

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS E FENÓLICOS EM CAFÉ SOLÚVEL UTILIZANDO HPLC/DAD

RESUMO

Acidez é uma característica típica e até certo ponto desejável para o café. Entretanto, se elevada, pode ser considerada um defeito. Pouco é conhecido sobre os ácidos encontrados na bebida e sua influência sobre o pH e acidez percebida. Métodos de estudo destes compostos em café solúvel não têm encontrado sucesso na determinação de diferentes classes de ácidos. Um método utilizando cromatografia líquida em fase reversa foi desenvolvido para determinação simultânea de ácidos carboxílicos e fenólicos em café solúvel. O método utilizou como fase móvel um gradiente de ácido sulfúrico (pH 2,5) e acetonitrila. As amostras de café solúvel foram diluídas para a concentração adequada, filtradas e diretamente injetadas em coluna Spherisorb ODS-2. Um detector de arranjo de diodos foi utilizado com registro a 210nm para ácidos carboxílicos e 278nm para fenólicos. A identificação dos compostos foi realizada através do tempo de retenção, co-cromatografia e espectro no UV. O método foi avaliado quanto aos parâmetros de linearidade, repetibilidade, exatidão e robustez. Em tais condições foi possível identificar numa mesma corrida ácidos carboxílicos (quínico, tartárico, málico, acético, cítrico, piroglutâmico) e ácidos fenólicos (5- cafeoilquínico; 3-cafeoilquínico e ferúlico), além de cafeína, furfural e 5 hidroximetil-furfural. O tempo de corrida total foi de 70 minutos. Os parâmetros de validação testados permitem-nos considerar o método linear, preciso e exato. Apenas ácido tartárico apresentou coeficiente de variação superior a 10% para testes de linearidade na faixa analisada. Testes de robustez mostraram que pH da fase móvel deve ser rigorosamente controlado para boa repetibilidade. O método pode, portanto, ser utilizado em análises de rotina em café solúvel, sem a necessidade de preparo prévio da amostra, permitindo identificar numa única corrida os ácidos carboxílicos e fenólicos, relacionando-os então com a acidez da bebida.

Palavras-chave: café solúvel, ácidos orgânicos, fenólicos, cromatografia líquida

SUMMARY

Acidity is a typical characteristic and it can be desirable for the coffee brew. However, high acidity can be considered a defect. Little is known about acids present in the brew and its influence on pH and perceived acidity. Methods of study of these compounds in soluble coffee did not succeed in the determination of different structures of acid. A method using liquid chromatography in reversed phase was developed for simultaneous determination of phenolic and carboxylic acids in soluble coffee. The method used as eluent a gradient of sulfuric acid (pH 2,5) and acetonitrile. The soluble coffee samples were diluted for the adjusted concentration, filtered and directly injected in column Spherisorb ODS-2. A photodiode array detector was used with 210nm register to carboxylic acids and 278nm to phenolics. The identification of compounds was carried through the time of retention, co-chromatography and spectrum in the UV.

Josiane Alessandra Vignoli e
Denisley Gentil Bassoli*

Cia. Iguaçu de Café Solúvel,
Departamento de Pesquisa &
Desenvolvimento

*Autora para correspondência:
BR 369, Km 88
CEP: 86300-000
Cornélio Procópio. PR
Fone: (43) 3524-1211
Fax: (43) 3524- 2542
E-mail: jvignoli@iguacu.com.br

The method was evaluated to the parameters of linearity, repeatability, accuracy and robustness. In such conditions it was possible to identify in the same run carboxylic acids (quinic, tartaric, malic, acetic, citric, pyroglutamic) and phenolic acids (5-caffeoylquinic; 3-caffeoylquinic and ferulic). Caffeine, furfural and 5-hydroxymethylfurfural can be identified too. The total chromatography run time was 70 minutes. The tested parameters of validation allowed considering the method linear, precise and accurate. But tartaric acid presented relative standard deviations superior to 10% for tests of linearity. Tests of robustness had shown that pH of the mobile phase must be rigorously controlled for good repeatability. The method can be used, therefore, in analyses of routine in soluble coffee, without the necessity of previous preparation of the sample, allowing identifying in an only run phenolic and carboxylic acids, relating them then with the acidity of the drink.

