

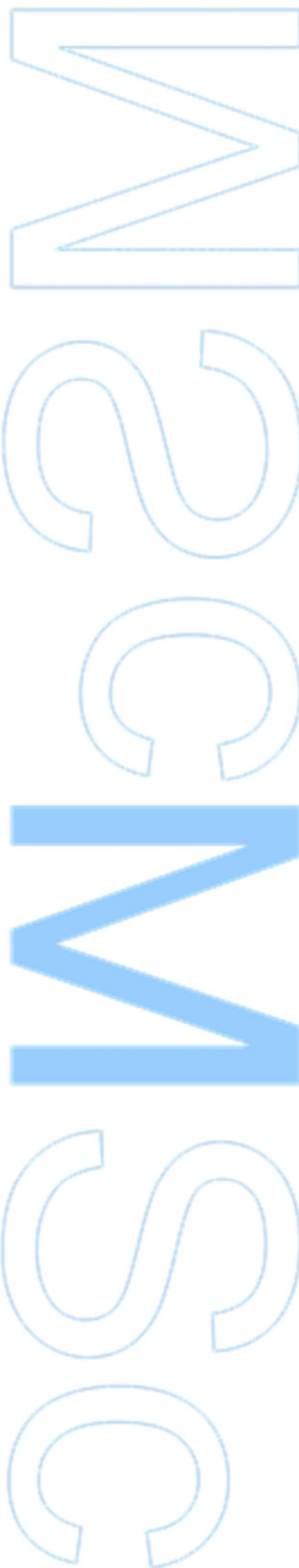


Determinação da trigonelina em cafés através de um sistema de baixa pressão com separação cromatográfica e deteção eletroquímica

**Manuela Norberta dos Santos Braga Teixeira
de Sousa**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em
Química

2018



Determinação da trigonelina em cafés através de um sistema de baixa pressão com separação cromatográfica e deteção eletroquímica

Manuela Norberta dos Santos Braga Teixeira de Sousa

Mestrado em Química

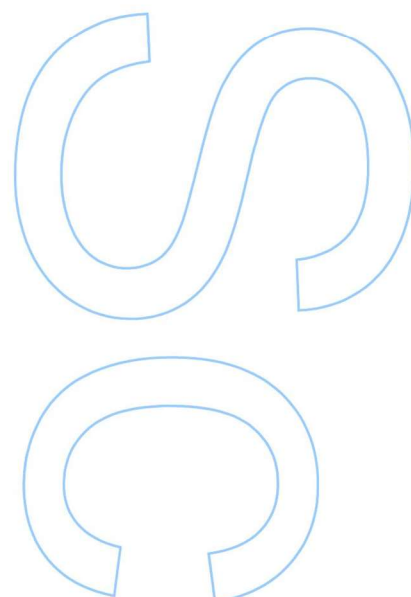
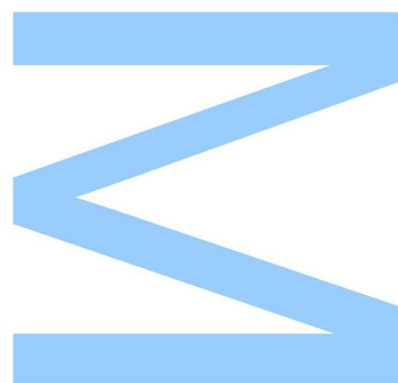
Departamento de Química e Bioquímica
2018

Orientador

Paulo Joaquim Ferreira de Almeida, Professor Auxiliar, FCUP

Coorientador

João Rodrigo da Silva Santos, Investigador Pós-Doutoramento – REQUIMTE-FCUP



Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos meus orientadores pelo apoio e disponibilidade sempre demonstrada que permitiram levar a bom porto esta dissertação.

Ao Professor Paulo Joaquim Almeida, por ter aceitado a minha integração no seu grupo de investigação, por todos os ensinamentos que me deu, por toda a paciência e pelo encorajamento incondicional, sem o qual não teria sido possível a realização deste trabalho.

Ao Doutor João Rodrigo Santos, por todo o tempo que me dedicou, por tudo que me ensinou com paciência infinita, pela motivação e ajuda e por todas as sugestões durante todas as etapas deste trabalho, a quem exprimo a minha gratidão.

Ao Professor José António Rodrigues, do grupo QuAQuA, pela oportunidade que me deu em poder trabalhar neste grupo de investigação. Foi para mim uma grande honra e uma enorme realização pessoal.

Ao Professor Luís Ferreira Guido, do grupo QuAQuA, pelas conversas construtivas.

A todos os investigadores do grupo QuAQuA com quem convivi, nomeadamente a Dra. Inês Valente, o Dr. Daniel Carvalho e o Dr. Rui Ramos, pela ajuda, e pela oportunidade de discutir ideias.

Aos colegas do laboratório, em especial à Liliana Cordeiro, à Cláudia Sousa, ao Pedro Brandão, à Stépánka Skalová e ao Marco Valente, pelo espírito de camaradagem, pela ajuda e pela amizade.

À minha família.

A todos, o meu sincero e profundo **Muito Obrigado**

Resumo

Neste trabalho explorou-se, pela primeira vez, a cromatografia de par iônico num sistema de fluxo de baixa pressão para a determinação de trigonelina em amostras de café. O sistema foi composto exclusivamente pelas partes de fluxo tradicionais, uma bomba peristáltica e uma válvula de injeção, além de uma coluna monolítica C₁₈. O sistema de detecção baseou-se num elétrodo de diamante dopado com boro, usado como elétrodo de trabalho.

A determinação da trigonelina em amostras de café foi o caso de estudo selecionado. A trigonelina, um alcaloide, é um marcador de qualidade do café por ser um precursor de vários compostos de impacto organolético e geralmente é determinado por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta. Assim, é de grande interesse o desenvolvimento de metodologias analíticas alternativas.

A metodologia desenvolvida, baseada na cromatografia de par iônico com detecção amperométrica, exigiu um estudo das condições experimentais necessárias para obter o sinal eletroquímico da trigonelina, bem como, uma otimização da composição da fase móvel. O procedimento adotado permitiu a separação do analito estudado dos outros compostos da matriz do café e a sua quantificação.

Verificou-se que a trigonelina apresenta um sinal de redução no elétrodo de diamante dopado com boro ao potencial de -1,4 V, sendo um processo irreversível. O potencial de condicionamento em sistema de análise por injeção em fluxo com detecção em amperometria pulsada e os tempos dos pulsos de potenciais foram $E_{red} = -1,4 \text{ V}$ (0,03 s) e $E_{cond} = 1,0 \text{ V}$ (0,1 s). Selecionou-se uma solução ajustadora de força iônica de composição ácido clorídrico 1,0 mol dm⁻³. A composição ótima da fase móvel foi acetonitrilo 10% (v/v), tetradecanossulfonato de sódio 0,25 mmol dm⁻³ e ácido fosfórico 0,10 (v/v). O volume do *loop* mais apropriado foi 34 µL, o caudal ótimo da fase móvel foi 0,71 mL min⁻¹ e da solução ajustadora de força iônica foi 0,14 mL min⁻¹.

A região de linearidade para a determinação da trigonelina foi verificada através da relação $I = f([trigonelina])$, pelo método da curva de calibração na gama linear entre 10 µmol dm⁻³ e 90 µmol dm⁻³. Os limites de detecção e de quantificação e o coeficiente de determinação foram de 3,11 µmol dm⁻³, 10,4 µmol dm⁻³ e 0,999 respetivamente. A gama de valores para os teores de trigonelina no café arábica foi de 0,939 a 0,337 em %(m/m), para café verde a torrado escuro enquanto que para o café robusta se obteve a gama de valores de 0,802 a 0,269 em %(m/m).

Palavras-chave: Cromatografia a baixa pressão, cromatografia por iônica, trigonelina, eletrodo de diamante dopado com boro, café.

Abstract

In this work, ion-pair chromatography was explored for the first time in a low-pressure flow system for the determination of trigonelline in coffee samples. The system consisted exclusively of traditional flow parts, a peristaltic pump and an injection valve, plus a C₁₈ monolithic column. The detection system comprised a doped diamond electrode, used as working electrode.

The determination of trigonelline in coffee samples was the case-study selected. Trigonelline, an alkaloid, is a coffee quality marker because it is a precursor of various compounds with an organoleptic impact and it is usually determined using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection methodologies. Thus, the development of alternative analytical methodologies is of great interest.

The proposed methodology, based on ion pair chromatography with amperometric detection, required a study of the experimental conditions needed to obtain the electrochemical signal of trigonelline, as well as an optimization of the composition of the mobile phase. The procedure adopted allowed the separation of the analyte from the other compounds in the coffee matrix and its quantification.

It was verified that trigonelline shows a reduction signal in the boron doped diamond electrode at the potential of -1.4 V, being it an irreversible process. The conditioning potential in the flow analysis system with pulsed amperometric detection and the times of potential pulses were $E_{\text{red}} = -1.4 \text{ V}$ (0.03 s) and $E_{\text{cond}} = 1.0 \text{ V}$ (0.1 s). An ionic strength adjustment solution of 1.0 mol dm⁻³ hydrochloric acid composition was selected. The optimum composition of the mobile phase was acetonitrile 10% (v/v), tetradecanesulfonate 0.25 mmol dm⁻³ and orthophosphoric acid 0.10 (v/v). The most appropriate loop volume was 34 μL , the optimal mobile phase flow was 0.71 mL min⁻¹ and the ionic strength adjustment solution was 0.14 mL min⁻¹.

The linearity region for the determination of trigonelline was verified through the relation $I = f([trigonelline])$, by the calibration curve method in the linear range between 10 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ and 90 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. The detection limit, the quantification limit and the determination coefficient were 3.11 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, 10.4 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ and 0.999, respectively. The range of values for trigonelline in arabic coffee was 0.939 to 0.337 in % (w/w), for green to dark roasted coffee, whereas for the robust coffee the values ranged from 0.802 to 0.269 in % (m/m).

Keywords: Low pressure chromatography, ion pair chromatography, trigonelline, boron doped diamond electrode, coffee.

Índice

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	III
ABSTRACT	V
ÍNDICE	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABELAS	XI
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XIII
PARTE I TEÓRICA.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. O CAFÉ.....	5
2.1 EFEITO DA TORRA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA NO CAFÉ	5
2.1.1 Efeito da torra sobre os constituintes do café	6
2.1.2 A trigonelina e o efeito da torra	8
2.2 INTERFERENTES PRESENTES NA MATRIZ DO CAFÉ.....	11
3. MÉTODOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DE TRIGONELINA	13
3.1. INTRODUÇÃO.....	13
3.2. MÉTODOS ELETROANALÍTICOS	15
3.2.1. A voltametria e a voltametria cíclica.....	16
3.2.2 Amperometria.....	19
3.2.3 Elétrodo de diamante dopado com boro.....	20
3.3 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA).....	21
3.3.1 Acoplamento de MPA a FIA e a HPLC	23
3.4 CROMATOGRAFIA DE PAR IÔNICO	24
3.5 MÉTODOS DE DETECÇÃO	25
3.6 SISTEMA DE FLUXO DE BAIXA PRESSÃO COM SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA.....	26
PARTE II EXPERIMENTAL.....	27
1. INTRODUÇÃO.....	29
2. INSTRUMENTAÇÃO, REAGENTES E PROCEDIMENTO	31
2.1 INSTRUMENTAÇÃO	31
2.2 REAGENTES, PADRÕES, AMOSTRAS E PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES	33
2.2.1 Preparação de soluções padrão	34
2.2.2 Soluções utilizadas em estudos de voltametria cíclica	34
2.2.3 Soluções utilizadas na otimização da solução ISA.....	35
2.2.4 Soluções padrão utilizadas no estudo de interferentes	35
2.2.5 Soluções utilizadas como fase móvel	36
2.2.5.1 Soluções da fase móvel com TBA	36
2.2.5.2 Soluções utilizadas na composição da fase móvel com OSS.....	36
2.2.5.3 Soluções utilizadas na composição da fase móvel com TDS	37
2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	37
2.3.1 Ensaios voltamétricos com a trigonelina.....	38
2.3.2 Sistema analítico desenvolvido e sua operacionalidade	39
2.3.3 Estudo de interferentes	41
2.3.4 Extração e determinação de trigonelina no café.....	42

2.4 AVALIAÇÃO DO MÉTODO	43
3. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO	45
3.1 CARATERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DA TRIGONELINA	45
3.1.1 Voltametria cíclica	45
3.1.1.1 Estudo do efeito do eletrólito de suporte e pH	46
3.1.1.2 Efeito da velocidade de varrimento	47
3.1.1.3 Perfil eletroquímico	47
3.1.1.4 Comparação do voltamograma da trigonelina com o de outros compostos.....	48
3.1.2 Detecção amperométrica acoplada ao sistema de fluxo	51
3.1.2.1 Amperometria DC	51
3.1.2.2 Amperometria MPA.....	52
3.1.2.3 Sistema de fluxo para estudo da solução de ajuste de força iônica ISA.....	53
3.2 CONDIÇÕES USADAS NO SISTEMA FIA.....	55
3.3 RETENÇÃO DA TRIGONELINA BASEADA EM CROMATOGRAFIA DE PAR IÔNICO	56
3.4 AVALIAÇÃO DE INTERFERENTES.....	58
3.5 DETERMINAÇÃO DE TRIGONELINA USANDO A METODOLOGIA DESENVOLVIDA.....	61
3.5.1 Curva de calibração.....	61
3.5.1.1 Estudo da repetibilidade do sinal da trigonelina	65
3.5.1.2 Estudo da repetibilidade do sinal da niacina	66
3.5.1.3 Estudo da repetibilidade do sinal para uma mistura de trigonelina e niacina	67
3.5.2 Determinação de trigonelina no café.....	67
3.5.3 Parâmetros cromatográficos	70
4. CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXOS	81
DADOS E TRATAMENTO DE DADOS	83

Índice de figuras

Figura 1 – Alterações visuais dos grãos de café durante a torra, (adaptado de http://www.tibaagan.com/coffee-roasts/).....	7
Figura 2 - Fórmula de estrutura da trigonelina	8
Figura 3 - Esquema da degradação da trigonelina durante a torra dos grãos de café, (adaptado de [35])	9
Figura 4 - Degradação da trigonelina durante a torra a diferentes temperaturas (°C), (adaptado de [15])	9
Figura 5 - Formação da niacina durante a torra a diferentes temperaturas (°C), (adaptado de [15])	9
Figura 6 - Relação entre a degradação da trigonelina (○) e a formação de niacina (●) durante a torra de café arábica da Guatemala a 205 °C, (adaptado de [1]).....	10
Figura 7 - Relação entre a formação de niacina e a perda de peso durante a torra de duas amostras de café arábica (●) e robusta (○), (adaptado de [1])	10
Figura 8 – Fórmulas de estrutura de alguns possíveis interferentes da trigonelina analisados neste trabalho.....	12
Figura 9 - Resumo dos métodos eletroanalíticos mais comuns. A grandeza da medida está colocada entre parêntesis (<i>I</i> ou <i>i</i> referem-se à intensidade de corrente, <i>E</i> ao potencial, <i>R</i> à resistência, <i>G</i> à condutância, <i>Q</i> à quantidade de carga, <i>t</i> ao tempo, <i>V</i> ao volume de solução padrão e <i>m</i> à massa da espécie eletrodepositada), (adaptado de [54])	15
Figura 10 - Variação de potencial na forma de uma onda triangular, em voltametria cíclica, (adaptado de [55])	18
Figura 11 - Voltamograma cíclico para um sistema reversível, (adaptado de [55]).....	18
Figura 12 - O efeito de aumento da irreversibilidade no formato dos voltamogramas cíclicos, (adaptado de [55])	18
Figura 13 - Voltamograma cíclico para um sistema irreversível, (adaptado de [55]).....	18
Figura 14 - Perturbação aplicada em amperometria (a) e resposta da intensidade de corrente em amperometria (b)	19
Figura 15 - Faixa de potencial aproximada para os eletrodos de platina, mercúrio, carbono e BDD em diferentes eletrólitos de suporte, (adaptado de [54]).....	20
Figura 16 - Etapas de formação do sinal transiente em FIA: (a) diferentes gradientes de concentração da amostra na solução transportadora; (b) sinal obtido pelo detetor, (adaptado de [68]).....	22
Figura 17 - Representação esquemática do sistema analítico desenvolvido neste trabalho	32
Figura 18 – Imagem da montagem experimental do sistema analítico desenvolvido com detecção amperométrica.....	39
Figura 19 – Imagem relativa ao pormenor da confluência	40
Figura 20 - Voltamogramas cíclicos da trigonelina para o estudo do efeito do eletrólito de suporte no seu perfil eletroquímico; [trigonelina] = 0,5 mmol dm ⁻³ ; velocidade de varrimento 1,0 Vs ⁻¹ ; E _{step} = 4,88 mV e E _{red} = -1,4 V.....	46
Figura 21 - Voltamogramas cíclicos da trigonelina para o estudo da velocidade de varrimento: (—) 0,1 Vs ⁻¹ ; (—) 0,5 Vs ⁻¹ e (—) 1,0 Vs ⁻¹ ; [trigonelina] = 5×10 ⁻⁴ mol dm ⁻³ ; E _{step} 4,88 mV e E _{red} = -1,4 V. Eletrólito de suporte: mistura de NaCl 0,1 mol dm ⁻³ com HCl 0,01 mol dm ⁻³ a pH igual a 2	47
Figura 22 - Voltamogramas cíclicos do sinal da trigonelina a diferentes concentrações: (—) 1×10 ⁻⁴ mol dm ⁻³ ; (—) 2×10 ⁻⁴ mol dm ⁻³ ; (—) 5×10 ⁻⁴ mol dm ⁻³ ; (—) 1,0×10 ⁻³ mol dm ⁻³ e do sinal do branco (—) mistura de NaCl 0,1 mol dm ⁻³ com HCl 0,01 mol dm ⁻³ a pH igual a 2; velocidade de varrimento 1,0 Vs ⁻¹ ; E _{step} 4,88 mV	48
Figura 23 – Comparação dos voltamogramas cíclicos de solução padrão de trigonelina com o de niacina: (—) trigonelina, (—) niacina de concentração 5,00×10 ⁻⁴ mol dm ⁻³ e (—) sinal do branco. Eletrólito de suporte: mistura de NaCl 0,1 mol dm ⁻³ com HCl 0,01 mol dm ⁻³ a pH igual a 2	49
Figura 24 – Comparação dos voltamogramas cíclicos de solução padrão de trigonelina com o sinal do branco e soluções padrão de: (A) [ácido 5-clorogénico] = 4,6 mmol dm ⁻³ ; (B) [cafeína] = 1,0 mmol dm ⁻³ e (C) [ácido cafeico] = 1,1 μmol dm ⁻³ . Solução de branco: mistura de NaCl 0,1 mol dm ⁻³ com HCl 0,01 mol dm ⁻³ a pH igual a 2.....	50
Figura 25 - Representação esquemática do sistema monocanal.....	51
Figura 26 - Representação esquemática do sistema analítico desenvolvido sem coluna monolítica.....	53
Figura 27 - Curvas de calibração da trigonelina para concentrações 0,05; 0,10; 0,30; 0,60 e 1,00 mmol dm ⁻³ em soluções HCl concentrações 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mol dm ⁻³	54

Figura 28 - Diagrama da curva de calibração da trigonelina para concentrações 0,05; 0,10; 0,30; 0,60 e 1,00 mmol dm ⁻³ com [HCl] = 1,0 mol dm ⁻³	54
Figura 29 - Dispositivo experimental para a implementação da metodologia. (A) Esquema da montagem; (B) Imagem da montagem	56
Figura 30 – Cromatogramas que evidenciam a separação do sinal da trigonelina do da niacina: (a) [trigonelina] = 0,5 mmol dm ⁻³ ; (b) [niacina] = 0,8 mmol dm ⁻³ ; (c) sobreposição de (a) e (b); (d) cromatogramas típicos de misturas de soluções padrão equimolares de trigonelina e niacina: (—) c = 0,03 mmol dm ⁻³ ; (—) c = 0,09 mmol dm ⁻³ ; fase móvel: TDS 0,25 mmol dm ⁻³ ; ACN 10% (v/v); H ₃ PO ₄ 0.1% (v/v)	59
Figura 31 – Perfil cromatográfico típico para grãos de café arábica: (—) café verde moído; (—) café verde moído com 3,20×10 ⁻⁵ mol dm ⁻³ de trigonelina; (—) café torrado escuro enriquecido com 1,62×10 ⁻⁵ mol dm ⁻³ de trigonelina e 3,0×10 ⁻⁵ mol dm ⁻³ de niacina; (—) café torrado escuro. (a) - sinal não identificado; (b) trigonelina; (c) niacina	60
Figura 32 - Cromatogramas típicos de soluções padrão de trigonelina.....	62
Figura 33 - Curva de calibração para a trigonelina.....	63
Figura 34 – Cromatogramas típicos de soluções padrão de niacina.....	64
Figura 35 - Curva de calibração para a niacina.....	64
Figura 36 - Cromatogramas de injeções sucessivas, (n=5), de solução padrão de trigonelina 90 μmol dm ⁻³	65
Figura 37 – Cromatogramas de injeções sucessivas, (n=2), de solução padrão de niacina 90 μmol dm ⁻³	66
Figura 38 - Cromatogramas de injeções sucessivas, (n=3), com soluções padrão equimolares de trigonelina e de niacina (30 μmol dm ⁻³).....	67
Figura 39 - Cromatogramas de injeções sucessivas, (n=2) para cada concentração, com soluções padrão equimolares de trigonelina e de niacina (10, 30, 60 e 90) μmol dm ⁻³)	67
Figura 40 – Perfil cromatográfico típico para grãos de café arábica e robusta, (verde, torrado escuro e torrado escuro enriquecido com niacina) e solução padrão de trigonelina e niacina: (A) (—) arábica verde moído; (—) robusta verde moído; (—) solução padrão equimolar de trigonelina e niacina, c = 30 μmol dm ⁻³ ; (B) (—) café arábica torrado escuro; (—) café robusta torrado escuro; (—) café arábica torrado escuro enriquecido com 4,0 μmol dm ⁻³ de niacina; (—) café robusta torrado escuro enriquecido com 4,8 μmol dm ⁻³ de niacina.....	68
Figura 41 - Variação do teor de trigonelina durante a torra no café arábica e robusta.....	70

Índice de tabelas

Tabela 1 - Composição química do café verde e torrado em % (m/m) das espécies arábica e robusta, (adaptado de [1])	6
Tabela 2 - Parâmetros importantes em voltametria cíclica.....	18
Tabela 3 - Comparação das características FIA e HPLC, (adaptado de [74])	24
Tabela 4 – Fórmulas químicas estruturais dos três reagentes par iônico utilizados	24
Tabela 5 – Lista da instrumentação utilizada	31
Tabela 6 – Componentes usados no subsistema para a separação cromatográfica da trigonelina, a baixa pressão	32
Tabela 7 – Componentes usados no subsistema para a caracterização eletroquímica da trigonelina por detecção amperométrica.....	33
Tabela 8 – Fabricante, pureza e densidade dos reagentes, padrões e amostras utilizados no trabalho experimental	34
Tabela 9 - Soluções utilizadas em estudos de voltametria cíclica.....	35
Tabela 10 - Soluções utilizadas na otimização da solução ISA	35
Tabela 11 - Soluções padrão utilizadas no estudo de possíveis interferentes da trigonelina.....	35
Tabela 12 – Constituintes das soluções usadas no estudo da composição da fase móvel em cromatografia de par iônico com TBA.....	36
Tabela 13 - Soluções do estudo da composição da fase móvel em cromatografia de par iônico com OSS	37
Tabela 14 - Soluções do estudo da composição da fase móvel em cromatografia de par iônico com TDS.....	37
Tabela 15 - Estudo dos tempos de pulso de E_1 e E_2 e do potencial de condicionamento E_2	52
Tabela 16 - Otimização da solução ajustadora de força iônica e pH.....	53
Tabela 17 – Resumo dos parâmetros experimentais otimizados em MPA/FIA.....	54
Tabela 18 - Estudo de t_R de trigonelina em função da composição da fase móvel usando o TBA como RPI.....	57
Tabela 19 - Estudo de t_R de trigonelina em função da composição da fase móvel usando OSS como RPI.....	57
Tabela 20 - Estudo de t_{eq} da coluna para fases móveis que compreendem diferentes concentrações de TDS e ACN e de t_R de trigonelina em função da composição da fase móvel usando TDS como RPI.....	58
Tabela 21 – Valores da intensidade de corrente de pico (i) e tempo de retenção (t_R) obtidos por análise de soluções padrão de trigonelina.....	63
Tabela 22 - Parâmetros da curva de calibração da trigonelina	63
Tabela 23 - Valores da intensidade de corrente de pico (i) e tempo de retenção (t_R) obtidos por análise de soluções padrão de niacina.....	64
Tabela 24 - Parâmetros da curva de calibração da niacina	65
Tabela 25 – Valores da intensidade de corrente de pico e t_R para estudo da repetibilidade da trigonelina com solução padrão de $90 \mu\text{mol dm}^{-3}$	65
Tabela 26 - Parâmetros da repetibilidade para o padrão de trigonelina.....	65
Tabela 27 - Valores da intensidade de corrente de pico e t_R para estudo da repetibilidade da niacina com solução padrão de $90 \mu\text{mol dm}^{-3}$	66
Tabela 28 – Parâmetros da repetibilidade para o padrão de niacina	66
Tabela 29 - Valores dos teores de trigonelina nas amostras de café.....	69
Tabela 30 - Parâmetros cromatográficos para a trigonelina.....	70

Abreviaturas e Símbolos

ACN	Acetonitrilo
BDD	Diamante dopado com boro
DC	Corrente contínua
FIA	Análise por injeção em fluxo
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ISA	Solução ajustadora de força iônica
MeOH	Metanol
MPA	Amperometria de múltiplos pulsos
MS	Espetrometria de massa
OSS	Octanossulfonato de sódio
RMN	Ressonância magnética nuclear
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
RPI	Reagente par iônico
rpm	Rotações por minuto
TBA	Fosfato de tetrabutílamônio
TDS	Tetradecanossulfonato de sódio
UV-Vis	Ultravioleta visível
E	Potencial
I ou i	Intensidade de corrente elétrica
E _M	Potencial máximo
E _m	Potencial mínimo
t _R	Tempo de retenção

Parte I

Teórica

1. Introdução

A trigonelina é um composto alcaloide presente nos grãos de café com teores que variam entre 0,3% (m/m) e 1,3% (m/m), sendo os menores correspondentes aos grãos de café torrado e os maiores aos grãos de café verde [1]. O teor de trigonelina depende principalmente da variedade do café e do grau de torra dos grãos, tendo sido também relacionado com o estado de maturação do grão verde e o método de processamento dos grãos pós-colheita [2]. Vários estudos têm demonstrado que a variedade arábica é mais rica em trigonelina que a robusta e que grãos deteriorados ou alterados apresentam menor teor de trigonelina. O tipo de processamento pós-colheita dos grãos de café através do método por via húmida também apresenta níveis mais elevados de trigonelina do que os obtidos pelo método por via seca ou natural [3, 4, 5]. Verifica-se que durante o processo de torra o teor de trigonelina diminui entre 50 a 80% do seu valor inicial [6, 7, 8]. Neste processo, a trigonelina é um precursor de compostos aromáticos que conferem amargor, sabor e aroma associados à bebida de café e caracterizadores do seu perfil organolético [9, 10, 11, 12].

Numa perspetiva de se poder controlar quais as condições de torra mais indicadas para a obtenção de um café que melhor satisfaça o consumidor, torna-se importante desenvolver metodologias analíticas capazes de determinar a trigonelina em amostras de café. O efeito da matriz do café, o carácter iónico da trigonelina (carregada positivamente em meio ácido e eletricamente neutra - mas carregada positiva e negativamente em diferentes partes da molécula, isto é, um zeuterião, em meios neutros e básicos) e ainda o baixo teor de trigonelina, especialmente no café torrado, são dificuldades que se devem ultrapassar no desenvolvimento de novos métodos de determinação [11, 13, 14, 15]. Relativamente ao efeito de matriz no café, a existência de compostos interferentes com teores muito baixos - como, por exemplo, cafeína com teores entre 0,9% (m/m) e 2,4% (m/m), niacina com teores inferiores a 0,03% (m/m) e ácidos clorogénicos com teores entre 1,2% (m/m) e 10,0% (m/m) [1] - tem dificultado o desenvolvimento de novas metodologias para a determinação de trigonelina em cafés.

