

METODOLOGIA PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE ÁCIDO NICOTÍNICO, TRIGONELINA, ÁCIDO CLOROGÊNICO E CAFEÍNA EM CAFÉ TORRADO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Sandriel Trindade Alves, Rafael Carlos Eloy Dias e Marta de Toledo Benassi*

Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-970 Londrina - PR, Brasil

Maria Brígida dos Santos Scholz

Instituto Agronômico do Paraná, CP 481, 86001-970 Londrina - PR, Brasil

Recebido em 21/3/05; aceito em 17/2/06; publicado na web em 14/6/06

HPLC ANALYSIS OF NICOTINIC ACID, TRIGONELLINE, CHLOROGENIC ACID AND CAFFEINE IN ROASTED COFFEE. A reverse phase liquid chromatography method was developed for simultaneous determination of trigonelline, caffeine, nicotinic and chlorogenic (5-CQA) acids in roasted coffee. A gradient of acetic acid/acetonitrile was used as mobile phase and detection was carried out in the UV. The samples were extracted with acetonitrile/water (5:95 v/v) at 80 °C/10 min. Good recovery (89 to 104%), repeatability and linearity were obtained. Detection limits of 0.01, 0.15, 0.04 and 0.04 mg mL⁻¹ were observed for nicotinic acid, trigonelline, 5-CQA and caffeine. The method, applied to arabica and robusta coffees with different degrees of roasting, was efficient and fast (~35 min) and also allowed identification of cinnamic acids.

Keywords: *Coffea arabica*; *Coffea canephora*; 5-CQA.

INTRODUÇÃO

Bebida aromática e de consumo disseminado pelo mundo, o café tem hoje importância relevante na economia, sendo um dos principais produtos de exportação de cerca de 40 países em desenvolvimento. São conhecidas mais de 100 espécies do gênero *Coffea* L. (Rubiaceae)¹, sendo as mais importantes *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, que correspondem a cerca de 80 e 20%, respectivamente, da produção nacional estimada para a safra 2004/2005². No Brasil, a quase totalidade das lavouras de café *canephora*, genericamente conhecido por robusta, é da cultivar conilon³.

Os cafés arábica e conilon diferem consideravelmente em preço, qualidade e aceitabilidade. Os grãos de arábica são verde claro e de forma ovalar, enquanto que o conilon tende a ser mais arredondado e castanho. Porém, após torra e moagem, não se distinguem as espécies visualmente e, como pertencem ao mesmo gênero, possuem poucas diferenças físico-químicas para permitir a detecção e/ou quantificação da adição de café conilon, de menor valor comercial, ao arábica⁴.

Diferentes técnicas analíticas para discriminação entre as espécies de café vêm sendo estudadas⁵, porém muitas vezes exigem o uso de técnicas como espectroscopia no infravermelho⁴, cujo equipamento e manutenção são relativamente caros, além de não ser usualmente utilizado na área de alimentos. Deve-se considerar ainda que grande parte dos trabalhos é relativa a grãos crus⁶⁻⁸. Como a avaliação de um só parâmetro não permite discriminação e caracterização adequadas, é interessante a quantificação dos compostos por uma técnica analítica multicomponente eficiente como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A literatura relata que ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico (5-ACQ) e cafeína têm sido estudados tanto para discriminação das espécies quanto para avaliação do grau de torra, qualidade e propriedades funcionais do café⁹⁻¹². Casal *et al.*⁹ avaliaram a eficiência de ácido nicotínico, trigonelina e cafeína como discriminadores para espécie e origem geográfica. Estudando a relação entre ativi-

dade antibacteriana e torra, Daglia *et al.*¹¹ verificaram que a soma dos teores de trigonelina e ácido nicotínico e a razão entre as quantidades de 5-ACQ e cafeína dependem das condições de torra dos grãos de café e podem ser usados como meio eficiente para monitoramento do processo de torra. Bicchi *et al.*¹² analisaram simultaneamente os ácidos clorogênicos em café verde e torrado, com o objetivo de diferenciar espécies e processos de torra.

Compostos identificados como bons discriminadores para as espécies *Coffea arabica* e *canephora* em outros países não necessariamente são eficientes para o produto brasileiro, devido ao emprego de variedades diferenciadas. Deve-se, ainda, considerar que em muitos estudos os compostos são determinados separadamente, aumentando o tempo de análise.