Keywords: soluble coffee, organic acids, phenolics, HPLC

INTRODUÇÃO

A acidez da bebida do café, junto com aroma sempre foi reconhecida como um importante atributo de qualidade sensorial. Acidez elevada, porém, pode ser considerada um defeito. Uma acidez elevada pode estar relacionada ao desenvolvimento da planta em regiões de alta altitude e em solos vulcânicos, bem como a determinadas condições de processamento. Grãos processados via úmida, por exemplo, apresentam acidez relativamente maior do que os mesmos processados via seca. A acidez será também dependente do grau de torra, tipo de torra e preparo da bebida (1).

Assim, uma relação das características sensoriais e dos compostos ácidos presentes na bebida tem sido alvo de grande interesse. Os ácidos encontrados em café verde e torrado já foram estudados por diferentes procedimentos, incluindo cromatografia gasosa e líquida. Entretanto, métodos de cromatografia gasosa são considerados trabalhosos e não aplicáveis a um grande número de amostras. Recentemente a técnica de eletroforese capilar vem se destacando na identificação de ácidos orgânicos de cadeia curta em amostras aquosas complexas com alta eficiência e mínimo trabalho na preparação da amostra (2). Porém, quando da indisponibilidade do equipamento a técnica de cromatografia líquida pode ser adequada para determinação de vários ácidos presentes na bebida. Devido à presença de ácidos carboxílicos e fenólicos no café, este trabalho teve como objetivo utilizar uma metodologia utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos, na qual as duas classes de ácidos são determinadas simultaneamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenvolvimento do método analítico para determinação de ácidos orgânicos e fenólicos

Condições cromatográficas: (Modificação da metodologia descrita por Benassi & Cecchi, 1998 (3)).

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido da marca Dionex, com detector de arranjo de diodos. Utilizou-se uma coluna C-18 – Spherisorb ODS-2, 4,6mm x 250mm, partículas esféricas de 5µm; precedida por coluna guarda. Utilizou-se como fase móvel ácido sulfúrico e acetona.

As condições cromatográficas definidas na corrida estão descritas a seguir:

Fase móvel: Gradiente de solução de ácido sulfúrico pH 2,5 (A) e acetona (B)

0 - 10 min: 100% A

10 - 20 min: 17,5% B

20 - 30 min: 27,5% B

Vazão: 0,5mL/min

Temperatura: 28°C

Deteção: 210 nm para ácidos orgânicos; 278 nm para compostos fenólicos

Preparo da amostra: O preparo da amostra foi realizado de acordo com Chambel *et al.*, 1997. (4). Após o preparo (dissolução em água fervente) o pH das amostras foi ajustado para 2,5 com H₂SO₄. Para análise de robustez, utilizou pó e extrato da amostra. Os extratos foram simplesmente diluídos quando necessário e o pH ajustado. Procedimento de limpeza em cartuchos SEP-PAK C18 foi avaliada, porém retenção dos ácidos fenólicos foi observada.

Validação da metodologia

A metodologia foi avaliada quanto aos parâmetros de linearidade, repetibilidade (precisão), robustez, exatidão e limites de detecção e quantificação. Para obtenção da linearidade as concentrações abrangeram a faixa de 50 a 150% da concentração alvo de cada composto, sendo que a determinação para cada concentração foi feita em triplicata a partir de preparações independentes de padrões. A exatidão foi determinada por meio da porcentagem de recuperação média das amostras fortificadas em três níveis, em triplicata (5). A precisão do método foi determinada em termos de repetitividade. Os experimentos da robustez foram definidos segundo o planejamento fatorial

Plackett-Burman, no qual foi avaliada a influência de sete variáveis independentes na variável resposta (concentração de cada composto). As variáveis avaliadas foram: tipo de amostra (pó ou extrato); pH da amostra; pH da fase móvel; temperatura do forno cromatográfico; vazão na bomba; analista e temperatura de extração da amostra.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de acordo com parâmetros da curva analítica (6).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No desenvolvimento da metodologia foi testado em substituição à acetonitrila o solvente metanol, por ser menos tóxico e mais barato, porém este provocou uma

