



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR CLUE-EM-EM PARA DETECÇÃO DE ADULTERANTES EM CAFÉ

V.C. Martins¹, R.L.O. Godoy², A.C.M.S. Gouvêa², M.C.P.A. Santiago², C.C. Couto³, O.F. Silva⁴

1- Departamento de Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia – CEP: 23890-000 – Seropédica – RJ – Brasil, Telefone: 55 (21) 2682-1023 – Fax: 55 (21) 3787-3742 – e-mail: (victor.dcmartins@gmail.com)

2- Embrapa Agroindústria de Alimentos – CEP: 23020-470 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil, Telefone: 55 (21) 3622-9775 – Fax: 55 (21) 2410-1090 – e-mail: (ronoel.godoy@embrapa.br; acristinagouvea@hotmail.com; manuela.santiago@embrapa.br)

3- Departamento de Ciência dos Alimentos – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CEP: 22290-180 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil, Telefone: 55 (21) 2542-7418 – e-mail: (cinthiaccouto@gmail.com)

4- Embrapa Agroindústria de Alimentos – CEP: 23020-470 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil, Telefone: 55 (21) 3622-9645 – Fax: 55 (21) 2410-1090 – e-mail: (otniel.freitas@embrapa.br)

RESUMO – Com um aumento crescente da produção e consumo em escala mundial, o café tem sido investigado com o intuito de minimizar os prejuízos à sua qualidade, como as recorrentes práticas de adulteração. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência e Espectrometria de Massas Sequencial (CLUE-EM-EM) e determinar marcadores químicos para diferentes adulterantes do café comercial. O método por Cromatografia com Interação Hidrofílica (CIH) apresentou melhor resolução cromatográfica, sendo utilizado para analisar os grãos de arroz, milho, cevada e soja, após processamento térmico similar ao café, quanto à presença de diferentes carboidratos. Através da razão massa/carga e do perfil de fragmentação, foi confirmada a diferenciação da soja por rafinose e estaquiose; milho por maltose; e arroz e cevada por maltotriose. Estes resultados possibilitarão a obtenção de análises mais precisas, sendo ainda necessário estudos com misturas em proporções conhecidas do café e dos adulterantes.

ABSTRACT – Due to the worldwide increasing production and consumption, coffee has been investigated with the purpose of minimize the damage to its quality, as the widespread practices of adulteration. The aim of this study was to develop a methodology by Ultra Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry Tandem (UPLC-MS-MS) and determine chemical markers for different adulterants in commercial coffee. The method by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) showed better chromatographic resolution, and the grains of rice, corn, barley and soybean, after thermal process similar to coffee, were analyzed for the presence of different carbohydrates. By mass/charge ratio and fragmentation profile, it was confirmed the differentiation of soybean by raffinose and stachyose; corn by maltose; and barley and rice by maltotriose. These results will make it possible to obtain more precise analysis, but it is still necessary studies with mixtures of known proportions of coffee and adulterants.

PALAVRAS-CHAVE: fraudes; identificação; fragmentação; alta resolução.

KEYWORDS: frauds; identification; fragmentation; high resolution.



1. INTRODUÇÃO

Os frutos do cafeeiro, pertencente à família Rubiaceae, são responsáveis por prover uma das bebidas mais apreciadas em todo o mundo e cujo consumo e produção em escala mundial apresentaram um aumento crescente nas últimas décadas. A qualidade do café pode ser influenciada por diferentes fatores, como a espécie botânica utilizada, as condições do processo de torrefação e até a ocorrência de adulterações (França et al., 2005; Gonzalez-Rios et al., 2007; ABIC, 2015; ICO, 2015).