A literatura descreve várias técnicas por CLAE para determinação de cafeína, trigonelina, ácido nicotínico e 5-ACQ em cafés torrados, mais usualmente empregando mecanismo de fase reversa¹¹⁻²⁰, sendo também citado o uso de permeação em gel^{13, 21-24}. Os compostos podem ser determinados individualmente ou associados, mas somente Daglia *et al.*¹¹ relatam a possibilidade de quantificação simultânea de todos os compostos.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar uma metodologia analítica simples e rápida, que permitisse determinar simultaneamente os teores de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico (5-ACQ) e cafeína em cafés arábica e conilon torrados em diferentes graus.

PARTE EXPERIMENTAL

Material

As amostras de café verde de origem conhecida foram obtidas junto ao Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR, Londrina, Brasil). Utilizou-se café arábica da variedade IAPAR 59 e café conilon. A torra foi realizada em torrador marca Rod-Bel e para controle do grau de torra foi utilizado o parâmetro perda de peso da amostra (13, 17 e 20% para torra clara, média e escura, respectivamente). As amostras

*e-mail: martatb@uel.br

foram moídas a uma granulometria em torno de 0,5 mm, armazenadas em sacos plásticos e acondicionadas em câmara fria a 10 °C.

Reagentes

Utilizou-se como solventes para preparo da fase móvel: acetonitrila (Carlo Erba, Duque de Caxias, Brasil) e metanol, ácido fórmico, ácido sulfúrico (Merck, Darmstadt, Alemanha) e ácido acético glacial (Synth, Diadema, Brasil) de grau cromatográfico. A água empregada no preparo de padrões e soluções foi obtida por sistema de purificação e filtração Milli-Q (Millipore, Billencia, EUA). As fases móveis utilizadas foram filtradas em sistema Millipore de filtração a vácuo com membranas de 0,45 µm (Millipore, Billencia, EUA) e degaseificadas, por 30 min antes de sua utilização, em degaseificador Shimadzu, modelo DGU-2A (Kyoto, Japão).

Nas análises foram empregados padrões (de grau analítico) da Sigma (Steinheim, Alemanha) de ácido caféico (ácido 3,4-dihidroxi-cinâmico), ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico), ácido cumárico (ácido 4-hidroxi-cinâmico), ácido clorogênico (ácido 1,3,4,5-tetraidroxícicloexano-carboxílico - 5-ACQ), ácido nicotínico (n-metilnicotinamida), cafeína (1,2,7-trimetilxantina) e trigonelina (1-metilpiridinium-3-carboxilato monoidrato).

Avaliação das condições cromatográficas

Para análise cromatográfica, utilizou-se um cromatógrafo a líquido Shimadzu (Kyoto, Japão), constituído de sistema de bombeamento de solvente (duas bombas modelo LC10AD) e válvula injetora Rheodyne, com alça de amostragem de 20 µL. O sistema está acoplado a um detector espectrofotométrico UV/visível Shimadzu (modelo SPD-10A) conectado por uma interface (CBM-101) a um microcomputador para processamento de dados.

Para encontrar as melhores condições cromatográficas para separação e quantificação dos compostos foram testadas duas colunas de fase reversa Spherisorb (Milford, EUA) com fase ligada de grupos alquílicos com cadeia de 18 carbonos. As colunas possuíam mesma dimensão e tamanho de partícula (4,6 x 250 mm, partículas esféricas de 5 µm e 80 Å de porosidade), mas diferentes taxas de recobrimento (ODS-2, capeada com 11,5% de carbono em peso, e ODS-1, não capeada, e 6,2% de recobrimento). No desenvolvimento, foram estudadas como fase móvel misturas isocráticas e gradiente de MeCN/H₂O e MeOH/H₂O, testando-se diferentes valores de pH pela adição de ácidos acético, fórmico, sulfúrico e fosfórico. Foi empregada detecção no UV e as análises foram realizadas à temperatura de aproximadamente 25 °C.