Tabela 1. Resultados obtidos nos diferentes parâmetros validados

Compostos	Faixa estudada (ug/mL)	r	Repetitividade (CV %)	Recuperação (%)	LD (ug/mL)	L Q (ug/mL)
tartárico	10 - 35	0,937	16,87
quínico	200 - 550	0,999	4,08	106,81	28,93	96,42
málico	10 - 35	0,995	24,50	2,14	7,15
acético	15 - 50	0,995	6,76	100,06	0,64	2,14
cítrico	30 - 120	0,998	5,84	104,76	3,92	11,31
piroglutâmico	20 - 60	0,997	2,77	117,86	4,19	13,97
3-ACQ** e 4-5 ACQ	50 - 150	0,998	3,08	111,93	7,38	24,61
ferúlico	2 - 20	0,999	1,34	87,86	0,62	2,00

**ACQ – ácido cafeoilquínico

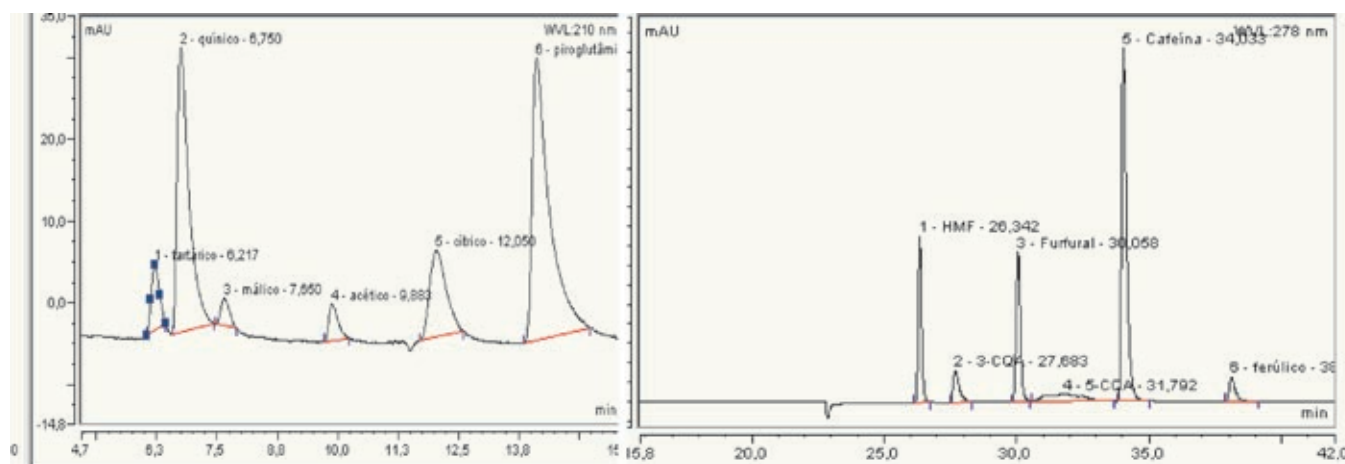


Figura 1. Perfil cromatográfico obtido para padrões de compostos presentes em café solúvel

pronunciada elevação na linha de base durante o gradiente. Assim, optou-se pela utilização de acetonitrila. Após definição das melhores condições de análise o processo de validação foi iniciado. Os compostos foram identificados por comparação de seus espectros com de seus respectivos padrões, co-cromatografia e tempo de retenção.

A Tabela I apresenta o coeficiente de correlação (r) obtido para linearidade, a porcentagem de recuperação nos testes de exatidão, os valores do coeficiente de variação (CV) (%) nas condições de repetibilidade e os limites de detecção e quantificação para os diferentes compostos.

Pode-se observar que com exceção do ácido tartárico, os demais compostos apresentaram um coeficiente de correlação de 0,99 dentro da faixa estudada. Para o parâmetro repetitividade apenas os ácidos tartárico e málico, apresentaram C.V. acima de 10%. Os demais compostos, entretanto, apresentam-se dentro dos limites de variação aceitáveis estabelecidos por (7).

