

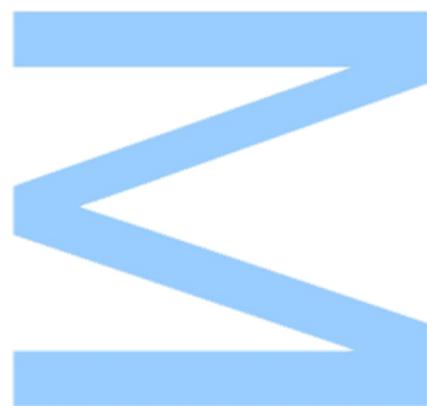
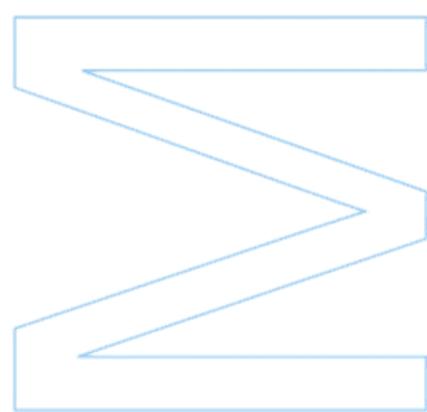
Estudo de compostos antioxidantes no café verde recorrendo a um sistema cromatográfico de baixa pressão com deteção amperométrica

Alexandra Maria Rangel Barbosa Poças
da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada à

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em Química

2020



Estudo de compostos antioxidantes no café verde recorrendo a um sistema cromatográfico de baixa pressão com deteção amperométrica

Alexandra Maria Rangel Barbosa Poças
da Silva

Mestrado em Química

Departamento de Química e Bioquímica

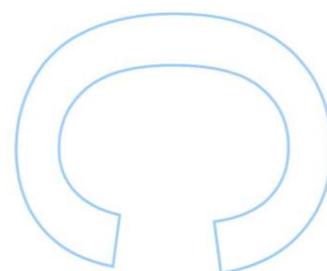
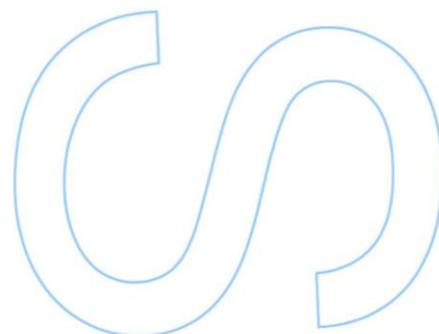
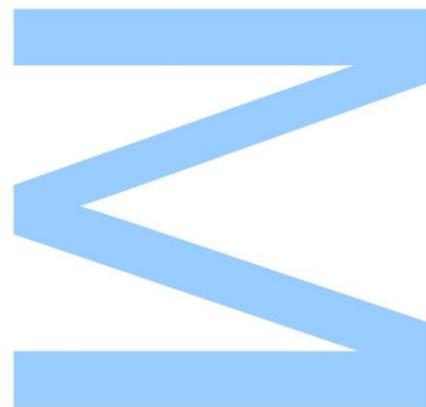
2020

Orientador

Paulo Joaquim Ferreira de Almeida, Professor Auxiliar, FCUP

Coorientador

João Rodrigo da Silva Santos, Investigador, REQUIMTE-FCUP

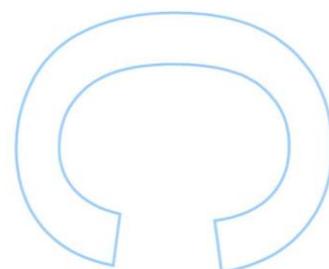
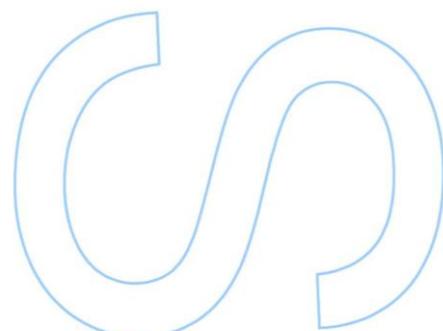
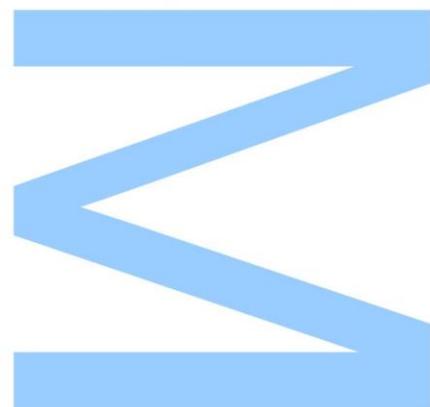




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____ / ____ / ____



Resumo

Neste trabalho realizou-se a identificação e quantificação de compostos antioxidantes no café verde com recurso a um sistema cromatográfico de baixa pressão com deteção amperométrica. O sistema de fluxo implementado foi baseado numa bomba peristáltica, uma válvula de injeção e uma coluna monolítica C₁₈ de 1 cm, de modo a conseguir a separação cromatográfica dos compostos antioxidantes. No sistema de deteção utilizou-se um elétrodo de diamante dopado com boro como elétrodo de trabalho.

Os principais objetivos foram a separação e identificação do maior número de antioxidantes presentes no café verde, recorrendo à metodologia desenvolvida, e a quantificação dos dois antioxidantes mais predominantes no mesmo, o ácido 5-cafeiolquínico (5-CQA) e a cafeína. Inicialmente, realizaram-se diferentes estudos referentes às condições de eluição e ao comportamento eletroquímico do 5-CQA e da cafeína em diferentes meios. A fase móvel selecionada neste trabalho foi preparada com 97,5% (v/v) de uma solução aquosa de ácido acético e ácido clorídrico, a pH=2,5, e 2,5% (v/v) de acetonitrilo, com um caudal de 0,71 mL·min⁻¹. A solução ajustadora de força iónica utilizada foi constituída por 1 mol·dm⁻³ de HCl, com caudal de 0,14 mL·min⁻¹. O volume de alça de injeção utilizado foi de 34 µL. A deteção amperométrica foi realizada por aplicação de um valor de diferença de potencial de +1,6 V e registo da intensidade de corrente correspondente a cada 0,1 s.

Com a metodologia adotada foi possível realizar a separação de 7 compostos antioxidantes presentes no café, tendo 6 destes sido identificados com recurso à espectrometria de massa. Os antioxidantes identificados foram a cafeína, o ácido 5-feruloilquínico e diferentes isómeros dos ácidos cafeoilquínicos (3-, 4-, 5- e *cis*-5-CQA). A quantificação do 5-CQA e da cafeína em extratos de café realizou-se com a aplicação do método da curva de calibração. Para o 5-CQA, os limites de deteção e quantificação e o coeficiente de correlação linear foram 9,25 µmol·dm⁻³, 30,8 µmol·dm⁻³ e 0,9994 respetivamente. Para a cafeína, relativamente aos mesmos parâmetros, obtiveram-se valores de 6,73 µmol·dm⁻³, 22,4 µmol·dm⁻³ e 0,9997, respetivamente.

A quantificação destes antioxidantes, em 5 diferentes amostras de café verde, permitiu a obtenção de resultados dentro do esperado, de acordo com o descrito na literatura. Os teores obtidos para o 5-CQA foram, para as amostras de café arábica, próximos de 4,5% (m/m) e, para as amostras de café robusta, próximos de 5% (m/m). Enquanto que, para a cafeína, foram próximos de 1,5% (m/m) para as amostras de café arábica e próximos a 2,5% (m/m) para as espécies de café robusta.

Palavras-chave: Cromatografia de baixa pressão; eletrodo de diamante dopado com boro; café verde; antioxidantes; ácidos clorogênicos; cafeína.

Abstract

In this paper, the identification and quantification of antioxidant compounds in green coffee was performed using a low-pressure chromatographic system with amperometric detection. The implemented flow system was based on a peristaltic pump, an injection valve and a C₁₈ monolithic column of 1 cm length, in order to achieve the chromatographic separation of antioxidant compounds. Regarding the detection system, a boron doped diamond electrode was used as working electrode.

The main aims of this paper were the separation and identification of the largest number of antioxidants present in green coffee using, for that effect, the abovementioned analytical system, and the quantification of the two most predominant antioxidant compounds, 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) and caffeine. Initially, different studies were performed referring to the elution conditions and electrochemical behavior of 5-CQA and caffeine in different medium conditions. The selected mobile phase was prepared with 97.5% (v/v) of an aqueous solution with acetic acid and hydrochloric acid, at pH=2.5, and 2.5% (v/v) of acetonitrile, with a flow of 0,71 mL·min⁻¹. The ionic strength adjustment solution was a solution of 1.0 mol·dm⁻³ hydrochloric acid, propelled at a flow rate of 0.14 mL·min⁻¹. The throughout volume was of 34 µL. The amperometric detection was performed by the application of a +1.6 V potential and recording the corresponding current intensity at every 0.1 s.

The developed methodology enabled the separation of 7 antioxidant compounds in green coffee, having 6 of these compounds been identified with mass spectra analysis. The antioxidant compounds identified were caffeine, 5-feruloylquinic acid and different isomers of caffeoylquinic acid (3-, 4-, 5- and *cis*-5-CQA). The quantification of 5-CQA and caffeine was achieved with the application of the calibration curve method, for a range of concentrations between 1x10⁻⁴ and 3x10⁻⁴ mol·dm⁻³. The detection and quantification limits and linear correlation coefficient for 5-CQA were 9.25 µmol·dm⁻³, 30.8 µmol·dm⁻³ and 0.9994, respectively. For caffeine, the same parameters were calculated, having the following values being obtained: 6.73 µmol·dm⁻³, 22.4 µmol·dm⁻³ e 0.9997, respectively.

The quantification results of these antioxidant compounds, in 5 different green coffee samples, were within the interval range described in the literature. The contents of 5-CQA were near 4.5% (w/w) for arabica coffee samples and near 5% (w/w) for robusta coffee samples. For caffeine, the contents obtained were near 1.5% (w/w) for arabica coffee samples, and near to 2.5% (w/w) to robusta coffee samples.

Keywords: Low pressure chromatography; boron doped diamond; green coffee; antioxidants; chlorogenic acids; caffeine.

Índice

Resumo -----	I
Abstract -----	III
Índice -----	V
Índice de figuras -----	VIII
Índice de tabelas -----	X
Abreviaturas e Símbolos -----	XII
1. Introdução -----	1
1.1. Generalidades sobre o café-----	1
1.2. Compostos antioxidantes no café-----	3
1.2.1. Impacto da torra na composição dos grãos de café-----	5
1.2.2. Metodologias analíticas para a determinação de antioxidantes no café verde-----	6
1.3. Cromatografia de baixa pressão com deteção eletroquímica-----	7
1.3.1. Desenvolvimento dos sistemas de fluxo, de média e baixa pressão, e das colunas cromatográficas-----	7
1.3.2. Sistemas cromatográficos de baixa pressão-----	10
1.3.3. Sistemas de cromatografia de baixa pressão com deteção eletroquímica-----	11
2. Instrumentação, reagentes e procedimento experimental -----	14
2.1. Instrumentação-----	14
2.1.1. Sistema cromatográfico de baixa pressão com deteção amperométrica-----	14
2.2. Reagentes, soluções e amostras-----	16
2.2.1. Preparação de soluções padrão-----	17
2.2.2. Preparação de soluções ISA-----	17

2.2.3. Preparação de soluções para os estudos de voltametria cíclica---	18
2.2.4. Preparação de soluções utilizadas como fase móvel -----	18
2.3. Procedimento experimental -----	19
2.3.1. Implementação e funcionamento do sistema analítico LPC-ED ---	19
2.3.2. Extração dos compostos antioxidantes dos grãos de café verde--	21
2.3.3. Identificação de antioxidantes por espectrometria de massa -----	22
3. Resultados experimentais e discussão-----	23
3.1. Resultados preliminares-----	23
3.1.1. Estudos de voltametria cíclica-----	23
3.1.2. Estudos de cromatografia de baixa pressão com deteção amperométrica-----	26
3.2. Otimização das condições de análise -----	27
3.2.1. Seleção da solução ISA-----	28
3.2.2. Otimização da composição da fase móvel-----	29
3.2.2.1. Seleção do ácido presente na fase móvel-----	29
3.2.2.2. Seleção do teor de acetonitrilo na fase móvel-----	31
3.2.3. Estudo dos potenciais aplicados ao elétrodo de trabalho para deteção amperométrica -----	33
3.3. Identificação de antioxidantes do extrato de café verde por HPLC- DAD-ESI-MS/MS -----	36
3.4. Parâmetros cromatográficos do 5-CQA e cafeína-----	37
3.5. Avaliação da seletividade do método -----	39
3.6. Quantificação dos antioxidantes 5-CQA e cafeína em extratos de café verde por LPC-ED -----	40
3.6.1. Curvas de calibração do 5-CQA e cafeína-----	40
3.6.1.1. Curva de calibração do 5-CQA-----	41
3.6.1.2. Curva de calibração da cafeína -----	43

3.6.1.3. Estudos de repetibilidade do sinal dos antioxidantes 5-CQA e cafeína 44

3.6.2. Determinação dos antioxidantes 5-CQA e cafeína no extrato de café verde 45

4. Conclusão ----- 48

5. Referências ----- 50

Índice de figuras

Figura 1 – Estrutura química do ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogénico).	4
Figura 2 - Mecanismo da reação geral de Maillard (adaptada de [20]).	5
Figura 3 - Formação de CGL a partir do ácido 3-cafeoilquínico (adaptada de [15]).	6
Figura 4 - Cronologia dos sistemas de fluxo e da cromatografia	9
Figura 5 - Classificação das técnicas eletroanalíticas.	12
Figura 6 - Esquema do sistema cromatográfico de baixa pressão com detecção amperométrica utilizado para a análise das amostras (legenda das letras na tabela 3).	14
Figura 7 - Pormenor referente à confluência e posicionamento dos elétrodos para a detecção amperométrica.	20
Figura 8 – Voltamogramas cíclicos obtidos na análise de uma solução padrão de 5-CQA, com concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, em três meios com diferentes valores de pH: (—) pH<1, (—) pH=4 e (—) pH=7.....	24
Figura 9 – Equação química que traduz a reação de oxidação do 5-CQA, proposta por [51].	24
Figura 10 - Voltamogramas cíclicos obtidos na análise de uma solução padrão de cafeína, com concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, em três meios com diferentes valores de pH: (—) pH<1, (—) pH=4 e (—) pH=7.....	25
Figura 11 – Equação química que traduz a reação de oxidação da cafeína, proposta por [52].	25
Figura 12 – Cromatogramas de um extrato de café verde, obtidos por LPC-ED, para as diferentes soluções ISA estudadas: (—) pH<1, (—) pH=4 e (—) pH=7.....	28
Figura 13 - Cromatogramas obtidos por LPC-ED, do extrato de café verde robusta de concentração 0,5 g / 100 mL, para o estudo do ácido presente na fase móvel. Constituição da fase móvel: (—) acetonitrilo 5% (v/v) e ácido fórmico $0,0265 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; (—) acetonitrilo 5% (v/v) e ácido acético $0,0265 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	30
Figura 14 - Cromatogramas obtidos no estudo da variação de ACN na fase móvel, com HCOOH ($0,0265 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Quantidade de ACN na fase móvel: (—) 5% (v/v), (—) 3% (v/v) e (—) 2% (v/v).	32

- Figura 15** – Cromatogramas obtidos no estudo da variação de ACN na fase móvel, com CH_3COOH ($0,0265 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Quantidade de ACN na fase móvel: (—) 5% (v/v), (—) 3% (v/v) e (—) 2% (v/v). 32
- Figura 16** – Cromatograma obtido por LPC-ED, para um extrato de café verde, com uma fase móvel de composição $0,0265 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ CH_3COOH e 2,5% ACN. 33
- Figura 17** - Cromatogramas obtidos por LPC-ED para: A) extrato de café verde na concentração de 0,5 g / 100 mL: B) solução modelo de 5-CQA e cafeína, ambos na concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ com a aplicação de diferentes potenciais no eletrodo de trabalho: móvel: (—) +1,6 V, (—) +1,4V, (—) +1,2 V, (—) +1,0 V e (—) +0,8 V. 35
- Figura 18** - Cromatograma obtido por HPLC-DAD-ESI-MS/MS, em modo negativo, relativamente à distribuição dos fragmentos 353 num extrato de café robusta verde. 37
- Figura 19** – Cromatogramas típicos, obtidos com a análise de soluções modelo de 5-CQA e cafeína com concentrações: (—) $3 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, (—) $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, (—) $2 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, (—) $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ e (—) $1 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 41
- Figura 20** - Curva de calibração típica obtida para o 5-CQA. 42
- Figura 21** - Curva da calibração obtida para a cafeína. 43

Índice de tabelas

Tabela 1 - Composição química, em % (m/m), de café verde e torrado das espécies arábica e robusta (adaptada de [7]).	2
Tabela 2 - Composição dos grãos de café verde arábica e robusta relativamente aos ácidos clorogénicos, seus subgrupos e respetivos isómeros (% (g de CGA / g café)) (adaptada de [19]).	4
Tabela 3 - Componentes do sistema analítico LPC-ED referentes à separação cromatográfica dos compostos antioxidantes do café.	15
Tabela 4 – Componentes do sistema analítico LPC-ED referentes à deteção amperométrica dos compostos antioxidantes do café.	15
Tabela 5 - Reagentes utilizados neste trabalho, pureza, referência e respetiva marca.	16
Tabela 6 - Soluções ISA utilizadas para ensaios de voltametria cíclica e otimização das condições de análise no decorrer dos ensaios.	18
Tabela 7 - Soluções utilizadas como fase móvel ao longo dos ensaios.	19
Tabela 8 – Condições de análise seleccionadas para realização dos ensaios voltamétricos.	23
Tabela 9 - Condições de análise utilizadas para a obtenção dos primeiros resultados de extrato de café verde no sistema LPC-ED.	27
Tabela 10 – Composição das fases móveis utilizadas para avaliar a influência do ácido adicionado à fase móvel no comportamento dos componentes presentes no extrato de café robusta verde.	30
Tabela 11 - Condições de análise para o estudo da influência da diferença de potencial aplicado no elétrodo de trabalho.	34
Tabela 12 – Fragmentos de massa obtidos após análise de um extrato de café verde por HPLC-DAD-ESI-MS/MS e correspondente proposta de identificação dos compostos.	36
Tabela 13 – Parâmetros cromatográficos para o 5-CQA e a cafeína.	38
Tabela 14 - Composição das soluções ISA e FM, condições do extrato de café e parâmetros da deteção amperométrica após otimização das condições de análise.	40

Tabela 15 - Dados, referentes ao 5-CQA, obtidos com a análise das soluções modelo preparadas (n=3).	41
Tabela 16 – Parâmetros associados à curva de calibração do 5-CQA.	42
Tabela 17 – Dados, referentes à cafeína, obtidos com a análise das soluções modelo preparadas (n=3)	43
Tabela 18 - Parâmetros associados à curva de calibração da cafeína.	44
Tabela 19 – Dados, referentes à área, altura e tempo de retenção dos sinais do 5-CQA e da cafeína, obtidos com a análise de uma solução modelo de $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, para ambos os analitos (n=5).....	44
Tabela 20 – Coeficientes de variação calculados para os parâmetros área, altura e tempo de retenção de uma solução modelo de concentração $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ de 5-CQA e cafeína (n=5).	45
Tabela 21 - Percentagem de humidade determinada para cada amostra estudada. ..	45
Tabela 22 - Valores obtidos para os teores de 5-CQA e cafeína nas diferentes amostras estudadas (n=3).....	46
Tabela 23 – Concentração de 5-CQA e cafeína num extrato de café verde robusta (Indonésia), de concentração 0,5 g / 100 mL, antes e após a adição padrão, e percentagem de recuperação registada.....	46

Abreviaturas e Símbolos

ACN	Acetonitrilo
BDD	Diamante dopado com boro
CGA	Ácido clorogénico
CQA	Ácido cafeoilquínico
diCQA	Ácido dicafeoilquínico
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
FIA	Análise por injeção em fluxo
FQA	Ácido feruloilquínico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ISA	Solução ajustadora de força iónica
LPC-ED	Cromatografia de baixa pressão com deteção amperométrica
MS	Espectrometria de massa
UV/Vis	Ultravioleta visível

1. Introdução

1.1. Generalidades sobre o café

O café foi introduzido na Europa ocidental durante o século XVII, época em que a poluição das águas desaconselhava o consumo de bebidas não alcoólicas. A preparação do café recorrendo a água fervida permitiu que esta se tornasse uma bebida alternativa ao consumo de álcool [1].

