



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JAQUELINE MUNISE GUIMARÃES DA SILVA

**DISCRIMINAÇÃO ESPECTROSCÓPICA NA REGIÃO DO UV
DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE E TORRADO DAS ESPÉCIES
C. ARABICA E *C. CANEPHORA***

JAQUELINE MUNISE GUIMARÃES DA SILVA

**DISCRIMINAÇÃO ESPECTROSCÓPICA NA REGIÃO DO UV
DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE E TORRADO DAS ESPÉCIES
C. ARABICA E *C. CANEPHORA***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora Prof^a. Dra. Ieda Spacino Scarminio

Londrina
2021

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

J36	<p>Silva, Jaqueline Munise Guimarães da. Discriminação espectroscópica de grãos de café verde e torrado das espécies C. arabica e C. canephora. / Jaqueline Munise Guimarães da Silva. - Londrina, 2021. 82 f. : il.</p> <p>Orientador: Ieda Spacino Scarminio . Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2021. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Quimiometria - Tese. 2. Planejamento estatístico de mistura - Tese. 3. Análise das Componentes Principais - Tese. 4. Análise de Variância por Análise de Componentes Simultâneos - Tese. I. Scarminio , Ieda Spacino . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.</p> <p>CDU 54</p>
-----	---

JAQUELINE MUNISE GUIMARÃES DA SILVA

**DISCRIMINAÇÃO ESPECTROSCÓPICA NA REGIÃO DO UV
DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE E TORRADO DAS ESPÉCIES
C. ARABICA E *C. CANEPHORA***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Profa. Dra. Yohandra Reyes Torres
Universidade Estadual do Centro Oeste
UNICENTRO

Londrina, 12 de março de 2021.

Dedico este trabalho aos meus
irmãos Julio, Juliana e Carlos (meus
presentes) e aos meus pais que
nunca desistem de mim.

AGRADECIMENTOS

A Prof^ª. Dra. Ieda Spacino Scarminio pela orientação e ensinamento ao longo do curso.

Aos colegas do Laboratório de Quimiometria em Ciências Naturais pelos conselhos, compartilhamentos de experiência e paciência.

Aos alunos de pós graduação do Laboratório em Quimiometria em Ciências Naturais pelo apoio.

Aos docentes que lecionaram as disciplinas cursadas.

Aos colegas de outras pesquisas, que embora não pertencessem ao mesmo laboratório, sempre alimentaram meus dias com risos e abraços.

Todas as coisas foram feitas por ele, e sem ele nada do que foi feito se fez.

SILVA, Jaqueline Munise Guimarães da. **Discriminação espectroscópica de grãos de café verde e torrado das espécies *C. arabica* e *C. canephora***. 2021. 81 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

Em virtude da expansão da cafeicultura no Brasil, pesquisas com enfoque na análise química revelam-se importantes para que a qualidade e especificação do produto sejam monitoradas. Desse modo, a partir de amostras comerciais e um planejamento de mistura realizaram-se duas pesquisas. A primeira teve ênfase na discriminação de grãos verdes e torrados das espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* por meio das impressões digitais obtidas por espectrofotometria na região ultravioleta. Em adição, desenvolveu-se uma segunda pesquisa, cujo intuito foi identificar os metabólitos que variaram à medida que *Coffea arabica* foi adicionado ao *Coffea canephora*, uma vez que os cafés comercializados podem conter a combinação de ambos. Por meio da Análise das Componentes Principais das impressões digitais verificou-se que a mistura binária (etanol:água 1:1 v:v) e ternária (isopropanol:etanol:água 1:1:1 v:v:v) são combinações de solventes que extraem metabólitos que diferenciam os cafés, sendo eles ácidos clorogênicos e metilxantinas. Os resultados da Análise de Variância por Componentes Simultâneos indicaram a partir da mistura binária que os fatores torra (processamento) e espécie são significativos para a discriminação dos cafés, e para a mistura ternária, os fatores espécie, processamento e a interação entre ambos foram significativos para a discriminação. No estudo das proporções 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 e 100:0 (%) de *Coffea arabica*:*Coffea canephora*, utilizando isopropanol:etanol (1:1, v:v) verificou-se nos grãos verdes que maiores proporções de *C. canephora* apresentam maior abundância relativa de ácidos clorogênicos (219 e 332 nm). Nos grãos torrados averiguou-se que maiores porcentagens de *C. arabica* apresentam maiores concentrações relativas de metabólitos com absorção em 289 nm.

Palavras-chave: quimiometria; planejamento estatístico de mistura; análise das componentes principais; análise de variância por análise de componentes simultâneos; metabólitos.

SILVA, Jaqueline Munise Guimarães da. **Discriminação espectroscópica de grãos de café verde e torrado das espécies *C. arabica* e *C. canephora***. 2021. 81 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Due to the expansion of coffee production in Brazil, research focusing on chemical analysis is relevant for the quality and specification of the product has been monitored. Thus, from commercial samples and a mixture of planning took place two surveys. The first emphasized the discrimination of green and roasted grains of the species *Coffea arabica* and *Coffea canephora* by means of the fingerprints obtained using spectrophotometry in the ultraviolet region. The second research aimed to identify the metabolites that varied as *Coffea arabica* was added to *Coffea canephora*, since the commercialized coffees may contain the combination of both. The fingerprints Principal Component Analysis found that the binary (ethanol: water 1: 1 v: v) and ternary (isopropanol: ethanol: water 1: 1: 1 v: v: v) mixture are combinations of solvents that extract metabolites that differentiate coffees, namely chlorogenic acids and methylxanthines. The results of the Analysis of Variance by Simultaneous Components indicated from the binary mixture that the factors roasting (processing) and species are significant for the discrimination of the coffees. For the ternary mixture, the factors species, processing and the interaction between both were significant. for discrimination. In the study of the proportions 0: 100, 25:75, 50:50, 75:25 and 100: 0 (%) of *Coffea arabica*: *Coffea canephora*, using isopropanol: ethanol (1: 1, v: v) showed that green grains with higher proportions of *C. canephora* have a higher relative abundance of chlorogenic acids (219 and 332 nm). In the roasted grains, the higher percentages of *C. arabica* have more relative concentrations of metabolites at 289 nm.

Keywords: chemometrics; mixture design; principal component analysis; analysis of variance by simultaneous component analysis; metabolites.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1** Principais estruturas dos ácidos clorogênicos, sendo: a) ácido fenílico; b) ácido cafeico; c) ácido-5-cafeoilquínico; d) ácido-trans-cinâmico; e) D-(-)-ácido quínico 24
- Figura 2** Estrutura química da cafeína..... 27
- Figura 3** Estrutura química da trigonelina..... 29
- Figura 4** Estrutura química do 5-hidroximetil-2-furfural 31

CAPÍTULO 3

- Figura 1** A) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. arabica* e *C. canephora* torrados obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas. B) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos torrados. C) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. arabica* e *C. canephora* torrados obtidos a partir dos solventes selecionados. D) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos torrados. 41
- Figura 2** A) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. arabica* e *C. canephora* verde obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas. B) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes. C) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. arabica* e *C. canephora* verde obtidos a partir dos solventes selecionados. D) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes..... 46
- Figura 3** A) Gráfico dos escores da Análise de Componentes Principais (ACP) (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. arabica*. Verde e torrado obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas. B) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de *C. arabica*. C) Gráfico dos escores da

Análise de Componentes Principais (ACP) (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. arabica* verde e torrado obtidos a partir dos solventes selecionados. D) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de *C. arábica*50

Figura 4

A) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. canephora* verde e torrado obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas. B) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos *C. canephora* verde e torrado. C) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. canephora* verde e torrado obtidos a partir dos solventes selecionados. D) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos *C. canephora* verde e torrado53

Figura 5

A) Gráfico dos escores da Análise de Variância por Análise de Componentes Simultâneos (ASCA) (CP1 x F1) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. arabica* e *C. canephora* obtidos a partir das réplicas de *ea*. B) Gráfico dos escores da Análise de Variância por Análise de Componentes Simultâneos (ASCA) (CP1 x F2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos verdes e torrados obtidos a partir das réplicas de *ea*. C) Gráfico dos *loadings* para as bandas de maior relevância para as espécies e processamento.....57

Figura 6

A) Gráfico dos escores da Análise de Variância por Análise de Componentes Simultâneos (ASCA) (CP1 x F1) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. arabica* e *C. canephora* obtidos a partir das réplicas de *iea*. B) Gráfico dos escores da Análise de Variância por Análise de Componentes Simultâneos (ASCA) (CP1 x F2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos verdes e torrados obtidos a partir das réplicas de *iea*. C) Gráfico dos escores de Variância por Análise de Componentes Simultâneos (ASCA) (CP1 x F1x F2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. arabica*, *C. canephora*,

	verde e torrado obtidos a partir das réplicas de <i>iea</i> . D) Gráfico dos <i>loadings</i> para as bandas de maior relevância para as espécies e processamento.....	59
Figura 7	Dendograma obtido pelo método de Ward das impressões digitais espectroscópicas na região do UV da mistura <i>C. arabica</i> : <i>C. canephora</i> para grãos verdes. Os números referem-se à proporção de <i>C. arabica</i>	60
Figura 8	Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais da região do UV para os grãos verdes nas proporções de 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 e 100:0 (%) de <i>C. arábica</i>	63
Figura 9	Gráfico dos <i>loadings</i> da CP1 x CP2 para as impressões digitais de UV para as diferentes proporções de <i>C. arábica</i>	63
Figura 10	Espectros dos extratos de <i>C. arabica</i> e <i>C. canephora</i> verdes em mistura binária etanol:isopropanol (1:1 v:v)	65
Figura 11	Espectros dos extratos médios das proporções de <i>C. arabica</i> e <i>C. canephora</i> verdes em mistura binária etanol:isopropanol (1:1 v:v)	65
Figura 12	Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP2 x CP3) das impressões digitais espectrais da região do UV para os grãos verdes nas proporções de 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 e 100:0 (%) de <i>C. arabica</i> : <i>C. canephora</i>	66
Figura 13	Gráfico dos <i>loadings</i> da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP2 x CP3) das impressões digitais espectrais da região do UV para os grãos verdes nas proporções de 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 e 100:0 (%) de <i>C. arabica</i> : <i>C. canephora</i>	67
Figura 14	Dendograma obtido pelo método de Ward das impressões digitais espectroscópicas na região do UV da mistura <i>C. arabica</i> : <i>C. canephora</i> para grãos de café torrados. Os números referem-se à proporção de <i>C. arábica</i>	68
Figura 15	Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais da região do UV para os grãos torrados nas proporções de 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 e 100:0 (%) de <i>C. arábica</i>	69
Figura 16	Gráfico dos <i>loadings</i> da Análise das Componentes Principais das	

impressões digitais espectrais da região do UV para os grãos torrados nas proporções de 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 e 100:0 (%) de *C. arabica*:*C. canephora* 71

Figura 17 Espectros dos extratos médios das proporções de *C. arabica* e *C. canephora* torrados em mistura binária etanol:isopropanol (1:1 v:v) 71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Parâmetros de Snyder para os solventes e misturas utilizadas: acidez (x_d), basicidade (x_e) e dipolaridade (x_n) e polaridade (P) 33
Tabela 2	Planejamento experimental centrado simples para os solventes: água ultrapura (a), etanol (e), hexano (h) e isopropanol (i)..... 34
Tabela 3	Massa das amostras de café conforme planejamento de mistura de dois componentes 35

CAPÍTULO 4

Tabela 1	Parâmetros obtidos pela ASCA conforme as análises adicionais de etanol e água..... 54
Tabela 2	Parâmetros obtidos pela ASCA conforme as análises adicionais de isopropanol, etanol e água..... 55

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	15
1.1	INTRODUÇÃO.....	16
1.2	OBJETIVOS	20
1.2.1	Objetivo Geral.....	20
1.2.2	Objetivos Específicos	20
2	CAPÍTULO 2 – BREVE DESCRIÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ	21
2.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ	22
3	CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	MATERIAL VEGETAL.....	34
3.2	PLANEJAMENTO DE MISTURA E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	34
3.3	PREPARAÇÃO DAS PROPORÇÕES DAS ESPÉCIES <i>C. ARABICA</i> E <i>C. CANEPHOR</i>	35
3.4	ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA	37
3.5	ANÁLISE MULTIVARIADA.....	37
3.5.1	Análise Exploratória Para Todos Os Pontos Do Planejamento.....	37
3.5.2	Análise Exploratória Das Proporções Das Espécies	38
4	CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
4.1	DISCRIMINAÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE E TORRADO DAS ESPÉCIES <i>C. ARABICA</i> E <i>C. CANEPHORA</i>	39
4.1.1	Análise Exploratória Das Impressões Digitais Espectrais Na Região Do UV De Grãos De Café Torrado Entre Espécies De <i>C. Arabica</i> E <i>C. Canephora</i>	39
4.1.2	Análise Exploratória Das Impressões Digitais Espectrais Na Região Do UV De Grãos De Café Verde Entre Espécies De <i>C. Arabica</i> E <i>C. Canephora</i>	45
4.1.3	Análise Exploratória Das Impressões Digitais Espectrais Na Região Do UV De <i>C. Arabica</i> Entre Grãos Verdes E Torrados	48
4.1.4	Análise Exploratória Das Impressões Digitais Espectrais Na Região Do UV De <i>C. Canephora</i> Entre Grãos Verdes E Torrados	55
4.1.5	Avaliação Dos Efeitos Espécie E Processamento Em Grãos De Café Usando ASCA	55

4.2	ESTUDO DAS PROPORÇÕES ENTRE AS ESPÉCIES <i>C. ARABICA</i> E <i>C. CANEPHORA</i>	61
4.2.1	Análise Exploratória Das Misturas De <i>C. Arabica</i> E <i>C. Canephora</i> Para Grãos De Café Verde	62
4.2.2	Análise Exploratória Das Misturas De <i>C. Arabica</i> E <i>C. Canephora</i> Para Grãos De Café Torrado	68
5	CAPÍTULO 5 - CONCLUSÃO	72
5.1	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	74



Capítulo **1**

Introdução e objetivos



1.1 INTRODUÇÃO

Responsável por uma parcela expressiva do faturamento agrícola do Brasil, o café é uma *commodity* que nos últimos anos apontou uma renda de US\$ 5,2 bilhões de dólares (BRASIL, 2020). Apesar do contexto pandêmico causado pela Covid-19 em 2020, as exportações mundiais foram 5,72% superiores ao ano anterior, o que expressa 0,5 milhões de sacas a mais (OIC, 2021). Entre o primeiro e terceiro trimestre de 2020 o número de sacas exportadas no Brasil foi na ordem de 30 milhões, movimentando aproximadamente US\$ 3,9 bilhões de dólares (CCCMG, 2020). Embora o lucro apresente maior ênfase em alguns estados brasileiros, como em Minas Gerais, em diversas localidades do território brasileiro o café atua na geração de empregos, exportação e principal renda familiar de agricultores (MESQUITA et al., 2007).