A importância da determinação da trigonelina requer o desenvolvimento de metodologias de execução fácil, de custo baixo e com capacidade analítica elevada. Por estes motivos, a determinação da trigonelina em cafés através de um sistema de baixa pressão com separação cromatográfica e deteção eletroquímica representa uma ferramenta útil, e tanto quanto foi possível pesquisar, não foram publicados até à data, trabalhos envolvendo metodologias de análise a baixa pressão. Assim, neste trabalho

apresenta-se um sistema de fluxo de baixa pressão com separação cromatográfica e deteção amperométrica para determinação da trigonelina em amostras de café. A fim de se conseguir alguma retenção da trigonelina, é realizada previamente uma modificação da fase estacionária com um reagente de par iónico. Aplicou-se, assim, a cromatografia de par iónico que permitiu a utilização de colunas apolares modificadas para a separação cromatográfica de compostos iónicos. Foram otimizadas as condições experimentais para se efetuar a separação da trigonelina e dos compostos interferentes.

Esta dissertação está dividida em duas partes: Parte I, dedicada à descrição teórica dos temas desenvolvidos; Parte II, dedicada ao desenvolvimento da metodologia experimental e resultados. No capítulo 1 da Parte I apresenta-se uma introdução, sendo o capítulo 2 dedicado à composição química do café verde e torrado, nas duas variedades arábica e robusta, bem como ao efeito provocado pela torra na sua composição; termina-se esta parte com uma abordagem dos métodos utilizados para a realização deste trabalho. A Parte II inicia-se com uma introdução sobre a metodologia experimental adotada; segue-se o capítulo 2 com a implementação experimental da metodologia e no capítulo 3 apresentam-se os resultados experimentais obtidos, o seu tratamento e discussão. A conclusão global do trabalho finaliza esta segunda parte e a dissertação.

2. O café

2.1 EFEITO DA TORRA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA NO CAFÉ	5
2.1.1 Efeito da torra sobre os constituintes do café	6
2.1.2 A trigonelina e o efeito da torra	8
2.2 INTERFERENTES PRESENTES NA MATRIZ DO CAFÉ.....	11

2.1 Efeito da torra na composição química no café

A planta do café (cafeeiro) pertence à família *Rubiacea*, género *Coffea*. *Coffea* tem centenas de espécies, apenas duas têm importância económica: *Coffea arábica* e *Coffea canephora*. As variedades *Típica* e a *Bourbon* são as mais conhecidas da *Coffea arábica*. A variedade de *Coffea canephora* cultivada em maior escala é a *Robusta*. Existem ainda duas espécies comercializadas, mas com pouquíssimo significado: a *Coffea liberica* e a *Coffea excelsa*. A produção mundial de *Coffea arábica* é de cerca de 70%, sendo superior a 25% a de *Coffea canephora* [16].

A composição química do grão verde de café e da bebida de café obtida a partir dos grãos de café torrados é complexa e depende das espécies de café utilizadas. As duas espécies de cafeeiro mais comuns, arábica e robusta¹, diferem entre si pelas suas características químicas, físicas e organoléticas. Para além da espécie e variedade do cafeeiro, a composição química e a qualidade do café dependem de outros fatores, tais como: métodos de cultivo, grau de maturação dos frutos, procedimentos adotados durante e após a colheita, entre outros [2, 3, 4, 5].

Os principais compostos presentes nos grãos de café verde e torrado das espécies arábica e robusta são: açúcares (sacarose, glicose, frutose, arabinose, galactose, maltose e polissacarídeos), lípidos (triglicerídeos e ácidos gordos livres), proteínas e outros em menor quantidade, mas que vão caracterizar o café. Dentre estes últimos são de referir a cafeína, (aproximadamente o dobro no café robusta), a trigonelina, os minerais e os ácidos gordos [17, 18, 19, 20, 21]. Os teores destes

¹ Para simplificar a escrita e melhorar a compreensão, a designação de *Coffea arábica* e de *Coffea canephora* serão substituídas pelos termos "arábica" e "robusta" ao longo desta dissertação.

compostos nos grãos de café verde são diferentes dos existentes nos grãos de café após a torra, como apresentado na Tabela 1 [1]. As diversas reações pirolíticas que ocorrem durante a torra resultam na degradação, formação e volatilização de vários compostos químicos. O processo de torra é considerado como a principal etapa da industrialização do café porque é na torra que o sabor e o aroma característicos do produto são desenvolvidos.

Tabela 1 - Composição química do café verde e torrado em % (m/m) das espécies arábica e robusta, (adaptado de [1])

Constituintes	Arábica		Robusta	
	Verde	Torrado	Verde	Torrado
Minerais	3,0 - 4,2	3,5 - 4,5	4,0 - 4,5	4,6 - 5,0
Cafeína	0,9 - 1,2	~1,0	1,6 - 2,4	~2,0
Trigonelina	1,0 - 1,2	0,5 - 1,0	0,6 - 0,75	0,3 - 0,6
Lípidos Totais	12,0 - 18,0	14,5 - 20,0	9,0 - 13,0	11,0 - 16,0
Ácidos clorogénicos totais	5,5 - 8,0	1,2 - 2,3	7,0 - 10,0	3,9 - 4,6
Ácidos alifáticos	1,5 - 2,0	1,0 - 1,5	1,5 - 2,0	1,0 - 1,5
Oligossacarídeos	6,0 - 8,0	0 - 3,5	5,0 - 7,0	0 - 3,5
Polissacarídeos totais	50,0 - 55,0	24,0 - 39,0	37,0 - 47,0	26,0 - 33,0
Aminoácidos	0,5 - 2,0	nd	0,8 - 2,0	nd
Proteínas	11,0 - 13,0	13,0 - 15,0	11,0 - 13,0	13,0 - 15,0
Compostos orgânicos voláteis	< 0,1	0,7-0,8	< 0,1	0,7-0,8
Niacina [15]	$1,6 \times 10^{-3}$ - $4,4 \times 10^{-3}$	$9,5 \times 10^{-3}$ - $2,6 \times 10^{-2}$	---	---

nd — não detetado

--- — valores não encontrados na literatura

% (m/m) em massa seca e significa massa de constituinte (em g) por 100 g de café

2.1.1 Efeito da torra sobre os constituintes do café

O café verde não possui o aroma e sabor típicos da bebida do café, sendo que a torra é essencial para a produção de compostos que conferem as características organoléticas associadas a esta bebida [4].

O café é um dos produtos mais modificados durante o processamento. Do ponto de vista técnico, a torra é uma operação complexa, consistindo num processo de transformação controlado temporalmente (9-15 minutos), efetuado numa gama de temperaturas entre 180 e 230 °C para a torra convencional, e que sofre a influência mútua de diversos parâmetros [22, 23]. Assim, a torra consiste em submeter o grão de café verde a um aquecimento a uma determinada temperatura, durante o intervalo de tempo necessário para atingir o grau de torra pretendido. Este processo é fundamental para o desenvolvimento do sabor e do aroma do café, sendo a etapa mais importante

para a qualidade do café segundo o ponto de vista do consumidor e por isso está diretamente relacionada com a sua aceitação como bebida [24].

Com a torra obtém-se uma mistura complexa de compostos voláteis e não voláteis de origem natural e de novas substâncias formadas durante o processo, realçando-se assim as melhores características associadas ao sabor, ao aroma e à acidez de cada tipo de grão. A esta mistura chama-se *flavour* do café [25]. O aroma deste produto é formado por uma mistura complexa de compostos voláteis com diferentes concentrações e diferentes poderes odoríficos. Estima-se que o grão de café torrado tenha mais de 2000 compostos químicos [16, 26]

O processo da torra depende da duração, da temperatura e da intensidade, sendo caracterizado pelo tempo em que os grãos de café estão submetidos a uma dada temperatura. A Figura 1 permite visualizar a mudança de coloração dos grãos de café durante esse processo. Por regra, a torra divide-se em três fases: a primeira fase visa essencialmente o aquecimento e secagem dos grãos; é um processo endotérmico onde os grãos começam a perder peso, a sua cor altera-se de verde a castanho muito claro e tem a duração de cerca de metade do tempo da operação - etapas de 1 a 4; na segunda fase, acentua-se a desidratação e consequente perda de massa, aumento do volume e escurecimento gradual dos grãos devido, em grande parte, às reações de Maillard (reação entre um aminoácido ou uma proteína e um açúcar obtendo-se produtos que dão sabor, odor e cor aos alimentos), tendo uma duração inferior à primeira – etapas de 5 a 13; a terceira fase é mais curta que a segunda, acentuam-se as transformações físicas, a extração da humidade atinge o seu limite máximo e ocorrem as transformações químicas mais importantes – etapas 14 a 16.



Figura 1 – Alterações visuais dos grãos de café durante a torra, (adaptado de <http://www.tibaagan.com/coffee-roasts/>)

As torras são habitualmente classificadas em torra moderadamente clara, torra média e torra escura. Na torra moderadamente clara, a acidez e o aroma são acentuados, mas há suavidade no sabor e é baixo o amargor; na torra média há equilíbrio das características de suavidade e sabor; na torra escura a acidez e o aroma são reduzidos, mas o amargor é forte. A classificação da torra também se pode basear na maior ou menor preservação de alguns constituintes do grão [27].

Uma vez que o processo de torra é tão importante, a sua monitorização passa por determinar os teores de alguns constituintes, nomeadamente a trigonelina e a niacina,

bem como a relação entre eles, por exemplo: a relação entre a degradação de trigonelina e a formação de niacina mostra o grau de torra dos grãos de café, contribuindo assim, para o aperfeiçoamento de uma melhor bebida de café. Para avanços futuros, entender este processo é um desafio de muitos, nomeadamente [28, 29, 30, 31, 32, 33].

2.1.2 A trigonelina e o efeito da torra

A trigonelina com nome IUPAC *1-methylpyridinium-3-carboxylate* e fórmula de estrutura representada na Figura 2 é um alcaloide que está presente em várias plantas como o café. Dependendo da espécie de café, a trigonelina está presente nos grãos verdes com teores de 1,0 e 0,8 % m/m de peso seco, nos cafés arábica e robusta respetivamente [1]. Embora exista em pequenas quantidades, a sua presença é fundamental devido aos produtos formados aquando da sua degradação térmica, aumentando os compostos voláteis de importância na análise sensorial.



Figura 2 - Fórmula de estrutura da trigonelina

A trigonelina por ação do calor sofre reações de desmetilação, degradando-se em niacina e outros produtos. A sua degradação térmica gera uma importante classe de compostos voláteis, formada principalmente por piridinas e pirróis, bem como uma classe de compostos não-voláteis onde se encontra a niacina, também conhecida por vitamina B₃ ou ácido nicotínico [34]. A niacina é encontrada em pequeníssimas quantidades nos grãos de café verde, com teores entre $1,6 \times 10^{-3}$ e $4,4 \times 10^{-3}$ % (m/m) enquanto que nos grãos de café torrado sofre um aumento, com teores entre $9,5 \times 10^{-3}$ e $2,6 \times 10^{-2}$ % (m/m) [1]. A evidência de que a trigonelina é precursora da niacina surge do facto de haver proporcionalidade entre a perda de trigonelina e a formação de niacina durante a torra [1, 15].

Na Figura 3 ilustram-se dois possíveis processos da degradação da trigonelina durante a torra [35]. Quer a trigonelina, quer os produtos da sua degradação são importantes sob o ponto de vista sensorial e nutricional.

Durante a torra, cerca de 50 a 80% da trigonelina presente no grão de café verde é degradada, estando o grau de degradação diretamente relacionado com a temperatura do processo [7, 8].

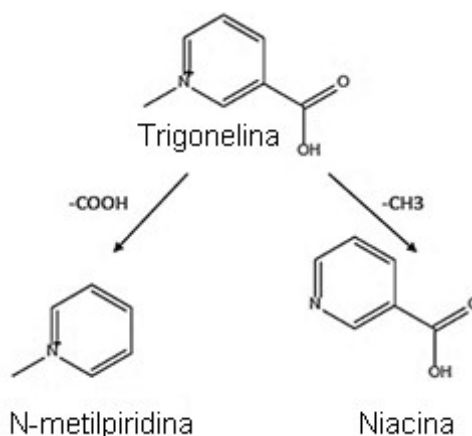


Figura 3 - Esquema da degradação da trigonelina durante a torra dos grãos de café, (adaptado de [35])

Apresentam-se na Figura 4 os resultados do estudo da degradação da trigonelina, efetuados por Hughes *et al*, referentes à determinação do teor desse alcaloide durante a torra de várias amostras de café a diferentes temperaturas [15]. A torra terminou quando as amostras atingiram o mesmo grau de torra identificado pela cor dos grãos torrados (torra média). Os autores deste estudo concluíram que há uma relação clara entre a perda de trigonelina e a formação de niacina embora tenham constatado que apenas uma proporção muito pequena de trigonelina degradada é realmente convertida em niacina. Esta conclusão ilustra-se na Figura 5 onde se apresentam os resultados da monitorização do teor de niacina efetuada durante a torra, em várias amostras sujeitas a diferentes temperaturas [15].

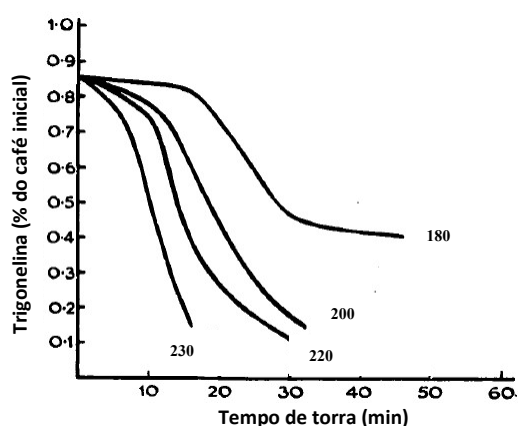


Figura 4 - Degradação da trigonelina durante a torra a diferentes temperaturas (°C), (adaptado de [15])

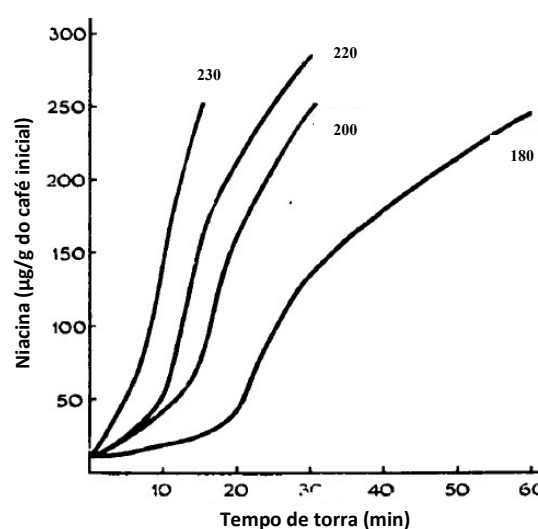


Figura 5 - Formação da niacina durante a torra a diferentes temperaturas (°C), (adaptado de [15])

Neste estudo os autores concluíram que a formação da niacina está mais dependente da temperatura a que ocorre a torra do que do tempo de torra, sendo efetiva entre os 180 °C e os 230 °C, mas o máximo de conversão de trigonelina em niacina é entre 200 e 220 °C.

A relação entre a taxa de degradação da trigonelina e a taxa de formação da niacina segue uma dependência como a ilustrada na Figura 6, onde se mostra que por 100 g de uma amostra de café arábica submetida a um processo de torra a 205°C, durante um período de cerca de 20 minutos a trigonelina diminuiu de 1,1% para 0,2 %, equivalendo a uma degradação de cerca de 80%, enquanto que a niacina aumentou cerca de 13 mg nesse período de tempo. Na Figura 7 mostra-se que o rendimento máximo ocorreu para uma perda de peso de cerca de 20% durante esse processo de torra, verificando-se que apenas cerca de 1 a 5% da trigonelina degradada resultou em niacina para um máximo de 40 mg; continuando a torra para além dos 20% da perda de peso verifica-se uma degradação da niacina [1].

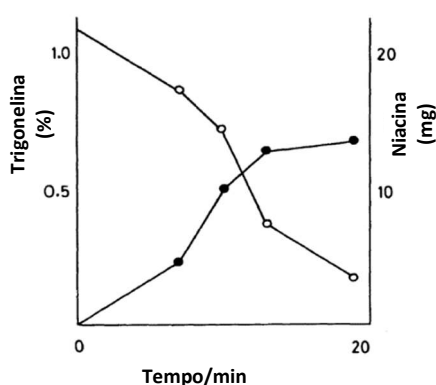


Figura 6 - Relação entre a degradação da trigonelina (O) e a formação de niacina (●) durante a torra de café arábica da Guatemala a 205 °C, (adaptado de [1])

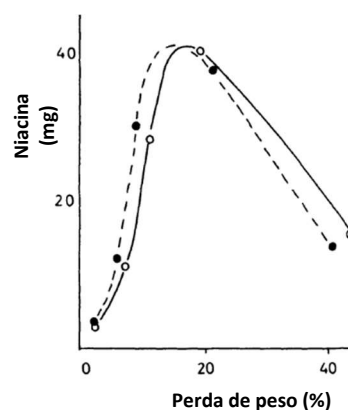


Figura 7 - Relação entre a formação de niacina e a perda de peso durante a torra de duas amostras de café arábica (●) e robusta (O), (adaptado de [1])

Após a torra, a trigonelina remanescente da degradação térmica influencia no sabor amargo da bebida.

A trigonelina é um composto importante, quer sobre o ponto de vista sensorial quer sobre o ponto de vista nutricional, pois apresenta efeitos sobre o sistema nervoso central, na mobilidade intestinal e na secreção da biliar. Entre as funções fisiológicas da trigonelina destaca-se a sua capacidade de proteger as células β do pâncreas, regular a atividade das enzimas antioxidantes, diminuir a peroxidação lipídica e aumentar o índice de sensibilidade à insulina [36]. Segundo Makowska et al. a trigonelina pode ser considerada um potencial agente anti-Alzheimer [37]. Além disso, é convertida em

niacina, que faz do café um dos únicos alimentos que tem o seu valor nutricional aumentado após o processamento térmico [18, 38].

Concluindo, é de grande importância conseguir determinar e quantificar a trigonelina existente nos grãos de cafés de forma rápida, cómoda e barata, pois assim pode-se resolver problemas tais como: identificar a origem e a espécie de determinado café, detetar contrafação, ajustar o grau de torra para apurar a qualidade do café, etc.

2.2 Interferentes presentes na matriz do café

Dada a complexidade química que caracteriza a matriz do café, principalmente após a torra, e tendo em conta a fórmula de estrutura de alguns constituintes é necessário fazer testes a possíveis interferentes da trigonelina.

Nos estudos de interferentes da trigonelina, no café, a cafeína deve ser analisada porque é o alcaloide maioritário presente nesta matriz, assim como a niacina e todos os outros compostos resultantes da degradação da trigonelina durante a torra. Também se deve determinar todos os compostos com fórmulas de estrutura semelhantes à da trigonelina presentes na composição química do café por poderem interferir na identificação e consequente determinação da trigonelina. A presença de interferentes da matriz, eluindo em tempos de retenção próximos ao da trigonelina, leva a perturbações no processo de análise. No âmbito deste trabalho, selecionaram-se alguns compostos para avaliar possíveis interferentes, tendo em conta o referido anteriormente. Assim, a cafeína, a niacina, a N-metilpiridina, a nicotinamida, o nicotinato de metilo, o ácido cafeico e o ácido 5-clorogénico serão estudados.

Na Figura 8 apresentam-se as fórmulas de estrutura dos possíveis compostos interferentes da trigonelina. As razões para a sua inclusão neste estudo devem-se ao facto de o ácido cafeico, o ácido 5-clorogénico e a cafeína mostrarem ser retidos em colunas C₁₈, usando uma fase móvel ácida com octanossulfonato de sódio (OSS) [39]. Por outro lado, a avaliação da interferência da niacina é obrigatória, pois este composto apresenta uma estrutura química similar à da trigonelina e é eletroativa nas mesmas condições [13].

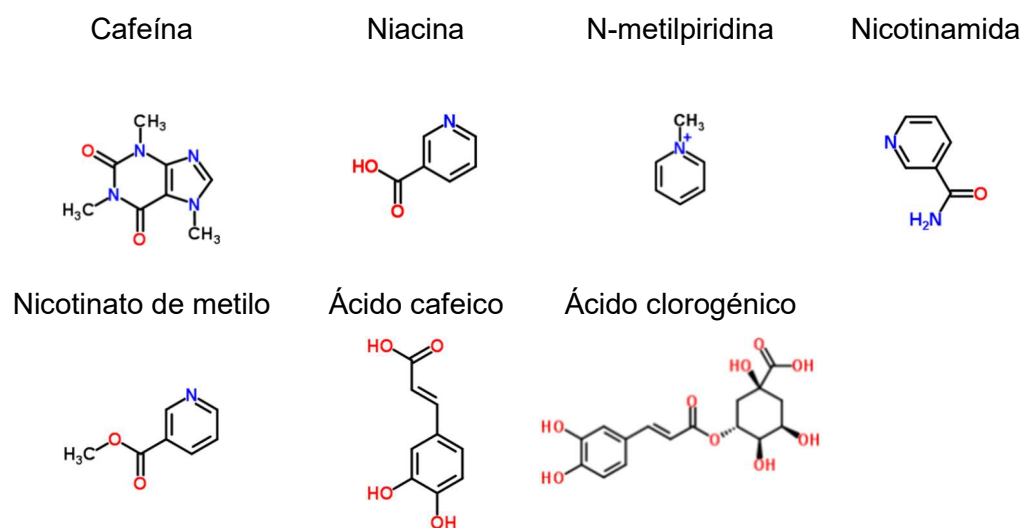


Figura 8 – Fórmulas de estrutura de alguns possíveis interferentes da trigonelina analisados neste trabalho

3. Métodos utilizados na determinação de trigonelina

3.1. INTRODUÇÃO.....	13
3.2. MÉTODOS ELETROANALÍTICOS	15
3.2.1. A voltametria e a voltametria cíclica.....	16
3.2.2 Amperometria.....	19
3.2.3 Elétrodo de diamante dopado com boro.....	20
3.3 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA).....	21
3.3.1 Acoplamento de MPA a FIA e a HPLC	23
3.4 CROMATOGRAFIA DE PAR IÔNICO.....	24
3.5 MÉTODO DE DETEÇÃO	25
3.6 SISTEMA DE FLUXO DE BAIXA PRESSÃO COM SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA.....	26

3.1. Introdução

Vários métodos têm sido citados na literatura para a determinação da trigonelina em cafés, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (HPLC-UV), nomeadamente a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC-UV) a técnica mais comumente usada entre as diversas abordagens adotadas.

Com recurso a RP-HPLC foi efetuada a determinação da trigonelina e dos ácidos nicotínico, clorogénicos e cafeico em amostras de café verde e torrado [33]. Baseado na mesma técnica, efetuou-se a análise de amostras de café instantâneo com determinação dos compostos trigonelina, cafeína e teobromina [30]. Também com RP-HPLC efetuou-se a determinação de ácidos clorogénicos em amostras de café instantâneo [40]. A combinação da técnica RP-HPLC com a detecção ultra violeta-visível (UV-Vis) foi aplicada na determinação da trigonelina em amostras de café [2, 6, 21, 41, 42]. Com a técnica HPLC combinada com um detetor de díodos (HPLC/DAD) foi determinada a presença de trigonelina, ácido nicotínico e cafeina em amostras de café torrado [18, 43]. Perrone *et al.* apresentaram uma metodologia de determinação da trigonelina baseada em HPLC e espetrometria de massa (HPLC-MS) [44]. Arai *et al.* aplicaram exclusivamente HPLC-UV na determinação de trigonelina, cafeína, ácidos clorogénicos, ácido nicotínico, ácido cafeico e teofilina em amostras de café instantâneo [39].

A cromatografia de fase gasosa (GC) foi a técnica escolhida por De Maria *et al.* para determinação dos ácidos clorogénicos e cafeína em amostras de café verde [38]. Uma metodologia multi-paramétrica baseada em ressonância magnética nuclear do protão (^1H -RMN) foi apresentada por del Campo *et al.* para determinação da trigonelina [4]. Outra das técnicas frequentes na literatura é a cromatografia iónica ou de par iónico que se baseia no revestimento prévio da coluna C_{18} com ácido polibutadieno-maleico (PBDMA), ou adicionando octanossulfonato à fase móvel [21, 39].

Sistemas de fluxo automático baseados em dispositivos de baixa pressão e colunas monolíticas têm sido abordagens analíticas recentemente exploradas que combinam a elevada seletividade, inerente à separação cromatográfica, com as potencialidades bem reconhecidas dos sistemas de fluxo de baixa pressão [45]. As principais características dos sistemas cromatográficos de baixa pressão são a versatilidade e facilidade de montagem, a reduzida manutenção que requerem, o baixo custo de implementação e a resposta rápida e estável. Estas características são ideais para implementar metodologias analíticas para análise de rotina em ambientes tanto de laboratório como de campo. Em sistemas de fluxo de baixa pressão, as colunas monolíticas C_{18} são as mais frequentemente usadas na separação de compostos não-iónicos e, mais recentemente, na separação de compostos iónicos [46]. Entretanto, também se tem explorado o acoplamento de colunas monolíticas com sistemas de fluxo de baixa pressão. Esta estratégia permite aumentar de uma forma simples e expedita a seletividade deste tipo de sistemas. Os trabalhos encontrados nesta área baseiam-se na utilização de colunas C_{18} , em aplicações de cromatografia de fase reversa e cromatografia iónica, sendo que, para esta última situação, a coluna é previamente condicionada com um surfactante [13]. Para conseguir separar compostos iónicos tem-se revestido a fase estacionária com um surfactante [47, 48, 49]. Para que se consigam reter os aniões o surfactante deve ser catiónico como, por exemplo, o brometo de didecil-dimetilamónio (DDAB) ou o cloreto de cetil-trimetilamónio (CTAC) [50, 51]. Caso se pretendam reter os catiões, deve-se usar um surfactante aniónico como o dioctil-sulfosucinato de sódio (DOSS) [49, 52, 53].

Existe ainda a possibilidade de empregar reagentes de par iónico para obter a separação dos compostos iónicos, apesar de esta alternativa ainda não ter sido explorada em sistemas de fluxo de baixa pressão. Estes reagentes constituem uma alternativa versátil para controlar a retenção de compostos iónicos, suportada pelo elevado número de diferentes reagentes par iónico disponíveis, conferindo ao sistema analítico a seletividade necessária para conseguir realizar a análise pretendida. Além disso, apresentam uma clara vantagem face a surfactantes, uma vez que não envolvem

nenhum revestimento permanente e, por isso, o revestimento de estabilidade a longo prazo não se torna um problema adicional.

Um outro desenvolvimento recente no campo dos sistemas analíticos resulta da junção da cromatografia de baixa pressão com a deteção eletroquímica [13]. A inclusão de detetores amperométricos em sistemas de fluxo com separação cromatográfica é ainda pouco utilizada, apesar da habitual boa sensibilidade dos detetores eletroquímicos. Este facto deve-se à baixa força iónica das fases móveis frequentemente utilizadas e devido à baixa reprodutibilidade de resposta dos eléctrodos sólidos. Com o desenvolvimento recente de eléctrodos com novos materiais, além dos vários modos de medição eletroquímica disponíveis, tem sido possível alcançar maior reprodutibilidade e sensibilidade, conferindo maior desempenho analítico a esta abordagem.

3.2. Métodos eletroanalíticos

Existem vários métodos eletroanalíticos e os mais frequentemente utilizados estão representados na Figura 9. Estes métodos são capazes de fornecer muita informação para caraterizar o comportamento eletroquímico do sistema e possuem também limites de deteção muito baixos.