Atualmente, o café é uma bebida amplamente consumida em todo o mundo, sendo os países do norte da Europa os que lideram a lista dos maiores consumidores. Nessa lista, segundo a Organização Internacional do Café, a Finlândia é o país que apresentou, em 2016, o maior consumo de café *per capita*, 12,2 kg/ano.

As espécies e variedades de café existentes no mundo são bastante numerosas, sendo a comercialização deste bem assente essencialmente em duas espécies: *Coffea Arabica* (Arábica) e *Coffea Canephora* (Robusta), que representam ca. 64% e 35% da comercialização, respetivamente [2]. Todas as restantes e diversas espécies de café representam apenas 1% da comercialização.

O café apresenta uma composição química complexa e variável dependendo de aspetos como: espécie do café, zona geográfica de cultivo, tipo de solo e fertilização do mesmo, grau de maturação dos frutos, processo da colheita, grau de torra, entre outros [2,3]. A lista de compostos identificados já atinge os 1000 [4].

A composição química dos grãos de café influencia não só características que definem a qualidade do café em todo o mundo, nomeadamente o sabor e aroma [5], como apresenta igualmente consequências a nível da saúde. Assim, o consumo de café encontra-se associado à prevenção de doenças como: diabetes tipo 2, doença de Parkinson, doenças hepáticas e doenças cardiovasculares. Contudo, a ingestão de café tem igualmente sido associado a problemas como: ansiedade, palpitações, insónia e perda de massa óssea [6].

Os grãos de café arábica e robusta apresentam uma composição química diversificada que inclui: minerais, ácidos fenólicos, lípidos, açúcares, aminoácidos, cafeína e melanoidinas. A composição química destes grãos sofre alterações durante o processo de torra, como é possível constatar por observação dos valores presentes na Tabela 1. Os monossacarídeos, frutose e glicose, e os aminoácidos livres são os compostos cuja degradação é total quando sujeitos ao processo de torra, enquanto que outros compostos, como os oligossacarídeos e os ácidos clorogénicos, sofrem uma diminuição acentuada da sua concentração. Em contrapartida, as melanoidinas são

compostos cuja formação depende do processo de torra ao qual os grãos de café são sujeitos. Este processo também favorece o aumento da concentração de outros compostos como lípidos e proteínas. A cafeína não aparenta sofrer alterações significativas na sua concentração com o processo de torra.

Tabela 1 - Composição química, em % (m/m), de café verde e torrado das espécies arábica e robusta (adaptada de [7]).

Componentes	Arábica		Robusta	
	Café verde	Café torrado	Café verde	Café torrado
Polissacarídeos ^a	43,0 – 45,0	~ 38	46,9 – 48,3	~ 42,0
Oligossacarídeos	6,0 – 8,0	0 – 3,5	5,0 – 7,0	0 – 3,5
Frutose ^b	6,25 – 8,3	n.d.	1,3 – 4,9	n.d.
Glicose ^b	0,01 – 0,45	n.d.	0,01 – 0,5	n.d.
Lípidos	12,0 – 18,0	14,5 – 20,0	9,0 – 13,0	11,0 – 16,0
Aminoácidos livres	0 – 2,0	n.d.	0 – 2,0	n.d.
Proteínas	11,0 – 13,0	13,0 – 15,0	11,0 – 13,0	13,0 – 15,0
Ácidos clorogénicos	5,5 – 8,0	1,2 – 2,3	7,0 – 10,0	3,9 – 4,6
Cafeína	0,9 – 1,2	0,9 – 1,2	1,6 – 2,4	1,6 – 2,4
Trigonelina	1,0 – 1,2	0,5 – 1,0	0,6 – 0,8	0,3 – 0,6
Ácidos gordos	1,5 – 2,0	1,0 – 1,5	1,5 – 2,0	1,0 – 1,5
Minerais	3,0 – 4,2	3,5 – 4,5	4,0 – 4,5	4,6 – 5,6
Melanoidinas	n.d.	16,0 – 17,0	n.d.	16,0 – 17,0

n.d. – não detetado

a – Valores obtidos de [8]

b – Valores obtidos de [9]

O potássio é o mineral predominante no café, e é importante para um funcionamento normal do sistema nervoso [10]. Os ácidos fenólicos, sobretudo os ácidos cafeico e ferúlico, são muito importantes no sabor desta bebida uma vez que estes ácidos reagem com o ácido quínico existente no café, dando origem aos ácidos clorogénicos [11] que, em conjunto com a cafeína e a trigonelina, são essenciais para o desenvolvimento do sabor amargo [12,13]. Os açúcares presentes nos grãos de café verde, particularmente os açúcares redutores glicose e frutose [14], reagem com os aminoácidos durante o processo de torra dando origem a melanoidinas [15], que apresentam atividade anti-hipertensiva e anticancerígena [15], bem como a outros compostos com impacto organolético, essenciais para o aroma e sabor do café [12]. Os

lípidos de maior predominância nos grãos de café são os diterpenos cafestol e caveol, recentemente associados ao aumento de colesterol [11].

1.2. Compostos antioxidantes no café

O café é uma das maiores fontes de antioxidantes presente na alimentação humana com baixo valor calórico [6]. A variação da composição do café durante a torra dos grãos conduz também a uma variação da sua atividade antioxidante e, enquanto alguns estudos afirmam que o aumento do grau da torra do grão de café conduz à diminuição progressiva da atividade antioxidante, outros defendem que o grau de torra média é o que apresenta a maior atividade antioxidante [15].

Os compostos do café responsáveis pela atividade antioxidante são, sobretudo, os compostos fenólicos (particularmente os ácidos clorogénicos), as melanoidinas e a cafeína [16]. Estes antioxidantes estão presentes em quantidades significativas nos grãos de café. Os compostos fenólicos correspondem a ca. 10% (m/m) da massa total dos grãos de café verde [16], a cafeína constitui ca. 1% a 2% (m/m) nos grãos de café verdes e torrados [16], podendo chegar a valores superiores a 3% (m/m) [17], e as melanoidinas representam até 25% da massa total dos grãos de café torrado [16].

Ácidos clorogénicos

Os ácidos clorogénicos (CGA) são uma família de ésteres que resultam da esterificação entre o ácido quínico e alguns ácidos fenólicos, como os ácidos cafeico e ferúlico. Os principais grupos de compostos formados nesta esterificação são os ácidos cafeoilquínicos (CQA), feruloilquínicos (FQA) e dicafeoilquínicos (diCQA), existindo pelo menos três isómeros dos ácidos em cada grupo [18].

Os CGA, bem como a maior parte dos antioxidantes presentes no café, existem em maior quantidade nos grãos de café verde da espécie robusta do que nos grãos de café da espécie arábica e representam, segundo Trugo e Macrae, entre 6,9% e 8,8% da massa total nas espécies arábica e robusta, respetivamente (Tabela 2). Dos três principais subgrupos destes ácidos, os ácidos cafeoilquínicos são os mais predominantes, representando entre 5,8% e 6,8% da massa total dos grãos de café verde arábica e robusta, respetivamente.

Tabela 2 - Composição dos grãos de café verde arábica e robusta relativamente aos ácidos clorogénicos, seus subgrupos e respetivos isómeros (% (g de CGA / g café)) (adaptada de [19]).

	Arábica	Robusta
CQA	5,761	6,823
3-CQA	0,459	0,732
4-CQA^a	0,768	1,125
5-CQA	4,534	4,966
5-FQA	0,249	0,604
diCQA	0,867	1,377
3,4-diCQA	0,213	0,505
3,5-diCQA	0,495	0,461
4,5-diCQA	0,159	0,411
CGA	6,877	8,804

^a Representa 4-CQA + 3-FQA, contudo os valores de 3-FQA no café são muito baixos comparativamente a 4-CQA, logo o erro associado à medição deste último composto é reduzido.

O ácido 5-cafeoilquínico (Figura 1) é o isómero mais predominante dos ácidos clorogénicos e representa, segundo Trugo e Macrae, 66% e 56% da totalidade dos CGA nos grãos de café verde arábica e robusta, respetivamente [19], e entre 4,5% a 5% da massa total do café verde, sendo muitas vezes referido e comercializado pelos distribuidores como ácido clorogénico. Este subgrupo dos ácidos clorogénicos é também constituído por outros dois isómeros, os ácidos 3- e 4-cafeoilquínico. O ácido 5-feruloilquínico é o mais predominante de todos os ácidos feruloilquínicos presentes no café verde, sendo pouco significativa a quantidade dos outros dois isómeros presentes no café verde, os ácidos 3- e 4-feruloilquínico. Por fim, os isómeros 3,4-diCQA, 3,5-diCQA e 4,5-diCQA são os mais predominantes no café verde entre todos os isómeros dos ácidos dicafeoilquínicos, apresentando, contudo, quantidades muito inferiores às dos ácidos cafeoilquínicos.

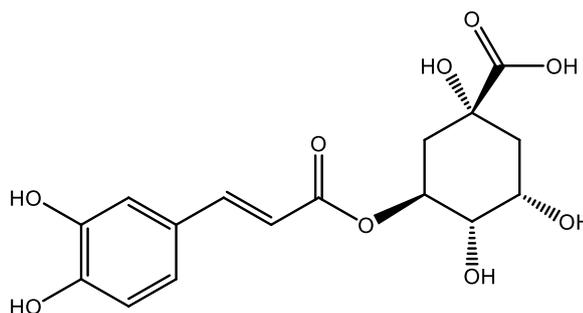


Figura 1 – Estrutura química do ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogénico).

1.2.1. Impacto da torra na composição dos grãos de café

O processo de torra é dependente de parâmetros como a temperatura e o tempo de torra, encontrando-se os procedimentos que envolvam elevada temperatura e um curto período associados a uma maior produção de compostos voláteis associados ao aroma do café [2].

Durante o processo de torra ocorrem reações responsáveis pela formação de compostos que contribuem para a qualidade do café, como é o caso das reações de Maillard, encontrando-se o mecanismo destas reações descrito na figura 2. Estas reações têm como principais reagentes os açúcares e aminoácidos existentes nos grãos de café verde que conduzem à formação de compostos alifáticos e aromáticos, que contribuem para o aroma e sabor da bebida, e de melanoidinas, um grande conjunto de compostos antioxidantes que são também responsáveis pela coloração acastanhada dos grãos após a torra [7].

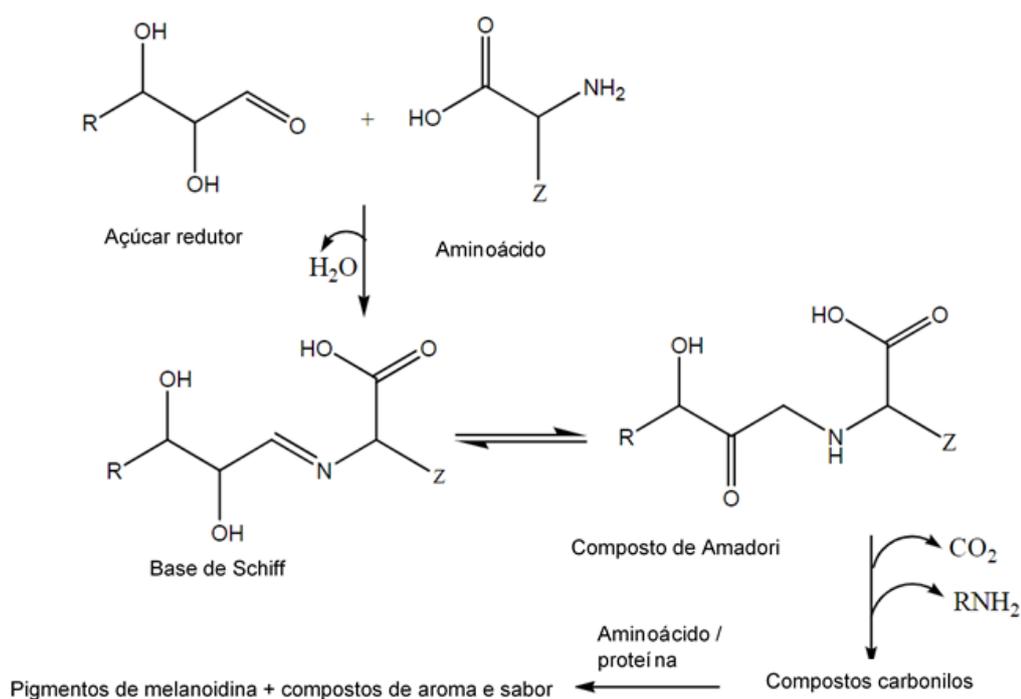


Figura 2 - Mecanismo da reação geral de Maillard (adaptada de [20]).

Estudos recentes afirmam que outros componentes no café, como os CGA, também são incluídos na formação das melanoidinas. Os CGA são os maiores constituintes dos compostos fenólicos presentes nos grãos de café verde, contudo, a sua concentração sofre uma diminuição acentuada durante o processo de torra, sobretudo, devido a reações de degradação, desidratação e ciclização a que estes ácidos estão sujeitos. A degradação dos CGA dá origem aos ácidos quínico, cafeico e

também cinâmico, sendo este último consumido em reações de formação de outros compostos com impacto organolético no café [7]. A desidratação e ciclização dos ácidos clorogénicos resultam na formação das lactonas de ácidos clorogénicos (CGL) (Figura 3), cuja quantidade formada é maior para um grau de torra médio leve [7]. Estes compostos apresentam uma quantidade reduzida no fim do processo da torra, contudo, a sua contribuição para o sabor amargo do café, e assim a qualidade do café comercializado, é significativa [13].

A cafeína, ao contrário dos compostos antioxidantes acima referidos, não sofre alterações significativas na sua concentração durante o processo da torra [16].

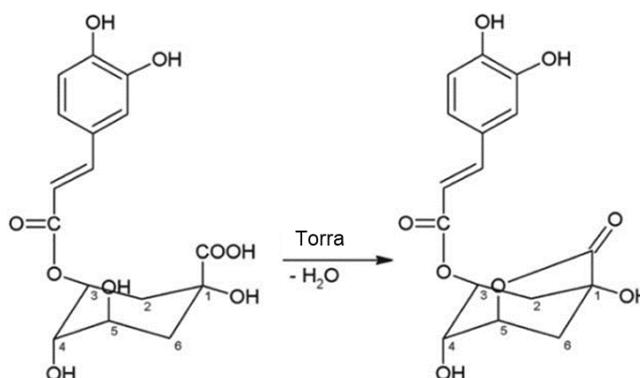


Figura 3 - Formação de CGL a partir do ácido 3-cafeoilquínico (adaptada de [15]).

1.2.2. Metodologias analíticas para a determinação de antioxidantes no café verde

O desenvolvimento de metodologias para a determinação de compostos antioxidantes no café verde é, na sua maioria, direcionado para a determinação de cafeína e dos ácidos clorogénicos, uma vez que estes representam uma elevada fração dos compostos antioxidantes presentes nos grãos de café antes da torra.

As metodologias comumente utilizadas para a determinação da cafeína e CGA nos extratos de café verde têm por base uma técnica de separação dos componentes, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), e duas técnicas para a deteção desses compostos, nomeadamente, espectrofotometria de absorção UV/Vis e espectrometria de massa (MS).

A cromatografia líquida de alta eficiência utilizada nestas metodologias baseia-se, maioritariamente, em cromatografia de fase reversa com recurso a uma coluna cromatográfica C₁₈ para separação dos diferentes componentes existentes no café verde. As condições de eluição variam consoante o estudo, sendo que os eluentes

utilizados apresentam similaridades na sua constituição: um meio aquoso, que pode conter uma pequena quantidade de ácido (por exemplo, ácido fórmico [21] ou o ácido trifluoroacético [22]), e um meio orgânico, que é habitualmente acetonitrilo ou metanol.

A espectrofotometria de absorção UV/Vis é a técnica normalmente acoplada a HPLC, uma vez que é uma técnica simples, rápida e com baixos custos associados [23] quando comparada a outras técnicas de deteção, como por exemplo, a espectrometria de massa. Apesar desta técnica possibilitar a observação dos sinais correspondentes aos diferentes compostos antioxidantes presentes no café verde separados por HPLC, não é possível atribuir a cada CGA um espectro de UV/Vis correspondente, uma vez que estes compostos apresentam espectros de UV/Vis muito semelhantes entre si [21].

A distinção dos CGA é muitas vezes realizada recorrendo à espectrometria de massa, mais especificamente, através de ionização por *electrospray* (ESI-MS). Esta técnica apresenta uma capacidade de fragmentação inferior a outras técnicas de MS, como a ionização química, o que lhe atribui a vantagem de ionizar os compostos da amostra, com fragmentação mínima das moléculas, preservando as ligações mais fracas [24]. Esta técnica de deteção permite identificar os diferentes ácidos clorogénicos anteriormente separados por cromatografia.

Estas três técnicas podem ser usadas em conjunto para um mesmo ensaio onde os compostos são separados por HPLC, detetados por espectroscopia de absorção de UV/Vis e novamente detetados por ESI-MS [21]. Contudo, devido aos custos relacionados com a técnica de fragmentação, esta é muitas vezes usada inicialmente apenas para identificação/confirmação dos compostos que são observados por UV/Vis. Após esta identificação, os restantes ensaios são realizados recorrendo apenas a HPLC com deteção UV/Vis, simplificando o processo [22].

1.3. Cromatografia de baixa pressão com deteção eletroquímica

1.3.1. Desenvolvimento dos sistemas de fluxo, de média e baixa pressão, e das colunas cromatográficas

Os sistemas de análise em fluxo de média e baixa pressão apareceram pela primeira vez em 1957 por Skeegs sob o conceito de análise em fluxo segmentado (SFA) [25]. Neste tipo de sistemas, as soluções de reagentes e a amostra eram misturadas em linha e as alíquotas dessa mistura intercaladas com bolhas de ar. Pressupunha-se, sob estas condições experimentais, o equilíbrio físico e químico antes do momento da

deteção. Este conceito representou um avanço na automação de equipamentos laboratoriais e funcionou como alavanca para o desenvolvimento posterior de novos sistemas automatizados.

O conceito de análise por injeção em fluxo (FIA) constitui o segundo desenvolvimento mais predominante no contexto de sistemas de fluxo, tendo sido descrito em 1975 [26]. A principal diferença entre os sistemas FIA e SFA é que os sistemas FIA possibilitaram a realização de análises sem necessidade de serem atingidos os equilíbrios físico e químico entre a amostra e os reagentes. O funcionamento dos sistemas FIA é bastante simples: a amostra é introduzida no sistema analítico com recurso a uma válvula de injeção e conduzida até ao detetor por uma solução transportadora sob condições de fluxo contínuo e não segmentado, tradicionalmente pela utilização de uma bomba peristáltica.

A partir do início da década de noventa, o desenvolvimento de novas estratégias na conceção de sistemas de fluxo ocorre com maior frequência, apresentando estes sistemas, mais ou menos fatores distintivos entre si, conforme se descreve sucintamente em seguida. Em 1990 ocorre o desenvolvimento dos sistemas de fluxo denominados de análise por injeção sequencial (SIA) [27]. Uma das distinções entre estes sistemas e os anteriores é a possibilidade de controle sobre a circulação do fluido em ambos os sentidos. Este tipo de sistema baseia-se na utilização de uma válvula de seleção monocanal, que permite que vários canais periféricos comuniquem entre si sequencialmente através de um canal central, sendo que cada canal periférico pode estar atribuído a diferentes equipamentos ou soluções. Em 1994 apareceram os sistemas MCFIA (análise por injeção em fluxo com multicomutação) [28] cuja principal característica é a presença de válvulas solenoides. Estas válvulas funcionam como elementos individuais de comutação permitindo, por exemplo, um menor consumo de soluções. No ano 2000, surgiram os sistemas SIA-LOV (*Lab-on-valve*) [29], baseados nos sistemas SIA. Estes sistemas têm como particularidade o uso de uma peça especificamente concebida para possibilitar a mistura de soluções e o acoplamento de detetores no seu interior. Esta peça encontra-se acoplada a uma válvula de seleção monocanal utilizada em sistemas SIA, tal como foi referido. As principais vantagens deste tipo de estratégia são o baixo consumo de reagentes e a versatilidade no acoplamento de diferentes detetores ao sistema analítico, estando inclusivamente descrita a manipulação de resinas sólidas nestes sistemas [30]. Os sistemas SIA-LOV fazem uso de seringas de pistão para a propulsão de soluções, o que nestas condições eleva este tipo de estratégia a sistemas de média pressão.