A demanda comercial do café está relacionada com diferentes tipos e espécies. Ao estar apto para a colheita, o grão cru, conhecido como verde (desprovido de qualquer processo físico ou químico) é submetido a procedimentos como lavagem, secagem e outras etapas pós-colheita. Em seguida, esse material é direcionado para processos que originam outros grãos conforme a especificidade do produto final, como o café torrado, que é formado por meio do aquecimento (até 240°C) dos grãos verdes (GARG, 2016; LIM, WANG, 2019).

Dentre as espécies que despertam maiores interesses comerciais, destacam-se o *Coffea arabica* (*C. arabica*) e *Coffea canephora* (*C. canephora*). Os grãos de *C. arabica* possuem características ácidas e aromas mais intensos, enquanto os de *C. canephora* caracterizam-se pelo amargor mais evidente (AGNOLETTI et al., 2019). No entanto, a espécie *C. arabica* tem maior procura por parte dos consumidores, exportando ao redor do mundo em 2019 aproximadamente 40,58 milhões de sacas a mais que o *C. canephora* (OIC, 2020; BRASIL, 2020). No Brasil houve um acréscimo médio de 16,19% no plantio de *C.*

arabica entre 2017 e 2019 (CONAB, 2020). A diferença entre as espécies *C. arabica* e *C. canephora* se dá tanto geneticamente (44 cromossomos para *C. arabica* e 22 para *C. canephora*) como no aspecto físico e composição química (MATULOVÁ et al., 2011).

Uma parcela expressiva do café comercial brasileiro é composta predominantemente por *C. canephora* torrado, uma vez que essa espécie dá mais corpo ao café. Por apresentar maior quantidade de sólidos solúveis eles são mais rentáveis. No entanto, análises sensoriais evidenciaram uma qualidade inferior da bebida preparada somente à base dessa espécie. Desse modo, antes da torrefação algumas indústrias misturam os grãos verdes das duas espécies (*C. arabica* e *C. canephora*) para elevar a qualidade da bebida (SANZ et al., 2002; WONGSA, 2019). A partir dessa combinação, *C. arabica* contribui para o aroma e ao *C. canephora* é atribuído a estrutura física e, juntos, aumentam o sabor da bebida. Adições de *C. canephora* à *C. arabica* também são realizadas para diminuir o valor do produto, uma vez que *C. arabica* apresenta maior custo (SANZ et al., 2002).

Pesquisas apontam que os grãos verdes de distintas espécies além de serem torrados exclusivamente para a bebida, podem ser utilizados para outros fins. Estudos clínicos sobre glicemia, antiaderência de *Streptococcus mutans* nos dentes, refrescos a base dos extratos de grãos verdes, complemento nutricional para trigo, e incorporação ao leite de soja, são alguns destinos alternativos (BUDRYN, 2013; BLUM, LEMAIRE, LAFAY, 2007; DAGLIA et al., 2012). Logo, verificar os perfis químicos das espécies verdes e torrados é relevante para inferir acerca da composição química, seja nos cafés analisados separadamente ou em proporções.

A fim de assegurar a qualidade dos cafés e principalmente prolongar vínculos de compra, as análises químicas, como espectroscópicas e cromatográficas são parâmetros para monitorar a qualidade desse produto. Na literatura, técnicas espectroscópicas são utilizadas para a análise química do café, como infravermelho próximo, infravermelho por

Transformada de Fourier, Raman e espectrofotometria na região Ultravioleta-Visível (UV-Vis) (ABREU et al., 2019; DANKOWSKA, DOMAGALA, KOWALEWSKI, 2011; MOREIRA, SCARMINIO, 2013; TERRILE, 2016). Segundo Belay (2011) a técnica espectrofotométrica é rápida, barata, simples, precisa e reprodutível.

A composição química do café resulta de uma combinação complexa entre lipídeos, carboidratos, aminoácidos, ácidos, cetonas, aldeídos e compostos fenólicos, que asseguram os principais aspectos sensoriais da bebida. Na área de ciências naturais tais substâncias são classificadas como metabólitos, primários e secundários (especializados). Em materiais vegetais, os metabólitos primários compõem macromoléculas, como lipídeos, proteínas e açúcares. Os secundários apresentam aplicações diversas, como farmacológicas e cosméticas, sendo ainda mais explorados, uma vez que possuem funções como estimulantes, fato que justifica seu crescente interesse comercial. Alguns dos principais metabólitos secundários do café são ácido nicotínico, trigonelina, ácido quinolínico, ácido pirogálico e cafeína (FARAH, DONANGELO, 2006; FARAH, 2012; ELIXABET et al., 2019). O café possui também alguns compostos fenólicos antioxidantes como ácido cafeico e ácidos clorogênicos (ACGs) (FARAH, DONANGELO, 2006; BELAY, 2011).

Nesse contexto de composição química, uma das áreas com crescente expansão no desenvolvimento de métodos analíticos para o controle de qualidade envolve abordagens metabolômicas. Nesse cenário, a impressão digital metabólica pode permitir a classificação rápida de amostras de diferentes origens biológicas e contribui no planejamento e execução de uma série de experimentos e técnicas espectroscópicas (ELLIS et al., 2007; JAN, AHMAD, 2019).

Em uma análise metabolômica o preparo de amostra é uma etapa relevante, uma vez que a heterogeneidade das amostras biológicas exige a utilização de aparelhagem mecânica como ultrassom e *shaker* em conjunto com solventes orgânicos adequados e de

diferentes polaridades, para que o tecido do material vegetal seja rompido e os metabólitos sejam extraídos com eficiência (CANUTO, et al., 2018). Frente à diversidade metabólica de amostras biológicas, métodos quimiométricos como análise exploratória e planejamento estatístico de misturas contribuem na identificação e escolha do melhor solvente extrator que fornece informações químicas significativas. O planejamento estatístico de mistura com solventes permite uma otimização da extração de compostos químicos por meio de misturas de solventes com distintas propriedades químicas, que quando associada à análise multivariada contribui na identificação e discriminação de espécies de café, bem como a investigação de compostos bioativos (ELLIS et al., 2007; JAN, AHMAD, 2019; SOARES, BRUNS, SCARMINIO, 2007).

As impressões digitais espectrofotométricas, adquiridas por meio do planejamento de mistura podem ser exploradas pela Análise das Componentes Principais (ACP) (MARCHEAFAVE et al., 2019). Associado ao planejamento de mistura essa ferramenta realiza combinações lineares nos dados espectrais cuja finalidade é diminuir a dimensionalidade das variáveis do conjunto espectral que carrega as informações mais importantes com o mínimo de perda (FERREIRA, 2014).

No estudo metabólico a ACP pode auxiliar na identificação e exploração do (s) efeito (s) que discrimina(m) as amostras (TERRILE et al., 2016). Em adição, uma ferramenta alternativa é a Análise de Variância por Análise de Componentes Simultâneos (ASCA, *Analysis of Variance - Simultaneous Component*) que no âmbito da ciência natural possibilita a identificação de efeitos tênues que podem estar mascarados por outras fontes biológicas (JANSEN, ENGEL, 2018). Dessa forma a aplicação de ACP e ASCA contribuem para explorar as informações e inferir acerca dos efeitos mais relevantes para as classes contidas na amostra.

1.2 OBJETIVOS

1.2.2 Objetivo Geral

Discriminar, a partir de um planejamento estatístico de mistura com solventes, as impressões digitais espectroscópicas na região do UV de grãos verdes e torrados das espécies *C. arabica* e *C. canephora*.

1.2.2 Objetivos Específicos

✓ Explorar pela Análise das Componentes Principais os solventes mais importantes na discriminação dos cafés de acordo com as espécies (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) e processamento (verde e torrado), de modo a determinar os efeitos dos fatores que discriminam tais amostras pela Análise de Variância por Análise de Componentes Simultâneos;

✓ Verificar as regiões de discriminação nas impressões digitais espectrofotométricas (UV) a medida com que *C. arabica* é adicionado a *C. canephora*, tanto em grãos verdes como torrados.



Capítulo

2

**Breve descrição da composição
química do café**



2. BREVE DESCRIÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ

2.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ

Pesquisas realizadas a partir de impressões digitais espectrais ou cromatográficas sugerem que a composição química do café, tanto em grãos verdes, torrados e de distintas espécies, estão associadas a moléculas com estruturas cíclicas, acíclicas, saturadas, insaturadas e com diferentes grupos funcionais. Em geral, a composição química do café abrange açúcares, lipídeos, proteínas, aminoácidos, alcalóides, compostos fenólicos, entre outros, sendo cada molécula com comportamento peculiar (KY et al., 2001; BELAY, 2011; FARAH et al., 2006, MOREIRA, TRUGO, DE MARIA, 2004).

Por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Ky et al., (2001) concluíram que Ácidos Clorogênicos (ACGs), os alcalóides (cafeína e trigonelina) e a sacarose são parâmetros determinantes para o aroma do café. Farah et al., (2006) também confirmaram por CLAE que as moléculas destacadas por Ky et al. (2001) estão relacionadas ao aroma, inclusive Farah et al., (2006) destacam que trigonelina e isômeros de ACGs estão fortemente correlacionados a qualidade do cafés verde e torrado.

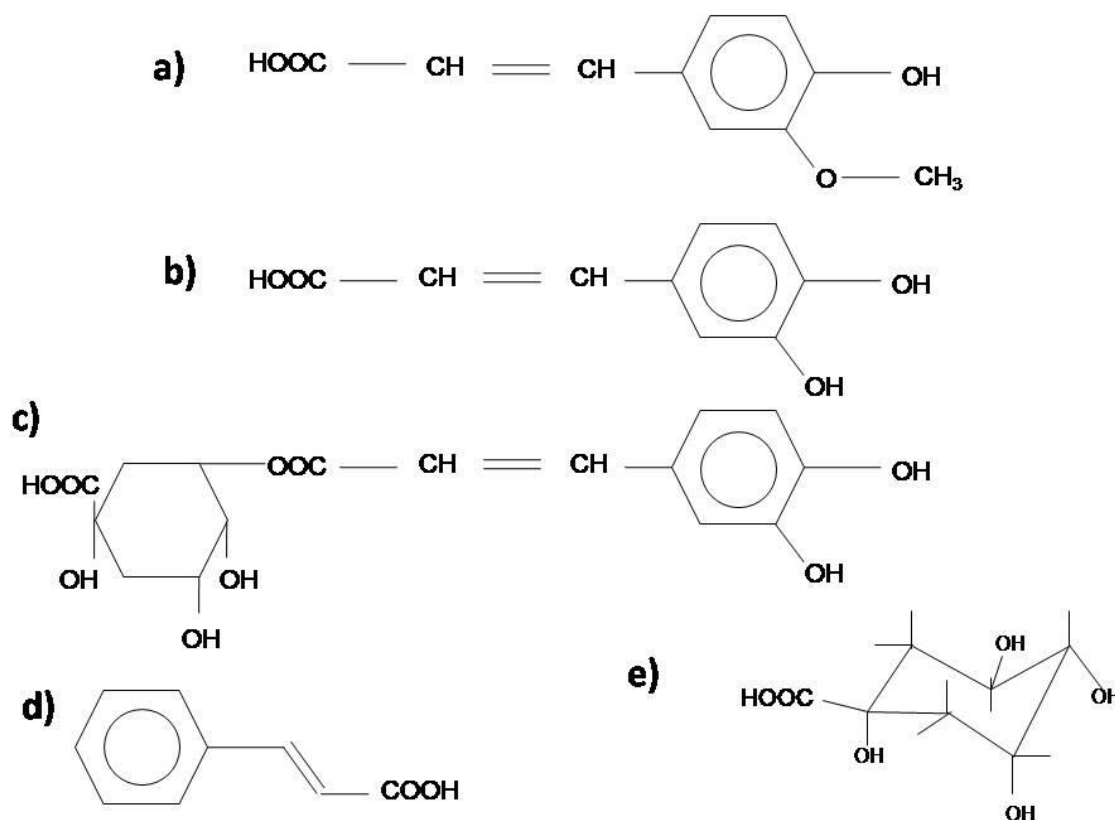
Estudos revelam que há moléculas presentes somente em determinadas espécies. Badmos, Lee, Kuhnert (2019) identificaram via Ressonância Magnética Nuclear (RMN) que metil cafestol é uma molécula específica do *C. canephora*. Os mesmos autores também verificaram que essa molécula não foi identificada nas amostras de *C. arabica*. Para além da contribuição nos aspectos sensoriais e diferenciação de espécies, a composição química também atribui ao café efeitos específicos. Os lipídeos, que representam cerca de 17% do peso seco dos grãos de café, empenham funções no desenvolvimento desse material vegetal e na saúde humana. Segundo Silva (2020), a composição lipídica do café abrange

classes de fosfolipídeos, triglicéridos, entre outros, que possuem contribuições particulares no café. Em sua pesquisa com foco na comparação de métodos de extração de moléculas no café, Dias et al., (2013) observaram por espectroscopia na região UV, que os lipídeos insaponificáveis podem apresentar absorções próximas a 230 e 285 nm. A partir da extração de constituintes do café com diclorometano e hexano, Terrile et al., (2016) observaram sinais desses metabólitos em 225 e 288 nm. Esses autores associaram 225 nm ao cafestol e 288 nm para cafeol. Além dos lipídeos, outras moléculas são relevantes. Chu (2012) e Crozier et al., (2012) atribuem à cafeína a ação como estimulante, e aos ACGs, atividade antioxidante. Amuta et al., (2011) averigaram a partir de estudos envolvendo espectroscopia na região UV que alcalóides como a trigonelina, presente no café, podem influenciar positivamente a inibição de crescimento microbológico como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, favorecendo o tratamento de enfermidades infecciosas.

