UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Determinação de cafeína e identificação de adulterações no café
empregando a eletroforese capilar com detecção condutométrica sem
contato

Thiago Nogueira

Dissertação de Mestrado

Claudimir Lucio do Lago

ORIENTADOR

SÃO PAULO

Data do Depósito do Trabalho na SPG: 09/11/2006

(9 de Novembro de 2006)

SUMÁRIO

I. Agradecimentos

II. Resumo

III. Abstract

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO 1

1.1 História do café 1

1.2 Breve introdução à eletroforese capilar 4

1.2.1 O fluxo eletrosmótico 6

1.3 Modalidades mais utilizadas de CE 8

1.4 Estratégias de separação 8

1.4.1 Efeito do pH 8

1.4.2 Separações conduzidas contra-EOF 9

1.4.3 Efeito de aditivos 9

1.5 Sistemas de detecção 11

Capítulo 2 – OBJETIVOS 13

Capítulo 3 - DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA 14

3.1 Introdução 14

3.2 Experimental 18

3.2.1 Materiais e métodos 18

3.2.1.1 Preparo das amostras 18

3.2.1.2 Condicionamento do capilar de sílica 19

3.2.2 Condições para a determinação de cafeína 20

3.3 Resultados e discussão	22
3.4 Conclusões parciais	40
Capítulo 4 - SEPARAÇÃO DE CARBOIDRATOS	41
4.1 Introdução	41
4.2 Experimental	44
4.2.1 Materiais e métodos	44
4.2.2 Preparo das amostras	44
4.3 Resultados e discussão	45
4.3.1 Separação em meio alcalino	45
4.3.2 Adição de borato	51
4.3.3 Efeito dos modificadores orgânicos	54
4.4 Conclusões parciais	64
Capítulo 5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	65
IV – BIBLIOGRAFIA	68
V – CURRICULUM VITAE	

“Quando nada mais parece ajudar, eu vou e olho o cortador de pedras martelando sua rocha, talvez cem vezes, sem que uma só rachadura apareça. No entanto, na centésima primeira martelada, a pedra se abre em duas, e eu sei que não foi aquela a que conseguiu, mas todas as que vieram antes”.

Autor desconhecido

I. AGRADECIMENTOS

Dedico esta dissertação aos meus pais, Roberto e Vanda por todo o amor e dedicação e por tornarem possível essa caminhada.

Aos meus sobrinhos Arthur e Raúl, dois presentes
de Deus.

E à toda minha família.

À minha namorada Lúcia por todo o amor, carinho, compreensão, paciência e, sem dúvida, por toda força e incentivo durante esta etapa.

Ao professor Claudimir, não só pelo suporte, ensinamentos e idéias, mas também pela confiança, liberdade e palavras de incentivo durante todo o trabalho.

Valeu produção!!!

Aos professores Lúcio e Gutz, por todo o apoio e ensinamentos.

Aos professores Dosil e Eduardo pelo companheirismo e ensinamentos.

Aos amigos de laboratório André, Carlos, Caracol, Daniela, Escobar, Fabiana, Heron, João, Marcos, Minoru, Osmar, Pedro, Pimenta, Pop, Robson, Socorro, Wanderson e Willian.

Em especial aos amigos Blanes e Renata por toda ajuda e companheirismo.

Ao Fernando (O especialista), Marlene e Vinny por toda ajuda na solução de problemas, pela atenção e companheirismo.

Às grandes amigas Déa, Nina, Renata e Vá por todo incentivo, carinho, dedicação e por todo suporte durante todo esse tempo.

À todos da secretaria da pós-graduação, Cibeles, Emiliano, Milton e Marcelo por todo auxílio.

À Dona Maria e D. Miriam da copa, não pelas amostras de café, porque isso graças ao CNPq não foi necessário, mas pelos momentos “first coffee” e “last coffee”.

Aos demais amigos e funcionários do IQ-USP.

E claro ao CNPq e CAPES por todo o suporte financeiro durante esses anos.

II RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidas estratégias para a determinação de cafeína e detecção de adulterações no café, empregando a eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D). A estratégia desenvolvida para a separação da cafeína se baseia na complexação dinâmica do analito com o ânion do eletrólito de corrida, 3,4-dimetoxycinamato. Utilizou-se como eletrólito de corrida 20 mmol L⁻¹ de ácido 3,4-dimetoxycinâmico/Tris (pH 8,5). As separações foram conduzidas contra o fluxo eletrosmótico e o tempo de análise foi menor do que 5 minutos. Adicionalmente, o método se mostrou seletivo uma vez que análogos da cafeína (teobromina e teofilina) apresentaram tempo de migração diferenciado. O método proposto foi comparado com uma metodologia padrão (HPLC), apresentando resultados concordantes. O método foi aplicado para a determinação de cafeína em amostras de café convencional, solúvel e descafeinado. O limite de quantificação estimado para o método (0,33 mg/g) se mostrou suficientemente baixo, de forma a atender às exigências da legislação vigente. A identificação de adulterações no café provenientes da adição de outros materiais pode ser procedida utilizando como indicadores os teores totais de glicose e xilose obtidas por hidrólise controlada. Para promover a separação dessas espécies dos demais carboidratos presentes no café, varias estratégias foram avaliadas. As separações foram realizadas utilizando NaOH como eletrólito de corrida, de forma a possibilitar a ionização dessas espécies. O emprego de aditivos como metanol, acetonitrila e íons borato foram avaliados. A melhor condição obtida foi utilizando 80 mmol L⁻¹ de NaOH, 0,5 mmol L⁻¹ CTAB e 30% (v/v) de metanol. Os resultados mostraram que é possível identificar contaminações menores que aquelas consideradas como limites aceitáveis.

III ABSTRACT

In this work, methods based on capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection (CE-C⁴D) for the determination of caffeine in coffee as well as for the identification of its adulteration by addition of some other vegetal products were developed. Caffeine is a neutral species, and the proposed method was based on its mobilization by the formation of a complex with the anion 3,4-dimethoxycinnamate. The experiments were carried out in buffer Tris/3,4-dimethoxycinnamic acid (pH 8.5) and the migration of the complex was done counter the electroosmotic flow. The running time was less than 5 minutes. In addition, theobromine and theophylline (two caffeine analogues) were completely separated. The new method was compared to a standard method based on HPLC, and similar results were obtained. Samples of integral, soluble, and decaffeinated coffees were analyzed and the limit of quantification (0.33 mg/g) was low enough to fulfill the Brazilian norm. The proposed approach for the identification of adulteration was based on the controlled hydrolysis of xylan and starch present in some vegetable adulterants, followed by the analysis of the resulting xylose and glucose, which are the monosaccharides that compose, respectively, the two polysaccharides. Although the monosaccharides are neutral species in ordinary conditions, they form anionic species in high values of pH. The best separations were obtained in NaOH 80 mmol L⁻¹, CTAB 0.5 mmol L⁻¹, and methanol 30% (v/v). The results showed that it is possible to identify levels of contamination below tolerable limits.

1. INTRODUÇÃO

1.1 História do café

O café provém de uma árvore do gênero *Coffea* e, dentre as várias espécies conhecidas, as mais comercializadas são *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, sendo popularmente conhecidas como arábica e robusta, respectivamente. A planta de café é originária da Etiópia, centro da África, onde ainda hoje faz parte da vegetação natural. A Arábia foi responsável pela propagação da cultura do café. O nome “*café*” não é originário da Kaffa, local de origem da planta, e sim da palavra árabe qahwa, que significa vinho. Por esse motivo, o café era conhecido como “*vinho da Arábia*” quando chegou à Europa no século XIV (1, 2).

O hábito de tomar café foi desenvolvido na cultura árabe. No início, o café era conhecido apenas por suas propriedades estimulantes e a fruta era consumida fresca, sendo utilizada para alimentar e estimular os rebanhos durante viagens. Em 1000 d.C., os árabes começaram a preparar uma infusão com as frutas, fervendo-as em água. Somente no século XIV, o processo de torrefação foi desenvolvido e, finalmente, a bebida adquiriu um aspecto mais parecido com o dos dias de hoje (2).

O café chegou ao norte do Brasil, mais precisamente em Belém, em 1727, trazido da Guiana Francesa para o Brasil a pedido do governador do Maranhão e Grão Pará. Já naquela época, o café possuía grande valor comercial. Devido às nossas condições climáticas, o cultivo de café se espalhou rapidamente, com produção voltada para o mercado doméstico. Em sua trajetória pelo Brasil, o

café percorreu os estados do Maranhão, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Minas Gerais. Num espaço de tempo relativamente curto, o café passou de uma posição relativamente secundária para a de produto-base da economia brasileira, onde o desenvolvimento se deu com total independência, ou seja, apenas com recursos nacionais, sendo, afinal, a primeira realização exclusivamente brasileira que visou a produção de riquezas (1).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de café, sendo que o café arábica representa 74% do parque cafeeiro brasileiro, enquanto que o café robusta 26% (3). O estado de Minas Gerais é o líder e responsável por 49,5% da produção total de café cru, seguido pelo Espírito Santo com 21,3%, São Paulo com 10,8%, Paraná com 5,5%, Bahia com 5,4% e Rondônia com 4,5%. Os demais estados juntos produzem apenas cerca de 3% . Atualmente, são produzidas, mundialmente, 113 milhões de sacas de café por ano, sendo 36 milhões de origem brasileira, o que representa quase o dobro da soma do valor produzido pelo segundo e terceiro produtores mundiais, Vietnã e Colômbia. O café é a bebida mais consumida mundialmente, depois da água, e a sua importância econômica tem incentivado vários estudos, principalmente no que se refere à composição do grão e da bebida (4-8).

Conforme citado, o café comercializado é composto basicamente por grãos de café arábica ou robusta ou, da mistura "*blends*" de ambos, sendo, o arábica considerado o de melhor qualidade (9) e, conseqüentemente, o de maior valor econômico, sendo cerca de 20-25 % mais caro. Desta forma, abre-se um campo para o desenvolvimento de métodos para diferenciação dessas fontes de grãos uma vez que, após o processo de torrefação a discriminação visual não é possível, fazendo-se necessárias outras formas de diferenciação. A química analítica tem

desempenhado um papel de grande importância no desenvolvimento de metodologias para a identificação dos compostos presentes no café, onde, muitas vezes, aliada a ferramentas quimiométricas, fornecem um grande número de informações para um controle da qualidade dos alimentos (10). Muitos trabalhos na literatura relatam aplicações de técnicas analíticas para a determinação de ácidos clorogênicos, cafeína, trigonelina, compostos voláteis, metais etc, como forma de diferenciação dos tipos de grãos. A utilização de cafeína e trigonelina como indicadores do tipo de grão foram descritas por Casal e colaboradores (6), em que a técnica empregada foi HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência). Outro emprego de HPLC foi descrito por Bicchi e colaboradores (4) utilizando a composição dos ácidos clorogênicos como critério de diferenciação. Esteban-Díez e colaboradores (8), utilizando espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR), descreveram o emprego da técnica como forma de diferenciação baseada na avaliação de cafeína, ácidos clorogênicos e acidez total. A avaliação dos compostos voláteis também é empregada com esta finalidade, uma vez que, estes são os grandes responsáveis pelo aroma, “flavor”, do café, onde, o café arábica possui um aroma mais pronunciado e apreciável para o consumo, conferindo a este tipo de café uma característica sensorial superior à do café robusta. Carrera e colaboradores (5), utilizando GC (cromatografia gasosa), descreveram a aplicação desta técnica para a classificação do café baseada na determinação da fração esterólica dos lipídeos presentes no óleo do café.