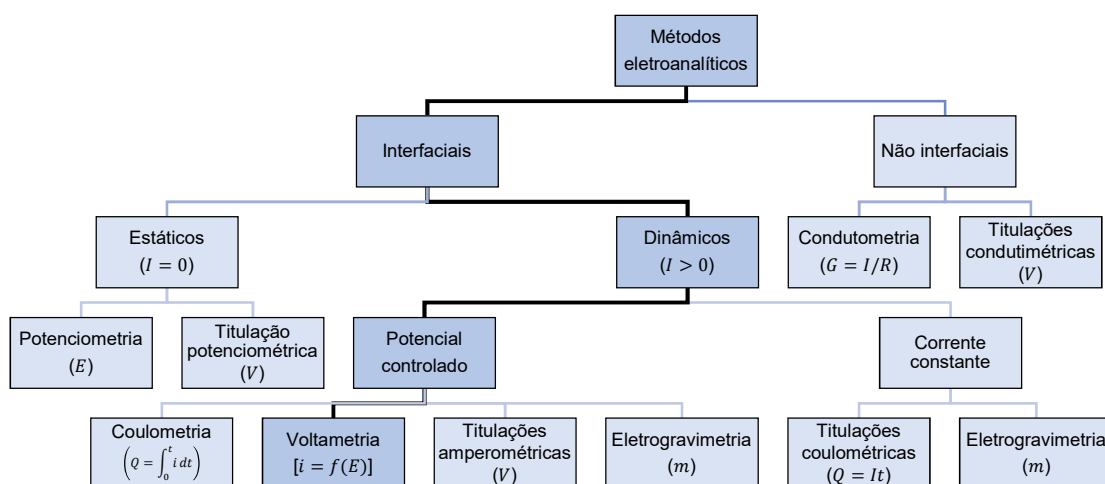


Figura 9 - Resumo dos métodos eletroanalíticos mais comuns. A grandeza da medida está colocada entre parêntesis (I ou i referem-se à intensidade de corrente, E ao potencial, R à resistência, G à condutância, Q à quantidade de carga, t ao tempo, V ao volume de solução padrão e m à massa da espécie eletrodepositada), (adaptado de [54])

Os métodos eletroanalíticos têm vantagens em comparação com outros tipos de procedimentos analíticos quantitativos porque, para além da sua instrumentação ser relativamente barata, também fornecem informação sobre um determinado estado de oxidação-redução de uma espécie química. Além disso, estes métodos possuem elevada sensibilidade (baixos limites de deteção), seletividade (possibilidade de se medir um analito de interesse mesmo na presença de interferentes), rapidez e baixo custo [54].

Dos muitos métodos eletroquímicos disponíveis, a voltametria, nas suas múltiplas formas, é de longe a técnica mais versátil e, por isso, a mais utilizada para estudar sistemas redox. Várias técnicas eletroanalíticas são usadas como detetores em diversos procedimentos cromatográficos.

3.2.1. A voltametria e a voltametria cíclica

A voltametria é uma técnica eletroquímica que consiste em aplicar sobre o eléctrodo de trabalho um potencial contínuo que varia com o tempo, provocando reações de oxidação e de redução nas espécies eletroativas presentes na solução. Baseia-se nos fenómenos que ocorrem na interface entre a superfície do eléctrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. É uma técnica dinâmica porque a célula eletroquímica funciona com intensidade de corrente eléctrica não nula ($I > 0$) que por sua vez é medida em função da aplicação de um potencial controlado. As informações qualitativas e quantitativas a respeito do analito são obtidas através da medida de intensidade de corrente em função de um potencial aplicado sob condições que promovem a polarização do eléctrodo de trabalho. As informações obtidas por esta técnica são representadas numa curva de intensidade de corrente em função do potencial, designada por voltamograma.

As células eletroquímicas utilizadas em voltametria são compostas, normalmente, por três eléctrodos imersos numa solução constituída pelos analito e eletrólito suporte. Um eléctrodo é designado eléctrodo de trabalho, cujo potencial varia regularmente com o tempo, podendo ser de ouro, prata, platina, carbono inerte, carbono vítreo, gota de mercúrio, diamante dopado com boro (BDD), etc. Outro eléctrodo é o de referência, constituído por Ag/AgCl ou calomelano, por exemplo, e cujo potencial permanece constante durante a experiência; serve para controlar com rigor o potencial imposto ao eléctrodo de trabalho. O terceiro eléctrodo é o auxiliar ou contra eléctrodo. Este eléctrodo pode, por exemplo, ser de ouro, platina ou carbono e tem a função de permitir o

transporte da corrente elétrica entre a fonte de sinal e o eletrodo de trabalho através da solução em estudo; completa o circuito elétrico por onde passa a intensidade de corrente resultante.

O eletrólito suporte ou inerte é uma solução que se adiciona para minimizar o fenómeno de migração dos iões eletroativos causados pelo campo elétrico. Tem uma concentração pelo menos 100 vezes superior às espécies eletroativas (a concentração das espécies eletroativas é de 5 mmol dm^{-3} ou inferior), que varia normalmente entre $0,01$ e $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$.

Nesta técnica, as informações sobre o analito são obtidas aplicando uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, medindo-se a intensidade de corrente elétrica que atravessa a solução entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar.

Atualmente reconhece-se um enorme potencial nas técnicas voltamétricas devido aos progressos na eletrónica e na conceção de equipamentos voltamétricos. Com isto consegue-se um controlo rigoroso da diferença de potencial aplicada e elevada precisão na medição da intensidade de corrente e intervalos de tempo.

A voltametria cíclica é a técnica voltamétrica mais comumente utilizada para obter informação qualitativa de processos redox. É, muitas vezes, a primeira técnica a ser aplicada, dando uma rápida localização dos potenciais de oxidação-redução das espécies eletroativas.

Nesta técnica estuda-se a relação intensidade de corrente-potencial numa célula voltamétrica quando submetida a um varrimento de potencial cíclico e linear. Consiste na aplicação de uma variação de potencial linear na forma de uma onda triangular ao eletrodo de trabalho, proporcionando reações de oxidação e de redução. Como ilustrado na Figura 10, um potencial mínimo (E_m) é selecionado e aplicado linearmente (varrimento direto) a velocidade constante em função do tempo até um determinado potencial limite (máximo), (E_M), e de seguida a direção de varrimento é invertida em direção ao potencial mínimo, finalizando-se um ciclo. O ciclo é repetido o número de vezes desejado, obtendo-se um voltamograma cíclico como se ilustra na Figura 11.

Os parâmetros mais importantes que podem ser obtidos a partir de um voltamograma cíclico são os potenciais e as intensidades de corrente de pico anódico e catódico. A definição destes parâmetros é apresentada na Tabela 2.

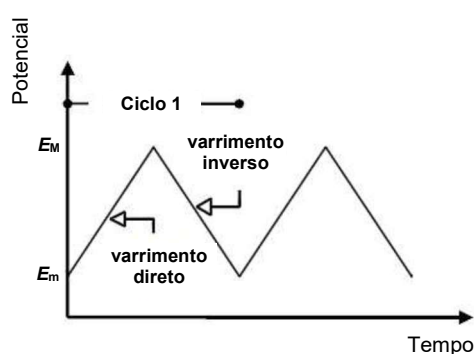


Figura 10 - Variação de potencial na forma de uma onda triangular, em voltametria cíclica, (adaptado de [55])

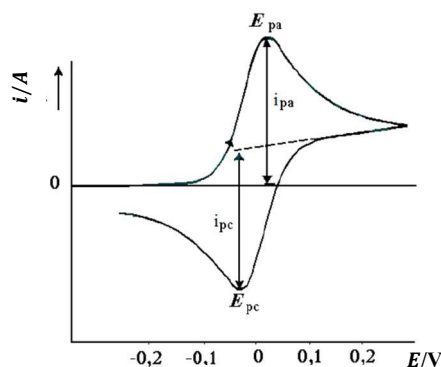


Figura 11 - Voltamograma cíclico para um sistema reversível, (adaptado de [55])

Tabela 2 - Parâmetros importantes em voltametria cíclica

Termo	Definição
E_{pa}	Potencial de pico anódico Potencial para o qual a intensidade de corrente anódica atinge o seu valor mais elevado
I_{pa}	Intensidade de corrente de pico anódica Valor mais elevado da intensidade de corrente anódica
E_{pc}	Potencial de pico catódico Potencial para o qual a intensidade de corrente catódica atinge o seu valor mais elevado
I_{pc}	Intensidade de corrente de pico catódica Valor mais elevado da intensidade de corrente catódica

Conforme o mecanismo das reações de oxidação redução realizadas na superfície do eletrodo de trabalho, o tipo de voltamograma gerado permite obter informações relativas à reação nomeadamente sobre a sua reversibilidade ou irreversibilidade, situações ilustradas na Figura 12 e na Figura 13.

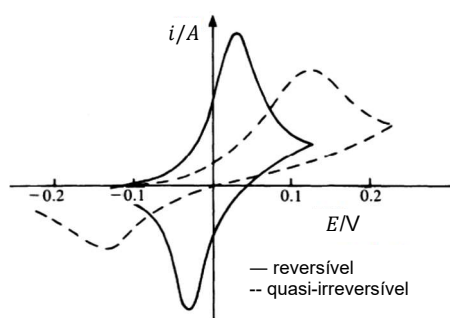


Figura 12 - O efeito de aumento da irreversibilidade no formato dos voltamogramas cíclicos, (adaptado de [55])

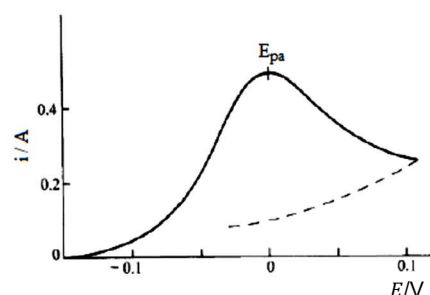


Figura 13 - Voltamograma cíclico para um sistema irreversível, (adaptado de [55])

3.2.2 Amperometria

A amperometria define-se como o sistema voltamétrico que funciona a potencial constante e no qual a intensidade de corrente é medida, sendo esta proporcional à concentração do analito [54].

A amperometria baseia-se na aplicação de um único pulso de potencial produzindo-se assim uma intensidade de corrente que decai rapidamente com o tempo, como ilustrado na Figura 14 (a) e (b). O eléctrodo de trabalho é mantido a um potencial constante e no qual ocorrem as reações redox de compostos eletroativos.

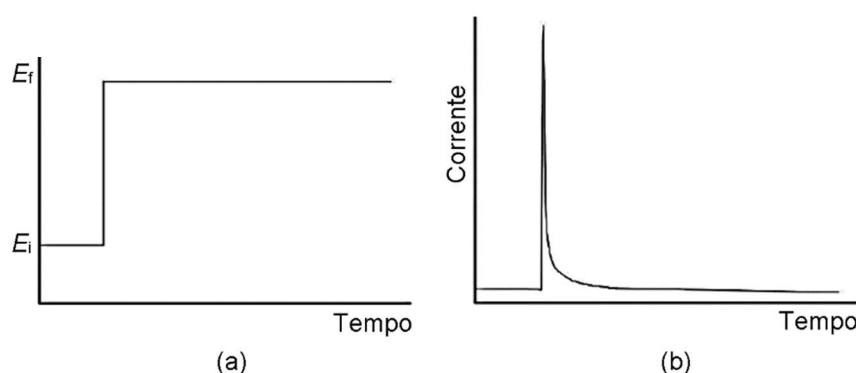


Figura 14 - Perturbação aplicada em amperometria (a) e resposta da intensidade de corrente em amperometria (b)

Uma grande vantagem da amperometria em relação à voltametria é a utilização de um potencial constante em contraste com um varrimento de potenciais usado na voltametria, fazendo com que a intensidade de corrente residual obtida apresente valores muito baixos. Isto concede à amperometria maior sensibilidade. Mas há desvantagens em manter o potencial constante. Algumas das desvantagens da amperometria a potencial constante são a baixa seletividade e a fraca estabilidade do sinal eletroquímico em função do tempo, comprometendo assim a repetibilidade da resposta e a reprodutibilidade dos resultados. A estabilidade do sinal depende da taxa de transferência de carga na interface entre o eléctrodo e a espécie eletroativa. A superfície do eléctrodo, com o decorrer dos trabalhos, começa a modificar-se gradualmente dependendo do tipo de composto envolvido. Assim, começa a sofrer passivação e contaminação, essencialmente, quando a espécie eletroativa e os produtos das reações adsorvem ou eletropolimerizam na superfície do eléctrodo de modo irreversível ou quasi-irreversível. Para ultrapassar esta limitação deve-se resolver estes problemas associados à superfície do eléctrodo. Nesse sentido, a amperometria de múltiplos pulsos, MPA (*Multiple pulse Amperometry*) representa uma alternativa para

prevenir a contaminação ou passivação da superfície do eletrodo e determinar compostos eletroativos. Aplica-se ao eletrodo de trabalho pulsos de potencial sequencial e continuamente em função do tempo e pulsos de condicionamento que procedem à limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo, permitindo assim uma resposta mais estável durante mais tempo.

A escolha do tempo de duração do pulso é um parâmetro importantíssimo e varia entre 30 a 500 ms. A sua otimização depende do tipo de análise a efetuar. A aplicação mais comum é o uso de dois pulsos de potenciais, possibilitando somente a deteção da espécie de interesse (em E_1) e a limpeza eletroquímica, periódica, (em E_2).

O potencial aplicado pode ser ajustado para maximizar a resposta para o analito de interesse, minimizando a resposta para analitos interferentes. Devido a todas estas características a MPA tem vantagens em relação à amperometria convencional, nomeadamente: aumento na estabilidade de resposta de um eletrodo em função do tempo, com a aplicação de um pulso de potencial de limpeza; aumento na seletividade e precisão através da deteção dos produtos de oxidação-redução; possibilidade de determinações simultâneas em análise por injeção em fluxo (FIA) com a utilização de apenas um eletrodo de trabalho, entre outras vantagens [56].

3.2.3 Eletrodo de diamante dopado com boro

A era dos eletrodos de diamante começou nos anos oitenta por investigadores japoneses e russos [57, 58]. Em 1992, Fujishima popularizou os eletrodos de BDD [59]. Em 1993 foi publicado o primeiro trabalho utilizando o eletrodo BDD em aplicações eletroquímicas [60]. Os seus autores apresentaram as propriedades inerentes a este eletrodo, fazendo despertar a atenção da comunidade científica para este material. Atualmente, o eletrodo BDD é muito utilizado em eletroanálise devido às suas características ímpares tais como: baixa e estável intensidade de corrente de

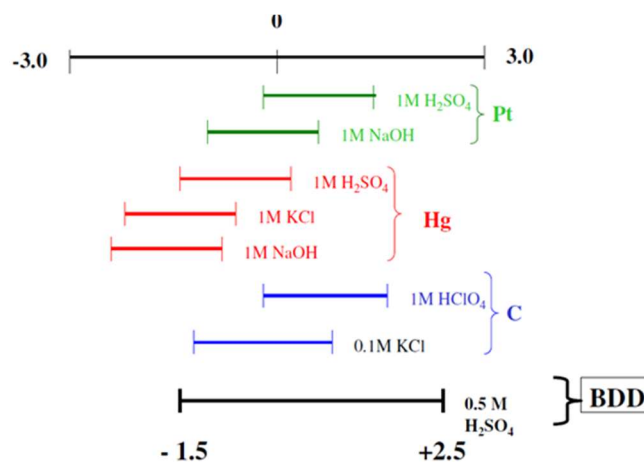


Figura 15 - Faixa de potencial aproximada para os eletrodos de platina, mercúrio, carbono e BDD em diferentes eletrólitos de suporte, (adaptado de [54])

fundo, extraordinária estabilidade morfológica e microestrutural a elevadas temperaturas, fraca adsorção de moléculas polares, melhorando assim a resistência do eletrodo à desativação, estabilidade eletroquímica de resposta a longo prazo em meios alcalinos e ácidos, possui uma larga janela de potencial em meio aquoso e não aquoso, como ilustrado na Figura 15, de entre muitas outras propriedades. Nenhum outro material mostra tanta versatilidade quanto um eletrodo BDD [61, 62].

3.3 Análise por injeção em fluxo (FIA)

O sistema de análise FIA desenvolveu-se a partir da combinação de características de métodos analíticos já existentes tais como: técnicas eletroquímicas, espectrofotometria, fluorescência, entre outras, bem como do aperfeiçoamento do método de análise em fluxo segmentado. Esta técnica foi desenvolvida em 1975 por Růžicka e Hansen e depressa se tornou numa técnica muito popular devido às suas vantagens, como por exemplo, simplicidade na instrumentação, eliminação de algumas possibilidades de contaminação, melhor precisão, diminuição de custos, aumento na velocidade de processamento, entre outras. Esta técnica constitui um poderoso aliado para a automação de procedimentos analíticos.

Este tipo de processo de análise pode ser dividido em três partes: propulsão dos líquidos, injeção da amostra e detecção. Na propulsão normalmente são usadas bombas peristálticas que servem para manter o caudal constante. Na injeção são usados injetores (os mais comuns são os de válvula rotatória desenvolvidos por Růžicka & Hansen) cuja função é introduzir um volume definido e reprodutível de amostra e por fim na detecção são empregues vários sistemas, como por exemplo, absorção atómica, amperometria, voltametria e outros [63, 64, 65].

O princípio da análise FIA está ilustrado na Figura 16 (a). Esta análise inicia-se com a adição de pequenos volumes de amostra, rigorosamente medidos injetados numa solução que os transporta, em fluxo constante, através do percurso analítico (fase 1). A amostra dispersa-se na solução transportadora que a conduz até um detetor adequado (fase 2). No decorrer desta fase, a amostra sofre dispersão na solução transportadora, produzindo uma zona caracterizada pela existência de gradientes de concentração. Nesta fase ainda podem ocorrer transformações, reações químicas, passar por etapas de separação, diluições, etc. O detetor regista, em contínuo, um parâmetro de medida associado à concentração do analito na solução. Quando a amostra passa pelo detetor provoca uma alteração do sinal que a caracteriza (fase 3). Desde que as condições

experimentais se mantenham constantes, a intensidade de corrente máxima que ocorre no pico observado no detetor é proporcional à concentração do analito [66, 67]. No final, o sistema volta a assumir as condições iniciais (fase 4), podendo iniciar-se um novo ciclo. O sinal característico do sistema FIA está representado na Figura 16 (b). Neste pode-se verificar que quando a zona de dispersão ainda não chegou ao detetor este regista o sinal de linha base (ou branco).

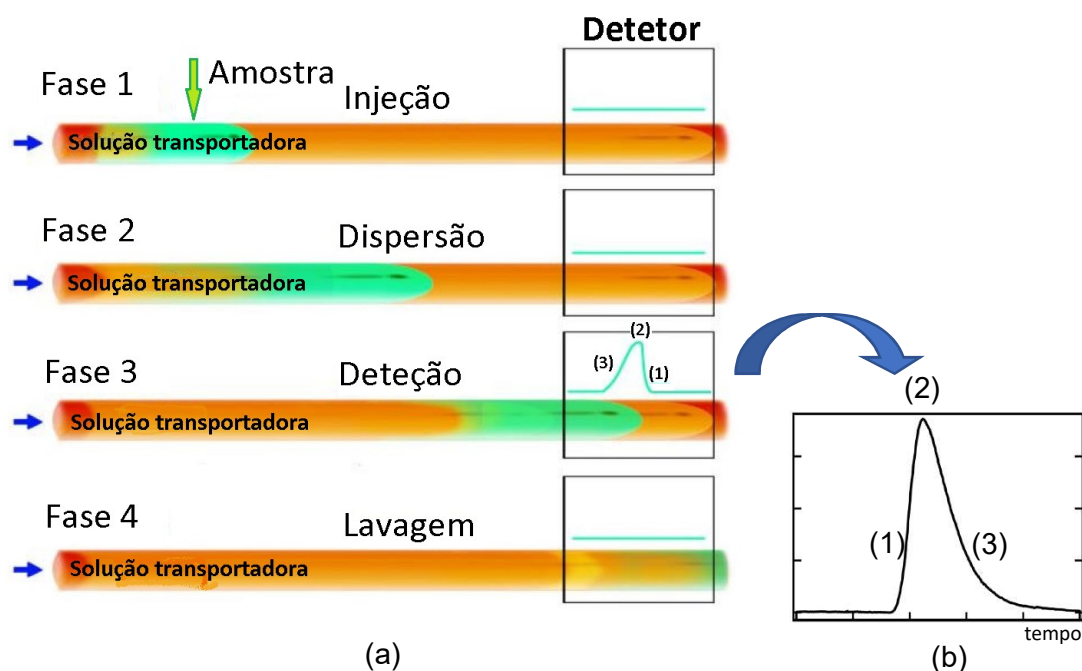


Figura 16 - Etapas de formação do sinal transiente em FIA: (a) diferentes gradientes de concentração da amostra na solução transportadora; (b) sinal obtido pelo detetor, (adaptado de [68])

Assim que a zona de dispersão da amostra chega ao detetor o sinal varia abruptamente (1) atingindo rapidamente um valor máximo (2). Conforme a zona de dispersão vai deixando o detetor, o sinal vai diminuindo de intensidade (3) até voltar a aproximar-se do valor inicial da linha base.

As determinações em FIA apresentam grandes vantagens nomeadamente a possibilidade de efetuar as determinações em condições de não equilíbrio físico ou químico e permitirem um processamento de dados bastante versátil, isto é, permitir a análise da altura, área e largura de picos ou a distância entre eles.

3.3.1 Acoplamento de MPA a FIA e a HPLC

O acoplamento de MPA com FIA representa uma alternativa para prevenir a contaminação do eléctrodo de trabalho e determinar vários compostos eletroativos, em simultâneo, uma vez que a técnica MPA permite obter até 10 amperogramas em função do tempo, com pulsos de pouca duração, mínimo de 30 ms para até 10 potenciais diferentes [69]. Além disso o fluxo contínuo da solução, proporcionado pelo sistema FIA, faz com que a superfície do eléctrodo sofra uma menor contaminação porque o tempo de contacto da amostra e dos produtos das reações redox com a superfície do eléctrodo é muito menor quando comparado com processos estacionários, aumentando assim a reprodutibilidade das análises. O primeiro trabalho apresentado na literatura, utilizando o acoplamento da amperometria pulsada com os sistemas de fluxo FIA para análise simultânea de compostos electroativos, foi proposto por Surareungchai *et al.*, na análise simultânea de glicose e frutose com a aplicação de quatro pulsos de potencial sobre um eléctrodo modificado [70]. O uso de MPA acoplada ao sistema hidrodinâmico FIA é usado para a determinação simultânea de dois ou mais analitos, para melhorar a seletividade na quantificação de compostos electroativos, melhorar o funcionamento de limpeza da superfície do eléctrodo de trabalho, entre outras utilizações [71].

As principais vantagens da detecção amperométrica em sistemas de fluxo FIA são: maior sensibilidade e menores efeitos da contaminação da superfície do eléctrodo de trabalho porque o tempo de contacto da amostra e dos produtos do processo redox com o eléctrodo é muito menor comparado com os processos estacionários, uma vez que o eletrólito de suporte flui continuamente durante a realização do ensaio. Por estas razões pode-se ver que há uma maior estabilidade de resposta do detetor e, como consequência, uma maior reprodutibilidade dos resultados [72].

O acoplamento de MPA com HPLC é utilizado para manter a reprodutibilidade do sinal, durante a análise, através da limpeza eletroquímica da superfície do eléctrodo de trabalho [73]. Na Tabela 3 estão resumidas algumas características comparativas entre o sistema FIA e o HPLC.

Tabela 3 - Comparação das características FIA e HPLC, (adaptado de [74])

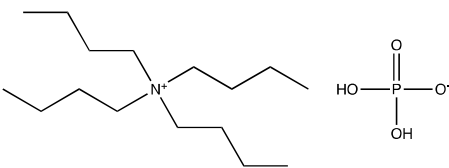
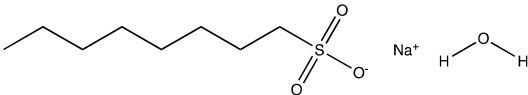
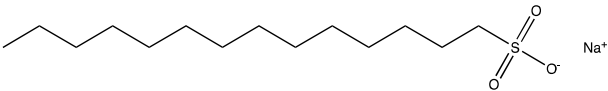
Parâmetro	FIA	HPLC
Introdução amostra	injeção	injeção
Volume amostra	pequeno (µL)	pequeno (µL)
Fluxo analítico	não segmentado	não segmentado
Velocidade da bomba	variável	variável
Pressão bombeamento	baixa	alta
Coluna	possível	sim
Obtenção de dados	integração ou altura do pico	integração

Pelo que se apresenta, pode-se concluir que a técnica FIA tem muitas semelhanças com a técnica HPLC.

3.4 Cromatografia de par iónico

A cromatografia de par iónico é uma técnica de cromatografia líquida que se baseia na adição à fase móvel de um sal contendo um contra ião relativamente à espécie a reter [75, 76, 77]. São exemplos iões orgânicos de cadeia longa como o ião amónio quaternário ou o sulfonato alquílico, apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Fórmulas químicas estruturais dos três reagentes par iónico utilizados

Estrutura	Sigla	Ref.
 Fosfato de tetrabutílamónio	TBA	[78, 79]
 Octanossulfonato de sódio	OSS	[39]
 Tetradecanossulfonato de sódio	TDS	

Neste mecanismo de separação, o pH da fase móvel é ajustado de modo a promover a ionização dos compostos da amostra. Adiciona-se o reagente par iónico aos eluentes e este é um surfactante catiónico ou aniónico. Juntamente com os iões do analito de carga oposta, os reagentes do par iónico formam um par de iões não carregado, o qual pode ser retardado na fase estacionária por interações hidrofóbicas. O par iónico neutro, ao entrar em contacto com a fase estacionária reversa, fica adsorvido devido à interação que ocorre entre a fase estacionária (apolar) e a cauda alifática presente no surfactante, proporcionando a separação [54, 80, 81].

O reagente par iónico (RPI) fosfato de tetrabutilamónio (TBA) é comumente usado para controlar a eluição de ácidos orgânicos em meios neutros-básicos em colunas não-polares [79].

Os compostos de sulfonato são usualmente explorados para controle de eluição de catiões em meios ácidos em colunas não-polares. Arai *et al.* utilizaram uma metodologia de HPLC-UV para a determinação simultânea de trigonelina, cafeína, ácido clorogénico e outros compostos relacionados em amostras de café instantâneo, usando uma fase móvel ácida, contendo octanossulfonato, em coluna C₁₈ de 15 cm de comprimento. Estes autores notaram o aumento do t_R de trigonelina com maiores concentrações de RPI e menor teor de metanol [39].

Na cromatografia de par iónico, os principais parâmetros experimentais que mais influenciam a retenção de um determinado analito são: composição da fase móvel em termos de seleção e concentração do reagente par iónico (RPI), concentração de fase orgânica e pH da fase móvel. O equilíbrio entre o surfactante e a fase estacionária é lento, a separação é mais sensível às variações de temperatura e de pH [82, 83].

3.5 Métodos de deteção

Entre os detetores acoplados a sistemas FIA, os mais comumente usados são os espectrofotométricos UV-Vis, fluorescência e eletroquímicos. A deteção eletroquímica é mais vantajosa que qualquer uma das outras duas. É nomeadamente quando os analitos não possuem um grupo cromóforo que absorva na região UV-Vis, quando as espécies apresentam baixo coeficiente de absorção e quando os analitos eletroativos não têm propriedades fluorescentes [84, 85].

As técnicas eletroquímicas mais exploradas na deteção em fluxo são a coulometria e a amperometria que apresentam múltiplas vantagens tais como: baixo

limite de deteção, elevada seletividade e uso de instrumentação mais barata quando comparadas com as técnicas empregadas na deteção UV-Vis e fluorescência

A deteção eletroquímica mais usada em sistemas de fluxo é a deteção amperométrica pulsada. Esta técnica apresenta elevadas potencialidades para o desenvolvimento de métodos de análise, essencialmente porque apresenta elevada estabilidade, boa seletividade e sensibilidade, elevada frequência de amostragem e baixo custo de instrumentação. Não menos importante, há a considerar a simplicidade no tratamento das amostras com etapas mínimas de preparação, essencialmente dissoluções e diluições, diminuindo significativamente os resíduos.

3.6 Sistema de fluxo de baixa pressão com separação cromatográfica

O desenvolvimento de sistemas de fluxo de baixa pressão com separação cromatográfica é uma tendência recente que combina sistemas de baixa pressão com colunas monolíticas [86]. Esta combinação só é possível devido à baixa contrapressão desenvolvida pelas colunas. Esta característica resulta das dimensões dos poros intrínsecos do monólito: os poros de maiores dimensões (macroporos com cerca de 2 μm) permitem maiores taxas de fluxo quando comparados com os valores usuais em metodologias tradicionais de HPLC. Os poros menores (mesoporos com cerca de 130 Å) são responsáveis pela elevada área superficial da fase estacionária que é um aspeto fundamental para um processo de separação cromatográfica. A fase móvel pode ser impulsionada através de dispositivos propulsores de baixa pressão geralmente aplicados em sistemas de análise de fluxo comum. O ponto essencial é a possibilidade de adicionar às vantagens reconhecidas de coletores de fluxo de baixa pressão (ou seja, de baixo custo e taxa de análise elevada) a seletividade cromatográfica para análise de amostras [13, 87].

A estratégia de cromatografia de par iónico em sistemas de fluxo de baixa pressão para a determinação de compostos iónicos é recente. É um novo desenvolvimento dentro da recente tendência de acoplamento de colunas monolíticas de comprimento reduzido (neste caso 1 cm de comprimento) a sistemas de fluxo convencionais. A compatibilidade do uso de colunas monolíticas de comprimento reduzido com reagentes de par iónico prevê a exploração das vantagens dessa abordagem, particularmente devido à fácil modificação da seletividade da coluna monolítica com base na seleção adequada dos reagentes de par iónico comercialmente disponíveis.

