

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE CAVEOL EM CAFÉ TORRADO E MOÍDO

Rafael C. E. DIAS¹; Fernanda G. CAMPANHA¹; Marta T. BENASSI¹, E-mail: martatb@uel.br

¹Universidade Estadual de Londrina, Londrina

Resumo:

No Brasil, o maior produtor e exportador de café, tem se destacado atualmente o estudo sobre a qualidade do café e da relação café e saúde. Compõem a fração lipídica insaponificável do café os diterpenos caveol e cafestol, interessantes por apresentarem efeitos conhecidos na saúde humana, como a ação quimioprotetora, antioxidante e hipercolesterolêmica. Além disso, os diterpenos poderiam ser utilizados como ferramenta de identificação de espécies (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*), por estarem presentes em diferentes teores. O presente trabalho objetivou a validação de metodologia espectrofotométrica para determinação de caveol em café torrado e moído. Utilizou terc-butil metil éter para extração da matéria insaponificável, limpeza com água e reação colorimétrica com KI para detecção de caveol. Os ensaios de repetibilidade em diferentes extrações e intra-dia (para mesma extração) apresentaram CV abaixo de 5 %, mostrando boa precisão. A metodologia apresentou linearidade ($R^2=0,996$, $p\leq 0,05$) e limites de detecção e quantificação de 0,00258 mg/mL e 0,00861mg/mL, respectivamente. A metodologia foi aplicada com sucesso na quantificação de kahweol em café arábica, conilon e misturas.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, diterpeno, discriminação

SPECTROFOTOMETRIC METHOD VALIDATION FOR ANALYSIS OF KAHWEOL IN ROASTED AND GROUNDED COFFEE

Abstract:

Since Brazil is the major producing and exporting country of coffee, a lot of researches have been conducted about coffee quality and the relation between coffee and health. The diterpenes kahweol and cafestol, interesting compounds of unsaponifiable fraction of coffee, presented known effect in the human health, as anticarcinogenic and antioxidants properties, and hypercholesterolemic action. Moreover, the diterpenes could be used as a tool of species identification (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) because of the differences of their amounts. The present work objectified the validation of spectrophotometric methodology for determination of kahweol in roasted and grounded coffee. Terc-butyl methyl ether was used for the extraction of the unsaponifiable matter, clean up with water and colorimetric reaction with KI for kahweol detection. The repeatability in different extractions and in the same day (for same extraction) presented CV below 5 %, showing good precision. The methodology had linearity ($R^2=0,996$, $p\leq 0,05$) and the limits of detection and quantification were 0,00258 mg/mL and 0,00861mg/mL, respectively. The method was successfully applied in the quantification of kahweol in arabica coffee, conilon and blends.

Key words: *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, diterpene, discrimination.

Introdução

O café é um dos produtos agrícolas de maior importância na economia mundial e é uma das bebidas mais consumidas. O Brasil se destaca por ser o maior produtor e exportador de café do mundo. As culturas brasileiras baseiam-se nas espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (conilon) (ABIC, 2007). Grande parte das pesquisas desenvolvidas atualmente tem destacado a ação dos compostos da bebida café na saúde humana (Cavin et al., 1998; Kurzrock & Speer, 2001a e b; Poste et al., 2000; Boekschoten et al., 2003).

Uma das maiores preocupações atuais da cafeicultura nacional é tornar o produto brasileiro competitivo internacionalmente em nível de qualidade, uma vez que sua imagem positiva baseia-se apenas no aspecto econômico (Lopes, 2000; Assad et al., 2002). As espécies do gênero *Coffea* diferem consideravelmente no preço, qualidade e aceitabilidade. Os grãos apresentam cor, formato e tamanho diferenciados, porém, após a torra e moagem, não se distinguem as espécies visualmente e, como pertencem ao mesmo gênero, possuem poucas diferenças para detecção da adição de café conilon, de menor valor comercial, ao arábica.

O teor de matéria insaponificável (MI) no óleo de café é relativamente alto (9 a 13 %), comparado com outros óleos vegetais (em geral < 1 %). Na MI do café destacam-se cafestol e caveol, diterpênicos relatados como causadores da elevação do nível de colesterol humano e com ação de quimioproteção e antioxidante (Urgert et al., 1995; Cavin et al. 1998; Kurzrock & Speer, 2001a). Desta forma, áreas diversas vêm demonstrando interesse na quantificação dos diterpenos de café, como a Engenharia Genética: o estudo do genoma funcional do cafeeiro, relacionado a análise genômica e estudo da biossíntese destes compostos em espécies de *Coffea* poderia viabilizar a identificação dos principais genes que controlam o acúmulo de diterpenos em café.