Os ACGs são os principais compostos fenólicos dos cafés. Em seu artigo Belay (2011) inclui os ACGs à classe dos ácidos hidroxicinâmicos. Wei e Tanokura (2015) realizaram um levantamento que indicou a presença de pelo menos 30 ACGs no café. Nas palavras de Belay (p. 6376, 2011), “os ACGs consistem em ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinâmico), ácido ferúlico (ácido 3-metoxi-4-hidroxicinâmico), p - cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico) e ácido sinápico (3,5-ácido dimetoxi-4-hidroxicinâmico).

Pelas pesquisas de Farah et al., (2005) e Rogers et al., (2010), os ACGs são constituídos basicamente (cerca de 80%) de ácidos cafeoilquínicos, que segundo outros autores (Belay, 2011; Perrone et al., 2008) podem apresentar subclasses. Farah e Donangelo (2006) estimam que cada grupo que compõem os ACGs podem apresentar no mínimo 3 isômeros nos grãos verdes. Badmos, Lee, Kuhnert (2019) afirmam que há isômeros de ACGs que são potenciais marcadores para inferir sobre a autenticidade de grãos verdes. Na Figura 1 são dispostas algumas das principais estruturas que compõem os ACGs.

Figura 1 – Principais estruturas dos ácidos clorogênicos, sendo: a) ácido ferúlico; b) ácido cafeico; c) ácido-5-cafeoilquínico; d) ácido-trans-cinâmico; e) D-(-)-ácido quinico.



Leituras espectroscópicas na região ultravioleta (UV) de padrão de ACGs em água e etanol são discutidas na pesquisa de Belay e Grolap (2009) e Navarra et al., (2017). No estudo de Belay e Grolap (2009) na qual o padrão de ACGs foi dissolvido em água, há 2 regiões. A primeira banda apresentou sinal em 217 nm com ombro em 240 nm e a segunda com sinais máximos em 324 nm e ombro em 296 nm. Belay e Grolap (2009) comentam que a banda próxima a 324 nm pode ser um meio promissor para a identificação de ACGs nos grãos de cafés. De acordo com Cornard et al., (2008) os sinais na região 324 – 330 nm podem estar relacionados com transições eletrônicas entre orbitais de maior e menor energia nas cadeias fechadas insaturadas de ACGs. Para Belay e Grolap (2009) essa interpretação também pode ser aplicada nas absorções em 217 nm. Belay (2011) afirma que além de serem utilizadas para

leitura de padrão, técnicas espectroscópicas também podem ser aplicadas para análises qualitativas de moléculas em amostras de café. Salienta-se que a absorção dos isômeros no UV pode sofrer oscilações e regiões peculiares. O ácido 5-cafeoilquínico por exemplo, apresenta absorção máxima em 320 nm (MARCUCCI et al., 2013).

Os ACGs podem sofrer variações na concentração, tanto em relação à espécie como processamento. Marcucci et al., (2013) observaram que cafés *gourmet* e descafeinados apresentam maiores teores de estruturas que compõem os ACGs, inclusive essas autoras determinaram que a quantidade de ácido 5-cafeoilquínico pode variar entre 0,38 a 2,66 g 100 g⁻¹ em amostras brasileiras. Ky et al., (2001) encontraram via CLAE teores superiores de ACGs na espécie *C. canephora* comparado ao *C. arabica*, assim, ACGs podem ser utilizados para diferenciar espécies de café. Badmos e Kuhnert (2012) evidenciaram pelo uso de CLAE em amostras de grãos torrados de diferentes processos agrícolas que a concentração de ACGs são parâmetros para discriminar essas amostras.

Farah e Donagelo (2006) apontam que ao serem submetidos ao processo de torrefação (torra), os ACGs presentes nos grãos verdes podem sofrer hidrólise, degradação e isomerização, de modo que os produtos obtidos apresentem baixo peso molecular. As autoras salientam, ainda, que as altas temperaturas podem induzir a polimerização dos ACGs com outros compostos. Segundo Moreira et al., (2015) e Nunes e Coimbra (2010) esses outros compostos são aminoácidos, sacarose, proteínas e alguns carboidratos. Como produto dessa polimerização, melanoidinas são formadas. Embora não estejam presentes exclusivamente no café torrado, Gniechwitz et al., (2008) comentam que as melanoidinas são compostos constituídos de grupos funcionais nitrogenados com alto peso molecular, sendo responsáveis pelo aroma após a torra, estando também associado a cor marrom dos grãos torrados. Estima-se que 25% do peso seco dos grãos torrados correspondam as melanoidinas.

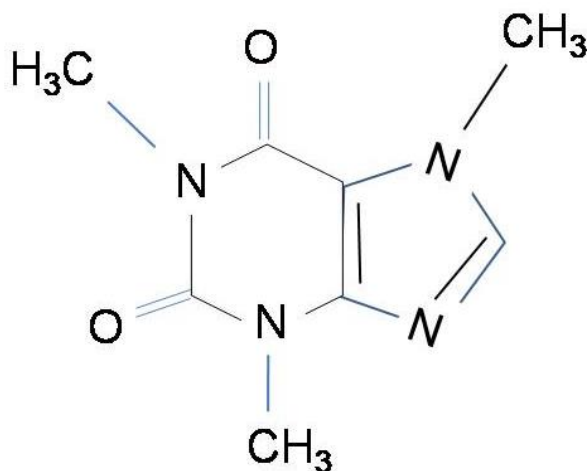
A partir de ultrafiltração e cromatografia de interação hidrofóbica,

Gniechwitz et al., (2008) isolaram as melanoidinas e verificaram que a fração dessa molécula apresenta atividade antioxidante de três a quatro vezes maiores do que a fração dos demais constituintes do café. Com o intuito de estudar os teores de alguns metabólitos no café brasileiro, Marcucci et al., (2013) verificaram via cromatografia que as melanoidinas no café brasileiro apresentam cerca de 0,253 a 0,476 g.100 g⁻¹. As autoras observaram que essas moléculas apresentam absorções em 420 nm. Outras consequências da torra na composição química também são descritas na literatura.

Ao analisar o café torrado por RMN, Wei et al., (2012) verificaram que concentrações relativas de ácidos cafeoilquínico diminuem em relação aos verdes em virtude da temperatura. No entanto, Wei et al (2012) averiguaram que as absorções de ácido quinico aumentam na torra. Wei et al., (2012) e Scholz-Böttcher, Ernst, Maier (1991) sugerem que a massa de ar quente na torrefação e níveis ácidos de pH contribuem para a formação de isômeros do ácido quinico. Assim, Wei e Tanokura (2015) afirmam que a decomposição dos ACGs podem ser utilizadas para inferir sobre o grau de torrefação. Outro metabólito relevante é a cafeína.

Conforme Mumin et al., (2006), a cafeína está presente em folhas, frutos e sementes de cerca de 63 espécies de plantas, apresentando diferentes proporções nos grãos de café verde e torrado em diferentes variedades. Os estudos de Silvarolla et al., (2004) e Ky et al., (2001) revelam que grãos verdes apresentam altos teores desse alcalóide, sofrendo variações conforme as espécies *C. arabica* e *C. canephora*. Por CLAE Ky et al., (2001) quantificaram maiores proporções desse metabólito em *C. canephora*. Análises desenvolvidas por Belay (2011) estimaram que a porcentagem de cafeína é de aproximadamente 1,2% no *C. arabica*, enquanto que no *C. canephora* esse valor é 2,2%. A estrutura química da cafeína está ilustrada na Fig. 2.

Figura 2 – Estrutura química da cafeína.



Análises espectroscópicas na região UV com padrão de cafeína utilizando etanol, indicaram segundo Navarra et al., (2017) que esse metabólito apresenta absorções máximas em 275 nm, sendo esse sinal possivelmente associado ao cromóforo C=O da cafeína. Essa atribuição também é considerada por López et al., (2003). Belay et al., (2008) que similarmente analisaram o padrão de cafeína na mesma técnica, porém, em água, verificaram que em meio aquoso a cafeína apresentou absorções máximas em 272 nm. Outros autores como Marcucci et al., (2013) também atribuem 272 nm para cafeína.

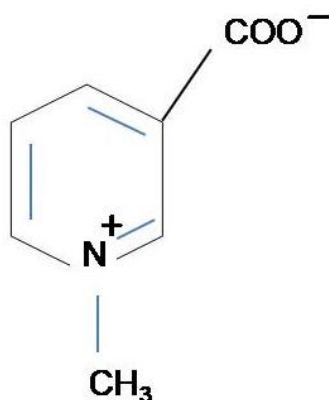
Belay et al., (2008) relatam que a leitura espectrofotométrica na região UV de cafeína realizada diretamente nas sementes de café é inviável sem uma extração prévia. A dificuldade em verificar nitidamente as bandas de cafeína sem a preparação dos extratos é justificada pela sobreposição de bandas, uma vez que a composição química do café abrange várias moléculas que absorvem numa mesma região. No *paper* esses autores descrevem a preparação da amostra a partir da extração dos grãos com solvente. Zhang et al., (2005) também defendem o uso de solventes para auxiliar na resolução dos dados obtidos para a cafeína. No entanto, segundo Belay et al., (2008) mesmo que o solvente contribua para a aquisição, ainda pode haver sobreposição.

Embora a concentração da cafeína seja naturalmente alta nos cafés, ela pode sofrer variações. Bell, Wetzel e Grande (1996) destacam que os métodos de preparação do café podem sofrer modificações. No entanto, alguns estudos mostram que em virtude do receio da ação estimulante da cafeína e até mesmo o registro de alguns problemas associados a esse metabólito, há amostras descafeinadas. Toci, Farah e Trugo (2006) averiguaram que os cafés descafeinados (grãos verdes e torrados) das espécies *C. arabica* e *C. canephora* apresentam composição química significativamente distinta em relação aos que possuem cafeína. Esses pesquisadores verificaram que trigonelina, proteína, sacarose, ACGs e seus isômeros são os que tiveram maior alteração, o que sugere uma correlação da cafeína com outras estruturas. Já o conteúdo lipídico e alguns carboidratos não apresentaram mudança.

A trigonelina é uma espécie presente nos grãos verdes e torrados que juntamente com a cafeína e outras moléculas compõem o grupo das metilxantinas, apresentando nitrogênio em sua composição (Moraes et al., 2008). Estudos destacam que há maior abundância da trigonelina em grãos verdes. Pelas análises de Marcucci et al., (2013) a concentração de trigonelina nos cafés brasileiros varia de 0,47 até 2,15 g.100g¹, sendo os maiores níveis deste metabólito em amostras descafeinadas. Estudos cromatográficos indicam maior concentração de trigonelina ao *C. arabica* (KY et al., 2001). Do ponto de vista qualitativo, a trigonelina pode apresentar absorções na região UV em 216, 265, 280 nm (AMUTA et al., 2011). No estudo de Marcucci et al., (2013) a trigonelina apresentou na região UV absorção máxima em 260 nm.

Na Figura 3 está a estrutura da trigonelina.

Figura 3 – Estrutura química da trigonelina.



Para Wei e Tanokura (2015) a trigonelina passa por degradação em virtude da temperatura, assim, durante a torra há a formação de pirazina, alquil-piridinas, furanos e pirróis, que parecem contribuir diretamente para o sabor da bebida. Análises com RMN mostram que N-metilpiridínio e ácido nicotínico são os principais produtos da pirólise da trigonelina, sendo o ácido nicotínico o segundo produto de degradação com maior concentração. Logo, essa molécula pode ser utilizada para inferir acerca do grau da torra, uma vez que os dados espectrais de RMN indicaram que com o passar do tempo as concentrações relativas dessas moléculas parecem sofrer oscilações (WEI et al., 2011; VIANI, HORMAN, 1974).

Os cafés (verde ou torrado) apresentam uma parcela de açúcares, dentre os mais abundantes nos grãos verdes destaca-se a sacarose, que conforme Ky et al., (2001) apresenta maior teor em *C. arabica*. Glicose, frutose, xilose e galactose são exemplos de outros açúcares no café.

Análises cromatográficas realizadas por Arruda et al., (2012) estimam que $7,54 \pm 0,235 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$ de grãos verdes da espécie *C. arabica* correspondem a açúcares

solúveis, sendo a quantidade dessa macromolécula alterada conforme as variações que o fruto dessa espécie pode apresentar, como a ausência e presença de casca.

Sanz et al., (2002) e Nakabayashi (1978) verificaram que ao ser submetida a altas temperaturas, a sacarose dá origem há espécies com ácidos carboxílicos, furanos e aldeído. Ressalta-se que há indícios de que os compostos formados também contribuem com uma parcela na melhora do sabor e aroma.

