KAREN STEFANIE MEJÍA CARMONA

Colunas capilares extratoras à base de grafeno e derivados ancorados em sílica para a determinação de Xantinas e Ocratoxina em amostras de café

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura:
Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Mejía Carmona, Karen Stefanie
Colunas capilares extratoras à base de grafeno e derivados ancorados em sílica para a determinação de Xantinas e Ocratoxina em amostras de café / Karen Stefanie Mejía Carmona. — São Carlos, 2019.
104 f.

Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

1. Química analítica. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Método cromatográfico. I. Título.

Sonia Alves - CRB: 4280/8

A mi madre por todos sus esfuerzos, incentivos y amor.

À minha mãe, por todos os seus esforços, incentivos e amor.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus mais sinceros agradecimentos e reconhecimento a todas as pessoas que estiveram presentes ao longo deste trabalho:

Ao meu orientador professor Dr. Fernando Mauro Lanças por ter me recebido no grupo de Cromatografia, pela orientação, as oportunidades de aprendizagem e conselhos dados durante esta etapa.

À Universidade de São Paulo (USP) e ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC) pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Aos meus pais Leyla e Fernando e minha irmã Caroll pelo apoio incondicional, esforços e sacrifícios ao longo destes anos. A minha família pela força, aos meus sobrinhos Dani e Santi pelos belos momentos compartilhados.

Ao meu namorado Jairo, por estar ao meu lado e realizar nossos sonhos juntos, pelo apoio, amor e as muitas alegrias e sorrisos que você tira de mim.

A meus colegas do laboratório CROMA pelos bons momentos, vivências e conversas. Ao Guilherme, Ana, Dalton, Arley e Pipe por me ajudarem neste trabalho com seus conhecimentos e darem respostas as minhas perguntas.

À CAPES pela bolsa concedida e à FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro ao grupo de cromatografia.

Aos docentes e funcionários do IQSC pela ajuda e cordialidade.

A todo o povo brasileiro pela magnifica acolhida e bem-vinda.

Obrigada!

RESUMO

A crescente necessidade de determinar constituintes naturais ou contaminantes em matrizes complexas de alimentos de maneira simples e automatizada, vem tornando frequente o emprego de técnicas miniaturizadas de preparo de amostra acopladas ao sistema analítico. A microextração em fase sólida no tubo (*in-tube* SPME) é uma técnica adequada que permite acoplamento direto com a cromatografia líquida (LC). Este trabalho apresenta o desenvolvimento de materiais à base de grafeno ancorados a sílica, os quais foram empregados como sorventes em *in-tube* SPME on-line com cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS) para a extração de xantinas e ocratoxina A (OTA) em amostras de café. Os materiais sintetizados foram caracterizados por espectroscopia vibracional no infravermelho (IR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Partículas de aminopropil sílica revestidas com óxido de grafeno e funcionalizadas com C_{18} e *end-capped* (SiGOC_{18}ecap) mostraram o melhor desempenho na extração. Consequentemente, o *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS foi implementado com sucesso empregando uma microcoluna (0,5 mm de diâmetro interno x 100 mm de comprimento) preenchida com partículas de SiGOC_{18}ecap. Os parâmetros de extração e as condições de detecção foram otimizados. O método desenvolvido para a análise de teobromina, teofilina e cafeína apresentou baixos limites de detecção (0,1–0,2 µg L^{-1}) e quantificação (0,3–1,0 µg L^{-1}), linearidade variando de 0,5 a 500 µg L^{-1}, adequados valores de recuperação entre 57 a 110%, e fatores de enriquecimento entre 5,6 e 7,2. A cafeína foi determinada em todas as amostras de café moído e solúvel analisadas em uma faixa de 12,1 a 36,5 mg g^{-1}. Pequenas quantidades de teobromina <0,10 mg g^{-1} e teofilina <0,07 mg g^{-1} foram detectadas em várias amostras. O método para a análise de OTA na bebida de café solúvel, apresentou limites de detecção e quantificação de 0,20 e 0,35 µg L^{-1}, respectivamente, linearidade na faixa de 0,35 a 2,0 µg L^{-1}, além de ser um procedimento simples e econômico para a avaliação de OTA. Este trabalho demonstrou que os materiais à base de grafeno são sorventes promissores para a extração em *in-tube* SPME e seu alto fator de pré-concentração obtido mostra sua boa capacidade de extração. Os métodos foram simples e eficientes, mostrando potencial para ser aplicado na análise de xantinas e OTA em outras matrizes.

ABSTRACT

Given the increasing need to analyze natural constituents or contaminating compounds in complex food matrices in a simple and automatized way, it has become frequent the use of miniaturized preparation techniques coupled with the analytical system. In-tube solid-phase microextraction (in-tube SPME) is a sensitive technique that allows its direct coupling to LC systems. Here we present a series of graphene-based materials supported on silica as sorbents used in an in-tube SPME system coupled *on-line* with Ultra Performance Liquid Chromatography and tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS) for the extraction of xanthines and ochratoxin A (OTA) in coffee samples. The synthesized materials were characterized by Infrared Spectroscopy (IR) and Scanning Electron Microscopy (SEM). Aminopropyl silica particles coated with graphene oxide functionalized with C_{18} and end-capping ($SiGOC_{18}$ecap) showed the best extraction performance. Consequently, *on-line* in-tube SPME-UPLC-MS/MS was successfully implemented employing a microcolumn (0,5 mm i.d x 100 mm) packed with $SiGOC_{18}$ecap particles. Extraction parameters and detection conditions were optimized. The validated method for xanthines showed low detection (0.1–0.2 µg L^{-1}) and quantification (0.3–1.0 µg L^{-1}) limits, linearity over the range 0.5–500 µg L^{-1} and recoveries of the individual xanthines from 57 to 110%). High extraction efficiency was determined by the enrichment factors obtained (5.6–7.2). Caffeine was determined in all roasted and soluble coffee samples analyzed at levels from 12.1 to 36.8 mg g^{-1}. Small amounts of theobromine < 0.10 mg g^{-1} and theophylline < 0.07 mg g^{-1} were also detected in several samples. The method for OTA analysis in soluble coffee beverage, presented limits of detection and quantification of 0.20 and 0.35 µg L^{-1}, respectively, linearity over the range 0.35–2.0 µg L^{-1}, besides being a simple and economical procedure for OTA evaluation. This work demonstrated that graphene-based materials represent a promising new sorbent for in-tube SPME. The high pre-concentration factor obtained showed a great extraction capacity. The methods were efficient, simple and fast, showing a good potential to be applied for the xanthines and ochratoxin analysis in other matrices.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração de um cafeeiro do tipo Coffea arabica L. Caule, galhos e folhas (A), partes da flor (1–4), sementes (5–6) e fruto (7–10). 16
Figura 2 - Fruto do café e as suas principais partes. 16
Figura 3 - Produção mundial de café no ano 2018. 17
Figura 4 - Alcaloides purínicos presentes no café. 22
Figura 5 - Estrutura química da ocratoxina A (OTA). 25
Figura 6 - Equilíbrio ácido-base da ocratoxina A. 25
Figura 7 - Classificação das técnicas miniaturizadas de extração. 29
Figura 8 - Esquema da automatização do sistema *in-tube* SPME acoplado on-line com cromatografia líquida no modo (A) *flow-through* e (B) *draw-eject*. (A1 e B1) posição de carregamento (extração), (A2 e B2) posição de injeção (dessorção). 31
Figura 9 - Dispositivos para in-tube SPME. (A) capilar aberto com fase polimérica, (B) sorvente empacotado, (C) fibras com recobrimento externo ou interno, (D) fase monolítica. 32
Figura 10 - Síntese de GO e GR. 33
Figura 11 - Número de publicações para o termo “Sample preparation” AND “graphene” na base de dados Scopus. 34
Figura 12 - Esquema da montagem in-tube SPME-UPLC-MS/MS utilizado no modo de extração flow-through e de eluição back-flush. 44
Figura 13 - Esquema da microcoluna de extração empregada. 45
Figura 14 - Gradiente de eluição por etapas empregado para a análise de OTA e condições de configuração da válvula de comutação no in-tube SPME (*). 48
Figura 15 - Espectro FTIR do grafite, óxido de grafeno (GO) e grafeno (GR). 53
Figura 16 - Espectro FTIR dos materiais Si (amarelo), $SiGO_{aq}$ (rosa), $SiGO_{aq}$ecap (verde) e $SiGO_{aq}$C18ecap (azul). 53
Figura 17 - SEM dos materiais sintetizados: (A) folhas de óxido de grafeno, GO, (B) aminosilica, Si, (C) GO ancorado a Si em meio aquoso, $SiGO_{aq}$ e (D) GO ancorado a Si em meio orgânico, $SiGO_{org}$. 54
Figura 18 - Fotografia dos materiais sintetizados. Da esquerda para a direita: Si, $SiGO_{aq}$, $SiGO_{org}$ e $SiGR_{aq}$. 55
Figura 19 - Cromatogramas obtidos pela injeção de solução padrão a 100 ug L^{-1} realizando o processo de extração das xantinas sem fase (preto), e do sobrenadante obtido depois do processo de extração com a fase SIGOaqecap (vermelho), analisados por HPLC-UV-Vis a 274 nm. 56

Figura 20 - Resultados da avaliação da capacidade extratora das fases sorventes baseadas em aminopropil sílica. 57
Figura 21 - Resultados da influência do tamanho de partícula na capacidade extratora das fases sorventes $SiGO_{aq}$ de d.p. 40–75 µm e 10 µm. 58
Figura 22 - Resultados da avaliação da capacidade extratora das fases sorventes baseadas em PSA. 59
Figura 23 - Resultados da avaliação do solvente de eluição. 60
Figura 24 - Cromatogramas de (A) íon total (TIC) do café descafeinado fortificado a 50,0 µg L^{-1} e (B) monitoramento das transições de quantificação no modo SRM. 62
Figura 25 - Estudo univariado das principais variáveis determinantes da eficiência de extração no sistema in-tube SPME. (A) volume de injeção, (B) fluxo de carregamento, (C) tempo de carregamento e (D) solvente de carregamento. 63
Figura 26 - Comparação entre os cromatogramas de café moído descafeinado branco (vermelho), café solúvel descafeinado branco (verde) e café fortificado ao segundo nível da curva analítica (roxo). 65
Figura 27 - Cromatogramas obtidos na determinação dos limites de detecção de (A) teobromina, (B) teofilina e (C) cafeína. 66
Figura 28 - Curva analítica da teobromina e gráfico de dispersão de resíduos do ajuste linear. 68
Figura 29 - Curva analítica da teofilina e gráfico de dispersão de resíduos do ajuste linear. 69
Figura 30 - Curva analítica da cafeína e gráfico de dispersão de resíduos do ajuste linear.. 69
Figura 31 - Cromatograma obtido no modo SRM mostrando as transições de quantificação na análise de xantinas em uma amostra de café solúvel brasileiro. 74
Figura 32 - Espectro UV-Vis da OTA em concentração 29,5 µg mL^{-1} obtido em solução de tolueno: ácido acético (99:1, v/v). 77
Figura 33 - Cromatograma obtido pela injeção de amostra de café preparada e fortificada com OTA a 10,0 µg L^{-1} (roxo), seguida da injeção de branco de água (verde), na avaliação do efeito de memória, nas condições de limpeza da coluna com 95% de ACN. 79
Figura 34 - Cromatogramas de (A) íon total (TIC) da OTA em café solúvel descafeinado fortificado a 10,0 µg L^{-1} e (B) monitoramento das transições de quantificação e confirmação no modo SRM. 80
Figura 35 - Cromatogramas obtidos no modo SRM da solução aquosa fortificada com OTA a 20,0 µg L^{-1} para a avalição do tempo de carregamento. 81
Figura 36 - Estudo univariado das principais variáveis determinantes da eficiência de extração da OTA no sistema in-tube SPME. (A) tempo de carregamento, (B) fase de carregamento variação da porcentagem de ACN e (C) fluxo de carregamento. 83

Figura 37 - Frações coletadas pela válvula de descarte a cada minuto a fluxo de (A) 0,100 mL min^{-1} e (B) 0,150 mL min^{-1}. 85
Figura 38 - Comparação entre os cromatogramas de café solúvel descafeinado branco (verde) e café solúvel descafeinado fortificado com OTA a 1,0 µg L^{-1} (roxo). 86
Figura 39 - Curva analítica da OTA em matriz de café solúvel fortificada. 87
Figura 40 - Gráfico de dispersão de resíduos do ajuste linear da curva analítica da OTA. ... 87
Figura 41 - Sobreposição dos cromatogramas da análise das amostras de café solúvel e café solúvel branco fortificado com OTA a 0,35 µg L^{-1}. (t_{ROTA} =11,18 min; $t_{Rinterferente}$=10,6 min). ... 89
Figura 42 - Estrutura química da ocratoxina A (OTA), o produto de isomerização térmica 2'R-ocratoxina A (2'R-OTA), e os produtos de degradação 2'-descarboxi-ocratoxina A (DC-OTA) e ocratoxina α-amida (OTamida). 90
Figura 43 - Sobreposição dos cromatogramas da análise das amostras de café solúvel, cerveja e vinho tinto fortificadas com OTA a 2,0 µg L^{-1} (traço preto) e amostra branca da matriz (traço vermelho)..... 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do café Arábica e Robusta, em grão verde e torrado. 21
Tabela 2 - Prevalência da OTA em café brasileiro. 26
Tabela 3 - Transições monitoradas no modo SRM e condições usadas para análise das xantinas. 46
Tabela 4 - Condições usadas para análise de xantinas no sistema in-tube SPME. 46
Tabela 5 - Transições monitoradas no modo SRM na análise de OTA. 48
Tabela 6 - Condições usadas para análise de OTA no sistema in-tube SPME. 49
Tabela 7 - Parâmetros cromatográficos e curvas analíticas para a avaliação das fases extratoras por HPLC-UV-Vis. 56
Tabela 8 - Avaliação do efeito matriz das xantinas em água e na matriz. 66
Tabela 9 - Limites de detecção e quantificação determinados para as xantinas. 67
Tabela 10 - LOD e LOQ de métodos publicados na análise de cafeína em amostras de café e chá. 67
Tabela 11 - Resultados do teste t de Student para a avaliação da linearidade das curvas analíticas das xantinas. 70
Tabela 12 - ANOVA de regressão e falta de ajuste para a teobromina. 71
Tabela 13 - ANOVA de regressão e falta de ajuste para a teofilina. 71
Tabela 14 - ANOVA de regressão e falta de ajuste para a cafeína. 71
Tabela 15 - Resultados da avaliação da repetitividade para as xantinas. 72
Tabela 16 - Resultados da avaliação da precisão intermediária para as xantinas. 72
Tabela 17 - Resultados da porcentagem de recuperação do processo de extração das xantinas. 73
Tabela 18 - Fator de pré-concentração para as xantinas usando o sistema in-tube SPME. . 73
Tabela 19 - Teor de teobromina, teofilina e cafeína em amostras de café comerciais. 75
Tabela 20 - Efeito da porcentagem de acetonitrila na fase de carregamento nas áreas da OTA e Xantinas (solução mista dos padrões em água, TB, TF e CAF a 200 µg L^{-1} e OTA a 20 µg L^{-1}) na microcoluna de extração. 82
Tabela 21 - Resultados do teste t de Student para a avaliação da linearidade da curva analítica da OTA. 88
Tabela 22 - ANOVA de regressão e falta de ajuste para a ocratoxina A. 88
Tabela 23 - Avaliação da resposta da transição de quantificação m/z 239 da OTA em função da matriz analisada fortificada a 2,0 µg L^{-1}. 92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura / sigla	Termo
ACN	Acetonitrila
AcF	Ácido fórmico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de variância
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CAF	Cafeína
C18	Octadecilsilano
DCC	1,3-diciclohexilcarbodiimida
DMF	Dimetilformamida
d.i	Diâmetro interno
d.p	Diâmetro de partícula
EDC	Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
ESI	Ionização por *electrospray*
F_{cal}	Valor de F de Fisher calculado
$F_{crítico}$	Valor de F de Fisher tabelado
GO	Óxido de grafeno
GR	Grafeno reduzido
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICH	*International Conference On Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*
In-tube SPME	Microextração em fase sólida no tubo
IPA	Isopropanol
MAPA	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial
NHS	N-hidroxisuccinimida
ODS	Clorodimetil-n-octadecilsilano
OTA	Ocratoxina A
PSA	Sílica com grupamentos amino primário e secundário
$PSAGO_{aq}$	PSA com GO suportado (síntese em meio aquoso)
$PSAGO_{aq}$C18ecap	$PSAGO_{aq}$ funcionalizado com C18 e *endcapping*

$PSAGO_{aq}$ecap	$PSAGO_{aq}$ funcionalizado com *endcapping*
$PSAGO_{org}$	PSA com GO suportado (síntese em meio orgânico)
$PSAGO_{org}$C18ecap	$PSAGO_{org}$ funcionalizado com C18 e *endcapping*
$PSAGO_{org}$ecap	$PSAGO_{org}$ funcionalizado com *endcapping*
$PSAGR_{aq}$	PSA com GR suportado (síntese em meio aquoso)
$PSAGR_{org}$	PSA com GR suportado (síntese em meio orgânico)
Si	Aminopropil sílica
$SiGO_{aq}$	Si com GO suportado (síntese em meio aquoso)
$SiGO_{aq}$10µm	Si (d.p 10 µm) com GO suportado (síntese em meio aquoso)
$SiGO_{aq}$C18ecap	$SiGO_{aq}$ funcionalizado com C18 e *endcapping*
$SiGO_{aq}$ecap	$SiGO_{aq}$ funcionalizado com *endcapping*
$SiGO_{org}$	Si com GO suportado (síntese em meio orgânico)
$SiGR_{aq}$	Si com GR suportado (síntese em meio aquoso)
$SiGR_{org}$	Si com GR suportado (síntese em meio orgânico)
SRM	Monitoramento de reações selecionadas
TB	Teobromina
t_{cal}	Valor de t de Student calculado
TF	Teofilina
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Trimetilclorosilano
t_R	Tempo de retenção
t_{tab}	Valor de t de Student tabelado
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
1.1 O café 15
1.2 Produção de café no Brasil 17
1.3 Processo de preparo do café 18
1.4 Composição química do café 20
1.4.1 Xantinas 21
1.5 Compostos contaminantes no café 23
1.5.1 As micotoxinas 23
1.5.2 Ocratoxina A 24
1.6 Preparo de amostra 27
1.6.1 Microextração em fase sólida no tubo (*in-tube* SPME) 29
1.6.2 Novos materiais baseados em grafeno para o preparo de amostra 32
1.7 Métodos analíticos para a determinação de xantinas em café 34
1.8 Métodos analíticos para a determinação de ocratoxina em café 35
1.9 Parâmetros de qualidade do método 37
2. OBJETIVOS 38
2.2 Objetivos específicos 38
3. EXPERIMENTAL 39
3.1 Padrões e reagentes 39
3.2 Preparo da solução estoque e de trabalho 39
3.3 Síntese dos materiais 40
3.3.1 Síntese do óxido de grafeno (GO) 40
3.3.2 Síntese do grafeno (GR) 41
3.3.3 Síntese do GO ancorado a sílica (Si) e a PSA 41
3.3.4 Funcionalização das partículas com ODS e endcapping 42
3.4 Caracterização das fases 42

3.5 Instrumentação e condições cromatográficas para avaliação da capacidade extratora das fases 42

3.5.1 Avaliação da capacidade extratora dos materiais sintetizados 43

3.5.2 Avaliação do solvente de eluição 43

3.6 Montagem do sistema *in-tube* SPME acoplado a UPLC-MS/MS 44

3.7 Instrumentação e condições cromatográficas do sistema *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS na análise de xantinas 45

3.8 Avaliação dos parâmetros determinantes da eficiência do processo *in-tube* SPME para as xantinas 47

3.9 Análise das xantinas em amostras de café 47

3.10 Instrumentação e condições cromatográficas *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS na análise de ocratoxina A 47

3.11 Avaliação dos parâmetros determinantes da eficiência do processo *in-tube* SPME para a ocratoxina A 49

3.12 Análise da ocratoxina A em amostras de café solúvel 49

3.13 Parâmetros de qualidade do método 50

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 52

4.1 Caracterização dos materiais 52

4.2 Avaliação da capacidade extratora dos materiais sintetizados 55

4.3 Avaliação do sistema *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS na análise de xantinas 61

4.4 Validação do método *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS na análise de xantinas 64

4.4.1 Seletividade 64

4.4.2 Efeito Matriz 65

4.4.3 Limites de detecção e quantificação 66

4.4.4 Linearidade 68

4.4.5 Precisão e exatidão 72

4.4.6 Fator de pré-concentração 73

4.5 Análise de xantinas em amostras de café 74

4.6 Determinação de ocratoxina A em café solúvel 76

4.6.1 Determinação da concentração de OTA usando espectrofotometria na região de ultravioleta (UV) 76

4.6.2 Otimização do método cromatográfico para a análise de ocratoxina A em café solúvel..... 77

4.6.3 Ensaios preliminares do método on-line *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS na análise de ocratoxina A 80

4.6.4 Otimização do método on-line *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS na análise de ocratoxina A em café solúvel 83

4.6.5 Avaliação das figuras de mérito do método *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS na análise de ocratoxina A em café solúvel 85

4.6.6 Análise de ocratoxina A em amostras de café solúvel 89

4.6.7 Aplicabilidade do método *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS para a análise de OTA em outras bebidas 91

CONCLUSÕES 94

REFERÊNCIAS 95

1. INTRODUÇÃO

1.1 O café

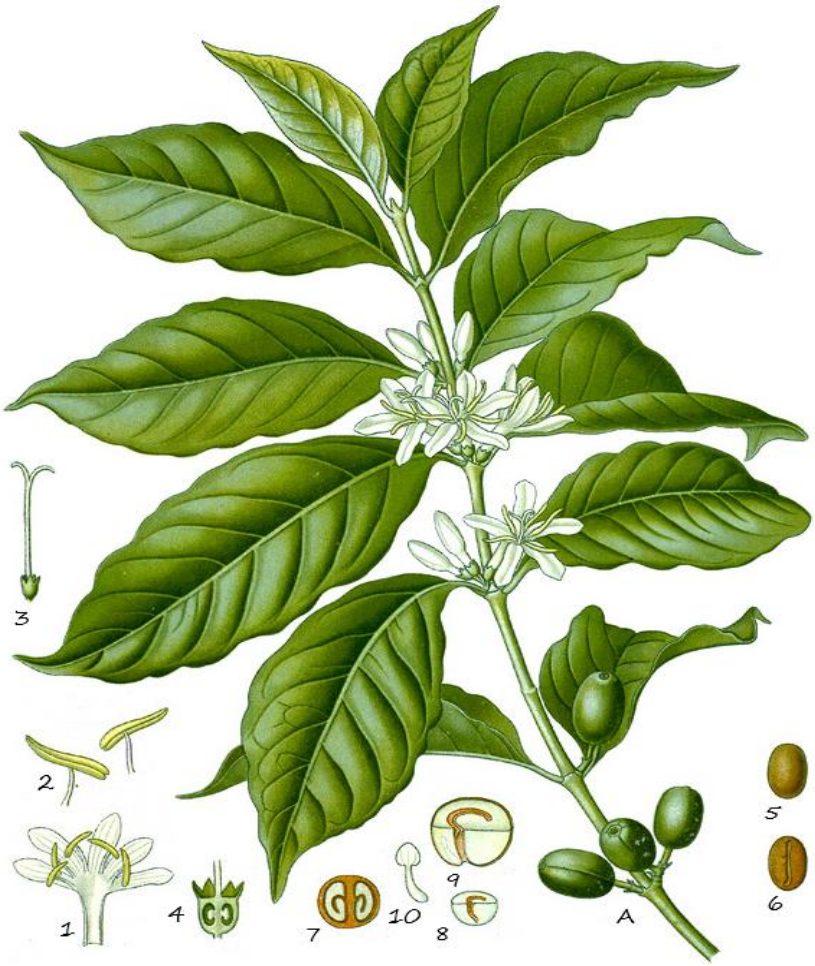
O café é uma das bebidas mais populares e amplamente consumidas em todo o mundo. O consumo de café deve-se, principalmente, a seu aroma e sabor caraterístico e suas propriedades estimulantes. O café, originário da Etiópia, foi primeiramente cultivado com fins comerciais no Iêmen, difundindo seu consumo pela Europa, Ásia e África.[1] Atualmente, o café é cultivado comercialmente no que é conhecido como o "cinturão de café" formado por países da África, América Central e do Sul e Ásia, localizados na zona entre o tropico de câncer e capricórnio.[1] Atualmente, Brasil, Vietnã e Colômbia são os maiores exportadores de café. [2]

O cafeeiro é um arbusto da familia *Rubiaceae* e do genus *Coffea,* cultivado a sol moderado, chuvas e temperaturas pouco variáveis. Conhecem-se 90 espécies diferentes das quais o *Coffea arabica* e o *Coffea canephora* são as espécies de maior importancia comercial.[3] O cafeeiro produz o fruto conhecido como cereja a qual contem duas sementes chamadas grãos de café os quais são usados para a produção de café.[4] A Figura 1 apresenta uma ilustração do cafeeiro e suas partes.

O fruto do café tem três etapas de maturação: na primeira, conhecida como granação, se dá a formação da semente (o fruto é verde); na segunda, chamada de amadurecimento, os frutos evoluem, aumenta a síntese de açúcares e o crescimento da mucilagem, passando pela mudança de cor de verde a verde-cana, a amarelo e, posteriormente, a vermelho ou cereja, o qual é o estágio de maturidade ideal para a colheita. Após esse estágio inicia-se a senescência do fruto, os quais apresentam coloração escura e secagem da mucilagem conhecida como frutos passas ou secos.[5]

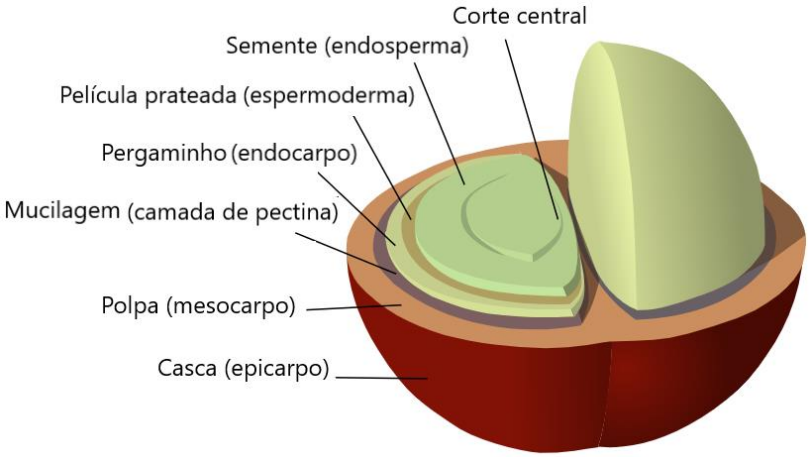
O fruto de fora para dentro tem a casca (epicarpo), a polpa (mesocarpo), o pergaminho (endocarpo), e duas sementes (endosperma) contidas no pergaminho e envoltas pela película prateada (espermoderma). A Figura 2 apresenta o fruto do café e as suas partes.[5]

Figura 1 - Ilustração de um cafeeiro do tipo *Coffea arabica L.* Caule, galhos e folhas (A), partes da flor (1–4), sementes (5–6) e fruto (7–10).



Fonte: Imagem de domínio público etiquetada para reutilização não comercial.[6]

Figura 2 - Fruto do café e as suas principais partes.



Fonte: Imagem etiquetada para reutilização. Adaptação a partir de: Image by: Y tambe. Vectorized by: Chabacano - Vectorization of image: Coffee_Bean_Structure.png, translated from ja:画像:Coffee Bean.png by the original author of the version 17:41, 4 Sep 2004., CC BY-SA 3.0.

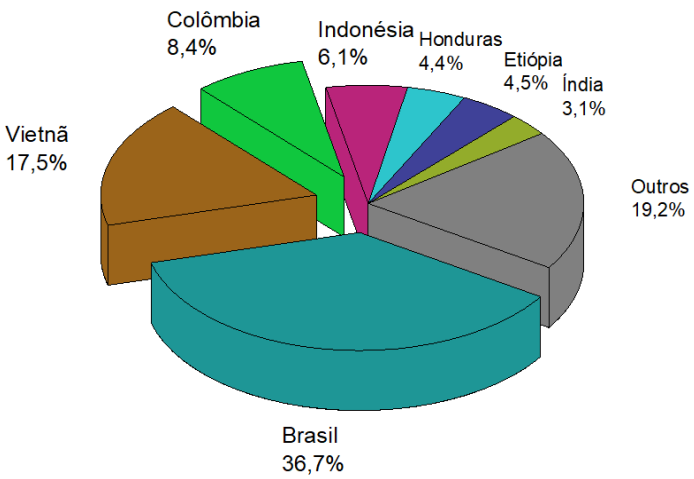
1.2 Produção de café no Brasil

O café é um produto de exportação importante, ocupando um lugar de destaque na agricultura brasileira, sendo Brasil seu maior produtor e exportador. Para o ano de 2018 a International Coffee Organization (ICO) indicou que da produção total mundial de 168,6 milhões de sacos (60 kg cada), o Brasil produziu 61 milhões, o que representa ao redor de 35% da produção global de café, seguido do Vietnã (18%) e da Colômbia (8%) (Fig. 3). Entre os principais consumidores do produto destacam-se a União Européia, os Estados Unidos, o Japão, a Rússia e o Canadá. [7]

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a produção de café no Brasil para o ano 2018 apresentou um aumento de 17% em relação ao ano anterior. O café ocupa a quinta posição entre os produtos mais exportados do agronegócio, representando 6,5% do faturamento bruto total da produção brasileira em 2018, situado depois da soja (37%), cana-de-açúcar (16%), milho (12%) e algodão (9%).[8,9]

O parque cafeeiro está estimado em 2,22 milhões de hectares distribuídos principalmente no sudeste do país, com uma ampla variedade de climas, relevos e altitudes que permitem a produção de diferentes tipos e qualidades de café.[8] Os principais estados produtores de café são: Minas Gerais (53%), Espírito Santo (22%), São Paulo (10%), Bahia (8%), Rondônia (4%) e Paraná (2%). Entre as espécies comercialmente cultivadas, aproximadamente 80% da produção é café arábica (*Coffea arabica*) e o restante é café robusta ou conilon (*Coffea Canephora*).[10]

Figura 3 - Produção mundial de café no ano 2018.



Fonte: Adaptada a partir de ICO, 2019.[7]

1.3 Processo de preparo do café

Da produção mundial de café, ao redor de 60% é café do tipo Arábica (*Coffea arabica*), 40% café robusta ou Conilon (*Coffea canephora*) e menos de 1% da espécie *Coffea liberica* e *Coffea excelsa.*[2,3] A qualidade do café, suas propriedades físico-químicas, sabor e aroma dependem em grande parte do processamento do mesmo, o que envolve as etapas de colheita, lavagem e seleção, fermentação, secagem e torrefação.

A colheita do fruto se divide principalmente em dois tipos: a colheita manual e a mecânica. Na colheita manual só os frutos em estado maduro ou cereja são colhidos em um cesto ou pano, e os que estão em outra fase de maturação (verde ou amarelo) serão coletados mais adiante, podendo ser necessárias duas ou mais colheitas por planta. Como consequência, uma maior mão de obra é necessária incrementando os custos de produção, porém permitindo obter-se um café de qualidade superior.[5]

Na colheita mecânica, o trabalho de derriça, recolhimento, abanação e descarga a granel do fruto é feito por máquinas com varetas vibratórias flexíveis. A derriça do café se faz no momento na qual a maioria dos frutos estão no estado cereja, porém, alguns frutos verdes e secos também são coletados. Este método oferece um maior rendimento, menor custo e tempo, porém com uma maior variação na qualidade do produto.[5]

Após a colheita, o café é submetido a um processo de pré-limpeza no campo para retirar impurezas como folhas e gravetos. Uma vez no local de processamento, se faz o processo de lavagem com água, onde por diferença de peso são separados os frutos leves ou fração de boias (frutos mal granados, brocados, passas e secos) da fração de frutos verdes e maduros, já que esses frutos leves podem comprometer a qualidade do café conferindo aromas e sabores indesejáveis.[5]

Após da lavagem, os dois lotes obtidos (frutos verdes e maduros, e frutos boias) podem ser processados separadamente por via seca ou via úmida. Por via seca os frutos são secos em terreiros ao sol, etapa altamente dependente das condições climáticas e que facilita o crescimento de microrganismos, ou por secadores mecânicos a temperatura controlada. Uma vez seco o fruto é descascado mecanicamente até obter a semente de café verde.[5,11]

No preparo por via úmida o café é descascado por fricção, em descascadores mecânicos que retiram a mucilagem, gradativamente, até obter cafés total ou parcialmente desmucilados. Após, o café é imerso em água, e a mucilagem restante é removida por fermentação, com ou sem adição de enzimas, lavado novamente e finalmente, seco em terreiros ou em cilindros rotatórios.[5,11]

Os cafés verdes obtidos são inspecionados, manual ou mecanicamente, quando então os grãos defeituosos são retirados e o grão é classificado por tamanho. Os grãos verdes são então armazenados em sacas mantendo o nível de umidade adequado (8–12%) até o processo de torrefação.[1,11]

No processo de torrefação o café verde é submetido a tratamento térmico por um tempo determinado em torradores com trocadores de calor por convecção e condução. A temperatura e tempo variam dependendo do grau de torrefação desejado. Assim, para uma torra clara utiliza-se aproximadamente 193 ºC; para torra média 205 ºC; e para uma torra escura 218 ºC, com tempos entre uns poucos segundos até, no máximo, 25 minutos. Quando o grau de torra é atingido, os grãos torrados são esfriados rapidamente com água ou ar a fim de condensar no grão os compostos voláteis responsáveis pelo aroma e sabor, assim como manter a umidade do grão (3–5%).[11]

Durante a torrefação ocorrem vários processos físico-químicos no café que conferem o aroma e gosto característico da bebida. O ponto de torra é monitorado pela mudança de cor em clara, média e escura. De acordo à Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC) uma torra clara confere uma acidez enfatizada, pouco corpo e aroma suave, enquanto que uma torra média apresenta equilíbrio entre corpo e acidez, com aromas mais acentuados. Uma torra escura tem uma acidez leve, amargor acentuado e corpo enfatizado. Após torrefação os grãos torrados inteiros e frios são embalados ou moídos com um rolo mecânico até chegar à granulometria do produto desejada.[12] Os principais tipos de café serão descritos:

1) *Café torrado e moído* — A granulometria do pó de café é definida pelo modo de preparo da bebida, sendo classificada em fina, média e grossa. Assim, uma moagem média é usada para o preparo de café em cafeteira com filtro de papel ou coador de pano, enquanto que uma moagem média/fina é empregada no preparo de café em máquinas de café expresso.[12]

2) *Café solúvel* — Para sua produção, a partir de café torrado moído fino, geralmente de café robusta ou *blends* com arábica, se obtém um extrato concentrado empregando água quente à alta pressão, utilizando percoladores. O extrato ou licor de café é submetido a processos de secagem que empregam evaporadores, *spray drying*, e *freeze drying* até obter o café em pó ou em grânulos.[13]

3) *Café descafeinado* — É aquele submetido a um processo de extração da cafeína a qual é o composto responsável pelos efeitos fisiológicos causados pela bebida. A extração da cafeína pode ser feita por três métodos de extração: com água, com solventes (cloreto de metileno e acetato de etila), e usando CO_2 em estado supercrítico. Esses processos de extração são feitos no café verde a fim de evitar perdas ou alterar os compostos gerados no processo de torra, o que confere as características de aroma e gosto típicas do café.[13] Os solventes utilizados não permanecem no produto uma vez que os grãos verdes após extração são submetidos a um processo de secagem e posterior torrefação.[14]

1.4 Composição química do café

A composição química do café envolve uma mistura complexa de fitoquímicos que varia de acordo com a espécie, variedade e processamento dos grãos.[15] Estima-se que o café tem mais de 1000 compostos presentes. A torrefação é o processo que mais alterações químicas produz na composição do café verde. Entre as mudanças causadas encontram-se: 1) Redução do teor de água e perda de peso dos grãos, 2) mudanças na cor ou compostos poliméricos gerados pelas reações de Maillard conhecidos como melanoidinas, 3) precursores não voláteis que permitem a aparição dos compostos de aroma, 4) degradação de compostos antioxidantes, ácidos clorogênicos, proteínas e aminoácidos.[11]

O café é formado por um grande número de compostos os quais podem ser classificados em: compostos nitrogenados (alcaloides, trigonelina, proteínas e aminoácidos); carboidratos (polissacáridos, monossacáridos); lipídios; ácidos clorogênicos e compostos voláteis.[16] A Tabela 1 apresenta uma comparação da composição do café verde e torrado das espécies arábica e robusta.

