

MÉTODOS DE ANÁLISE ORGÂNICA DO CAFÉ'. I. COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO *

H. V. AMORIM **
M. A. GUERCIO ***
J. G. CORTEZ ***
E. MALAVOLTA **

RESUMO

Três métodos de determinação do ácido clorogênico em café verde foram comparados. Foram utilizadas seis amostras de café, sendo que três de qualidade de bebida Mole e três Rio. Os resultados obtidos com os três métodos para os cafés Rio não diferiram estatisticamente entre si, embora os métodos de MOORES et al. e WEISS (oficial da AOAC) deram valores menores para os cafés Mole em relação ao método cromatográfico de GNAGY modificado. É discutido uma provável interferência da alta atividade da polifenol oxidase geralmente encontrada nos cafés Mole que oxidaria o ácido clorogênico durante a extração pelos dois primeiros métodos.

INTRODUÇÃO

O grão do café possui vários tipos de compostos fenólicos e os mais importantes, segundo a quantidade encontrada no grão, são os ácidos clorogênicos. A Figura 1. mostra a fórmula do ácido clorogênico e no Quadro 1 são apresentados alguns resultados sobre a quantidade destes compostos fenólicos no café verde, expressos em relação à matéria seca.

* Parte da tese apresentada à ESALQ, USP, para a obtenção do título de Doutor, pelo primeiro autor. Trabalho realizado com verba do convênio IBC/GERCA/ESALQ. Entregue para publicação em 5/12/73.

** Departamento de Química, Setor Bioquímica da ESALQ, USP, Piracicaba, S. P., Brasil.

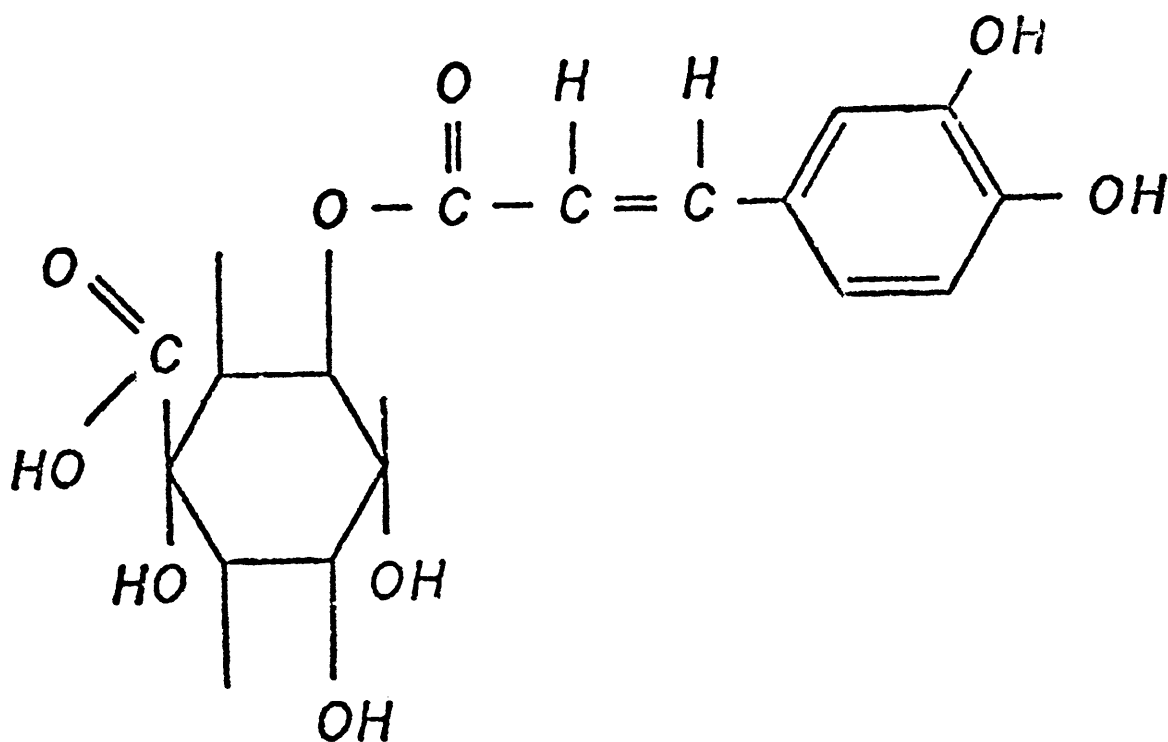
*** Bolsista da CNPq e IBC, respectivamente, junto ao Departamento de Química, Setor Bioquímica da ESALQ, USP.

