

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DOS TEORES DE CAFEÍNA, TRIGONELINA E ÁCIDO CLOROGÊNICO EM AMOSTRAS DE CAFÉ CRU POR ANÁLISE MULTIVARIADA (PLS) EM DADOS DE ESPECTROSCOPIA POR REFLEXÃO DIFUSA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO¹

MORGANO, M.A. ¹ (PG); CAMARGO, C. ¹ (IC); PAGEL, A.P. ² (IC); FERRÃO, M.F. ² (PQ); BRAGAGNOLO, N. ³ (PQ) e FERREIRA, M.M.C. ⁴ (PQ)

¹ CONSÓRCIO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DO CAFÉ

¹ Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada - ITAL <morgano@ital.org.br>; ² Depto de Química e Física - UNISC; ³ Depto. de Ciência de Alimentos - FEA - UNICAMP; ⁴ Instituto de Química - UNICAMP

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi investigar o uso da espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) associada a métodos multivariados de análise (método dos mínimos quadrados parciais - PLS) para a determinação do teor de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico em amostras de café cru. O método analítico proposto possibilita a determinação direta, sem tratamento e destruição da amostra, com obtenção de resultados rápidos (em intervalos da ordem de minutos), redução de custos, mão-de-obra e equipamentos e sem o consumo de reagentes químicos de forma a preservar o meio ambiente. Os níveis de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico foram inicialmente determinados usando-se como método de referência a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); posteriormente foram construídos modelos de regressão a partir dos espectros no infravermelho próximo das amostras de café cru. O método proposto forneceu resultados com boa capacidade de previsão dos teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico, sendo os erros médios inferiores a 8% para as três propriedades estudadas.

Palavras-chave: cafeína, trigonelina, ácido clorogênico, infravermelho, PLS.

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CAFFEINE, TRIGONELIN AND CHLOROGENIC ACID CONTENTS IN SAMPLES OF RAW COFFEE BY MULTIVARIATE ANALYSIS (PLS) OF DATA OBTAINED BY DIFFUSE REFLECTION NEAR INFRARED SPECTROSCOPY

ABSTRACT: The aim of this work was to investigate the use of the spectroscopy in the near infrared (NIR) associated to multivariate analysis methods (method of the partial least square - PLS) for the determination of the caffeine, trigoneline and chlorogenic acid grade in samples of raw coffee. The proposed analytic method should make possible direct determinations (without treatment and

destruction) of the sample, with fast results (in intervals of the order of minutes), reduction of costs, labor and equipments and without the consumption of chemical reagents in way to preserve the environment. The caffeine, trigoneline and chlorogenic acid levels were initially used as reference method the technique of high performance liquid chromatography (HPLC) and later regression models were built starting from the spectra of the near infrared. The proposed method supplied results with good capacity of forecast of the caffeine, trigoneline and chlorogenic acid grade, and the mean error were below to 8% for the three studied properties.

Key words: caffeine, trigoneline, chlorogenic acid, infrared, PLS.

INTRODUÇÃO

A cafeína (1,3,7-Trimetilxantina) é um alcalóide encontrado em grande variedade de bebidas (chá, café, refrigerantes). Quando ingerida, atua como diurético e estimulante dos sistemas nervoso central e cardiovascular. A trigonelina tem recebido considerável atenção tanto pelo ponto de vista sensorial como pelo nutricional, além da baixa atividade fisiológica, tendo efeito sobre o sistema nervoso central, a secreção da bile e a motilidade intestinal. O termo ácido clorogênico é usado para referir-se a uma família de ésteres formados por um ou mais ácidos aromáticos, onde predominam os radicais representados pelos grupos $-OH$, $-H$ e $-OCH_3$. O ácido clorogênico é normalmente metabolizado em plantas, freqüentemente associado com a proteção destas contra o ataque de insetos ou microrganismos¹. A Figura 1 apresenta as fórmulas estruturais desses compostos.