Tabela 1 - Composição do café Arábica e Robusta, em grão verde e torrado.

Composto	***Arábica***		***Robusta***	
	Verde (%)	**Torrado (%)**	**Verde (%)**	***Torrado (%)***
Cafeína	0,8–1,4	1,1–1,3	1,5–2,5	2,4
Trigonelina	0,6–1,2	0,4	0,3–0,9	0,2
Proteínas	8,5–12	7,5–10	8,5–12	7,5–10
Aminoácidos livres	0,2–0,8	0,0	0,8–1,0	0,0
Ácidos clorogênicos	4,1–9,2	1,9–2,5	6,1–12,1	3,3–3,8
Ácidos alifáticos	1,0–2,9	1,6	1,3–2,2	1,6
Polissacáridos	43–46	35	48–55	39
Sacarose	6,0–9,0	0,0	0,9–4,8	0,0
Açúcares reduzidos	0,1	0,3	0,4	0,3
Lipídios	15,0–18,0	17,0	7,0–12,0	11,0
Melanoidinas	-	25,5	-	25,5
Água	8–12	0–5	8–12	0–5

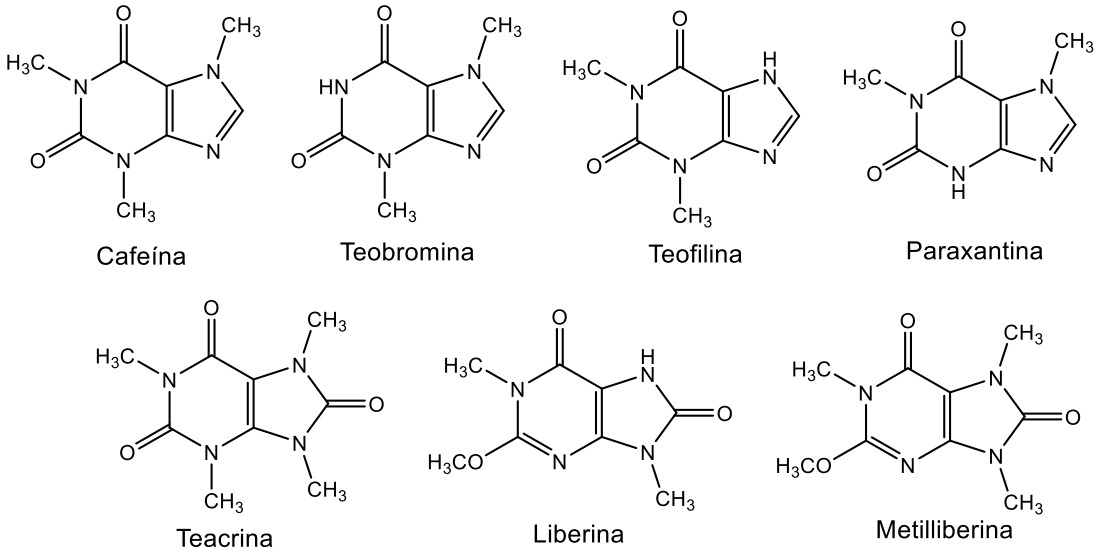
Fonte: Adaptação a partir de PARLIMENT, 2000. FARAH, 2012 e WANG, 2014.[11,14,17]

1.4.1 Xantinas

As xantinas são um grupo de alcalóides purínicos, dentre os quais destaca-se a cafeína como um dos constituintes bioativos mais importantes do café e pelo qual esta bebida é reconhecida. A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é relativamente estável à temperatura do processo de torrefação e sua concentração encontra-se ao redor de 1,7% na variedade robusta e aproximadamente de 1,0% na variedade arábica.[18]

Além da cafeína, também estão presentes pequenas quantidades de outras metilxantinas (Fig. 4). A relação entre a teobromina (3,7-dimetilxantina) e a teofilina (1,3-dimetilxantina), presentes a baixas concentrações (0,03–0,08%), é usada para a diferenciação dos grãos verdes entre as espécies arábica e robusta, uma vez que não é afetada pelo grau de maturidade. Durante o processo de torrefação, verificou-se que o teor de teofilina e teacrina diminui à medida que aumenta o grau de torrefação, ao contrário da cafeína, da teobromina e da paraxantina (1,7-dimetilxantina), cujo conteúdo é quase o mesmo. Teacrina (ácido 1,3,7,9-tetrametilurico) e metiliberina não tem sido detectadas em *C. arabica*. Frutos de café colhidos no estado de maturidade-passa tem um maior teor de teofilina, teobromina, liberina e teacrina.[16]

Figura 4 - Alcaloides purínicos presentes no café.



Fonte: Autoria própria.

O teor de cafeína em café verde é variável entre 1,0–2,5% e depende do desenvolvimento da semente, assim como da origem. Em arábica o teor de cafeína é menor que em robusta. O conteúdo de cafeína não diminui com o processo de torrefação; pelo contrário, tende a aumentar até cerca de 10% devido à perda de peso dos grãos durante o processo. O teor de cafeína em café solúvel é aproximadamente o dobro devido ao processo de extração com água, já que a cafeína é altamente solúvel em água quente.[16]

As metilxantinas são bem conhecidas pelos seus efeitos fisiológicos. A cafeína, teobromina e teofilina são as mais estudadas e encontram-se presentes naturalmente principalmente em café, chá, mate, guaraná, cola e cupuaçu. A cafeína e teobromina também são adicionadas em bebidas energéticas, refrigerantes, suplementos e medicamentos. A cafeína encontra-se em maior teor em café e chá, a teobromina em cacau, e a teofilina em baixas quantidades em café e cacau.[19]

Os efeitos fisiológicos causados pela cafeína ainda são muito estudados. Entre os efeitos positivos associados estão: a estimulação do sistema nervoso central, respiratório e cardíaco,[19] aumento do estado de alerta, capacidade de aprendizagem, e rendimento físico.[14] O consumo moderado de café tem efeitos diuréticos, assim como ajuda a reduzir o risco a desenvolver diabetes, obesidade,[19] doenças

neurodegenerativas,[20,21] cardíacas,[15] e câncer,[22] assim como melhora a consolidação da memória a longo prazo.[23]

Estudos recentes têm demostrado que as metilxantinas têm efeitos sinérgicos com outros fitoquímicos como os flavonoides e os ácidos clorogênicos presentes no café, chá e cacau, que permitem manter uma boa saúde cerebral.[24] No entanto, o excessivo consumo de café pode causar ansiedade, insônia, taquicardia, dor de cabeça,[14,18] e aumentar o risco de doenças cardiovasculares.[19]

1.5 Compostos contaminantes no café

Além dos compostos presentes naturalmente no café, substâncias contaminantes como micotoxinas, acrilamida, β-carbolina e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) também podem estar presentes. Um contaminante é definido como aquela substância adicionada não intencionalmente que está presente no alimento produto dos processos de manufatura, processamento, preparação, tratamento, embalagem, seleção, transporte, ou como resultado de uma contaminação ambiental.[25]

A ocorrência das micotoxinas no café deve-se principalmente as práticas inadequadas na safra, colheita, torrefação ou armazenamento. Outras substâncias indesejáveis como a acrilamida, β-carbolina e PAHs são formados nos processos de torrefação em altas temperaturas.[14]

1.5.1 As micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por alguns fungos filamentosos e cuja presença tem sido detectada principalmente em produtos agrícolas ou processados como cereais e grãos, tomates, frutas cítricas, uvas, nozes, vinho e cerveja.[25] Estima-se que aproximadamente 25% dos agro cultivos no mundo contém micotoxinas, e várias classes podem ser simultaneamente encontradas no mesmo alimento.[26]

As micotoxinas presentes em alimentos são produzidas geralmente pelos fungos do gênero *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillinum*. Entre os grupos de

micotoxinas mais relevantes, com maior ocorrência, e de maior risco a saúde estão: aflatoxinas (Aflatoxina B1, AfB1), tricotecenos (Deoxinivanelol, DON), fumonisinas (fumonisina B1, FB1), zearalenona (ZEN) e ocratoxinas (ocratoxina A, OTA).[27]

A contaminação pode acontecer em qualquer fase do cultivo, colheita, processamento ou armazenamento, quando as condições ambientais são favoráveis para a proliferação desses fungos, especialmente a umidade e a temperatura.[26] Por essa razão, alimentos originários de climas tropicais e subtropicais são os mais suscetíveis à contaminação. Fatores químicos e ambientais como teor de água, pH, nutrientes disponíveis, substrato, integridade física da planta e do grão, também afetam o crescimento dos fungos e a produção das micotoxinas.[28]

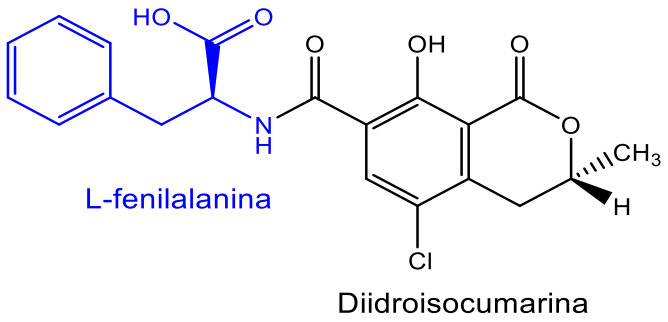
A contaminação de alimentos por fungos é uma questão importante de segurança alimentar para a saúde humana e animal uma vez que os compostos produzidos por esses microrganismos têm repercussões no sistema nervoso central, respiratório e cardiovascular, bem como no trato digestivo e urinário, além de efeitos cancerígenos e imunossupressores.[26]

1.5.2 Ocratoxina A

As ocratoxinas, denominadas A, B e C, são produzidas por várias espécies dos gêneros *Aspergillus* em climas tropicais, e pelo *Penicillinum* em climas temperados e frios. Do grupo, a ocratoxina A (OTA) é a mais importante, pois apresenta maior ocorrência em alimentos, e maior toxicidade. Sua estrutura química (Fig. 5) consiste num pentacetídeo derivado da diidroisocumarina ligado pelo grupo 7-carboxilo a uma molécula de L-fenilalanina.[26] Essa micotoxina é geralmente estável em altas temperatura e ambientes ácidos. A OTA é um ácido fraco (Fig. 6), com valores de pK_a = 4,4 para o grupo carboxílico e pK_a = 7,5 para o grupo fenólico, apresentando três espécies: a protonada, a monoaniônica e a dianiônica.[29]

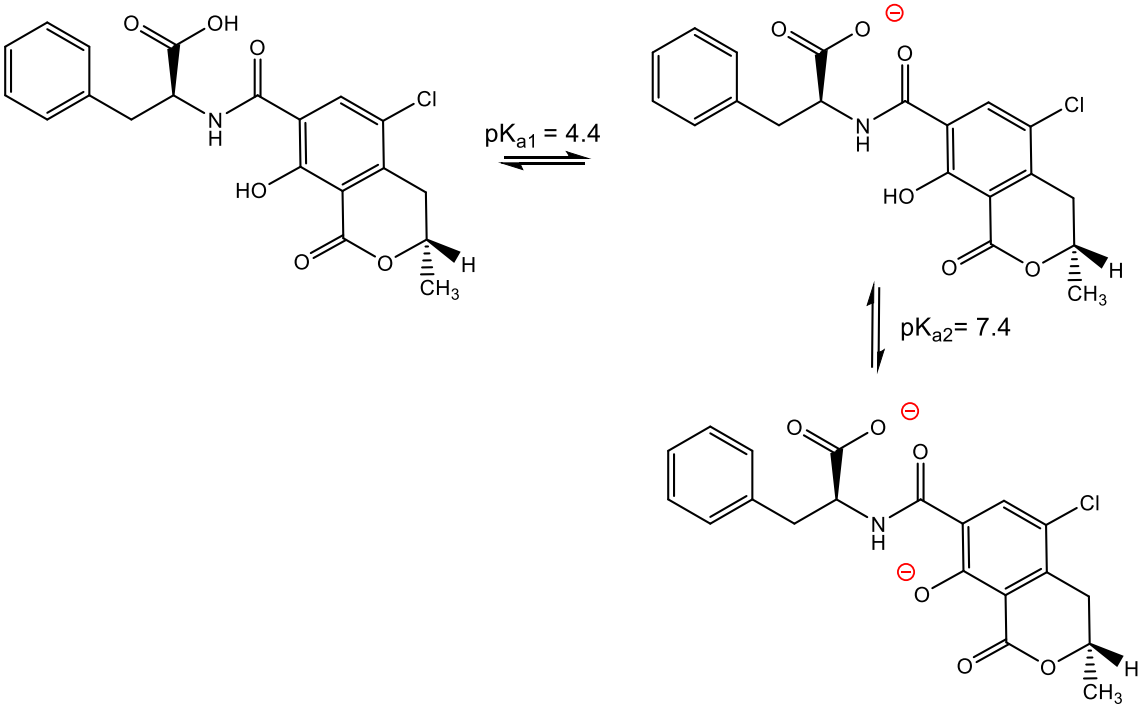
A OTA tem sido encontrada em uma grande variedade de alimentos, cereais e derivados processados, grãos, carne de porco, nozes, temperos, uvas e vinho, café, cerveja e frutos secos.[30,31] As fontes mais significativas de OTA na ingestão diária são cereais, vinho e café.[30]

Figura 5 - Estrutura química da ocratoxina A (OTA).



Fonte: Autoria própria.

Figura 6 - Equilíbrio ácido-base da ocratoxina A.



Fonte: Adaptação a partir de DONHAL, V., 2010.[29]

O efeito adverso mais notável da OTA é a nefrotoxicidade, associada à Nefropatia Endêmica de Balkan (do inglês BEN), que causa degeneração tubular, fibrose intersticial e diminuição da função renal. Em humanos a OTA tem uma taxa de eliminação lenta do organismo (35 dias) quando comparado com ratos (55–120 h) e porcos (70–120 h), o que faz incrementar os efeitos adversos à saúde humana.[26] Como a OTA é lipossolúvel, tende-se a acumular nos tecidos adiposos.[30] Estudos em animais tem demostrado que a OTA também é um agente teratogênico e carcinogênico, por isto a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (do inglês

IARC) a classificou no grupo 2B como possível carcinógeno humano.[31] Os mecanismos de toxicidade ainda não foram complemente elucidados. Devido a sua semelhança à fenilalanina, possivelmente inibe a síntese de proteínas e afeta as rotas metabólicas, interferindo na respiração mitocondrial e na peroxidação lipídica.[26]

A OTA é a micotoxina mais relatada como presente em café verde, torrado e solúvel.[31–38] A Tabela 2 mostra os dados da OTA encontrados em amostras de café do Brasil.[26]

Geralmente, a contaminação com fungo nos cultivos se dá no período pré-colheita. As frutas maduras são as mais suscetíveis a danos e rachaduras e, desse modo, à contaminação. Porém, uma pesquisa mostrou que o *Asperigillus ochraceus* não invade o cafeeiro ou as cerejas de café antes da colheita, e que a maior contaminação com o fungo foi apresentada pelas cerejas que foram coletadas do solo, ou depois dos processos de secagem e armazenamento. O anterior indica que a contaminação no café ocorre após colheita, por fontes contaminadas como o solo e superfícies, pelo que uma escolha adequada dos frutos antes do processamento diminui significativamente a contaminação e proliferação nas etapas posteriores.[26]

Uma vez que frutos contaminados tenham sido colhidos, tanto o processamento dos frutos por via úmida quanto por via seca promove o desenvolvimento dos fungos e, por isto, as cerejas devem ser processadas o mais rápido possível. Uma vez processados, os grãos verdes devem ter um teor máximo de umidade de 14%, e devem ser armazenados controlando rigorosamente a umidade (50–75%) e a temperatura (menor que 26 °C). O café verde, por ser muito higroscópico, é susceptível à contaminação por fungos na etapa do transporte.[26]

Tabela 2 - Prevalência da OTA em café brasileiro.

Tipo de Café	**Espécie**	**No. Positivos / No. Amostras**	**% de Positivos**	**Concentração de OTA ($\mu g\ kg^{-1}$)**
Café verde	Não especifica	2/3	67	2,0–4,0
Café torrado	Arábica	23/34	68	0,3–65,0
	Arábica	41/47	87	1,3–31,5
	Robusta	16/16	100	1,7–23,3
Café solúvel	Arábica	16/16	100	0,5–5,1
	Não especifica	81/82	99	<0,16–10,0

Fonte: Adaptado de VIERRA T., 2014.[26]

Estima-se que com o processo de torrefação, os níveis de OTA podem ser reduzidos entre 65–100%,[39,40] porém, outros estudos mostram que é parcialmente reduzido (14–62%) quando o processo de torrefação é rápido.[26] A OTA é relativamente estável sob os métodos habituais de processamento e torrefação. Devido à sua alta solubilidade em água quente, a quantidade presente em uma xícara de café varia entre 50–80% de OTA, dependendo do modo de preparação.[39,41]

A contaminação por OTA é um problema sanitário e comercial, o que faz necessário à sua regulação. Brasil, Israel, Suíça, Uruguai e a União Europeia tem estabelecido os limites máximos regulatórios (LMR) de OTA em vários alimentos. Atualmente, a Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos e outras nações ainda não tem estabelecidos LMRs para a OTA, já que ainda não há evidências científicas suficientes para comprovar a genotoxicidade da OTA.[42] No Brasil, em 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu os LMR para café torrado (moído ou grão) e café solúvel em 10 µg kg^{-1}.[43] A União Europeia (EU) estabeleceu os LMR de OTA de 5 µg kg^{-1} em café torrado e de 10 µg kg^{-1} em café instantâneo.[44]

1.6 Preparo de amostra

Entre os métodos de análise que tem sido desenvolvidos para a determinação de compostos não voláteis no café, destacam-se aqueles que utilizam técnicas cromatográficas, como por exemplo a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O café representa uma das matrizes mais variáveis e complexas para analisar, pois varia de acordo com o tipo de café, *blends*, tipo de processamento, torrefação, entre outros. A maioria dos métodos analíticos para análise de metilxantinas e micotoxinas requerem um passo adicional de pré-tratamento, extração e/ou concentração dos analitos, além de moagem e filtração da amostra antes da análise instrumental.[45,46]

Entre as técnicas de extração empregadas no preparo de amostra de café estão a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE).[45,46] A LLE é uma técnica simples, que consiste em fazer uma extração com uma mistura de solventes imiscíveis apropriada, geralmente orgânico e aquoso. As desvantagens que esta técnica apresenta são o emprego e descarte de grandes volumes de solventes

orgânicos, maiores custos operacionais, exposição dos analistas a solventes tóxicos, além da formação de emulsões entre as fases que pode resultar na perda do analito.[47]

A SPE é considerada uma das técnicas mais populares de preparo de amostra. Esta consiste na partição líquido-sólido que ocorre dentro de um cartucho de extração contendo um material sorvente, no qual o analito é retido e concentrado da amostra líquida que flui pelo cartucho. A SPE aumenta a seletividade, apresenta facilidade de automação e acoplamento em linha com técnicas cromatográficas. Porém, tem como limitações o alto custo dos cartuchos e dificuldade na seleção do sorvente adequado.[47] A SPE permite a pré-concentração dos analitos por meio de sorventes mais seletivos reduzindo, assim, as etapas de manipulação e preparação da amostra. Dentre os sorventes mais seletivos, tem-se os imunossorventes, materiais de acesso restrito (RAM) e os polímeros molecularmente impressos (MIP).[47]

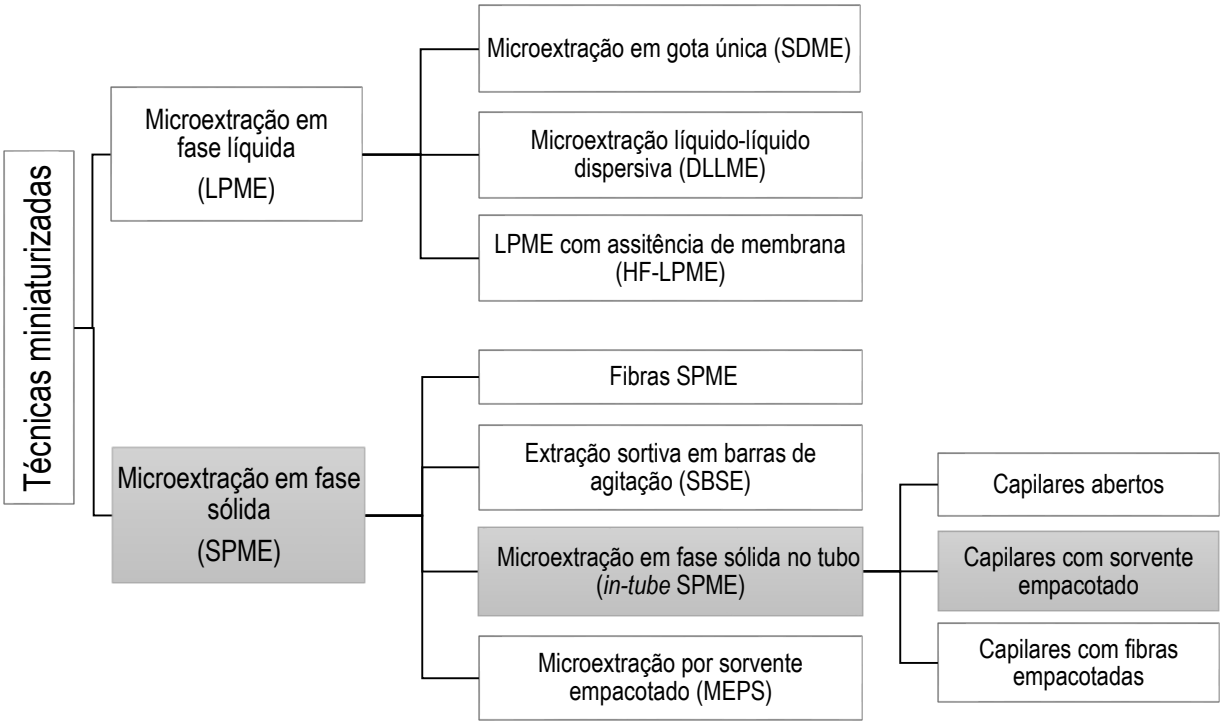
No entanto, novas técnicas miniaturizadas de preparo de amostra que reduzem ou eliminam o uso de solventes, minimizam o volume da amostra e o número de etapas, tem sido desenvolvidas. Estas técnicas, também denominadas técnicas sortivas de extração, estão baseadas no equilíbrio de distribuição do analito entre a matriz da amostra e uma fase extratora. A extração dos analitos depende do coeficiente de partição dos solutos entre as fases.[48,49]

As técnicas miniaturizadas de extração são classificadas em dois grupos principais: microextração em fase líquida (LPME) e microextração em fase sólida (SPME), as quais estão baseadas nos mesmos princípios da LLE e SPE, respectivamente. A Figura 7 apresenta um esquema das técnicas miniaturizadas mais relevantes. Estas técnicas combinam a extração e a concentração do soluto em uma única etapa e permitem a fácil introdução do soluto no sistema cromatográfico empregando o mesmo dispositivo usado na extração. [48]

Atualmente, técnicas miniaturizadas e automatizadas estão sendo empregadas nas análises de xantinas e micotoxinas como a DLLME[50] on-line SPE[51] e on-line *in-tube* SPME[52] em amostras de alimentos. Com o intuito de avaliar novos materiais na extração de xantinas e OTA, a microextração em fase sólida no tubo (*in-tube* SPME) usando sorvente empacotado foi escolhida para desenvolver este projeto, já que permite a fácil automatização do processo quando acoplado a cromatografía líquida

(LC). Além disso, esta técnica miniaturizada tem sido pouco explorada em estudos envolvendo amostras de café.

Figura 7 - Classificação das técnicas miniaturizadas de extração.



Fonte: Adaptado de KATAOKA, H., 2010.[48]

1.6.1 Microextração em fase sólida no tubo (*in-tube* SPME)

A *in-tube* SPME foi desenvolvida como uma melhoria para superar os problemas do acoplamento das fibras de SPME com a cromatografia líquida, incluindo a baixa capacidade e fragilidade da fibra e a instabilidade aos solventes. A *in-tube* SPME é comumente usada na análise de compostos termolábeis ou não voláteis em amostras aquosas.

Essa técnica geralmente emprega como dispositivo de extração uma parte de um tubo capilar (uma coluna capilar aberta de GC) a qual internamente contém uma fase estacionária ou extratora.[53] A extração do analito na *in-tube* SPME, bem como na SPME, está baseada em um processo de equilíbrio, no qual o analito sofre uma partição entre a fase extratora e a amostra. Este equilíbrio pode ser influenciado pelos

seguintes fatores: tipo de sorvente, pH da solução, volume da amostra, comprimento da coluna capilar, número de ciclos e velocidade de extração.[54]

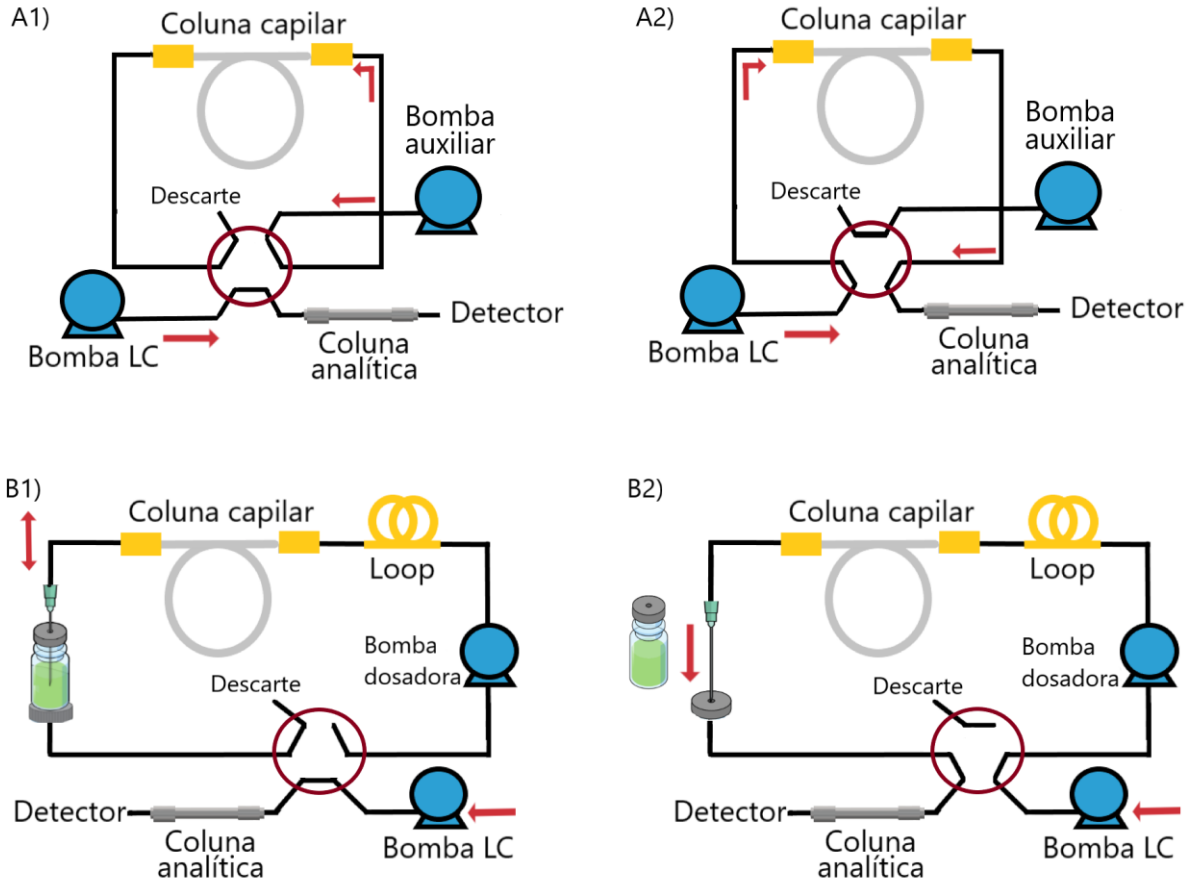
Na *in-tube* SPME o processo de extração dos analitos ocorre no interior do tubo. A amostra flui através do dispositivo capilar, os analitos interagem com a fase extratora e, em seguida, são eluídos pela fase móvel e transferidos para o HPLC. Assim, a extração, concentração, separação e detecção dos analitos são realizadas numa única etapa.[55]

Uma das vantagens mais importantes da *in-tube* SPME é que permite o acoplamento on-line com sistemas LC levando à redução do tempo de análise, uso de solventes orgânicos, custos operacionais e manipulação das amostras, melhorando a sensibilidade e precisão do método analítico, diminuindo os erros experimentais.[55]

O processo automatizado pode ser feito em dois modos de extração: *flow-through*, no qual a amostra passa continuamente em uma única direção pelo capilar, ou no modo *draw-eject*, no qual a amostra é repetidamente aspirada e dispensada no capilar. A Figura 8 apresenta um esquema do sistema *in-tube* SPME nos dois modos de operação.

O sistema on-line *in-tube* SPME-HPLC no modo *flow-through*, utilizado neste projeto, consiste no uso de uma bomba auxiliar; uma coluna de extração capilar instalada em uma válvula de seis pórticos que permite a comutação das colunas de extração e a coluna analítica; e um sistema de HPLC. A introdução da amostra pode ser manual ou automatizada. Na posição de carregamento (Fig. 8-A1), a amostra aquosa passa continuamente pelo capilar, ocorrendo o processo de extração. Depois, a válvula de seis pórticos é girada para a posição de injeção (Fig. 8-A2), para a dessorção e transferência dos analitos da fase extratora para a coluna analítica, para serem separados e detectados no HPLC.[56]

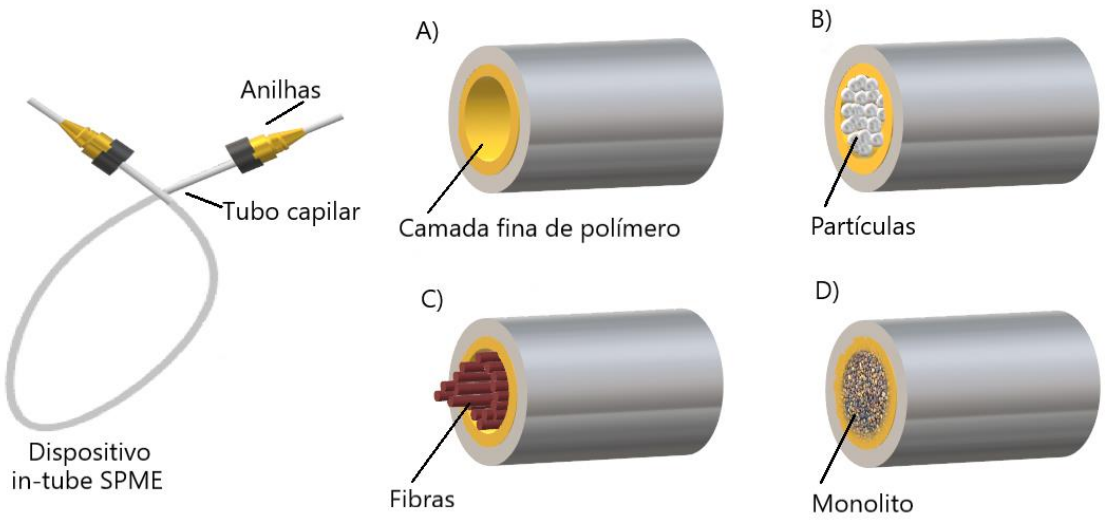
Figura 8 - Esquema da automatização do sistema *in-tube* SPME acoplado on-line com cromatografia líquida no modo (A) *flow-through* e (B) *draw-eject*. (A1 e B1) posição de carregamento (extração), (A2 e B2) posição de injeção (dessorção).



Fonte: Autoria própria.