Adicionalmente, informações sobre a origem do café são de grande relevância, uma vez que os cafés são classificados de acordo com a sua origem geográfica. Considerando que os tipos de solos empregados para o cultivo das plantações diferem em suas propriedades físico-químicas, a avaliação de macro e

micro-minerais presente nos grãos, é empregada, também, para extrair informações sobre a sua origem. As técnicas baseadas na espectroscopia de absorção e emissão atômica são, sem dúvidas, as mais utilizadas com esse propósito, sendo o ICP-AES a mais empregada, dada à possibilidade de determinação simultânea de muitas espécies. Santos e Oliveira (7), utilizando esta técnica, descreveram a possibilidade de identificação da origem dos cafés comercializados em alguns estados brasileiros. A classificação dos cafés, baseada na diferença da composição mineral, pôde ser utilizada como parâmetro indicativo de diferenças nos processos de industrialização e/ou de fatores que influenciam o cultivo da planta, como tipo de solo e a utilização de fertilizantes.

Recentemente, a atenção vem sendo voltada para a eletroforese capilar (*capillary electrophoresis* - CE) como uma nova e poderosa opção para a análise de uma extensa gama de compostos, geralmente iônicos ou ionizáveis. Em CE, separações mais rápidas podem ser executadas com boa seletividade, alta eficiência, sensibilidade suficiente para a maioria das aplicações e baixo consumo de amostra e reagentes. Sendo assim, o desenvolvimento de metodologias empregando a CE mostra-se como um campo bastante promissor para a determinação de espécies relevantes para a avaliação da qualidade do café.

1.2 Breve introdução à eletroforese capilar

Desde a introdução do primeiro equipamento comercial de CE, há pouco mais de 20 anos, aplicações da técnica têm se difundido. Hoje, a CE é uma técnica analítica reconhecidamente versátil que é utilizada com sucesso para a

separação de íons pequenos, de moléculas neutras e de biomoléculas grandes. A CE é empregada em diversos campos da ciência, tais como a química analítica, forense, clínica, orgânica, dos produtos naturais, na indústria farmacêutica, em separações quirais, biologia molecular, dentre outras áreas em que a CE é utilizada não somente como uma técnica de separação, mas também para responder às questões físico-químicas.

A vantagem da CE sobre GC, HPLC, TLC (cromatografia em camada delgada), e SGE (eletroforese em placa de gel) é a aplicabilidade para a separação de uma extensa gama de compostos utilizando o mesmo instrumento e, na maioria dos casos, a mesma coluna de separação, sendo necessária somente a mudança na composição do eletrólito de corrida. Esta versatilidade é uma característica importante e muitas vezes requerida em diversos campos da ciência e que não é encontrada em nenhuma outra técnica de separação. Adicionalmente, os resíduos gerados, geralmente um tampão aquoso ou, em alguns casos, com uma pequena quantidade de modificador orgânico, são da ordem de poucos mililitros e podem ser descartados sem gerar grande impacto ao meio ambiente. O mesmo não é válido para HPLC e TLC, onde uma grande quantidade de solventes orgânicos é gerada, ou ainda para GC, onde os compostos voláteis gerados, muitas vezes tóxicos, são liberados para o meio ambiente.

A eletroforese, como uma técnica analítica, foi descrita pela primeira vez por Tiselius em 1930 (11), em que foi relatada a separação de proteínas em plasma sangüíneo. Por este trabalho pioneiro, Tiselius foi premiado em 1948 com um prêmio Nobel.

Em 1967, Hjertén (12) demonstrou a possibilidade de conduzir separações eletroforéticas em tubos de vidro de 300 μm de diâmetro interno e

detecção dos compostos na região do UV, nomeando esta técnica de eletroforese em zona livre. Embora outros pesquisadores tenham relatado a utilização da eletroforese em tubos de vidro e Teflon (13-15), esta técnica não se tornou popular até 1981 quando Jorgenson e Lukacs (16) publicaram um trabalho, no qual demonstraram o alto poder de resolução da eletroforese capilar em zona (CZE).

Em CE, as separações são conduzidas em tubos com dimensões de 15 a 100 μm de diâmetro interno, e 50 a 100 cm de comprimento, preenchidos com um eletrólito condutor, e submetidos à ação de um campo elétrico. A utilização do capilar oferece muitas vantagens sobre os outros meios utilizados para eletroforese (placas de gel, papel, etc.). Pois, devido a fatores geométricos, a relação entre a área superficial interna e volume é apreciavelmente grande, possibilitando a dissipação eficiente do calor gerado pela passagem da corrente elétrica (efeito Joule) (17).

1.2.1 O fluxo eletrosmótico

Dentre os vários materiais utilizados na fabricação de capilares, a sílica fundida tem sido o material mais empregado, o que proporciona aos capilares dimensões precisas, alta constante dielétrica, baixa condutividade elétrica, alta condutividade térmica, resistência mecânica, maleabilidade etc. No entanto, a utilização de capilares de sílica é também responsável por um importante fenômeno em CE, o fluxo eletrosmótico (EOF) (18). A existência do fluxo se deve à dupla camada elétrica que se desenvolve na interface sílica/solução. Em pH acima de 3, ocorre a dissociação dos grupos silanóis superficiais (Si-OH) que constituem a

parede interna do capilar de sílica, conferindo à superfície interna um caráter negativo. Com isso, os cátions do eletrólito tendem a se aproximar da parede e, sob um campo elétrico, são atraídos para o cátodo, e, como estão solvatados arrastam o solvente, proporcionando o “bombeamento” de solução no interior do capilar. Desta forma, a movimentação dos íons dentro do capilar passa a depender não somente da sua própria mobilidade, mas também da mobilidade do EOF. O tempo em que as espécies levam para passar pelo detector (velocidade aparente) representa a somatória das velocidades efetiva e da velocidade do EOF.

Em condições normais (polaridade normal), o EOF ocorre do ânodo (pólo positivo) para o cátodo (pólo negativo). No entanto, quando desejado, o EOF pode ser reduzido, suprimido ou mesmo ter o sentido invertido.

A redução e/ou supressão do EOF é, na maioria dos casos, aplicada com o objetivo de reduzir a mobilidade aparente das espécies no interior do capilar, favorecendo, desta forma, a separação de espécies de mobilidades muito próximas. A redução e/ou supressão podem ser conseguidas apenas pela diminuição do pH ($\leq 3,0$), adição de solventes orgânicos ou aditivos para recobrir a parede interna do capilar, tais como, tensoativos catiônicos, álcool polivinílico, polímeros de celulose entre outros. A escolha adequada do tamanho do tensoativo, assim como da sua concentração, permite o controle direto da magnitude do EOF e mesmo a sua inversão (19). Esta estratégia de se adicionar um composto ao eletrólito para manipulação do EOF é chamada de desativação dinâmica. A utilização de capilares revestidos tem se tornado uma prática comum, na qual os grupos silanóis são bloqueados quimicamente pela reação com ligantes polares do tipo organosilanos (20).

1.3 Modalidades mais utilizadas de CE

O modo mais comum desta técnica é a eletroforese capilar em zona (CZE) ou, eletroforese capilar em solução livre (FSCE). Basicamente, a separação ocorre devido à migração diferenciada das espécies, onde, sob a ação de um campo elétrico, cada zona migra com velocidade característica da própria espécie. De uma maneira geral, esse modo é aplicado à separação de espécies iônicas ou facilmente ionizáveis.

Por esta razão, Terabe e colaboradores (21) introduziram uma nova versão da CE, a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC). Nesta modalidade, a separação é proporcionada pela associação diferenciada entre os diversos solutos neutros e uma fase micelar, em geral iônica.

1.4 Estratégias de separação

O comportamento da migração das espécies é definido pelo pH, tipo do tampão, força iônica, tipo e concentração do solvente orgânico e, adicionalmente, dos equilíbrios químicos estabelecidos, como troca iônica e complexação (22).

1.4.1 Efeito do pH

Quando a separação envolve solutos com caráter ácido-base, a mobilidade eletroforética do soluto depende do pH do eletrólito. Portanto, a

estratégia principal, e mais simples, é a modulação do pH. A variação do pH, além da influência sobre o EOF, exerce influência na ionização das espécies e, desta forma, favorece a diferenciação das mobilidades efetivas.

1.4.2 Separações conduzidas contra-Fluxo eletrosmótico

Como mencionado anteriormente, o EOF é desejável, dispensável, ou mesmo indesejável. Separações conduzidas em contra-EOF são propostas com o intuito de promover a resolução em linha de base para pares críticos. O objetivo desta estratégia é possibilitar um aumento do tempo de residência das espécies no interior do capilar, auxiliando, desta forma, na resolução de pares adjacentes, em especial de ânions moderadamente lentos.

1.4.3 Efeito de aditivos

A adição de compostos inorgânicos e/ou orgânicos ao eletrólito de corrida é comumente empregada de forma a melhorar a separação de pares críticos, a qual ocorre através de interações seletivas aditivo-soluto, diminuição do EOF, diferenciação na solvatação das espécies, etc.

Mudanças nas propriedades físico-químicas podem alterar drasticamente a seletividade e resolução dos compostos em CE como resultado da presença de um solvente orgânico no eletrólito de corrida, assim como mudanças nas propriedades ácido-base dos analitos, na viscosidade e constante dielétrica do

meio de separação (23). O quadro 1 apresenta alguns aditivos e/ou classes, comumente empregados em CE.

QUADRO 1 : Principais aditivos utilizados em CE.

ADITIVO	FUNÇÃO e/ou EFEITO
Éter coroa	Utilizados em separações quirais e como complexantes auxiliares na separação de metais.
Metais de transição	Modificam a mobilidade de certos solutos, auxiliando na resolução.
Polímeros de celulose	Utilizados como supressores do EOF.
Ciclodextrinas	Utilizados em separações quirais e como complexantes auxiliares na separação de solutos neutros ou iônicos.
Solventes orgânicos	Aumentam a solubilidade de solutos orgânicos. Reduzem a interação soluto-capilar. Agentes modificadores do EOF. Mudanças nas propriedades físico-químicas dos analitos e dos meios micelares
Tensoativos catiônicos	Utilizados como inversores do EOF
Borato	Complexa com os grupos OH^- de açúcares, conferindo uma carga efetiva a estas espécies.

1.5 Sistemas de detecção

O desenvolvimento de novos sistemas de detecção em CE tem sido uma área de intensa pesquisa desde a implementação da técnica. Onde, em geral, os mesmos tipos de detecção utilizados em cromatografia líquida são empregados. No entanto, a construção de detectores para CE, seu acoplamento com o capilar e sua manutenção são, todavia, mais trabalhosos que para a cromatografia líquida devido às dimensões reduzidas.

Os detectores podem ser classificados em dois tipos: os universais e os específicos. Os detectores universais medem a diferença entre alguma propriedade do soluto em relação à solução. Assim, o sinal não depende das propriedades do soluto, mas da diferença entre as propriedades do soluto e solução. Este modo de detecção é interessante para a determinação quando a separação das espécies é completa. Nesta classe estão incluídos os detectores de índice de refração e condutividade, entre outros que empregam métodos indiretos. Os detectores específicos medem uma propriedade específica do soluto, que não são semelhantes em todas as espécies. A detecção é, portanto, limitada aos solutos que possuem a referida propriedade. Um sistema de detecção seletivo é particularmente interessante quando a separação total das espécies presentes na amostra não ocorre. Nesta classe estão incluídos os fotodetectores baseados na absorção na região do UV/VIS, na fluorescência, ou no espalhamento Raman, os espectrômetros de massas, os detectores amperométricos e os radiométricos (18).