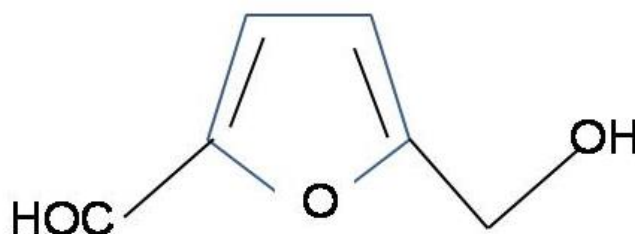
Além de estarem associados a propriedades organolépticas do café, os açúcares também são meios para determinar adulteração no café. Pauli, Cristiano e Nixdorf (2011) verificaram por CLAE utilizando como detector UV-Vis, que altos teores de glicose e xilose sugerem alterações na amostra, que podem ter resultado da adição de cascas de café ou substâncias amiláceas às amostras. No mesmo estudo verificou-se que o aumento de espécies provenientes da sacarose e a diminuição da galactose também podem indicar erros nas amostras.

Wei e Tanokura (2015) observaram que a torrefação resulta na diminuição de alguns ácidos e aumento de outros, que também podem estar relacionados aos açúcares. Ácido cítrico e ácido málico são exemplos de espécies que decréscem com a torrefação, logo, há maiores teores desses ácidos nos grãos verdes. Terrile (2016) realizou no UV-Vis a leitura de padrão em etanol desses ácidos, verificando que as regiões próximas a 215 nm estão associados a tais estruturas. Ácidos como láctico, acético e fórmico, são exemplos de substâncias que apresentaram maiores concentrações no café após o aquecimento.

De modo geral, à degradação de sacarose é atribuída a formação de ácidos de cadeia aberta. Ressalta-se que demais açúcares como frutose e glicose são reestruturadas após o processamento (GINZ et al., 2000). Assim, muitos subprodutos são formados, como o 5-hidroxi metil-2-furfural (HF). Estudos com foco nesta molécula em específico a associam com um indicador de prejuízos causados pelas altas temperaturas. Consequentemente, HF é

um parâmetro para melhores condições de torra, sendo utilizado ainda para acompanhar o monitoramento do café durante no armazenamento (WEI, TANOKURA, 2015; LOCAS, YAYLAYAN, 2008). Análises voltadas para o Hf apresentam absorções em 280 nm (SILVA et al., 2008). No entanto, dependendo do solvente utilizado essa região de 280 nm também pode apresentar sinais de ácidos de baixo peso molecular em amostras de café (MOREIRA et al., 2014). A estrutura do HF é apresentada na Fig. 4.

Figura 4 – Estrutura do 5-hidroximetil-2-furfural.



Outro aspecto relevante sobre a torrefação e os açúcares envolve a solubilidade de algumas moléculas. Wei et al., (2011), Wei et al., (2012), Wei et al., (2013) confirmaram por RMN que a solubilidade de açúcares nos grãos verdes apresentam comportamento distinto após a torra. Segundo os *papers* supracitados, na qual extratos de café obtidos por água foram analisados, a solubilidade de açúcares aumenta em virtude do desprendimento de carboidratos da parede celular em razão do aquecimento.

Estudos mostram que existem de 900 até 1000 compostos voláteis formados na torra (WEI, TANOKURA, 2015; MOREIRA, TRUGO, DE MARIA, 2000). Conforme a pesquisa de Moreira, Trugo, De Maria (2000) tais compostos podem apresentar os grupos funcionais álcool, fénol, cetona, lactonas, éster, éter, aminas, entre outros, tanto em cadeias

abertas ou fechadas, como 2-furil metanotiol, caveofurano, N-furil-2-metil-pirrol, e demais. Os autores ainda reforçam que esses compostos apresentam concentrações baixas, daí a dificuldade de estudá-los.



Capítulo 3

Materiais e Métodos



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Os grãos de café verde e torrado das espécies *C. arabica* e *C. canephora* foram fornecidos pela Companhia Cacique de Café Solúvel (Londrina – Paraná). Essas amostras foram moídas em um moinho IKA A11, peneiradas (0,710 mm) e armazenadas em recipientes fechados que ficaram em ambiente fechado sob ar condicionado com temperatura média de ± 16 °C. A empresa não informou as condições de temperatura utilizadas no processo de torrefação.

3.2 PLANEJAMENTO DE MISTURA E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Para o preparo dos extratos foi usado um planejamento do tipo centroide simplex de quatro componentes, cuja escolha dos solventes embasou-se nos parâmetros de Snyder (BARWICK, 1997), sendo eles: água ultrapura (*a*) (18,2 MΩ cm 60 Hz) preparada usando um sistema de purificação Milli-Q Plus (São Paulo, Brasil), etanol (*e*) Impex (São Paulo, Brasil), hexano (*h*) Anidrol (São Paulo, Brasil) e isopropanol (*i*) Impex (São Paulo, Brasil), todos de grau analítico. Na Tabela 1 estão dispostos os valores correspondentes as propriedades químicas de cada solvente utilizado. As proporções dos solventes utilizadas no preparo dos extratos obtidas a partir do planejamento de mistura estão apresentadas na Tab. 2.

Tabela 1 – Parâmetros de Snyder para os solventes e misturas utilizadas: acidez (x_d), basicidade (x_e) edipolaridade (x_n) e polaridade (P).

Misturas	Parâmetros de Snyder			
	x_d	x_e	x_n	P
<i>i</i>	0,57	0,17	0,26	3,92
<i>e</i>	0,52	0,19	0,29	4,40
<i>a</i>	0,43	0,18	0,45	10,20
<i>h</i>	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabela 2 – Planejamento experimental centróide simplex para os solventes: água ultrapura (*a*), etanol (*e*), hexano (*h*) e isopropanol (*i*).

Extratos	Solventes			
	Isopropanol	Etanol	Água	Hexano
<i>i</i>	1	0	0	0
<i>e</i>	0	1	0	0
<i>a</i>	0	0	1	0
<i>h</i>	0	0	0	1
<i>ie</i>	½	½	0	0
<i>ia</i>	½	0	½	0
<i>ih</i>	½	0	0	½
<i>ea</i>	0	½	½	0
<i>eh</i>	0	½	0	½
<i>ah</i>	0	0	½	½
<i>iea</i>	1/3	1/3	1/3	0
<i>ieh</i>	1/3	1/3	0	1/3
<i>eah</i>	0	1/3	1/3	1/3
<i>iah</i>	1/3	0	1/3	1/3
<i>ieah1</i>	1/4	1/4	1/4	1/4
<i>ieah2</i>	1/4	1/4	1/4	1/4
<i>ieah3</i>	1/4	1/4	1/4	1/4

Para o preparo dos extratos pesou-se em balança analítica (Schimadzu AY 220) 2,50 g de cada amostra (referente aos grãos de diferentes espécies e condições de processamento). Cada uma foi transferida para um erlenmeyer de 250 mL e foram adicionados 60 mL do solvente extrator, conforme Tabela 2. Os erlenmeyers foram submetidos à agitação orbital (*Shaker* ACB Labor) por 30 minutos a 150 rpm e temperatura constante à 25°C. Na sequência a mistura foi filtrada. Esse mesmo procedimento foi realizado outras 6 vezes, totalizando 420 mL. Após a última filtragem, as soluções ficaram expostas a ventilação, e por fim, liofilizadas (Virtus SP Scientific a $81,5 \pm 0,1$ °C e 20 ± 2 m Torr) até massa constante.

3.3 PREPARAÇÃO DAS PROPORÇÕES DAS ESPÉCIES *C. ARABICA* E *C. CANEPHORA*

Para o estudo das proporções das duas espécies de café um planejamento de

mistura de dois componentes foi utilizado. A escolha dos solventes etanol:isopropanol (1:1 v:v) se deu a partir dos resultados de discriminação obtidos pela Análise das Componentes Principais (ACP) (Figura 4 do capítulo 4), na qual essa mistura apresentou boa separação entre as classes. As proporções estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Massa das amostras de café conforme planejamento de misturas de dois componentes

Proporções das misturas			
<i>C. canephora</i>		<i>C. arabica</i>	
Porcentagem (%)	Massa (g)	Porcentagem (%)	Massa (g)
100	1,00	0	0,00
75	0,75	25	0,25
50	0,50	50	0,50
25	0,25	75	0,75
0	0,00	100	1,00

Conforme a tabela 3 as amostras foram pesadas em balança analítica (Schimadzu AY 220) e transferidas para um erlenmeyer de 250 mL, nas quais foram adicionados 30 mL da mistura binária etanol:isopropanol (1:1 v:v). Ambos solventes eram de grau analítico, provenientes da empresa Impex (São Paulo, Brasil).

Os erlenmeyers foram submetidos à agitação orbital (*Shaker* ACB Labor) por 30 minutos a 150 rpm e temperatura constante à 25°C. Posteriormente a mistura foi filtrada. Esse mesmo procedimento foi realizado outras 6 vezes, totalizando 210 mL. Após a última filtragem, as soluções foram encaminhadas para análise espectrofotométrica na região do UV. Ressalta-se que para cada proporção realizou-se seis replicatas, totalizando sete amostras replicatas para cada ponto do planejamento.

3.4 ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA

As impressões digitais espectrais na região do Ultravioleta Visível (UV – Vis) foram adquiridas a partir de um espectrofotômetro Thermo Scientific modelo Evolution 60S (Massachusetts, Estados Unidos) acoplado ao *software* Vision Lite. Para cada leitura utilizou-se uma cubeta de quartzo, com capacidade de 1 mL. A solução analisada foi preparada a partir de 0,05 g do extrato, dissolvidos em 30 mL da respectiva mistura. A leitura do branco acerca do respectivo solvente ou mistura de solvente de cada amostra foi realizada a fim de não haver interferência nos resultados. A faixa espectral da análise adotada foi de 200 – 800 nm (tanto para o estudo com todos os pontos do planejamento como das proporções). Para as leituras a resolução foi de 1 nm.

3.5 ANÁLISE MULTIVARIADA

3.5.1 Análise Exploratória Para Todos Os Pontos Do Planejamento

Inicialmente foi selecionada a faixa que continha informações espectrais (200 - 399 nm), e em seguida os espectros foram suavizados pelo filtro de Savitzky-Golay com janela de nove pontos. Para a análise exploratória por ACP de todo o conjunto de extratos preparados de acordo com o planejamento estatístico de misturas, as absorções foram organizadas em matrizes, sendo compostas por 34 linhas (17 de cada café), que correspondem aos extratos provenientes das diferentes classes (*C. arabica* x *C. canephora* ou verde x torrado) e 200 colunas que se referem aos comprimentos de onda (200 - 399 nm).

Para o modelo ASCA construiu-se uma matriz de 200 colunas

(comprimentos de onda 200 - 399 nm) e 28 linhas (as absorções) correspondente aos extratos preparados em etanol:água (1:1 v:v) e isopropanol:etanol:água (1:1:1 v:v:v). O processamento dos dados e as análises quimiométricas foram realizadas no *software* Matlab R2016 com auxílio do PLS *toolbox* 8.7 da *Eigenvector Research*.

3.5.2 Análise Exploratória Das Proporções Das Espécies

Para a análise exploratória as impressões digitais na região do UV foram organizadas em matrizes, compostas por 200 linhas correspondentes as absorções e 35 colunas referentes às proporções 0:100, 25:75, 50:50, 75:25, 100:0 (%) de *C. arabica*. Os dados foram submetidos à ACP e Análise de *Clusters* no *software* *Statistica* 2010, sendo os dados autoescalados antes da aplicação da ACP.

Capítulo 4

Resultados e Discussão



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

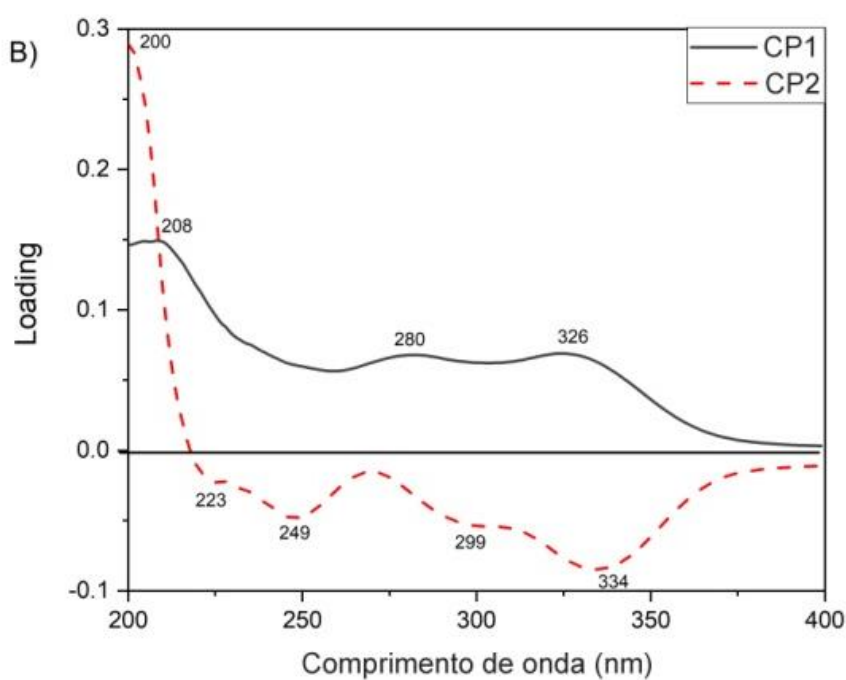
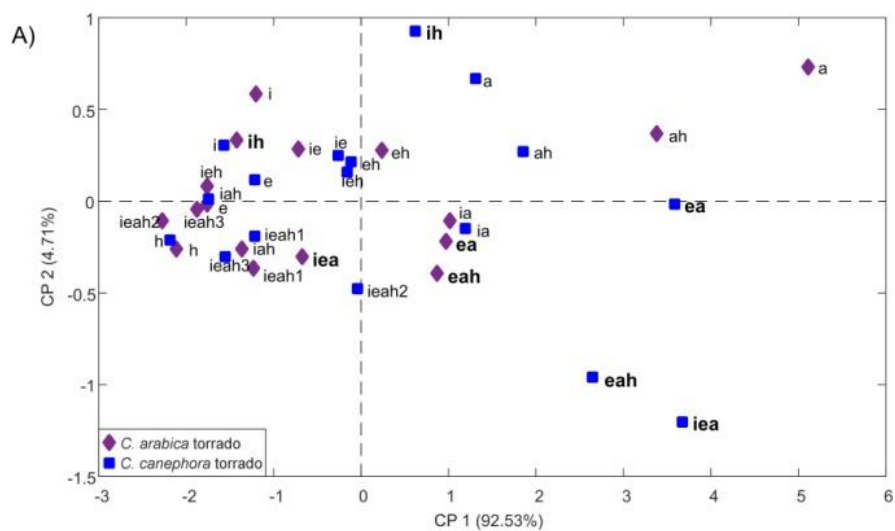
4.1 DISCRIMINAÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE E TORRADO DAS ESPÉCIES *C. ARABICA* E *C. CANEPHORA*