As colunas de microextração no seu formato original consistiam no uso de um pedaço de coluna capilar de cromatografia gasosa, a qual tem a fase extratora na superficie interna do capilar (Fig 9A) e nos extremos são colocados anilhas que permitem a conexão com os equipamentos. Atualmente também são empregados tubos capilares de materiais como aço inox, poliéter-éter-cetona (PEEK) e politretrafluoroetileno (PTFE) que conferem outras propriedades de resistência a altas pressões ou maior flexibilidade. Adicionalmente, existe uma grande variedade de materiais de preenchimento, disponíveis comercialmente, como octadecilsilano ancorado em sílica (C18), cianopropilsílica, aminosílica, e materiais sintetizados no laboratório (*home-made*) (Fig. 9B); microfibras recobertas com fase extratora (Fig. 9C); ou fases monolíticas que permitem uma alta permeabilidade (Fig. 9D).[57]

Figura 9 - Dispositivos para *in-tube* SPME. (A) capilar aberto com fase polimérica, (B) sorvente empacotado, (C) fibras com recobrimento externo ou interno, (D) fase monolítica.



Fonte: Autoria própria.

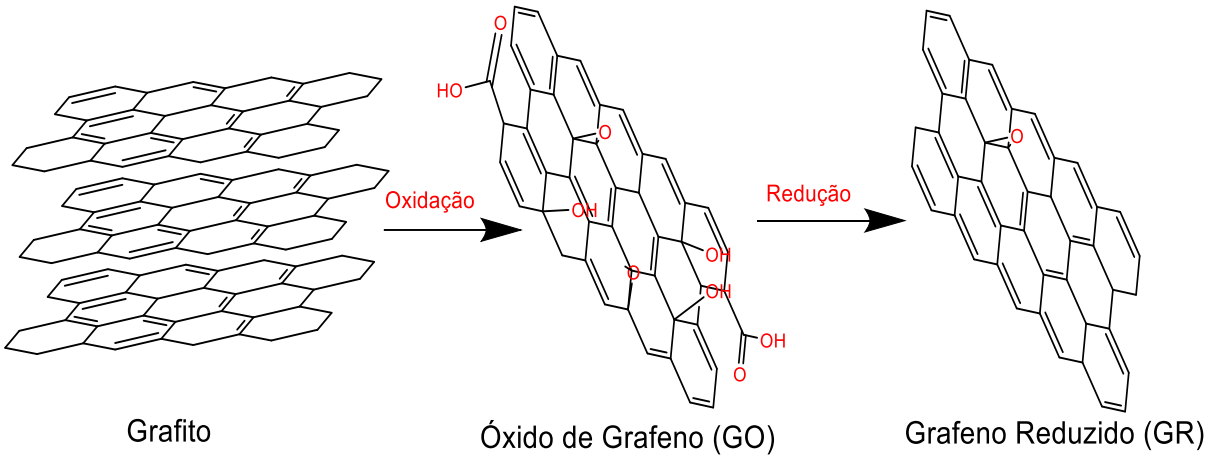
Materiais sorventes clássicos como o octadecilsilano (C18), polidimetilsiloxano (PDMS) e divinilbenzeno (DVB), têm sido empregados na *in-tube* SPME para análises de xantinas em amostras de cacau[58] e ocratoxinas em café verde[59] e vinho[52,60].

Entre as limitações da técnica, tem-se a baixa eficiência e seletividade das fases extratoras convencionais. Como na SPE, a eficiência da técnica melhora com o uso de sorventes seletivos para os analitos e que sejam estáveis em diferentes matrizes e solventes[47]. Recentemente, novos materiais como polímeros molecularmente impressos (MIP), materiais magnéticos e nanomateriais de carbono (nanotubos de carbono, grafito e derivados do grafeno), foram propostos e aplicados no preparo de amostra.[61,62]

1.6.2 Novos materiais baseados em grafeno para o preparo de amostra

O grafeno reduzido (GR) e o óxido de grafeno (GO) têm sido utilizados em várias aplicações devido às suas propriedades eletrônicas, mecânicas, ópticas e térmicas, bem como a sua grande área de superfície (~2700 m^2 g^{-1}).[61] A síntese mais amplamente utilizada para a obtenção de grafeno em grande escala e baixo custo é o método Hummers, no qual parte-se da oxidação de grafite para GO e posterior redução para GR (Fig. 10).[62]

Figura 10 - Síntese de GO e GR.



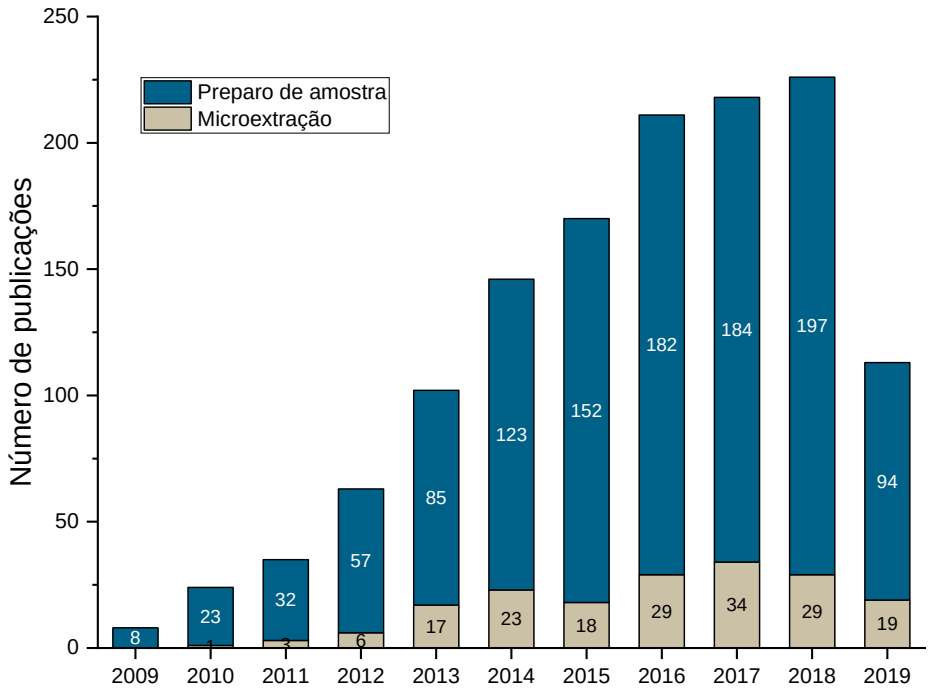
Fonte: Autoria própria.

Em geral, o GR é considerado como um sorvente hidrofóbico, não polar, com uma grande afinidade pelas estruturas de carbono baseadas em anéis aromáticos. Por outro lado, o GO contém grupos polares como carboxila, hidroxila e epóxi, apresentando maior polaridade e, portanto, maior afinidade para a formação de ligações de hidrogênio e/ou interações eletrostáticas com compostos que contém oxigênio ou nitrogênio.[62]

O uso desses materiais como sorventes no preparo de amostra tem sido recentemente uma das alternativas mais promissoras. A Figura 11 apresenta o número de publicações que empregaram o grafeno no preparo de amostra, segundo a base de dados Scopus, na qual se observa uma tendência crescente nos últimos dez anos.[62–64] Porém, o uso de grafeno em técnicas miniaturizadas de preparo de amostra é ainda um número limitado.

Estudos recentes realizados em nosso grupo de pesquisa sobre o uso de GR e GO como sorventes, na extração de parabenos[65] e triazinas[66] em matrizes aquosas e tetraciclinas em leite,[67] demonstraram sua versatilidade e ampla aplicação, com resultados promissores que estimulam a melhor exploração do seu potencial em novas aplicações no preparo de amostra como a *in-tube* SPME.

Figura 11 - Número de publicações para o termo “Sample preparation” AND “graphene” na base de dados Scopus.



Fonte: Scopus, artigos e revisões, data: 06/05/2019.

1.7 Métodos analíticos para a determinação de xantinas em café

A determinação de cafeína se faz usualmente no café torrado como um procedimento de qualidade, pois é um dos parâmetros importantes na caracterização organoléptica e um requisito legal, pois o teor de cafeína deve ser informado na embalagem quando o café é descafeinado.[45]

O método mais utilizado para a detecção e quantificação de cafeína e outras xantinas é a cromatografia líquida em fase reversa com detector ultravioleta-visível (UV-vis) ou espectrometria de massas (MS). Outros métodos eletroquímicos, espectroscópicos e eletroforéticos podem ser empregados, porém devido à complexidade da amostra e aos custos operacionais, prefere-se análise por HPLC-UV-vis.[45]

Para a análise por HPLC, na maioria dos métodos relatados, o café é previamente submetido a um processo de extração sólido-líquido com água quente ou solvente orgânico, filtração, e clarificação ou diluição. As xantinas são altamente solúveis em água ou metanol e estáveis em temperaturas do processamento e

preparo do café. Nesses métodos, a etapa de preparo de amostra é laboriosa sendo a que consome o maior tempo. Portanto, como estratégias para a diminuição do tempo total de analise utiliza-se a semi-automatização, emprego de colunas de separação monolíticas[68] ou core-shell[69], ou de cartuchos de SPE off-line ou on-line.[58,70,71]

Até o momento, somente dois métodos que não empregam preparo de amostra foram encontrados. Huck *et al*. utilizaram espectroscopia vibracional no infravermelho próximo (NIR) para a análise de xantinas diretamente no café moído.[72] O método é rápido (análise feita em segundos), porém precisa-se experiência na interpretação dos dados e calibração do instrumento. Recentemente, Russo *et al*. desenvolveram um método de análise on-line que emprega um cartucho no qual se faz a extração direta na matriz sólida e posterior determinação por HPLC, porém o tempo total da análise se encontra acima dos métodos convencionais.[73]

1.8 Métodos analíticos para a determinação de ocratoxina em café

Para a determinação de OTA em café, primeiramente a OTA deve ser extraída da matriz com um solvente orgânico, água ou uma mistura. O solvente usado, e recomendado no método oficial da AOAC, é metanol (MeOH): água 3% $NaHCO_3$ (1:1, v/v). No entanto, outras proporções (25:75; 80:20 v/v) ou solventes podem ser também usados (água 1% $NaHCO_3$, MeOH, acetonitrila (ACN), etilenoglicol: água 5% $NaHCO_3$, entre outros).[46]

O extrato é posteriormente submetido a uma etapa de limpeza, utilizando LLE ou cartuchos de SPE, preferencialmente empacotados com um sorvente de imunoafinidade, os quais são chamados de colunas de imunoafinidade (IAC). As IAC tem sido um dos avanços mais relevantes na análise de OTA, pois é um sorvente altamente seletivo, permitindo, assim, obter-se limites de detecção baixos (0,1–0,2 ng g^{-1}).[74] As IAC usam anticorpos ligados na superfície do material sorvente, quando o extrato aquoso passa através do cartucho, a OTA (o antígeno) é ligada seletivamente ao anticorpo. Os interferentes passam pelo cartucho e a OTA é posteriormente eluída com um solvente orgânico (MeOH ou ACN), para a posterior análise.[74]

Dentre as vantagens do uso das IAC na análise de OTA estão à obtenção de extratos limpos, a simples operação, a redução de solventes orgânicos, e a

automatização. No entanto, apresenta algumas desvantagens como baixo número de anticorpos na fase, e a dependência de condições ótimas de extração como meio aquoso, pH controlado, força iônica e concentração do extrato de café. Além disso, as IAC têm um tempo de meia vida curto, pois os anticorpos sofrem biodegradação, tem um elevado custo, e apresentam incompatibilidade com alguns solventes orgânicos que desnaturam os anticorpos.[74]

A determinação da OTA pode ser feita por métodos qualitativos como cromatografia em camada delgada (do inglês TLC) e o ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês ELISA), ou por métodos quantitativos como HPLC acoplado a detector de fluorescência (FLD) ou espectrometria de massas sequencial (MS/MS).

A fluorescência natural da OTA permite que esta seja analisada por HPLC-FLD, o qual é altamente sensível e permite obter baixos limites de detecção sem a presença de interferentes, além de apresentar um menor custo de análise quando comparado com MS.[75] A determinação de OTA por FLD é altamente dependente do pH. A OTA, em pH = 3,0, encontra-se majoritariamente como espécie protonada (96%), apresentando comprimento de onda máximo de excitação a 330 nm e de emissão a 460 nm. No entanto, à medida em que o pH é direcionado para valores mais alcalinos (pH > 5,0 a 9,0), a distribuição das espécies monoaniônica e dianiônica da OTA aumentam, favorecendo a conjugação do anel fenólico. Este fato produz um fenômeno denominado fototautomerismo, o qual causa um deslocamento do comprimento de onda máximo de excitação de 330 até 380 nm e de emissão de 460 a 445 nm, respectivamente.[29,75]

O uso de LC-MS/MS permite a confirmação inequívoca da OTA pelo espectro de massas. É uma das técnicas atuais mais importantes que provê bastante informação e permite também a detecção simultânea de outras micotoxinas presentes que não tem a propriedade de fluorescência e a detecção de micotoxinas emergentes ou metabólitos mascarados.[27] Além disso, fornece baixos limites de detecção e quantificação, porém um pouco maiores do que os obtidos com HPLC-FDL.[46]

1.9 Parâmetros de qualidade do método

Os parâmetros de qualidade de um método de análise consiste em uma serie de experimentos que permitem avaliar parâmetros ou figuras de mérito com a finalidade de demonstrar que o método é adequado para a finalidade proposta.[76] A avaliação dos parâmetros de validação varia de acordo com cada guia, porém os parâmetros são basicamente os mesmos. Existem vários guias de validação internacionais e nacionais, entre elas o guia da International Council for Harmonization (ICH)[77] e do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)[76] respectivamente, as quais foram utilizadas para definir os parâmetros a seguir:

Seletividade*:* Capacidade do procedimento analítico de determinar o analito de interesse na presença de interferentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz.

Linearidade: Habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras em uma faixa definida de concentração do analito que se espera encontrar ou avaliar. A faixa de trabalho compreende as concentrações em que a linearidade for atingida, definindo-se, assim, a curva analítica correspondente.

Precisão: Estimativa da proximidade entre os resultados obtidos de ensaios independentes em condições operacionais similares. A precisão pode ser expressa em termos da dispersão dos resultados por meio da repetitividade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade.

A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas nas mesmas condições (mesmo procedimento, analista, equipamentos, etc.) em curtos espaços de tempo. A precisão intermediária é avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, usando o mesmo método analítico no mesmo laboratório, mas variando condições como: dia, analista, equipamento, entre outras. A reprodutibilidade é avaliada mediante a realização de um ensaio interlaboratorial.

Exatidão: Grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. A exatidão pode ser relatada como a porcentagem de recuperação.

Limite de detecção: A menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Para métodos instrumentais, o limite de detecção pode ser determinado pela relação sinal-ruído. A relação sinal-ruído deve ser maior ou igual a 3:1.

Limite de quantificação: A menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. A relação sinal/ruído deve ser no mínimo de 10:1.

Efeito matriz: é um estudo que objetiva verificar possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação da resposta instrumental em métodos que usam análise por LC-MS.

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo desenvolver colunas capilares extratoras a base de grafeno e óxido de grafeno ancoradas a óxidos para a análise de ocratoxina A e xantinas, usando a técnica *in-tube* SPME na etapa de preparo de amostras. O uso desses dispositivos na análise dos compostos de interesse, com aplicações em amostras comerciais de café, foi avaliado e otimizado, utilizando-se HPLC na etapa de separação e determinação dos analitos.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar as fases extratoras baseadas em grafeno e óxido de grafeno ancoradas a óxidos para o preparo de colunas capilares de extração.
- Desenvolver um método para a análise de xantinas e OTA off-line.
- Avaliar o acoplamento on-line das colunas capilares extratoras com HPLC-MS/MS e avaliar as principais figuras de mérito referentes a qualidade do método.
- Aplicar e otimizar o método desenvolvido na análise dos compostos de interesse em amostras comerciais de café.

3. EXPERIMENTAL

3.1 Padrões e reagentes

Padrões de xantinas, teobromina (TB) 99% e teofilina (TF) anidra 99% foram adquiridos da Sigma-Aldrich; enquanto o padrão de cafeína (CAF) 99% foi adquirido da Alfa Aesar. Padrão de ocratoxina A (OTA) 99,5% da Fluka-Analytical.

Para a síntese do óxido de grafeno e dos derivados ancorados as partículas de sílica utilizou-se: grafite em pó < 20 µm, permanganato de potássio ($KMnO_4$) 99%, nitrato de sódio ($NaNO_3$) 99%, N,N-dimetilformamida (DMF), 1,3-dicicloexilcarbodiimida (DCC) 99%, N-hidroxisuccinimida (NHS) 97%, cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e trimetilclorosilano (TMS), todos grau ACS da Sigma-Aldrich. Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 97,9% e imidazol 98% da Mallinckrodt grau AR, ácido clorídrico fumegante 37% (HCl) da Fluka grau AR, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30% da Synth (Diadema, Brasil), hidrato de hidrazina (80% em água) para síntese da Merck, e clorodimetil-n-octadecilsilano (ODS) 95% da Alfa Aesar.

Materiais sorventes: aminopropil sílica gel (Si) esférica 40–75 µm, sílica com grupamentos amina primária-secundária (PSA) da Supelco e material sorvente C18 (35–75 µm) da Alltech.

Os solventes utilizados para as fases móveis foram acetonitrila (ACN), metanol (MeOH), grau HPLC da Tedia, água purificada com um sistema Milli-Q da Millipore, tolueno 99,5% grau ACS da Tedia, ácido fórmico (AcF) 98% da Fluka, e ácido acético glacial 99,9% da J.T. Baker.

3.2 Preparo da solução estoque e de trabalho

Soluções estoque individuais de teobromina e teofilina foram preparadas na concentração de 250 mg L^{-1} e cafeína em 1000 mg L^{-1} em metanol e armazenadas a -4 °C em frascos âmbar. Soluções de trabalho mistas de xantinas foram preparadas em água ultrapura e em matriz de café preparado conforme a necessidade a partir das soluções estoque preparadas anteriormente.

Solução estoque de OTA de 150 mg L^{-1} em metanol e armazenada a -18 °C em frasco âmbar. 1,000 mL da solução estoque foi diluído em 5,000 mL de MeOH (armazenada a -18 °C em frasco âmbar, rotulada solução estoque 2), a concentração exata desta solução foi determinada por espectrofotometria UV-Vis.[78] Para isto, colocou-se 1,000 mL da solução estoque 2 num frasco e foi seco com N_2, e posteriormente redissolvido em 1,000 mL de tolueno: ácido acético (99:1, v/v). Esta solução foi transferida a uma cela de quartzo de 1,0 mL, e determinada sua concentração no comprimento de onda máximo em 333 nm. Soluções de trabalho foram feitas em água ultrapura, assim como em matriz de café preparado em água conforme a necessidade, a partir da solução estoque de aproximadamente 30 mg L^{-1} de OTA em MeOH.

3.3 Síntese dos materiais

3.3.1 Síntese do óxido de grafeno (GO)

O GO foi sintetizado a partir do grafite pelo método de Hummers modificado.[79] Em um balão de 500 mL colocou-se 50,0 mL de H_2SO_4, 1,0 g de grafite e 1,0 g de $NaNO_3$ em agitação constante em um banho de gelo por 2 h. Lentamente, adicionou-se 6,0 g de $KMnO_4$ sob agitação e deixou-se por 1 h. Posteriormente, aumentou-se a temperatura até 40 °C e deixou-se toda a noite. Conforme a reação avança observa-se uma viragem da cor de verde obscuro a marrom claro. A seguir, 40,0 mL de água foram adicionados lentamente sob agitação forte, sendo a solução colocada de novo em um banho de gelo sob agitação ao qual adicionou-se mais 160 mL de água e 10,0 mL de H_2O_2 30% usando um conta-gotas, observando-se uma mudança da cor a amarelo. A solução foi deixada até o dia seguinte para obter um precipitado marrom de GO. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado e o sedimento centrifugado, lavado cinco vezes com uma solução aquosa de HCl (5%, v/v) para remover as impurezas dos íons metálicos e, finalmente, lavado com água até pH neutro. O produto foi redisperso em água sob ultrassom por 30 min e, então, centrifugado a 2500 rpm e liofilizado.

3.3.2 Síntese do grafeno (GR)

Em um balão colocou-se 300,0 mg de GO em 100 mL de água e deixou-se sob ultrassom por 3 h para redispersão. Posteriormente, adicionou-se 80 µL de monoidrato de hidrazina (80%) e colocou-se sob refluxo e agitação a 80 °C por 12 h. O GO foi gradualmente reduzido até formar um precipitado preto (GR). O produto foi filtrado e lavado com água e MeOH, e depois seco na estufa a 40 °C por 24 h.[80]

3.3.3 Síntese do GO ancorado a sílica (Si) e a PSA

Para o acoplamento das folhas de GO em aminopropil sílica (Si) e sílica amina primaria-secundária (PSA), dois métodos de síntese foram comparados.[81] Para a síntese em meio aquoso, 40,0 mg de GO foram dispersos em 80,0 mL de água e sonicados por 1 h. Adicionou-se 0,750 mL de uma solução aquosa 10 mol L^{-1} de EDC/5 mol L^{-1} de NHS e deixou-se sob agitação por 30 min para a ativação das folhas. Posteriormente, 1,0 g de Si foi adicionado sob agitação por 4 h a temperatura ambiente. O sólido foi filtrado e lavado três vezes com MeOH e água, alternadamente, e finalmente liofilizado, ao qual denominou-se $SiGO_{aq}$. O mesmo procedimento foi feito para obter-se o $PSAGO_{aq}$. Adicionalmente GO foi ancorado a partículas de amino sílica de 10 µm para avaliar a influência do tamanho de partícula ($SiGO_{aq}$10µm).

Na síntese em meio orgânico, 40,0 mg de GO foram dispersos em 100 mL de DMF e sonicados por 1 h. Adicionou-se 1,0 g de Si e 40,0 mg de DCC e deixou-se sob agitação por 24 h a 50 °C. O produto foi filtrado e lavado três vezes com MeOH e água, alternadamente, e finalmente liofilizado; denominou-se $SiGO_{org}$. O mesmo procedimento foi feito para obter-se o $PSAGO_{org}$.

A aminopropil sílica com grafeno reduzido (SiGR) foi obtida a partir da redução do $SiGO_{aq}$ e do $SiGO_{org}$.[65] Para isto, 200,0 mg do material ($SiGO_{aq}$ ou $SiGO_{org}$) foram colocados em 10,0 mL de água, seguido pela adição de 120 µL de monohidrato de hidrazina (80%). A mistura foi agitada por 2 h sob refluxo a 95 °C e depois filtrado e lavado com água e MeOH alternadamente, e então, seco na estufa, sendo denominado $SIGR_{aq}$ e $SIGR_{org}$. O mesmo procedimento foi feito para obter $PSAGR_{aq}$ e $PSAGR_{org}$ a partir do $PSAGO_{aq}$ e do $PSAGO_{org}$, respectivamente.

3.3.4 Funcionalização das partículas com ODS e endcapping

Em um balão de duas bocas acoplado a um condensador de Friedrich, e sob atmosfera de nitrogênio, colocou-se 400,0 mg de $SiGO_{aq}$ em 4,0 mL de tolueno seco, seguido da adição de 5,0 mg de imidazol dissolvido em 400 µL de tolueno e de 40,0 mg de ODS em 600 µL de tolueno. A reação foi deixada sob refluxo por 5 h com aquecimento no banho de óleo. As partículas funcionalizadas foram filtradas e lavadas com tolueno, MeOH, MeOH: água (1:1, v/v), e MeOH. O produto foi seco na estufa a 40 °C por 24 h e, finalmente, submetido ao processo de *endcapping* usando 50 µL de TMS, empregando as mesmas condições descritas anteriormente. O material obtido foi denominado $SiGO_{aq}$C18ecap. Da mesma forma, foi feito o material SiGO-endcapping, empregando somente 100 µL de TMS (denominou-se $SiGO_{aq}$ecap).[82] Do mesmo jeito foram obtidos os materiais $PSAGO_{aq}$ecap, $PSAGO_{org}$ecap, $PSAGO_{aq}$C18ecap e $PSAGO_{org}$C18ecap.

3.4 Caracterização das fases

Os materiais sintetizados foram caracterizados utilizando-se um espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) modelo IRAffinity-1 da Shimadzu® (Kyoto, Japan). Os espectros foram obtidos na faixa de 4000 a 400 cm^{-1}, utilizando discos de KBr. A morfologia dos materiais foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando um microscópio modelo LEO 440 da ZEISS-Leica® (Cambridge, Inglaterra).

3.5 Instrumentação e condições cromatográficas para avaliação da capacidade extratora das fases

As análises foram realizadas em um sistema HPLC (Prominence LC–20A da Shimadzu®) com detector de UV-Vis. A coluna utilizada foi uma Poroshell 120 Fenil-hexil (2,1 mm de d.i x 100 mm de comprimento; 2,7 µm de d.p) da Agilent®. As condições cromatográficas foram: volume de injeção 20 µL, temperatura da coluna 40 °C, comprimento de onda 274 nm, vazão 0,200 mL min^{-1}, fase móvel água (A): ACN (B), em um programa de gradiente por solvente (10% B por 2 min, a 50 % B em 5 min, mantendo em 50% B até 8 min e voltando a 10% B em 10 min).

Foram realizadas as curvas analíticas para TB, TF e CAF pelo método de padronização externa, usando água ultrapura fortificada nas seguintes concentrações: 20, 50, 100, 200 e 500 µg L^{-1}, avaliadas em triplicata.

3.5.1 Avaliação da capacidade extratora dos materiais sintetizados

Foram pesados 10,0 mg de cada material sintetizado em um tubo do tipo *eppendorf* de 2 mL, em duplicata. As fases foram condicionadas primeiramente com MeOH (1,000 mL) sob ultrassom por 4 min e depois centrifugadas (14000 rpm, 5 min). Na sequência, o mesmo procedimento foi feito duas vezes com água (1,000 mL x 2).

Para o processo de extração, foi adicionado 1,000 mL da solução dos padrões a 100 µg L^{-1} em água ultrapura no material previamente condicionado. Então, o tubo foi agitado em um minishaker (1000 rpm, 1 h), e centrifugado (14000 rpm, 5 min). Finalmente, o sobrenadante foi filtrado por membrana de celulose (0,45 µm) e transferido a um vial para posterior injeção de 20 µL no HPLC-UV-Vis.

A área do pico obtida para o sobrenadante foi comparada com a área da solução padrão (100 µg L^{-1}), e pela diferença entre as áreas foi determinada a porcentagem de analito sorvida no material.

3.5.2 Avaliação do solvente de eluição

Foram pesados 5,0 mg do material mais seletivo em um tubo *eppendorf* de 2 mL, em duplicata. As fases foram condicionadas primeiramente com MeOH (1,000 mL) sob ultrassom por 4 min e depois centrifugadas (14000 rpm, 5 min). Na sequência, o mesmo procedimento foi feito duas vezes com água (1,000 mL x 2).

Para o processo de extração foi adicionado 1,000 mL da solução de 100 µg L^{-1} dos padrões, o tubo foi agitado em um minishaker (1000 rpm, 1 h) e depois centrifugado (14000 rpm, 10 min). O sobrenadante foi descartado. 200 µL de solvente de eluição foram adicionados à fase, e então deixados sob ultrassom (4 min) e centrifugado (14000 rpm, 5 min). Em seguida, o sobrenadante foi filtrado e transferido a um vial para posterior injeção de 20 µL no HPLC-UV-Vis.

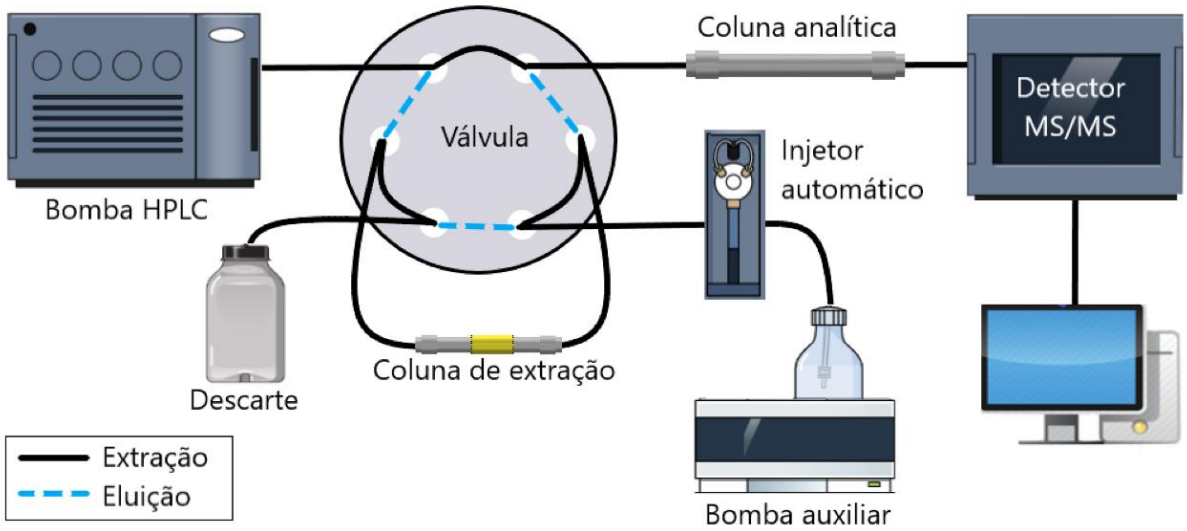
3.6 Montagem do sistema *in-tube* SPME acoplado a UPLC-MS/MS

O sistema *in-tube* SPME acoplado a um UPLC-MS/MS foi configurado no modo de extração *flow-through*, na qual a amostra passa uma única vez pela coluna capilar em uma única direção. Os analitos foram eluídos no modo *back-flush,* ou seja, no sentido contrário ao carregamento da amostra para evitar o alargamento das bandas cromatográficas.

O sistema *in-tube* SPME foi conectado ao UPLC-MS/MS por meio de uma válvula externa de seis pórticos Supelpro® da Supelco e operada pelo software do cromatógrafo em duas posições, 1: carregamento e 2: eluição.

Na posição de carregamento, a amostra (50 µL) é levada até a coluna de extração pela fase de carregamento por meio de uma bomba auxiliar LC–20AT Shimadzu, a qual se encontra conectada ao injetor automático. A amostra passa pela coluna de extração, a qual retém os compostos de interesse e os interferentes são levados ao descarte. Posteriormente, a válvula gira à posição de eluição e, assim, a fase móvel do cromatógrafo passa pela coluna capilar (*back-flush*) transferindo os analitos à coluna analítica onde ocorre a separação e posterior detecção e quantificação pelo MS/MS. O esquema da operação do sistema e mostrado na Figura 12.

Figura 12 - Esquema da montagem *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS utilizado no modo de extração *flow-through* e de eluição *back-flush*.



Fonte: Autoria própria.

Aproximadamente 20,0 mg do material que apresentou a maior capacidade de extração de xantinas (avaliado como descrito em 3.5.1) foi empacotado em uma coluna capilar (0,50 mm de d.i x 100 mm de comprimento; frit de 10 µm) de aço inox pelo método de *slurry packing* usando-se uma mistura de THF:IPA (1:6, v/v) para suspender o material e água como solvente de empacotamento com ajuda de uma bomba pneumática Haskel modelo DSHF–122. A Figura 13 apresenta um esquema da montagem de microcoluna utilizada na extração dos analitos.

Figura 13 - Esquema da microcoluna de extração empregada.

Fonte: Autoria própria.

3.7 Instrumentação e condições cromatográficas do sistema *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS na análise de xantinas

As análises foram realizadas em um sistema Acquity/UPLC - Ultra Performance LC (Waters) acoplado a um detector XEVO TQ MS (Waters) com ionização a pressão atmosférica por *electrospray* (ESI). A coluna analítica foi uma Poroshell 120 Fenil-hexil (2,1 mm de d.i. x 100 mm de comprimento; 2,7 µm de d.p.) da Agilent, utilizada nas seguintes condições: temperatura da coluna, 40 °C; temperatura do injetor, 20 °C; fase móvel A: água: ácido fórmico 0,1%, B: MeOH: ácido fórmico 0,1%, em modo isocrático 25% de B; vazão 0,200 mL min^{-1} e volume de injeção 50 µL no modo full-loop. O tempo total do método foi de 12,5 min.

As condições do ESI foram: modo de ionização positivo; voltagem do capilar, 3,0 kV; voltagem do cone, 30 V; temperatura da fonte, 150 °C; temperatura de dessolvatação, 350 °C; vazão do gás de dessolvatação N_2, 900 L h^{-1}; vazão do gás de colisão Ar, 0,15 mL min^{-1}, tempo de aquisição de dados (dwell time) de 0,067 s. Os dados obtidos foram analisados pelo software MassLynx (versão 4.1).

As condições do MS foram otimizadas pela infusão direta dos padrões de TB, TF e CAF em uma concentração de 0,500 µg mL^{-1} em fase móvel. As análises foram realizadas no modo monitoramento de reações selecionadas (SRM) com as transições descritas na Tabela 3.

Para a análise das xantinas no *in-tube* SPME on-line foram utilizadas as condições apresentadas na Tabela 4.

Tabela 3 - Transições monitoradas no modo SRM e condições usadas para análise das xantinas.

Analito	**Íon precursor *(m/z)***	**Íon *fragmento* *(m/z)***	**Voltagem do cone (V)**	**Energia de colisão (V)**	**Tempo de retenção (min)**
Teobromina	181	67[a] 138	30	28 24	3,18
Teofilina	181	69 96 124[a]	30	24 24 18	4,00
Cafeína	195	42 110 138[a]	30	26 22 20	5,74

[a] Transição de quantificação.

Tabela 4 - Condições usadas para análise de xantinas no sistema *in-tube* SPME.

Etapa	**Tempo (min)**	**Fluxo de carregamento (mL min^{-1})**	**Fase móvel Coluna de extração**
Extração dos analitos[a]	0,0–0,5	0,100	100% água
Eluição e lavagem	0,5–7,0	0,200	Fase móvel da coluna analítica programação isocrática MeOH: água (25:75, v/v)[b].
Condicionamento da coluna	7,5–10,0	0,100	100% água

[a] Injeção no modo full-loop (50 µL).

[b] As fases móveis do HPLC foram acidificadas com 0,1% ácido fórmico.

3.8 Avaliação dos parâmetros determinantes da eficiência do processo *in-tube* SPME para as xantinas

A otimização foi feita univariadamente em matriz de café descafeinado preparado em água ultrapura (como descrito em 3.9.), e fortificado a 50,0 µg L^{-1} com TB, TF e CAF. Os parâmetros estudados foram: tempo de carregamento, volume de injeção, fluxo de carregamento e tipo de solvente de carregamento.

