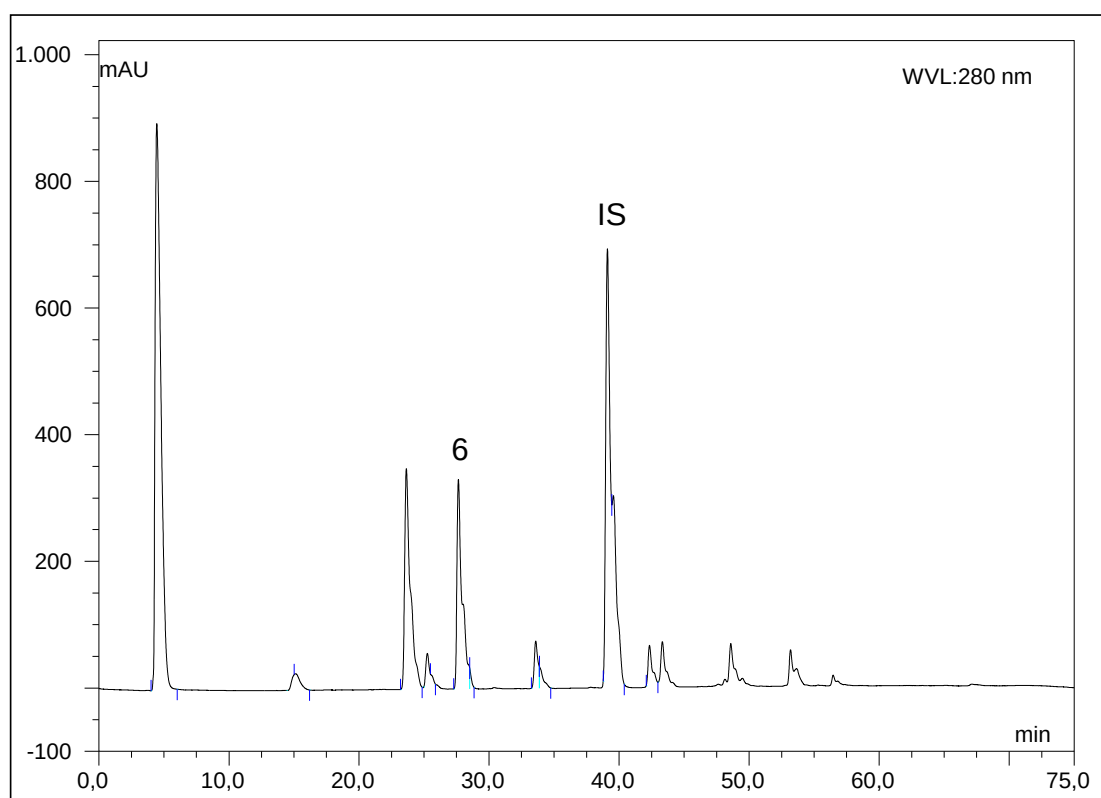
2.1. Material

Green coffees used in this work were selected according to their chlorogenic acid content typical of Arabica and robusta coffees. Initially green coffees from robusta Angola (CGA content 7.14% caffeine content 1.98%), Uganda (CGA 7.19%, Caffeine 1.89%), Vietnam (CGA 8.03%, Caffeine 1.99%), India (CGA 9.40% Caffeine 2.57%) and Arabica Brazil (CGA 6.40% Caffeine 1.06%), Columbia (CGA 6.53% Caffeine 1.02%) Honduras (CGA 6.97% Caffeine 1.06%). Green coffees with higher content of CGA from arabica (Honduras) and robusta (India) coffees were selected (Supplementary Figure S1). The water content of green Honduras coffee was 7.04% and 7.22% for India green coffee.

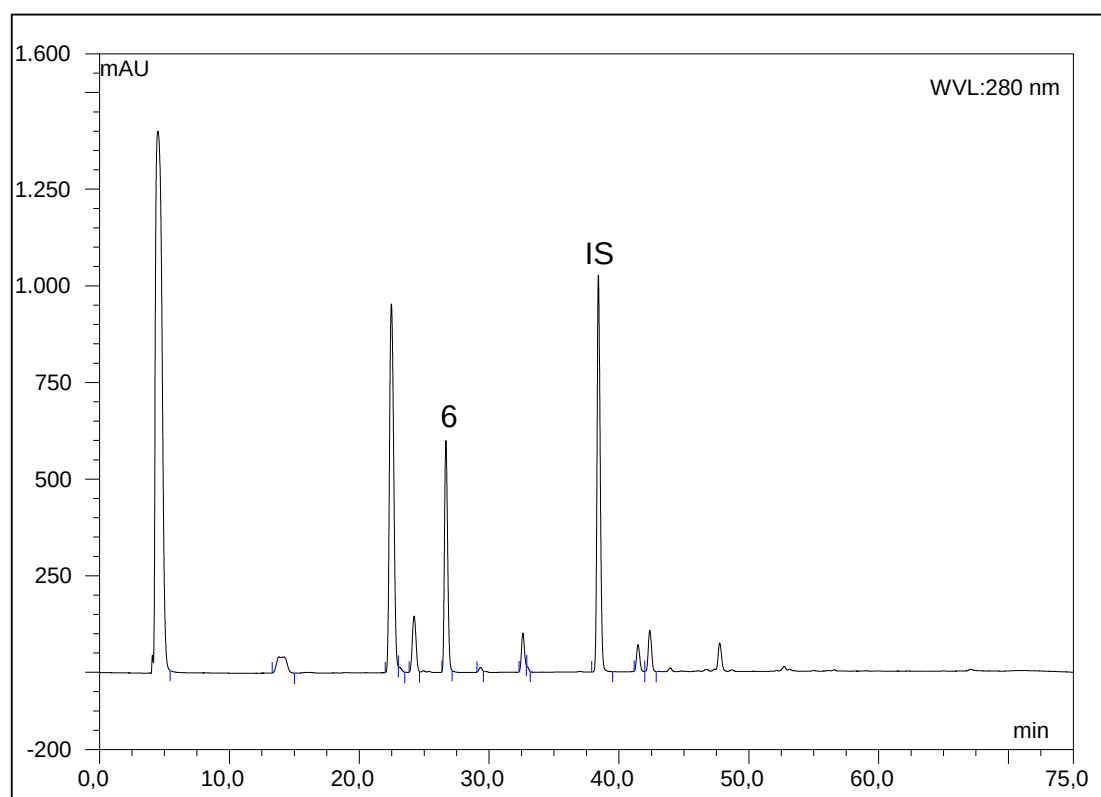
a)



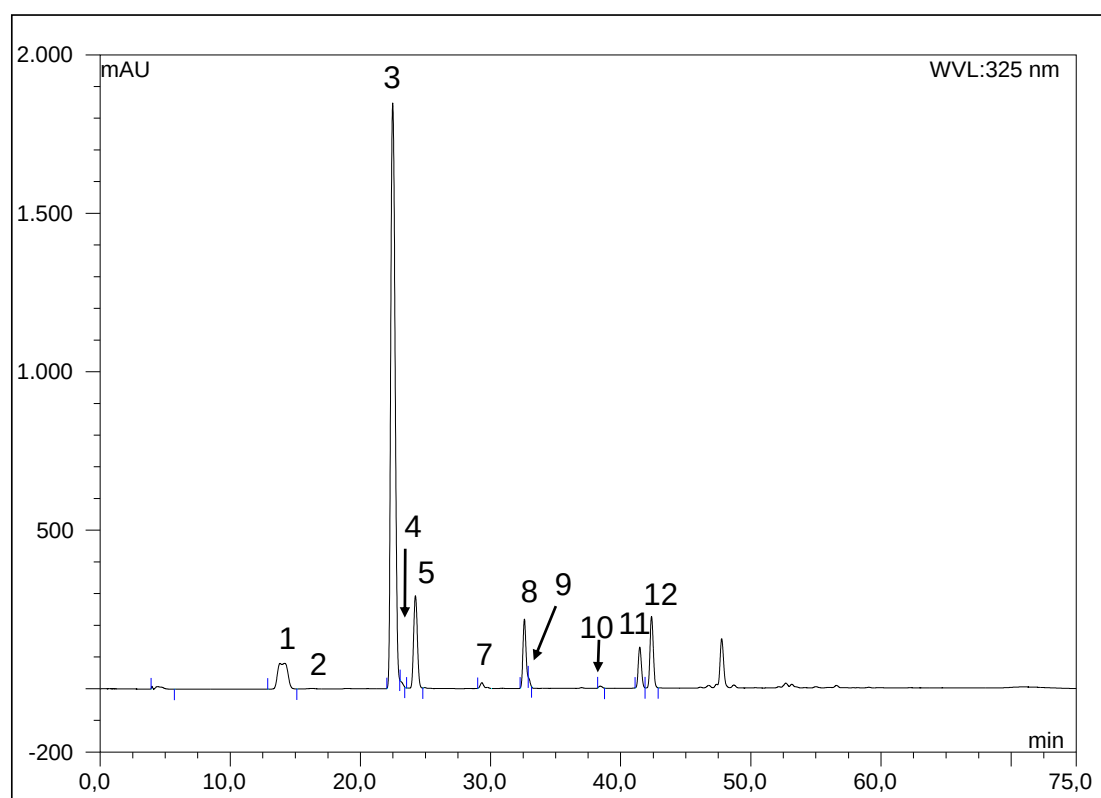
b)



c)



d)



Supplementary Figure S1 – Chromatograms of chlorogenic acid (325 nm) and caffeine (280 nm) for India (a and b, respectively) and Honduras (c and d, respectively) green coffees. 1 – 3-CQA, 2 – 1-FQA, 3 – 5-FQA, 4 – 3-FQA, 5 – 4-CQA, 6 – Caffeine, 7 – 5-CoQA, 8 – 5-FQA, 9 – 4-FQA, 10 – 4-CoQA, 11 – 3,4-diCQA, 12 – 3,5-diCQA, IS – Internal Standard (Veratric acid).

2.2. Roasting of Coffee Bean Sample

Green coffee bean samples were roasted on a Probat Pre 1Z 88 coffee roaster at 200 degree. Roasted coffee stayed one day on ambiente temperature, to released CO₂.

