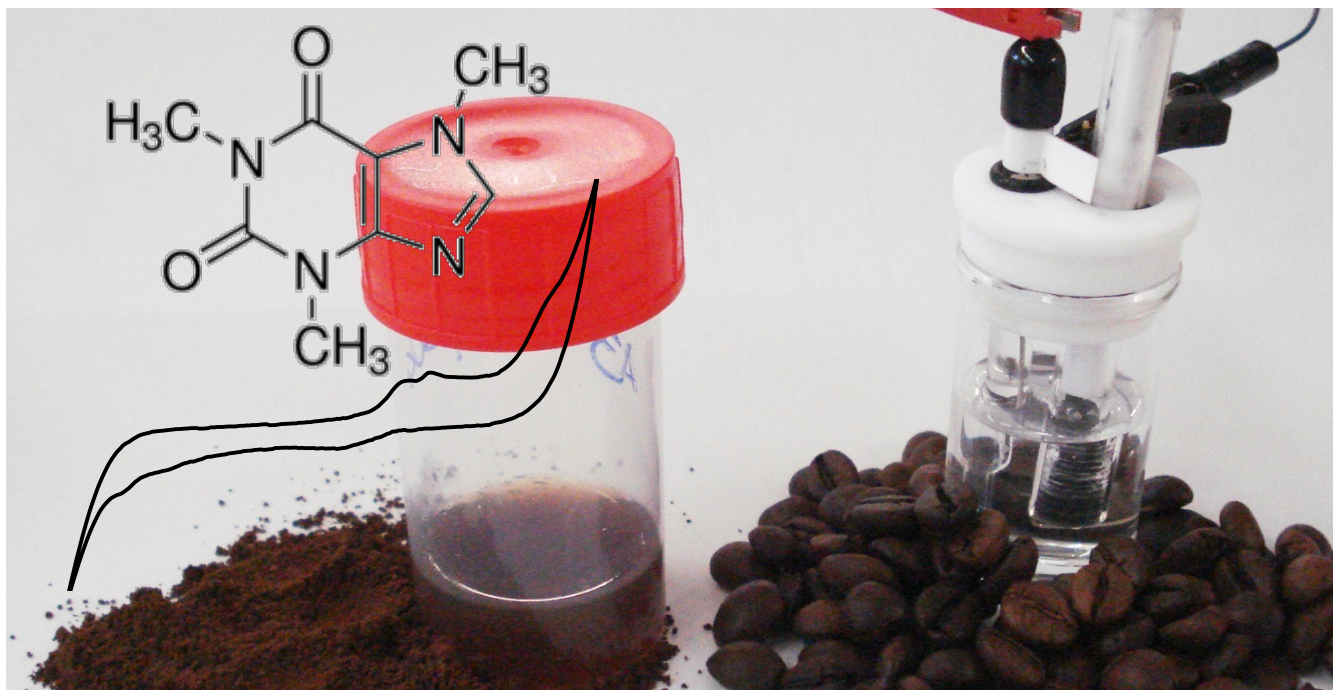


# **Análise de cafeína em café por voltametria cíclica e com eléctrodos compósitos de grafite, óxidos de metal e resina epoxílica**

**Rafael Sanchez Trovo**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança  
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança  
Alimentar*

Orientado por  
**Professor Dr. Luís Avelino Guimarães Dias**  
**Professor Dr. Evandro Bona**



**Análise de cafeína em café por voltametria cíclica  
e com eléctrodos compósitos de grafite, óxidos de metal  
e resina epoxílica**

**Rafael Sanchez Trovo**

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para efeito da obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar através do acordo de Dupla Diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientado por:  
**Professor Dr. Luís Avelino Guimarães Dias**  
**Professor Dr. Evandro Bona**

**Bragança**  
**2017**

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus por ter esta oportunidade de realizar esse novo caminho.

A minha família pelo apoio e dedicação para que eu pudesse vir à Portugal.

A UTFPR e a IPB, juntamente com todo seu corpo docente, pelo acordo de dupla diplomação firmado e por todo o amparo exercido por ambas as partes.

Ao Professor Doutor Luís Dias, orientador científico, e ao Professor Doutor Evandro Bona, co-orientador, pela disponibilidade e apoio durante toda a elaboração do trabalho.

A Heloisa, Jacqueline, Cristhian e Cleno que dividiram a maior parte do seu intercambio comigo.

À todos meus antigos e novos amigos feitos nesse período na Europa.

A Laís Vernasqui por toda ajuda que me foi oferecida durante a realização e elaboração do trabalho.

## Resumo

Este trabalho incidiu na análise de cafeína por voltametria cíclica com o objetivo estudar o desempenho de eléctrodos de trabalho compósitos de grafite, óxidos de metal e resina epoxídica. Especificamente, pretende-se averiguar se o sistema voltamétrico permite a análise de cafeína em amostras de café. Usaram-se 13 amostras de café adquiridas numa superfície comercial, na forma de grão e de várias origens: Angola, Brasil, Camarões, Colombia, Costa do Marfim, Costa Rica, Guatemala, Índia, Portugal, São Tomé e Príncipe, Timor Leste, Uganda e Vietnam.

Este estudo preliminar envolveu a construção de 13 eléctrodos de trabalho com composições diferentes e a seleção de seis com maior sensibilidade à cafeína: C, C+PbO 7,5%, C+Cu<sub>2</sub>O 7,5%, C+PbO<sub>2</sub> 15%, C+PbO<sub>2</sub> 7,5% e C+Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 15%. A composição da solução que melhor incrementava o sinal de cafeína foi de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol/L e um pH de 1,25. A voltametria cíclica foi realizada no intervalo de potencial entre -2 e +2 V, com velocidade de varrimento de 0,4 V/s e num intervalo de leitura da corrente de 10 mA/V. Os eléctrodos de trabalho usados analisaram a solução redox de ferrocianeto/ferricianeto como um processo quase-reversível, mostrando bom desempenho eletroquímico. Na análise da cafeína, os voltamogramas cíclicos mostram a presença de 2 picos anódicos (aproximadamente a +0,82 e +1,7 V) e 1 pico catódico (aproximadamente a -0,82 V) com variação na intensidade de corrente associada à variação da concentração de cafeína na solução, como se verificou nos estudos de calibração. Extratos de café foram analisados por HPLC, tendo-se obtidos níveis de cafeína entre 0,38 e 1,90 mg/g de café. O café com maior concentração de cafeína foi o de origem Costa do Marfim e embora o café de Costa Rica apresente o nível mínimo de cafeína, também as mostras de Brasil, Colômbia, Guatemala e Timor apresentaram níveis baixos. Na análise eletroquímica, verificou-se que a informação voltamétrica tinha influência da matriz do extrato. No estudo da relação entre a informação quantitativa da cafeína e voltamogramas cíclicos parciais, usando regressão PLS, verificou-se que os eléctrodos de trabalho selecionados permitem obter informação sobre a cafeína nos extratos de cafeína. Em trabalho futuro, será necessário otimizar o procedimento de análise voltamétrica principalmente na análise dos extratos de café, onde a concentração de cafeína deve ser incrementada, e ter uma maior caracterização química do extrato de para se perceber a sua influência nos voltamogramas cíclicos e, por isso, na quantificação.

Palavras-chave: Cafeína; café; eléctrodos compósitos; voltametria cíclica; HPLC.

## Abstract

This work focused on the analysis of caffeine by cyclic voltammetry with the objective of studying the performance of graphite, metal oxides and epoxy resin composite working electrodes. Specifically, it was intended to investigate if the voltammetric system allows the analysis of caffeine in coffee samples. Thirteen coffee samples purchased on a commercial surface, in the form of grain and from various origins, were used: Angola, Brazil, Cameroon, Colombia, Ivory Coast, Costa Rica, Guatemala, India, Portugal, São Tome and Principe, Uganda and Vietnam.

This preliminary study involved the construction of 13 working electrodes with different compositions and the selection of six with higher sensitivity to caffeine: C, C + PbO 7.5%, C + Cu<sub>2</sub>O 7.5%, C + PbO<sub>2</sub> 15%, C + PbO<sub>2</sub> 7.5% and C + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 15%. The composition of the solution that best enhanced the caffeine signal was with 0.1 mol/L of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and a pH of 1.25. Cyclic voltammetry was performed in the potential range between -2 and +2 V, with a scanning rate of 0.4 V/s and a current reading range of 10 mA/V. The working electrodes analyzed the ferrocyanide / ferricyanide redox solution as a quasi-reversible process, showing good electrochemical performance. In the caffeine analysis, the cyclic voltammograms show the presence of 2 anode peaks (approximately at +0.82 and +1.7 V) and 1 cathode peak (approximately at -0.82 V) with variation in current intensity associated with concentration of caffeine in the solution, as found in the calibration studies. Coffee extracts were analyzed by HPLC and caffeine levels were obtained between 0.38 and 1.90 mg/g coffee. The coffee with the highest concentration of caffeine was originated in Ivory Coast, and although coffee in Costa Rica has the minimum level of caffeine, the samples from Brazil, Colombia, Guatemala and Timor also had low levels. In the electrochemical analysis, it was verified that the voltammetric information had influence of the matrix of the extract. In the study of the relationship between quantitative caffeine information and partial cyclic voltammograms using PLS regression, it was found that the selected working electrodes allow to obtain information about caffeine in caffeine extracts. In future work, it will be necessary to optimize the voltammetric analysis procedure mainly in the analysis of the coffee extracts, where the concentration of caffeine must be increased, and to have a greater chemical characterization of the coffee's extract to see its influence on the cyclic voltammograms.

Keywords: Caffeine; coffee; composite electrodes; cyclic voltammetry; HPLC.

## PREÂMBULO

**Enquadramento.** A cafeína é um composto que está muito presente na vida e saúde das pessoas através de várias bebidas e medicamentos. Sendo um alcaloide natural, pode ser encontrado em muitas espécies de plantas (folhas, sementes e frutos), salientando-se o chá e o café. Como produto farmacológico, a cafeína é um estimulante, resultando em estado de humor mais descontraído, diminuição da fadiga, aumento do foco e em pensamentos claros e mais rápidos. Geralmente, a cafeína é prescrita como adjuvante em formulações de fármacos por permitir a redução dos riscos de várias doenças crônicas. Também é utilizado em muitos refrigerantes, como agente de sabor, contribuindo para a viciação neste produto. Considerando que se trata de um ingrediente comum em uma variedade de bebidas e em formulações de drogas, o controlo analítico é importante. Este trabalho é neste âmbito, desenvolvimento de eléctrodos voltamétricos para estabelecer novas metodologias analíticas.

**Objetivos.** O objetivo geral deste trabalho consistiu na construção e verificação do desempenho de eléctrodos de trabalho compósitos de grafite e óxidos de metal com resina epoxilica na análise voltamétrica de cafeína, para posterior aplicação na medição de cafeína em amostras de café.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- construção de eléctrodos de trabalho voltamétricos por mistura de grafite, óxidos de metal e resina epoxilica;
- estudar as condições experimentais para a análise de cafeína por voltametria cíclica e cromatografia líquida de alto desempenho;
- estabelecer o intervalo dinâmico de aplicação dos eléctrodos de trabalho testados;
- estudar a precisão e exatidão da análise por voltametria cíclica e cromatografia líquida de alto desempenho;
- analisar amostras de café de diferentes origens pelas duas metodologias;
- estabelecer comparação entre as duas metodologias;

**Estrutura do trabalho.** Neste trabalho, o capítulo 1 apresenta uma breve apresentação sobre a importância da cafeína e das suas características físico-químicas, bem como, para

a saúde humana. Neste capítulo, também se insere a temática do café, a sua composição química geral, os efeitos na saúde humana dando ênfase ao princípio ativo cafeína e os aspetos sensoriais da bebida. Posteriormente, introduz-se os métodos analíticos mais usados na análise da cafeína, salientando as aplicações de análise de cafeína no café.

No segundo capítulo, apresenta-se toda a metodologia usada no trabalho laboratorial de cromatografia líquida e voltametria cíclica, bem como os métodos estatísticos usados no tratamento dos dados analíticos que foram usados no capítulo seguinte. No capítulo 3, apresentam-se os resultados obtidos e a sua discussão. O trabalho é finalizado com as conclusões finais (capítulo 4) e a bibliografia utilizada.

# Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Preâmbulo.....	iv
Índice Geral.....	vi
Índice de Tabelas.....	vii
Índice de Figuras.....	viii
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1. Cafeína .....	1
1.2. Propriedades físico-químicas da cafeína.....	1
1.3. Propriedades da cafeína .....	2
1.4. O café.....	3
1.5. Processamento e torrefação do café.....	4
1.6. Composição química do café.....	5
1.7. Saúde humana e café .....	6
1.8. Métodos de análise.....	7
1.8.1. Espectrofotometria .....	8
1.8.2. Cromatografia.....	8
1.8.3. Voltametria .....	10
<b>2. Materiais e métodos .....</b>	<b>18</b>
2.1. Reagentes e produtos químicos.....	18
2.2. Amostragem .....	18
2.3. Análise por HPLC .....	19
2.4. Construção dos eléctrodos de trabalho.....	20
2.5. Célula eletroquímica.....	21
2.6. Análises por voltametria cíclica.....	21
2.7. Análise estatística .....	23
<b>3. Resultados.....</b>	<b>25</b>
3.1. Análise por HPLC .....	25
3.2. Análises por voltametria cíclica.....	28
3.2.1. Solução redox .....	28
3.2.2. Condições voltamétricas para análise de cafeína.....	29
3.2.3. Calibração voltamétrica .....	34
3.2.4. Análise de amostras de café .....	39
<b>4. Conclusões .....</b>	<b>45</b>
<b>Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>46</b>

**ÍNDICE DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Classificação do grau de torra do café.....	5
<b>Tabela 2</b> - Produtos químicos utilizados no trabalho.....	19
<b>Tabela 3.</b> Composição dos eléctrodos de trabalho usados na análise voltamétrica.....	21
<b>Tabela 4.</b> Concentrações médias de cafeína no café.....	28
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros obtidos dos voltamogramas cíclicos da análise à solução redox com os eléctrodos construídos.....	30
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros obtidos das calibrações lineares efetuadas usando os dados voltamétricos medidos.....	39
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros da regressão PLS entre as concentrações e voltamogramas cíclicos parciais das amostras de café.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Estruturas químicas da: A) cafeína; B) teobromina; e, C) teofilina.....	1
<b>Figura 2. –</b> Excitação do sinal potencial-tempo num experimento de voltametria cíclica.....	11
<b>Figura 3.-</b> Voltamograma cíclico para solução redox em sistema reversível.....	13
<b>Figura 4.-</b> Exemplo de voltamograma cíclicos onde a intensidade de corrente aumenta com a concentração do composto a analisar.....	13
<b>Figura 5.-</b> Voltamograma cíclico para transferência de eletrões reversível.....	15
<b>Figura 6 –</b> Oxidação da CAF: A) reação global; B) mecanismo (Spătaru et al., 2002)).....	17
<b>Figura 7 –</b> Imagem dos eletrodos construídos.....	22
<b>Figura 8 –</b> Cromatograma típico de uma amostra de café.....	26
<b>Figura 9 –</b> Concentrações médias de cafeína no café.....	28
<b>Figura 10 –</b> Voltamograma cíclico típico para a solução redox obtido com o eléctrodo C.....	29
<b>Figura 11 –</b> Voltamogramas cíclicos dos eléctrodos a diferentes valores de pH.....	32
<b>Figura 12 –</b> relação entre a intensidade de corrente do pico anódico e o respectivo valor de pH para os seis eléctrodos de trabalho.....	34
<b>Figura 13 -</b> Intensidade de corrente do pico anódico 1 e os valores de velocidade de varrimento do potencial.....	34
<b>Figura 14 -</b> Voltamogramas cíclicos das 5 soluções padrão de calibração mais concentradas para cada um dos eléctrodos de trabalho seleccionados.....	36
<b>Figura 15 –</b> Voltamograma cíclicos evidenciando cada um dos três picos obtidos para o eléctrodo C_Al2O315%.....	38
<b>Figura 16 –</b> Voltamogramas cíclicos obtidos pelo eléctrodo C_Al2O315% para 13 amostras analisadas: A) completo; B) no intervalo anódico de 0 a +2 V.....	41
<b>Figura 17 –</b> Voltamogramas cíclicos parciais obtidos pelo eléctrodo C_Al2O315% para 13 amostras analisadas no intervalo anódico de 0 a +2 V.....	43

## 1. Introdução

A cafeína é o composto que está presente na vida humana diária por se tratar de um ingrediente comum em uma variedade de alimentos (bebidas suaves e energéticas) e em formulações de drogas (geralmente, em combinação com outros fármacos).

### 1.1. Cafeína

A estrutura de 3,7-di-hidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona (nome da IUPAC), trivialmente conhecida por cafeína (CAF, 1,3,7-trimetilxantina), é um alcaloide natural (compostos nitrogenados heterocíclicos) que pertence à família de compostos orgânicos conhecidos como metilxantinas (derivados metilados da xantina). As metilxantinas mais abundantes no reino vegetal são a CAF, teofilina e teobromina (Figura 1), no entanto, a CAF e a teofilina são as de maior interesse farmacêutico. A teofilina e teobromina são xantinas bimetiladas (com dois grupos metilo).