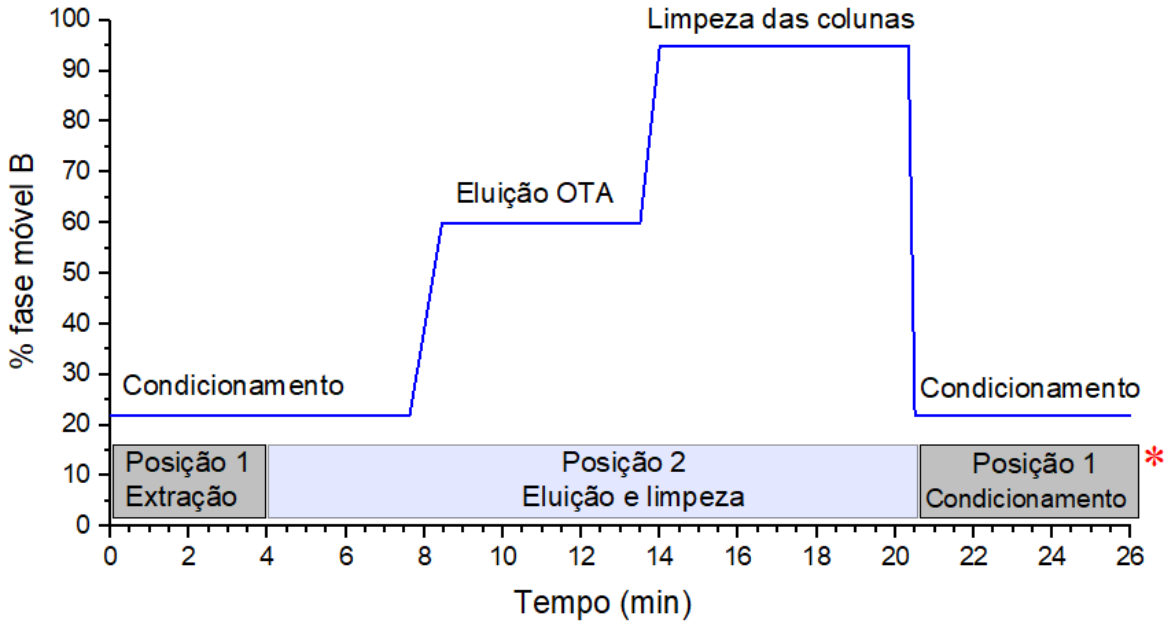
3.9 Análise das xantinas em amostras de café

Foram analisadas 14 amostras de café comercial, de café moído e café solúvel, de origem brasileira e colombiana. As amostras foram obtidas de estabelecimentos de venda local em São Carlos, SP, Brasil e em Bogotá, Colômbia. As amostras foram armazenadas em um lugar seco e protegido da luz. As amostras de café solúvel foram moídas em um gral até obter pó fino. 50,0 mg da amostra foram adicionados em um erlenmeyer, em seguida, adicionou-se 50,0 mL de água quente (80 °C) e agitado com um bastão de vidro, uma vez frio o extrato foi centrifugado e uma alíquota de 0,100 mL foi diluída a 10,00 mL com água ultrapura. A seguir, 1,000 mL da solução foi filtrado por membrana 0,20 µm e transferido a um vial para posterior injeção de 50 µL (modo full-loop) no sistema *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS.

3.10 Instrumentação e condições cromatográficas *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS na análise de ocratoxina A

As análises foram realizadas em um sistema UPLC-MS/MS descrito em 3.9. A coluna analítica foi uma Poroshell 120 SB-C8 (2,1 mm de d.i. x 100 mm de comprimento; 2,7 µm de d.p.) da Agilent, utilizada nas seguintes condições: temperatura da coluna, 40 °C; temperatura do injetor, 15 °C; volume de injeção 50 µL no modo full-loop; vazão 0,200 mL min^{-1}, fase móvel A: água: ácido fórmico 0,1%, B: ACN: ácido fórmico 0,1%, no modo gradiente de eluição por etapas (Fig. 14). Tempo total do método foi de 26 min. A agulha do injetor foi lavada entre cada injeção com um ciclo de lavagem adicional.

Figura 14 - Gradiente de eluição por etapas empregado para a análise de OTA e condições de configuração da válvula de comutação no *in-tube* SPME (*).



Fonte: Autoria Própria.

As condições usadas no ESI foram: modo de ionização positivo; voltagem do capilar, 3,0 kV; voltagem do cone, 16 V; temperatura da fonte, 150 °C; temperatura de dessolvatação, 400 °C; vazão do gás de dessolvatação N_2, 800 L h^{-1}; vazão do gás de colisão Ar, 0,15 mL min^{-1}, tempo de aquisição de dados (*dwell* time), 0,620 s.

As condições do MS foram otimizadas utilizando o padrão de OTA em uma concentração de 100 µg L^{-1} em fase móvel. As análises foram realizadas no modo monitoramento de reações selecionadas (SRM) usando as transições descritas na Tabela 5. Os dados obtidos foram analisados pelo software MassLynx (versão 4.1).

Para a análise da OTA no *in-tube* SPME on-line foram utilizadas as condições apresentadas na Tabela 6.

Tabela 5 - Transições monitoradas no modo SRM na análise de OTA.

Analito	**Íon precursor *(m/z)***	**Íon fragmento *(m/z)***	**Voltagem do cone (V)**	**Energia de colisão (V)**
Ocratoxina A	404	221 239[a]	24	36 26

[a] Transição de quantificação.

Tabela 6 - Condições usadas para análise de OTA no sistema *in-tube* SPME.

Etapa	Tempo (min)	Fluxo de carregamento (mL min^{-1})	Fase móvel Coluna de extração[b]	Posição da válvula
Extração dos analitos[a]	0,0–4,0	0,150	15% ACN	1 Carregamento
Eluição	4,0–13,5	0,200	Fase móvel da coluna analítica programação gradiente 22–60% ACN (Fig. 14)	2 Eluição
Lavagem	14–20,5	0,200	Fase móvel da coluna analítica programação gradiente 95% ACN (Fig. 14)	2 Eluição
Condicionamento da coluna	20,5–26,0	0,150	15% ACN	1 Carregamento

[a] Injeção no modo full-loop (50 µL).

[b] Todas as fases móveis foram acidificadas com 0,1% ácido fórmico.

3.11 Avaliação dos parâmetros determinantes da eficiência do processo *in-tube* SPME para a ocratoxina A

Para otimização dos parâmetros de extração foram levados em conta os resultados obtidos na extração de xantinas e decidiu-se fixar o volume de amostra injetada em 50 µL, ou seja, operando no modo full-loop. Os parâmetros de fluxo, tempo e composição da fase de carregamento (variação na porcentagem de ACN) foram otimizados por análise univariada. A otimização foi avaliada em matriz de café descafeinado preparado em água ultrapura (como descrito em 3.12) e fortificado com OTA a 10,0 µg L^{-1}.

3.12 Análise da ocratoxina A em amostras de café solúvel

Foram analisadas 4 amostras de café comercial solúvel de origem colombiana. As amostras foram obtidas de estabelecimentos de venda local (Bogotá, Colômbia) e foram armazenadas em um lugar seco e protegido da luz. As amostras de café solúvel foram moídas em um gral até obter pó fino. A 1,000 g da amostra em um tubo falcon adicionou-se 10,0 mL de água ultrapura fervente (100 °C), o tubo foi agitado no minishaker (1000 rpm, 10 min), e centrifugado (14500 rpm, 10 min). 1,000 mL do

extrato foi filtrado primeiramente por membrana de 0,45 µm e depois por membrana de 0,22 µm, e transferido a um vial para posterior injeção de 50 µL (modo full-loop) no sistema *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS.

3.13 Parâmetros de qualidade do método

O guia Q2B: Validation of Analytical Procedures do ICH[77] foi utilizada para a avaliação das figuras de mérito: seletividade, efeito matriz, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

A seletividade foi avaliada pela comparação da injeção dos extratos de café descafeinado branco e fortificado ao nível 2 da curva analítica a fim de verificar a presença ou não de possíveis interferentes que coeluam no mesmo tempo de retenção do analito.

O efeito matriz foi avaliado determinando se os sinais dos analitos obtidos em solvente e na matriz apresentavam diferenças significativas. Para isto foram comparadas as áreas obtidas na matriz de café e em água, em três pontos da faixa de concentração de trabalho.

Para o estabelecimento da linearidade foram construídas curvas analíticas em cinco níveis de concentração (em triplicata), sendo avaliada mediante inspeção visual da curva e mediante testes e métodos estatísticos apropriados. O coeficiente de correlação (r), coeficiente angular ou inclinação (b) e o intercepto (a), e a somatória dos resíduos, foram estimados. Como critérios de aceitabilidade tem-se $r \geq 0,99$, inspeção visual da linearidade e os resíduos individuais não devem ser maiores que ± 20%.[76]

Para a avaliação estatística da inclinação (b), do intercepto (a) e do coeficiente de correlação (r), aplicou-se o teste t de Student calculando-se o desvio padrão dos residuais ($S_{x/y}$) - Eq.1, da inclinação (S_b) - Eq. 2, do intercepto (S_a) - Eq. 3, assim como os valores de t_{cal} definidos pelas equações 4, 5 e 6, respectivamente.[83] As hipóteses nulas empregadas foram: para o intercepto (a), H_0= o intercepto não é significativamente diferente de zero (a=0); para a inclinação (b), H_0= a inclinação não é significativamente diferente de zero (b=0); e para o coeficiente de correlação (r), H_0= não existe correlação entre a concentração e a resposta do analito.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad \text{(Eq. 1)}$$

$$S_a = S_{y/x}\sqrt{\frac{\sum(x_i{}^2)}{n\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{(Eq. 2)}$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{(Eq. 3)}$$

$$t_a = \frac{a}{S_a} \;\; ; \;\; t_b = \frac{b}{S_b} \;\; ; \;\; t_r = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad \text{(Eq. 4; 5; 6)}$$

Adicionalmente, a regressão e o desvio da linearidade ou falta de ajuste foram avaliados mediante uma análise de variância (ANOVA) e teste F,[83,84] considerando o modelo de regressão linear simples. Como critérios de aceitação foram usados: para a regressão linear, se $F_{calculado} \geq F_{tabelado}$ existe uma correlação entre *y* (resposta) e *x* (concentração), ou seja, há regressão significativa na curva analítica; para o desvio da linearidade, se $F_{calculado} \leq F_{tabelado}$ não existe desvio significativo da linearidade na curva analítica, sendo o modelo considerado satisfatório.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados como sendo a concentração do analito que apresentava sinal de 3 e 10 vezes a relação sinal/ruído da matriz branco, respectivamente.

A precisão foi expressa em termos da repetitividade, foram feitos nove experimentos (três níveis por triplicata), nas mesmas condições e no mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada com cinco experimentos (em duplicata), realizados em dois dias diferentes.

A exatidão foi verificada pela fortificação de 9 amostras de café em três níveis na faixa de concentração da curva analítica (baixo, médio e alto) e realizados em triplicata, sendo expressa como porcentagem de recuperação. O valor da porcentagem de recuperação foi obtido através da equação 7. Onde, C_f = o teor medido após fortificada a matriz branca, C_{nf} = o teor medido na matriz não fortificada, e C_{ad} = o teor do analito puro adicionado à matriz branca:

$$R(\%) = \frac{C_f - C_{nf}}{C_{ad}} x\ 100 \quad \text{(Eq. 7)}$$

Por último, foi avaliado o fator de concentração do sistema on-line *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS, calculados pela comparação das áreas das mesmas amostras injetadas no sistema on-line e injetadas no sistema off-line. As amostras foram avaliadas nos níveis baixo, médio e alto das curvas analíticas, em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos materiais

A comparação das bandas registradas nos espectros vibracionais na região do infravermelho correspondentes ao grafite, óxido de grafeno e grafeno (Fig. 15), evidencia a obtenção do GO a partir de grafite, confirmado pela aparição das seguintes bandas: estiramento O-H em 3382 cm^{-1}, estiramento C=O em 1728 cm^{-1}, estiramento C-C em 1620 cm^{-1}, dobramento C-O-H em 1220 cm^{-1}, e dobramento C-O-C em 1054 cm^{-1}, o que sugere a presença de grupos funcionais oxigenados tais como hidroxilas, epóxidos e carbonilas nas folhas.[85]

No espectro do grafeno são observadas duas bandas em 1550 cm^{-1} e 950 cm^{-1}, correspondentes ao estiramento C=C e ao dobramento C-O-H, respectivamente, além da redução significativa dos estiramentos relacionados com funções oxigenadas que estavam presentes no GO, o que sugere que o GO foi reduzido pela hidrazina.

Os espectros IR para a aminopropil sílica (Si), o GO acoplado a Si ($SiGO_{aq}$), e $SiGO_{aq}$ funcionalizado com C18 e *endcapping* ($SiGO_{aq}$C18ecap e $SiGO_{aq}$ecap) são apresentados na Figura 16. No espectro da aminopropil sílica é observado o dobramento Si-H em 803 cm^{-1}, uma banda intensa e ampla em 1100 cm^{-1} característica do estiramento Si-O, uma banda em 1630 cm^{-1} correspondente ao dobramento N-H que sugere uma ligação peptídica entre o GO e a Si e um estiramento Si-O-H em 3420 cm^{-1}.[81,86]

Nos espectros do $SiGO_{aq}$ e $SiGO_{aq}$ecap é observado um aumento da banda de estiramento Si-O-H, o que pode ser atribuído ao aumento dos grupos OH presentes nas folhas do GO. Para o espectro de $SiGO_{aq}$C18ecap, observa-se uma redução na banda do estiramento O-H, e a aparição de duas bandas em 2928 cm^{-1} e 2856 cm^{-1}, atribuídas aos estiramentos assimétricos C-H do metileno ($-CH_2-$), o que sugere que a ligação da C18 na partícula de SiGO efetivamente ocorreu.

Figura 15 - Espectro FTIR do grafite, óxido de grafeno (GO) e grafeno (GR).

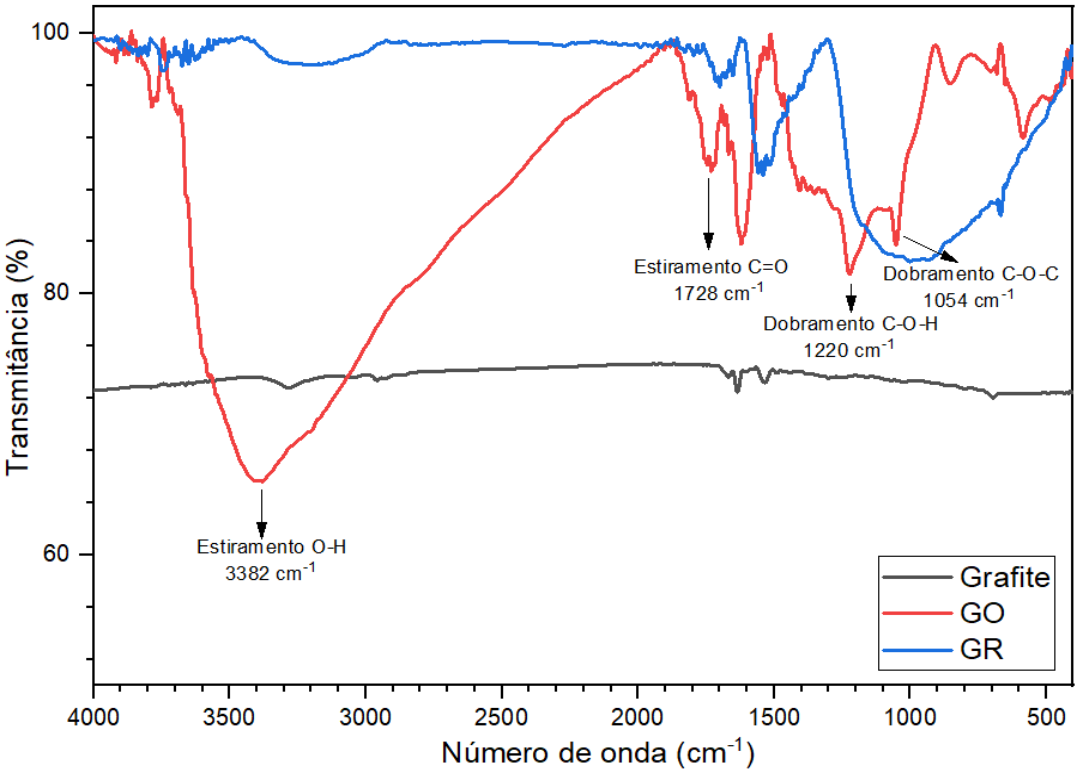
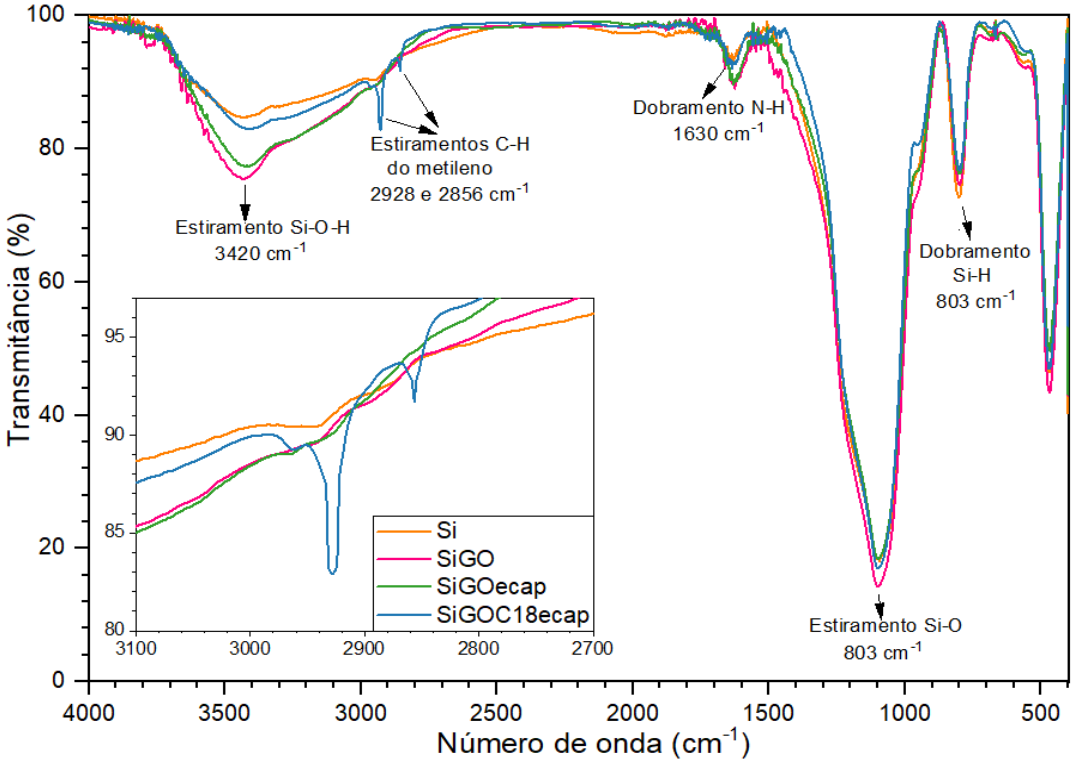


Figura 16 - Espectro FTIR dos materiais Si (amarelo), $SiGO_{aq}$ (rosa), $SiGO_{aq}$ecap (verde) e $SiGO_{aq}$C18ecap (azul).



A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar a morfologia dos materiais sintetizados. Na Figura 17 pode-se observar a estrutura de folhas do GO (A), as partículas esféricas e lisas da Si (B), e o acoplamento do $SiGO_{aq}$ em meio aquoso (C) e meio orgânico (D). Observou-se que pelos dois métodos de síntese as folhas do GO foram ancoradas na superfície da Si, o que permite usá-la como suporte. No entanto, foi evidenciado um maior recobrimento das partículas sintetizadas no meio aquoso quando comparadas com o meio orgânico, conservando a estrutura das folhas do GO, o que sugere que essa síntese é mais factível, porque evita a aglomeração das folhas e deixa uma maior área superficial exposta para interagir com os analitos. Além disso, essa síntese leva menos tempo (4 h comparado com as 24 h no meio orgânico).

A Figura 18 mostra uma fotografia dos materiais sintetizados. Observa-se a troca da coloração da Si (branca) quando ancorada ao GO (coloração marrom), e a mudança depois do processo de redução a uma cor cinza (SiGR), fato que evidencia o aumento do teor de carbono presente no material.

Figura 17 - SEM dos materiais sintetizados: (A) folhas de óxido de grafeno, GO, (B) aminosilica, Si, (C) GO ancorado a Si em meio aquoso, $SiGO_{aq}$ e (D) GO ancorado a Si em meio orgânico, $SiGO_{org}$.

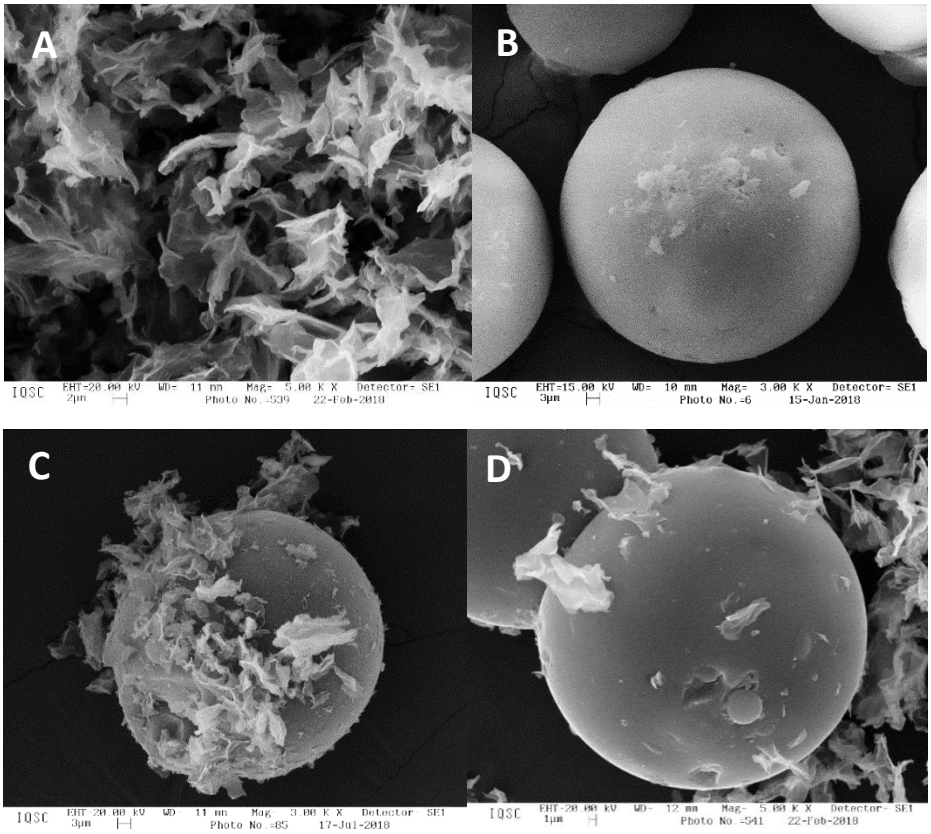


Figura 18 - Fotografia dos materiais sintetizados. Da esquerda para a direita: Si, $SiGO_{aq}$, $SiGO_{org}$ e $SiGR_{aq}$.

Em uma segunda etapa, os materiais ancorados em PSA, uma vez sintetizados, foram diretamente avaliados na extração de xantinas, pois se achava que pelo fato de ter dois grupamentos aminas diferentes (primaria e secundária) o recobrimento com as folhas poderia ser maior, e a eficiência na extração também aumentaria. Porém, os resultados da avaliação na extração (mostrados posteriormente na Figura 22) apresentaram um menor desempenho quando comparado com as partículas sintetizadas a partir de aminopropil sílica, e por esta razão, estes materiais não foram caracterizados.

4.2 Avaliação da capacidade extratora dos materiais sintetizados

A avaliação da capacidade extratora dos materiais foi feita por HPLC-UV-vis e um teste de extração dispersiva off-line como descrito na seção 3.5 e 3.5.1, respectivamente.

O método cromatográfico desenvolvido para a análise de TB, TF e CAF mostrou uma separação adequada, apresentando resolução cromatográfica (R_s) entre os picos superior a 2,8, sendo os analitos detectados a 274 nm, em tempo de análise total de 10 min. As curvas analíticas obtidas para cada analito foram ajustadas ao modelo de regressão linear simples e mostraram coeficientes de correlação maiores que 0,99. Os parâmetros cromatográficos e as equações da reta são apresentados na Tabela 7.

Posteriormente, os 15 materiais sintetizados a partir de Si e PSA, e os materiais empregados como suporte (Si e PSA), e fase C18 comercial foram avaliados, empregando uma solução padrão de TB, TF e CAF a 100 µg L^{-1} cada, preparada em

água ultrapura (como descrito em 3.5.1). Foram injetadas no sistema cromatográfico a solução padrão, em quadruplicata, passando pelo processo de extração sem fase, e a área obtida foi comparada com a área da solução padrão passando pelo processo de extração com cada fase, em duplicata. A Figura 19 apresenta um exemplo do cromatograma obtido da solução dos padrões antes e depois do processo de extração com a fase SiGOaqecap. Deste modo, foi possível determinar pela diferença das áreas a porcentagem de xantinas sorvidas nos materiais (Figuras 20, 21 e 22).

Os materiais sintetizados contendo derivados do grafeno suportados em aminopropil sílica (Si) foram comparados com o material de partida (Si) e com octadecilsilano suportado em sílica, C18 (Fig. 20). Observa-se que as partículas da Si ao serem recobertas com as folhas de GO, tanto em meio orgânico (SiGOorg) quanto em meio aquoso (SiGOaq), aumentam a extração dos analitos de interesse ao redor de 25%. Este fato pode ser atribuído ao recobrimento das partículas com as folhas de GO que aumenta a área superficial e o caráter hidrofóbico das partículas permitindo, assim, uma maior interação e afinidade com os analitos.

Tabela 7 - Parâmetros cromatográficos e curvas analíticas para a avaliação das fases extratoras por HPLC-UV-Vis.

Analito[a]	**t_R (min)**	**W_b**	**Resolução**	**Equação da reta**	**R^2**
Teobromina (TB)	2,540	0,401	$Rs_{(TB-TF)}$: 2,8	y= 87,0x + 444,4	0,9994
Teofilina (TF)	3,806	0,495	$Rs_{(TF-CAF)}$: 4,1	y= 85,3x + 179,6	0,9992
Cafeína (CAF)	5,505	0,328		y= 67,2x + 142,2	0,9996

T_R: tempo de retenção; W_b: largura na base do pico; R_s: resolução.

Figura 19 - Cromatogramas obtidos pela injeção de solução padrão a 100 ug L^{-1} realizando o processo de extração das xantinas sem fase (preto), e do sobrenadante obtido depois do processo de extração com a fase SIGOaqecap (vermelho), analisados por HPLC-UV-Vis a 274 nm.

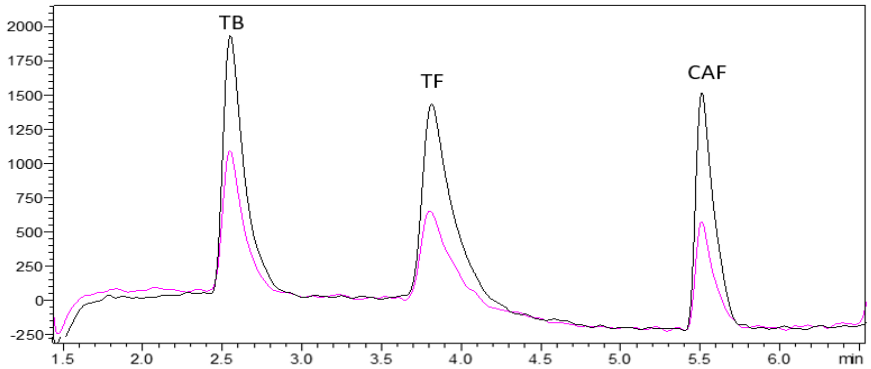
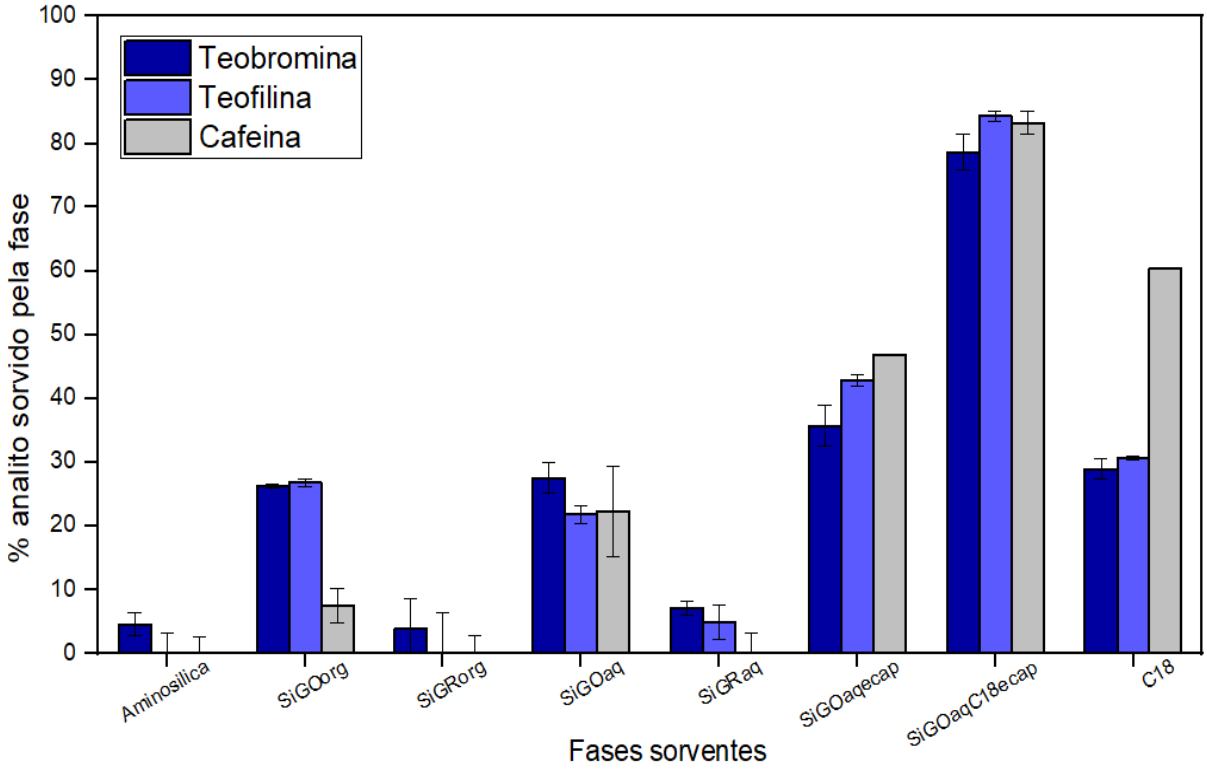


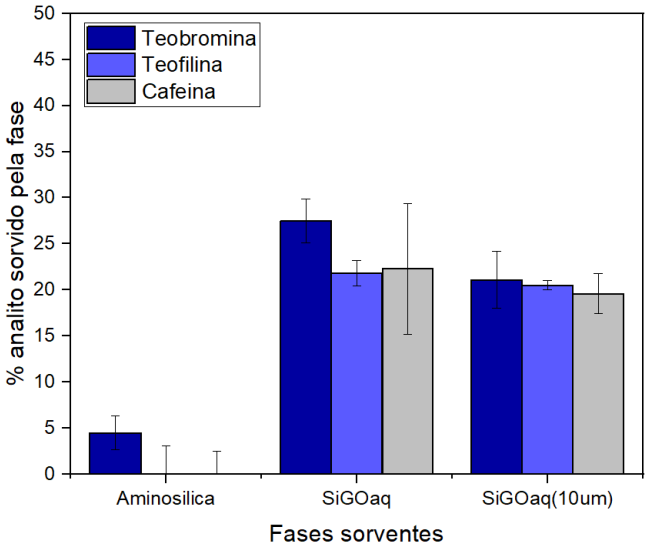
Figura 20 - Resultados da avaliação da capacidade extratora das fases sorventes baseadas em aminopropil sílica.



Observa-se que quando estas partículas são reduzidas ($SiGR_{org}$ e $SiGR_{aq}$) a extração dos analitos diminui, o que permite afirmar que os analitos apresentam uma maior interação com os grupamentos oxigenados do GO, demostrando a importância destes, possivelmente devido a interações do tipo ligações de hidrogênio. Observa-se também que o material $SiGO_{aq}$ sintetizado em meio aquoso, apresenta uma maior extração da cafeína, o que é refletido em um aumento da porcentagem geral da extração das xantinas, quando comparado com o material sintetizado no meio orgânico $SiGO_{org}$. Por esta razão, o material $SiGO_{aq}$ foi escolhido para fazer as posteriores sínteses.

Para avaliar a influência do tamanho da partícula na extração, pois quanto menor o tamanho de partícula maior a área superficial disponível para ser recoberta com o GO, foram ancoradas folhas de GO em partículas de aminopropil sílica de 10 µm ($SiGO_{aq}$10µm) e comparadas com $SiGO_{aq}$ (d.p 40–70 µm) na extração das xantinas. Os resultados mostram que o tamanho da partícula não apresenta diferença significativa na extração dos analitos (Fig. 21).

Figura 21 - Resultados da influência do tamanho de partícula na capacidade extratora das fases sorventes $SiGO_{aq}$ de d.p. 40–75 µm e 10 µm.