Quadro 1 – Compostos fenólicos encontrados no grão de café, e variação dos teores segundo diversas fontes.

COMPOSTO FENÓLICO	QUANTIDADE	FONTE
Ácido clorogênico total	2 – 8 %	LOCKHART (1957)
	4,5 – 8,5 %	STREULI (1970)
	4,0 – 10,0 %	NAVELLIER (1970)
	7,6 %	FELDMAN et al. (1969)
Ácido clorogênico ou ác. 3 – cafeoilquínico	3,1 – 6,2 %	STREULI (1970)
	3,77 – 5,56%	FELDMAN et al. (1969)
Ác. criptoclorogênico ou ác. 4 – cafeoilquínico	0,42 – 0,44%	STREULI (1970)
	0,41%	FELDMAN et al. (1969)
Ác. neoclorogênico ou ác. 5 – cafeoilquínico	0,12 – 1,00%	STREULI (1970)
	0,88%	FELDMAN et al. (1969)
Ác. isoclorogênicos ou ác. 3–4, 3–5 e 4–5 dicafeoilquínico	0,35 – 1,40%	STREULI (1970)
	0,60%	FELDMAN et al. (1969)
Ácido cafêico	0,17 – 0,24%	FELDMAN et al. (1969)
	1,00%	LOCKHART (1957)

Segundo NAVELLIER (1970), o ácido clorogênico foi descoberto no café por Payesse em 1802, que lhe deu o nome de ácido cáfico. Posteriormente outros nomes foram dados ao ácido clorogênico como por exemplo, ácido cafetânico, aldeído verídico, tanino clorogênico, etc.

FIGURA 1 — Ácido clorogênico. A diferença com seus isômeros consiste na ligação do ácido cafêico com o ácido quínico, que é feita em carbonos diferentes.



No que se refere à determinação quantitativa dos ácidos clorogênicos, será dada ênfase à literatura de 10 a 12 anos passados, devido ao fato de que somente há 8 anos a estrutura destes isômeros foi elucidada (CORSE et al., 1965). A confusão na literatura sobre os ácidos clorogênicos é frequente devido à existência dos 6 isômeros, fato esse que pode ser apreciado nas discussões de SONDHEIMER et al. (1961) e CORSE et al. (1965).

NAVELLIER (1970) relatou e discutiu desde as primeiras tentativas de determinação do ácido clorogênico no café feitas há 60 anos atrás, até a metodologia mais sofisticada dos dias atuais.

Entre os métodos mais modernos e que têm sido aplicados atualmente encontra-se a adaptação feita por MOORES et al. (1948). Posteriormente esse método sofreu pequenas modificações (WEISS, 1957) e foi aceito pela A. O. A. C., embora até hoje não tenha sido considerado como método definitivo (A. O. A. C., 1970)

Em 1967, LEHMANN e HAHN (1967) descreveram um método no qual os grãos de café são extraídos com metanol e posteriormente o extrato é passado por uma coluna de poliamida onde os compostos interferentes são separados. No primeiro eluído da coluna pode-se determinar trigonelina; logo em seguida o ácido clorogênico é eluído e a solução é lida no espectrofotômetro a 324 nm.

Um outro método para separar e determinar quantitativamente os ácidos clorogênicos do café foi idealizado por GNAGY (1961 e 1962), onde se usa

cromatografia mono dimensional e se faz a leitura, em espectrofotometro a 328 nm, da intensidade da cor das manchas eluídas. Com esse método, o autor conseguiu separar quatro isômeros do ácido clorogênico.

O mais avançado método para separar e determinar quantitativamente os isômeros do ácido clorogênico, inclusive os 3 isômeros do ácido isoclorogênico, utiliza a cromatografia de gás como técnica (KUNG et al., 1967), empregando uma coluna capilar de 330 cm (SE - 54). A volatilização dos ácidos clorogênicos é feita reagindo os ácidos fenólicos com BSA (bis-(trimetilsilil)acetamida) e HMDSi (hexametildisilazane). Atualmente os autores trabalham com uma coluna 3% OV-101 que é bem mais barata e fácil de preparar e conseguem os mesmos resultados (J. T. KUNG, comunicação pessoal).