Parte II

Experimental

1. Introdução

Para determinar a trigonelina em cafés, através de um sistema de baixa pressão com separação cromatográfica e detecção eletroquímica, desenvolveu-se uma metodologia onde se adotou uma estratégia analítica que combina dispositivos propulsores de baixas pressões, como as bombas peristálticas, com colunas monolíticas. Com vista a alcançar esse objetivo foram delineadas as seguintes etapas de trabalho experimental:

- caracterização eletroquímica da trigonelina;
- estudo da retenção da trigonelina num sistema de fluxo de baixa pressão com colunas monolíticas;
- aplicação da metodologia desenvolvida na determinação de trigonelina em cafés.

A caracterização eletroquímica da trigonelina foi realizada por voltametria cíclica e amperometria pulsada sob diferentes condições eletroquímicas e de eletrólito de suporte. Utilizou-se um eletrodo de diamante dopado com boro devido às suas reconhecidas vantagens, mais concretamente a ampla janela de potencial de trabalho e a baixa intensidade de corrente de fundo [88].

A retenção da trigonelina foi avaliada através do mecanismo de par iónico, tendo sido estudada a influência da fase móvel, particularmente ao nível dos reagentes de par iónico selecionados e respetiva concentração [89].

A metodologia desenvolvida foi aplicada na determinação da trigonelina em amostras de café das variedades arábica e robusta. As amostras analisadas foram obtidas de grãos de café verde e de cafés torrados com diferentes níveis de torra.

Esta metodologia apresenta como principais vantagens, o baixo custo por análise, a elevada taxa de análises, a facilidade de implementação e a versatilidade analítica típica de sistemas de análise em fluxo [13].

2. Instrumentação, reagentes e procedimento

2.1 INSTRUMENTAÇÃO	31
2.2 REAGENTES, PADRÕES, AMOSTRAS E PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES.....	33
2.2.1 Preparação de soluções padrão	34
2.2.2 Soluções utilizadas em estudos de voltametria cíclica	34
2.2.3 Soluções utilizadas na otimização da solução AFI	35
2.2.4 Soluções padrão utilizadas no estudo de interferentes	35
2.2.5 Soluções utilizadas como fase móvel	36
2.2.5.1 Soluções da fase móvel com TBA.....	36
2.2.5.2 Soluções utilizadas na composição da fase móvel com OSS	36
2.2.5.3 Soluções utilizadas na composição da fase móvel com TDS	37
2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	37
2.3.1 Ensaios voltamétricos com a trigonelina.....	38
2.3.2 Sistema analítico desenvolvido e a sua operacionalidade	39
2.3.3 Estudo de interferentes	41
2.3.4 Extração e determinação de trigonelina no café.....	42
2.4 AVALIAÇÃO DO MÉTODO	43

2.1 Instrumentação

Para a realização deste trabalho recorreu-se a um largo conjunto de instrumentos, especificamente dedicados a cada uma das diversas fases que compõem toda a metodologia desenvolvida.

Na preparação das soluções usou-se a instrumentação detalhada na Tabela 5.

Tabela 5 – Lista da instrumentação utilizada

Instrumentação	Especificação / Utilização
Balança analítica <i>Mettler</i>	modelo AE50, para pesagem rigorosa dos reagentes
Banho de ultrassons <i>Bandelin Sonorex</i>	modelo TK100, para homogeneização e/ou desgaseificação de soluções
Medidor de pH <i>Hanna Instruments</i>	HI 2550, equipado com um eletrodo de vidro combinado
Micropipetas <i>Gilson Pipetman</i>	para medições rigorosas de volumes inferiores ou iguais a 1 mL
Sistema Millipore Simplicity TM	para purificação da água
Moinho	para moer os grãos de café
Placa de aquecimento <i>Gallenhamp</i>	SWT – 500 – D10L para aquecer a água utilizada na preparação das soluções de amostras de café
Agitador magnético <i>Metrohm</i>	E 649 a 2 rpm

Para a análise das amostras utilizou-se o sistema analítico desenvolvido e esquematizado na Figura 17. Este, é constituído por dois subsistemas, sendo um destinado à separação cromatográfica da trigonelina e o outro à determinação eletroquímica da trigonelina por detecção amperométrica.

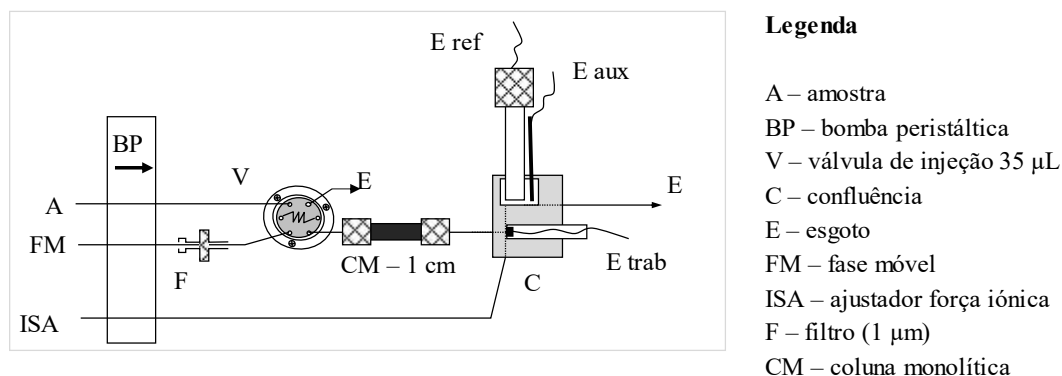


Figura 17 - Representação esquemática do sistema analítico desenvolvido neste trabalho

O primeiro subsistema destina-se à separação cromatográfica da trigonelina, a baixa pressão, sendo constituído pelos componentes apresentados na Tabela 6. O segundo subsistema é composto pelos componentes apresentados na Tabela 7. Para elétrodo de trabalho foi selecionado o elétrodo BDD por causa das boas caraterísticas eletroquímicas que apresenta, tais como, estabilidade à corrosão em meios muito agressivos, baixo risco de passivação, intensidade de corrente de fundo reduzida e estável, estabilidade de resposta durante longos períodos de tempo, larga janela de potencial em meio aquoso e não aquoso, e robustez física [90, 91, 92].

Tabela 6 – Componentes usados no subsistema para a separação cromatográfica da trigonelina, a baixa pressão

Componentes do sistema de fluxo de baixa pressão para separação cromatográfica	
BP	bomba peristáltica (Gilson, Minipuls 3)
ISA	solução ajustadora de força iónica
A	amostra
FM	fase móvel
V	válvula de injeção de baixa pressão (35 µL) (Rheodyne, 5020)
CM	coluna monolítica C ₁₈ de fase reversa (Merck, Chromolith, RP-18E, 10 mm por 4,6 mm) alojada num suporte de coluna (Merck, 1.51471.0001)
E	esgoto

Tabela 7 – Componentes usados no subsistema para a caracterização eletroquímica da trigonelina por detecção amperométrica

Componentes do sistema de detecção eletroquímico	
E_{trab}	Eléctrodo de trabalho – eléctrodo de diamante dopado com boro alojado num corpo PEEK (Windsor Scientific, 3 mm Ø, 3MMDIAM.BDD.PEEK)
E_{ref}	Eléctrodo de referência de junção única– AgCl/Ag (Thermo Scientific, 900100) preenchido com KCl, 3M
E_{Aux}	Eléctrodo auxiliar de carbono vítreo (Metrohm, 6.1248.040)
C	Confluência – peça de poli (metacrilato de metilo (PMMA) para suporte dos eléctrodos, onde se faz o ajuste das condições de meio do eluato e o acoplamento da coluna monolítica MC

Para ligar estes componentes foram utilizados tubos de diâmetro variável e de menor comprimento possível. Na bomba peristáltica, para transporte da solução de fase móvel, usou-se tubagem de propulsão Tygon de 1,02 mm de diâmetro interno (i.d.), (Gilson, Inc., F117938); para transporte da solução ISA utilizou-se tubagem Tygon de 0,38 mm i.d. (Gilson, Inc., F117933). As restantes conexões ao longo do sistema de fluxo foram realizadas com tubagem PTFE de 0,8 mm i.d. (Kinesis, 008T16-080-20) e conectores apropriados. Utilizou-se ainda um filtro de seringa em Nylon com 25 mm de diâmetro e poros de 1,0 μm (Whatman, 6750-2510) que foi colocado no tubo da fase móvel entre a bomba peristáltica e a válvula de injeção. Os sinais eletroquímicos, nomeadamente em voltametria cíclica e amperometria de múltiplos pulsos, foram obtidos usando um sistema formado por um potencióstato Tipo II $\mu\text{Autolab}$ e controlado por software GPES 4.9 para Windows (ambos da EcoChemie B.V., Utrecht, Holanda). As medições da altura dos picos cromatográficos foram efetuadas através deste software.

2.2 Reagentes, padrões, amostras e preparação de soluções

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada (condutância específica inferior a 0,1 $\mu\text{S cm}^{-1}$) e filtrada (usando uma membrana com porosidade de 0,45 μm). Os reagentes foram usados como comprados sem purificação adicional e encontram-se indicados na Tabela 8, assim como as suas características gerais.

Tabela 8 – Fabricante, pureza e densidade dos reagentes, padrões e amostras utilizados no trabalho experimental

Reagentes, padrões e amostras	Pureza e densidade	Marca e Referência
Ácido clorídrico (HCl)	35,9% ; (1,19 g/cm ³)	Fisher Chemical, H / 1200 / PB17
Acetato de sódio (NaCH ₃ COO)	99%	Aldrich
Fosfato de sódio (Na ₃ O ₄ P)	96%	Aldrich
Cloreto de sódio (NaCl)	≥99,8	Sigma-Aldrich, 31434
Acetonitrilo (ACN)	grau de gradiente de HPLC 99,99%	Fisher Chemical, A / 0627/17
Metanol (MeOH)	grau de gradiente de HPLC ≥99,9%	Chem-Lab NV, CL00.1364
Ácido ortofosfórico (H ₃ PO ₄)	grau eletroquímico HPLC > 85%	Fisher Chemical, O / 0515PB08
Reagentes par iónico		
Fosfato de tetrabutilamónio	cromatografia iónica ≥ 99,0%	Sigma-Aldrich, 86833
Octanossulfonato de sódio	cromatografia iónica ≥ 99,0%	Sigma-Aldrich, 74882
Tetradecanossulfonato de sódio	cromatografia iónica ≥ 99,0%	Sigma-Aldrich, 87191
Padrões		
Trigonelina	≥97,5%	Sigma-Aldrich, T5509
Niacina	≥ 98,0%	Sigma-Aldrich, N4126
Cafeína	≥99,0%	Fluka, 27600
Ácido clorogénico	≥95,0%	Aldrich, C3878
Ácido cafeico	≥98,0%	Sigma-Aldrich C0625
Ácido benzoico	≥99,0%	Merck, 8.22257.1000
Amostras		
Grãos de café verde, arábica do Brasil e robusta do Uganda, comprados numa loja local		

2.2.1 Preparação de soluções padrão

As soluções padrão-mãe de trigonelina de concentração $1,00 \times 10^{-2}$, $1,00 \times 10^{-3}$ e $5,00 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³ e de niacina de concentração $5,00 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³ foram preparadas a partir dos respetivos reagentes comerciais, usando a água desionizada como solvente. As soluções de menor concentração foram preparadas por diluição com água desionizada das soluções padrão-mãe. As soluções iniciais foram armazenadas à temperatura ambiente e protegidas da luz até serem utilizadas. Todas estas soluções apresentaram estabilidade durante um mês. Findo este período prepararam-se novas soluções.

2.2.2 Soluções utilizadas em estudos de voltametria cíclica

As soluções utilizadas nos estudos efetuados em voltametria cíclica, assim como a solução utilizada como eletrólito de suporte, apresentam-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Soluções utilizadas em estudos de voltametria cíclica

Solução
HCl 0,1 mol dm ⁻³ (pH =1)
NaCl 0,1 mol dm ⁻³ com HCl 0,01 mol dm ⁻³ (pH=2)
NaCH ₃ COO 0,1 mol dm ⁻³ com NaCl 0,1 mol dm ⁻³ (pH =4)
Na ₃ O ₄ P 0,1 mol dm ⁻³ com NaCl 0,1 mol dm ⁻³ (pH =7)
Ácido cafeico 1,1 µmol dm ⁻³
Cafeína 1,0 mmol dm ⁻³
Ácido clorogénico 4,6 mmol dm ⁻³
Niacina 0,8 mmol dm ⁻³
Solução utilizada no eletrólito de suporte (branco)
NaCl 0,1 mol dm ⁻³ com HCl 0,01 mol dm ⁻³ (pH =2)

2.2.3 Soluções utilizadas na otimização da solução ISA

Para otimizar a solução de ajuste de força iónica - ISA - prepararam-se as soluções da Tabela 10.

Tabela 10 - Soluções utilizadas na otimização da solução ISA

Solução
HCl 0,10 mol dm ⁻³
HCl 0,50 mol dm ⁻³
HCl 1,0 mol dm ⁻³
HCl 2,0 mol dm ⁻³

2.2.4 Soluções padrão utilizadas no estudo de interferentes

Para o estudo dos interferentes da trigonelina prepararam-se as soluções padrão listadas na Tabela 11. As soluções padrão de cada um dos compostos referidos têm concentrações 10 vezes superiores às normalmente esperadas no café.

Tabela 11 - Soluções padrão utilizadas no estudo de possíveis interferentes da trigonelina

Nome do interferente	Concentração / mol dm ⁻³
Ácido cafeico	1,1 µmol dm ⁻³
Cafeína	1,0 mmol dm ⁻³
Ácido clorogénico	4,4 mmol dm ⁻³
Niacina	0,8 mmol dm ⁻³

2.2.5 Soluções utilizadas como fase móvel

As soluções utilizadas como fase móvel em cromatografia de par iónico para a retenção de compostos iónicos em colunas apolares foram constituídas pelas misturas abaixo referidas, tendo em atenção a composição da fase móvel com TBA, OSS e TDS. Após a preparação, todas as soluções foram desarejadas em sistema de ultrassons durante 10 minutos.

2.2.5.1 Soluções da fase móvel com TBA

Na Tabela 12 detalham-se as misturas para as soluções da fase móvel em cromatografia de par iónico com ACN 2% e 10% e TBA com concentrações de 1, 9 e 20 mmol dm⁻³.

Tabela 12 – Constituintes das soluções usadas no estudo da composição da fase móvel em cromatografia de par iónico com TBA

Solvente orgânico	[TBA] / mmol dm ⁻³
ACN 10%	Sem TBA
ACN 10%	1,0
ACN 10%	9,0
ACN 2%	20,0

2.2.5.2 Soluções utilizadas na composição da fase móvel com OSS

Na Tabela 13 apresentam-se as soluções utilizadas no estudo de otimização da fase móvel em cromatografia de par iónico com MeOH 2, 5 e 10%, ACN 2, 5 e 10%, H₃PO₄ 0,10% (v/v) e OSS com concentrações de 1, 5, 10 e 20 mmol dm⁻³

Tabela 13 - Soluções do estudo da composição da fase móvel em cromatografia de par iónico com OSS

Solvente orgânico	[OSS] / mmoldm ⁻³	Solução ajustadora de pH
MeOH 2, 5 e 10%	Sem OSS	250 µL de solução comercial de H ₃ PO ₄
ACN 2, 5 e 10%	Sem OSS	250 µL de solução comercial de H ₃ PO ₄
MeOH 2% 5% 10%	1, 5, 10 e 20 1, 5, 10 e 20 1, 5, 10 e 20	250 µL de solução comercial de H ₃ PO ₄
ACN 2% 5% 10%	1, 5, 10 e 20 1, 5, 10 e 20 1, 5, 10 e 20	250 µL de solução comercial de H ₃ PO ₄

2.2.5.3 Soluções utilizadas na composição da fase móvel com TDS

Na Tabela 14 apresentam-se as soluções utilizadas no estudo de otimização da fase móvel em cromatografia de par iónico com ACN 2, 5, 10 e 50%, H₃PO₄ 0,10% (v/v) e TDS com concentrações de 1, 2 e 5 mmol dm⁻³.

Tabela 14 - Soluções do estudo da composição da fase móvel em cromatografia de par iónico com TDS

Solvente orgânico	[TDS] / mmol dm ⁻³	Solução ajustadora de pH
ACN 50%	Sem TDS	-----
ACN 2% 5% 10%	1, 2 e 5 1, 2 e 5 1, 2 e 5	250 µL de solução comercial de H ₃ PO ₄

2.3 Procedimento experimental

De início foram efetuados alguns estudos preliminares com a trigonelina, em voltametria cíclica, com o objetivo de avaliar a sua eletroatividade no elétrodo BDD.

No passo seguinte acoplou-se um sistema de deteção amperométrica a um sistema de fluxo monocal, sem coluna cromatográfica e fizeram-se estudos em amperometria DC e MPA, com o objetivo de otimizar as condições de trabalho.

Por fim, acoplou-se a coluna cromatográfica ao sistema desenvolvido e realizaram-se todos os ensaios para estudar a retenção e a separação da trigonelina de outros compostos e possíveis interferentes, presentes no café, utilizando a cromatografia de par iónico. A escolha da estratégia de cromatografia de par iónico para

separar a trigonelina dos restantes compostos da matriz do café deve-se ao carácter iónico permanente deste composto - a trigonelina pode ocorrer como um catião (em meios ácidos) ou como um zeuterião ($\text{pH} > 4$). Neste estudo determinaram-se os principais parâmetros experimentais que mais influenciam a retenção da trigonelina: composição da fase móvel em termos de seleção e concentração do reagente par iónico (RPI), concentração de fase orgânica e pH da fase móvel.

O RPI avaliado em primeiro lugar foi o fosfato de tetrabutílamónio (TBA). Na fase orgânica utilizou-se o acetonitrilo devido à sua baixa viscosidade em soluções aquosas sendo responsável por uma diminuição da pressão do sistema relativamente às soluções aquosas. Em segundo lugar foi avaliado o octanossulfonato de sódio (OSS) e, por fim, ensaiou-se o tetradecanossulfonato de sódio (TDS), numa tentativa de explorar a cadeia hidrofóbica mais longa deste composto para aumentar a retenção de trigonelina. Fez-se um estudo semelhante ao descrito para o OSS.

Fez-se também um estudo cromatográfico ao ácido 5-clorogénico, à cafeína, ao ácido cafeico e à niacina para verificar se há interferências com o tempo de retenção da trigonelina. Esse estudo ainda foi realizado em café verde e torrado para avaliar o efeito da matriz nessas amostras.

Por fim, determinou-se o teor de trigonelina no café através do método da curva de calibração.

2.3.1 Ensaios voltamétricos com a trigonelina

Os ensaios preliminares foram realizados em voltametria cíclica e em amperometria. Com isto pretendeu-se avaliar a eletroatividade da trigonelina, utilizando o eléctrodo BDD como eléctrodo de trabalho em diferentes eletrólitos de suporte e a diferentes velocidades de varrimento, bem como o seu perfil eletroquímico.

Para efetuar estes ensaios voltamétricos utilizou-se uma célula eletroquímica, contendo um eléctrodo de trabalho, um eléctrodo de referência e um eléctrodo auxiliar. A gama de potenciais utilizada para o eléctrodo de trabalho variou de -2,00 V a 1,50 V.

A escolha do eletrólito de suporte é de extrema importância em medidas eletroanalíticas porque, para além de modificar as propriedades das soluções e a interface eléctrodo-solução, influencia diretamente na intensidade de corrente de pico e no potencial de pico. Por estes motivos, deve-se estudar a influência do pH numa gama de valores suficientemente abrangente para se seleccionar o eletrólito de suporte mais adequado.

Nestes ensaios preliminares, para o estudo das variáveis eletroquímicas que influenciam a resposta da trigonelina no eletrodo BDD realizaram-se ensaios em VC, utilizando diferentes soluções de trigonelina com concentrações de 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 mmol dm⁻³. Os eletrólitos de suporte utilizados na otimização foram soluções de: HCl 0,1 mol dm⁻³, (pH =1,0); mistura de HCl 0,01 mol dm⁻³ com NaCl 0,1 mol dm⁻³, (pH =2,0); mistura de tampão acetato 0,01 mol dm⁻³ com NaCl 0,1 mol dm⁻³ (pH =4,0) e mistura de tampão fosfato 0,01 mol dm⁻³ com NaCl 0,1 mol dm⁻³, (pH =7,0). Para cada um destes meios foram testadas três velocidades de varrimento diferentes: 0,1; 0,5 e 1,0 V s⁻¹. Todos estes ensaios foram feitos com e sem agitação magnética.

Para se entender melhor o sinal eletroquímico observado para a trigonelina, fez-se em VC ensaios com a niacina por esta ser semelhante na estrutura química. Efetuou-se também para outros compostos presentes no café, nomeadamente, ácido 5-clorogénico, cafeína e ácido cafeico, para se verificar se eram eletroativos no eletrodo BDD e a que potencial. Para fazer os ensaios em amperometria acoplou-se um sistema de deteção amperométrico a um sistema de fluxo monocal.

2.3.2 Sistema analítico desenvolvido e sua operacionalidade

Implementou-se um sistema analítico para a determinação da trigonelina no café, tendo como principais vantagens: a simplicidade, a facilidade de montagem, a robustez, a elevada taxa de análise e ainda a facilidade no ajuste automático da força iónica. Este sistema é composto por uma bomba peristáltica para a propulsão das amostras e das soluções, uma válvula de injeção de baixa pressão dedicada à injeção da amostra no sistema de fluxo, uma coluna monolítica de 1 cm de comprimento alojada num suporte de coluna e um sistema de deteção eletroquímico, como ilustrado na Figura 18.

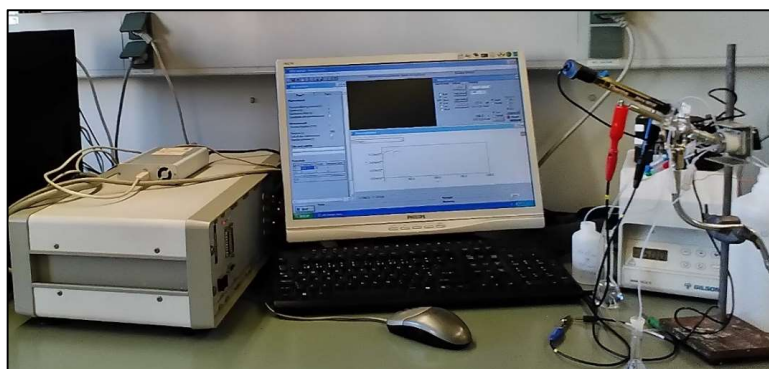


Figura 18 – Imagem da montagem experimental do sistema analítico desenvolvido com deteção amperométrica

Para unir a coluna monolítica ao eletrodo de trabalho numa configuração “wall-jet” (o contacto do jato da solução com a superfície do eletrodo de trabalho é frontal) foi construída uma confluência feita em poli(metacrilato de metilo). Esta confluência também apresenta um canal de entrada através do qual a solução de ajuste da força iónica é misturada com o eluato antes da deteção, como se pode ver na Figura 19. Outra característica importante da confluência é a sua capacidade de acomodar de forma apropriada os eletrodos na célula eletroquímica, facilitando o manuseio do eletrodo de trabalho. Para tal basta que o eletrodo tenha dimensões adequadas para se manter firmemente seguro no interior da confluência e se manter posicionado à menor distância do ponto de saída do jato de solução.

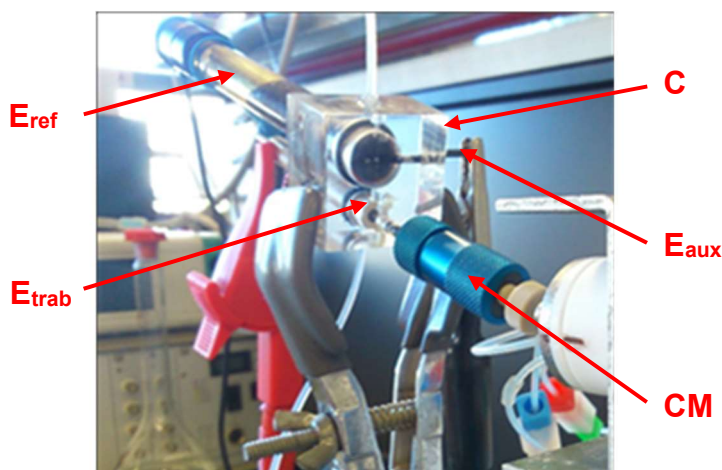


Figura 19 – Imagem relativa ao pormenor da confluência

As distâncias entre a válvula de injeção e a coluna, bem como entre a coluna e o eletrodo de trabalho, foram mantidas no mínimo a fim de reduzir o alargamento da banda. Além disso, o acoplamento do eletrodo de trabalho próximo do final da coluna tem por objetivo aumentar a resposta analítica sobre o tempo de resposta e sensibilidade [93]. Utilizou-se um filtro de seringa em Nylon com 25 mm de diâmetro e poros de $1,0\ \mu\text{m}$, colocado no tubo da fase móvel entre a bomba peristáltica e a válvula de injeção, com o propósito de aumentar a vida útil da coluna, sendo substituído a cada 5 dias.

A solução da fase móvel e a solução ISA são previamente desarejadas durante 10 minutos em banho de ultrassons antes de serem usadas. Estas soluções são impulsionadas simultaneamente pela bomba peristáltica a 7,50 rpm (a um caudal de $0,71\ \text{mL min}^{-1}$ e $0,14\ \text{mL min}^{-1}$ para as soluções de fase móvel e ISA respetivamente). Nesse momento ocorre o equilíbrio da fase estacionária da coluna com os pares de iões

da fase móvel e na extremidade da coluna, na confluência, o eluato é misturado imediatamente com a solução ISA antes de chegar ao eletrodo de trabalho, permitindo a estabilização da resposta do eletrodo.

Este é um procedimento importante a ser realizado antes da análise da amostra, uma vez que o período de equilíbrio das colunas com RPI depende da concentração do reagente par iónico; o tempo de equilíbrio da coluna é mais longo quando tem reagente de par iónico presente na fase móvel do que nas condições tradicionais de cromatografia de partição, já que os equilíbrios completos do RPI com a fase estacionária precisam de ser previamente estabelecidos. Considerando um exemplo típico de fase móvel de 1-tetradecanesulfonato de sódio, 0,25 mmol dm⁻³ e um caudal de 0,71 mL min⁻¹ é necessário um período de condicionamento de cerca de 90 minutos. A análise é realizada após a estabilidade da linha de base ($i < 0,5 \mu\text{A} / 5 \text{ min}^{-1}$). Para tal, enche-se o “loop” (circuito), (neste caso, com um volume de 34 μL de amostra) e, em seguida, injeta-se em direção à coluna monolítica onde ocorre a separação cromatográfica. À saída da coluna, o eluato é misturado automaticamente com a solução ISA para que o analito, caso esteja presente, possa ser detetado através do detetor amperométrico.

Na aplicação deste procedimento, todas as soluções de amostras foram previamente filtradas através de filtros de seringas de celulose regeneradas de 0,45 μm (Tecnocroma, S13RC045B) antes de serem analisadas para evitar danos na coluna provocados por partículas. No final de cada semana de trabalho, a coluna era acondicionada em água: acetonitrilo 50:50 (v/v). Este modo de proceder experimentalmente permitiu prolongar o desempenho da coluna monolítica por vários meses.

2.3.3 Estudo de interferentes

Dada a complexidade química que caracteriza a matriz do café, principalmente após a torra, a metodologia usada para determinar a trigonelina foi acompanhada de estudos, a outros constituintes do café, para verificar a existência de interferentes provenientes da matriz na amostra a ser analisada.

O efeito de eventuais interferentes foi estudado através da comparação dos tempos de retenção de soluções padrão de ácido cafeico, de ácido clorogénico, de cafeína, e de niacina, com concentrações 10 vezes superiores à habitual presente no café, nas condições experimentais previamente selecionadas para a trigonelina - ACN, 10% (v/v), TDS, 0,25 mmol dm⁻³, H₃PO₄ 0,10% (v/v) num sistema de fluxo

cromatográfico de baixa pressão - com soluções de amostras de café. As soluções padrão de concentrações: $|\text{ácido cafeico}|_{\text{testado}} = 1,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$; $|\text{ácido 5-clorogénico}|_{\text{testado}} = 4,6 \text{ mmol dm}^{-3}$; $|\text{niacina}|_{\text{testada}} = 0,8 \text{ mmol dm}^{-3}$; $|\text{cafeína}|_{\text{testada}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, foram injetadas no sistema, de acordo com o procedimento experimental anteriormente referido na Parte Experimental, secção 2.3.1.

