



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

AMÉLIA ELENA TERRILE

**IMPRESSÃO DIGITAL ESPECTROSCÓPICA EM GRÃOS
CRUS DE *COFFEA ARABICA*, CULTIVADO EM DOIS TIPOS
DE ARRANJO E DUAS DENSIDADES DE PLANTIO**

Londrina
2016

AMÉLIA ELENA TERRILE

**IMPRESSÃO DIGITAL ESPECTROSCÓPICA EM GRÃOS
CRUS DE *COFFEA ARABICA*, CULTIVADO EM DOIS TIPOS
DE ARRANJO E DUAS DENSIDADES DE PLANTIO**

Tese apresentada junto à Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química - Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutor – Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dra. Ieda Spacino Scarminio

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Terrile, Amélia Elena.

Impressão digital espectroscópica em grãos crus de *Coffea arabica*, cultivado em dois tipos de arranjos e duas densidades de plantio / Amélia Elena Terrile. - Londrina, 2016. 133 f. : il.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2016.

Inclui bibliografia.

1. *Coffea arabica* - Tese. 2. Alta densidade de plantio - Tese. 3. Análise espectroscópica - Tese. 4. Análise quimiométrica - Tese. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

AMÉLIA ELENA TERRILE

**IMPRESSÃO DIGITAL ESPECTROSCÓPICA EM GRÃOS
CRUS DE *COFFEA ARABICA*, CULTIVADO EM DOIS TIPOS
DE ARRANJO E DUAS DENSIDADES DE PLANTIO**

Tese apresentada junto à Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química - Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutor – Área de concentração: Química Analítica.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Marta de Toledo Benassi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Isabel Craveiro Moreira
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Dr. Mário Henrique Montazzolli Killner
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Paulo Henrique Março
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Londrina, 09 de Setembro de 2016.

Dedico este trabalho à minha família:
Claudecir, Gui e Isaac, pelo amor
incondicional em todos os momentos.

“Obrigada, Senhor, porque chegou o tempo de colher este fruto tão esperado e por ter colocado no meu caminho as pessoas que fizeram possível o processo de formação deste fruto”.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Ieda Spacino Scarminio, pelo incentivo e orientação na condução desta pesquisa, pelos conselhos, pela confiança depositada, pelo carinho, pela amizade em todos os momentos.

Aos estagiários que se transformaram em amigos: Gustavo Galo Marcheafave e Guilherme Santana de Oliveira, pela dedicação e companherismo, pelo esforço incondicional enquanto estive desenvolvendo a parte experimental.

Ao Professor Dr. Roy Edward Bruns, que tem acompanhado de perto este trabalho e dado sugestões valiosas para o seu encaminhamento.

Às pesquisadoras Miroslava Rakocevic (EMBRAPA-Campinas) e Maria Brígida dos Santos Schultz (IAPAR-Londrina), pelas orientações na área agronômica.

Ao Professor Dr. Paulo Sergio Parreira, do Departamento de Física da UEL, pela ajuda e sugestões nas análises de minerais em EDXRF e no processamento dos dados.

Ao Professor Dr. Fernando César de Macedo Jr. e às técnicas Yasmin Tadayozzi e Vanessa Liberatti, do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UEL pelas sugestões no preparo das amostras e a realização das análises.

Às minhas amigas Fernanda Delaroza e Elis Daiane Pauli, porque com elas aprendi os caminhos “informáticos” da Quimiometria e o compartilhar de cada dia. Obrigada pelo ombro amigo!

Ao meu amigo Pedro Henrique Hatumura, obrigada por ter sempre a mão estendida para me ajudar e pela sua companhia nos cursos e viagens de estudos.

Aos meus amigos do LQCN: Sabrina Afonso, Filipe Guizellini, Galileu Bernardes Malta, Guilherme Luiz Scheel, Patrícia Morena Sanchez e Fabiano Bueno, presentes em todos os momentos, pela alegria e amizade sincera.

Aos professores do Curso do Doutorado Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, pelo estímulo e palavras de aliento, e muito especialmente, ao Professor Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia.

À Professora Dra. Maria Inês Rezende (na época, Chefe de Departamento), pela amizade e liberação do uso de equipamento específico do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia.

Aos funcionários dos Departamentos de Química e Bioquímica e Biotecnologia da UEL: Ivanira, Dalva, Márcia, Nelson e Sérgio, pela amizade e o suporte técnico.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), pela licença otorgada para realizar esta capacitação.

Aos meus amigos da UTFPR que acreditaram em meu potencial e apoiaram os meus planos: Isabel, Lúcia, Margarida, Elaine, Cláudio, Mayka, Fábio e Janete do câmpus Londrina, e Vanderlei, do câmpus Pato Branco, pela inestimável colaboração.

A minha amiga Cristiana, pela sincera amizade e pela ajuda na formatação deste trabalho.

A minha irmã, Maria Cristina (Tutua), que cumpriu sua promessa de falar uma vez por semana comigo como nossa mãe o fazia. Tem sido muito bom e continuará a sê-lo!

Aos irmãos em Cristo da Igreja Batista Jardim Palmares (JAPAL), obrigada pelas orações!

Tudo fez Deus formoso no seu devido tempo; também pôs a eternidade no coração do homem, sem que este possa descobrir as obras que Deus fez desde o princípio até o fim.

Eclesiastes 3: 11

Goza a vida com a mulher que amas, todos os dias da tua vida fugaz, os quais Deus te deu debaixo do sol; porque esta é a tua porção nesta vida pelo trabalho com que te afadigaste debaixo do sol. Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o conforme as tuas forças, porque no além, para onde tu vais, não há obra, nem projetos, nem conhecimento, nem sabedoria alguma.

Eclesiastes 9: 9-10

TERRILE, Amélia Elena. **Impressão digital espectroscópica em grãos crus de *Coffea arabica*, cultivado em dois tipos de arranjo e duas densidades de plantio**. 2016. 133 p. Tese (Doutorado em Química) - Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Poucos estudos têm relacionado a produção de metabólitos especializados com o adensamento de cultivo de cafeeiros. Neste estudo, foi investigada a impressão digital metabólica de grãos crus de *Coffea arabica* cv. IAPAR 59, provenientes de cafeeiros cultivados em dois tipos de arranjos, quadrado-S e retangular-R, e duas densidades de plantio: 6.000 e 10.000 pts ha⁻¹. Nas amostras brutas foram determinados os teores de umidade, cinzas, lipídios e os minerais foram analisados por EDXRF. O planejamento experimental simplex centroide com quatro solventes foi utilizado para a obtenção de extratos os quais foram analisados nas regiões do UV-Vis, do Infravermelho (FIR) e por RMN ¹H. Os extratos lipídicos também foram analisados por FTIR. Os dados espectroscópicos foram submetidos à análise exploratória (ACP e AH). O tipo de arranjo e a densidade de plantas não influenciaram no teor de umidade, cinzas e lipídios analisados. A ACP dos dados obtidos por EDXRF diferenciou os tratamentos pela densidade de plantio, mostrando que S6 e R6 se caracterizaram pelo maior teor de Mn e P enquanto que S10 e R10, pelo maior conteúdo de Cu, K, e Ca. Os maiores rendimentos na extração por solventes foram obtidos com etanol e etanol: acetona. Os rendimentos foram reproduzidos pelo modelo quadrático no qual foram usados apenas os coeficientes significativos no nível de 95% de confiança. Os dados do UV-Vis mostraram que os tratamentos se diferenciaram pelo teor de ACG e lipídios insaponificáveis e/ou cafeína, sendo isto confirmado pela AH dos dados de FTIR. Os espectros FTIR mostraram que os tratamentos S6 e R10 possuem maior teor de lipídios enquanto que S10 e R6 apresentaram maiores conteúdos de carboidratos e proteínas. A análise exploratória dos extratos lipídicos no FTIR indicou que os arranjos quadrados poderiam ser caracterizados por uma maior quantidade de cafeína enquanto que nos retangulares se evidencia a presença de ácidos graxos insaturados. A ACP dos dados espectrais de RMN ¹H mostrou diferenças na composição entre os extratos etanólicos e não etanólicos dos arranjos quadrados. A influência da densidade de plantio nestes arranjos pôde ser observada nos extratos obtidos com acetona. O tratamento S6 apresentou maior abundância relativa de cafeína e a presença de aldeído insaturado no extrato acetônico.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. IAPAR 59. Alta densidade de plantio. Análise espectroscópica. Análise quimiométrica.

TERRILE, Amélia Elena. **Spectroscopic fingerprint of green bean of *Coffea arabica*, cultivated under different space management treatments.** 2016. 133 p. Thesis (Doctoral in Chemistry) – (UEL/UEPG/UNICENTRO) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Few studies have linked the production of specialized metabolites with the high planting density of coffee. In this study, it was investigated the metabolic fingerprint of green grains of *Coffea arabica* IAPAR 59, cultivated in two types of arrangements, square-S and rectangular-R, and two planting densities: 6.000 and 10.000 pts ha⁻¹. Raw samples was used for analysis of moisture, ash and lipids. The minerals were analyzed by EDXRF. A simplex centroid design for four solvents was used to obtain the extracts that were analyzed by UV-VIS, infrared (FTIR) and ¹H NMR. Lipid extracts were also analyzed by FTIR. Spectroscopic data were submitted to exploratory analysis (PCA and CA). Moisture, ash and lipids contents were not influenced by the type of arrangement and plant density. The PCA of EDXRF data differentiated treatments by planting density. The S6 and R6 treatments were characterized by higher content of Mn and P while S10 and R10 had the higher content of Cu, K and Ca. The higher yields in the solvent extraction were obtained with ethanol and ethanol: acetone. The experimental data were reproduced by the quadratic model where only significant coefficients at the 95% confidence level were used. UV-Vis spectral data showed that the treatments were differenced by CGA content and unsaponifiable lipids and/or caffeine. This was confirmed by the CA of FTIR data. The FTIR spectra showed that the S6 and R10 treatments have higher lipid content while S10 and R6 showed higher carbohydrates and protein contents. Exploratory analysis of lipid extracts in FTIR indicated that the square arrangements could be characterized by a higher caffeine content. The rectangular treatment evidenced the presence of unsaturated fatty acids. The PCA of ¹H NMR spectral data showed differences in the composition between the ethanolic and non-ethanolic extracts of square arrangements. The influence of planting density on these arrangements could be observed in the acetone extracts. The S6 treatment showed higher relative abundance of caffeine and the presence of unsaturated aldehyde in acetone extract.

Key words: *Coffea arabica*. IAPAR 59. High planting density. Spectroscopic analysis. Chemometric analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Relação entre os graus de liberdade num planejamento experimental.....	34
Figura 2 – Esquema da transformação matemática na ACP	39
Figura 3 – Exemplo de gráfico de a) escores e b) <i>loadings</i>	40
Figura 4 – Exemplo de dendrograma	41

CAPÍTULO 3

Figura 1 – Esquema da disposição dos cafeeiros na plantação.....	49
Figura 2 – Exsicata de <i>Coffea arabica</i> cv. IAPAR 59	50
Figura 3 – Esquema do preparo das amostras de <i>C. arabica</i> cv. IAPAR 59	51
Figura 4 – Gráfico dos escores para (a) os tratamentos e para (b) os minerais	59
Figura 5 – Espectros no infravermelho dos extratos lipídicos de grãos crus de <i>C. arabica</i> cv. IAPAR 59	61
Figura 6 – Gráfico dos escores das CP1 e CP2 dos dados espectroscópicos na região do Infravermelho dos extratos lipídicos de grãos crus de <i>C. arabica</i> cv. IAPAR 59.....	62
Figura 7 – Gráfico dos <i>loadings</i> da CP2 para os dados espectroscópicos na região do Infravermelho dos dos extratos lipídicos de grãos crus de <i>C. arabica</i> cv. IAPAR 59.....	63

CAPÍTULO 4

Figura 1 – Planejamento experimental simplex centroide para quatro solventes.....	72
Figura 2 – Esquema de extração	76
Figura 3 – Rendimento dos extratos brutos de <i>Coffea arabica</i> cv. IAPAR 59	79
Figura 4 – Resíduos do modelo quadrático para S6.....	83
Figura 5 – Resíduos do modelo quadrático para S10.....	84
Figura 6 – Resíduos do modelo quadrático para R6	84
Figura 7 – Resíduos do modelo quadrático para R10	85
Figura 8 – Respostas previstas pelo modelo quadrático para S6.....	85

Figura 9 – Respostas previstas pelo odelo quadrático para S10.....	86
Figura 10 – Respostas previstas pelo odelo quadrático para R6.....	86
Figura 11 – Respostas previstas pelo odelo quadrático para R10.....	87
Figura 12 – Curvas de nível preeditas pelo modelo quadrático para o tratamento S6	88
Figura 13 – Curvas de nível preeditas pelo modelo quadrático para o tratamento S10	88
Figura 14 – Curvas de nível preeditas pelo modelo quadrático para o tratamento R6.....	89
Figura 15 – Curvas de nível preeditas pelo modelo quadrático para o tratamento R10.....	89

CAPÍTULO 5

Figura 1 – Gráfico dos escores de CP2 x CP3 dos perfis característicos no UV-Vis dos extratos brutos de <i>Coffea arabica</i> , cv. IAPAR 59.	97
Figura 2 – Espectros no UV de extratos de grãos crus de <i>Coffea arabica</i> , cv. IAPAR 59, obtidos com etanol (a), diclorometano (b) e hexano (c).	98
Figura 3 – Dendrograma dos espectros no UV dos extratos obtidos de grãos crus de <i>C. arabica</i> , cv. IAPAR 59. Os tratamentos foram identificados com números 1 (S6), 2 (S10), 3 (R6) e 4 (R10)	100
Figura 4 – (a) Gráfico dos escores de CP1 x CP2 e (b) gráfico dos <i>loadings</i> dos espectros FTIR dos extratos obtidos de grãos crus de <i>C. arabica</i> , cv. IAPAR 59.....	102
Figura 5 – Espectros FTIR dos extratos R10 <i>deh</i> (a), R6 <i>eh</i> (b), R6 <i>d</i> (c), S10 <i>deh</i> (d), S6 <i>eh</i> (e) e S6 <i>d</i> (f) obtidos de grãos crus de <i>C. arabica</i> , cv. IAPAR 59	103
Figura 6 – Dendrograma dos espectros FTIR dos extratos obtidos de grãos crus de <i>C. arabica</i> , cv. IAPAR 59	105
Figura 7 – Espectros FTIR de extratos de (a) etanol: diclorometano e (b) etanol obtidos de grãos crus de <i>C. arabica</i> , cv. IAPAR 59	106

CAPÍTULO 6

Figura 1 – Gráfico dos escores de CP1 x CP2 dos espectros de RMN ¹ H dos extratos brutos de grãos crus de <i>C. arabica</i> , cv. IAPAR 59.	115
Figura 2 – Gráfico dos <i>loadings</i> dos espectros de RMN ¹ H dos extratos brutos de grãos crus de <i>C. arabica</i> , cv. IAPAR 59.	116

Figura 3 – Espectros médios de RMN ¹ H dos extratos não etanólicos e etanólicos obtidos de grãos crus de <i>C. arabica</i> , cv. IAPAR 59.....	118
Figura 4 – Espectros de RMN ¹ H dos extratos em diclorometano obtidos de grãos crus de <i>C. arabica</i> , cv. IAPAR 59.....	119
Figura 5 – Espectros de RMN ¹ H dos extratos em hexano obtidos de grãos crus de <i>C. arabica</i> , cv. IAPAR 59.....	120
Figura 6 – Espectros RMN ¹ H dos extratos em etanol/acetona (<i>ea</i>) e etanol/acetona/hexano (<i>eah</i>) do tratamento S10 obtidos de grãos crus de <i>C. arabica</i> , cv. IAPAR 59.....	121
Figura 7 – Espectros RMN ¹ H dos extratos em etanol/acetona (<i>ea</i>) e etanol/acetona/hexano (<i>eah</i>) do tratamento S6 obtidos de grãos crus de <i>C. arabica</i> , cv. IAPAR 59.....	122
Figura 8 – Dendrograma dos espetros de RMN ¹ H dos extratos brutos de grãos crus de <i>C. arabica</i> , cv. IAPAR 59.....	123
Figura 9 – Espectros de RMN ¹ H dos extratos em acetona de S6 e S10 obtidos de grãos crus de <i>C. arabica</i> , cv. IAPAR 59.....	124
Figura 10 – Espectros de RMN ¹ H dos extratos em acetona de S6 e S10 nas regiões de (a) 4.0 -8.0 ppm e (b) 8.0-10.0 ppm. Os extratos foram obtidos de grãos crus de <i>C. arabica</i> , cv. IAPAR 59.....	125

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Composição química dos cafês arábica e robusta (g/100g (b.s.)).....	21
Quadro 1 – Publicações sobre composição química do <i>C. Arabica</i>	22

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Conteúdo mineral em grãos crus de cultivares de café arábica.....	46
Tabela 2 – Identificação dos tratamentos dos cafeeiros amostrados.....	49
Tabela 3 – Planejamento 2^2 para estudo do efeito do tipo de arranjo e da densidade de plantio sobre os teores de cinzas e lipídios	56
Tabela 4 – Análise de variância para os efeitos principais e de interação sobre o teor de cinzas	56
Tabela 5 – Análise de variância para os efeitos principais e de interação sobre o teor de lipídios.....	57
Tabela 6 – Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^2 para o teor de cinzas.....	57
Tabela 7 – Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^2 para o teor de lipídios.....	57
Tabela 8 – Teor de minerais presentes nas amostras de <i>Coffea arabica</i> cv. IAPAR 59.....	58
Tabela 9 – Área dos picos correspondentes aos minerais analisados	59
Tabela 10 – Pesos (<i>loadings</i>) de cada mineral analisado nas CP's	60
Tabela 11 – Atribuição das bandas identificadas no gráfico dos <i>loadings</i> da CP2	64

CAPÍTULO 4

Tabela 1 – Tabela de análise de variância para o ajuste do modelo.....	74
Tabela 2 – Planejamento experimental Simplex Centroide para quatro componentes: etanol (<i>e</i>), acetona (<i>a</i>), diclorometano (<i>d</i>) e hexano (<i>h</i>).....	75
Tabela 3 – Número de ciclos necessários para extração exaustiva	77
Tabela 4 – Equações do modelo quadrático para cada tratamento	80
Tabela 5 – Análise de variância para o ajuste dos modelos quadráticos dos tratamentosos	81

Tabela 6 – Coeficientes de determinação (R^2) e somas quadráticas dos resíduos dos modelos para cada tratamento.....	82
---	----

CAPÍTULO 6

Tabela 1 – Parâmetros de aquisição dos dados espectrais	114
Tabela 2 – Deslocamentos químicos atribuídos aos átomos de H dos isômeros dos ACG.	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>a</i>	Acetona
<i>ah</i>	Acetona: hexano
ACG	Ácidos clorogênicos
ACP	Análise das Componentes Principais
AH	Análise Hierárquica
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARN	Ácido ribonucleico
ASTM	American Society for Testing and Material
ATR	Attenuated Total Reflectance
b.s.	Base seca
b.u.	Base úmida
CA	Cluster Analysis
CIFC	Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro
CP	Componente Principal
cv.	Cultivar
<i>d</i>	Diclorometano
<i>da</i>	Diclorometano: acetona
<i>dah</i>	Diclorometano: acetona: hexano
<i>dea</i>	Diclorometano: etanol: acetona
<i>deah</i>	Diclorometano: etanol: acetona: hexano
<i>deh</i>	Diclorometano: etanol: hexano
<i>dh</i>	Diclorometano: hexano
EDXRF	Fluorescência de raios X por energia dispersiva
<i>e</i>	Etanol
<i>ea</i>	Etanol: acetona
<i>eah</i>	Etanol: acetona: hexano
<i>ed</i>	Etanol: diclorometano
<i>eh</i>	Etanol: hexano
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho om Transformada de Fourier
FUEL	Fundação da Universidade Estadual de Londrina

g. l.	Graus de liberdade
<i>h</i>	Hexano
ha	Hectare
IAPAR	Instituto Agronômico do Paraná
IV	Infravermelho
LAPA	Laboratório de Apoio à Pesquisa Agropecuária
LQCN	Laboratório de Quimiometria em Ciências Naturais
<i>MQ</i>	Média quadrática
MS	Espectrometria de massa
NaOH	Hidróxido de sódio
PCA	Principal Component Analysis
PE	Ponto de ebulição
pts	Plantas
R	Retangular
R6	Retangular 6.000 pts ha ⁻¹
R10	Retangular 10.000 pts ha ⁻¹
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
S	Quadrado
S6	Quadrado 6.000 pts ha ⁻¹
S10	Quadrado 10.000 pts ha ⁻¹
<i>SQ</i>	Soma quadrática
UV	Ultravioleta
Vis	Visível

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: COFFEA ARABICA	19
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 O CAFÉ	20
1.2 PLANTIOS DE ALTA DENSIDADE	23
1.3 COFFEA ARABICA CV. IAPAR 59	24
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 2: MÉTODOS ESTATÍSTICOS E QUIMIOMÉTRICOS	30
1 INTRODUÇÃO	31
2 PLANEJAMENTO FATORIAL	33
3 ANÁLISE EXPLORATÓRIA	37
3.1 ANÁLISE DAS COMPONENTES PRINCIPAIS	37
3.2 ANÁLISE HIERÁRQUICA	40
REFERÊNCIAS	42
CAPÍTULO 3: ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	44
1 INTRODUÇÃO	45
2 MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1 AMOSTRAS DE GRÃOS	49
2.2 PREPARO DAS AMOSTRAS	51
2.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	52
2.3.1 Determinação do teor de umidade	52
2.3.2 Determinação do teor de cinzas	52
2.3.3 Determinação de lipídios pelo método de Soxhlet	53
2.3.4 Análise espectroscópica dos extratos lipídicos	54
2.3.5 Análise de minerais por EDXRF	54
2.3.6 Processamento dos dados	55

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.1	DETERMINAÇÃO DE UMIDADE, CINZAS E LIPÍDIOS	55
3.2	TEOR DE MINERAIS POR EDXRF	58
3.3	ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DOS EXTRATOS LIPÍDICOS	60
	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66
 CAPÍTULO 4: PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE MISTURAS		69
1	INTRODUÇÃO	70
2	MATERIAL E MÉTODOS	74
2.1	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	74
2.2	PROCESSAMENTO DOS DADOS	78
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS	91
 CAPÍTULO 5: ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS NAS REGIÕES DO UV- VIS E DO INFRAVERMELHO		93
1	INTRODUÇÃO	94
2	MATERIAL E MÉTODOS	95
2.1	ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISÍVEL	95
2.2	ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	95
2.3	PROCESSAMENTO DOS DADOS	95
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
3.1	ANÁLISE DO PERFIL CARACTERÍSTICO NO UV-VIS	96
3.2	ANÁLISE DA IMPRESSÃO DIGITAL POR FTIR	101
	CONCLUSÃO	107
	REFERÊNCIAS	108

CAPÍTULO 6: ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA POR RMN 1H.....	111
1 INTRODUÇÃO.....	112
2 MATERIAL E MÉTODOS	113
2.1 AMOSTRAS DE CAFÉ	113
2.2 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA RMN 1H.....	113
2.3 PROCESSAMENTO DOS DADOS	114
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	114
CONCLUSÃO.....	127
REFERÊNCIAS.....	129
CONCLUSÃO GERAL	131

CAPITULO 1



Coffea arabica

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CAFÉ

O cafeeiro pertence à família *Rubiceae* e ao gênero *Coffea*. As duas espécies mais importantes são *Coffea arabica* (café Arábica) e *Coffea canephora* (café Robusta). Comercialmente, estas espécies correspondem à maior parte da produção mundial, sendo Arábica responsável por 70% desta produção. Em menor escala tem-se as espécies *Coffea liberica* (café Libérica) e *Coffea dewevrei* (café Excelsa)¹⁻². Para o preparo da bebida, utilizam-se os grãos provenientes de diferentes regiões geográficas. Para a obtenção de um café de qualidade, com características sensoriais desejáveis e agradável ao paladar do público consumidor é necessário conhecer o tipo de plantio, solo, condições climáticas, arquitetura do cafeeiro além de como foram realizados a colheita, o armazenamento e a torra³⁻⁷.

O café é uma fonte de compostos bioativos⁸. A cafeína (estimulante do sistema nervoso central) e os ácidos clorogênicos (ação antioxidante) são os mais importantes compostos bioativos do café. Outras substâncias que possuem funções fisiológicas são os álcoois diterpênicos (cafestol e caveol) e a trigonelina⁹⁻¹⁰. Estes compostos são chamados de metabólitos especializados porque sua produção aumenta quando a planta é submetida a condições de estresse ou a situações ecológicas específicas tais como condição biótica ou abiótica, radiação solar ou sombreamento, atração de polinizadores ou defesa contra o ataque de pragas¹¹.

A Tabela 1 apresenta a composição química dos grãos crus dos cafés arábica e robusta¹²⁻¹³. As diferenças entre as duas espécies de café estão relacionadas aos teores de cafeína, ácidos clorogênicos totais, sacarose e lipídios. Arábica e robusta se diferenciam também em relação às condições ambientais de cultivo e processamento. O café arábica é cultivado principalmente em região de montanha e o seu sabor é adocicado com

toque floral/frutado. Já o café robusta é plantado em planícies, sendo mais resistente às doenças e caracteriza-se por sabor forte semelhante ao cacau¹⁴.

Tabela 1 – Composição química dos cafés crus arábica e robusta (g/100g (b.s.))

Componentes	Arabica	Robusta
Caféina	0,9-1,3	1,5-2,5
Trigonelina	0,6-2,0	0,6-0,7
Cinzas	3,0-4,2	4,4-4,5
Ácidos clorogênicos totais	4,10-7,90	6,10-11,3
Ácidos alifáticos	1,50-1,90	0,90-1,40
Ácido quínico	0,47-0,57	0,31-0,39
Açúcares redutores	0,10-0,80	0,31-0,40
Sacarose	6,25-8,45	0,90-4,85
Polissacarídeos	43,0-45,0	46,9-48,3
Lignina	3,0	3,0
Pectina	2,0	2,0
Proteínas	10,0-11,0	11,0-15,0
Aminoácidos livres	0,5	0,8-1,0
Lipídios	15,0-17,0	7,0-10,0

Fonte: Adaptado¹²⁻¹³

O café arábica é a base da produção do café torrado. A Colômbia produz apenas café arábica enquanto que outros países de América Latina, África e Ásia comercializam a mistura desta espécie com café robusta¹⁵. A composição química do *C. arabica* tem sido estudada, existindo inúmeros trabalhos de revisão em relação a este assunto. O Quadro 1 apresenta uma lista de publicações que podem ser consultadas a respeito das substâncias contidas no café.

Quadro 1 – Publicações sobre composição química do *C. Arabica*

Título	Ano
Lipídios em grãos de café ¹⁶	2001
Determinação de minerais em café cru ¹⁷	2002
Distribution, biosynthesis and function of purine and pyridine alkaloids in <i>Coffea arabica</i> seedlings ¹⁸	2004
Métodos para análise de ácido clorogênico ¹⁹	2004
Parâmetros bromatológicos de grãos crus e torrados de cultivares de café (<i>Coffea arabica</i> L.) ²⁰	2005
Pattern recognition applied to mineral characterization of Brazilian coffees and sugar-cane spirits ²¹	2005
Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee ²²	2006
Coffee carbohydrates ²³	2006
Phenolic compounds in coffee ²⁴	2006
The lipid fraction of the coffee bean ²⁵	2006
Differentiation of coffee varieties according to their sterolic profile ²⁶	2007
Concentrações de metais pesados em grãos de café produzidos em lavouras sobre solos originados do basalto e do arenito Caiuá ²⁷	2009
Polyphenolic chemistry of tea and coffee: A century of progress ²⁸	2009
Isolation of coffee diterpenes by means of high-speed countercurrent chromatography ²⁹	2009
Coffee constituents ¹³	2012
Composição química de cafés arábica de cultivares tradicionais e modernas ³⁰	2013
The chemical composition of Yemeni green coffee ³¹	2013
Volatile composition and antioxidant capacity of Arabica coffee ³²	2013
Caffeic Acid: a review of its potential use for medications and cosmetics ³³	2014
Óleo de Grãos de Café Cru: Diterpenos Cafestol e Caveol ³⁴	2014
Coffee in health and disease prevention ³⁵	2015
Role of degradation products of chlorogenic acid in the antioxidant activity of roasted coffee ³⁶	2015
Chemical composition in wild ethiopian Arabica coffee accessions ³⁷	2016

Fonte: O próprio autor

1.2 PLANTIOS DE ALTA DENSIDADE

O cultivo de plantios adensados tem sido usado para aumentar a produção do café. O número de plantas por hectare pode variar de 5.000 a 20.000. Esta é uma condição natural de crescimento dos cafeeiros³⁸. Devido ao fato de que as plantas de café estão muito perto neste tipo de plantio, são necessárias cultivares de pequeno porte com alta resistência às pragas. A proximidade dos pés de café permite a conservação da umidade do solo e promove o intercâmbio de gases, reduzindo a evapotranspiração. O solo se cobre rapidamente com o desenvolvimento das plantas e as raízes crescem em profundidade devido ao aumento na demanda de nutrientes, particularmente minerais e água³⁹⁻⁴⁰. A competição pela radiação solar favorece o desenvolvimento da área foliar que ajuda a suportar os frutos, submetendo-os ao autossombreamento. Desta maneira, a produção de metabólitos especializados tais como as metilxantinas e os ácidos clorogênicos (ACG) pode mudar⁴¹.

Os estudos sobre mudanças provocadas por densidade e tipos de arranjos de plantio nas culturas de café envolvem principalmente análises biológicas e agrônômicas tais como produção de frutos⁴² e impactos provocados pela radiação solar, o estresse hídrico⁴³⁻⁴⁵ e a absorção de minerais⁴⁶⁻⁴⁷. Em relação à produção de frutos em cultivares de *C. arabica*, tem se encontrado os maiores rendimentos quando a densidade de plantio variava entre 7.000 e 10.000 plantas ha⁻¹, sendo a produção máxima de frutos alcançada entre o terceiro e o quinto ano⁴⁸. Quando comparada a produção de frutos em *C. arabica* cv. IAPAR 59, cultivada em altas densidades de plantio (14.000, 10.000 e 6.000 pts ha⁻¹), foi observado que o rendimento por pé nas plantações de maior densidade foi menor que nas de menor densidade⁴⁹. Estudos têm mostrado que a produção de frutos depende do espaçamento entre as linhas de plantio e entre as plantas, sendo requerida a poda após a quarta colheita⁵⁰.

1.3 *COFFEA ARABICA* CV. IAPAR 59

A cultivar IAPAR 59 do *Coffea arabica* é a 5ª geração proveniente do cruzamento das cultivares Villa Sarchi 971/10 de *C. arabica* e o Híbrido de Timor 832/2, originado num cruzamento espontâneo entre *C. arabica* e *C. canephora*. O desenvolvimento foi realizado no CIFIC - Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, em Portugal⁵¹. Esta cultivar apresenta arquitetura compacta com menor altura, diâmetro e volume de copa, favorecendo o cultivo adensado e a colheita tanto manual quanto mecanizada. Além destas vantagens, a cultivar IAPAR 59 é resistente a trinta raças de *Hemileia vastatrix*, conhecida como ferrugem-do-café ou fungo da ferrugem além de ser completamente resistente ao nematoide *Meloidogyne exigua* in Costa Rica⁵².

Os atributos sensoriais e características físico-químicas da cv. IAPAR 59 foram estudadas mostrando que a bebida preparada com esta cultivar apresentou-se mais ácida e com menos densidade³⁷. Quando comparados os cafés arábica tradicionais com os cafés obtidos mediante o cruzamento arábica x canephora, observou-se um aumento nos teores de ácidos clorogênicos (ACG), cafestol e caveol e conseqüentemente, da atividade antioxidante⁵³.