Todos esses métodos analíticos entretanto, foram adaptados sem levar em consideração a qualidade ou a idade da semente do café, e como a atividade de várias enzimas variam com o tempo pós-colheita e a qualidade da bebida (PEREIRA, 1962, AMORIM e SILVA, 1968, ROTEMBERG e IACHAN, 1971, 1972, SANINT e VALENCIA, 1972 e OLIVEIRA, 1972) seria justo investigar se os métodos mais utilizados na prática não sofrem interferência quando aplicados a diferentes tipos de café.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de café utilizadas (*Coffea arabica* L. var. Mundo Novo) neste ensaio foram colhidas no mesmo ano em diversas regiões do Estado de São Paulo. As provas de xícara para classificação foram feitas por provadores profissionais do IBC, São Paulo.

A percentagem de umidade foi determinada pelo método da A. O. A. C. (1970) com três repetições. Este café não foi empregado para determinação do ácido clorogênico, pois a temperatura de secagem, cerca de 100°C, destrói parte deste. A determinação da umidade foi efetuada com o objetivo de se calcular a quantidade de ácido clorogênico em relação à matéria seca.

Para os três métodos estudados, as amostras de café foram trituradas em um moinho Willey com peneira n.º 40 e imediatamente pesadas e o ácido clorogênico extraído.

O método de MOORES et al. (1948) e o método oficial da A. O. A. C. (1970) adaptado por WEISS (1957) foram empregados sem alteração. O método cromatográfico de GNAGY (1961 e 1962) foi modificado por AMORIM (1972) como segue: Dois gramas de café moído eram imediatamente extraídos com 100 ml de metanol a 80% (70 - 80°C) com refluxo por 2 horas. O resíduo era extraído mais três vezes nas mesmas condições. Os extratos eram juntados e volume era reduzido sob vácuo a 15 ml e guardado a -10°C sob atmosfera de nitrogênio até a hora de ser cromatografado.

Tomou-se 50 µl de cada amostra e aplicou-se em papel SCHLEICHER & SCHULL, DASSEL n.º 2043a. O solvente usado era uma mistura de n-butanol: ácido acético: água (4:1:2,2-v/v/v). Utilizou-se cromatografia monodimensional ascendente.

Os cromatogramas foram secos durante 15 minutos e em seguida recortavam-se as manchas vistas na luz ultra-violeta (longa) e eluia-se o material com 10 ml de metanol a 80% durante 30 minutos. As soluções eram filtradas (lá de vidro), a fim de remover fibras de celulose do papel, e lidas a 324 nm em espectrofotômetro Zeiss PM-QII.

A reta padrão era feita com ácido clorogênico aplicado no mesmo cromatograma, nas concentrações de 10 a 70 µg. Seguiu-se a mesma marcha das amostras para eluição e leituras .

Para o cálculo dos ácidos clorogênicos totais, utilizou-se a soma de seus isômeros. Eram feitos 3 cromatogramas para cada amostra, e em cada cromatograma, 3 repetições. Portanto, nove determinações para cada amostra.

Para a análise estatística utilizou-se os modelos aconselhados por PIMENTEL GOMES (1963).

RESULTADOS

O Quadro 1 mostra os resultados obtidos nas seis amostras e pelos três métodos com as respectivas repetições.

Dois delineamentos estatísticos foram feitos, um deles, cuja análise de variância aparece no Quadro 2. mostra que houve diferença significativa no teor de ácido clorogênico entre as amostras, considerando-se as médias dos três métodos. Também foi observado que houve uma diferença significativa entre os métodos. O teste de Tukey revelou que o método de MOORES et al. (1948) não diferiu do método de WEISS (1957), mas ambos diferiram estatisticamente do método cromatográfico de GNAGY (1961, 1962) modificado por AMORIM (1972) ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

O outro delineamento estatístico, cujo objetivo era determinar se havia diferença entre os métodos, considerando-se a qualidade da bebida do café, aparece no quadro 3. Pode-se observar que pelo teste F houve significância estatística para os tipos ou qualidade da bebida e para os métodos.

O teste Tukey foi empregado para as amostras de café Mole e Rio separadamente, e este revelou que para os cafés Rio não houve diferença significativa no teor de ácido clorogênico para os três métodos empregados. Entretanto, o teste de Tukey foi significativo ao nível de 1% de probabilidade quando se comparou os três métodos dentro dos cafés Mole. Tanto as médias das análises efetuadas pelo método de MOORES et al. (1948) como as do de WEISS (1957) diferiram ao nível de 1% das médias obtidas pelo método de GNAGY (1961, 1962) modificado por AMORIM (1972). O método de MOORES não foi estatisticamente diferente do de WEISS.