Desde 1851, são observados relatos de fraudes em café por adição de matérias-primas de menor custo, como raiz de chicória, milho e cevada, e atualmente diversos órgãos internacionais e nacionais tem atuado na garantia da qualidade do café (Lancet, 1851; Oliveira et al., 2015). Até o início de 2013, a Instrução Normativa de nº16 de 24 de maio de 2010 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2010) encontrava-se em vigor e reprovava cafés torrados em grãos e cafés torrados e moídos quando estes apresentam teor de impurezas, sedimentos e matérias estranhas igual ou superior a 1,0%. Há uma forte tendência para que entre em vigor uma instrução normativa mais rígida, sendo necessário o desenvolvimento de métodos que empreguem técnicas analíticas com maior sensibilidade e seletividade.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de detecção por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial (CLUE-EM-EM) e determinar os carboidratos marcadores de adulteração por adição de arroz, milho, soja e cevada em café comercial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais, Solventes e Equipamentos

Para o desenvolvimento do método cromatográfico, foram adotados inicialmente padrões, da marca Sigma-Aldrich® (Alemanha), dos carboidratos mencionados por Santiago et al. (2012):

Tabela 1 – Relação entre os carboidratos e os prováveis adulterantes utilizados.

Analitos	Massa Molar (g.mol ⁻¹)	Íon Molecular [M+Na] ⁺	Indicativo de Adição
Maltose	342,1162	365,1059	Milho
Rafinose	504,1690	527,1587	Soja
Estaquiose	666,2218	689,2115	
Kestose	504,1690	527,1587	Cevada
Nistose	666,2218	689,2115	

Fonte: Os autores.

Os solventes utilizados foram acetonitrila e metanol, grau LC-MS, e ácido fórmico, grau de pureza 98-100%, da Merck® (Alemanha). A água purificada empregada nos experimentos foi obtida pelo sistema de purificação de água Milli-Q® Gradient 10A Millipore® e Elix® /RiOs™ 5 (EUA). Adquiriram-se também grãos de café torrado, milho, soja, cevada e arroz integral no comércio varejista da cidade do Rio de Janeiro – RJ.

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de ultra eficiência Acquity UPLC® acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução Synapt®, modelo G1, com ionização por eletronebulização e analisadores do tipo quadrupolo e tempo de voo (QTdV), da Waters® (EUA),



e colunas Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ (2,1 mm x 150 mm, 1,7 µm), da Waters[®] (EUA), e Kinetex[®] HILIC 100Å (2,1 mm x 50 mm, 1,7 µm), da Phenomenex[®] (EUA).

2.2 Experimental

Preparo de solução-padrão: Foi pesado 1 mg de cada padrão de carboidrato em balão volumétrico de 50,00 mL, resultando em uma solução-padrão com concentração de 20 µg.mL⁻¹. Realizou-se ainda uma diluição 1:4 (v/v) para obtenção de solução-padrão igual a 5 µg.mL⁻¹ de cada carboidrato. Outra solução foi preparada de maneira similar utilizando como solvente um extrato cafeeiro obtido a partir da aplicação da metodologia de Macrae (1998) em grãos de café torrados.

Determinação do método por CLUE-EM-EM: O método cromatográfico foi estabelecido através de um estudo com o emprego de diferentes tipos de fase estacionária; tipos de solventes e de composição da fase móvel, em % v/v; do volume de vazão, em mL.min⁻¹; e da temperatura da coluna, em °C. Foi adotado o método por Cromatografia com Interação Hidrofílica (CIH), com a utilização de coluna HILIC e fase móvel em gradiente de acetonitrila e solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (v/v), conforme Tabela 2, com os parâmetros volume de injeção de 1,0 µL, fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, temperatura da coluna de 35°C e tempo de corrida de 10 min. As condições do espectrômetro de massas foram empregadas de acordo com Martins et al. (2015), com a detecção dos íons moleculares referentes aos adutos de sódio [M+Na]⁺ e fragmentação por energias de colisão de 15,0 V para os íons de m/z 365, 25,0 V para íons de m/z 527 e 30,0 V para íons de m/z 689.

Tabela 2 – Composição da fase móvel: acetonitrila (A) e solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (B).

Tempo de Corrida (min)	A	B
0,0	92,0	8,0
2,9	92,0	8,0
3,0	90,0	10,0
6,8	90,0	10,0
7,3	60,0	40,0
8,3	60,0	40,0
8,8	92,0	8,0
10,0	92,0	8,0

Fonte: Os autores.