2.3. Chlorogenic Acid and Caffeine Content of Green and Roasted Coffees

Chlorogenic acids (CGA) were extracted overnight from green and roasted ground coffees (1 g) with 100 mL of a solution of methanol/water (70:30 v/v) containing 0.5% Na₂SO with constant stirring (125 rpm) in the dark. To the solution was added 1 mL of veratric acid as internal standard (100 mg/mL, in methanol). After filtration of the coffee powder, the colloidal material present in the extracts was precipitated by the addition of 1 mL of Carrez I and II solutions (Trugo & Macrae, 1984). The extracts were analyzed by HPLC (Dionex, Ultimate 3000) by injection of 25 µL of the sample on a reversed-phase HPLC

column (C18-ACE; 25 cm length, 0.45 cm internal diameter, and 5 μ m particle diameter). Eluent A was a 5% formic acid aqueous solution, and eluent B was methanol. The eluent program was as follows: 0–5 min, 5% eluent B; 5–45 min, 40% B; 45–65 min, 70% B; 65–75 min, 5% B. The column temperature was set at 25 °C, and the flow was 0.8 mL/min. The eluent was continuously monitored from 200 to 600 nm with a photodiode array detector (PDA-100, Dionex). Caffeoylquinic acids (CQA) were quantified by the internal standard method using a 5-CQA calibration and was performed by comparison with the retention time and literature values (Farah *et al.*, 2006; Perrone *et al.*, 2008). Caffeine was quantified in the same way by using a caffeine calibration curve.

2.4. Color of Roasted Coffee Powder

Roasted coffee powder colors were directly measured with a Minolta chroma meter (model CR-300, Minolta, Tokyo, Japan). The equipment was set up for illuminant D65 and 10° observer. The equipment was calibrated with a white standard ($L^* = 97.71$; $a^* = -0.59$; and $b^* = 2.31$), and each sample was put on a Petri dish and read in five different locations. Numerical values of chroma (C^*), hue (h) were calculated according to the following formulas:

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

$$h^* = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right)$$

2.5. Preparation of Coffee Brews and Isolation of the High Molecular Weight Material (HMWM)

Roasted coffee beans were ground (250 μ m), and infusions were prepared by extraction of 30 g of powdered coffee with 1L of water at 80 °C during 20 min. After filtration cloth, the filtrate was filtered again, this time under vacuum through glass fiber paper, and the residue was washed with 20 ml of distilled water. The infusions were concentrated in vacuo on a rotary evaporator at 40 °C until 200 ml (settled volume in a volumetric flask). For determining the total solids content was removed 50 mL of each of the infusions, these having been lyophilized after freezing. The total solids obtained for India coffee infusion was 26.30% and for Honduras coffee infusion it was 21.30%. For the isolation

of HMWM, the remaining 150 ml were dialyzed at 4 ° C (dialysis membrane with 12-14 kDa MWCutoff) until the dialysis water is present colorless. After dialysis, the retentate was freeze-dried, giving the HMWM.

2.6. Characterization of Coffee Bean Samples and HMWM fractions

Green and roasted coffee were characterized according to their content of sucrose, glucose and fructose by anion exchange chromatography. It also determined the content of total sugars by anion exchange chromatography after Saeman and acid hydrolysis (Nunes & Coimbra, 2001). Protein content was determined according to the Dumas method (PRIMACS, Carbon-Nitrogen/Protein analyzer, Skalar, The Netherlands), by multiplying the nitrogen content by 6.25.

2.7. Spectroscopic Analysis

For all coffee samples, a 1 mg/mL solution was prepared by dissolving 5 mg sample in 5 ml of 3M urea solution. Absorbance was measured at 280, 325 and 405 nm using a spectrophotometer. To ensure linearity, the absorbance value of three wavelengths had to be between 0.1 and 1.3, so a solution was prepared for media absorbance at 405 nm and then diluted 5 to 15 times for reading at 325 and 280 nm. The specific extinction coefficient (KMIX) was calculated using the Lambert-Beer law:

$$Abs = K_{mix}(L\ g^{-1}\ cm^{-1}) \times Concentration(g\ L^{-1}) \times Cell\ length(cm)$$

2.8. Antioxidant Activity

For all coffee samples, a 1 mg/mL solution was prepared by dissolving 5 mg sample in 5 ml of 3M urea solution. It was placed 19mg of ABTS and 5 ml of ultrapure H₂O in a first tube, the second tube was placed 38 mg of potassium peroxidissulfit and 1 mL of ultrapure H₂O. 88 uL was removed from the second tube to the first tube. The tubes were placed in complete darkness for 16h. It was prepared a 20mmol acetic acid solution (2.7 ml / 1000 ml H₂O, pH = 4.5, and retired 2.78 ml of the first tube to 250 mL acetic acid solution. For the determination of antioxidant activity calibration, the line was composed of a control test and five patterns with different concentrations of Trolox. It was removed 200 uL

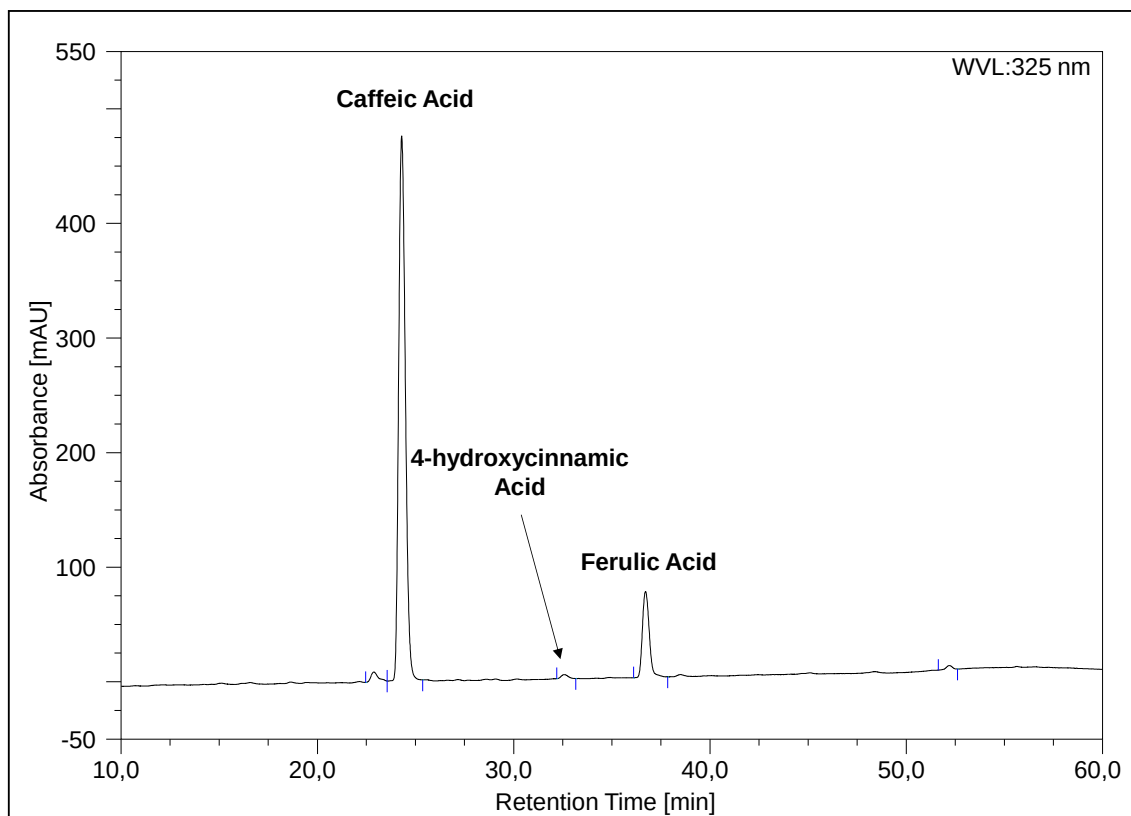
sample to a test tube and added 2 mL of ABTS. Absorbance was measured at 734 nm after 15 minutes at ambient temperature.

2.9. Adsorbed Phenolic Compounds

For determination of the adsorbed phenolic compounds in coffee melanoidins, a 5mg/mL solution of coffee melanoidins were analyzed by direct injections (100 μ L) on a RP-HPLC by the method described previously for chlorogenic acids determination. For determination of the effect of melanoidins in the determination of free phenolic compounds, melanoidin solutions (5 mg/mL) were spiked with different concentration of 5-CQA and incubated overnight at room temperature. Each solution was analyzed by RP-HPLC as described previously and the areas were compared with that of aqueous solutions of 5-CQA with the same concentrations.