Esta tese tem como objetivo geral definir as relações entre a densidade e tipo de arranjo do plantio sobre a produção de metabólitos especializados em grãos crus de *C. arabica* cv. IAPAR 59, cultivado em dois tipos de arranjo: quadrado e retangular, e em duas densidades de plantio: 6.000 e 10.000 plantas ha⁻¹. Os objetivos específicos para o desenvolvimento deste trabalho são apresentados nos Capítulos 3, 4, 5 e 6, assim como as conclusões inerentes aos mesmos.

No Capítulo 2 são apresentados os métodos estatísticos e quimiométricos utilizados na análise dos dados gerados.

O Capítulo 3 corresponde à análise de minerais e lipídios. Apresenta a determinação e cálculo de cinzas e lipídios e a análise dos resultados através da análise de variância. Os extratos lipídicos foram analisados por espectroscopia na região do Infravermelho (IV) e os minerais presentes nas amostras cruas foram analisados por fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDXRF). Os dados obtidos na região do IV e por EDXRF foram submetidos à análise das componentes principais (ACP).

No Capítulo 4 descreve-se a obtenção dos extratos usando um planejamento experimental simplex centroide, cálculo dos rendimentos de cada extrato, avaliação do efeito do solvente extrator através de um modelo ajustado e curvas de nível preditas pelo modelo.

No Capítulo 5, são apresentados a parte experimental, análise por ACP e análise hierárquica (AH) dos dados espectrais coletados no UV e na região do Infravermelho dos extratos obtidos no planejamento experimental do Capítulo 4.

O Capítulo 6 descreve a análise dos extratos obtidos no planejamento experimental do Capítulo 4 por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H) e a análise exploratória dos dados espectrais por ACP e AH.

REFERÊNCIAS

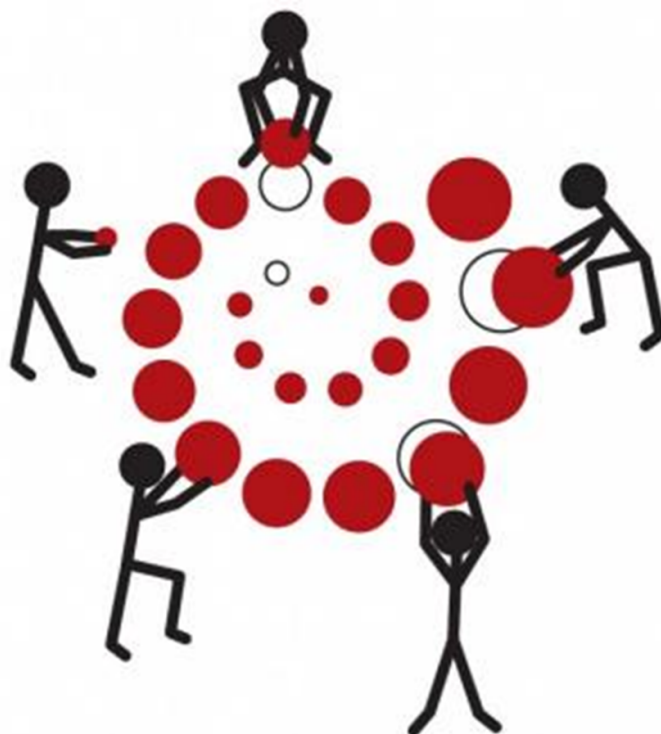
- ¹ ICO – INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Relatório sobre o mercado cafeeiro**. Disponível em: < <http://dev.ico.org/news/cmr-0114-p.pdf> >. Acesso em 11 Maio 2016.
- ² FARIAS, E. T.; SILVA, E. A. A.; TOOROP, P. E.; BEWLEY, D. E.; HILHORST, H. W. M. Expression studies in the embryo and in the micropylar endosperm of germinating coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seeds. **Plant Growth Regul.**, v. 75, p. 575-581, 2015.
- ³ DA MATTA, F. M.; RAMALHO, J. D. C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Braz. J. Plant Physiol.** v. 18, p. 55-81, 2006.
- ⁴ JÖET, T.; LAFFARGE, A.; DESCROIX, F.; DOULBEAU, S.; BERTRAND, B.; KOCHKO, A.; DUSSERT, S. Influence of environmental factors, wet processing and their interactions on the biochemical composition of green Arabica coffee beans. **Food Chem.**, v.118, p. 693-701, 2010.
- ⁵ GONZALEZ-RIOS, O.; SUAREZ-QUIROZ, M. L.; BOULANGER, R.; BAREL, M.; GUYOT, B.; GUIRAUD, J. P.; SCHORR-GALINDO, S. Impacto f “ecological” post-harvest processing on the volatle fraction of coffee beans : I. Green coffee. **J. Food Comp. Anal.**, v. 20, p. 289-296, 2007.
- ⁶ SELMAR, D.; BYTOF, G.; KNOPP, S. E. The storage of green coffee (*Coffea arabica*): decrease of viability and changes of potencial aroma precursors. **Ann. Botany.**, v. 101, p. 31-38, 2008.
- ⁷ HEČIMOVIĆ, I.; BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; HORŽIĆ, D.; KOMES, D. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. **Food Chem.**, v. 129, p. 991-1000, 2011.
- ⁸ RODRIGUES, N. P.; BRAGAGNOLO, N. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC–DAD–MSⁿ. **J. Food Comp. Anal.**, v. 32, p. 105-115 2013.
- ⁹ ESQUIVEL, P.; JMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Res. Int.**, v. 46, p. 488-495, 2012.
- ¹⁰ CANO-MARQUINA, A.; TARÍN, J. J.; CANO, A. The impact of coffee on health. **Maturitas**, v. 75, p.7-21, 2013.
- ¹¹ PICHERSKY, E.; LEWINSOHN, E. Convergent evolution in plant specialized metabolism. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 62, p. 549–566, 2011.
- ¹² CLARK, R. J.; VITZTHUM, O. G. Ed. **Coffee: Recent developments**. Berlin: Blackwell Science, 2001. 257 p.
- ¹³ FARAH, A. Coffee constituents. In: CHU, YI-FANG. **Coffee: Emerging health effects and disease prevention**. First Edition. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2012.

- ¹⁴ CAGLIANI, L. R.; PELLEGRINO, G.; GIUGNO, G.; CONSONNI, R. Quantification of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. robusta in roasted and ground coffee blends. **Talanta**, v. 106, p. 169-173, 2013.
- ¹⁵ ARANA, V. A.; MEDINA, J.; ALARCON, R.; MORENO, E.; HEINTZ, L.; SCHAFER, H.; WIST, J. Coffee's country of origin determined by NMR: The Colombian case. **Food Chem.**, v. 175, p. 500-506, 2015.
- ¹⁶ LAGO, R. C. A. Lipídios em grãos de café. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 19, p. 319-340, 2001.
- ¹⁷ MORGANO, M. A.; PAULUCI, L. F.; MANTOVANI, D. M. B.; MORY, E. E. M. Determinação de minerais em café cru. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 22, p. 19-23, 2002.
- ¹⁸ ZHENG, X-Q.; ASHIHARA, H. Distribution, biosynthesis and function of purine and pyridine alkaloids in *Coffea arabica* seedlings. **Plant Sci.**, v. 166, p. 807-813, 2004.
- ¹⁹ DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Quim. Nova**, v. 27, p. 586-592, 2004.
- ²⁰ MENDONÇA, L. M. V. L.; PEREIRA, R. G. F. A.; MENDES, A. N. G. Parâmetros bromatológicos de grãos crus e torrados de cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 25, p. 239-243, 2005.
- ²¹ FERNANDES, A. P.; SANTOS, M. C.; LEMOS, S. G.; FERREIRA, M. M.C.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Pattern recognition applied to mineral characterization of Brazilian coffees and sugar-cane spirits. **Spectrochim. Acta Part B**, v. 60, p. 717-724, 2005.
- ²² MURKOVIC, M.; DERLER, K. Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 69, p. 25-32, 2006.
- ²³ REDGWELL, R.; FISCHER, M. Coffee carbohydrates. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 18, p. 165-174, 2006.
- ²⁴ FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 18, p. 23-36, 2006.
- ²⁵ SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 18, p. 201-216, 2006.
- ²⁶ ČÍŽKOVÁ, H.; SOUKUPOVÁ, V.; VOLDŘICH, M.; ŠEVČÍK, R. Differentiation of coffee varieties according to their sterolic profile. **J. Food Nutr. Res.**, v. 46, p. 28-34, 2007.
- ²⁷ SCHMIDT, C. A. P.; MIGLIORANZA, E.; NAGASHIMA, G.; GRECCO, F. Concentrações de metais pesados em grãos de café produzidos em lavouras sobre solos originados do basalto e do arenito Caiuá. **Cienc. Rural**, v.39, p. 1590-1593, 2009.
- ²⁸ WANG, Y.; HO, C-T. Polyphenolic chemistry of tea and coffee: A century of progress. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 8109-8114, 2009.

- ²⁹ SCHARNHOP, H.; WINTERHALTER, P. Isolation of coffee diterpenes by means of high-speed countercurrent chromatography. **J. Food Comp. Anal.**, v. 22, p. 233–237, 2009
- ³⁰ GOOD KITZBERGER, C. S.; SCHOLZ, M. B. S.; PEREIRA, L. F. P.; BENASSI, M. T. Composição química de cafés arábica de cultivares tradicionais e modernas. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.48, p.1498-1506, 2013.
- ³¹ NOGAIM, Q. A.; AL-DUAIS, M.; AL-WARAFI, A.; AL-ERIANEE, H.; AL-SAYADI, M. The chemical composition of Yemeni green coffee. **J. Food Chem. Nutr.**, v. 1, p. 42-48, 2013.
- ³² CHEONG, M. W.; TONG, K. H.; ONG, J. J. M.; LIU, S. Q.; CURRAN, P.; YU, B. Volatile composition and antioxidant capacity of Arabica coffee. **Food Res. Int.**, v. 51, p. 388-396, 2013.
- ³³ MAGNANI, C.; ISAAC, V. L. B.; CORREA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Caffeic Acid: a review of its potential use for medications and cosmetics. **Anal. Methods UK**, v. 6, p. 3203-3210, 2014.
- ³⁴ TSUKUI, A.; OIGMAN, S. S.; REZENDE, C. M. Óleo de Grãos de Café Cru: Diterpenos Cafestol e Caveol. **Rev. Virtual Quim.**, v. 6, p. 16-33, 2014.
- ³⁵ PREEDY, V. R. Ed. **Coffee in health and disease prevention**. USA: Elsevier, 2015. 1046 p.
- ³⁶ KAMIYAMA, M.; MOON, J-K.; JANG, H. W.; SHIBAMOTO, T. Role of Degradation products of chlorogenic acid in the antioxidant activity of roasted coffee. **J. Agric. Food Chem.**, v. 63, p. 1996–2005, 2015.
- ³⁷ SCHOLZ, M. B. S.; GOOD KITZBERGER, C. S.; PAGIATTO, N. F.; PEREIRA, L. F. P.; DAVRIEUX, F.; POT, D.; CHARMENTANT, P.; LEROY, T. Chemical composition in wild ethiopian Arabica coffee accessions. **Euphytica**, v. 209, p. 429-438, 2016.
- ³⁸ AKUNDA, E.M.W.; IMBAMBA, S. K.; KUMAR, D. High density planting of coffee. I. Micro-climatic and related changes. **East Afr. Agric. For. J.**, v. 45, p. 130–132, 1979.
- ³⁹ CASSIDY, D. S. M.; KUMAR, D. Root distribution of *Coffea arabica* L. in Zimbabwe. I. The effect of plant density, mulch, cova planting and shade in Chipinge. **Zimbabwe J. Agric. Res.**, v. 22, p.119-132, 1984.
- ⁴⁰ VAN DER VOSSSEN, H. A. M. A critical analysis of the agronomic and economic sustainability of organic coffee production. **Expl. Agric.**, v. 41, p. 449-473, 2005.
- ⁴¹ DA MATTA, F. M. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. **Field Crops Res**, v. 86, p. 99-114, 2004.
- ⁴² PAULO, E. M.; FURLANI JR., E. Yield performance and leaf nutrient levels of coffee cultivars under different plant densities. **Sci. Agric.** (Piracicaba, Braz.), v. 67, p. 720-726, 2010.

- ⁴³ SANTANA, M. S.; OLIVEIRA, C. A. DA S.; QUADROS, M. Crescimento inicial de duas cultivares de cafeeiro adensado influenciado por níveis de irrigação localizada. **Eng. Agric.**, Jaboticabal, v.24, p. 644-653, 2004.
- ⁴⁴ MELKE, A.; FETENE, M. Eco-physiological basis of drought stress in coffee (*Coffea arabica*, L.) in Ethiopia. **Theor. Exp. Plant Physiol.**, v.26, p.225-239, 2014.
- ⁴⁵ NASCIMENTO, L. M.; SPHAR, C. R.; SANDRI, D. Produtividade de cafeeiro orgânico no cerrado sob diferentes regimes hídricos. **Coffee Sci.**, Lavras, v. 9, p. 354-365, 2014.
- ⁴⁶ VALADARES, S. V.; NEVES, J. C. L.; NOVAIS, R. F.; ROSA, G. N. G. P.; MARTINEZ, H. E. P.; VENEGAS, V. H. A. Yield gains of coffee plants from phosphorus fertilization may not be generalized for high density planting. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 38, p. 905-911, 2014.
- ⁴⁷ PREZOTTI, L. C.; DA ROCHA, A. C. Nutrição do cafeeiro arábica em função da densidade de plantas e da fertilização com NPK. **Bragantia**, v. 63, p. 239-251, 2004.
- ⁴⁸ KUFA, T.; SHIMBER, T.; YILMA, A.; NETSERE, A.; TAYE, E. The impact of close spacing on yield of arabica coffee under contrasting agro-ecologies of Ethiopia. **Afr. Crop Sci. J.**, v. 9, p. 401-409, 2001.
- ⁴⁹ RAKOCEVIC, M.; ANDROCIOLI-FILHO, A. Morpho-physiological characteristics of (*Coffea arabica* L.) in different arrangements: lessons from a 3D virtual plant approach. **Coffee Sci.**, Lavras, v. 5, p. 154-166, 2010.
- ⁵⁰ ANDRADE, W. E. B.; GUIMARÃES, P. T. G.; FAQUIN, V.; GUIMARÃES, R. J. Produtividade do cafeeiro arábica em condições de adensamento, no noroeste fluminense. **Coffee Sci.**, Lavras, v. 9, p. 90-101, 2014.
- ⁵¹ SILVEIRA, S. H.; RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; SERA, T.; CARVALHO, V.P.; COELHO, A. S. G. Assessment of genetic variability within and among coffee progenies and cultivars using RAPD markers. **Genet. Mol. Biol.**, v. 26, p. 329-336, 2003.
- ⁵² SERA, T. Coffee Genetic Breeding at IAPAR. **Crop Breed. Appl. Biotechnol.** v. 1, p. 179-199, 2001.
- ⁵³ GOOD KITZBERGER, C. S.; SCHOLZ, M. B. S.; BENASSI, M. T. Bioactive compounds content in roasted coffee from traditional and modern *Coffea arabica* cultivars grown under the same edapho-climatic conditions. **Food Res. Int.**, v. 61, p. 61-66, 2014.

CAPÍTULO 2



Métodos Estatísticos e Quimiométricos

1 INTRODUÇÃO

Nas décadas de 80 e 90, os cientistas dedicaram o seu esforço a desvendar o sequenciamento genético de vários organismos (Era Genômica). Mas isto não foi suficiente para compreender a produção de metabólitos pela célula. Na era pós-genômica, surgem as diferentes disciplinas com o sufixo “oma”, dedicadas a estudar os grupos de metabólitos da célula tais como proteoma (conjunto de todas as proteínas da célula), transcriptoma (conjunto de todos os ARNm transcritos) e metaboloma (conjunto de todos os metabólitos produzidos e/ou modificados)¹.

A metabolômica é uma ciência ômica cujo objetivo é determinar o perfil dos metabólitos em amostras de tecidos animais e vegetais, submetidos a condições específicas. As mudanças na produção de metabólitos nas plantas podem ser induzidas pela genética, condições climáticas, tipo de solo, estresse hídrico e nutricional, radiação solar, arquitetura vegetal, padrão de plantio, procedimentos pós-colheita além de outros fatores. Em estudos metabolômicos, diferentes metabólitos são investigados simultaneamente, utilizando técnicas analíticas, tais como a espectroscopia (UV-Vis, Infravermelho médio, NMR), espectrometria de massa (MS), cromatografia (HPLC, GC) e técnicas combinadas². Duas abordagens metabolômicas estão sendo empregadas para pesquisar alterações de metabólitos: o perfil metabólico e a impressão digital metabólica ou *fingerprint*. O perfil metabólico consiste em uma abordagem orientada à investigação de metabólitos específicos (*target*). A impressão digital metabólica é uma abordagem não orientada à pesquisa de metabólito ou grupo de metabólitos específico (*untarget*). O objetivo da impressão digital metabólica é o perfil metabólico global³.

Quando o perfil metabólico ou impressão digital metabólica de duas ou mais amostras são comparados, é utilizada a análise metabolômica a qual é composta por

amostragem, preparação da amostra, derivação (se necessário), uso de técnicas analíticas instrumentais apropriadas, processamento e interpretação de dados^{3,4}. A informação contida nessas variáveis precisa ser extraída e os métodos quimiométricos têm sido utilizados para o processamento de dados obtidos de amostras de café⁵⁻⁹.

Atualmente, o trabalho experimental num laboratório de pesquisa química inclui técnicas sofisticadas que geram milhares de dados. Somente com o uso de ferramentas matemáticas e estatísticas adequadas, estes dados poderão fornecer informação confiável que ajudem na aplicabilidade dos resultados obtidos no trabalho árduo, cuidadoso e objetivo do pesquisador.

A interdisciplinaridade entre a química, a matemática e a estatística gerou a Quimiometria. Kowalski (1978)¹⁰ definiu Quimiometria como "uma disciplina química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou otimizar procedimentos experimentais e extrair o máximo de informação relevante, através da análise de dados". Kramer (1998)¹¹ definiu Quimiometria como a arte de processar dados com o objetivo de extrair informação útil. Já para Kumar et al.¹², Quimiometria é a ciência onde certos métodos estatísticos e matemáticos interagem com medidas em processos químicos.

A Quimiometria não é de uso exclusivo da Química. Hoje em dia, seu uso abrange as mais diversas áreas tais como Física, Biologia, Ciências Sociais, Ciências do Meio Ambiente, Biologia e Medicina¹³, Economia, Engenharia, Agronomia entre outras¹⁰. Suas primeiras aplicações na Química Analítica foram no processamento de dados multivariados gerados em cromatografia líquida de alta eficiência e em espectroscopia UV-Vis¹⁴. A Quimiometria pode ser dividida em Análise exploratória; Calibração multivariada; Proposta de modelos de classificação e Planejamento fatorial¹⁵.

Neste trabalho foram utilizados os Planejamentos Fatorial (Capítulo 3) e Simplex Centróide (Capítulo 4) e a Análise Exploratória utilizando Análise das Componentes

Principais e Análise Hierárquica (Capítulos 5 e 6). Neste capítulo são descritos os fundamentos do Planejamento Fatorial, da Análise das Componentes Principais e da Análise Hierárquica. O Planejamento Simplex Centroide e suas bases teóricas encontram-se no Capítulo 4.

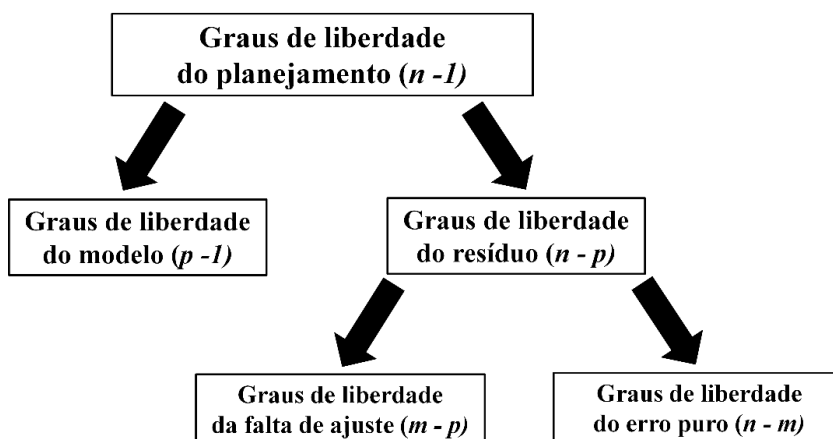
2 PLANEJAMENTO FATORIAL

Quando a resposta de um experimento é influenciada por dois ou mais fatores, sejam estes qualitativos ou quantitativos, considera-se que o sistema em análise se comporta como uma função que opera sobre os fatores (variáveis de entrada), originando as respostas (variáveis de saída)¹⁶. Para que o experimento se torne produtivo e com resultados confiáveis é necessário planejar o que se deseja realizar, organizando os procedimentos. De acordo com Brereton (2007)¹⁴, existem quatro razões para realizar o planejamento do experimento: 1) Fazer uma triagem, para decidir quais fatores são importantes na influência do parâmetro analisado; 2) Otimizar ou seja, determinar quais as melhores condições para obter a melhor resposta desejada; 3) Economizar tempo de execução nas análises e 4) Obter um modelo quantitativo que expresse a resposta em função dos fatores escolhidos.

Quando se faz um experimento é necessário conhecer os graus de liberdade envolvidos no experimento, os quais são valores calculados que fornecem uma medida da restrição dos dados quando se alcança um determinado nível de previsão. Ao avaliar um modelo quantitativo, quanto maior for o seu número de graus de liberdade, maior é a robustez do modelo e a previsão se torna mais representativa¹⁷. Para fazer o cálculo dos graus de liberdade do modelo, dos resíduos, da falta de ajuste e do erro puro (aleatório) são necessários o número de observações realizadas (n), o número de parâmetros do modelo (p), o número de

níveis diferentes da variável independente (m) e o número de repetições em cada um desses níveis (n_i). A Figura 1 esquematiza a relação entre os graus de liberdade de um experimento¹⁴.

Figura 1 – Relação entre os graus de liberdade num planejamento experimental.



Fonte: O próprio autor

O planejamento fatorial é definido como o conjunto de experimentos realizados em ordem aleatória que permite avaliar os efeitos das variáveis e de suas interações de forma multivariada. As variáveis podem ser controladas independentemente umas das outras. Isto significa que elas são estatisticamente independentes¹⁸. Neste trabalho, foram estudados dois fatores: um qualitativo, o tipo de arranjo de pés de café, e outro quantitativo, a densidade de plantio e sua influência sobre os teores de cinzas e de lipídios (respostas). Portanto, trata-se de um planejamento fatorial completo 2^2 , pois têm-se dois fatores (arranjo e densidade de plantio), cada um com dois níveis (S-quadrado e R-retangular; 6.000 e 10.000 plantas por ha^{-1}). O efeito que cada fator exerce na resposta do experimento é definido como a mudança mensurável na resposta devido à uma mudança no nível do fator analisado. A mudança na resposta pode ser grande ou pequena como também positiva (o valor da resposta aumenta) ou negativa (o valor da resposta diminui)¹⁹. O efeito que apenas um dos fatores produz na resposta quando muda de nível é denominado efeito principal. O efeito da interação

ocorre quando o efeito de uma variável depende do nível da outra, ou seja, as duas variáveis (arranjo e densidade) interagem entre si^{16,20}.

Como não é possível fazer cálculos com as variáveis da maneira como elas são apresentadas no experimento, se faz necessário codificar os seus níveis. Convencionalmente se estabelece o valor (-1) para o nível mais baixo e (+1), para o mais alto. A importância da codificação reside em que todas as variáveis estudadas têm a mesma relevância, independentemente de serem qualitativas, quantitativas e das suas unidades de medida¹⁵.

Para calcular cada um dos efeitos principais (tipo de arranjo ou densidade de plantio) sobre o teor de cinzas e de lipídios se aplica a Equação (1), onde \bar{Y}_+ é a média das respostas (% de cinzas ou de lipídios) quando a variável analisada está no seu nível mais alto (retangular ou 10.000 pts ha⁻¹) e \bar{Y}_- é a média das respostas (% de cinzas ou de lipídios) quando a variável analisada está no seu nível mais baixo (quadrado ou 6.000 pts ha⁻¹). No caso do efeito de interação entre os dois fatores, a resposta obtida (teor de cinzas ou de lipídios) é multiplicada pelo produto dos códigos referentes às variáveis (-1 ou +1) e se aplica a Equação 1.

$$\text{Efeito} = \bar{Y}_+ - \bar{Y}_- \quad (1)$$

Para estimar o erro experimental num planejamento, é necessário realizar repetições autênticas dos experimentos nas mesmas condições. Isto se consegue, aleatorizando o experimento. Uma das maneiras de fazê-lo é sortear a ordem em que serão realizadas as repetições^{14,16}. Assim é possível que fatores desconhecidos contaminem os efeitos que se desejam analisar. Quando se têm repetições autênticas é possível calcular uma estimativa conjunta da variância experimental de acordo com a Equação 2, onde $v_i = n-1$ é o

número de graus de liberdade da variância do i -ésimo ensaio (s^2). O **erro-padrão** (erro experimental característico das respostas) é calculado aplicando a raiz quadrada na Equação 2¹⁶.

$$s^2 = \frac{v_1 s_1^2 + v_2 s_2^2 + \dots + v_n s_n^2}{v_1 + v_2 + \dots + v_n} \quad (2)$$

Dado que as repetições são autênticas e os ensaios foram realizados aleatoriamente, os valores das respostas são estatisticamente independentes. Considerando que eles têm a mesma variância populacional (σ^2), pode-se calcular o **erro-padrão de um efeito** de acordo com a Equação 3¹⁶.

$$s(\text{efeito}) = \sqrt{\sigma^2 / n} = \sqrt{s^2 / n} \quad (3)$$

A distribuição t de Student é utilizada para construir os intervalos de confiança dos efeitos, considerando v o número de graus de liberdade ($n - 1$) (Equação 4). A letra η representa o verdadeiro valor de um efeito enquanto que $\hat{\eta}$ é a estimativa desse valor obtida através dos ensaios. Os efeitos que podem ser interpretados são aqueles cujo valor é diferente de zero. Portanto o intervalo de confiança da Equação 4 não deve incluir este valor¹⁶.

$$\hat{\eta} - t_v \cdot s(\text{efeito}) < \eta < \hat{\eta} + t_v \cdot s(\text{efeito}) \quad (4)$$

3 ANÁLISE EXPLORATÓRIA

Em Química, dados cromatográficos, espectroscópicos e de espectrometria de massa fornecem informação sobre centenas de compostos presentes nas amostras. Técnicas hífenadas aumentam ainda mais o número de dados disponíveis para análise. Este é um típico caso de impressão digital metabólica e a análise dos dados se torna multivariada¹⁴. Quando se deseja analisar as semelhanças ou diferenças entre várias amostras com o objetivo de classificá-las ou agrupá-las dois tipos de métodos podem ser empregados: os supervisionados e os não supervisionados. Os supervisionados são métodos nos quais se constrói um modelo para classificar as amostras. A classe à qual pertence a amostra já é pré-estabelecida. Nos métodos não supervisionados, deseja-se observar se há agrupamento entre as amostras sem utilizar informação prévia das mesmas¹⁰. A seguir é apresentada uma breve descrição dos métodos não supervisionados utilizados neste trabalho: Análise das Componentes Principais e Análise Hierárquica.

3.1 ANÁLISE DAS COMPONENTES PRINCIPAIS

A análise das componentes principais (ACP) trata-se de uma técnica simples, aplicada a dados com nenhum agrupamento nas observações e nenhuma divisão em subconjuntos, que permite reduzir um grande número de variáveis a umas poucas em função da correlação que existe entre as mesmas²¹⁻²². Esta técnica assume que os dados não seguem uma distribuição em particular. Matematicamente, cada componente principal (CP) pode ser descrita como uma combinação linear das variáveis originais onde a importância ou peso de cada variável é dada pelos pesos (*loadings*). Esta combinação linear fornece ainda para cada

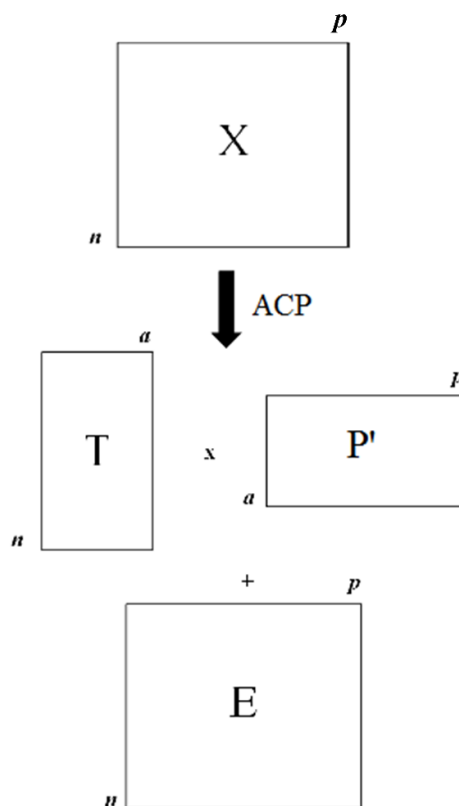
objeto valores chamados escores e o objetivo da ACP é maximizar a variância dessa combinação linear²⁴.

Os dados são dispostos numa matriz \mathbf{X} de n linhas correspondentes às amostras e p colunas, correspondentes às variáveis^{23,25}. A componente principal é uma reta que minimiza a distância dos pontos experimentais à reta. A primeira CP é a combinação linear dos dados com máxima variância e quanto maior a variância, maior é a quantidade de informação que essa componente contém. A segunda CP é a combinação linear com máxima variância na direção ortogonal em relação à primeira CP. Esta propriedade das componentes principais (CP's) é denominada ortogonalidade e se cumpre em todas elas, sendo cada uma delas ortogonal às que a precedem^{10,23}.

No procedimento matemático para encontrar as componentes principais numa determinada análise, a matriz \mathbf{X} dos dados é transformada na combinação de outras três matrizes de acordo com a Equação (5), onde \mathbf{T} é a matriz dos escores, \mathbf{P}' é a matriz dos pesos (*loadings*) e \mathbf{E} , a matriz dos erros, considerando \mathbf{TP}' como um modelo. A Figura 2 mostra o número de linhas e colunas de cada matriz. Note-se que a matriz dos erros \mathbf{E} possui os mesmos números de linhas e de colunas que a matriz original \mathbf{X} . O número de colunas de \mathbf{T} e o número de linhas de \mathbf{P}' , denominado a , representa o número de componentes principais significativas.

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \quad (5)$$

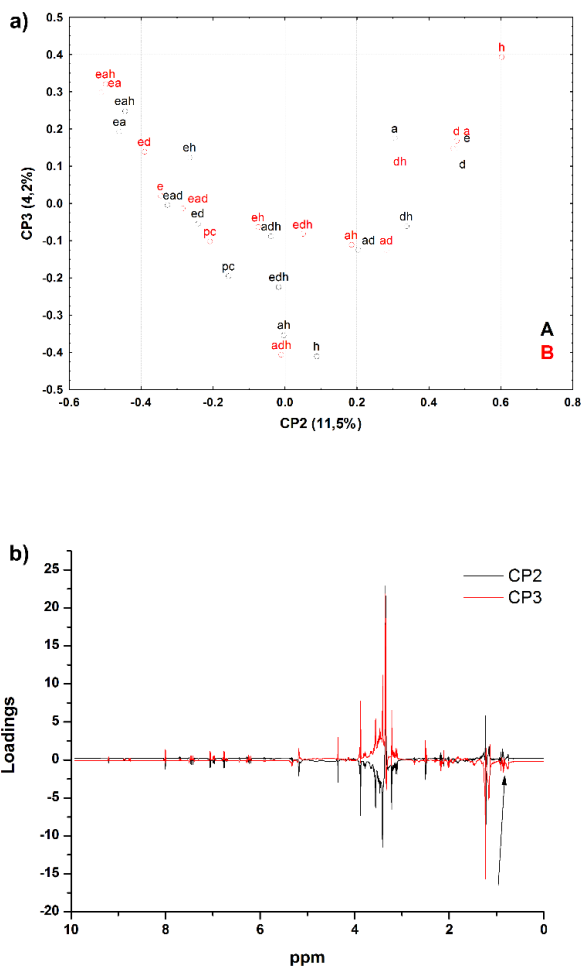
Figura 2 – Esquema da transformação matemática na ACP



Fonte: O próprio autor

A ACP é interpretada através de gráficos dos escores e dos pesos (*loadings*). O primeiro destes está relacionado com a distribuição das amostras ao longo das CP's escolhidas para representá-lo. Os gráficos dos escores mais usados são o bidimensional ($CP_1 \times CP_j$) (Figura 3a) e o tridimensional ($CP_1 \times CP_j \times CP_k$). O gráfico dos *loadings* (Figura 3b) mostra o peso que cada variável tem dentro de determinada componente e como este determina a formação de grupos no gráfico dos escores. Para caracterizar os grupos formados no gráfico dos escores, os *loadings* positivos de uma determinada componente são associados aos escores positivos dessa CP e os *loadings* negativos se correspondem com os escores negativos da mesma²³.