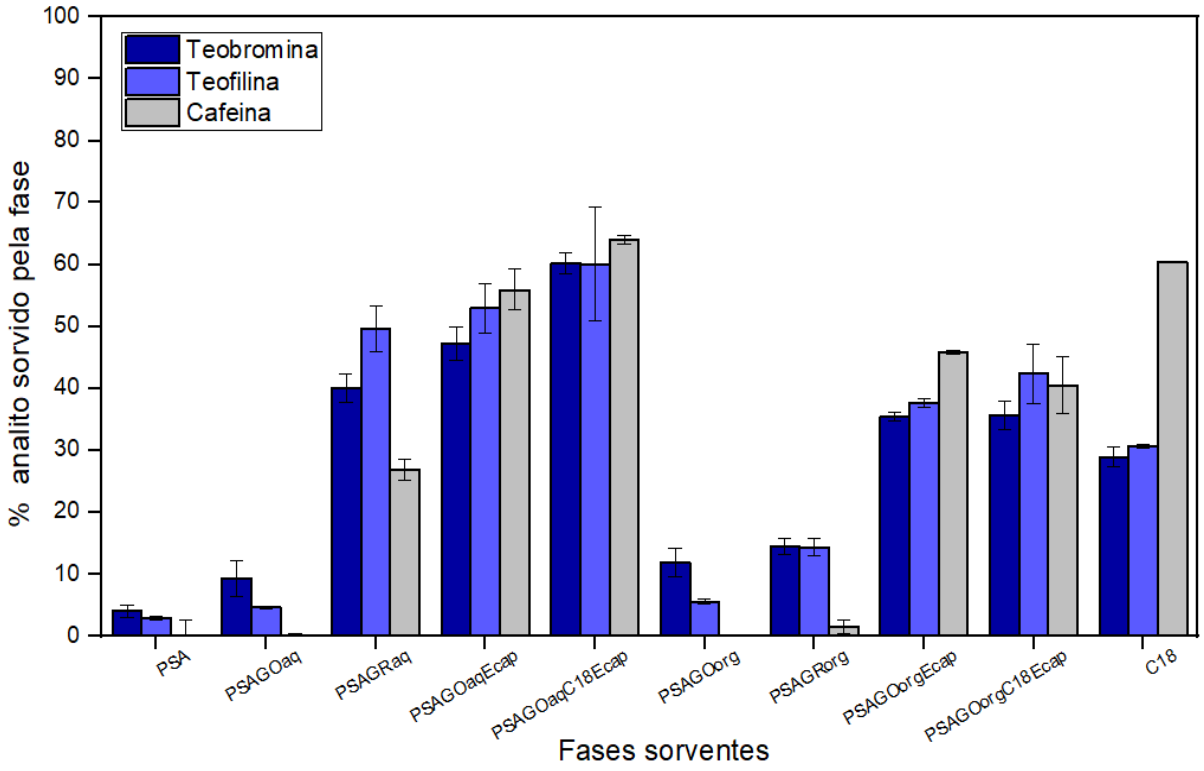
A posterior funcionalização de $SiGO_{aq}$, com o procedimento de *endcapping* ($SiGO_{aq}$ecap) (Fig. 20), permitiu o acoplamento de grupos trimetilsilanos nos agrupamentos OH disponíveis na superfície da partícula, por substituição do H do grupo silanol por grupos CH_3 tornando-a mais hidrofóbica, e aumentando a eficiência de extração (35–46%). Quanto a funcionalização com ODS/*endcapping* ($SiGO_{aq}$C18ecap), apresentaram no geral a maior retenção para todas as xantinas (~80%). Este fato pode estar relacionado com o recobrimento das folhas do GO na aminopropil sílica, já que aumenta a área superficial desta e, assim, permite uma maior área disponível para o C18 reagirem com os grupamentos OH livres na superfície, incrementando a quantidade de carbono na partícula tornando-a mais hidrofóbica, o que aumenta sua capacidade de extração.

A fase comercial utilizada sem adição de derivados de grafeno e sem *endcapping,* ou seja, apenas C18, apresentou uma eficiência entre 29% e 35% para a extração de teobromina e teofilina, respectivamente, e uma preferência na extração de cafeína (65%). Estes resultados, quando comparados com a fase sintetizada de $SiGO_{aq}$C18ecap, a qual apresenta porcentagens de extração entre 80% e 85%, para todas as xantinas, permitem concluir que a fase sintetizada é mais eficiente na extração destes analitos.

Os resultados da sorção dos analitos nos materiais baseados em PSA são apresentados na Figura 22. Observa-se que o gráfico apresenta em geral o mesmo comportamento dos materiais baseados em Si, pois ao serem recobertos com GO e posteriores funcionalizações com ODS e/ou *endcapping* apresentam uma melhora na extração das xantinas. Observa-se, também, que os materiais sintetizados em meio aquoso apresentam uma maior extração dos analitos (10–60%) quando comparados com os sintetizados em meio orgânico (10–45%). Este resultado pode estar relacionado ao maior recobrimento do material suporte ou melhor eficiência da reação. Além disso, é um processo mais eficiente dentro do conceito de química verde ("Green Chemistry"), pois consome menos tempo de síntese e gera menor quantidade de resíduo químico.

Em geral, ao serem comparados os dois tipos de suportes (Si e PSA) é possível afirmar que nos dois casos os materiais sintetizados no meio aquoso apresentam melhores resultados do que em meio orgânico, e que a funcionalização GO/ODS/*endcapping* apresenta maior seletividade na extração de xantinas quando comparado com as partículas suporte não funcionalizadas, e com a C18 comercial.

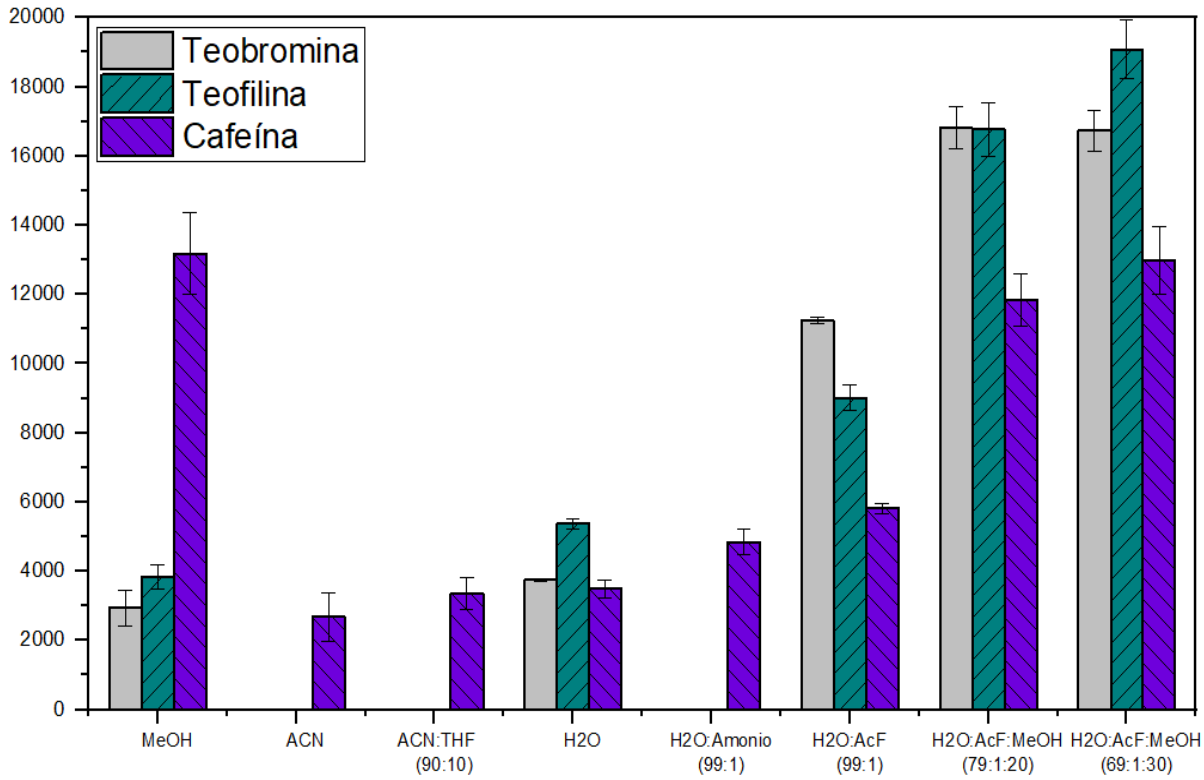
Figura 22 - Resultados da avaliação da capacidade extratora das fases sorventes baseadas em PSA.



A partir destes resultados foi possível determinar que o material que apresenta a maior seletividade é $SIGO_{aq}C18ecap$, o qual será utilizado no formato de microcoluna na próxima fase.

Com a fase $SiGO_{aq}C18endcap$, a qual foi escolhida como a fase com maior capacidade de extração das xantinas, fizeram-se testes do solvente mais adequado para eluir os analitos da fase sorvente como descrito em 3.5.2 (Fig. 23). Dos solventes orgânicos estudados (MeOH, ACN e ACN: THF (9:1, v/v)) o MeOH apresentou a maior capacidade de eluição, mostrando uma maior preferência na eluição da cafeína, seguido pelas outras duas xantinas. Os demais solventes orgânicos eluíram apenas a cafeína, porém em menor quantidade quando comparada com o MeOH. Dos solventes aquosos, a eluição com água apresentou resultados similares ao MeOH, eluindo as três xantinas, porém, quando a água é acidificada apresenta uma melhora na eluição destas, diferente de quando está basificada.

Figura 23 - Resultados da avaliação do solvente de eluição.



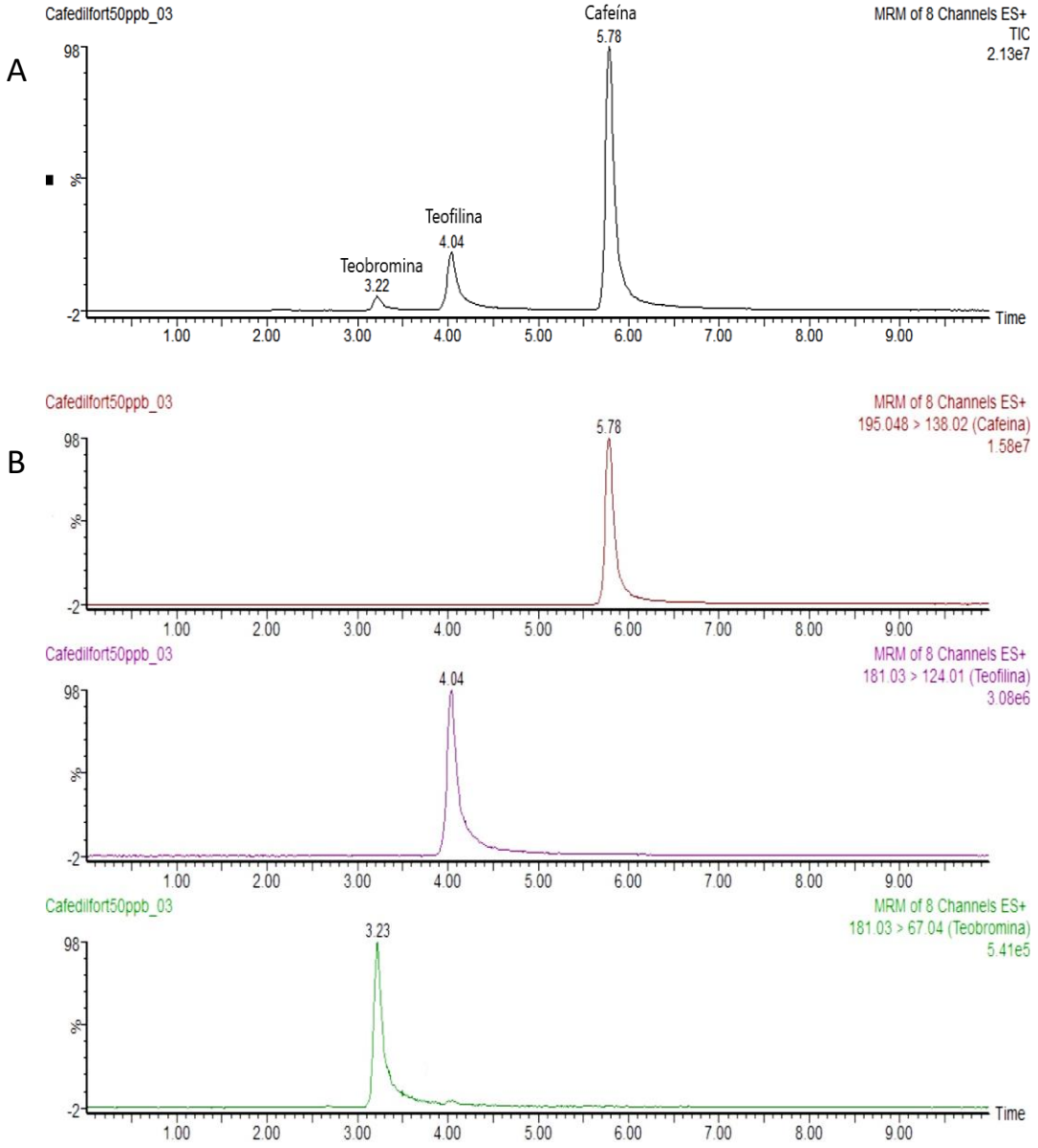
Os solventes polares próticos solubilizam melhor as xantinas favorecendo as ligações de hidrogênio, e a acidificação do meio promove a protonação das xantinas permitindo a elas terem maior afinidade pela fase móvel. Dos resultados anteriores decidiu-se avaliar uma mistura dos solventes água: ácido fórmico: MeOH (79:1:20, v/v/v) e (79:1:30, v/v/v), os quais apresentaram uma maior capacidade na eluição dos analitos, sendo assim selecionados como solventes de eluição (Fig. 23). Estes resultados indicam que as xantinas interagem com a fase estacionária por diferentes mecanismos, como interações π-π devido ao sistema de anéis aromáticos com elétrons π deslocalizados na estrutura do GO, os quais interagem com os anéis aromáticos das xantinas, assim como também ligações de hidrogênio através dos grupos amina e carbonila disponíveis, além de fenômenos adsorção.

4.3 Avaliação do sistema *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS na análise de xantinas

Com os resultados dos testes anteriores procedeu-se à avaliação do $SiGO_{aq}$C18ecap como dispositivo de extração on-line no sistema *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS. Também a partir dos resultados do solvente de eluição, decidiu-se utilizar como fases móveis água e MeOH acidificados. As condições do sistema de extração *in-tube* SPME, assim como os parâmetros otimizados para a separação cromatográfica e quantificação de xantinas, são descritos em 3.7 e 3.8, respectivamente.

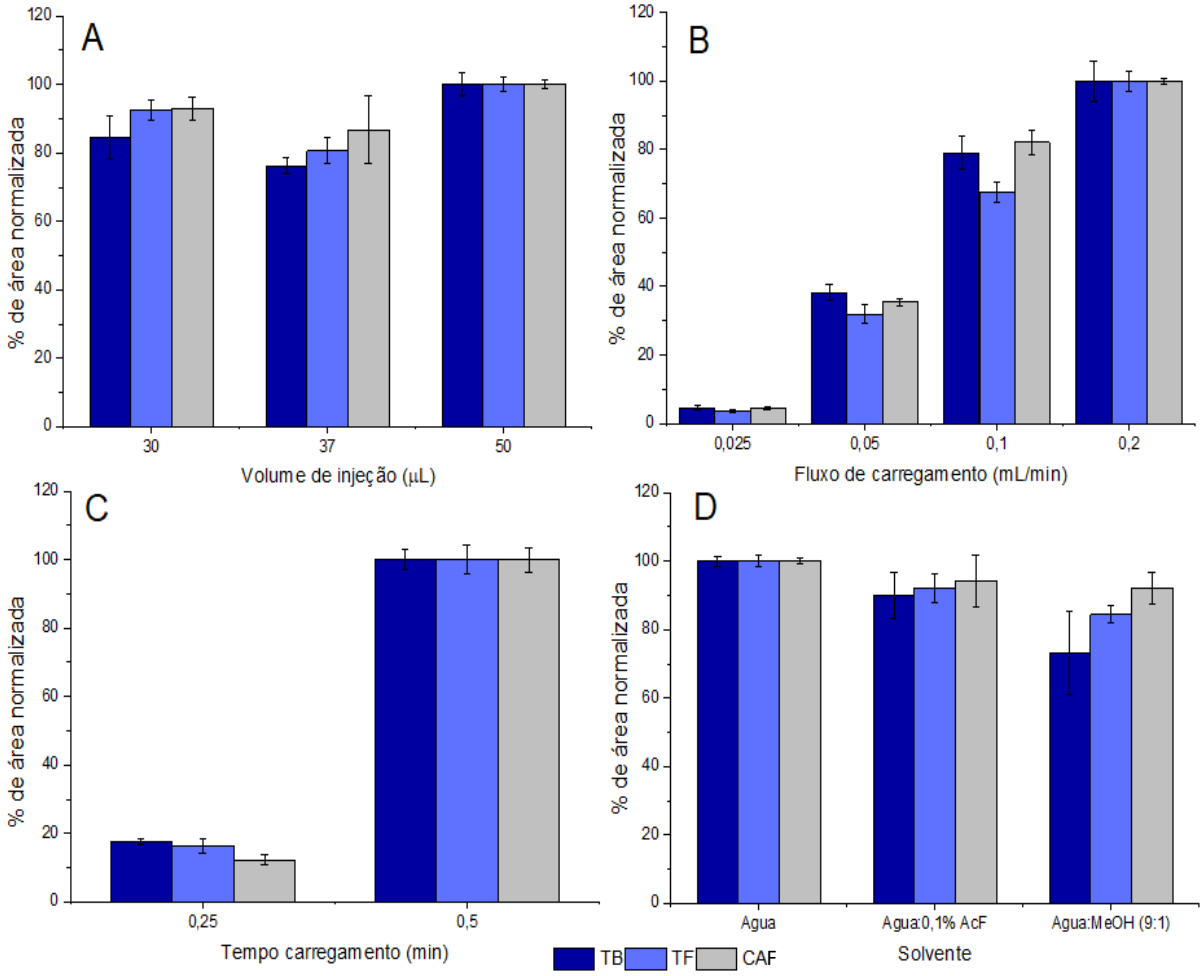
O cromatograma do íon total (TIC) (Fig. 24A) mostra que o sistema de extração *in-tube* SPME conseguiu extrair as três xantinas da amostra, apresentando separação dos picos na linha base, e repetitividade nas análises. A Figura 24B apresenta os cromatogramas de massas individuais para os analitos estudados, com suas transições de quantificação monitoradas no modo SRM: para teobromina *m/z* 181→67; para teofilina *m/z* 181→124 e para cafeína *m/z* 195→138.

Figura 24 - Cromatogramas de (A) íon total (TIC) do café descafeinado fortificado a 50,0 µg L^{-1} e (B) monitoramento das transições de quantificação no modo SRM.



Os parâmetros determinantes da eficiência do processo de extração tais como: volume de injeção, tempo de carregamento da amostra, fluxo de carregamento e natureza do solvente, foram estudados de forma univariada. Os resultados são apresentados na Figura 25 como porcentagem de área de pico normalizada em relação à maior reposta obtida. Todas as determinações foram feitas em matriz de café descafeinado preparado e fortificado com as xantinas a 50,0 µg L^{-1} e com injeções por triplicata.

Figura 25 - Estudo univariado das principais variáveis determinantes da eficiência de extração no sistema *in-tube* SPME. (A) volume de injeção, (B) fluxo de carregamento, (C) tempo de carregamento e (D) solvente de carregamento.



O volume de injeção (Fig. 25A) foi avaliado, no modo partial-loop 30 µL e 37 µL, e no modo full-loop 50 µL. Entre estes o modo full-loop permitiu obter as maiores recuperações para os três analitos, pois quanto maior volume de injeção, maior quantidade de analito entra no dispositivo para ser extraído e, portanto, foi escolhido 50 µL para a execução dos experimentos seguintes.

O parâmetro de fluxo de carregamento (Fig. 25B) foi avaliado em quatro níveis (0,025; 0,050; 0,100 e 0,200 mL min^{-1}). Observou-se que fluxos mais rápidos favorecem maiores recuperações, resultando em maiores áreas cromatográficas para todos os analitos. Embora o fluxo de 0,200 mL min^{-1} gerou os melhores resultados, esta condição aumenta a pressão da microcoluna extratora, diminuindo o tempo de vida útil desta. Além disso, a medida em que aumenta a pressão folhas de GO podem

ser desprendidas da fase estacionária e ocasionar entupimento dos frits; portanto, foi escolhido 0,100 mL min^{-1} como fluxo de carregamento.

O tempo de carregamento da amostra (Fig. 25C) foi avaliado em três níveis: 0,25 min; 0,50 min e 0,75 min, porém os resultados com o tempo de 0,75 min foram excluídos pois o pico da cafeína apresentou um alongamento de banda significativo que interferia com a sua quantificação. Para os três analitos o tempo de 0,50 min gerou as maiores respostas cromatográficas; portanto escolheu-se esse tempo para avaliar o parâmetro seguinte.

Finalmente, foi avaliada a influência do tipo de fase de carregamento (Fig. 25D) sendo testadas três fases móveis: água ultrapura 100%; água: AcF 0,1%; e água: MeOH (90:10, v/v). Observa-se que para todos os analitos as maiores áreas foram obtidas com 100% de água. Este fato concorda com os resultados anteriormente obtidos do solvente de eluição, pois ao acidificar ou ao adicionar metanol na fase de carregamento, os analitos terão menor afinidade pela fase extratora; por esta razão foi escolhida água ultrapura como fase de carregamento.

4.4 Validação do método *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS na análise de xantinas

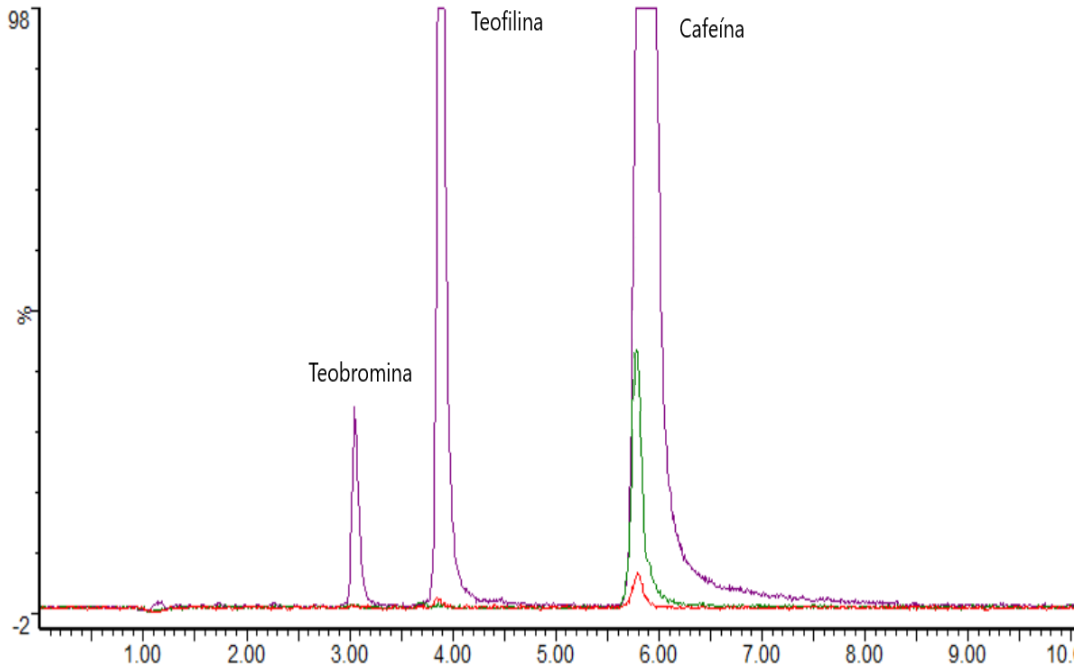
Com as condições de extração e separação otimizadas procedeu-se à avaliação das seguintes figuras de mérito.

4.4.1 Seletividade

Este parâmetro foi avaliado pela injeção da matriz branco de café descafeinado moído e solúvel, sendo a matriz de café fortificada ao segundo nível da curva analítica (Fig. 26). O método demostrou ser seletivo para teobromina (3,17 min) e teofilina (3,97 min) pois não apresentou coeluição de picos interferentes no tempo de retenção destes analitos. Para a cafeína foi observado um pico no tempo de retenção (5,86 min) tanto para café moído (traço vermelho) como para café solúvel (traço verde), e verificou-se pelas transições das massas que a cafeína se encontra presente nas amostras de café descafeinado, o que é normal, pois o processo de descafeinação não retira totalmente a cafeína da matriz permitindo estar presente num teor de 0,1 e

0,3% máximo no café descafeinado moído e solúvel, respectivamente.[14,87] Como a cafeína se encontra presente naturalmente na matriz e é o mesmo analito a ser avaliado, o método então se considera seletivo para cafeína, não havendo outros interferentes presentes na matriz.

Figura 26 - Comparação entre os cromatogramas de café moído descafeinado branco (vermelho), café solúvel descafeinado branco (verde) e café fortificado ao segundo nível da curva analítica (roxo).



4.4.2 Efeito Matriz

Avaliou-se também este parâmetro, com o intuito de estimar-se o efeito matriz na determinação de xantinas. Para tal foram determinados os sinais dos analitos em água e em matriz de café. Os resultados apresentados na Tabela 8 mostram que o efeito matriz não é significativo na faixa de trabalho avaliada pois os resultados encontram-se dentro da precisão do método. Embora a matriz de café seja considerada complexa, o preparo de amostra na análise das xantinas desenvolvido dilui consideravelmente a matriz (pois partiu-se de uma solução de 1,0 mg de café/mL de água e posterior diluição 1:100 em água), pelo qual não apresentou contribuição no aumento ou supressão do sinal analítico.

Tabela 8 - Avaliação do efeito matriz das xantinas em água e na matriz.

Analito	Concentração (µg L^{-1})	CV(%)	($Área_{matriz}$/ $área_{água}$)*100
Teobromina	0,5	8,6	104
	5	6,2	101
	20	1,4	93
Teofilina	0,5	6,5	102
	5	7,1	96
	20	1,6	96
Cafeína	50	8,9	105
	200	3,9	99
	500	3,3	100

4.4.3 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram avaliados pela diluição sucessiva dos padrões na matriz branco até obter-se 3 e 10 vezes a relação sinal-ruído, respectivamente. A relação sinal ruído foi calculada pelo software MassLynx no modo *peak-to-peak* como apresentado na Figura 27 para a determinação do LOD em cada xantina. A Tabela 9 apresenta os limites de detecção e quantificação obtidos para cada analito em µg L^{-1}.

Figura 27 - Cromatogramas obtidos na determinação dos limites de detecção de (A) teobromina, (B) teofilina e (C) cafeína.

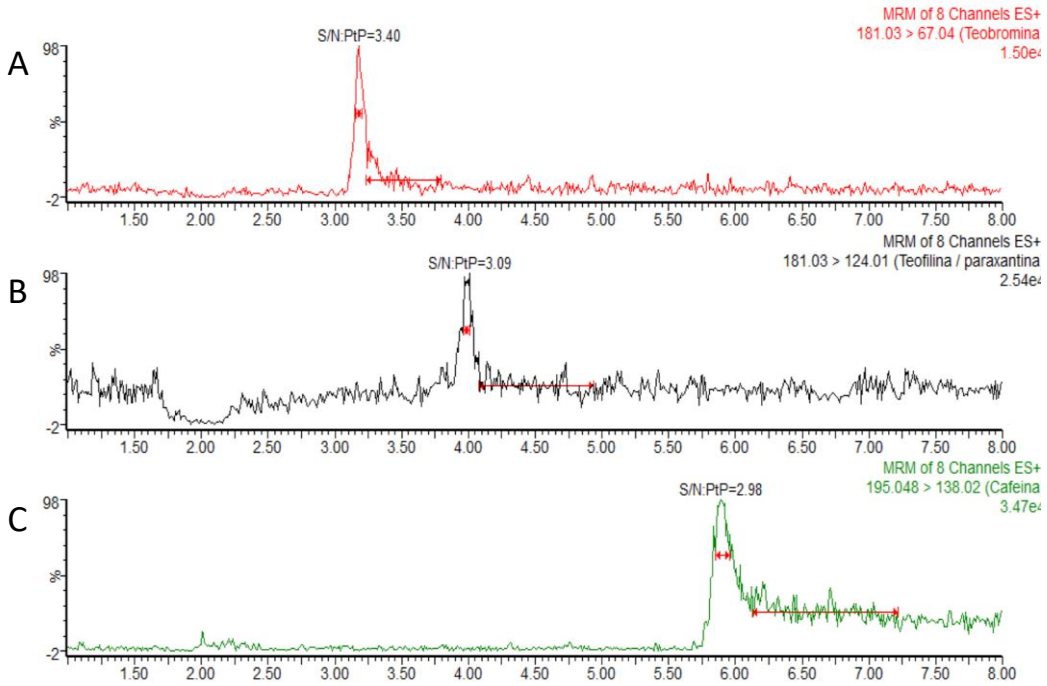


Tabela 9 - Limites de detecção e quantificação determinados para as xantinas.

Analito	LOD (µg L^{-1})	LOQ (µg L^{-1})
Teobromina	0,2	1,0
Teofilina	0,1	0,5
Cafeína	0,1	0,3

As curvas analíticas foram feitas estabelecendo como primeiro nível de calibração o LOQ anteriormente calculado; porém para a cafeína o primeiro nível começou em 50,0 µg L^{-1} e foi estabelecido como novo LOQ para a faixa de trabalho utilizada.

A Tabela 10 apresenta os limites de detecção e quantificação para cafeína em amostras de café e chá de trabalhos publicados, empregando diferentes métodos de extração e de análise cromatográfica. Observa-se que os limites de detecção e quantificação para matriz de café no trabalho aqui descrito são os mais baixos, o que demonstra o potencial da *in-tube* SPME-HPLC-MS/MS na determinação de xantinas em baixas concentrações e sua aplicabilidade na análise de amostras complexas. Também observa-se que a microtécnica *in-tube* SPME fornece os menores limites de detecção tanto em matriz de café como em chá.

Tabela 10 - LOD e LOQ de métodos publicados na análise de cafeína em amostras de café e chá.

Matriz	Técnica de extração	Método analítico	LOD (µg L^{-1})	LOQ (µg L^{-1})	Referencia
Café	*In-tube* SPME	HPLC-MS/MS	0,1	0,3	Este trabalho
Café	SPE	HPLC-UV	200	600	71
Café	UAD	HPLC-UV	1,9	5,17	88
Café	UAD	µLC-UV	50	160	68
Café	DLLME	HPLC-UV	460	1540	89
Café	DLLME	GC-NPD	20	50	50
Café	-	OLE-LC	31	56	73
Café	LLE	HPLC-MS/MS	11,9	39,6	90
Chá	*In-tube* SPME	HPLC-ESI-MS	0,01	-	91
Chá	UAD µ-dSPE	HPLC-UV	0,09[a] 0,17[b] 0,11	3,00[a] 0,55[b] 0,37	79

[a] Teobromina, [b] Teofilina. - : não definido.

UAD: extração assistida por ultrassom; DLLME: microextração líquido-líquido dispersiva; µ-dSPE: microextração em fase sólida dispersiva: µLC: cromatografía líquida capilar; GC-NPD: cromatografía gasosa – detector de fósforo e nitrogênio; OLE-LC: *on-line extraction – liquid chromatography*.

4.4.4 Linearidade

Para a avaliação da linearidade, cada analito foi analisado em diferentes níveis de concentração em triplicata, e foram construídos os gráficos do sinal analítico em função da concentração do analito. As curvas analíticas foram feitas na faixa de trabalho de 1,0 a 20 µg L^{-1} para a teobromina, teofilina de 0,5 a 20 µg L^{-1}, e cafeína de 50 a 500 µg L^{-1}.

Segundo o guia de validação do ICH, as curvas analíticas devem ser plotadas apresentando o intercepto (a), coeficiente angular ou inclinação (b) e coeficiente de determinação (r^2). Adicionalmente, devem ser avaliados por inspeção visual da curva analítica e pela análise dos gráficos de resíduos, mediante testes estatísticos apropriados. Porém, o guia não específica os testes estatísticos em questão. No estudo estes foram avaliados como sugerido por Miller et al.[83] e Kutner et al.[84] aplicando o teste t de student e ANOVA, ambos empregando-se o software Excel.

As curvas analíticas e suas respectivas equações da reta e coeficientes de determinação para teobromina, teofilina e cafeína são apresentadas nas Figuras 28, 29, e 30, respectivamente.

Figura 28 - Curva analítica da teobromina e gráfico de dispersão de resíduos do ajuste linear.

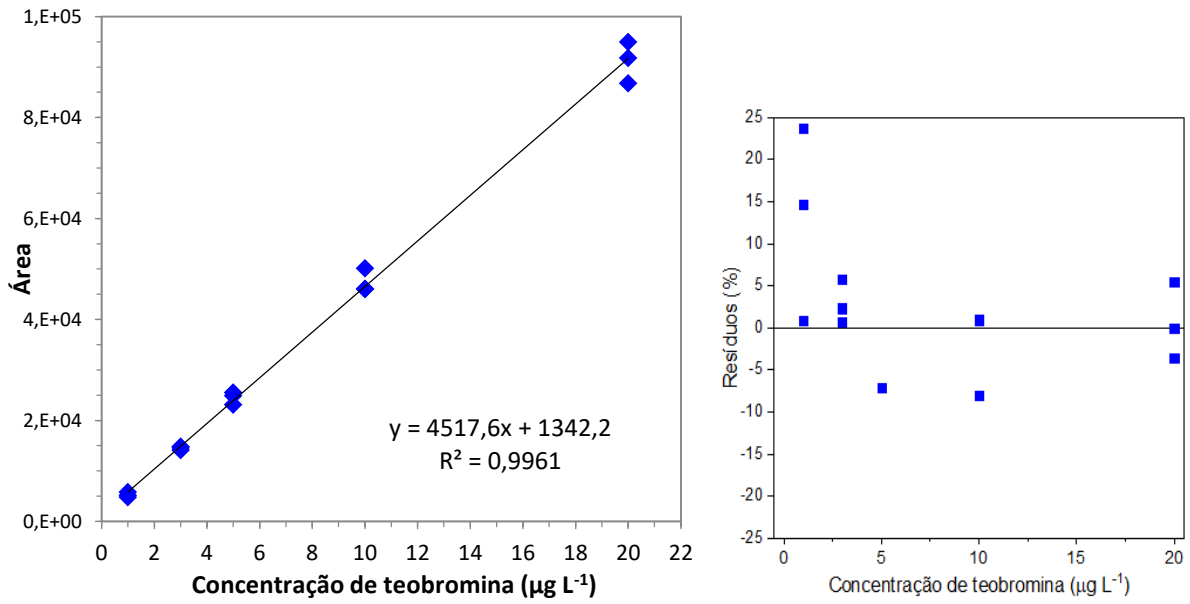


Figura 29 - Curva analítica da teofilina e gráfico de dispersão de resíduos do ajuste linear.