2.10. Alkaline Saponification

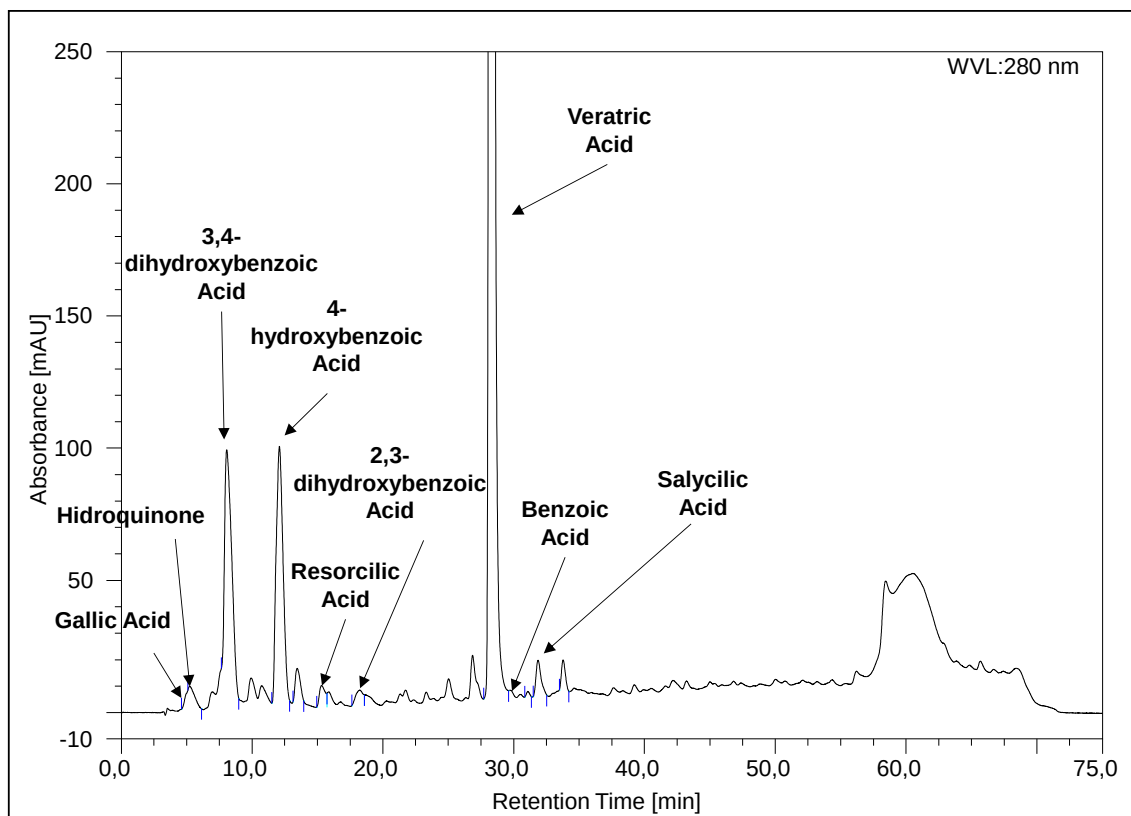
For determination of ester-linked phenolic compounds, melanoidins were subjected by alkaline saponification by using a procedure that prevented oxidation of phenolic compounds (Nardini *et al.*, 2002). To 750 μ L of the melanoidin solution (12 mg/mL), 750 μ L of 2 M NaOH solution containing 2% (w/w) ascorbic acid and 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid was added. After incubation for 1h at 30°C, the mixture was quenched to pH $\approx$ 1 with 330 μ L of 5 M HCl to precipitate most of the coffee material, preventing precipitation during further analysis. The mixture was stored for 2h at 4°C, the precipitate was removed by centrifugation, and the supernatant was analyzed by reversed-phase HPLC. Experiments were performed at least in duplicate. A calibration line was made with caffeic acid, ferulic acid, quinic acid and 4-hydroxycinnamic acid (Supplementary Figure S2). For calibration line it was used the same method as the samples.



Supplementary Figure S2 – Chromatogram of alkaline saponification (325 nm) for India coffee.

2.11. Alkaline Fusion

In a nickel crucible, 1g of solid NaOH and 100 mg of zinc dust were weighed, and, after fusion of the mixture at 350 °C, 5 mg of HMWM was also (Batistic & Mayaudon, 1970). After 10 s, the nickel crucible was removed and rapidly cooled on ice. The fusion cake was solubilized by adding 6 M HCl, and 200 μ L of internal standard solution was added (1 mg/ml veratric acid on ethanol) and acidified with 6 M HCl to pH 1-2. The acidic mixture was extracted three times with 50 mL of diethyl ether. After evaporation of the organic solvent under vacuum, the residue was analyzed by HPLC. Quantification was performed by the internal standard method using gallic acid, hydroquinone, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, resorcilic acid, 2,3-dihydroxybenzoic acid, benzoic acid and salicylic acid (Supplementary Figure S3).

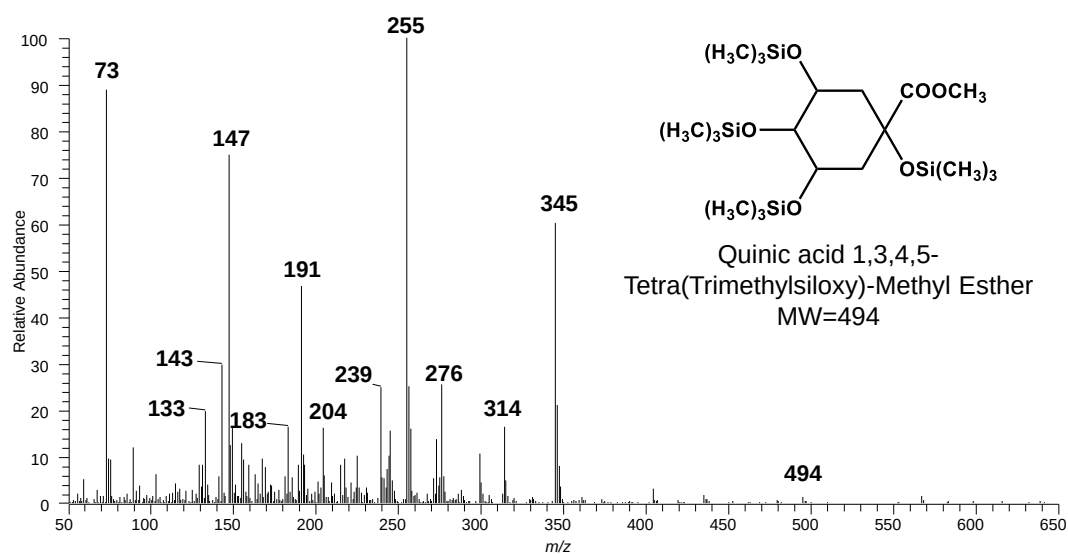


Supplementary Figure S3 - Chromatogram of alkaline fusion (280 nm) for India coffee.

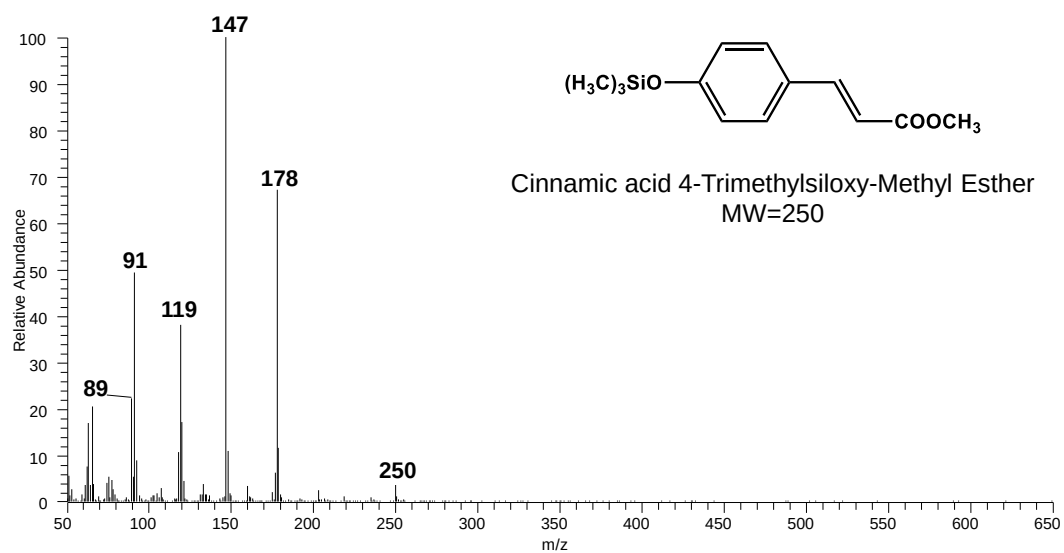
2.12. Methanolysis

For methanolysis was weighed about 5 mg of sample and added 2 ml of a methanol solution 0.5 M HCl (2mL dry methanol + 280 uL of acetyl chloride) (Nunes *et al.*, 2008). Added to the cold (on ice) . Tubes were placed in a heating block at 90 ° C for 24h. On the next day the samples were evaporated at 40 ° C and was added 200 µL of internal standard solution (mg / ml veratric acid in methanol) and evaporated again. After evaporating it was added 250 uL pyridine and 250 uL of BSTFA and placed in a heating block at 70 ° C for 30 min. After derivitaton sample were analysed by GC. A calibration line was made with caffeic acid, ferulic acid, quinic acid and 4-hydroxycinnamic acid (Suplemntary Figure S4). For calibration line it was used the same method as the samples.

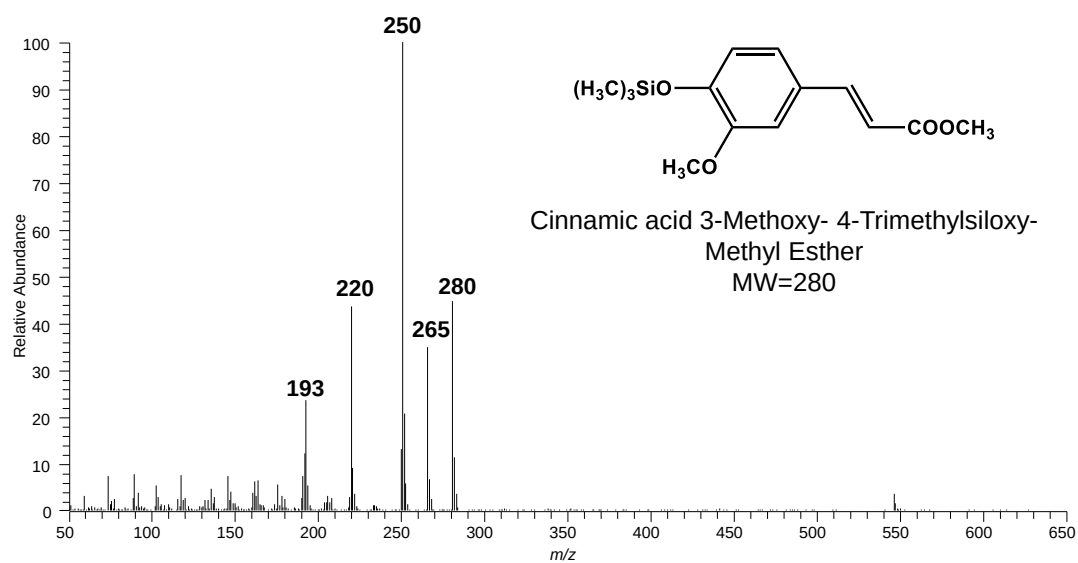
a)