Paralelamente aos sistemas de fluxo de baixa pressão, também as colunas cromatográficas para cromatografia líquida, foram sujeitas a desenvolvimentos com o

passar das décadas, como resumido na figura 4. A primeira separação cromatográfica de que há registo data de 1901, quando Mikhail Tsvet realizou a separação de pigmentos nas plantas utilizando uma coluna de carbonato de cálcio [31]. Apenas anos mais tarde, em 1938, existe registo de um novo desenvolvimento na cromatografia com o aparecimento da cromatografia de troca iónica [32]. A partir desta data os desenvolvimentos associados às colunas cromatográficas começaram a surgir, destacando-se neste contexto o aparecimento das colunas à base de sílica em 1941 [33]. Em 1967 surgiram as colunas constituídas por partículas de diâmetro compreendido entre 40-50 μm que aumentaram significativamente a eficiência da coluna quando comparada à eficiência das colunas utilizadas até ao momento, constituídas por partículas de diâmetro superior a 100 μm [34]. Apesar das vantagens associadas à diminuição do tamanho das partículas, foram encontradas dificuldades associadas às partículas de sílica de diâmetro inferior a 40 μm , nomeadamente a reprodutibilidade de empacotamento das mesmas devido à forma irregular das mesmas. Só em 1974, com o aparecimento de partículas uniformes esféricas é que esta desvantagem foi ultrapassada [34]. O diâmetro da partícula diminuiu significativamente, sendo que em 2004 já se registava a utilização de partículas com 1,7 μm de diâmetro [34].

Em 1996 apareceram pela primeira vez as colunas monolíticas [35], tendo a comercialização destas sido iniciada em 2000. Em 2007 iniciou-se a comercialização de partículas *core-shell*, sendo que estas partículas foram desenvolvidas pela primeira vez na década de 90, mas apenas anos mais tarde é que foi possível a sua produção com tamanho reduzido, entre 1,3 - 2,7 μm [34].

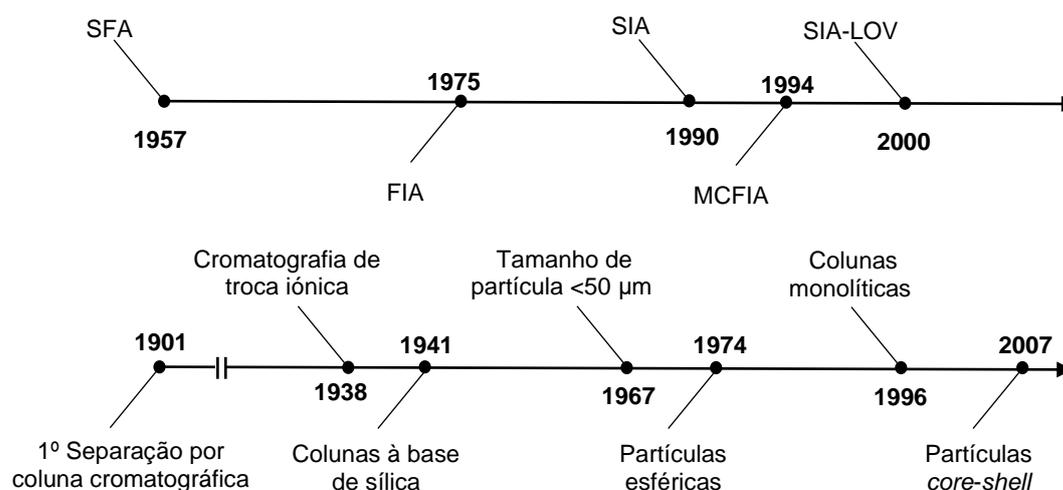


Figura 4 - Cronologia dos sistemas de fluxo e da cromatografia

O primeiro registo do acoplamento de uma coluna cromatográfica a um sistema de fluxo de baixa pressão com deteção eletroquímica data 1989 por Hart e Jordan [36]. Estes autores implementaram um sistema de fluxo baseado numa coluna de partículas de tamanho 40 μm acoplada a um sistema FIA para a separação e posterior deteção eletroquímica da vitamina A num preparado multivitamínico. O acoplamento de uma coluna monolítica a um sistema de fluxo de média pressão ocorreu em 2003, ficando a técnica descrita por SIC, cromatografia de injeção sequencial [37]. Assim, novas metodologias com base em sistemas de fluxo de baixa pressão e colunas monolíticas foram desenvolvidas até à atualidade, com diversas áreas de aplicabilidade [38].

1.3.2. Sistemas cromatográficos de baixa pressão

Tendo por base os sistemas de fluxo de média e baixa pressão desenvolvidos até à atualidade selecionaram-se os sistemas FIA para implementação da metodologia desenvolvida.

Os sistemas FIA contam com mais de 40 anos de existência e numerosas utilizações em diferentes metodologias. A preferência por estes sistemas é justificada pela simplicidade e baixos custos da instrumentação, o consumo reduzido de reagentes e amostras, a facilidade de automação e a versatilidade da técnica [39]. Esta última vantagem é essencial na escolha dos sistemas FIA uma vez que a montagem destes sistemas pode ser facilmente alterada consoante o objetivo do estudo. Uma das alterações possíveis é o acoplamento de uma coluna cromatográfica, dando assim origem aos sistemas cromatográficos de baixa pressão (LPC).

As colunas monolíticas, apesar de relativamente recentes comparativamente às colunas de partículas, apresentam melhor acoplamento a sistemas LPC, tal deve-se, sobretudo, à baixa pressão de retorno que conduz à não necessidade de bombas de média ou alta pressão. As vantagens destas colunas estendem-se ainda pela possibilidade de usar elevados caudais nas análises sem perda significativa de eficiência, contribuindo para um maior número de análises a ser realizado num menor período de tempo e para um baixo custo por análise [40].

O acoplamento de uma coluna monolítica a um sistema FIA é uma opção para o desenvolvimento de metodologias cromatográficas com menores custos que por HPLC, mas com a seletividade de análise que é pretendida na cromatografia. Contudo, também se encontram limitações associadas a esta acoplação uma vez que, apesar da pressão originada pelas colunas monolíticas ser inferior às colunas de partículas, estas precisam

de ter curto comprimento para que a pressão do sistema seja inferior à que a bomba peristáltica consegue suportar.

1.3.3. Sistemas de cromatografia de baixa pressão com detecção eletroquímica

A compatibilidade dos sistemas FIA com diferentes técnicas de detecção possibilitou o desenvolvimento de técnicas LPC com recurso a detecção eletroquímica. O artigo publicado em 1989 de Hart e Jordan, que regista a primeira acoplação bem sucedida de uma coluna cromatográfica a um sistema de fluxo de baixa pressão, é também pioneiro na utilização da detecção eletroquímica na cromatografia de baixa pressão [36]. Em 2004 foram publicados dois artigos, ambos sobre a determinação de iões em amostras de água em sistemas cromatográficos de baixa pressão, com coluna monolítica, e detecção condutimétrica [41,42]. Que se tenha conhecimento, apenas mais dois trabalhos foram publicados com base no desenvolvimento de sistemas de cromatografia de baixa pressão com detecção eletroquímica (LPC-ED), com a introdução da detecção amperométrica para a determinação de compostos presentes no café [43,44] e que serviram como base para o desenvolvimento do trabalho atual.

As técnicas eletroanalíticas existentes são numerosas e podem ser classificadas de diversas formas. Um exemplo de classificação é representado no esquema da Figura 5 [45]. A primeira distinção entre as técnicas é efetuada tendo por base as que consideram, ou não, as reações que ocorrem no elétrodo de trabalho. As técnicas condutimétricas são exemplos de técnicas que não consideram essas reações, uma vez que são utilizadas para a medição de propriedades *bulk* das amostras, que não são específicas a uma determinada reação, como a condutividade. As técnicas eletroanalíticas, que consideram as reações que ocorrem no elétrodo de trabalho, são subdivididas em três grupos, considerando a quantidade de analito que é consumida durante o estudo. Este consumo pode ser total, parcial ou inexistente, sendo que o consumo parcial representa a perda de 0,1% ou menos da quantidade total do analito. Coulometria e eletrogravimetria são exemplos de técnicas eletroanalíticas onde ocorre o consumo total do analito, enquanto que a voltametria e a amperometria são exemplos de técnicas onde apenas se observa um consumo parcial do mesmo. Técnicas como a potenciometria e a tensiometria não apresentam consumo do analito em estudo.

A voltametria engloba diferentes técnicas entre as quais, a voltametria cíclica, a amperometria de múltiplos pulsos e a amperometria de corrente direta. A voltametria cíclica é a primeira técnica habitualmente a ser utilizada quando se inicia o estudo

eletroquímico de alguma espécie, uma vez que permite estudar o comportamento do analito num intervalo considerável de potencial. A voltametria cíclica baseia-se na variação de potencial a uma velocidade constante enquanto se regista a intensidade de corrente associada a cada valor de diferença de potencial aplicado ao eléctrodo de trabalho, permitindo a obtenção do potencial de oxidação ou redução da espécie caso ele se encontre dentro do intervalo de potenciais estudados. A amperometria de múltiplos pulsos é uma técnica que permite a aplicação de diversas diferenças de potencial, que se mantêm constantes, e a medição da intensidade de corrente durante o tempo da análise permitindo a identificação de diferentes analitos eletroativos presentes em solução. Esta técnica também é muito aplicada quando existe a necessidade de condicionar ou limpar o eléctrodo de trabalho durante os ensaios, em geral pela aplicação de dois potenciais, um para a obtenção do sinal pretendido e outro para o condicionamento ou limpeza do eléctrodo [46]. A amperometria de corrente direta é outra técnica de deteção amperométrica, semelhante à amperometria de múltiplos pulsos, com a diferença que apenas permite a aplicação de uma única diferença de potencial no eléctrodo de trabalho. Esta particularidade conduz à utilização desta técnica em ensaios onde não existe necessidade de condicionar o eléctrodo de trabalho durante o decorrer da análise.

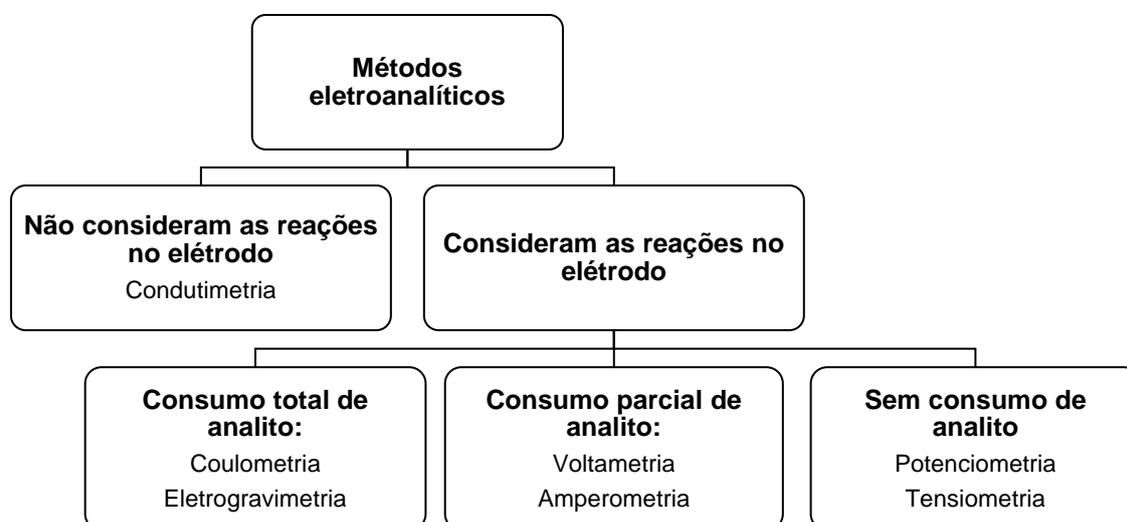


Figura 5 - Classificação das técnicas eletroanalíticas.

Estas técnicas de voltametria são realizadas com recurso a uma célula de 3 eléctrodos: eléctrodo de referência (E_{ref}), eléctrodo de trabalho (E_{trab}) e contra eléctrodo ou eléctrodo auxiliar (E_{aux}). É à superfície do eléctrodo de trabalho que ocorrem as reações de oxidação e redução das espécies em estudo presentes em solução, sendo importante a escolha do eléctrodo mais adequado para o estudo a realizar. O eléctrodo de diamante dopado com boro (BDD) é muito utilizado na deteção eletroquímica uma vez

que apresenta como principais vantagens o facto de poder ser utilizado dentro de um intervalo largo de potencial, apresentar elevada estabilidade em soluções tanto ácido como alcalinas, e ainda apresentar uma intensidade de corrente de fundo estável e baixa. De salientar igualmente, a baixa adsorção de compostos orgânicos e inorgânicos à superfície destes eléctrodos o que minimiza a necessidade de aplicar uma diferença de potencial para limpeza do eléctrodo [46].

2. Instrumentação, reagentes e procedimento experimental

2.1. Instrumentação

Para a preparação de soluções utilizou-se: uma balança analítica Mettler, AE50, para a pesagem rigorosa de massas, um banho de ultrassons Bandelin Sonorex, TK100, para homogeneização/desgaseificação de soluções, um medidor de pH Hanna Instruments, HI 2550, com um elétrodo de vidro combinado, HI1131, um sistema Millipore Direct-Q 3UV para purificação da água e uma placa de aquecimento com agitação magnética (Framo - Gerätetechnik M 21/1, 1000 rpm).

Para a medição de volumes iguais e inferiores a 1000 μL utilizaram-se micropipetas Gilson (P1000 – capacidade máxima de 1000 μL ; P200 – capacidade máxima de 200 μL). Para a medição de volumes superiores a 1,00 mL utilizou-se material de vidro aferido.

2.1.1. Sistema cromatográfico de baixa pressão com deteção amperométrica

Para a análise das amostras utilizou-se o sistema analítico esquematizado na Figura 6. Este sistema permite, numa primeira etapa, a separação cromatográfica dos compostos seguindo-se, posteriormente, numa segunda etapa, a deteção amperométrica dos mesmos.

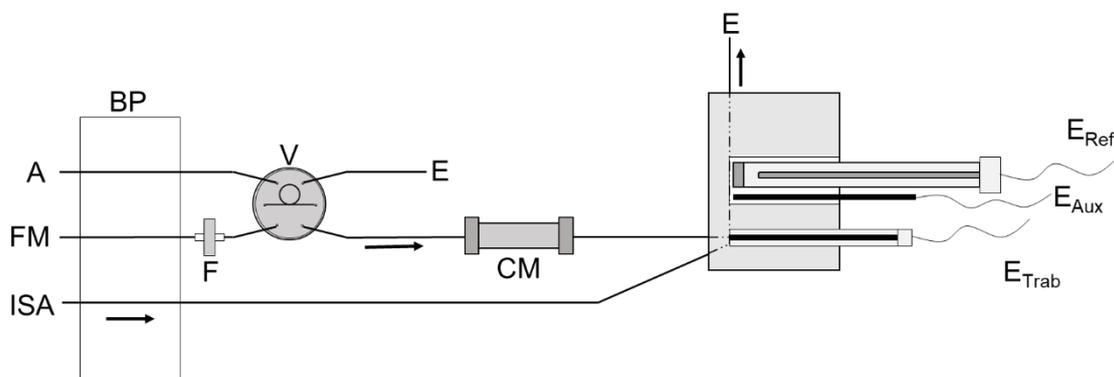


Figura 6 - Esquema do sistema cromatográfico de baixa pressão com deteção amperométrica utilizado para a análise das amostras (legenda das letras na tabela 3).

Tabela 3 - Componentes do sistema analítico LPC-ED referentes à separação cromatográfica dos compostos antioxidantes do café.

Componentes da separação cromatográfica do sistema LPC-ED	
A	Amostra
FM	Fase móvel
ISA	Solução ajustadora da força iónica
BP	Bomba peristáltica (Gilson, Minipuls 3)
F	Filtro de Nylon, tamanho de poro de 1,0 μm (Whatman, 6750-2510)
V	Válvula de injeção (34 μL) (Rheodyne, 5020)
CM	Coluna monolítica C_{18} (Merck, Chromolith RP-18e, 1.51452.0001, 10 mm x 4,6 mm) em suporte de coluna (Merck, 1.52256.0001)
E	Efluentes

Para os estudos de separação dos compostos antioxidantes existentes nos extratos de café verde foi utilizada uma coluna monolítica C_{18} de fase reversa com 1 cm de comprimento. A deteção amperométrica destes mesmos compostos foi estudada com recurso a um sistema de três eléctrodos de acordo com as características descritas na tabela 4.

Tabela 4 – Componentes do sistema analítico LPC-ED referentes à deteção amperométrica dos compostos antioxidantes do café.

Constituintes da deteção amperométrica do sistema LPC-ED	
E_{Ref}	Eléctrodo de referência Ag/AgCl (Thermo Scientific Orion, 900200) – preenchido com solução 10% (m/v) KNO_3 .
E_{Aux}	Eléctrodo auxiliar de carbono (Metrohm, 6.1247.000)
E_{Trab}	Eléctrodo de trabalho – eléctrodo de diamante dopado com boro (BDD) (Windsor Scientific, 3MMDIAM.BDD.PEEK, 3 mm \varnothing)

A conexão de todos estes componentes dos sistemas foi realizada com recurso a tubagem de diferentes diâmetros internos (d.i.). Na bomba peristáltica, para o transporte da solução ISA e da fase móvel, recorreu-se a tubos Tygon com 0,38 mm d.i. (Gilson, Inc., F117933) e com 1,02 mm d.i. (Gilson, Inc., F117938), respetivamente. As restantes conexões foram realizadas com recurso a tubagem PTFE com 0,8 mm d.i. (Kinesis, 008T16-080-20) e conectores quando necessários. O comprimento dos tubos

usados para conectar a válvula de injeção à coluna monolítica e esta ao sistema de detecção foi o menor possível (< 2 cm). Colocou-se ainda um filtro de seringa de Nylon com 25 mm de diâmetro e poros de 1,0 μm (Whatman, 6750-2510), entre a bomba peristáltica e a válvula de injeção, no tubo de transporte da fase móvel, para efeitos de filtração desta solução.

Para a obtenção dos sinais eletroquímicos, nos ensaios de voltametria cíclica e de amperometria, recorreu-se a um potencióstato $\mu\text{Autolab}$ Tipo II controlado por software GPES 4.9 (EcoChemie B.V., Utrecht, Holanda).

Para a realização dos ensaios de espectrometria de massa recorreu-se a um HPLC-DAD-MS/MS da Finningan Surveyor Plus (Thermo Electron Corporation, USA).

2.2. Reagentes, soluções e amostras

Toda a água utilizada durante os ensaios e preparação de soluções foi água desionizada obtida pelo sistema de purificação de água (resistividade > 18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$, filtro 0,2 μm) previamente referido.

Os reagentes utilizados ao longo do trabalho para preparação de soluções padrão, fase móvel e solução ISA encontram-se descritos na tabela 5. As amostras de café utilizadas foram grãos de café robusta verde, provenientes da Indonésia, Uganda e Vietname, e arábica verde, provenientes do Brasil e Honduras.

Tabela 5 - Reagentes utilizados neste trabalho, pureza, referência e respetiva marca.