Figura 3 – Exemplo de gráfico de a) escores e b) *loadings*



Fonte: O próprio autor

3.2 ANÁLISE HIERÁRQUICA

A análise hierárquica consiste em dividir um grupo de objetos em classes menores de tal maneira que objetos que se encontram próximos no espaço das variáveis formam parte de uma mesma classe. A distância entre dois pontos no espaço de n -dimensões (espaço das amostras) com coordenadas (x_1, x_2, \dots, x_n) e (y_1, y_2, \dots, y_n) é dada pela Equação 6 e é denominada **distância euclidiana**.

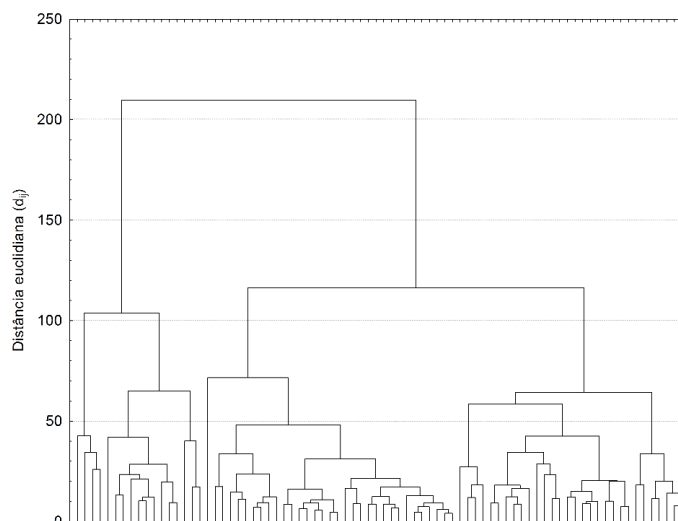
$$d = \sqrt{(x_1 - y_1)^2 + (x_2 - y_2)^2 + \dots + (x_n - y_n)^2} \quad (6)$$

No início da análise, considera-se que cada amostra representa um grupo separado. Admitindo que amostras próximas no espaço n -dimensional têm características semelhantes, pode-se calcular a distância d entre elas com a Equação 5, criando-se um novo grupo. Calcula-se novamente a distância entre os dois grupos, repetindo-se o processo até terminar com as n amostras. As sucessivas etapas de agrupamento são visualizadas num gráfico denominado dendrograma (Figura 4)^{10,23}.

A separação para identificar os grupos formados pode ser feita escolhendo a distância euclidiana, no eixo vertical ou a **similaridade** entre os grupos que é calculada pela Equação 7, onde d_{ij} é a distância euclidiana entre os pontos i e j e d_{max} , a distância máxima entre dois pontos quaisquer²³. Note-se que quanto menor a distância entre dois pontos, maior será sua similaridade.

$$s_{ij} = 100 (1 - d_{ij} / d_{max}) \quad (7)$$

Figura 4 – Exemplo de dendrograma



Fonte: O próprio autor

REFERÊNCIAS

- ¹ VILAS BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma. **Biotecnologia Cien. Desenvol.** v. 36, p. 58-69, 2006.
- ² BUNDY, J. G.; DAVEY, M. P.; VIANT, M. R. Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. **Metabolomics**, v. 5, p. 3-21, 2009.
- ³ CEVALLOS-CEVALLOS, J. M.; REYES-DE-CORCUERA, J. I., ETXEBERRIA, E.; DANYLUK, M. D.; RODRICK, G. E. Metabolomic analysis in food science: A review. **Trends Food Sci. Tech.**, v. 20, p. 557–566, 2009.
- ⁴ DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **Trends Anal. Chem.**, v. 24, p. 285-294, 2005.
- ⁵ TAVARES, L, A. **Utilização de métodos quimiométricos aliados a RMN na caracterização dos diferentes tipos de cafés comerciais.** 2007. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.
- ⁶ DE SOUZA, R. M. N.; BENASSI, M. T. Discrimination of commercial roasted and ground coffees according to chemical composition. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, p. 1347-1354, 2012.
- ⁷ MOREIRA, I.; SCARMINIO, I. S. Chemometric discrimination of genetically modified *Coffea arabica* cultivars using spectroscopic and chromatographic fingerprints. **Talanta**. v.107, p. 416–422, 2013.
- ⁸ DELAROZA, F.; RAKOCEVIC, M.; MALTA, G. B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Spectroscopic and chromatographic fingerprint analysis of composition variations in *Coffea arabica* leaves subject to different light conditions and plant phenophases. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 00, No. 00, 1-10, 2014.
- ⁹ MOREIRA, I.; SCHEEL, G. L.; HATUMURA, P. H.; SCARMINIO, I. S. Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em *Coffea arabica*. **Quim. Nova**, v. 37, n. 1, p. 39-43, 2014.
- ¹⁰ FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria.** Conceitos, métodos e aplicações. Campinas – SP: editora da Unicamp, 2015. 493 pp.
- ¹¹ KRAMER, R. **Chemometric techniques for quantitative analysis.** New York, USA. 1998. 203 pp.
- ¹² KUMAR, N.; BANSAL, A.; SARMA, G.S.; RAWAL, R. K. Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. **Talanta**, v. 123, p. 186-199, 2014.
- ¹³ COVA, T. F. G. G. **Aplicações em Quimiometria.** Do diagnóstico médico à ciétiometria. 2011. Dissertação de Mestrado. FCTUC. Departamento de Química. Universidade de Coimbra. 115 pp.
- ¹⁴ BRERETON, R. G. **Applied chemometrics for scientists.** Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd. 2007. 379 pp.

- ¹⁵ PEREIRA FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em Química**. São Carlos, SP: Edufscar, 2015. 88 pp.
- ¹⁶ NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4 ed. São Paulo: Bookman Companhia Editora, 2010. 413 p.
- ¹⁷ HAIR JR., J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 688 pp.
- ¹⁸ BREITKREITZ, M. C.; SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de Quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. Um tutorial, Parte III. **Quim. Nova**, v. 37, p. 564-573, 2014.
- ¹⁹ TOMÀS-MORER, X.; GONZÁLEZ-SABATÉ, L.; FERNÁNDEZ-RUANO, L.; GÓMEZ-CARRACEDO, M. P. Implementing a robust methodology: experimental designs and optimisation. In: ANDRADE-GARDA, J. M. (Ed.) **Basic Chemometric Techniques in Atomic Spectroscopy**. 2nd ed. Cambridge (UK): The Royal Society of Chemistry, 2013. p. 123-255.
- ²⁰ MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 8th ed. United States: John Wiley & Sons Ltd. 2013. 724 pp.
- ²¹ SABIN, J. G.; FERRÃO, M. F.; FURTADO, J. C. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 40, n. 3, p. 387-396, 2004.
- ²² MARQUES, J. M.; MARQUES, M. A. M. As componentes principais no descarte de variáveis em um modelo de regressão múltipla. **Revista FAÉ Curitiba**, v. 8, n. 1, p. 93-101, 2005.
- ²³ MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 6. ed. Gosport: Pearson, 2010. 278 p.
- ²⁴ HÄRDLE, W. K.; SIMAR, L. **Applied multivariate statistical analysis**. 3rd ed. Germany: Springer Berlin Heilderberg. 2012. 486 pp.
- ²⁵ MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Quim. Nova**, v. 21, p. 467-469, 1998.
- ²⁶ BRERETON, R. G. **Chemometrics for pattern recognition**. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd. 2009. 504 pp.

CAPÍTULO 3



Análises físico-químicas

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Instrução Normativa 8/2003 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, define-se como Café Beneficiado Grão Cru, o “endosperma do fruto de diversas espécies do gênero *Coffea*, principalmente *Coffea arabica* e *Coffea canéfora* (robusta ou conillon)”. A semente deve ser lavada dessecada e desprovida dos tegumentos externos, excetuando o espermoderma, película que envolve todo o endosperma¹⁻².

Dentro da cadeia de produção do café, o teor de umidade é um dos fatores que determina sua qualidade. No processo de colheita, o fruto contém entre 55 e 65% (b.s.) de umidade. Processos eficientes de secagem devem ser aplicados de tal maneira de reduzir esse valor até 11% (b.s.) para impedir o dano das membranas celulares e a consequente perda de compostos ligados ao aroma e ao sabor da bebida final³. O conteúdo de umidade no café cru deve ser conhecido, principalmente por dois motivos. Primeiro, para evitar o crescimento de micro-organismos e, desta maneira, a evolução de processos fermentativos e o desenvolvimento de micotoxinas, principalmente durante o armazenamento e transporte do produto. Segundo, para diminuir a taxa de respiração do grão. Desta maneira, evita-se a produção de substâncias com odores indesejáveis que alteram as características sensoriais do café e diminuem o seu valor de mercado. A umidade do café cru deve estar entre 8,0 e 12,5 %⁴⁻⁵.

Segundo ANVISA (2016)⁶, o teor de cinzas do café, considerado resíduo mineral fixo, deve ser, no máximo, de 5%. De acordo com a Tabela 1 do Capítulo I, o café arábica apresenta 4,2% de cinzas (minerais). Alguns destes minerais são essenciais ao organismo. Os principais minerais presentes no café são cálcio, potássio, sódio, magnésio, fósforo, manganês, ferro, cobalto, cromo e zinco. Também podem ser encontrados alumínio,

bário, rubídio, estrôncio, chumbo, molibdênio, titânio e cádmio⁷⁻⁸. Estudos realizados em amostras de cafés comercializados mostraram que 99,94% da composição mineral corresponde aos macroelementos na seguinte ordem: K>Ca>Mg>Na. Os microelementos totalizavam 0.04% e decresciam na ordem Fe>Mn>Cu>Zn>Ni>Co>Pb>Cd⁹. O teor de minerais do café depende do tipo de solo, o que indica que seria possível diferenciar os cafeeiros cultivados em distintos tipos de solo utilizando o perfil mineral¹⁰. A Tabela 1 apresenta os teores de minerais, expressos em mg por kg de café cru em cultivares de café arábica¹¹.

Tabela 1 – Conteúdo mineral em grãos crus de cultivares de café arábica

Mineral	mg.kg⁻¹
K	12.200 - 17.000
Mg	1.600 - 2.060
Ca	1.000 - 1.900
P	1.200 - 1.800
Fe	23 - 367
Mn	14 - 60
Cu	6,0 - 370
Zn	3,7 - 57
Al	0,6 - 32,2
Ba	1,1 - 17,6
Ni	0,1 - 44,0
Co	0,1 - 1,2

Fonte: Adaptado de MORGANO et al., 2002¹¹

Para a determinação de minerais em grãos crus e torrados de café têm sido utilizadas diferentes técnicas sendo as mais frequentes espectroscopia de absorção atômica (chama ou forno de grafite), assim como também a emissão em plasma acoplado indutivamente¹¹⁻¹⁵. A desvantagem destas técnicas é o preparo da amostra o que torna a análise demorada. Uma alternativa para este tipo de análise é o uso da espectroscopia de

fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDXRF). O fundamento desta técnica consiste em incidir raios X sobre a amostra a ser analisada. Desta maneira, os elementos presentes são excitados, emitindo raios X com energias que são características de cada elemento (análise qualitativa). A intensidade do pico correspondente a cada elemento aumenta com a quantidade presente na amostra (análise quantitativa)¹⁶. Esta técnica se caracteriza por ser multielementar (determina elementos a partir do Na), simultânea (determina vários elementos numa única análise) e não destrutiva (a amostra pode ser usada em outra análise). Podem ser analisados elementos cujas concentrações podem alcançar menos que 1 mg kg⁻¹. Outra vantagem é que a amostra pode se apresentar em qualquer forma física e é independente da forma em que se apresenta o elemento¹⁷.

Os lipídios dos grãos crus do café, também denominados “óleo de café”, encontram-se principalmente concentrados no endosperma e, na forma de ceras, na camada externa do grão. Em café arábica cru, o teor pode variar de 12 a 20 %, sendo a média de 15 %¹⁸⁻¹⁹. A classificação dos lipídios em saponificáveis e insaponificáveis está baseada na sua reação com NaOH para originar ou não sais de sódio (sabões). Os lipídios saponificáveis do café estão compostos por ácidos graxos livres, mono-, di- e triacilgliceróis. Os ácidos graxos encontrados no óleo do café e nas ceras são: mirístico (14:0), palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2), linolênico (18:3), araquídico (20:0), gadoleico (20:1), behênico (22:0) e lignocérico (24:0). As maiores proporções correspondem aos ácidos linoleico e palmítico. Speer; Kurzrock; Kölling-Speer (2004)²⁰ observaram que o teor de ácidos graxos livres em café cru aumentava com o tempo devido à hidrólise pela ação enzimática. Diferentes condições de umidade, temperatura e atmosfera de estocagem foram estudadas sendo que os fatores que mais influenciaram foram os dois primeiros.

Dentro dos insaponificáveis destacam-se os álcoois pentacíclicos diterpênicos cafestol, caveol e os seus derivados, dehidro-cafestol, dehidro-caveol, 16-O-

metilcafestol e 16-O-metilcaveol. O 16-O-metilcafestol está presente apenas nos grãos crus de café robusta e é estável à torrefação, sendo utilizado como indicador da presença da espécie robusta em *blends* de café arábica. Os diterpenos podem estar na forma livre ou como ésteres de ácidos graxos¹⁹. Além dos diterpenos mencionados, esteróis, álcoois triterpênicos e fosfatídeos constituem a fração insaponificável do café. Substâncias com características antioxidantes também fazem parte desta fração lipídica do café tais como tocoferóis e hidroxitriptamidas¹⁸.

Vários métodos têm sido estudados e aplicados para extração dos lipídios do café. Quando se trata de extrair e calcular o teor de lipídios totais de um sistema alimentar, o método mais utilizado é o de Soxleht. Embora o processo completo de extração seja longo (6 a 8 horas), autores têm demonstrado que, usando um tempo menor de extração (4 horas) os valores encontrados para 8 e 4 h não apresentam diferença significativa entre eles²¹. Estes autores aplicaram o método de Soxleht na extração de óleo de aveia, rico em ácidos graxos insaturados, e em gordura de frango. A determinação de hidroperóxidos mostrou que o óleo de aveia tinha menor índice de hidroperóxidos do que o frango. Assim como o café, a aveia possui ácidos ferúlico e cafeico que atuam como antioxidantes²².

Considerando-se a importância destes parâmetros, neste estudo avaliou-se a influência do tipo de arranjo (quadrado ou retangular) e da densidade de plantio (6.000 e 10.000 pts ha⁻¹) sobre os teores de cinzas, lipídios e minerais em grãos crus de *Coffea arabica* cv. IAPAR 59.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS DE GRÃOS

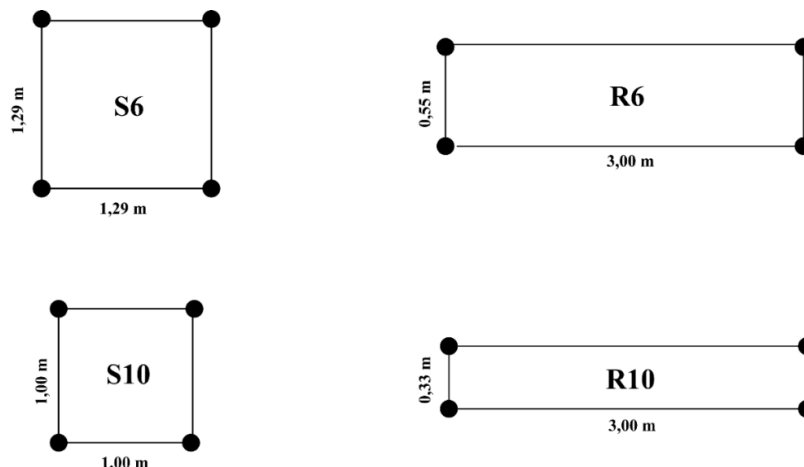
As amostras de grãos crus de *Coffea arabica* cv. IAPAR 59 foram fornecidas pelo Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina – PR (23°18'S e 51°17' W). Os cafeeiros foram cultivados em dois tipos de arranjos: quadrado (S) e retangular (R) e em duas densidades diferentes: 6.000 e 10.000 pts ha⁻¹. A Tabela 2 mostra os arranjos, densidades, distância entre fileiras e entre plantas, área por planta e suas respectivas simbologias. A disposição dos cafeeiros em cada tratamento é mostrada na Figura 1.

Tabela 2 – Identificação dos tratamentos dos cafeeiros amostrados

Arranjo	Densidade (plantas ha ⁻¹)	Distância entre fileiras e entre plantas (m)	Área/planta (m ²)	Identificação
Quadrado	6000	1,29 x 1,29	1,66	S6
Quadrado	10000	1,00 x 1,00	1,00	S10
Retangular	6000	3,00 x 0,55	1,66	R6
Retangular	10000	3,00 x 0,33	1,00	R10

Fonte: O próprio autor

Figura 1 – Esquema da disposição dos cafeeiros na plantação



Fonte: O próprio autor

A adubação foi realizada com N-P-K de formulação 20-5-20, utilizando entre 50 e 60 g por cova, considerando, desta maneira, a eficiência de adubo por planta. A formulação mencionada aplicou-se nos cafeeiros quatro vezes por ano, nos meses de Setembro, Novembro, Janeiro e Maio. Os frutos maduros e de coloração vermelha foram colhidos em 07 de Junho de 2010, tendo as plantas aproximadamente 2 m de altura. A secagem foi feita em caixas de fundo telado até atingir 12% de umidade. A casca e o pergaminho foram removidos em máquina de beneficiamento e embalados em sacos de papel para serem transportados ao laboratório. Os grãos defeituosos (imaturos verdes, quebrados ou pretos) foram retirados manualmente das amostras. A exsicata do *Coffea arabica* cv. IAPAR 59 foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Londrina sob o número FUEL 53984 (Figura 2).

Figura 2 – Exsicata de *Coffea arabica* cv. IAPAR 59



Fonte: O próprio autor

2.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras dos grãos crus foram submetidas à moagem no Laboratório de Fisiologia Vegetal do IAPAR. Os grãos foram congelados com nitrogênio líquido e a moagem dos mesmos foi realizada em moinho Perten Laboratory Mill 366. A peneiração foi realizada em peneira Granutest ASTM 25- Tyler 24, abertura de 0,710 mm (Figura 3). As amostras processadas foram transportadas ao Laboratório de Quimiometria em Ciências Naturais (LQCN) da UEL onde foram pesadas com precisão de 0,01 g e embaladas em sacos plásticos especiais para vácuo e selados em selador Selovac modelo 120 B. O armazenamento das amostras até o momento das análises e preparo dos extratos foi realizado em *freezer/cooler* Electrolux, modelo H 160, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 3 – Esquema do preparo das amostras de *C. arabica* cv. IAPAR 59



Fonte: O próprio autor

2.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

2.3.1 Determinação do teor de umidade

Embora as amostras tenham sido secas no Instituto Agrônômico do Paraná até alcançar 12% de umidade, este parâmetro foi novamente determinado para ser usado no cálculo dos rendimentos em base seca, no processo de extração (Capítulo 4). A umidade dos grãos moídos foi determinada utilizando uma massa de 2,000 g de amostra, pesada em pesa-filtro previamente tarado e submetido a estufa por 1 hora. A pesagem foi realizada com precisão de 0,0001 g, em balança Shimadzu AY220. As amostras foram colocadas em estufa Brasdonto modelo 5, a 105 °C, por 4 horas²³. O tempo empregado evita perdas de componentes voláteis e a exposição à oxidação das substâncias presentes no café. A análise foi realizada em triplicata. A porcentagem de umidade foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ umidade} = \frac{(\text{massa inicial} - \text{massa final})}{\text{massa inicial}} \times 100$$

2.3.2 Determinação do teor de cinzas

A determinação de cinzas²⁴ foi realizada em triplicata. Os cadinhos foram colocados na mufla Marconi MA385, a 550 °C, durante 12 h (*over night*), esfriados em dessecador e pesados com precisão de 0,0001g. Para a análise foi utilizada uma massa de 3,0000g. As amostras foram carbonizadas em bico de Bunsen até que não soltaram mais fumaça. A incineração foi realizada em mufla a 550 °C por 12 h (*over night*), esfriadas em dessecador e pesadas. O procedimento foi repetido mais uma vez e o teor de cinzas foi calculado de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ cinzas} = \frac{\text{massa final}}{\text{massa inicial}} \times 100$$

2.3.3 Determinação de lipídios pelo método de Soxhlet

A determinação de lipídios foi realizada usando o método de Soxhlet²⁴, com modificações, utilizando a mistura hexano (PE 69 °C) e éter de petróleo (30-60 °C) com o objetivo de diminuir a temperatura de ebulição durante a extração. Balões de 500 mL para a coleta do extrato foram colocados em estufa Brasdonto Modelo 5, a 105 °C, por uma hora e esfriados em dessecador com sílica gel até atingir a temperatura ambiente. Foi registrado o peso de cada balão.

Foi pesada uma massa de 3,000 g de amostra em balança Shimadzu AY220 sobre papel de filtro e foi feito um cartucho de Soxhlet e grampeado nas pontas. O cartucho foi colocado em aparelho de Soxhlet e 250 mL de mistura 1:1 de hexano p.a. e éter de petróleo p.a., ambos Alphatec, foi introduzida no balão coletor. O equipamento foi montado e a mistura de solventes foi aquecida em manta elétrica Fisatom modelo 102E durante 8 horas a 55 ± 2 °C.

Os solventes foram evaporados em rotaevaporador Fisatom 801 até restarem 10% do extrato no balão. O extrato contendo os lipídios foi transferido para frasco âmbar de 30 mL com tampa, previamente tarado. A eliminação do restante do solvente foi realizada sob circulação forçada de ar, protegendo a boca do recipiente com véu. Uma vez secos, os vidros foram pesados e a porcentagem de lipídios foi calculada como segue:

$$\% \text{ lipídios} = \frac{(\text{massa vidro} + \text{lipídios}) - \text{massa vidro}}{\text{massa amostra}} \times 100$$

As análises foram realizadas em triplicata. Os extratos foram conservados em freezer Electrolux Super FE26 a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, posteriormente, analisados por espectroscopia na região do Infravermelho médio.

2.3.4 Análise espectroscópica dos extratos lipídicos

Os espectros na região do Infravermelho médio (675 a 4000 cm^{-1}) dos extratos brutos e dos extratos lipídicos foram obtidos com o espectrômetro Thermo Scientific Nicolet iS10 FTIR, usando o acessório ATR (Attenuated Total Reflectance) com janela de germânio. O modo de medição foi realizado no modo transmitância, com 60 scans e resolução 4 cm^{-1} .

2.3.5 Análise de minerais por EDXRF

A determinação dos minerais presentes nas amostras de *C. arabica* cv. IAPAR 59 foi realizada pela técnica de fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDXRF). Utilizou-se o espectrômetro Shimadzu Energy Dispersion Fluorescence X Ray localizado no Laboratório de Apoio à Pesquisa Agropecuária (LAPA) da UEL. Uma massa de aproximadamente 2 g de amostra (grãos crus moídos) foi colocada em um porta-amostra Chemplex e cobertos com filme Mylar. Para a obtenção dos espectros foi utilizado o modelo orgânico que fornece as porcentagens de matéria orgânica e de metais presentes no sistema analisado.

2.3.6 Processamento dos dados

O programa computacional Statistica 7.0 foi utilizado para verificar a existência de diferença significativa entre as médias dos tratamentos para os teores de cinzas e lipídios no nível de significância de 95%. O teste de Levene foi utilizado para verificar a homogeneidade de variância e o teste *t* de Student, para comparação das médias. O mesmo programa foi usado no processamento dos dados gerados nas análises de minerais por EDXFR e na espectroscopia na região do Infravermelho médio. Os espectros no Infravermelho e os gráficos dos *loadings* foram gerados usando o programa Origin Pro 8.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE, CINZAS E LIPÍDIOS

Os teores de umidade dos tratamentos foram $9.19 \pm 0,31$ (S6), $9,02 \pm 0,43$ (S10), $8,99 \pm 0,31$ (R6) e $8,80 \pm 0,07$ % (R10). Os teores se mantiveram dentro da faixa encontrada na literatura (8,0 e 12,5 %)⁵, mesmo tendo passado pelo processamento descrito no preparo das amostras. Os dados obtidos nas análises de cinzas e lipídios das amostras coletadas de grãos de *Coffea arabica* cv. IAPAR 59 foram organizados num planejamento fatorial 2² para saber se os resultados ou respostas (quantitativas) eram influenciadas pelos fatores arranjo (quadrado e retangular), pelas densidades (6.000 e 10.000 pts ha⁻¹) ou pela sua combinação de ambos. A atribuição dos sinais (-) e (+) foi feita da seguinte maneira: quadrado (-) e retangular (+); 6.000 pts ha⁻¹ (-) e 10.000 pts ha⁻¹ (+). Os valores apresentados nas 4ª e 5ª colunas correspondem às triplicatas (réplicas) de cada análise (Tabela 3).

Tabela 3 – Planejamento 2² para estudo do efeito do tipo de arranjo e da densidade de plantio sobre os teores de cinzas e lipídios.

Densidade	Arranjo	Tratamento	Cinzas (%)	Lipídios (%)
-1	-1	S6	3,86	15,28
-1	-1	S6	3,68	14,01
-1	-1	S6	3,66	12,65
1	-1	R6	3,64	12,75
1	-1	R6	3,74	15,05
1	-1	R6	3,68	12,23
-1	1	S10	3,75	13,76
-1	1	S10	3,68	14,99
-1	1	S10	3,53	13,06
1	1	R10	3,65	14,10
1	1	R10	3,76	13,43
1	1	R10	3,86	12,54

Fonte: O próprio autor

A análise de variância (ANOVA) para os efeitos principais (arranjo e densidade de plantio) e o seu efeito de interação sobre o teor de cinzas e de lipídios são apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. A média, o desvio padrão e os efeitos estimados assim como os intervalos de confiança no nível de 95% de confiança são apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 4 – Análise de variância para os efeitos principais e de interação sobre o teor de cinzas

Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F calculado	P
Densidade (1)	0,002408	1	0,002408	0,251304	0,629659
Arranjo (2)	0,000075	1	0,000075	0,007826	0,931681
1 x 2	0,016875	1	0,016875	1,760870	0,221139
Erro	0,076667	8	0,009583		
Total	0,096025	11			

Fonte: O próprio autor

Tabela 5 – Análise de variância para os efeitos principais e de interação sobre o teor de lipídios

Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F calculado	P
Densidade (1)	1,11742	1	1,117421	0,808681	0,394772
Arranjo (2)	0,00068	1	0,000676	0,000489	0,982893
1 x 2	0,00219	1	0,002189	0,001584	0,969227
Erro	11,05426	8	1,381782		
Total	12,17455	11			

Fonte: O próprio autor

Tabela 6 – Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2² para o teor de cinzas

Fator	Efeito	Desvio padrão	t (8)	p	Limite confiança (-95%)	Limite confiança (+95%)
Média	3,707500	0,028260	131,1939	0,000000	3,642333	3,772667
Densidade	0,028333	0,056519	0,5013	0,629659	-0,102001	0,158667
Arranjo	0,005000	0,056519	-0,0885	0,931681	-0,135334	0,125334
1 x 2	0,075000	0,056519	1,3270	0,221139	-0,055334	0,205334

Fonte: O próprio autor

Tabela 7 – Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2² para o teor de lipídios

Fator	Efeito	Desvio padrão	t (8)	p	Limite confiança (-95%)	Limite confiança (+95%)
Média	13,65400	0,339335	40,23748	0,000000	12,87149	14,43651
Densidade	-0,61031	0,678671	-0,89927	0,394772	-2,17532	0,95471
Arranjo	-0,01501	0,678671	-0,02212	0,982893	-1,58003	1,55000
1 x 2	0,02701	0,678671	0,03980	0,969227	-1,53801	1,59203

Fonte: O próprio autor

De acordo com as Tabelas 4 e 5, observa-se que, para os níveis estudados de arranjo e densidade, estes fatores assim como sua interação não foram relevantes para os teores de cinzas e de lipídios pois o valor de *p* foi maior que 5%. As Tabelas 6 e 7 confirmam que os efeitos analisados não são significativos pois os seus intervalos de confiança incluem o valor zero²⁵. Isto indica que o tipo arranjo e a densidade de plantio assim como a sua interação não influenciam no teor de minerais totais e lipídios analisados. Os valores de média para o

teor de cinzas assim como os intervalos de confiança (Tabela 6) encontram-se dentro dos disponíveis na literatura²⁶⁻²⁷. O teor de lipídios encontrado (Tabela 7) é menor que 16%, estando dentro da faixa observada para *C. arabica*¹⁸.

3.2 TEOR DE MINERAIS POR EDXRF

A Tabela 8 apresenta as médias e desvios padrões correspondentes ao teor, expresso em mg kg⁻¹, dos metais identificados em cada amostra de grãos de *C. arabica* analisada. Os valores observados para os elementos analisados são semelhantes aos encontrados em café cru^{11,28}.

Tabela 8 – Teor de minerais presentes nas amostras de *C. arabica* cv. IAPAR 59.

Elemento	S6	R6	S10	R10
K	13910 ± 20	13770 ± 20	14050 ± 30	13910 ± 30
Ca	1200 ± 10	1180 ± 10	1220 ± 10	1300 ± 10
S	800 ± 10	830 ± 10	820 ± 10	830 ± 10
P	660 ± 20	680 ± 20	640 ± 20	670 ± 20
Mn	30 ± 0,0	30 ± 0,0	30 ± 0,0	30 ± 0,0
Fe	30 ± 0,0	30 ± 0,0	30 ± 0,0	30 ± 0,0
Cu	30 ± 0,0	30 ± 0,0	30 ± 0,0	30 ± 0,0

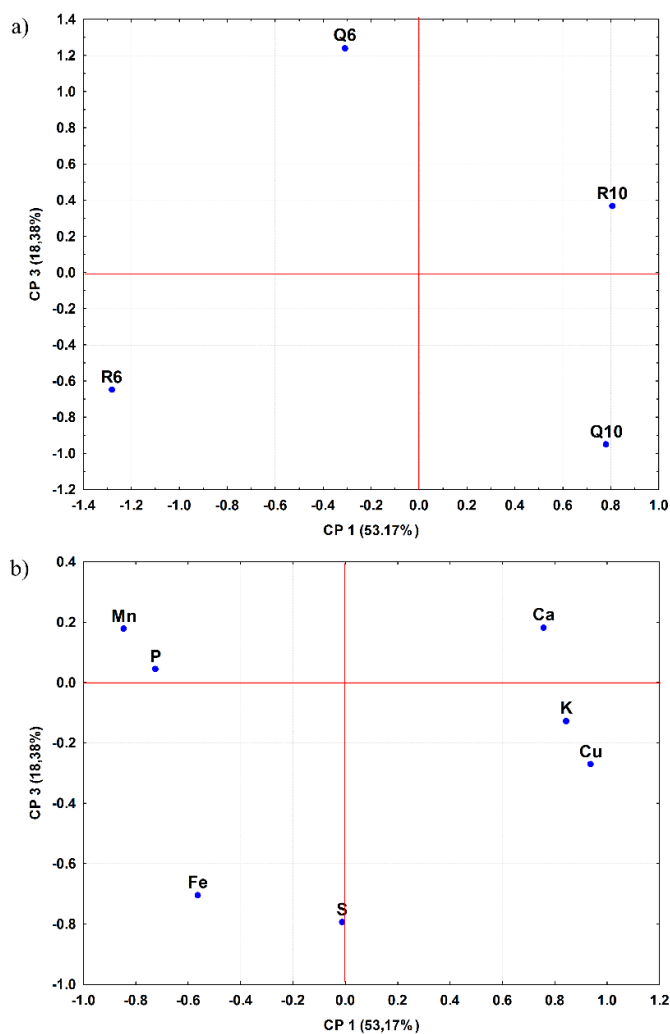
Fonte: O próprio autor

Com o objetivo de verificar se existe uma diferenciação entre os tipos de arranjos (S e R) e as densidades de plantio (6.000 e 10.000 pts ha⁻¹), os valores das áreas dos picos dos espectros obtidos (Tabela 9) foram submetidos a uma análise exploratória. As três componentes principais obtidas explicam 53,17% (CP1), 28,44% (CP2) e 18,38% (CP3) da variância total contida nos dados. A melhor discriminação dos arranjos estudados foi verificada através da projeção de CP1 e CP3. Os gráficos dos escores são apresentados na Figura 4 a) e b).