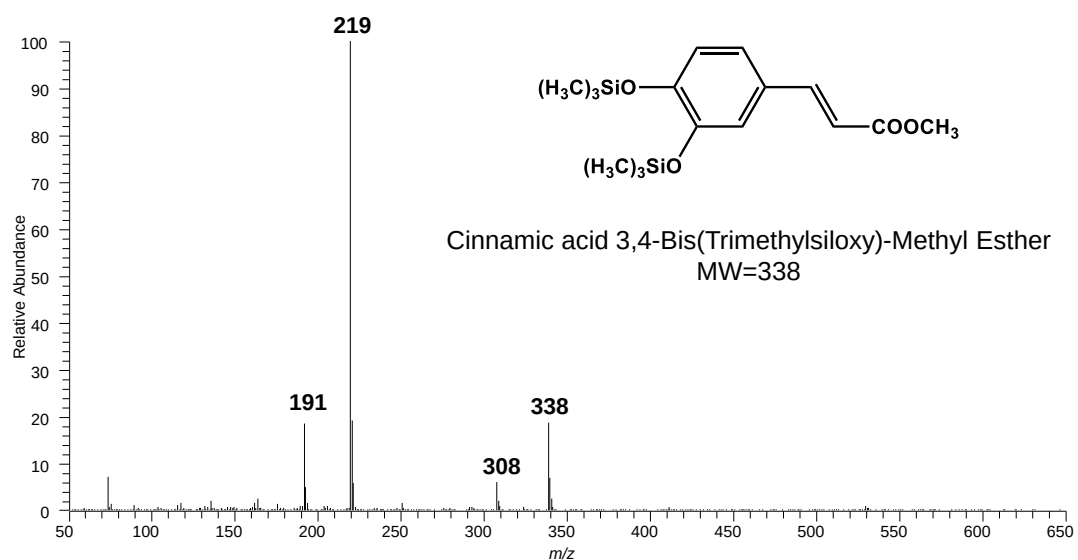
b)



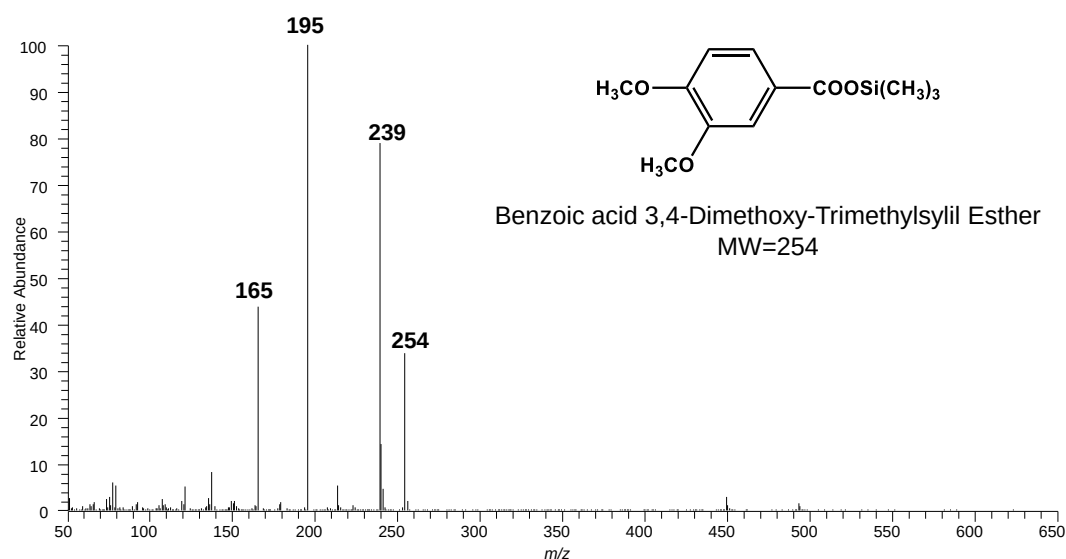
c)



d)



e)



Supplementary Figure S4 – Structure and mass spectra of standards after silylation released by methanolysis – a) Quinic acid derivative; b) *p*-Coumaric acid derivatives; c) Ferulic acid derivative and d) Caffeic acid derivative. e) Internal standard used (Veratric acid)

2.13. Statistical Analysis

All chemical analyses of green coffees, roasted coffees, soluble solids and HMWM were performed in duplicate unless otherwise stated. Significant differences ($p < 0.05$) in chemical composition were analyzed by one-way ANOVA or two-way ANOVA using the software Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). A Tuckey HSD post hoc test was performed for detecting significantly different means ($p < 0.05$).

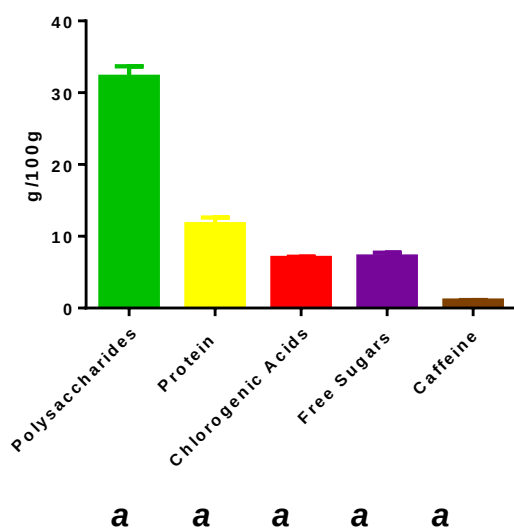
3. Results and Discussion

3.1. Chemical Composition of Green and Roasted Coffee

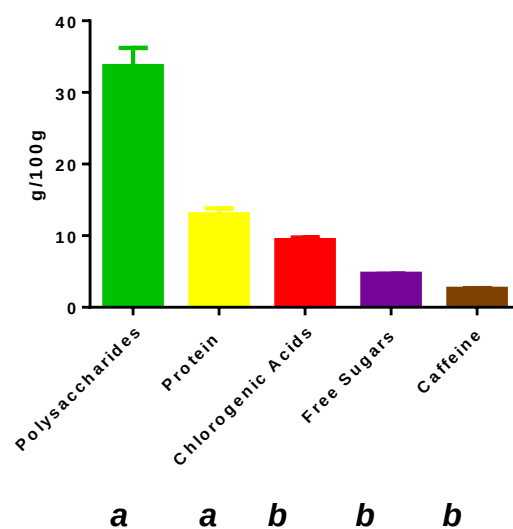
The chemical composition of green and roasted Arabica and Robusta coffees used in this work are shown in Figure 1 and Table S1 to Table S3. They present the typical composition of Arabica and robusta coffees (Macrae, 1985; Belitz *et al.*, 2004), concerning their content in chlorogenic acids (Farah *et al.*, 2006), caffeine (Clifford, 1987) and sucrose (Clarke & Vitzthum, 2001). As can be observed the amount of chlorogenic acids in India robusta coffee are significantly higher than that present in Arabica Honduras coffee (34.7% higher). Also the amount of caffeine present in robusta

coffee is significantly higher than that of Arabica coffee (144% higher). The inverse trend is observed for the simple sugars, where the amount of sucrose is significantly higher in the Arabica coffee when compared to the robusta coffee (53.8% higher). Concerning the composition of polymeric sugars (Supplementary Table S1), it is observed that robusta coffee contained a higher amount of galactose, suggesting a higher amount of arabinogalactans in their cell walls, being in accordance with the typical cell wall composition of robusta coffees when compared to Arabica coffee (Bradbury & Halliday, 1990). Roasting of both coffees for the same degree of roast (~8%) resulted in a drastic decrease in the chlorogenic acid content of both arabica and robusta coffees (Table 2), being observed a decrease of 60% for Arabica coffee and 68% for robusta coffee, although the amount of chlorogenic acids consumed is significantly higher in robusta coffee (6.37g/100g) when compared to Arabica coffee (4.19g/100g). Also during roasting there was observed a significant decrease in the amount of sucrose (98% for Arabica and 99% for robusta), but again the amount of sucrose consumed during roasting is significantly higher for arabica (7.0 g/100g) when compared to robusta (4.6 g/100g). Also there was observed a significant decrease in the total polysaccharides present in coffee beans being in accordance with the literature (Redgwell *et al.*, 2002; Oosterveld *et al.*, 2003).

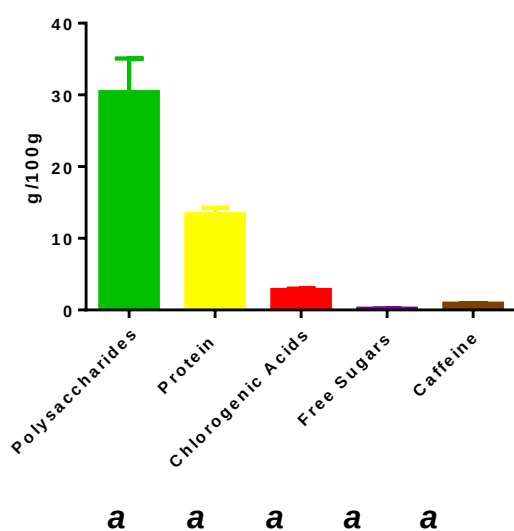
Green Honduras



India



Roasted Honduras



India

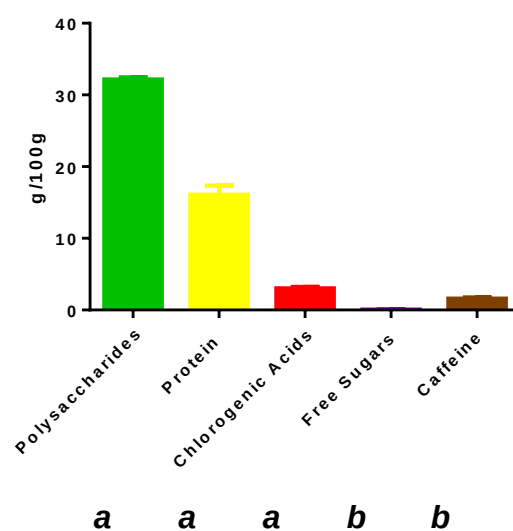


Figure 1 – Chemical composition of green and roasted coffee Honduras and India Coffees. For each chemical component, identical letters in the same row are not significantly different (t-Student test, $p < 0.05$)