A detecção condutométrica tem demonstrado um grande potencial na análise de íons (13, 24), sendo amplamente utilizada em cromatografia de íons (IC).

Esse tipo de detecção é uma boa alternativa à detecção fotométrica, principalmente na análise de soluções de baixa concentração, quando a falta de sensibilidade é o principal obstáculo para a detecção indireta na região do UV. Por outro lado, a interferência do elevado campo elétrico para a separação dos analitos e os danos causados aos pequenos eletrodos expostos às amostras podem gerar problemas adicionais.

Fracassi da Silva e do Lago (25) e Zemmann e colaboradores (26) demonstraram, quase que simultaneamente e totalmente independentes, a possibilidade da detecção condutométrica sem contato dos eletrodos com a solução. Nesse tipo de detecção o aumento da frequência do sinal durante as medidas de condutividade (oscilometria) possibilita a instalação dos eletrodos fora do capilar, superando os problemas de interferência. A detecção condutométrica sem contato (capacitively coupled contactless conductivity detection – C⁴D) é proporcionada através do acoplamento dos dois eletrodos, em forma de anel, em torno do revestimento externo de poliimida do capilar de sílica fundida. A resposta do detector é devida, essencialmente, às diferenças de condutividade entre o eletrólito e o analito, ou seja, a detecção é baseada na substituição do co-íon presente no eletrólito pelo analito. Nos casos em que o analito apresenta maior mobilidade que o co-íon do eletrólito ocorre um aumento da condutividade nessa região, o qual é registrado como um sinal positivo. Por outro lado, quando o co-íon apresenta maior mobilidade que o analito, o pico é registrado como um sinal negativo, portanto, quanto maior a diferença entre as mobilidades, maior a sensibilidade obtida.

A CE-C⁴D destaca-se pela simplicidade em relação ao instrumental utilizado quando comparado aos métodos com detecção óptica, que dependem de lâmpadas, monocromadores e fotocélulas.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é desenvolver metodologias para permitir a caracterização de café em pó e solúvel através de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato. Estas metodologias deveriam permitir avaliar o conteúdo de cafeína inclusive em produtos descafeinados e de carboidratos que permitam identificar possíveis contaminações e fraudes.

3 DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA

3.1 Introdução

Dentre os componentes do café, a cafeína sempre recebeu maior atenção devido às suas propriedades fisiológicas e farmacológicas, principalmente em relação ao seu uso como estimulante. A cafeína é uma espécie neutra, conforme pode se verificar na Figura 1, em uma ampla faixa de pH.

FIGURA 1: Estrutura da molécula de cafeína.

Portanto, a sua migração no interior do tubo capilar é conduzida exclusivamente pela mobilidade do fluxo eletrosmótico. Desta forma, a cafeína não é separada das demais espécies neutras presentes na matriz da amostra.

O desenvolvimento de metodologias utilizando a eletroforese capilar de zona (CZE) com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta para determinação de cafeína tem sido relatado na literatura para aplicações em diferentes amostras como medicamentos, chocolates, refrigerantes, chás e café (27-33). No entanto, uma peculiaridade dos métodos propostos é a impossibilidade da separação de cafeína das demais espécies neutras presentes na matriz da amostra.

Desta forma, o desenvolvimento de metodologias utilizando a eletroforese capilar em meio micelar (MEKC) tem sido reportado para diferentes aplicações (34-40), em que a separação da cafeína das demais espécies presentes na amostra ocorre devido às diferenças dos coeficientes de partição com a fase polar (fase aquosa) e com a fase micelar. Um fato observado nesse modo de CE com detecção no UV é a formação de um pico “duplo” (splitting) de cafeína. Segundo Pomilio (35) e colaboradores, o aparecimento desse pico é devido às estruturas de ressonância apresentarem-se com características de uma espécie zwitteriônica.

Outras modalidades de CE têm sido propostas para a determinação de cafeína, dentre elas a CE em meio de microemulsão (MEEKC), a qual é empregada para a separação de cafeína de um grande número de compostos fenólicos com uma melhor resolução em linha de base do que por MEKC (41). A utilização de nanotubos de carbono também foi relatada na literatura, onde esses materiais desempenham o papel da fase estacionária em uma modalidade que foi descrita como “pseudo eletrocromatografia capilar” (42).

Fracassi da Silva e do Lago (43) e Carvalho (44) relataram a aplicação da CE no modo MEKC para a determinação de álcoois alifáticos, demonstrando a possibilidade de detecção condutométrica sem contato de espécies não iônicas. No entanto, o mecanismo pelo qual ocorre a detecção condutométrica em MEKC não é ainda bem compreendido, pois vários fenômenos contribuem para o comportamento da condutividade na região dos analitos. Com isso, o desenvolvimento de uma metodologia baseada na complexação da cafeína, conferindo a esta espécie uma mobilidade efetiva, surge como uma estratégia para a determinação de cafeína por CZE-C⁴D.

Doenças como osteoporose, problemas nos processos de absorção, excreção e reabsorção de metais no intestino e rins e anemia causada pela deficiência em ferro podem ser ocasionados pelo consumo excessivo de cafeína (45). Para compreender melhor esta associação entre cafeína e estes distúrbios, Kolayli e colaboradores (46) determinaram as constantes de complexação para alguns metais e a cafeína. Uma possibilidade de proporcionar a migração diferenciada da cafeína em CE seria, portanto, a complexação dessa espécie com um metal, conferindo a ela um caráter catiônico e, portanto, uma mobilidade maior que a mobilidade do EOF.

Uma outra alternativa é a de conferir à cafeína uma carga efetiva através da formação de um complexo com caráter aniônico. A formação de um complexo com o ânion clorogenato foi descrita pela primeira vez no início do século passado por Gorter (47). Horman e Viani (48) posteriormente demonstraram que a cafeína também complexa com análogos do ânion clorogenato, como o ânion cafeato e 3,4-dimetoxycinamato. Desta forma, o desenvolvimento de metodologias baseadas na formação do complexo cafeína-cafeato ou cafeína-3,4-dimetoxycinamato, em que o complexo possui uma carga efetiva negativa, apresenta-se como uma estratégia para a determinação de cafeína por CZE- C^4D . A Figura 2 ilustra a estrutura proposta para o complexo formado entre a cafeína e o ânion clorogenato, originando uma espécie passível de ionização e capaz de ser analisada por CZE.

Ácido clorogênico

Cafeína

FIGURA 2: Estrutura proposta do complexo cafeína-clorogenato.

3.2 Experimental

3.2.1 Materiais e métodos

Cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina), teofilina (1,3-dimetilxantina) e ácido cafêico foram adquiridos da SIGMA (St Louis, USA). Tris-hidroximetil-aminometano e ácido 3,4-dimetoxicinâmico foram adquiridos da ALDRICH (Steinheim, Germany). Metanol e hidróxido de sódio foram adquiridos da MERCK (Darmstadt, Germany) e diclorometano da SYNTH (Diadema, Brasil). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções padrão e amostras foram preparadas utilizando-se água deionizada, com resistividade maior ou igual a 18 MΩ (NANOpure UV, Barnsted, Dubuque, USA).

3.2.1.1 Preparo das amostras

As amostras de café foram adquiridas no comércio local. Todas as amostras de café solúvel foram previamente homogeneizadas utilizando-se almofariz e pistilo de porcelana.

As amostras de café solúvel foram preparadas a partir da solubilização de 0,4 g de café solúvel em 10 mL de água deionizada a 90 °C durante 10 minutos. As soluções foram centrifugadas (Force 7 Microcentrifuge, Denver Instrument, Arvada, USA) durante 10 min a 10.000 rpm e filtradas em membrana millipore® 0,22 µm de poro e mantidas para análise.

As amostras de café convencional foram preparadas a partir da extração com água a 90 °C durante 10 minutos de cerca de 1 g de material. As

soluções foram filtradas em papel, centrifugadas e filtradas em membrana millipore® 0,22 µm de poro e mantidas para análise.

As amostras de café solúvel descafeinado foram preparadas a partir da solubilização de 0,3 g de café em 10 mL de água a 90 °C, e posterior extração, adaptada da metodologia proposta por Ashoor e colaboradores (49). O pH da solução foi ajustado até 10 com solução de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹. A solução foi então transferida para um funil de separação e extraída utilizando 20 mL de diclorometano (3 vezes). A solução foi então evaporada à temperatura ambiente e o material residual ressuspendido em 1 mL de água e filtradas em membrana millipore® 0,22 µm de poro.

Para o ensaio de recuperação da extração, foi adicionada uma massa conhecida de cafeína (0,1 mg) no início da preparação das amostras. Para se evitar erros provenientes da etapa de pesagem, adicionou-se 100 µL de solução aquosa de cafeína 1 g L⁻¹.

3.2.1.2 Condicionamento do capilar de sílica

O capilar foi condicionado antes de cada ciclo de análises com fluxo constante de solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ por 15 minutos e, pelo mesmo período, com água deionizada e eletrólito de corrida. Posteriormente aplicou-se a alta tensão até a estabilização da linha base.

Todas as análises foram realizadas em um equipamento de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato construído em nosso laboratório (25), Figura 3. Os experimentos foram realizados com o detector

operando em 600 kHz e 2,0 V_{pp}. A temperatura no interior do equipamento foi mantida em aproximadamente 25 °C.

FIGURA 3 : Equipamento de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato construído em nosso laboratório.

3.2.2 Condições para a determinação de cafeína

Condição 1

Utilizou-se como eletrólito de corrida 30 mmol L⁻¹ de ácido cafêico dissolvido em metanol 10 % em água (v/v), ajustando o pH com Tris-hidroximetilaminometano (Tris) para pH 8,0. Utilizou-se um capilar de sílica fundida de 75 µm d.i. x 50 cm comprimento total (40 cm até o detector).

Condição 2

Utilizou-se como eletrólito de corrida 20 mmol L⁻¹ de ácido 3,4-dimetoxicinâmico, ajustando o pH com Tris para pH 8,5. Utilizou-se um capilar de sílica fundida de 75 µm d.i. x 60 cm comprimento total (50 cm até o detector).

As quantificações nas amostras foram realizadas por comparação da área do pico da amostra com a área do pico do padrão de cafeína.

Como parte do processo de validação foi avaliado os seguintes parâmetros,

- ✓ Linearidade,
- ✓ Limite de Detecção (*LD*) e Limite de Quantificação (*LQ*). O *LD* foi estimado como sendo,

$$LD = 3,3 \left(\frac{s}{S} \right)$$

onde, *s* é a estimativa do desvio padrão do sinal analítico do branco e *S* é a inclinação da curva analítica. O *LQ* foi estimado como sendo,

$$LQ = 10 \left(\frac{s}{S} \right)$$

- ✓ A reprodutibilidade do método foi avaliada baseada no Coeficiente de Variação (CV) da quantidade de cafeína encontrada no café para 3 diferentes dias.

- ✓ A precisão instrumental foi avaliada baseada no (CV) dos valores de área e tempo de migração do padrão e amostra.

- ✓ A exatidão do método foi avaliada baseada na recuperação de cafeína em dois níveis de concentração, bem como pela comparação com uma

metodologia de referência. A cromatografia líquida de alta eficiência foi a técnica escolhida. Utilizou-se metodologia descrita na literatura por Trugo e colaboradores (50), utilizando coluna reversa C-18 em cromatógrafo líquido (LC-10AD, Shimadzu, Kyoto, Japan). Foi utilizada fase móvel constituída de água:metanol (60:40, v/v) e comprimento de onda de detecção em 272 nm. As análises foram realizadas em sistema isocrático com vazão de 0,9 mL min⁻¹. A quantificação foi obtida por comparação da área do pico da amostra com a área do pico do padrão de cafeína.