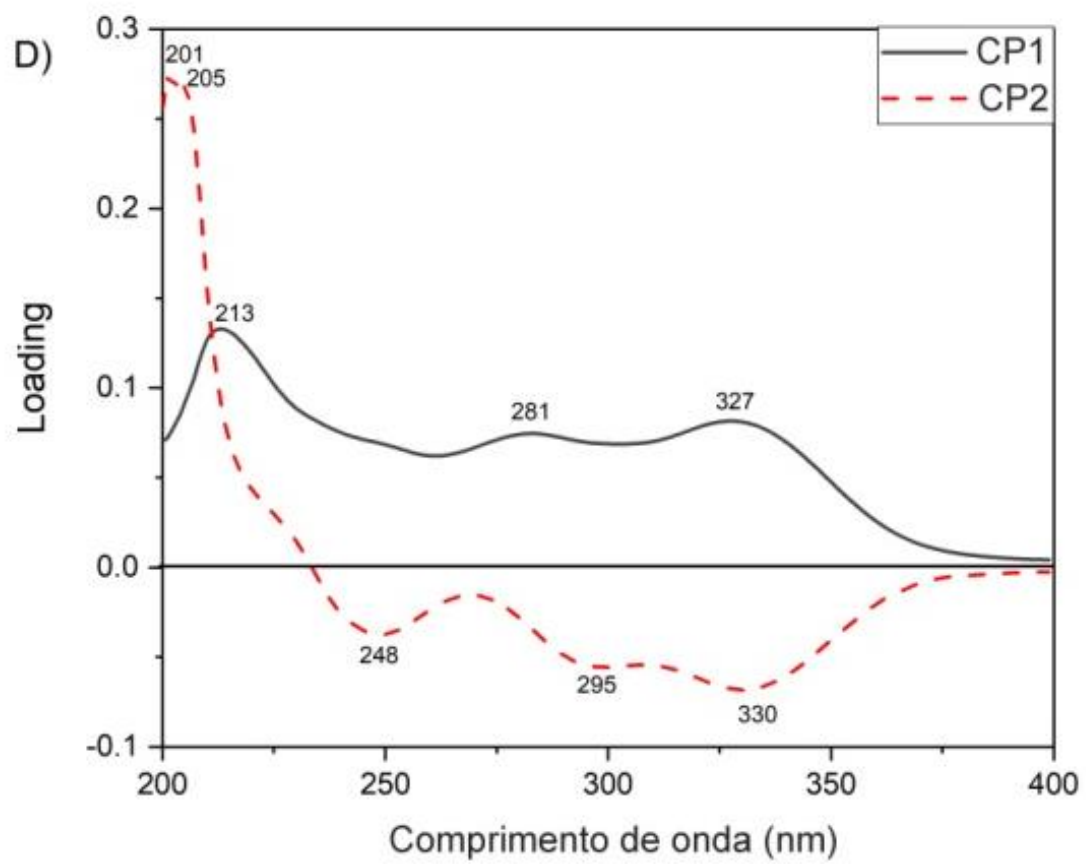
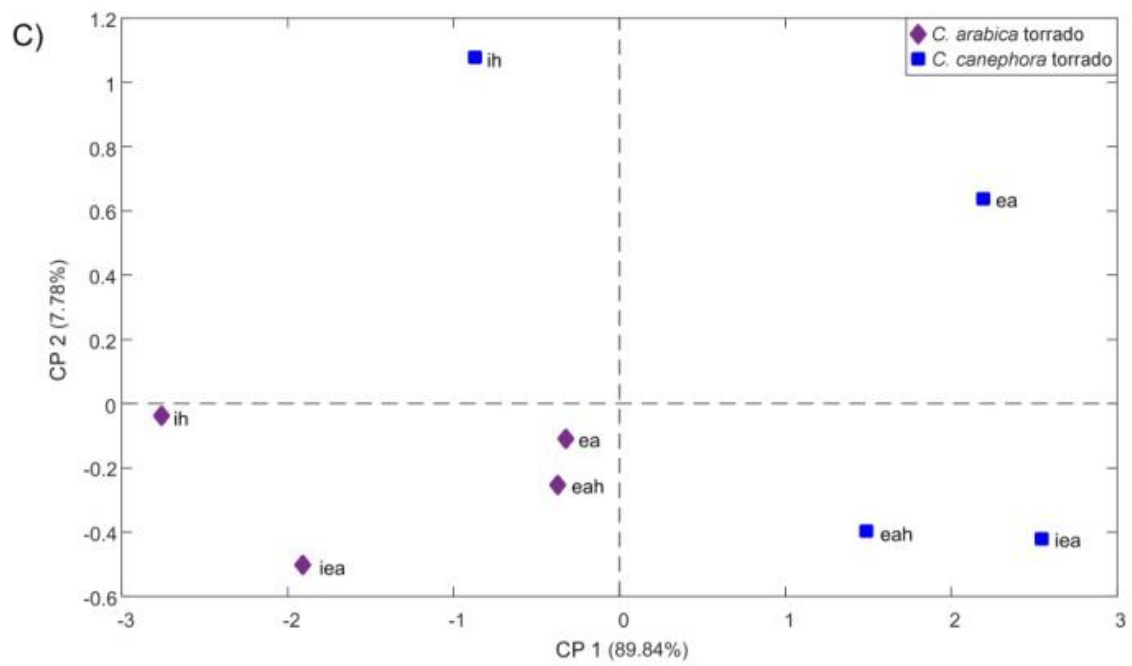
As impressões digitais espectrais na região do UV para os grãos de café verde e torrado das espécies *C. arabica* e *C. canephora* foram obtidas conforme o planejamento estatístico de mistura de solventes. A fim de obter informações acerca dos cafés em estudo, todas as impressões digitais foram organizadas em matrizes e submetidas à ACP. Além disso, utilizou-se para a validação da separação os solventes de extração que mostraram maior tendência de separação entre as classes, tanto em razão das espécies (*C. arabica* x *C. canephora*) como do processamento (verde x torrado).

4.1.1 Análise Exploratória Das Impressões Digitais Espectrais Na Região Do UV De Grãos De Café Torrado Entre Espécies De *C. Arabica* E *C. Canephora*

O gráfico dos escores entre a Primeira Componente Principal (CP1) e a Segunda Componente Principal (CP2) explicou 97,24% da variação total dos dados (Figura 1A). A CP1 mostra a formação de dois grandes grupos relacionados às características dos solventes utilizados na extração. Em outras palavras, os extratos dos grãos de café obtidos a partir de solventes contendo água (*a*), como as misturas binárias água:etanol (1:1, v:v) - *ea*; água:isopropanol (1:1, v:v) - *ia*; água:hexano (1:1, v:v) - *ah* e ternárias (etanol:água:hexano (1:1:1, v:v:v) - *eah*; isopropanol:etanol:água (1:1:1, v:v:v) - *iea* tiveram valores mais positivos na CP1. No lado negativo da CP1 ficaram agrupados os extratos constituídos em sua maioria por isopropanol (*i*), etanol (*e*) e hexano (*h*), tanto puros como misturados.

Figura 1 A) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. arabica* e *C. canephora* torrados obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas. B) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos torrados. C) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. arabica* e *C. canephora* torrados obtidos a partir dos solventes selecionados. D) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos torrados.





De acordo com o gráfico dos *loadings* da CP1 (Fig. 1B) as bandas em torno de 208, 280 e 326 nm, com os valores mais positivos, contribuíram para a formação do grupo entre as amostras de café torrado obtidas a partir da composição extratora contendo igual ou acima de 33% de água. A absorção em 208 nm pode ser de ácidos orgânicos ou açúcares (VELOSO et al., 2013). A banda em torno de 280 nm pode ser devido à presença de compostos aromáticos, principalmente cafeína, trigonelina e aminoácidos aromáticos (SUHANDY et al., 2016; MACRAE, BEAUMONT, 1987). O sinal em 326 nm pode ser atribuído à classe dos ácidos clorogênicos (ACGs), sendo essa absorção uma transição eletrônica HOMO – LUMO no anel benzóico (BELAY, GHOLAP, 2009). Esse metabólito também é absorvido em 249 e 334 nm, na qual 249 nm são de duas ligações insaturadas da cadeia carbônica dos ACGs (BELAY, GHOLAP, 2009; BELAY, 2011). Como destaca Belay et al., (2011), as absorções espectrofotométricas na região UV pode apresentar sobreposições de mais de um metabólito na mesma região. Assim, salienta-se que as atribuições feitas nesse parágrafo, assim como no corpo do texto, são possibilidades de associações entre sinais e metabólitos conforme a literatura.

Os extratos das misturas ternárias de etanol:água:hexano (1:1:1, v:v:v) – *eah* e isopropanol:etanol:água (1:1:1, v:v:v) – *iea* de grãos de *C. canephora* torrado apresentaram os maiores valores negativos na CP2, logo, são caracterizados pelas bandas em 223, 249, 299 e 334 nm (Fig. 1B). Essas bandas, como já mencionadas, podem ser características dos ACGs ou seus isômeros, como ácido quínico, um ácido esterificado encontrado naturalmente em café verde, cuja concentração é aumentada por se tratar também de um produto de degradação devido à torrefação (AYSELI, KELEBEK, SELLI, 2021; BELAY, 2011; BELAY, GHOLAP, 2009; WEI, TANOKURA, 2015).

Os resultados da ACP também mostraram que o extrato obtido pela mistura binária de isopropanol:hexano (1:1, v:v) – *ih*, para o *C. canephora* torrado apresentou o maior

valor de escore positivo na CP2 (Fig. 1A). Segundo os valores dos *loadings* positivos para a CP2, a banda em 200 nm foi a que mais contribuiu para a separação desse extrato. A faixa entre 190 – 210 nm pode ser atribuída a açúcares e ácidos orgânicos (VELOSO et al., 2013), logo, esse sinal está relacionado a essa espécie.

A interpretação gráfica dos escores da ACP sugere que quanto maior o distanciamento entre os pares de escores de um mesmo solvente para diferentes classes, maior a diferença química entre as impressões digitais. Logo, verificaram-se os solventes que apresentaram maior separação em relação aos pares de extratos. Os extratos obtidos pelas misturas binárias de etanol:água (1:1, v:v) – *ea* e isopropanol:hexano (1:1, v:v) – *ih*, bem como as misturas ternárias compostas de etanol:água:hexano (1:1:1, v:v:v) – *eah* e isopropanol:etanol:água (1:1:1, v:v:v) – *iea* foram selecionados e a ACP foi aplicada novamente para as impressões digitais obtidas dos extratos preparados nesses solventes.

O gráfico dos escores (Fig. 1C) indicou pela CP1 (89,84%) que há uma tendência de separação entre os cafés, na qual os valores mais positivos são de *C. canephora* torrado. Os respectivos valores nos *loadings* (Fig. 1D) mostram que as bandas em torno de 213, 280 e 327 nm contribuíram para a separação entre as espécies. Além disso, o extrato de isopropanol:hexano (1:1, v:v) – *ih*, com valor mais positivo na CP2, mostra a contribuição da banda em 205 nm na separação dos grãos de *C. canephora*.

Assim, os extratos de isopropanol:hexano (1:1, v:v) – *ih*, etanol:água (1:1, v:v) – *ea*, etanol:água:hexano (1:1:1, v:v:v) – *eah* e isopropanol:etanol:água (1:1:1, v:v:v) – *iea* para os grãos de *C. canephora* sugerem maiores concentrações de açúcares ou ácidos orgânicos em 205 nm, metilxantinas em 281 nm e AGCs (bandas em 213, 248, 295 e 330 nm) quando comparadas ao *C. arabica*. Os espectros originais desses extratos confirmam os resultados da ACP, em que as intensidades relativas para metilxantinas e ACGs foram maiores para os grãos de *C. canephora*. Estudos atestaram que grãos de *C. arabica* possuem

um menor conteúdo de metilxantinas e ACGs em relação ao *C. canephora*, fato verificado nesses extratos (DAGLIA et al., 2012; ELIXABET et al., 2019).