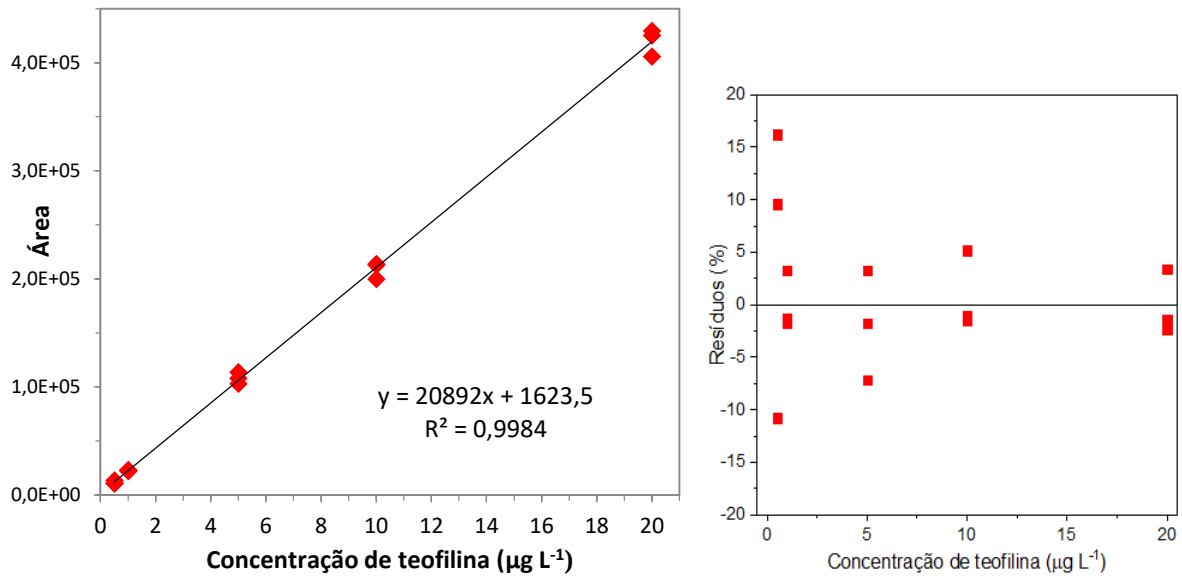
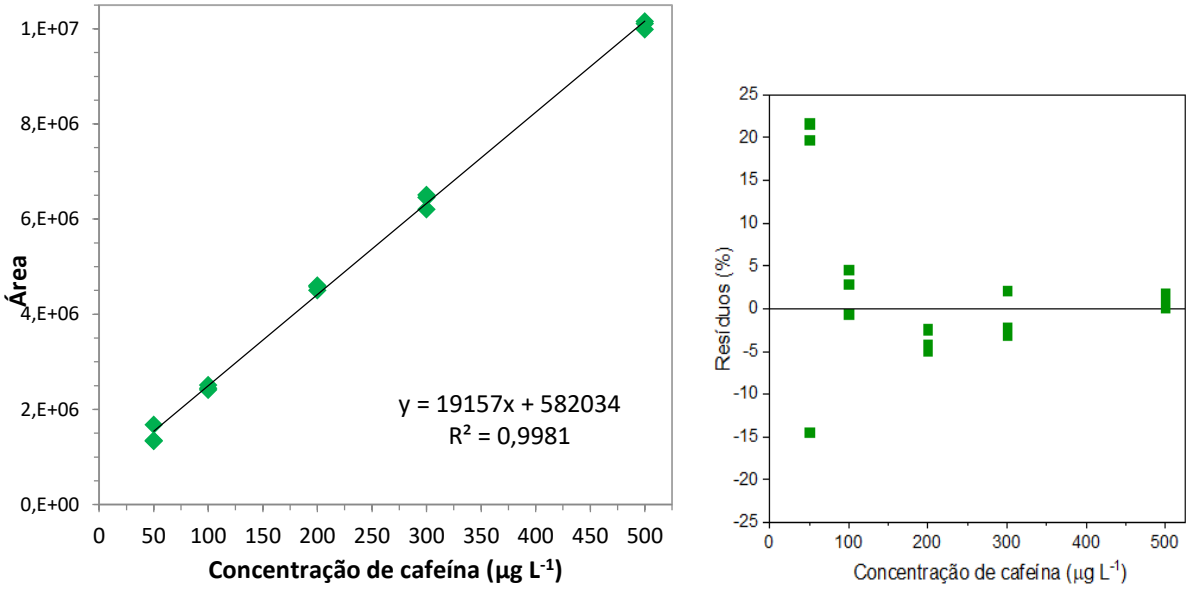


Figura 30 - Curva analítica da cafeína e gráfico de dispersão de resíduos do ajuste linear.



Observa-se que as curvas analíticas apresentam um bom ajuste linear com coeficientes de determinação maiores que 0,99 para todos os analitos. Da análise da dispersão de resíduos observa-se que os residuais para todos os analitos apresentam uma distribução aleatória ao redor do eixo y=0 e encontram-se dentro do critério de aceitação do Manual de Garantia da Qualidade – MAPA,[76] já que são menores do que 20%, com exceção do primeiro nível de concentração da teobromina e cafeína, nos quais o residual excede um pouco esse valor (24%). Este fato possivelmente deve-se a um dado anômalo, porém não pode ser descartado estatisticamente devido ao número restrito de dados.

Da análise t de Student, avalia-se estatisticamente a inclinação, intercepto e coeficiente de correlação. No teste avaliou-se, para cada analito, 5 níveis de concentração (k = 5 níveis) por triplicata (n = 15 dados). A Tabela 11 apresenta para cada analito o valor de t calculado e t tabelado, com 95% de confiança e n-2 graus de liberdade.

De acordo com a Tabela 11, para a teobromina e a teofilina os interceptos não foram significativamente diferentes de zero. Para a cafeína, o intercepto foi significativamente diferente de zero, indicando que a reta não passa pela origem (a = 0). Para os três analitos as inclinações são significativamente diferentes de zero e existe correlação entre a concentração e a resposta.

Nas tabelas 12, 13, e 14 são apresentadas as análises de variância ANOVA de regressão e da falta de ajuste para a teobromina, teofilina e cafeína, respectivamente, com 95% de confiança.

Tabela 11 - Resultados do teste t de Student para a avaliação da linearidade das curvas analíticas das xantinas.

	t_{cal} **teobromina**	t_{cal} **teofilina**	t_{cal} **cafeína**	t_{tab}
Intercepto (a)	1,66	0,69	8,85	2,16
Inclinação (b)	57,91	91,19	81,64	2,16
Coeficiente de correlação (r)	57,62	90,07	82,64	2,16

Tabela 12 - ANOVA de regressão e falta de ajuste para a teobromina.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média quadrática	$F_{Calculado}$	$F_{Crítico}$
Regressão	1	1,4131E+10	1,4131E+10	2888,6784	4,9646
Erro	13	5,4782E+07	4,2140E+06		
Falta de ajuste	3	5,8640E+06	1,9547E+06	0,3996	3,7083
Erro puro	10	4,8919E+07	4,8919E+06		
Total	14	1,4186E+10			

Tabela 13 - ANOVA de regressão e falta de ajuste para a teofilina.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média quadrática	$F_{Calculado}$	$F_{Crítico}$
Regressão	1	3,4019E+11	3,4019E+11	6687,9258	4,9646
Erro	13	5,3760E+08	4,1354E+07		
Falta de ajuste	3	2,8928E+07	9,6426E+06	0,1896	3,7083
Erro puro	10	5,0867E+08	5,0867E+07		
Total	14	3,4073E+11			

Tabela 14 - ANOVA de regressão e falta de ajuste para a cafeína.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média quadrática	$F_{Calculado}$	$F_{Crítico}$
Regressão	1	1,4092E+14	1,4092E+14	9228,9857	4,9646
Erro	13	2,7231E+11	2,0947E+10		
Falta de ajuste	3	1,1962E+11	3,9873E+10	2,6113	3,7083
Erro puro	10	1,5269E+11	1,5269E+10		
Total	14	1,4119E+14			

Para todos os analitos, a ANOVA demostrou que houve regressão significativa entre a resposta e a concentração, e que não houve desvio da linearidade. Isto permite concluir que o ajuste linear foi adequado na faixa linear para teobromina de 1,0–20 µg L^{-1}, teofilina de 0,5–20 µg L^{-1} e cafeína de 50–500 µg L^{-1}, não necessitando da ponderação dos dados.

4.4.5 Precisão e exatidão

Os resultados da avaliação da repetitividade (Tabela 15) mostra que a dispersão dos resultados expressa como porcentagem de desvio padrão relativo (%RSD) é baixa (menor do que 10%) para todas as xantinas na faixa de trabalho avaliada. Os resultados da precisão intermediária (Tabela 16) avaliada em dias diferentes mostra desvios menores que 10%. O guia ICH não estabelece um critério de aceitação; porém, de acordo com o Manual de Garantia da Qualidade – MAPA os resultados cumprem com o critério estabelecido por esse guia (RSD ≤ 20%).

Tabela 15 - Resultados da avaliação da repetitividade para as xantinas.

Analito	Concentração (µg L^{-1})	% RSD
Teobromina	1,0	6,0
	10	4,1
	20	4,1
Teofilina	0,5	8,5
	10	6,1
	20	6,5
Cafeína	50	2,4
	200	8,6
	500	7,3

Tabela 16 - Resultados da avaliação da precisão intermediária para as xantinas.

Analito	Dia 1 (%RSD)	Dia 2 (%RSD)
Teobromina (3,0 µg L^{-1})	4,1	5,0
Teofilina (1,0 µg L^{-1})	6,9	3,3
Cafeína (50 µg L^{-1})	1,7	2,5

Os resultados da exatidão foram avaliados em três níveis de concentração para cada analito (Tabela 17). Foi utilizado como critério de aceitação aqueles definidos pelo Manual de Garantia da Qualidade – MAPA o qual estabelece valores entre 70 e 120% para concentrações acima de 1 µg L^{-1}, e entre o 50 e 120% para concentrações abaixo de 1 µg L^{-1}, e %RSD menores do que 20%. Observa-se que os resultados se encontram dentro dos critérios de aceitabilidade estabelecidos. Os resultados que apresentaram menor recuperação foram a concentração mais baixa em teobromina e

teofilina ≥ 1µg L^{-1} (56,7–61,5%); porém, como apresentam %RSD menores que 10% (Tabela 15), podem ser aceitos. Portanto, conclui-se que o método é preciso e exato para todos as xantinas nas faixas de trabalho avaliadas.

Tabela 17 - Resultados da porcentagem de recuperação do processo de extração das xantinas.

Analito	Concentração de fortificação (µg L^{-1})	Exatidão (%)
Teobromina	1,0	56,7
	10	78,1
	20	84,1
Teofilina	0,5	61,3
	10	81,4
	20	94,4
Cafeína	50	75,1
	200	110,9
	500	92,5

4.4.6 Fator de pré-concentração

Por último, a avaliação do fator de concentração para cada analito em três níveis de concentração é apresentada na Tabela 18. Observa-se que foram obtidos fatores concentração entre 5,6 a 7,2, o que demostra que o dispositivo de extração reteve os analitos eficientemente, e permite pré-concentrá-los na microcoluna, obtendo-se assim uma maior detectabilidade no método on-line (LOD e LOQ mais baixos quando comparados com a injeção direta).

Tabela 18 - Fator de pré-concentração para as xantinas usando o sistema *in-tube* SPME.

Analito	Concentração (µg L^{-1})	Fator de pré-concentração
Teobromina	1,0	7,0
	10	6,8
	20	6,4
Teofilina	0,5	6,8
	10	6,7
	20	6,2
Cafeína	50	7,2
	200	6,1
	500	5,6

4.5 Análise de xantinas em amostras de café

Uma vez avaliados os parâmetros de qualidade do método, foram avaliadas 14 amostras de café de origem brasileira e colombiana e preparados como indicado na seção 3.9. A Figura 31, mostra um cromatograma de uma amostra típica de café solúvel analisada no modo SRM, onde se observa a presença das três xantinas.

Todas as amostras de café analisadas continham cafeína em concentrações variáveis, dependendo do tipo de café. Em algumas amostras, a maioria de café solúvel, foram detectadas e/ou quantificadas teobromina e teofilina em baixas quantidades. Os resultados das análises dos cafés são apresentados na Tabela 19. Os dados de concentração obtidos em massa/volume pelo método desenvolvido foram convertidos em unidades de concentração massa/massa para comparação com os resultados relatados na literatura.

Figura 31 - Cromatograma obtido no modo SRM mostrando as transições de quantificação na análise de xantinas em uma amostra de café solúvel brasileiro.

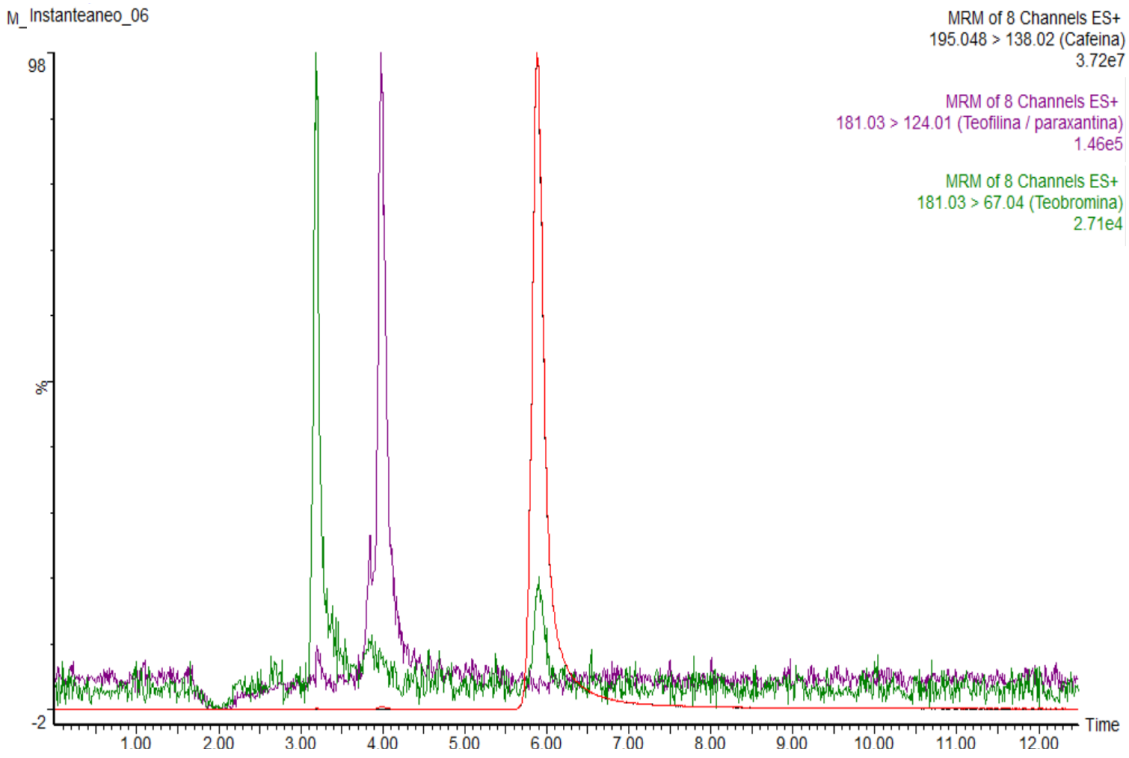


Tabela 19 - Teor de teobromina, teofilina e cafeína em amostras de café comerciais.

Tipo	Origem	Teobromina (mg g^{-1})[a]	Teofilina (mg g^{-1})[b]	Cafeína (mg g^{-1})[c]
Moído[d]	Blend latinoamérica	n.d	n.d	12,8
Moído[e]	Blend latinoamérica e Ásia	n.d	n.d	14,6
Moído[e]	Brasil	n.d	< LOQ	18,6
Moído	Brasil	n.d	n.d	22,1
Moído	Colômbia	n.d	n.d	12,5
Moído	Colômbia	n.d	n.d	12,1
Solúvel	Colômbia	n.d	n.d	14,0
Solúvel	Colômbia	n.d	n.d	21,9
Solúvel	Brasil	< LOQ	0,07	30,4
Solúvel	Brasil	< LOQ	0,06	35,0
Solúvel	Brasil	< LOQ	< LOQ	35,6
Solúvel	Brasil	< LOQ	< LOQ	36,5
Solúvel descafeinado	Brasil	n.d	n.d	0,9[f]
Solúvel descafeinado	Colômbia	n.d	n.d	1,7

n.d: não detectado, < LOQ: menor ao limite de quantificação.

Limites de detecção e quantificação do método desenvolvido em unidades de m/m: [a]TB (LOD: 0,02 mg g^{-1}, LOQ: 0,10 mg g^{-1}), [b]TF (LOD:0,01 mg g^{-1}, LOQ: 0,05 mg g^{-1}), e [c]CAF (LOD:0,01 mg g^{-1}, LOQ: 0,03 mg g^{-1}).
Especificações do fabricante: [d] *Blend* de arábicas, [e] *blend* de arábicas e robustas, [f] teor máximo de cafeína 0,3%.

Para café moído a cafeína encontra-se entre 12,1 a 22,1 mg g^{-1}. Observou-se que as amostras de café colombiano apresentam um menor teor de cafeína, devido ao fato de que nesse país são cultivadas apenas a espécie *C. arábica,* na qual os grãos apresentam menor teor de cafeína (ver Tabela 1). Para as amostras de origem brasileira, altos teores de cafeína indicam que foram utilizados *blends* com grãos de *C. robusta* ou grãos em estados de maturação verdes, sendo que quanto maior proporção deles maior será o teor de cafeína.[21]

O café solúvel apresenta um maior teor de cafeína (21,9–38,5 mg g^{-1}), o qual é esperado pois o café solúvel é o extrato aquoso concentrado e liofilizado do café moído. Além disso, para produzir o café solúvel geralmente são empregados *blends* com maior quantidade de *C. robusta* do que *C. arábica*, já que para produzir 1 kg de café solúvel é necessária uma menor quantidade de *C. robusta* como matéria prima,[92]

devido ao fato de que *C. robusta* tem um maior conteúdo de sólidos solúveis, o que aumenta o rendimento da produção.[14] Observa-se que o café solúvel colombiano apresenta um menor teor comparado com o brasileiro, o que está de acordo com os dados obtidos para café moído. Duas amostras de café descafeinado foram analisadas: a amostra brasileira mostrou-se dentro do teor máximo permitido de cafeína para café solúvel (0,3%) segundo o regulamento RDC n° 277 da ANVISA,[93] quantificando-se 0,09% presente na amostra. A amostra de café solúvel descafeinado colombiano apresentou 0,17%, e se encontra dentro das legislações internacionais que permitem um teor máximo de 0,35%.

Os teores de cafeína em café descafeinado, moído e solúvel estão em concordância com os valores relatados por Lima et al.[21] (8,3–19,8 mg g^{-1}), Belguidoum et al.[88] (0,7–27,2 mg g^{-1}), Tzanavaras et al.[94] (38 mg g^{-1}) e Perrone et al.[90](0,2–21,6 mg g^{-1}).

4.6 Determinação de ocratoxina A em café solúvel

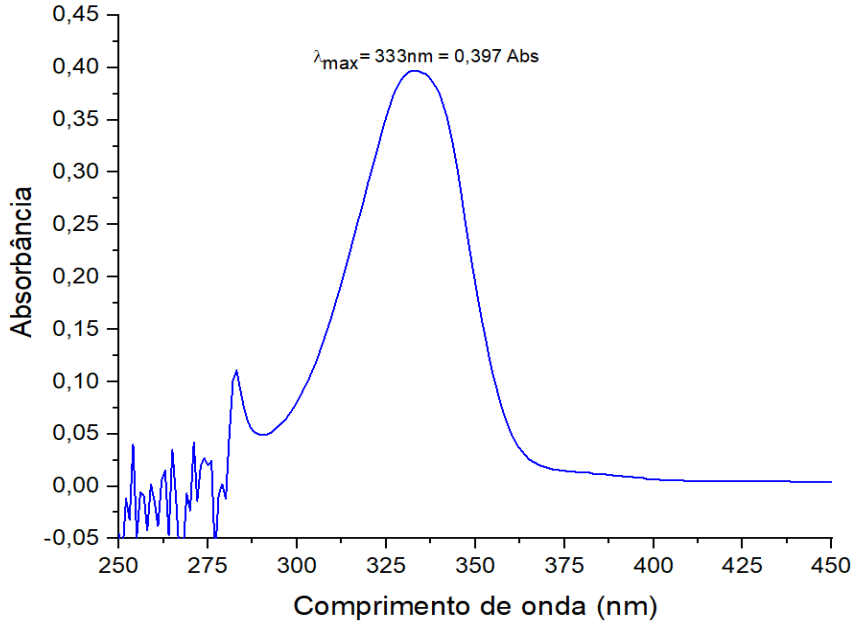
4.6.1 Determinação da concentração de OTA usando espectrofotometria na região de ultravioleta (UV)

Para a determinação da concentração da solução estoque de ocratoxina A seguiu-se o procedimento oficial da AOAC[78] a partir da obtenção do espectro UV-vis da OTA em uma solução de tolueno: ácido acético (99:1, v/v). A análise se faz em meio acidificado para garantir a protonação dos grupos ionizáveis, evitando o deslocamento do comprimento máximo de absorção em 333 nm.

O espectro obtido da OTA em meio acidificado (Fig. 32) apresenta absorção máxima no comprimento de onda em 333 nm, a qual é empregada para a determinação da concentração exata da solução estoque, utilizando a Lei de Lambert-Beer, descrita pela equação 8, rearranjada:

$$OTA\left(\frac{\mu g}{mL}\right) = \frac{Abs*MM*1000}{\varepsilon * l} \qquad \text{(Eq. 8)}$$

Figura 32 - Espectro UV-Vis da OTA em concentração 29,5 µg mL^{-1} obtido em solução de tolueno: ácido acético (99:1, v/v).



Onde Abs é a absorbância obtida (λ_{max}, 333nm), ε é o coeficiente de absortividade molar da OTA em tolueno: ácido acético (99:1, v/v) (Ɛ = 5440 L mol^{-1} cm^{-1}), l é o caminho óptico (1 cm), MM refere-se à massa molecular da OTA (403,8 g mol^{-1}), e 1000 é o fator de conversão (m/m).

4.6.2 Otimização do método cromatográfico para a análise de ocratoxina A em café solúvel

Para a análise da OTA, usou-se a mesma microcoluna de extração utilizada na análise das xantinas, pois a fase SiGOC$_{18}$ecap apresentou boa capacidade extratora para compostos com estruturas de anéis aromáticos e grupamentos amina e carboxila e, portanto, foi avaliada para a extração de OTA. Porém, como a fase extratora não é seletiva, outros compostos podem ser co-extraídos e injetados no sistema.

Trabalhos publicados tem usado fases extratoras não seletivas (C_{18}, aminopropil sílica e PSA, entre outras) em técnicas como *in-tube* SPME, SPE e QuEChERS na análise de OTA em vinho[52], cerveja[95] e café[96]. Estes trabalhos são um

bom indício do que fase escolhida $SiGOC_{18}$ecap pode funcionar para a extração de OTA.

O sistema de extração *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS foi testado primeiramente com soluções aquosas de OTA a 20,0 µg L^{-1} e depois corroborados com a matriz de café solúvel descafeinado fortificada com OTA. Os parâmetros otimizados para a separação cromatográfica e quantificação de OTA são descritos em 3.10. Todas as análises empregaram fases móveis e fases de carregamento acidificadas para garantir a protonação da OTA.

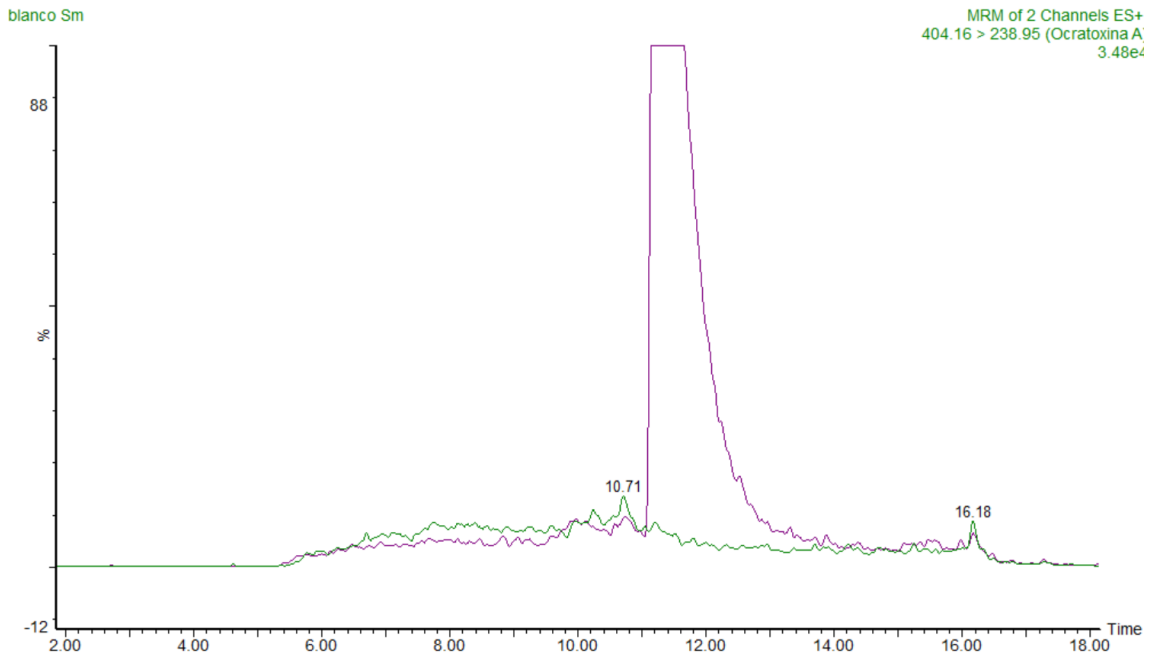
A programação de eluição por gradiente (ver Figura 14), foi feita por etapas para realizar o condicionamento, eluição e determinação da OTA, assim como a limpeza das colunas em uma mesma corrida cromatográfica. Os gradientes selecionados foram otimizados a fim de reduzir e/ou separar os interferentes da OTA, obter o maior sinal analítico da OTA, e evitar o efeito de memória (*carryover)* na coluna de extração.

Assim, na primeira etapa isocrática empregou-se 22% de ACN de 0 a 7,63 min, a qual permite a eluição de compostos polares como as xantinas; a diminuição destes foi verificada na etapa de optimização do sistema.

Na segunda etapa, ocorre a eluição da OTA, nesta etapa isocrática (de 8,45 a 13,5 min); foram testadas três porcentagens de ACN, 50%, 60% e 70%, e encontrou-se que 60% apresentou os melhores resultados em relação ao formato de pico e maior área obtida para a OTA.

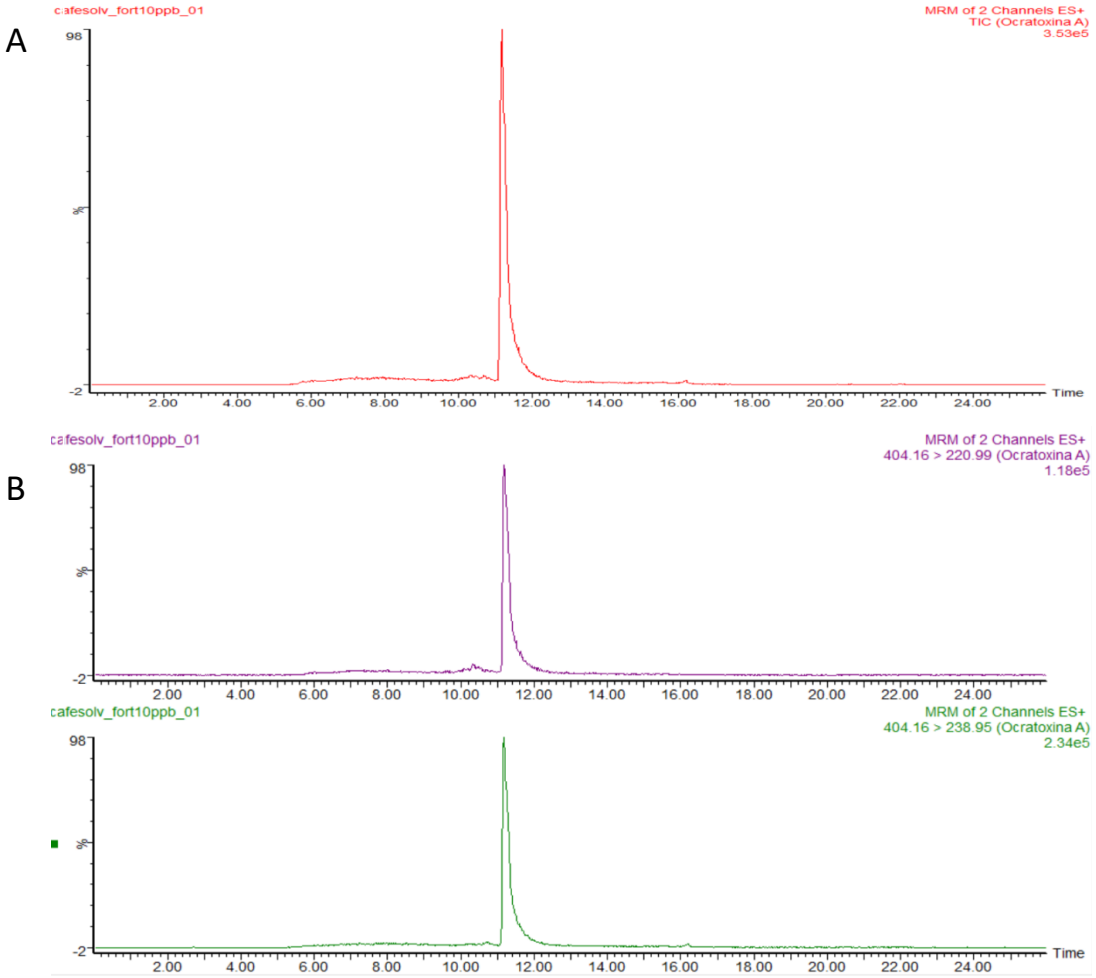
Por último, para a etapa de limpeza, encontrou-se que 95% de ACN por 6,30 min são suficientes para realizar a limpeza das colunas extratora e analítica. Concentrações de OTA maiores do que 20,0 µg L^{-1} e porcentagens de ACN menores do que 90% apresentam efeitos de memória no dispositivo de microextração. A limpeza das colunas foi verificada pela injeção de amostra de café preparado e fortificada a 10,0 µg L^{-1} seguida pela injeção de branco de água; como se observa na Figura 33, o branco não apresenta sinal analítico no tempo de retenção da OTA (11,18 min).

Figura 33 - Cromatograma obtido pela injeção de amostra de café preparada e fortificada com OTA a 10,0 µg L^{-1} (roxo), seguida da injeção de branco de água (verde), na avaliação do efeito de memória, nas condições de limpeza da coluna com 95% de ACN.



O cromatograma do íon total (TIC) (Fig. 34A) mostra o pico da OTA em 11,18 min, sendo 4 min de tempo de carregamento e 7,18 min o tempo de retenção na coluna analítica, usando a programação de eluição por gradiente (Fig. 14). A Figura 34B também apresenta os cromatogramas individuais para as transições monitoradas do íon protonado da OTA *m/z* 404 no modo SRM, das quais *m/z* 404→239 foi escolhida como a transição de quantificação, pois apresenta maior área de pico, e *m/z* 404→221 escolhida como a transição de confirmação da identidade da OTA.

Figura 34 - Cromatogramas de (A) íon total (TIC) da OTA em café solúvel descafeinado fortificado a 10,0 µg L^{-1} e (B) monitoramento das transições de quantificação e confirmação no modo SRM.



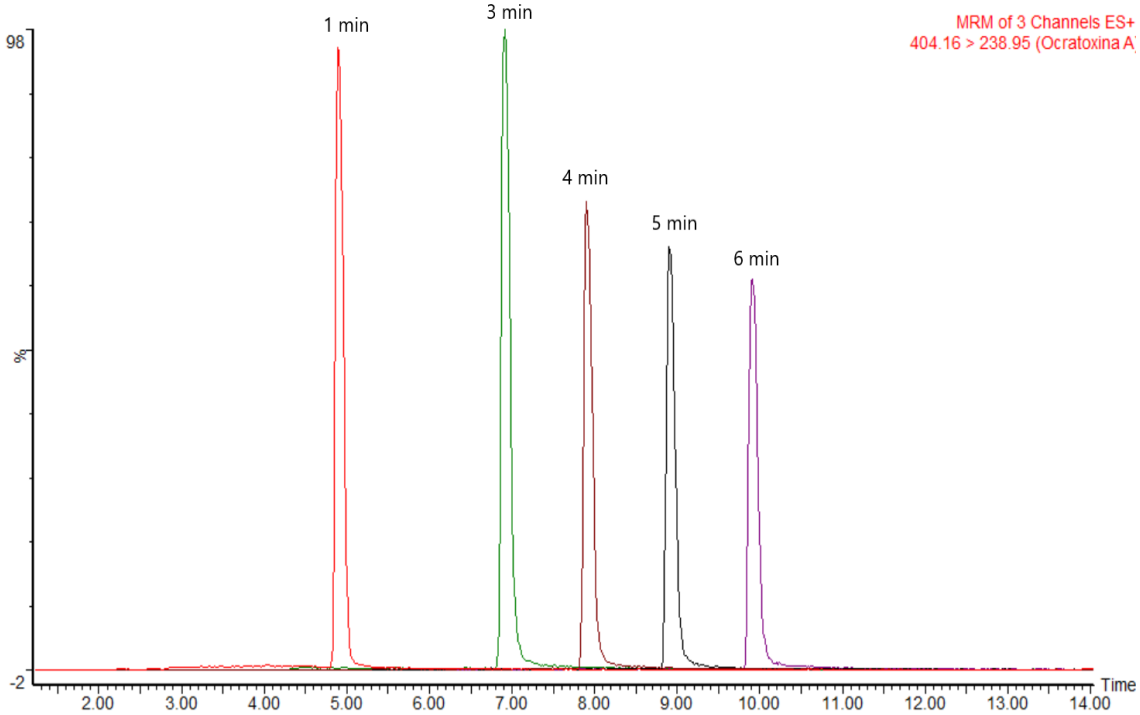
4.6.3 Ensaios preliminares do método on-line *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS na análise de ocratoxina A

Com o intuito de diminuir o número de interferentes na análise de café no sistema on-line *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS (como a cafeína, um dos compostos majoritários no café que é sorvido pela fase, e compostos como açúcares os quais são os responsáveis pela coloração no café) fizeram-se experimentos iniciais para determinar o tempo mínimo de extração e a porcentagem de ACN necessários para diminuir a afinidade destes compostos polares pela fase extratora, observando-se, pela válvula de descarte, que a maior parte da coloração da solução de café injetada seja eliminada sem diminuir significativamente o sinal da OTA.