Todos os dados foram tratados utilizando-se o programa computacional Microcal Origin 5.0 (Microcal software, Northampton, USA).

3.3 Resultados e discussão

A formação de um complexo entre a cafeína e íons metálicos, apesar de ser uma proposta bastante interessante, não apresentou sucesso como forma de separação da cafeína. Os baixos valores das constantes de associação (cafeína-íon metálico) desfavorecem a formação de um complexo com uma mobilidade eletroforética efetiva superior à mobilidade do EOF. Foram avaliados os cátions Zn²⁺ e Ca²⁺. Os valores das constantes de associação da cafeína e alguns íons metálicos são apresentados no Quadro 2.

QUADRO 2 : Valores das constantes de associação do íon metálico com a cafeína e com EDTA*.

Íon metálico	Cafeína	EDTA
Cálcio	29,6	$5,01 \times 10^{10}$
Magnésio	22,4	$4,90 \times 10^{10}$
Ferro (II)	59	$2,14 \times 10^{10}$
Zinco	396	$3,16 \times 10^{10}$
Crômio	592	-
Chumbo	55	$1,10 \times 10^{10}$
Cobalto	83	$2,04 \times 10^{10}$
Manganês	9,3	$1,10 \times 10^{10}$

*Valores retirados da Referência (46).

Para a estratégia envolvendo a complexação com os análogos do ácido clorogênico, foi necessário escolher o cátion para a composição do tampão. Conforme foi citado, a cafeína é uma espécie neutra no intervalo de pH comumente utilizado em eletrólitos de corrida para CE. Portanto, o valor de pH não exerce influência na mobilidade efetiva da cafeína. A escolha do cátion para o eletrólito, que tinha inicialmente o ânion cafeato como o complexante, teve como motivação a necessidade de um cátion que tivesse capacidade tamponante em meio levemente alcalino, de forma a favorecer a solubilização do ácido cafêico. O composto Tris foi escolhido devido à baixa mobilidade da espécie protonada, pois, em geral, uma baixa mobilidade do contra íon é requerida de forma a reduzir a condutividade do eletrólito de corrida, proporcionando uma melhor estabilidade da linha base e, conseqüentemente, um aumento da relação sinal-ruído.

Conforme esperado, a complexação da cafeína com o ânion cafeato ocorre no interior do capilar, possibilitando assim sua migração diferenciada. O complexo cafeína-cafeato tem característica de uma espécie aniônica e, portanto, quando utilizada polaridade normal, ou seja, o potencial positivo é aplicado na extremidade de introdução da amostra, a separação do complexo é conduzida em

contra-EOF. Optou-se pela não inversão do fluxo, pois, segundo Horman e Viani (48) a formação do complexo é proporcionada apenas por interações hidrofóbicas. Dessa forma, a utilização de surfactantes catiônicos poderia acarretar a redução da associação das espécies de interesse.

A formação do complexo ocorre de forma dinâmica, e, portanto, sob ação de um campo elétrico os íons cafeato ao migrarem para o ânodo “arrastam” as moléculas de cafeína, separando esta zona das demais espécies neutras. Então, o sinal correspondente ao complexo formado aparece após o pico correspondente ao EOF (ou pico da água) e é registrado como um pico negativo, Figura 4, o que é explicado pela baixa mobilidade do complexo cafeína-cafeato quando comparado com o ânion cafeato livre.

FIGURA 4: Eletroferograma do padrão de cafeína ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) obtido utilizando 30 mmol L^{-1} de ácido cafêico/Tris ($\text{pH} = 8$), potencial $+17 \text{ kV}$, inj.30 s (10 cm de coluna d'agua), capilar de $75 \text{ }\mu\text{m}$ d.i. x 50 cm comprimento total.

A utilização do eletrólito contendo o ânion cafeato apresentou resultados satisfatórios com relação à possibilidade da separação da cafeína das demais espécies neutras presente na amostra devido à formação do complexo cafeína-cafeato. No entanto, a utilização do cafeato como o ânion do eletrólito para o desenvolvimento de uma metodologia para a determinação de cafeína por CZE não é de fato vantajoso, devido a fatores limitantes como a instabilidade do cafeato em pH levemente alcalino, devido à presença de um grupo catecol e, sem dúvida, pelo elevado custo do ácido cafêico.

Sendo assim, a utilização de outro análogo do ácido clorogênico, o ácido 3,4-dimetoxicinâmico, foi então avaliada. A Figura 5 apresenta as estruturas químicas dos ácidos de interesse. A utilização do 3,4-dimetoxicinamato como ânion do eletrólito apresentou vantagens quando comparado ao cafeato não somente quanto à estabilidade da solução e reduzido custo, mas também no que se refere a complexação com a cafeína, devido ao seu maior valor da constante de associação. O Quadro 3 apresenta os valores das constantes de associação da cafeína com o clorogenato e análogos.

QUADRO 3 : Valores das constantes de associação da cafeína com alguns ânions de interesse.*

Espécie	Constante de associação
Clorogenato	16,9
3,4-dimetoxicinamato	15,7
Cafeato	12,2
m-coumarato	10,4
Cinamato	4,8

*Valores retirados da referência (48).

A Figura 6 apresenta um eletroferograma para a separação de padrão cafeína utilizando-se o 3,4-dimetoxicinamato como ânion do eletrólito.

FIGURA 6: Eletroferograma do padrão de cafeína ($0,3 \text{ g L}^{-1}$) obtido utilizando 20 mmol L^{-1} de ácido 3,4-dimetoxicinâmico/Tris (pH 8,5), +25 kV, 30 s, capilar de $75 \mu\text{m}$ d.i. x 60 cm comprimento total.

O método proposto foi avaliado quanto à possibilidade de separação de análogos da cafeína. Para isso, utilizou-se padrões de teobromina e teofilina. Devido ao fato dessas espécies apresentarem dois grupos ionizáveis ($\text{pK}_{\text{a}1} = 1,0$ e $\text{pK}_{\text{a}2} = 10,0$) e ($\text{pK}_{\text{a}1} = 8,77$ e $\text{pK}_{\text{a}2} = 11,5$) (34), respectivamente, esses compostos encontram-se na forma aniônica em meio levemente alcalino. A Figura 7 ilustra a estrutura dessas metilxantinas. A complexação do 3,4-dimetoxicinamato com essas espécies foi observada. No entanto, em $\text{pH} < 8,5$ ocorre a co-migração da cafeína e da teofilina, devido à teofilina encontrar-se na forma protonada. Em $\text{pH} \geq 8,5$, a teofilina apresenta um grupo carregado negativamente e, com isso, as respectivas mobilidades dos complexos formados com o 3,4-dimetoxicinamato diferem da mobilidade do complexo formado com a cafeína. A Figura 8 apresenta o

eletroferograma obtido para a separação dessas espécies.

FIGURA 8 : Eletroferograma dos A) padrões de teobromina e cafeína ($0,2 \text{ g L}^{-1}$) e teofilina ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) e B) I - solução de café solúvel (dil 1:5), II- amostra fortificada com padrão de teobromina, cafeína e teofilina. Utilizando as mesmas condições da figura 6.

Precisão

A avaliação da precisão instrumental foi baseada na análise de cinco injeções consecutivas de um mesmo padrão de cafeína e de cinco injeções consecutivas de uma amostra de café. A Figura 9 apresenta os eletroferogramas obtidos. Os valores do coeficiente de variação (CV) de tempo de migração e área do pico apresentaram valores menores que 0,18% e 1,1%, respectivamente. Esses resultados indicam uma boa precisão instrumental. Os valores de CV são apresentados na Tabela 1.

FIGURA 9: Eletroferogramas de cinco injeções consecutivas de A) padrão de cafeína ($0,3 \text{ g L}^{-1}$), B) amostra de café (diluição 1:5). Utilizando as mesmas condições da figura 6.

TABELA 1 Valores dos Coeficientes de Variação de tempo de migração e área de padrão de cafeína e amostra, (n = 5).

	Tempo de migração % CV	Área do pico % CV
Padrão de Cafeína	0,18	0,84
Amostra	0,16	1,1

A precisão intermediária do método foi avaliada com base no CV dos valores de cafeína encontrados. O valor do CV foi de 3,7 %, para determinações em 3 diferentes dias da amostra 1. A Tabela 2 apresenta os valores da quantidade de cafeína encontrada.

TABELA 1 : Valores da concentração de cafeína determinada no café em 3 diferentes dias.

Amostra	Concentração de cafeína (mg/g de café) ^a	% CV ^b
Amostra 1	31,2	1,2
Amostra 1	32,6	0,8
Amostra 1	30,3	0,5

^a Valor médio para 3 determinações consecutivas

^b Coeficiente de variação para 3 determinações consecutivas

Exatidão

Os valores de recuperação de cafeína apresentaram valores superiores a 90% para a maioria das amostras. A Tabela 3 apresenta os valores de

recuperação obtidos para testes em dois níveis de concentração. Os valores expressos na tabela abaixo representam a média dos valores recuperados de quatro diferentes marcas de café solúvel e de duas diferentes marcas de café convencional.

TABELA 2 : Valores recuperados de cafeína em café solúvel e convencional.

Amostra	Concentração adicionada (mg L ⁻¹)	Recuperação* %	Concentração adicionada (mg L ⁻¹)	Recuperação* %
Café solúvel	50	98 (6)	100	101(8)
Café convencional	50	101 (4)	100	99(9)

*Valores do Coeficiente de Variação expressos entre parênteses.

O método proposto foi aplicado para quantificação de cafeína em diferentes amostras de café. A construção de uma curva analítica foi feita correlacionando as áreas obtidas com as concentrações, sendo o coeficiente de correlação obtido maior que 0,99. A Figura 10 apresenta uma curva analítica típica para a quantificação de cafeína. Os limites instrumentais de detecção foram estimados em 0,033 g L⁻¹ e o de quantificação em 0,1 g L⁻¹.

FIGURA 10 : Curva analítica dos padrões de cafeína. Concentrações de 0,1 – 0,5 g L⁻¹ do composto.

Como forma de avaliar a exatidão do método proposto, foram realizadas determinações por CZE e HPLC para um grande número de amostras. A Figura 11 apresenta alguns eletroferogramas para a separação de cafeína em amostras de café. Os valores obtidos pelo método proposto apresentaram valores concordantes com os valores obtidos pelo método de referência, para um intervalo de 95% de confiança. A Tabela 4 apresenta os valores da concentração de cafeína em diferentes amostras de café e os valores de concentração obtidos pela determinação por HPLC. A Figura 12 mostra dois cromatogramas típicos para a separação de cafeína em café solúvel e convencional por HPLC.

FIGURA 11 : Eletroferogramas para a separação de cafeína em amostras de café (a-d) solúvel e (e-f) convencional.

TABELA 3 : Valores da concentração de cafeína presente em diferentes amostras de café.

Amostra	Concentração de cafeína (mg/g de café)	Valor de referência (mg/g de café)*	Tipo
Amostra 1	31,5 ± 0,9	31,53 ± 0,06	solúvel
Amostra 2	33,1 ± 0,4	33,62 ± 0,06	solúvel
Amostra 3	33,0 ± 1,6	33,40 ± 0,02	solúvel
Amostra 4	29,5 ± 0,7	30,02 ± 0,03	solúvel
Amostra 5	12,7 ± 0,8	12,51 ± 0,08	convencional
Amostra 6	14,2 ± 0,5	14,47 ± 0,07	convencional

Valores expressos em intervalo de 95% de confiança, n = 3.

