

DETERMINAÇÃO DE ACRILAMIDA POR ESPECTROFLUORÊSCENCIA EM AMOSTRAS DE CAFÉ

CLO Corrêa^{*1}, AS Luna¹, EM Penha² e LMF Gottschalk²

¹ Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524; carla.levi@gmail.com, ² Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501; leda.fortes@embrapa.br

A importância da pesquisa em café é justificada dada a sua popularidade, sendo a segunda bebida mais consumida mundialmente perdendo apenas para a água. A acrilamida, substância que representa riscos à saúde humana devido ao seu potencial tóxico, é formada após o processo de torra do grão. A rota de formação de acrilamida é através da reação entre aminoácidos presentes no grão e açúcares redutores, conhecida como reação Maillard.

A quantificação da acrilamida em café constitui um bom exemplo de dificuldade analítica, não só devido à complexidade da matriz envolvida, mas principalmente por fatores relacionados com a própria substância: trata-se de uma molécula de baixa massa molecular, com elevada polaridade, logo extremamente difícil de extrair de matrizes aquosas por solventes orgânicos convencionais, com más propriedades cromatográficas e de difícil detecção, dada a ausência de propriedades adequadas à generalidade dos detectores cromatográficos mais usados.

A espectrofluorimetria é uma técnica quantitativa que vem ganhando importância na área química e ciências de alimentos, por sua simplicidade, rapidez da análise, sensibilidade e seletividade. Para realizar o tratamento dos dados obtidos por esta técnica, se lança mão de técnicas quimiométrica, tais como regressão por quadrados mínimos parciais (PLS, Partial Least Squares Regression).

O objetivo deste trabalho é validar um método de determinação de acrilamida (ACR) em amostras de café por espectrofluorescência usando diclorofluoresceína (DCF) como fluoróforo, visto que a acrilamida é uma substância supressora de fluorescência. A validação foi uma alternativa mais em conta financeiramente à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrômetro de massa, método comumente usados para quantificação dessa substância.

A curva analítica foi feita com sete padrões e para isso foram usadas duas soluções: uma solução de 25ppb de DCF, denominada solução I e outra solução 25ppm de acrilamida, denominada solução II. Foi feito um espectro de fluorescência da solução de DCF a λ de excitação de 200-400nm e λ de emissão de 512nm. Foi observado dois picos: o primeiro em λ de excitação de 233nm e o segundo em λ de excitação de 254nm. Este segundo estava em λ de emissão de 510nm, ou seja, não é pico é espalhamento de segunda ordem, pois este fenômeno ocorre quando λ de emissão é aproximadamente o dobro do λ de excitação. Logo o pico verdadeiro está em λ de excitação de 233nm. Uma vez decidida as condições do espectrofluorímetro como: λ de excitação de 233nm; λ de emissão de 400 – 600nm, com alta sensibilidade e cubeta Q 204. A curva analítica foi feita variando a concentração de acrilamida de 0 – 7,5ppm como é elucidado na tabela 1. Cada um dos sete padrões da curva foi feito em triplicata.

Tabela 1: Curva analítica de acrilamida.

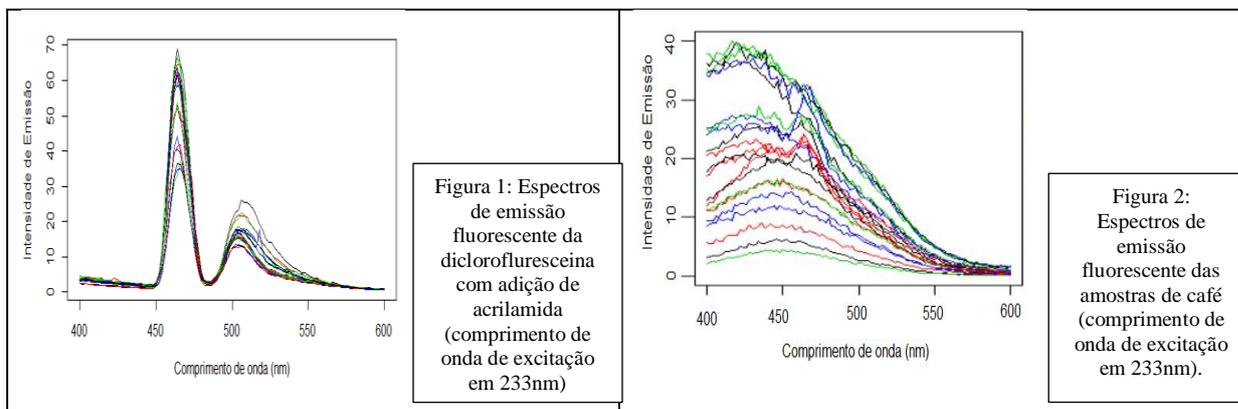
Nº Solução	Avolumado com água milliQ em balões de 10mL		Concentração de acrilamida (ppm)
1	1mL de Solução I	0mL de solução II	0,0
2	1mL de Solução I	0,2mL de solução II	0,5
3	1mL de Solução I	0,25mL de solução II	0,625
4	1mL de Solução I	0,5mL de solução II	1,25
5	1mL de Solução I	1,0mL de solução II	2,5
6	1mL de Solução I	2,0mL de solução II	5,0
7	1mL de Solução I	3,0mL de solução II	7,5

Para o ensaio de repetibilidade foram escolhidas as soluções número 4,5 e 6 que fizeram parte da curva analítica. Foram feitas 10 medidas de cada solução sob as mesmas condições no espectrofluorímetro as quais foram feitas as medidas da curva analítica.

Para a determinação de acrilamida em amostras de café foram escolhidas sete amostras de café robusta e arábica torrados e moídos em diferentes graus de torra (clara, média e escura) e depois de feita a extração de acrilamida, as amostras foram analisadas no espectrofluorímetro. Estas análises foram feitas pelo método de adição padrão de acordo (100 μ L, 200 μ L, 250 μ L da solução II).

Resultado e Conclusão:

A calibração foi executada através da modelagem do PLS com 1 componente (LV) de variância explicada de 81,26% em X e 95,33% em Y feita na base estatística do RStudio.



A figura 1 mostra os Espectros de emissão fluorescente da diclorofluoresceína no comprimento de onda de excitação em 233nm, onde é possível notar que as curvas estão bem sobrepostas de acordo com a diferença de concentração (quanto maior a concentração menor o sinal de intensidade). Através gráfico de predição do modelo de calibração apresentou um fator de correlação de 93,85%. Os Resultados de desvio padrão da repetibilidade foram baixos, conforme mostra a Tabela 2, evidenciando que a variabilidade observada dentro do laboratório, ao longo de curto intervalo de tempo, usando um único operador, mesmo método em itens de teste idênticos, mesmo equipamento, no mesmo laboratório, em intervalos de tempo curtos é mínima.

Tabela 2: Média aritmética e desvio padrão da repetibilidade.

N° da Solução	Desvio padrão da repetibilidade
4	0,62
5	0,45
6	0,07

Quando o modelo PLS de calibração gerado foi aplicado às amostras de café, conforme mostra a figura 2 com os espectros de emissão fluorescente no comprimento de onda de excitação em 233nm, pode-se observar que este modelo não se aplica ao tipo de amostra devido a uma severa interferência de matriz mesmo empregando o método de adição de padrão. Conclui-se, portanto, que a Criação do modelo de PLS de calibração feito no RStudio para a determinação de acrilamida por espectrofluorescência se aplica apenas às amostras cuja matriz seja água, pois quando foi aplicado às amostras de café, o modelo não foi capaz de predizer as concentrações de acrilamida presente nas mesmas.