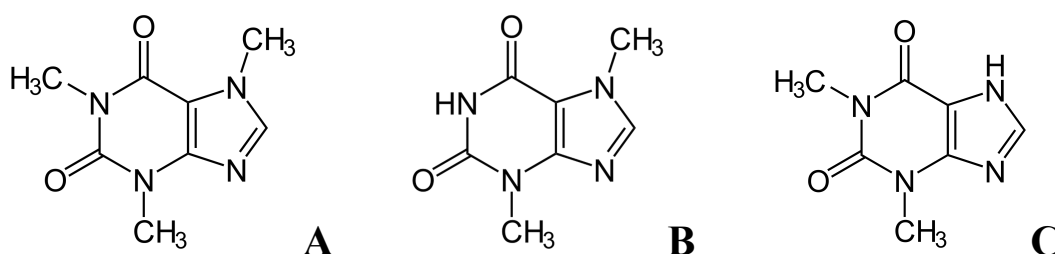


Figura 1 - Estruturas químicas da: A) cafeína; B) teobromina; e, C) teofilina.

### 1.2. Propriedades físico-químicas da cafeína

A CAF (trimetilxantina), de massa molecular 194,194 g/mol, apresenta caráter básico mais pronunciado que as dimetilxantinas, mas são eletrólitos fracos. A solubilidade em água aumenta com a temperatura e com a adição de ácido diluído como o HCl e ácido cítrico. É também solúvel em álcoois e solventes orgânicos clorados, como o clorofórmio. Os dados de solubilidade apresentados no Merck índice (O'Neil, 2013) mostram que 1 g de CAF é dissolvida em: 46 mL de água; 5,5 mL de água a 80

°C; 1,5 mL de água em ebulição; 66 mL de etanol; 22 mL de etanol a 60 °C; 50 mL de acetona; 5.5 mL de clorofórmio; 530 mL de éter dietílico; 100 mL de benzeno; e., 22 mL benzene em ebulição. O composto é um pó branco inodoro ou de agulhas brilhantes brancas e de gosto amargo (O'Neil, 2013). Quando aquecido até decomposição liberta gases tóxicos de óxidos de nitrogénio (Lewis, 2004).

### 1.3. Propriedades da cafeína

Há vários materiais de plantas que tem a CAF na sua composição como constituinte, onde serve como um inseticida natural (paralisa e mata) de alguns insetos que se alimentam da planta, por exemplo: folhas de chá, grãos de café, castanhas de caju, cacau e feijão.

A CAF tem muitos efeitos fisiológicos importantes para a saúde Humana pois é uma substância psicoativa. Devido às suas propriedades estimulantes nos sistemas nervoso central e cardiovascular, a CAF é usada quase em todos os países do mundo na forma de produtos alimentares como café, chá, refrigerantes e chocolates. Os efeitos resultam em humor descontraído, diminuição da fadiga, aumento do foco e em pensamentos claros e mais rápidos. O consumo moderado de CAF ajuda também na redução dos riscos de várias doenças crônicas como, por exemplo: diabetes, doenças de Parkinson, doença do fígado e cólon, câncer, além de melhorar a função imune. Também atua como vasoconstritor, aumentando a pressão arterial, estimulando a secreção gástrica e aumentando os ciclos respiratórios. É também usado como diurético pois pode causar vômitos e desidratação.

Embora a dose fatal de CAF tenha sido avaliada em mais de 10 g (cerca de 170 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal), o consumo em excesso de CAF causa tremores, náuseas, nervosismo, convulsões e efeitos mutacionais de ADN. A CAF também é considerada um fator de risco para doença cardiovasculares, asma, mau funcionamento renal e pode afetar o comportamento causando depressão e hiperatividade.

A nível farmacêutico (Švorc, 2013), a CAF é prescrita como adjuvante analgésico em formulações de fármacos para o tratamento de dor de cabeça e dor relacionada à cirurgia pós-parto, pós-operatória dentária e de terapêutica para o tratamento da enxaqueca em combinação com outras drogas como o ácido acetilsalicílico (aspirina), paracetamol, ácido ascórbico.

Considerando que o seu consumo em doses mais elevadas, pode levar a vários distúrbios fisiológicos, a sua monitorização em produtos alimentares de consumo diário (por exemplo, café, chá, refrigerantes e chocolates) é importante. Neste trabalho, para demonstrar as capacidades analíticas dos eléctrodos de trabalho voltamétricos construídos na análise da CAF em amostras reais, seleccionou-se o café por ter uma matriz complexa. O café é uma das bebidas mais consumidas mundialmente devido às suas características sensoriais e aos benefícios para a saúde humana.

#### 1.4. O café

Em 2011, a produção mundial de café correspondeu a 131 milhões de sacas, aproximadamente. (Organização Internacional do Café - OIC, 2012).

Dentro das várias espécies conhecidas de café, as mais comercializadas são a *Coffea arabica* e a *Coffea canephora*, comercialmente conhecidas por café arábica e café robusta, respectivamente. O café arábica, nome atribuído por o primeiro cultivo ter sido feito pelos árabes, ocupa mais da metade da produção mundial do grão e é usada como matéria prima de cafés mais requintados, com acidez e aromas acentuados, resultando em uma bebida mais qualificada. O café robusta corresponde a uma bebida mais robusta, ou seja, com mais corpo devido a sua maior quantidade de sólidos solúveis, faltando a acidez e complexidade do café arábica.

O café comum mais comercializado é café expresso, seguido do descafeinado e, mais recentemente, os cafés especiais. O café expresso é obtido através de um processo de extração sob pressão usando café moído e teve origem na Itália, estando atualmente muito bem consolidado no mercado mundial. O café descafeinado envolve a remoção da CAF do café. A extração do alcaloide é feita no grão ainda verde, sem passar pelo processo de torrefação. Ao longo dos anos essa técnica tem evoluindo de forma a reduzir a toxicidade do processo (os solventes mais comuns e viáveis apresentam uma elevada toxicidade), usando-se atualmente dióxido de carbono supercrítico sob alta pressão para a extração do composto. Os cafés especiais diferenciam-se em algum atributo qualitativo do produto, no processo de produção ou pelo serviço a ele relacionado (Zylbersztajn e Farina, 2001).

A qualidade da bebida está dependente de várias características, como: variedade do café, condições edafo-climáticas, aspecto dos grãos, procedimentos de colheita, tipo

de processamento, grau de torra, armazenagem do grão, método de moagem, entre outras. O processamento e torrefação do café são os passos determinantes para obter um café de qualidade.

### **1.5. Processamento e torrefação do café**

O processamento de via úmida é o mais aconselhável quando se deseja obter um produto de maior qualidade, já que preserva qualidade importante do grão, mas é um processo que requer cuidados durante seu processo. Neste processo, a polpa do fruto é removida e o grão deixado a fermentar durante 18 a 30 horas, para acentuar a acidez do café, sendo de seguida, lavado e seco. Este processamento é indicado para o café arábica já que esta espécie de café possui atributos sensoriais de maior qualidade. O processamento por via seca é mais simples, porém resulta num café de qualidade inferior ao citado acima. Essa redução na qualidade do café é justificada pelo fato do não despolpamento, que permite a passagem de açúcares para o grão, e pela secagem ao sol, que em muitas vezes é feita na terra. Ambos os tipos de processamento do grão podem ser ensacados e vendidos como café verde ou também chamado de grão cru.

Após esta etapa de preparação do grão, segue-se a torra do café ou torrefação, processo que garante modificações químicas nos grãos e que permite obter uma bebida de qualidade. Este processo é dependente da temperatura e envolve reações químicas de grande complexidade, sendo responsável pela diminuição da acidez, o surgimento de aroma e sabor, além da pigmentação escura devido principalmente a reação de Mailard e caramelização. A degradação de compostos como CGA (ácido clorogênico) é um dos pontos responsáveis pelo amargor característico do café. A classificação do grau de torrefação do café está descrita na Tabela 1, de acordo com a Associação brasileira de indústria de café (ABIC), realçando as características do café para os graus de torra claro, média e escura.

Tabela 1. Classificação do grau de torra do café.

<b>Grau de torra</b>	<b>Características</b>	<b>Equipamento</b>
Clara	Acentuada acidez, suavidade do aroma e o sabor, menos amargor.	Ideal para maquinas de café expresso.
Média	Acentua o aroma e sabor.	Ideal para coador de pano ou filtro de papel.
Escura	Diminui a acidez, acentua sabor amargo, bebida mais escura.	

## 1.6. Composição química do café

O café é uma bebida complexa que mostra grande variabilidade na sua composição química, pois dependem de fatores como a espécie de café usada, região de cultivo, modo de cultivo (tradicional ou orgânicos), técnicas pós-colheita (húmidas ou secas), armazenagem do grão, grau de torra, tipo de café comercial e método de moagem são apenas alguns dos fatores que influenciam a composição química do fruto, concentração de CAF e o grau da atividade biológica dos compostos encontrados na bebida. São os variados compostos no café, além da CAF, que conferem seu sabor e aroma único, como por exemplo, metilxantinas, flavonóides, ácidos fenólicos e ligninas. Os compostos bioativos presentes no café são metilxantinas (CAF, teobromina, teofilina), álcoois diterpênicos (cafestol e kahweol), ácidos clorogênicos (ácidos cafeiloquinínicos, ácidos feruloilquinínicos e ácidos p-cumaroilquinínicos), ácidos hidroxicinâmicos (ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido p-cumárico), flavonóides (catequinas, antocianinas), tocoferóis e melanoidinas. São substâncias que protegem as plantas contra patógenos e stress abiótico, como mudanças na temperatura, teor de água, exposição à luz UV e deficiência de nutrientes minerais (Patay et al., 2016A). Estas substâncias biologicamente ativas apresentam propriedades antioxidantes, hepatoprotetoras, antibacterianas, antivirais, anti-inflamatórios e hipolipidêmicos (Patay et al., 2016B).

Os aspectos sensoriais estão dependentes da sua composição química e são importantes para a comercialização do produto que depende da aceitabilidade pelo

consumidor. A avaliação do café expresso é realizada ao nível dos atributos: aroma, doçura, amargor, acidez, corpo e sabor residual. O atributo de amargor é proveniente principalmente da presença da CAF, devendo ser leve ou moderado para um café de melhor qualidade. Um amargor bem acentuado geralmente é encontrado em cafés de pior qualidade. Por exemplo, o café robusta possui um teor de CAF mais alto (entre 2% e 4,5%) que o café arábica (Conselho Nacional do Café - CNC, 2010).

## **1.7. Saúde humana e café**

No relacionamento de doenças com o consumo de café inferem-se os inúmeros benefícios à saúde pela ingestão da bebida; por exemplo, a redução na incidência do mal de Alzheimer, ou até mesmo na redução do desenvolvimento de alguns cânceres; pesquisas levando em conta a diabetes tipo II demonstraram uma redução significativa no risco de incidência da doença e que a ingestão isolada da CAF pode levar a diminuição da tolerância da glicose (Saab, 2016). Para umas doenças como mal de Parkinson apresentam-se enfraquecidas relacionadas com o consumo da bebida. Em contrapartida uma ingestão excessiva do café pode gerar complicações relacionadas a tolerância à glicose ou a sensibilidade a insulina, isso se deve à grande quantidade de CAF no fruto. Também está referido que os compostos bioativos presentes no café, tais como ácidos clorogênicos, outros compostos fenólicos, magnésio e trigonelina, podem neutralizar estes efeitos alterando a absorção de glicose, metabolismo da glicose no fígado, liberação de incretina e sensibilidade à insulina (de Meija, 2014). Mas, em geral, a ingestão aguda de café cafeinado tem efeitos na saúde Humana semelhantes à da CAF.

Os estudos clínicos sobre o café são importantes e necessários para o conhecimento deste produto alimentar para se entender as diferenças entre café cafeinado e café descafeinado e assim esclarecer a importância dos compostos polifenólicos na modulação do metabolismo dos açúcares. E também, as comparações com as propriedades das substâncias puras permitem verificar se as substâncias do café descafeinado não são apenas neutras, mas até protetoras (de Meija, 2014)

Sendo o café uma matriz complexa, com uma elevada variabilidade de compostos, estabelecer os seus mais diversos efeitos no corpo humano é um dos principais desafios para as pesquisas em prós e contras para a saúde em consequência do consumo de café. Estes estudos estão limitados por esta complexidade, podendo

ocorrer efeitos sinérgicos e antagónicos da mistura dos componentes, que se podem sobrepor aos variados efeitos de cada composto.

Presentemente, considera-se que uma ingestão moderada diária de CAF <400 mg não está associada a efeitos adversos em adultos saudáveis. Crianças e adolescentes metabolizam a CAF de forma mais rápida do que adultos, porém em geral ingerem uma quantidade menos significativa. Comumente esses dois grupos consomem mais CAF em chás do que no próprio café, de qualquer forma o consumo excessivo de CAF deve ser evitado devido ao desconhecimento dos efeitos que tal substância pode causar no desenvolvimento do cérebro. A quantidade de CAF necessária para produzir efeitos adversos varia de pessoa para pessoa, pois depende do peso, sexo, idade e sensibilidade à substância. (de Meija, 2014)

A exposição efetuada sobre o café mostra a importância deste produto alimentar, cuja qualidade resulta de todos os passos envolvidos desde a sua produção até à obtenção do produto final. Mais, a complexidade da matriz do café mostra a relevância de se desenvolver novas metodologias analíticas mais simples, rápidas e de fácil utilização para a determinação de parâmetros químicos que possam avaliar a sua qualidade, como a quantidade em CAF.

## **1.8. Métodos de análise**

Nesta secção faz-se uma introdução aos métodos instrumentais analíticos usados na análise do café: espectrofotometria, cromatografia e voltametria. As duas primeiras metodologias analíticas são as ferramentas mais comuns em laboratórios de análise química. Cada metodologia tem as suas vantagens e desvantagens de aplicação, e permitem efetuar análise qualitativa e quantitativa, mas requerem procedimentos de tratamento da amostra diferentes. Neste âmbito, a voltametria é uma metodologia mais simples por permitir a análise direta em amostras de café e com baixo custo.

### ***1.8.1. Espectrofotometria***

A espectrofotometria tem como princípio de funcionamento a interação de radiação electromagnética com o composto analisado. Os mais comuns são os espectrofotômetros de ultravioleta e infravermelho, onde compostos absorvem radiação e sofrem transições eletrônicas e vibracionais, respectivamente.

De um modo simples, um espectrofotômetro tem uma fonte de emissão de onda (depende da aplicação e pode ser da zona do ultravioleta, visível e infravermelho) com seleção de comprimento de onda (radiação monocromática cujo comprimento de onda depende da substância a analisar), o suporte onde a amostra é inserida, e por fim o detector onde a radiação emitida é lida após passar pela amostra. A espectrofotometria pode ser usada para quantificação de compostos por interação (depende das propriedades ópticas da substância) com a radiação através da detecção da radiação por reflectância, transmitância, absorvância, emissão e fluorescência. Globalmente, todos os sistemas analíticos precisam de ser calibrados, usando solventes, reagentes e padrões de qualidade analítica para garantir a precisões e exatidões aceitáveis.

Na análise de café a espectrofotometria foi usada para: quantificar o kahweol que é um composto específico do café arábica e, por isso, pode ser usado para discriminar entre espécies de café. A análise foi baseada em reações colorimétricas e medidas espectrofotométricas ultravioleta e visível (Dias et al., 2013); análise de CAF por espectrofotometria UV-Vis (Belay et al., 2008); estudo das alterações nas propriedades antioxidantes no café robusta durante a torrefação por métodos colorimétricos usando espectrofotometria Vis (Votavová et al., 2009).

### ***1.8.2. Cromatografia***

Na sequência de métodos de análise quantitativos, a cromatografia é um dos métodos de separação mais usados nos laboratórios químicos por permitir a análise de multiparâmetros com precisão e exatidão aceitáveis. Atualmente a cromatografia pode ser aplicada com diferentes meios de interação analito e fases móvel/estacionária como cromatografia líquida (LC), cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), cromatografia flash (FC), cromatografia de papel (TLC), cromatografia de fluido

supercrítico (SFC), e cromatografia gasosa (GC). Todas as técnicas cromatográficas citadas se baseiam no princípio de interação do composto a analisar com a fase móvel e a fase estacionária, envolvendo estados de equilíbrio. A fase móvel tem como função principal fazer sair o analito da coluna na cromatografia gasosa.

As duas técnicas mais usadas são o HPLC e GC. O sistema de HPLC mostra-se eficaz na separação de compostos orgânicos. A fase móvel é líquida e de polaridade diferente do analítico, para que a separação possa ocorrer na fase estacionária (coluna) de polaridade semelhante. A fase estacionária da coluna para HPLC é selecionada tendo em conta os compostos que se pretendem analisar, bem como as dimensões da coluna e das suas partículas, sendo de referir que as análises com partículas pequenas (aumento da superfície de contato com os compostos a separar) permitem uma maior eficiência na separação, mas com maior tempo de análise. Os compostos são separados na coluna devido aos tempos diferentes de interação com cada uma das duas fases. O equipamento envolve uma bomba de alta pressão, um sistema de injeção, a coluna, detectores e um computador para registro dos dados. Os detectores mais usados são o de índice de refração, ultravioleta e visível e fluorescência.