*Valores obtidos por HPLC.

Os valores dos limites de detecção do método foram estimados em 0,33 e 0,83 (mg de cafeína / g de café) para o café convencional e solúvel, respectivamente. Segundo Portaria nº 377, de 26 de abril de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), o produto descafeinado deve conter no máximo 1 mg de cafeína / g de café. Para se atingir os limites estipulados pela legislação foi necessária a extração de cafeína do café descafeinado.

Industrialmente, a descafeinação é realizada nos grãos crus inteiros, antes do processo de torrefação. A maioria dos métodos existentes utiliza solventes para extração de cafeína, como diclorometano, clorofórmio, álcool, acetona, água e

outros (51), sendo o diclorometano o mais utilizado no Brasil. A extração de cafeína utilizando solventes pode ser realizada de duas formas. A primeira utiliza a extração direta dos grãos pelo solvente. A segunda, a água é utilizada como fase extratora, e, em seguida a cafeína é extraída da fase aquosa utilizando-se um solvente orgânico, onde, uma das funções da água é separar a cafeína associada ao ácido clorogênico e permitir que o solvente tenha acesso à cafeína, além de facilitar sua saída pela parede celular do grão (52).

A tentativa de extrair a cafeína utilizando um solvente diretamente da massa de café solúvel descafeinado não apresentou resultados satisfatórios. Foram utilizados os solventes acetato de etila e diclorometano. A extração utilizando água e, posteriormente, diclorometano mostrou-se bastante eficiente. O pH da solução aquosa de café foi ajustado para 10, de forma a manter as espécies ácidas presentes na matriz da amostra dissociadas, mantendo-as assim na fase aquosa.

A Figura 13 apresenta um eletroferograma típico para a separação de cafeína em café descafeinado.

FIGURA 13: Eletroferogramas para a separação de cafeína em amostras de café solúvel descafeinado, I) amostra A, II) amostra B.

A recuperação do processo de extração foi feita de forma a assegurar a exatidão do método proposto. A Tabela 5 apresenta os valores de cafeína presente no café descafeinado e os valores de recuperação. O método de extração apresentou boa repetibilidade, ($CV = 3,6\%$, para 4 diferentes extrações). Os valores recuperados apresentaram-se melhores que 89% para todas as amostras.

TABELA 4 : Valores da concentração de cafeína presente em amostras de café solúvel descafeinado.

Amostra	Concentração de cafeína (mg/g de café) ^a	Recuperação ^b %
Amostra A	0,71 ($\pm$ 0,03)	94 ($\pm$ 1,5)
Amostra A	0,72 ($\pm$ 0,05)	97 ($\pm$ 1,1)
Amostra A	0,76 ($\pm$ 0,04)	89 ($\pm$ 1,9)
Amostra B	0,35 ($\pm$ 0,03)	97 ($\pm$ 2,1)

^aValores expressos em intervalo de 95% de confiança, n=3.

^bValores do Coeficiente de Variação expressos entre parênteses.

3.4 Conclusões parciais

A metodologia proposta, baseada na complexação de cafeína com o ânion 3,4-dimetoxycinamato, mostrou-se satisfatória para a separação de cafeína por CZE-C⁴D, possibilitando a quantificação em amostras de café.

A quantificação de cafeína foi realizada com o mínimo pré-tratamento, e um curto tempo de corrida (< 5 min).

Os valores obtidos pelo método mostraram-se concordantes com os obtidos pelo método de referência (HPLC) considerando um intervalo de 95% de confiança.

O método apresentou vantagens sobre o método padrão para determinação de cafeína. Vantagens essas, que são intrínsecas da própria técnica, no que se refere a rapidez e no baixo volume de resíduos gerados. Adicionalmente, o método não apresentou uma interferência de matriz considerável, o que seria um problema em potencial, haja vista que o café possui uma imensa gama de compostos orgânicos. Estes compostos ocasionam um desgaste em colunas cromatográficas em análises rotineiras e, portanto, há também um menor custo/análise.

Adicionalmente, a metodologia proposta mostra-se potencialmente aplicável na análise rotineira do teor de cafeína em amostras de café descafeinado, detectando produtos que estariam fora das especificações da Anvisa.

4 SEPARAÇÃO DE CARBOIDRATOS

4.1 Introdução

A adulteração do café utilizando aditivos é a maior preocupação da indústria produtora de café, impulsionada pelo elevado valor econômico deste produto. Basicamente, qualquer material contendo carboidratos solúveis é potencialmente um adulterante do café. O material para fraudar o café deve ser o mais barato possível, estar disponível em grande quantidade e apresentar perfeita semelhança visual com o café ao ser torrado e moído (53). Os principais adulterantes utilizados são extratos de chicória, malte, milho, ervilha, soja, a casca e outras partes da planta de café (55).

A avaliação visual é tradicionalmente utilizada para detectar a adição de outro tipo de material ao grão verde de café, porém esta estratégia é, obviamente, inapropriada para detecção no café após a torra e processamento. Portanto, os carboidratos livres e totais, presentes no café, mostram-se como potentes indicadores não somente de algum grau de adulteração, mas também, em alguns casos, da própria fonte adulterante (55-57).

O teor de glicose e xilose total foram identificados como sendo excelentes indicadores para a detecção dos mais frequentes tipos de adulteração. Uma vez que o amido, polissacarídeo constituído por moléculas de glicose, está presente em pequena quantidade no café, a determinação de glicose total mostra-se um importante parâmetro para a detecção de adulterações provenientes da adição de materiais ricos em amido, como é o caso do milho, cevada, dentre outros cereais.

Por outro lado, a xilose, monossacarídeo constituinte da xilana, um polissacarídeo estrutural presente na casca dos frutos e nos galhos da maioria das plantas, é um importante indicador da adição da casca do grão de café e de outras partes da planta.

A quantidade máxima de xilose presente no café foi determinada por Prodolliet e colaboradores (55) utilizando grãos de café cru durante e após a torrefação e processamento. Baseado nos valores encontrados de xilose total, os cafés comercializados puderam ser classificados como adulterados e não adulterados. Para a estimativa da quantidade máxima de glicose total, a determinação foi procedida em amostras classificadas como não adulteradas.

A quantidade máxima de glicose e xilose total foram estimadas em 2,1 e 0,4%, respectivamente (55). Recentemente, Girard e colaboradores (58) estabeleceram novos valores para a quantidade máxima de glicose e xilose, 2,32 e 0,42%, respectivamente. Os limites de especificação, com os quais, o material pode ser classificado como adulterado, foram calculados como sendo 2,46 e 0,45% para glicose e xilose, respectivamente.

A cromatografia líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada tem sido a mais aplicada para determinação dos carboidratos totais no café, visto o grande número de publicações empregando a técnica (55, 57-61).

A aplicação da CE para a separação de carboidratos no café foi descrita por Hu e colaboradores (62) utilizando a detecção amperométrica pulsada e separações conduzidas em contra-EOF empregando NaOH como eletrólito de corrida.

Dentre as estratégias que não envolvem etapas de derivatização dos carboidratos, a utilização de eletrólitos extremamente alcalinos de forma a promover

a desprotonação dos grupos hidroxila das moléculas de açúcar, tornando essas espécies negativamente carregadas, tem sido a estratégia mais empregada em separações por CE, em geral baseada na detecção indireta na região do UV (63), eletroquímica (62) e espectrometria de massas (64). Outras estratégias envolvendo a não-derivatização dessas espécies baseiam-se na complexação dinâmica, como por exemplo, ânions borato (65) ou ainda íons metálicos (66).

Previamente, nosso grupo de trabalho relatou a aplicação da CZE-C⁴D para a separação de mono e dissacarídeos em amostras alimentares (67). A aplicação da C⁴D mostrou-se como uma excelente alternativa para a detecção dessa classe de compostos, uma vez que a detecção é baseada na diferença de condutividade entre o analito e solução, superando o problema de baixa absorvidade dessas espécies.

4.2 Experimental

4.2.1 Materiais e métodos

D-arabnose, D-frutose, D-galactose, D-glicose, D-manose, D-xilose e sacarose foram adquiridas da SIGMA (St Louis, USA). Metanol, acetonitrila, ácido clorídrico, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), hidróxido de sódio, tetraborato de sódio, mono-hidrogeno-fosfato de sódio e a resina de troca aniônica de base forte (III) foram adquiridos da MERCK (Darmstadt, Germany). As soluções padrão e amostras foram preparadas utilizando-se água deionizada, com resistividade maior ou igual a 18 MΩ (NANOpure UV, Barnsted, Dubuque, USA).

4.2.2 Preparo das amostras

As amostras de café foram preparadas a partir da hidrólise de 1 g do material, utilizando 10 mL de HCl 1 mol L⁻¹, sob aquecimento a 90°C durante 150 minutos. As soluções foram filtradas e seu volume completado para 10 mL.

A neutralização do ácido foi feita passando a solução filtrada pela resina de troca aniônica. Esta etapa foi procedida de duas maneiras; em batelada, utilizando 10 g de resina e sob agitação durante 10 minutos; e em fluxo, utilizando uma bomba peristáltica e uma seringa de 10 mL preenchida com a resina.

A resina foi condicionada utilizando NaOH 1 mol L⁻¹ em um béquer, sob agitação, filtrada em papel e lavada utilizando água deionizada até pH~7.

As amostras de milho e casca do grão de café foram processadas utilizando um triturador do tipo mixer vertical (SB40, Black & Decker, China).

O equipamento utilizado e o condicionamento do capilar foram descritos anteriormente na seção 3.2.1.2. Foram utilizados capilares de diâmetro interno de 50 μm e comprimento total de 90 cm, e capilar de 20 μm d.i. e 50 cm de comprimento total.

As demais condições de separação serão tratadas durante a discussão dos resultados.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Separação em meio alcalino

A separação de carboidratos por CZE é baseada nos seus respectivos graus de dissociação. De acordo com os valores de pK_a dos carboidratos, eletrólitos de corrida fortemente alcalinos ($\text{pH} \geq 12$) são necessários para a ionização desses analitos (68, 69), possibilitando a separação dessa classe de compostos na forma aniônica. Assim, a separação é baseada nas mobilidades eletroforéticas das espécies, sem a necessidade de etapas de derivatização prévias. A figura 14 apresenta a estrutura química dos açúcares de interesse neste trabalho e seus respectivos valores de pK_a .

FIGURA 14: Estrutura química dos açúcares de interesse e seus respectivos valores de pK_a .

Neste trabalho, hidróxido de sódio (NaOH) foi escolhido como o eletrólito de corrida. Previamente, nosso grupo havia relatado a aplicação de CE- C^4D para a determinação de carboidratos utilizando 10 mmol L^{-1} de NaOH, $4,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 e $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB [66]. A utilização de fosfato como

aditivo resulta em uma melhor estabilização da linha base, devida ao efeito tamponante deste ânion, impedindo grandes oscilações da condutividade do meio.

Como primeiro passo, optamos pela utilização dessas mesmas condições para a separação dos carboidratos presentes na amostra de café. A inversão do EOF foi promovida adicionando-se ao eletrólito de corrida tensoativo catiônico (CTAB) e aplicando-se potencial negativo na extremidade de introdução da amostra. A figura 15 apresenta um eletroferograma para a separação de alguns padrões de açúcares.