A nicotinamida, a N-metilpiridina e o nicotinato de metilo que embora apresentem estruturas químicas semelhantes à trigonelina não foram avaliados, como possíveis interferentes, pois a sua concentração no café não é significativa quando comparada com os níveis de trigonelina (é cerca de mil vezes inferior à da trigonelina) [39, 94, 95].

Para avaliar os possíveis interferentes ou a interferência compararam-se os tempos de retenção das soluções padrão de ácido 5-clorogénico, cafeína, ácido cafeico e niacina com o das soluções padrão de trigonelina e amostras de café.

2.3.4 Extração e determinação de trigonelina no café

As amostras de café verde das espécies arábica e robusta foram adquiridas numa loja local. A torra do café foi realizada usando um torrador de café (Hottop Coffee roaster KN-8828B-2K). O nível de torra foi medido com base no parâmetro de luminosidade de acordo com o espaço de cor tridimensional CIE $L^* a^* b^*$ usando um colorímetro (Minolta CR-400, Konica-Minolta, Osaka, Japan). Para cada espécie de café foram preparados três níveis de torras diferentes, que incluíam intensidades de torra-leve, média e escura, com base em valores de L^* medidos em ca. 30, 25 e 20, respetivamente [96, 97]. Todas as amostras verdes e torradas foram previamente moídas e peneiradas (25 mesh).

A extração da trigonelina em amostras de café verde e torrado pode ser feito seguindo diferentes procedimentos [38, 42, 44, 98]. Apresenta-se de seguida o procedimento adotado neste trabalho, adaptado de [21].

Pesou-se 0,05 g de amostra e colocou-se em 50 ml de água desionizada fervendo durante 10 minutos com agitação moderada. A solução resultante foi deixada até atingir a temperatura ambiente antes de se ajustar o volume. Por fim, todas as amostras foram filtradas, inicialmente com um filtro de papel Watman nº 1 e posteriormente com filtros de seringas de celulose regenerada, 0,45 μm (Sartorius, ref. 17765) antes de serem analisadas no sistema analítico desenvolvido (Parte Experimental, secção 2.3.2). Para fins de quantificação, a humidade das amostras verdes e torradas foi determinada de acordo com os procedimentos de referência (Norma Internacional ISO de 1994 e 2003) [99, 100].

2.4 Avaliação do método

Após a seleção prévia das condições experimentais para determinar a trigonelina, usando o sistema desenvolvido, nomeadamente, as condições eletroquímicas e a composição da solução de ajuste da força iónica para deteção eletroquímica, bem como a seleção da fase móvel para controle da retenção de trigonelina, a seletividade da metodologia proposta foi avaliada da seguinte forma:

- através do estudo individual de compostos presentes no café com estrutura similar à da trigonelina (encontrado na literatura);
- através da análise de extratos de café;
- através da análise de extratos de café com adição de solução padrão de trigonelina;
- através da análise de lotes de café verde e torrado para a caracterização do perfil de concentração de trigonelina.

Ainda para a avaliação da metodologia proposta para a determinação da trigonelina estudou-se a linearidade, a repetibilidade e a sensibilidade.

A linearidade da curva de calibração foi estudada através de ensaios em triplicado de soluções padrão de trigonelina e niacina de concentrações diferentes, calculando-se o coeficiente de determinação.

Para determinação da repetibilidade do sinal foram analisadas várias soluções de igual composição e determinado o coeficiente de variação como medida da repetibilidade.

Na determinação da sensibilidade do método, o limite de deteção e o limite de quantificação foram calculados de acordo com Miller and Miller, (2000) e Skoog, (2007) [101, 54].

A concentração da trigonelina na solução amostra foi determinada pelo método da curva de calibração conhecendo a intensidade de corrente do pico da trigonelina na solução amostra de café. A partir deste valor calculou-se o teor de trigonelina no café.

3. Resultados experimentais e discussão

3.1 CARATERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DA TRIGONELINA	45
3.1.1 Voltametria cíclica	45
3.1.1.1 Estudo do efeito do eletrólito de suporte	46
3.1.1.2 Efeito da velocidade de varrimento.....	47
3.1.1.3 Perfil eletroquímico	47
3.1.1.4 Comparação do sinal voltamétrico da trigonelina com o de outros compostos	48
3.1.2 Detecção amperométrica acoplada ao sistema de fluxo	51
3.1.2.1 Amperometria DC	51
3.1.2.2 Amperometria MPA	52
3.1.2.3 Sistema de fluxo para estudo da solução de ajuste de força iônica ISA.....	53
3.2 CONDIÇÕES USADAS NO SISTEMA FIA	55
3.3 RETENÇÃO DA TRIGONELINA BASEADA EM CROMATOGRAFIA DE PAR IÔNICO.....	56
3.4 AVALIAÇÃO DE INTERFERENTES.....	58
3.5 DETERMINAÇÃO DE TRIGONELINA USANDO A METODOLOGIA DESENVOLVIDA.....	61
3.5.1 Curva de calibração	61
3.5.1.1 Estudo da repetibilidade do sinal da trigonelina.....	65
3.5.1.2 Estudo da repetibilidade do sinal da niacina.....	66
3.5.1.3 Estudo da repetibilidade do sinal para uma mistura de trigonelina e niacina ...	67
3.5.2 Determinação de trigonelina no café	67
3.5.3 Parâmetros cromatográficos	70

3.1 Caraterização eletroquímica da trigonelina

Existem poucas metodologias eletroquímicas para a determinação da trigonelina e, tanto quanto se sabe, a determinação deste composto usando um eletrodo de diamante dopado com boro ainda não foi explorada. Os estudos preliminares pretenderam avaliar a viabilidade da utilização do eletrodo BDD.

De seguida é apresentado o estudo de cada uma das variáveis eletroquímicas em voltametria cíclica e em amperometria, utilizando o eletrodo BDD, de modo a avaliar a eletroatividade da trigonelina.

Nos estudos amperométricos foram utilizadas as técnicas de amperometria DC e MPA acoplada a um sistema FIA.

3.1.1 Voltametria cíclica

Na caracterização eletroquímica da trigonelina por voltametria cíclica estudou-se o efeito do eletrólito de suporte, a velocidade de varrimento de potencial e o perfil

eletroquímico. Também se estudam outros compostos para se entender melhor as características da trigonelina. De seguida detalham-se os resultados obtidos em cada um destes estudos.

3.1.1.1 Estudo do efeito do eletrólito de suporte e pH

A influência do eletrólito de suporte e pH foi analisada numa gama de valores de 1,0 a 9,0, sendo apresentados resultados só para pH de 1,0 a 7,0 porque a partir de pH maior que 7,0 o sinal desaparece. As soluções estudadas como eletrólito de suporte estão apresentadas, na Parte Experimental (secção 2.2.2), na Tabela 9.

A Figura 20 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para a trigonelina nos diferentes eletrólitos de suporte e o respetivo sinal do branco. É possível observar que, dos que foram estudados, o sinal é mais nítido a pH igual a 2 notando-se também que há uma tendência para o potencial do pico se deslocar para potenciais mais negativos quanto menos ácida for a solução.

Assim, o eletrólito de suporte que proporcionam uma melhor resposta para o processo de redução da trigonelina é a mistura NaCl 0,1 mol dm⁻³ e HCl 0,01 mol dm⁻³ a pH igual a 2.

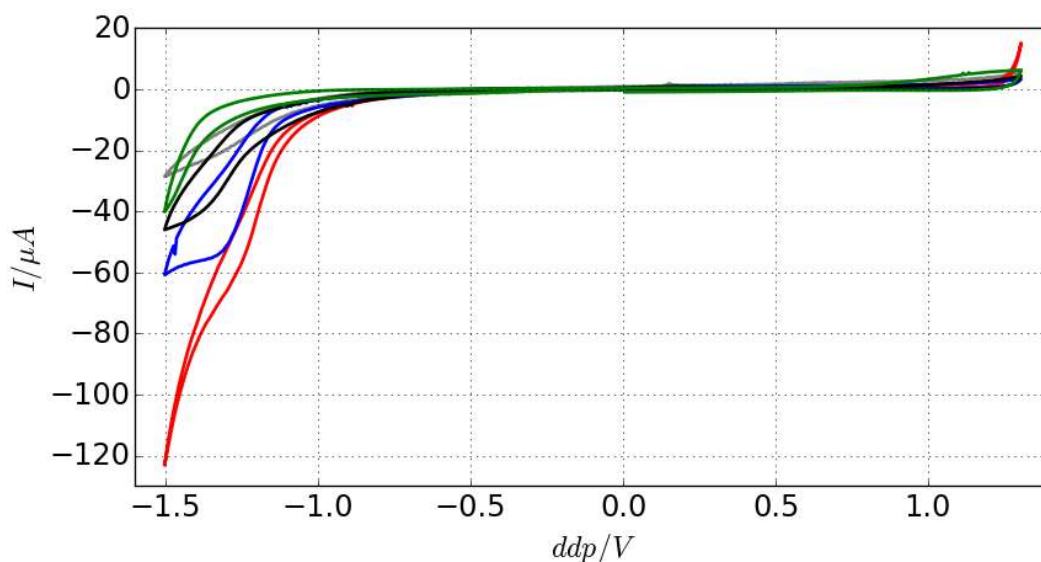


Figura 20 - Voltamogramas cíclicos da trigonelina para o estudo do efeito do eletrólito de suporte no seu perfil eletroquímico; [trigonelina] = 0,5 mmol dm⁻³; velocidade de varrimento 1,0 Vs⁻¹; E_{step} = 4,88 mV e E_{red} = -1,4 V

(—) pH=1,0; (—) pH=2,0; (—) pH=4,0; (—) pH=7,0 e (—) sinal do branco

3.1.1.2 Efeito da velocidade de varrimento

O efeito da velocidade de varrimento de potencial no comportamento voltamétrico da trigonelina foi estudado para os valores de $0,1 \text{ Vs}^{-1}$, $0,5 \text{ Vs}^{-1}$ e $1,0 \text{ Vs}^{-1}$, usando as melhores condições de meio e de pH (eletrólito de suporte: mistura de NaCl $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ com HCl $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ a $\text{pH}=2$), anteriormente selecionadas. As restantes condições experimentais, concentração da trigonelina e parâmetros para a VC, mantêm-se iguais às usadas anteriormente. Os voltamogramas cíclicos deste estudo estão apresentados na Figura 21. Analisando os resultados, observa-se que com o aumento da velocidade de varrimento de potencial ocorre uma melhor definição do sinal com menor ruído. Assim, a velocidade de varrimento que dá melhor resposta é de $1,0 \text{ Vs}^{-1}$.

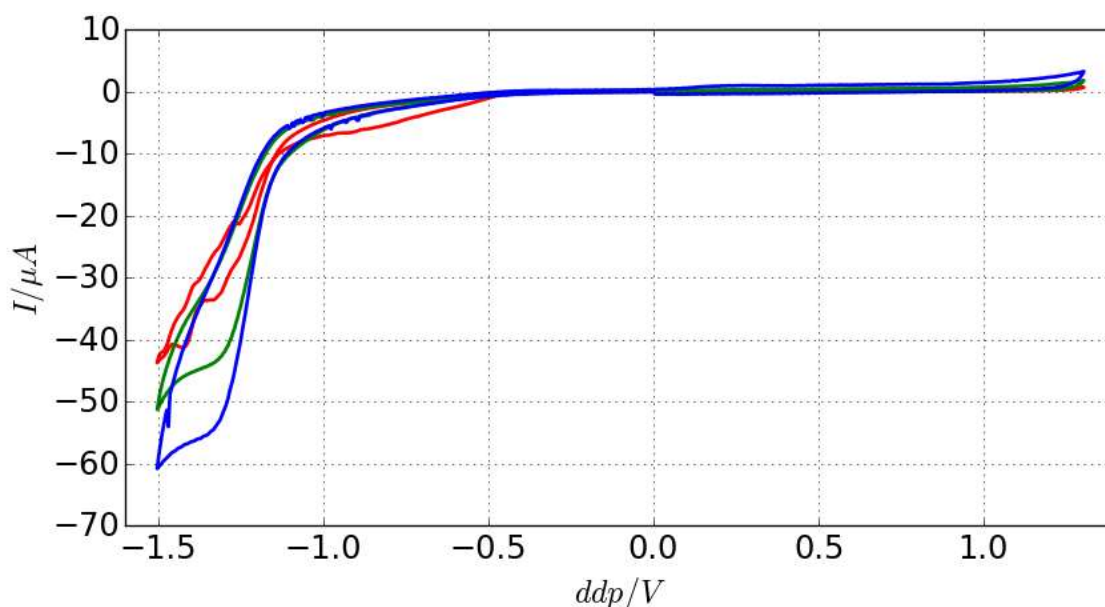


Figura 21 - Voltamogramas cíclicos da trigonelina para o estudo da velocidade de varrimento: (—) $0,1 \text{ Vs}^{-1}$; (—) $0,5 \text{ Vs}^{-1}$ e (—) $1,0 \text{ Vs}^{-1}$; $[trigonelina] = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $E_{\text{step}} = 4,88 \text{ mV}$ e $E_{\text{red}} = -1,4 \text{ V}$. Eletrólito de suporte: mistura de NaCl $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ com HCl $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ a pH igual a 2

Observou-se que com agitação se obtinha melhores resultados, pois a agitação faz com que a solução junto do eléctrodo seja renovada e assim a resposta é mais nítida. Nesse sentido utilizou-se uma velocidade de agitação de 2 rpm.

3.1.1.3 Perfil eletroquímico

Fizeram-se quatro ensaios com diferentes concentrações de trigonelina, 0,1; 0,2; 0,5 e $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ para verificar a existência de relação entre o sinal analítico e a

concentração de trigonelina, bem como, observar a presença de processos de oxidação ou de redução da trigonelina sobre a superfície do eletrodo de BDD.

Os resultados experimentais, obtidos por VC, mostraram que este composto sofre uma reação redox a aproximadamente -1,40 V. Apresenta apenas um pico, o de redução a -1,40 V, indicando que a trigonelina é eletroativa, na superfície do eletrodo de BDD, a esse potencial, segundo um processo irreversível, pois não apresenta um segundo pico que, a existir, seria de oxidação. A Figura 22 apresenta voltamogramas cíclicos da trigonelina a diferentes concentrações e do sinal do branco. Observa-se que os sinais da trigonelina estão relacionados com a sua concentração. Assim, conclui-se que a trigonelina apresenta atividade eletroquímica no eletrodo BDD.

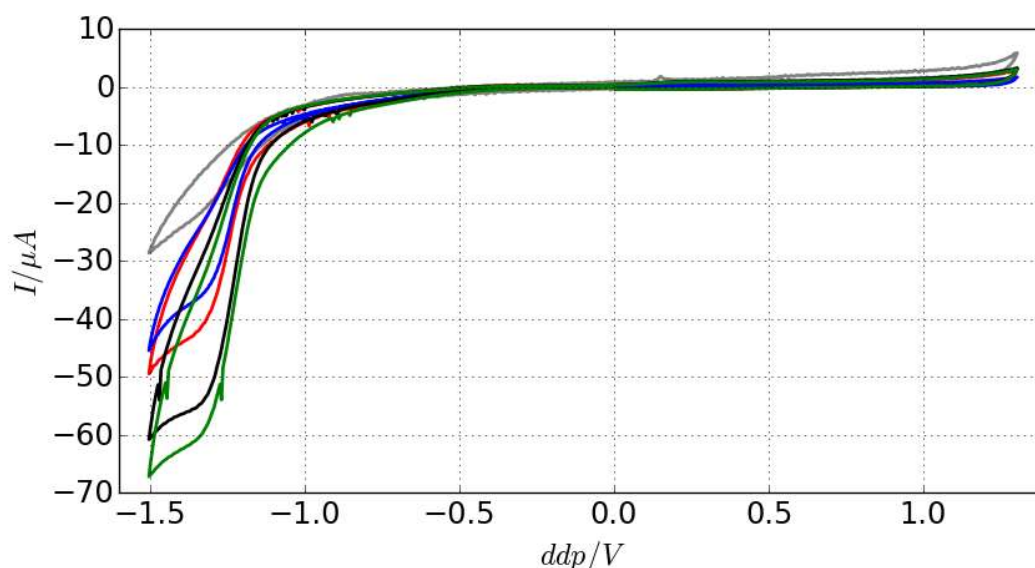


Figura 22 - Voltamogramas cíclicos do sinal da trigonelina a diferentes concentrações: (—) 1×10^{-4} mol dm^{-3} ; (—) 2×10^{-4} mol dm^{-3} ; (—) 5×10^{-4} mol dm^{-3} ; (—) $1,0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} e do sinal do branco (—) mistura de NaCl 0,1 mol dm^{-3} com HCl 0,01 mol dm^{-3} a pH igual a 2; velocidade de varrimento $1,0 \text{ Vs}^{-1}$; E_{step} 4,88 mV

Esta otimização feita em VC foi realizada, alterando uma variável de cada vez, mantendo todas as outras constantes.

3.1.1.4 Comparação do voltamograma da trigonelina com o de outros compostos

Nas condições experimentais enunciadas atrás, estudaram-se soluções padrão de niacina equimolares da trigonelina de concentração $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Os resultados obtidos encontram-se representados nos voltamogramas cíclicos da Figura 23, onde se pode observar que o sinal da trigonelina e da niacina surgem ao mesmo potencial de

redução e que o voltamograma da niacina tem um perfil similar ao da trigonelina. Estes resultados também estão de acordo com estudos polarográficos anteriores que atribuíram à ligação C=N a onda de redução irreversível de vários derivados de piridina [102, 103].

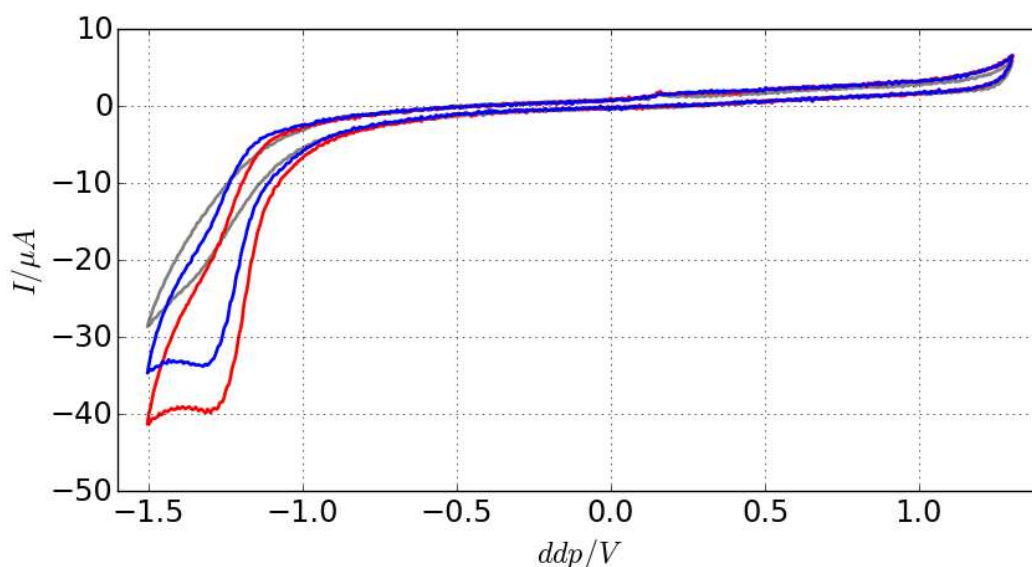


Figura 23 – Comparação dos voltamogramas cíclicos de solução padrão de trigonelina com o de niacina: (—) trigonelina, (—) niacina de concentração $5,00 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ e (—) sinal do branco. Eletrólito de suporte: mistura de NaCl $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ com HCl $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ a pH igual a 2

Para as soluções padrão de ácido 5-clorogénico, de cafeína e de ácido cafeico obtiveram-se os voltamogramas apresentados na Figura 24. Comparando o sinal do branco e o voltamograma da trigonelina com cada um dos compostos referidos anteriormente pode-se concluir que:

O voltamograma do ácido 5-clorogénico, apresentado na Figura 24 (A), mostra um perfil eletroquímico diferente do da trigonelina e do sinal do branco. Ao potencial de -1,4 V não é visível um sinal semelhante ao apresentado pela trigonelina: aparecem dois picos, um a aproximadamente 0,3 V e o outro a aproximadamente 0,8 V, podendo ser o primeiro de redução e o segundo de oxidação. O voltamograma da cafeína apresentado na Figura 24 (B) mostra que este composto tem um perfil eletroquímico semelhante ao do branco, não apresentando qualquer evidência relevante. Quanto ao ácido cafeico, representado na Figura 24 (C), pode-se observar que apresenta um perfil eletroquímico diferente do da trigonelina, não apresentando qualquer sinal a -1,4 V, mas à semelhança do ácido 5-clorogénico, apresenta dois picos bem distintos na mesma gama de potencial.

Perante estes resultados pode-se dizer que nenhum destes compostos apresenta um potencial de redução igual ao da trigonelina.

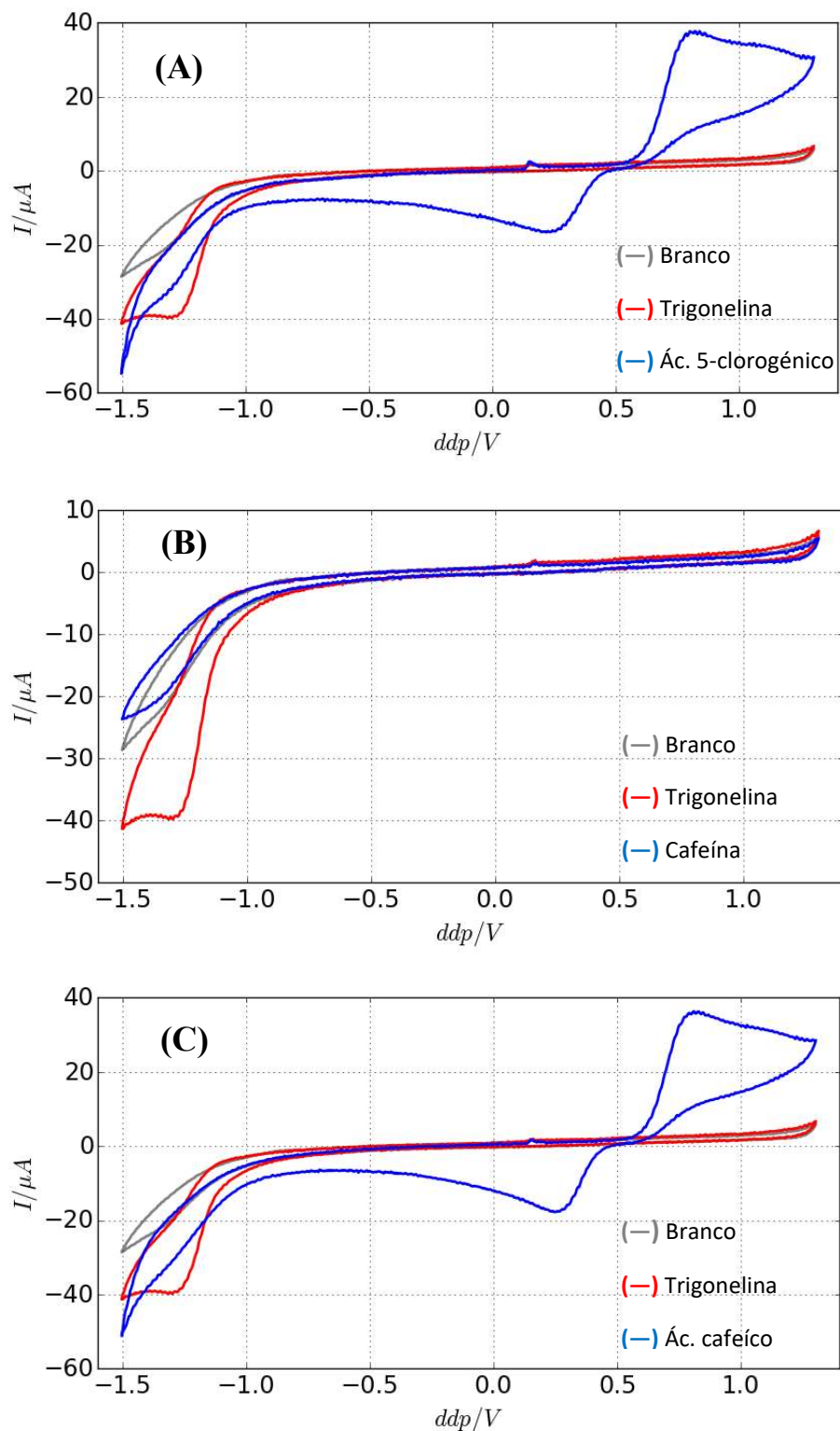


Figura 24 – Comparação dos voltamogramas cíclicos de solução padrão de trigonelina com o sinal do branco e soluções padrão de: (A) $[\text{ácido 5-clorogénico}] = 4,6 \text{ mmol dm}^{-3}$; (B) $[\text{cafeína}] = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ e (C) $[\text{ácido cafeico}] = 1,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Solução de branco: mistura de NaCl $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ com HCl $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ a pH igual a 2

3.1.2 Deteção amperométrica acoplada ao sistema de fluxo

O sinal analítico da trigonelina foi também estudado num sistema de fluxo monocanal para avaliar a estabilidade da resposta do detetor eletroquímico sob condições de potencial fixo a serem aplicadas durante a análise em fluxo. Para tal usou-se a deteção amperométrica acoplada ao sistema de fluxo desenvolvido, representado na Figura 17, mas sem a utilização da coluna monolítica, ou seja, como está representado na Figura 25.

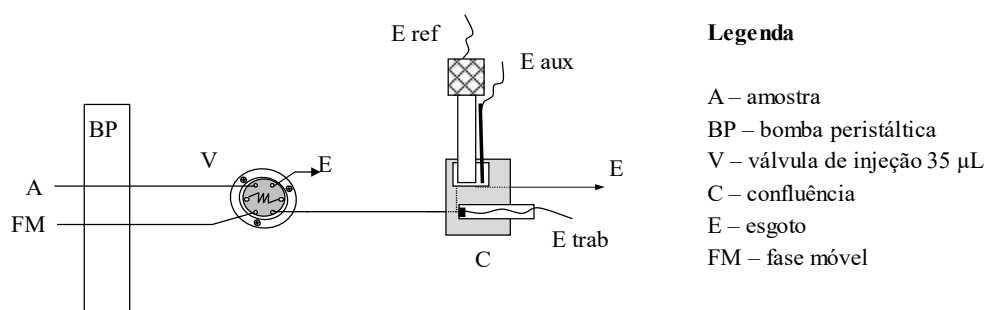


Figura 25 - Representação esquemática do sistema monocanal

Com base nos resultados anteriores, prepararam-se soluções padrão de trigonelina de concentrações 0,1; 1 e 10 mmol dm^{-3} na mistura de NaCl 0,1 mol dm^{-3} com HCl 0,01 mol dm^{-3} . A composição da solução transportadora, assinalada na Figura 25 como FM, também foi a mistura de NaCl 0,1 mol dm^{-3} com HCl 0,01 mol dm^{-3} de modo que, o sinal obtido apenas diga respeito ao analito. O potencial de elétrico de trabalho foi fixado a -1,4 V. O caudal e o volume do *loop* foram ajustados a 0,5 mL min^{-1} e 34 μL , respetivamente.

3.1.2.1 Amperometria DC

Injeções consecutivas de soluções padrão de trigonelina com deteção amperométrica DC resultaram em sinal decrescente, chegando esse sinal a desaparecer nas últimas injeções. Assim, surge a necessidade de um passo de condicionamento do elétrico de trabalho no final de cada medição. A limitação associada a este modo de deteção está na estabilidade do sinal que por sua vez

depende das condições da superfície do eletrodo. Para ultrapassar esta limitação recorreu-se à amperometria MPA.

3.1.2.2 Amperometria MPA

Dois valores de potencial diferentes foram então aplicados ao eletrodo de trabalho, o potencial E_1 onde ocorre redução da trigonelina e o potencial E_2 visando o condicionamento do eletrodo. Assim, fez-se um estudo com o objetivo de selecionar o melhor tempo de aplicação do pulso de potencial de redução. Fixou-se o potencial de redução E_1 obtido por VC e variou-se o tempo de aplicação, t_1 para valores no intervalo de 0,03 s a 0,2 s. Para o potencial de condicionamento, E_2 , estudou-se o melhor valor para o potencial num intervalo de 0,0 V a 1,5 V e, de forma análoga ao anterior, para o tempo num intervalo de 0,1 s a 0,2 s (resultados não mostrados). Estes ensaios foram realizados alterando-se uma variável de cada vez mantendo todas as outras constantes. Os valores obtidos estão representados na Tabela 15.