Reagente	Pureza	Referência	Marca
Acetonitrilo (ACN)	Grau de gradiente de HPLC $\geq 99,9\%$	A/0627/17	Fisher Chemical
Ácido acético (CH_3COOH)	Grau técnico $\geq 98\%$	84528.290	VWR
Ácido clorídrico (HCl)	37%	H/1200/PB17	Fisher Chemical
Ácido fórmico (HCOOH)	99-100%	CL00.1305.1000	Chem-Lab NV
Hidrogenofosfato dissódico (Na_2HPO_4)	>99,5%	CL00.1463.100	Chem-Lab NV
Padrões			
Cafeína	$\geq 99\%$	200-362-1	Sigma-Aldrich
Ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA)	$\geq 95\%$	C3878	Sigma-Aldrich

2.2.1. Preparação de soluções padrão

As soluções padrão de cafeína e 5-CQA foram preparadas na concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, a partir dos reagentes comercializados e utilizando como solvente água desionizada.

Para a realização das curvas de calibração prepararam-se soluções modelo com os dois analitos acima referidos. Estas soluções, com concentração variável entre 1×10^{-4} e $3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, por diluição das soluções padrão preparadas.

De todas as soluções preparadas, as de cafeína eram as que apresentavam uma maior estabilidade, permanecendo estáveis até 6 meses após a preparação das soluções, sem condições específicas de armazenamento.

As soluções de 5-CQA apresentaram sinais de degradação durante a análise após 4 dias da sua preparação, levando à necessidade de preparar estas soluções a cada três dias.

2.2.2. Preparação de soluções ISA

As soluções ISA utilizadas para os ensaios de voltametria cíclica e para a otimização das condições de análise pelo sistema cromatográfico de baixa pressão encontram-se descritas na tabela 6. A primeira solução ISA foi preparada por diluição de HCl concentrado até obtenção de uma concentração de $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, solução que apresenta um valor de pH inferior a 1. A solução tampão de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ foi preparada por diluição de ácido acético concentrado até à obtenção de uma concentração de $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, com a diluição quase concluída adicionou-se NaHO $4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ até obtenção de um valor de $\text{pH}=4$. Por fim, a solução tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ foi preparada por dissolução de Na_2HPO_4 em água para obtenção de uma solução de concentração $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, antes de finalizar a preparação da solução adicionou-se HCl $6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ até obtenção de um valor de $\text{pH}=7$.

Estas soluções, tais como as utilizadas como fase móvel, foram desgaseificadas no banho de ultrassons durante 10 minutos.

Tabela 6 - Soluções ISA utilizadas para ensaios de voltametria cíclica e otimização das condições de análise no decorrer dos ensaios.

Solução preparada / mol.dm ⁻³		pH
Solução de HCl	1	<1
Solução tampão CH ₃ COOH/CH ₃ COO ⁻	0,5	4
Solução tampão H ₂ PO ₄ /HPO ₄ ²⁻	0,5	7

2.2.3. Preparação de soluções para os estudos de voltametria cíclica

Para os estudos de voltametria cíclica recorreu-se às soluções de cafeína e 5-CQA na concentração de 1×10^{-3} mol·dm⁻³ e às soluções ISA preparadas. Para o efeito misturou-se 1,00 mL da solução ISA com 5,00 mL da solução padrão preparada. A proporção entre as duas soluções teve como objetivo simular a mistura que ocorre à superfície do eletrodo no sistema LPC-ED, com base nos caudais de cada solução, 0,71 mL·min⁻¹ e 0,14 mL·min⁻¹, para as soluções FM e ISA, respetivamente, com o objetivo de alterar o pH da solução padrão para o valor de pH pretendido.

2.2.4. Preparação de soluções utilizadas como fase móvel

As soluções utilizadas para a otimização da fase móvel encontram-se descritas na tabela 7. Prepararam-se dois conjuntos de fases móveis, distinguíveis pela presença de ácido fórmico ou acético na sua constituição. O primeiro conjunto de fases móveis foi preparado com 0,1% (v/v) de ácido fórmico, ácido clorídrico até à obtenção de pH=2,5 e diferentes quantidades de acetonitrilo: 5:95, 3:97 e 2:98 (v/v). O segundo conjunto foi preparado com 0,15% (v/v) de ácido acético, ácido clorídrico até à obtenção de um pH=2,5 e diferentes quantidades de acetonitrilo: 5:95, 3:97, 2,5:97,5 e 2:98 (v/v). Após a preparação, cada fase móvel foi desgaseificada no banho de ultrassons durante 10 minutos.

A acidificação da fase móvel respeitou o intervalo de trabalho de pH da coluna monolítica, 2 a 7,5 [43], e foi realizada com o objetivo de manter o 5-CQA sob a forma não iónica, apresentando este um valor de $pK_a = 3,5$.

Tabela 7 - Soluções utilizadas como fase móvel ao longo dos ensaios.

Solvente orgânico		Ácido	
Solvente	% (v/v)	Ácido	mol·dm ⁻³
ACN	5	HCOOH	0,0265
	3		
	2		
	5		
	3	CH ₃ COOH	
	2,5		
	2		

2.3. Procedimento experimental

2.3.1. Implementação e funcionamento do sistema analítico LPC-ED

O sistema analítico utilizado para a determinação de compostos antioxidantes no café verde foi baseado em trabalhos anteriores [43]. Este sistema é constituído por uma bomba peristáltica, responsável pela propulsão das amostras e soluções ISA e de fase móvel ao longo de todo o sistema; a válvula de injeção, que permite a injeção de um volume constante de amostra para análise; uma coluna monolítica C₁₈ com 1 cm de comprimento para a separação dos componentes das amostras; e um sistema de três eléctrodos para a deteção eletroquímica dos compostos eluídos.

O sistema analítico implementado neste trabalho tem como particularidade a utilização de uma confluência na parte do sistema responsável pela deteção amperométrica. Esta confluência, constituída com poli(metacrilato de metilo), permite o acoplamento do eléctrodo de trabalho sob uma configuração *wall-jet*, ou seja, o jato de eluato proveniente da coluna monolítica é projetado perpendicularmente à superfície do eléctrodo de trabalho. Como é possível observar na figura 7, esta confluência apresenta também outra entrada junto à superfície do eléctrodo de trabalho para a solução ISA, permitindo assim o ajuste do pH e da força iónica do eluato no momento de deteção, para estudo da sensibilidade da deteção [44]. Após este ajuste, a mistura é encaminhada para a saída da confluência e, por fim, descartada. A introdução da confluência do sistema permite um fácil manuseamento dos eléctrodos sempre que

necessário e ainda uma curta distância entre o posicionamento de todos os elétrodos no sistema. Também a distância entre a válvula de injeção até à confluência, incluindo a coluna monolítica foi a mais curta possível para minimizar a dispersão dos componentes da amostra desde o momento de injeção até à sua deteção.

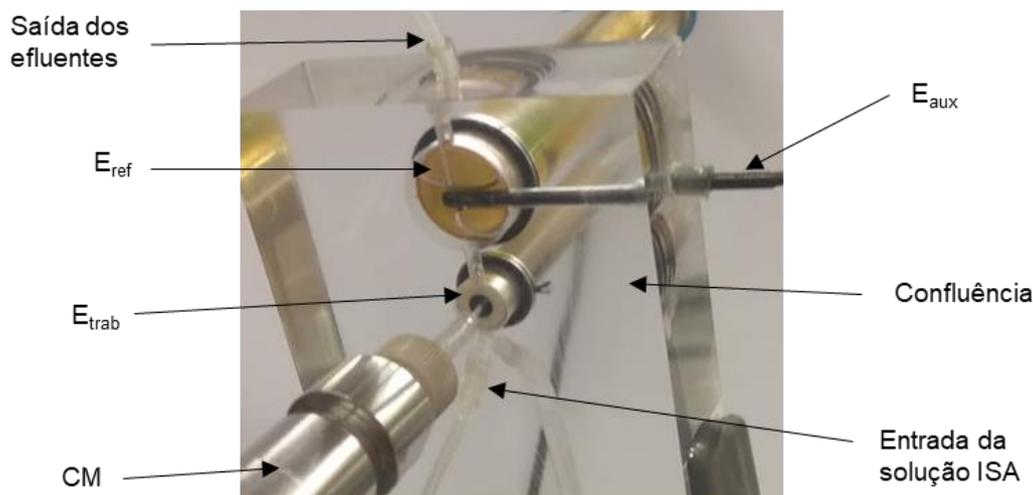


Figura 7 - Pormenor referente à confluência e posicionamento dos elétrodos para a deteção amperométrica.

As soluções utilizadas como fase móvel e solução ISA foram desgaseificadas no banho de ultrassons durante 10 minutos no início de cada dia de trabalho. Estas soluções foram impulsionadas no sistema pela bomba peristáltica, à velocidade de 7,5 rpm que se traduz num caudal de $0,71 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $0,14 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para as soluções de fase móvel e ISA, respetivamente, sendo estas condições de funcionamento baseadas num trabalho prévio [44].

Antes da injeção das amostras no sistema, e recorrendo às condições referidas, a coluna monolítica é condicionada com a solução de fase móvel a utilizar durante 20 minutos, igualmente necessário para estabilizar a resposta eletroquímica. Quando todo o sistema se encontra operacional, a amostra a analisar é inserida na alça de injeção presente na válvula de injeção, um volume de $34 \mu\text{L}$, e injetada no sistema. A amostra é então direcionada para a coluna monolítica onde ocorre a separação cromatográfica. Posteriormente, é direcionada para a confluência onde ocorre a mistura do eluato com a solução ISA e subsequente deteção amperométrica com recurso aos elétrodos.

O condicionamento do eletrodo de trabalho, realizado sempre que se verificava uma diminuição da resposta eletroquímica, é obtido por realização de um ensaio de voltametria cíclica, com variação do potencial de $+2,0 \text{ V}$ a $-2,0 \text{ V}$ durante 2 minutos.

Entre a bomba peristáltica e a válvula de injeção foi colocado um filtro de seringa para prevenir o entupimento da coluna monolítica. Este filtro foi trocado no início de cada semana, considerando uma rotina de trabalho de 8 horas diárias.

No fim de cada dia de trabalho a coluna monolítica foi condicionada em acetoneitrilo com o intuito de aumentar o tempo de vida útil da mesma.

2.3.2. Extração dos compostos antioxidantes dos grãos de café verde

Os grãos de café a estudar foram moídos e peneirados, de modo a se obter apenas partículas de tamanho inferior a 700 μm . Após a obtenção dos grãos moídos procedeu-se à obtenção do extrato líquido. O processo de extração foi realizado utilizando a fase móvel para garantir a precipitação de proteínas [47] durante este processo. Deste modo, é possível prevenir a obstrução da coluna monolítica durante a análise cromatográfica.

Para a preparação do extrato pesou-se, rigorosamente, uma massa próxima de 0,1000 g do café verde moído e transferiu-se esta massa para um gobelé com 20,00 mL de fase móvel. Procedeu-se ao aquecimento desta mistura a uma temperatura de 80 °C durante 10 minutos, com agitação moderada [48]. Posteriormente, deixou-se a mistura arrefecer até à temperatura ambiente, ajustou-se a massa de água evaporada e procedeu-se à filtração. Para este efeito utilizaram-se, primeiramente, dois filtros de pregas (Whatman nº 1) e, posteriormente, com um filtro de seringa de celulose regenerada com 0,45 μm de tamanho do poro (Sartorius, 17765). Após estes procedimentos o extrato encontra-se pronto a ser analisado no sistema LPC-ED implementado.

Aquando da determinação dos antioxidantes nos extratos de café verde foi necessário obter o teor de humidade dos grãos de café verde analisados. O teor de humidade foi determinado por gravimetria de acordo com o procedimento de referência descrito na ISO 6673 de 2003 [49]. Este procedimento baseou-se na colocação de uma caixa de Petri na estufa, a 105 °C, durante uma hora. Após este tempo, a mesma é colocada no exsiccador até atingir a temperatura ambiente e pesada na balança analítica. Concluída a primeira etapa, pesou-se uma massa rigorosa de grãos de café verde (10 g) para a caixa de Petri e colocou-se na estufa por 16 horas, a 105 °C. No fim deste tempo, a caixa é colocada novamente no exsiccador a temperatura ambiente e posteriormente pesada na balança analítica. O teor de humidade é obtido pelo quociente entre a diferença de massa registada e a massa de café inicial.

2.3.3. Identificação de antioxidantes por espectrometria de massa

Para a identificação dos diferentes compostos antioxidantes colocou-se a coluna monolítica no HPLC-DAD-ESI-MS. Na separação cromatográfica foram aplicadas as mesmas condições de caudal e constituição da fase móvel utilizadas no sistema cromatográfico de baixa pressão. O volume de injeção foi de 25 μ L, e na deteção espectrofotométrica programou-se o DAD para um intervalo de comprimentos de onda compreendidos entre 220-500 nm. Na deteção por espectrometria de massa foi utilizado um detetor quadrupolo de massa com armadilha de iões (Finningan LCQ Deca XP Plus) com uma fonte ESI. As condições selecionadas para esta última análise foram:

- modo negativo de deteção por ESI (exceto quando referido o contrário);
- temperatura do capilar a 325 °C;
- gás de revestimento (N_2) a 40 (unidades arbitrárias);
- gás auxiliar (N_2) a 15 (unidades arbitrárias);
- voltagem da fonte a 5 kV;
- voltagem do capilar a 15 V;
- intervalo de massas de análise: 160-500 m/z;

A este tipo de análise foram submetidas amostras de café robusta verde cujo extrato foi preparado de acordo com o procedimento previamente descrito.

3. Resultados experimentais e discussão

3.1. Resultados preliminares

3.1.1. Estudos de voltametria cíclica

O ácido 5-cafeoilquínico e a cafeína são os dois antioxidantes maioritários presentes no café verde e a sua atividade eletroquímica, com um elétrodo BDD, já se encontra estudada e descrita [50,51]. Contudo, a influência do pH do meio no comportamento eletroquímico destas espécies eletroativas é um fator importante e não totalmente estudado.

A voltametria cíclica foi a técnica utilizada para o estudo do comportamento eletroquímico do 5-CQA e da cafeína, encontrando-se os parâmetros selecionados para a obtenção dos voltamogramas, para ambos os analitos, descritos na tabela 8. As soluções utilizadas para a realização deste estudo foram preparadas como descrito no ponto 2.2.3. Durante a realização do estudo foi perceptível que a ausência de um condicionamento prévio a cada ensaio conduz à instabilidade do sinal eletroquímico dos analitos, uma vez que os ensaios não foram repetíveis. Esta observação motivou a necessidade de adicionar duas etapas de condicionamento a serem aplicadas antes de cada ensaio. Primeiramente foi realizada a aplicação de uma diferença de potencial de +1,6 V (60 s), para ativação do elétrodo BDD, seguida da aplicação de 0 V (15 s).

Tabela 8 – Condições de análise selecionadas para realização dos ensaios voltamétricos.

1º Condicionamento	Diferença de potencial	1,6 V
	Tempo	60 s
2º Condicionamento	Diferença de potencial	0 V
	Tempo	15 s
Varrimento	$E_{\text{início}}$	0 V
	$E_{1^\circ \text{ vértice}}$	0 V
	$E_{2^\circ \text{ vértice}}$	+1,8 V
	E_{step}	4,88 mV
	Velocidade de varrimento	0,1 V·s ⁻¹

Os voltamogramas obtidos para o 5-CQA e para a cafeína encontram-se representados nas figuras 8 e 10, respetivamente. Em ambos os analitos, é perceptível que o aumento do pH do meio contribuiu para a diminuição da intensidade dos sinais de oxidação. Relativamente ao 5-CQA é possível observar que, mesmo se obtendo um sinal de oxidação com maior intensidade no meio mais ácido, o sinal de oxidação permanece mais largo e menos definido do que o obtido para a cafeína em condições semelhantes. Considerando o meio mais ácido estudado e as condições de análise descritas previamente, o 5-CQA apresenta um potencial de oxidação de +1,2 V, encontrando-se a equação química que traduz a reação deste analito descrita na figura 9 de acordo com N. Alpar *et al.* [51]. Ao contrário da cafeína, este analito não apresenta um valor de potencial de oxidação consensual na literatura [50,51]. Estas diferenças podem ser justificadas pelo impacto que o processo de condicionamento tem na deteção do 5-CQA [51].

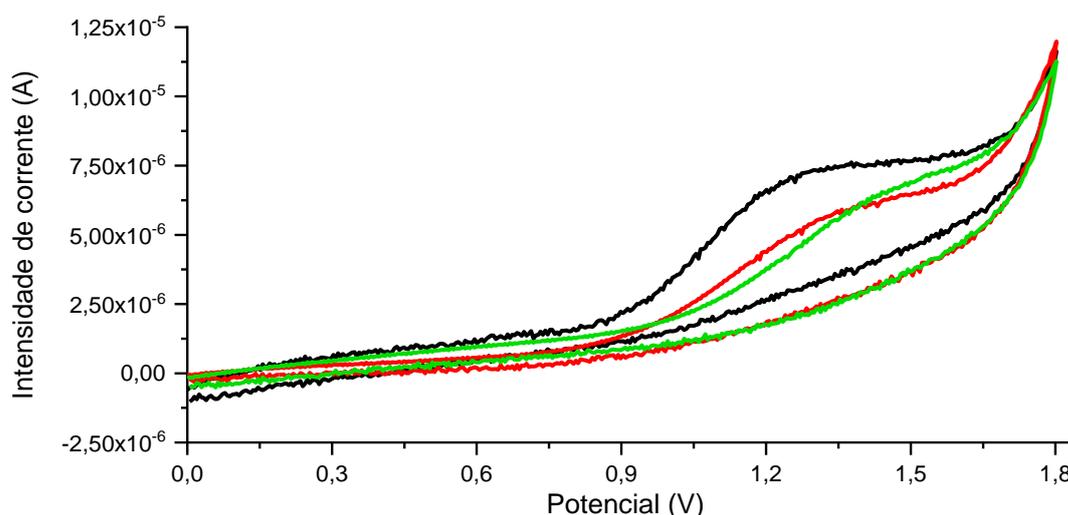


Figura 8 – Voltamogramas cíclicos obtidos na análise de uma solução padrão de 5-CQA, com concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, em três meios com diferentes valores de pH: (—) pH<1, (—) pH=4 e (—) pH=7.

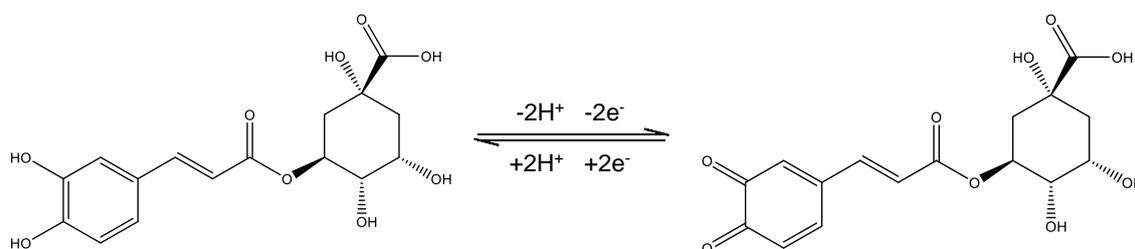


Figura 9 – Equação química que traduz a reação de oxidação do 5-CQA, proposta por N. Alpar *et al.* [51].

A cafeína por outro lado, apresenta um sinal de oxidação bastante claro e definido, verificando-se uma diminuição do potencial de oxidação com o aumento do pH do meio. O potencial obtido para este analito, nas mesmas condições em que se obteve o potencial de oxidação do 5-CQA, foi de +1,5 V e a equação química que traduz esta reação de oxidação encontra-se descrita na figura 11 de acordo com L. Švorc [52]. O potencial da cafeína encontra-se em concordância com os valores descritos na literatura para este analítico, em meio ácido, com um eletrodo BDD [47,48], bem como a diminuição deste potencial com o aumento do pH do meio [53].