Quadro 1 — Teor de ácido clorogênico total (matéria seca) em grãos de café beneficiado de diferentes qualidades de bebida empregando-se tres métodos analíticos.

Número da amostra e qualidade da bebida	MOORES et al. (1948) % ácido clorogênico	M E T O D O S	
		WEISS (1957) oficial AOAC (1970) % ácido clorogênico	GNAGY (1961, 1962) modificado por AMORIM (1972) % ácido clorogênico
1 — MOLE	5,80	5,51	6,80
	5,94	5,61	6,49
	5,24	5,68	5,99
2 — MOLE	6,67	5,92	7,50
	6,69	5,90	7,20
	6,65	6,54	6,70
3 — MOLE	6,61	6,49	6,95
	6,47	6,56	6,50
	<u>6,41</u>	<u>6,45</u>	<u>6,42</u>
Média parcial	6,28 ^a	6,07 ^a	6,73 ^b
1 — RIO	6,37	6,87	6,76
	6,47	6,39	6,42
	6,51	6,43	6,22
2 — RIO	7,13	6,94	7,43
	6,97	6,66	7,11
	6,91	6,76	6,71
3 — RIO	6,59	6,47	6,67
	7,01	6,42	6,79
	<u>7,12</u>	<u>6,47</u>	<u>6,72</u>
Média parcial	6,79 ^a	6,60 ^a	6,76 ^a
Média Geral	6,54 ^a	6,34 ^a	6,75 ^b

a — não diferem estatisticamente entre si.

B — difere de "a" estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade (considerar as médias na horizontal).

Quadro 2 — Delineamento estatístico para o cálculo de significância onde se comparou as amostras e os métodos de uma maneira geral.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Amostras (A)	5	5,6265	1,1253	18,41**
Métodos (M)	2	1,4854	0,7427	12,16**
Interação (AxM)	10	1,8522	0,1852	3,03**
(Tratamentos)	(17)	8,9641	0,5273	
Resíduo	36	2,1990	0,0611	
T O T A L	53	11,1631		

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Quadro 3 — Delineamento estatístico visando a comparação entre tres métodos e as qualidades de bebida ou tipos de café.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tipos (T)	1	0,5725	0,5725	12,37**
Métodos (M)	2	0,4965	0,2482	5,36*
Interação (TxM)	2	0,2353	0,1176	2,54
(Tratamentos)	(5)	1,3043	0,2608	
Resíduo	12	0,5549	0,0462	
T O T A L	17	1,8592		

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

DISCUSSÃO

Pelos resultados apresentados no Quadro 1 e as análises de variância acompanhadas pelos testes de Tukey, pode-se observar que: a) Considerando-se os três métodos e as médias das determinações para as 6 amostras, o método cromatográfico deu valores superiores aos outros dois métodos e estatisticamente significativos, entretanto o método de MOORES et al. (1948) não diferiu do de WEISS (1957); b) os três métodos não diferiram entre si quando se considerou apenas os cafés Rio; c) para os cafés Mole, o método cromatográfico deu valores mais elevados do que os outros dois métodos que não diferiram significativamente entre si.

A diferença principal entre o método de MOORES et al. (1948) e o de WEISS (1957) é na extração do ácido clorogênico. MOORES extrai com água e temperatura ambiente e WEISS com água fervente e continua fervendo por 15 minutos. Estes dois métodos apresentam defeitos que podem influir na quantificação do ácido clorogênico em grãos de café. O uso da água a temperatura ambiente, possibilita a extração do complexo enzimático da polifenol oxidase que pode oxidar o ácido clorogênico. Pelo espectra do ácido clorogênico no U. V. pode-se notar que este quando oxidado não possui o pico a 324 nm, comprimento de onda utilizado para a determinação do ácido clorogênico pelos três métodos. Por outro lado, a extração a quente permite uma inativação parcial da polifenol oxidase durante os 10 primeiros minutos, pois AMORIM e SILVA (1968a) só conseguiram inativar a polifenol oxidase de grãos de café (em solução) com aquecimento à 95°C durante 10 minutos. ROTEMBERG e IACHAN (1972) observaram que a lacase nem a 100°C era inativada completamente.