Tabela 15 - Estudo dos tempos de pulso de E_1 e E_2 e do potencial de condicionamento E_2

Tempos e potenciais de trabalho e condicionamento		
Para potencial de trabalho fixo E_1		
Parâmetro	Intervalo estudado	Valor selecionado
E_1 / V	Obtido em VC	-1,4
t_1 / s	0,03 – 0,2	0,03
Para potencial de condicionamento E_2		
Parâmetro	Intervalo estudado	Valor selecionado
E_2 / V	0,00 – 1,50	1,0
t_2 / s	0,1 – 0,2	0,1

Verificou-se que aquando de injeções sucessivas de soluções padrão de trigonelina a diferentes concentrações, se a superfície do eletrodo for mantida limpa e eletroquimicamente ativa durante a análise, a resposta é estável, repetível e reprodutível na gama linear de trabalho.

As condições experimentais para obter um sinal analítico para a trigonelina, usando um eletrodo BDD, foram semelhantes às observadas por Santos & Rangel, 2015, em termos de eletrólito de suporte e condições eletroquímicas de potencial-tempo para a determinação da niacina [13]. Isto deve-se à semelhança da estrutura química entre a trigonelina e a niacina.

3.1.2.3 Sistema de fluxo para estudo da solução de ajuste de força iónica ISA

O ajuste em termos de força iónica e pH foi feito usando o sistema de fluxo desenvolvido, representado na Figura 17, mas sem a utilização da coluna monolítica, ou seja, como está representado na Figura 26. Prepararam-se quatro soluções de HCl ($0,10 \text{ mol dm}^{-3}$; $0,50 \text{ mol dm}^{-3}$; $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$ e $2,0 \text{ mol dm}^{-3}$) e soluções padrão de trigonelina com concentrações na gama de $0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$ a $1,00 \text{ mmol dm}^{-3}$. A solução transportadora, representada na Figura 26 por FM, foi a água.

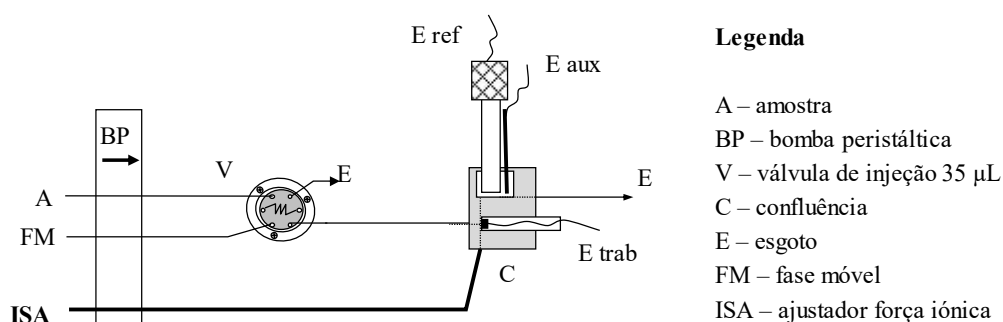


Figura 26 - Representação esquemática do sistema analítico desenvolvido sem coluna monolítica

Os resultados obtidos para cada um dos ensaios realizados estão resumidos na Tabela 16.

Tabela 16 - Otimização da solução ajustadora de força iónica e pH

trigonelina / mmol dm^{-3}	HCl / mol dm^{-3}							
	0,1	0,5	0,5	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0
	$i / \mu\text{A}$	$i / \mu\text{A}$	$i / \mu\text{A}$	$i / \mu\text{A}$	$i / \mu\text{A}$	$i / \mu\text{A}$	$i / \mu\text{A}$	$i / \mu\text{A}$
0,05	3,6	---	5,6	7,5	6,5	6,7	6,0	6,6
0,10	5,8	9,97	10,2	12,4	12,3	14,1	13,5	11,8
0,30	12,1	21,2	20,9	25,8	24,5	27,5	24,2	22,3
0,60	18,1	31,3	32,1	38,9	38,2	39,9	37,2	33,1
1,00	22,8	39,6	43,0	53,2	51,8	54,0	49,1	43,1

i — Intensidade da corrente

As curvas de calibração da trigonelina realizadas neste estudo estão apresentadas na Figura 27. A solução ajustadora de força iónica selecionada foi a de HCl $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$, pois a curva de calibração obtida nestas condições apresenta uma maior sensibilidade. Na Figura 28 está representado um fiagrama referente à curva de

calibração da trigonelina obtida com soluções padrão de trigonelina e a solução de HCl $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$.

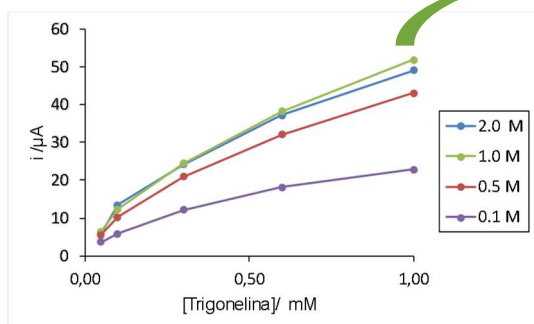


Figura 27 - Curvas de calibração da trigonelina para concentrações 0,05; 0,10; 0,30; 0,60 e $1,00 \text{ mmol dm}^{-3}$ em soluções HCl concentrações 0,1; 0,5; 1,0 e $2,0 \text{ mol dm}^{-3}$

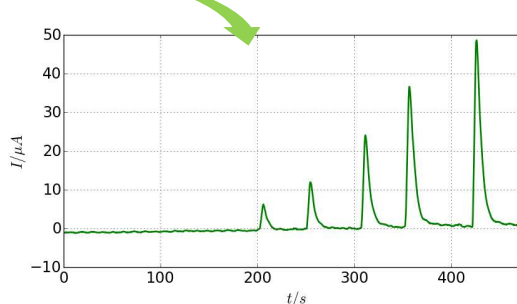


Figura 28 - Diagrama da curva de calibração da trigonelina para concentrações 0,05; 0,10; 0,30; 0,60 e $1,00 \text{ mmol dm}^{-3}$ com $[\text{HCl}] = 1,0 \text{ mol dm}^{-3}$

Na Tabela 17 pode-se ver um resumo das condições experimentais selecionadas com os estudos de otimização em MPA/FIA.

Tabela 17 – Resumo dos parâmetros experimentais otimizados em MPA/FIA

Parâmetros	Valor selecionado
Potencial de condicionamento E_2	1,0 V
Tempos dos potenciais t_1 e t_2	0,03 s e 0,1 s
Solução ajustadora de força iónica e pH	HCl $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$
Caudal da solução ajustadora de força iónica	$0,14 \text{ mL min}^{-1}$
Solução transportadora (FM)	água
Caudal da solução transportadora	$0,71 \text{ mL min}^{-1}$

Esta configuração do sistema de fluxo visou realizar o ajuste da composição de eluição em termos de força iónica e pH, a fim de aumentar a sensibilidade do eletrodo de trabalho sem aumento significativo de dispersão. As taxas de fluxo selecionadas foram $0,14$ e $0,71 \text{ mL min}^{-1}$ para solução ajustadora de força iónica e solução transportadora, respetivamente, que incorporam coeficientes de dispersão semelhantes a resultados anteriores [13]. A solução ajustadora de força iónica selecionada foi HCl $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$ (usada nos ensaios seguintes) e a transportadora (futura fase móvel) foi a água. Sob as condições experimentais agora referidas, a análise eletroquímica na superfície do eletrodo de trabalho ocorreu com força iónica de cerca de $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ (para minimizar o ruído elétrico) e pH igual 2 após observações anteriores discutidas durante ensaios de VC.

A deteção amperométrica de múltiplos pulsos acoplada a sistemas FIA para a quantificação da trigonelina apresentou boa sensibilidade, seletividade e repetibilidade

para os compostos estudados. É um método simples, rápido, necessita de etapas simples de preparação da amostra (dissoluções e diluições), usa instrumentação automatizada e versátil, tem uma menor exposição do analista, baixo custo e elevada frequência analítica.

3.2 Condições usadas no sistema FIA

Os parâmetros volume do *loop* e caudal do sistema FIA contribuem de forma significativa para a sensibilidade e para a frequência analítica da metodologia; como tal, foram avaliados para obter melhor sinal e garantir uma boa resolução do pico (resultados não mostrados). O aumento do volume do *loop* tem impacto positivo na sensibilidade e no limite de deteção, mas pode provocar fenómenos de sobrecarga que prejudicam esses dois parâmetros. O volume do *loop* utilizado foi de 34 μL em toda a fase experimental; este valor está dentro da gama analisada (11-50 μL), em trabalhos recentes, explorando variedades semelhantes [13, 87]. Verificou-se que estas condições experimentais são adequadas para este estudo.

O caudal é outra condição a ajustar experimentalmente em sistemas de análise de fluxo com o objetivo de obter um maior desempenho na taxa de análise de amostras. Em sistemas de fluxo de baixa pressão com separação cromatográfica, ajustar o valor do caudal tem as seguintes consequências:

- com caudais elevados, obtém-se maior taxa de análise de amostras, mas há o risco de provocar a rutura do sistema por aumento de pressão bem como a perda de resolução de picos;
- com caudais baixos, o risco de rutura diminui, mas aumenta o limite de deteção e obtém-se menor taxa de análise de amostras.

Para otimizar o sistema de análise e baixar o risco de rutura do mesmo, procurou-se o valor ótimo do caudal, tendo-se selecionado os valores de: 0,71 mL min^{-1} para a fase móvel e 0,14 mL min^{-1} para a solução ISA, valores que se mantiveram durante toda a fase experimental. Estes valores são semelhantes aos já experimentados em trabalhos anteriores [13, 87].

3.3 Retenção da trigonelina baseada em cromatografia de par iónico

Para estudar a retenção da trigonelina acoplou-se a coluna cromatográfica ao sistema analítico desenvolvido. Na Figura 29 apresenta-se o esquema da montagem final em (A) e a imagem do dispositivo experimental em (B) proposto para o desenvolvimento da metodologia apresentada. Avaliou-se a composição da fase móvel em termos de seleção e concentração do RPI, teor de fase orgânica e pH da fase móvel.

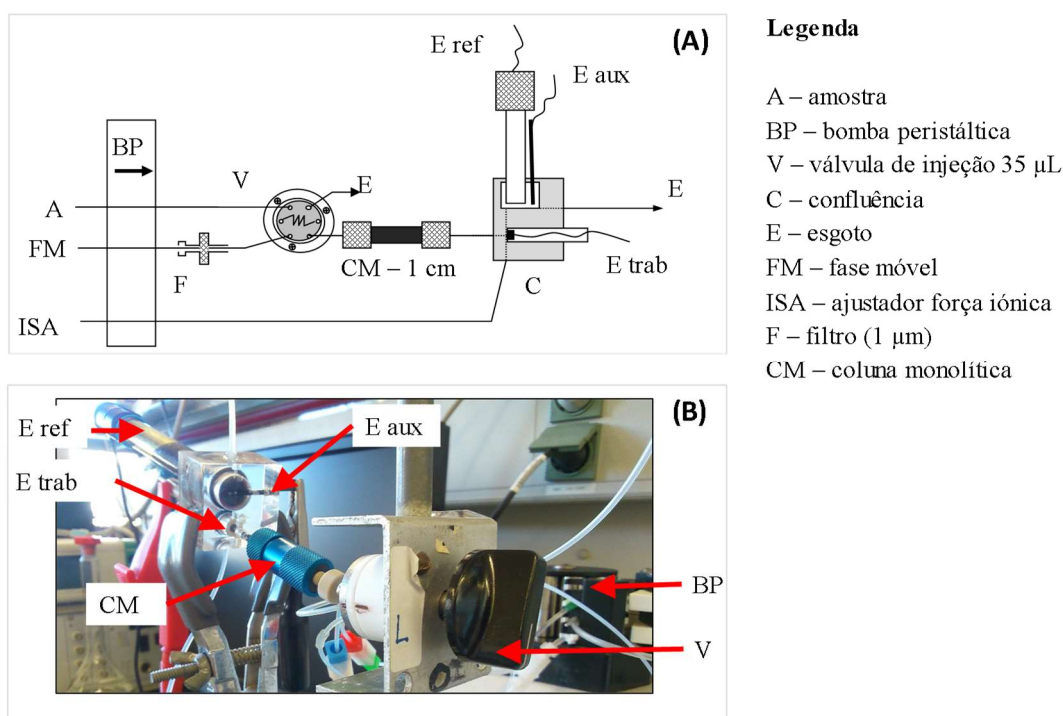


Figura 29 - Dispositivo experimental para a implementação da metodologia. (A) Esquema da montagem; (B) Imagem da montagem

O RPI avaliado em primeiro lugar foi o TBA. Prepararam-se quatro soluções aquosas de fase móvel diferentes: ACN 10% (v/v); TBA 1,0 mmol dm^{-3} , ACN 10% (v/v); TBA 10 mmol dm^{-3} , ACN 10% (v/v) e TBA 20 mmol dm^{-3} , ACN 2% (v/v). O valor de pH dessas soluções foi de 7, garantindo a desprotonação do grupo carboxílico de trigonelina. Foram injetadas soluções aquosas padrão de trigonelina e o tempo de retenção, t_R , foi de aproximadamente 30 s para todos os ensaios, como ilustrado na Tabela 18. Este valor está próximo do volume morto do sistema de fluxo, indicando que qualquer uma das fases móveis testadas não proporcionou retenção significativa de trigonelina pela fase estacionária.

Tabela 18 - Estudo de t_R de trigonelina em função da composição da fase móvel usando o TBA como RPI

[TBA]	ACN (v/v)	
	2%	10%
mmol dm ⁻³	t_R/s	t_R/s
0,0	--	29
1,0	--	29
9,0	--	29
20,0	22	--

Assim, resolveu-se experimentar um RPI alternativo, o octanossulfonato de sódio (OSS).

Neste trabalho, as soluções da fase móvel foram preparadas usando diferentes concentrações de RPI e duas fases orgânicas (acetonitrilo e metanol): os níveis de concentração de RPI ensaiados foram 1, 5, 10 e 20 mmol dm⁻³; para cada concentração de RPI referida, o conteúdo de acetonitrilo e metanol foi ajustado para 2%, 5% e 10% (v/v). As fases móveis foram aciduladas com ácido fosfórico (H₃PO₄) a 0,10% (v/v) para assegurar a protonação do grupo carboxílico da trigonelina. O valor de pH dessas soluções foi de 2.

Para todas as fases móveis testadas, observou-se, no geral, aumento do t_R para maior concentração de RPI e menor de fase orgânica conforme esperado. Ainda assim, a retenção máxima alcançada foi de cerca de 74 segundos, o que era previsivelmente insuficiente para a determinação de trigonelina na matriz do café. Estes resultados estão ilustrados na Tabela 19.

Tabela 19 - Estudo de t_R de trigonelina em função da composição da fase móvel usando OSS como RPI

[OSS]	H ₃ PO ₄ 0,10% (v/v)					
	MeOH (v/v)			ACN (v/v)		
	2%	5%	10%	2%	5%	10%
mmol dm ⁻³	t_R/s	t_R/s	t_R/s	t_R/s	t_R/s	t_R/s
0,0	30	34	31	41	35	32
1,0	71	56	43	49	47	37
5,0	49	73	53	68	65	42
10,0	56	74	65	71	69	45
20,0	55	69	67	67	63	50

Um terceiro RPI foi então ensaiado, tetradecanossulfonato de sódio (TDS). Diferentes fases móveis foram preparadas com base em diferentes concentrações de RPI e acetonitrilo como indicado na Tabela 20. As fases móveis foram novamente todas

aciduladas com H_3PO_4 a 0,1% (v/v) para assegurar a protonação do grupo carboxílico na trigonelina como mencionado anteriormente.

Tabela 20 - Estudo de t_{eq} da coluna para fases móveis que compreendem diferentes concentrações de TDS e ACN e de t_R de trigonelina em função da composição da fase móvel usando TDS como RPI

[TDS]	ACN (v/v)					
	2%		5%		10%	
mmol dm ⁻³	t_R / s	t_{eq} / min	t_R / s	t_{eq} / min	t_R / s	t_{eq} / min
0,25	220	~ 240	173	~ 140	135	~ 90
0,50	240	~ 180	183	~ 90	156	~ 70
1,00	**	**	190	~ 70	160	~ 50

** O RPI precipita dentro do sistema de fluxo; t_R tempo de retenção; t_{eq} tempo de equilíbrio da coluna

A principal diferença observada foi o aumento do t_R da trigonelina quando comparado com o obtido anteriormente para o OSS e TBA. Além disso, o t_R de trigonelina aumentou para maiores concentrações de TDS e menores concentrações de ACN na fase móvel, seguindo os resultados obtidos para o OSS. Outra observação retirada destes ensaios foi o tempo que passou para que o equilíbrio entre o surfactante e a fase estacionária fosse atingido. Com base nos resultados obtidos, outros ensaios foram realizados usando a seguinte composição de fase móvel: ACN, 10% (v/v), TDS, 0,25 mmol dm⁻³, H_3PO_4 0,10% (v/v).

3.4 Avaliação de interferentes

Aquando dos estudos em voltametria cíclica para o ácido 5-clorogénico, para a cafeína e para o ácido cafeico, na Parte Experimental, secção 3.1.1.4 verificou-se que nenhum destes compostos tinham o mesmo potencial de redução da trigonelina. Só a niacina é que apresentou um potencial de redução de -1,4 V. Apesar disso, resolveu-se confirmar que não havia problemas na separação cromatográfica com esses compostos.

Os resultados dos ensaios realizados mostraram que o ácido 5-clorogénico, a cafeína e o ácido cafeico não tiveram qualquer interferência na janela do tempo de retenção da trigonelina, como aliás seria de esperar depois dos ensaios em VC (resultados não mostrados). A niacina apresenta um pico, como ilustrado na Figura 30 (b). Na Figura 30 estão apresentados vários cromatogramas elucidativos sobre a separação do sinal da trigonelina e da niacina.

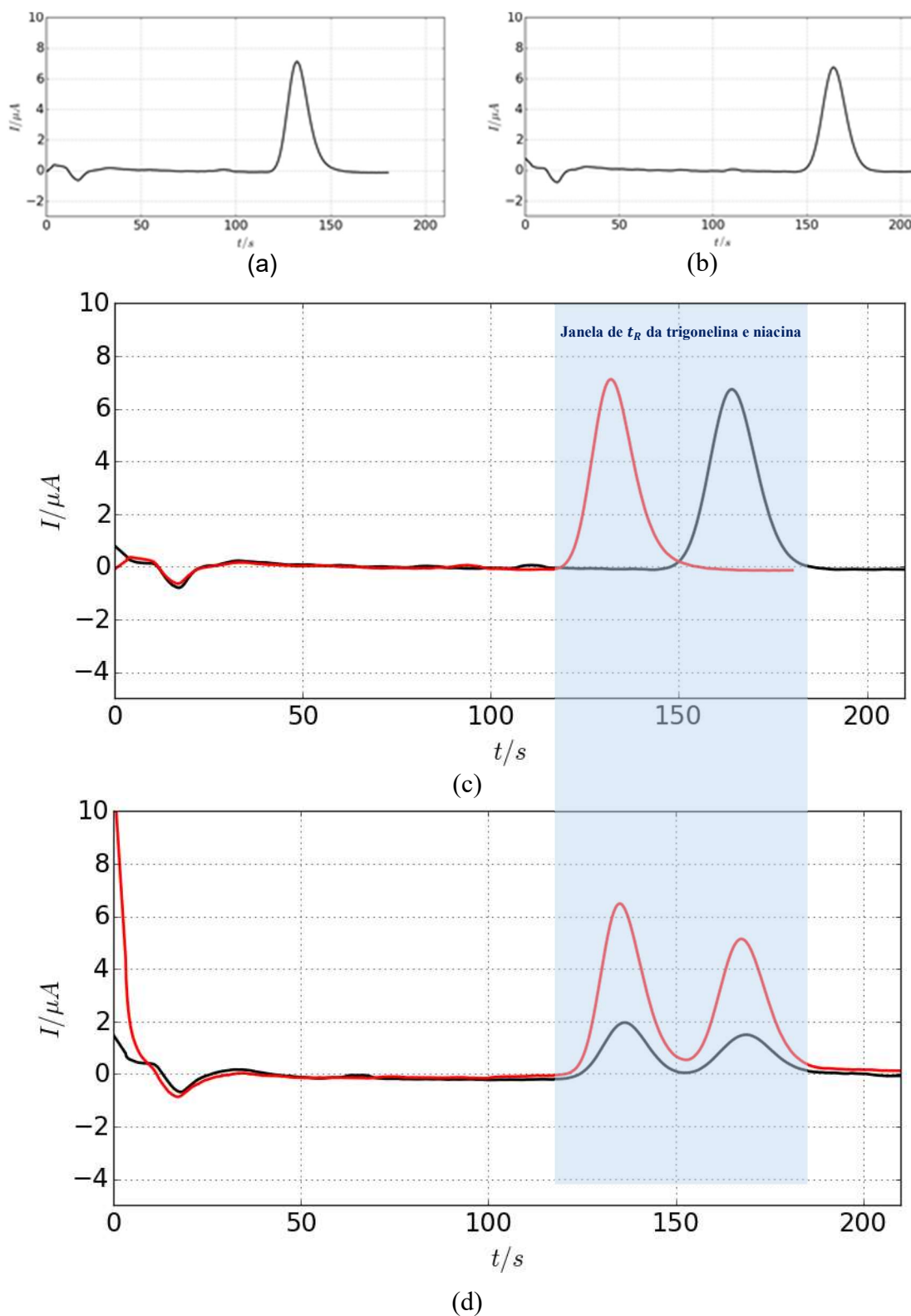


Figura 30 – Cromatogramas que evidenciam a separação do sinal da trigonelina do da niacina: **(a)** [trigonelina] = $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$; **(b)** [niacina] = $0,8 \text{ mmol dm}^{-3}$; **(c)** sobreposição de (a) e (b); **(d)** cromatogramas típicos de misturas de soluções padrão equimolares de trigonelina e niacina: (—) $c = 0,03 \text{ mmol dm}^{-3}$; (—) $c = 0,09 \text{ mmol dm}^{-3}$; fase móvel: TDS $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$; ACN 10% (v/v); H_3PO_4 0.1% (v/v)

Em (a) e (b) temos os cromatogramas individuais da trigonelina e da niacina, respetivamente, onde podemos observar os picos bem definidos. Em (c) encontramos a sobreposição dos cromatogramas (a) e (b). Da observação destes cromatogramas constata-se que na janela do t_R da trigonelina não existe sinal relevante para além do sinal da linha de base a não ser, o da niacina. A trigonelina e a niacina têm picos próximos, sendo que o da trigonelina antecede o da niacina. Nenhum dos compostos determinados causou qualquer interferência na determinação da trigonelina. Na Figura 30(d) apresentam-se cromatogramas típicos de misturas de soluções padrão equimolares de trigonelina e niacina nas mesmas condições de trabalho que os anteriores nos quais se observam dois picos correspondentes a estes dois compostos onde o pico de menor t_R em cada sinal corresponde à trigonelina.

O estudo das interferências também foi realizado em café verde e torrado para avaliar o efeito da matriz nessas amostras. As amostras de vários tipos de café foram preparadas e analisadas como mencionado anteriormente, na Parte Experimental, secção 2.3.3.

Em todos os ensaios cromatográficos foi observado o mesmo t_R e perfil do sinal para a trigonelina, nomeadamente, em soluções padrão de trigonelina e niacina, café verde e torrado e café verde e torrado enriquecido com soluções padrão de trigonelina. Foi observado a ausência de picos interferentes no t_R da trigonelina na matriz café verde e torrado. Para além disso, o sinal da trigonelina está bem resolvido nos cromatogramas de café verde e torrado, como ilustrado na Figura 31.

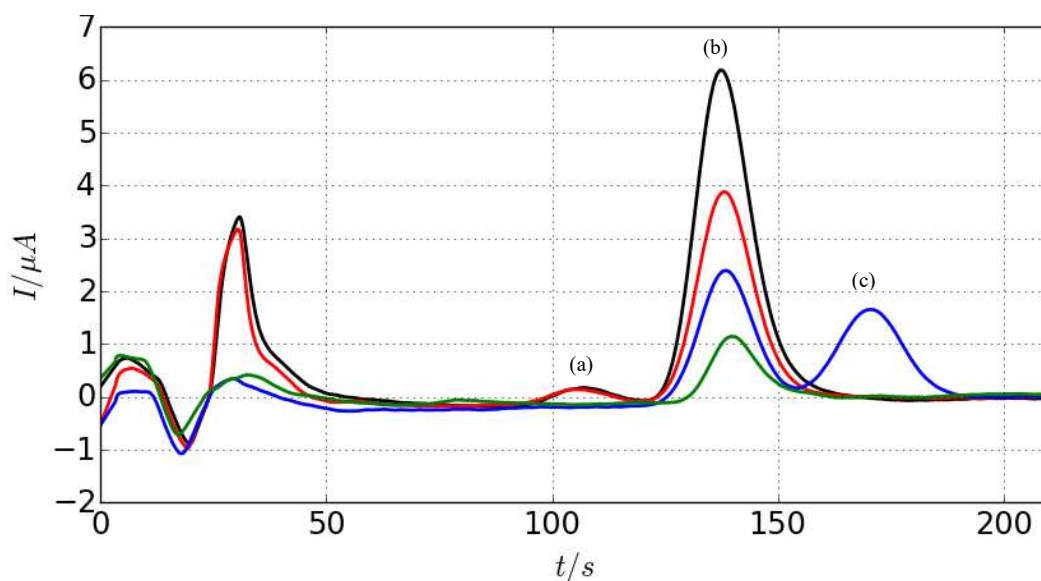


Figura 31 – Perfil cromatográfico típico para grãos de café arábica: (—) café verde moído; (—) café verde moído com $3,20 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ de trigonelina; (—) café torrado escuro enriquecido com $1,62 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ de trigonelina e $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ de niacina; (—) café torrado escuro. (a) - sinal não identificado; (b) trigonelina; (c) niacina

Uma vez que os compostos analisados não interferiram no t_R da trigonelina, podemos dizer que este estudo serviu para avaliar o grau de separação do sinal da trigonelina do da niacina, concluindo-se assim, que os sinais estão bem resolvidos.

Foi também observado um sinal adicional durante a análise das amostras de café verde que eluiu antes do sinal da trigonelina, ilustrado na Figura 31 pico (a). Embora a identificação deste composto esteja fora do âmbito deste trabalho, esta observação reforça ainda mais a potencialidade deste simples sistema analítico para determinações multiparamétricas em amostras de café moído.

3.5 Determinação de trigonelina usando a metodologia desenvolvida

Para determinar o teor de trigonelina (e niacina) em cafés, por este procedimento, é necessário realizar um estudo prévio com vista à obtenção das curvas de calibração para a trigonelina e para a niacina. Nesse sentido, uma série de ensaios foram realizados nas condições anteriormente otimizadas.

3.5.1 Curva de calibração

Após a otimização das variáveis experimentais, estudou-se para a trigonelina a relação $I = f(|trigonelina|)$, de forma a averiguar a região de linearidade para a quantificação de trigonelina, utilizando um sistema cromatográfico de baixa pressão com deteção amperométrica. Com o objetivo de se obter uma curva de calibração, realizaram-se ensaios de soluções padrão no intervalo de concentrações entre 10,0 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ e 90 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Os cromatogramas obtidos entre 0 e 210 s ilustram-se na Figura 32. A composição da fase móvel é: ACN, 10% (v/v), TDS, 0,25 mmol dm^{-3} , H_3PO_4 0,10% (v/v). A composição da solução ISA é: HCl 1,0 mol dm^{-3} . O caudal da fase móvel é 0,71 mL min^{-1} e da solução ISA é 0,14 mL min^{-1} , sendo o volume do *loop* de 34 μL .