Supplementary Table S1 – Total Sugar Composition (Grams per 100 g, as is Basis) of Green and Roasted Coffees

	Rha	Ara	Gal	Man	Glc	Glc _p olym	Total
Green							
Honduras	0.04±0.0	2.00±0.24	7.82±0.31	16.2±0.9	9.76±0.20	6.17	35.8±1.6
India	0.06±0.0	1.98±0.06	9.96±0.30	15.0±1.2	9.00±1.1	6.69	36.0±2.7
Roasted							
Honduras	0.02±0.0	1.15±0.16	6.25±1.07	16.9±2.5	6.11±1.01	5.99	30.5±4.7
India	0.06±0.0	1.53±0.11	8.96±0.26	15.5±0.1	6.12±0.36	6.08	32.2±0.3

Supplementary Table S2 – Chlorogenic Acid (CGA) Composition of Green and Roasted Coffees (Grams per 100 g, as is Basis)

	Green		Roasted	
	Honduras	India	Honduras	India
3-CQA	0.501±0.034	0.666±0.025	0.079±0.007	0.090±0.000
1-FQA	0.059±0.000	0.059±0.000	0.018±0.000	0.043±0.000
3-CoQA	-	-	0.073±0.000	0.080±0.000
5-CQA	4.353±0.253	5.061±0.295	1.492±0.143	1.517±0.095
3-FQA	0.061±0.007	0.072±0.006	0.654±0.002	0.661±0.038
4-CQA	0.657±0.001	0.932±0.031	0.029±0.005	0.014±0.001
5-CoQA	0.098±0.004	0.070±0.004	0.182±0.000	0.185±0.000
5-FQA	0.369±0.000	0.843±0.000	-	-
4-FQA	0.060±0.008	0.059±0.008	-	-
4-CoQA	0.069±0.005	0.070±0.005	-	-
3,4-diCQA	0.284±0.036	0.760±0.025	0.054±0.000	0.060±0.000
3,5-diCQA	0.459±0.088	0.798±0.020	0.201±0.029	0.379±0.005
Total	6.972±0.140	9.397±0.346	2.781±0.209	3.029±0.192

Supplementary Table S3 - Soluble Sugar, Caffeine, and Protein Contents (Grams per 100 g, as is Basis) of Green and Rosted Coffees

	Suc	Glc	Fru	Total	Caffeine	Protein
Green						
Honduras	7.14±0.53	0.02±0.00	0.03±0.01	7.19±0.53	1.05±0.05	11.68±0.92
India	4.49±0.00	0.07±0.01	0.12±0.01	4.67±0.02	2.57±0.02	12.97±0.83
Roasted						
Honduras	0.14±0.00	0.05±0.00	0.01±0.00	0.20±0.00	0.88±0.05	13.34±0.98
India	0.04±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00	0.07±0.00	1.59±0.17	16.08±1.18

Although both coffees were roasted for approximately the same organic loss. India coffees showed a higher L* and b* value. The higher L* value means that this coffee showed a higher lightness and its higher b* value means that it also presented higher yellow component. Although the red component given by a* were not significantly different for both coffees (Supplementary Table S4).

Supplementary Table S4 – Chromatic Properties of Roasted Coffee Powders

	L*	a*	b*	C*	h*
Honduras	37.628±0.742	9.966±0.113a	15.746±0.328	18.635±0.330	56.669
India	40.406±0.210	9.864±0.112a	18.984±0.571	21.394±0.554	62.544

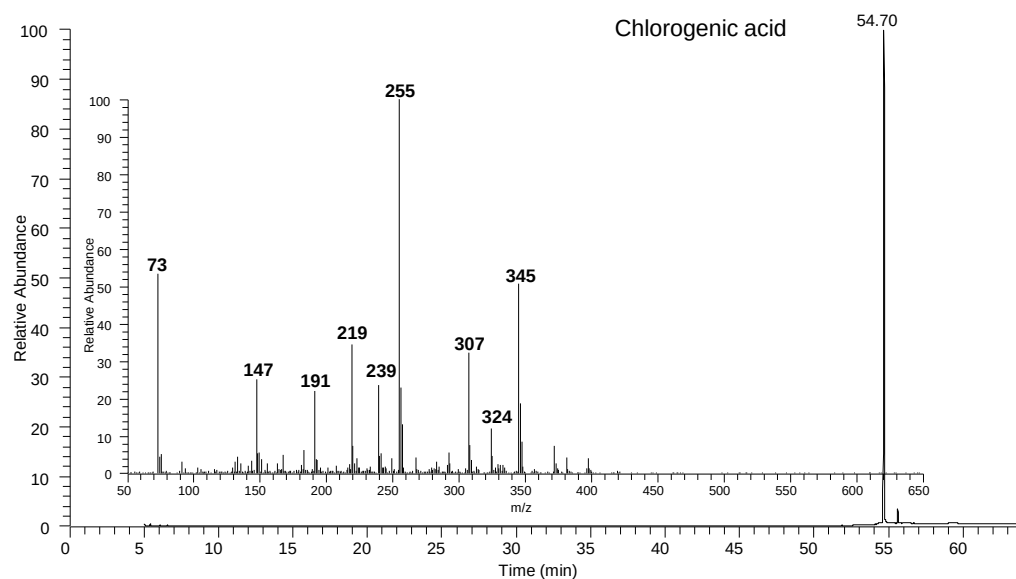
3.2. Chemical composition of the high molecular weight material of roasted coffee brews

The high molecular weight material (HMWM) was isolated from coffee infusions prepared from arabica and robusta roasted coffees. The amount of HMWM recovered from robusta coffee infusions was higher (7.6 g/100g) than that obtained from arabica coffee (5.7 g/100g). Although the difference when compared to total soluble solids extracted from each coffee was not almost inexistent (32g/100g TS and 29 g/100g TS for arabica and robusta coffees, respectively). Polysaccharides were the main component presented of HMWM significantly higher in robusta coffee (46.2g/100g) when compared to arabica coffee (37.2g/100g), this being in accordance with the literature (Coelho *et al.*,

2014). Protein was the second higher component present in the HMWM (~12 g/100g) with no significant differences between the coffees. These results are also in accordance with literature (Coelho *et al.*, 2014). The HMWM obtained from robusta coffee presented a higher value of Kmix 405. Kmix 325 nm and Kmix 280 nm when compared with arabica coffee. The HMWM brown color corresponds to 56% and 45% of the brown color of the total solids. The amount of unknown material can be calculated by subtracting the percentage of polysaccharides and protein present in the HMWM. The results shown that arabica coffee had a significantly higher value of unknown material (51.5%) when compared with robusta coffee (41.5%). Melanoidin brown index (MBI) was calculated dividing the Kmix 405 nm values by amount of unknown material. Robusta coffee had a significantly higher value of MBI when compared with arabica coffee (+31%). These results suggest that CGA amount in the initial green coffees can have a higher influence on the brown color formation of the HMWM when compared to sucrose. As Arabica coffees showed a higher amount and degradation of sucrose during roasting when compared to robusta coffee were the amount of degraded CGA was higher.

The amount and nature of phenolic compounds incorporated in the melanoidins from both coffees were studied by determination of the amount of adsorbed phenolic compounds, esterified phenolic compounds and phenolic compounds released by alkaline fusion (Coelho *et al.*, 2014). Nevertheless as a previous model study has shown. The phenolic compounds can react with reducing sugars and be linked by glycosidic bonds either through the phenolic group or through the hydroxyl groups of quinic acid (Moreira *et al.*, 2015). So in order to be able to differentiate this kind of linkages a methanolysis was applied to the HMWM and the efficiency and linkages cleaved by this method were studied by applying it to phenolic standards as chlorogenic acid, Hesperidin naringin and ellagic acid. In all standards, with the exception of ellagic acid, the initial product was totally consumed and the corresponding quinic and caffeic acid for chlorogenic acid (Supplementary Figure S5), rhamnose, glucose and hesperetin for hesperidin (Supplementary Figure S6), and rhamnose, glucose and naringenin for naringin (Supplementary Figure S7). The methanolysis of ellagic acid didn't allow to degrade its structure, being recovered only the initial phenolic compounds (Supplementary Figure S8).

a)



b)