Assim, primeiramente empregou-se uma solução padrão de OTA de 20,0 µg L^{-1} em água ultrapura, a qual foi injetada no sistema on-line variando o tempo de giro da válvula (fase de carregamento 22% de ACN a 0,100 mL min^{-1}). Os resultados (Fig. 35) mostraram que empregando-se um tempo de 1 a 3 min a área obtida para o analito não diminui significativamente; a partir de 4 a 6 min observa-se uma redução progressiva do pico cromatográfico. Nas condições de estudo o tempo de 3 minutos é mais favorável que 1 min, já que quanto mais tempo o analito permanece retido na coluna de extração, maior é a eluição dos possíveis interferentes obtendo-se, assim, um extrato mais limpo.

A seguir, uma amostra de café solúvel descafeinada (sem fortificar com OTA) preparada como indicado no item 3.12, foi injetada para avaliar a coloração na saída do descarte. Para isso foram coletadas frações da fase móvel descartada em um frasco tipo eppendorf a cada minuto durante 8 minutos de tempo de extração. Encontrou-se que entre 3 e 4 minutos, a um fluxo de 0,100 mL min^{-1}, é o tempo mínimo que a amostra necessita para eliminar a maioria da coloração. Assim, escolheu-se 4 min como tempo mínimo de extração para realizar os experimentos seguintes.

Figura 35 - Cromatogramas obtidos no modo SRM da solução aquosa fortificada com OTA a 20,0 µg L^{-1} para a avalição do tempo de carregamento.



Uma solução padrão mista de xantinas (teobromina, teofilina e cafeína) a 200 µg L^{-1} cada e OTA a 20,0 µg L^{-1} em água ultrapura, foram injetadas no modo on-line (fluxo de 0,100 mL min^{-1} e 4 min de tempo de carregamento) variando a porcentagem de ACN na fase de carregamento. As transições das xantinas e ocratoxina, apresentadas nas Tabelas 3 e 5, respectivamente, foram monitoradas simultaneamente pelo MS/MS (para as xantinas de 0,0 min a 8,0 min, e para a OTA de 8,0 min a 26,0 min). Os resultados da variação da área tanto para a OTA como para as xantinas, observadas com a mudança da porcentagem de ACN são apresentadas na Tabela 20.

Observa-se que a medida que se aumenta a porcentagem de solvente orgânico na fase de carregamento as xantinas apresentam maior afinidade pela fase móvel diminuindo sua área. A partir de uma concentração na fase de carregamento ≥ 15% de ACN reduz significativamente a absorção das xantinas na fase extratora sem afetar drasticamente a quantidade de OTA sorvida pela fase; por esta razão foi escolhida 15% de ACN como a porcentagem mínima na fase de carregamento.

Os experimentos anteriores definiram os níveis mínimos dos parâmetros determinantes da eficiência do processo de extração: tempo de carregamento da amostra, 4 min; fluxo de carregamento, 0,100 mL min^{-1}; e composição da fase de carregamento, água: ACN (85:15, v/v): 0,1% AcF; estes foram posteriormente estudados de forma univariada.

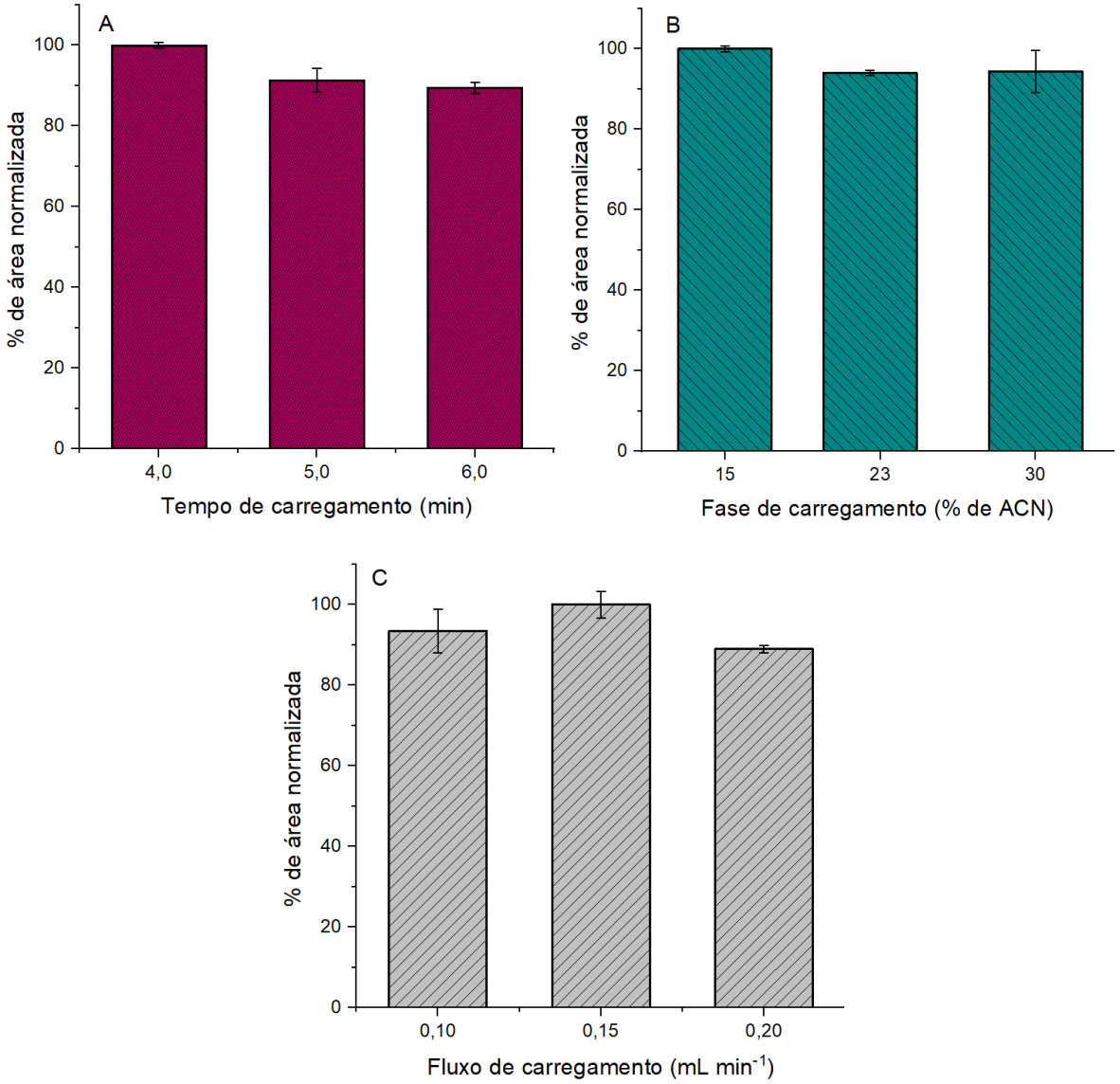
Tabela 20 - Efeito da porcentagem de acetonitrila na fase de carregamento nas áreas da OTA e Xantinas (solução mista dos padrões em água, TB, TF e CAF a 200 µg L^{-1} e OTA a 20 µg L^{-1}) na microcoluna de extração.

Acetonitrila (%)	**∑ das áreas xantinas**	**Área Ocratoxina A**
5	$4,30 \times 10^6$	$9,91 \times 10^4$
10	$1,26 \times 10^6$	$9,50 \times 10^4$
15	$2,65 \times 10^5$	$9,29 \times 10^4$
22	$1,53 \times 10^5$	$7,98 \times 10^4$

4.6.4 Otimização do método on-line *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS na análise de ocratoxina A em café solúvel

Uma vez definidos os níveis mínimos, a optimização dos parâmetros determinantes da eficiência do processo de extração no sistema on-line, foi avaliada em matriz de café descafeinado preparado e fortificado a 10,0 µg L^{-1}, com injeções por triplicata e volume de injeção de 50 µL (modo full-loop), como indicado em 3.11. Os resultados são apresentados como porcentagem de área normalizada na Figura 36.

Figura 36 - Estudo univariado das principais variáveis determinantes da eficiência de extração da OTA no sistema *in-tube* SPME. (A) tempo de carregamento, (B) fase de carregamento variação da porcentagem de ACN e (C) fluxo de carregamento.



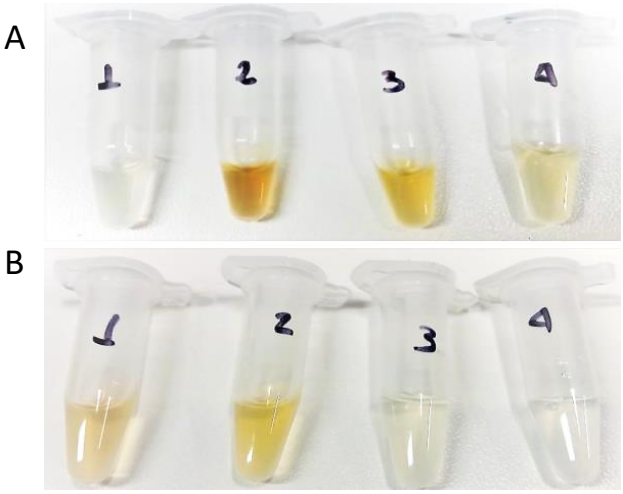
O tempo de carregamento da amostra (Fig. 36A) foi avaliado em três níveis: 4,00 min; 5,00 min e 6,00 min. O tempo de 4,00 min gerou as maiores respostas cromatográficas e por essa razão, escolheu-se esse tempo para avaliar o parâmetro seguinte. Em maiores tempos de carregamento ocorre a perda do analito, porém, nos casos em que a amostra apresenta vários interferentes e/ou o extrato encontra-se concentrado, o uso de tempo de carregamento maior seria uma alternativa para essas amostras, já que permite eliminar os interferentes, e assim, valores menores para os limites de detecção podem ser alcançados, evitando-se a contaminação geral do sistema analítico. Neste caso, 4 min demonstrou ser o tempo adequado tanto para a extração do analito como para evitar a contaminação do sistema.

A influência da porcentagem de ACN na fase carregamento foi testada em três níveis (15, 22 e 30%). Observa-se que a maior área foi obtida com 15% de ACN (Fig. 36B). Este fato concorda com os resultados anteriormente obtidos na fase inicial, pois ao aumentar a quantidade de orgânico a OTA tem maior afinidade pela fase móvel ocorrendo a perda dessa pela válvula de descarte.

O parâmetro de fluxo de carregamento (Fig. 36C) foi avaliado em três níveis (0,100; 0,150 e 0,200 mL min^{-1}). Observou-se que a um fluxo de 0,150 mL min^{-1} se obtém uma maior recuperação da OTA, resultando em uma maior área cromatográfica. Adicionalmente, este resultado mostra que fluxos maiores permitem fazer uma melhor limpeza da amostra.

A Figura 37 apresenta as frações coletadas pela válvula de descarte a cada minuto para os fluxos de 0,100 mL min^{-1} (Fig. 37A) e 0,150 mL min^{-1} (Fig. 37B). No fluxo de 0,100 mL min^{-1} observa-se que nas frações 2 e 3 a maior parte da coloração é eliminada, porém a fração 4 apresenta um pouco de coloração sendo possível que parte desses interferentes polares eluam até a coluna analítica e causem a diminuição do sinal analítico da OTA. Na Figura 37B, avaliada em fluxo de 0,150 mL min^{-1}, observa-se que nas frações 1, 2 e 3 são eliminadas a maior parte da coloração da amostra e a fração 4 é praticamente translucida no tempo de giro da válvula, evitando a eluição de interferentes e obtendo um maior sinal do analito. Para o fluxo de 0,200 mL min^{-1} o sinal da OTA diminui possivelmente pela perda deste pela válvula de descarte. Além disso o fluxo de 0,200 mL min^{-1} gera uma maior pressão na coluna de extração, o que pode diminuir sua vida útil.

Figura 37 - Frações coletadas pela válvula de descarte a cada minuto a fluxo de (A) 0,100 mL min^{-1} e (B) 0,150 mL min^{-1}.

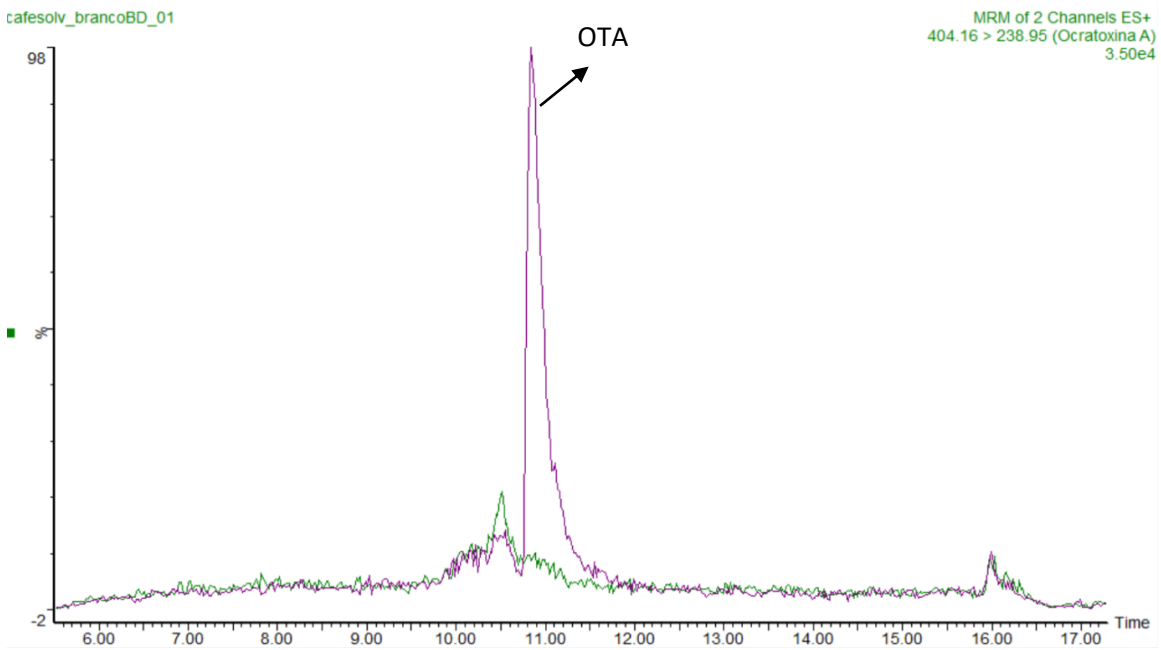


4.6.5 Avaliação das figuras de mérito do método *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS na análise de ocratoxina A em café solúvel

Com as condições de extração e separação otimizadas procedeu-se à avaliação das seguintes figuras de mérito descritas a seguir.

A seletividade foi avaliada pela injeção da matriz branco de café solúvel preparado e fortificada a 1,0 µg L^{-1} (Fig. 38). O método mostrou ser seletivo para a detecção e quantificação de OTA (11,18 min), pois não foram observados picos interferentes que coeluam no tempo de retenção da OTA. No entanto, observou-se um pico interferente em 10,60 min na transição de quantificação e de verificação, *m/z* 404→239 e *m/z* 404→221, respectivamente. O interferente não foi eliminado, e se encontrou presente em todas as amostras de café analisadas, sendo observado nas duas transições monitoradas.

Figura 38 - Comparação entre os cromatogramas de café solúvel descafeinado branco (verde) e café solúvel descafeinado fortificado com OTA a 1,0 µg L^{-1} (roxo).



A linearidade do método foi avaliada construindo uma curva analítica na matriz branca de café solúvel descafeinado preparado e fortificado na faixa de 0,35 a 2,0 µg L^{-1}. A faixa de concentração na curva analítica foi determinada levando em conta o Limite Máximo Regulatório (LMR) estabelecido pela ANVISA no Brasil e pela União Europeia (EU) de 10 µg kg^{-1} em café solúvel, como também a diluição feita no preparo da amostra (1:10, g/mL).

A Figura 39 apresenta a curva analítica com o intercepto (a), coeficiente angular (b) e coeficiente de determinação (r^2) para a OTA. A curva foi avaliada mediante inspeção visual e averiguação dos resíduos, além de testes estatísticos apropriados. O modelo de regressão linear mostrou-se adequado, obtendo um coeficiente de determinação maior do que 0,99. Da análise de dispersão dos resíduos (Fig. 40) observa-se uma distribuição normal ao redor do eixo y=0 com uma dispersão menor do que 20%, encontrando-se dentro do critério de aceitação do Manual de Garantia da Qualidade – MAPA.[76]

Figura 39 - Curva analítica da OTA em matriz de café solúvel fortificada.

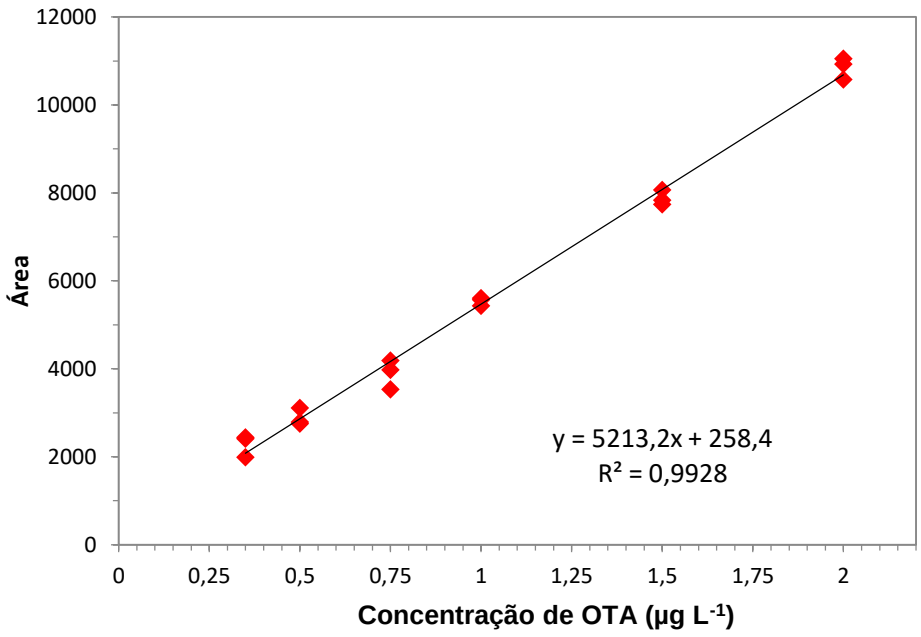
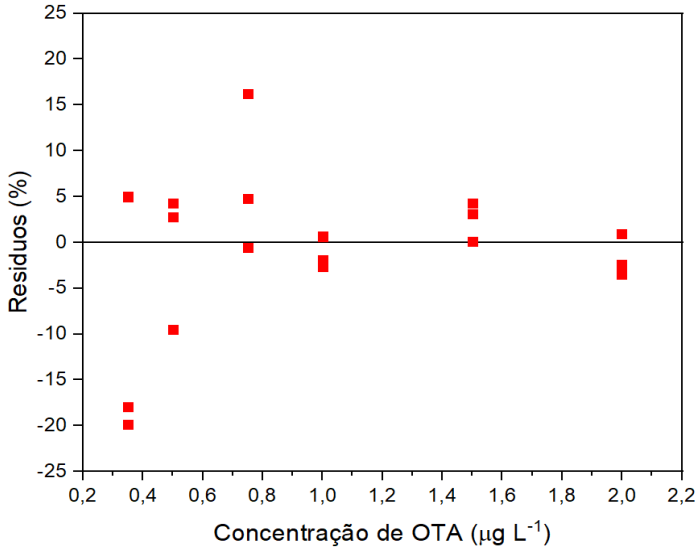


Figura 40 - *Gráfico* de dispersão de resíduos do ajuste linear da curva analítica da OTA.



O valor de t de student para a análise de regressão[83] foi calculado com as ferramentas de dados do software excel. O teste avaliou estatisticamente a inclinação, intercepto e coeficiente de correlação para a OTA nos 6 níveis de concentração (k = 6 níveis) por triplicata (n = 18 dados). A Tabela 21 apresenta as hipóteses nulas avaliadas, os valores de t tabelados e os resultados das t calculados, com 95% de

confiança e n-2 graus de liberdade. De acordo com a Tabela 21, o intercepto não é significativamente diferente de zero, a inclinação é significativamente de cero, e existe correlação entre a concentração e a resposta.

A tabela 22 apresenta a análise de variância ANOVA de regressão e falta de ajuste para a OTA, com 95% de confiança. A análise ANOVA demostrou que houve regressão significativa entre a resposta e a concentração, e que não houve desvio da linearidade o que permite concluir que o ajuste linear foi adequado para OTA na faixa linear de 0,35 a 2,0 µg L^{-1}.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir da análise da matriz de café branco fortificado a 0,50 µg L^{-1} e fazendo-se diluições posteriores na matriz até obter uma relação sinal ruído de 3:1 e 10:1, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação do método foram 0,20 e 0,35 µg L^{-1}, respectivamente.

Tabela 21 - Resultados do teste t de Student para a avaliação da linearidade da curva analítica da OTA.

	t_{cal}	t_{tab}	**Interpretação do teste**
Intercepto (a)	1,99	2,12	O intercepto não é significativamente diferente de zero
Inclinação (b)	46,97	2,12	A inclinação é significativamente diferente de zero
Coeficiente de correlação (r)	46,97	2,12	Existe correlação entre a concentração e a resposta do analito

Tabela 22 - ANOVA de regressão e falta de ajuste para a ocratoxina A.

Fontes de variação	**Graus de liberdade**	**Soma dos quadrados**	**Média quadrática**	$F_{Calculado}$	$F_{Crítico}$
Regressão	1	161706166	161706166	3118,62	4,7472
Erro	16	1172849	73303		
Falta de ajuste	4	550627	137657	2,6548	3,2592
Erro puro	12	622222	51852		
Total	17	162879015			

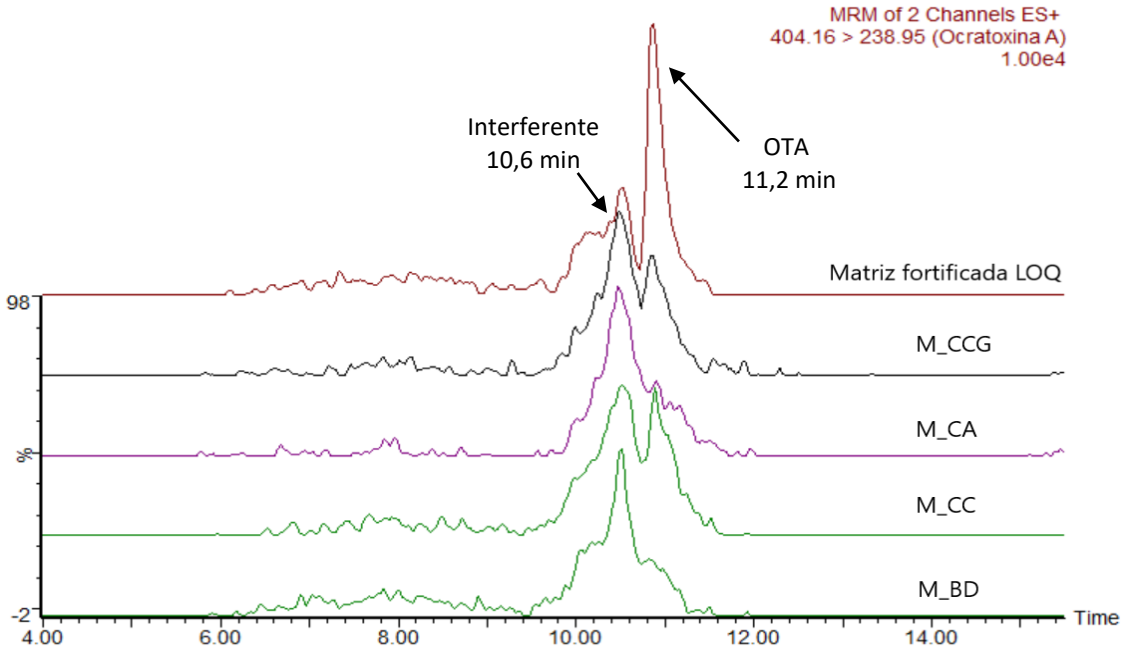
A precisão do método calculada como repetitividade no segundo nível da curva analítica (0,50 µg L^{-1}), foi de 25%. Os resultados de precisão estão dentro dos critérios de aceitação segundo o Manual de Garantia da Qualidade – MAPA[76] para micotoxinas que se encontram abaixo de 1 µg L^{-1} em matrizes de alimentos de origem vegetal (% de recuperação de 50–120%, e desvio-padrão relativo da repetitividade DPR_r < 40).

Três amostras "branco" de café sólido foram fortificadas no LMR (10 µg kg^{-1}) com uma solução padrão OTA em metanol, as amostras foram deixadas na capela até o dia seguinte para secar o solvente e preparadas conforme a seção 3.12. As porcentagens de recuperação de OTA obtidas variaram entre 69,3–112,5% com um coeficiente de variação de 27%.

4.6.6 Análise de ocratoxina A em amostras de café solúvel

Uma vez avaliadas as figuras de mérito do método, foram avaliadas 4 amostras de café solúvel de origem colombiana e preparadas como indicado na seção 3.12. A Figura 41, mostra os cromatogramas da matriz de café solúvel branco fortificado no LOQ, 0,35 µg L^{-1} e das amostras analisadas. Das amostras analisadas é possível dizer que nenhuma delas ultrapassa o LMR estabelecido pela ANVISA e a União Europeia para café solúvel.

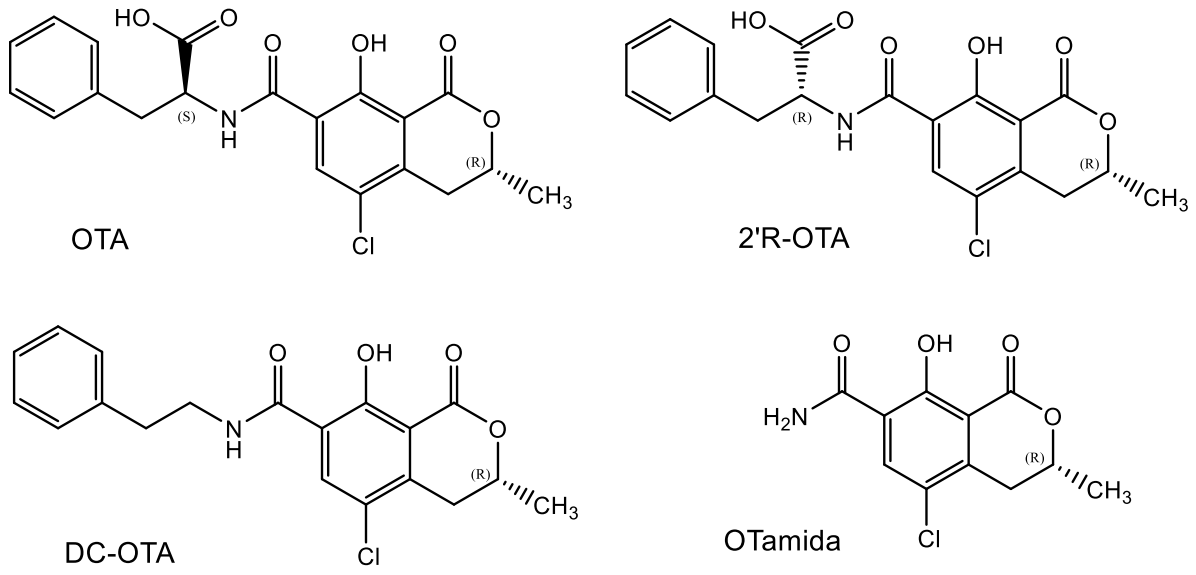
Figura 41 - Sobreposição dos cromatogramas da análise das amostras de café solúvel e café solúvel branco fortificado com OTA a 0,35 µg L^{-1}. (t_{ROTA} =11,18 min; $t_{Rinterferente}$=10,6 min).



A OTA não foi detectada nas amostras analisadas. Na Figura 41 observa-se que duas amostras parecem estar contaminadas, porém se encontram abaixo do LOD do método. Também observa-se que o formato do pico do interferente varia, sendo alto em algumas amostras, alterando a resolução dos picos e atrapalhando o sinal da OTA a baixas concentrações.

Uma possível explicação para a presença deste pico interferente é dada por Cramer et al.[97] e Sueck et al.[98], os quais tem estudado os produtos de degradação térmica da ocratoxina A. O nome químico da ocratoxina A (OTA) ou 14-(S)-ocratoxina A, de acordo com a IUPAC é N-((3R)-(5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-7-isocromanil) carbonila)-3-fenil-L-alanina (Figura 42). A OTA tem sido amplamente relatada em café,[28,30,31] assim como sua redução durante o processo de torra.[26,39] As altas temperaturas usadas nos processos de torra do café, podem levar à conversão de OTA ao estereoisómero 2’R-ocratoxina A (2’R-OTA), e a formação dos produtos de degradação térmica como a OTA descarboxilada (DC-OTA), e a ocratoxina α-amida (OTamida),[97,98] as estruturas são apresentadas na figura 42.

Figura 42 - Estrutura química da ocratoxina A (OTA), o produto de isomerização térmica 2’R-ocratoxina A (2’R-OTA), e os produtos de degradação 2’-descarboxi-ocratoxina A (DC-OTA) e ocratoxina α-amida (OTamida).



Fonte: Adaptação a partir de SUECK, F., 2019. [98]

A conversão de OTA a 2’R-OTA pode acontecer lentamente a temperaturas abaixo de 120 °C, sendo que uma conversão de 25% pode ser obtida depois de 30 min a 150 °C; 5 min a 180 °C; e 1 min a 210 °C durante o processo de torra do café.[98] Temperaturas superiores a 240 °C podem levar área à degradação de OTA e 2’R-OTA em outros subprodutos.[97] Como reação alternativa, a OTA pode ligar-se aos polissacáridos presentes na matriz durante o processo de torra.[99] Na análise dos cafés, a relação média de OTA:2’R-OTA encontrada foi 2:1; em algumas amostras a 2’R-OTA ultrapassa a OTA.

A 2’R-OTA e OTA apresentam as mesmas transições de massas. No entanto, a 2’R-OTA sendo diastereoisómero da OTA por pode ser separada cromatograficamente empregando uma coluna não quiral. Desta forma é possível diferencia-las mediante o tempo de retenção e o emprego de padrões.

Caso o interferente não seja a 2’R-OTA, uma das soluções mais eficientes para eliminar o interferente seria usar materiais sorventes mais seletivos baseados no uso de anticorpos ou aptâmeros, permitindo alcançar limites de detecção e quantificação menores.[100,101]

4.6.7 Aplicabilidade do método *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS para a análise de OTA em outras bebidas

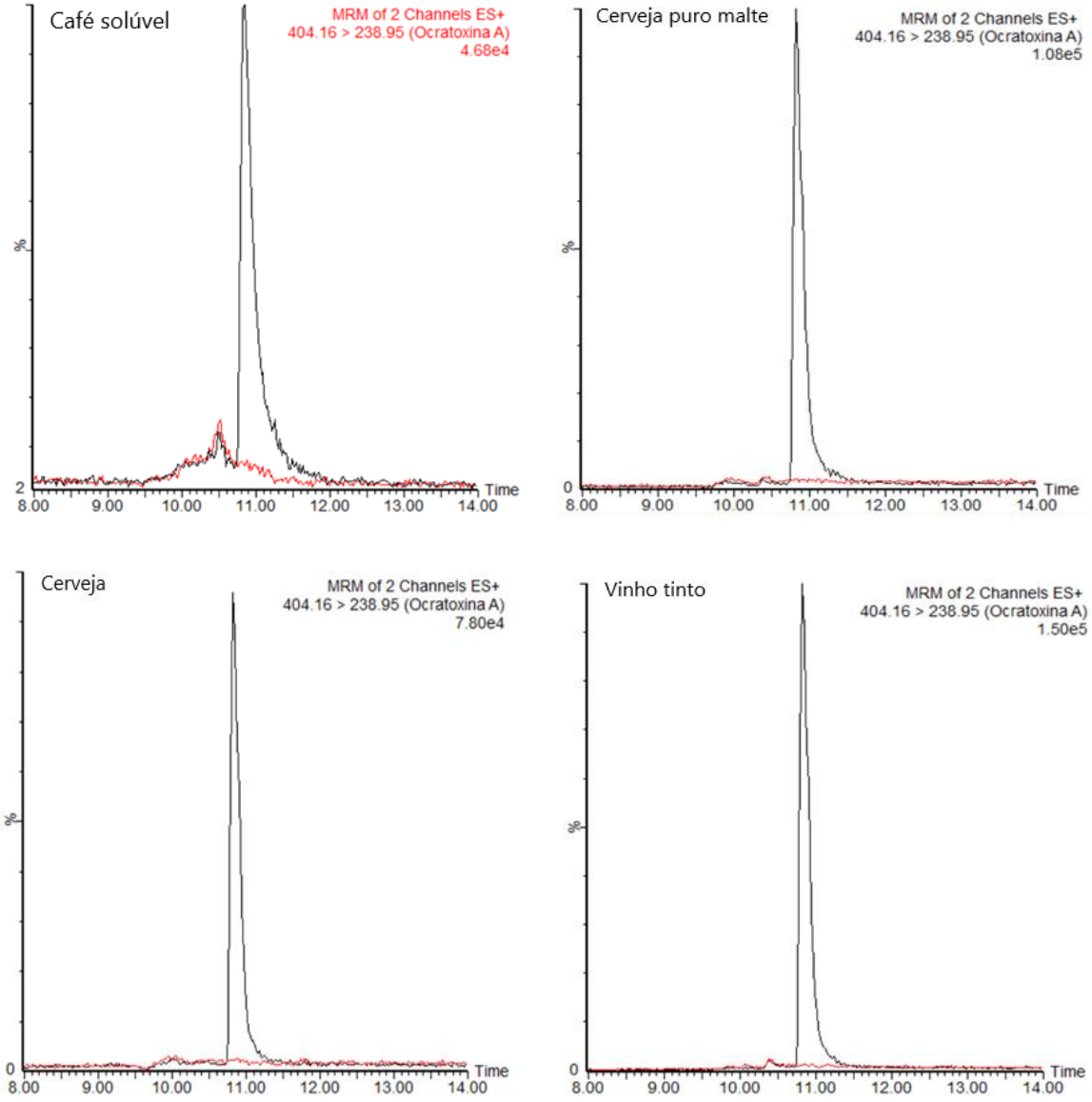
O método foi testado em outros tipos de bebidas, incluindo vinho e cerveja, para verificar sua aplicabilidade, possíveis interferentes e a resposta da OTA em cada matriz. Assim, foram analisadas duas amostras de cerveja e uma amostra de vinho as quais foram degaseificadas em ultrassom por 10 min, fortificadas com 2,0 µg L^{-1} de OTA, e filtradas por membrana de 0,22 µm prévio à análise no sistema *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS.

