

OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CAFEÍNA, TRIGONELINA E ÁCIDO CLOROGÊNICO EM CAFÉ UTILIZANDO HPLC COM COLUNA DE PERMEAÇÃO EM GEL

Gislaine Chrystina NOGUEIRA¹, Sueli Regina BAGGIO¹, Neura BRAGAGNOLO¹, Roberto Machado de MORAES¹, Emília Emico Miya MORI²

¹Centro de Química de Alimentos & Nutrição Aplicada, ²Núcleo de Análises Físicas, Sensoriais e Estatísticas, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Av. Brasil 2880, CEP 13073-001, São Paulo, Brasil, neura@fea.unicamp.br

ABSTRACT: Coffee is an important product for the national economy. Although Brazil is known by its coffee productivity, it is slowly starting to appear in the quality coffee world. The quality of the coffee is directly related to important chemical compounds such as, caffeine, trigonelline, and chlorogenic acids. These compounds are associated to human health and flavor formation during roasting. In this context, it is necessary to know the values of these compounds in the different coffees produced in Brazil, using modern methodologies that could quantify them efficiently. In the present work, there was adapted a methodology for the simultaneous determination of caffeine, trigonelline, and total chlorogenic acids (ACG) through high performance liquid chromatography on permeation column. The extraction of the compounds were evaluated under many conditions, as well as different mobile phases and flow rates. The method was validated through recovery in two levels and precision. Ten samples paired of raw and roasted coffee from the state of São Paulo were analyzed. The caffeine levels varied from 1.00 to 1.25 g/100g for roasted coffee, and from 0.88 to 1.16g/100g for raw coffee. The trigonelline levels varied from 0.87 to 1.15 g/100g and from 0.57 to 0.78 g/100g for raw and roasted coffees respectively. The ACG levels varied from 2.66 to 3.54 g/100g for roasted coffee, and from 5.07 to 6.24 for raw coffee. Some variations among samples were observed. The roasting process reduced the ACG and trigonelline levels, and increased the caffeine ones.

KEY-WORDS: coffee, caffeina, chlorogenic acid, trigonelline, HPLC

RESUMO: O café é um produto de extrema importância para a economia nacional e, embora o Brasil seja conhecido pela quantidade de café que produz, está começando a marcar lentamente presença no mundo dos cafés de qualidade. A qualidade do café está diretamente relacionada aos teores de componentes químicos importantes, tais como a cafeína, a trigonelina e os ácidos clorogênicos, os quais estão associados à saúde humana e à formação de flavour durante a torrefação. Assim, existe uma crescente necessidade de se conhecer os valores destes compostos, nos cafés produzidos no Brasil, utilizando-se metodologias modernas, que consigam quantificar tais componentes com eficiência. Neste trabalho, adequou-se uma metodologia para a determinação simultânea de cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos totais (ACG) empregando cromatografia líquida de alta eficiência com coluna de permeação em gel. A extração destes analitos sob várias condições foram avaliadas, bem como diferentes fases móveis e fluxos. O método foi validado através da recuperação em dois níveis e da precisão. Foram analisadas 10 amostras pareadas de café cru e torrado provenientes do Estado de São Paulo. Os teores de cafeína variaram de 1,00 a 1,25 g/100g no café torrado e de 0,88 a 1,16 g/100g no café cru. A trigonelina variou de 0,87 a 1,15 g/100g e de 0,57 a 0,78 g/100g nos cafés crus e torrados, respectivamente. Os valores de ACG variaram de 2,66 a 3,54 g/100g no café torrado e de 5,07 a 6,24 no café cru. Algumas variações entre as amostras foram observadas. O processo de torrefação reduz os teores de ACG e trigonelina e aumenta os de cafeína.

PALAVRAS CHAVES: café, cafeína, ácido clorogênico, trigonelina, HPLC

INTRODUÇÃO

O café tem sido uma das bebidas mais aceitas no mundo. Mantém uma estabilidade crescente de importância comercial pelos últimos 150 anos e até hoje é um dos mais importantes artigos de transações comerciais internacionais.