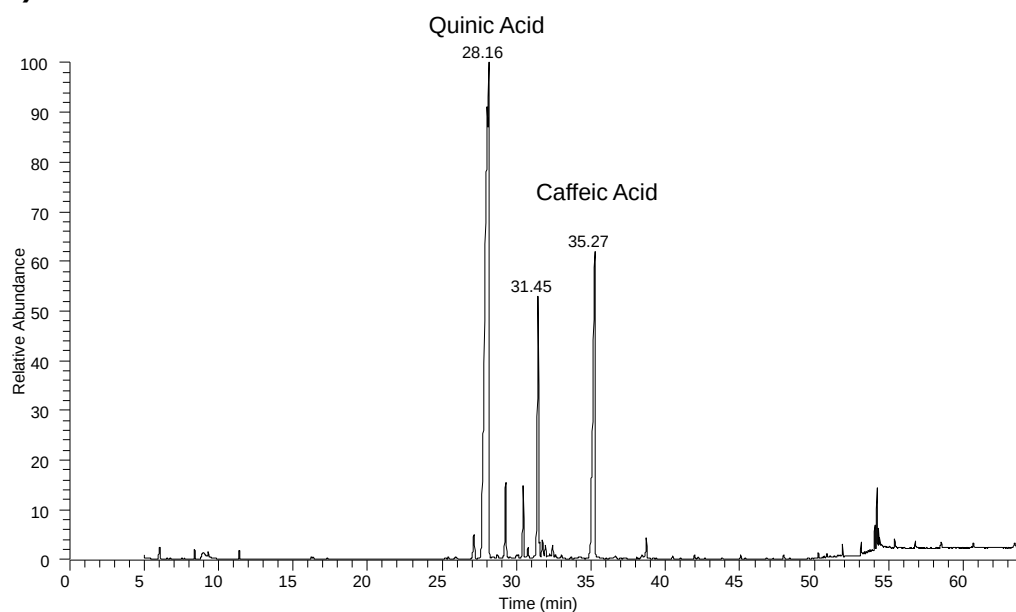
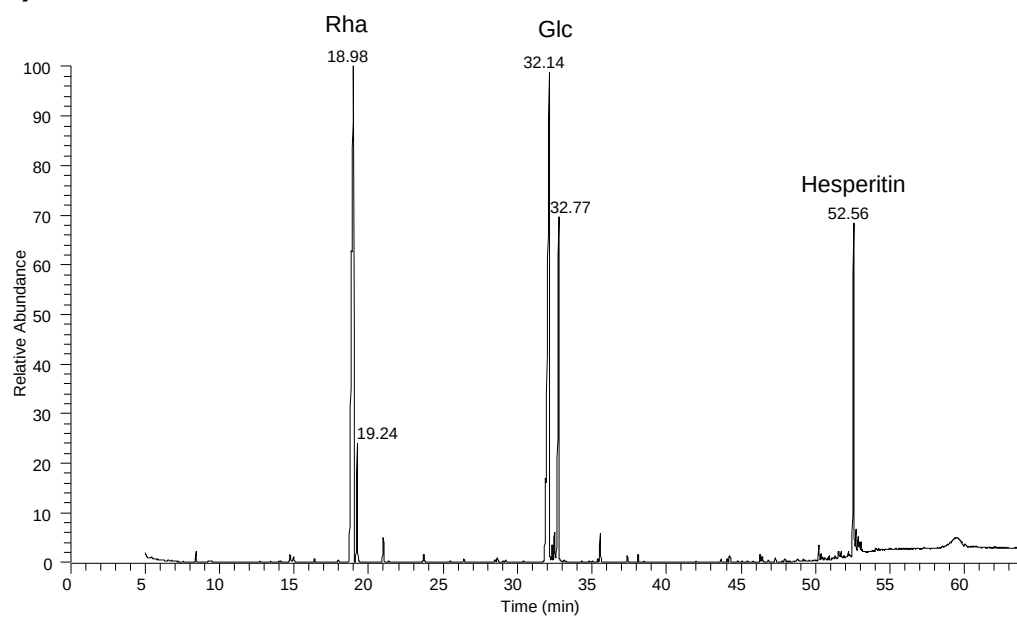


Figure S5 – Chromatograms of a) chlorogenic acid after silylation and b) products of chlorogenic acid methanolysis after silylation.

a)



b)

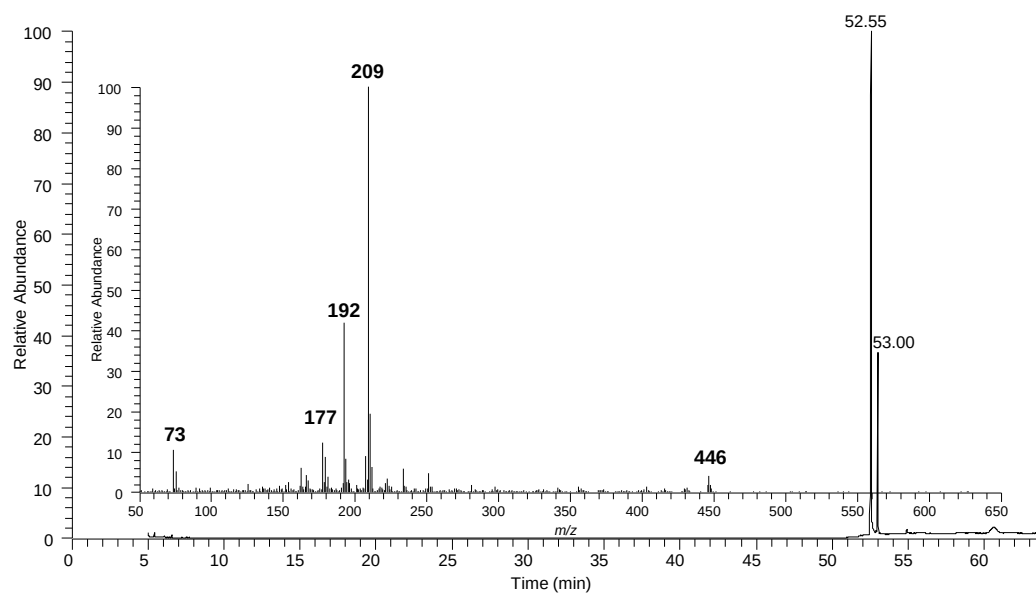


Figure S6 – Chromatograms of a) products of hesperidin methanolysis after silylation and b) hesperetin after silylation.

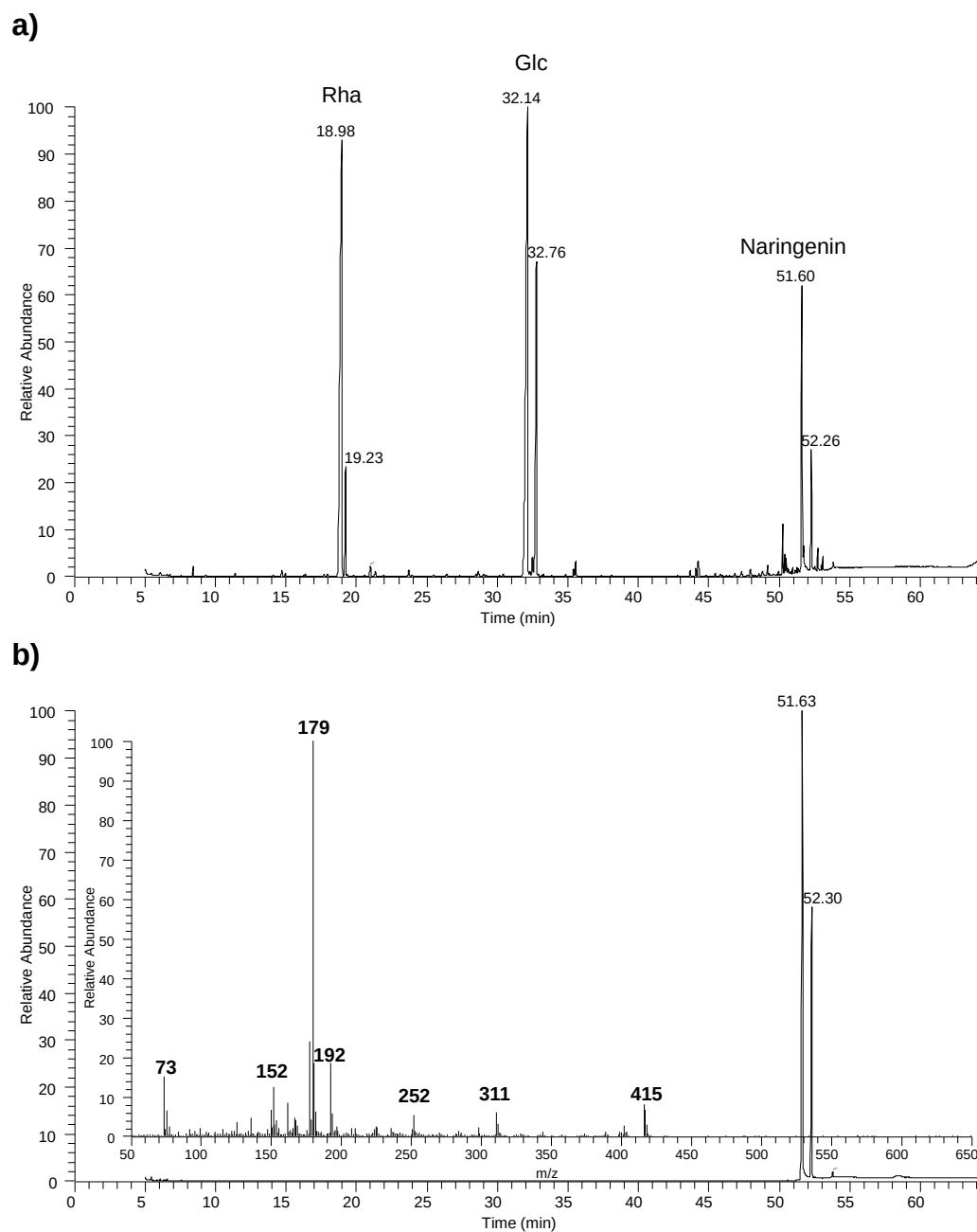


Figure S7 – Chromatograms of a) products of narigin methanolysis after silylation and b) naringenin after silylation

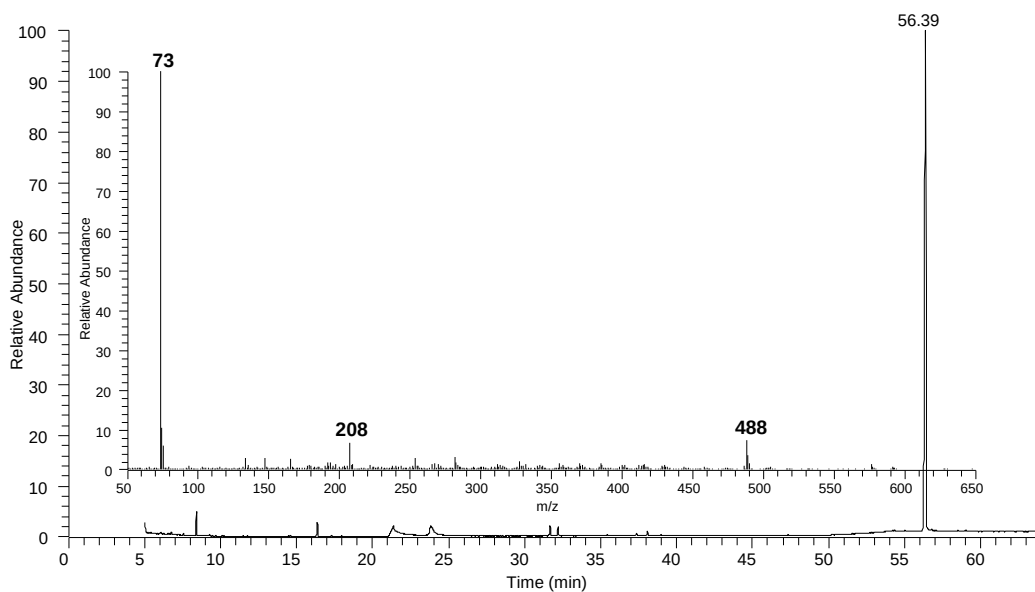


Figure S8 – Chromatograms of products of ellagic acid methanolysis after silylation

These results show that methanolysis can cleave the ester bonds but also the glycosidic bonds between sugar glycosides and phenolic compounds. So methanolysis was applied to the HMWM of both coffees for quantification of quinic acid, caffeic acid, ferulic acid and 4-hydroxycinnamic acid (Figure 2). As can be observed there was possible to detect caffeic, ferulic and quinic acid after methanolysis of the HMWM.