Torrefação dos adulterantes do café: Os grãos de milho, cevada, arroz e soja foram encaminhados para o Laboratório de Micologia, localizado na Planta-Piloto de Pós-Colheita da Embrapa Agroindústria de Alimentos, onde foram submetidos ao tratamento térmico similar ao utilizado para torrefação do grão de café verde e obtidas amostras moídas com coloração semelhante ao café comercial.

Análise de açúcares solúveis: A partir das amostras *in natura* e torradas, foram obtidos, pelo método de Macrae (1998), extratos de açúcares para milho, cevada e arroz. Para o estudo com soja, adotou-se o método abordado por Oliveira et al. (2010) devido ao seu conteúdo proteico. Procedeu-se, portanto, a verificação por CLUE-EM-EM da presença e ausência dos analitos, antes e após o processamento térmico, determinando os carboidratos específicos como marcador de adulteração para cada tipo de grão.

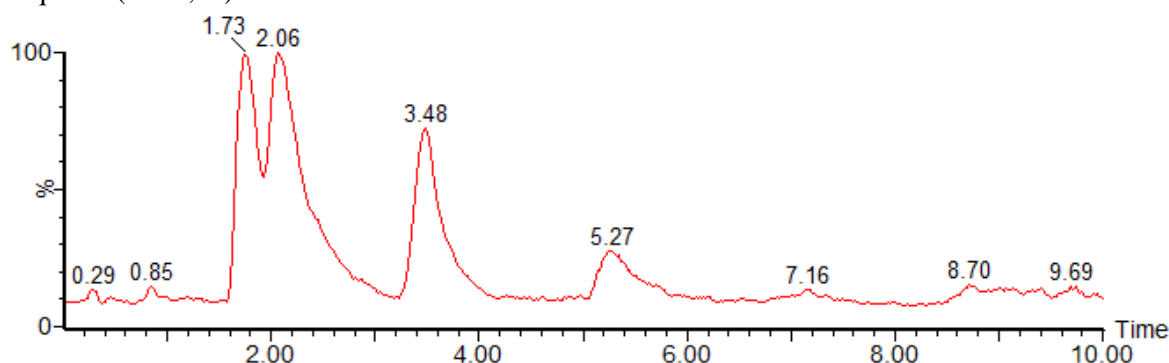


3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram desenvolvidos dois métodos cromatográficos tanto por Fase Reversa (FR), utilizando coluna contendo fase estacionária C_{18} , quanto por CIH através do uso de coluna de sílica. O primeiro método mostrou-se inviável devido à baixa repetitividade dos tempos de retenção dos analitos em corridas cromatográficas realizadas em diferentes dias. Segundo Walter et al. (2005), a perda de resolução está relacionada com a interrupção e o reinício do fluxo de fase móvel altamente aquosa (acima de 90% v/v) em colunas de fase reversa, sobretudo aquelas que possuem poros de diâmetros médios menor que 20 nm, como as colunas para CLUE. Quando o fluxo cessa, a pressão liberada favorece a saída da fase móvel dos poros da fase estacionária apolar, principalmente na saída da coluna, região mais próxima à pressão atmosférica, o que diminui a interação entre fase estacionária e fase móvel.

O segundo método, por CIH, apresentou boa resolução cromatográfica e maior estabilidade entre corridas cromatográficas e dias de análise e, por este motivo, foi adotado para o estudo dos adulterantes. A Figura 1 refere-se ao cromatograma da solução-padrão em água, cujo perfil foi similar para a solução-padrão em extrato cafeeiro.

Figura 1 – Cromatograma do pico base, por CLUE-EM, da solução-padrão a $5,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em água, com detecção da maltose ($t_r - 0,85$), kestose ($t_r - 1,73$), rafinose ($t_r - 2,06$), nistose ($t_r - 3,48$) e estaquiiose ($t_r - 5,27$).



Fonte: Os autores.

Após a determinação do método, foi realizado o estudo de cada adulterante, verificando o possível efeito do processamento térmico. Os resultados estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 – Detecção dos analitos, por CLUE-EM-EM, nas matrizes *in natura* e torrada.