Tabela 9 – Área dos picos correspondentes aos minerais analisados.

Elemento	S6	R6	S10	R10
K	4,801	4,755	4,848	4,802
Ca	0,653	0,644	0,664	0,709
S	0,105	0,110	0,109	0,109
P	0,025	0,026	0,025	0,026
Mn	0,376	0,374	0,360	0,350
Fe	0,448	0,461	0,457	0,439
Cu	0,983	0,920	1,141	1,066

Fonte: O próprio autor

Figura 4 –Gráfico dos escores para (a) os tratamentos e para (b) os minerais

Fonte: O próprio autor

Pode se visualizar que a CP1 diferencia os tratamentos pela densidade de plantio. Os arranjos mais densos (10.000 pts ha⁻¹) encontram-se nos escores positivos da CP1 apresentando maior quantidade de Cu, K e Ca. Os arranjos menos densos (6.000 pts ha⁻¹) se caracterizam por ter maiores teores de Mn e P. O tratamento R6 (escores negativos de CP1 e CP3) se caracterizou por um maior teor de Fe e S quando comparado com os outros três tratamentos. A Tabela 10 mostra os autovetores (pesos, *loadings* ou coeficientes das Componentes Principais) para cada mineral analisado. Os maiores pesos correspondem aos valores destacados em negrito.

Tabela 10 – Pesos (*loadings*) de cada mineral analisado nas CP's

Mineral	CP1	CP2	CP3
K	0,845	0,519	-0,128
Ca	0,758	-0,626	0,181
S	-0,011	-0,606	-0,795
P	-0,724	-0,689	0,04
Mn	-0,844	0,506	0,177
Fe	-0,563	0,431	-0,705
Cu	0,938	0,214	-0,273

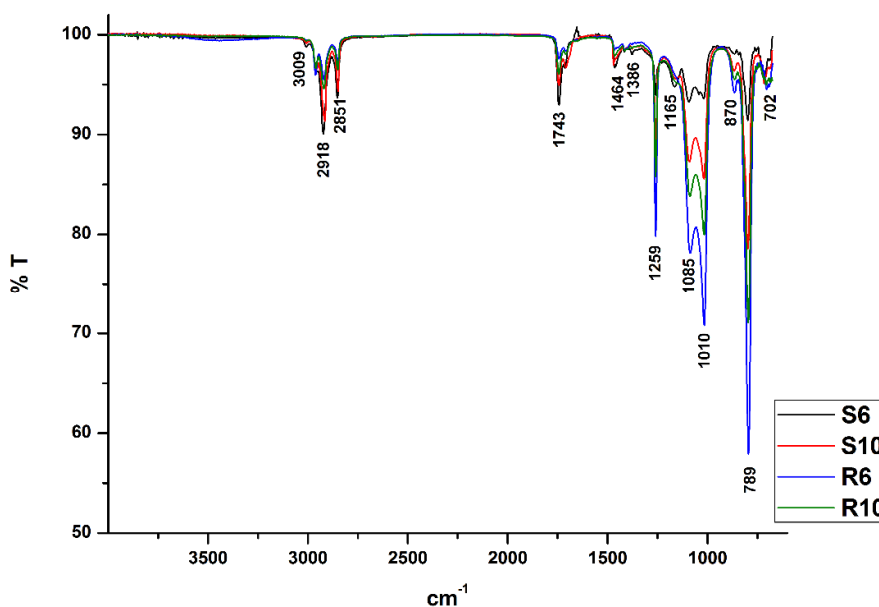
Fonte: O próprio autor

3.3 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DOS EXTRATOS LIPÍDICOS

Os espectros na região do Infravermelho médio dos extratos lipídicos dos quatro arranjos estudados apresentam perfis semelhantes (Figura 5). A 3009 cm⁻¹ observa-se uma banda que pode ser atribuída às vibrações de estiramento do grupo C=C-H²⁹, indicando presença de insaturações na cadeia dos lipídios. As bandas em 2918 e 2861 cm⁻¹ correspondem às vibrações de estiramento simétrico e assimétrico respectivamente da ligação

entre Csp^3 e H do grupo metila (CH_3). O grupo metileno (CH_2) apresenta as mesmas bandas, porém relacionadas a estiramento assimétrico (2918 cm^{-1}) e simétrico (2861 cm^{-1})³⁰.

Figura 5 – Espectros no Infravermelho dos extratos lipídicos de grãos crus de *C. arabica* cv. IAPAR 59.



Fonte: O próprio autor

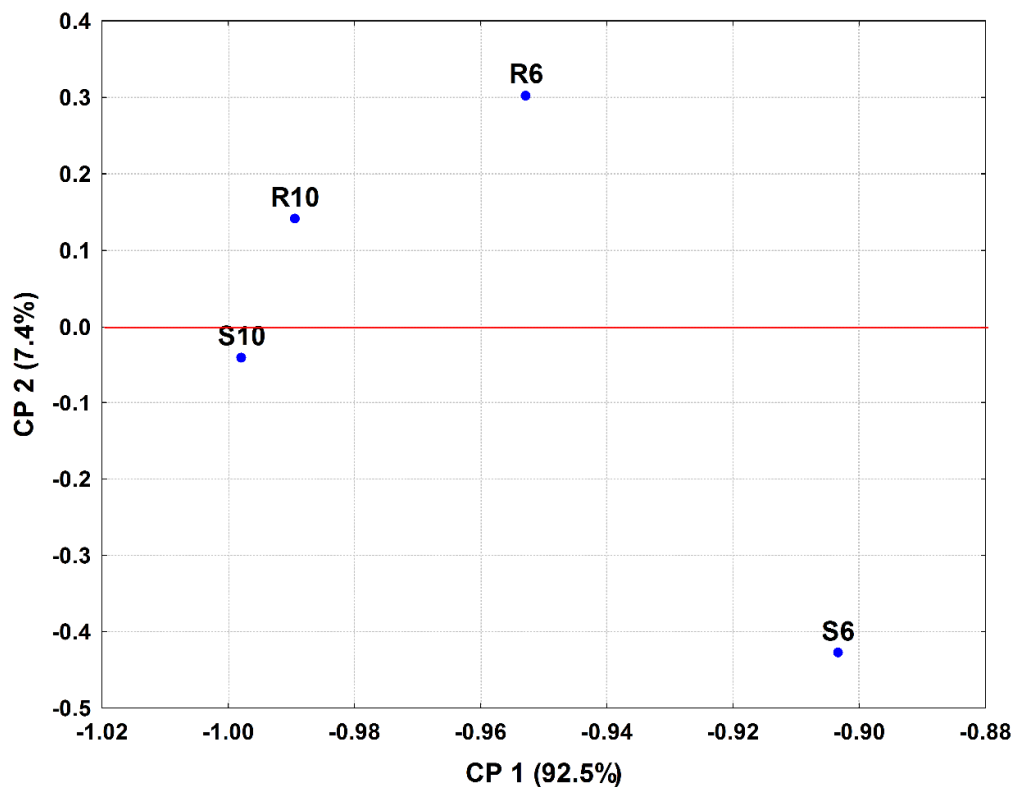
A banda em 1743 cm^{-1} caracteriza o estiramento da ligação do grupo carbonila presente em triacilgliceróis³¹. A banda em 1386 cm^{-1} é atribuída à deformação angular simétrica da ligação C-H de um grupo CH_3 terminal enquanto que a banda a 1464 cm^{-1} corresponde à deformação angular de grupos metileno³⁰. Estes grupos estão presentes nos ácidos graxos estudados em café³².

A região de 1259 a 1165 cm^{-1} pode ser atribuída a estiramento da ligação C-O de ésteres metílicos. As deformações fora do plano *wagging* e *twisting* de grupos metilenos aparecem nas regiões de 1380 a 1180 cm^{-1} e 1300 a 1170 cm^{-1} . A região entre 1150 e 870 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação simples C-C e à vibração *rocking* do grupo

metila³¹. Entre 720 e 810 cm^{-1} encontra-se a região das frequências referentes à deformação no plano (*rocking*) de grupos CH_2 de parafinas³¹.

Os dados dos espectros na região do infravermelho dos extratos lipídicos dos tratamentos S6, S10, R6 e R10 foram submetidos à análise de componentes principais (ACP). A matriz foi composta por 4 amostras (extratos) e 1678 variáveis. As duas primeiras componentes principais explicam 99,9% da variância total dos dados. No gráfico dos escores das CP1 e CP2 (Figura 6) se observam dois grupos separados pela CP2. Nos escores positivos da CP2 se agruparam os extratos dos arranjos retangulares. Os extratos obtidos dos arranjos quadrados ficaram agrupados nos valores negativos desta componente.

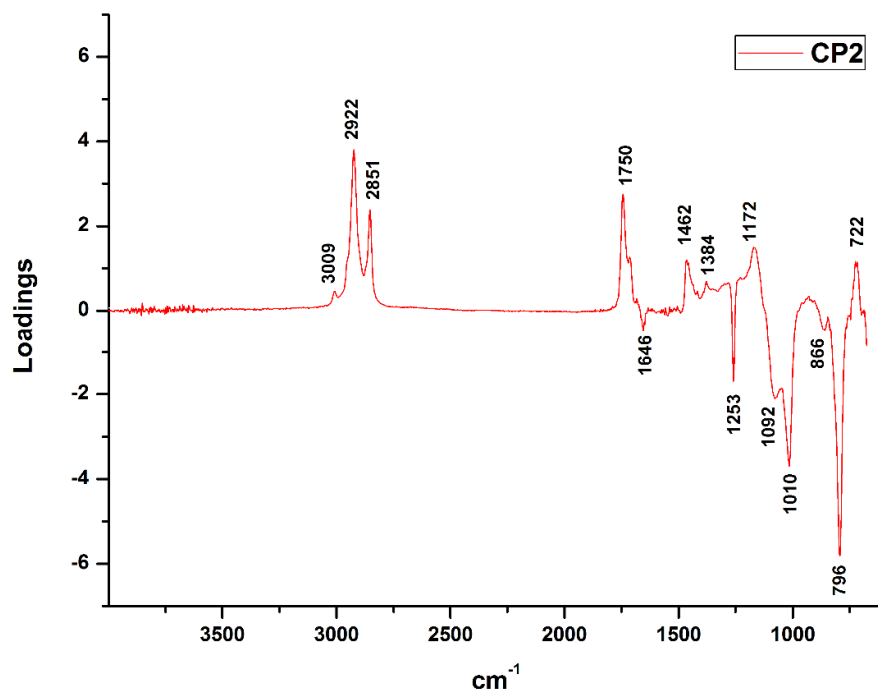
Figura 6 - Gráfico dos escores das CP1 e CP2 dos dados espectroscópicos na região do Infravermelho dos extratos lipídicos de grãos crus de *C. arabica* cv. IAPAR 59.



Fonte: O próprio autor

A Figura 7 mostra o gráfico dos *loadings* da CP2 que permite distinguir os grupos formados devido às regiões dos espectros na região do infravermelho. Os extratos lipídicos dos arranjos retangulares sofrem maior influência de grupos funcionais com valores de transmitância que apresentam *loadings* positivos em 3009, 2922, 2851, 1750, 1462, 1384, 1172 e 722 cm^{-1} . As amostras dos arranjos quadrados possuem valores de escores negativos, sofrendo maior influência de grupos funcionais com valores de transmitância que apresentam *loadings* negativos em 1646, 1253, 1092, 1010, 866 e 796 cm^{-1} .

Figura 7 - Gráfico dos *loadings* da CP2 para os dados espectroscópicos na região do Infravermelho dos dos extratos lipídicos de grãos crus de *C. arabica* cv. IAPAR 59.



Fonte: O próprio autor

A Tabela 11 mostra a atribuição destas bandas aos grupos presentes em moléculas presentes nos extratos lipídicos^{30-31,33-35}

Tabela 11 – Atribuição das bandas identificadas no gráfico dos *loadings* da CP2

Arranjo	Banda (cm ⁻¹)	Grupo	Vibração
Retangular	3009	C=C-H	Estiramento C-H
Retangular	1462	CH ₂ /CH ₃	Flexão angular simétrica C-H
Retangular	1384	CH ₃ terminal	Flexão simétrica C-H
Retangular	1172	CO-O-C (Triacilgliceróis)	Estiramento simétrico C-O
Retangular	722	(CH ₂) _n , n ≥ 4	Deformação (<i>rocking</i>) C-H
Quadrado	1646	C=O amida	Estiramento C=O
Quadrado	1253 (1261-1250)	CH ₂	Deformação (<i>rocking</i>) ou flexão (<i>wagging</i>) C-H
Quadrado	1092	N-C alifático	Estiramento
Quadrado	1010	N-C alifático	Estiramento
Quadrado	866	Anel benzênico com 2 H adjacentes	Estiramento
Quadrado	796 (720-810)	CH ₂	Deformação (<i>rocking</i>) C-H

Fonte: O próprio autor

A análise da Tabela 11 mostra as diferenças entre os dois tipos de arranjos. A primeira destas diferenças é a banda em 3009 cm⁻¹ (estiramento do grupo C=C-H) que poderia indicar que os arranjos retangulares contêm mais ácidos graxos insaturados que os quadrados. Nos arranjos quadrados, a banda em 1646 cm⁻¹ pode ser atribuída ao grupo amida da cafeína. Este composto bioativo do café foi identificado em extratos obtidos com misturas contendo hexano³⁶. A região entre 1020 e 1220 cm⁻¹ (arranjos quadrados) corresponde ao estiramento da ligação N-C alifático³³, grupo presente na molécula de cafeína. Estudos realizados em folhas de café têm mostrado que a influência da radiação solar aumenta o conteúdo de cafeína. Nos arranjos quadrados, a incidência da radiação é mais uniforme que nos

retangulares (Figura 1) o que poderia indicar um maior teor deste composto nesses arranjos. A banda em 866 cm^{-1} está compreendida na região do anel benzênico, contendo dois H adjacentes e corresponde à deformação da ligação C-H³⁷. De acordo com os dados fornecidos pelo gráfico dos *loadings* pode afirmar que os arranjos quadrados se caracterizam por um maior de cafeína enquanto que os arranjos retangulares apresentam ácidos graxos insaturados.

CONCLUSÃO

Os teores de umidade, cinzas e lipídios das amostras de grãos crus dos quatro tratamentos analisados apresentaram valores de acordo com os disponíveis na literatura. A análise de variância (ANOVA) para os efeitos principais (arranjo e densidade de plantio) e o seu efeito de interação não influenciaram sobre os teores de cinzas (minerais totais) e de lipídios no nível de 95% de confiança.

No entanto os minerais identificados (K, Ca, S, P, Mn, Fe e Cu) e quantificados por EDXRF diferenciaram os tratamentos pela densidade de plantio através da análise das componentes principais. Os tratamentos menos densos (S6 e R6) se caracterizaram por um maior conteúdo de Mn e P enquanto que os de maior densidade (S10 e R10) apresentaram maior teor de Cu, K e Ca. O tratamento R6 se diferenciou dos outros três por apresentar maior teor de Fe e S.

O estudo exploratório dos extratos lipídicos na região do infravermelho indicou que os arranjos quadrados poderiam ser caracterizados por uma maior quantidade de cafeína enquanto que nos retangulares se evidencia a presença de ácidos graxos insaturados.

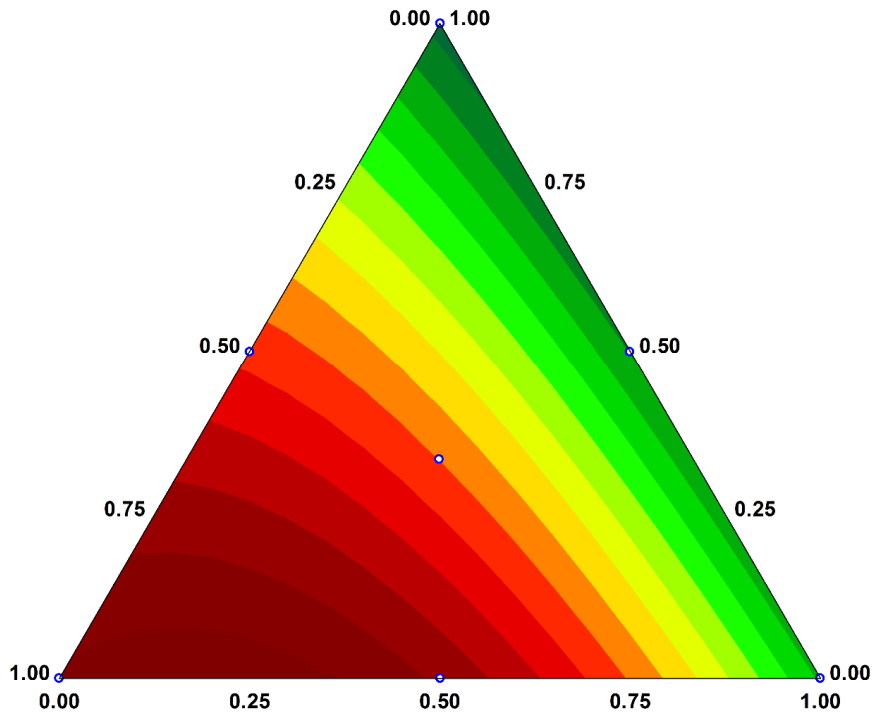
REFERÊNCIAS

- ¹ MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa 8/2003**. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=550412066>>. Acesso em 15 agosto 2016.
- ² PEREIRA, C. E.; VON PINHO, E. V. R.; OLIVEIRA, D. F.; KIKUTI, A. L. P. D. Determinação de inibidores da germinação no espermoderma de sementes de café (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, p. 306-311, 2002.
- ³ BORÉM, F. M.; OLIVEIRA, P. D.; ISQUIERDO, E. P. et al. Scanning electron microscopy of coffee beans subject to different forms processing and drying. **Coffee Sci.**, Lavras, v. 8, p. 218-225, 2013.
- ⁴ SILVA, J. S.; RUFATO, S. Determinação da umidade do café. In: **Secagem e armazenagem do café – Tecnologias e custos. Cap. 5**.
- ⁵ REH, C. T.; GERBER, A.; PRODOLLIET, J.; VUATAZ, G. Moisture determination in green coffee –Method comparison to study specificity and accuracy. **Food Chem.**, v. 96, p. 423–430, 2006.
- ⁶ ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução 12/78**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/12_78_cafe_cru.htm>. Acesso em 17 Abril 2016.
- ⁷ LIMA, D. R. **Café e composição química**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publicue/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=161&sid=81>>. Acesso em 11 Fevereiro 2013.
- ⁸ NASCIMENTO, P. M. **Estudo da composição química, atividade antioxidante e potencial odorífico de um café conillon, em diferentes graus de torrefação e análise comparativa com café arábica**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.
- ⁹ GOGOASA, I.; PIRVU, A.; ALDA, L. M. et al. The mineral content of different coffee brands. **J. H. F. B.**, v. 17, p. 68-71, 2013.
- ¹⁰ FARAH, A. Coffee constituents. In: CHU, YI-FANG. **Coffee: Emerging health effects and disease prevention**. First Edition. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2012.
- ¹¹ MORGANO, M. A.; PAULUCI, L. F.; MANTOVANI, D. M. B.; MORY, E. E. B. Determinação de minerais em café cru. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 22, p. 19-23, 2002.
- ¹² FERNANDES, A. P. et al. Pattern recognition applied to mineral characterization of Brazilian coffees and sugar-cane spirits. **Spectrochim. Acta B**, v. 60, p. 717-724, 2005.
- ¹³ NASCIMENTO, P. M. **Estudo da composição química, atividade antioxidante e potencial odorífico de um café conillon, em diferentes graus de torrefação e análise**

- comparativa com café arábica.** 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.
- ¹⁴ OLESZCZUK, N. et al. Method development for the determination of manganese, cobalt and copper in green coffee comparing direct solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta**, v. 73, p. 862–869, 2007.
- ¹⁵ POHL, P.; STELMACH, E.; WELNA, M.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A. Determination of the elemental composition of coffee using instrumental methods. **Food Anal. Methods**, v. 6, p. 598–613, 2013.
- ¹⁶ WILLARD, H. H. et al. **Métodos Instrumentales de Análisis**. 2a. ed. México: CECSA. 1986.
- ¹⁷ ORLIĆ, I.; MAKJANIĆ, J.; VALKOVIĆ, V. Optimization of XFRS for the analysis of toxic elements and heavy metals in coffee products. **J. Radioanal. Nucl. Ch.**, v. 102, p. 203-210, 1986.
- ¹⁸ LAGO, R. C. A. Lipídios em grãos de café. **B. CEPPA**. v. 19, p. 319-340, 2001.
- ¹⁹ SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Braz. J. Plant. Physiol.** v. 18, p. 201-216, 2006.
- ²⁰ SPEER, K.; KURZROCK, T.; KÖLLING-SPEER, I. Effects of controlled storage on the lipid fraction of green Arabica coffee beans. **In: 20th International Scientific Colloquium on Coffee**, Bangalore 2004, p. 161-68, ASIC Paris.
- ²¹ BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Quim. Nova**, v. 32, p. 849-854, 2009.
- ²² PETERSON, D. M.; EMMONS, C. L.; HIBBS, A. H. Phenolic Antioxidants and antioxidant activity in pearling fractions of oat groats. **J. Cereal Sci.**, v. 33, p. 97-103, 2001.
- ²³ ABIC. **Instrução Normativa 16/2010**. Disponível em: <<http://pt.slideshare.net/cafeicultura/guia-prtico-abic-para-caf-torrado-e-moido-atendendo-in-162010>>. Acesso em 8 Junho 2016.
- ²⁴ INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 1. ed. digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.
- ²⁵ NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria** 4. ed. Porto Alegre: Bookman. 2010. 414 p.
- ²⁶ LAGO, R. C. A.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. C. **Composição centesimal e de aminoácidos de café verde, torrado e de borra de café solúvel**. Trabalho apresentado no II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. 2001. Vitória, ES.

- ²⁷ LIMA, D. R. **Café e composição química**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=161&sid=81>>. Acesso em 11 Fevereiro 2013.
- ²⁸ DEBASTIANI, R. **Análise elementar do café através da técnica PIXE**. 2009. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Física). Universidade Federal de Rio Grande do Sul, porto Alegre, 2008.
- ²⁹ SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuables plant substances by IR and Raman spectroscopy. **Vib. Spectrosc.**, v. 43, p. 13-25, 2007.
- ³⁰ PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction of Spectroscopy: A guide for students of organic chemistry**. 2. ed.. Orlando, USA: Saunders College Publishing. 1996, 511 p.
- ³¹ CHAPMAN, D. Infrared spectroscopy of lipids. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 42, p. 353-371, 1965
- ³² NIKOLOVA-DAMYANOVA, B.; VELIKOVA, R.; JHAM, G. N. Lipid classes, fatty acid composition and triacylglycerol molecular species in crude coffee beans harvested in Brazil. **Food Res. Int.** v. 31, p. 479-486, 2004.
- ³³ STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. Chichester: John Wiley & Sons. 2004. 224 p
- ³⁴ PARADKAR, M. M.; IRUDAYARAJ, J. A rapid FTIR spectroscopic method for estimation of caffeine in soft drinks and total methylxanthines in tea and coffee. **J. Food Sci.**, v. 67, p. 2507-2511, 2006.
- ³⁵ MURUGANATHAM, S.; ANBALAGAN, G.; RAMAMURTHY, N. FTIR and SEM-EDS comparative analysis of medicinal plants, *Eclipta alba* Hassk and *Eclipta prostrata* Linn. **Romanian J. Biophys.**, v. 19, p. 285-294, 2009.
- ³⁶ MOREIRA, I.; SCHEEL, G. L.; HATUMURA, P. H.; SCARMINIO, I. S. Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em *Coffea arabica*. **Quim. Nova**, v. 37, p. 39-43, 2014.
- ³⁷ MISTRY, B. D. **Handbook of Spectroscopy Data: Chemistry- UV, IR, PMR, CNMR and Mass Spectroscopy**. Jaipur, India: Oxford Book Company. 2009, 242 p.

CAPÍTULO 4



Planejamento experimental de misturas

1 INTRODUÇÃO

Durante a preparação da amostra, o processo de extração é uma etapa chave por ajudar a extrair os metabólitos da matriz vegetal que é extremamente complexa. A extração por solvente é o procedimento mais utilizado pela facilidade de execução, eficiência e aplicabilidade abrangente¹. Entre os fatores que afetam a extração por solvente cabe destacar a temperatura, a relação volume de solvente/massa de amostra, tempo e tamanho de partícula da amostra².

Como os compostos bioativos do café possuem diferentes polaridades, é conveniente fazer a escolha dos solventes para a extração baseada nesta propriedade. Compostos fenólicos como os ácidos clorogênicos (ACG) se dissolvem bem em álcoois de baixo peso molecular, acetona e acetato de etila³⁻⁴ devido à formação de ligações H com estes solventes. Etanol puro tem mostrado ser eficiente na extração de ACG e trigonelina. Sua mistura com acetato de etila e diclorometano resultou também eficiente para ACG, e suas misturas binárias com diclorometano e com hexano, para trigonelina⁵. Diclorometano é o solvente por excelência para a extração de cafeína⁶, além da sua mistura 1:1 com hexano⁵. Em relação aos lipídios do café, hexano é um dos solventes mais utilizados na área de alimentos devido a sua baixa polaridade⁷.

Para este estudo foram escolhidos os solventes etanol, acetona, diclorometano e hexano. A eficiência destes solventes e suas misturas na extração de metabólitos do café cru já foram estudados por outros autores^{5,8-9}. A escolha do solvente extrator pode ser feita utilizando um planejamento experimental adequado¹⁰.

Em experimentos onde se utilizam misturas de solventes, as variáveis são as proporções dos diferentes componentes. Desta maneira, assume-se que a resposta medida é dependente apenas das proporções relativas dos componentes da mistura e não da quantidade total da mistura. A Equação 1 mostra a relação entre as proporções x_i para uma mistura

qualquer de q componentes. Os graus de liberdade são iguais a $q-1$, pois a proporção do último componente é o que falta para completar 100%¹¹.

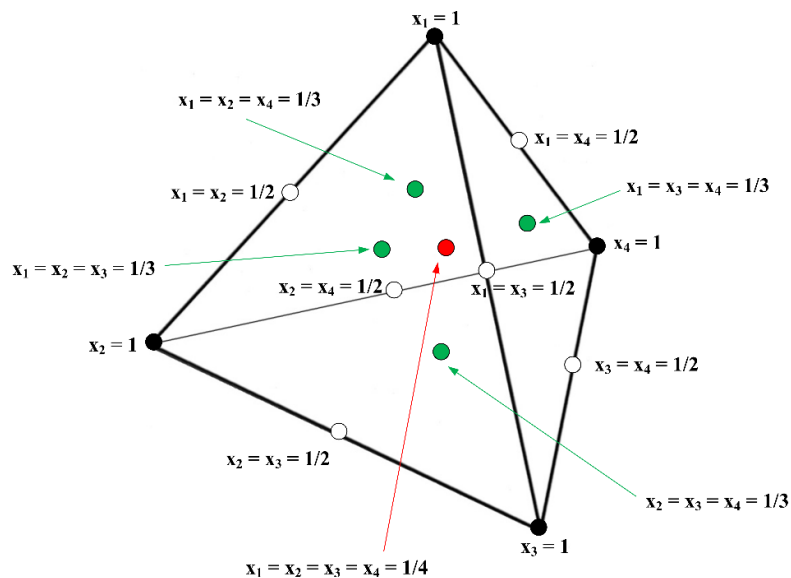
$$\sum_{i=1}^q x_i = 1 \quad \text{ou } 100\% \quad (1)$$

Para prever os rendimentos de extrações com misturas de quatro solventes, os modelos canônicos linear, quadrático e cúbico especial podem ser utilizados na otimização. O modelo geral para quatro componentes é definido pela Equação 2, onde \hat{y} é a resposta estimada e b são os parâmetros do modelo de regressão. O modelo linear inclui apenas o primeiro termo; o quadrático é formado por o primeiro e o segundo termos e, o cúbico especial, pelos três primeiros termos¹¹.

$$\hat{y} = \sum_{i=1}^4 b_i x_i + \sum_{i<j}^4 \sum_j^4 b_{ij} x_i x_j + \sum_{i<j}^4 \sum_{j<k}^4 \sum_k^4 b_{ijk} x_i x_j x_k + b_{1234} x_1 x_2 x_3 x_4 \quad (2)$$

O quarto termo da Equação 2 é um termo de quarta ordem. Para que este seja considerado é necessário incluir um ensaio que contenha a mistura dos quatro solventes, denominado ponto central. Neste caso, cada solvente contribui com $\frac{1}{4}$ do volume total do volume da mistura extratora. Desta maneira, o planejamento experimental é representado por um tetraedro (Figura 1).

Figura 1 – Planejamento experimental simplex centroide para quatro solventes



Fonte: O próprio autor

A Equação 2 pode ser representada na forma matricial, sendo $\hat{\mathbf{y}}$ o vetor coluna dos valores previstos pelo modelo, \mathbf{X} a matriz contendo os pontos do planejamento e \mathbf{b} , o vetor coluna dos estimadores dos parâmetros¹² (Equação 3).

$$\hat{\mathbf{y}} = \mathbf{X}\mathbf{b} \quad (3)$$

O vetor \mathbf{b} , constituído pelas estimativas dos parâmetros b da Equação 2, pode ser calculado pela Equação 4 e as incertezas (desvios padrões) das estimativas dos parâmetros ($\mathbf{V}(\mathbf{b})$), pela Equação 5.

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^t\mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^t \mathbf{y} \quad (4)$$

$$\mathbf{V}(\mathbf{b}) = (\mathbf{X}^t\mathbf{X})^{-1} \sigma^2 \quad (5)$$

O sinal dos parâmetros b , nos termos de interação, é muito importante para determinar se o efeito da interação entre os solventes que compõem a mistura é sinérgico ou antagônico. Se o $b > 0$, então a resposta obtida com os dois componentes misturados é sempre maior que a simples soma das respostas dos solventes puros (sinergismo). Caso $b < 0$, as previsões do modelo quadrático são sempre inferiores às do modelo linear, pois neste o termo de interação se encontra ausente¹¹.

Para escolher o modelo adequado que se ajusta aos resultados experimentais, ele deve possuir significância estatística. A avaliação do modelo e dos resíduos (diferença entre a resposta prevista pelo modelo e os valores experimentais) se faz através da análise de variância (ANOVA). O método utilizado é o dos mínimos quadrados. A Tabela 1 mostra os parâmetros utilizados na ANOVA onde n_i é o número de repetições no nível i ; m é o número de níveis distintos da variável independente; $n = \sum n_i$ ou número total de observações e p é o número de parâmetros do modelo. Os parâmetros da Tabela 1 serão aplicados e explicados na apresentação dos resultados deste capítulo.