Os maiores produtores de café do mundo são Brasil, Colômbia, México e Guatemala, onde se destaca o plantio de café arábica (*Coffea arabica*). A qualidade do café, além dos atributos sensoriais, pode ser avaliada através da quantificação de componentes como cafeína, associada à saúde humana, a trigonelina e os ácidos clorogênicos, responsáveis pela formação do *flavour* durante a torrefação (Trugo & Macrae, 1989; De Maria *et alii*, 1995). Muitos métodos têm sido estudados para a quantificação desses compostos. A técnica mais utilizada atualmente tem sido a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Este trabalho teve por objetivo otimizar uma metodologia utilizando HPLC com coluna de permeação em gel para determinação simultânea de cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos totais em cafés crus e torrados provenientes do Estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

Foram analisadas 10 amostras pareadas de cafés verdes e torrados provenientes do Estado de São Paulo (Tabela 04 e 05). A torrefação do café foi feita em torrador Tupan tipo D-1 FH215, com capacidade máxima de 20kg, sendo utilizada a temperatura de 210°C pelo período de 13 a 15 minutos. O ponto de torra adotado foi o de médio claro. As amostras foram trituradas em moinho até passarem por uma peneira de 0,59mm.

2.2. Metodologia

Foram testados diversos procedimentos de extração com a finalidade de se obter um pico bem resolvido e separado para o ácido clorogênico. O resumo das condições testadas encontra-se na Tabela 01. O procedimento de extração no qual obteve-se os melhores resultados consistiu de extrair as amostras de café (0,5g) com 30ml de metanol 70% e água acidificada com ácido clorídrico 0,1N até pH 1,5 (para evitar a isomerização do ácido clorogênico) à quente (80°C) em banho-maria com agitação constante por 10 min. Filtrar em balão de 200ml e completar o volume com o mesmo solvente da extração, tomar alíquota de 5ml e transferir para balão de 25ml e completar o volume com o mesmo solvente da extração, tomar uma alíquota, evaporar todo metanol e completar o volume com água deionizada. Filtrar com membrana de 0,45 µm (ME 25, Scheicher & Schuell) e injetar no HPLC.

Tabela 01. Variações da metodologia testada

Solução de extração a 80°C	Fase Móvel	Fluxo (ml/min)
Água Deionizada	Água Deionizada	0,5
Água Deionizada	Água Deionizada	0,9
Metanol 70%	Água Deionizada	0,9
Metanol 70% com água pH 3,0	Água Deionizada	1,1
Metanol 70% com água pH 3,0*	Água Deionizada	1,1
Água Deionizada pH 3,0	Água Deionizada pH 3,0	1,1
Metanol 70% com água pH 1,5	Água pH 3,0 + MeOH (90:10)	0,9
Metanol 70% com água pH 1,5*	Água Deionizada Fervida c/ trap	1,1

*antes da injeção, evaporou-se todo o metanol e completou-se o volume evaporado com água deionizada.

Foi utilizado um cromatógrafo líquido (Schimadzu, Japão) com sistema binário de solventes (LC-10AD), válvula "Rheodyne" com alça de amostragem de 20µL. Uma coluna TSK G3000 SW HPGF (300x8mm) e a respectiva coluna de guarda (Supelco, USA) foram utilizadas para este trabalho e um detector por conjunto de diodos (Schimadzu, M 10 A), fixado a 272nm, segundo a descrição de De Maria *et alii* (1995). De acordo com os cromatogramas, os melhores resultados obtidos foram com as seguintes condições cromatográficas: fase móvel de água deionizada fervida (para retirada de gases), resfriada em frasco fechado com trap de cal sodada (para captura de CO₂) e fluxo de 1,1 ml/min. O aumento no fluxo da fase móvel deixou o método mais rápido com tempo de corrida de apenas 17 min.