FIGURA 15: Eletroferograma para a separação dos padrões de frutose (F), manose (M), xilose (X), arabinose (A), glicose (G), galactose (Ga) e sacarose (S), 50 mg L⁻¹ cada, exceto (S), 100 mg L⁻¹. Utilizando 10 mmol L⁻¹ de NaOH, 4,5 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄, 0,5 mmol L⁻¹ CTAB, potencial -25 kV, injeção 30 s (10 cm de coluna d'água), capilar de 90 cm, 50 µm d.i.

Conforme observado na figura 15, manose e frutose co-migram e o pico correspondente à glicose/arabinose também se apresenta não resolvidos.

Sendo assim, decidiu-se avaliar a influência da concentração de NaOH sobre a resolução dos pares críticos. A figura 16 apresenta os eletroferogramas obtidos para as separações dos açúcares variando a concentração de NaOH entre 10 – 80 mmol L⁻¹. Para esta série de experimentos, optou-se pela utilização de um capilar de diâmetro interno de 20 µm. Dessa forma, possibilitou-se a aplicação de altos valores de potencial elétrico, uma vez que o diâmetro reduzido favorece a dissipação do calor gerado e fornecendo correntes elétricas apreciavelmente baixas e, portanto, sendo possível manter o mesmo potencial aplicado para altas concentrações de NaOH.

O que podemos observar é um aumento da relação S/R quando a concentração de base foi aumentada de 10 mmol L⁻¹ (figura 16a) para 20 mmol L⁻¹ (figura 16b). O fato se deve, basicamente, ao aumento da dissociação dos açúcares no interior do capilar, o que favorece, também, o aumento da mobilidade das espécies. O que se observa na figura 16b é a sobreposição do pico da xilose com o par manose/frutose, onde o aumento da concentração de NaOH, e conseqüentemente do pH, favorece o aumento da mobilidade efetiva dessa espécie em relação ao par manose/frutose e dessa forma promovendo uma inversão da ordem de migração, conforme pode ser observado nas figuras 16c e 16d, em que a xilose adquire mobilidade suficiente para separar-se da frutose e manose, as quais, pelas mesmas, razões também se resolveram.

A elevação da concentração de base ocasionou a inversão do par não resolvido manose/frutose por manose/arabinose, desta forma, possibilitando a separação da glicose dos demais açúcares.

A compreensão da ordem de migração, não é de fato tão óbvia, uma vez que os valores de pK_a são bastante próximos e provavelmente apenas o volume não explique a migração diferenciada. Como por exemplo, as moléculas de glicose e galactose possuem mesmo valor de pK_a e mesma estrutura, diferenciando somente sua conformação. Tal fato provavelmente ocasiona uma interação diferenciada dessas espécies com a solução por interações polares e pontes de hidrogênio intra e inter-moleculares, fazendo com que este par de açúcares se separe.

No caso das demais espécies, os efeitos da dissociação, posição das hidroxilas e tamanho do anel exercem efeitos que em muitos casos se sobrepõe aos efeitos dessas interações, o que não pode ser descartado, porém exigiria um estudo de correlação de todos estes parâmetros, o que não é o objetivo deste trabalho.

FIGURA 16: Eletroferogramas para a separação dos açúcares variando a concentração de NaOH em a- 10, b- 20, c- 40, d- 60, e- 80 mmol L⁻¹; 0,5 mmol L⁻¹ CTAB, -25kV, inj. 20 s (10 cm de coluna d'agua). Capilar de 50 cm de comprimento e 20 μ m d.i.

Apesar da separação dos picos da xilose e glicose serem conseguidas com o aumento da concentração do eletrólito, o emprego dessas condições apresenta como desvantagem um fenômeno denominado de *overshooting*,

responsável por perturbações na linha base, figura 16d e 16e, o qual é dependente de condições experimentais, tais como a geometria da cela de detecção e a composição do eletrólito. Carvalho e colaboradores (67) observaram este fenômeno utilizando 50 mmol L^{-1} de NaOH para separação de açúcares empregando a CZE- C^4D . Assim como Fracassi da Silva e do Lago (43) utilizando este mesmo modo de detecção para a separação de álcoois alifáticos empregando a CE no modo MEKC em tampão fosfato 50 mmol L^{-1} e SDS 50 mmol L^{-1} . Este fenômeno não é ainda bem compreendido e parece ser uma peculiaridade deste tipo de detecção, uma vez que, empregando outros modos de detecção (espectrofotométrica ou amperométrica) em condições semelhantes, este fato não é observado.

Portanto, com o intuito de se evitar a utilização de altas concentrações de hidróxido, decidiu-se avaliar o efeito da adição do ânion borato ao eletrólito sobre a separação dos açúcares, mantendo a concentração de NaOH em 20 mmol L^{-1} .

4.3.2 Adição de borato

A principal razão para a utilização de tampão borato em CZE para a separação de carboidratos é a de conferir uma mobilidade efetiva a essas espécies. Pela adição de borato a uma solução aquosa de açúcares, eles são transformados em um complexo aniônico com o borato (70).

A separação de açúcares por eletroforese utilizando borato foi introduzida por Consden e Stanier (71). Desde então, muitos trabalhos na literatura têm relatado estudos para uma elucidação da estrutura deste complexo, o que foi bem elucidado por Dawber e Hardy (72) através de medidas polarimétricas. A formação do complexo pode ser simplificada pelas equações seguintes.

Onde, L é o poliól ligante e B^- representa o tetraborato.

Como tentativa de separação dos carboidratos de interesse, a utilização do borato como aditivo complexante foi avaliada. A separação foi conduzida em contra-EOF e a concentração de NaOH foi mantida em 20 mmol L^{-1} e variou-se a concentração de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ entre 0,1 e $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$. A figura 17 apresenta os eletroferogramas obtidos.

FIGURA 17: Eletroferograma para a separação dos padrões de manose (M), xilose (X), arabinose (A), glicose (G), galactose (Ga) 50 mg L⁻¹ cada, utilizando 20 mmol L⁻¹ de NaOH, variando concentração de Na₂B₄O₇ em a- 0; b- 0,1; c- 0,2; d-0,4 mmol L⁻¹, +20 kV, inj. 30 s (10 cm de coluna d'água), capilar de 90 cm, 50 µm.

A adição de borato não apresentou resultados satisfatórios quanto à separação dos açúcares. Além do mais, o aumento da concentração de borato ao eletrólito de corrida ocasionou grande redução na sensibilidade, conforme observado. Desta forma, decidiu-se avaliar a influência da adição de modificadores orgânicos ao eletrólito de corrida.

4.3.3 Efeito dos modificadores orgânicos

Para promover a resolução de alguns pares críticos de açúcares, alguns solventes orgânicos foram empregados. Conforme citado no capítulo 1, a utilização de modificadores orgânicos como aditivos é uma prática comum em CE como forma de alterar a seletividade da separação. As pontes de hidrogênio intra-moleculares dos carboidratos são geralmente afetadas pelos solventes, dependendo do seu tipo e concentração. De uma maneira geral, a influência sobre a conformação dos carboidratos depende do caráter prótico ou aprótico dos solventes, uma vez que este parâmetro determina a solvatação dos solutos e se as pontes de hidrogênio intra-moleculares irão se estabilizar [68].

Para fins de estudos da influência dos solventes, um solvente prótico (metanol) e um aprótico (acetonitrila) foram avaliados. Ambos, como já era esperado, reduziram a condutividade do eletrólito resultando em correntes apreciavelmente baixas. No entanto, a adição de metanol ao eletrólito não apresentou alterações significativas quanto à seletividade de separação. A figura 18 (a-d) apresenta os eletroferogramas obtidos variando a concentração de metanol entre 0 e 30 % (v/v). O fato observado foi a redução da mobilidade do EOF. Desta forma, o aumento do tempo de migração dos analitos favoreceu ainda mais a

resolução do pico da xilose do pico correspondente à frutose/manose, que mantiveram a co-migração, assim como o pico correspondente à glicose/arabinose. Outro fato observado foi a redução na sensibilidade com o aumento da concentração de metanol, o que ocorre, basicamente, devido às mudanças ocasionadas na dissociação dessas espécies.

As condições obtidas foram então aplicadas na tentativa de separação da xilose presente na amostra de café, para tal, foi necessária a avaliação da eficiência de neutralização do HCl utilizado na etapa de hidrólise. Todas as amostras foram reforçadas com xilose de forma a assegurar que o café contivesse a quantidade máxima permitida, e então hidrolisada sob as mesmas condições. A figura 19-I apresenta eletroferogramas para separação empregando amostra neutralizada em fluxo utilizando volumes na proporção 1:1 de solução de café e resina. As figuras 19- II e III apresentam a separação empregando a neutralização em batelada utilizando volumes na proporção 1:1 e 1:2, respectivamente. Em todos os casos, a eficiência de neutralização não foi satisfatória, resultando em uma amostra com uma grande força iônica. Fato este, que possivelmente prejudica a separação da xilose em relação ao par manose/frutose. As amostras foram fortificadas com padrão de xilose e apresentaram-se com uma baixa resolução. A tentativa de se eliminar o ácido borbulhando nitrogênio foi procedida, porém, também sem sucesso.

FIGURA 18 : Eletroferograma para a separação dos padrões de frutose (F), manose (M), xilose (X), arabinose (A), glicose (G), galactose (Ga) e sacarose (S), 50 mg L⁻¹ cada, exceto (S), 100 mg L⁻¹, utilizando 10 mmol L⁻¹ de NaOH, 4,5 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄, 0,5 mmol L⁻¹ CTAB, variando a concentração de metanol em A- 0; B- 10; C- 20; D- 30 em %(v/v), -25 kV, inj. 30 s (10 cm de coluna d'água), capilar de 90 cm, 50 µm.

FIGURA 19: Separação dos carboidratos em amostra de café fortificada com 4 mg de xilose e hidrolisada com 10 mL de HCl 1 mol L⁻¹ (90 °C por 150 min.) neutralizada em fluxo utilizando coluna de troca aniônica com 10 mL de altura (item Ia); amostra neutralizada em batelada utilizando volumes de solução/resina na proporção de 1:1 (item IIa) e 1:2 (item IIIa). Os eletroferogramas indicados com a letra b correspondem à fortificação com padrão de xilose. Utilizando 10 mmol L⁻¹ de NaOH, 4,5 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄, 0,5 mmol L⁻¹ CTAB, MeOH 10 % (v/v), - 25 kV, inj. 30 s (10 cm de coluna d'água), capilar de 90 cm, 50 μm.

Uma vez que, o preparo das amostras ainda apresenta-se deficitária insistiu-se na tentativa de separação da glicose do pico correspondente a arabinose. Para tanto, avaliamos o efeito da adição de acetonitrila ao eletrólito de corrida.

A adição de acetonitrila promoveu algumas alterações quanto à seletividade, conforme pode ser observado na figura 20. A adição de 10% proporcionou a separação do par manose/frutose, figura 20b, no entanto, não exerceu influência sobre o par glicose/arabinose. A adição de 20 % ocasionou uma inversão de pares críticos, figura 20c, onde os picos manose/xilose tornaram-se não resolvidos.

A condição utilizando 10 % de acetonitrila foi aplicada para a separação dos açúcares na amostra hidrolisada de café e neutralizada com resina de troca aniônica em batelada. Conforme observado na figura 21a o surgimento de um pico desconhecido (?), cujo tempo de migração é igual ao do pico da xilose, confirmado pela fortificação da amostra com padrão, figura 21b, impossibilita a detecção desta espécie no café. Possivelmente, este pico seja correspondente a algum produto gerado durante o processo de hidrólise, uma vez que, o café é uma matriz bastante complexa e a adição de acetonitrila promoveu alterações na mobilidade desta espécie.