A identificação dos compostos foi feita no próprio cromatógrafo a líquido, com base nos tempos de retenção dos solutos eluídos da coluna comparados com o do padrão e por co-cromatografia. A quantificação foi feita por padronização externa, construindo-se as curvas de calibração, onde a área do pico cromatográfico foi proporcional a quantidade de padrão injetado.

Extração

Como a literatura citava diferentes técnicas para preparo de amostras^{6,7,12,16,17,24}, foram testadas quatro condições de extração: H₂O a 80 e 100 °C, solução MeOH/H₂O (10:90 v/v) com 5% de ácido acético à 80 °C e solução MeCN/H₂O (5:95 v/v) à 80 °C. As amostras (0,50 g) foram extraídas com 30 mL das soluções por 10 min e filtradas em balão de 100 mL em papel de filtro qualitativo. Uma alíquota (5 mL) do filtrado foi transferida para um balão volumétrico (25 mL), completando-se o volume com a solução de extração. O extrato final foi filtrado em membrana Millipore (Billencia, EUA) de 0,45 µm e injetado diretamente no cromatógrafo.

Avaliação do método

Para avaliação da metodologia, seguiram-se as recomendações da AOAC²⁵, estudando-se a linearidade, repetibilidade, recuperação e sensibilidade.

A linearidade do método foi determinada pela análise em triplicata de misturas padrão em seis diferentes concentrações, construindo-se a curva analítica e calculando-se o coeficiente de determinação (R²) e nível de significância (p).

Para determinação da repetibilidade, foram analisadas cinco extrações diferentes (0,50 g) da mesma amostra, sujeitas às mesmas condições de extração e análise, no mesmo equipamento, no menor espaço de tempo possível. Estudou-se também a repetibilidade intra-dia, avaliando-se a mesma extração da amostra (0,50 g) com cinco repetições ao longo do dia, e a repetibilidade inter-dias (precisão intermediária), analisando-se uma mistura padrão dos compostos, que foi preparada e congelada a fim de retardar o processo de degradação, e injetada com intervalos de 24 h durante 5 dias.

A recuperação foi determinada por adição do padrão da substância em estudo à amostra de café arábica de torra média antes da análise. Primeiramente estimou-se a concentração das substâncias no extrato de café, obtendo-se teores de 0,012 g/100 g de amostra em base seca para ácido nicotínico, 0,489 g/100 g para trigonelina, 0,475 g/100 g para 5-ACQ e 1,350 g/100 g para cafeína. Em seguida, para cada composto foi feita análise adicionando-se quantidade de padrão correspondente a 50% da concentração inicial. As análises foram realizadas em triplicata.

Na determinação da sensibilidade do método, o limite de detecção (LD) foi estabelecido empregando-se soluções de concentrações decrescentes até o menor nível detectável e o limite de quantificação (LQ), até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Os valores de LD e LQ foram estimados usando as Equações 1 e 2⁶. O valor de h_n foi determinado pela multiplicação de h_n por um fator estabelecido de acordo com o perfil dos picos cromatográficos.

$$LD = 2 C_s h_n / h_s \quad (1)$$

$$LQ = 6 C_s h_n / h_s \quad (2)$$

onde: h_n = variação máxima do ruído; h_s = altura do sinal cromatográfico; C_s = concentração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo da extração e definição das condições cromatográficas

Optou-se pela extração com MeCN/H₂O (5:95 v/v) à 80 °C, pela melhor resolução observada para os picos de ácido nicotínico e trigonelina e por apresentar a mesma porcentagem de modificador orgânico da fase móvel no início da corrida cromatográfica.

Inicialmente trabalhou-se com padrões, utilizando coluna Spherisorb ODS-2 e, como fase móvel, uma mistura isocrática de MeOH/solução aquosa 0,04% de ácido fórmico (20:80 v/v) com pH 3,2. No detector, foi empregada uma programação de maneira a detectar cada composto no comprimento de onda de máxima absorvância: trigonelina e ácido nicotínico a 260 nm, cafeína a 272 nm e 5-ACQ a 320 nm. Nessas condições, a ordem de eluição foi trigonelina, ácido nicotínico, 5-ACQ e cafeína, com tempo de corrida de 35 min.