Uma outra desvantagem da extração aquosa a quente e que pode levar a erros na determinação quantitativa é o fato de que o ácido clorogênico quando aquecido em meio aquoso em pH ao redor de 7,0, transforma-se em seus isômeros (J. T. Kung, comunicação pessoal). Os isômeros do ácido clorogênico não possuem o mesmo coeficiente de extinção. Em nosso laboratório (AMORIM e GUERCIO, não publicado), utilizando-se de metanol espectroscópico à 80% e um Zeiss PM-QII, foram obtidos os seguintes valores:

ácido clorogênico (NBC) $E \frac{1 \text{ mg}}{1 \text{ cm}} = 57$ e $E \frac{1 \text{ } \mu\text{mol}}{1 \text{ cm}} = 21,76$; ácido isclorogênico (K & K) $E \frac{1 \text{ cm}}{1 \text{ mg}} = 48,6$ e $E \frac{1 \text{ } \mu\text{mol}}{1 \text{ cm}} = 25,41$.

O método cromatográfico de GNAGY (1961, 1962) modificado por AMORIM (1972) não sofre desta desvantagem na extração, pois foi utilizado metanol à 80% a quente, o que inativaria a polifenol oxidase, mas as transformações do ácido clorogênico em seus isômeros não foi investigada.

Os resultados obtidos neste trabalho parecem evidenciar que talvez a oxidação na extração seja o fator principal dos menores teores encontrados pelos métodos de MOORES e WEISS. Tal hipótese é evidenciada pelo fato de que os melhores cafés (Mole) tem atividade da polifenol oxidase superiores aos cafés de baixa qualidade (Rio), (AMORIM e SILVA, 1968b); RO-

TEMBERG e IACHAN, 1971, 1972; SANINT e VALENCIA, 1972 e OLIVEIRA, 1972). Levando-se em conta que somente para os cafés Moles o teor de ácido clorogênico foi menor quando determinado pelos métodos de MOORES e WEISS em relação ao método cromatográfico, fato este que não ocorreu para os cafés Rio que no geral possuem atividades da polifenol oxidase bem baixa, é lícito inferir que a diferença encontrada entre os métodos estudados deve-se pelo menos em parte a maior atividade da polifenol oxidase encontrada nos cafés Mole que oxidaria parte do ácido clorogênico durante a extração.

Deve-se tomar em consideração que a idade da semente pós-colheita tem influência na atividade da polifenol oxidase, diminuindo com o tempo de armazenamento (PEREIRA, 1962 e OLIVEIRA, 1972).

No método de LEHMANN e HAHN, (1967) cuja extração é feita com metanol a frio, tem a vantagem de evitar a oxidação do ácido clorogênico e a transformação deste em seus isômeros, mas tem a desvantagem de ser muito longo e exigir cuidados especiais na construção da micro-coluna de poliamida.

Talvez uma combinação do método de LEHAMANN e HAHN (1967) com o de WEISS (1957) dessem resultados melhores e em menor espaço de tempo, podendo assim ser mais empregado para análise de rotina.

CONCLUSÕES

A extração dos ácidos clorogênicos do café verde pelo método de MOORES et al. (1948) e WEISS (1957) que é o oficial da AOAC (1970) deve ser modificada pois o complexo enzimático polifenol oxidase deve oxidar os ácidos clorogênicos, diminuindo o valor que se encontra na semente. Isto ficou evidenciado quando se compararam estes dois métodos com o cromatográfico, cuja extração com metanol inibe a enzima em questão, e que apresentou valores maiores para os cafés Moles, (alta atividade enzimática) não diferindo os três métodos quando se utilizaram cafés Rio (baixa atividade enzimática).

SUMMARY

METHODS OF ORGANIC ANALYSIS OF COFFEE. I. COMPARISON OF METHODS OF CHLOROGENIC ACID DETERMINATION.

Three methods of total chlorogenic acid determination in green coffee were studied. Six coffee samples, three Soft (best) and three Rio (worst) were used. The method of MOORES et al. (1948), WEISS (1957) and GNAGY (1961, 1962) adapted by AMORIM (1972) gave no statistic difference when Rio coffees were used, however, the method of MOORES et al. (1948) and WEISS (1957) gave lower values than the GNAGY — AMORIM procedure, for the Solft coffees. No statistical difference was found between MOORES and WEISS methods. It was infered that the higher enzymatic activities of polyphenol oxidase found in the best coffees (Solft), oxidize the chlorogenic acids in the extraction procedure of the MOORES and WEISS methods, leading to the lower chlorogenic acid values observed.