Matriz	Condições	Íons observados
Arroz	<i>In natura</i>	Presença de rafinose
	230°C por 50 min	Ausência de rafinose
Milho	<i>In natura</i>	Presença de maltose e rafinose
	250°C por 30 min	Presença de maltose
Cevada	<i>In natura</i>	Presença de kestose, rafinose e nistose
	230°C por 100 min	Ausência de kestose, rafinose e nistose
Soja	<i>In natura</i>	Presença de rafinose e estaquiiose
	245°C por 15 min	Presença de rafinose e estaquiiose

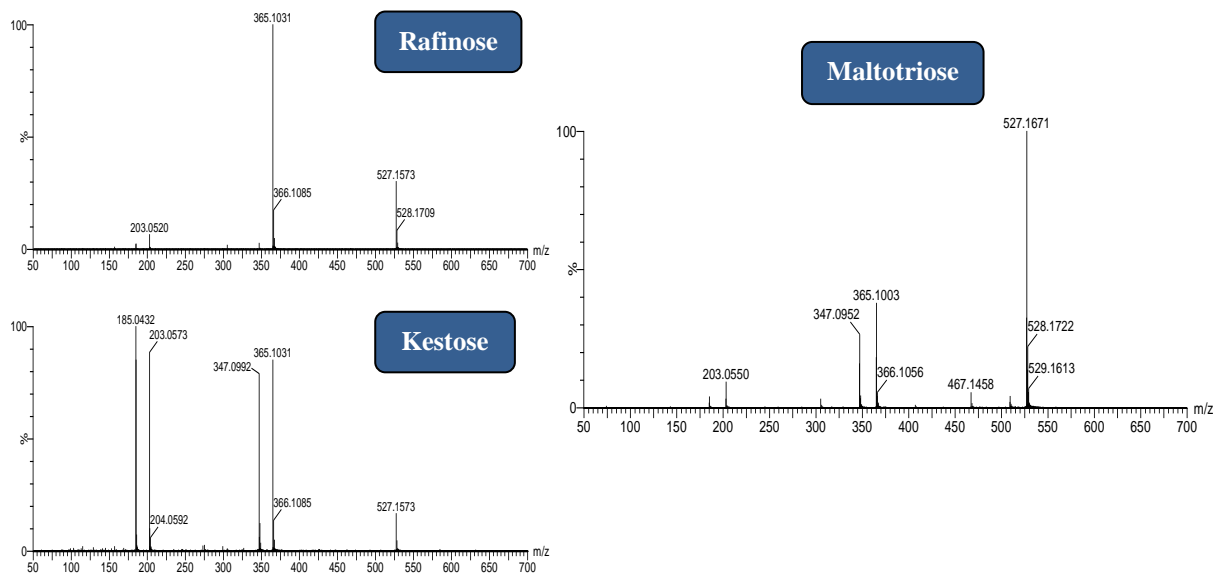
Fonte: Os autores.



Entre os adulterantes, a soja apresentou maior facilidade de diferenciação, sendo confirmada a possibilidade de detecção por rafinose e estaquiase, enquanto o extrato aquoso de milho foi o único em que foi possível identificar a presença de maltose, mesmo que em baixa intensidade. Destaca-se ainda a ausência dos analitos, sobretudo kestose e nistose, no teste com cevada torrada, podendo ser associado ao elevado tempo de exposição ao calor.

Os extratos de arroz, cevada e milho apresentaram ainda dois íons de m/z 527 e 689, que se referem aos isômeros de rafinose e kestose e de estaquiase e nistose. O íon de m/z 527 foi identificado como a maltotriose, pela razão m/z observada e pelo perfil de fragmentação. O íon molecular da maltotriose apresenta uma menor tendência à fragmentação do que a kestose e a rafinose, na energia de colisão de 25,0 V, conforme Figura 2.

Figura 2 – Comparação entre os espectros de massas sequencial (EM-EM) dos isômeros rafinose, kestose e maltotriose, sob energia de colisão de 25,0 V.



Fonte: Os autores.