A separação do ácido nicotínico e trigonelina foi a principal dificuldade observada. A sobreposição parcial dos picos foi atribuída, principalmente, ao fato do ácido nicotínico ser um produto de degradação da trigonelina^{11,27}, apresentando características físico-químicas e comportamento cromatográfico semelhantes. Comparou-se a eficiência, testando-se tanto o pH da fase móvel ácida (variando de 2,2 a

3,2) quanto o emprego de diferentes ácidos orgânicos (fórmico, acético) e mineral (sulfúrico). Estudou-se, também, a adição de modificador orgânico em diferentes proporções (de 10 a 35% de metanol), empregando-se eluição isocrática e por gradiente. Optou-se pelo emprego de fase móvel utilizando gradiente de eluição de ácido acético/H₂O (5:95 v/v) e variando-se a proporção de metanol de 25 a 30%. Nessas condições ocorria uma inversão na ordem de eluição (ácido nicotínico/trigonelina), interessante pelo fato do pico da trigonelina apresentar cauda, que não diminuía significativamente com alterações no pH ou com aumento/redução da polaridade da fase móvel, e do ácido nicotínico ser encontrado em menor proporção no café.

Entretanto, ainda havia dificuldade para se obter a separação dos compostos. Assim, estudou-se o emprego da coluna ODS-1, com menor taxa de recobrimento e não capeada, que apresentou melhor resolução entre ácido nicotínico e trigonelina. Analisou-se uma amostra real (café arábica) e observou-se que a trigonelina estava sendo co-eluída com outros compostos não identificados, e que variações no gradiente com acetonitrila não melhoravam a seletividade. Como não se resolveu a separação entre a trigonelina e os interferentes, optou-se pela mudança do modificador orgânico, trocando-se metanol por acetonitrila.

Quanto às condições de detecção, como a mudança de comprimento de onda (λ) eventualmente acarretava oscilações na linha de base e o λ de máxima absorvância de trigonelina, ácido nicotínico e cafeína são próximos, optou-se por detectar os três compostos a 272 nm e o 5-ACQ a 320 nm.

Portanto, as análises cromatográficas foram efetuadas empregando uma coluna Spherisorb ODS 1 (250 x 4,6 mm, 5 μ m, 80 Å de porosidade; Darmstadt, Alemanha), 6,2% de substituição, não capeada, acoplada a pré-coluna (C₁₈, 5 μ m). A fase móvel foi constituída por ácido acético/H₂O (5:95 v/v) (A) e acetonitrila (B), utilizando eluição gradiente de B para A: 0 min, 5%; 5 min, 5%; 10 min, 13%, com vazão de 0,7 mL/min. A detecção UV/Vis foi programada como segue: 0 a 15 min a 272 nm, 15 a 23 min a 320 nm e de 23 min até o final, 272 nm. As análises foram realizadas à temperatura ambiente (25 °C).

A Figura 1 apresenta o cromatograma de mistura padrão de ácido nicotínico, trigonelina, cafeína e 5-ACQ. Pode-se observar que a metodologia permite, ainda, separação e detecção simultânea dos ácidos caféico, ferúlico e cumárico. A determinação simultânea destes ácidos cinâmicos poderá vir a ser de interesse, uma vez que tem sido citado o emprego como possíveis discriminadores para espécie e grau de torra⁷.

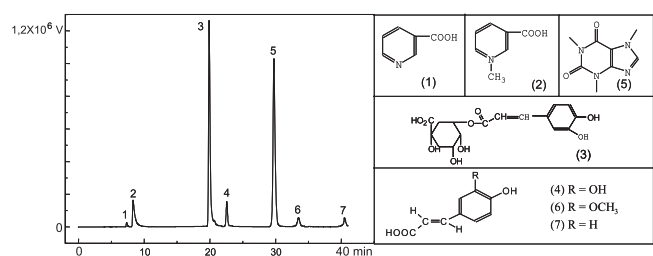


Figura 1. Cromatograma de mistura padrão de ácido nicotínico (1), trigonelina (2), 5-ACQ (3), ácido caféico (4), cafeína (5), ácido ferúlico (6) e ácido cumárico (7). Condições: Coluna Spherisorb ODS-1, 4,6 x 250 mm, 5 μ m. Fase móvel: gradiente de ácido acético/H₂O (5:95 v/v) (A) e MeCN (B), 0 a 5' – 5% B; 10' – 13% B, vazão: 0,7 mL/min. Detecção: 0 a 15' – 272 nm, 15' a 23' – 320 nm e, de 23' até o final, 272 nm

A eficiência da metodologia proposta na separação de ácido nicotínico, trigonelina, cafeína e 5-ACQ pode ser observada na

Figura 2, onde se verifica uma resolução satisfatória dos picos em um tempo de análise relativamente curto (~35 min) para extratos de café arábica, com torra clara (A) e escura (B), e café conilon com torra escura (C).