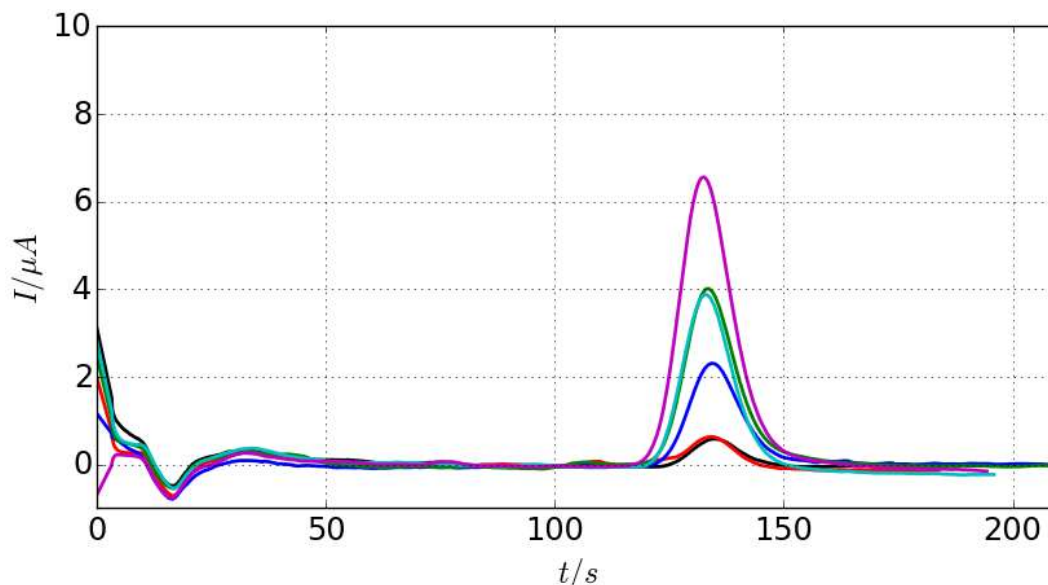


Figura 32 - Cromatogramas típicos de soluções padrão de trigonelina

Conforme seria de esperar, para cada injeção de solução padrão de trigonelina verificou-se o aparecimento de um sinal cromatográfico com o mesmo tempo de retenção, característico da trigonelina, e cuja intensidade de corrente aumentou com o aumento da concentração. Na Tabela 21 encontram-se resumidos os valores de intensidade de corrente do pico e respetivos tempos de retenção obtidos após injeção de cada solução padrão de trigonelina. A representação gráfica dos valores da intensidade de corrente de pico em função da concentração de trigonelina injetada (Figura 33) permitiu verificar que é possível estabelecer uma correlação linear entre o sinal lido e a concentração de solução padrão de trigonelina injetada. Construiu-se assim a curva de calibração, procurando-se uma regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O resultado obtido apresenta-se na Figura 33 juntamente com o diagrama de dispersão dos dados. No intervalo estudado verifica-se um excelente ajuste de regressão linear indicado pelo valor 0,999 para o coeficiente de determinação. A gama linear de concentração para a trigonelina apresenta o declive $(7,11 \pm 0,29) \times 10^{-2}$ A mol⁻¹ dm³ e a ordenada na origem tem o valor $0,19 \pm 0,15$ μA. A relação linear obtida é descrita pela equação 1 com $[trigonellina]$, em μmol dm⁻³, e I , em μA.

$$I_{(\mu A)} = 7,11 \times 10^{-2} [trigonellina]_{(\mu mol\ dm^{-3})} + 0,19 \quad (1)$$

Tabela 21 – Valores da intensidade de corrente de pico (i) e tempo de retenção (t_R) obtidos por análise de soluções padrão de trigonelina

[trigonelina] $\mu\text{mol dm}^{-3}$	i μA	t_R s
10	0,94	135,91
10	0,87	135,34
30	2,30	136,31
60	4,38	135,29
60	4,57	135,38
90	6,58	137,11

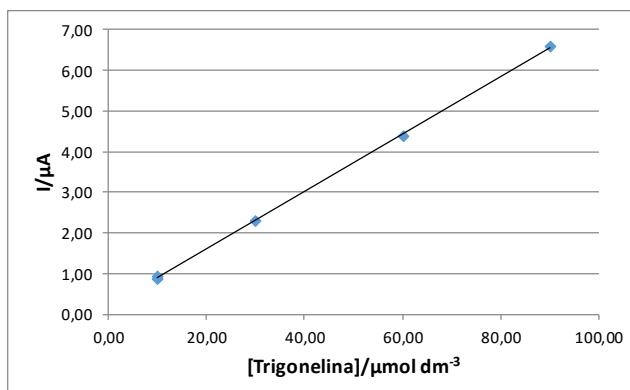


Figura 33 - Curva de calibração para a trigonelina

O limite de deteção (LOD) é $3,11 \mu\text{mol dm}^{-3}$ e o limite de quantificação (LOQ) é $10,4 \mu\text{mol dm}^{-3}$, valores calculados através das expressões apresentadas por Miller & Miller [101]. Na Tabela 22 estão resumidos todos estes valores.

Tabela 22 - Parâmetros da curva de calibração da trigonelina

Parâmetros da curva de calibração para a trigonelina*	
Coeficiente de determinação	0,999
Declive	$(7,11 \pm 0,29) \times 10^{-2} \text{ A mol}^{-1} \text{ dm}^3$
Ordenada na origem	$0,19 \pm 0,15 \mu\text{A}$
Limite de deteção	$3,11 \mu\text{mol dm}^{-3}$
Limite de quantificação	$10,4 \mu\text{mol dm}^{-3}$
Gama linear de trabalho	$10,0 \mu\text{mol dm}^{-3}$ a $90 \mu\text{mol dm}^{-3}$

* calculados segundo Miller & Miller [101]

Outro estudo similar ao efetuado para a trigonelina foi também realizado para a niacina, tendo-se para isso analisado os cromatogramas dos ensaios que se apresentam na Figura 34.

Na Tabela 23 encontram-se resumidos os valores da intensidade de corrente de pico e respetivos tempos de retenção obtidos após injeção de cada solução padrão de niacina. Conforme seria de esperar, aconteceu tudo igual aos ensaios da trigonelina exceto o tempo de retenção que é maior. A representação gráfica dos valores da intensidade de corrente de pico em função da concentração de niacina injetada (Figura 35) permitiu verificar que é possível estabelecer uma relação linear entre o sinal lido e a concentração de solução padrão de niacina injetada.

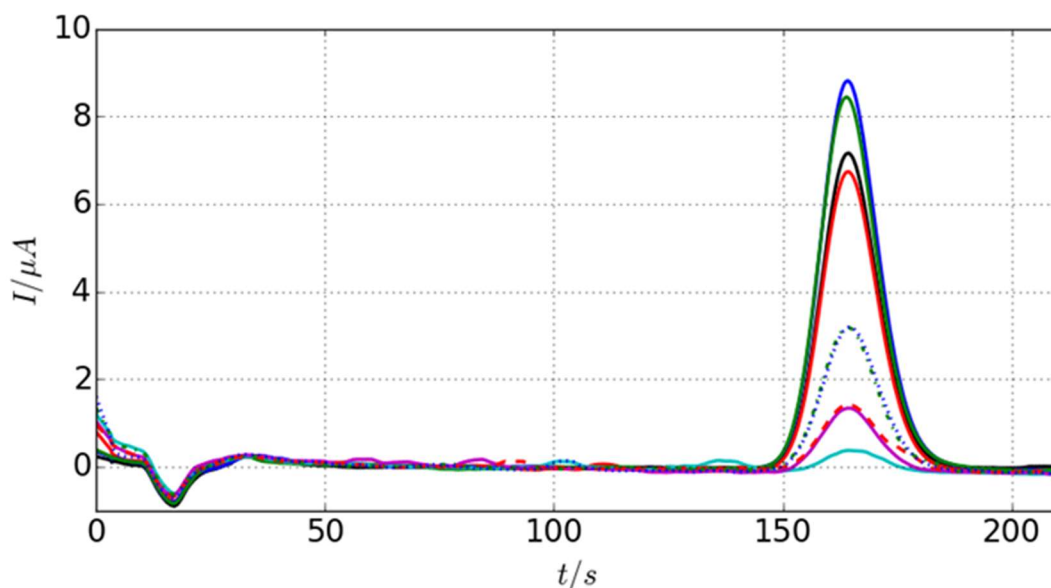


Figura 34 – Cromatogramas típicos de soluções padrão de niacina

Construiu-se a curva de calibração, procurando-se uma regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O resultado obtido apresenta-se na Figura 35. No intervalo estudado verifica-se um excelente ajuste de regressão linear indicado pelo valor 0,999 para o coeficiente de determinação. A gama linear de concentração para a niacina apresenta o declive $(6,34 \pm 0,26) \times 10^{-2} \text{ A mol}^{-1} \text{ dm}^3$ e a ordenada na origem tem o valor $-0,06 \pm 0,25 \text{ } \mu\text{A}$. O limite de deteção (LOD) é $7,97 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ e o limite de quantificação (LOQ) é $26,6 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$, valores calculados através de expressões apresentadas por Miller & Miller [101]. Na Tabela 24 estão resumidos os valores de interesse.

Tabela 23 - Valores da intensidade de corrente de pico (i) e tempo de retenção (t_R) obtidos por análise de soluções padrão de niacina

[niacina] $\mu\text{mol dm}^{-3}$	i μA	t_R s
10	0,68	164,39
30	1,74	165,36
30	1,80	165,39
60	3,72	164,29
60	3,72	165,33
120	7,86	165,17
120	7,44	165,48
150	9,56	164,99
150	9,22	165,18

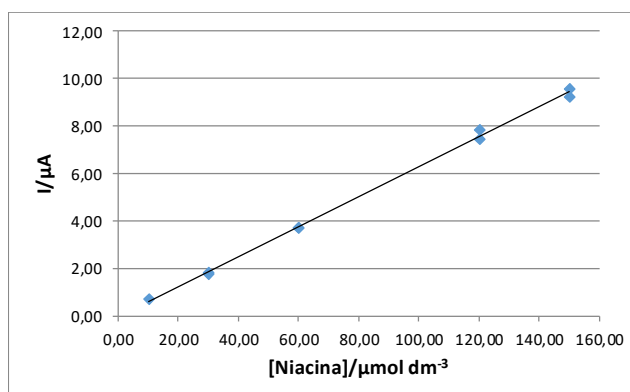


Figura 35 - Curva de calibração para a niacina

Tabela 24 - Parâmetros da curva de calibração da niacina

Parâmetros da curva de calibração da niacina [*]	
Coeficiente de determinação	0,999
Declive	$(6,34 \pm 0,26) \times 10^{-2} \text{ A mol}^{-1} \text{ dm}^3$
Ordenada na origem	$-0,06 \pm 0,25 \text{ } \mu\text{A}$
Limite de deteção	$7,97 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$
Limite de quantificação	$26,6 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$
Gama linear de trabalho	$10,0 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ a $150 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$

^{*} calculados segundo Miller & Miller [101]

3.5.1.1 Estudo da repetibilidade do sinal da trigonelina

No estudo da repetibilidade do sinal fizeram-se injeções consecutivas de solução padrão de trigonelina. A título de exemplo, apresentam-se de seguida os resultados de 5 injeções para a solução padrão de trigonelina de concentração $90 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$. Os cromatogramas obtidos para estes ensaios apresentam-se na Figura 36 e os valores associados aos picos da trigonelina em cada cromatograma estão listados na Tabela 25. Com estes valores obtêm-se coeficientes de variação (CV) muito baixos, quer para o t_R quer para a altura do pico, similares aos obtidos para a generalidade dos ensaios, onde se obtêm valores de CV para o t_R inferior a 3% e para a altura do pico inferior a 5%, (Tabela 26).

Tabela 25 – Valores da intensidade de corrente de pico e t_R para estudo da repetibilidade da trigonelina com solução padrão de $90 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$

t_R s	i μA
135,58	3,86
136,90	3,97
137,06	4,10
137,20	4,19
135,40	4,19

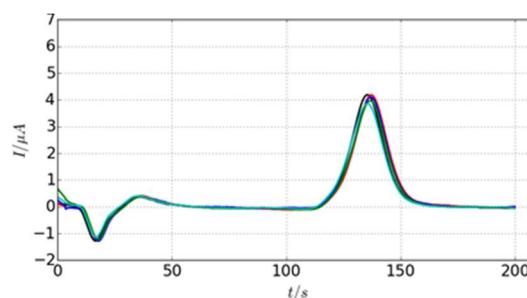


Figura 36 - Cromatogramas de injeções sucessivas, (n=5), de solução padrão de trigonelina $90 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$

Tabela 26 - Parâmetros da repetibilidade para o padrão de trigonelina

Parâmetros da repetibilidade [*]		
Coeficiente de variação ⁺ (CV)	Tempo de retenção	< 3%
	Altura do pico	< 5%

^{*} calculados segundo Miller & Miller [101] e Skoog [54]

⁺ [trigonelina] = $90 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$

Para completar estes resultados pode-se ainda realçar que, para estas condições analíticas aplicadas à determinação da trigonelina, este sistema de fluxo tem uma taxa de resíduos de ACN de cerca de 0,20 mL para um tempo de cerca de 180 s por análise, pelo que este sistema tem elevado desempenho analítico, apresentando uma taxa de 20 análises por hora.

3.5.1.2 Estudo da repetibilidade do sinal da niacina

De forma análoga fez-se este estudo da repetibilidade do sinal para a niacina em diferentes concentrações.

A título de exemplo, apresentam-se de seguida os resultados dos ensaios para a solução padrão de niacina de concentração $90 \mu\text{mol dm}^{-3}$, ($n = 2$). Os cromatogramas obtidos para os ensaios das soluções padrão de $90 \mu\text{mol dm}^{-3}$ de niacina apresentam-se na Figura 37 e os valores associados aos picos da niacina em cada cromatograma estão listados na Tabela 27. Aqui, os CV quer para o tempo de retenção quer para a intensidade de corrente de pico também são da mesma ordem de grandeza dos da trigonelina, como mostra a Tabela 28.

Tabela 27 - Valores da intensidade de corrente de pico e t_R para estudo da repetibilidade da niacina com solução padrão de $90 \mu\text{mol dm}^{-3}$

t_R s	i μA
164,56	4,50
164,56	4,74

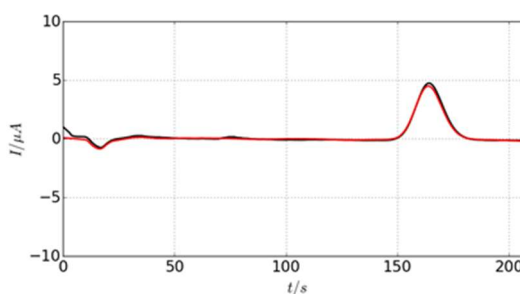


Figura 37 – Cromatogramas de injeções sucessivas, ($n=2$), de solução padrão de niacina $90 \mu\text{mol dm}^{-3}$

Tabela 28 – Parâmetros da repetibilidade para o padrão de niacina

Parâmetros da repetibilidade *		
Coeficiente de variação* (CV)	Tempo de retenção	< 3%
	Altura do pico	< 5%

* calculados segundo Miller & Miller [101] e Skoog [54]

+ [trigonelina] = $90 \mu\text{mol dm}^{-3}$

3.5.1.3 Estudo da repetibilidade do sinal para uma mistura de trigonelina e niacina

De forma análoga fez-se o estudo da repetibilidade para soluções padrão equimolares de trigonelina e niacina. De forma a ilustrar a repetibilidade deste método, para soluções padrão equimolares de mistura de trigonelina e niacina com concentração $30 \mu\text{mol dm}^{-3}$, para $n=3$, temos a Figura 38. Na Figura 39 pode-se observar os cromatogramas das soluções padrão equimolares de trigonelina e niacina de concentrações 10, 30, 60 e $90 \mu\text{mol dm}^{-3}$, ($n = 2$).

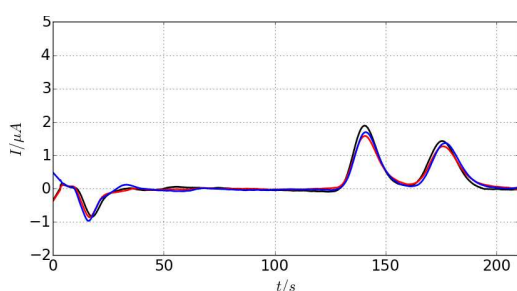


Figura 38 - Cromatogramas de injeções sucessivas, ($n=3$), com soluções padrão equimolares de trigonelina e de niacina ($30 \mu\text{mol dm}^{-3}$)

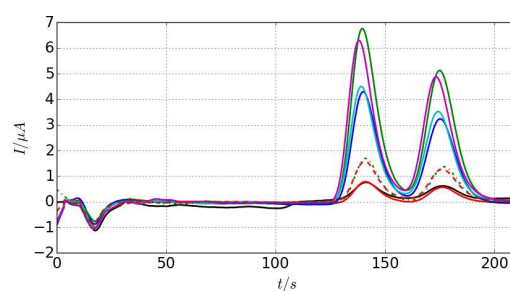


Figura 39 - Cromatogramas de injeções sucessivas, ($n=2$) para cada concentração, com soluções padrão equimolares de trigonelina e de niacina ($10, 30, 60$ e $90 \mu\text{mol dm}^{-3}$)

3.5.2 Determinação de trigonelina no café

Com base nas condições experimentais otimizadas e na linearidade obtida, entre a intensidade de corrente do pico e a concentração de trigonelina e niacina, o passo seguinte consistiu em efetuar a quantificação de trigonelina em amostras de café.

Foram avaliados dois tipos de grãos de café (verde e torrado), duas espécies diferentes (arábica e robusta), três tipos de torra (leve, médio e escuro) e duas regiões de cultivo (Brasil e Uganda). Duas amostras de café, uma da espécie arábica e outra da robusta, foram torradas, nas condições referidas na Parte Experimental, (secção 2.3.4), moídas e analisadas, através do método analítico desenvolvido, para o estudo da determinação de trigonelina em cafés verdes e torrados. Os teores de trigonelina foram obtidos a partir do método da curva de calibração.

Observa-se que os perfis cromatográficos apresentados, quer para as amostras de café arábica e de café robusta quer para uma solução padrão de trigonelina e niacina são idênticos, como se pode ver na Figura 40. Na Figura 40 (A) pode-se ver maiores teores de trigonelina para amostras arábica verde do que para amostras robusta verde.

Este resultado era esperado, uma vez que se sabe que as espécies de arábica geralmente apresentam maior conteúdo desse alcaloide. Na Figura 40 (B) constata-se a diminuição do teor de trigonelina durante o processo de torra e o aumento do teor de niacina, como era de esperar. Os valores de t_R correspondentes aos dois compostos de interesse foram identificados: trigonelina aproximadamente 135 s e niacina aproximadamente 165 s.

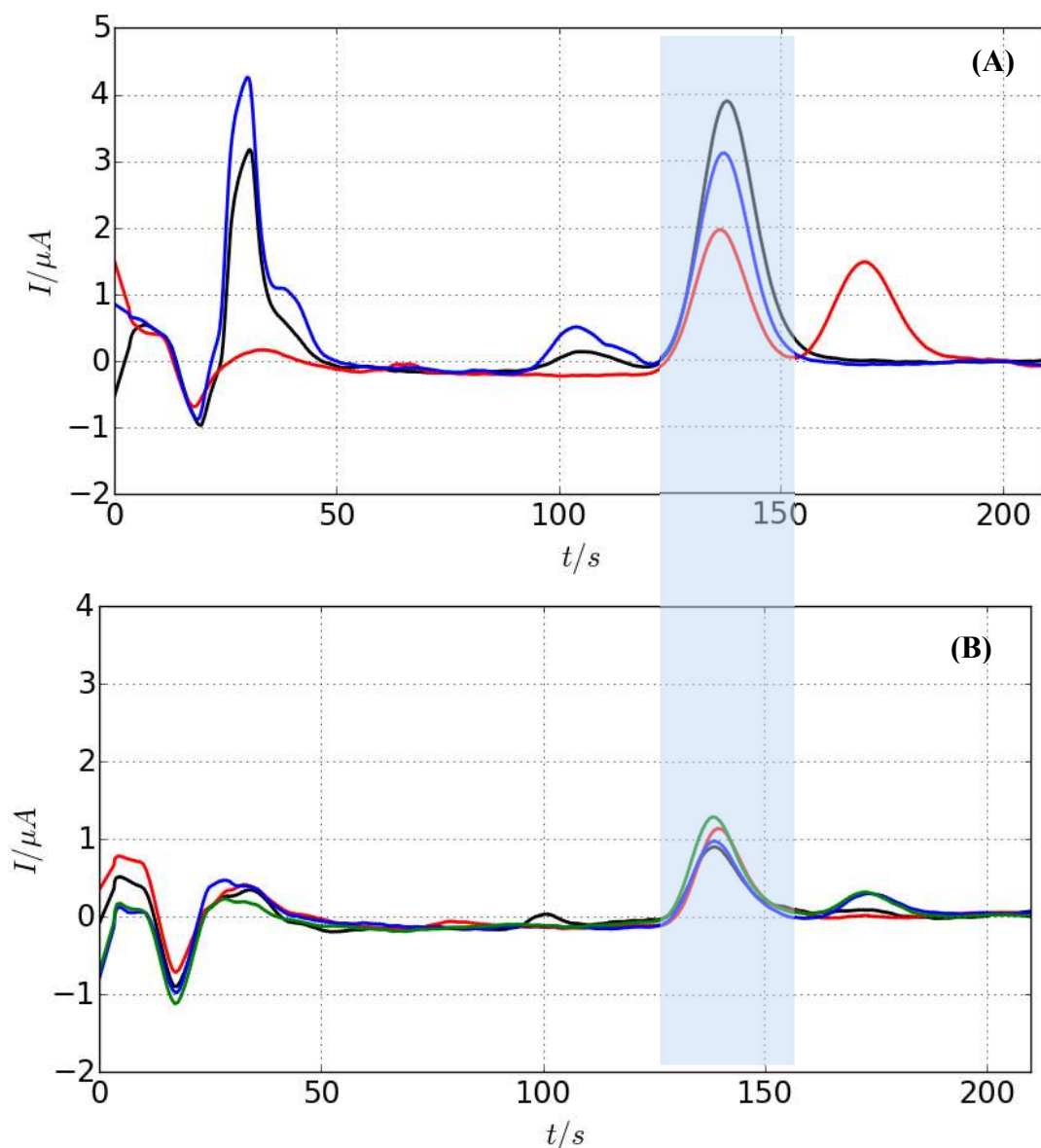


Figura 40 – Perfil cromatográfico típico para grãos de café arábica e robusta, (verde, torrado escuro e torrado escuro enriquecido com niacina) e solução padrão de trigonelina e niacina: **(A)** (—) arábica verde moído; (—) robusta verde moído; (—) solução padrão equimolar de trigonelina e niacina, $c = 30 \mu mol dm^{-3}$; **(B)** (—) café arábica torrado escuro; (—) café robusta torrado escuro; (—) café arábica torrado escuro enriquecido com $4,0 \mu mol dm^{-3}$ de niacina; (—) café robusta torrado escuro enriquecido com $4,8 \mu mol dm^{-3}$ de niacina

Os valores experimentais dos teores de trigonelina em amostras de café verde e com diversos graus de torra, das duas espécies em questão, apresentam-se na Tabela 29 e encontram-se representados na Figura 41.

Verificou-se que há medida que o grau de torra se elevou, para ambas as espécies, o teor de trigonelina diminuiu, o que significa que houve degradação térmica para este alcaloide. As torras mais acentuadas promoveram maior degradação de trigonelina, enquanto que a torra leve quase não interferiu nos teores de trigonelina. Pode-se dizer que, para além da variabilidade nos teores de trigonelina observados em cafés verdes de diferentes regiões e de diferentes espécies, a sua estabilidade foi influenciada pela temperatura, ou seja, os teores de trigonelina diminuíram com o aumento da temperatura no processo de torra. Os teores de trigonelina no café arábica e robusta variam de $(0,939 \pm 0,033$ a $0,802 \pm 0,009)$ g/100g no café verde e $(0,337 \pm 0,003$ a $0,269 \pm 0,012)$ g/100g na torra escura, como ilustrado na Tabela 29 e Figura 41.

Tabela 29 - Valores dos teores de trigonelina nas amostras de café

Amostra	Teor de trigonelina (% m/m) *	CV (%) ⁺
Arábica (Brasil)	Verde	$0,939 \pm 0,033$
	Leve	$0,958 \pm 0,023$
	Médio	$0,647 \pm 0,015$
	Escuro	$0,337 \pm 0,003$
Robusta (Uganda)	Verde	$0,802 \pm 0,009$
	Leve	$0,757 \pm 0,015$
	Médio	$0,593 \pm 0,002$
	Escuro	$0,269 \pm 0,012$

* média $\pm$ desvio padrão (valores expressos em "g de trigonelina/g de matéria seca $\times 100$ ")

⁺ coeficiente de variação para n=2

Todos os resultados observados estão dentro dos valores típicos encontrados na literatura [1, 2, 11, 18, 104]. Estas observações atestam a elevada seletividade da metodologia desenvolvida, considerando a grande mudança química da matriz do café durante o processo de torra. A viabilidade da metodologia proposta é reforçada pela sustentabilidade dos aspetos de seletividade discutidos anteriormente (Parte Experimental secção 3.5.1).

Os dados que conduziram a estes resultados estão apresentados nas tabelas A, B e C na secção Anexos.

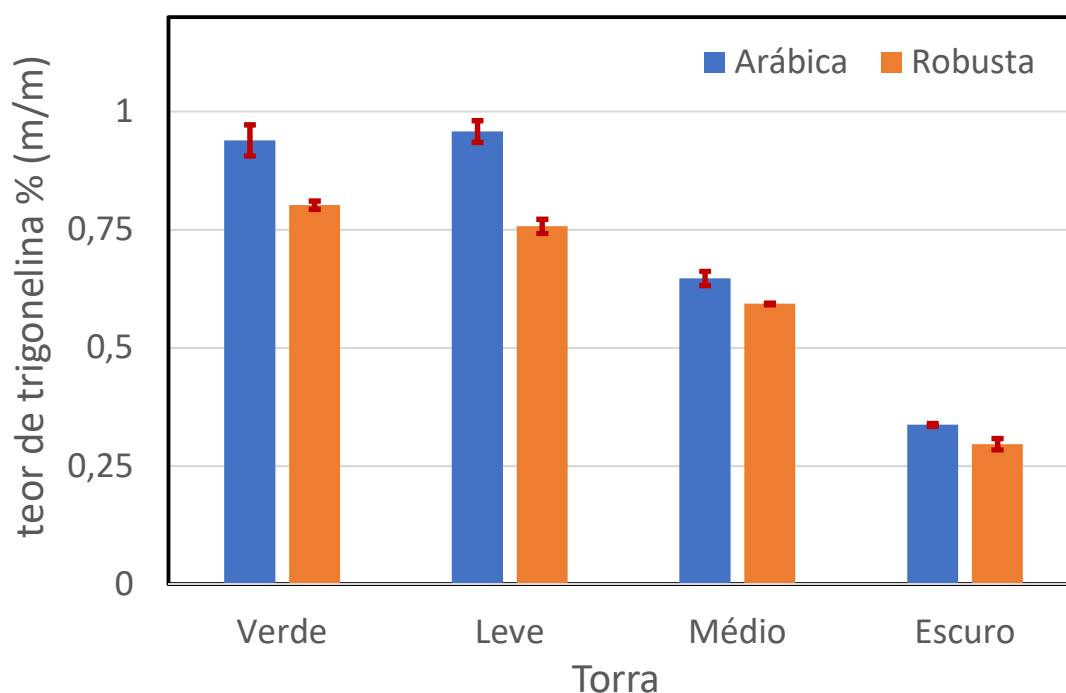


Figura 41 - Variação do teor de trigonelina durante a torra no café arábica e robusta

3.5.3 Parâmetros cromatográficos

Do ponto de vista do desempenho cromatográfico, o presente sistema de fluxo apresentou valores típicos para a assimetria e para o parâmetro H (altura dos pratos teóricos) já observados em sistemas de fluxo semelhantes, representados na Tabela 30 [87]. Comparando estes resultados com os apresentados noutro trabalho, também baseado numa variedade semelhante, mas explorando uma coluna revestida para retenção de compostos ionizáveis, verifica-se que a abordagem de cromatografia de par iónico apresentou sinais com simetria melhorada e melhor resolução para os compostos remanescentes da matriz [13]. Maior desempenho da abordagem de pares de iões em comparação com a cromatografia de fase reversa em termos de número de pratos teóricos e fator de assimetria [105].

Tabela 30 - Parâmetros cromatográficos para a trigonelina

Desempenho cromatográfico	
Assimetria	1,5
t_R (s)	135
H ($10^{-5} m^{-1}$)	1,5
Resolução (R_s) ^a	1,5

^a calculado baseado em picos adjacentes da trigonelina observados em amostras de café verde e torrado

Em relação à determinação de trigonelina por este processo, a taxa de análise e o consumo de eluente por análise foram mais atraentes em comparação com as metodologias de HPLC-DAD que apresentam períodos de análise tipicamente de 30 minutos [18, 41].