Os diterpenos são relativamente estáveis a torra. O café arábica apresenta teores significativamente mais altos de diterpenos que o conilon, e caracteriza-se pelo alto teor de caveol. Desta forma, a adição de café conilon ao café arábica

tende a diminuir a quantidade de diterpenos, principalmente caveol. Foi verificado em trabalho prévio que o caveol poderia ser utilizado como ferramenta para diferenciação de espécies de café torrado em graus de torra variado (Dias, 2005).

Entre as técnicas utilizadas para determinação de caveol, destacam-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa (CG) (Pettitt et al., 1987; Urgert et al., 1995; Lercker et al., 1995; Castillo, et al., 1999; Kurzrock & Speer, 2001b; Araujo & Sandi, 2006) e, em um trabalho, foi citado o uso de Espectroscopia Raman (Rubayiza & Meurens, 2005). No entanto, deve-se considerar que essas metodologias são sofisticadas e caras e seria interessante o desenvolvimento de método mais simples e rápido.

Uma metodologia espectrofotométrica qualitativa tem sido desenvolvida para avaliação de caveol em café torrado (Alves *et al.*, 2003; Dias et al., 2005). É proposta extração a quente das amostras utilizando terc-butil metil éter e limpeza com água. Após reação colorimétrica com KI, mede-se a absorvância a 620 nm. A avaliação de cada etapa e testes de rusticidade definiram o procedimento de extração e avaliação dos diterpenos. A metodologia já foi empregada para café conilon e diferentes variedades de arábica, mostrando-se eficiente na identificação das espécies, sugerindo a possível utilização como método de triagem para adição de conilon ao arábica, como sugerido por Kemsley et al. (1995).

O presente trabalho objetivou a validação de metodologia espectrofotométrica para determinação de caveol em amostras de café torrado, avaliando-se linearidade, repetibilidade e sensibilidade.

Material e Métodos

Material

As amostras de café verde de origem conhecida foram obtidas junto ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), utilizando-se café arábica da variedade Iapar-59 e conilon. A torra foi feita em um torrador marca Rod-Bel (aquecimento a gás com capacidade para 300 g) com a temperatura variando de 190 a 230°C e tempo suficiente para atingir 17 % de perda de peso das amostras, denominado torra média. Após a torra e moagem, a uma granulometria de 500 nm (peneira ABNT 35), foi feita mistura das espécies na proporção 30 % de café conilon e 70 % de arábica para ensaio de recuperação.

Extração e Análise Espectrofotométrica

As amostras foram submetidas a saponificação com hidróxido de potássio, extração da MI com terc-butil metil éter e limpeza com água destilada. A reação colorimétrica da MI foi efetuada com adição de iodeto de potássio (KI) a partir do método desenvolvido por Alves *et al.* (2003) e Dias et al. (2005). Utilizou-se um espectrofotômetro UV-Visível GBC Cintra 20, com faixa de detecção de 190 a 1000 nm e abertura de fenda de 2 nm. Após reação, foi avaliada a absorvância a 620 nm (Figura 1).

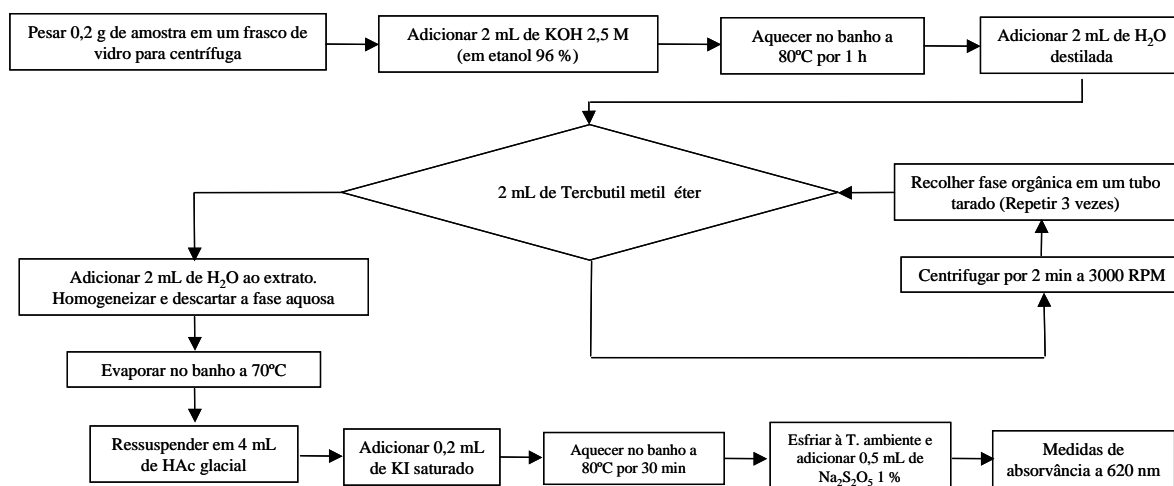


Figura 1: Condições propostas para extração das amostras de café.