A Tabela 23 apresenta a comparação dos resultados de área e altura obtidas em três matrizes diferentes (café solúvel, cerveja e vinho), à mesma concentração e os cromatogramas correspondentes são apresentados na Figura 43.

Tabela 23 - Avaliação da resposta da transição de quantificação *m/z* 239 da OTA em função da matriz analisada fortificada a 2,0 µg L^{-1}.

Matriz	Concentração de OTA (µg L^{-1})	Relação Sinal/Ruído
Café solúvel	2,0	57,02
Cerveja puro malte	2,0	271,73
Cerveja	2,0	230,35
Vinho	2,0	294,72

Figura 43 - Sobreposição dos cromatogramas da análise das amostras de café solúvel, cerveja e vinho tinto fortificadas com OTA a 2,0 µg L^{-1} (traço preto) e amostra branca da matriz (traço vermelho).



Os cromatogramas mostram que o método também pode ser aplicado para a determinação de OTA em cerveja e vinho, sendo um processo mais simples pois a amostra ao estar em estado líquido só precisa ser desgaseificada e filtrada antes da injeção no sistema o que reduz o tempo total de preparo de amostra quando comparado com o café solúvel. Além disso, a resposta analítica é maior para a análise de cerveja e vinho, pois à mesma concentração de fortificação a relação sinal-ruído (S/N) apresentada por estas duas matrizes foram maiores quando comparadas com a S/N da matriz de café solúvel (Tabela 23). Assim, menores limites de detecção e quantificação podem ser atingidos nas matrizes de cerveja e vinho. Das matrizes analisadas pode-se inferir que a matriz de café é a mais complexa e que apresenta maior supressão do sinal da OTA no MS/MS.

Na análise de cerveja foi observado que a resposta da OTA varia dependendo do tipo de cerveja, comportamento este igual ao detectado no café moído, o que permite afirmar que devem ser avaliados cuidadosamente os efeitos da matriz em cada produto.

No início, este método foi desenvolvido para a análise de OTA em café torrado moído, porém não conseguiu ser validado pois apresentava variações significativas nos resultados por fatores como a origem, tipo de café analisado (descafeinado ou normal), marca, entre outros. Além, uma maior quantidade de interferentes no extrato e baixa exatidão no procedimento de extração foi encontrada, possivelmente devido a interações da OTA com a matriz sólida que dificultavam sua extração. No entanto, para café solúvel o método mostrou-se adequado, a matriz é aparentemente mais simples e a extração com água quente foi consistente. Também, a análise foi restrita a café de origem colombiano, assumindo que a única espécie utilizada foi *Coffea arábica*, o que fez com que os resultados nestas condições não apresentassem variações significativas.

Este método desenvolvido poderia ser utilizado para a avalição da ingestão de OTA em café solúvel, já que a OTA consegue ser extraída com água quente. Além de ser um procedimento simples, rápido, econômico, automatizado e verde quando comparado com métodos convencionais[102] que empregam colunas de imunoafinidade (IAC) ou por extração com solventes.[103]

CONCLUSÕES

Foram sintetizados materiais baseados em grafeno e ancorados em aminopropil sílica (Si) e sílica amino primária–secundária (PSA). A síntese em meio aquoso foi o procedimento mais rápido, simples e gerou menos contaminante para a obtenção do GO ancorado ao suporte. As caracterizações dos materiais mostraram que as sínteses foram bem-sucedidas. Evidenciou-se que o ancoramento do GO suportado na aminopropil sílica permite obter uma ampla gama de materiais melhorando a sua capacidade de extração quando é funcionalizada com octadecilsilano e trimetilsilano. A fase adsorvente $SiGO_{aq}$C18ecap foi o material com maior capacidade de extração das xantinas com uma porcentagem de retenção de ~80%, o qual foi testado com êxito como material sorvente em formato de microcoluna para a extração das xantinas e a ocratoxina A.

As condições de extração para cada método foram avaliadas e otimizadas dependendo principalmente da complexidade do extrato e da natureza dos analitos. Os métodos on-line *in-tube* SPME-UPLC-MS/MS desenvolvidos mostraram-se adequados na análise de xantinas e ocratoxina A em matrizes complexas como o café, e aplicação em outras bebidas. Além disso, diminuiram o número de etapas de preparo de amostra, uso de solventes orgânicos, geração de resíduos, e tempo de extração e análise. Os métodos desenvolvidos foram simples, rápidos e econômicos quando comparados com técnicas de analise convencionais e dispositivos de extração que são descartados depois de um único uso. As microcolunas de extração conseguiram ser reutilizadas aproximadamente 200–300 vezes, sem apresentar efeitos de memória (carryover), nem perda do desempenho na extração.

Os materiais desenvolvidos e avaliados em conjunto com a microtécnica de extração *in-tube* SPME mostraram boa capacidade sortiva em matrizes aquosas para os analitos de interesse, com resultados robustos e confiáveis. Isto sugere que possuem um grande potencial para serem usados em estudos envolvendo uma ampla variedade de analitos com estruturas que possuem anéis aromáticos, presentes em matrizes de alimentos, ambientais e biológicas.

REFERÊNCIAS

1 GIBSON, M. Tea and coffee. *In*: GIBSON, M. **Food science and the culinary arts.** London: Academic Press, 2018. p. 353–372. Doi: 10.1016/B978-0-12-811816-0.00018-X.

2 INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). **Historical data on the global coffee trade, total production 1990 - present, 2018/19.** London: ICO, 1990. Disponível em: http://www.ico.org/historical/1990%20onwards/PDF/1a-total-production.pdf. Acesso em: 24 abr. 2019.

3 FARAH, A.; FERREIRA DOS SANTOS, T. The coffee plant and beans. *In:* PREEDY, V. R. **Coffee in health and disease prevention.** Amsterdam: Academic Press, 2015. p. 5–10. Doi: 10.1016/B978-0-12-409517-5.00001-2.

4 RODRIGUES, C.; MAIA, R.; RIBEIRINHO, M.; HILDEBRANT, P.; GAUTZ, L.; PROHASKA, T.; MÁGUAS, C. Coffee. *In*: DE LA GUARDIA, M.; GONZALVES, A. **Comprehensive analytical chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2013. v. 60, p. 573–598. Doi: 10.1016/B978-0-444-59562-1.00022-0.

5 MESQUITA, C. M.; DE REZENDE, J. E.; CARVALHO, J. S.; FABRI JUNIOR, M. A.; MORAES, N. C.; DIAS, P. T.; DE CARVALHO, R. M.; DE ARAÚJO W. G. **Manual do café**: colheita e preparo (Coffea arábica L.). Belo Horizonte: EMATER-MG, 2016. 52 p.

6 COFFEA arabica. Los Angeles: Wikipedia, 2019. Disponível em: https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Coffea_arabica_-_Köhler–s_Medizinal-Pflanzen-189.jpg. Acesso: 24 abr. 2019.

7 INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). **Trade statistics tables**. London: ICO, 2019. Disponível em: http://www.ico.org/trade_statistics.asp. Acesso em: 25 abr. 2019.

8 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Café no Brasil.** Brasília, MAPA, 2018. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira. Acesso em: 24 abr. 2019.

9 CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ. **Cafés do Brasil ocupam quinto lugar no ranking do faturamento das lavouras**. [*S. l.*], 2019. Disponível em: http://www.consorciopesquisacafe.com.br/index.php/imprensa/noticias/907-2019-01-29-16-52-37. Acesso em: 25 abr. 2019.

10 CONSORCIO PESQUISA CAFÉ. **Produção dos cafés do Brasil equivale a 36% da produção mundial em 2018.** [*S. l.*], 2018. Disponível em: <http://www.consorciopesquisacafe.com.br/index.php/imprensa/noticias/871-2018-05-30-18-51-06>. Acesso em: 25 abr. 2019.

11 PARLIMENT, T. H.; HO, C. T.; SCHIEBERLE, P. **Caffeinated beverages: health benefits, physiological effects, and chemistry**. Washington, DC: American Chemical Society, 2000. 435 p. (ACS Symposium Series).

12 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Recomendações técnicas da ABIC**. Rio de Janeiro: ABIC, [20--]. Disponível em: http://abic.com.br/recomendacoes-tecnicas/recomendacoes-tecnicas-da-abic/. Acesso em: 24 abr. 2019.

13 VIANI, R.; PETRACCO, M. Coffee. *In*: ULLMANN'S Encyclopedia of Industrial Chemistry**.** Weinheim: Wiley VCH, 2012. v. 9, p. 467- 498. Doi:0.1002/14356007.a07_315.

14 FARAH, A. Coffee constituents. *In:* CHU, Y. F. **Coffee:** emerging health effects and disease prevention. Iowa: Wiley-Blackwell, 2012. p. 22–58.

15 BØNN, S. K.; WARD, N. C.; HODGSON, J. M.; CROFT, K. D. Effects of tea and coffee on cardiovascular disease risk. **Food & Function,** Cambridge, v. 3, p. 575–591, 2012. Doi:10.1039/c2fo10288a.

16 FLAMENT, I.; BESSIÈRE-THOMAS, Y. **Coffee flavor chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2002. p. 11-29.

17 WANG, X.; LIM, L. T. Physicochemical characteristics of roasted coffee. *In:* PREEDY, V. R. **Coffee in health and disease prevention.** Amsterdam: Academic Press, 2015. p. 247-254. Doi:10.1016/B978-0-12-409517-5.00027-9.

18 LEAN, M. E. J.; ASHIHARA, H.; CLIFFORD, M. N.; CROZIER, A. A. Purine alkaloids: A focus on caffeine and related compounds in beverages. *In*: CROZIER, A.; ASHIHARA, H.; TOMÁS-BARBERÁN, F. **Teas, cocoa and coffee:** plant secondary metabolites and health. Oxford: John Willey & Sons, 2012. p. 25 - 44. Doi:10.1002/9781444347098.ch2.

19 CARRAGETA, D. F.; DIAS, T. R.; ALVES, M. G.; OLIVEIRA, P. F.; MONTEIRO, M. P; SILVA, B. M. Anti-obesity potential of natural methylxanthines. **Journal of Functional Foods,** Amsterdam, v. 43, p. 84–94, 2018. Doi: 10.1016/j.jff.2018.02.001.

20 OÑATIBIA-ASTIBIA, A.; FRANCO, R.; MARTÍNEZ-PINILLA, E. Health benefits of methylxanthines in neurodegenerative diseases. **Molecular Nutrition & Food Research,** Weinheim, v. 61, n. 6, p. 1–14, 2017. Doi:10.1002/mnfr.201600670.

21 DE PAULA LIMA, J.; FARAH, A. Methylxanthines in stimulant foods and beverages commonly consumed in Brazil. **Journal of Food Composition Analysis,** Maryland Heights, v. 78, p. 75–85, 2019. Doi: 10.1016/j.jfca.2019.02.001.

22 NKONDJOCK, A. Coffee and cancers. *In:* CHU, Y. F. **Coffee:** emerging health effects and disease prevention. Iowa: Wiley-Blackwell, 2012. p. 197–209.

23 BOROTA, D.; MURRAY, E.; KECELI, G. CHANG, A.; WATABE, J. M.; LY, M.; TOSCANO, J. P.; YASSA, M. A. Post-study caffeine administration enhances memory consolidation in humans. **Nature Neuroscience***,* New York*,* v. 17, n. 2, p. 201–203, 2014. Doi:10.1038/nn.3623.

24 SCHUSTER, J.; MITCHELL, E. S. More than just caffeine: psychopharmacology of methylxanthine interactions with plant-derived phytochemicals. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry,** Philadelphia, v. 89, p. 263–274, 2019. Doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.09.005.

25 FRENICH, A. G.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; DEL MAR AGUILERA-LUIZ, M. Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS. **Trends in Analytical Chemistry,** Amsterdam, v. 63, p. 158–169. 2014. Doi: 10.1016/j.trac.2014.06.020.

26 VIEIRA, T.; CUNHA, S.; CASAL, S. Mycotoxins in coffee. *In:* PREEDY, V. R. **Coffee in health and disease prevention.** Amsterdam: Academic Press. 2015. p. 225- 233. Doi:10.1016/B978-0-12-409517-5.00025-5.

27 GRUBER-DORNINGER, C.; NOVAK, B.; NAGL, V.; BERTHILLER, F. Emerging mycotoxins: beyond traditionally determined food contaminants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington DC, v. 65, n. 33, p. 7052–7070, 2017. Doi:10.1021/acs.jafc.6b03413.

28 PATRIARCA, A.; FERNÁNDEZ, P. V. Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. **Curent Opinion in Food Science,** Oxford, v. 14, p. 50–60, 2017. Doi:10.1016/j.cofs.2017.01.011.

29 DOHNAL, V.; PAVLÍKOVÁ, L.; KUCA, K. The pH and mobile phase composition effects ochratoxin a fluorescence at liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science,** Oxford, v. 48, p. 766–770, 2010. Doi:10.1093/chromsci/48.9.766.

30 ALSHANNAQ, A.; YU, J. H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. **International Journal of Environmental Research and Public Health***,* Basel, v. 14, n. 6, p. 1–20, 2017. Doi:10.3390/ijerph14060632.

31 VECCHIO, A.; MINEO, V.; PLANETA, D. Ochratoxin A in instant coffee in Italy. **Food Control,** Oxford, v. 28, n. 2, p. 220–223, 2012. Doi:10.1016/j.foodcont.2012.04.029.

32 BESSAIRE, T.; PERRIN, I.; TARRES, A.; BEBIUS, A.; REDING, F.; THEURILLAT, V. Mycotoxins in green coffee: Occurrence and risk assessment. **Food Control,** Oxford, v. 96, p. 59–67, 2019. Doi:10.1016/j.foodcont.2018.08.033.

33 VANESA, D.; ANA, P. Occurrence of Ochratoxin A in coffee beans, ground roasted coffee and soluble coffee and method validation. **Food Control,** Oxford, v. 30, n.2, p. 675–678 2013. Doi:10.1016/j.foodcont.2012.09.004.

34 BENITES, A. J.; FERNANDES, M.; BOLETO, A. R.; AZEVEDO, S.; SILVA, S.; LEITÃO, A. L. Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal. **Food Control,** Oxford, v. 73, p. 1223–1228, 2017. Doi:10.1016/j.foodcont.2016.10.037.

35 GALARCE-BUSTOS, O.; ALVARADO, M.; VEGA, M.; ARANDA, M. Occurrence of ochratoxin A in roasted and instant coffees in Chilean market. **Food Control,** Oxford, v. 46, p. 102–107, 2014. Doi:10.1016/j.foodcont.2014.05.014.

36 DE ALMEIDA, A. P.; ALABURDA, J.; SHUNDO, L.; RUVIERI, V.; NAVAS, S. A.; LAMARDO, L. C. A.; SABINO, M. Ochratoxin A in Brazilian instant coffee. **Brazilian Journal of Microbiology,** Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 300–303, 2007.

37 BANDEIRA, R. D. DA C. C.; UEKANE, T. M.; DA CUNHA, C. P.; DA CUNHA, V. S.; RODRIGUES, J. M.; DE GODOY, R. L.; DE LA CRUZ, M. H. C. Development and validation of a method for detection and quantification of ochratoxin A in green coffee using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v. 32, n. 4, p. 775–782, 2013. Doi:10.1590/s0101-20612012005000120.

38 CASAL, S.; VIEIRA, T.; CRUZ, R.; CUNHA, S. C. Ochratoxin A in commercial soluble coffee and coffee substitutes. **Food Research International,** Oxford, v. 61, p. 56–60, 2014. doi:10.1016/j.foodres.2014.04.045.

39 LA PERA, L.; AVELLONE, G.; LO TURCO, V.; DI BELLA, G.; AGOZZINO, P.; DUGO, G. Influence of roasting and different brewing processes on the ochratoxin A content in coffee determined by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection (HPLC-FLD). **Food Additives & Contaminants:** Part A - Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**,** Oxford, v. 25, p. 1257–1263, 2008. Doi:10.1080/02652030802112627.

40. HATZOLD, T. Introduction. *In:* CHU, Y. F. **Coffee:** emerging health effects and disease prevention. Iowa: Wiley-Blackwell, 2012. p. 1–20. Doi:10.1002/9781119949893.ch1.

41 SUÁREZ-QUIROZ, M. DE LOUISE, B.; GONZALEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SCHORR-GALINDO, S.; GUIRAUD, J. P. The impact of roasting on the ochratoxin a content of coffee. **International Journal of Food Science & Technology,** West Sussex, v. 40, n. 6, p. 605–611, 2005. Doi:10.1111/j.1365-2621.2005.00958.x.

42 MITCHELL, N. J.; CHEN, C.; PALUMBO, J. D.; BIANCHINI, A.; CAPPOZZO, J.; STRATTON, J.; RYU, D.; WU, F.; NUTRITION, H.; LANSING, E. A Risk assessment of dietary ochratoxin A in the United States. **Food and Chemical Toxicology,** Oxford, v. 100, p. 265–273, 2018. Doi:10.1016/j.fct.2016.12.037.A..

43 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução de Diretoria Colegiada– RDC Nº 07, de 18 de fevereiro de 2011.** Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília: ANVISA, 2011.

44 REGLAMENTO (CE) 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006: por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. **Official Journal of the European Union**, Bruxelles, L364, p. 5–24, 2006.

45 SANTOS, J. R.; RANGEL, A. O. S. S. Determination of caffeine in coffee using low-pressure chromatography. *In:* PREEDY, V. R. **Coffee in health and disease prevention.** Amsterdam: Academic Press. 2015. Doi:10.1016/B978-0-12-409517-5.00108-X.

46 VIEIRA, T.; CUNHA, S.; CASAL, S. Analysis of the mycotoxin Ochratoxin A in coffee. *In:* PREEDY, V. R. **Coffee in health and disease prevention.** Amsterdam: Academic Press, 2015. Doi:10.1016/b978-0-12-409517-5.00112-1.

47 RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P. D.; SMITH, R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1153, n. 1–2, p. 36–53, 2007. Doi:10.1016/j.chroma.2007.01.134.

48 KATAOKA, H. Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry.** Heidelberg, v. 396, n. 1, p. 339–364, 2010. Doi:10.1007/s00216-009-3076-2.

49 PŁOTKA-WASYLKA, J.; SZCZEPAŃSKA, N.; DE LA GUARDIA, M.; NAMIEŚNIK, J. Miniaturized solid-phase extraction techniques. **Trends in Analytical Chemistry,** Amsterdam, v. 73, p. 19–38, 2015. Doi:10.1016/j.trac.2015.04.026.

50 SERESHTI, H.; SAMADI, S. A rapid and simple determination of caffeine in teas, coffees and eight beverages. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 158, p. 8–13, 2014. Doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.095.

51 SALINAS-VARGAS, M. E.; CAÑIZARES-MACÍAS, M. P. On-line solid–phase extraction using a C18 minicolumn coupled to a flow injection system for determination of caffeine in green and roasted coffee beans. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 147, p. 182–188, 2014. Doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.134.

52 ANDRADE, M. A.; LANÇAS, F. M. Determination of Ochratoxin A in wine by packed in-tube solid phase microextraction followed by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1493, p. 41–48, 2017. Doi:10.1016/j.chroma.2017.02.053.

53 EISERT, R.; PAWLISZYN, J. Automated in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Analytical Chemistry,** Washington, DC, v. 69, n. 16, p. 3140–3147, 1997. Doi:10.1021/ac970319a.

54 KATAOKA, H. Automated sample preparation using in-tube solid-phase microextraction and its application: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 373, n. 1–2, p. 31–45, 2002. Doi:10.1007/s00216-002-1269-z.

55 MOLINER-MARTINEZ, Y.; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R.; VERDÚ-ANDRÉS, J.; MOLINS-LEGUA, C.; CAMPÍNS-FALCÓ, P. Recent advances of in-tube solid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry,** Amsterdam, v. 71, p. 205–213, 2015. Doi:10.1016/j.trac.2015.02.020.

56 KATAOKA, H.; ISHIZAKI, A.; NONAKA, Y.; SAITO, K. Developments and applications of capillary microextraction techniques: a review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 655, n. 1-2, p. 8–29, 2009. Doi:10.1016/j.aca.2009.09.032.

57 MACIEL, E. V. S.; DE TOFFOLI, A. L.; LANÇAS, F. M. Current status and future trends on automated multidimensional separation techniques employing sorbent-based extraction columns. **Journal of Separation Science,** Weinheim, v. 42, n. 1, p. 258-272, 2019. Doi:10.1002/jssc.201800824.

58 BRUNETTO, M. DEL R.; GUTIÉRREZ, L.; DELGADO, Y.; GALLIGNANI, M.; ZAMBRANO, A.; GÓMEZ, A.; RAMOS, G.; ROMERO, C. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. **Food Chemistry***,* Amsterdam, v. 100, n. 2, p. 459–467, 2007. Doi:10.1016/j.foodchem.2005.10.007.

59 VATINNO, R.; ARESTA, A.; ZAMBONIN, C. G.; PALMISANO, F. Determination of Ochratoxin A in green coffee beans by solid-phase microextraction and liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1187, n. 1-2, p. 145–150, 2008. Doi:10.1016/j.chroma.2008.02.020.

60 SAVASTANO, M. L.; LOSITO, I.; PATI, S. Rapid and automatable determination of ochratoxin A in wine based on microextraction by packed sorbent followed by HPLC-FLD. **Food Control,** Oxford, v. 68**,** p. 391–398, 2016. Doi:10.1016/j.foodcont.2016.04.016.

61 WEN, Y.; CHEN, L.; LI, J.; LIU, D.; CHEN, L. Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis. **Trends in Analytical Chemistry,** Amsterdam, v. 59, p. 26–41, 2014. Doi:10.1016/j.trac.2014.03.011.

62 SITKO, R.; ZAWISZA, B.; MALICKA, E. Graphene as a new sorbent in analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry,** Amsterdam, v. 51, p. 33–43, 2013. Doi:10.1016/j.trac.2013.05.011.

63 GAO, Y.; ZHANG, L.; HUANG, H.; HU, J.; SHAH, S.M.; SU, X. Adsorption and removal of tetracycline antibiotics from aqueous solution by graphene oxide. **Journal of Colloid and Interface Science**, Maryland Heights, v. 368, n.1, p. 540–546, 2012. Doi:10.1016/j.jcis.2011.11.015.

64 CHENG, L.; PAN, S.; DING, C.; HE, J.; WANG, C. Dispersive solid-phase microextraction with graphene oxide based molecularly imprinted polymers for determining bis(2-ethylhexyl) phthalate in environmental water. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1511, p. 85–91, 2017. Doi:10.1016/j.chroma.2017.07.012.

65 FUMES, B. H; LANÇAS, F. M. Use of graphene supported on aminopropyl silica for microextraction of parabens from water samples. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1487, p. 64–71, 2016. Doi:10.1016/j.chroma.2017.01.063.

66 DE TOFFOLI, A. L.; FUMES, B. H.; LANÇAS, F. M. Packed in-tube solid phase microextraction with graphene oxide supported on aminopropyl silica: determination of target triazines in water samples. **Journal of Environmental Science and Health. Part B:** Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, New York, v. 53, n. 7, p. 434–440, 2018. Doi:10.1080/03601234.2018.1438831.

67 VASCONCELOS S. M. E.; FUMES, B. H.; DE TOFFOLI, A. L.; LANÇAS, F. M. Graphene particles supported on silica as sorbent for residue analysis of tetracyclines in milk employing microextraction by packed sorbent. **Electrophoresis,** Weinheim, v. 39, n.15 p. 2047–2055, 2018. Doi:10.1002/elps.201800051.

68 AL-OTHMAN, Z. A.; AQEL, A.; ALHARBI, M. K. E.; BADJAH-HADJ-AHMED, A. Y.; AL-WARTHAN, A. A. Fast chromatographic determination of caffeine in food using a capillary hexyl methacrylate monolithic column. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 132, n. 4, p. 2217–2223, 2012. Doi:10.1016/j.foodchem.2011.12.071.

69 ROSTAGNO, M. A.; MANCHÓN, N.; ARRIGO, M.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; MARTÍNEZ, J. Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 685, n. 2, p. 204–211, 2011. Doi:10.1016/j.aca.2010.11.031.

70 HACKETT, J.; TELEPCHAK, M. J.; COYER, M. J. Analysis of total caffeine and other xanthines in specialty coffees using mixed mode solid-phase extraction and liquid chromatography-diode-array detection after microwave digestion. **Journal of Analytical Toxicology**, Oxford, v. 32, n.8, p. 695–701, 2008. Doi:10.1093/jat/32.8.695.

71 RODRIGUES, C. I.; MARTA, L.; MAIA, R.; MIRANDA, M.; RIBEIRINHO, M.; MÁGUAS, C. Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, Maryland Heights, v. 20, n. 5, p. 440–448, 2007. Doi:10.1016/j.jfca.2006.08.005.

72 HUCK, C. W.; GUGGENBICHLER, W.; BONN, G. K. Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in coffee by near infrared spectroscopy (NIRS) compared to high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 538, p. 195–203, 2005. Doi:10.1016/j.aca.2005.01.064.

73 RUSSO, M.; ZOCCALI, M.; DE GARA, L.; FANALI, C.; DUGO, L.; DUGO, P.; MONDELLO, L. Use of an online extraction technique coupled to liquid chromatography for determination of caffeine in coffee, tea, and cocoa. **Food Analytical Methods,** New York, *v.* 11, n. 10, p. 2637–2644, 2018. Doi:10.1007/s12161-018-1247-5.

74 HUERTAS-PÉREZ, J. F.; ARROYO-MANZANARES, N.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; GÁMIZ-GRACIA, L. Solid phase extraction as sample treatment for the determination of Ochratoxin A in foods: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.** New York, v. 57, n. 16, p. 3405–3420, 2017. Doi:10.1080/10408398.2015.1126548.

75 FRENETTE, C.; PAUGH. R. J.; TOZLOVANU. M.; MAUD. J.; PFOHL-LESZKOWICZ. A.; MANDERVILLE. R. Structure – activity relationships for the fluorescence of ochratoxin A : insight for detection of ochratoxin A metabolites. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 617, n. 1-2, p. 153–161, 2008. doi:10.1016/j.aca.2007.12.030.

76 BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica: áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos.** Brasília: MAP, 2015. 51 p. Doi:10.1107/S1744309112015230.

77 UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Guidance for industry**: Q2B validation of analytical procedures: methodology. Rockville: FDA, 1996. p. 301–827. Disponível em: https://www.fda.gov/media/71725/download. Acesso em: 24 abr. 2019.

78 VARGAS, E. A.; DOS SANTOS, E. A. Determination of Ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Rockville, v. 88, n. 3, p. 773–779, 2005.

79 SERESHTI, H.; KHOSRAVIANI, M.; SAMADI, S.; AMINI-FAZL, M. S. Simultaneous determination of theophylline, theobromine and caffeine in different tea beverages by graphene-oxide based ultrasonic-assisted dispersive micro solid-phase extraction combined with HPLC-UV. **RSC Advances**, Cambridge, v. 4, n. 87, p. 47114–47120, 2014. Doi:10.1039/c4ra06412g.

80 PARK, S.; AN, J.; POTTS, J. R.; VELAMAKANNI, A.; MURALI, S.; RUOFF, R. S. Hydrazine-reduction of graphite- and graphene oxide. **Carbon,** Oxford, v. 49, n. 9, p. 3019–3023, 2011. Doi:10.1016/j.carbon.2011.02.071.

81 LIU, Q.; SHI, J.; SUN, J.; WANG, T.; ZENG, L.; JIANG, G. Graphene and Graphene Oxide Sheets Supported on Silica as Versatile and High-Performance Adsorbents for Solid-Phase Extraction. **Angewandte Chemie,** Weinheim, v. 50, n. 26, p. 5913–5917, 2011. Doi:10.1002/anie.201007138.

82 NAZARIO, C. E. D. **Desenvolvimento e caracterização de materiais beseados em sílica com aplicabilidade em extração em fase sólida e cromatografía líquida de ultra alta eficiência**. 2013. 225 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

83 MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Estadística y quimiometría para química analítica.** 4. ed. Madrid: Pearson Educación, 2002. p. 269. ISBN: 84-205-3514-1.

84 KUTNER, M. H.; NACHTSHEIM, C. J.; NETER, J.; LI, W. **Applied linear statistical models.** 5. ed. Boston: McGraw-Hill Irwin, 2005. ISBN 0-07-238688-6.

85 CHUA, C. K.; PUMERA, M. Chemical reduction of graphene oxide: a synthetic chemistry viewpoint. **Chemical Society Reviews**, Cambridge. v. 43, n.1, p. 291–312, 2014. Doi:10.1039/c3cs60303b.

86 SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds.** 7. ed. New York: John Wiley & Sons, 2005. Doi:10.1016/0022-2860(76)87024-x.

87 EUROPEAN COMMISSION. **Directive 1999/4/EC of the European Parliament and of the Council of 22 February 1999 relating to coffee extracts and chicory extracts**. *EUR-Lex - 31999L0004 - EN - EUR-Lex* (1999). Disponível em: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1561675245784&uri=CELEX:31999L0004. Acesso em: 27 mai. 2019.

88 BELGUIDOUM, K.; AMIRA-GUEBAILIA, H.; BOULMOKH, Y.; HOUACHE, O. HPLC coupled to UV-vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, Amsterdam**,** v. 45, n. 4, p. 1314–1320, 2014. Doi:10.1016/j.jtice.2014.03.014.

89 FRIZZARIN, R. M.; MAYA, F.; ESTELA, J. M.; CERDÀ, V. Fully-automated in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of caffeine in coffee beverages. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 212, p. 759–767, 2016. Doi:10.1016/j.foodchem.2016.06.032.

90 PERRONE, D.; DONANGELO, C. M.; FARAH, A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 110, p. 1030–1035, 2008. Doi:10.1016/j.foodchem.2008.03.012.

91 WU, J.; XIE, W.; PAWLISZYN, J. Automated in-tube solid phase microextraction coupled with HPLC-ES-MS for the determination of catechins and caffeine in tea. **Analyst**, Cambridge, v. 125, n. 12, p. 2216–2222, 2000. Doi:10.1039/b006211l.

92 FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA. **Café de Colombia:** molienda y extracción. [*S. l.*], 2010. Disponível em: http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobre_el_cafe/el_cafe/industrializacion/molienda_y_extraccion. Acesso em: 24 abr. 2019.

93 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução nº 277, de 22 de setembro de 2005**. Regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. Brasília: ANVISA, *2*005.

94 TZANAVARAS, P. D.; THEMELIS, D. G. Development and validation of a high-throughput high-performance liquid chromatographic assay for the determination of caffeine in food samples using a monolithic column. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 581, p. 89–94, 2007. Doi:10.1016/j.aca.2006.07.081.

95 TAMURA, M.; UYAMA, A.; MOCHIZUKI, N. Development of a multi-mycotoxin analysis in beer-based drinks by a modified quechers method and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Analytical sciences**, Tokyo, v. 27, n. 6, p. 629–635, 2011.Doi:10.2116/analsci.27.629.

96 SIBANDA, L.; DE SAEGER, S.; VAN PETEGHEM, C. Optimization of solid-phase clean-up prior to liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in roasted coffee. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 959, p. 327–33, 2002. Doi:10.1016/S0021-9673(02)00408-9.

97 CRAMER, B.; MAIKA, K.; HUMPF, H. U. Identification and in Vitro cytotoxicity of ochratoxin a degradation products formed during coffee roasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington DC, v. 56, n. 14, p. 5673–5681, 2008. Doi: 10.1021/jf801296z.

98 SUECK, F.; HEMP. V.; SPECHT. J.; TORRES. O.; CRAMER, B.; HUMPF, H. Occurrence of the Ochratoxin A degradation product 2’r-ochratoxin a in coffee and other food: an update. **Toxins**, Basel, v. 11, n. 6, p. 1–10, 2019. Doi: 10.3390/toxins11060329.

99 BITTNER, A.; CRAMER, B.; HUMPF, H. Matrix binding of Ochratoxin A during roasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington DC, v. 61, n. 51, p. 12737–12743, 2013. Doi: 10.1021/jf403984x.

100 RHOUATI, A.; YANG, C.; HAYAT, A.; MARTY, J. L. Aptamers: A promosing tool for ochratoxin a detection in food analysis. **Toxins**, Basel, v. 5, n.11, p. 1988–2008, 2013. Doi:10.3390/toxins5111988.

101 H A, T. H. Recent advances for the detection of ochratoxin A. **Toxins**, Basel, v. 7, n.12, p. 5276–5300, 2015. doi:10.3390/toxins7124882.

102 DRUNDAY, V.; PACIN, A. Occurrence of Ochratoxin A in coffee beans, ground roasted coffee and soluble coffee and method validation. **Food Control**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 675-678, 2013. doi:10.1016/j.foodcont.2012.09.004.103.

103 GARCÍA-MORALEJA, A.; FONT, J.; MAÑES, J.; FERRER, E. Analysis of mycotoxins in coffee and risk assessment in Spanish adolescents and adults. **Food and Chemical Toxicology,** Kidlington, v. 86, p. 225-233, 2015. Doi:10.1016/j.fct.2015.10.014.