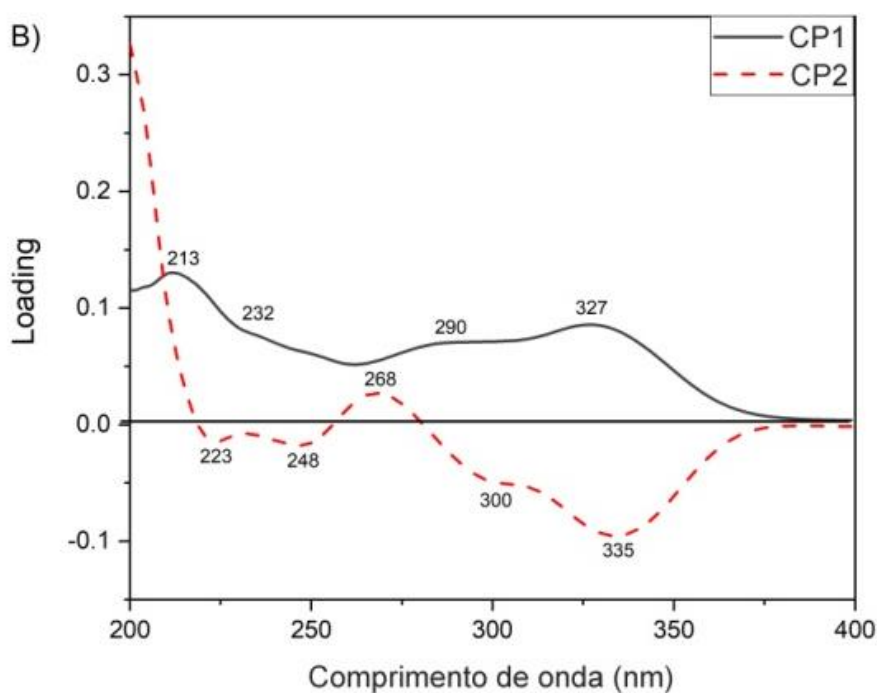
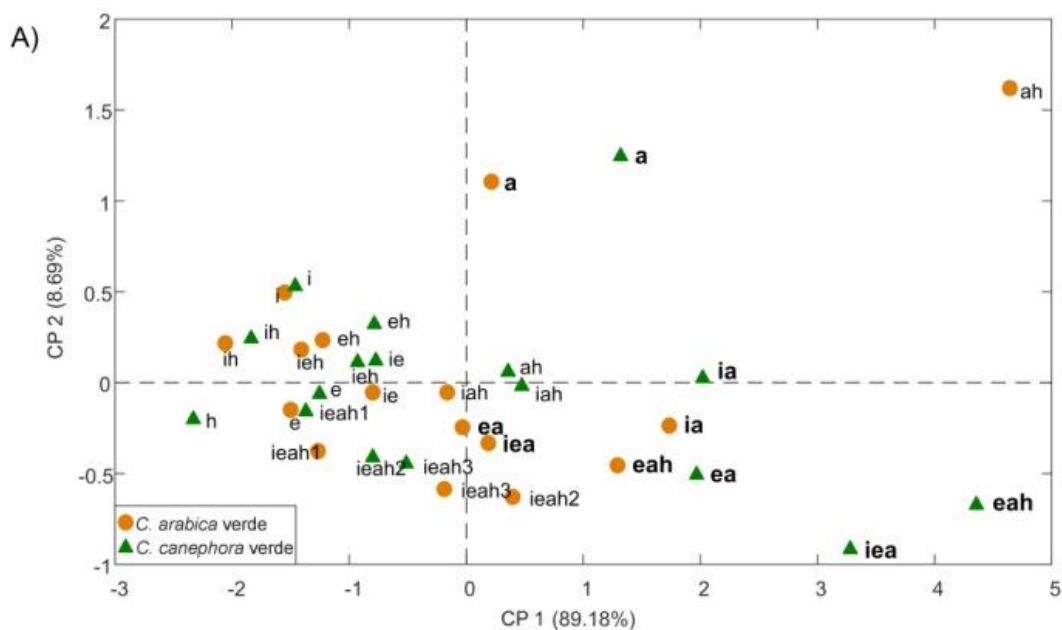
4.1.2 Análise Exploratória Das Impressões Digitais Espectrais Na Região Do UV De Grãos De Café Verde Entre Espécies De *C. Arabica* E *C. Canephora*

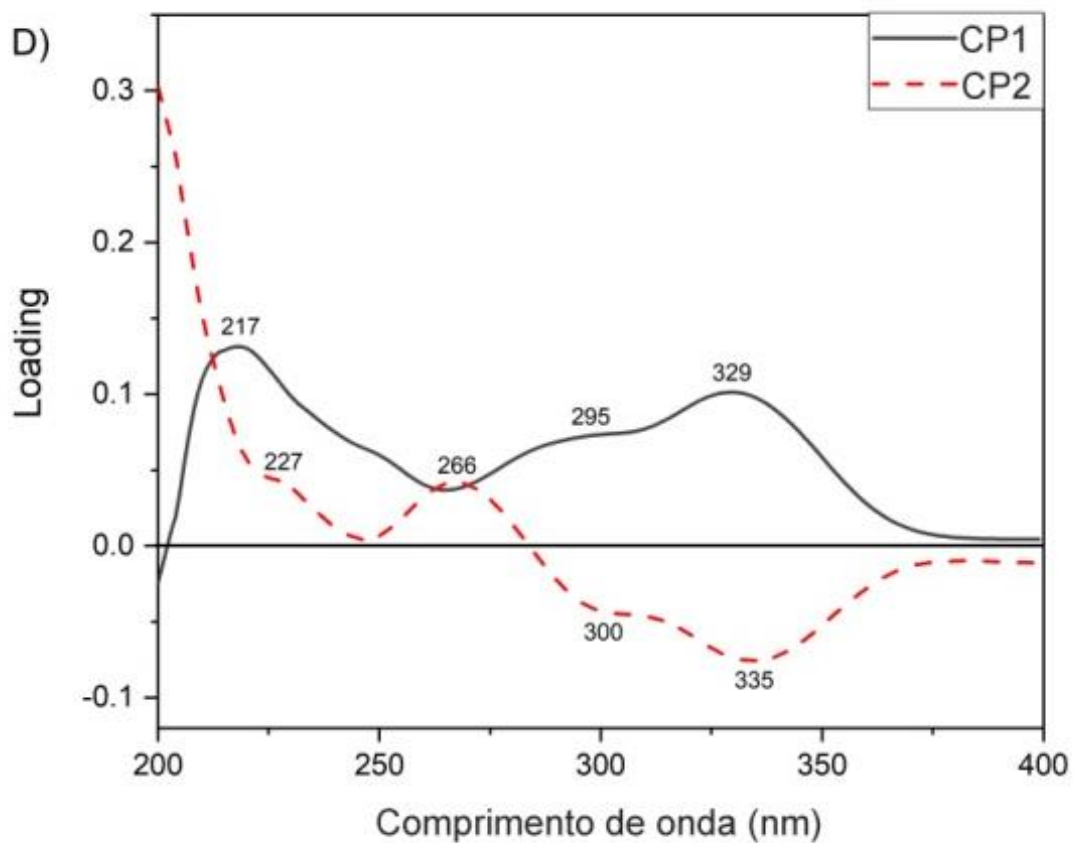
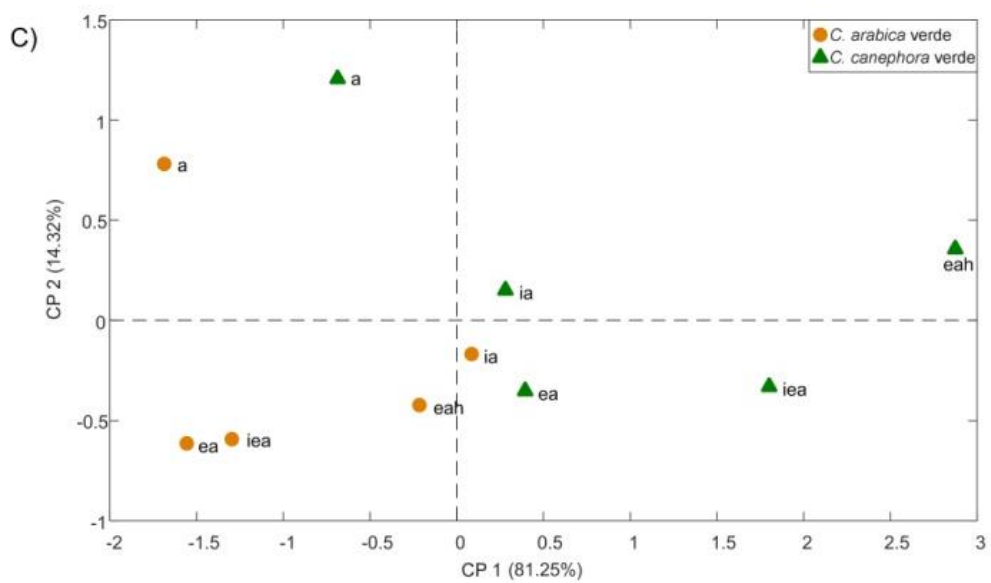
A ACP das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. canephora* e *C. arabica* verde mostraram comportamento análogo ao do café torrado, na qual as duas primeiras componentes principais explicaram 97,87% da variação total dos dados (Fig 2A). Os espectros relativos aos extratos obtidos a partir das misturas extratoras contendo água concentraram-se na região positiva da CP1, onde os maiores valores são do *C. canephora*.

As bandas em torno de 213, 232, 290 e 327 nm (Fig. 2B) provavelmente de ACGs (BELAY, 2011; BELAY, GHOLAP, 2009; NAVARRA et al., 2017) foram responsáveis pela separação dos extratos contendo igual ou acima de 33% de água. Inclusive etanol:água:hexano (1:1:1, v:v:v) – *eah* e isopropanol:etanol:água (1:1:1, v:v:v) – *iea* de *C. canephora* apresentaram os maiores valores na CP1 positiva, o que sugere que tais bandas foram relevantes para estes solventes (Fig. 2A).

Além disso, essas misturas (etanol:água:hexano (1:1:1, v:v:v) – *eah* e isopropanol:etanol:água (1:1:1, v:v:v) – *iea* de *C. canephora* tiveram os maiores valores negativos de escore na CP2 (8,69%), logo, essas soluções demonstram ser melhores extratoras de ACGs (223, 248, 300 e 335 nm) (Fig. 2B) em relação aos demais solventes e/ou misturas explorados nesse trabalho.

Figura 2 A) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. arabica* e *C. canephora* verde obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas. B) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes. C) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. arabica* e *C. canephora* verde obtidos a partir dos solventes selecionados. D) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes.





A partir dos resultados da ACP (Fig 2A) dos grãos de café verde, foram selecionados os extratos com as maiores diferenças químicas, uma vez que os distanciamentos dos pares de extratos podem indicar essa mudança. Assim, selecionou-se água (*a*), isopropanol:água (1:1, v:v) – *ia*, etanol:água (1:1, v:v) – *ea*, isopropanol:etanol:água (1:1:1, v:v:v) – *iea* e etanol:água:hexano (1:1:1, v:v:v) – *eah*. A ACP foi então novamente aplicada, apenas para as respectivas impressões digitais, a fim de confirmar as mudanças metabólicas observadas. No novo modelo verificou-se que os extratos dos grãos de *C. canephora* encontram-se na parte mais positiva da CP1 (Fig. 2C). Por meio do gráfico dos *loadings* da CP1 (Fig. 2D) é possível observar que as bandas em 217, 295 e 329 nm, características dos ACGs (BELAY, 2011; BELAY, GHOLAP, 2009) foram responsáveis pela explicação da distinção entre os extratos das diferentes espécies de café verde. Os resultados sugerem que grãos de *C. canephora* possuem maiores intensidades relativas desses metabólitos. Os extratos obtidos por meio de água pura encontram-se mais distantes dos demais extratos, na parte mais positiva da CP2 e negativa da CP1. A banda em torno de 200 nm foi a responsável por essa separação, de acordo com o valor mais positivo de *loading* na CP2.

A partir dos espectros originais dos extratos aquosos, pode-se observar outras regiões em 275 nm e 320 nm que podem ser de metilxantinas e ácido cafeico respectivamente (NAVARRA et al., 2017; SUHANDY et al., 2016), sendo que as metilxantinas contém uma banda mais intensa na região de 200 nm. Além disso, é possível observar que os extratos para os grãos de *C. canephora* apresentaram valores de escores mais positivos na CP1, indicando maiores intensidades relativas desses metabólitos (ACGs em 217, 295 e 329 nm) em relação a *C. arabica*.