2.3. Quantificação

Nas primeiras condições testadas ocorria um alargamento de banda no pico do ácido clorogênico. Testamos então, calcular pela altura e pela área (Tabela 02) e verificamos que as concentrações calculadas em função da altura apresentaram valores menores. Desta forma, a quantificação foi realizada por padronização externa utilizando-se a área dos picos. A curva padrão foi construída com 6 pontos e o intervalo de concentração foi

de 2 a 12µg/ml para cafeína e trigonelina e de 6 a 36µg/ml para ácido clorogênico. A pureza dos picos foi verificada através da obtenção dos espectros de absorvância no início, ápice e término do pico.

Tabela 02. Resultados da comparação dos cálculos dos teores de ácido clorogênico, trigonelina e cafeína utilizando altura e área dos picos*.

Analitos (g/100g)	Resultados obtidos pelo cálculo por área	Resultados obtidos pelo cálculo por altura
Ác. Clorogênico	3,24 ± 0,21	2,93 ± 0,57
Trigonelina	0,70 ± 0,00	0,59 ± 0,01
Cafeína	1,29 ± 0,03	0,95 ± 0,01

*média ± estimativa de desvio padrão de duplicatas.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Validação do método

Realizou-se a recuperação dos três compostos em cafés crus e torrados determinados de acordo com o método proposto. Os resultados obtidos estão na Tabela 03. Embora saiba-se que a solubilidade dos compostos seja maior em água que em metanol, isso não interferiu na extração, como pode-se observar pela recuperação. A precisão do método foi ótima para todos os compostos estudados cujas % de coeficiente de variação foram sempre menores que 4.

Tabela 03. Recuperação de ácido clorogênico, trigonelina e cafeína em cafés crus e torrados, determinados de acordo com o método proposto*.

Analito	(mg/g) adicionado no café cru	Recuperação Café Cru (%)	(mg/g) adicionado no café torrado	Recuperação Café Torrado (%)
ACG	23,42	99,0 ± 0,9	20,11	100 ± 0
Trigonelina	8,35	92 ± 2	6,46	91 ± 0
Cafeína	10,06	98 ± 1	10,29	98 ± 3

*Média de 2 repetições.

3.2. Teores de ácido clorogênico total, trigonelina e cafeína nas amostras de cafés crus e torrados

Analisando as concentrações destes analitos verificamos que pequenas diferenças foram encontradas entre as amostras de cafés crus (Tabela 04). O café 8 apresentou menor teor de ACG, enquanto que os 4, 5 e 7 apresentaram teores maiores em relação aos três compostos.

Tabela 04. Resultados obtidos, em g/100g, na base úmida, na determinação de ácidos clorogênicos totais, trigonelina e cafeína para cafés crus do Estado de São Paulo*.

No.	Identificação	Ác. Clorogênico	Trigonelina	Cafeína
1	Coop. São Manuel	5,63 ± 0,20	0,99 ± 0,01	1,04 ± 0,04
2	Sítio Córrego da Onça	5,95 ± 0,04	0,87 ± 0,05	1,16 ± 0,02
3	Faz. Da Lagoa	6,39 ± 0,01	1,07 ± 0,01	1,03 ± 0,00
4	Faz. São Sebastião	6,17 ± 0,12	1,15 ± 0,04	1,14 ± 0,03
5	Sítio S. Sebastião	6,17 ± 0,09	1,12 ± 0,09	1,12 ± 0,04
6	Faz. São Pedro	5,46 ± 0,21	0,96 ± 0,02	1,09 ± 0,01
7	Sítio Olho d'água	6,24 ± 0,00	1,15 ± 0,05	1,09 ± 0,00
8	Faz. Prata	5,07 ± 0,04	0,93 ± 0,01	0,92 ± 0,01
9	Sítio São José	5,91 ± 0,23	0,91 ± 0,02	1,06 ± 0,04
10	Sítio São Benedito	5,42 ± 0,10	0,87 ± 0,02	0,88 ± 0,01

*média ± estimativa de desvio padrão de duplicatas.

Os valores de cafeína para cafés torrados variaram de 1,0 a 1,3 g/100g (Tabela 05). As amostras 4 e 6, mostraram tendência em apresentar maior teor, no entanto não foram significativamente diferentes das demais. Os teores de ACG variaram de 2,7 a 3,5 g/100g, os quais também não foram significativamente diferentes. As amostras 5 e 6 tenderam a ter maiores valores. As amostras 4, 6 e 7 apresentaram valores significativamente maiores que as demais, cuja média ficou em torno de 0,8 g/100g de trigonelina e as demais variaram de 0,6 a 0,7 g/100g.