FIGURA 20: Eletroferograma para a separação dos padrões de frutose (F), manose (M), xilose (X), arabinose (A), glicose (G), galactose (Ga) e sacarose (S), 50 mg L⁻¹ cada, exceto (S), 100 mg L⁻¹, utilizando 10 mmol L⁻¹ de NaOH, 4,5 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄, 0,5 mmol L⁻¹ CTAB, variando a concentração de acetonitrila em A- 0; B- 10; C- 20 % em (v/v), -25 kV, inj. 30 s (10 cm de coluna d'água), capilar de 90 cm, 50 μm.

FIGURA 21: Separação dos açúcares em amostra de café hidrolisada com 10 mL de HCl 1 mol L^{-1} (90°C por 150 min.) neutralizada em batelada utilizando resina de troca aniônica com 10 mL de volume e posterior diluição de 20 vezes (item a); amostra fortificada com padrão de xilose (item b). Utilizando 10 mmol L^{-1} de NaOH, $4,5 \text{ mmol L}^{-1}$ Na_2HPO_4 , $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ CTAB, ACN 10 % (v/v), -25 kV, inj. 30 s (10 cm de coluna d'água), capilar de 90 cm, $50 \text{ }\mu\text{m}$.

Uma vez que, a simples adição de um modificador orgânico não apresentou resultados satisfatórios no que se refere à possibilidade de separação do par glicose/arabinose, decidiu-se investir na separação elevando a concentração de NaOH de 10 para 80 mmol L^{-1} , tendo em vista que nesta condição, conforme apresentado na figura 16e, a separação do par glicose/arabinose foi conseguida, apesar do problema das flutuações da linha base devidas ao fenômeno *overshooting*, como discutido anteriormente. Desta forma, a adição de metanol foi

avaliada com o intuito de reduzir estas perturbações e possibilitar uma melhor delimitação dos picos, permitindo uma maior precisão na determinação das áreas dos picos. A figura 22 apresenta os eletroferogramas obtidos variando a concentração de metanol entre 10 e 30 % (v/v).

FIGURA 22: Eletroferograma para a separação dos padrões de frutose (F), manose (M), xilose (X), arabinose (A), glicose (G) e galactose (Ga) 200 mg L⁻¹ cada. Utilizando 80 mmol L⁻¹ de NaOH, 0,5 mmol L⁻¹ CTAB, variando a concentração de MeOH em A- 10; B- 20; C- 30 em %(v/v), -25 kV, inj. 30 s (10 cm de coluna d'agua), capilar de 50 cm de comprimento e 20 µm d.i.

Conforme observado na figura 22 o incremento de metanol ao eletrólito de corrida proporcionou uma melhoria na linha base e, adicionalmente, auxiliou na resolução do pico da frutose do par manose/arabinose.

A condição utilizando 30 % de metanol foi aplicada para separação dos açúcares presentes no café. Os limites de quantificação para xilose e glicose foram estimados através da relação S/R. O valor obtido para ambos foi de 200 mg L⁻¹ e para o método foi estimado em 0,2 g/100 g de café. Esse valor é suficientemente baixo para atingir os limites de especificação para estes açúcares: 0,45 e 2,46 % (m/m) para xilose e glicose, respectivamente.

A condição de separação estabelecida foi aplicada para a análise de amostras de café, as quais foram contaminadas com a casca do grão de café e grãos de milho, na proporção de 10 % (m/m), antes da etapa de hidrólise. Os eletroferogramas para a separação dos açúcares em amostras de café, sem adulteração e adulterada, são apresentados na figura 23.

Como já era esperado, a análise da amostra de café contendo casca indicou a presença de xilose, monossacarídeo obtido após a hidrólise ácida da casca. A adição de 10 % de casca ao pó de café representou uma quantidade de aproximadamente 1,2 % de xilose, cerca de 3 vezes superior ao permitido para o café.

A amostra contaminada com o milho indicou a presença de glicose, proveniente da hidrólise do amido. A adição de 10 % de milho ao café representou uma quantidade de cerca de 3 % de glicose, valor superior aos 2,46 % tolerados.

FIGURA 23: Separação dos açúcares em amostras de café hidrolisada com 10 mL de HCl 1 mol L⁻¹ (90 °C por 150 min.) neutralizada em batelada utilizando resina de troca aniônica (item a); amostra contaminada com a casca do grão de café 10 % (m/m) (item b) e amostra contaminada com grão de milho 10 % (m/m) (item c). Utilizando 80 mmol L⁻¹ de NaOH, 0,5 mmol L⁻¹ CTAB, MeOH 30 % (v/v), -25 kV, inj. 20 s (10 cm de coluna d'água), capilar de 50 cm de comprimento e 20 µm d.i.

4.4 Conclusões parciais

A separação dos carboidratos empregando a CE mostra-se como uma alternativa para determinação dessas espécies em diferentes matrizes. A adição de modificadores orgânicos apresentou melhora no que se refere a estabilidade da linha base. A adição de acetonitrila ocasionou alterações seletivas na solvatação das espécies, conferindo uma separação do par crítico manose/frutose. Entretanto, o mesmo não se pode observar com a adição de metanol, uma vez que este não promoveu alterações significativas na seletividade da separação.

A adição de íons borato como forma de promover a separação dos pares co-migrantes não se mostrou eficaz, uma vez que a relação concentração de borato/açúcares não foi suficiente para complexar estas espécies.

Apesar da metodologia ainda necessitar de uma otimização, a estratégia utilizando altas concentrações de NaOH (80 mmol L^{-1}) mostrou-se a mais eficiente para a separação de xilose e glicose. A adição de 30% de metanol ao eletrólito acarretou em uma diminuição nas flutuações da linha base.

Com a metodologia foi possível detectar variações nas características do café com adição de 10 % (m/m) de casca de café ou de milho. Desta forma, podemos concluir que a CE-C⁴D apresenta grande potencialidade para a detecção de fraudes no café processado, utilizando como indicadores os teores de glicose e xilose totais.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Conforme demonstrado nos capítulos anteriores, os objetivos deste trabalho foram alcançados uma vez que foi possível a determinação de cafeína em amostras de café e o limite de quantificação do método (0,33 mg/g) se apresentou suficientemente baixo, de forma a atender às exigências da legislação vigente para produtos descafeinados no que se refere à quantidade máxima de cafeína presente. Foi demonstrado também a potencialidade da aplicação da CE para a identificação de adulterações de café, baseada na composição de carboidratos da amostra, empregando os monossacarídeos glicose e xilose como indicadores.

Além de permitir determinar a concentração de cafeína, a proposta apresentada no capítulo 3 mostra uma estratégia não muito comum em CE que é a formação de complexos orgânicos entre analito e uma espécie modificadora da carga efetiva deste. Existem algumas estratégias similares a esta como são os casos da formação de complexos entre espécies bioquímicas (fragmentos de DNA e proteínas) e micelas.

No primeiro caso, estão incluídas técnicas de reconhecimento de espécies bioquímicas como CEMSA (*capillary electrophoresis mobility shift assay*). Embora muito utilizada para macromoléculas, acreditamos que existam poucas demonstrações de casos envolvendo espécies pequenas como as metilxantinas e o ácido 3,4-dimetoxicinâmico.

A cromatografia eletrocínética micelar, por sua vez, envolve a formação de estruturas contendo múltiplas unidades da espécie do tensoativo, porém, ao contrário dos complexos apresentados no capítulo 3, a interação é não específica.

Apesar de não terem sido apresentadas, existem outras possibilidades para as quais a metodologia desenvolvida tem grande potencial para ser utilizada, tais como análise de cafeína em fármacos ou de seus metabólitos em fluídos biológicos.

Os resultados apresentados no capítulo 4 mostram a possibilidade de identificar a adulteração de café em pó pela adição da casca e outras partes da planta de café, assim como de outros produtos, como o milho, durante a etapa de processamento do café.

A principal dificuldade encontrada foi o alto teor iônico resultante do processo de hidrólise ácida. Uma alternativa que mereceria ser avaliada é a hidrólise enzimática, a qual permitiria obter os monossacarídeos sem necessariamente utilizar um meio com força iônica elevada. Alguns testes foram efetuados utilizando enzimas presentes no tubo digestivo de alguns insetos. Apesar de não serem apresentados, os resultados mostraram-se promissores.

Uma outra alternativa que mereceria ser avaliada é a utilização de carvão ativo como forma de *clean-up* da amostra. Uma vez que os carboidratos adsorvem neste material, a remoção do ácido pode ser efetuada com água e, posteriormente, os carboidratos eluídos do carvão empregando um solvente orgânico.

O emprego da CE como alternativa à HPLC para determinação de cafeína apresenta vantagens que são características da própria técnica tais como pequeno volume de resíduo gerado e baixa relação custo/análise. Adicionalmente, a aplicação da CE para a separação de carboidratos apresenta uma vantagem bastante requerida, no que se refere ao reduzido tempo de análise, quando comparada ao método padrão empregando a cromatografia líquida.

Acreditamos que este trabalho tenha contribuído para a demonstração da potencialidade da CE, em especial com a detecção condutométrica sem contato, reforçando a versatilidade da técnica, uma vez que as aplicações empregaram um mesmo equipamento e mesmo tipo de coluna capilar (diferindo apenas o diâmetro interno), na análise de diferentes compostos.

IV REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. <http://www.abic.com.br>, acessado em agosto de 2006
2. <http://www.cybercoffee.com.au>, acessado em agosto de 2006
3. <http://www.agricultura.gov.br>, acessado em setembro de 2005
4. Bicchi, C. P.; Binello, A. E.; Pellegrino, G. M.; Vanni, A. C., Characterization of Green and Roasted Coffees through the Chlorogenic Acid Fraction by Hplc-Uv and Principal Component Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, 43, (6), 1549-1555.
5. Carrera, F.; Leon-Camacho, M.; Pablos, F.; Gonzalez, A. G., Authentication of green coffee varieties according to their sterolic profile. *Analytica Chimica Acta* **1998**, 370, (2-3), 131-139.
6. Casal, S.; Oliveira, M. B. P. P.; Alves, M. R.; Ferreira, M. A., Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, 48, (8), 3420-3424.
7. dos Santos, E. J.; de Oliveira, E., Determination of mineral nutrients and toxic elements in Brazilian soluble coffee by ICP-AES. *Journal of Food Composition and Analysis* **2001**, 14, (5), 523-531.
8. Esteban-Diez, I.; Gonzalez-Saiz, J. M.; Pizarro, C., An evaluation of orthogonal signal correction methods for the characterisation of arabica and robusta coffee varieties by NIRS. *Analytica Chimica Acta* **2004**, 514, (1), 57-67.
9. Clarke, R. J., *Coffee*. London, **1985**.
10. Piggot, J. R., *Statistical Procedures in Food Research*. London, 1986.