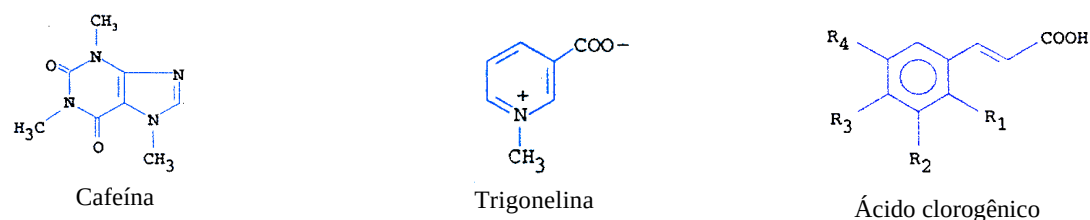


Figura 1 - Fórmulas químicas estruturais de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico. Os radicais R_1 , R_2 , R_3 e R_4 são normalmente representados pelos grupos $-OH$, $-H$ e $-OCH_3$.

Muitos métodos analíticos são citados na literatura para a quantificação do teor de cafeína em café. Esses métodos incluem a determinação gravimétrica^{2,3}, a espectrofotometria na região do ultravioleta^{3,4}, a cromatografia^{5,6,7}, a eletroforese capilar⁸ e a espectrometria de massas⁹. Recentemente, o emprego de técnicas de reflexão no infravermelho, associadas aos métodos multivariados de análise, tem sido objeto de estudo para estimar o teor desses compostos em produtos alimentícios.

Dentre as diversas técnicas de reflexão no infravermelho pode-se destacar a reflexão difusa, já bem fundamentada na literatura¹⁰. Esta técnica vem sendo amplamente aplicada utilizando-se equipamentos que operam na região do infravermelho próximo, na análise de alimentos, devido à facilidade em obter espectros de pós, sólidos e espécies adsorvidas em sólidos.

Assim, o objetivo deste trabalho foi o de desenvolver uma metodologia para a determinação dos teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico em amostras de café cru, utilizando-se dos espectros no infravermelho próximo (NIR) e da aplicação do método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Para construção dos modelos de regressão foram usadas 55 amostras de café cru, da variedade arábica, procedentes de diferentes regiões dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Bahia. Todas as amostras foram inicialmente homogeneizadas em moinho de facas até a obtenção de partículas de tamanho reduzido e passaram por peneira de 0,84 mm de tamanho de abertura de poro.

Método de determinação de cafeína por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O procedimento experimental foi realizado de acordo com o descrito por De Maria¹¹ como visto a seguir.

Foi pesado 0,5 g das amostras seguido de extração a quente (80°C) com 30 mL de CH₃OH:H₂O deionizada (70:30 v/v), permanecendo a mistura em banho-maria sob agitação por 10 minutos.

A mistura foi filtrada em balão volumétrico de 200 mL e, desta solução, tomou-se uma alíquota de 5 mL, transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com a solução (70:30 v/v) de metanol e água. Tomou-se uma nova alíquota de 2 mL e deixou-se secar sob N₂ até que todo o metanol fosse evaporado, completando posteriormente o volume com água deionizada até o volume inicial de 2 mL.

A solução foi filtrada, procedendo-se à determinação de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico, utilizando um sistema de CLAE, nas seguintes condições cromatográficas:

- Coluna: TSK G3000 SW HPGF (300 x 8 mm, partículas de 10 µm de tamanho); coluna de guarda: TSK (7,5 mm x 7,5 cm, partículas de 10 µm de tamanho); fase móvel: água deionizada; fluxo de fase móvel: 1,0 mL/min; detector: espectrofotométrico de conjunto de fotodiodos, fixado em 272 nm; temperatura da coluna: 30°C; cromatógrafo: Shimadzu, modelo M10AVP.

Obtenção dos espectros na região do infravermelho próximo

Os espectros no infravermelho próximo foram coletados conforme descrito na Tabela 1, sendo realizadas três réplicas para cada amostra, com resolução de 4 cm^{-1} e 16 varreduras para cada espectro. O infravermelho foi equipado com um acessório de reflectância difusa, sendo os sinais expressos em $\log(1/R)$.

Tabela 1 - Instrumentação e região empregada na obtenção dos espectros

Técnica	Instrumental	Região
NIR	Espectrômetro BOMEM DA-08 + acessório de reflectância difusa (JASCO)	4000 - 10.000 cm^{-1}

Construção dos modelos de regressão

O método de regressão utilizado no tratamento de dados deste estudo foi o método por mínimos quadrados parciais (PLS) e o *software* usado foi o *Pirouette*¹². A construção do modelo a partir dos espectros no infravermelho próximo foi feita utilizando a região espectral de 10.000–5.800 cm^{-1} e 5.500–4.900 cm^{-1} .