Os tempos médios de retenção para 15 injeções de mistura padrão ao longo de vários dias foram de $7,5 \pm 0,1$ min para ácido nicotínico, $8,3 \pm 0,2$ min para trigonelina, $20,2 \pm 0,4$ min para 5-ACQ e $30,6 \pm 0,5$ min para cafeína. Pode-se observar que a variabilidade dos tempos no método proposto foi pequena ($CV < 2\%$).

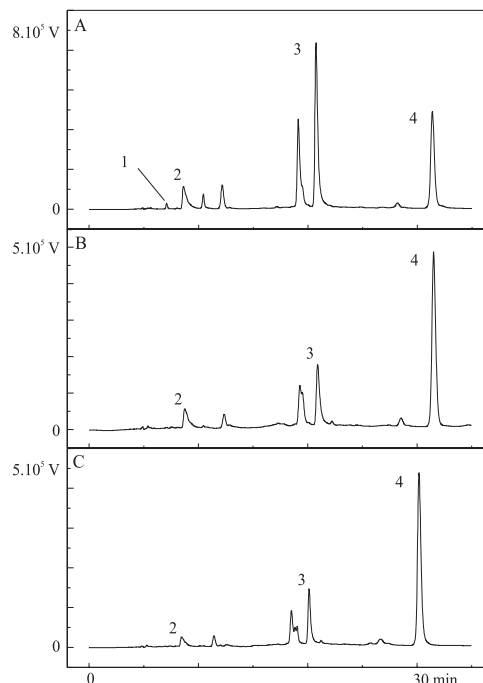


Figura 2. Cromatogramas dos extratos de amostra de café arábica com torra clara (A) e escura (B) e conilon com torra escura (C). Picos: ácido nicotínico (1), trigonelina (2), 5-ACQ (3) e cafeína (4). Condições: Coluna Spherisorb ODS-1, 4,6 x 250 mm, 5 μ m. Fase móvel: gradiente de ácido acético/H₂O (5:95 v/v) (A) e MeCN (B), 0 a 5' – 5% B; 10' – 13% B, vazão: 0,7 mL/min. Detecção: 0 a 15' – 272 nm, 15' a 23' – 320 nm e, de 23' até o final, 272 nm

Avaliação do método

As curvas de calibração mostraram-se lineares na faixa estudada e com alta correlação (R^2 acima de 0,99 para $p < 0,001$), em intervalos de concentração de 0,10 a 1,20 mg/L para ácido nicotínico, 1,00 a 12,0 mg/L para trigonelina, 0,20 a 22,0 mg/L para 5-ACQ e 10,0 a 25,0 mg/L para cafeína.

Quanto à precisão da metodologia, avaliando-se a repetibilidade entre 5 extrações consecutivas, observou-se que o maior CV foi correspondente ao ácido nicotínico (6,4%) que, devido a sensibilidade à torra, encontrava-se em concentrações mais baixas que os outros compostos nas amostras analisadas. Para os ensaios de repetibilidade intra e inter-dias (precisão intermediária), foram observados CV inferiores a 5% para todos os compostos (Tabela 1). Na literatura são relatados CV variando de 3 a 7% para cafeína, 3 a 6% para trigonelina e 3 a 5% para ácido clorogênico total, empregando-se diferentes metodologias para análise em cafés verde e instantâneo^{21,22}. Para café torrado são apresentados valores de repetibilidade de 1,3 e 1,1% para trigonelina e cafeína, respectivamente¹⁶.