O objetivo do presente capítulo foi identificar o melhor solvente extrator dos metabólitos presentes em grãos crus de *C. arabica* em relação ao rendimento do extrato obtido, utilizando planejamento experimental simplex centroide e superfície de resposta.

Tabela 1 – Tabela de análise de variância para o ajuste do modelo¹¹

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p - 1}$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n - p}$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^n (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m - p}$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n - m}$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	
% de variação explicada: $\frac{SQ_R}{SQ_T}$			
% máxima de variação explicável: $\frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T}$			

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

A escolha da melhor condição experimental para a obtenção dos extratos foi feita através de um planejamento experimental simplex centroide, de acordo com a Tabela 2, sendo *e* =etanol (Exodo), *a* = acetona (Fmaia), *d*= diclorometano (Anidrol) e *h* = hexano (Anidrol). Além dos solventes puros, foram utilizadas 6 misturas binárias, 4 misturas ternárias e o ponto central (mistura dos 4 solventes) foi realizado em 6 replicatas para estimar o erro padrão¹⁰.

Tabela 2 – Planejamento experimental Simplex Centroide para quatro componentes: etanol (*e*), acetona (*a*), diclorometano (*d*) e hexano (*h*)

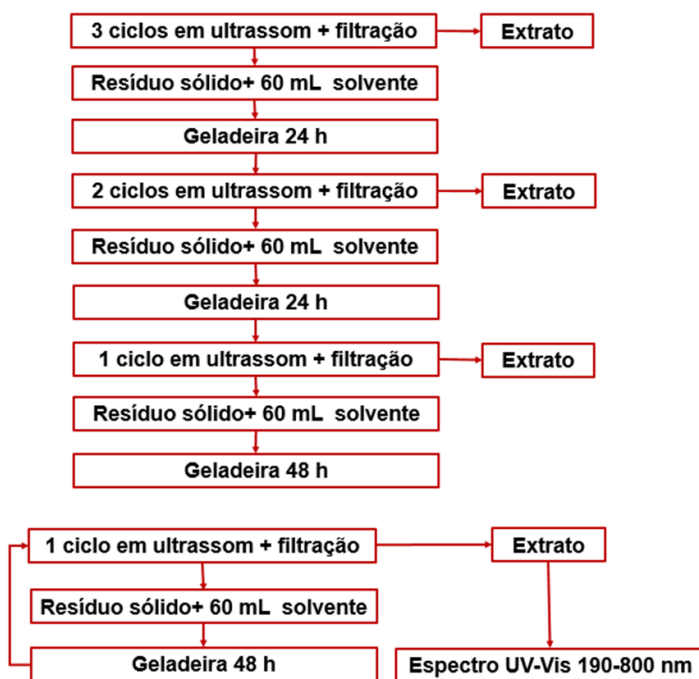
Extrato	Solventes			
	Etanol (<i>e</i>)	Acetona (<i>a</i>)	Diclorometano (<i>d</i>)	Hexano (<i>h</i>)
<i>e</i>	1	0	0	0
<i>a</i>	0	1	0	0
<i>d</i>	0	0	1	0
<i>h</i>	0	0	0	1
<i>ea</i>	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0	0
<i>ed</i>	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$	0
<i>eh</i>	$\frac{1}{2}$	0	0	$\frac{1}{2}$
<i>da</i>	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0
<i>ah</i>	0	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$
<i>dh</i>	0	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
<i>dea</i>	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	0
<i>deh</i>	$\frac{1}{3}$	0	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$
<i>eah</i>	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	0	$\frac{1}{3}$
<i>dah</i>	0	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$
<i>deah1</i>	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$
<i>deah2</i>	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$
<i>deah3</i>	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$
<i>deah4</i>	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$
<i>deah5</i>	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$
<i>deah6</i>	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$

Fonte: O próprio autor

Para a extração pesou-se 2,50 g dos grãos crus moídos em balança Shimadzu AY220 e adicionaram-se 60 mL do solvente extrator, em frasco de 150 mL com tampa. A mistura foi submetida a banho de ultrassom Ultracleaner 1400 Unique por 120 minutos. A temperatura foi mantida a $15 \pm 2^\circ\text{C}$ com gelo. Este procedimento se faz necessário pois a temperatura do banho aumenta durante o processo de ultrassonicação. Desta maneira se evita a perda do solvente por evaporação e a oxidação dos compostos fenólicos¹. A Figura 2 mostra o esquema da extração. Durante os três primeiros dias foram realizados três, dois e um ciclos de extração, respectivamente. Os extratos foram mantidos em geladeira (4°C) durante

24 h com o objetivo de estabelecer o equilíbrio entre a solução extratora e o sólido. Após os três primeiros dias de extração, o extrato foi mantido em geladeira por 48 horas. A partir desse momento, realizou-se um ciclo de extração a cada 48 h. A extração foi considerada exaustiva quando houve sobreposição entre os espectros UV-Visível de dois extratos consecutivos. O espectrofotômetro utilizado foi o Thermo Scientific Evolution 60 com cubetas de quartzo. A Tabela 3 mostra o número de ciclos de extração utilizados para cada solvente extrator.

Figura 2 – Esquema de extração



Fonte: O próprio autor

Tabela 3 – Número de ciclos necessários para extração exaustiva

Extrato	Número de ciclos			
	S6	S10	R6	R10
<i>e</i>	13	13	13	13
<i>a</i>	10	9	10	10
<i>d</i>	15	15	16	15
<i>h</i>	25	21	24	20
<i>ea</i>	23	23	11	23
<i>ed</i>	10	16	16	12
<i>eh</i>	17	17	17	10
<i>ad</i>	10	10	10	10
<i>ah</i>	14	8	11	10
<i>dh</i>	11	11	11	11
<i>dea</i>	8	8	8	8
<i>deh</i>	11	10	11	10
<i>eah</i>	18	13	18	15
<i>dah</i>	8	8	8	8
<i>deah1</i>	9	9	9	9
<i>deah2</i>	8	8	8	8
<i>deah3</i>	8	9	8	10
<i>deah4</i>	11	13	15	11
<i>deah5</i>	13	15	14	10
<i>deah6</i>	12	9	12	8

Fonte: O próprio autor

A evaporação do solvente dos extratos foi realizada em rotaevaporador Fisatom 801, mantendo-se a temperatura do banho em 50 ± 2 °C e a rotação em 42 ± 2 rpm. Após a evaporação de cerca de 90% do líquido, a mistura foi transferida para frasco âmbar de 30 mL com tampa, previamente tarado. A eliminação do restante do solvente foi realizada sob circulação forçada de ar, protegendo a boca do recipiente com véu. Uma vez secos, os extratos foram conservados em *freezer* Electrolux Super FE26 até o momento de serem liofilizados.

Para a liofilização, foi acrescentado 1 mL de água MiliQ a cada extrato seco. A suspensão do material efetuou-se em banho de ultrassom Ultracleaner 1400 Unique, por 30 minutos e o congelamento, em *freezer* Electrolux Super FE26, a -20 °C. A liofilização foi realizada em liofilizador Virtis SP Scientific, a $-81,5 \pm 0,1$ °C e 20 ± 2 mTorr, até obtenção de massa constante. Nestas condições foi calculado o rendimento da extração para cada solvente, expressando os resultados em base seca (b.s.).

$$\% \text{ rendimento b.u.} = \frac{\text{massa final}}{\text{massa inicial}} \times 100$$

$$\% \text{ rendimento b.s.} = \frac{\% \text{ rendimento b.u.}}{(100 - \% \text{ umidade})} \times 100$$

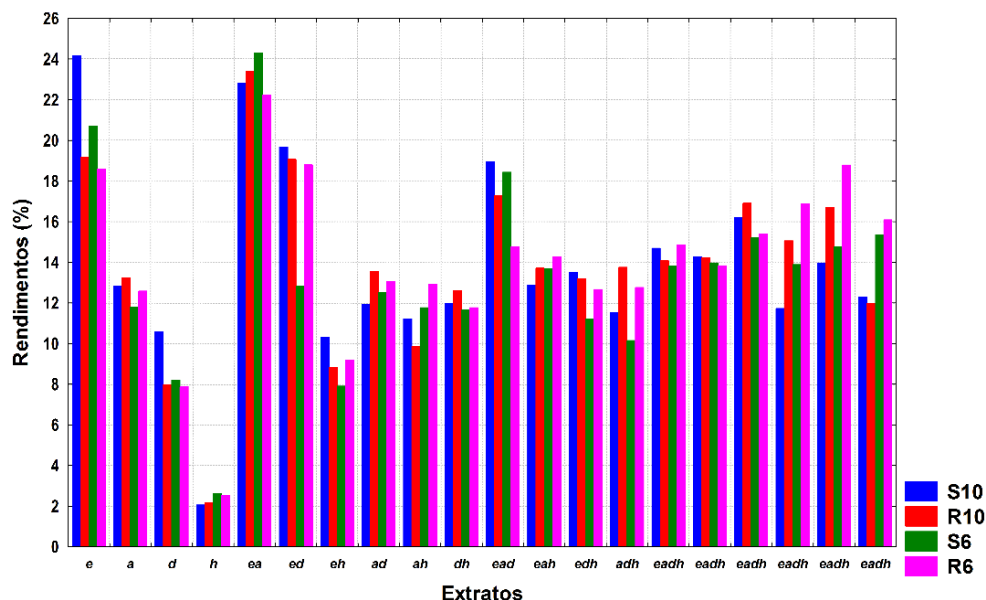
2.2 PROCESSAMENTO DOS DADOS

O programa computacional Statistica 7.0 foi utilizado para obter as curvas de nível para a escolha do melhor solvente extrator. A escolha e validação dos modelos foram definidas pelos resultados da análise de variância (ANOVA) das regressões, verificando a existência ou não de falta de ajuste e significância da regressão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento dos extratos brutos das amostras S10, S6, R10 e R6, obtidos de acordo com o planejamento experimental simplex centroide (Tabela 2), são mostrados na Figura 3.

Figura 3 – Rendimento dos extratos brutos de grãos crus de *Coffea arabica* cv. IAPAR 59



Fonte: O próprio autor

Para avaliar o efeito do solvente extrator sobre os rendimentos obtidos, foram testados modelos de misturas para verificar qual o que se ajusta para explicar as repostas obtidas. O modelo linear apresentou falta de ajuste em todos os tratamentos estudados neste trabalho. Foi testado então o modelo quadrático. Para os tratamentos S10 e S6 foram considerados os coeficientes significativos no nível de 95% de confiança. No caso dos tratamentos R10 e R6, os modelos foram ajustados eliminando-se as interações cujos coeficientes não foram significativos no nível de 95% de confiança. O modelo cúbico também foi testado e ajustou-se aos rendimentos dos quatro tratamentos, porém não apresentou termos cúbicos significativos no nível de 95% de confiança. Desta maneira, o modelo quadrático foi aceito por ser o mais simples. A Tabela 4 mostra as equações polinomiais do modelo quadrático para cada tratamento. A resposta prevista pelo modelo é representada por \hat{y} e as variáveis independentes são identificadas por e = etanol, a = acetona, d = diclorometano e h = hexano. Os valores entre parênteses representam os desvios padrões dos parâmetros.

Tabela 4 – Equações do modelo quadrático para cada tratamento

Tratamento	Equação ajustada do modelo quadrático
S ₆	$\hat{y} = +20.58e + 11.99a + 8.22d + 2.84h + 32.07ea - 15.90eh + 12.11ah + 22.15dh$ (±1.11) (±1,11) (±1,11) (±1,11) (±4.96) (±4.95) (±4.95) (±4.96)
S ₁₀	$\hat{y} = + 24,56e + 13,23a + 10,88d - 17,63eh + 17,96dh$ (±1,46) (±1,46) (±1,46) (±6,14) (±6,14)
R ₆	$\hat{y} = +18.16e + 13,40a + 8.70d + 20.47ea + 16,03ed + 20.36ah + 25.00dh$ (±1.59) (±1.59) (±1.59) (±7.31) (±7.31) (±7.31) (±7.31)
R ₁₀	$\hat{y} = +19.47e + 14,88a + 8.93d + 22.15ea + 15,19ed + 27.84dh$ (±1.60) (±1.33) (±1.47) (±6,79) (±6,77) (±6,78)

Fonte: O próprio autor

Os solventes puros etanol, acetona e diclorometano apresentaram coeficientes significativos no nível de 95% de confiança para os quatro tratamentos, sendo o etanol o que apresentou os maiores coeficientes dos três solventes mencionados. O hexano apenas foi significativo para o tratamento S₆. A mistura diclorometano: hexano apresentou efeito sinérgico nos quatro tratamentos entanto que a mistura etanol: acetona mostrou mesmo efeito nos tratamentos S₆, R₆ e R₁₀, apresentando os maiores coeficientes. Isto indica que a presença simultânea destes dois solventes na mistura consegue extrair uma maior quantidade de compostos com característica polar.

A mistura etanol: diclorometano apresentou um aumento de rendimento apenas nos arranjos retangulares (R₆ e R₁₀). Para os arranjos quadrados (S₆ e S₁₀), a mistura de hexano com etanol apresentou efeito antagônico (coeficiente negativo), contribuindo para a diminuição do rendimento entanto que a mistura hexano: acetona mostrou efeito sinérgico nos tratamentos de baixa densidade de plantio (S₆ e R₆).

A análise de variância foi utilizada para verificar a significância a e a falta de ajuste do modelo quadrático (Tabela 5). A razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro (MQ_{faj}/MQ_{ep}) se mostrou menor que o F tabelado no nível de 95% de

confiança. Isto mostra que não há falta de ajuste do modelo quadrático para todos os tratamentos. A razão entre as médias quadráticas da regressão e dos resíduos (MQ_R/MQ_r) resultou maior que o valor do F tabelado no nível de 95% de confiança, indicando que o modelo quadrático foi significativo para todos os tratamentos.

Tabela 5 – Análise de variância para o ajuste dos modelos quadráticos dos tratamentos

Fonte de variação	Soma quadrática	g. l.	Média quadrática	Valor de F calculado	Valor de F tabelado	P
S6						
Regressão	391,62	9	43,51	34,01	3,02	0,000002
Resíduos	12,79	10	1,28			
Falta de ajuste	10,40	5	2,08	4,34	5,05	0,066635
Erro Puro	2,40	5	0,48			
Total	404,41	19	21,28			
S10						
Regressão	421,94	9	46,88	21,37	3,02	0,000022
Resíduos	21,94	10	2,19			
Falta de ajuste	8,47	5	1,69	0,63	5,05	0,688521
Erro Puro	13,47	5	2,69			
Total	443,88	19	23,36			
R6						
Regressão	317,96	7	45,42	14,60	2,91	0,000053
Resíduos	37,32	12	3,11			
Falta de ajuste	22,53	7	3,22	1,09	4,88	0,479884
Erro Puro	14,79	5	2,96			
Total	355,28	19	18,70			
R10						
Regressão	363,59	7	51,94	19,40	2,91	0,000012
Resíduos	32,13	12	2,68			
Falta de ajuste	15,20	7	2,17	0,64	4,88	0,714075
Erro Puro	16,93	5	3,39			
Total	395,72	19	20,83			

Fonte: O próprio autor

O ajuste do modelo é dado pelo coeficiente de determinação R^2 , calculado pelo quociente entre a soma quadrática da regressão e a soma quadrática total (Equação 6). A Tabela 6 mostra os valores calculados para o modelo de cada tratamento analisado.

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} \quad (6)$$

Tabela 6 – Coeficientes de determinação (R^2) e somas quadráticas dos resíduos dos modelos para cada tratamento.

Tratamento	R^2	SQ_r
S6	0,9684	12,79
S10	0,9506	21,94
R6	0,8950	37,32
R10	0,9188	32,13

Fonte: O próprio autor

Os valores calculados de R^2 mostram que os modelos quadráticos dos arranjos quadrados (S6 e S10) foram melhor ajustados aos valores experimentais que os arranjos retangulares. Isto também pode ser observado através do valor das somas quadráticas dos resíduos para cada um destes modelos (Tabelas 5 e 6), cujos valores são inversamente proporcionais a R^2 .

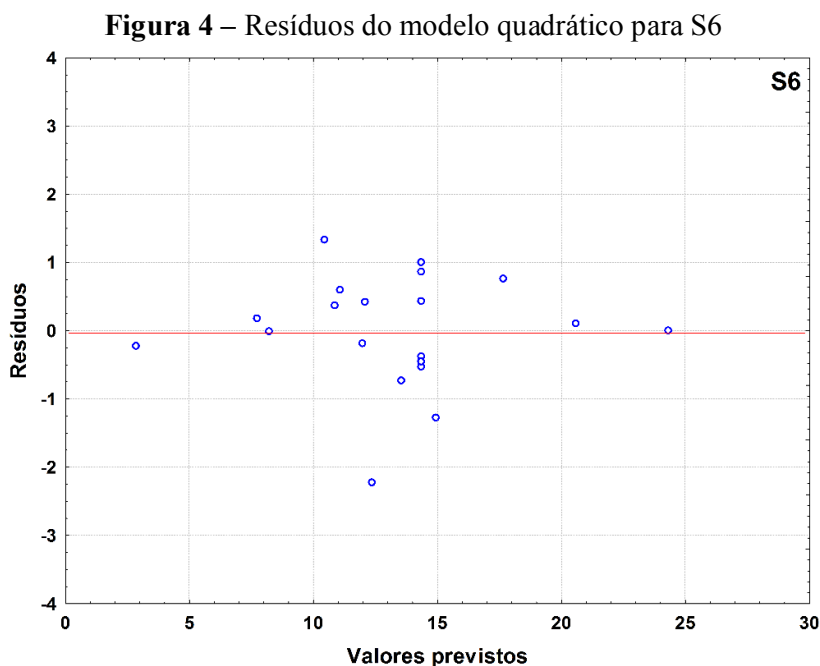
Na Tabela 5, podem ser observados dois valores: a soma quadrática da falta de ajuste do modelo aos valores obtidos experimentalmente e a soma quadrática devida ao erro puro, que dá uma medida do erro aleatório. A soma quadrática dos resíduos é o resultado da soma desses dois parâmetros (Equação 7).

$$SQ_r = SQ_{ep} + SQ_{faj} \quad (7)$$

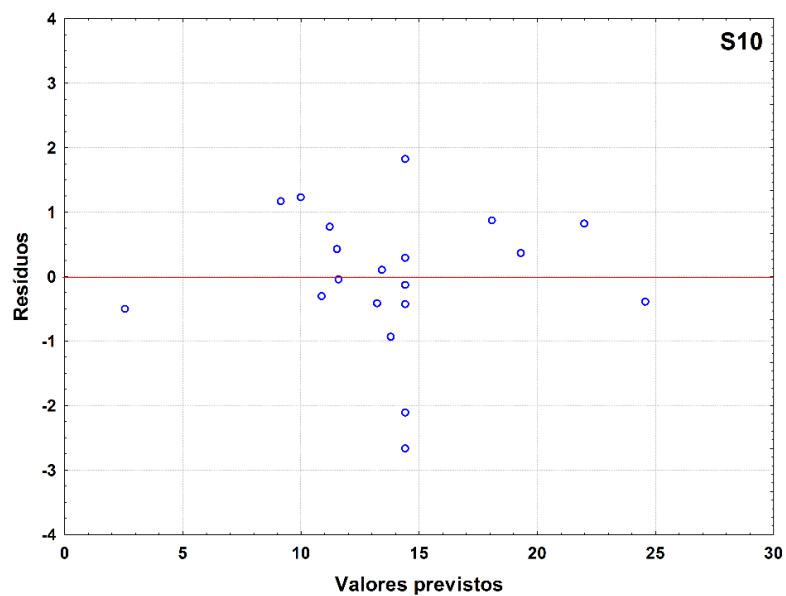
Observa-se que, no caso dos tratamentos de baixa densidade de plantio, S6 e R6, os resíduos deixados pelo modelo são devidos em 81% e 60%, respectivamente, à falta de ajuste do modelo, entanto que para S10 e R10 os resíduos são devido principalmente ao erro puro (erros aleatórios). A porcentagem de variação explicada, calculada com a Equação 8, apresentou os seguintes valores: S6 (99,41%), S10 (96.97%), R6 (95.84%) e R10 (95.72%).

$$\%v.e. = \frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T} \quad (8)$$

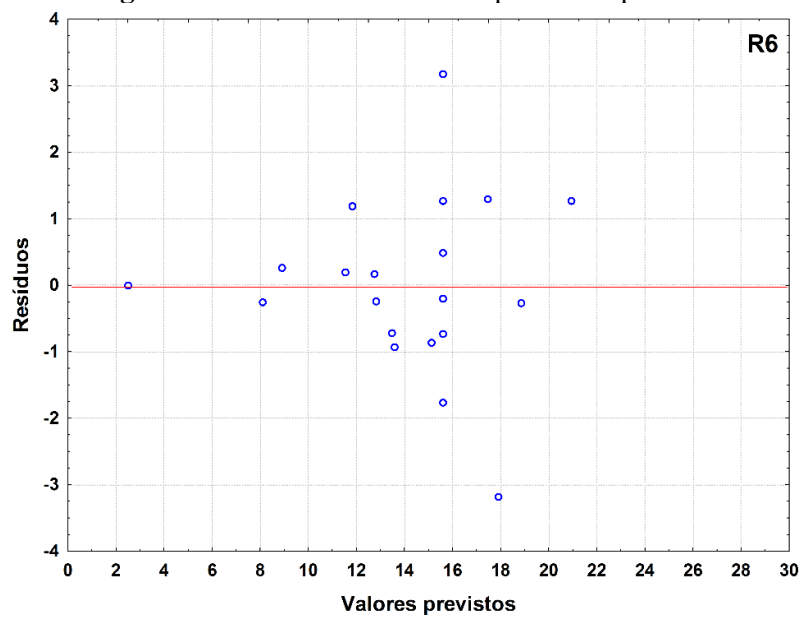
As Figuras 4 a 7 mostram os resíduos deixados pelo ajuste do modelo quadrático durante o estudo do rendimento de extratos nos quatro tratamentos de grãos crus de *Coffea arabica* c.v. IAPAR 59. Em todos os casos, observa-se que os resíduos se distribuem aleatoriamente, não revelando tendências e indicando que o modelo quadrático se adequa aos valores experimentais¹³.



Fonte: O próprio autor

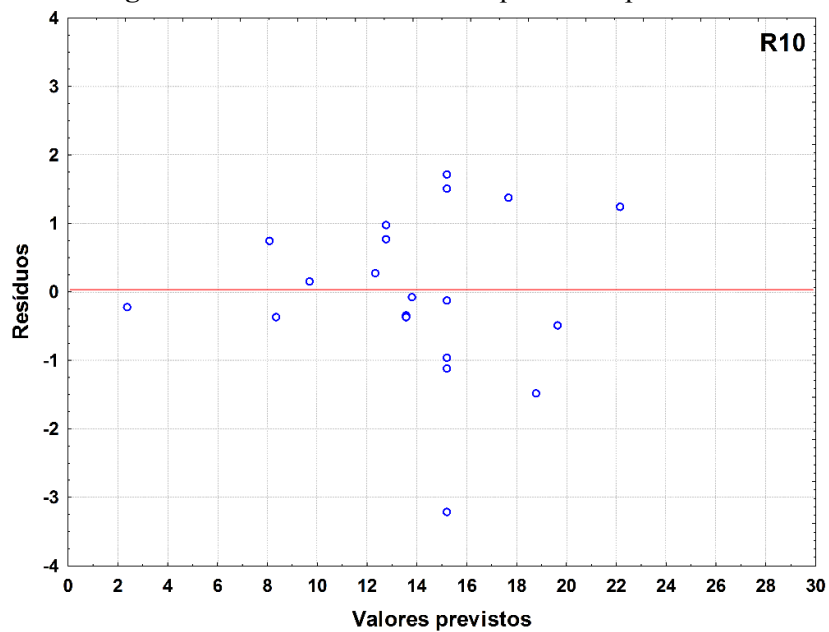
Figura 5 – Resíduos do modelo quadrático para S10

Fonte: O próprio autor

Figura 6 – Resíduos do modelo quadrático para R6

Fonte: O próprio autor

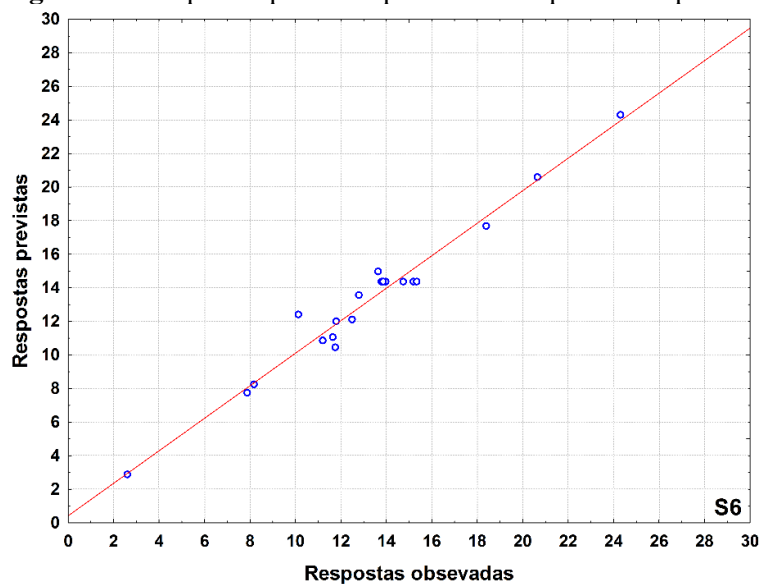
Figura 7 – Resíduos do modelo quadrático para R10



Fonte: O próprio autor

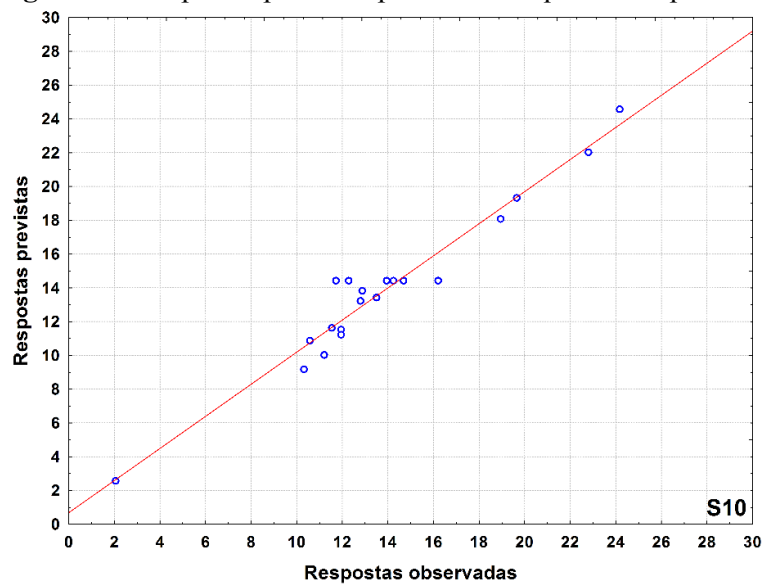
As Figuras 8 a 11 mostram as respostas previstas pelo modelo quadrático versus as respostas observadas no estudo do rendimento de extratos nos quatro tratamentos de grãos crus de *C. arabica* c.v. IAPAR 59.

Figura 8 – Respostas previstas pelo modelo quadrático para S6



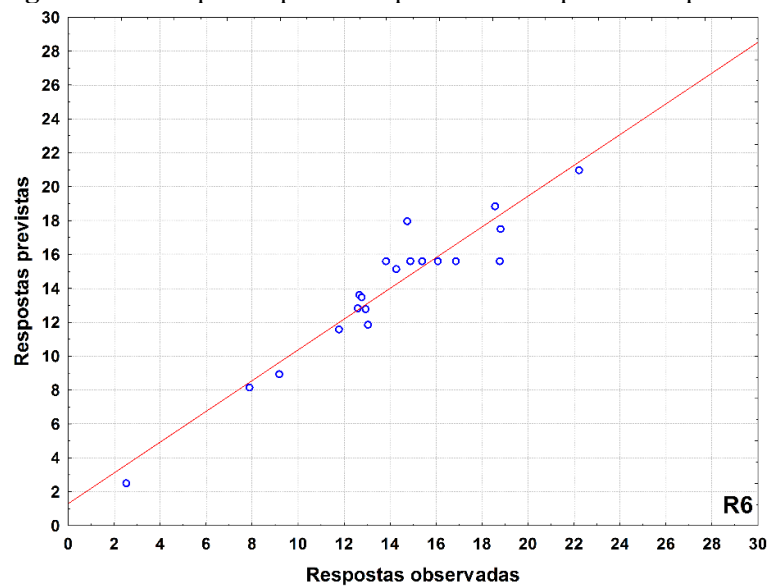
Fonte: O próprio autor

Figura 9 – Respostas previstas pelo modelo quadrático para S10

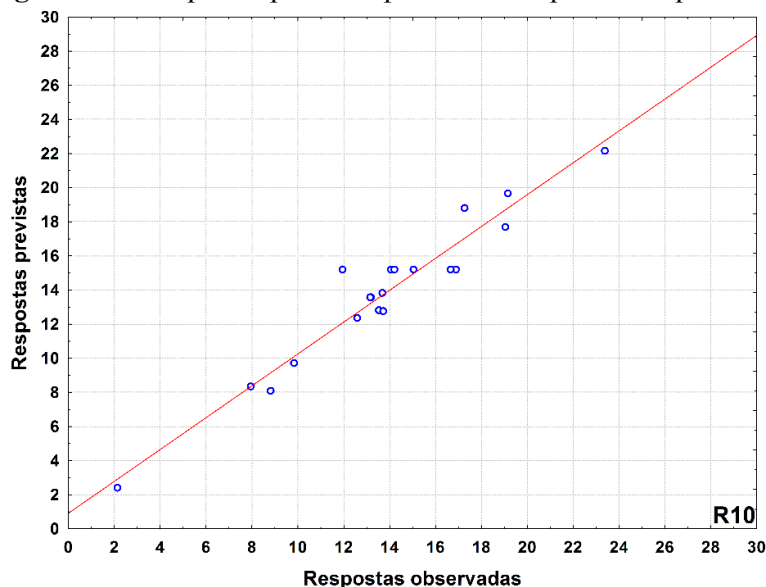


Fonte: O próprio autor

Figura 10 – Respostas previstas pelo modelo quadrático para R6



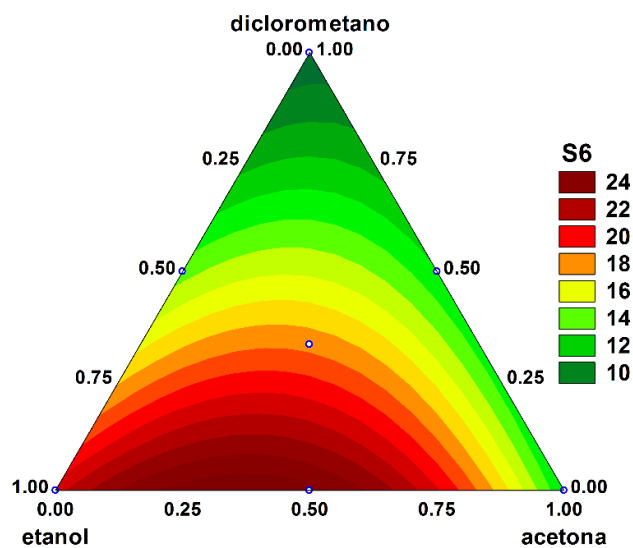
Fonte: O próprio autor

Figura 11 – Respostas previstas pelo modelo quadrático para R10

Fonte: O próprio autor

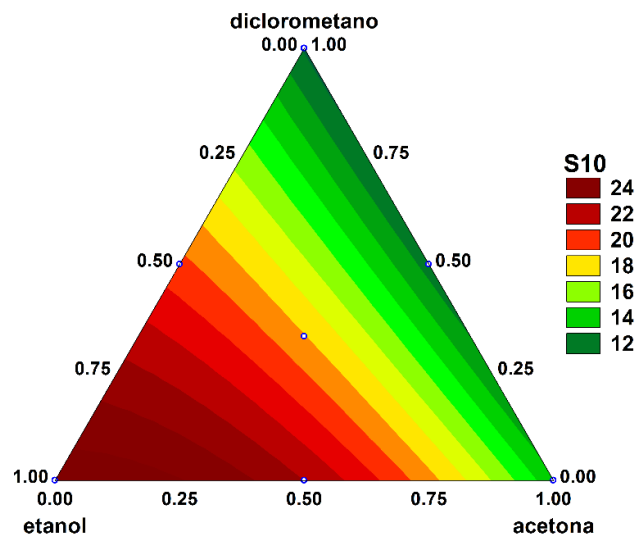
Como os gráficos mostram a qualidade de ajuste entre o valor estimado pelo modelo quadrático e o experimental, é possível construir as curvas de nível para cada arranjo, mostradas nas Figuras 12 a 15. Para o tratamento S10, a curva de nível mostra que o maior rendimento é obtido com etanol puro, sendo 24,56% o valor previsto pelo modelo para este solvente. As curvas de nível dos tratamentos S6, R6 e R10 apresentam os maiores rendimentos quando são obtidos a partir de misturas 1:1 etanol: acetona, onde os rendimentos previstos pelos modelos seriam 24,26%, 20,97% e 22,72% para S6, R6 e R10, respectivamente. Os rendimentos previstos pelos modelos para os solventes mencionados são consistentes com os obtidos experimentalmente: 24,17% (S10), 24,30% (S6), 22,22% (R6) e 23,40% (R10).