Validação

Para a validação, foram seguidas as recomendações da AOAC (2003), estudando-se a linearidade, repetibilidade e sensibilidade, como sugere Ribani *et al.* (2004).

A linearidade do método foi determinada pela análise de misturas padrão em seis diferentes concentrações. Foi construída a curva analítica para obtenção do nível de significância (p) e de determinação (R^2).

Para verificação da precisão foi determinada a repetibilidade do método, alisando-se seis extrações diferentes (0,20 g) da mesma amostra, sujeitas às mesmas condições de extração e análise, no mesmo equipamento, no menor espaço de tempo possível (repetibilidade em diferentes extrações). Foi estudado também a repetibilidade intra-dia, avaliando-se a mesma extração da amostra (0,20 g) com cinco repetições ao longo do dia.

A determinação da sensibilidade do método foi realizada pelo cálculo do limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) (Equações 1 e 2).

$$LD = 3 s / S$$

Equação 1

$$LQ = 10 s / S$$

Equação 2

onde s é a estimativa do desvio-padrão do branco e S é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica (Ribani *et al.*, 2004).

Resultados e Discussão

Os resultados mostraram uma boa precisão do método (Tabela 1). Segundo o Boletim da Vigilância Sanitária (2002), níveis de coeficientes de variação aceitáveis para devem estar abaixo de 15 %. A média da concentração para amostra de café arábica torrado em nível intermediário foi de aproximadamente 485 mg de caveol / 100 g de amostra. Para amostra de café conilon não foi detectada a presença de caveol. Na literatura foram encontrados teores de caveol numa ampla faixa, principalmente devido às diferentes origens geográficas e espécies de café: menor que 10 mg/100 g de café conilon a 650 mg/100 g de café arábica. O menor nível encontrado para café arábica foi de 57,5 mg/100 g (Urgert *et al.*, 1995; Kurzrock & Speer, 2001a; Lago, 2001)

Tabela 1: Valores de desvio padrão (S) e coeficiente de variação em porcentagem (CV%) em ensaios de repetibilidade.

Precisão	S	CV%
Entre-extrações*	0,092	2,65
Intra-dia**	0,057	4,55

* Seis repetições; ** Cinco repetições

A faixa de concentração utilizada para a construção da curva de calibração foi de 0,05 a 0,35 mg de caveol/mL de solução antes da reação colorimétrica, correspondente a um valor máximo de 700 mg de caveol/100 g de amostra, estimativa extraída da literatura (Urgert *et al.*, 1995), e mínimo segundo estudo prévio que demonstrou que abaixo deste limite não é possível uma leitura segura da absorvância.

A curva de calibração (Equação 3) apresentou linearidade ($R^2 = 0,996$, $p \leq 0,05$) em uma faixa bastante ampla.

$$y = 1,6264x - 0,3278$$

Equação 3

onde y é a absorvância obtida experimentalmente e x a quantidade de caveol utilizada antes da ressuspensão em ácido acético glacial.

A partir da curva de calibração foi estimada a sensibilidade do método, observou-se valores de LD e LQ de 0,00258 mg/mL e 0,00861 mg/mL, respectivamente. Não foram encontrados dados na literatura para comparação.

A Figura 2 mostra os espectros correspondentes a leitura nas concentrações de padrão de caveol empregadas para elaboração da curva de calibração. Pode ser observado que o perfil do espectro, independente da concentração, é bastante característico na faixa de detecção do caveol (próximo a 620nm).