No modelo PLS, as informações espectrais e as concentrações são usadas ao mesmo tempo na fase de calibração. Uma matriz contendo os espectros dos padrões (**X**) é relacionada com outra matriz que armazena dados sobre a sua concentração (**Y**), resultando as equações 1 e 2, nas quais os elementos **T** e **U** são chamados de *scores* de **R** e **C**, respectivamente, e os elementos de **P** e **Q** são chamados de *loadings*. Já as matrizes **E** e **F** representam os erros da modelagem de **X** e **Y**.

O modelo resultante é:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^t + \mathbf{E} \quad (1)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}^t + \mathbf{F} \quad (2)$$

O resultado desse procedimento é uma equação linear de uma curva de calibração semelhante à equação 3, em que **R** é uma matriz de resposta (assim como um conjunto de espectros) para uma série de amostras de calibração, **c** é um vetor com a concentração de todas as amostras, **b** é um vetor contendo os parâmetros do modelo e **e** é um vetor que representa o ruído do espectro e os erros do modelo.

$$\mathbf{c} = \mathbf{Rb} + \mathbf{e} \quad (3)$$

CrITÉRIOS para avaliação dos modelos de regressão

Para que um modelo seja eficiente, é necessário que ele descreva da melhor forma possível a situação real, levando-se em conta o maior número possível de variações.

Uma medida empregada para avaliar a habilidade de previsão de um modelo é o SEC (Standard Error of Calibration), que apresenta informações a respeito da diminuição do erro produzida pelo aumento da complexidade do modelo, sendo expressa conforme equação 4, em que n representa o número de amostras utilizadas, y_i é o valor de referência da i -ésima amostra e $\hat{y}_i$ é a previsão para o valor desta amostra.

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (4)$$

Na avaliação do conjunto de amostras de validação pode-se ajustar a expressão empregada para determinar o SEC, sendo denominada SEV. Este critério é bastante útil quando se deseja avaliar se o modelo tende a superdimensionar o número de variáveis latentes a serem empregadas. Os valores de SEV são calculados com os y_i de referência e os valores estimados com o conjunto de validação, conforme equação 5.

$$SEV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (5)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na construção dos modelos de regressão foram utilizados os valores médios dos teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico obtidos na análise da CLAE e 165 espectros das amostras de café, dos quais 93 foram utilizados na calibração e 72 na validação dos modelos. Foram construídos diversos modelos, dentre os quais foi escolhido aquele com melhor capacidade de previsão dos resultados dos teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico.

Na tentativa de minimizar os efeitos causados pela dificuldade na obtenção de um espectro ideal, foram empregadas técnicas de tratamentos matemáticos nos espectros, antes de o conjunto dos espectros ser modelado pelas técnicas quimiométricas. Assim, como pré-processamento, os dados foram centrados na média e aos espectros NIR foram aplicadas a correção multiplicativa de sinal (MSC) e a primeira derivada.

Na aquisição dos espectros por técnicas de reflexão, alguns fenômenos indesejáveis, como o espalhamento da luz, provocado pela não-homogeneidade da amostra, decorrente de diferenças de granulometria, geometria, empacotamento e orientação das partículas, podem ocorrer. Também costumam acompanhar os sinais analíticos os ruídos das mais diversas origens. A presença destes ruídos pode dificultar a interpretação, bem como a modelagem das propriedades associadas aos sinais espectrais, sendo recomendada sua eliminação ou minimização. A técnica de correção do espalhamento de luz (MSC) é um processo matemático que visa corrigir o efeito do espalhamento de luz presente nos espectros obtidos por técnicas de reflexão. Na MSC a interferência relativa ao espalhamento de luz é minimizada com base no espalhamento médio de todos os espectros formadores na matriz de dados **X**. Nas Figuras 2 e 3 podem ser observados os conjuntos de espectros NIR antes e após a aplicação da MSC. O conjunto dos espectros apresentado na Figura 3 é bem mais uniforme.

A aplicação da primeira derivada sobre os dados espectrais pode destacar ombros espectrais, bem como minimizar o efeito de inclinações provocadas na linha de base dos espectros, devido à morfologia das partículas. Esse processo faz com que as informações contidas ao longo dos diferentes comprimentos de onda sejam geralmente acentuadas.