Figura 12 – Curvas de nível previstas pelo modelo quadrático para o tratamento S6.



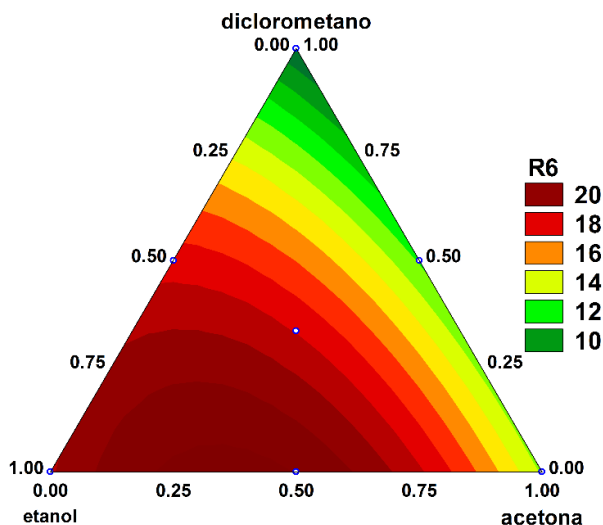
Fonte: O próprio autor

Figura 13 – Curvas de nível previstas pelo modelo quadrático para o tratamento S10.



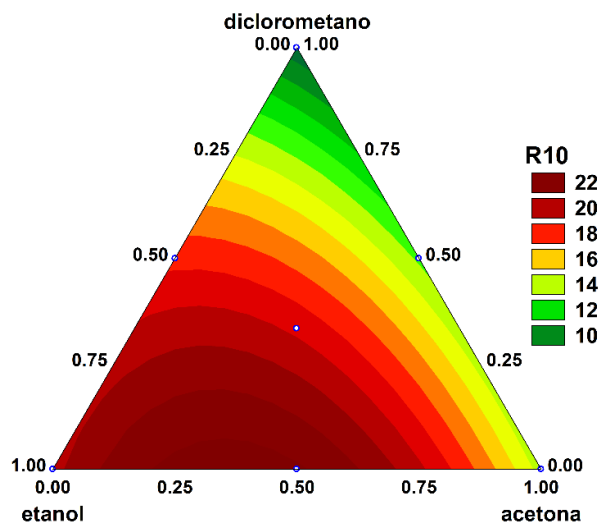
Fonte: O próprio autor

Figura 14 – Curvas de nível previstas pelo modelo quadrático para o tratamento R6.



Fonte: O próprio autor

Figura 15 – Curvas de nível previstas pelo modelo quadrático para o tratamento R10.



Fonte: O próprio autor

Como foi mostrado na Tabela 1 do Capítulo 1, a maioria dos compostos presentes no grão cru de *C. arabica*, são polares ou apresentam vários grupos com esta característica na sua estrutura (proteínas, carboidratos, ácidos clorogênicos e cafeína, entre outros). Portanto, é de esperar que os solventes extratores mais polares empregados neste

trabalho etanol e etanol: acetona apresentem os maiores rendimentos. Trabalhos desenvolvidos com *C. arabica* cv. IAPAR 59 também apresentaram os maiores rendimentos com solventes puros ou misturas contendo este tipo de solventes: etanol (15%), etanol: diclorometano (21%), etanol: acetona (15%), etanol: hexano (18%) e etanol: acetona: diclorometano (14%)^{5,9}. O hexano (apolar) apresentou os menores rendimentos neste planejamento: 2,61% (S6), 2,06% (S10), 2,52% (R6) e 2,17% (S10).

CONCLUSÃO

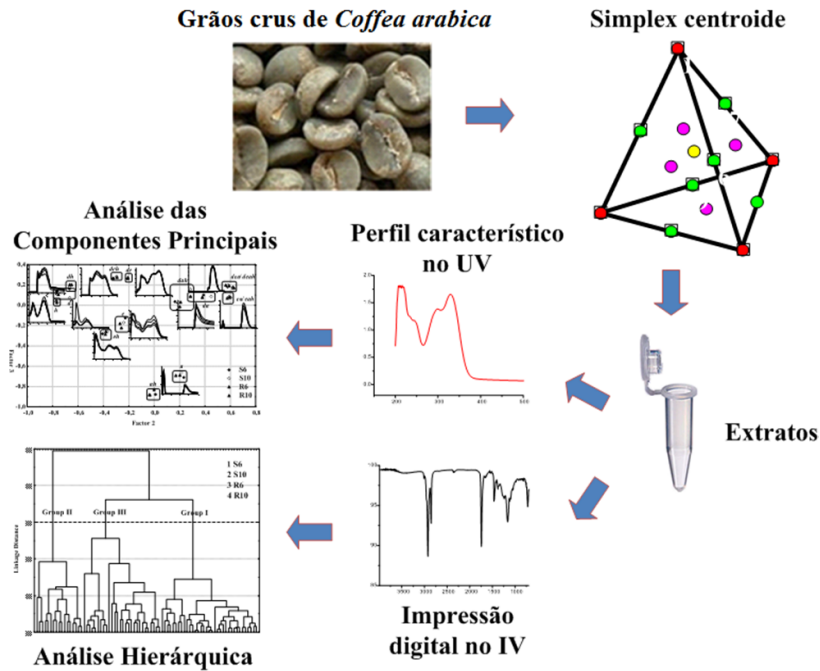
Os maiores rendimentos no processo de extração foram obtidos com etanol puro (24,17%) para o tratamento S10 e a mistura etanol: acetona (24,30%, 22,22% e 23,40%) para os tratamentos S6, R6 e R10. O modelo quadrático foi o que melhor se ajustou para representar os rendimentos das extrações, apresentando coeficientes de determinação entre 0,89 e 0,97. Verificou-se que os resíduos se distribuem aleatoriamente, não revelando tendências e indicando que o modelo quadrático se adequa às respostas observadas. No caso dos tratamentos de baixa densidade de plantio (S6 e R6), os resíduos deixados pelo modelo são devidos principalmente à falta de ajuste do modelo, enquanto que para S10 e R10 (alta densidade de plantio) os resíduos são devidos, principalmente, ao erro puro (erros aleatórios). A variação explicada pela regressão se mostrou superior a 97% em todos os tratamentos.

REFERÊNCIAS

- ¹ DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313-7352, 2010.
- ² PINELO, M.; RUBILAR, M.; JEREZ, M.; SINEIRO, J.; NUNEZ, M.J. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 2111-2117, 2005.
- ³ XU, B. J.; CHANG, S. K. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **J. Food Sci.**, v. 72, p. 159-166, 2007.
- ⁴ DICIAULA, M. C.; LOPESA, G. C.; SCARMINIO, I. S.; MELLO, J. C. P. Optimization of solvent mixtures for extraction from bark of *Schinus terebinthifolius* by a statistical mixture-design technique and development of a uv-vis spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. **Quim. Nova**, v. 37, p. 158-163, 2014.
- ⁵ MOREIRA, I.; SCHEEL, G. L.; HATUMURA, P. H.; SCARMINIO, I. S. Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em *Coffea arabica*. **Quim. Nova**, v. 37, p. 39-43, 2014.
- ⁶ TOCI, A.; FARAH, A.; TRUGO, L. C. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafês arábica e robusta antes e após a torração. **Quim. Nova**, v. 29, p. 965-971, 2006.
- ⁷ BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Quim. Nova**, v. 32, p. 849-854, 2009.
- ⁸ DELAROZA, F.; RAKOCEVIC, M.; MALTA, G. B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Spectroscopic and Chromatographic fingerprint analysis of composition variations in *Coffea arabica* leaves subject to different light conditions and plant phenophases. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 25, p. 1929-1938, 2014.
- ⁹ MOREIRA, I.; SCARMINIO, I. S. Chemometric discrimination of genetically modified *Coffea arabica* cultivars using spectroscopic and chromatographic fingerprints. **Talanta**, v. 107, p. 416-422, 2013.
- ¹⁰ SOARES, P. K.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design – principal component optimization for selective compound extraction from plant material. **J. Sep. Sci.**, v. 30, p. 3302-3310, 2007.
- ¹¹ NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4 ed. São Paulo: Bookman Companhia Editora, 2010. 413 p.
- ¹² BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; NETO, B. B. **Statistical design – Chemometrics**. Amsterdam: Elsevier, 2006. 412 p.

- ¹³ PASSARI, L. M. Z. G.; SOARES, P. K.; BRUNS, R. E. Estatística aplicada à Química: dez dúvidas comuns. **Quim. Nova**, v. 34, p. 888-892, 2011.

CAPÍTULO 5



*Análises espectroscópicas
nas regiões do UV-Vis e
do Infravermelho*

1 INTRODUÇÃO

As espectroscopias no UV-Vis e na região do Infravermelho são técnicas analíticas que têm sido usadas na identificação e quantificação dos constituintes do metaboloma do café. A preparação da amostra é relativamente simples e os reagentes e equipamentos encontram-se dentro de um preço acessível. A espectroscopia UV-Vis tem sido aplicada para quantificação de cafeína¹⁻⁴, determinação simultânea de metilxantinas⁵, determinação de ácidos clorogênicos e suas atividades antioxidantes⁶⁻⁸ e classificação de cafés com e sem cafeína e em relação à vida de prateleira⁹.

A espectroscopia na região do Infravermelho médio por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica importante para auxiliar na identificação de constituintes químicos e elucidação de suas estruturas, sendo considerada a melhor e mais simples técnica para identificar e caracterizar biomoléculas¹⁰. FTIR tem sido usada para estimar quantidades de metilxantinas em amostras de chá e café¹¹; avaliar os efeitos causados pelas condições de torra do café¹²; discriminar entre cafés torrados defeituosos e não defeituosos¹³ e entre cafés torrados e os seus adulterantes¹⁴.

O objetivo deste capítulo foi investigar as mudanças espectrais na região do Ultravioleta e do Infravermelho nos extratos de grãos crus de *C. arabica* cv. IAPAR 59 cultivados em dois arranjos e duas densidades de plantio. Para isto foram utilizados os extratos obtidos pelo planejamento experimental Simplex Centroide descrito no Capítulo 4. Desta maneira, o uso de misturas de solventes na extração aumenta as chances de observar importantes mudanças espectrais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

Para a obtenção dos espectros na região do UV-Visível foram utilizados os extratos brutos obtidos pelo planejamento exposto no Capítulo 4. Foi pesada uma massa de 50 mg de cada extrato em balança Shimadzu AY220, sendo dissolvida em 20 mL do solvente extrator. A mistura foi colocada em banho de ultrassom Ultracleaner 1400 Unique, durante 20 minutos. Os espectros foram obtidos na faixa de 190 a 800 nm com espectrofotômetro UV-Visível Thermo Scientific modelo Evolution 60S, usando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

2.2 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Os espectros na região do Infravermelho médio ($4000-675\text{ cm}^{-1}$) dos extratos brutos foram obtidos com espectrômetro Thermo Scientific Nicolet iS10 FTIR usando acessório de refletância total atenuada (ATR) com janela de germânio. As medidas foram coletadas no modo transmitância, com 64 *scans* e 4 cm^{-1} de resolução.

2.3 PROCESSAMENTO DOS DADOS

O programa Statistica 7.0 foi usado para a análise exploratória dos dados dos espectros no UV e no infravermelho médio, usando Análise das Componentes Principais (ACP) e Análise Hierárquica (AH). Os gráficos dos espectros e dos *loadings* foram plotados usando o programa Origin Pro 8.

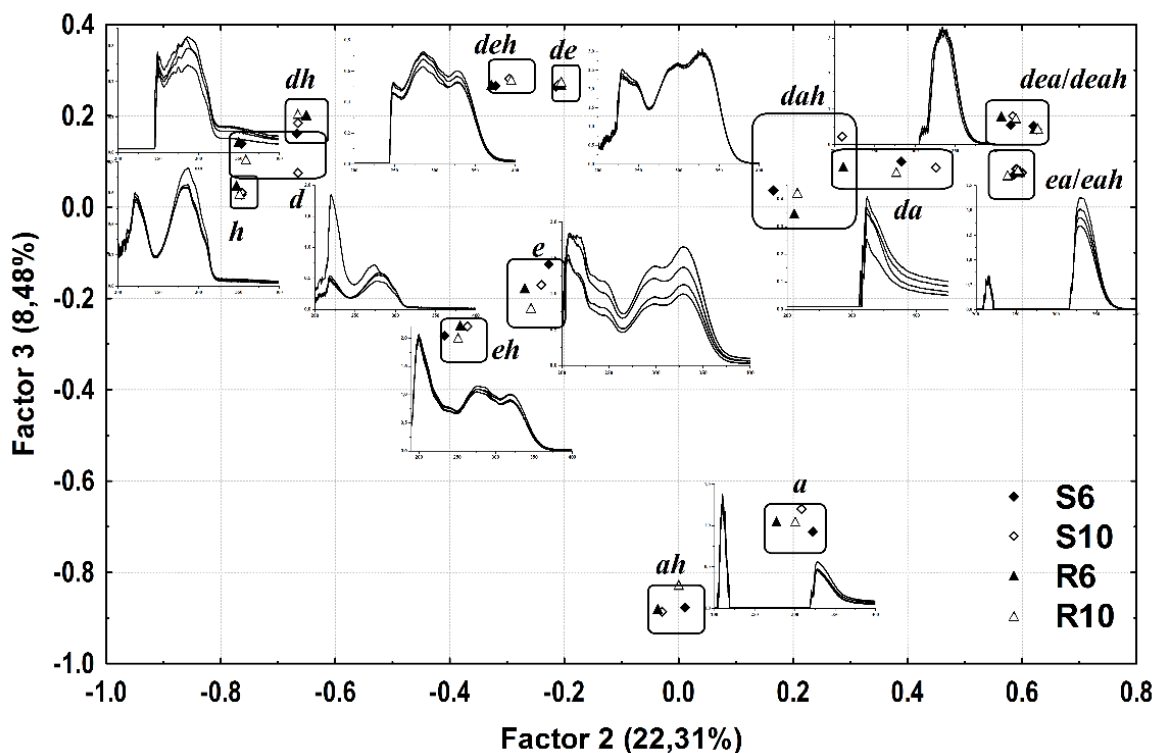
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISE DO PERFIL CARACTERÍSTICO NO UV-VIS

Os dados dos espectros de absorção foram submetidos à ACP com o objetivo de visualizar a formação de grupos de metabólitos em grãos crus de café nos diferentes arranjos e densidades de plantio estudados. Os dados espectrais, representados pelos valores de absorvância, foram colocados numa matriz de 601 linhas e 80 colunas, onde cada linha representa o comprimento de onda variável e as colunas, os 80 extratos obtidos no planejamento simplex centroide (20 extratos para cada tratamento: S6, S10, R6 e R10). As três primeiras componentes principais explicaram 89,40 % da variância total dos dados.

Embora os escores das 2^a e 3^a componentes principais (CP) expliquem apenas 30,79 % da variância total dos dados, elas proveem importante informação química (Figura 1). A separação gráfica dos extratos foi devida às diferentes propriedades das amostras e às suas interações com o solvente extrator. Ao longo da CP2 observou-se a formação de dois grupos: nos escores negativos estão os extratos obtidos com os solventes puros etanol (*e*), diclorometano (*d*) e hexano (*h*), as misturas binárias *dh*, *de*, *eh* e a ternária *deh*. Os seus espectros UV representam o perfil característico dos compostos bioativos do café: ácidos clorogênicos, metilxantinas e álcoois pentacíclicos. Os extratos obtidos com misturas de acetona (*a*) com os outros solventes estão agrupados nos escores positivos tanto da CP2 quanto da CP3. Os seus perfis indicam a presença de ácidos e compostos fenólicos. Os extratos obtidos com acetona pura (*a*) e com a mistura acetona: hexano (*ah*) foram separados dos outros extratos CP3. Alguns metabólitos foram identificados pelo seu espectro de absorção.

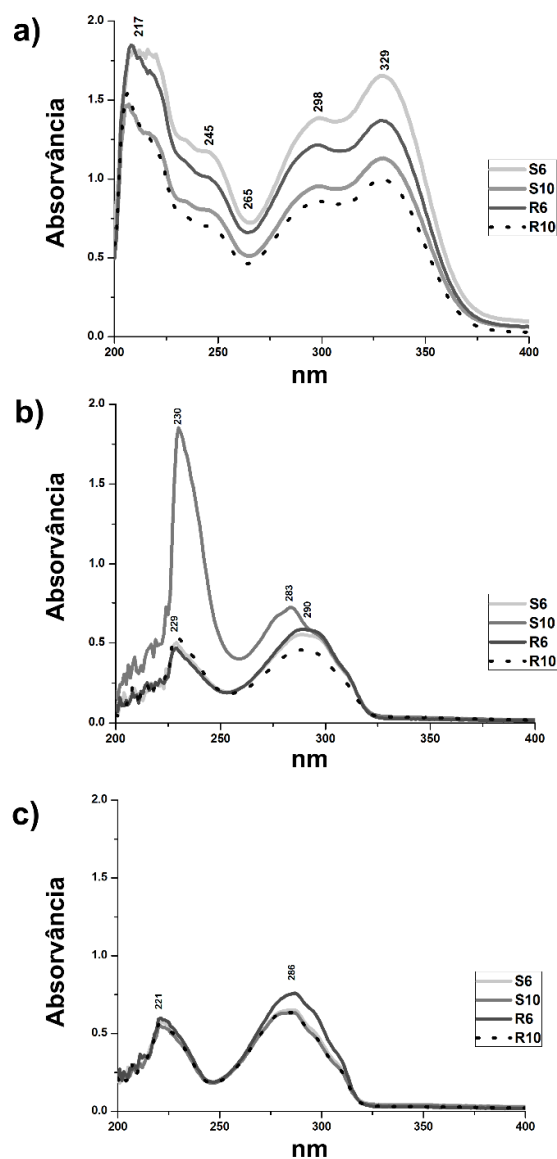
Figura 1 - Gráfico dos escores de CP2 x CP3 dos perfis característicos no UV-Vis dos extratos brutos de *C. arabica*, cv. IAPAR 59.



Fonte: O próprio autor

Os espectros dos extratos etanólicos possuem duas bandas: a primeira a 217 nm com ombro a 245 nm e a segunda banda a 329 nm com ombro a 298 nm. O mínimo encontrou-se a 264 nm (Figura 2a). As duas bandas com os seus ombros correspondem à transição eletrônica HOMO→LUMO. Estes espectros são típicos de ácidos clorogênicos (ACG) os quais têm sido caracterizados e determinados em grãos de café por espectroscopia UV-Vis¹⁵. Os tratamentos de baixa densidade de plantio (S6 e R6) mostraram maiores conteúdos de ACG que os tratamentos de alta densidade (S10 e R10). No tratamento de 6.000 plantas ha⁻¹, cada planta possui maior espaço disponível em relação ao tratamento de maior densidade (10.000 plantas ha⁻¹ permitindo um aumento na incidência da radiação solar. A radiação UV gera radicais livres que causam danos nas células. Sob esta condição, as plantas produzem compostos antioxidantes como mecanismo de defesa¹⁶. Consequentemente, o nível de ACG aumenta.

Figura 2 - Espectros no UV de extratos de grãos crus de *C. arabica*, cv. IAPAR 59, obtidos com etanol (a), diclorometano (b) e hexano (c).



Fonte: O próprio autor

Os espectros dos extratos obtidos com diclorometano e hexano mostram perfil semelhante com duas bandas: 229-230 nm e 283-290 nm para os extratos de diclorometano (Figura 2b) e 221 nm e 286 nm, para os extratos de hexano (Figura 2c). Estas bandas são características dos lipídios insaponificáveis do café: cafestol e caveol. Para estes álcoois pentacíclicos, têm sido encontrados valores a 225 nm para cafestol e 288 nm, para caveol¹⁷. O tratamento S10 apresentou

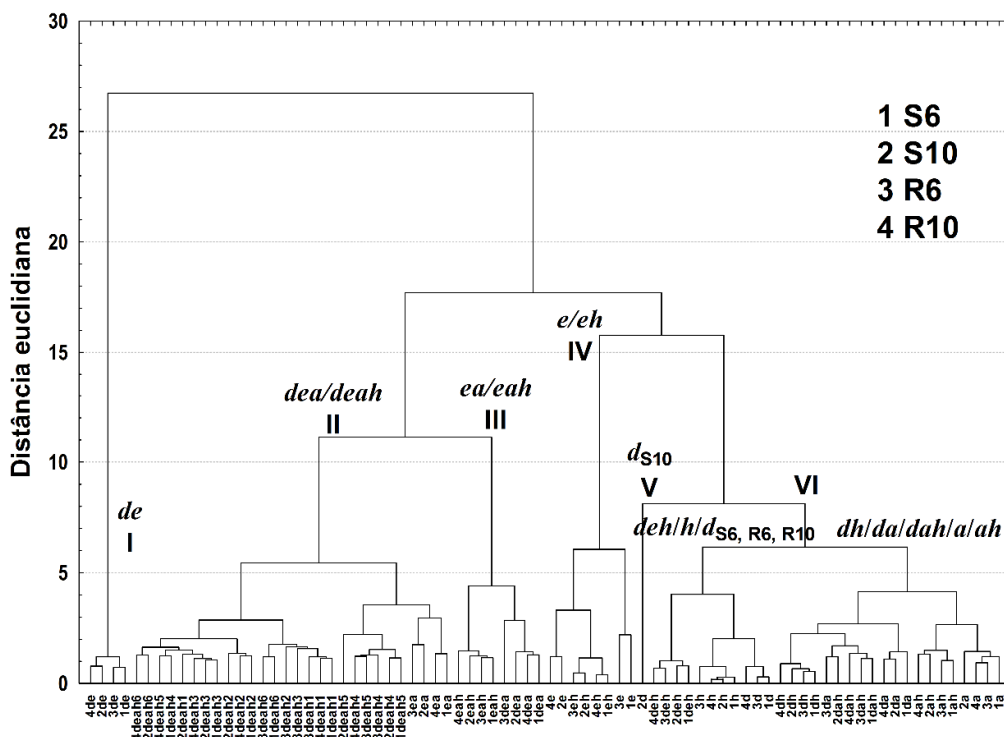
os maiores teores de cafestol e caveol no extrato obtido com diclorometano enquanto que, no extrato com hexano, o tratamento R6 apresentou um teor levemente maior de caveol quando foi comparado com os outros tratamentos. As metilxantinas (caféina, teobromina e teofilina) também absorvem nesta região espectral. Estudos realizados em folhas de chá sobre caféina mostraram que sua molécula absorve entre 244 e 300 nm quando o solvente extrator era diclorometano. Neste caso, o λ_{\max} foi 276 nm¹. Quando extraídas com água, as metilxantinas mostraram λ_{\max} entre 270 e 280 nm¹⁸. Consequentemente, os espectros destes alcaloides poderiam estar mascarados pelo espectro do caveol. No gráfico dos escores de CP2 x CP3 da Figura 1, os extratos de diclorometano e de hexano estão agrupados muito próximo, nos escores negativos da CP2. Isto sugere que suas composições são semelhantes.

Os pares de espectros dos extratos preparados com *a/ah*, *ea/eah*, *da/dah* e *dea/deah* exibiram o mesmo perfil espectral (Figura 1), indicando que contêm a mesma classe de metabólitos, mas com intensidades maiores que aqueles preparados com acetona. Os espectros dos extratos obtidos com acetona pura e suas misturas com etanol e/ou hexano exibiram duas bandas. A banda a 215 nm é característico dos ácidos cítrico ou málico, de acordo com a informação obtida pela autora, usando padrões destes ácidos dissolvidos nos respectivos solventes e sob as mesmas condições. A banda a 330 nm não foi atribuída a nenhum metabólito.

Os resultados obtidos na ACP foram confirmados pela análise hierárquica (AH) como mostrado no dendrograma da Figura 3. Os tratamentos foram identificados com os números 1 (S6), 2 (S10), 3 (R6) e 4 (R10). Quando o dendrograma é examinado no ponto 7.0 (distância euclidiana), podem ser identificados seis grupos. Cada grupo está formado por espectros que possuem algumas similaridades. O Grupo I está formado apenas pelos extratos obtidos com a mistura diclorometano: etanol. O perfil dos espectros indicou que esta mistura extrai metabólitos diferentes daqueles extraídos pelos solventes puros. O Grupo II contém extratos obtidos pelas

misturas *dea* e *deah*. Portanto, estas misturas extraem os mesmos tipos de metabólitos tendo uma banda não identificada a 330 nm. O Grupo III corresponde aos espectros dos extratos obtidos com as misturas *ea* e *eah*. A banda a 215 nm diferencia os Grupos II e III de espectros. Os espectros dos extratos obtidos com etanol e a mistura etanol: hexano constituem o Grupo IV e possuem o perfil de ACG (Figura 2a). O Grupo V é formado apenas pelo espectro do extrato em diclorometano do tratamento S10. Isto indica que há diferenças no conteúdo dos álcoois pentacíclicos (cafestol e caveol) quando se o compara com os outros três tratamentos. Os espectros dos extratos em diclorometano dos tratamentos S6, R10 e R6 estão agrupados juntos com os espectros dos extratos obtidos com *h*, *dh*, *deh*, *a*, *ah*, e *dah*, formando o Grupo VI. As Figuras 2b e 2c mostram semelhantes para os espectros dos extratos em diclorometano e hexano de S6, R10 e R6. Estes extratos formam, juntos, um subgrupo do grupo VI.

Figura 3 - Dendrograma dos espectros no UV dos extratos obtidos de grãos crus de *C. arabica*, cv. IAPAR 59. Os tratamentos foram identificados com números 1 (S6), 2 (S10), 3 (R6) e 4 (R10)



Fonte: O próprio autor

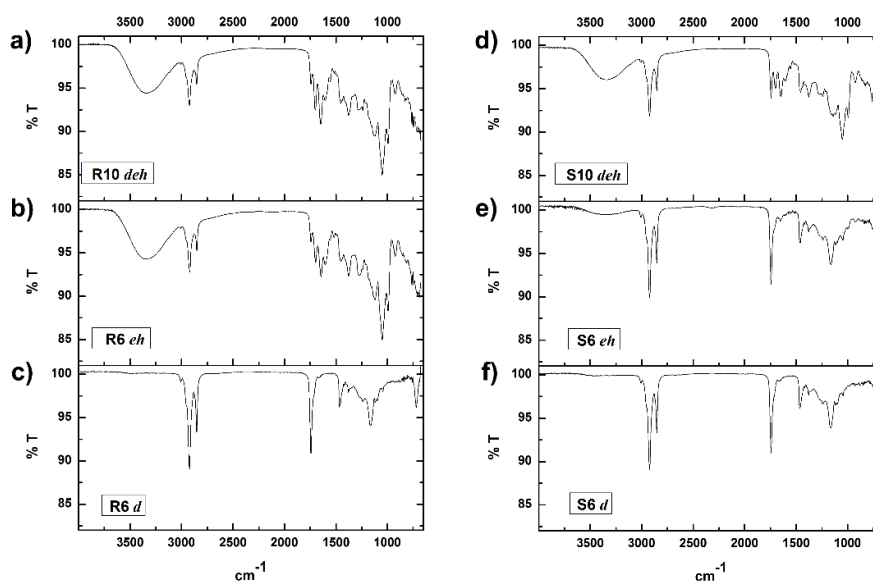
3.2 ANÁLISE DA IMPRESSÃO DIGITAL POR FTIR

A ACP também foi aplicada aos dados obtidos por FTIR. A matriz foi composta por 80 amostras (extratos) e 1678 variáveis. As duas primeiras componentes principais explicaram 99.03% da variância total dos dados. O gráfico dos escores de CP1 x CP2 mostra dois grupos separados pela CP2 (Figura 4a), sendo bem diferente do gráfico dos escores da Figura 1, onde os extratos foram separados pelo solvente extrator. Os pontos espectrais dispuseram-se em uma de duas linhas quase retas, indicando dois grupos principais (Figura 4a). Na interseção das duas linhas, encontram-se pontos sobrepostos correspondentes aos extratos com espectros semelhantes enquanto que os espectros mais diferentes se localizam nos dois limites extremos. Os solventes puros hexano e diclorometano e as misturas binárias e ternárias contendo acetona e diclorometano (Grupo I) possuem valores positivos de CP2. Os extratos das misturas binárias e ternárias contendo etanol e hexano se agruparam nos escores negativos da CP2 (Grupo II). Os pontos correspondentes a alguns extratos foram eliminados do gráfico com o objetivo de visualizar mais facilmente os pontos de interesse.

A Figura 4b mostra o gráfico dos *loadings* das CP1 e CP2. Ao longo da CP2, encontram-se valores grandes e positivos de *loadings* a 3342; 1648; 1604; 1048 e 990 cm^{-1} correspondentes aos extratos brutos do Grupo I (misturas binárias e ternárias contendo acetona e diclorometano). As amostras do Grupo II têm grandes *loadings* negativos a 2922; 2846; 1742; 1470; 1174, 1098 e 722 cm^{-1} . As bandas na faixa entre 1500 e 2000 cm^{-1} foram relacionadas aos modos de estiramento das ligações C=C e C=O, mas dependendo do tipo de função orgânica a que pertence a ligação C=O, as bandas podem aparecer dentro da região 1650-1830 cm^{-1} sendo que o estiramento C=N também ocorre nesta região¹⁹. No Grupo I, as bandas observadas a 3342 (estiramento N-H) e a 1648 cm^{-1} (estiramento C=O de amidas), correspondem provavelmente à cafeína. O solvente diclorometano pertence a este grupo e tem sido usado para descafeinar e isolar

Os espectros correspondentes aos extremos dos Grupos I e II (Figura 4a) foram plotados para analisar o seu comportamento. O extrato em diclorometano de R6 (R6 *d*) foi escolhido para representar o extremo do Grupo I. Os extratos em etanol: hexano de R6 (R6 *eh*) e em diclorometano: etanol: hexano de R10 (R10 *deh*) representaram o extremo do Grupo II (Figura 4a). Da mesma maneira, os espectros dos extratos correspondentes aos arranjos quadrados S10 *deh*, S6 *eh* e S6 *d* também foram plotados para investigar as possíveis mudanças na produção de metabólitos devidas ao tipo de padrão de plantio. As impressões digitais na região do infravermelho são apresentadas na Figura 5.

Figura 5 - Espectros FTIR dos extratos R10 *deh* (a), R6 *eh* (b), R6 *d* (c), S10 *deh* (d), S6 *eh* (e) e S6 *d* (f) obtidos de grãos crus de *C. arabica*, cv. IAPAR 59.