Os ensaios para verificação da exatidão do método forneceram valores de 95, 103 e 104% para trigonelina, 5-ACQ e cafeína, respectivamente, indicando que a recuperação foi eficiente e dentro da faixa

Tabela 1. Coeficiente de variação em porcentagem (CV%)* para os ensaios de repetibilidade de ácido nicotínico, trigonelina, 5-ACQ e cafeína

Compostos	Entre extrações(%)	Intra-dia(%)	Inter-dia (%)
Ácido nicotínico	6,4	4,8	2,1
Trigonelina	4,4	1,5	3,7
5 - ACQ	3,3	0,7	4,1
Cafeína	2,2	1,7	3,9

*Correspondente a 15 análises.

citada na literatura. Para trabalhos que utilizaram condições de extração semelhantes são descritos valores de recuperação no café torrado de 99 a 103% para cafeína^{16,18} e 98% para trigonelina¹⁶. Nogueira *et al.*²⁴ relatam recuperação de 100, 91% e 98% para 5-ACQ, trigonelina e cafeína, e Chambel *et al.*¹⁹, valores entre 88 e 94% e 74 e 77% para 5-ACQ e cafeína. Para ácido nicotínico foi observada recuperação de 89%, mas não se encontrou dados na literatura para comparação.

Os limites de detecção e de quantificação do sistema cromatográfico para ácido nicotínico, trigonelina, 5-ACQ e cafeína foram calculados conforme descrito anteriormente. Como na literatura é citado apenas que h_s necessita ser de duas a dez vezes maior que h_n , optou-se por trabalhar com um valor correspondente a 10 vezes para trigonelina e ácido nicotínico, que apresentavam menor absorvidade e pior resolução, e, para os demais compostos, uma razão igual a 6.

Obteve-se LD de 0,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 5-ACQ e cafeína, e 0,15 e 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para trigonelina e ácido nicotínico, respectivamente. Na literatura são relatados, para café torrado, limites de 0,1 a 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cafeína e 0,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para trigonelina^{16,20}. Os limites de quantificação obtidos seriam, convertendo-se para massa de analito por massa de amostras de café, correspondentes a 0,012 g 100 g⁻¹, para 5-ACQ e cafeína, e 0,045 e 0,0028 g 100 g⁻¹ para trigonelina e ácido nicotínico, respectivamente. Esses valores são muito inferiores aos usualmente encontrados nas amostras comerciais, conforme pode ser verificado na discussão a seguir, demonstrando a sensibilidade do método.

Os teores dos compostos para algumas das amostras estudadas estão na Tabela 2, mostrando que o método foi eficiente para avaliação em diferentes espécies (arábica e conilon) e graus de torra.

Tabela 2. Teores* de ácido nicotínico, trigonelina, 5-ACQ e cafeína para cafés arábica e conilon em diferentes graus de torra

Tipo Torra	Arábica**		Conilon**
	Escura	Média	Clara
Ácido nicotínico	0,009 \pm 0,001	0,012 \pm 0,000	0,032 \pm 0,001
Trigonelina	0,297 \pm 0,009	0,489 \pm 0,006	0,683 \pm 0,011
5-ACQ	0,26 \pm 0,01	0,47 \pm 0,02	2,01 \pm 0,08
Cafeína	1,36 \pm 0,06	1,35 \pm 0,05	2,25 \pm 0,13

* g da substância por 100 g de amostra em base seca; ** média de duplicata \pm desvio padrão.

Para cafeína, que possui estabilidade à torra^{28,29}, foram observados valores de 1,35 a 2,25 g 100 g⁻¹, para café arábica e conilon, respectivamente (Tabela 2). Maiores teores de cafeína são sempre relatados para a espécie conilon. Daglia *et al.*¹¹ descreveram teores de 0,88 a 1,23 g 100 g⁻¹ de amostra para arábica e 1,57 a 2,20 g 100 g⁻¹ para conilon. A variação da cafeína em cafés torrados de diversos países, encontrada por Casal *et al.*⁹, foi de 1,21 a 1,61 g 100 g⁻¹ (arábica) e 2,08 a 2,68 g 100 g⁻¹ (conilon). Os mesmos autores¹⁵ relataram teor de 1,24 g 100 g⁻¹ para café arábica brasileiro. Monteiro e Trugo³⁰, estudando dez amostras de café comerciais do Brasil encontraram variação de 0,8 a 1,4 g 100 g⁻¹.