Alguns trabalhos de análise do café com HPLC são: quantificação de ácidos clorogênicos em extratos de grão de café verde por HPLC-UV rápido (Craig et al., 2016); análise de tocoferóis e triglicéridos em grãos de café verdes e torrados pertencentes às variedades de café arábica e robusta, por HPLC, usando o detector de índice de refração (análise de triglicéridos) e fluorescência (análise de tocoferóis), com finalidade de diferenciar variedades de café (González et al., 2001); análise de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), compostos indesejáveis que se forma durante o processo de torrefacção do café e que podem transferir-se para a cerveja de café, usando HPLC com detector de fluorescência (Tfouni et al., 2013); determinação quantitativa de compostos fenólicos (oito ácidos fenólicos e três flavonóides) e CAF em diferentes marcas de café no mercado argelino por HPLC com detector UV-vis (Belguidoum et al., 2014); avaliação do efeito das condições de torrefacção nos perfis NIR e HPLC de amostras de café e também em função da origem varietal dos grãos (café Arábica ou Robusta) (De Luca et al., 2016).

Na análise de compostos orgânicos voláteis ou semivoláteis, o GC é frequentemente utilizado. Assim qualquer indústria (petroquímicas, farmacêuticas e alimentícia) que pretendem analisar os voláteis em amostras, aplica esta metodologia em seus laboratórios. Um cromatógrafo de gás é basicamente composto por fonte de gás

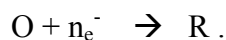
(fase móvel de arrasto), injetor de amostra, coluna cromatográfica (fase estacionária) num forno para controlo da temperatura, um detector, e um computador para registro dos dados obtidos com a separação de componentes. O funcionamento desta técnica se baseia no princípio da interação do composto a analisar com a fase estacionária, ou seja, os compostos que entram na coluna (que pode ser controlado pela temperatura do forno) são separados na coluna devido aos tempos diferentes de interação com a fase estacionária, tendo a fase móvel a função de fazer sair todos os compostos injetado. Neste caso, a fase móvel é chamada de gás de arrasto por ser inerte. Em geral usam-se colunas capilares selecionados com fase estacionária em função dos compostos a analisar. Os detectores mais usados na cromatografia gasosa são o detector por chama ionizante (FID) e o detector de massa (MS).

Alguns estudos de aplicação de GC na análise do café são: autenticação de misturas de café expresso italiano (entre café arábica e robusta) através da razão dos picos cromatográficos entre kahweol e 16-O-metilcafestol, usando GC com detector FID (Pacetti et al., 2012); determinação de compostos marcadores voláteis de defeitos comuns de café torrado (leve, queimado, escuro, cozido e subdesenvolvido) usando seis perfis de tempo-temperatura, por GC com detector de massa (Yang et al., 2016); identificar compostos aromáticos em pó de café para estudar a influência do tipo de embalagem original no tempo de evolução usando GC-MS (Bröhan et al., 2009); Análise do vestígios de pesticidas organoclorados em café por GC com detector MS (Bresin et al., 2015).

### ***1.8.3. Voltametria***

O primeiro passo para entender como a voltametria funciona é analisar como a reação de oxidação-redução ocorre. Separando em duas partes, a oxidação e a redução, na primeira temos a perda de elétron(ões) do ião, do átomo ou da molécula e, na redução ocorre o inverso, ou seja o ganho de elétron(ões). Para este tipo de mecanismo de reação oxidação-redução usa-se a abreviação *redox*. Este tipo de reação ocorre em simultâneo, ou seja, se um composto A foi oxidado, necessariamente um composto B deve ser reduzido por conta do número de elétrões livres na solução.

**Reação redox.** Na reação *redox* existem dois agentes importantes, um agente oxidante (“O”) e um agente redutor (“R”) (Ham e Bryan, 2016). O agente oxidante tem a propriedade de receber elétrons ( $e^-$ ) segundo uma constante de velocidade de transferência de elétrons  $k_d$  (passo direto), tornando-se assim reduzida:



O agente redutor tem a propriedade de doar elétrons, segundo uma constante de velocidade de transferência de elétrons  $k_r$  (passo reverso), tornando-se assim oxidada:



A reação de oxidação e a de redução são denominadas cada uma de metade do processo *redox* inteiro. A soma das metades da reação representa a reação *redox*:



onde, no equilíbrio,  $k_d = k_r$ .

A partir desse princípio da reação *redox* é possível aprofundar um pouco mais e entender a relação dele com a “eletricidade” e com o fluxo de elétrons. Caso a reação *redox* esteja em um circuito é possível quantificar o fluxo de elétrons na solução por algum dispositivo capaz de medir tensão como um galvanômetro. A técnica mais utilizada para obtenção de informação de reações eletroquímicas é a voltametria cíclica, pois é uma técnica rápida, precisa e permite obter dados termodinâmicos e cinéticos da reação *redox*. Voltametria cíclica é muitas vezes a primeira técnica aplicada em estudos eletro-analíticos. Particularmente, oferece uma rápida localização do potencial *redox* de espécies eletroativas e a praticidade de medição do processo *redox* (Wang, 2006).

**Sistema analítico de voltametria.** Em geral, para a análise voltamétrica precisa-se de um potenciostato, equipamento que permite fazer varrimento de potencial e leitura de intensidade de corrente e de uma célula electroquímica. A célula electroquímica usada é eletrolítica, que permite estudar os fenômenos de redução e oxidação, em geral, sob a ação de um potencial controlado externo, permitindo controlar a direção da reação e sua intensidade. A análise precisa de uma solução eletrolítica (eletrólito ou sal de suporte) para reduzir a resistência do meio, eliminando a corrente de migração, e pode ser uma

solução tampão se houver necessidade de manter constante o pH da solução. Em geral usa-se uma célula de três eléctrodos com um eléctrodo de referência (ER), um contra-eléctrodo (CE) e um eléctrodo de trabalho (ET). No ET ocorrem as reações de oxidação-redução e pode ser de metal (mercúrio, platina ou ouro), carbono vítreo ou pasta de carbono, ou qualquer um destes com superfícies modificadas. O CE pode ser de qualquer tipo (normalmente platina), mas deve ser um bom condutor e não deve interferir com as reações que ocorrem na solução. O ER é um eléctrodo de calomelano saturado ( $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ) ou um eléctrodo de prata / cloreto de prata ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) e tem um potencial constante.

**Voltametria cíclica.** Na voltametria cíclica faz-se uma variação linear do potencial do eletrodo de trabalho, segundo uma onda de forma triangular, tal como apresentado na Figura 2 (Wang, 2006), e mede-se a intensidade de corrente obtida.

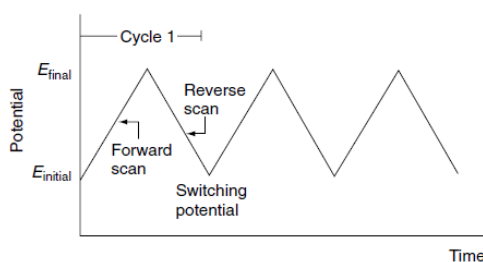


Figura 2. Excitação do sinal potencial-tempo num experimento de voltametria cíclica (Wang, 2006)

Na Figura 3 mostra-se um exemplo de um voltamograma cíclico de um ciclo potencial simples solução com um composto que sofre reação *redox* reversível. No primeiro semi-ciclo é aplicado um potencial a partir de um valor negativo até um valor positivo, resultando em um pico anódico devido à oxidação do composto em análise na forma oxidada “O” para a forma reduzida “R”. Ao terminar esta primeira parte, o ciclo é invertido e a forma reduzida “R” é re-oxidada para “O” em um pico catódico. O voltamograma corresponde aos dois semi-ciclos, que são semelhantes por se tratar de uma reação reversível.

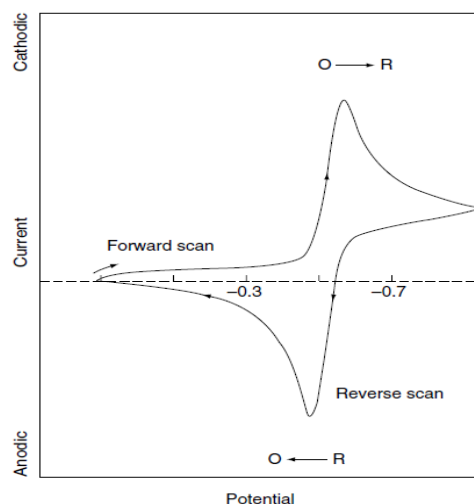


Figura 3. Voltamograma cíclico para solução redox em sistema reversível (Wang, 2006).

Analisando os picos fornecidos pelo voltamograma é possível quantificar as quantidades de componentes em amostras que são ativas em solução redox, como se pode visualizar na Figura 4, que mostra os picos catódicos e anódicos aumentarem de intensidade com a concentração do composto em análise. Alguns exemplos de trabalhos de análise do café apresentados usando voltametria cíclica são, por exemplo, na determinação de compostos fenólicos totais (Kilmartin e Hsu, 2003; Magarelli et al., 2013) e avaliação das propriedades antioxidantes (Laskowska e Kurleto, 2011) por estarem ambas associadas a espécies eletroativas. Como o objetivo deste trabalho é a análise de CAF, o estudo a seguir apresentado está orientado só para este composto.

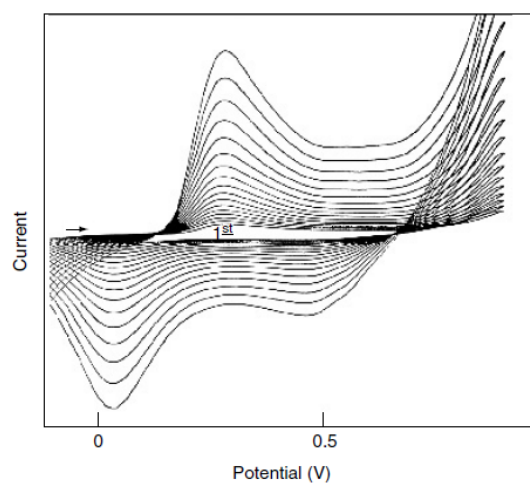


Figura 4. Exemplo de voltamograma cíclicos onde a intensidade de corrente aumenta com a concentração do composto a analisar (Wang, 2006).

**Eléctrodos de trabalho voltamétricos.** Os métodos electroquímicos estão sendo bastante utilizados para a análise química, em geral, vários tipos de eléctrodos metálicos e de carbono. Os eléctrodos com base de carbono têm uma utilidade bem ampla, já que apresentam vantagens significantes como baixo custo, amplo intervalo de potencial, além de possuir uma variabilidade e sensibilidade alta na detecção de componentes diversos. Como aspecto negativo, tem uma baixa taxa de transferência na superfície do eletrodo em relação aos eléctrodos metálicos.

Na construção dos eléctrodos há muitos fatores que podem influenciar a qualidade e eficiência da análise. O tipo de carbono ou método utilizado na elaboração do eletrodo demonstram forte influencia na qualidade da análise. Alguns tipos de carbono são de utilização mais comum como carbono vítreo, pasta de carbono, fibra de carbono, ou componentes como grafite e colas *epoxy*. Além da densidade de cada material, a presença de sujidades como grupos funcionais na superfície pode influenciar negativamente a análise.

O eléctrodo de carbono mais utilizado é o carbono vítreo devido às vantagens apresentadas, como alta reprodutibilidade, boas propriedades químicas e uma ampla gama de potencial que pode ser lida.

**Parâmetros de operação na voltametria cíclica.** Durante a condução de um experimento de voltametria cíclica alguns parâmetros devem ser estabelecidos. Esses parâmetros estão dependentes de alguns fatores; por exemplo, o tipo de eletrodo de trabalho a usar, solvente de preparação da amostra e amostra a analisar tem grande influencia nesses parâmetros.

O primeiro parâmetro de operação para a voltametria cíclica é o intervalo do potencial em que o eletrodo de trabalho selecionado é capaz de trabalhar para aquele tipo de amostra, sendo importante para determinação dos pontos de início e fim de uma reação *redox*. Outro parâmetro é o intervalo de intensidade da corrente utilizada no sistema, pois tem influencia na visualização do pico para redução e, se possível, da oxidação. O valor utilizado vai variar de amostra para amostra assim como entre os tipos de eléctrodos. Outro fator importante na voltametria cíclica é a frequência dos pontos a analisar, pois caso os pontos estejam muito separados pode ocorrer a linearização da curva, e se estiverem muito próximos pode ocorrer muito ruído na curva.

Na Figura 5 mostra-se um voltamograma cíclico para transferência reversível de eletrões (sistema electroquímico de um composto *redox* reversível) com os parâmetros importantes a medir:  $E_{p,c}$ , o pico do potencial catódico;  $E_{p,a}$ , o pico do potencial anódico;  $E_i$  e  $E_f$ , os potenciais inicial e o potencial de inversão, respectivamente;  $I_{p,c}$ , o pico da corrente catódica;  $I_{p,a}$ , o pico da corrente anódica. No geral, em sistemas reversíveis pode-se obter informação quantitativa por voltametria, através da equação Randles-Sevcik, que especifica a corrente anódica ( $I_a$ ) ou catódica ( $I_c$ ) em função da concentração do composto a analisar:

$$i_p = 2,69 \times 10^8 n^{3/2} A D^{1/2} V^{1/2} C$$

onde, intensidade de corrente de pico ( $i_p$ ) em sistemas reversíveis é dada a partir da equação de Randles-Sevcik, onde:  $n$ = número de electrões envolvidos;  $A$ = área do eléctrodo ( $m^2$ );  $D$ = coeficiente de difusão ( $m^2/s$ );  $C$ = concentração ( $mol/L$ );  $v$ =velocidade de varrimento ( $V/s$ ).

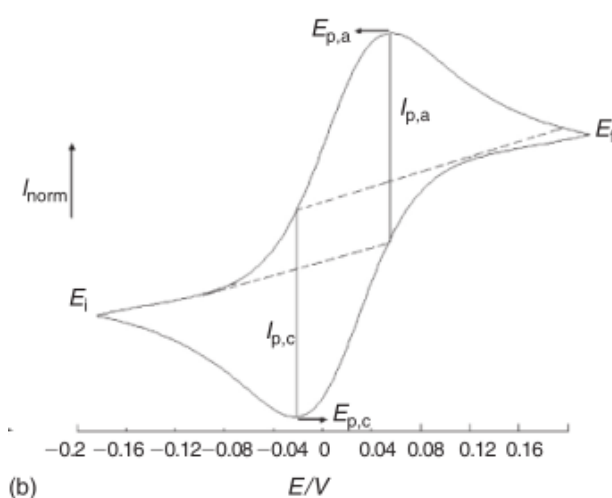


Figura 5. Voltamograma cíclico para transferência de eletrões reversível (Wang, 2006).

Estes parâmetros voltamétricos dão informação sobre o desempenho de um eléctrodo de trabalho num sistema contendo um composto *redox* reversível a analisar. Por exemplo:

- o número dos electrões (n) pode ser determinada pela separação entre os potenciais de pico através da expressão

$$n \times (E_{pa} - E_{pc}) \cong 59 \text{ mV};$$

- a razão entre intensidade de corrente de pico catódico ( $I_{pc}$ ) e a do pico anódico ( $I_{pa}$ ) é unitária, ou seja,

$$I_{pc}/I_{pa} = 1 ;$$

- o potencial redox ( $E^0$ ) para uma reacção reversível, que significa que  $k_d$  e  $k_r$  são iguais quando o potencial aplicado é  $E^0$ , é calculado por,

$$E^0 = (E_{pc} + E_{pa})/2 .$$

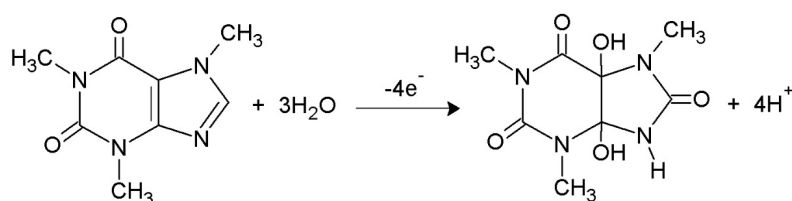
**Voltametria cíclica da cafeína.** O comportamento irreversível da oxidação da CAF foi estudado no eléctrodo de diamante dopado com boro usando voltametria cíclica e voltametria de varredura linear (LSV) por Spătaru et al. (2002). O esquema do processo global de oxidação da CAF proposto (Figura 6), que é semelhante ao referido por Hansen e Dryhurst (1971), envolve quatro electrões ( $4e^-$ ) e quatro protões ( $4H^+$ ).

No mecanismo, o primeiro passo é uma oxidação  $2e^-$ ,  $2H^+$  da ligação C-8 para N-9 para dar o ácido úrico substituído, seguindo-se de uma oxidação imediata de  $2e^-$ ,  $2H^+$  para o análogo de 4,5-diol do ácido úrico, que rapidamente fragmenta.

Na determinação de CAF temos exemplos de trabalho que mostram as pontencialidade da técnica voltamétrica. Por exemplo, a análise de CAF: em formulações farmacêuticas usando um eléctrodo de diamante dopado com boro usando voltametria de onda quadrada (SWV) e voltametria de pulso diferencial (DPV) (Lourenção et al., 2009); usando eléctrodos de carbono vítreo e carbono vítreo modificado com Nafion (polímero de permuta catiônica, derivado de perfluorossulfonato de Teflon) por aplicação da voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso diferencial (DPV), em bebidas comerciais e drogas, incluindo café (Torres et al., 2014); com eléctrodo de pasta de carbono modificado com antraquinona, usando parafina, por voltametria cíclica (CV) em fármacos (Tadessa et al., 2013); usando um

eléctrodo de lápis de grafite comercial simples e o método de voltametria de remoção anódica de onda quadrada (SWASV) (Ly et al., 2004); por medição indireta, usando eléctrodo de pasta de carbono modificado com 1,4-benzoquinona e voltametria de onda quadrada e cíclica, que se baseia na supressão da corrente de pico de 1,4-benzoquinona na adição de CAF, em amostras de café (Aklilu et al., 2008).