4.1.3 Análise Exploratória Das Impressões Digitais Espectrais Na Região Do UV De *C. Arabica* Entre Grãos Verdes E Torrados

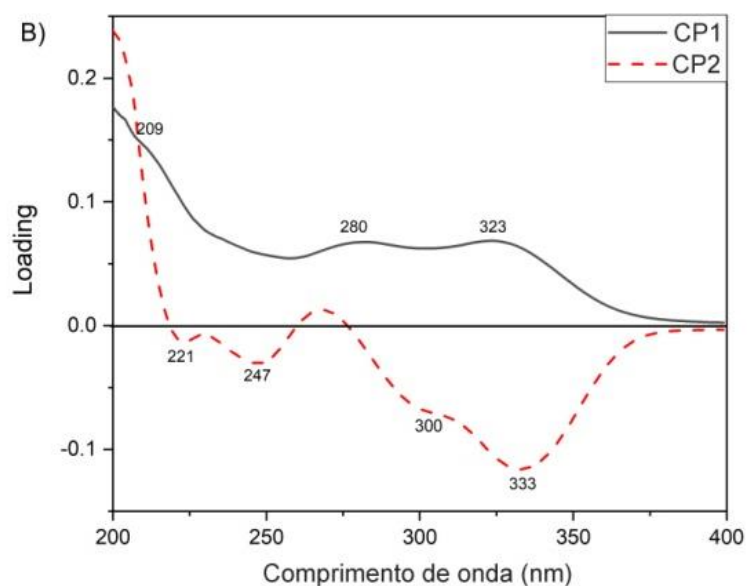
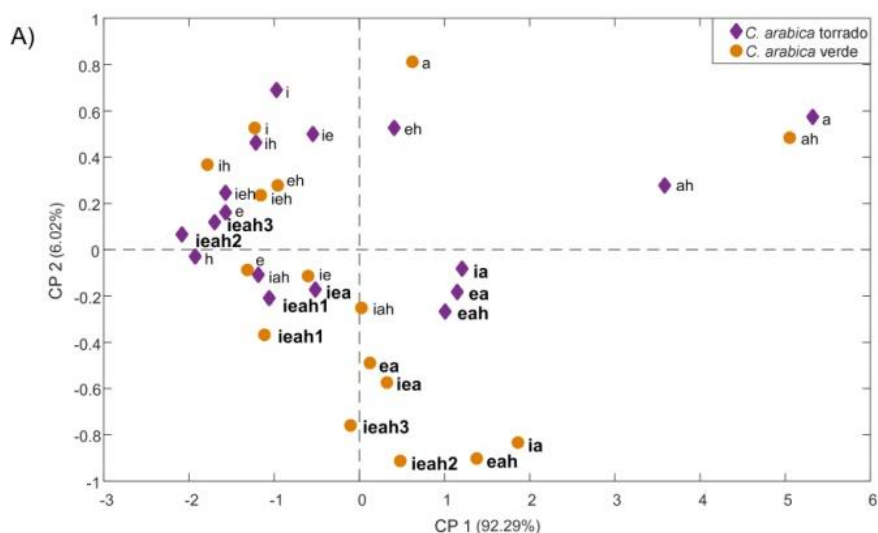
Por meio do gráfico dos escores (Fig. 3A) verificou-se que misturas contendo água também formaram um grupo separado dos demais solventes entre verde e torrado da espécie *C. arabica*. Na CP1 positiva dispuseram-se os extratos com maiores teores de água e na negativa as demais misturas (Fig. 3A). A região negativa da CP1 com positiva da CP2 foi composta por misturas de isopropanol (*i*) etanol (*e*) e hexano (*h*). Dessa forma, de acordo com os valores de *loadings* positivos para CP1 (Fig 3B), as bandas possivelmente de metilxantinas e ácido cafeico em 200, 280 e 323 nm (MACRAE, BEAUMONT, 1987; SUHANDY et al., 2016), foram responsáveis pelo agrupamento dos extratos mais aquosos.

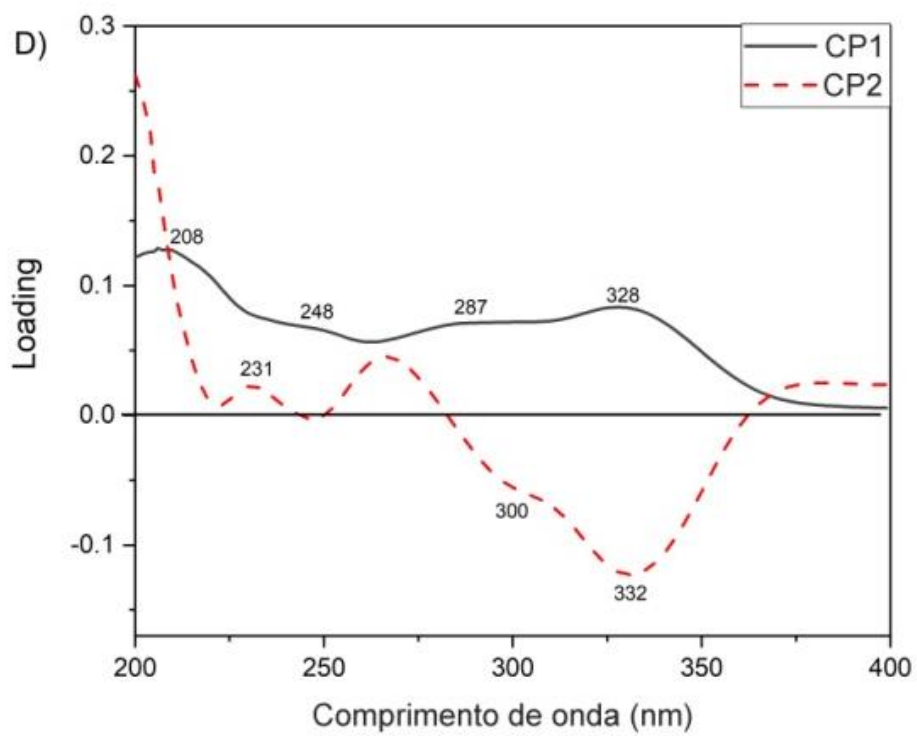
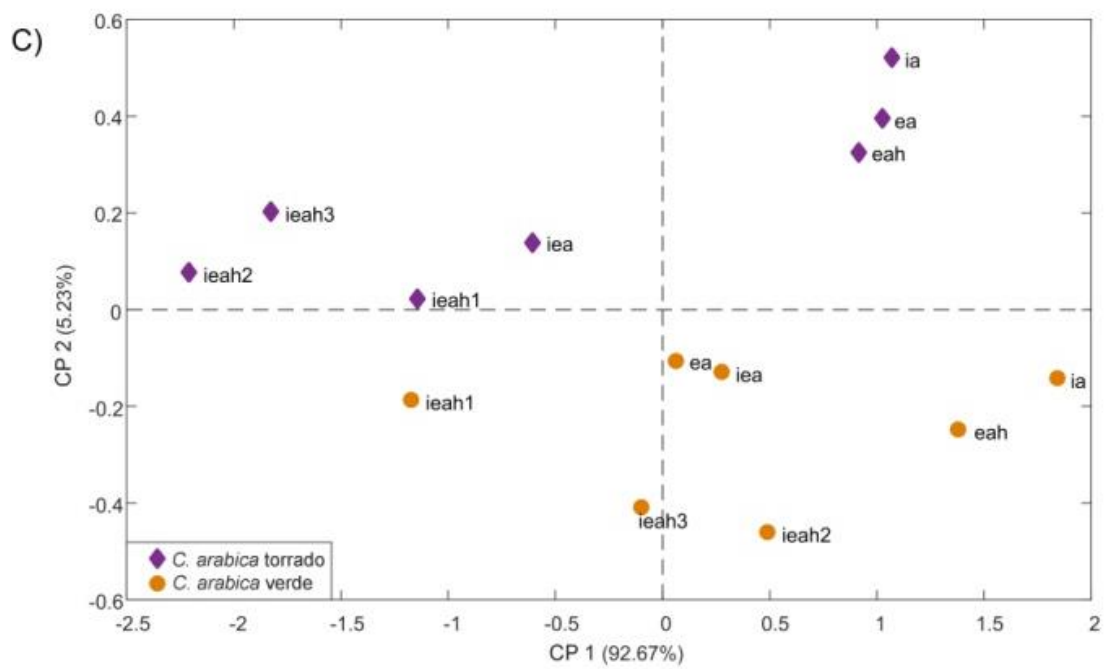
Na CP2 (6,02%) verificou-se uma tendência de separação entre os dois tipos de café, na qual os verdes tiveram os maiores valores negativos na CP2, o que indica uma associação com as bandas em 221, 247, 300 e 335 nm de ACGs (Fig. 3B) sendo os extratos verdes de isopropanol:etanol:água (1:1:1, v:v:v) – *iea*, etanol:água:hexano (1:1:1, v:v:v) – *eah* e quaternárias (1:1:1:1 v:v:v:v) – *ieah* os que apresentaram os maiores valores negativos nesta CP2. As maiores intensidades nos grãos verdes justificam-se pela torrefação que, dependendo da temperatura, pode degradar até 30% da estrutura do ACG (LÓPEZ et al., 2003).

Dentre os solventes extratores do planejamento, as misturas compostas de isopropanol:água (1:1, v:v) – *ia*, etanol:água (1:1, v:v) – *ea*, etanol:água:hexano (1:1:1, v:v:v) – *eah*, isopropanol:etanol:água (1:1:1, v:v:v) – *iea* e isopropanol:etanol:água: hexano (1:1:1:1, v:v:v:v) – *ieah* foram as que demonstraram maior separação entre o processamento para os grãos de *C. arabica*, por isso foram analisadas em uma nova ACP. Ao analisar tais solventes (Fig. 3C), confirmou-se a separação entre grãos verdes x torrados pela CP2. Tal comportamento no gráfico dos escores é evidenciado pelos *loadings* (Fig. 3D), na qual os grãos verdes apresentam sinais analíticos de ACGs (300 e 332 nm) superiores aos torrados (BELAY; GHOLAP, 2009). A mistura obtida por isopropanol:etanol:água:hexano 1:1:1:1,

v:v:v) – *ieah* foi responsável pelas maiores intensidades, já que eles possuem os maiores valores na CP2 negativa.

Figura 3 A) Gráfico dos escores da Análise de Componentes Principais (ACP) (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. arabica*. Verde e torrado obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas. B) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de *C. arabica*. C) Gráfico dos escores da Análise de Componentes Principais (ACP) (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. arabica* verde e torrado obtidos a partir dos solventes selecionados. D) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de *C. arabica*.