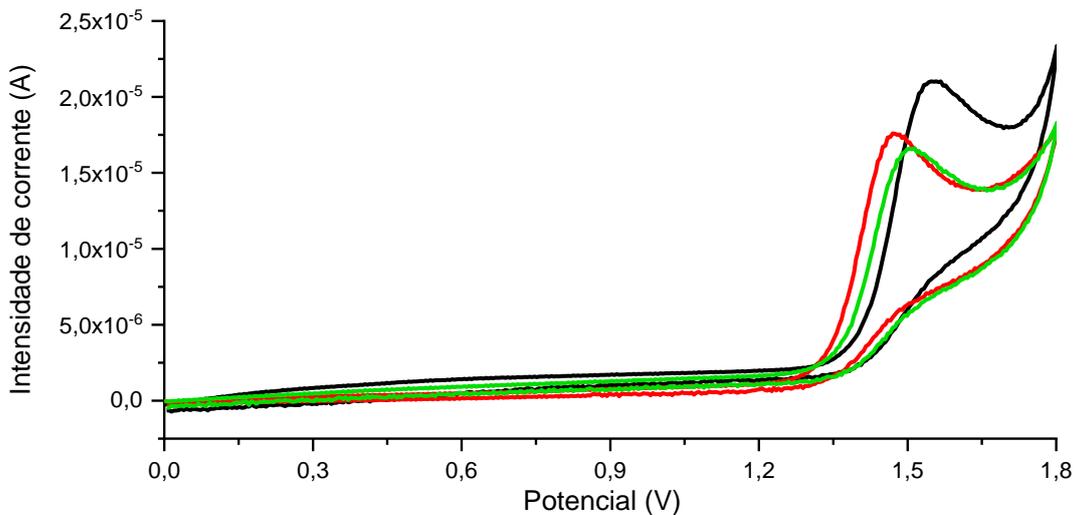


Figura 10 - Voltamogramas cíclicos obtidos na análise de uma solução padrão de cafeína, com concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, em três meios com diferentes valores de pH: (—) pH<1, (—) pH=4 e (—) pH=7.

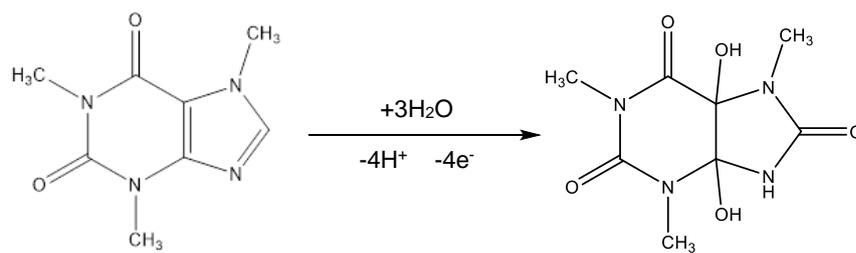


Figura 11 – Equação química que traduz a reação de oxidação da cafeína, proposta por L. Švorc [52].

3.1.2. Estudos de cromatografia de baixa pressão com deteção amperométrica

Após a avaliação do comportamento eletroquímico do 5-CQA e da cafeína, com o eléctrodo BDD, em meios com diferentes valores de pH, estudou-se a retenção do 5-CQA e da cafeína num sistema cromatográfico de baixa pressão com uma coluna monolítica C_{18} de 1 cm.

A retenção da cafeína foi estudada por Santos e Rangel [54], num sistema cromatográfico de baixa pressão em que se ilustra a retenção destes compostos utilizando uma fase móvel de composição água:acetonitrilo, 98:2 (v/v). Essas condições experimentais serviram de base para os ensaios que em seguida se descrevem. Assim, para a realização do estudo da retenção do 5-CQA e da cafeína, no sistema LPC-ED implementado, avaliaram-se diferentes composições de fase móvel, preparadas conforme descrito no ponto 2.2.4., nomeadamente com 0,1% (v/v) de HCOOH, HCl para obtenção de pH = 2,5; acetonitrilo nas proporções 95:5, 97:3 e 98:2 (v/v). A acidificação da fase móvel tem por objetivo manter a espécie 5-CQA na forma protonada, conforme anteriormente referido. Durante a realização destes ensaios recorreu-se à utilização de uma solução ajustadora de força iónica, de HCl $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, para a obtenção de um meio ácido para a deteção amperométrica, que foi confirmado pelos ensaios de voltametria cíclica ser o meio que contribui para a obtenção de melhores resultados.

A deteção amperométrica nestes ensaios foi realizada, com a aplicação de uma diferença de potencial de +1,6 V, valor ao qual é possível observar os sinais de oxidação do 5-CQA e da cafeína, tendo-se selecionado como intervalo de tempo para o registo da intensidade de corrente ao longo da análise o menor permitido pelo equipamento, 0,1 s. As condições utilizadas para a obtenção destes resultados encontram-se descritos na tabela 9.

Tabela 9 - Condições de análise utilizadas para a obtenção dos primeiros resultados de extrato de café verde no sistema LPC-ED.

ISA e FM		
Solução ajustadora de força iónica	Composição	HCl (1 mol·dm ⁻³)
	Caudal	0,14 mL·min ⁻¹
Fase móvel	Composição*	ACN (5% (v/v)) e HCOOH (0,106 mol·dm ⁻³) pH = 2,5
	Caudal	0,71 mL·min ⁻¹
Deteção amperométrica		
Diferença de potencial		+1,6 V
Intervalo de tempo entre medições da intensidade de corrente		0,1 s

*Composição de fase móvel selecionada para os ensaios de otimização da solução ISA

Recorrendo ao sistema LPC-ED e às condições de análise referidas anteriormente, obtiveram-se os cromatogramas, de uma solução modelo de 5-CQA e de cafeína (resultados não apresentados), para as diferentes fases móveis estudadas.

Por comparação dos diferentes resultados obtidos concluiu-se que a utilização de uma fase móvel mais rica em acetonitrilo conduz a uma retenção semelhante do 5-CQA e da cafeína, e a fase móvel com 2% de acetonitrilo é que apresenta a maior separação entres estes dois compostos, ainda que não seja completa.

Com a confirmação de que é possível realizar a deteção e retenção do 5-CQA e da cafeína no sistema LPC-ED implementado procedeu-se a um estudo mais aprofundado da constituição da fase móvel, para a otimização da separação destes dois antioxidantes.

3.2. Otimização das condições de análise

A otimização das condições de análise foi realizada de acordo com as seguintes etapas: (1) estudo da composição da solução ISA; (2) constituição da fase móvel e; (3) avaliação do valor das diferenças de potencial a aplicar durante a análise.

3.2.1. Seleção da solução ISA

O estudo da solução ajustadora de força iónica foi o primeiro passo na otimização das condições de análise, tendo sido estudadas três soluções ISA, previamente descritas no ponto 2.2.2.

Estes ensaios foram realizados de modo a observar o comportamento eletroquímico dos antioxidantes presentes no extrato de café verde em meios com diferentes valores de pH. Como o objetivo é estudar todos os compostos do café verde possíveis de identificar no sistema LPC-ED, e não apenas o 5-CQA e a cafeína, recorreu-se à fase móvel estudada com maior quantidade de acetonitrilo, 5% (v/v), contribuindo também para um menor tempo de análise. As condições utilizadas para a realização destes ensaios encontram-se descritas na tabela 9 e os cromatogramas obtidos encontram-se descritos na figura 12.

A amostra de café verde selecionada para os estudos de otimização foi a espécie robusta, uma vez que esta apresenta quantidades superiores de antioxidantes, comparativamente à espécie arábica. Os extratos analisados foram preparados na concentração de 0,5 g / 100 mL.

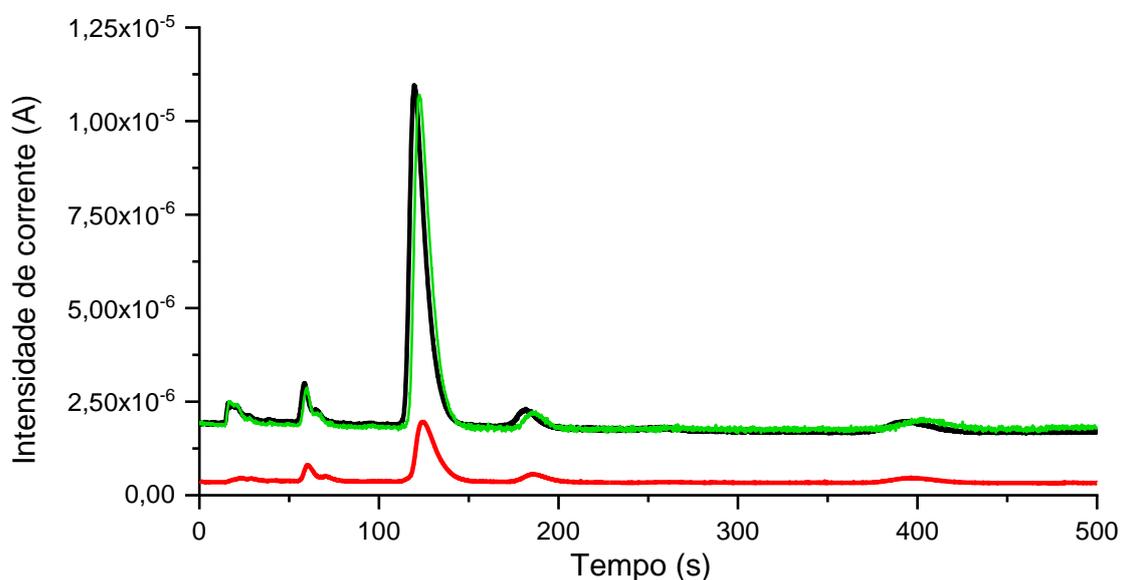


Figura 12 – Cromatogramas de um extrato de café verde, obtidos por LPC-ED, para as diferentes soluções ISA estudadas: (—) pH<1, (—) pH=4 e (—) pH=7.

Numa primeira comparação é possível excluir a solução ISA pH=7 para ensaios futuros uma vez que os sinais obtidos, sobretudo os sinais do 5-CQA e da cafeína, são muito menores que os obtidos nos ensaios realizados com solução ISA pH<1 e ISA pH=4. Os resultados obtidos, utilizando as soluções ISA pH<1 e ISA pH=4, são muito

semelhantes, contudo, com a utilização da solução ISA pH=4, observou-se uma diminuição na intensidade dos sinais dos compostos antioxidantes nos ensaios em que se injetou repetidamente a mesma amostra, o que revelou uma irrepetibilidade na resposta. O mesmo comportamento foi observado nos ensaios realizados na ausência de solução ISA, fazendo-se passar a fase móvel pelo canal da solução ISA, para que as condições dos ensaios se mantivessem os mais semelhantes possíveis.

Uma vez que, com a utilização da solução ISA pH<1, não se verificaram alterações na intensidade dos sinais com a repetição dos ensaios, foi esta a solução ISA escolhida para os ensaios futuros.

3.2.2. Otimização da composição da fase móvel

Após a seleção da solução ISA, que permitiu a obtenção de melhores resultados nos estudos efetuados, procedeu-se ao estudo da composição da fase móvel. Este estudo foi realizado com o objetivo de melhorar a separação dos sinais cromatográficos da cafeína e do 5-CQA. A otimização da fase móvel dividiu-se em duas etapas: o estudo do ácido utilizado e a quantidade de solvente orgânico presente na fase móvel.

3.2.2.1. Seleção do ácido presente na fase móvel

Segundo M.C. García *et al*, a seletividade da coluna é influenciada pelo ácido utilizado na fase móvel [55]. Os autores deste trabalho avaliaram o efeito da adição de 3 ácidos na composição da fase móvel, ácido trifluoroacético, ácido fórmico e ácido acético, na separação de proteínas por cromatografia líquida de fase reversa, tendo sido observado que o tempo de retenção destas proteínas era afetado consoante o ácido adicionado à fase móvel.

Para o estudo da influência de diferentes ácidos no comportamento dos compostos presentes no extrato de café verde selecionaram-se dois ácidos: ácido fórmico, já utilizado nos ensaios anteriores, e ácido acético, ambos compatíveis com ensaios ESI-MS [55]. Para a realização destes estudos recorreu-se às fases móveis descritas na tabela 10, que foram preparadas conforme descrito no ponto 2.2.4.

Tabela 10 – Composição das fases móveis utilizadas para avaliar a influência do ácido adicionado à fase móvel no comportamento dos componentes presentes no extrato de café robusta verde.

Fase móvel	Composição	Concentração
A	ACN	5% (v/v)
	HCOOH	0,0265 mol·dm ⁻³ (0,1% (v/v))
B	ACN	5% (v/v)
	CH ₃ COOH	0,0265 mol·dm ⁻³ (0,15% (v/v))

Os ensaios foram realizados recorrendo às condições de análise previamente utilizadas e descritas na tabela 9, com as fases móveis acima descritas. Os resultados obtidos estão representados na figura 13.

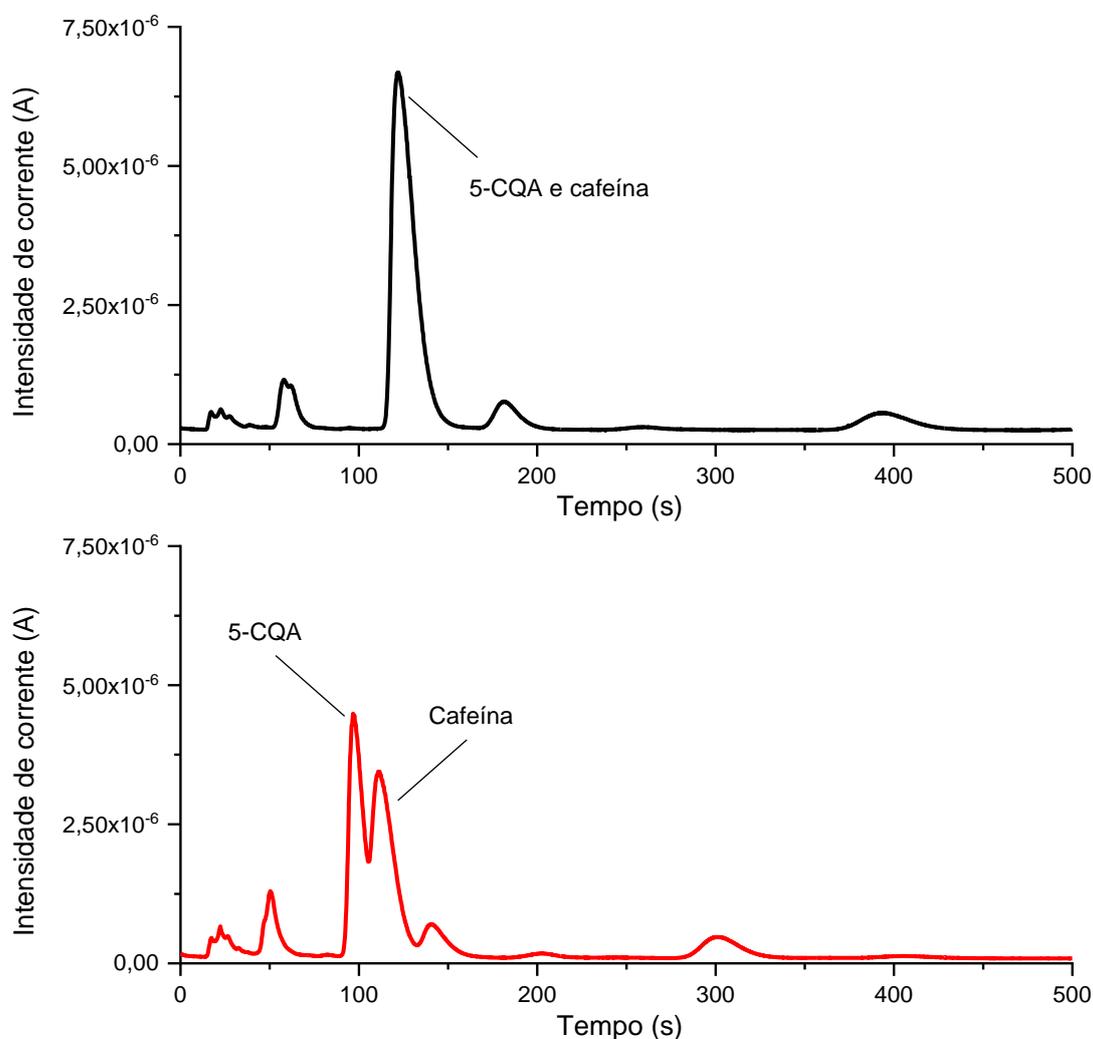


Figura 13 - Cromatogramas obtidos por LPC-ED, do extrato de café verde robusta de concentração 0,5 g / 100 mL, para o estudo do ácido presente na fase móvel. Constituição da fase móvel: (—) acetonitrilo 5% (v/v) e ácido fórmico 0,0265 mol·dm⁻³; (—) acetonitrilo 5% (v/v) e ácido acético 0,0265 mol·dm⁻³.

Por comparação dos resultados obtidos, foi possível verificar que a utilização de ácido acético na fase móvel conduziu à separação parcial dos sinais cromatográficos do 5-CQA e da cafeína, ao contrário do observado com a utilização de ácido fórmico, onde os sinais relativos a estes dois compostos apresentaram tempos de retenção muito semelhantes, coelindo como um único sinal. A análise de uma solução modelo de 5-CQA e cafeína, na concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, com a utilização de fase móvel B (tabela 10), permitiu verificar que o 5-CQA é o primeiro antioxidante a ser eluído nestas condições, com um tempo de retenção próximo aos 100 s, seguido da eluição da cafeína, que apresentava um tempo de retenção perto dos 110 s.

3.2.2.2. Seleção do teor de acetonitrilo na fase móvel

O estudo realizado anteriormente permitiu concluir que, numa fase móvel com 5% (v/v) de acetonitrilo, a presença de ácido acético favorece a separação, mesmo que ainda parcialmente, dos sinais cromatográficos do 5-CQA e da cafeína. Contudo, também a quantidade de solvente orgânico na composição fase móvel tem influência no tempo de retenção dos analitos ao longo da análise.

Com o objetivo de obter uma separação completa entre os sinais cromatográficos do 5-CQA e da cafeína estudaram-se três fases móveis com diferentes quantidades de acetonitrilo na sua constituição: 5 (v/v), 3 (v/v) e 2% (v/v), tendo sido estes estudos realizados para ambos os ácidos estudados anteriormente. Os ensaios foram realizados de acordo com as condições descritas na tabela 9, com exceção da composição da fase móvel, e os resultados obtidos encontram-se reproduzidos nas figuras 14 e 15.

A utilização de ácido fórmico, na concentração de $0,0265 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, na fase móvel não conduziu a uma separação total do 5-CQA e da cafeína, mesmo que a fase móvel utilizada apresentasse um valor mínimo de 2% (v/v) de acetonitrilo, como seria de esperar pelos resultados obtidos com as soluções modelo, em condições semelhantes. A utilização de ácido acético conduziu à separação parcial dos sinais cromatográficos destes dois antioxidantes com uma fase móvel de 5% (v/v) de acetonitrilo, sendo esta separação total quando a quantidade de solvente orgânico na fase móvel foi de 2% (v/v).

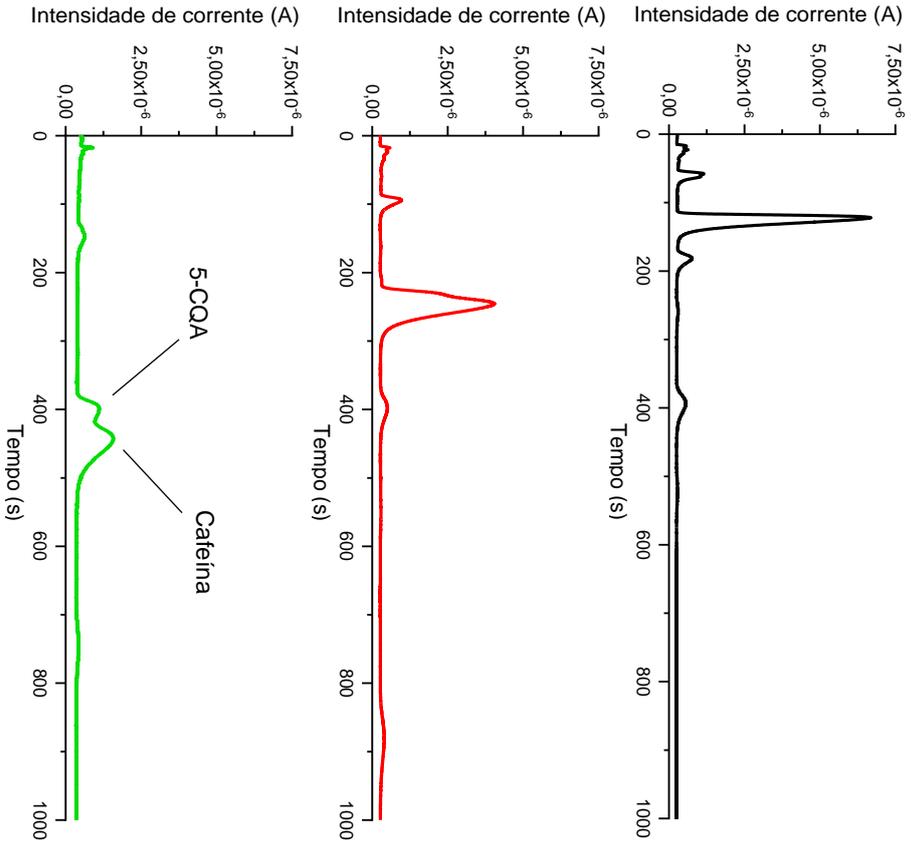


Figura 14 - Cromatogramas obtidos no estudo da variação de ACN na fase móvel, com HCOOH (0,0265 mol·dm⁻³). Quantidade de ACN na fase móvel: (—) 5% (v/v), (—) 3% (v/v) e (—) 2% (v/v).