Para 5-ACQ, cujos teores variam em função da espécie e da torra^{28,31}, foram observados valores de 0,26 g 100 g⁻¹ para café arábica com torra escura a 2,01 g 100 g⁻¹ para conilon com torra clara (Tabela 2). Trugo e Macrae³¹ relataram teores de 0,1 a 1,21 g 100 g⁻¹ e 0,05 a 1,39 g 100 g⁻¹ para cafés arábica e conilon, respectivamente, torrados em diferentes graus. Daglia *et al.*¹¹, para amostras de diversas origens geográficas, obtiveram valores no intervalo de 0,14 (Costa Rica) a 2,17 g 100 g⁻¹ (Guatemala) para a espécie arábica. Para café arábica brasileiro, foi relatada menor variação: de 0,32 a 2,03 g 100 g⁻¹ de café. As concentrações para conilon variaram de 0,08 (Indonésia) a 3,04 g 100 g⁻¹ (Costa do Marfim). Monteiro e Trugo³⁰ relataram valores de 0,11 a 0,596 g 100 g⁻¹ para cafés brasileiros comerciais com graus de torra tradicional (média) a extra-forte.

Com relação à trigonelina, em que a concentração também é dependente da espécie e torra^{27,29}, obtiveram-se teores de 0,297 g 100 g⁻¹ para café arábica com torra escura a 0,683 g 100 g⁻¹ para conilon com torra clara (Tabela 2). Foram relatados para conilon variações de 0,632 até 0,097 g 100 g⁻¹ do café verde ao mais torrado, e para o café arábica, a variação nas mesmas condições foi de 0,89 a 0,049 g 100 g⁻¹. As concentrações determinadas por Daglia *et al.*¹¹ variaram de 0,531 a 0,990 g 100 g⁻¹ para arábica com torra correspondente a 13,5 % de perda de peso, e de 0,080 a 0,446 g 100 g⁻¹ para conilon de torra mais intensa (20% de perda de peso), para cafés de diversos países. Monteiro e Trugo³⁰ relatam valores de 0,2 a 0,5 g 100 g⁻¹ para cafés brasileiros com torra de média a extra-forte.

Para o ácido nicotínico, que tanto é formado quanto degradado durante a torra dependendo das condições de processo^{11,27,29}, foram obtidos teores de 0,009 g 100 g⁻¹ para café arábica com torra escura a 0,032 g 100 g⁻¹ para conilon com torra clara (Tabela 2). Para ácido nicotínico são, usualmente, relatadas concentrações mais baixas que para os outros compostos em estudo, principalmente em condições de torra mais severa. Casal *et al.*²⁹ relataram concentração de 0,017 e 0,013 g 100 g⁻¹ para cafés arábica e conilon em condições de torra com 22% de perda de peso. Daglia *et al.*¹¹ descreveram que o teor máximo de ácido nicotínico obtido para amostras com 20% de perda de peso foi de 0,02 g 100 g⁻¹, e para várias amostras não foi detectado ácido nicotínico nesse grau de torra.

CONCLUSÕES

A melhor condição para separação e quantificação simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, 5-ACQ e cafeína foi conseguida utilizando-se uma coluna de fase reversa Spherisorb ODS-1, empregando-se como fase móvel gradiente de ácido acético/H₂O (5:95 v/v) e MeCN e detecção no UV com comprimento de onda programável. A melhor condição de extração foi obtida utilizando-se solução de MeCN/H₂O (5:95 v/v) à 80 °C por 10 min. As curvas de calibração mostraram-se lineares na faixa estudada e observou-se adequada recuperação (de 90 a 105%) e repetibilidade. O limite de detecção dos compostos (0,01; 0,15; 0,04 e 0,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ácido nicotínico, trigonelina, 5-ACQ e cafeína, respectivamente) foi abaixo dos teores médios encontrados no café, permitindo a quantificação com segurança. O método foi testado com cafés arábica e conilon com diferentes graus de torra, mostrando-se eficiente e rápido (~35 min) e permitindo ainda a separação e identificação dos ácidos caféico, cumárico e ferúlico.