**A**



**B**

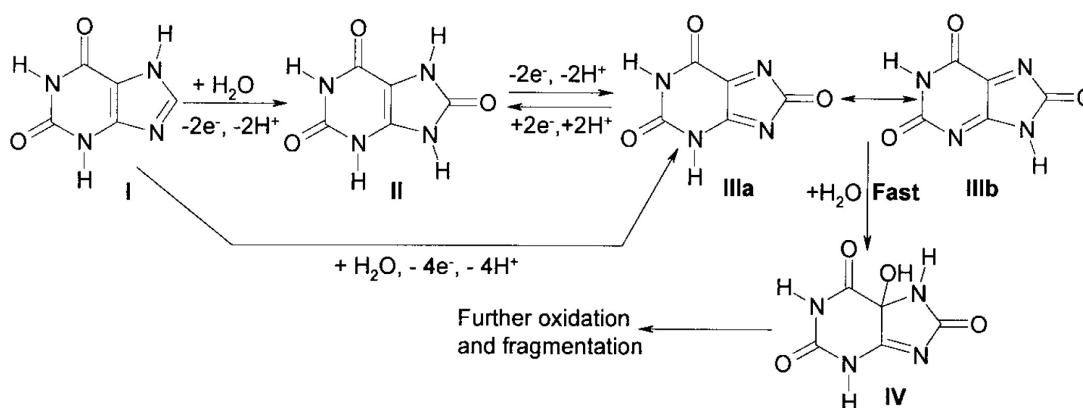


Figura 6 – Oxidação da CAF: A) reação global; B) mecanismo (Spătaru et al., 2002)).

De salientar que não foram encontrados trabalhos envolvendo eléctrodos de grafite com óxidos de metal e, por isso, há grande relevância no presente estudo por estar associado ao desenvolvimento de novas metodologias de análise de CAF.

Na secção seguinte apresentam-se os materiais, reagentes, soluções e procedimentos usados no trabalho experimental executado neste trabalho.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Reagentes e produtos químicos

As soluções usadas neste trabalho foram todas preparadas com água desionizada (tipo II) e com reagentes analíticos de pureza adequada para análise. Os reagentes e produtos químicos que foram utilizados neste trabalho, apresentam-se na Tabela 2.

Tabela 2. Produtos químicos utilizados no trabalho.

Composto	Formula molecular	Marca
Hidrogenofosfato de Potássio	$K_2HPO_4$	Panreac
Dihidrogenofosfato de Potássio	$KH_2PO_4$	Fluka
Hexacianoferrato (III) de potássio	$K_3[Fe(CN)_6]$	Acrõs Organics
Hexacianoferrato (IV) de potássio	$K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$	Acrõs Organics
Cafeína	$C_8H_{10}N_4O_2$	Panreac
Ácido perclórico	$HClO_4$	Riedel-deHaen
Acetato de sódio	$CH_3COONa.3H_2O$	Merck
Ácido acético	$CH_3COOH$	Panreac
Ácido sulfúrico	$H_2SO_4$	Panreac

### 2.2. Amostragem

As 13 amostras de café foram adquiridas numa superfície comercial, na forma de grão, por pesagem e de várias origens: Angola, Brasil, Camarões, Colombia, Costa do Marfim, Costa Rica, Guatemala, Índia, Portugal, São Tomé e Príncipe, Timor Leste, Uganda e Vietnam. As amostras não tinham qualquer referência à respetiva variedade de café. Os grãos de café foram moídos no laboratório numa máquina de moer café (Fagor Practica ML-300) até à obtenção de um pó fino e armazenados em recipientes devidamente fechados e conservados à temperatura ambiente e no escuro. Ao contrário das outras, a amostra Portuguesa foi adquirida em pacote de marca Torrié.

### 2.3. Análise por HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizada para determinar a concentração de CAF presente nas amostras de cafés de diferentes origens.

**Equipamento de HPLC.** O equipamento de cromatografia utilizado era constituído por uma bomba ternária da marca Varian, modelo 9010, um injetor automático da marca HTA modelo HT800L, um detetor Diode Array da marca Varian modelo Pro Star 330 utilizando um comprimento de onda de 280 nm, uma coluna da marca SUPELCO com fase estacionária Kromacil C185 com comprimento de 150 mm e 4,6 mm de diâmetro e um forno da marca Jones Chromatography modelo 7981 a 30° C. o Fluxo da análise foi de 1mL/min com dois eluentes misturados segundo um gradiente de eluente e com um tempo de corrida de 30 minutos. O gradiente do eluente segue a proporção de 70:30 de eluente A e B, respectivamente, para o tempo inicial da análise; ao tempo de 20 minutos a proporção é de 0:100; e, ao fim da análise em 30 minutos, a proporção retorna ao valor inicial (Dias et al., 2014). O software utilizado para obtenção dos cromatogramas era da marca Varian, Star Chromatography Work Station Versão 6.4.

**Eluente.** Na análise da CAF, o eluente A foi uma solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% e o eluente B foi metanol com ácido fórmico a 0,1%. Todos os eluentes preparados para o HPLC foram filtrados com um sistema de filtração da Phenomenex, acoplado a uma bomba de vácuo da Laboport, usando filtros 0,2 µm de nylon da marca Whatman, e desgasificados em ultrassons (Elma Transsonic 460/H), durante 5 minutos.

**Soluções padrão de calibração.** Na calibração do equipamento usaram-se soluções padrão de calibração de CAF. Estas soluções aquosas foram preparadas por diluição de uma solução padrão com concentração de 5 g/L, obtendo-se soluções padrão de calibração com concentrações entre 24 e 200 mg/L.

**Soluções de controlo de qualidade.** Para criticar a precisão e exatidão da metodologia desenvolvida prepararam-se 3 soluções de controlo de qualidade por diluição de uma solução concentrada de 0,5 g/100,0 mL, obtendo-se as concentrações de 60, 100 e 170 mg/L.

**Extrato de café.** A extração da CAF foi obtida por mistura de 2,0 g de café com 20 g de água desionizada e após ebulição da mistura (100°C) durante 15 minutos, com agitação esporádica (metodologia alterada de Hecimovic et al., 2011). Após o tempo da extração, a mistura foi deixada a arrefecer até alcançar a temperatura ambiente. Por pesagem, a água perdida na etapa de aquecimento foi resposta e posteriormente a mistura foi filtrada com filtro Whatman. Após esta etapa, 0,5 mL de cada extrato de CAF foi diluído em balões de 25 mL com água desionizada, e filtrado em filtros de seringa descartáveis de 0,2 µm de nylon da marca Whatman, para análise em HPLC. As soluções de café restantes foram congeladas para posterior análise por voltametria.

## 2.4. Construção dos eléctrodos de trabalho

Para a construção dos eléctrodos de trabalho utilizou-se pastas resultantes da mistura de resina epoxy da marca Araldite, grafite e diferentes óxidos de metal. Cada pasta obtida foi colocada numa das extremidades de um cilindro de acrílico (10 cm de comprimento e 0,6 cm de diâmetros interno). No centro do tubo foi inserido um fio de cobre que ficou em contato com a pasta e de tamanho suficiente para 2 cm ficarem fora do tubo acrílico, para a transmissão do sinal. Para vedar esta extremidade, usou-se a resina epoxy. Na Figura 7 mostra-se uma fotografia dos eléctrodos construídos.

Treze eléctrodos foram construídos com diferentes percentagens de óxidos de metal - grafite - resina e, após testados no seu desempenho na análise de CAF foram selecionados seis eléctrodos. As percentagens dos compostos usadas na preparação dos seis eléctrodos selecionado estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição dos eléctrodos de trabalho usados na análise voltamétrica

<b>Eléctrodo</b>	<b>Resina (%)</b>	<b>Carbono (%)</b>	<b>Óxido de Metal (%)</b>	<b>Óxido de Metal Utilizado</b>
C	50.0	50.0	0.0	--
C_PbO7,5%	48.5	43.9	7.5	PbO
C_Cu <sub>2</sub> O7,5%	48.6	43.9	7.5	Cu <sub>2</sub> O
C_PbO <sub>2</sub> 15%	44.6	40.4	15.0	PbO <sub>2</sub>
C_PbO <sub>2</sub> 7,5%	48.5	44.0	7.5	PbO <sub>2</sub>
C_Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 15%	44.6	40.4	15.0	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>



Figura 7 – Imagem dos eletrodos construídos.

## 2.5. Célula eletroquímica

Para a montagem da célula eletroquímica foram utilizados os eléctrodos construídos, como eléctrodos de trabalho, e dois eléctrodos obtidos comercialmente (Biologic Science Instruments) um eletrodo de filamento de platina como eléctrodo auxiliar (A-002233); e, o eléctrodo de referência Ag/AgCl, de junção simples (RE-1B). Os eléctrodos eletroquímicos foram ligados a um equipamento potenciostato-galvanostato PG580 (Uniscan Instruments Ltd), controlado com o Software UiEChem versão 1.34 (Uniscan Instruments Ltd), que foi instalado em um computador, permitindo adquirir os sinais de voltametria.

## 2.6. Análises por voltametria cíclica

**Solução redox.** Para verificar o comportamento dos eléctrodos construídos foi utilizada uma solução padrão redox de ferrocianeto/ferricianeto, que tem comportamento de reação reversível. Esta solução foi preparada com 0,4224g de  $K_4[Fe(CN)_6]$  e 0,3292g de  $K_3[Fe(CN)_6]$  em 100 mL de solução tampão de fosfato (0,1 mol/L e a pH=7,00). A solução tampão de fosfato foi obtidas por mistura das soluções de  $K_2HPO_4$  e  $KH_2PO_4$ ,

ambas de concentração 0,1 mol/L (dissolução de 17,418g e 13,609g das respectivas massas em 1 litro de água deionizada). O valor de pH foi confirmado através da leitura do pH usando um eléctrodo de pH combinado (Hanna Instruments 30) e um pHmetro (Hanna Instruments pH 211 Microprocessor pHMeter).

As condições estabelecidas para a voltametria cíclica foram: potencial inicial de -2 V; potencial final de +2 V; velocidade de varrimento de 0,4 V/s; Volts por ponto igual a 0,02 V; número de ciclos igual a 2; intervalo de leitura da corrente de 10 mA/V. Os voltamogramas cíclicos obtidos foram analisados com o objetivo de recolher informação sobre o pico anódico ( $I_{pa}$  e  $E_{pa}$ ) e catódico ( $I_{pc}$  e  $E_{pc}$ ).

**Soluções para estabelecer as condições de análise voltamétrica.** Neste ponto experimental procurou-se estabelecer qual o melhor meio iónico e valor de pH para a análise de CAF por voltametria cíclica. Várias soluções foram preparadas com concentração de 0,08 mol/L em CAF e diferentes valores de pH: pH 0,56 com ácido perclórico 0,1 mol/L; pH 1,01 com ácido sulfúrico 0,1 mol/L; pH 1,87 com ácido sulfúrico 0,01 mol/L; pH 5,00 com solução tampão de acetato 0,1 mol/L; pH 7,00 com solução tampão de fosfato 0,05 mol/L. O meio iónico destas soluções foi obtido por medição de 5 mL da respectiva solução concentrada para um balão de 25 mL onde se adicionou a CAF. A solução de ácido perclórico, de concentração 0,5 mol/L, foi preparada medindo 21,5 mL do ácido concentrado (70% e  $d=1,67$ ) e diluindo a 500 mL, com água desionizada. A solução de ácido sulfúrico 0,5 mol/L foi obtida por medição na proporção de 27,8 mL do ácido concentrado (98% e  $d=1,84$ ) para 1 L de solução. Por diluição desta solução (10 mL para um balão volumétrico de 100 mL) preparou-se a solução de ácido sulfúrico 0,05 mol/L. A solução tampão de acetato foi preparada por dissolução de 136,0 g de acetato de sódio num volume final de 2 L (0,5 mol/L), com água desionizada, e o valor de pH acertado com um eléctrodo de pH combinado (Hanna Instruments 30) usando uma solução de ácido acético preparada por diluição de 7,25 mL do ácido concentrado (96% e  $d=1,06$ ) ao volume final 250 mL (0,5 mol/L). Com o mesmo procedimento, a solução tampão de fosfato foi preparada por mistura de soluções de  $K_2HPO_4$  0,1 mol/L (17,4 g em 1L) e  $KH_2PO_4$  0,1 mol/L (13,6 g em 1 L).

Nestes ensaios, a voltametria cíclica foi aplicada com as condições experimentais definidas para a medição da solução redox, exceto no número de ciclos que foram 5. Como objetivo, mediram-se as intensidades de corrente do pico anódico nos voltamogramas cíclicos obtidos.

Para o estudo de qual a velocidade de varrimento mais adequada para a análise voltamétrica, usou-se uma solução de CAF 0,0312 mol/L preparada com o meio (pH) selecionado no passo anterior. As velocidades de varrimento testadas foram: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; e, 0,6 V/s. Nestes ensaios e nos a seguir apresentados, as condições experimentais de voltametria cíclica mantiveram-se iguais às usadas anteriormente, pois a velocidade de varrimento usada, correspondeu à selecionada, e os voltamogramas cíclicos obtidos foram analisados de forma a obter a intensidade de pico anódico. A velocidade de varrimento que permite obter o maior sinal de intensidade de corrente no pico anódico foi selecionado e usado em todas as seguintes análises voltamétricas.

**Soluções padrão de calibração.** As soluções padrão de calibração foram preparadas por diluição de uma solução de 0,5 g/100 mL de CAF, no intervalo de 8 a 2006 mg/L. Todas as soluções analisadas tinham o meio iônico de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol/L. Os resultados retirados dos voltamogramas cíclicos obtidos foram as intensidades de pico e a respectiva meia área do pico (área da primeira metade do pico) para os picos onde mostravam variação no sinal em função da concentração de cafeína. Com estes 2 dados voltamétricos pretendeu-se qual o melhor parâmetro para estabelecer a relação linear com a concentração de CAF.

**Extratos de café.** Os extratos de café preparadas para a análise por HPLC foram usadas na análise voltamétrica cíclica. Todas as soluções foram preparadas por medição de 5 mL do extrato de CAF, que foi preparado para os ensaios de HPLC, e 5 mL do meio iônico o meio iônico de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol/L para um balão volumétrico de 25 mL, cujo volume foi ajustado com água desionizada.

## 2.7. Análise estatística

O trabalho implicou a organização dos dados, cálculo de médias, desvios padrões, outros parâmetros de avaliação de erros, bem como, a regressão linear e todas estatísticas associadas através do programa de cálculo Excel.

Na análise multivariada com regressão pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS) usou-se o programa de estatística R. Todos os procedimentos de avaliação do modelo PLS, como as técnicas de validação cruzada (LOOCV e K-folds) e

de divisão dos dados em grupo de treino e teste foram também desenvolvidos com este programa.

A regressão PLS é uma técnica geralmente usada para previsão e que tem a capacidade de redução de informação usando componentes principais quer nas variáveis independentes quer nas variáveis dependentes (Maroco, 2007). Uma grande vantagem é não ser afetada pela multicolinearidade das variáveis independentes. Como nos voltamogramas cíclicos se tem um grande número de variáveis explicativas, e muitas destas correlacionadas, há um elevado risco de se obter um modelo bem ajustado e com pouco ou nenhum poder de predição. Por isso, é necessário verificar a capacidade de previsão para cada variável latente adicionado de forma a não incluir informação redundante.

### 3. Resultados

Nesta secção do trabalho apresentam-se os resultados obtidos da análise por HPLC e por voltametria cíclica quer de soluções padrão quer das amostras de café.

#### 3.1. Análise por HPLC

Com o objetivo de determinar os níveis de cafeína em amostras de café começou-se por estabelecer a calibração do equipamento de HPLC. Na Figura 8 mostra-se o cromatograma típico obtido da análise de uma amostra de café (amostra do Brasil), onde se verifica que o pico da CAF elui ao tempo de retenção  $5,72 \pm 0,08$  min.