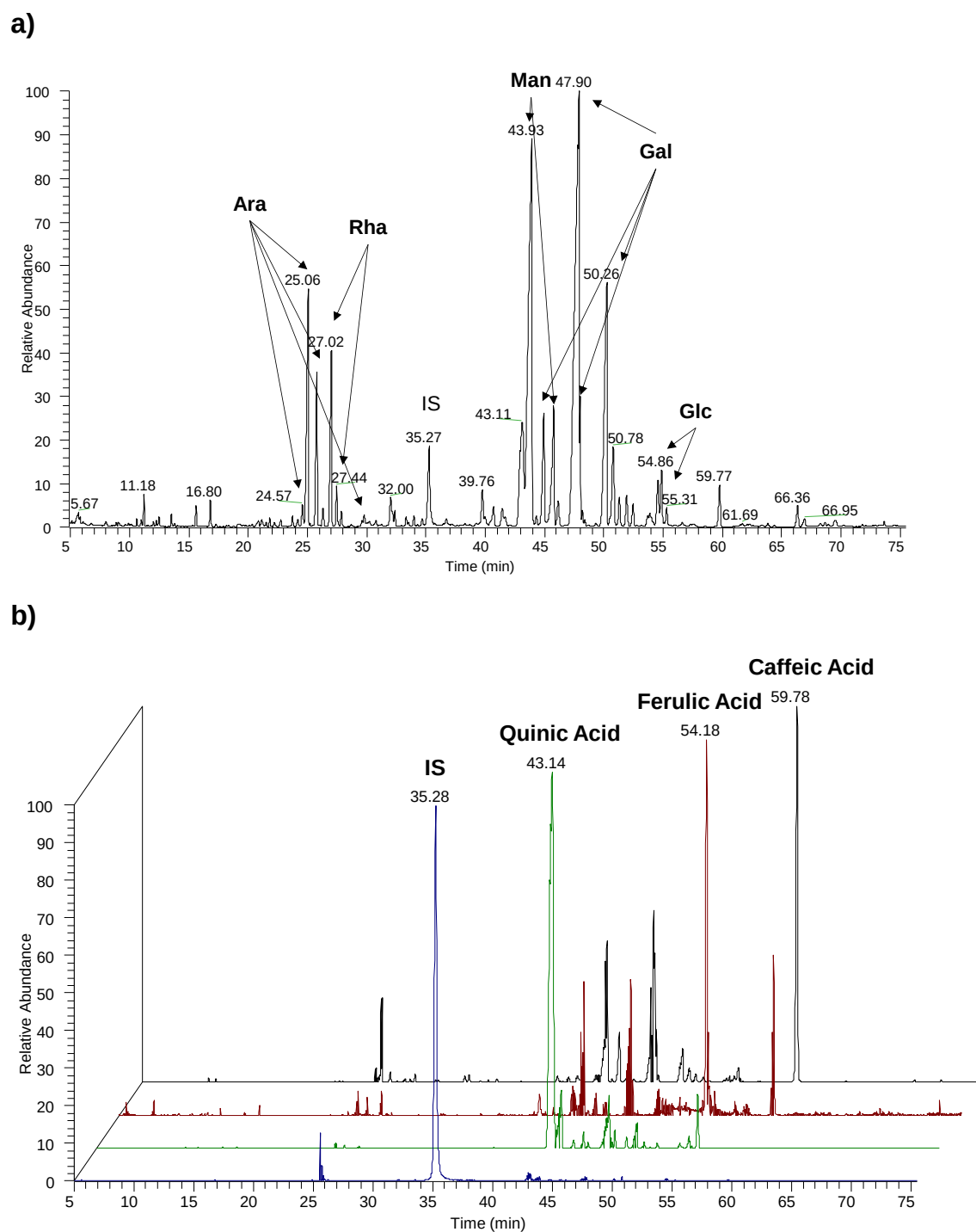


Figure 2 – GC-MS chromatogram of methanolysis products obtained for India HMWM a) total ion current and identification of the sugar components; b) extracted ion chromatograms showing the presence of quinic, ferulic and caffeic acids. IS – internal standard.

Figure 3 shows the results obtained by applying all these four methods. As can be observed (Supplementary Table S5) both HMWM contained a very small amount of adsorbed phenolic compounds ranging from 0.078 to 0.107 mmol/100g of the HMWM.

The alkaline fusion of the HMWM released a significantly higher amount of phenolic compounds from robusta coffee when compared to arabica coffee. This results show that during roasting the amount of phenolic compounds incorporated in robusta coffee is higher than that incorporated in arabica coffee. This being due to the higher amount of CGA in robusta coffee when compared to Arabica coffee, being in accordance with previous results using “in bean” models (Coelho *et al.*, 2014). The amount of esterified phenolic compounds was not significantly different between both coffees, although being significantly higher than the amount of adsorbed phenolic compounds (26.9 times higher). The amount of phenolic compounds released by methanolysis was for both coffees significantly higher than that released by saponification (6.2 times higher). These results show that a significant amount of phenolic compounds are incorporated in coffee melanoidins in a glycosidic linked formed, confirming the model studies of Moreira *et al.* 2015. The amount of glycosidic bound phenolic compounds represent in average 34% of the phenolic compounds released by alkaline fusion a value significantly higher than that ester linked (6% in average for both coffee). Nevertheless the amount of phenolic compounds only released by alkaline fusion still represent 60% of the phenolic compounds present in the HMWM. Calculating the amount of phenolic compounds released as caffeic acid it can be concluded that the amount phenolic compounds present in the HMWM of robusta coffee represent ~8.9% while for the Arabica coffee it represents ~5.8%. The amount of quinic acid recovered by methanolysis correspond to 2.27% for robusta coffee and 0.92% for arabica coffee. The amount of quinic acid recovered the HMWM is in the same range of that released by alkaline saponification by Bekedam *et al.* 2008. Interestingly the amount of quinic acid recovered by methanolysis represent 0.65 mol/mol in relation to the phenolic compounds recovered by methanolysis for the robusta coffee and 0.35 mol/mol for arabica coffee. The amount of phenolic compounds incorporated in coffee melanoidins correspond to 14.8 and 20.2% of the chlorogenic acid lost during the roasting process being in agreement with the results obtained by Carina *et al.* 2014. The K_{mix} at 325 and 280 nm obtained for the HMWM are in agreement with the amount of phenolic compounds recovered by alkaline fusion. The ABTS scavenging capacity is in agreement with the different amount of total phenolic compounds released by alkaline fusion (1.53 times higher in robusta in relation to arabica coffee), with the robusta coffee HMWM showing a 1.37 times higher antioxidant capacity.

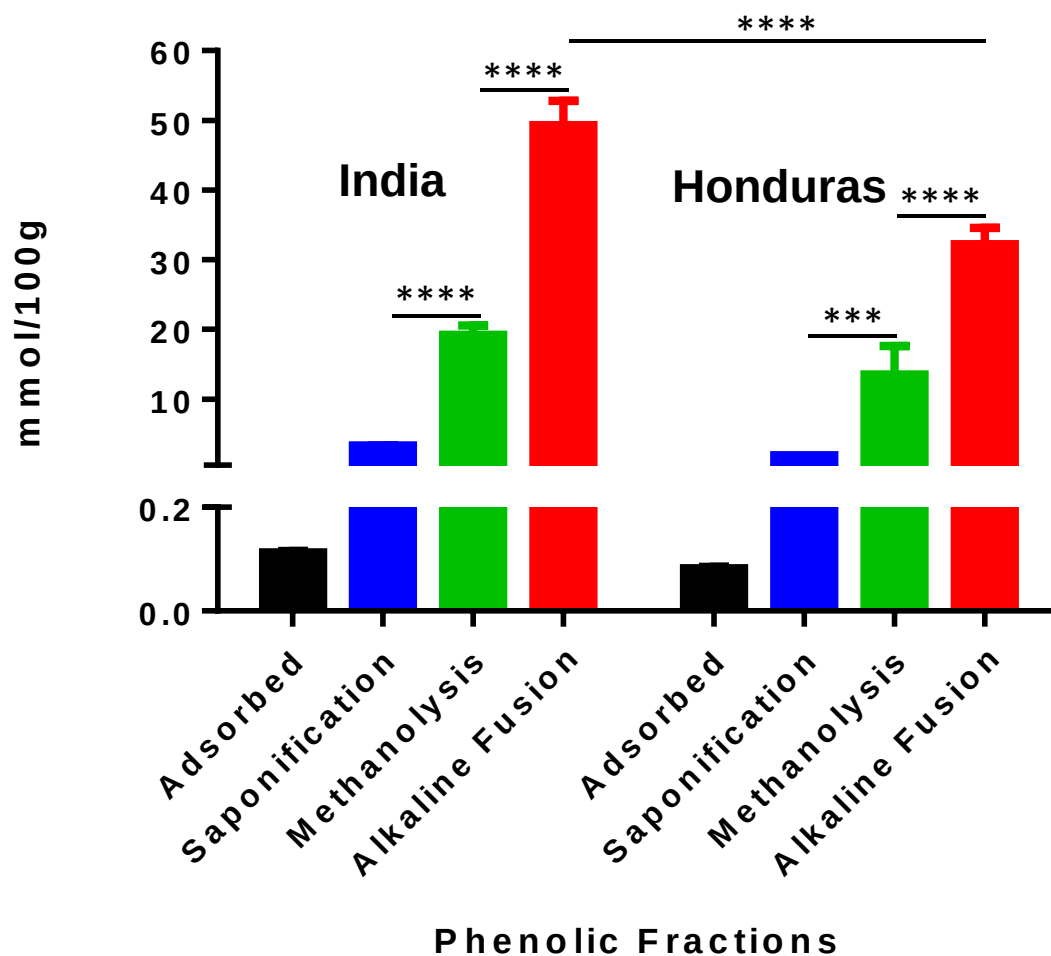


Figure 3 - Profile of phenolic compounds present in the HMWM of (a) India (robusta) and (b) Honduras (arabica) coffees; Tuckey post-hoc test *** - $p < 0.001$; **** - $p < 0.0001$.