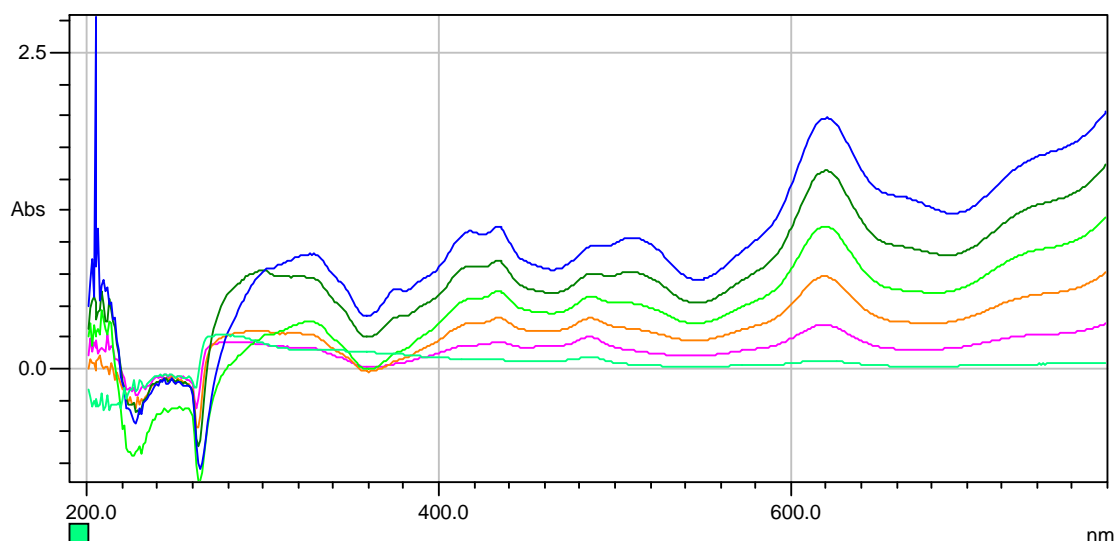


Figura 2: Espectrogramas correspondentes dados da curva de calibração para catecol. As cores correspondem às diferentes concentrações das soluções-padrão: azul – 0,35 mg/mL; verde escuro – 0,29; verde – 0,23; laranja – 0,17; rosa – 0,11; verde claro – 0,05 mg/mL.

A Figura 3 apresenta a curva espectral típica para uma amostra de café torrado de um blend com 30% de arábica e 70% de conilon, onde pode ser observada a presença de interferentes coloridos principalmente até o comprimento de onda de 400nm. Na região de interesse (próximo a 620 nm) não existe interferência, os espectros da amostra e padrão se assemelham (Figura 2 e 3), e, mesmo considerando-se a pequeno teor de arábica da mistura, o catecol pode ser facilmente detectado.

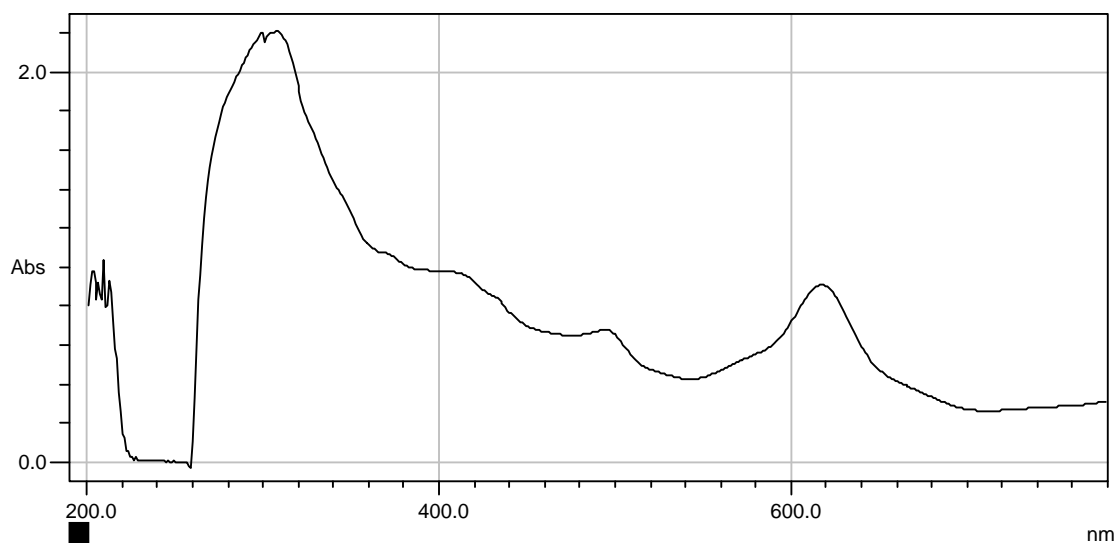


Figura 3: Espectrograma para amostra de mistura de café torrado 30 % arábica e 70 % de conilon. O pico a 620 nm é produzido pelo produto da reação colorimétrica entre catecol e iodeto de potássio.