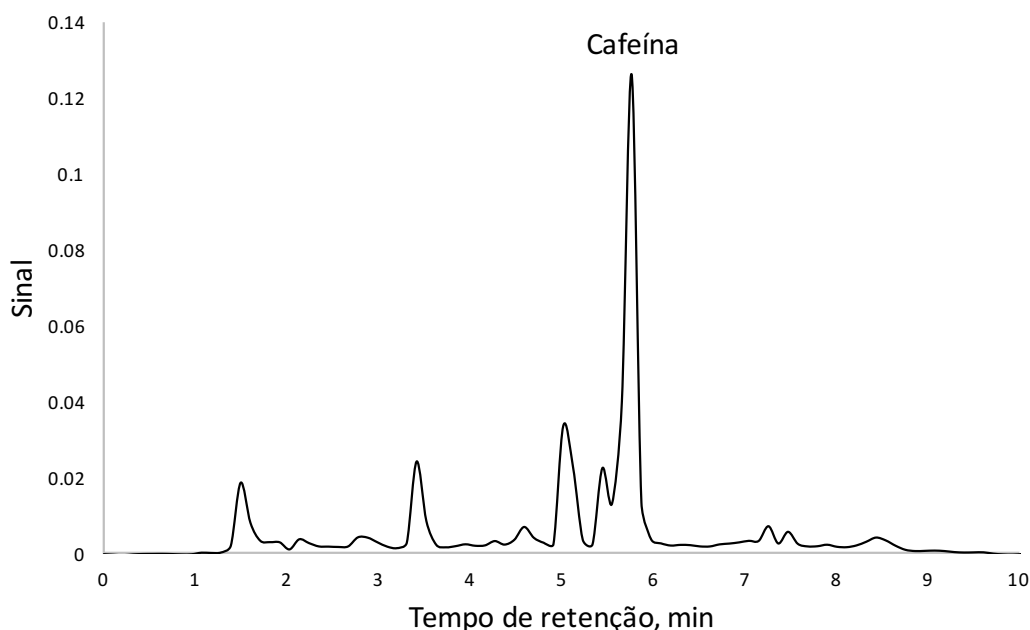


Figura 8 – Cromatograma típico de uma amostra de café

A calibração do HPLC foi efetuada no intervalo dinâmico de concentração de CAF entre 24 e 200 mg/L. A relação entre a área do pico da CAF e a respectiva concentração foi representada por um modelo linear de declive de  $975 \times 10^2 \pm 6 \times 10^2$  (sensibilidade elevada) e ordenada na origem, de  $15 \times 10^4 \pm 7 \times 10^4$ . Verificou-se que os pontos experimentais da calibração seguem uma tendência linear quer visualmente quer pelo coeficiente de correlação de 0,99990 (o coeficiente de determinação,  $R^2$ , indica que

99,99% da variabilidade dos dados são explicados pelo modelo linear). Os limites de detecção e quantificação calculados a partir das estatísticas da reta de calibração foram de 2,44 e 7,40 mg/L, respectivamente, estando a baixo do intervalo dinâmico definido para a calibração.

Na verificação do desempenho de previsão do modelo linear obtido usaram-se 3 soluções de controlo de qualidade (SCQ) de concentrações 59, 101 e 169 mg/L (níveis baixo, médio e alto). No estudo da repetitividade, o método mostrou ser reprodutível pois as concentrações médias obtidas para as três SCQs ( $59,4 \pm 0,9$ ;  $106,7 \pm 0,6$ ; e,  $168 \pm 2$  mg/L) tiveram desvios padrão relativos percentuais (Sr%) inferiores a 1,7% (precisões aceitáveis). No caso do estudo da exatidão obtiveram-se erros relativos percentuais (Er%) de 0,6%, 5,5% e 0,7%, respetivamente, para as SCQs de concentração crescente. O resultado obtido para a solução de 101 mg/L não foi o melhor mas considerou-se tratar de uma situação pontual, talvez na preparação da solução, uma vez que no estudo de precisão intermédia (análise desta solução em 5 dias diferentes), o Er% para esta solução foi de 0,3% mostrando uma exatidão aceitável. O Sr% para este estudo foi de 0,4%, que confirma a precisão aceitável da metodologia desenvolvida.

A qualidade analítica do método de HPLC também foi verificada com a amostra Portuguesa de café que foi preparada 4 vezes, usando o procedimento descrito na secção 2.3, mas com diferentes tempos de ebulição (entre 15 a 40 minutos) para verificar se o procedimento de preparação da amostra funciona. Os resultados mostram uma precisão aceitável (Sr%=4,7%), concluindo-se que quer a análise por HPLC quer a preparação da amostra permitem resultados reprodutíveis.

Na Tabela 4 e Figura 9 apresentam-se os resultados médios obtidos, de três repetições, da análise da CAF em soluções de café que resultaram da extração de CAF de 2, 0 g de cada amostra de café em 20 mL de água desionizada, após 15 minutos de ebulição. Os resultados evidenciam uma grande variabilidade de concentração de CAF nas amostras de café que variaram entre 18 e 95 mg/g de café, ou seja, níveis percentuais entre 1,9% e 9,5% de CAF no café. O café com maior concentração de CAF foi o de origem Costa do Marfim e, o de menor concentração, o café de Costa Rica. Também as mostras de Brasil, Colômbia, Guatemala e Timor apresentam níveis baixos.

Os níveis de CAF no café variam conforme o género do grão de café, a sua origem geográfica e o processo de torra aplicada. Há estudos onde os níveis de cafeína no café são baixos, como por exemplo, o estudo apresentado por Belguidoum et al. (2014), onde os níveis de cafeína no café variaram entre 0,01 e 0,2%. Por outro lado, o

trabalho de Hecimovic et al. (2011) apresentou níveis mais elevados de percentagem de cafeína, variando entre 0,6 e 2,6 %, estando dependente do País de origem do café e do grau de torra. Este trabalho serviu de referência para o procedimento de extração da cafeína, com algumas modificações. Na mesma ordem de grandeza, Silvarolla et al. (2000) obteve níveis de cafeína a variar entre 0,46 e 2,82% em grãos de café Arábica com proveniência da Etiópia.

Tabela 4 – Concentrações médias de cafeína no café

País	Concentração, mg/g de café	s, mg/g de café	sr%	% no café
Angola	46,1	0,8	1,8	4,6
Brasil	21	1	6,2	2,1
Camarões	27,0	0,3	1,3	2,7
Colômbia	20,1	0,3	1,6	2,0
Costa do Marfim	95	4	4,0	9,5
Costa Rica	18,7	0,5	2,6	1,9
Guatemala	22	1	4,4	2,2
Índia	51	2	4,5	5,1
Portugal	61	3	4,7	6,1
São Tomé	71	2,5	3,5	7,1
Timor	19,4	0,8	4,1	1,9
Uganda	34	1	3,9	3,4
Vietnam	40	1	3,4	4,0

s – desvio padrão; sr% - desvio padrão relativo percentual

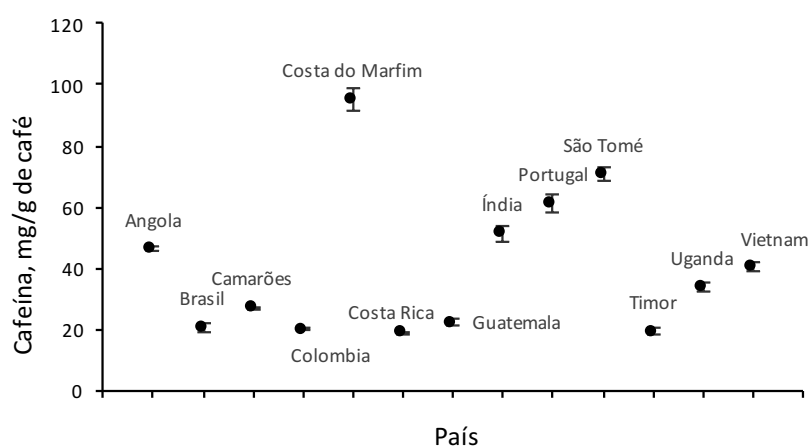


Figura 9 – Concentrações médias de cafeína no café

Neste trabalho obtiveram-se níveis superiores a 2,8% de cafeína no café em 7 das amostras analisadas (Angola, Costa do Marfim, Índia, Portugal, São Tomé, Uganda e Vietnam), o que leva a inferir, considerando que são resultados médios provenientes de ensaios independentes, que realmente são amostras com elevados níveis de cafeína. A Figura 9 mostra que as amostras analisadas apresentam variabilidade aceitável para proceder com estudo de análise de cafeína por voltametria cíclica.

## 3.2. Análises por voltametria cíclica

### 3.2.1. Solução redox

No estudo do comportamento dos eléctrodos construídos usou-se a solução padrão redox de ferrocianeto/ferricianeto preparada com solução tampão de fosfato a pH=7,00. Na Figura 10 mostra-se um exemplo típico do voltamograma cíclico obtido para esta solução com o eléctrodo C. A figura permite verificar que os picos anódicos e catódicos são semelhantes, indicativo de que o composto analisado mostra uma reação próxima da reversível. Na Tabela 5 apresentam-se os parâmetros médios (resultados de 3 repetições) da intensidade de corrente do pico anódico e catódico, bem como, os respectivos valores de potencial medidos nos voltamogramas cíclicos das soluções redox.

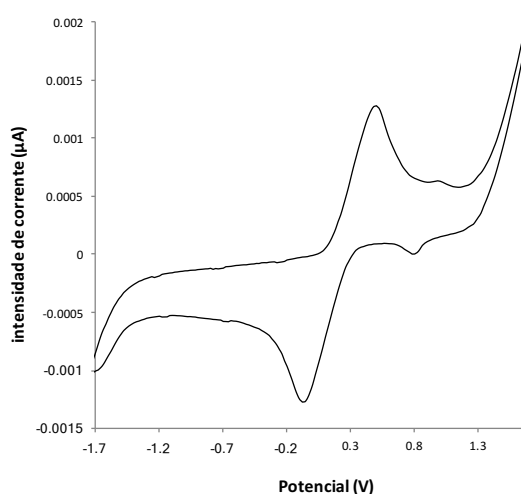


Figura 10 – Voltamograma cíclico típico para a solução redox obtido com o eléctrodo C (V=0,4 V/s; Eléctrodo de referência Ag/AgCl)

Os dados apresentados mostram que a razão das intensidades de corrente do pico anódico e catódico,  $I_{pa}/I_{pc}$ , foram próximos da unidade, esperado para um sistema reversível. Também se verificou que a diferença entre os potenciais dos picos anódico e catódico ( $\Delta E = E_{pa} - E_{pc}$ ) são altos (por exemplo, o de carbono vítreo é de 102 mV) mostrando que há um afastamento da reversibilidade (quanto menor é este valor, mais reversível é o processo). De salientar que para o sistema redox usado, onde ocorre a transferência de um electrão, o valor de  $\Delta E$  deveria ser de 59 mV. Assim, todos os resultados mostraram que os eléctrodos de trabalho usados analisaram a solução redox de ferrocianeto/ferricianeto como um processo quase-reversível.

Tabela 5 – Parâmetros obtidos dos voltamogramas cíclicos da análise à solução redox com os eléctrodos construídos

Eléctrodo	$I_{pa}/I_{pc}$	$\Delta E = E_{pa} - E_{pc}$ , mV	$E^\circ = (E_{pc} + E_{pa})/2$ , mV
C	1.02±0.02	500±10	193±6
C_PbO7,5%	0.92±0.02	473±23	203±12
C_Cu <sub>2</sub> O7,5%	1.09±0.03	355±9	208±5
C_PbO <sub>2</sub> 15%	0.97±0.04	365±10	212±10
C_PbO <sub>2</sub> 7,5%	1.04±0.06	347±12	213±6
C_Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 15%	0.92±0.02	387±12	202±15

Neste ponto, os eléctrodos C\_Cu<sub>2</sub>O7,5%, C\_PbO<sub>2</sub>15%, C\_PbO<sub>2</sub>7,5% e C\_Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>15% mostram melhor desempenho eletroquímico do que C\_PbO7,5% e C, cujos valores de  $\Delta E$  são superiores a 470 mV. Em relação aos valores de  $E^\circ$ , o potencial redox para uma reacção reversível em equilíbrio, os 6 eléctrodos de trabalho mostraram resultados semelhantes como esperado, por terem sido preparados com o mesmo material de base: grafite e resina epoxilica (Araldite).

### 3.2.2. Condições voltamétricas para análise de cafeína

Para a análise de CAF por voltametria cíclica foi necessário estabelecer qual o meio iónico e valor de pH mais adequado. Neste estudo usaram-se várias soluções de CAF de concentração de 0,08 mol/L e com diferentes meios iónicos para estabelecer diferentes valores de pH na solução: pH 0,56 com ácido perclórico 0,1 mol/L; pH 1,01 com ácido sulfúrico 0,1 mol/L; pH 1,87 com ácido sulfúrico 0,01 mol/L; pH 5,00 com solução tampão de acetato 0,1 mol/L; pH 7,00 com solução tampão de fosfato 0,1 mol/L.

Na Figura 11 mostram-se, para cada valor de pH, os voltamogramas cíclicos de todos os eléctrodos de trabalho seleccionados. Os voltamogramas cíclicos mostram 3 picos representativos da oxidação da CAF (confirmado na secção 3.2.3; voltamogramas de uma reação não reversível), comuns aos seis eléctrodos seleccionados, mas dependente do valor de pH do meio.

Como a figura mostra, os três picos referidos estão presentes nos voltamogramas cíclicos das soluções com pH 0,56 e 1,01, em todos os eléctrodos seleccionados. O pico 3 perde intensidade de sinal à medida que o valor de pH aumenta. Também se verificou que este pico mostra melhor perfil ao pH 1,01 do que ao pH 0,56. Os eléctrodos C\_PbO7,5%, C\_Cu2O7,5%, C\_PbO215% e C\_PbO27,5% mostraram um pico extra numa posição que depende do eléctrodo usado, mas, em geral, aparece dentro do intervalo de -0,4V e +0,4V. Este pico corresponde ao ião metálico que resulta da dissolução ácida do óxido de metal presente na superfície do eléctrodo de trabalho.

Na Figura 12 mostram-se as relações encontradas entre a intensidade de corrente do pico anódico e o respectivo valor de pH para os seis eléctrodos de trabalho, usando a informação do pico1. Tal como se visualiza, os sinais mais elevados foram obtidos para as soluções de ácido sulfúrico (pH 1,01 ou 1,87). Por isso, todos os ensaios voltamétricos a seguir apresentados foram realizadas com o ácido sulfúrico 0,1 mol/L por permitir ter sinais com valores de intensidade de corrente aceitáveis e picos (1, 2 e 3) melhor definidos em todos os eléctrodos de trabalho.

No estudo da velocidade de varrimento e usando as melhores condições de meio e pH (ácido sulfúrico 0,1 mol/L e pH 1,01) seleccionadas pelo passo anterior e testaram-se as velocidades de varrimento do potencial de 0,10 a 0,60 V/s. As restantes condições experimentais, concentração em CAF e parâmetros para a voltametria cíclica, mantem-se iguais às usadas anteriormente.