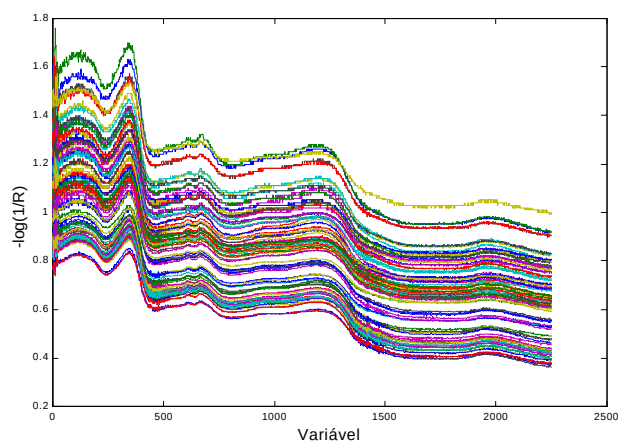


Figura 2 - Conjunto de espectros sem tratamento.

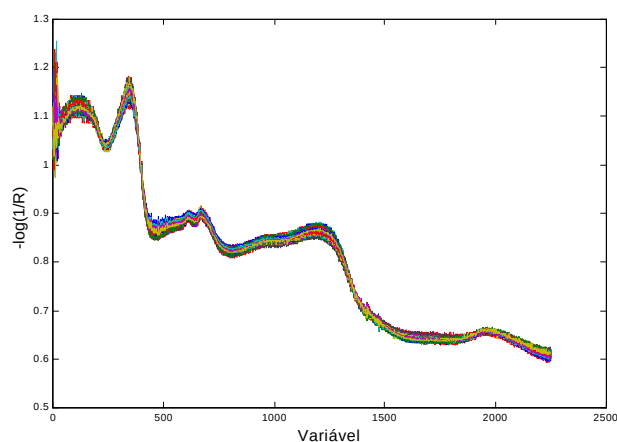


Figura 3 - Conjunto de espectros após tratamento MSC.

Os resultados obtidos para algumas das amostras usadas na validação do modelo de regressão e seus respectivos desvios-padrões são apresentados na Tabela 2. Os valores encontrados pelo método proposto (NIR) forneceram resultados concordantes com os obtidos pela técnica de CLAE.

Tabela 2 - Resultados dos teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico em amostras de café cru obtidos pela técnica de espectroscopia no infravermelho próximo e pela técnica de CLAE

Amostra	Cafeína (g/100g)		Ác.Clorogênico (g/100g)		Trigonelina (g/100g)	
	CLAE	NIR	CLAE	NIR	CLAE	NIR
2	1,161 ± 0,018	1,128 ± 0,192	5,951 ± 0,042	5,846 ± 0,607	0,874 ± 0,051	0,866 ± 0,179
4	1,135 ± 0,034	1,114 ± 0,041	6,169 ± 0,119	5,537 ± 0,376	1,160 ± 0,043	1,044 ± 0,025
10	0,879 ± 0,010	0,836 ± 0,065	5,423 ± 0,102	5,355 ± 0,134	0,868 ± 0,019	0,849 ± 0,041
11	1,087 ± 0,020	1,027 ± 0,077	5,061 ± 0,079	5,608 ± 0,314	1,084 ± 0,056	0,992 ± 0,117
13	0,903 ± 0,006	1,018 ± 0,017	5,292 ± 0,048	5,811 ± 0,364	0,909 ± 0,020	0,986 ± 0,064
15	0,974 ± 0,020	0,955 ± 0,066	5,233 ± 0,073	5,380 ± 0,196	0,853 ± 0,028	0,887 ± 0,070
21	1,063 ± 0,013	1,013 ± 0,018	5,886 ± 0,007	5,508 ± 0,102	0,950 ± 0,014	0,943 ± 0,005
25	1,153 ± 0,003	1,199 ± 0,073	6,088 ± 0,161	6,138 ± 0,781	0,949 ± 0,014	0,951 ± 0,010
33	1,236 ± 0,026	1,226 ± 0,179	5,783 ± 0,149	6,251 ± 0,720	0,962 ± 0,024	0,997 ± 0,016
35	1,108 ± 0,026	1,023 ± 0,035	5,958 ± 0,150	5,840 ± 0,559	0,957 ± 0,008	1,021 ± 0,174
37	0,939 ± 0,010	0,939 ± 0,055	6,142 ± 0,020	5,485 ± 0,004	1,127 ± 0,014	0,968 ± 0,065
41	0,906 ± 0,006	0,908 ± 0,040	4,598 ± 0,076	4,636 ± 0,222	0,842 ± 0,007	0,764 ± 0,103
42	0,782 ± 0,012	0,887 ± 0,035	4,671 ± 0,034	4,593 ± 0,291	0,765 ± 0,005	0,707 ± 0,028
46	0,957 ± 0,030	0,935 ± 0,043	5,088 ± 0,057	5,086 ± 0,219	0,854 ± 0,002	0,872 ± 0,049
53	0,873 ± 0,013	0,870 ± 0,041	4,990 ± 0,031	4,908 ± 0,098	0,840 ± 0,003	0,778 ± 0,007
55	0,953 ± 0,005	0,919 ± 0,051	5,193 ± 0,006	4,901 ± 0,372	0,782 ± 0,006	0,771 ± 0,050