Fonte: O próprio autor

Os espectros R10 *deh*, R6 *eh* e S10 *deh* (Figuras 5a, 5b e 5d) apresentam características diferentes daquelas previstas pelo gráfico dos *loadings* para o Grupo II (Figura 4b). Estes espectros têm uma banda larga cerca de 3333 cm^{-1} e outras mais agudas em 1644 ; 1600 ; 1050

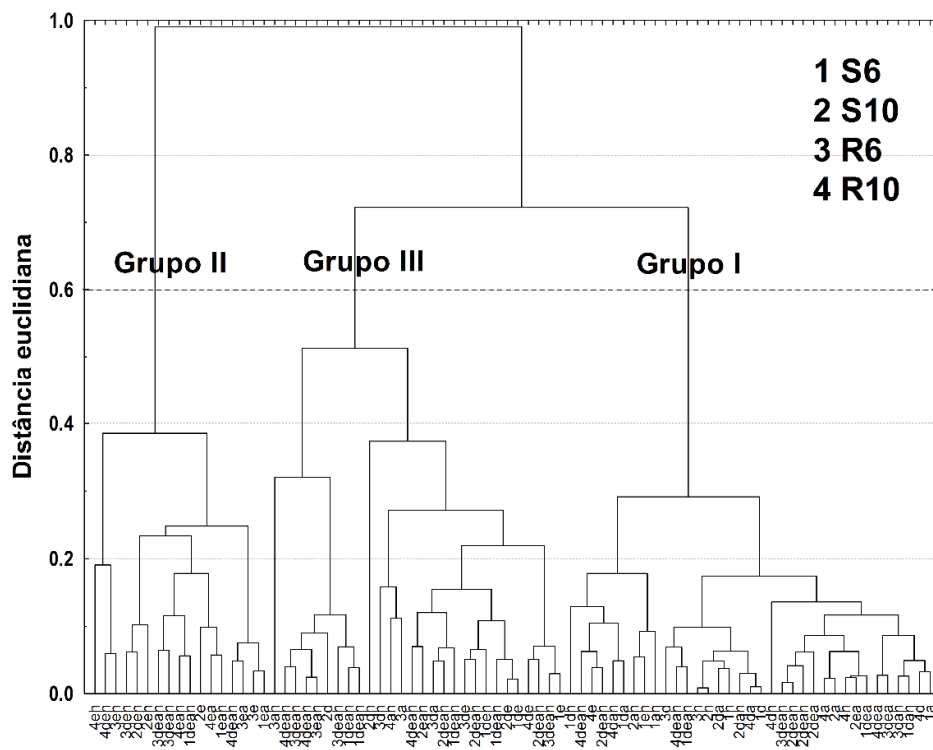
e 993 cm^{-1} . Estas bandas coincidem com os picos do gráfico de *loadings* do Grupo I. Outras bandas foram observadas para estes extratos em 1747 (ésteres de ácidos graxos) e 1704 cm^{-1} (ácidos orgânicos)²⁶. A região com bandas em 1452 , 1380 , 1260 , 1128 e 1059 cm^{-1} pode ser atribuída aos ácidos clorogênicos²⁷. As bandas espectrais dos extratos de grãos coletados de padrões de plantio retangulares (R10 *deh* e R6 *eh*) foram mais intensas do que aquelas provenientes dos extratos de grãos de S10 (S10 *deh*). Os espectros dos extratos R6 *d* e S6 *d* (Figuras 5c e 5f) exibem o mesmo perfil, mas eles não apresentam as bandas características do Grupo I: 3342 , 1648 , 1604 , 1048 e 990 cm^{-1} como mostrado nos valores positivos do gráfico de *loadings* (Figura 4b). Estes espectros apresentam bandas em 2920 ; 2865 ; 1735 ; 1459 ; 1165 , 1095 e 721 cm^{-1} , as mesmas do Grupo II. Outras bandas que caracterizam estes extratos são: 3010 (estiramento =C-H), 1380 (flexão C-H do grupo CH_3), e 721 cm^{-1} (movimento *rocking* de grupos $(\text{CH}_2)_n$ quando $n \geq 4$)¹⁹ e a região entre 1300 e 1000 cm^{-1} (estiramento C-O)²¹. Esta informação indica a possível presença de ésteres de ácidos graxos nos extratos em diclorometano de R6 e S6, o que significa que o espaço de solo mais disponível para as plantas nos tratamentos de menor densidade de plantio leva à formação de mais ácidos graxos.

O espectro do extrato S6 *eh* (Figura 5e) apresenta um perfil semelhante aos dos espectros de R6 *d* e S6 *d* (Figuras 5c e 5f) e estes extratos estão localizados no Grupo I (Figura 4a). Os extratos etanol: hexano dos outros três tratamentos (R6, R10 e S10) estão no Grupo II. Isto sugere que os metabólitos de S6 extraídos pela mistura etanol: hexano são diferentes dos metabólitos extraídos de S10, R6 e R10.

Os resultados obtidos através da ACP foram confirmados por AH. Quando o dendrograma é analisado no ponto 0,6 discrimina três grupos (Figura 6). O Grupo I (extratos das misturas binárias ou ternárias de acetona e diclorometano) (Figura 4a) encontra-se localizado à direita deste dendrograma enquanto que os extratos do Grupo II (misturas binárias ou ternárias de etanol e hexano) estão localizadas à esquerda. Um terceiro grupo não caracterizado na Figura 4a

(Grupo III) contém os extratos obtidos com as misturas quaternárias dos solventes e aqueles obtidos com a mistura etanol: diclorometano. Esta figura mostra que os tratamentos foram separados pelos solventes puros etanol e diclorometano, indicando que os níveis de ACG e cafestol/caveol ou cafeína poderiam discriminar estes tratamentos. Estes resultados podem ser comparados com aqueles obtidos por espectroscopia UV-Vis para os extratos com etanol e diclorometano (Figuras 2a e 2b). Os espectros dos extratos de etanol mostraram o perfil de ACG sendo o tratamento S6 o que apresentou o maior teor destes ácidos (Figura 2a). Na AH da impressão digital no Infravermelho, o extrato etanólico de S6 encontra-se isolado dos outros três (S10 e, R6 e e R10 e) no Grupo III (Figura 6). No espectro UV-Vis da Figura 2b, o tratamento S10 exibe o maior conteúdo de cafestol e caveol e ele aparece separado dos outros no Grupo III do dendrograma na região do Infravermelho (Figura 6).

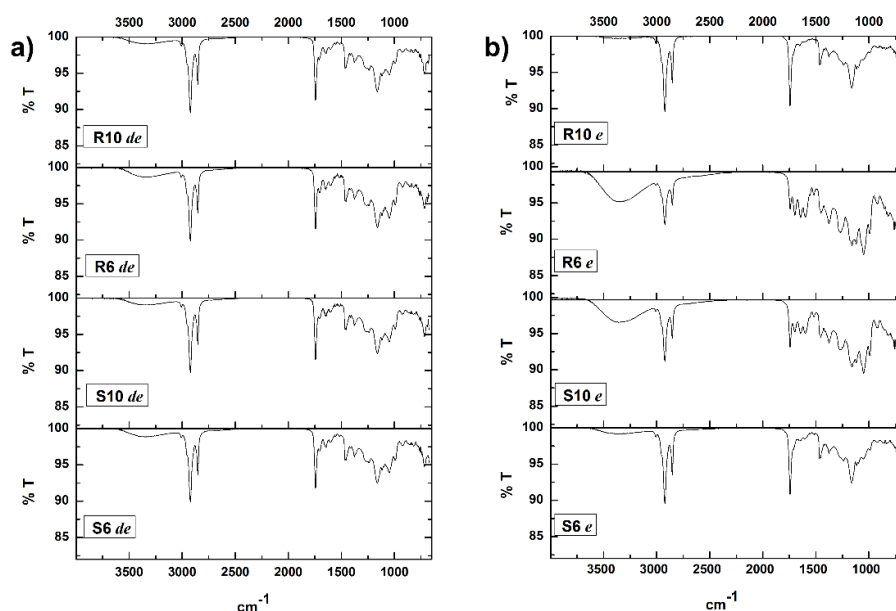
Figura 6 - Dendrograma dos espectros FTIR dos extratos obtidos de grãos crus de *C. arabica*, cv. IAPAR 59.



Fonte: O próprio autor

Os quatro espectros FTIR dos extratos obtidos com a mistura etanol: diclorometano apresentaram perfis espectrais semelhantes (Figura 7a). As bandas em 3331 (N-H) e 1695, 1648 e 1604 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento das ligações C=C e C=N. Estes grupos estão presentes na cafeína. As bandas em 1742 cm^{-1} (estiramento C=O), 2841 e 2920 cm^{-1} (estiramento C-H de grupos CH_2 e CH_3) e 1165 cm^{-1} (estiramento C-O) podem ser atribuídos a triacilgliceróis²¹. A banda fraca em 3009 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação C-H no grupo =C-H²⁸. Isto indica a presença de ácidos graxos insaturados.

Figura 7 - Espectros FTIR de extratos de (a) etanol: diclorometano e (b) etanol obtidos de grãos crus de *C. arabica*, cv. IAPAR 59.



Fonte: O próprio autor

Os espectros FTIR dos extratos etanólicos de S10 e R6 mostraram bandas em várias regiões diferentes daquelas presentes nos espectros de S6 e R10 (Figura 7b). Somente os espectros dos dois primeiros tratamentos possuem uma banda larga na região de 3100 a 3600 cm^{-1} atribuída à presença de compostos com grupos O-H e N-H²³. A banda em 1742 cm^{-1} corresponde ao grupo éster de triacilgliceróis sendo menos intensa que nos espectros etanólicos de R10 e S6. A

região entre 1700 e 1500 cm^{-1} pode ser atribuída à absorção da ligação peptídica (C-NH) de esqueleto proteico²⁹. Eles também apresentam várias bandas intensas na região entre 1325 e 950 cm^{-1} , que podem ser associadas a carboidratos²⁹. Os espectros de S6 e R10 têm bandas características de triacilgliceróis: 1742 (intensa), a região entre 3000 e 2800 cm^{-1} , correspondente ao estiramento C-H, 1463 e 1379 cm^{-1} (CH_2 e CH_3 *scissoring*) e 1121 e 720 cm^{-1} (CH_3 e CH_2 *wagging*)²¹. Isto sugere que estes tratamentos podem ter maiores teores de triacilgliceróis que S10 e R6.

CONCLUSÃO

A ACP dos espectros UV-Vis mostrou que as diferenças dos perfis característicos nesta região foram atribuídas principalmente aos extratos etanólicos que apresentaram o perfil característico dos ACG. O maior teor destes compostos foi encontrado nos tratamentos de menor densidade de plantio (S6 e R6). Os espectros dos extratos em diclorometano e em hexano apresentaram bandas características de cafestol e caveol. Em diclorometano, o extrato do tratamento S10 continha o maior teor destes lipídios insaponificáveis. O extrato em hexano do tratamento S6 apresentou um teor levemente maior destes álcoois pentacíclicos dos que os outros tratamentos. Baseado nestas análises, os compostos bioativos do café podem ser extraídos utilizando solventes puros. A análise hierárquica dos dados obtidos no infravermelho médio confirmou que os níveis de ACG e cafeína diferenciaram estes tratamentos. A análises dos espectros nesta região sugere que S6 e R10 possuem maior teor de lipídios entanto que S10 e R6 se caracterizam por maiores conteúdos de carboidratos e proteínas.

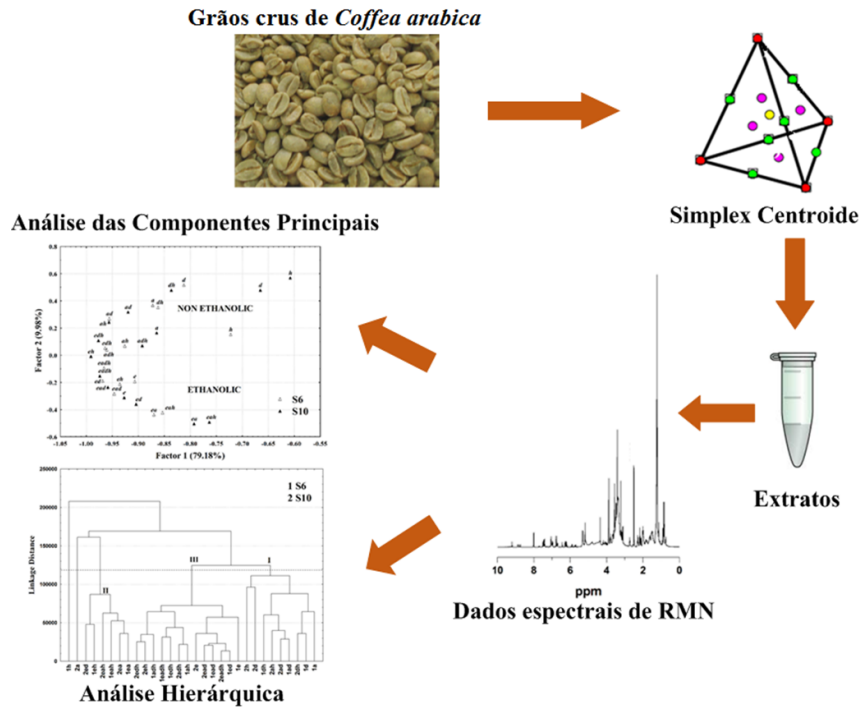
REFERÊNCIAS

- ¹ BELAY, A.; TURE, K.; REDİ, M.; ASFAW, A. Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. **Food Chem.**, v. 108, p. 310-315, 2008.
- ² ATOMSSA, T.; GHOLAP, A. V. Characterization of caffeine and determination of caffeine in tea leaves using UV-Visible spectrometer. **Afr. J. Pure and Appl. Chem.**, v. 5, p. 1-8, 2011.
- ³ DOBRINAS, S.; SOCEANU, A.; POPESCU, V.; STANCIU, G.; SMALBERGER, S. Optimization of a UV-Vis spectrometric method for caffeine analysis in tea, coffee and other beverages. **St. Cerc. St. CICBIA**, v. 14, p. 71-78, 2013.
- ⁴ DELAROZA, F.; RAKOCEVIC, M.; MALTA, G. B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Spectroscopic and chromatographic fingerprint analysis of composition variations in *Coffea arabica* leaves subject to different light conditions and plant phenophases. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 25, p. 1929-1938, 2014.
- ⁵ LÓPEZ-MARTÍNEZ, L.; LÓPEZ-DE-ALBA, P. L.; GARCÍA-CAMPOS, R.; LEÓN-RODRÍGUEZ, L. M. Simultaneous determination of methylxanthines in coffees and teas by UV-Vis spectrophotometry and partial least squares. **Anal. Chim. Acta**, v. 493, p. 83-94, 2003.
- ⁶ ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chem.**, v. 85, p. 27-36, 2005.
- ⁷ PARRAS, P. et al. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. **Food Chem.** v.102, p. 582-592, 2007.
- ⁸ VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. **Food Chem.**, v. 124, p. 863-868, 2011.
- ⁹ SOUTO, U. T. C. P.; PONTES, M. J. C.; SILVA, E. C. et al. UV-Vis spectrometric classification of coffees by SPA-LDA. **Food Chem.**, v. 119, p. 368-371, 2010.
- ¹⁰ KUMAR, J. K.; PRASAD, A. G. D. Fourier Transform Infrared Spectroscopy: an advanced technique for identification of biomolecules. **Drug Invent. Today**, v. 4, p. 616-618, 2012.
- ¹¹ PARADKAR, M. M.; IRUDAYARA, J. A rapid FTIR spectroscopy method for estimation of caffeine in soft drinks and total methylxanthines in tea and coffee. **J. Food Sci.**, v. 67, p. 2507-2511, 2002.
- ¹² LYMAN, D. J.; BENCK, R.; DELL, S.; MERLE, S.; MURRAY-WIJELATH, J. FTIR-ATR Analysis of brewed coffee: Effect of roasting conditions. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 3268-3272, 2003.

- ¹³ CRAIG, A. P.; FRANÇA, A. S. OLIVEIRA, L. S. Discrimination between defective and non-defective roasted coffees by diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy. **LWT-Food Sci. Technol.**, v. 47, p. 505-511, 2012.
- ¹⁴ REIS, N.; FRANÇA, A. S. OLIVEIRA, L. S. Discrimination between roasted coffee, roasted corn and coffee husks by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy. **LWT-Food Sci. Technol.** v. 50, p. 715–722, 2013.
- ¹⁵ BELAY, A.; GHOLAP, A. V. Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. **Afr. J. Pure and Appl. Chem.**, v. 3, p. 234-240, 2009.
- ¹⁶ HECK, C. I.; MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **J. Food Sci.**, v. 72, p. 138-151, 2007.
- ¹⁷ DIAS, R. C. E.; FARIA, A. F.; MERCADANTE, A. Z.; BRAGAGNOLOB, N.; BENASSI, M. T. Comparison of extraction methods for kahweol and cafestol analysis in roasted coffee. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 24, p. 492-499, 2013.
- ¹⁸ KHANCHI, A. R.; MAHANI, M. K.; HAJIHOSSEINI, M.; MARAGHEH, M. G.; CHALOOSI, M.; BANI, F. Simultaneous spectrophotometric determination of caffeine and theobromine in Iranian tea by artificial neural networks and its comparison with PLS. **Food Chem.**, v. 103, p. 1062–1068, 2007.
- ¹⁹ PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction of Spectroscopy: A guide for students of organic chemistry.** 2. ed.. Orlando, USA: Saunders College Publishing. 1996, 511 p.
- ²⁰ TOCI, A.; FARAH, A.; TRUGO, L. C. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafês arábica e robusta antes e após a torração. **Quim. Nova**, v. 29, p. 965-971, 2006.
- ²¹ CHAPMAN, D. Infrared spectroscopy of lipids. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 42, p. 353-371, 1965
- ²² DUFOUR, E. In **Infrared Spectroscopy for Food Quality, Analysis and Control.** Sun, D.-W., ed. USA: Academic Press. 2009, 448 p.
- ²³ MISTRY, B. D. **Handbook of Spectroscopy Data: Chemistry- UV, IR, PMR, CNMR and Mass Spectroscopy.** Jaipur, India: Oxford Book Company. 2009, 242 p.
- ²⁴ BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Quim. Nova**, v. 32, p. 849-854, 2009.
- ²⁵ NIKOLOVA-DAMYANOVA, B.; VELIKOVA, R.; JHAM, G. N. Lipid classes, fatty acid composition and triacylglycerol molecular species in crude coffee beans harvested in Brazil. **Food Res. Int.**, v. 31, p. 479-486, 1998.
- ²⁶ DIMITRIĆ-MARKOVIĆ, J. M.; MIOĆ, U. B.; BARANAC, J. M.; NEDIĆ, Z. P. Study of the IR spectra of the copigments of malvin chloride with organic acids. **J. Serb. Chem. Soc.**, v. 66, p. 451-462, 2001.

- ²⁷ SEGNEANU, A. E.; GROZESCU, I.; SFIRLOAGA, P. The influence of extraction process parameters of some biomaterials precursors from *Helianthus annuus*. **Dig. J. Nanomater. Bios.** v. 8, 1423-1433, 2013.
- ²⁸ SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuables plant substances by IR and Raman spectroscopy. **Vib. Spectrosc.**, v. 43, p. 13-25, 2007.
- ²⁹ DUFOUR, E. In **Infrared Spectroscopy for Food Quality, Analysis and Control**. Sun, D.-W., ed. USA: Academic Press. 2009, 448 p.

CAPÍTULO 6



Análise espectroscópica por RMN ^1H

1 INTRODUÇÃO

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é utilizada como ferramenta para discriminar amostras vegetais quando as plantas são submetidas a diferentes condições de plantio. RMN é uma técnica universal, rápida e não destrutiva¹. É necessária uma pequena quantidade de amostra e quase nenhuma manipulação é exigida no seu preparo. Em pesquisas realizadas com café, RMN ¹H tem sido usada para estudo da formação do complexo cafeína-clorogenato², identificação de diterpenos³, análise de extratos de grãos crus de café⁴, estudo das mudanças que ocorrem durante o processo de torra⁵⁻⁶, quantificação dos aromas do café⁷ e análise de óleo de café cru⁸ entre outros.

Quando métodos quimiométricos são aplicados aos dados espectrais de RMN, obtidos de amostras de café, estas podem ser classificadas e os seus constituintes identificados para ajudar a discriminar as amostras. Análise das componentes principais (ACP), análise discriminante pela projeção ortogonal para estruturas latentes (OPLS-DA) e análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais (PLS-DA) foram usadas em caracterização geográfica de cafés⁹⁻¹⁰ e para a caracterização metabólica de cafés especiais e comerciais¹¹. Desta maneira, métodos de análise multivariada podem ser aplicados a dados espectrais de RMN ¹H para extrair informação sobre a influência da densidade de plantio sobre a produção de metabólitos especializados em grãos de café.

O objetivo deste capítulo foi analisar os dados espectrais obtidos por RMN ¹H dos extratos de grãos crus de *Coffea arabica* cv. IAPAR 59 cultivados em arranjo quadrado e em duas densidades de plantio. As análises das Componentes Principais (ACP) e a hierárquica (AH) foram aplicadas para estudar os efeitos da densidade de plantio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS DE CAFÉ

As amostras utilizadas para a análise por RMN ^1H foram extratos dos arranjos quadrados (S6 e S10) obtidos por planejamento Simplex Centroides descrito no Capítulo 4. A escolha dos arranjos quadrados foi realizada baseada em que estes apresentaram as maiores diferenças em relação à produção de compostos bioativos, resultados já apresentados no Capítulo 5.

2.2 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA RMN ^1H

Para as análises por RMN ^1H foi pesado 0.0300 g de cada extrato dos tratamentos S6 e S10 (30 amostras) em balança analítica Shimadzu modelo AY220, utilizando tubo do tipo *ependorf*. A dissolução foi realizada com 0.5 mL de dimetilsulfóxido hexadeuterado Sigma-Aldrich (DMSO- d_6) 99.96% contendo 0.03% (v/v) de tetrametilsilano (TMS). A mistura foi agitada em IKA Lab Dancer até completa dissolução. Os espectros de RMN ^1H foram obtidos no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UEL com espectrômetro Bruker Avance III, operando a 400 MHz. Foi utilizada sonda multinuclear inversa de 5 mm (BBI). Os parâmetros de aquisição são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros de aquisição dos dados espectrais

Parâmetro	¹H
Temperatura (K)	298.0
Janela espectral (Hz)	8012.820
Tempo de aquisição (AQ) (s)	4.0894465
Número de pontos coletados (TD)	65526
Número de <i>scans</i>	64
Aumento do sinal (RG)	71.8
Intervalo de amostragem (DW) (μs)	62.400
Resolução FID (Hz)	0.122266

Fonte: O próprio autor

2.3 PROCESSAMENTO DOS DADOS

A matriz de dados dos espectros de RMN ¹H foi inicialmente construída no programa Excel. Para diferenciar os extratos pela sua composição, os dados espectrais foram analisados usando o método das Componentes Principais (ACP) e análise hierárquica (AH). Para tais objetivos foi usado o programa Statistica 7.0. O processamento dos espectros foi realizado usando os programas SpinWork 4.0 e Dmfit, alinhando o sinal do DMSO no espectro RMN ¹H em 2.54 ppm como deslocamento de referência. Os espectros e o gráfico dos *loadings* foram plotados usando o programa Origin Pro 8.

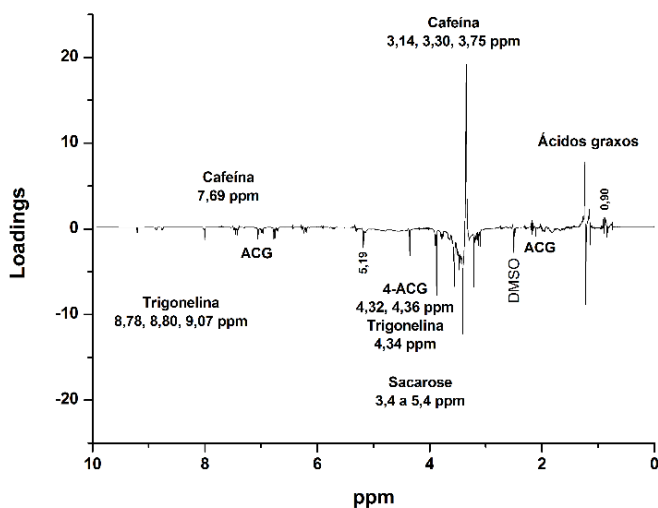
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de visualizar os grupos formados por causa das diferentes densidades de plantio (6.000 plantas ha⁻¹ e 10.000 plantas ha⁻¹), os dados espectrais de RMN ¹H foram submetidos à ACP. As intensidades dos sinais foram colocadas numa matriz formando 9490 linhas e 30 colunas. Cada linha continha as intensidades de cada sinal para um determinado valor de deslocamento químico (ppm) e cada coluna correspondia a um extrato. Os escores da primeira e

extratos obtidos com etanol puro (*e*), suas misturas binárias com diclorometano (*ed*), acetona (*ea*) e hexano (*eh*). As misturas ternárias de etanol com acetona/hexano (*eah*) e acetona/diclorometano (*ead*) e a mistura quaternária (*eadh*) estão também nos escores negativos de CP2.

A Figura 2 mostra o gráfico dos *loadings* da CP2. Ao longo de CP2, *loadings* grandes e positivos são encontrados em 1.22, 1.25, 3.14, 3.30 e 3.75 ppm. Em 7.69 ppm, observa-se um *loading* muito pequeno e positivo. Estes deslocamentos identificam compostos extraídos por solventes ou misturas de solventes do grupo não etanólico. Os extratos do grupo etanólico são caracterizados por *loadings* grandes e negativos na região entre 3.4 e 5.4 ppm. *Loadings* moderados são encontrados em 4.32 e 4.36 ppm e pequenos *loadings*, em 6.77, 6.94, 6.97, 7.05, 7.08, 7.42, 7.46, 7.49 e 7.99 ppm aparecem na região aromática de RMN ^1H (6.8 a 8.0 ppm)¹². *Loadings* muito pequenos encontram-se em 8.78, 8.80 e 9.02 ppm.

Figura 2 – Gráfico dos *loadings* dos espectros de RMN ^1H dos extratos brutos de grãos crus de *C. arabica*, cv. IAPAR 59.



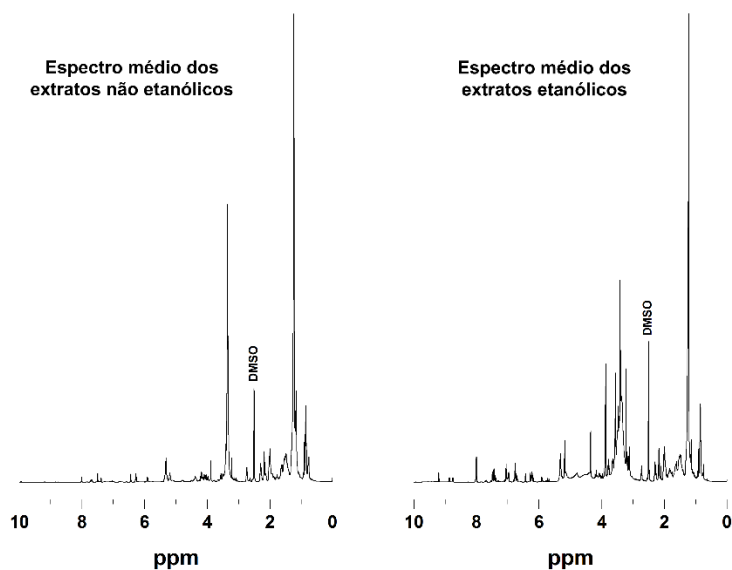
Fonte: O próprio autor

Wei e colaboradores⁴ desenvolveram um trabalho detalhado sobre a atribuição dos deslocamentos químicos em espectros de ^1H e ^{13}C RMN de grãos crus de café. Para este propósito os autores utilizaram extrato aquoso, obtido com D_2O . Para poder atribuir os deslocamentos químicos identificados na Figura 2 aos compostos bioativos do café cru, os espectros de NMR das amostras de café foram divididos em três regiões. A região em campo baixo (5.5 a 8.0 ppm) mostra os sinais característicos de prótons aromáticos. Os prótons dos ácidos clorogênicos (ACG), cafeína e trigonelina têm seus sinais nesta região. Os deslocamentos químicos dos átomos de H dos isômeros dos ACG (3-ACG, 4-ACGe 5-), ligados aos átomos C1, C2, C4, C5 e C8 aparecem entre 6.25 e 7.50 ppm⁴. O sinal do H aromático da cafeína está em 7.69 ppm e a trigonelina pode ser identificada pelos sinais em 8.04, 8.78, 8.80 e 9.07 ppm. Estes deslocamentos podem ser atribuídos aos átomos de H do anel piridínico¹³.

A região de campo médio (3.0 a 5.5 ppm) tem sinais que correspondem a prótons anoméricos de açúcares e prótons olefínicos. Os isômeros dos ACG mostram deslocamentos químicos nesta região atribuídos aos átomos de H ligados aos carbonos C10, C11 e C12⁴. Os átomos de H de ácidos graxos insaturados, diterpenos (cafestol e caveol), trigonelina e três sinais da cafeína (3.14, 3.30 e 3.75 ppm) podem ser encontrados nesta região. O deslocamento químico da trigonelina em 4.34 ppm corresponde ao grupo metila ligado ao nitrogênio do anel piridínico. Em 5.18 ppm encontra-se o sinal do grupo metileno benzílico^{12,14}.

Na região de campo alto (0.8 a 3.0 ppm) encontram-se os sinais correspondentes aos grupos metila, metileno e metino. Os grupos metila terminais de ácidos graxos mostram um sinal em 0.90 ppm e os CH_2 da cadeia interna destes ácidos têm um sinal em 1.28 ppm¹. Desta maneira, as misturas não etanólicas contêm uma maior proporção de cafeína e lipídios enquanto que as misturas etanólicas extraem mais açúcares, ACG e trigonelina. Os espectros médios das regiões etanólica e não etanólica da Figura 1 foram plotados para confirmar as respostas observadas nos *loadings* (Figura 2). Estes espectros são mostrados na Figura 3.

Figura 3 – Espectros médios de RMN ^1H dos extratos não etanólicos e etanólicos obtidos de grãos crus de *C. arabica*, cv. IAPAR 59.



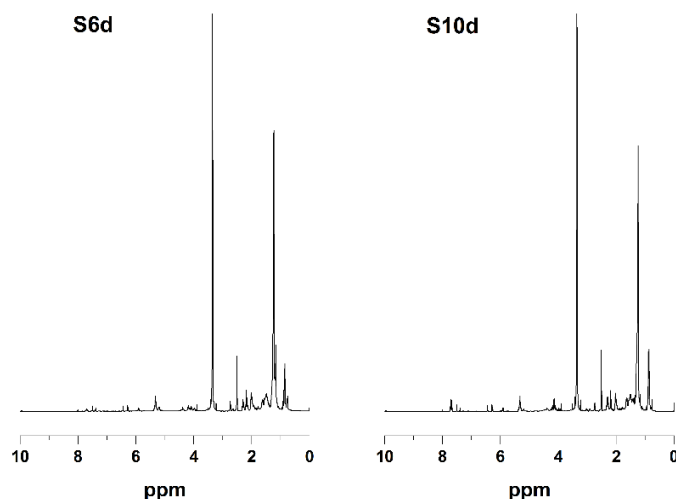
Fonte: O próprio autor

Os dois espectros da Figura 3 têm sinais comuns na região de 0.8 a 3 ppm e na região dos ACG. Os sinais já descritos para ácidos graxos aparecem aqui: metila (0.90 ppm) e metileno (1.23 ppm)¹⁰. O gráfico de *loadings* (Figura 2) mostra valores positivos e negativos para estes grupos. A presença de lipídios nas misturas etanólicas e não etanólicas está relacionado ao hexano que tem sido usado com extrator de lipídios¹⁵. Os deslocamentos químicos dos ACG foram observados em campo baixo (6.25 a 7.50 ppm), campo médio (3.0 a 5.5 ppm) e campo alto (0.8 a 3.0 ppm)⁴.