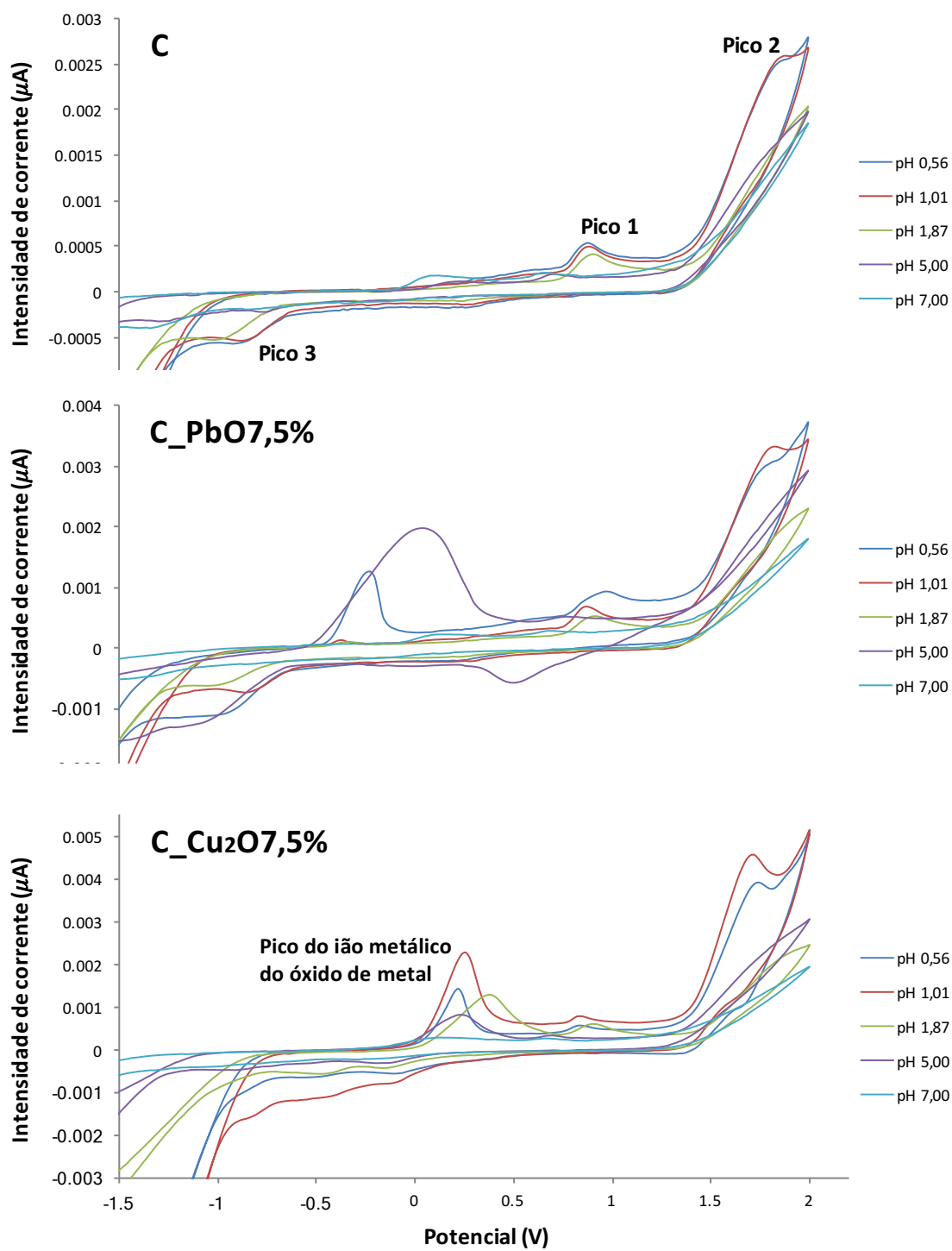


Figura 11 – Voltamogramas cíclicos dos eléctrodos a diferentes valores de pH

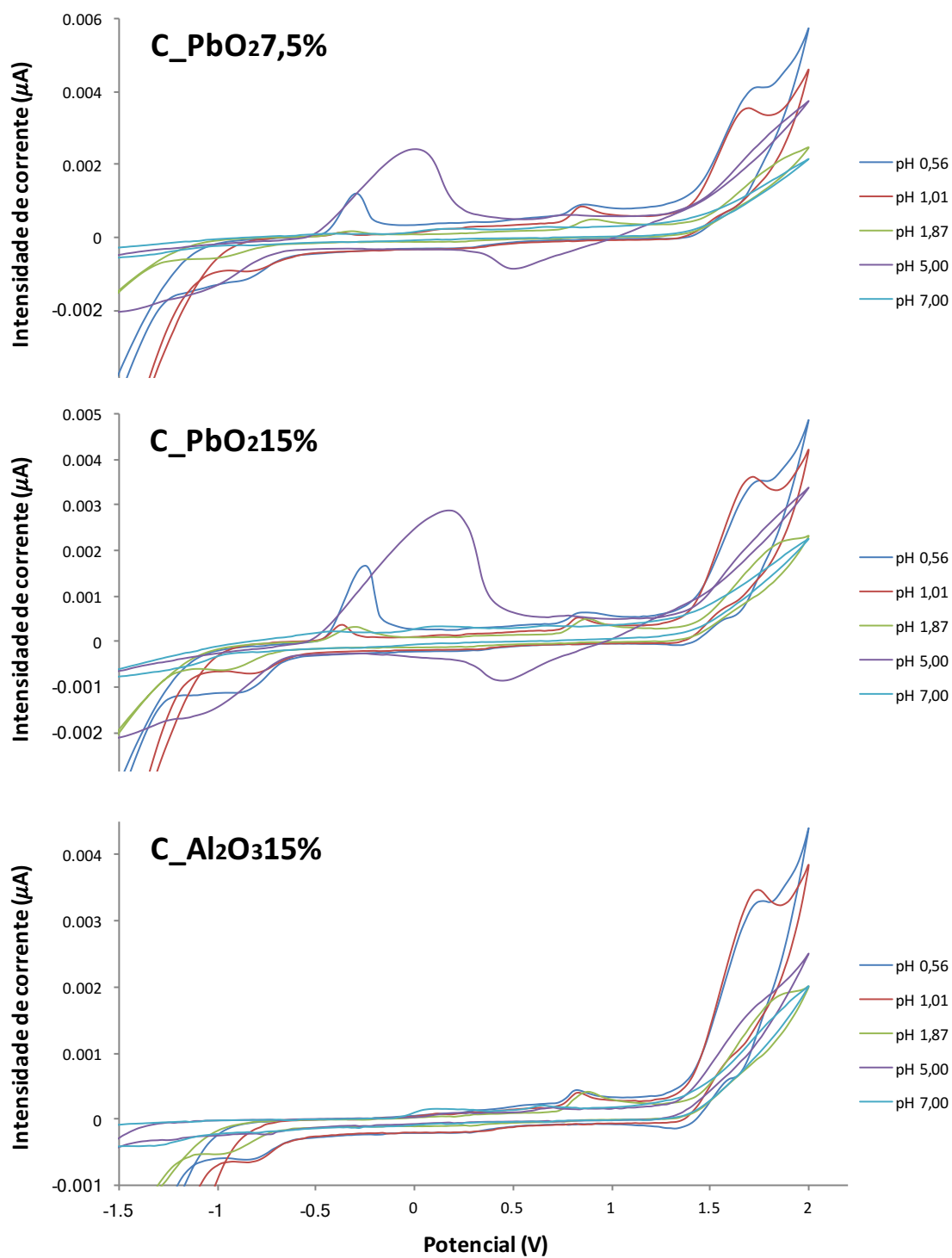


Figura 11 – Voltamogramas cíclicos dos eléctrodos a diferentes valores de pH (continuação).

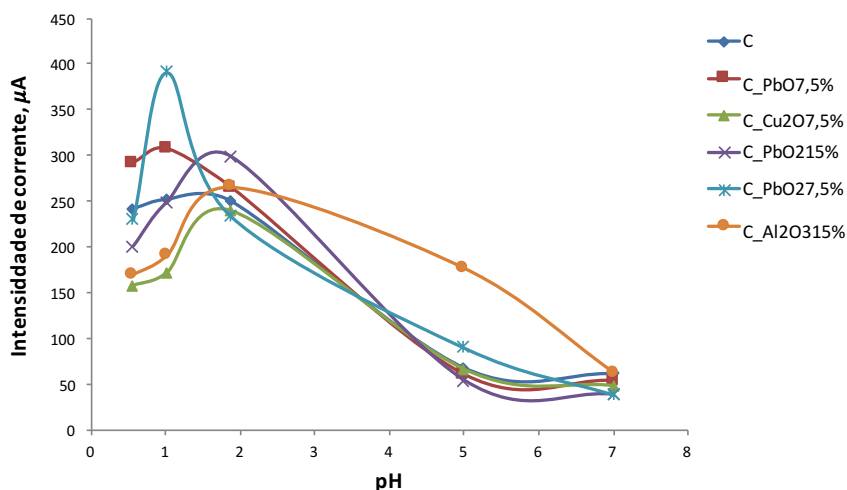


Figura 12 – relação entre a intensidade de corrente do pico anódico e o respectivo valor de pH para os seis eléctrodos de trabalho

Na Figura 13 fez-se a representação gráfica da relação entre a intensidade de corrente do pico anódico 1 e os valores da raiz quadrada da velocidade de varrimento do potencial. A figura mostra evidência de que só a partir da velocidade de varrimento 0,40 V/s ( $\sqrt{V}=0,6 \text{ V}^{1/2}/\text{s}^{1/2}$ ), o valor de intensidade de corrente do pico se mantém constante. Por isso, seleccionou-se este valor para ser usado em todas as seguintes análises voltamétricas, por permitir uma transferência rápida de eletrões na superfície do eléctrodo de trabalho e a intensidade de corrente obtida estar limitada pela difusão do composto em análise para a superfície do eléctrodo.

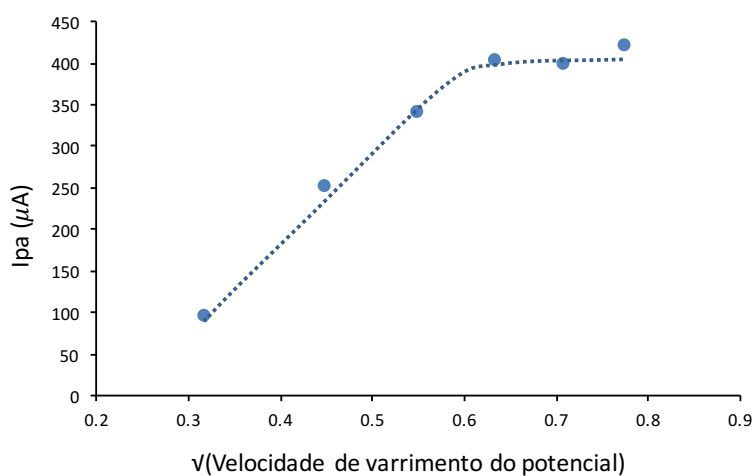


Figura 13 - Intensidade de corrente do pico anódico 1 e os valores de velocidade de varrimento do potencial com a raiz quadrada

### 3.2.3. Calibração voltamétrica

**Soluções padrão de calibração.** As soluções padrão de calibração foram preparadas por diluição de uma solução de 0,5 g/100 mL de CAF, no intervalo de 20 a 2006 mg/L. Todas as soluções analisadas tinham o meio iônico de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 mol/L. Na Figura 14 mostram-se voltamogramas cíclicos das 5 soluções padrão de calibração mais concentradas para cada um dos eléctrodos de trabalho seleccionados. Todas as figuras mostram 2 picos anódicos (aproximadamente a +0,82 e +1,7 V) e 1 pico catódico (aproximadamente a -0,82 V) com variação na intensidade de corrente associada à variação da concentração de CAF na solução. Nos voltamogramas cíclicos dos eléctrodos de trabalho C\_PbO7,5%, C\_PbO<sub>2</sub>15% e C\_PbO<sub>2</sub>7,5% aparece outro pico anódico, a aproximadamente a -0,3V, que corresponde ao ião metálico que se dissolve do óxido de metal que faz parte da composição da superfície do eléctrodo. No eléctrodo C\_Cu<sub>2</sub>O7,5%, este pico aparece a potencial mais elevado, a aproximadamente +0,28 V.

Também se pode verificar que voltamogramas obtidos para os eléctrodos C\_PbO<sub>2</sub>7,5% e C\_Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>15% apresentam maior consistência com a variação das concentrações de CAF nas soluções padrão de calibração analisadas nos três picos identificados como resultantes da análise da CAF.

Para salientar este facto, na Figura 15 apresentam-se 3 gráficos evidenciando a zona de variação do sinal intensidade de corrente em função do potencial de cada um dos três picos, para as 5 soluções padrão de calibração, obtidos para o eléctrodo C\_Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>15%.

Os dados retirados de cada um dos três picos dos voltamogramas cíclicos obtidos da análise às soluções padrão de calibração foram a intensidade de pico anódico e a respectiva meia área do pico. Na Tabela 6 mostram-se os parâmetros obtidos das calibrações efetuadas usando estes dados. Como se esperava, a maior parte dos eléctrodos mostraram uma tendência linear entre os sinais de intensidade de corrente do pico anódico ou a respectiva meia área do pico e as concentrações de CAF, para os três picos identificados. De salientar que, o software do potenciostato não permitiu nas soluções com concentração mais baixas em CAF medir o valor da intensidade de corrente do pico nem o da meia área do pico, mesmo com o pico definido, dificultando a calibração a valores mais baixos.

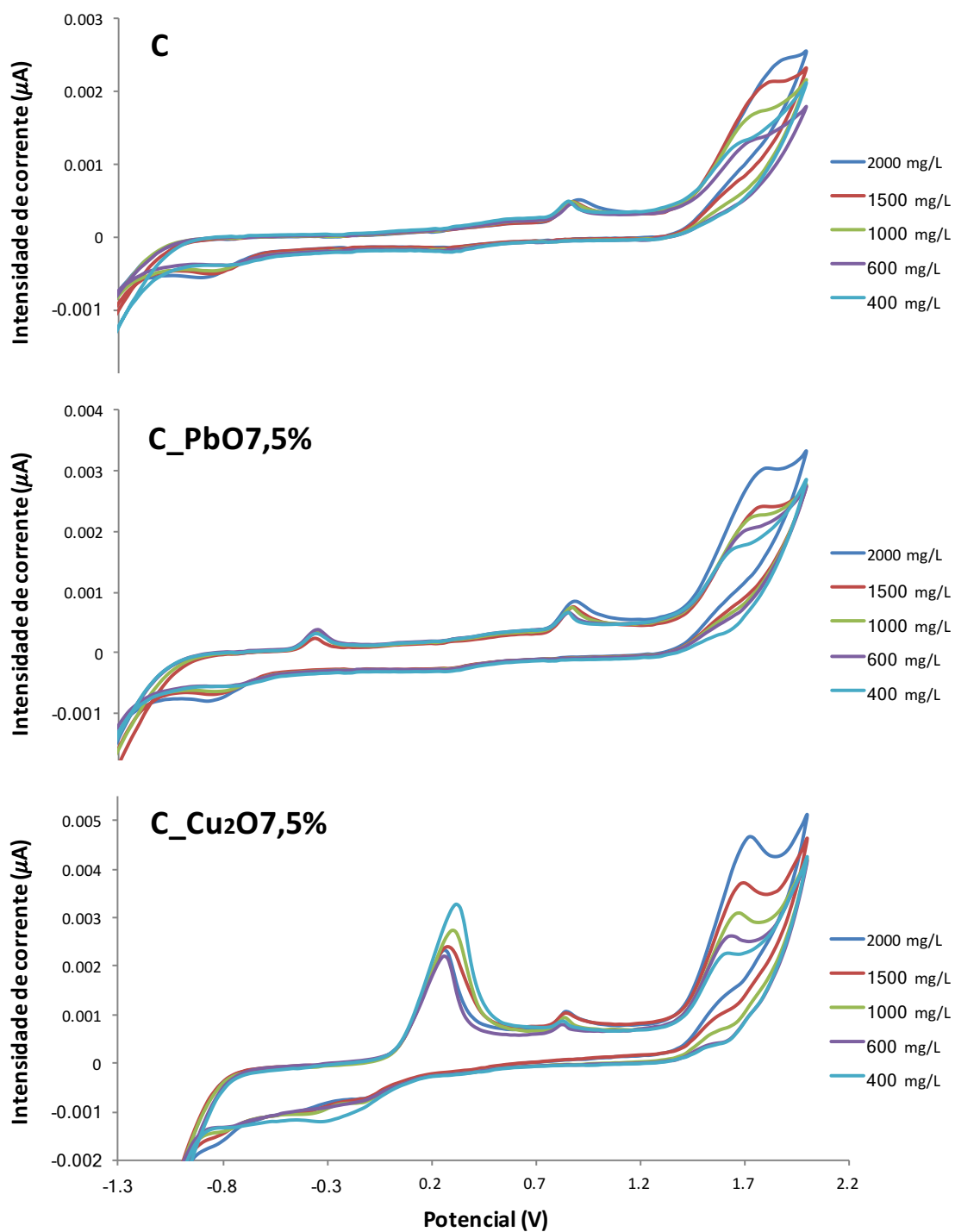


Figura 14 - Voltamogramas cíclicos das 5 soluções padrão de calibração mais concentradas para cada um dos eléctrodos de trabalho seleccionados.

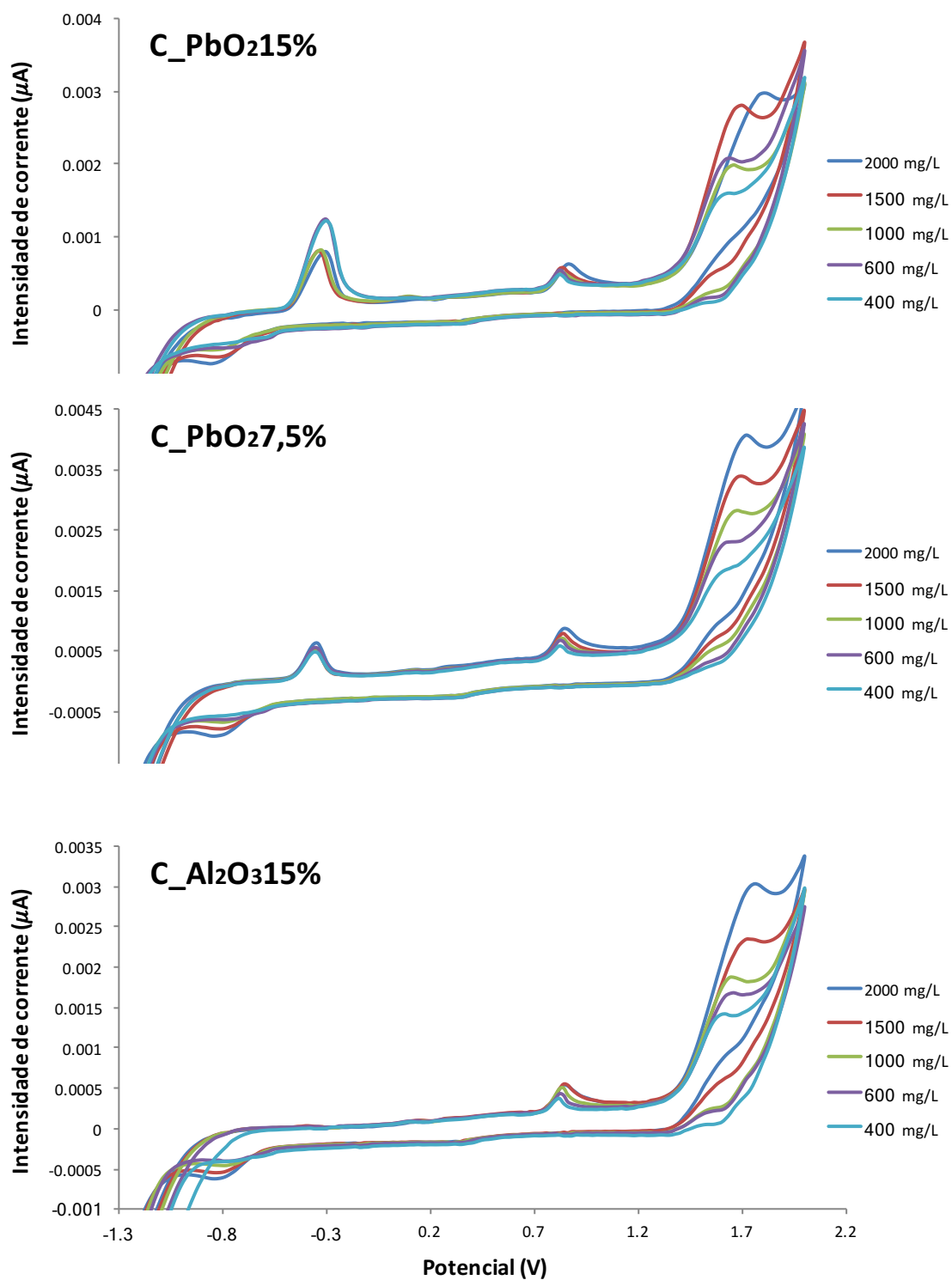


Figura 14 - Voltamogramas cíclicos das 5 soluções padrão de calibração mais concentradas para cada um dos eléctrodos de trabalho seleccionados (continuação).