De acordo com a literatura, era esperado encontrar-se teores de ACG e trigonelina menores no café torrado, pois estes compostos são instáveis na temperatura de torrefação e se degradam em outros compostos que são responsáveis pelo flavor do café. A cafeína, entretanto é estável na temperatura de torrefação, assim, a alteração no teor de cafeína se deve à perda de umidade durante o processo.

A legislação 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) do Ministério da Saúde estabelece o mínimo de 1% de cafeína em café cru, enquanto que a portaria 377 de 26 de abril de 1999, estabelece mínimo de 0,7 g/100g de cafeína no café torrado. Observamos que das 10 amostras analisadas apenas 2 amostras de café cru e nenhuma de café torrado apresentam valores inferiores ao estabelecido na legislação.

Tabela 05. Resultados obtidos, em g/100g, na base úmida, na determinação de ácidos clorogênicos totais, trigonelina e cafeína para cafés torrados provenientes do Estado de São Paulo*.

No.	Identificação	Ác. Clorogênico	Trigonelina	Cafeína
1	Coop. São Manuel	2,81 ± 0,03	0,62 ± 0,02	1,04 ± 0,00
2	Sítio Córrego da Onça	3,12 ± 0,00	0,59 ± 0,00	1,12 ± 0,02
3	Faz. Da Lagoa	3,18 ± 0,02	0,65 ± 0,01	1,08 ± 0,00
4	Faz. São Sebastião	3,12 ± 0,01	0,76 ± 0,00	1,25 ± 0,02
5	Sítio S. Sebastião	3,35 ± 0,04	0,61 ± 0,00	1,00 ± 0,03
6	Faz. São Pedro	3,54 ± 0,07	0,78 ± 0,01	1,13 ± 0,02
7	Sítio Olho d'água	3,14 ± 0,00	0,77 ± 0,01	1,03 ± 0,04
8	Faz. Prata	2,95 ± 0,00	0,57 ± 0,00	1,12 ± 0,01
9	Sítio São José	2,66 ± 0,09	0,68 ± 0,01	1,10 ± 0,01
10	Sítio São Benedito	2,83 ± 0,09	0,63 ± 0,02	1,01 ± 0,01

* média ± estimativa de desvio padrão de duplicatas.

CONCLUSÕES

O método para análise simultânea de ácidos clorogênicos totais, trigonelina e cafeína mostrou-se rápido, eficiente e preciso. Os teores de cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos totais apresentaram algumas variações entre as amostras analisadas, tanto cruas como torradas. Para podermos estabelecer a qualidade dos cafés brasileiros através dos teores de cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos totais, um maior número de amostras devem ser analisadas, principalmente as provenientes de outras regiões. Este trabalho será posteriormente correlacionado com os resultados obtidos das análises sensoriais das mesmas amostras podendo-se, então, avaliar quais dos analitos foram mais importantes na qualidade da bebida.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP pela bolsa de iniciação científica concedida a Gislaine Christina Nogueira que permitiu o desenvolvimento desde trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL, LEIS DECRETOS, etc. Resolução nº 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. **Diário Oficial**, Brasília, 24 de julho de 1978. Portaria nº 377 de 26 de abril de 1999 da Secretaria da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. **Diário Oficial**, Brasília, 29 de abril de 1999.
- DE MARIA, C. A. B.; TRUGO, L. C.; MOREIRA, R. F. A. Simultaneous determination of total chlorogenic acid, trigonelline and caffeine in green coffee samples by high performance gel filtration chromatography. **Food Chemistry**, 52,447-449, 1995.
- TRUGO, L. C.; MACRAE, R. Application of High Performance Liquid Chromatography to the Analysis of Some Non-volatile Coffee Components. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, 39, 97-107, março, 1989.

AVISO

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS
SEGUINTE ENDEREÇOS:

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES

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

EMBRAPA CAFÉ

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