11. Tiselius, A. Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis. Tese de Doutorado, Suécia, 1930.
12. Hjerten, S., *Chromatographic reviews* **1967**, 9, 122-219.
13. Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M.; Verheggen, T. P. E. M., High-Performance Zone Electrophoresis. *Journal of Chromatography* **1979**, 169, (Feb), 11-20.
14. Neuhoff, V.; Schill, W. B.; Sternbac, H., Micro-Analysis of Pure Deoxyribonucleic Acid-Dependent Ribonucleic Acid Polymerase from Escherichia-Coli - Action of Heparin and Rifampicin on Structure and Function. *Biochemical Journal* **1970**, 117, (3), 623-627.
15. Virtanen, R., Zone Electrophoresis in a Narrow-Bore Tube Employing Potentiometric Detection - Theoretical and Experimental Study. *Acta Polytechnica Scandinavica-Chemical Technology Series* **1974**, (123), 1-67.
16. Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D., Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass-Capillaries. *Analytical Chemistry* **1981**, 53, (8), 1298-1302.
17. Tavares, M. F. M., Separation mechanisms in capillary electrophoresis. *Quimica Nova* **1997**, 20, (5), 493-511.
18. Tavares, M. F. M., Capillary electrophoresis: Basic concepts. *Quimica Nova* **1996**, 19, (2), 173-181.
19. Tavares, M. F. M.; Colombara, R.; Massaro, S., Modified electroosmotic flow by cationic surfactant additives in capillary electrophoresis - Evaluation of electrolyte systems for anion analysis. *Journal of Chromatography A* **1997**, 772, (1-2), 171-178.
20. Nahum, A.; Horvath, C., Surface Silanols in Silica-Bonded Hydrocarbonaceous Stationary Phases .1. Dual Retention Mechanism in Reversed-Phase Chromatography. *Journal of Chromatography* **1981**, 203, (Jan), 53-63.

21. Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T., Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries. *Analytical Chemistry* **1984**, 56, (1), 111-113.
22. Guzman, N. A., *Capillary Electrophoresis Technology*. New York, 1993.
23. Huie, C. W., Effects of organic solvents on sample pretreatment and separation performances in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2003**, 24, (10), 1508-1529.
24. Huang, X. H.; Pang, T. K. J.; Gordon, M. J.; Zare, R. N., On-Column Conductivity Detector for Capillary Zone Electrophoresis. *Analytical Chemistry* **1987**, 59, (23), 2747-2749.
25. da Silva, J. A. F.; do Lago, C. L., An oscillometric detector for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* **1998**, 70, (20), 4339-4343.
26. Zemann, A. J.; Schnell, E.; Volgger, D.; Bonn, G. K., Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* **1998**, 70, (3), 563-567.
27. Sombra, L. L.; Gomez, M. R.; Olsina, R.; Martinez, L. D.; Silva, M. F., Comparative study between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography in 'guarana" based phytopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2005**, 36, (5), 989-994.
28. Horie, H.; Mukai, T.; Kohata, K., Simultaneous determination of qualitatively important components in green tea infusions using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1997**, 758, (2), 332-335.
29. Walker, J. C.; Zaugg, S. E.; Walker, E. B., Analysis of beverages by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1997**, 781, (1-2), 481-485.

30. Haque, A.; Xu, X. H.; Stewart, J. T., Determination of ephedrine, theophylline and phenobarbital in a tablet dosage form by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1999**, 21, (5), 1063-1067.
31. Geldart, S. E.; Brown, P. R., Separation of purine and pyrimidine bases by capillary zone electrophoresis with carbonate buffers. *Journal of Chromatography A* **1999**, 831, (1), 123-129.
32. Hurst, W. J.; Martin, R. A., The Quantitative-Determination of Caffeine in Beverages Using Capillary Electrophoresis. *Analisis* **1993**, 21, (9), 389-391.
33. Regan, F.; Shakalisava, Y., Rapid simultaneous determination of alkylxanthines by CZE and its application in analysis of pharmaceuticals and food samples. *Analytica Chimica Acta* **2005**, 540, (1), 103-110.
34. Pomilio, A. B.; Trajtemberg, S. P.; Vitale, A. A., Micellar electrokinetic capillary chromatography of methylxanthines-containing beverages: discussion of the molecular species involved. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2005**, 85, (4), 622-628.
35. Pomilio, A. B.; Trajtemberg, S.; Vitale, A. A., High-performance capillary electrophoresis analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electrokinetic capillary chromatography. *Phytochemical Analysis* **2002**, 13, (4), 235-241.
36. Aucamp, J. P.; Hara, Y.; Apostolides, Z., Simultaneous analysis of tea catechins, caffeine, gallic acid, theanine and ascorbic acid by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A* **2000**, 876, (1-2), 235-242.
37. Stach, D.; Schmitz, O. J., Decrease in concentration of free catechins in tea over time determined by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* **2001**, 924, (1-2), 519-522.

38. Watanabe, T.; Nishiyama, R.; Yamamoto, A.; Nagai, S.; Terabe, S., Simultaneous analysis of individual catechins, caffeine, and ascorbic acid in commercial canned green and black teas by micellar electrokinetic chromatography. *Analytical Sciences* **1998**, 14, (2), 435-438.
39. Zhao, Y. P.; Lunte, C. E., Determination of caffeine and its metabolites by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* **1997**, 688, (2), 265-274.
40. Hyotylainen, T.; Siren, H.; Riekkola, M. L., Determination of morphine analogues, caffeine and amphetamine in biological fluids by capillary electrophoresis with the marker technique. *Journal of Chromatography A* **1996**, 735, (1-2), 439-447.
41. Huang, H. Y.; Lien, W. C.; Chiu, C. W., Comparison of microemulsion electrokinetic chromatography and micellar electrokinetic chromatography methods for the analysis of phenolic compounds. *Journal of Separation Science* **2005**, 28, (9-10), 973-981.
42. Wang, Z. H.; Luo, G. A.; Chen, J. F.; Xiao, S. F.; Wang, Y. M., Carbon nanotubes as separation carrier in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2003**, 24, (24), 4181-4188.
43. da Silva, J. A. F.; do Lago, C. L., Conductivity detection of aliphatic alcohols in micellar electrokinetic chromatography using an oscillometric detector. *Electrophoresis* **2000**, 21, (7), 1405-1408.
44. Carvalho, A. Z. Aplicação de Eletroforese Capilar com Detecção Condutométrica sem Contato à Determinação de Espécies Neutras. Dissertação de Mestrado **2003**, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

45. Borse, B. B.; Rao, L. J. M.; Nagalakshmi, S.; Krishnamurthy, N., Fingerprint of black teas from India: identification of the regio-specific characteristics. *Food Chemistry* **2002**, 79, (4), 419-424.
46. Kolayli, S.; Ocak, M.; Kucuk, M.; Abbasoglu, R., Does caffeine bind to metal ions? *Food Chemistry* **2004**, 84, (3), 383-388.
47. Gorter, K., *Ann. Chem* **1907**, 358, 327.
48. Horman, I.; Viani, R., Nature and Conformation of Caffeine-Chlorogenate Complex of Coffee. *Journal of Food Science* **1972**, 37, (6), 925-&.
49. Ashoor, S. H.; Seperich, G. J.; Monte, W. C.; Welty, J., High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Caffeine in Decaffeinated Coffee, Tea, and Beverage Products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **1983**, 66, (3), 606-609.
50. Trugo, L. C.; Macrae, R.; Dick, J., Determination of Purine Alkaloids and Trigonelline in Instant Coffee and Other Beverages Using High-Performance Liquid-Chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1983**, 34, (3), 300-306.
51. Ramalakshmi, K.; Raghavan, B., Caffeine in coffee: Its removal. Why and how? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1999**, 39, (5), 441-456.
52. Toci, A.; Farah, A.; Trugo, L. C., Effect of decaffeination using dichloromethane on the chemical composition of arabica and robusta raw and roasted coffees. *Quimica Nova* **2006**, 29, (5), 965-971.
53. Bheema Rao, M.; Vittal Rao, A. S.; Abraham, K. O.; Shankaranarayana, M. L., Estimation of chicory in coffee-chicory mixture. *Indian Coffee* **1986**, 50, (12), 13-19.

55. Prodolliet, J.; Bruelhart, M.; Blanc, M. B.; Leloup, V.; Cherix, G.; Donnelly, C. M.; Viani, R., Adulteration of Soluble Coffee with Coffee Husks and Parchments. *Journal of Aoac International* **1995**, 78, (3), 761-767.
56. Blanc, M. B.; Davis, G. E.; Parchet, J. M.; Viani, R., Chromatographic Profile of Carbohydrates in Commercial Soluble Coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1989**, 37, (4), 926-930.
57. Prodolliet, J.; Bruelhart, M.; Lador, F.; Martinez, C.; Obert, L.; Blanc, M. B.; Parchet, J. M., Determination of Free and Total Carbohydrate Profile in Soluble Coffee. *Journal of Aoac International* **1995**, 78, (3), 749-761.
58. Girard, P.; Stober, P.; Blanc, M.; Prodolliet, J., Carbohydrate specification limits for the authenticity assessment of soluble (instant) coffee: Statistical approach. *Journal of Aoac International* **2006**, 89, (4), 999-1003.
59. Prodolliet, J.; Bugner, E.; Feinberg, M., Determination of Carbohydrates in Soluble Coffee by Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection - Interlaboratory Study. *Journal of Aoac International* **1995**, 78, (3), 768-782.
60. Prodolliet, J.; Bugner, E.; Feinberg, M., Determination of carbohydrates in soluble (Instant) coffee by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: Summary of collaborative study. *Journal of Aoac International* **1996**, 79, (6), 1400-1407.
61. Stober, P.; Giller, V.; Spack, L.; Prodolliet, J., Estimation of the measurement uncertainty of the high-performance anion-exchange chromatographic determination of carbohydrates in soluble (instant) coffee. *Journal of Aoac International* **2004**, 87, (3), 647-656.

62. Hu, Q.; Zhou, T. S.; Zhang, L.; Fang, Y. Z., Study of the separation and determination of monosaccharides in soluble coffee by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. *Analyst* **2001**, 126, (3), 298-301.
63. Soga, T.; Serwe, M., Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Chemistry* **2000**, 69, (3), 339-344.
64. Klampfl, C. W.; Buchberger, W., Determination of carbohydrates by capillary electrophoresis with electrospray-mass spectrometric detection. *Electrophoresis* **2001**, 22, (13), 2737-2742.
65. Hoffstetterkuhn, S.; Paulus, A.; Gassmann, E.; Widmer, H. M., Influence of Borate Complexation on the Electrophoretic Behavior of Carbohydrates in Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry* **1991**, 63, (15), 1541-1547.
66. El Rassi, Z., Recent developments in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of carbohydrate species. *Electrophoresis* **1999**, 20, (15-16), 3134-3144.
67. Carvalho, A. Z.; da Silva, J. A. F.; do Lago, C. L., Determination of mono- and disaccharides by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis* **2003**, 24, (12-13), 2138-2143.
68. Dang, Q.; Sun, Z.; Ling, D., Separation of sulphonamides and determination of the active ingredients in tablets by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A* **1992**, 603, (1-2), 259-266.
69. Zemmann, A.; Nguyen, D. T.; Bonn, G., Fast separation of underivatized carbohydrates by coelectroosmotic capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **1997**, 18, (7), 1142-1147.

70. Boeseken, J., The Use of Boric Acid for the Determination of the Configuration of Carbohydrates. *Advances in Carbohydrate Chemistry* **1949**, 4, 189-210.
71. Consden, R.; Stanier, W. M., Ionophoresis of Sugars on Paper and Some Applications to the Analysis of Protein Polysaccharide Complexes. *Nature* **1952**, 169, (4306), 783-785.
72. Dawber, J. G.; Hardy, G. E., Polarimetric Study of the Interaction of Electrolytes with Mannitol and Sorbitol. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions I* **1984**, 80, 2467-2478.