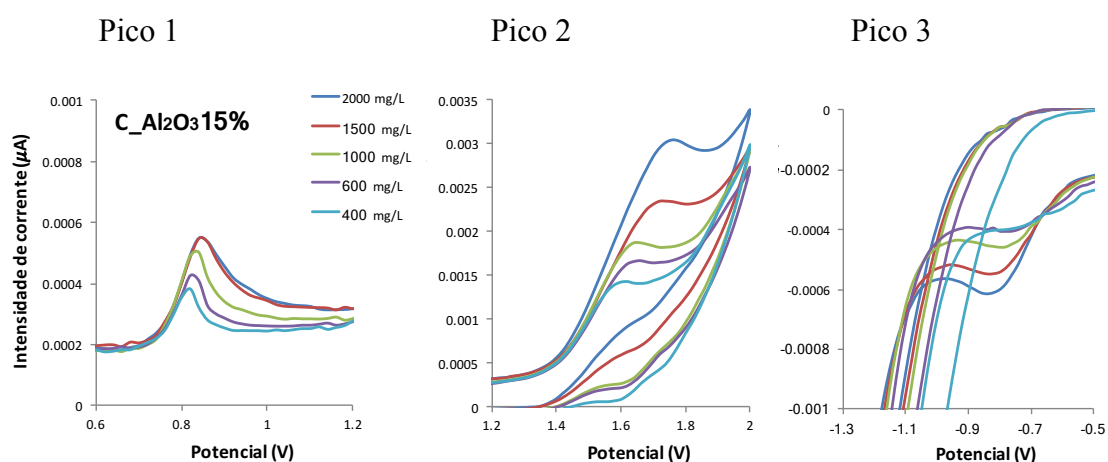


Figura 15 – Voltamograma cíclicos evidenciando cada um dos três picos obtidos para o eléctrodo C<sub>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>15%</sub>.

Os resultados dão evidência, como já tinha sido referido anteriormente, que os 3 picos analisados estão diretamente dependentes da concentração de cafeína em solução. As diferenças nos resultados são evidentes pois a relação linear obtida com os dados de intensidade de corrente do pico são superiores aos obtidos com os da área do meio pico. Por esta razão, na avaliação do desempenho dos modelos obtidos usaram-se somente os dados referentes às intensidades de corrente do pico.

As calibrações mostraram que nos eléctrodos C, C<sub>PbO<sub>2</sub>7,5%</sub> e C<sub>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>15%</sub> os resultados do pico 1 são coerentes com a variação da concentração de cafeína nas soluções padrão de calibração, mas com menor variação dos pontos à reta ajustada. Estes dois últimos eléctrodos e o eléctrodo C<sub>Cu<sub>2</sub>O7,5%</sub> permitiram medições lineares no pico 2 para concentrações superiores a 2,0 mmol/L ou 400 mg/L, ao contrário dos restantes eléctrodos considerando que a curvatura do pico não está bem definida (ver Figura 14) e, por isso, não foi possível estabelecer o potencial correto do pico. De salientar que os valores de intensidade de corrente obtidos no pico 3, mostraram uma relação linear evidente, com exceção do eléctrodo C que mostrou uma relação polinomial de 2º grau e do eléctrodo C<sub>Cu<sub>2</sub>O7,5%</sub>, que não mostrou pico mensurável.

Tabela 6 - Parâmetros obtidos das calibrações lineares efetuadas usando os dados voltamétricos medidos.

Eléctrodo	Intensidade de corrente do pico, $\mu\text{A}$				Área do meio pico, $\mu\text{A}^2$			
	Intervalo de Concentrações, $\mu\text{M}$	Declive	Ord.Orig.	R	Intervalo de Concentrações, $\mu\text{M}$	Declive	Ord.Orig.	R
<b>Pico 1</b>								
C	[40; 2006]	0.101	89.7	0.910	[40; 2006]	0.0234	6.2	0.937
C_PbO7,5%	[40; 2006]	0.185	103.6	0.946	[40; 2006]	0.0421	6.0	0.952
C_Cu <sub>2</sub> O7,5%	[401; 2006]	0.106	96,2	0.979	[401; 2006]	0.0501	-16.4	0.970
C_PbO <sub>2</sub> 15%	[101; 2006]	0.140	84.9	0.956	[101; 2006]	0.0269	5.5	0.987
C_PbO <sub>2</sub> 7,5%	[101; 2006]	0.197	89.3	0.953	[101; 2006]	0.0374	1.9	0.991
C_Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 15%	[40; 1500]	0.204	70,39	0.981	[40; 2006]	0.0189	6.0	0.981
<b>Pico 2</b>								
C	Nd	nd	nd	nd	[40; 2006]	0.127	18.2	0.985
C_PbO7,5%	Nd	nd	nd	nd	[40; 2006]	0,217	20.4	0.987
C_Cu <sub>2</sub> O7,5%	[201; 2006]	0.632	216.6	0.990	[201; 2006]	0.229	11.9	0.991
C_PbO <sub>2</sub> 15%	[401; 2006]	0.295	317.1	0.856	[101; 2006]	0.154	22.9	0.983
C_PbO <sub>2</sub> 7,5%	[1003; 2006]	0.448	336.8	0.986	[1003; 2006]	0.168	54.3	0.986
C_Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 15%	[401; 2006]	0.323	262.0	0.997	[40; 2006]	0.141	23.8	0.977
<b>Pico 3</b>								
C	[401; 2006]	-0.072	-26.6	0.986	[401; 2006]	-0.0151	-11.3	0.987
C_PbO7,5%	[602; 2006]	-0.087	-32.5	0.982	[601; 2006]	-0.0269	-10.1	0.995
C_Cu <sub>2</sub> O7,5%	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C_PbO <sub>2</sub> 15%	[601; 2006]	-0.110	12.7	0.989	[601; 2006]	-0.0275	1.9	0.994
C_PbO <sub>2</sub> 7,5%	[601; 2006]	-0.150	40.7	0.984	[601; 2006]	-0.0393	12.92	0.983
C_Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 15%	[601; 2006]	-0.075	-29.5	0.999	[601; 2006]	-0.0201	-10.36	0.989

nd – não definido

Na globalidade, os eléctrodos C\_Cu<sub>2</sub>O7,5%, C\_PbO<sub>2</sub>7,5% e C\_Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>15% foram os que apresentaram maior consistência na análise quantitativa atendendo que mostraram possibilidade de estabelecer modelos de calibração para, pelo menos, dois picos com resultados razoáveis ao nível do modelo ajustado e com maior proximidade dos pontos experimentais à reta ajustada. De entre estes três eléctrodos salienta-se o de C\_Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>15%, que mostrou ser mais robusto às variações laboratoriais.

No estudo quantitativo com estes últimos eléctrodos quer com soluções de controlo de qualidade, para avaliar a precisão e exatidão dos modelos de calibração obtidos, quer com as soluções de extrato de cafeína das amostras de café obtiveram-se resultados com erros elevados. Considerando a qualidade dos modelos apresentados na Tabela 6, esta situação era esperada, justificando-se pelo facto de as análises voltamétricas terem sido efetuadas em diferentes dias em condições de temperatura ambiente não controladas, onde as variações foram mais de 10 °C.

No sentido de mostrar que os voltamogramas cíclicos das amostras de café têm informação quantitativa da cafeína, no estudo seguinte correlaciona-se esta informação com as concentrações de cafeína obtidas por HPLC, usando métodos estatísticos de calibração multivariada.

### ***3.2.4. Análise de amostras de café***

As amostras de café preparadas para a análise por HPLC foram usadas na análise voltamétrica cíclica. Todas as soluções foram preparadas por diluição de 5 mL da solução de extração de cafeína e de 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol/L a 25 mL. Na Figura 16 mostram-se os voltamogramas cíclicos das 13 amostras obtidos com cada um dos eléctrodos de trabalho seleccionados.

Os voltamogramas mostram que a matriz do extrato de café alterou o aspecto do voltamograma principalmente no intervalo de potenciais entre 0,5 e +1,3 V, que corresponde à zona do pico 1. De referir que a matriz do extrato de café poderá também estar a influenciar a informação da CAF nos picos 2 e 3.

Foi no sentido de averiguar estas possibilidades que se pretendeu verificar se era possível correlacionar os voltamogramas cíclicos dos extratos de café com a informação quantitativa da cafeína obtida por HPLC. Para simplificar o estudo usou-se apenas a informação do voltamograma correspondente ao pico 1 e 2, ou seja, ao intervalo de valores de potencial anódico entre 0 e +2 V.

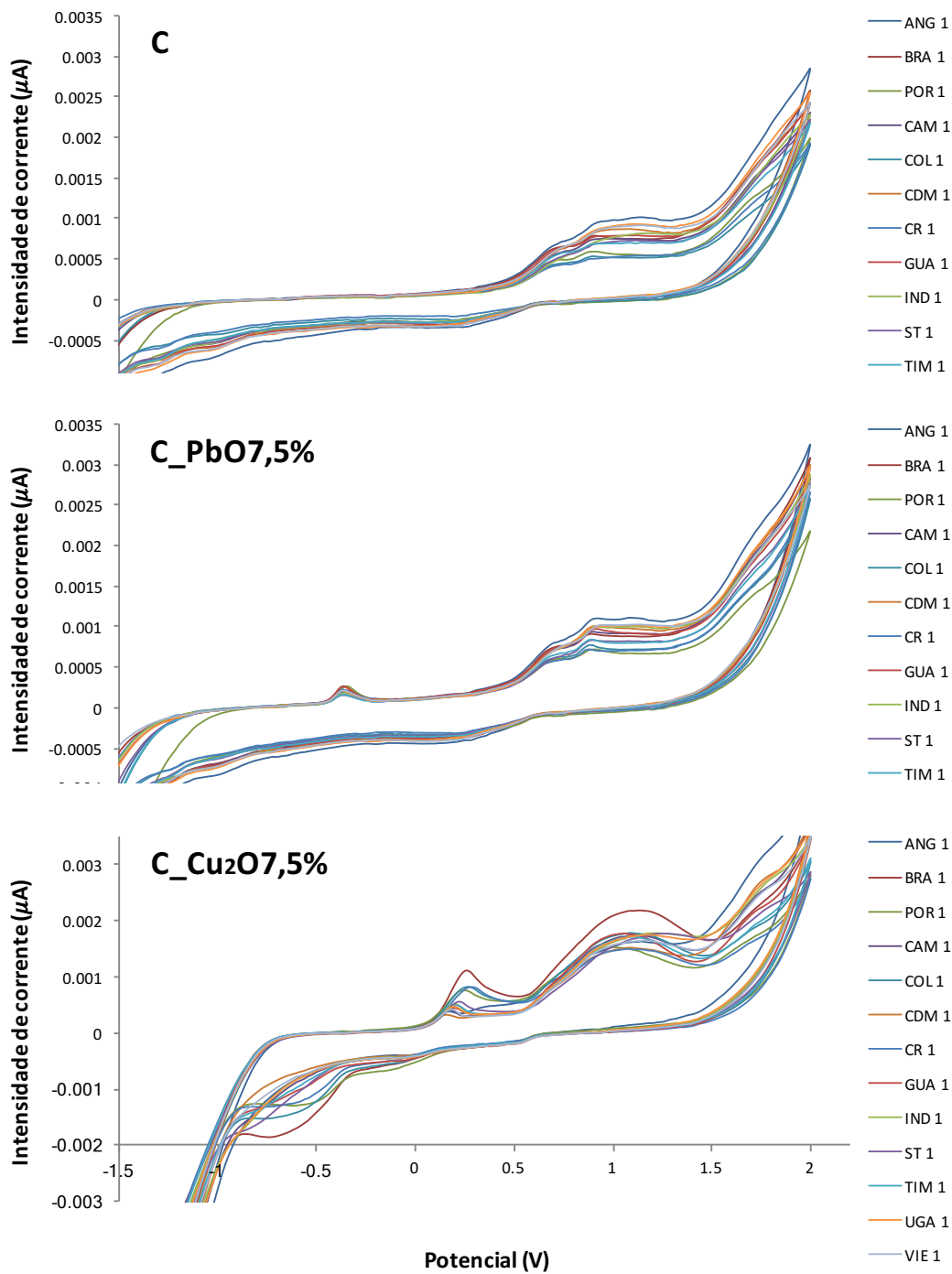


Figura 16 - Voltamogramas cíclicos das 13 amostras para cada um dos eléctrodos de trabalho seleccionados. ANG – Angola; BRA – Brasil; POR – Portugal; CAM – Camarões; COL – Colômbia; CDM – Costa do Marfim; CR – Costa Rica; GUA – Guatemala; IND – Índia; ST – São Tomé e Príncipe; TIM – Timor; UGA – Uganda; VIE – Vietnam.

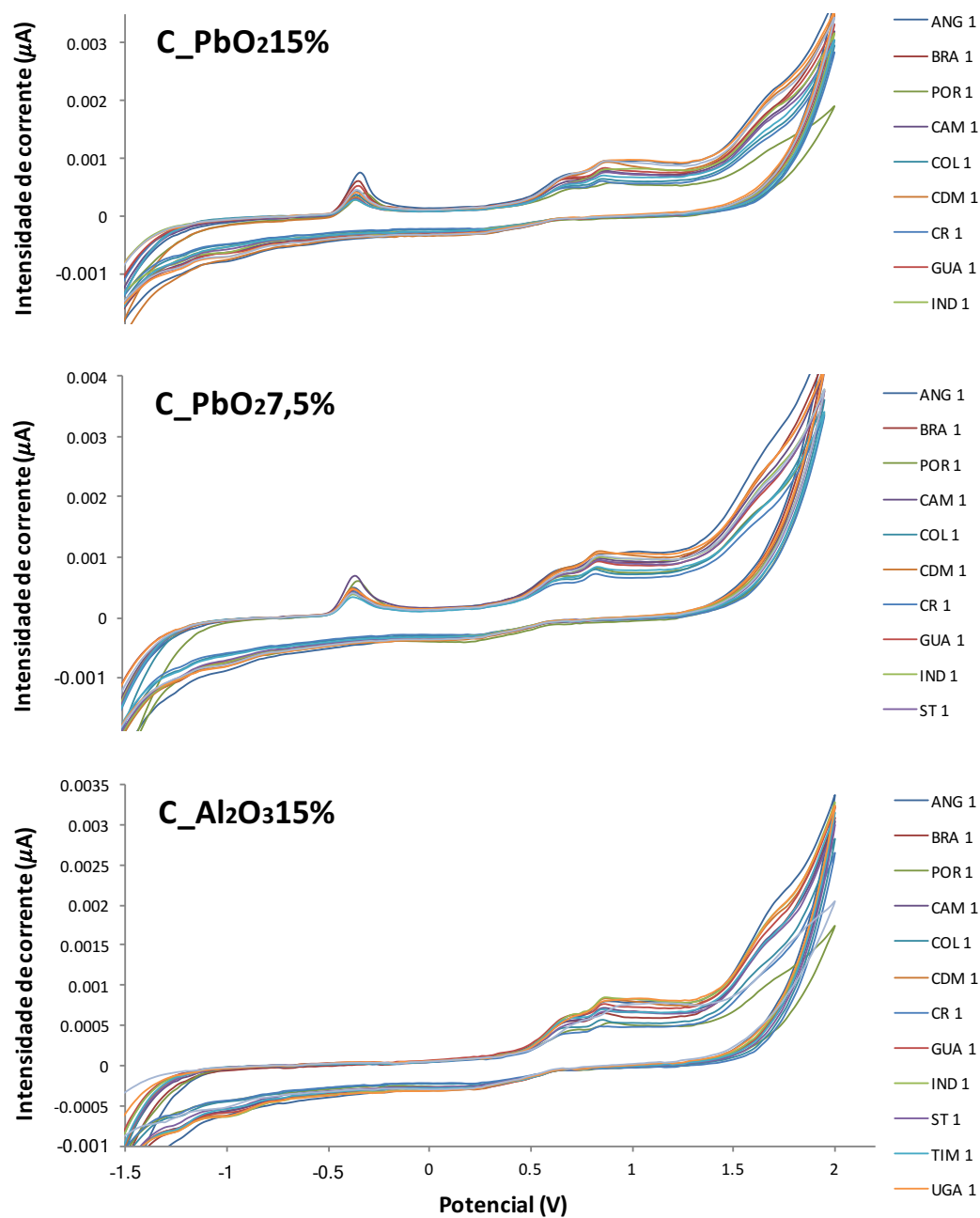


Figura 16 - Voltamogramas cíclicos das 13 amostras para cada um dos eléctrodos de trabalho seleccionados (continuação). ANG – Angola; BRA – Brasil; POR – Portugal; CAM – Camarões; COL – Colômbia; CDM – Costa do Marfim; CR – Costa Rica; GUA – Guatemala; IND – Índia; ST – São Tomé e Príncipe; TIM – Timor; UGA – Uganda; VIE – Vietnam.