Com base nos resultados acima mencionados foram selecionadas as seguintes condições experimentais:

- medições eletroquímicas efetuadas em MPA;
- $E_1 = -1,4 \text{ V}$ (0,03s); $E_2 = 1,0 \text{ V}$ (0,1s);
- fase móvel: TDS $0,25 \text{ mol dm}^{-3}$, H_3PO_4 0,1% (v/v);
- fase orgânica: ACN 10% (v/v); solução ISA: $\text{HCl } 1,0 \text{ mol dm}^{-3}$;
- caudal fase móvel: $0,71 \text{ mL min}^{-1}$; caudal solução ISA: $0,14 \text{ mL min}^{-1}$;
- curva de calibração típica de soluções padrão de trigonelina na gama de concentrações de $10,0 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ a $90 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$;
- ensaios de repetibilidade realizados através de injeções consecutivas de solução padrão de trigonelina.

4. Conclusões

Neste trabalho determinou-se a trigonelina em cafés, verde e torrado, através de um sistema de baixa pressão com separação cromatográfica e detecção eletroquímica. Com este sistema explorou-se a cromatografia par iônico acoplada a um detetor amperométrico com um eletrodo BDD como eletrodo de trabalho. Esta estratégia analítica combina a versatilidade inerente à configuração do coletor de fluxo, com a seletividade dos diferentes reagentes de par iônico mais as potencialidades do modo de detecção eletroquímica.

O estudo por voltametria cíclica mostrou que a trigonelina é eletroativa no eletrodo BDD, apresentando um sinal de redução irreversível que aumentou com a diminuição de pH e com o aumento da velocidade de varrimento. O potencial de redução da trigonelina foi de -1,4 V em meio NaCl 0,1 mol dm⁻³ com HCl 0,01 mol dm⁻³ a pH igual a 2 e velocidade de varrimento 1,0 Vs⁻¹.

O tipo de detetor amperométrico utilizado permitiu impor ao eletrodo de trabalho dois valores diferentes de potencial sequencialmente, por períodos definidos, E₁, onde ocorre a redução, E_{red} = -1,4 V (0,03 s) e E₂ onde ocorre a limpeza eletroquímica, E_{cond} = 1,0 V (0,10 s).

A fim de aumentar a sensibilidade do eletrodo de trabalho sem aumentar a dispersão fez-se o ajuste da composição do eluato em termos de força iônica e pH. Um aumento de sensibilidade foi observado para soluções ISA de HCl até 1,0 mol dm⁻³, selecionando-se a de HCl 1,0 mol dm⁻³.

A estratégia de cromatografia de par iônico em sistemas de fluxo de baixa pressão mostrou que o RPI que apresentou melhores condições na separação de trigonelina foi o tetradecanossulfonato de sódio (TDS). A composição da fase móvel utilizada foi ACN 10% (v/v), TDS 0,25 mmol dm⁻³ e H₃PO₄ 0,10% (v/v).

A quantificação da trigonelina foi feita através do método da curva de calibração. O limite de detecção (LOD) foi de 3,11 µmol dm⁻³ e o limite de quantificação (LOQ) foi de 10,4 µmol dm⁻³. Na gama linear de trabalho 10,0 µmol dm⁻³ a 90 µmol dm⁻³ o valor do coeficiente de determinação foi de 0,999. O tempo de retenção para a trigonelina foi de 135 s.

A niacina também foi estudada para se verificar se o t_R da niacina interferia com o t_R da trigonelina. Concluiu-se que não há interferência porque o sinal da niacina aparece aos 165 s.

Determinou-se o teor de trigonelina em amostras de café arábica e robusta e verificou-se que o café arábica verde possui maior teor de trigonelina, $0,939 \pm 0,033$ %m/m, do que o café robusta verde, $0,802 \pm 0,009$ %m/m. Também se pode verificar que o teor de trigonelina diminui com o grau de torra, quer no arábica quer no robusta.

Do ponto de vista do caso de estudo, pode-se concluir que o método desenvolvido nesta dissertação é adequado e poderá, em alguns casos, substituir o método de HPLC com economia de reagentes e de equipamento, além de menor tempo de análise (~ 20 injeções h^{-1}), menor custo por análise e elevada precisão. Além disso, os resultados obtidos por HPLC são semelhantes.

O procedimento proposto pode ser estendido a outras amostras com compostos eletroativos que possuam comportamentos eletroquímicos semelhantes à trigonelina e à niacina com elevada probabilidade de sucesso.

Referências

- [1] A. W. Smith, R. J. Clarke e R. Macrae, *Coffee: Chemistry*, vol. 1, London, 1987.
- [2] C. Campa, J. F. Ballester, S. Doulebeau, S. Dussert, S. Hamon e M. Noirot, "Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species," *Food Chemistry*, vol. 88, pp. 39-43, 2004.
- [3] A. S. Franca, L. S. Oliveira, J. C. Mendonça e X. A. Silva, "Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans," *Food Chemistry*, vol. 90, pp. 89-94, 2005.
- [4] G. del Campo, I. Berregi, R. Caracena e J. Zuriarrain, "Quantitative determination of caffeine, formic acid, trigonelline and 5-(hydroxymethyl)furfural in soluble coffees by ¹H NMR spectrometry," *Talanta*, vol. 81, pp. 367-371, 2010.
- [5] G. S. Duarte, A. A. Pereira e A. Farah, "Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods," *Food Chemistry*, vol. 118, pp. 851-855, 2010.
- [6] A. Franca, J. C. Mendonça e S. D. Oliveira, "Composition of green and roasted coffees of different cup qualities," *LWT*, vol. 38, pp. 709-715, 2005.
- [7] M. C. Monteiro e L. C. Trugo, "Determinação de compostos bioativos em amostras de café torrado," *Química Nova*, vol. 28 (4), pp. 637-641, 2005.
- [8] H. D. Belitz e W. Grosch, "Química de los alimentos," *Acribia*, 1988.
- [9] J. A. Vignoli, M. C. Viegas, D. G. Bassoli e M. T. Benassi, "Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees," *Food Research International*, 2013.
- [10] M. N. Clifford, "The Influence of Coffee Bean Maturity on the Content of Chlorogenic Acids, Caffeine and Trigonelline," *Food Chemistry*, vol. 26, pp. 59-69, 1987.
- [11] C. L. Ky, J. Louarn, S. Dussert, B. Guyot, S. Hamon e M. Noirot, "Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea Arabica* L. and *C. Canephora* P. accessions," *Food Chemistry*, vol. 75, pp. 223-230, 2001.
- [12] A. Gant e et al, *Journal of AOAC International*, vol. 98, p. nº1 98, 2015.
- [13] J. R. Santos e A. O. Rangel, "Development of a chromatographic low-pressure flow injection system using amperometric detection: Application to the analysis of niacin in coffee," *Food Chemistry*, vol. 187, pp. 152-158, 2015.
- [14] S. Oestreich-Janzen, "Chemistry of Coffee," em *Coffee: Chemistry*, vol. 1, Germany, Elsevier, 2010, pp. 1085 - 1113.
- [15] E. B. Hughes e R. F. Smith, "Soc. Chemical Industry," vol. 65, pp. 284-286, 1946.
- [16] R. C. Alves, S. Casal e B. Oliveira, "Benefícios do café na saúde: Mito ou realidade?," *Quim. Nova*, vol. 32 (8), pp. 2169-2180, 2009.
- [17] A. Illy e R. Viani, *Espresso Coffee: the Science of Quality*, 2nd ed. ed., London: Elsevier, 2005.
- [18] S. Casal, M. B. Oliveira, M. R. Alves e M. A. Ferreira, "Discriminate Analysis of Roasted Coffee Varieties for Trigonelline, Nicotinic Acid, and Caffeine Content," *Food Chem*, vol. 48, pp. 3420 - 3424, 2000.
- [19] M. J. Martín, F. Pablos e A. G. González, *Food Chem.*, vol. 66, p. 365, 1999.
- [20] M. R. Alves, S. Casal, M. B. Oliveira e M. A. Ferreira, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 80, p. 511, 2003.

- [21] M. J. Martín, F. Pablos, M. Bello e A. G. González, "Determination of trigonelline in green and roasted coffee from single column ionic chromatographh," *Fresenius J. Anal. Chem.*, vol. 357, pp. 357-358, 1997.
- [22] R. J. Clarke e O. G. Vitzthum, Edits., "Technology I: Roasting," em *Roasting, in Coffee: recent developments*, United Kingdom, Blackwell Science Ltd, 2001, pp. 90-107.
- [23] R. J. Clarke, "Roast and Ground," em *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, B. Caballero, L. Trugo e P. Fingias, Edits., London, Academic Press, 2003b, pp. 1487-1493.
- [24] R. J. Clarke e R. Macrae, "Technology," em *Roasting and Grinding, in Coffee*, vol. 2, E. A. Science, Ed., London, 1987b, pp. 73-107 Clarke, R.J., Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science, London, 73-107, 1987b..
- [25] A. Buffo and C. Cardelli-Freire, "Coffee flavour: an overview," *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 19, pp. 99-104, 4 February 2004.
- [26] M. Daglia, A. Papetti, C. Dacarro and G. Gazzani, "Isolation of an antibacterial component from roasted coffee," *J.Pharmac. Biomed. Analysis*, vol. 18, pp. 219-225, 1998.
- [27] A. Illy e R. Viani, Espresso Coffee: the chemistry of quality, London: Academic Press Limited, 1995.
- [28] L. C. Trugo and R. A. Macrae, "A Study of the Effect of Roasting on the Chlorogenic Acid Composition of Coffee Using HPLC," *Food Chem*, vol. 15, pp. 219-227, 1984b.
- [29] M. P. Purdon e D. A. McCamey, "Use of a 5-Caffeoylquinic Acid/Caffeine Ratio to Monitor the Coffee Roasting Process," *J. Food Sci*, vol. 53, pp. 1680-1683, 1987.
- [30] L. C. Trugo, R. Macrae e J. Dick, "Determination of purine alkaloids and trigonelline in instant coffee and other beverages using high performance liquid chromatography," *J. Sci. Food Agri.*, vol. 34, pp. 300-306, 1983.
- [31] P. Mazzafera, "Trigonelline in Coffee," *Phytochemistry*, vol. 30, pp. 2309-2310, 1991.
- [32] L. C. Trugo, R. Macrae e N. M. Trugo, "Determination of nicotinic acid in instant coffee using high performance liquid chromatography," *J. Micronutr. Anal.*, vol. 51, pp. 55-63, 1985-1989.
- [33] M. Daglia, M. T. Cuzzoni e C. Dacarro, "Antibacterial Activity of Coffee: Relationship between Biological Activity and Chemical Maskers," *J.Agric. Food Chem*, vol. 42, pp. 2273-2277, 1994.
- [34] L. Trugo, "An investigation of coffee roasting using high performance liquid cromatography," *Food Chem.*, vol. 19, pp. 1-9, 1986.
- [35] V. Tellstrom, K. Meyer, S. Brand, M. Becker e A. Barsch, "Coffee - What else? Characterization and authenticity assessment of Coffee by high resolution LC-MS," em *Food Metabolomics Posterbook*, Germany, 2016.
- [36] L. Zhou, A. Khalil, F. Bindler, M. Zhao, C. Marcic, S. Ennahar e E. Marchioni, "Effect of heat tratment on the content of individual phospholipids in coffee beans," *Food Chem.*, vol. 141 (4), pp. 3846-3850, 2013.
- [37] J. Makowska, D. Szczesny, A. Lichucka, A. Gieldon, L. Chmurzynski e R. Kaliszan, "Preliminary studies on trigonelline as potencial anti-Alzheimer disease agent: Determination by hydrophilic interaction liquid chromatography and modeling of interactions with beta- amyloid," *Journal of Chromatography B*, 2013.
- [38] C. A. De Maria, L. C. Trugo e R. F. Moreira, "Simultaneous determination of total chlorogenic acid, trigonelline and caffeine in green coffee samples by high performance gel filtration chromatography," *Food Chem*, vol. 52 (4), pp. 447-449, 1995.
- [39] K. Arai, H. Terashima, S.-i. Aizawa, A. Taga, A. Yamamoto, K. Tsutsumiuchi e S. Kodoma, "Simultaneous Determination of Trigonelline, Caffeine, Chlorogenic Acid and Their Related

- Compounds in Instant Coffee Samples by HPLC Using an Acidic Mobile Phase Containing Octanesulfonate," *Analytical Sciences*, vol. 31, pp. 831-835, 2015.
- [40] L. C. Trugo e R. Macrae, "Chlorogenic acid composition of instant coffees," *Analyst*, vol. 109, pp. 263-6, 1984.
- [41] S. T. Alves, R. C. Dias e M. T. Benassi, "Metodologia para análise simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogénico e cafeína em café torrado por cromatografia líquida de alta eficiência," *Química Nova*, vol. 29 (6), pp. 1164-1168, 2006.
- [42] S. Casal, M. B. Oliveira e M. A. Ferreira, "Development of an HPLC/Diode-Array Detector Method for Simultaneous Determination of Trigonelline, Nicotinic Acid and Caffeine in Coffee," *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 21 (20), pp. 3187-3195, 1998.
- [43] M. Minamisawa, S. Yoshida e N. Takai, "Determination of Biologically Active Substances in Roasted Coffee using a Diode-Array HPLC system," *Analytical Sciences*, vol. 20, pp. 325-328, 2004.
- [44] D. Perrone, C. M. Donangelo e A. Farah, "Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry," *Food Chemistry*, vol. 110, pp. 1030-1035, 2008.
- [45] M. Fernández, H. M. González-San Miguel, J. M. Estela e V. Cerdà, "Contribution of multi-commuted flow analysis combined with monolithic columns to low-pressure, high-performance chromatography," *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 28 (3), pp. 336-346, 2009.
- [46] E. P. Nesterenko, C. Guivarch, C. Duffy e B. Paull, "Separation of nucleic acid precursors on an amphoteric surfactant modified monolith using combined eluent flow, pH and concentration gradient," *J. Sep. Sci.*, vol. 30, pp. 2910-2916, 2007.
- [47] B. Paull e P. N. Nesterenko, "New possibilities in ion chromatography using porous monolithic stationary-phase media," *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 24 (4), pp. 295-303, 2005.
- [48] S. D. Chambers, K. M. Glenn e C. A. Lucy, "Developments in ion chromatography using monolithic columns," *J. Sep. Sci.*, vol. 30, pp. 1628-1645, 2007.
- [49] D. Connolly, D. Victory e B. Paull, "Rapid, low pressure, and simultaneous ion chromatography of common inorganic anions and cations on short permanently coated monolithic columns," *J. Sep. Sci.*, vol. 27, pp. 912-920, 2004.
- [50] S. Pelletier e C. A. Lucy, "Fast and high-resolution ion chromatography at high pH on short columns packed with 1,8 μ m surfactant coated silica reverse-phase particles," *Journal of Chromatography A*, vol. 1125, pp. 189-194, 2006.
- [51] D. Connolly e B. Paull, "Fast ion chromatography of common inorganic anions on a short ODS column permanently coated with didodecyldimethylammonium bromide," *Journal of Chromatography A*, vol. 953, pp. 299-303, 2002.
- [52] C. Ó. Ríordáin, P. Nesterenko e B. Paull, "Zwitterionic ion chromatography with carboxybetaine surfactant-coated particle packed and monolithic type columns," *Journal of Chromatography A*, vol. 1070, pp. 71-78, 2005.
- [53] C. Ó. Ríordáin, L. Barron, E. Nesterenko, P. N. Nesterenko e B. Paull, "Boule gradient ion chromatography using short monolithic columns modified with a long chained zwitterionic carboxybetaine surfactant," *Journal of Chromatography A*, vol. 1109, pp. 111-119, 2006.
- [54] D. A. Skoog, F. J. Holler e I. A. Nieman, *Princípios de Análise Instrumental*, 6ª ed., São Paulo: Bookman, 2007.
- [55] A. M. Brett e C. M. Brett, *Eletroquímica: Princípios, Métodos e aplicações*, Oxford University Press, 1996.

- [56] D. T. Gimenes, J. M. Freitas, R. A. Munoz e E. M. Richter, "Flow Injection Amperometric Method for Determination of Diclofenac in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Electrode," *Electroanalysis*, vol. 23 (11), pp. 2521-2525, 2011.
- [57] M. Iwaki, S. Sato, K. Takahashi e H. Sakairi, "Electrical conductivity of nitrogen and argon implanted diamond," *Nuclear Instruments and Methods*, vol. 209/210, pp. 1129-1133, 1983.
- [58] Y. V. Pleskov, A. Y. Sakharova e M. D. Krotova, "Photoelectrochemical properties of semiconductor diamond," *Electroanal. Chem.*, vol. 228, pp. 19-27, 1987.
- [59] K. Patel, K. Hashimoto e A. Fujishima, "Application of boron doped CVD diamond film to photoelectrode," *Denki Kagaku*, vol. 60, p. 659, 1992.
- [60] G. M. Swain e R. Ramesham, "The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline diamond thin-film electrodes," *Analytical Chemistry*, vol. 65 (4), pp. 345-351, 1993.
- [61] K. Pecková, J. Musilová e J. Barek, "Boron Doped Diamond Film Electrodes New Tool for Voltammetric Determination of Organic Substances," *Analytical Chemistry*, vol. 39 (3), pp. 148-172, 2009.
- [62] G. M. Swain, "Electroanalytical applications of diamond electrodes," em *Thin Film Diamond II*, vol. 77, C. E. Nebel e J. Ristein, Edits., USA, Elsevier Inc., 2004, pp. 121-148.
- [63] G. K. Budnikov, "Voltammetric detection in flow injection analysis using electrocatalytic systems," *Analytical Chemistry*, vol. 51, pp. 143-148, 1996.
- [64] I. S. Adam e A. N. Anthemidis, "Flow injection wetting-film extraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of cadmium in environmental waters," *Talanta*, vol. 77, pp. 1160-1164, 2009.
- [65] A. Y. Yashin, "A flow injection system with amperometric detection for selective determination of antioxidants in foodstuffs and drinks," *Russian Journal of General Chemistry*, vol. 78, pp. 2566-2571, 2008.
- [66] J. Ruzicka e E. H. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, vol. 78, p. 145, 1975.
- [67] J. Ruzicka e E. H. Hansen, *Flow Injection Analysis*, 2 ed., J. W. & Sons, Ed., New York, 1988, pp. 87-137.
- [68] M. R. Siddiqui, Z. A. AlOthman e N. Rahman, "Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 10, pp. 1409-1421, 2017.
- [69] W. T. Santos, E. G. Almeida, E. M. Richter, D. T. Gimenes e H. E. Ferreira, "Simultaneous flow injection analysis of paracetamol and ascorbic acid with multiple pulse amperometric detection," *Electroanalysis*, vol. 20, pp. 1878-1883, 2008.
- [70] W. Surareungchai, W. Deepunya e P. Tasakorn, "Quadruple pulsed amperometric detection for simultaneous flow injection determination of glucose and fructose," *Analytica Chimica Acta*, vol. 448, pp. 215-220, 2001.
- [71] T. J. Guedes, G. A. Andrade, A. B. Lima, R. A. Silva e W. T. Santos, "Simple and Fast Determination of Warfarin in Pharmaceutical Samples Using Boron-doped Diamond Electrode in BIA and FIA Systems with Multiple Pulse Amperometric Detection," *Electroanalysis*, vol. 29, pp. 2340-2347, 2017.
- [72] R. I. Catarino, A. C. Conceição, M. B. Q. Garcia, M. L. Gonçalves, J. L. Lima e M. M. Santos, "Flow amperometric determination of pharmaceuticals with on-line electrode surface renewal," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 33, pp. 571-580, 2003.
- [73] C. F. Lo, F. M. Filippi, D. Montaldo e F. Lanuzza, "Determination of glucose, fructose, sucrose and lactose in chocolate based matrices using HPLC with pulsed amperometric detection," *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 29, pp. 2733-2739, 2006.

- [74] C. B. Ranger, "Flow injection analysis. Principles, techniques, applications, design," *Analytical Chemistry*, vol. 53 (1), pp. 20A-32A, 1981.
- [75] R. Gloor e E. L. Johnson, "Practical aspects of reverse phase ion pair chromatography," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 15, pp. 413-423, 1977.
- [76] J. H. Knox e R. A. Hartwick, "Mechanism of ion pair liquid chromatography of amines, neutrals, zwitterions and acids using anionic hetaerons," *J. Chromatogr.*, vol. 204, pp. 3-21, 1981.
- [77] S. P. Wang e C. S. Liao, "Comparison of ion-pair chromatography and capillary zone electrophoresis for the assay of organic acids as markers of abnormal metabolism," *J. Chromatography A*, vol. 1051, pp. 213-219, 2004.
- [78] S. Eksborg e G. Schill, "Ion pair partition chromatography of organic ammonium compounds," *Anal. Chem.*, vol. 45, pp. 2092-2100, 1973.
- [79] S. Eksborg, R. Lagerstrom, R. Modin e G. Schill, "Ion pair chromatography of organic compounds," *J. Chromatogr.*, vol. 83, pp. 99-110, 1973.
- [80] K. N. Petritis, P. Chaimbault, C. Elfakir e M. Dreux, "Ion-pair reversed-phase liquid chromatography for determination of polar underivatized amino acids using perfluorinated carboxylic acids as ion pairing agent," *Chromatography A*, vol. 833, pp. 147-155, 1999.
- [81] P. Chaimbault, K. Petritis, C. Elfakir e M. Dreux, "Ion-pair chromatography on a porous graphitic carbon stationary phase for the analysis of twenty underivatized protein amino acids," *Chromatography A*, vol. 870, pp. 245-254, 2000.
- [82] S. Srijaranai, R. Burakham, R. Deming e T. Khammeng, "Simplex aptimization of ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatographic analysis of some heavy metals," *Talanta*, vol. 56, pp. 655-661, 2002.
- [83] M. T. Hearn, *Ion-pair chromatography: theory and biological and pharmaceutical applications*, New York, 1985.
- [84] R. P. Baldwin, "Electrochemical determination of carbohydrates: Enzyme electrodes and amperometric detection in liquid chromatography and capillary electrophoresis," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 19, pp. 69-81, 1999.
- [85] A. Kotani, F. Kusu e K. Takamura, "New electrochemical detection method in high-performance liquid chromatography for determining free fatty acids," *Analytica Chimica Acta*, vol. 465, pp. 199-206, 2002.
- [86] D. Satinský, P. Solich, P. Chocholous e R. Karlicek, "Monolithic columns - a new concept of separation in the sequential injection technique," *Analytica Chimica Acta*, vol. 499, pp. 205-214, 2003.
- [87] J. R. Santos e A. O. Rangel, "Development of a chromatographic low pressure flow injection system using amperometric detection: Application to the analysis of methylxanthines in coffee," *Analytica Chimica Acta*, vol. 715, pp. 57-63, 2012.
- [88] L. Svorc, *Food Chemistry*, vol. 135, pp. 1198-1204, 2012.
- [89] J. Stahlberg, *Journal of Chromatography*, vol. 356, pp. 231-245, 1986.
- [90] J. H. Luong, K. B. Male e J. D. Glennon, "Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications," *Analyst*, vol. 134, pp. 1965-1979, 2009.
- [91] A. Krakt, "Doped Diamond: A Compact Review on a New, Versatile Electrode Material," *International Journal of Electrochemical Science*, vol. 2, pp. 355-385, 2007.
- [92] M. Panizza e G. Cerisola, "Application of diamond electrodes to electrochemical processes," *Electrochimica Acta*, vol. 51, pp. 191-199, 2005.

- [93] L. Maixnerová, J. Barek e K. Pecková, "Thin-Layer and Wall-Jet Arrangement of Amperometric Detector with Boron-Doped Diamond Electrode: Comparision of Amperometric Determination of Aminobiphenyls in HPLC-ED," *Electroanalysis*, vol. 24 (3), pp. 649-658, 2012.
- [94] R. Lang, E. F. Yagar, R. Eggers e T. Hofmann, "Quantitative Investigation of Trigonelline, Nicotinic Acid and Nicotinamide in Foods, Urine and Plasma by Means of LC-MS/MS and Stable Isotope Dilution Analysis," *J. Afric. Food Chem.*, vol. 56, pp. 11114-11121, 2008.
- [95] R. H. Stadler, N. Varga, J. Hau, F. A. Vera e D. Welti, "Alkylpyridiniums. 1. Formation in Model Systems via Thermal Degradation of Trigonelline," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, pp. 1192-1199, 2002.
- [96] L. C. Mendes, H. C. Menezes, M. Aparecida e A. P. Silva, "Optimization of the roasting of robusta coffee (*C. canephora conillon*) using acceptability tests and RSM," *Food Quality and Preference*, vol. 12, pp. 153-162, 2001.
- [97] X. Wang e L.-T. Lim, "Physicochemical Characteristics of Roasted Coffee," em *Coffee in health and Disease Prevention*, 2015, pp. 247-254.
- [98] *NORMA Internacional ISO 10095 Coffee-Determination of caffeine content-Method using high-performance liquid chromatography. International Organization for Standardization, 6p.*, 1992.
- [99] *NORMA Internacional ISO 11294 Roasted ground coffee - determination of moisture content - method by determination of loss mass at 103 °C*, 1994).
- [100] *NORMA Internacional ISO 6673 Green coffee - determination of loss in mass at 105 °C*, 2003.
- [101] J. N. Miller e J. C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4 ed., P. Hall, Ed., 2000.
- [102] G. Dryhurst, "Pyridines and Pyridine Nucleotides," *ELECTROCHEMISTRY OF BIOLOGICAL MOLECULES*, pp. 473-577, 1977.
- [103] S. Kumar, P. K. Sharma, R. Dudhe e N. Kumar, "Pyridine: Potencial for biological activities," *Journal of Chronotherapy and Drug Delivery*, vol. 2 Issue 2, pp. 71-78, 2011.
- [104] F. Wei, K. Furihata, M. Koda, F. Hu, T. Miyakawa e M. Tanokura, "Roasting Process of Coffee Beans as Studied by Nuclear Magnetic Resonance: Time Course of Changes in Composition," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60 (4), pp. 1005-1012, 2012.
- [105] A. S. Amin, H. A. Dessouki e I. A. Agwa, "Ion-pairing and reversed phase liquid chromatography for the determination of three different quinolones," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 4(3), pp. 249-257, 2011.

Anexos

Dados e tratamento de dados

Anexo A - Dados obtidos dos cromatogramas de amostras de café arábica

Arábica								
Ensaio	Verde		Leve		Médio		Escuro	
	t _R s	i μA	t _R s	i μA	t _R s	i μA	t _R s	i μA
1	137,19	3,78	137,26	4,14	137,25	2,72	137,98	1,54
2	137,90	3,60	137,01	4,05	137,02	2,80	136,21	1,53
3	--	--	136,99	3,92	--	--	--	--

Anexo B – Dados obtidos dos cromatogramas de amostras de café robusta

Robusta								
Ensaio	Verde		Leve		Médio		Escuro	
	t _R s	i μA	t _R s	i μA	t _R s	i μA	t _R s	i μA
1	137,17	3,22	136,89	3,05	135,77	2,44	136,90	1,26
2	136,88	3,17	135,99	3,08	135,48	2,45	136,00	1,19
3	--	--	136,34	2,97	--	--	--	--

Anexo C – Determinação da trigonelina na solução amostra e do teor de trigonelina no café

Amostra		I ^a μA	[trigonelina] ^b μmol dm ⁻³	dms ^c (%)	Teor de trigonelina ^d (% m/m)	CV ^e (%)
Arábica (Brasil)	Verde	3,69 ± 0,13	49,2 ± 2,36	91,0	0,939 ± 0,033	3,5
	Leve	4,03 ± 0,11	54,0 ± 2,08	96,5	0,958 ± 0,023	2,4
	Médio	2,76 ± 0,06	36,1 ± 2,37	96,9	0,647 ± 0,015	2,4
	Escuro	1,54 ± 0,01	18,9 ± 2,55	97,2	0,337 ± 0,003	0,9
Robusta (Uganda)	Verde	3,20 ± 0,04	42,2 ± 2,35	91,3	0,802 ± 0,009	1,1
	Leve	3,03 ± 0,06	40,0 ± 2,04	91,6	0,757 ± 0,015	1,9
	Médio	2,45 ± 0,01	31,7 ± 2,40	92,8	0,593 ± 0,002	0,3
	Escuro	1,23 ± 0,05	14,5 ± 2,62	93,7	0,269 ± 0,012	4,3

^a média das intensidades de corrente ± desvio padrão

^b calculada pelo método da curva de calibração de equação da reta $I_{(\mu A)} = 7,11 \times 10^{-2} [\text{trigonelina}]_{(\mu\text{mol dm}^{-3})} + 0,19$ com intervalo de confiança a 95% [101]

^c determinação de matéria seca [99, 100]

^d média ± desvio padrão (valores expressos em "g de trigonelina/g de matéria seca × 100")

^e coeficiente de variação [54]