Supplementary Table S5 – Phenolic compounds released from HMWM (mmol/100g)

	Honduras	India
Adsorbed		
3-CQA	0.011±0.002	0.010±0.004
3-CoQA	0.005±0.001	0.011±0.006
5-CQA	0.015±0.002	0.017±0.004
3-FQA	0.022±0.001	0.050±0.002
5-CoQA	0.012±0.001	0.006±0.001
3.4-diCQA	0.008±0.001	0.006±0.001
3.5diCQA	0.005±0.001	0.007±0.001
Total	0.078±0.002 ^{§,a}	0.107±0.011 ^{§,a}

Saponification		
Caffeic	1.74±0.02	2.89±0.078
4-hydroxycinnamic	0.030±0.001	0.029±0.000
Ferulic	0.161±0.000	0.407±0.029
Total	1.93±0.11 ^{§,a}	3.33±0.02 ^{§,a}
Methanolysis		
Caffeic acid	11.6±2.5	17.1±1.6
4-hydroxycinnamic	n.d	n.d
Ferulic acid	2.0±0.3	2.1±0.3
Total	13.6±4.1 [§]	19.2±1.3 [§]
Quinic acid	4.8±0.3	11.8±1.5
Alkaline Fusion		
Gallic Acid	0.200±0.006	0.305±0.056
Hydroquinone	1.80±0.27	3.23±0.37
3,4-dihydroxybenzoic Acid	10.6±4.2	19.0±0.3
4-hydroxybenzoic Acid	9.30±4.85	17.0±3.6
Resorcylic Acid	5.46±0.88	3.86±0.20
2,3-dihydroxybenzoic Acid	0.928±0.055	1.21±0.05
Benzoic Acid	2.18±0.09	0.965±0.389
Salicylic Acid	1.77±0.17	3.68±2.84
Total	32.3±2.3	49.3±3.5
ANOVA		%Variation
Interaction	p<0.0001 (4)	3.9
Coffee Variety	p<0.0001 (1)	3.2
Phenolic Method	p<0.0001 (4)	91.8

Rows with the same symbol (§) and columns with the same letter are not significantly different (p<0.05). Tuckey post-hoc test.

Table 1 – Chemical Composition and Spectroscopic Properties of the High Molecular Weight Material Isolated from Honduras and India Roasted Coffee Infusions.

	Honduras	India
Yield (g/100g Coffee)	5.69	7.63
Rha	0.21±0.02	0.77±0.05
Ara	3.47±0.07	4.67±0.25
Gal	28.2±1.3	32.7±3.8
Man	4.51±0.46	7.62±0.94
Glc	0.82±0.10	0.53±0.03
Total Sugars	37.2±0.6 ^a	46.2±5.1 ^b
Protein	11.3±0.4 ^a	12.3±1.0 ^a
Antioxidant Activity TEAC (mmol Trolox/100g)	0.38±0.03 ^a	0.52±0.01 ^b
K _{mix280nm}	6.49±0.52 ^a	7.49±0.46 ^a
K _{mix325nm}	5.34±0.38 ^a	6.30±0.37 ^b
K _{mix405nm}	2.72±0.22 ^a	2.87±0.18 ^a
MBI	5.28	6.93

For each chemical component, identical letters in the same row are not significantly different (t-Student test, p<0.05)

4. Conclusions

The amount of phenolic compounds incorporated into coffee melanoidins during roasting is higher in robusta coffee when compared to arabica coffee this being due to the higher amount of chlorogenic acids in green coffees. A high amount of phenolic compounds present in coffee melanoidins were present as intact caffeic and ferulic acid residues that can be released by methanolysis that account in average for 34% that with those released by alkaline fusion. Also the amount of quinic acid released by methanolysis is higher in robusta coffee when compared to Arabica coffee corresponding to 0.65 mol/mol in relation to the phenolic compounds recovered by methanolysis for the robusta coffee and 0.35 mol/mol for Arabica coffee. This difference in phenolic compounds incorporated in coffee melanoidins from both species agree well with the antioxidant activity of both melanoidins and also with their K_{mix} at 280 and 325 nm. The amount of phenolic compounds incorporated to coffee melanoidins account for ~6% and ~ 9% for arabica

and robusta coffees respectively showing that after polysaccharides and protein, phenolic compounds are one of the main components of coffee melanoidins probably impacting on their reactivity and health benefits of coffee melanoidins.

Aknolwdgments: We appreciate the financial support provided to the project PTDC/QUI-QUI/100044/2008, to the Research Unit in Vila Real (PEst-OE/QUI/UI0616/2014), and to the QOPNA Research Unit 62/94 (Project PEst-C/QUI/UI0062/2013; FCOMP-01-0124-FEDER-037296) by the Foundation for Science and Technology (FCT) and COMPETE.

References:

- Batistic. L., Mayaudon. J. (1970). Étude chromatographic des acides phénoliques et des phenols obtenus par la fusion alcaline des acides humiques. *Plant Soil*, 33, 473-477.
- Bekedam. E. K., Schols. H. A., Van Boekel. M. A., Smit. G. (2008). Incorporation of chlorogenic acids in coffee brew melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2055-2063.
- Belitz. H. D., Grosh. W., Schieberle. P. (2004). Coffee, Tea, Cocoa in *Food Chemistry*. Springer, 3rd Edition, 939-950.
- Bradbury. A. G. W., Halliday. D. J. (1990). Chemical structures of green bean polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 389-392.
- Clarke. R. J., Vitzthum. O. G. (2001). Coffee: recent developments. 1st ed. Blackwell Science. Oxford.
- Clifford M.N. (1987). Chemical and physical aspects of green coffee products. In Clifford M.N.. Wilson KC (editores) Coffee, botany, biochemistry and production of beans and beverage. Croom Helm e Methuen Inc. Nova Iorque. EUA. 305-374.
- Coelho. C., Ribeiro. M., Cruz. A. C. S., Domingues. M. R. M., Coimbra. M. A., Bunzel. M., Nunes. F. M. (2014). Nature of phenolic compounds in coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 7843-7853.

Farah. A.; Monteiro. M. C; Trugo. L. C. (2005). Distribuição de ácidos clorogénicos nos principais defeitos do café. In: Annals of the IV Simpósio de PNP&D Embrapa Café. Londrina. P.R., Brazil.

Farah. A., de Paulis. T., Moreira. D. P., Trugo. L. C., Martin. P. R. (2006). Chlorogenic acids and lactones in regular and water decaffeinated arabica coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 374–381.

Friedman, M. (1996). Food browning and its prevention: An overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 631-653.

Hofmann. T., Bors. W., Stettmaier. K. (1999). Radical-assisted melanoidin formation during thermal processing of foods as well as under physiological conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 391-396.

Ledl. F., Schleider. E. (1990). New aspects of the maillard reaction in foods and in human body. *Angewandte Chemie*, Int. Ed. Engl, 29, 565-594.

Macrae. R. (1985). In Coffee Volume 1: Chemistry, Clarke. R. J., Macrae. R., Eds., Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London. UK.

Moreira. A. S. P., Nunes, F. M., Domingues, M. R., Coimbra, M. A. (2012). Coffee melanoidins: structures mechanisms of formation and potential health impacts. *Food Function*, 3, 903-915.

Moreira. A. S. P., Coimbra. M. A., Nunes. F. M., Passos. C. P., Santos. S. A. O., Silvestre. A. J. D., Silva. A. M. N., Rangel. A., Domingues. M. R. M. (2015). Chlorogenic acid–arabinose hybrid domains in coffee melanoidins: Evidences from a model system. *Food Chemistry*, 185, 135-144.

Nardini. M., Cirillo. E., Natella. F., Mencarelli. D., Comisso. A., Scaccini. C. (2002). Detection of bound phenolic acids: Prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chemistry*, 79, 119–124.

Nunes. F. M., Coimbra. M. A. (2001). Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted arabica coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1773–1782.

Nunes. F. M., Reis. A., Silva. A. M. S., Domingues. M. R. M., Coimbra. M. A. (2008). Rhamnoarabinosyl and rhamnoarabinoarabinosyl side chains as structural features of coffee arabinogalactanas. *Phytochemistry*, 69, 1573-1585.

Nunes. F.M., Cruz. A. C. S., Coimbra. M. A. (2012). Insight into the Mechanism of Coffee Melanoidin Formation Using Modified “in Bean” Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 8710–8719.

Oosterveld. A., Varagen. A. G. J., Schols. H. A. (2003). Effect of roasting on carbohydrate composition of *coffea arabica* beans. *Carbohydrate. Polymers*, 54, 183-192.

Perrone. D., Farah. A., Donangelo. C. M., de Paulis. T., Martin. P. R. (2008). Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. *Food Chemistry*, 106, 859–867.

Redgwell. R. J., Trovato. V., Curti. D., Fischer. M. (2002). Effect of roasting on degradation and structural features of polysaccharides in arabica coffee beans. *Carbohydrate. Research*, 337, 421-431.

Trugo. L. C., Macrae. R. (1984). A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chemistry*, 15, 219-227.