Como exemplo, na Figura 17 mostra-se a informação presente nos voltamogramas cíclicos parciais das amostras obtidos pelo eléctrodo C\_Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>15%. A figura mostra que os voltamogramas cíclicos das diferentes amostras de café são semelhantes no perfil e que as variações podem apresentar informação sobre os níveis de cafeína presentes.

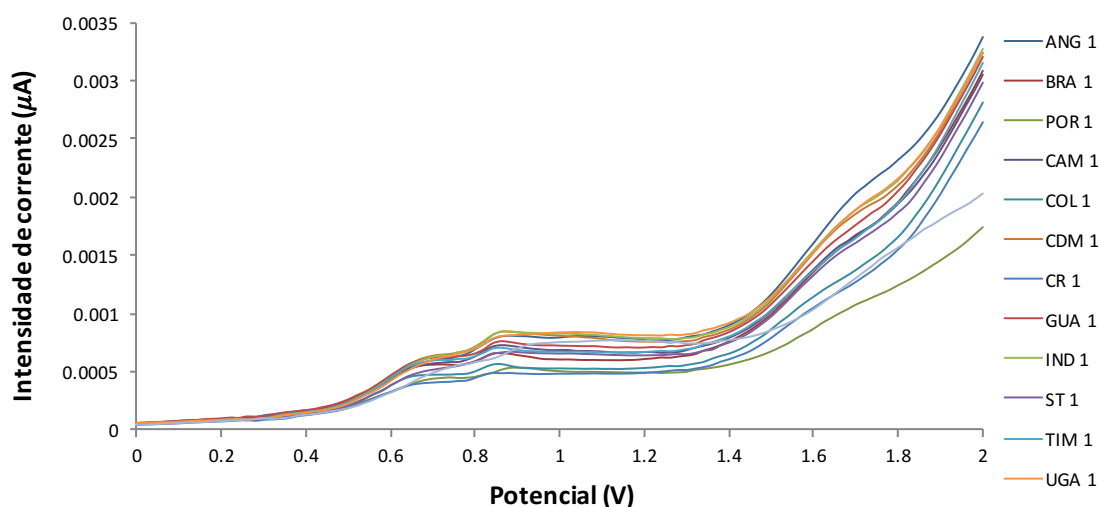


Figura 17 – Voltamogramas cíclicos parciais obtidos pelo eléctrodo C\_Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>15% para 13 amostras analisadas no intervalo anódico de 0 a +2 V. ANG – Angola; BRA – Brasil; POR – Portugal; CAM – Camarões; COL – Colômbia; CDM – Costa do Marfim; CR – Costa Rica; GUA – Guatemala; IND – Índia; ST – São Tomé e Príncipe; TIM – Timor; UGA – Uganda; VIE – Vietnam.

Para confirmar esta possibilidade usou-se o método supervisionado PLS para obter modelos de estimação, uma vez que, se verificou que os dados de concentração de CAF obtidos por HPLC mostravam alguma discordância com os da voltametria cíclica. Para diminuir a variabilidade dos dados usou-se as médias das concentrações e voltamogramas cíclicos parciais em cada amostra. Para efeitos comparativos fixou-se em 9, o número de componentes principais para os modelos PLS. Na Tabela 7 apresentam-se os parâmetros de estimação provenientes da regressão PLS para os dados obtidos de cada eléctrodo selecionado.

De forma homogênea, a percentagem de variância explicada da variável independente, ou seja, da informação presente nos voltamogramas cíclicos parciais, foi

superior a 99,9%, indicativo que o modelo mostra um bom ajuste aos dados eletroquímicos.

Tabela 7 – Parâmetros da regressão PLS entre as concentrações e voltamogramas cíclicos parciais das amostras de café

Eléttodos	% Var X	% Var Y	Declive $\pm$ s	IC <sub>Declive</sub>	EPR	R <sup>2</sup> <sub>ajustado</sub>	Valor de p
C	99,93	75,01	1,00 $\pm$ 0,08	[0,83; 1,17]	26,15	0,9293	<0,001
C_PbO7,5%	99,92	88,54	1,00 $\pm$ 0,05	[0,89; 1,11]	17,7	0,9676	<0,001
C_Cu <sub>2</sub> O7,5%	99,98	98,38	1,00 $\pm$ 0,02	[0,96; 1,04]	6,66	0,9954	<0,001
C_PbO <sub>2</sub> 15%	99,95	86,81	1,00 $\pm$ 0,05	[0,88; 1,12]	18,99	0,9627	<0,001
C_PbO <sub>2</sub> 7,5%	99,95	85,65	1,00 $\pm$ 0,06	[0,88; 1,12]	19,81	0,9594	<0,001
C_Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 15%	99,88	80,10	1,00 $\pm$ 0,07	[0,85; 1,15]	23,33	0,9437	<0,001

% Var X – percentagem de variância explicada das variáveis independentes; % Var Y - percentagem de variância explicada da variável dependente; S – desvio padrão; IC – Intervalo de confiança a 95%; EPR – Erro padrão residual; R<sup>2</sup> – coeficiente de determinação; p – probabilidade.

No caso, das concentrações médias de HPLC, a percentagem de variância explicada esteve entre os valores de 75,0 e 88,6%, valores baixos, com exceção do eléctrodo C\_Cu<sub>2</sub>O7,5%, que apresentou um valor mais elevado, 98,4%. Na globalidade, estes resultados, traduzem-se em modelos PLS de estimação fracos, com exceção deste último eléctrodo, mas, todos significativos na tendência linear (valor de p < 0,001). Das relações lineares entre os dados de concentração obtidos por HPLC (valores esperados) e os estimados pelos modelos PLS obtidos verificou-se que os:

- declives são próximos do teórico (a unidade) e com erros razoáveis, como se pode verificar nos intervalos de confiança;
- valores das ordenadas na origem não são significativos para o modelo linear pois os valores de p foram sempre superiores a 0,05;
- coeficientes de determinação ajustados foram inferiores a 0,99 (com exceção do eléctrodo C\_Cu<sub>2</sub>O7,5%) e, por isso, traduzem-se em modelos lineares fracos;
- erros dos modelos levam às mesmas conclusões, ou seja, em geral elevados e indicativos de um modelo linear fraco por os pontos estarem afastados da linha de ajuste.

Com o objetivo de obter modelos de previsão, os dados analíticos foram testados no ajuste por regressão PLS com validação cruzada, por exemplo, K-folds com ou sem repetição, bem como, com a divisão das amostras em grupo de treino e teste. Qualquer tentativa demonstrou que os modelos obtidos eram também fracos na explicação da

variância da variável dependente (concentrações de CAF na solução) e, por isso, os resultados não foram apresentados.

Todos os resultados demonstraram que os eléctrodos de trabalho seleccionados permitem obter informação sobre a CAF em solução quer pelos voltamogramas cíclicos que apresentaram os 3 picos que foram confirmados na secção das calibrações quer por, na relação de voltamogramas cíclicos parciais com as concentrações obtidas por HPLC, terem-se obtido modelos PLS de estimação com relação linear evidente.

De realçar que esta informação é relevante para o trabalho futuro pois demonstra que os eléctrodos seleccionados poderão ser usados na análise de CAF, sendo necessário otimizar o procedimento analítico principalmente na análise dos extratos de café, onde a concentração de CAF deve ser incrementada. Com maior variação dos sinais nos voltamogramas cíclicos e nas concentrações espera-se ultrapassar as dificuldades que foram encontradas neste trabalho. Também será relevante reunir mais informação da composição nos extratos de café para se perceber a sua influência nos voltamogramas cíclicos e, por isso, na quantificação.

## 4. Conclusões

O presente estudo apresenta resultados preliminares da análise de cafeína e extratos de café com elétrodos compósitos de grafite, óxidos de metal e resina epoxilica. O desempenho eletroquímico destes elétrodos foi verificado com uma solução redox reversível e confirmado como aceitável. Na análise da cafeína foi possível identificar 3 picos nos voltamogramas cíclicos que são de processo redox da cafeína, indicativo que a análise voltamétrica permite obter informação de presença de cafeína em solução. Verificou-se ainda, diferenças acentuadas entre as medições de soluções sintéticas e extratos de cafeína. Neste seguimento, este trabalho preliminar de observação do desempenho dos elétrodos compósitos nos extratos de café permitiu definir as orientações do trabalho futuro. Após otimizar a extração da cafeína em níveis superiores aos usados neste trabalho, uma das linhas de investigação será a análise de cafeína no extrato de café por calibração com adição de padrão (adição de uma solução padrão sintética) e, a outra, desenvolver a análise multivariada de calibração, linear ou não linear, para análise de cafeína usando somente amostras de extratos de café e os respectivos voltamogramas cíclicos.

## Referencias Bibliográficas

Aklilu, M., M. Tessema, M. Redi-Abshiro, Indirect voltammetric determination of caffeine content in coffee using 1,4-benzoquinone modified carbon paste electrode, *Talanta*, 76 (4), 742-746, 2008.

Azevedo, B. M., Perfil sensorial de cafés (*coffea arabica l.*) expressos adoçados com sacarose e diferentes edulcorantes, Tese de mestrado, Unicamp, p. 102, 2013

Belay, A., K. Ture, M. Redi, A. Asfaw, Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer, *Food Chemistry*, 108 (1), 310–315, 2008.

Belguidoum, K., H. Amira-Guebailia, Y. Boulmokh, O. Houache, HPLC coupled to UV–vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45 (4), 1314–1320, 2014.

Bresin, B., M. Piol, D. Fabbro, M. A. Mancini, B. Casetta, C. Del Bianco, Analysis of organo-chlorine pesticides residue in raw coffee with a modified “quick easy cheap effective rugged and safe” extraction/clean up procedure for reducing the impact of caffeine on the gas chromatography–mass spectrometry measurement, *Journal of Chromatography A*, 1376, 167–171, 2015.

Bröhan, M., T. Huybrighs, C. Wouters, B. Van der Bruggen, Influence of storage conditions on aroma compounds in coffee pads using static headspace GC–MS, *Food Chemistry*, 116 (2), 480–483, 2009.

Cano-Marquina, A., J.J. Tarín, A. Cano, The impact of coffee on health. *Maturitas*, 75(1), 2013.

Craig, A.P., C. Fields, N. Liang, D. Kitts, A. Erickson; Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantification of chlorogenic acids in green coffee bean extracts, *Talanta*, 154 (1), 481–485, 2016.

De Luca, S., M. De Filippis, R. Bucci, A.D. Magri, A.L. Magri, F. Marini, Characterization of the effects of different roasting conditions on coffee samples of different geographical origins by HPLC-DAD, NIR and chemometrics, *Microchemical Journal*, 129, 348–361, 2016.

- de Mejia, E. G., M.V. Ramirez-Mares, Impact of caffeine and coffee on our health. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25(10), 489–492, 2014.
- Dias, L.G., C. Sequeira, A.C.A. Veloso, M.E.B.C. Sousa, A.M. Peres, Evaluation of healthy and sensory indexes of sweetened beverages using an electronic tongue, *Analytica Chimica Acta*, 848, 32–42, 2014.
- Dias, R.C.E., S.T. Alves, M.T. Benassi, Spectrophotometric method for quantification of kahweol in coffee, *Journal of Food Composition and Analysis*, 31 (1), 137–143, 2013.
- González, A.G., F. Pablos, M.J. Martín, M. León-Camacho, M.S. Valdenebro, HPLC analysis of tocopherols and triglycerides in coffee and their use as authentication parameters, *Food Chemistry*, 73 (1), 93–101, 2001.
- Gulaboski, R., Pereira, C. M., Electroanalytical techniques and instrumentation in food analysis. *Handbook of Food Analysis Instruments*, 379–402, 2008.
- Ham, B. M., A. MaHam, *Analytical Chemistry: a Chemist and laboratory Technicians Toolkit*, Wiley, 197-380, 2016.
- Hansen B.H., G. Dryhurst, Voltammetric oxidation of some biologically important xanthines at the pyrolytic graphite electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 30 (3), 417-426, 1971.
- Hecimovic, I., A. Belšcak-Cvitanovic, D. Horzic, D. Komes, Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting, *Food Chemistry*, 129, 991–1000, 2011.
- Kilmartin, P.A., C.F. Hsu, Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry, *Food Chemistry*, 82 (4), 501–512, 2003.
- Kreuml, M. T. L., D. Majchrzak, B. Ploederl, J. Koenig, Changes in sensory quality characteristics of coffee during storage. *Food Science & Nutrition*, 1(4), 267–72, 2013.
- Laskowska, B., K.K. Kurlito, Cyclic voltammetry as a method of determining antioxidant activity of selected low-molecular compounds, *Chemik*, 65 (10), 1059-1062, 2011.
- Lewis, R.J. Sr. (ed), *Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials*, 11th Edition. Wiley-Interscience, Wiley & Sons, Inc. Hoboken, p. 666, 2004.

- Lourenção, B. C., R.A. Medeiros, R.C. Rocha-Filho, L.H. Mazo, O. Fatibello-Filho, Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. *Talanta*, 78(3), 748–752, 2009.
- Ly, S.Y., Y.S. Jung, M.H. Kim, I.K. Han, W.W. Jung, H.S. Kim, Determination of Caffeine Using a Simple Graphite Pencil Electrode with Square-Wave Anodic Stripping Voltammetry, *Microchim. Acta*, 146, 207–213, 2004.
- Magarelli, G., J.G. da Silva, I.A. de Sousa, I.S.D. Lopes, J.R SouzaDe, L.V. Hoffmann, C.S.P. de Castro, Development and validation of a voltammetric method for determination of total phenolic acids in cotton cultivars, *Microchemical Journal*, 109, 23–28, 2013.
- Maroco, J., *Análise Estatística - Com Utilização do SPSS*, 3rd Edn., Sílabo, Lda, Lisboa, 2007.
- Monteiro, M.A.M., V.P.R. Minim, A.F. Silva, J.B.P. Chaves, H.M.A.B. Cardello, Perfil sensorial da bebida café (*Coffea arabica* L.) determinado por análise tempo-intensidade, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 25 (4), 772-780, 2005.
- O'Neil, M.J. (ed.), *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, p. 289, 2013.
- Pacetti, D., E. Boselli, M. Balzano, N.G. Frega, Authentication of Italian Espresso coffee blends through the GC peak ratio between kahweol and 16-O-methylcafestol, *Food Chemistry*, 135 (3) 1569–1574, 2012.
- Patay, E.B., N. Sali, T. Koszegi, Antioxidant potential, tannin and polyphenol contents of seed and pericarp of three *Coffea* species, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9 (4), 366–371, 2016A.
- Patay, E.B., T. Bencsik, N. Papp, Phytochemical overview and medicinal importance of *Coffea* species from the past until now. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9 (9), 1–5, 2016B.
- Saab, S., D. Mallam, G.A. Cox, M.J. Tong, Impact of coffee on liver diseases: A systematic review. *Liver International*, 34 (4), 495–504, 2014.

- Sampaio, E.V.D.S.B., T.L. da Costa, Estoques e Fluxos de Carbono no Semi-Árido Nordeste: Estimativas Preliminares, *Revista Brasileira de Geografia Física*, 6, 1275–1291, 2011.
- Silvarolla, M.B., P. Mazzafera, M.M.A. de Lima, Caffeine content of ethiopian coffea arabica beans, *Genet. Mol. Biol.*, 23 (1), 213-215, 2000.
- Spătaru, N., B.V. Sarada, D.A. Tryk, A. Fujishima, Anodic voltammetry of xanthine, theophylline, theobromine and caffeine at conductive diamond electrodes and its analytical application, *Electroanalysis*, 14, 721-728, 2002.
- Švorc, L., Determination of caffeine: A comprehensive review on electrochemical methods. *International Journal of Electrochemical Science*, 8(4), 5755–5773, 2013.
- Tadesse, Y., A. Tadese, R.C. Saini, R. Pal; Cyclic Voltammetric Investigation of Caffeine at Anthraquinone Modified Carbon Paste Electrode, *International Journal of Electrochemistry*, Article ID 849327, 7 pages, 2013.
- Tfouni, S.A.V., C.S. Serrate, F.M. Leme, M.C.R. Camargo, C.R.A. Teles, K.M.V.A.B. Cipolli, R.P.Z. Furlani, Polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee brew: Influence of roasting and brewing procedures in two Coffea cultivars, *LWT - Food Science and Technology*, 50 (2), 526–530, 2013.
- Torres A. C., Madalina M. Barsan, Christopher M.A. Brett, Simple electrochemical sensor for caffeine based on carbon and Nafion-modified carbon electrodes, *Food Chemistry*, 149, 215–220, 2014.
- Votavová, V., M. Voldřich, R. Ševčík, H. Čížková, J. Mlejnecká, M. Stolař, T. Fleišman, Changes of Antioxidant Capacity of Robusta Coffee during Roasting, *Czech Journal of Food Sciences*, 27, S49-S52, 2009.
- Wang, J., *Analytical Electrochemistry, Third Edition. Analytical Electrochemistry, Third Edition*, 2006.
- Yang, N., C. Liu, X. Liu, T.K. Degn, M. Munchow, I. Fisk, Determination of volatile marker compounds of common coffee roast defects, *Food Chemistry*, 211, 206–214, 2016.
- Zylbersztajn, D., E. Farina (coordenadores), Diagnóstico sobre o sistema agroindustrial de cafés especiais e qualidade superior do estado de Minas Gerais, Relatório Final,

Programa de Estudos dos Negócios do Sistema Agroindustrial, Universidade de São Paulo, 2001.