Na avaliação da exatidão e LD e LQ tartárico e málico foram, portanto, desconsiderados. A exatidão medida pela porcentagem de recuperação para os demais compostos variou de 87,86 a 117,86% encontrando-se dentro dos limites permitidos (7).

Conforme observado na Tabela I, a faixa de estudo e trabalho para todos os compostos apresenta-se acima dos limites de detecção e quantificação calculados podendo, portanto, serem detectados e quantificados com segurança.

Os resultados de robustez mostraram que todos os parâmetros estudados foram significativos pelo menos para um dos compostos detectados (dados não apresentados) e devem, portanto, ser rigorosamente controlados para que se tenha uma resposta confiável. Pequenas alterações nas condições cromatográficas foram suficientes para mudanças no perfil de eluição e da resolução entre picos adjacentes.

A Figura I apresenta um cromatograma para padrões obtidos nas condições cromatográficas descritas. Podemos observar que além da determinação dos compostos ácidos acima estudados, é possível na mesma corrida a identificação e quantificação de cafeína, furfural e hidroximetilfurfural; oferecendo uma grande vantagem para análise da bebida do café, onde a identificação destes compostos pode ser de interesse.

Outras metodologias já foram utilizadas para determinação de ácidos orgânicos em bebida. Entre as mais recentes está a técnica de eletroforese capilar. Através desta, foram identificados 17 ácidos orgânicos de cadeia curta: oxálico, fórmico, fumárico, mesacônico, succínico, maleico, málico, isocítrico, cítrico, acético, citracônico, glicólico, propiônico, láctico, furanóico, piroglutâmico, quínico e ainda nitrato (8). Cromatografia líquida de troca iônica

também tem sido utilizada na detecção de ácidos orgânicos em diferentes bebidas (9). Entretanto, nas duas últimas, compostos fenólicos, bem como furfurais e cafeína, não podem ser detectados. Desta maneira, o método desenvolvido torna-se interessante já que pode detectar os principais ácidos orgânicos da bebida associados a outros compostos que também apresentam importante indicação de qualidade da bebida.

Podemos concluir, portanto, que, dentro das condições estudadas os ácidos quínico, acético, cítrico, piroglutâmico, 3 ACQ e 4-5 ACQ e ferúlico, podem ser identificados e quantificados com segurança.

Referências

1. **Coffee Research**, 2006. *Coffee Acidity* – disponível em: <http://www.coffeeresearch.org/coffee/acidity.htm>. Acesso em setembro de 2006.
2. MAESO et al. *Capillary electrophoresis for caffeine and pyroglutamate determination in coffees – Study in vivo effect on learning and locomotor activity in mice*. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 41, p.1095- 1100, 2006.
3. BENASSI, M.T.; CECCHI, H.M. *Method Development For The Simultaneous Determination Of Carboxylic Acids, Phenolic Compounds And Sorbic Acid In White Wines*. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 21, n. 4, p. 491-501, 1998.
4. CHAMBEL et al. *Development of an HPLC/Diode Array Detector Method for Simultaneous Determination of 5-HMF, Furfural, 5-O-Caffeoylquinic Acid and Caffeine in Coffee*. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 20 (18), p. 2949-2957, 1997.
5. GREEN, J.M. (1996). *A practical guide to analytical method validation*, **Analytical Chemistry News and Features**, May 1, 305^a - 309 A.
6. RIBANI et al. *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. **Química Nova**, 27, n. 5, p.771- 780, 2004.
7. GARFIELD, F.M. (2000). *Quality assurance principles for analytical laboratories*. 3 rd Ed. AOAC International. USA 4.
8. GALLI, V.; BARBAS, C. *Capillary electrophoresis for the analysis of short-chain organic acids in coffee*. **Journal of Chromatography A**, 1032, p. 299-304, 2004.
9. Dionex, 2006. Application Note 143- Determination of Organic Acids in Fruit Juices. Disponível em: <http://www1.dionex.com/en-us/applications>.