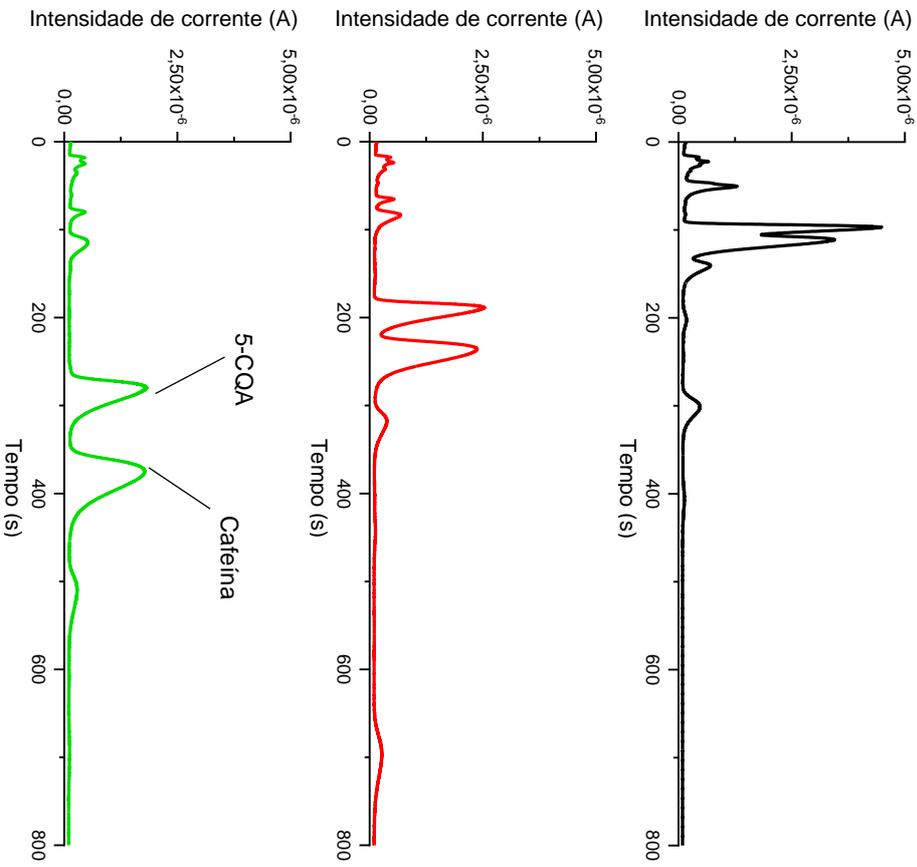


Figura 15 - Cromatogramas obtidos no estudo da variação de ACN na fase móvel, com CH₃COOH (0,0265 mol·dm⁻³). Quantidade de ACN na fase móvel: (—) 5% (v/v), (—) 3% (v/v) e (—) 2% (v/v).

A utilização de uma fase móvel com 2% (v/v) de acetonitrilo e 0,15% (v/v) de ácido acético foi a que apresentou a melhor separação do 5-CQA e da cafeína. No entanto, com o objetivo de diminuir o tempo de análise, sem comprometer a separação cromatográfica dos sinais do 5-CQA e da cafeína, estudou-se outra fase móvel com 2,5% de acetonitrilo. Apresenta-se na figura 16 um cromatograma típico obtido nestas condições.

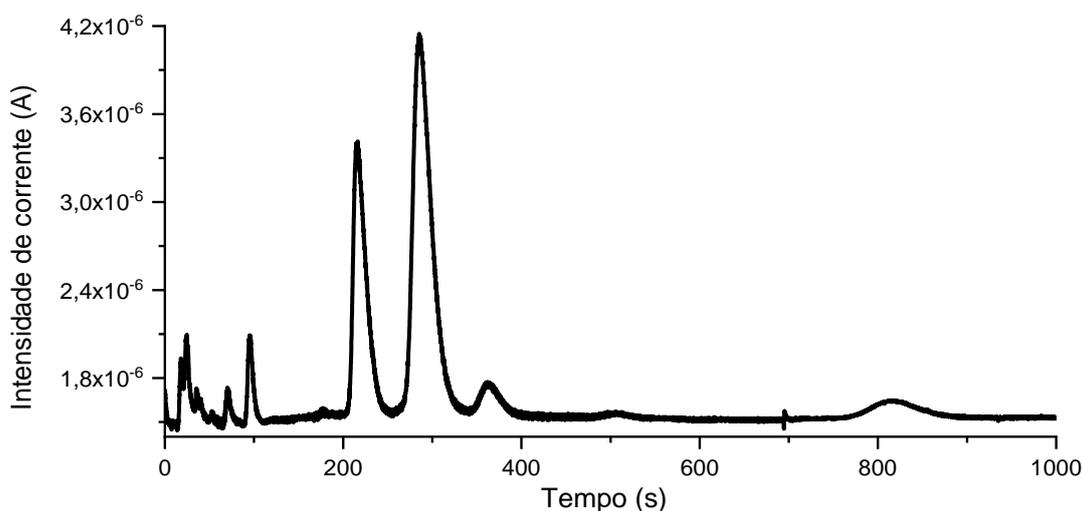


Figura 16 – Cromatograma obtido por LPC-ED, para um extrato de café robusta verde, com uma fase móvel de composição $0,0265 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ CH}_3\text{COOH}$ e 2,5% ACN.

Como é possível observar, a última fase móvel estudada foi a mais adequada para dar continuidade aos estudos, permitindo a separação completa do 5-CQA e da cafeína e com um tempo de análise menor.

3.2.3. Estudo dos potenciais aplicados ao elétrodo de trabalho para deteção amperométrica

Após a otimização das soluções, ajustadora de força iónica e fase móvel, utilizadas no sistema LPC-ED para a análise de extratos de café verde, procedeu-se ao estudo dos potenciais aplicados no elétrodo de trabalho para a realização da deteção amperométrica dos antioxidantes.

A obtenção de resultados, nos ensaios anteriores a este estudo, foi conseguida pela utilização da amperometria, com a aplicação de uma diferença de potencial de +1,6 V, com registo da intensidade de corrente a cada 0,1 s. Assim, estudou-se o intervalo de potencial compreendido entre +1,6 V até ao valor mínimo de potencial ao qual não fossem observáveis sinais de oxidação de nenhum antioxidante presente do extrato de

café verde. O estudo deste intervalo de potenciais foi realizado com uma diminuição de 100 mV entre ensaios para um melhor acompanhamento do comportamento dos diferentes antioxidantes. Apresenta-se, todavia, uma versão mais resumida destes resultados correspondente a uma diminuição de 200 mV entre ensaios.

Devido aos baixos valores de potencial estudados houve necessidade de realizar um condicionamento do eléctrodo antes de cada análise. As condições de análise utilizadas para a realização deste estudo encontram descritas na tabela 11, e os cromatogramas obtidos encontram-se representados na figura 17A.

Nestas mesmas condições analisou-se uma solução modelo de 5-CQA e cafeína, cujos cromatogramas obtidos encontram-se representados na figura 17B.

Tabela 11 - Condições de análise para o estudo da influência da diferença de potencial aplicado no eléctrodo de trabalho.

Etapa	Diferença de potencial / V	Tempo / s
Condicionamento	+1,6	60
Análise	+1,6 / +1,4 / +1,2 / +1,0 / +0,8	0,1

A comparação entre os cromatogramas das figuras 17A e 17B permitiu observar que, os sinais C e D da figura 17A sofreram um abaixamento da intensidade de corrente para valores de potencial aplicados inferiores, similar aos compostos 5-CQA e cafeína, respetivamente, e que, provavelmente, mais nenhum composto coeluiu com estes dois antioxidantes, uma vez que a variação da altura dos sinais e o comportamento eletroquímico foram semelhantes.

A intensidade do sinal eletroquímico da cafeína foi o primeiro a diminuir consideravelmente com a realização do ensaio com uma diferença de potencial de +1,4 V. A intensidade do sinal de oxidação do 5-CQA apresentou uma diminuição progressiva aquando da aplicação de valores de diferença de potencial, ao eléctrodo de trabalho, progressivamente menores, desde a aplicação de +1,2 V até o seu desaparecimento total a +0,6 V.

A diminuição prolongada da intensidade do sinal relativo ao 5-CQA, ao longo da diminuição dos potenciais, encontra-se de acordo com os resultados obtidos por voltametria cíclica nos ensaios preliminares, uma vez que o sinal de oxidação obtido para este antioxidante era mais alargado e menos definido que o da cafeína.

O comportamento eletroquímico similar entre alguns sinais auxiliou na sua identificação. Vários sinais do extrato de café verde apresentaram um comportamento muito semelhante ao do 5-CQA, nomeadamente quanto à diminuição prolongada da

intensidade do sinal ao longo da aplicação de menores diferenças de potencial. Estas semelhanças de comportamento entre os diferentes compostos apontaram para que os antioxidantes não identificados apresentassem uma estrutura química semelhante à do 5-CQA, o que está de acordo com o descrito na literatura relativamente à presença de outros ácidos clorogénicos no café verde.

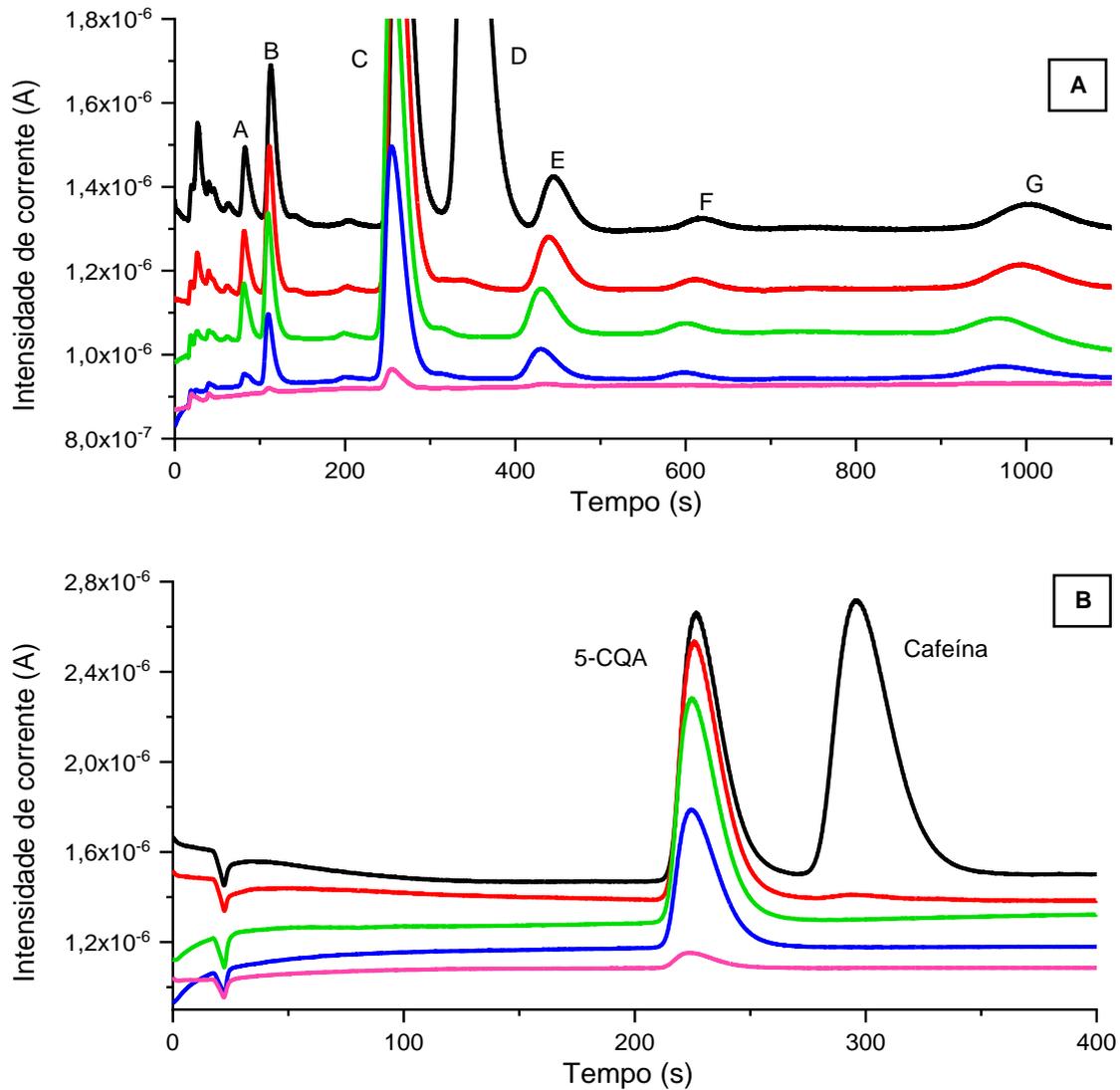


Figura 17 - Cromatogramas obtidos por LPC-ED para: A) extrato de café robusta verde na concentração de 0,5 g / 100 mL; B) solução modelo de 5-CQA e cafeína, ambos na concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ com a aplicação de diferentes potenciais no eléctrodo de trabalho: móvel: (—) +1,6 V, (—) +1,4V, (—) +1,2 V, (—) +1,0 V e (—) +0,8 V.

3.3. Identificação de antioxidantes do extrato de café verde por HPLC-DAD-ESI-MS/MS

Com a conclusão dos estudos das condições de eluição e deteção eletroquímica iniciaram-se os estudos para a identificação dos compostos detetados no sistema LPC-ED. Estes estudos foram realizados recorrendo a um sistema HPLC-DAD-MS/MS, onde a coluna monolítica utilizada ao longo deste trabalho foi acoplada a este equipamento. As condições de análise utilizadas foram idênticas às condições escolhidas para o sistema LPC-ED. A deteção por ESI-MS foi realizada em modo positivo e em modo negativo. Os resultados encontram-se descritos na tabela 12.

Tabela 12 – Fragmentos de massa obtidos após análise de um extrato de café verde por HPLC-DAD-ESI-MS/MS e correspondente proposta de identificação dos compostos.

Pico	MS	MS ²	Composto	Solução padrão / referência
A	205*	----	----	----
B	353	191 (100), 179 (50), 135 (10)	3-CQA	[56]
C	353	191 (100), 179 (5)	5-CQA	Solução padrão
D	195*	138*	Cafeína	Solução padrão
E	353	173 (100), 179 (95), 191 (20), 135 (10)	4-CQA	[56]
F	353	191 (100), 179 (5)	<i>Cis</i> -5-CQA	[57]
G	367	191 (100), 193 (10), 173 (2)	5-FQA	[58]

*modo positivo de deteção

Numa primeira análise, foi possível verificar que os fragmentos de massa 353, em modo negativo, encontraram-se distribuídos por 4 sinais do cromatograma, como é possível observar na figura 18. Este fragmento é típico dos ácidos cafeoilquínicos, subgrupo dos ácidos clorogénicos, e a diferenciação entre os isómeros, em análises por espectrometria de massa, é obtida realizando-se uma segunda fragmentação que, nas análises realizadas, conduziram aos resultados de MS² descritos na tabela anterior. Esta segunda análise permitiu confirmar a presença de 4 isómeros dos ácidos cafeoilquínicos: 3-CQA, 5-CQA, 4-CQA e *cis*-5-CQA. A identificação do sinal C como 5-CQA foi baseada na análise de uma solução padrão deste antioxidante, nas mesmas condições experimentais, que apresentou um tempo de retenção e perfil de fragmentação semelhantes ao observado na análise do extrato. O sinal F apresentou também o mesmo perfil de fragmentação que o 5-CQA, confirmando a presença do

isómero *cis*-5-CQA, referido previamente por Mehari *et al.* [57]. Os sinais B e E foram identificados como sendo os outros dois isómeros existentes, 3-CQA e 4-CQA, respetivamente, por comparação dos perfis de fragmentação de cada composto com os que se encontram descritos na literatura.

A análise por MS² foi também realizada para o fragmento de massa 367, associado aos ácidos feruloilquínicos, permitindo a identificação do isómero 5-FQA no sinal G.

A identificação do sinal C como cafeína foi baseada na análise dos fragmentos e comparação dos mesmos com os resultados obtidos na análise de uma solução padrão deste antioxidante.

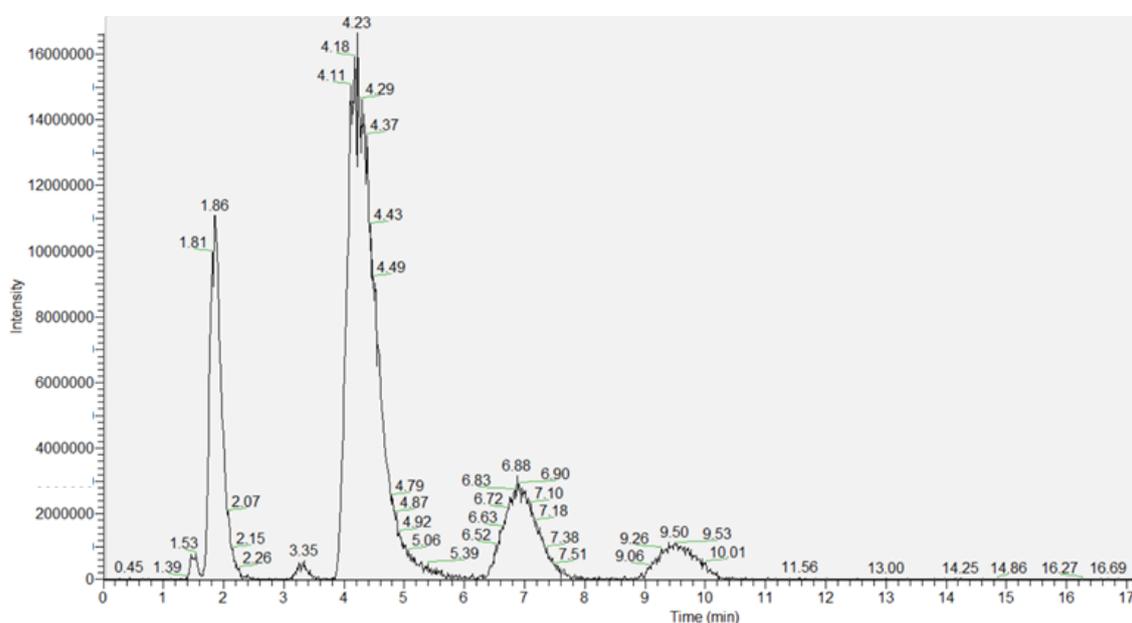


Figura 18 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD-ESI-MS/MS, em modo negativo, relativamente à distribuição dos fragmentos 353 num extrato de café robusta verde.

3.4. Parâmetros cromatográficos do 5-CQA e cafeína

Após a identificação dos compostos antioxidantes presentes no extrato de café verde procedeu-se à caracterização e avaliação dos parâmetros cromatográficos da metodologia desenvolvida, com base num cromatograma típico obtido para a análise de um extrato de café robusta verde. Estes parâmetros foram calculados para o 5-CQA e a cafeína, dois dos antioxidantes identificados e que foram posteriormente quantificados, e os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela 13.

Tabela 13 – Parâmetros cromatográficos para o 5-CQA e a cafeína.