Portanto, foi possível diferenciar os extratos de soja dos demais adulterantes através da comparação dos espectros de massa dos isômeros de m/z 527. O íon de m/z 689 apresentou comportamento similar a maltotriose, sendo necessário o estudo da fragmentação da maltotetraose.

4. CONCLUSÃO

A partir do acoplamento entre as técnicas de Cromatografia Líquida de Utra Eficiência e Espectrometria de Massas Sequencial, foi possível desenvolver dois métodos de detecção de oligossacarídeos, sendo o método de separação por cromatografia por interação hidrofílica apresentando maior reprodutibilidade quando comparado ao método por fase reversa. Além disso, o seguinte estudo do efeito da torrefação sobre os principais adulterantes do café comercial permitiu a confirmação da diferenciação entre a soja, cujo marcador é a rafinose e a estaquiase; o milho, que foi a única matriz a ser detectada a maltose; e o arroz e a cevada, em que a presença de apenas maltotriose pode ser considerada um indicativo da adição destes grãos. O preparo de misturas entre um café isento



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

de adulteração e estes materiais vegetais possibilitará a determinação do limite de detecção para cada adulterante e a verificação do efeito matriz sobre os analitos investigados.

5. AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro concedido.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIC - Associação Brasileira de Indústria de Café (2015). *Indicadores de Desempenho da Cafeicultura Brasileira*. Disponível em <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=52>
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2010). *Regulamento Técnico para o Café Torrado em Grão e para o Café Torrado e Moído* (Instrução Normativa nº 16, 24 de maio de 2010). Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- Franca, A. S., Mendonça, J. C. F., Oliveira, S. D. (2005). Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT - Food Science and Technology*, 38 (7), 709-715.
- Gonzalez-Rios, O., Suarez-Quiroz, M. L., Boulanger, R., Barel, M., Guyot, B., Guiraud, J., Schorr-Galindo, S. (2007). Impact of “ecological” post-harvest processing on coffee aroma: II. Roasted coffee. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 (3-4), 297-307.
- ICO - International Coffee Organization (2015). *Trade Statistic Tables*. Disponível em http://www.ico.org/trade_statistics.asp?section=Statistics
- Macrae, R (1998). *Food Science and Technology – A series of monographs: HPLC in food analysis* (2. ed.). Cambridge, Massachusetts: Academic Press.
- Martins, V. C., Godoy, R. L. O., Laudeauzer, C. M., Gôuvea, A. C. M. S., Santiago, M. C. P. A., Borguini, R. G., Pacheco, S., Nascimento, L. S. M., Braga, E. C. O. (2015). Definição de parâmetros em espectrometria de massas sequencial para detecção de fraudes em café. *Semioses*, 9 (1), 1-7.
- Oliveira, E. M. M., Farah, A., Silva, O. F., Souza, A. M., Santos, T. F., Santiago, M. C. P. A. (2015). *Coffee in Health and Disease Prevention - Chapter 105 - Overview of Currently Applied Techniques for Detection of Adulterants in Coffee and Potential Use of DNA-Based Methods as Promising New Analytical Tools*. San Diego: Academic Press.
- Oliveira, M. A., Carrão-Panizzi, M. C., Mandarino, J. M. G., Leite, R. S., Campos Filho, P. J., Vincentini, M. B. (2010). Quantificação de teores de açúcares, oligossacarídeos e amido em genótipos/cultivares de soja (*Glycine Max* (L) Merrill) especiais utilizados para alimentação humana. *Brazilian Journal of Food Technology*, 13 (1), 23-29.
- Santiago, M. C. P. A., Godoy, R. L. O., Licurgo, F. M. S., Rosa, J. S., Pacheco, S., Nascimento, L. S. M. (2012). Adaptations in HPLC method for fraud determination in coffee. In Proceedings of 7^o Encontro Nacional de Cromatografia, Porto, Portugal.
- The Lancet (1851). Coffee, and its adulterations. *The Lancet*, 57 (1427), 21-26.
- Walter, T. H., Iraneta, P., Capparella, M. (2005). Mechanism of retention loss when C₈ and C₁₈ HPLC columns are used with highly aqueous mobile phases. *Journal of Chromatography A*, 1075, 177-183.