REFERÊNCIAS

- Carvalho, L. M.; Silva, E. A. M.; Azevedo, A. A.; Mosquim, P. R.; Cecon, P. R.; *Pesq. Agropec. Bras.* **2001**, *36*, 411.
- <http://www.conab.gov.br>, acessada em Novembro 2004.
- Bragança, S. M.; Carvalho, C. H. S.; Fonseca, A. F. A.; Ferrão, R. G.; *Pesq. Agropec. Bras.* **2001**, *36*, 765.
- Kemsley, E. K.; Ruault, S.; Wilson, R. H.; *Food Chem.* **1996**, *54*, 321.

5. Tzouros, N. E.; Arvanitoyannis, I. S.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2001**, *41*, 287.
6. Martín, M. J.; Pablos, F.; González, A. G.; *Talanta* **1998**, *46*, 1259.
7. Andrade, P. B.; Leitão, R.; Seabra, R. M.; Oliveira, M. B.; Ferreira, M. A.; *Food Chem.* **1998**, *61*, 511.
8. Carrera, F.; Leon-Camacho, M.; Pablos, F.; Gonzalez, A. G.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, *370*, 131; Ky, C.L.; Louarn, J.; Dussert, S.; Guyot, B.; Hamon, S.; Noirot, M.; *Food Chem.* **2001**, *75*, 223.
9. Casal, S.; Oliveira, M. B. P. P.; Alves, M. R.; Ferreira, M. A.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3420.
10. Daglia, M.; Papetti, A.; Gregotti, C.; Bertè, F.; Gazzani, G.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1449; Daglia, M.; Racchi, M.; Papetti, A.; Lanni, C.; Govoni, S.; Gazzani, G.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1700.
11. Daglia, M.; Cuzzoni, M. T.; Decano, C.; *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2273.
12. Bicchi, C. P.; Binello, A. E.; Pellegrino, G. M.; Vanni, A. C.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1549.
13. De Maria, C. A. B.; Moreira, R. F. A.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 586.
14. Trugo, L. C.; Macrae, R.; *Analyst* **1984**, *109*, 263.
15. Trugo, L. C.; Macrae, R.; Dick, J.; *J. Sci. Food Agric.* **1983**, *34*, 300.
16. Casal, S.; Oliveira, B.; Ferreira, M. A.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1998**, *21*, 3187.
17. Vitorino, M. D.; França, A. S.; Oliveira, L. S.; Borges, M. L.; *Revista Brasileira de Armazenamento* **2001**, *3*, 17.
18. Camargo, M. C. R.; Toledo, M. C. F.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **1998**, *18*, 421.
19. Chambel, P.; Oliveira, M. B.; Andrade, P. B.; Seabra, R. M.; Ferreira, M. A.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1997**, *20*, 2949.
20. Bispo, M. S.; Veloso, M. C. C.; Pinheiro, H. L. C.; Oliveira, R. F. S.; Reis, J.; Andrade, J. B.; *J. Chromatogr. Sci.* **2002**, *40*, 45.
21. Trugo, L. C.; De Maria, C. A. B.; Werneck, C. C.; *Food Chem.* **1991**, *42*, 81.
22. De Maria, C. A. B.; Trugo, L. C.; Moreira, R. F. A.; Petracco, M.; *Food Chem.* **1995**, *52*, 447.
23. De Maria, C. A. B.; Trugo, L. C.; Corá, G.; *Quim. Nova* **1996**, *19*, 350.
24. Nogueira, G. C.; Baggio, S. R.; Bragagnolo, N.; Moraes, R. M.; Mori, E. M.; *Anais do Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, Poços de Caldas, Brasil, 2000.
25. A.O.A.C.; *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th ed., Association of Official Analytical Chemists: Arlington, 2003, apêndice E.
26. Francotte, E.; Davatz, A.; Richert, R.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1996**, *686*, 77.
27. De Maria, C. A. B.; Moreira, R. F. A.; Trugo, L. C.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 209.
28. Moreira, R. F. A.; Trugo, L. C.; De Maria, C. A. B.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 195.
29. Casal, S.; Oliveira, B.; Ferreira, M. A.; *Food Chem.* **2000**, *68*, 481.
30. Monteiro, M. C.; Trugo, L. C.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 637.
31. Trugo, L. C.; Macrae, R.; *Food Chem.* **1984**, *15*, 219..