Parâmetro	Analito	
	5-CQA	Cafeína
Tempo de retenção / s	235	310
Assimetria	2,1	1,8
Resolução*	1,7	1,7
N#	667	622
H& / m	$1,50 \times 10^{-5}$	$1,61 \times 10^{-5}$

* Valor calculado relativamente ao sinal cromatográfico mais próximo

Número de pratos teóricos

& Altura do prato teórico

Os sinais cromatográficos obtidos para estes dois antioxidantes apresentaram um valor de resolução igual a 1,7, o que ilustra a separação quantitativa das áreas dos sinais nas condições de eluição adotadas.

Relativamente aos parâmetros de assimetria, número de pratos teóricos e altura de prato teórico, constatou-se que os respetivos valores são semelhantes para os dois analitos referidos, bem como similares aos obtidos num trabalho anterior referente à determinação da trigonelina num sistema LPC-ED semelhante ao implementado [44].

O tempo de análise de um extrato de café verde, para a determinação dos diferentes antioxidantes identificados é de, aproximadamente, 18 minutos, permitindo um ritmo de 3 análises por hora. Este ritmo é superior ao encontrado normalmente em metodologias de HPLC-DAD, com colunas de 10 cm, para a determinação dos mesmos antioxidantes, onde o ritmo de análise é ca. 2 h^{-1} .

Relativamente ao volume de efluente gerado, tendo por base o tempo de cada análise, o caudal da fase móvel, $0,71 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, e a constituição da mesma em acetonitrilo, 2,5% (v/v), observou-se um gasto de 0,325 mL de acetonitrilo por análise. Este valor é também inferior ao normalmente encontrado em metodologias tradicionalmente utilizadas para a determinação dos mesmos analitos.

3.5. Avaliação da seletividade do método

A cafeína e os ácidos clorogénicos são os principais antioxidantes presentes no café verde, encontrando-se os últimos divididos em vários subgrupos com variados tempos de retenção quando analisados por cromatografia de fase reversa.

A seletividade do método foi avaliada por comparação dos resultados obtidos por LPC-ED com os cromatogramas descritos na literatura para um extrato de café verde. Tendo como base de comparação os cromatogramas de ácidos clorogénicos obtido por cromatografia de fase reversa com colunas de tamanho igual ou superior a 10 cm [59,60], é possível verificar que a ordem de eluição dos CGA é semelhante à obtida no método desenvolvido. Os diferentes ácidos cafeoilquínicos são os primeiros a ser eluídos, com sinais de intensidades superiores aos restantes ácidos clorogénicos, apresentando o isómero 5-CQA a maior intensidade entre todos os ácidos cafeoilquínicos.

Os ácidos feruloilquínicos são o segundo grupo a ser eluído, observando-se apenas o isómero 5-FQA. Na análise do fragmento 367 em ESI-MS identificou-se a possível presença do isómero 3-FQA, a um tempo de retenção entre o 5-CQA e a cafeína. Porém, a concentração deste isómero no café verde é muito reduzida não tendo sido por isso considerada como interferência durante a determinação do 5-CQA e da cafeína.

De acordo com diversos autores [59,60], os diCQA são o último grupo dos ácidos clorogénicos a ser eluído que, apesar de não terem sido detetados na metodologia desenvolvida, não vão interferir na determinação dos restantes compostos identificados uma vez que o seu tempo de eluição é superior ao de análise.

Todas estas observações, em conjunto com as conclusões obtidas por análise do comportamento eletroquímico dos diferentes compostos (em 3.2.3.), bem como com o perfil de fragmentação obtido, permitem corroborar a seletividade da metodologia desenvolvida para os compostos identificados.

3.6. Quantificação dos antioxidantes 5-CQA e cafeína em extratos de café verde por LPC-ED

Com base na metodologia desenvolvida ao longo deste trabalho realizou-se a quantificação de alguns dos antioxidantes identificados nos extratos de café verde de amostras de café arábica e robusta. Realizou-se assim um conjunto de ensaios nas condições experimentais descritas na tabela 14, para a obtenção das curvas de calibração dos compostos antioxidantes 5-CQA e cafeína e, posteriormente, para a determinação dos diversos parâmetros cromatográficos.

Tabela 14 - Composição das soluções ISA e FM, condições do extrato de café e parâmetros da deteção amperométrica após otimização das condições de análise.

ISA e FM		
Solução ajustadora de força iónica	Composição	HCl (1 mol·dm ⁻³)
	Caudal	0,14 mL·min ⁻¹
Fase móvel	Composição	ACN (2,5% (v/v)) e CH ₃ COOH (0,0265 mol·dm ⁻³) pH = 2,5
	Caudal	0,71 mL·min ⁻¹
Extrato		
Amostra	Robusta / arábica verde	
Concentração	0,5 g / 100 mL	
Meio de extração	ACN (2,5% (v/v)) e CH ₃ COOH (0,0265 mol·dm ⁻³)	
Alça de injeção	34 µL	
Deteção amperométrica		
Diferença de potencial	+1,6 V	
Intervalo de tempo entre medições da intensidade de corrente	0,1 s	

3.6.1. Curvas de calibração do 5-CQA e da cafeína

Para a quantificação dos antioxidantes 5-CQA e cafeína prepararam-se soluções modelo contendo ambos os compostos com concentrações compreendidas entre 1×10^{-4} e 3×10^{-4} mol·dm⁻³. Na figura 19 encontram-se os cromatogramas típicos obtidos na análise destas soluções modelo.

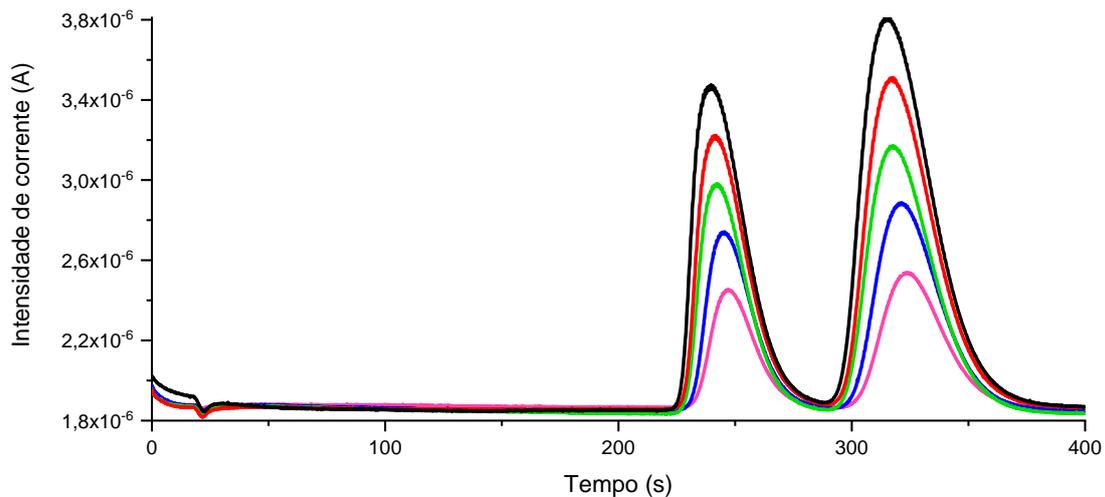


Figura 19 – Cromatogramas típicos, obtidos com a análise de soluções modelo de 5-CQA e cafeína com concentrações: (—) $3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, (—) $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, (—) $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, (—) $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ e (—) $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

É possível observar que os sinais obtidos para cada analito apresentam o mesmo tempo de retenção e perfil que os sinais do cromatograma representado na figura 17A identificados como 5-CQA e cafeína. Com os resultados obtidos foi possível realizar a construção das respetivas curvas de calibração e posterior determinação dos parâmetros analíticos associados a cada uma delas.

3.6.1.1. Curva de calibração do 5-CQA

Os dados obtidos referentes à área e tempo de retenção de cada uma das soluções modelo de 5-CQA analisadas encontram-se descritos na tabela 15.

Tabela 15 - Dados, referentes ao 5-CQA, obtidos com a análise das soluções modelo preparadas (n=3).

Concentração / $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	Área* / A·s	Tempo de retenção* / s
$1,00 \times 10^{-4}$	$(1,32 \pm 0,02) \times 10^{-5}$	$247,6 \pm 0,5$
$1,50 \times 10^{-4}$	$(2,05 \pm 0,02) \times 10^{-5}$	$245,0 \pm 0,5$
$2,00 \times 10^{-4}$	$(2,75 \pm 0,02) \times 10^{-5}$	$241,9 \pm 0,5$
$2,50 \times 10^{-4}$	$(3,35 \pm 0,02) \times 10^{-5}$	$241,7 \pm 0,8$
$3,00 \times 10^{-4}$	$(4,11 \pm 0,02) \times 10^{-5}$	$239,4 \pm 0,2$

A análise deste conjunto de resultados permitiu a construção de uma curva de calibração para o 5-CQA, com um coeficiente de correlação linear de 0,9994. Na figura 20 encontra-se a representação gráfica desta curva de calibração e na equação 1 encontra-se a relação linear entre as concentrações de 5-CQA analisadas e as áreas dos respetivos sinais obtidos. Esta relação linear apresenta como valores de declive e ordenada na origem, $0,138 \pm 0,009 \text{ A}\cdot\text{s}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3$ e $(-0,363 \pm 1,81)\times 10^{-6} \text{ A}\cdot\text{s}$, respetivamente.

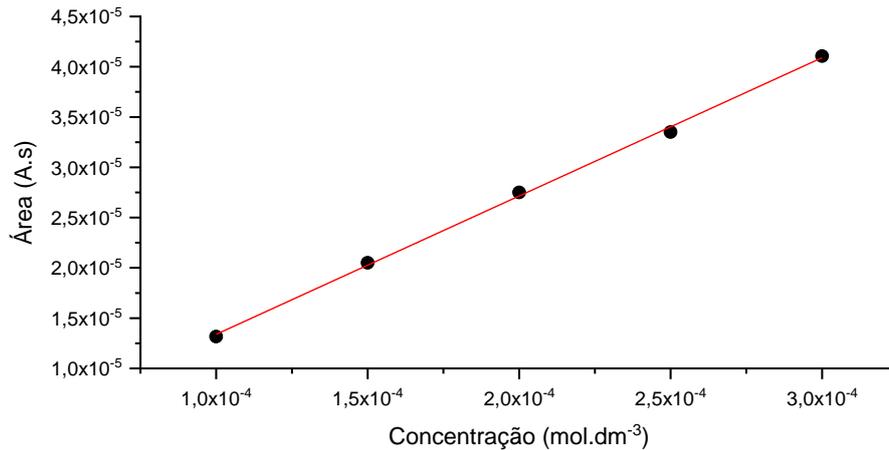


Figura 20 - Curva de calibração típica obtida para o 5-CQA.

$$\text{Área}_{(\text{A}\cdot\text{s})} = 0,138 \times [\text{5-CQA}]_{(\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3})} - 3,63 \times 10^{-7} \quad \text{(equação 1)}$$

A partir da curva de calibração procedeu-se à determinação dos parâmetros descritos na tabela 16, tendo os mesmos sido calculados de acordo com o descrito por Miller e Miller [61].

Tabela 16 – Parâmetros associados à curva de calibração do 5-CQA.

Parâmetros da curva de calibração do 5-CQA*	
Coeficiente de correlação linear	0,9994
Declive	$0,138 \pm 0,009 \text{ A}\cdot\text{s}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3$
Ordenada na origem	$(-0,363 \pm 1,81)\times 10^{-6} \text{ A}\cdot\text{s}$
Limite de quantificação	$3,08\times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
Limite de deteção	$9,25\times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
Intervalo de linearidade estudada	$1\times 10^{-4} \text{ a } 3\times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

*parâmetros calculados segundo Miller e Miller [61].

3.6.1.2. Curva de calibração da cafeína

A concentração de cafeína de cada solução modelo analisada, bem como os valores respetivos da área e tempo de retenção, encontram-se descritos na tabela 17.

Tabela 17 – Dados, referentes à cafeína, obtidos com a análise das soluções modelo preparadas (n=3) .

Concentração / mol·dm ⁻³	Área / A·s	Tempo de retenção / s
1,00x10 ⁻⁴	(2,30 ± 0,07)x10 ⁻⁵	324,4 ± 0,9
1,50x10 ⁻⁴	(3,33 ± 0,03)x10 ⁻⁵	321,0 ± 0,5
2,00x10 ⁻⁴	(4,41 ± 0,03)x10 ⁻⁵	317,6 ± 0,3
2,50x10 ⁻⁴	(5,61 ± 0,04)x10 ⁻⁵	317,5 ± 0,6
3,00x10 ⁻⁴	(6,70 ± 0,06)x10 ⁻⁵	314,6 ± 0,6

A partir dos resultados obtidos foi possível estabelecer para o sinal da cafeína uma relação de linearidade entre a concentração deste analito e a área do sinal obtido. A curva de calibração, representada na figura 21, foi obtida para concentrações de cafeína compreendidas entre 1x10⁻⁴ e 3x10⁻⁴ mol·dm⁻³, tendo-se obtido um coeficiente de correlação linear de 0,9997. A relação linear entre a concentração de analito e a área do sinal medido encontra-se descrita pela equação 2, tendo-se obtido valores de 0,22 ± 0,01 A·s·mol⁻¹ ·dm³ e (0,387 ± 2,12)x10⁻⁶ A·s para o declive e ordenada na origem, respetivamente.

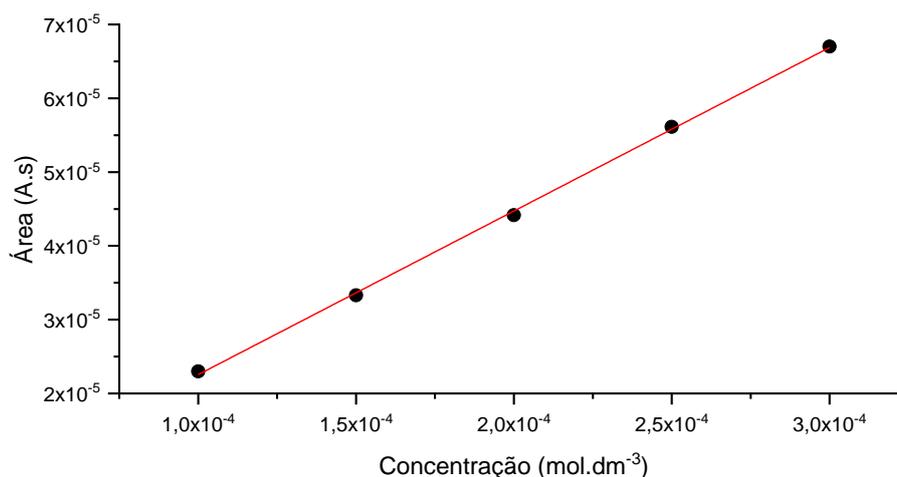


Figura 21 - Curva da calibração obtida para a cafeína.

$$\text{Área}_{(A \cdot s)} = 0,22 \times [\text{Cafeína}]_{(mol \cdot dm^{-3})} + 3,87 \times 10^{-7} \quad \text{(equação 2)}$$

A partir da curva de calibração foi possível determinar parâmetros como o limite de deteção e o limite de quantificação da cafeína na metodologia desenvolvida. Estes e outros parâmetros associados à curva de calibração encontram-se descritos na tabela 18, tendo os mesmos sido calculados de acordo com o descrito por Miller e Miller[61].

Tabela 18 - Parâmetros associados à curva de calibração da cafeína.

Parâmetros da curva de calibração da cafeína*	
Coeficiente de correlação linear	0,9997
Declive	$0,22 \pm 0,01 \text{ A}\cdot\text{s}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3$
Ordenada na origem	$(0,387 \pm 2,12)\times 10^{-6} \text{ A}\cdot\text{s}$
Limite de quantificação	$2,24\times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
Limite de deteção	$6,73\times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
Intervalo de linearidade estudada	$1\times 10^{-4} \text{ a } 3\times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

*parâmetros calculados segundo Miller e Miller[61].

3.6.1.3. Estudos de repetibilidade do sinal dos antioxidantes 5-CQA e cafeína

Para o estudo da repetibilidade do sinal dos dois antioxidantes quantificados realizaram-se 5 injeções consecutivas de uma solução modelo preparada, na concentração de $2\times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, para o 5-CQA e a cafeína. Os resultados obtidos para cada analito, relativamente ao tempo de retenção, altura e área do sinal obtido, encontram-se descritos na tabela 19.

Tabela 19 – Dados, referentes à área, altura e tempo de retenção dos sinais do 5-CQA e da cafeína, obtidos com a análise de uma solução modelo de $2\times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, para ambos os analitos (n=5).

Analito	Área / A·s	Altura / A	Tempo de retenção / s
5-CQA	$(2,75 \pm 0,02)\times 10^{-5}$	$(1,15 \pm 0,01)\times 10^{-6}$	$241,9 \pm 0,7$
Cafeína	$(4,41 \pm 0,03)\times 10^{-5}$	$(1,34 \pm 0,01)\times 10^{-6}$	$317,8 \pm 0,7$

Com base nestes dados foram calculados os coeficientes de variação (CV), segundo Miller e Miller [61], para os três parâmetros registados, para os dois analitos referidos. Os valores de CV obtidos encontram-se representados na tabela 20.

Tabela 20 – Coeficientes de variação calculados para os parâmetros área, altura e tempo de retenção de uma solução modelo de concentração $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ de 5-CQA e cafeína (n=5).

Parâmetros da repetibilidade – CV*			
Analito	Área do sinal	Altura do sinal	Tempo de retenção
5-CQA	0,79%	0,84%	0,30%
Cafeína	0,67%	0,71%	0,22%

*parâmetros calculados segundo Miller e Miller[61].

3.6.2. Determinação dos antioxidantes 5-CQA e cafeína no extrato de café verde

Após a obtenção das curvas de calibração, para o 5-CQA e a cafeína, e determinação dos respetivos parâmetros associados procedeu-se à determinação destes antioxidantes em grãos de café verde.

Foram selecionadas as espécies de café arábica e robusta por serem as mais comercializadas no mercado do café [2]. A degradação elevada dos ácidos clorogénicos durante o processo de torra levou a que apenas se estudassem grãos de café verde. Os grãos de café verde estudados são provenientes de cultivos no Brasil e Honduras, no caso da espécie arábica, e da Indonésia, Uganda e Vietname, no caso da espécie robusta. A determinação da humidade destas amostras, para efeitos da determinação da matéria seca, foi realizada de acordo com a norma ISO 6673 [49] e os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela 21.

Tabela 21 - Percentagem de humidade determinada para cada amostra estudada.

Espécie	Robusta			Arábica	
	Indonésia	Uganda	Vietname	Brasil	Honduras
% de Humidade	11,3	10,7	10,2	13,6	11,0

A determinação do 5-CQA e cafeína nas amostras de café verde foi realizada após a preparação de extratos na concentração de 0,5 g / 100 mL, conforme descrito no ponto 2.3.2. Estes extratos foram analisados de acordo com a metodologia desenvolvida e os analitos quantificados com recurso às curvas de calibração previamente determinadas. Os resultados associados a esta quantificação encontram-se descritos na tabela 22.

Tabela 22 - Valores obtidos para os teores de 5-CQA e cafeína nas diferentes amostras estudadas (n=3)

Espécie	Proveniência	5-CQA (% (m/m))*	CV	Cafeína (% (m/m))*	CV
Robusta	Indonésia	3,94 ± 0,05	1,15	2,42 ± 0,02	0,98
	Uganda	4,88 ± 0,02	0,39	2,64 ± 0,01	0,14
	Vietname	5,56 ± 0,06	1,10	2,90 ± 0,03	1,13
Arábica	Brasil	4,50 ± 0,02	0,49	1,53 ± 0,02	1,63
	Honduras	4,38 ± 0,04	0,93	1,44 ± 0,03	1,91

* resultados expressos em “g de analito / g de amostra seca x100”

Os teores de 5-CQA, obtidos para as diferentes amostras analisadas, encontram-se de acordo com o descrito na literatura, com valores próximos de 4,5% (m/m) para as espécies arábica e valores próximos a 5% (m/m) para as espécies robusta, com exceção da amostra proveniente da Indonésia. Esta amostra apresenta um teor de 5-CQA inferior ao esperado, contudo, a composição do café verde é afetada por diversos fatores, entre os quais se encontram, por exemplo, o clima e as práticas agrícolas [62].