LITERATURA CITADA

- AMORIM, H. V., D. M. SILVA. 1968a — Relação da atividade da polifenol oxidase do grão de *Coffea arabica* L. com a qualidade da bebida. Boletim Técnico-Científico n.º 31. ESALQ, USP, Piracicaba, S. P. Brasil. 16 páginas.
- AMORIM, H. V., D. M. SILVA. 1968b — Relationship between the polyphenol oxidase activity of coffee beans and the quality of the beverage Nature (London), 219: 381-382.
- AMORIM, H. V. 1972 — Relação entre alguns compostos orgânicos do grão do café verde com a qualidade da bebida. Tese de Doutorado. Esc. Sup. Agr. "Luiz de Queiroz" da USP, Piracicaba, S. P.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — Official Methods of Analysis, 1970. — 11th Edition. Washington.
- CORSE, J., R. E. LUNDIN, A. C. WAISS JR. 1965 — Identification of several components of isochlorogenic acid. Phytochem. 4: 527-529.
- FELDMAN, J. R., W. S. RYDER and J. KUNG. 1969 — Importance of non volatile compounds to the flavor of coffee. J. Agr. Food Chem. 17: 733-739.
- GNAGY, M. J. 1961 — Chlorogenic acid in coffee and coffee substitutes. J. Ass. Off. Anal. Chem. 44: 272-275.
- GNAGY, M. J. 1962 — Chlorogenic acid in coffee and coffee substitutes. J. Ass. Off. Anal. Chem. 45: 770-774.
- KUNG, J. T., W. S. RYDER, J. R. FELDMAN. 1967 — The separation and determination of mono and di-caffeoylquinic acids in coffee by gas chromatography of their trimethylsilyl derivatives. Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés. pag. 223-229. Trieste. Italie.
- LEHMANN, G., H. G. HAHN. 1967 — Über die Bestimmung der chlorogensäure und des trigonellins. Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés. pag. 115-120. Trieste. Italie.
- LOCKHART, E. E. 1957 — Chemistry of coffee. The Coffee Brewing Institute, Inc. Publication n.º 25. 20 pag.
- MOORES, R. G., D. L. McDERMOTT, T. R. WOOD. 1948 — Determination of chlorogenic acid in coffee. Anal Chem 20: 620-624.
- NAVELLIER, P. 1970 — Coffee. "In" Encyclopédia of Industrial Chemical Analysis. Pag. 373-447. Vol. 10. John Wiley & Sons, Inc.
- OLIVEIRA, J. C. 1972 — Relação da atividade do polifenol oxidase, peroxidase e catalase dos grãos do café e a qualidade da bebida. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo. 80 pags. Piracicaba, S. P. Brasil.
- PEREIRA, M. J. 1962 — Proof of the existence of a chlorogenic acid oxidase in the coffee bean, change in its activity according to the of the bean. Estudos Agrônômicos (Lisboa), 3: 151-156.
- PIMENTEL GOMES, F. 1963 — Curso de Estatística Experimental. 2.^a Edição. ESALQ, USP, Piracicaba, S. P. 384 páginas.
- ROTEMBERG, B., A. IACHAN. 1971 — Método químico automático para diferenciação de "Café Bebida". Rev. Bras. Tecnol. 2: 67-69.
- ROTEMBERG, B., A. IACHAN. 1972 — Contribuição ao estudo enzimático do grão do café. I. Tirosinase e lacase. Rev. Bras. Tecnol., 3: 155-159.
- SANINT, O. B., G. VALENCIA, A. 1972 — Actividad enzimática en el grano de café en relación con la calidad de la bebida. I. Duracion de la fermentacion. Cenicafé (Colombia), 23: 59-71.

-
- SONDHEIMER, E., C. D. SZYMANSKI, J. W. CORSE. 1961 — Isolation of chlorogenic acid and its isomers from coffee. *J. Agr. Food Chem.* 9: 146-149.
- STREULLI, H. 1970 — Kaffee. "In" *Alkaloidhaltige Genussmittel, Gewürze, Kochsalz*. J. Schormüller Ed. Spring-Verlag, Berlin.
- WEISS, L. C. 1957 — Report on chlorogenic acid in coffee. *J. Ass. Off. Agr. Chem.* 40: 350-354.