Conclusões

A metodologia foi aplicada com sucesso na quantificação de catecol em café arábica, conilon e misturas. Apresentou boa precisão (CV abaixo de 5 %), linearidade ($R^2=0,996$, $p \leq 0,05$) numa ampla faixa de concentração e limites de detecção e quantificação de 0,00258 mg/mL e 0,00861 mg/mL, respectivamente.

Agradecimento

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CPB&D/Café) pelo financiamento da pesquisa (Subprojeto nº 19.2004.576.02).

Referências Bibliográficas

- ABIC - Associação Brasileira da Indústria de Café. Disponível em <http://www.abic.com.br>. Acesso em: 09 março 2007.
- ALVES, S. T.; SCHOLZ, M. B. D. S.; BENASSI, M. T. (2003) Desenvolvimento de metodologia espectrofotométrica para diferenciação de café torrado, *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. In: VIII ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, Curitiba, Anais...
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 15 março 2007.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. (1995) 16^a. ed. Washington: AOAC, cap. 30, p. 4-5.
- ARAÚJO, J.M.A; SANDI, D. (2006) Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry*, 101:1087-1094.
- ASSAD, E. D.; SANO, E. E.; DA CUNHA, S. A. R.; CORREA, T. B. S.; RODRIGUES, H. R. (2002) Identificação de impurezas e misturas em pó de café por meio de comportamento espectral e análise de imagens digitais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37: 211-216.
- BOEKSCHOTEM, M. V.; ENGBERINK, M. F.; KATAN, M. B.; SCHOUTEN, E. G. (2003) Reproducibility of the serum lipid response to coffee oil in healthy volunteers. *Nutrition Journal*, 2:1-8.
- BOLETIM 2002 DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA – Nº 040.02. Disponível em <http://www.sindusfarma.org.br>. Acesso em: 15 março 2007.
- CASTILLO, M. L. R.; HERRAIZ, M.; BLANCH, G. P. (1999) Rapid analysis of cholesterol-elevating compounds in coffee brews by off-line high performance liquid chromatography / high resolution gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47:1525-1529.
- CAVIN, C.; HOLZÄUSER, D.; CONSTABLE, A.; HUGGETT, A. C.; SCHILTER, B. (1998) The coffee-specific diterpenos cafestol and kahweol protect against aflatoxin B1-induced genotoxicity through a dual mechanism. *Carcinogenesis*,19:1369-1375.
- DIAS, R. C. E. Discriminação de espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) em diferentes graus de torra. 2005. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- DIAS, R. C. E.; SCHOLZ, M. B. S.; BENASSI, M. T. (2005) Otimização de método espectrofotométrico para discriminação de café arábica e conilon em diferentes graus de torra. In: 6^o Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, Anais... Campinas.
- KEMSLEY, E. K.; RUAULT, S.; WILSON R.H. (1995) Discrimination between *Coffea arabica* and *Coffea canephora* variant *robusta* beans using infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 54:321-326.
- LAGO, R. C. A. Lipídios em grãos. (2001) *Boletim do CEPA*, 19:319-340.
- LERCKER, G.; FREGA, N.; BOCCI, F.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T. (1995) High resolution gas chromatographic determination of diterpenic alcohols and sterols in coffee lipids. *Chromatographia*, 41:29-33.
- LOPES, L. M. V. (2000) Avaliação da qualidade de grãos de diferentes cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). 95 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- KURZROCK, T.; SPEER, K. (2001a) Diterpenes and diterpene esters in coffee. *Food Reviews International*, 17:433-450.
- KURZROCK, T.; SPEER, K. (2001b) Identification of kahweol fatty acid esters in arabica coffee by means of LC/MS. *Journal of Separation Science*, 24: 843-848.
- PETTITT, JR; BRUCE, C. (1987) Identification of the diterpene esters in arabica and canephora coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35:549-551.

POSTE, S. M.; ROOS, B.; VERMEULEN, M.; AFMAN, L.; JONG, M. C.; DAHLMANS, V. E. (2000) Cafestol increases serum cholesterol levels in apolipoprotein E*3-Leiden transgenic mice by suppression of bile acid synthesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 20:155-156.

RIBANI, M.; BATTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F.; MELO, L. F. C. (2004) Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27:771-780, 2004

RUBAYIZA, A. B.; MEURENS, M. (2005) Chemical discrimination of arabica and robusta coffees by Fourier Transform Raman Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:4654-4659.

URGERT, R.; VAN DER WEG, G.; KOSMEIJER-SCHUIL, T. G.; VAN DE BOVENKAMP, P.; HOVENIER, R.; KATAN, M.B. (1995) Levels of the cholesterol-elevating diterpenes cafestol and kahweol in various coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43:2167-2172.