Os teores de cafeína obtidos encontram-se igualmente de acordo com o descrito na literatura, tendo sido obtidos valores superiores para as espécies robusta, com valores próximos a 2,5% (m/m), enquanto que as espécies arábica apresentam valores próximos a 1,5% (m/m).

Adicionalmente, foi realizado um ensaio de recuperação com uma das amostras analisadas, a espécie robusta proveniente na Indonésia, para verificar o possível efeito de matriz do café verde. Para a realização deste estudo adicionou-se uma concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, de 5-CQA e cafeína, ao extrato de café verde, após a preparação e filtração do mesmo. Os resultados obtidos, referentes à concentração dos analitos no extrato antes e depois da adição padrão e à percentagem de recuperação, encontram-se descritos na tabela 23.

Tabela 23 – Concentração de 5-CQA e cafeína num extrato de café verde robusta (Indonésia), de concentração 0,5 g / 100 mL, antes e após a adição padrão, e percentagem de recuperação registada.

	5-CQA	Cafeína
Concentração _(sem adição padrão) $\times 10^{-4} / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	1,85 ± 0,10	1,99 ± 0,07
Concentração _(após adição padrão) $\times 10^{-4} / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	2,84 ± 0,14	2,95 ± 0,08
Concentração adicionada $\times 10^{-4} / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	1,00	1,00
% de recuperação	98,6	96,1

Como é possível observar, para ambos os analitos estudados, a percentagem de recuperação obtida é superior a 96%, confirmando a ausência de um efeito matriz durante a análise dos extratos de café verde, o que reforça a seletividade da metodologia desenvolvida.

4. Conclusão

A implementação de um sistema cromatográfico de baixa pressão com deteção amperométrica revelou-se eficaz para a separação e identificação de compostos antioxidantes presentes no café verde. A separação cromatográfica foi realizada com recurso a uma coluna monolítica de 1 cm, enquanto que a deteção amperométrica foi realizada com recurso a um sistema de 3 eléctrodos, recorrendo-se ao eléctrodo de diamante dopado com boro como eléctrodo de trabalho.

Os ensaios de voltametria cíclica realizados com os dois antioxidantes mais predominantes do café verde, o 5-CQA e a cafeína, permitiram observar os sinais de oxidação destes analitos em meios com diferentes valores de pH. Verificou-se que os sinais de oxidação dos analitos em estudo apresentavam maior intensidade em meios mais ácidos. Os valores de potencial de oxidação foram de +1,2 V e +1,5 V para o 5-CQA e a cafeína, respetivamente.

No estudo do ajuste do pH e da força iónica do eluato, constatou-se que a solução de 1 mol·dm⁻³ de HCl foi a que melhor correspondeu aos objetivos pretendidos. A utilização de um meio ácido no momento de deteção revelou ser importante para um aumento da sensibilidade do eléctrodo de trabalho e estabilidade de resposta.

A separação cromatográfica dos sinais relativos ao 5-CQA e à cafeína foi obtida quando se utilizou uma fase móvel de constituição 2,5% (v/v) de acetonitrilo, 0,15% (v/v) de CH₃COOH e HCl para obtenção de pH=2,5.

A deteção amperométrica dos analitos foi realizada por aplicação de uma diferença de potencial de +1,6 V, valor ao qual foi possível observar os sinais de oxidação do 5-CQA e da cafeína.

As condições selecionadas para a realização dos ensaios cromatográficos permitiram a separação de sete antioxidantes presentes no café verde, tendo-se identificado seis destes: 3-CQA, 5-CQA, cafeína, 4-CQA, *cis*-5-CQA e 5-FQA. A identificação destes compostos antioxidantes baseou-se nos resultados obtidos no estudo do comportamento eletroquímico de cada espécie identificada e na comparação dos fragmentos obtidos por HPLC-DAD-ESI-MS/MS com os descritos na literatura.

Com a metodologia desenvolvida ao longo deste trabalho realizou-se a quantificação do 5-CQA e da cafeína recorrendo ao método da curva de calibração construída a partir de uma gama de concentrações compreendida entre 1x10⁻⁴ e 3x10⁻⁴ mol·dm⁻³. Para o 5-CQA, os valores obtidos para o limite de quantificação (L.Q.) e de deteção (L.D.) foram de 30,8 µmol·dm⁻³ e 9,25 µmol·dm⁻³, respetivamente, e o coeficiente de correlação linear obtido foi de 0,9994. Para a cafeína, o coeficiente de

correlação linear obtido foi de 0,9997 e os valores de L.Q e L.D foram $22,4 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ e $6,73 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, respetivamente.

A quantificação destes dois antioxidantes foi realizada em 5 amostras de café verde, duas da espécie arábica e três de espécie robusta, todas de diferentes origens de cultivo. Os teores de 5-CQA obtidos para as amostras de café robusta são, na sua maioria, valores próximos de 5% (m/m), enquanto que nas amostras de café arábica estes valores encontram-se próximos de 4,5% (m/m). A quantificação da cafeína, nestas mesmas amostras, evidenciou uma maior concentração deste antioxidante em amostras de café robusta, de valor próximo a 2,5% (m/m), comparativamente às amostras de café arábica, cujos teores obtidos foram próximos de 1,5% (m/m).

A metodologia desenvolvida ao longo deste trabalho permitiu a separação, identificação e determinação de 6 compostos antioxidantes conhecidos do café verde, podendo ser uma alternativa válida às metodologias de HPLC-DAD, normalmente utilizadas para este efeito. A substituição de uma metodologia HPLC-DAD por LPC-ED contribui para uma diminuição dos custos com os equipamentos e reagentes envolvidos, bem como uma redução no tempo de análise e redução dos custos por análise.

5. Referências

- (1) Grigg, D. "The Worlds of Tea and Coffee: Patterns of Consumption". *GeoJournal* **2002**, 57 (4), 283–294.
- (2) Pacetti, D.; Lucci, P.; Frega, N. G. "Unsaponifiable Matter of Coffee", *Coffee in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc., **2015**.
- (3) Farah, A.; Dos Santos, T. F. "The Coffee Plant and Beans: An Introduction", *Coffee in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc., **2015**.
- (4) Baspinar, B.; Eskici, G.; Ozcelik, A. O. "How Coffee Affects Metabolic Syndrome and Its Components". *Food Funct.*, **2017**, 8 (6), 2089–2101.
- (5) Franca, A. S.; Mendonça, J. C. F.; Oliveira, S. D. "Composition of Green and Roasted Coffees of Different Cup Qualities". *LWT - Food Science and Technology.*, **2005**, 38 (7), 709–715.
- (6) O'Keefe, J. H.; DiNicolantonio, J. J.; Lavie, C. J. "Coffee for Cardioprotection and Longevity". *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **2018**, 61 (1), 38–42.
- (7) Wei, F.; Tanokura, M. "Chemical Changes in the Components of Coffee Beans during Roasting". *Coffee in Health and Disease Prevention*, Elsevier Inc., **2015**.
- (8) Wang, X.; Lim, L. T. "Physicochemical Characteristics of Roasted Coffee". *Coffee in Health and Disease Prevention*, **2015**, 247–254.
- (9) Kleinwächter, M.; Bytof, G.; Selmar, D. "Coffee Beans and Processing". *Coffee in Health and Disease Prevention*, Elsevier Inc., **2015**.
- (10) Gogoasa, I.; Alexandra, P.; Maria, A. L.; Ariana, V.; Maria, R.; Maria, D.; Diana, M.; Simion, A.; Gergen, I. "The Mineral Content of Different Coffee Brands". *J. Hortic. For. Biotechnol.*, **2013**, 17 (4), 68–71.
- (11) Cano-Marquina, A.; Tarín, J. J.; Cano, A. "The Impact of Coffee on Health". *Maturitas*, **2013**, 75 (1), 7–21.
- (12) De Castro, R. D.; Marraccini, P. "Cytology, Biochemistry and Molecular Changes during Coffee Fruit Development". *Brazilian J. Plant Physiol.*, **2006**, 18 (1), 175–199.
- (13) Kraehenbuehl, K.; Page-Zoerkler, N.; Mauroux, O.; Gartenmann, K.; Blank, I.; Bel-Rhliid, R. "Selective Enzymatic Hydrolysis of Chlorogenic Acid Lactones in a Model

- System and in a Coffee Extract". Application to Reduction of Coffee Bitterness, *Food Chem.* **2017**, 218, 9–14.
- (14) De Oliveira Petkowicz, C. L. "Polysaccharides in Coffee and Their Relationship to Health: An Overview", *Coffee in Health and Disease Prevention*, Elsevier Inc., 2014.
- (15) Moreira, A. S. P.; Nunes, F. M.; Domingues, M. R.; Coimbra, M. A. "Coffee Melanoidins: Structures, Mechanisms of Formation and Potential Health Impacts", *Food Funct.*, **2012**, 3 (9), 903–915.
- (16) Catelani, T. A.; Páscoa, R. N. M. J.; Santos, J. R.; Pezza, L.; Pezza, H. R.; Lima, J. L. F. C.; Lopes, J. A. "A Non-Invasive Real-Time Methodology for the Quantification of Antioxidant Properties in Coffee During the Roasting Process Based on Near-Infrared Spectroscopy", *Food Bioprocess Technol.*, **2017**, 10 (4), 630–638.
- (17) Ky, C. L.; Louarn, J.; Dussert, S.; Guyot, B.; Hamon, S.; Noiro, M. "Caffeine, Trigonelline, Chlorogenic Acids and Sucrose Diversity in Wild *Coffea Arabica* L. and *C. Canephora* P. Accessions", *Food Chem.*, **2001**, 75 (2), 223–230.
- (18) Narita, Y.; Inouye, K. "Chlorogenic Acids from Coffee", *Coffee in Health and Disease Prevention*, Elsevier Inc., **2015**.
- (19) Trugo, L. C.; Macrae, R. "A Study of the Effect of Roasting on the Chlorogenic Acid Composition of Coffee Using HPLC", *Food Chem.*, **1984**, 15 (3), 219–227.
- (20) Augustine, D. A.; Bent, G.-A. "Reducing Acrylamide Exposure: A Review of the Application of Sulfur-Containing Compounds - A Caribbean Outlook", *Eur. J. Nutr. Food Saf.*, **2019**, 9 (3), 192–209.
- (21) Vinson, J. A.; Chen, X.; Garver, D. D. "Determination of Total Chlorogenic Acids in Commercial Green Coffee Extracts", *J. Med. Food*, **2019**, 22 (3), 314–320.
- (22) Navarra, G.; Moschetti, M.; Guarrasi, V.; Mangione, M. R.; Militello, V.; Leone, M. "Simultaneous Determination of Caffeine and Chlorogenic Acids in Green Coffee by UV/Vis Spectroscopy", *J. Chem.*, **2017**, 2017.
- (23) Tuhkanen, T.; Ignatev, A. "Humic and Fulvic Compounds", 3rd edition, Elsevier Inc., **2019**.
- (24) Banerjee, S.; Mazumdar, S. "Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte",

Int. J. Anal. Chem. **2012**, 2012, 1–40.

- (25) Skeggs, L. T. "An Automatic Method for Colorimetric Analysis", *J. Agric. Food Chem.*, **1957**, 28, 311–322.
- (26) Ruzicka, J.; Hansen, E. H. "Flow Injection Analysis Part 1. a New Concept of Fast Continuous Flow Analysis", *Anal. Chim. Acta.*, **1975**, 78, 145–157.
- (27) Ruzicka, J.; Marshall, G. D. "Sequential Injection: A New Concept for Chemical Sensors, Process Analysis and Laboratory Assays", *Anal. Chim. Acta* **1990**, 237 (C), 329–343.
- (28) Reis, B. F.; Giné, M. F.; Zagatto, E. A. G.; Lima, J. L. F. C.; Lapa, R. A. "Multicommutation in Flow Analysis. Part 1. Binary Sampling: Concepts, Instrumentation and Spectrophotometric Determination of Iron in Plant Digests", *Anal. Chim. Acta*, **1994**, 293 (1–2), 129–138.
- (29) Ruzicka, J. "Lab-on Valve: Universal Microflow Analyzer Based on Sequential and Bead Injection", *Analyst*, **2000**, 125 (6), 1053–1060.
- (30) Sammani, M. S.; Clavijo, S.; González, A.; Cerdà, V. "Development of an On-Line Lab-on-Valve Micro-Solid Phase Extraction System Coupled to Liquid Chromatography for the Determination of Flavonoids in Citrus Juices", *Anal. Chim. Acta*, **2019**, 1082, 56–65.
- (31) Ettre, L. S.; Sakodynskii, K. I. M . S . "Tswett and the Discovery of Chromatography I: Early Work (1899-1903)", *Chromatographia*, **1993**, 35, 223–231.
- (32) Taylor, T. I.; Urey, H. C. "Fractionation of the Lithium and Potassium Isotopes by Chemical Exchange with Zeolites", *J. Chem. Phys.*, **1938**, 6 (8), 429–438.
- (33) Martin, A. J. P.; Synge, R. L. M. "A New Form of Chromatogram Employing Two Liquid Phases. 1. A Theory of Chromatography 2. Application to the Micro-Determination of the Higher Monoamino-Acids in Proteins". *Trends Biochem. Sci.*, **1941**, 2 (11), 1358–1368.
- (34) Guillarme, D.; Veuthey, J.-L. "Theory and Practice of UHPLC and UHPLC–MS", Elsevier Inc., 2017.
- (35) Viklund, C.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J.; Irgum, K. "Monolithic, "Molded", Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations, Catalysis, or Solid-Phase Chemistry: Control of Porous Properties during Polymerization", *Chem.*

Mater., **1996**, 8 (3), 744–750.

- (36) Hart, J. P.; Jordan, P. H. "Low-Pressure Liquid Chromatography with Electrochemical Detection for the Determination of Vitamin a in a Multi-Vitamin Preparation", *Analyst*, **1989**, 114 (December), 1633–1635.
- (37) Šatínský, D.; Solich, P.; Chocholouš, P.; Karlíček, R. "Monolithic Columns - A New Concept of Separation in the Sequential Injection Technique", *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 499 (1–2), 205–214.
- (38) Idris, A. M. "The Second Five Years of Sequential Injection Chromatography: Significant Developments in the Technology and Methodologies", *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **2014**, 44 (3), 220–232.
- (39) García Jiménez, J. F.; Carmen Valencia, M.; Capitán-Vallvey, L. F. "Parabens Determination with a Hybrid FIA/HPLC System with Ultra-Short Monolithic Column", *J. Anal. Chem.*, **2010**, 65 (2), 188–194.
- (40) Mistry, K.; Grinberg, N. "Application of Monolithic Columns in High Performance Liquid Chromatography", *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2005**, 28 (7–8), 1055–1074.
- (41) Connolly, D.; Victory, D.; Paull, B. "Rapid, Low Pressure, and Simultaneous Ion Chromatography of Common Inorganic Anions and Cations on Short Permanently Coated Monolithic Columns", *J. Sep. Sci.*, **2004**, 27 (10–11), 912–920.
- (42) Victory, D.; Nesterenko, P.; Paull, B. "Low-Pressure Gradient Micro-Ion Chromatography with Ultra-Short Monolithic Anion Exchange Column", *Analyst* **2004**, 129 (8), 700–701.
- (43) Santos, J. R.; Rangel, A. O. S. S. "Development of a Chromatographic Low Pressure Flow Injection System Using Amperometric Detection: Application to the Analysis of Niacin in Coffee", *Food Chem.*, **2015**, 187, 152–158.
- (44) Sousa, M. B. T.; Santos, J. R.; Almeida, P. J.; Rodrigues, J. A. "Low Pressure Ion Pair Chromatography with Amperometric Detection for the Determination of Trigonelline in Coffee Samples", *Food Res. Int.*, **2018**, 114 (August), 223–229.
- (45) Izutsu, K. "Overview of Electrochemical Techniques", *Electrochemistry in Nonaqueous Solutions*, **2002**; Vol. 5, pp 109–165.
- (46) Lourencao, B. C.; Medeiros, R. A.; Fatibello-Filho, O. "Simultaneous Determination of Antihypertensive Drugs by Flow Injection Analysis Using Multiple

- Pulse Amperometric Detection with a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode", *J. Electroanal. Chem.*, **2015**, 754, 154–159.
- (47) Wells, D. A.; Prep, S.; Company, S.; Paul, S. "Bioanalytical Applications : Solid-Phase Extraction", *Elsevier Inc.*, **2013**.
- (48) Alves, S. T.; Carlos, R.; Dias, E.; Benassi, D. T.; Agrônômico, I.; Pr, L. "Metodologia Para Análise Simultânea de Ácido Nicotínico, Trigonelina, Ácido Clorogénico e Cafeína Em Café Torrado Por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", *Quim. Nova*, **2006**, 29 (6), 1164–1168.
- (49) *Norma ISO 6673 Green Coffee - Determination of Loss in Mass at 105°C*; 2003.
- (50) Yardim, Y.; Keskin, E.; Zühre, Ş. "Voltammetric Determination of Mixtures of Caffeine and Chlorogenic Acid in Beverage Samples Using a Boron-Doped Diamond Electrode", *Talanta*, **2013**, 116, 1010–1017.
- (51) Alpar, N.; Yardim, Y.; Şentürk, Z. "Selective and Simultaneous Determination of Total Chlorogenic Acids, Vanillin and Caffeine in Foods and Beverages by Adsorptive Stripping Voltammetry Using a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode", *Sensors and Actuators B*, **2018**.
- (52) Švorc, L. "Determination of Caffeine: A Comprehensive Review on Electrochemical Methods", *Int. J. Electrochem. Sci.*, **2013**, 8, 5755–5773.
- (53) Švorc, L.; Tomčík, P.; Svítková, J.; Rievaj, M.; Bustin, D. "Voltammetric Determination of Caffeine in Beverage Samples on Bare Boron-Doped Diamond Electrode". *Food Chem.*, **2012**, 135 (3), 1198–1204.
- (54) Santos, J. R.; Rangel, A. O. S. S. "Development of a Chromatographic Low Pressure Flow Injection System: Application to the Analysis of Methylxanthines in Coffee". *Anal. Chim. Acta*, **2012**, 715, 57–63.
- (55) García, M. C.; Hogenboom, A. C.; Zappey, H.; Irth, H. "Effect of the Mobile Phase Composition on the Separation and Detection of Intact Proteins by Reversed-Phase Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry", *J. Chromatogr. A*, **2002**, 957 (2), 187–199.
- (56) Clifford, M. N.; Wu, W.; Kuhnert, N. "The Chlorogenic Acids of *Hemerocallis*", *Food Chem.*, **2006**, 95 (4), 574–578.
- (57) Mehari, B.; Redi-abshiro, M.; Singh, B.; Combrinck, S.; Atlabachew, M.; Mccrindle, R. "Profiling of Phenolic Compounds Using UPLC – MS for Determining the

- Geographical Origin of Green Coffee Beans from Ethiopia", *J. Food Compos. Anal.*, **2016**, *45*, 16–25.
- (58) Ncube, E. N.; Mhlongo, M. I.; Piater, L. A.; Steenkamp, P. A.; Dubery, I. A.; Madala, N. E. "Analyses of Chlorogenic Acids and Related Cinnamic Acid Derivatives from *Nicotiana Tabacum* Tissues with the Aid of UPLC-QTOF-MS/MS Based on the in-Source Collision-Induced Dissociation Method". *Chem. Cent. J.*, **2014**, *8* (1), 1–10.
- (59) Craig, A. P.; Fields, C.; Liang, N.; Kitts, D.; Erickson, A. "Performance Review of a Fast HPLC-UV Method for the Quantification of Chlorogenic Acids in Green Coffee Bean Extracts", *Talanta*, **2016**, *154*, 481–485.
- (60) Fujioka, K.; Shibamoto, T. "Chlorogenic Acid and Caffeine Contents in Various Commercial Brewed Coffees", *Food Chem.*, **2008**, *106* (1), 217–221.
- (61) Miller, J. N.; Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Sixth edit.; Pearson Education Limited, **2010**.
- (62) Rostagno, M. A.; Celeghini, R. M. S.; Debien, I. C. N.; Nogueira, G. C.; Meireles, M. A. A. "Phenolic Compounds in Coffee Compared to Other Beverages", *Coffee in Health and Disease Prevention*, Elsevier Inc., **2015**.