Para verificar a validade do modelo construído foram determinados o erro-padrão de calibração (SEC), o erro-padrão de validação (SEV) e o coeficiente de correlação (R^2). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Avaliação dos modelos de regressão por PLS para determinação do teor de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico em amostras de café cru

Parâmetro	Cafeína	Ácido clorogênico	Trigonelina
R ²	0,9528	0,9857	0,9895
SEC (g/100g)	0,017	0,042	0,009
SEV (g/100)	0,064	0,466	0,091
Nº de Fatores	10	7	8

Os erros relativos médios entre o método quimiométrico e o método de referência (CLAE) foram de 5,4% para a cafeína, 6,7% para o ácido clorogênico e 7,7% para a trigonelina, o que indica boa capacidade de previsão dos teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico pelo método proposto para as amostras de café cru.

CONCLUSÃO

O método proposto mostrou-se eficiente para determinação dos teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico.

Os modelos de regressão construídos apresentam melhor desempenho quando são empregados como pré-processamentos a centralização na média, a aplicação de primeira derivada e a correção multiplicativa de sinal.

As principais vantagens do método proposto, quando comparado com o método tradicional de CLAE, são: redução do tempo de análise, não-destruição da amostra, pouca manipulação da amostra, resíduos químicos não são formados e custo reduzido por amostra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CLARKE, R.J., MACRAE, R., **Coffee**. Elsevier Applied Science, v.1, p.127-128, 1985.

CORTES, F.F. Nota sobre um novo processo de doseamento da cafeína no café. **Rev. Soc. bras. Quim.**, 4, 105, 1993.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ª ed. São Paulo, IMESP, I, 189-92, 195-6, 1985.

PASEIRO, P. & SIMAL, J. Contribucion a la determinacion espectrofotometrica de cafeína en cafes. **An. Bromat.**, 36, 97-108, 1984.

- MUHATADI, F.J., EL-HAWARY, S.S., HIFNAWY, M.S. Comparative HPLC and GLC determination of caffeine in different food products. **J. Liq. Chromatogr.**, 13, 1013-1028, 1990.
- CHEN, Q.C., MOU, S.F., HOU, X.P., NI, Z.M. Simultaneous determination of caffeine, theobromine and theophylline in foods and pharmaceutical preparations by using ion chromatography. **Anal. Chim. Acta**, 371, 287-296, 1998.
- WANG, A.P.L., GUO, X., LI, L. Liquid chromatography/Time-of-flight mass spectrometry with a pulse sample introduction interface. **Anal. Chem.**, 66, 3664-3675, 1994.
- HURST, W.J., MARTIN, R.A. The quantitative determination of caffeine in beverages using capillary electrophoresis. **Anal. Chem.**, 65, 389-391, 1993.
- LAURITSEN, F.R., KETOLA, R.A. Quantitative determination of semivolatile organic compounds in solution using trap-and-release membrane inlet mass spectrometry. **Anal. Chem.**, 69, 4917-4922, 1997.
- HOOTON, D.E. The versatility of near-infrared reflectance devices. **Cereal Food World**, 23, 176-179, 1978.
- DE MARIA, C.B., TRUGO, L.C., MOREIRA, R.F.A. Simultaneous determination of total chlorogenic acid, trigonelline and caffeine in green coffee sample by high performance gel filtration chromatography. **Food Chem.**, 52, 447-449, 1995.
- PIROUETTE, Multivariate Data Analysis for IBM PS Systems, version 3.2, Infometrix, Seattle, WA, USA, 2001