Os espectros RMN ^1H dos extratos etanólicos e não etanólicos apresentaram diferenças na região dos açúcares e nos sinais de trigonelina. Somente o espectro médio dos extratos etanólicos apresentaram estes sinais característicos. Sacarose é o principal açúcar nos grãos maduros de café¹⁶. Os sinais (ppm) com seu correspondente H foram: 3.45 (HC4 glicose), 3.56 (HC2 glicose), 3.66 (HC1 frutose), 3.78 (HC3 glicose), 3.82 (HC6 glicose), 3.83 (HC6 frutose), 3.88 (HC5 glicose), 3.90 (HC5 frutose), 4.19 (HC4 frutose) e 4.21 (HC3 frutose). Os deslocamentos

químicos da trigonelina foram observados em 4.35, 8.77, 8.87 e 9.20 ppm. A solubilidade da sacarose nas misturas etanólicas é devida às ligações H entre os grupos OH da sacarose e o grupo OH do etanol. A trigonelina se solubiliza nestas misturas porque é um composto mesoiônico. Sua estrutura apresenta uma carga positiva sobre o átomo de N e uma carga negativa no grupo carboxilato. Sua molécula se estabiliza por ressonância¹³. Como os pontos dos extratos em diclorometano e em hexano de S6 e S10 estão bem separados na Figura 1, seus espectros foram plotados para visualizar as diferenças entre ambos tratamentos. A Figura 4 mostra os espectros dos extratos em diclorometano.

Figura 4 - Espectros de RMN ¹H dos extratos em diclorometano obtidos de grãos crus de *C. arabica*, cv. IAPAR 59.



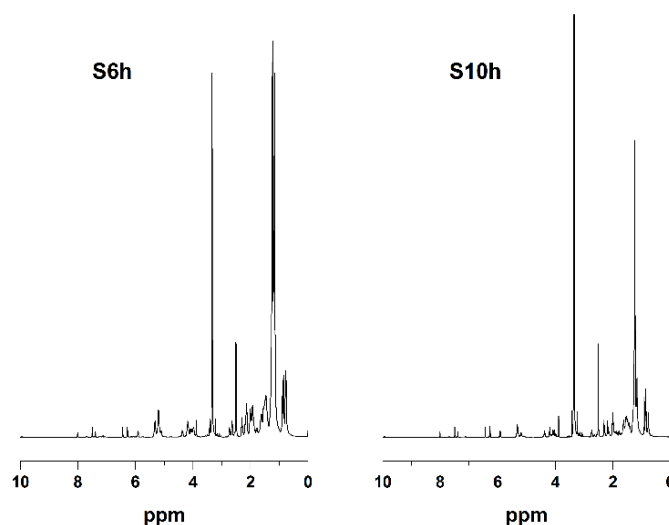
Fonte: O próprio autor

Estes espectros mostram os deslocamentos químicos característicos dos grupos N-metil da cafeína em 3.28, 3.44 e 3.88 ppm¹⁷. O sinal em 7.70 ppm corresponde ao átomo de H ligado ao átomo de C8 do heterociclo aromático da cafeína⁴. Os extratos em diclorometano também contêm ácidos graxos. A região entre 0.7 e 3.0 ppm é atribuída a estes compostos¹¹. Os dois

primeiros sinais correspondem aos grupos metila e metileno de ácidos graxos⁹. Os deslocamentos químicos em 4.24 e 4.29 ppm correspondem ao H ligado ao C12 do 5-ACG⁴.

Os espectros dos extratos em hexano (Figura 5) mostram os deslocamentos químicos característicos de grupos metila em $\delta < 1$ ppm. O sinal do grupo metileno também está presente em 1.22 ppm. Seu sinal é mais intenso que os do grupo metila¹². Isto indica que há um grande número destes grupos e eles podem ser atribuídos às longas cadeias de ácidos graxos. Os deslocamentos químicos dos ACG também estão presentes nos espectros dos extratos de hexano. Os sinais entre 1.90 e 2.18 ppm podem ser atribuídos aos hidrogênios dos grupos metileno dos C13 e C15 nos ácidos cafeoilquínicos (ACQ): 3-ACQ, 4-ACQ e 5-ACQ. Os sinais dos prótons aromáticos dos ACQ estão entre 6.25 e 8.00 ppm. Os deslocamentos químicos dos grupos N-metil da cafeína estão presentes em 3.22, 3.35 e 3.88 e o dos prótons aromáticos, em 7.70 ppm¹⁷.

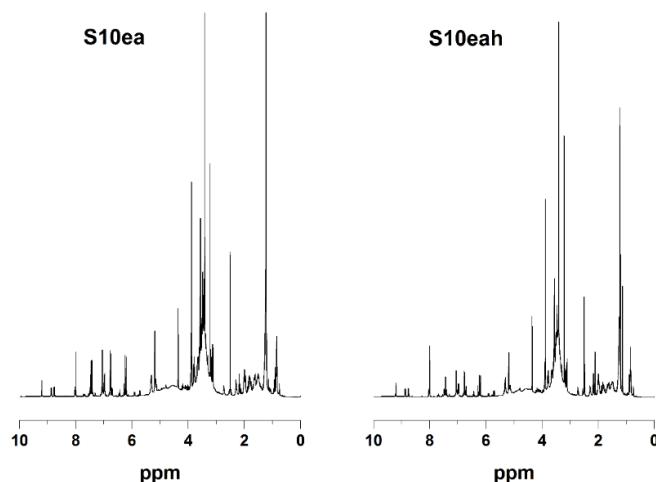
Figura 5 - Espectros de RMN ¹H dos extratos em hexano obtidos de grãos crus de *C. arabica*, cv. IAPAR 59.



Fonte: O próprio autor

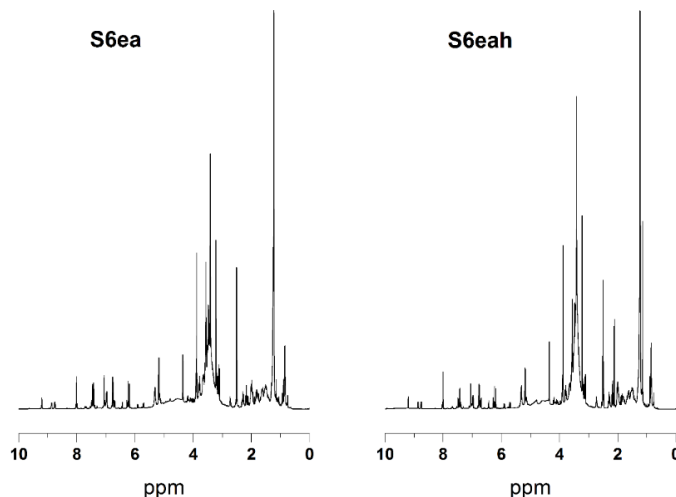
Os pontos terminais dos espectros de RMN ^1H dos extratos do grupo etanólico, *ea* e *eah* (Figura 1), foram plotados com o objetivo de visualizar e identificar os deslocamentos químicos. As Figuras 6 e 7 mostram estes espectros para os tratamentos S10 e S6. A região dos prótons alifáticos está presente nos quatro espectros: a região entre 0.8 e 1.24 ppm corresponde aos ácidos graxos e triacilgliceróis²; os metilenos do ácido quínico, entre 1.88 e 2.08 ppm⁴ e o H ligado aos C13 e C15 dos ACG são identificados entre 2.04 e 2.24 ppm. Os deslocamentos químicos dos prótons aromáticos dos ACG foram observados na região de 6.0 a 8.0 ppm. Os sinais da trigonelina foram encontrados em 4.35 (N-metil), 8.0, 8.86 e 9.2 ppm. Estes três últimos correspondem aos prótons aromáticos ligados aos C5, C4/C6 e C2 respectivamente².

Figura 6 - Espectros RMN ^1H dos extratos em etanol/acetona (*ea*) e etanol/acetona/hexano (*eah*) do tratamento S10 obtidos de grãos crus de *C. arabica*, cv. IAPAR 59.



Fonte: O próprio autor

Figura 7 - Espectros RMN ^1H dos extratos em etanol/acetona (*ea*) e etanol/acetona/hexano (*eah*) do tratamento S6 obtidos de grãos crus de *C. arabica*, cv. IAPAR 59.



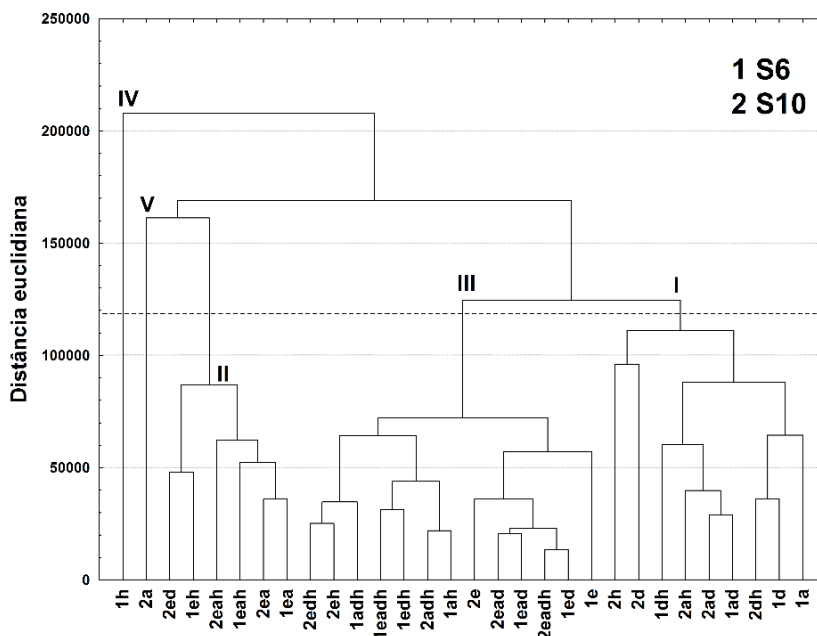
Fonte: O próprio autor

Os deslocamentos químicos dos carboidratos foram encontrados entre 3.5 e 5.5 ppm¹⁸. Os átomos de H da sacarose apresentaram os seus sinais (ppm) em 3.46 (HC4 glicose), 3.57 (HC2 glicose), 3.68 (HC1 frutose), 3.78 (HC3 glicose), 3.82 (HC6 glicose), 3.83 (HC6 frutose), 3.87 (HC5 glicose), 3.89 (HC5 frutose), 4.18 (HC4 frutose) e 4.21 (HC3 frutose). O H ligado ao carbono anomérico da glicose tem sinal em 5.41 ppm⁴. Este sinal não foi facilmente observado nos espectros (Figuras 6 e 7) devido à sobreposição com os sinais dos ACG. Os espectros dos extratos em *eah* de ambos tratamentos mostraram um deslocamento químico em 2,11 ppm. Este sinal pode ser atribuído a um grupo metileno ligado a C=C ou C=O¹⁹, indicando a possível presença de ácidos graxos insaturados nos extratos contendo hexano.

O dendrograma obtido através da análise hierárquica é apresentado na Figura 8 e confirma os resultados da ACP. Quando o dendrograma é examinado no ponto 120.000 são discriminados cinco grupos. Os Grupos I e II correspondem aos grupos não etanólico e etanólico da Figura 1. Um terceiro grupo é formado pelos extratos localizados na intercessão desses dois grupos

(Figura 1). Os extratos em hexano de S6 e em acetona de S10 são anômalos (*outliers*). Isto indica que suas composições são muito diferentes daquelas do grupo não etanólico, embora ambos possuam escores positivos na CP2.

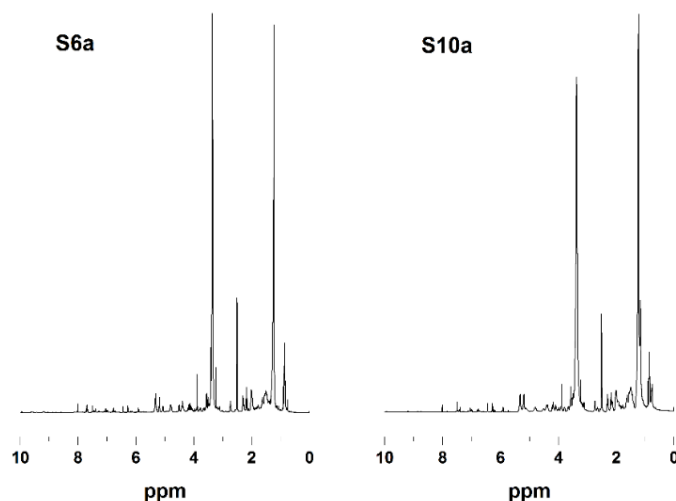
Figura 8 - Dendrograma dos espectros de RMN ^1H dos extratos brutos de grãos crus de *C. arabica*, cv. IAPAR 59.



Fonte: O próprio autor

Os espectros dos extratos em hexano e a identificação dos sinais já foram descritos. O dendrograma mostra que os extratos em acetona separam os tratamentos S6 e S10. Por esta razão, os espectros dos extratos em acetona dos dois tratamentos foram plotados para identificar qual a diferença na composição de S6 e S10 (Figura 9). A região entre 0 e 4 ppm mostrou sinais em 1.98, 2.03, 2.16, 2.18, 2.20 e 2.28 ppm atribuídos à estrutura base do ácido quínico. Os sinais da sacarose aparecem em 3.47 (HC4 glicose), 3.56 (HC2 glicose), 3.66 (HC1 frutose), 3.78 (HC3 glicose), 3.82 (HC6 glicose/HC6 frutose) e 3.88 (HC5 glicose/HC5 frutose) ppm como já descrito nas Figuras 6 e 7. Estes sinais não apareciam no espectro médio do grupo não etanólico (Figura 3) ao qual pertence os extratos em acetona.

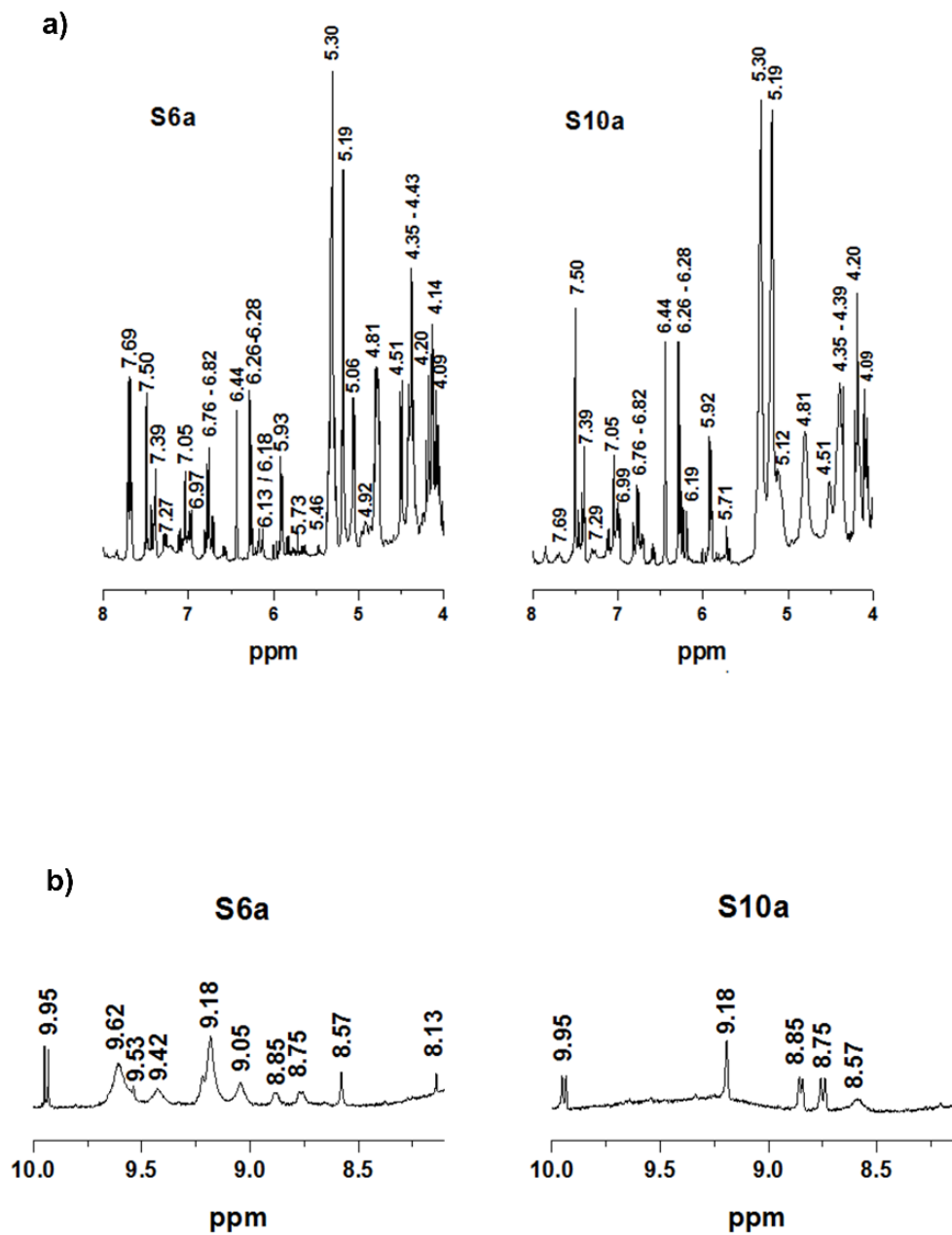
Figura 9 - Espectros de RMN ^1H dos extratos em acetona de S6 e S10 obtidos de grãos crus de *C. arabica*, cv. IAPAR 59.



Fonte: O próprio autor

As regiões entre 4 e 8 (Figura 10a) e entre 8 e 10 (Figura 10b) ppm foram expandidas para visualizar e identificar as diferenças entre os tratamentos S6 e S10. Os deslocamentos químicos da sacarose foram observados em 4.09 (HC3 frutose) e 4.20 (HC4 frutose) ppm. O sinal da trigonelina foi em 4.35 ppm e o sinal aromático da cafeína foi em 7.69 ppm. O deslocamento químico em 5.19 ppm identificou a presença do metileno do grupo benzílico. Os sinais dos ACG foram observados entre 4.18 e 7.50 ppm. A Tabela 2 mostra os deslocamentos químicos atribuídos aos átomos de H dos ACG e sua correspondência com os isômeros destes ácidos⁴. Dois sinais em 4.14 e 5.46 ppm foram encontrados apenas no espectro do extrato em acetona de S6 (Figura 10a). O sinal em 4.14 ppm pode ser atribuído ao grupo metino ligado a OH na estrutura do ácido quínico e o sinal em 5.46 ppm, pertencente ao H ligado ao carbono anomérico da glicose⁴.

Figura 10 - Espectros de RMN ^1H dos extratos em acetona de S6 e S10 nas regiões de (a) 4.0 -8.0 ppm e (b) 8.0-10.0 ppm. Os extratos foram obtidos de grãos crus de *C. arabica*, cv. IAPAR 59.



Fonte: O próprio autor

Tabela 2 – Deslocamentos químicos atribuídos aos átomos de H dos isômeros dos ACG

Sinal (ppm) no espectro de S6a	Sinal (ppm) no espectro de S10a	3-ACG	4-ACG	5-ACG
4.18	4.19	C10H	-----	-----
4.35 – 4.43	4.35 – 4.39	-----	C10H/C12H	-----
4.92	-----	-----	C11H	
5.30	5.30	-----	-----	C10H
5.37*	5.38*	C12H	-----	-----
6.27	6.29	C1H	C1H	C1H
6.76 – 6.82	6.76 – 6.82	C4H /C5H	C4H /C5H	C4H /C5H
6.97	6.99	C8H	C8H	C8H
7.27	7.29	-----	-----	C2H
7.50	7.50	C2H	C2H	-----

* Sinal sobreposto

Fonte: O próprio autor

A abundância relativa de dois sinais presentes em ambos espectros da Figura 10a merece comparação. É o caso do sinal da cafeína em 7.69 ppm e o C2H dos isômeros 3-ACG e 4-ACG em 7.50 ppm. No espectro de S6a, os dois sinais apresentaram a mesma intensidade enquanto que no espectro de S10a, O sinal da cafeína diminui e o dos isômeros do ACG aumenta numa menor extensão. Estudos mostraram que o conteúdo de cafeína era maior em folhas de café expostas ao sol do que nas expostas à sombra²⁰. Da mesma maneira, os grãos de café do tratamento S6 (menor densidade de plantio) poderia produzir mais cafeína que os grãos produzidos por S10 (maior densidade de plantio). Os ACG tiveram uma resposta fraca à exposição de radiação. Estudos têm mostrado que 3-ACG diminui em condições de alta luminosidade enquanto que 4-ACG aumenta²¹.

Na região entre 8.0 e 10.0 ppm, o espectro de S6a mostrou os deslocamentos químicos de trigonelina em 8.13, 8.75, 8.85 e 9.05 ppm (Figura 10b). O espectro de S10 apresentou apenas os sinais 8.75 e 8.85 ppm. Sinais largos foram observados em 9.42, 9.53 e 9.62 ppm no espectro de extrato em acetona de S6. Sinais de próton aldeídico são encontrados na região entre 9.0 e 10.0 ppm com estas características^{12,17}. Em pesquisas com café cru foi observada a presença de

aldeídos insaturados²². Estes compostos foram formados por auto-oxidação de ácidos graxos insaturados, principalmente ácido linoleico. As estruturas dos aldeídos foram elucidadas por espectrometria de massas, FTIR e RMN. Os deslocamentos químicos encontrados pelos autores possuíam os mesmos valores que aqueles da Figura 10b. O tratamento S6 estava mais exposto à radiação solar do que S10 devido à maior separação entre plantas e radiação é um dos fatores que inicia a auto-oxidação de cadeias insaturadas de lipídios²³. O deslocamento químico em 9.95 ppm apresenta um dublete e corresponde a um H aldeídico. Isto poderia indicar que o H está próximo a um C sp². O sinal em 8.57 ppm é atribuído a H ligado a C sp² em um heterociclo com nitrogênio e o sinal em 8.13 ppm corresponde a H ligado a um grupo C=O de éster ou amida⁴.

CONCLUSÃO

A análise das componentes principais (ACP) dos espectros de RMN ¹H mostraram diferenças na impressão digital entre os extratos etanólicos e não etanólicos. As regiões correspondentes aos ácidos graxos e aos ACG estavam presentes nos espectros médios dos dois tipos de extratos. Apenas o espectro médio dos extratos etanólicos apresentou os deslocamentos químicos característicos de açúcares e trigonelina. Os espectros dos pontos extremos do grupo etanólico (extratos *ea* e *eah*) mostraram deslocamentos químicos correspondentes a ácidos graxos, açúcares e ACG. O sinal em 2,11 ppm nos espectros de *S6eah* e *S10eah* indicaram a presença de ácidos graxos insaturados

Os espectros dos pontos extremos do grupo não etanólico, representados pelos extratos em diclorometano e em hexano de S6 e S10, possuíam deslocamentos químicos de ácidos graxos, cafeína e ACG, não apresentando diferenças entre os dois tratamentos. Os extratos em acetona ficaram bem separados na análise hierárquica. A comparação das abundâncias relativas dos sinais de cafeína e ACG indicou que o tratamento de menor densidade de plantio produziu maior

teor de cafeína, provavelmente por ter maior disponibilidade de luz. Somente o espectro do extrato em acetona de S6 apresentou sinais característicos de aldeído insaturado. A formação destes compostos a partir de ácidos graxos insaturados poderia ser induzida pela maior radiação solar à qual está submetido o tratamento de baixa densidade de plantio (S6).

REFERÊNCIAS

- ¹ FARAG, M. A.; PORZEL, A.; SCHMIDT, J.; WESSJOHANN, L. A. Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): a comparison of MS and NMR methods in metabolomics. **Metabolomics**, v. 8, p. 492-507, 2012.
- ² D'AMELIO, A.; FONTANIVE, L.; UGGERI, F.; SUGGI-LIVERANI, F.; NAVARINI, L. NMR resolution of the caffeine-chlorogenate complex in aqueous solution and coffee brews. **Food Biophys.**, v. 4, p. 321-330, 2009.
- ³ SHARNHOP, H.; WINTERHALTER, P. Isolation of coffee diterpenes by means of high-speed countercurrent chromatography. **J. Food Comp. Anal.**, v. 22, p. 233-237, 2009.
- ⁴ WEI, F.; FURIHATA, K.; HU, F.; MIYAKAWA, T.; TANOKURA, M. Complex mixture analysis of organic compounds in green coffee bean extract by two-dimensional NMR spectroscopy. **Magn. Reson. Chem.**, v. 48, p. 857-865, 2010.
- ⁵ CIAMPA, A.; RENZI, G.; TAGLIANTI, A.; SEQUI, P.; VALENTINI, M. Studies on coffee roasting process by means of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **J. Food Quality**, v. 33, p.199-211, 2010.
- ⁶ WEI, F.; FURIHATA, K.; KODA, M.; HU, F.; MIYAKAWA, T.; TANOKURA, M. Roasting process of coffee beans as studied by nuclear magnetic resonance: time course of changes in composition. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, p. 1005-1012, 2012.
- ⁷ CAGLIANI, L. R.; PELLEGRINO, G.; GIUGNO, G.; CONSONNI, R. (2013). Quantification of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. robusta in roasted and ground coffee blends. **Talanta**, v. 106, p. 169-173, 2013.
- ⁸ D'AMELIO, A.; DE ANGELIS, E.; NAVARINI, L.; SCHIEVANO, E.; MAMMI, S. Green coffee oil analysis by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Talanta**, v. 110, p. 118-127, 2013.
- ⁹ CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R.; COGLIATI, C. NMR based geographical characterization of roasted coffee. **Talanta**, v. 88, p. 420-426, 2012.
- ¹⁰ ARANA, V. A.; MEDINA, J.; ALARCON, R. et al. Coffee's country of origin determined by NMR: The Colombian case. **Food Chem.**, v. 175, p. 500-506, 2015.
- ¹¹ KWON, D-J.; JEONG, H-J.; MOON, H. et al. Assessment of green coffee bean metabolites dependent on coffee quality using ¹H NMR-based metabolomics approach. **Food Res. Internat.**, v. 67, p. 175-182, 2015.
- ¹² PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction of Spectroscopy: A guide for students of organic chemistry**, 2th ed.; Saunders College Publishing, Orlando, USA. 1996, pp. 511
- ¹³ MACHADO, A. R. T.; LAGE, G. A.; MEDEIROS, F. S.; FILHO, J. D. S.; PIMENTA, L. P. S. Quantitative analysis of trigonelline in some *Annona* species by proton NMR spectroscopy. **Nat. Prod. Bioprospect.**, v. 3, p. 158-160, 2013.

- ¹⁴ CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. 2nd. ed. Oxford University Press Inc., New York, USA, 2012. 1265 pp.
- ¹⁵ BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Quim. Nova**, v. 32, p. 849-854, 2009.
- ¹⁶ REDGWELL, R.; FISCHER, M. (2006). Coffee carbohydrates. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 18, p. 165-174, 2006.
- ¹⁷ BOSCO, M.; TOFFANIN, R.; DE PALO, D.; ZATT, L.; SEGRE, A. High-resolution ¹H NMR investigation of coffee. **J. Sci. Food Agric.**, v. 79, p. 869-878, 1999.
- ¹⁸ MACHADO, A. R. T.; CAMPOS, V. A. C.; SILVA, W. J. R.; CAMPOS, V. P.; ZERI, A. C. M.; OLIVEIRA, D. F. Metabolic profiling in the roots of coffee plants exposed to the coffee root-knot nematode, *Meloidogyne exigua*. **Eur. J. Plant. Pathol.**, v. 134, p. 431-441, 2012.
- ¹⁹ MISTRY, B. D. **Handbook of Spectroscopy Data: Chemistry -UV, IR, PMR, CNMR and Mass Spectroscopy**, Oxford Book Company, Jaipur, India, 2009, pp.242.
- ²⁰ DELAROZA, F.; RAKOCEVIC, M.; MALTA, G. B. et al. (2014). Spectroscopic and chromatographic fingerprint analysis of composition variations in *Coffea arabica* leaves subject to different light conditions and plant phenophases. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 25, p. 1929-1938, 2014.
- ²¹ MARTINS, S. C. V.; ARAÚJO, W. L.; TOGHE, T.; FERNIE, A. R.; DA MATTA, F. M. In high-light-acclimated coffee plants the metabolic machinery is adjusted to avoid oxidative stress rather than to benefit from extra light enhancement in photosynthetic yield. **PLoS One**, v. 9, e94862, 2014.
- ²² BOOSFELD, J.; VITZTHUM, O. G. Unsaturated aldehydes: identification from green coffee. **J. Food Sci.**, v. 60, p. 1092-1096, 1995.
- ²³ WĄSOWICZ, E.; GRAMZA, A.; HEŃ, M. et al. Oxidation of lipids in foods. **Pol. J. Food Nutr. Sci.**, v. 13/54, p. 87-100, 2004.

CONCLUSÃO GERAL



CONCLUSÃO GERAL

A aplicação de planejamento fatorial permitiu concluir que o tipo de arranjo, a densidade de plantio e a interação entre eles não influenciam nos teores de minerais totais (cinzas) e lipídios das amostras de grãos crus dos quatro tratamentos analisados no nível de 95% de confiança.

A densidade de plantio influenciou no teor de minerais específicos analisados por EDXRF, diferenciando os tratamentos através da análise das componentes principais. Os de menor densidade (S6 e R6) apresentaram maior conteúdo de Mn e P enquanto que os de maior densidade (S10 e R10) se caracterizaram por um maior teor de Cu, K e Ca. Fe e S foram os minerais que diferenciaram o tratamento R6 dos outros três.

A polaridade dos compostos presentes no café foi determinante nos rendimentos alcançados. Os solventes mais polares do planejamento Simplex Centroide, etanol e a mistura etanol: acetona, apresentaram os maiores rendimentos, enquanto que com hexano (apolar) foram obtidos os menores rendimentos. Neste trabalho, o modelo quadrático ajustou-se para o cálculo dos rendimentos com coeficientes de determinação $\geq 0,9$.

A espectroscopia UV-Vis permitiu caracterizar os perfis dos compostos bioativos nesta região. Os tratamentos foram separados pelos teores de ácidos clorogênicos, cafestol e cafeol. O maior teor de ACG foi encontrado nos tratamentos de menor densidade de plantio (S6 e R6). Os lipídios insaponificáveis e/ou cafeína, caracterizados nos extratos em diclorometano e hexano, apresentaram-se em maior quantidade nos arranjos quadrados (S10 e S6). Esses resultados foram confirmados pela análise hierárquica dos dados de FTIR. A análise de espectros nesta região sugere que os tratamentos S6 e R10 possuem maior teor de lipídios enquanto que S10 e R6 se caracterizam por maiores conteúdos de carboidratos e proteínas. O estudo exploratório dos extratos lipídicos na região do infravermelho também indicou que os arranjos quadrados (S6 e S10) poderiam

ser caracterizados por uma maior quantidade de cafeína enquanto que nos retangulares se evidencia a presença de ácidos graxos insaturados.

Em relação aos arranjos quadrados (S6 e S10), cujos extratos foram analisados por RMN ^1H , a ACP mostraram diferenças na composição entre os extratos etanólicos e não etanólicos, sendo que apenas os etanólicos apresentaram os sinais característicos de açúcares e trigonelina. A presença de ácidos graxos insaturados foi confirmada também nos arranjos quadrados por esta técnica. A influência da densidade de plantio pôde ser observada nos extratos obtidos com acetona, quando comparadas as abundâncias relativas dos sinais de cafeína e ACG. A maior abundância relativa de cafeína e a presença de sinais característicos de aldeído insaturado no extrato acetônico de S6 indicariam que a formação destes compostos poderia ter sido induzida pela maior radiação solar à qual está submetido o tratamento de baixa densidade de plantio.

O uso de técnicas espectroscópicas com mínima preparação de amostra além do manejo simples dos equipamentos e de seus softwares são recomendados para análise de metabólitos presentes em amostras cruas e extratos vegetais. Estas técnicas associadas aos métodos quimiométricos utilizados neste trabalho, permitiram diferenciar a produção dos metabólitos aos arranjos e densidade de plantio estudados. Cabe destacar que a RMN ^1H mostrou detalhes nos seus espectros que não foram observados nas espectroscopias UV-Vis e FTIR.