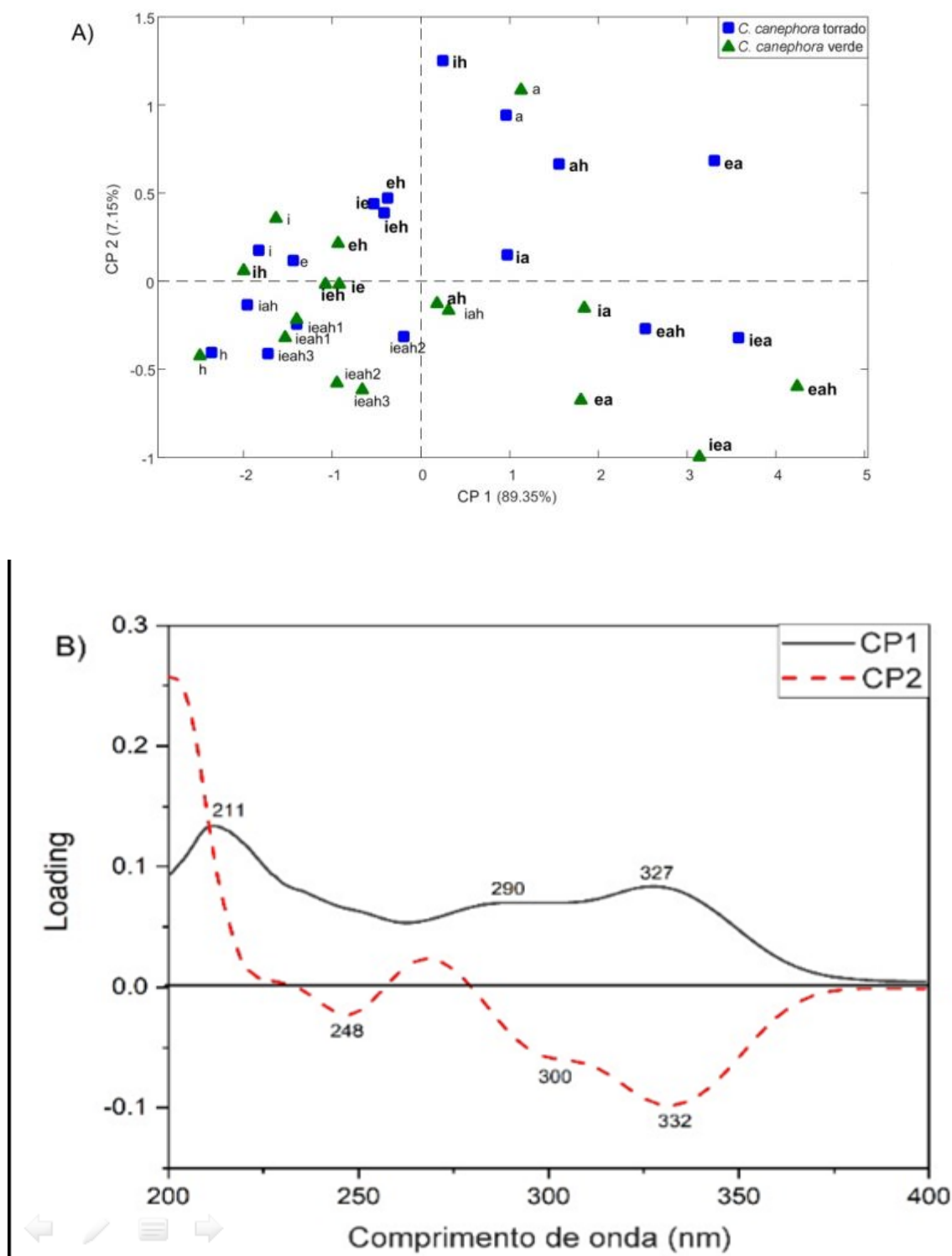


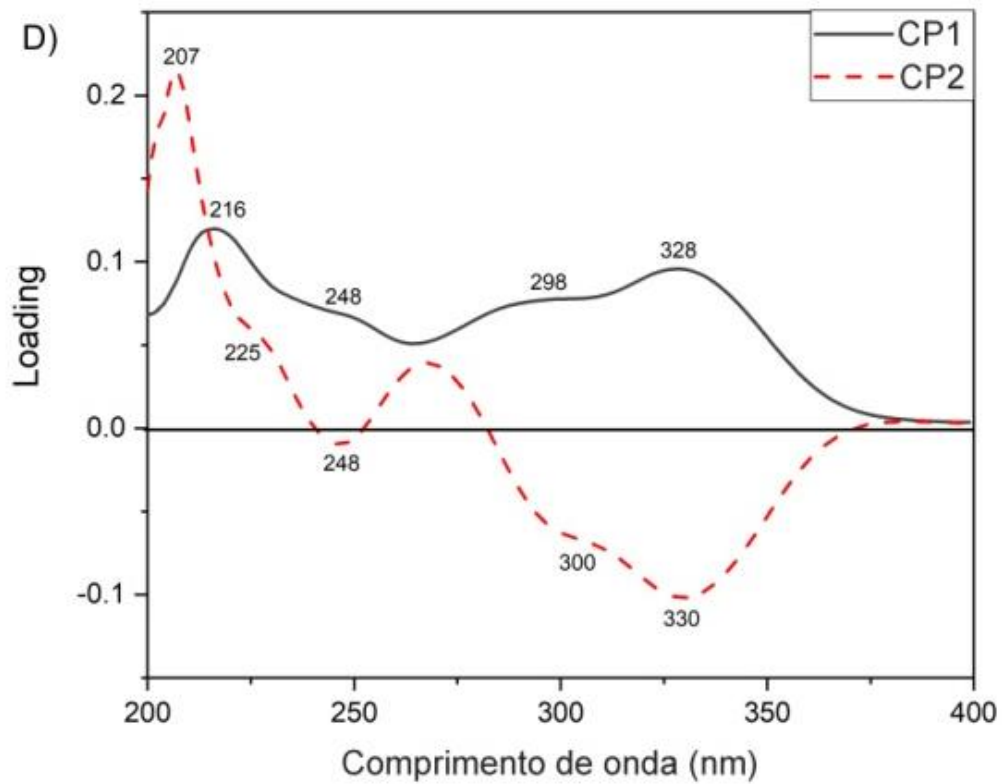
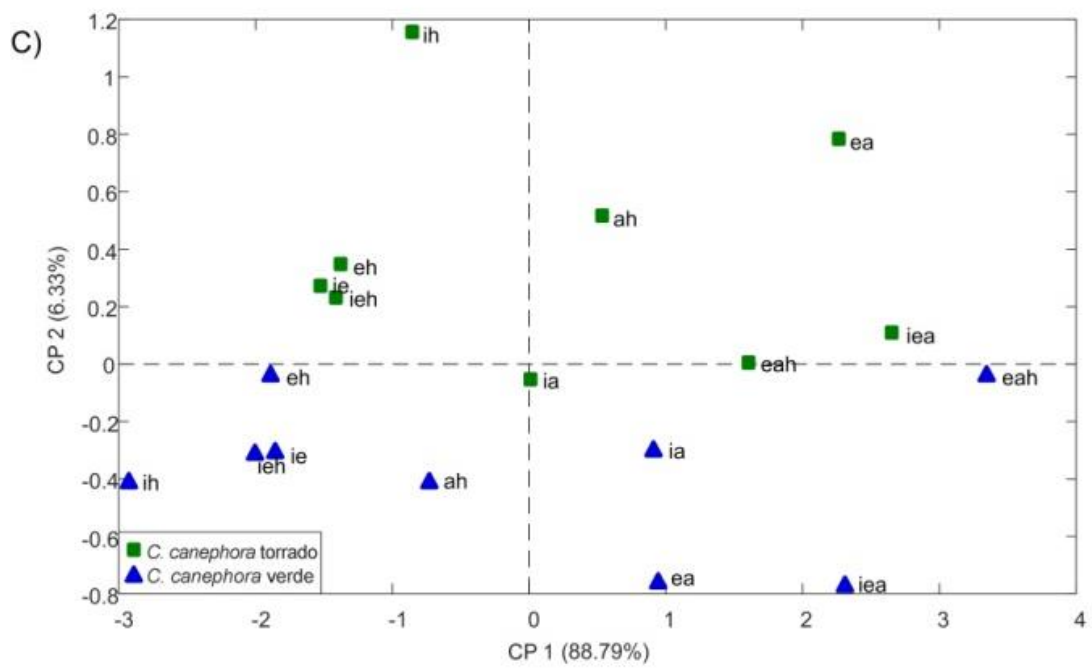
4.1.4 Análise Exploratória Das Impressões Digitais Espectrais Na Região Do UV De *C. Canephora* Entre Grãos Verdes E Torrados

Ao comparar as impressões digitais dos grãos verdes x torrados de *C. canephora* observou-se um comportamento distinto aos supracitados. Apesar da CP1 positiva conter em sua maioria extratos aquosos, eles não separaram unicamente a classe de café. Pode-se observar que isopropanol (*i*), etanol (*e*) e hexano (*h*) em misturas binárias (isopropanol:hexano (1:1, v:v) - *ih*, etanol:hexano (1:1, v:v) - *eh* e etanol:isopropanol (1:1, v:v) - *ei* e ternária isopropanol: etanol:hexano (1:1:1, v:v:v) - *ieh* também separaram grãos verdes x torrados. Em média os maiores valores de escore para a CP2 (7, 15%) foram do café torrado, e os menores do verde (Fig. 4A), o que reforça por meio dos valores dos *loadings* (Fig. 4B) a sugestão de que os grãos verdes independente da espécie indicam maior absorção de ACGs em 300 e 332 nm (BELAY; GHOLAP, 2009).

Para explorar as informações espectrais, os extratos obtidos por etanol:hexano (1:1, v:v) - *eh*, isopropanol:etanol (1:1, v:v) - *ie*, etanol:água (1:1, v:v) - *ea*, água:hexano (1:1, v:v) - *ah*, isopropanol:água (1:1, v:v) - *ia*, isopropanol:hexano (1:1, v:v) - *ih*, isopropanol:etanol:água (1:1:1, v:v:v) - *iea* e etanol:água:hexano (1:1:1, v:v:v) *eah* foram analisados por ACP. Na CP2 (Fig. 4C) verificou-se que a maior intensidade de metilxantinas se deu nos extratos torrados, visto que o maior valor da CP2 positiva são extratos preparados em isopropanol:hexano (1:1, v:v) - *ih* conforme *loadings* em 207 e 272 nm. Já nos grãos verdes, verificou-se que há maior teor de ACGs em 300 e 330 nm (Fig. 4D), visto que são os valores mais negativos na CP2. Observa-se, ainda, que na CP1 estão as amostras extraídas por solventes aquosos.

Figura 4 A) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. canephora* verde e torrado obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas. B) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos *C. canephora* verde e torrado. C) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. canephora* verde e torrado obtidos a partir do solventes selecionados. D) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos *C. canephora* verde e torrado.





4.1.5 Avaliação Dos Efeitos Espécie E Processamento Em Grãos De Café Usando ASCA

Por meio da ACP verificou-se que os solventes etanol:água (1:1, v:v) – *ea* e isopropanol:etanol:água (1:1:1, v:v:v) – *iea* foram os melhores para a separação dos cafés, tanto entre espécies como processamento. Para avaliar se de fato estes fatores são estatisticamente significativos nas mudanças metabólicas, a ASCA foi aplicada a matriz espectral das réplicas de etanol:água (1:1, v:v) – *ea* e isopropanol:etanol:água (1:1:1, v:v:v) – *iea*. Na ordem de examinar a significância dos efeitos dos fatores na ASCA, o teste de permutação com 10.000 randomizações foi utilizado, obtendo assim os respectivos *p*-valores para cada fator. Na Tabela 1 são apresentadas numericamente as interações dos principais efeitos associados às espécies (F1) dos tipos de café (F2) das réplicas dos solventes *ea* para cada amostra.

Tabela 1 – Parâmetros obtidos pela ASCA conforme as análises adicionais de etanol e água.

Fatores	CPs	Efeitos	<i>p</i> -valor
Espécie	1	11,88	0,0065
Processamento	1	51,50	0,0001
Interação (espécie x processamento)	1	0,78	0,5326
Média	-	0,00	-
Resíduos	-	35,83	-

Pelos valores dispostos na Tabela 1 pode-se afirmar que espécies e processamento são fatores que apresentam efeitos significativos na discriminação dos cafés, uma vez que o *p*-valor para ambos os fatores é inferior a 0,05. Todavia salienta-se que o processamento (F2 = 51,50, com *p*-valor igual a 0, 0,0001) tem maior efeito que a espécie (F1 = 11,88, com *p*-valor igual a 0, 0,0065). Ressalta-se que a interação entre espécie e processamento não foi significativa.

De acordo com os gráficos do submodelo ACP da ASCA (Fig. 5A), os

escores da espécie *C. arabica* (verde e torrado) concentraram-se na CP1 negativa enquanto que a espécie *C. canephora* apresentou os maiores valores na CP1 positiva. Logo, pode-se afirmar que as bandas de metilxantinas (207 e 287 nm) e ACGs (240 e 328 nm) distinguiram as espécies *C. arabica* x *C. canephora* (BELAY, 2011; NAVARRA et al., 2017; SUHANDY et al., 2016). Os extratos de grãos verdes dispuseram-se na CP1 positiva, enquanto as amostras torradas localizaram-se na CP1 negativa (Fig. 5B). Nos *loadings* (Fig. 5C) pode-se averiguar que as bandas em 218, 300 e 328 nm (ACGs) (processamento) tiveram maiores sinais para o café verde.

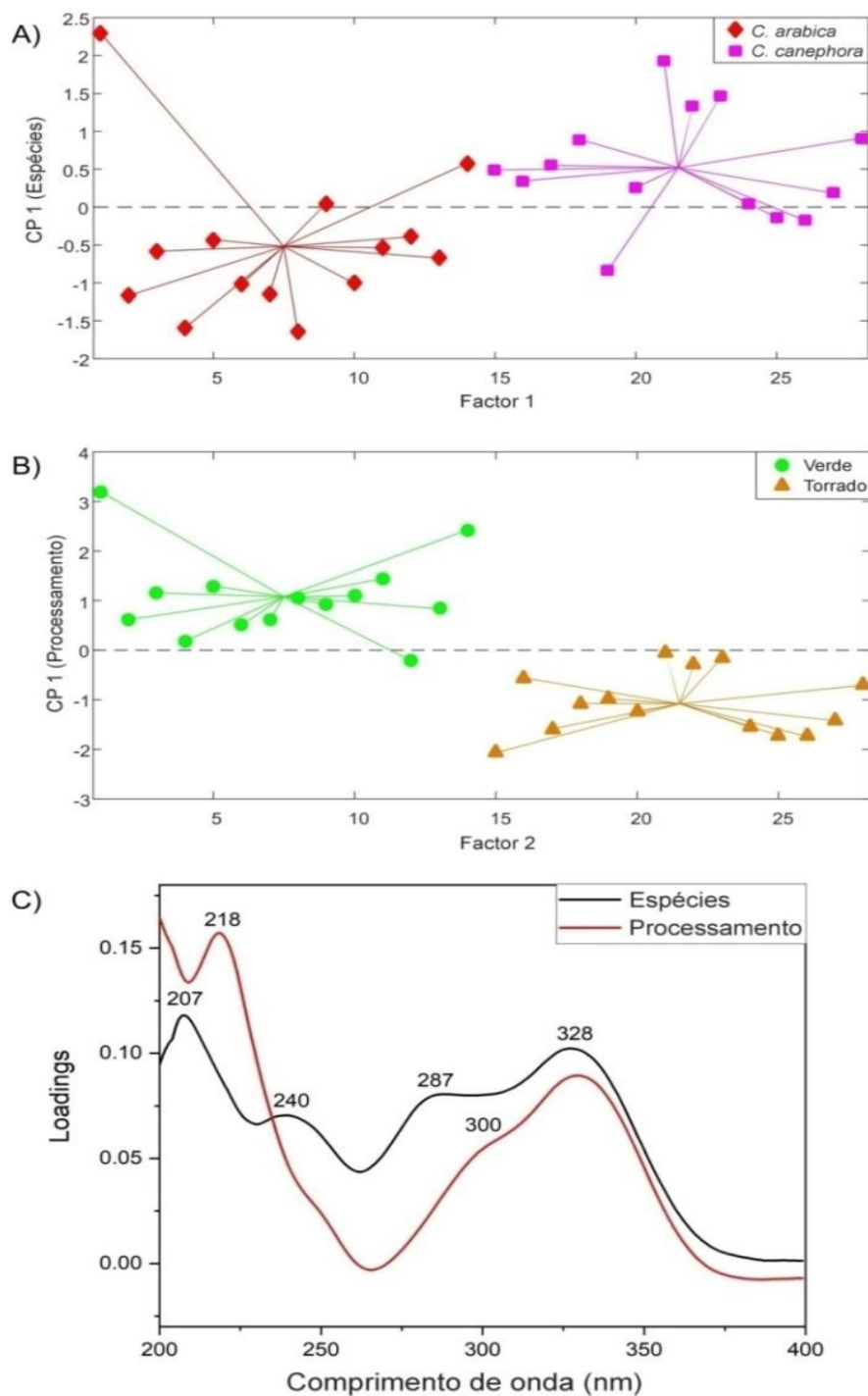
Como mencionado, além de etanol:água (1:1, v:v) - *ea*, os extratos das análises adicionais adquiridos por isopropanol:etanol:água (1:1:1, v:v:v) - *iea* também foram submetidos à ASCA, obtendo os valores da Tabela 2.

Os *p*-valores descritos na Tabela 2 mostram que espécies, processamento e a interação (espécies x processamento) são efeitos significativos nas mudanças espectrais. No entanto, como a espécie ($F_1 = 58,40$, com *p*-valor igual a 0,0001) foi superior ao processamento ($F_2 = 14,83$ com *p*-valor igual a 0,0005). Desse modo, pode-se afirmar que para o solvente isopropanol:etanol:água (1:1:1, v:v:v) - *iea* as espécies demonstraram maior efeito em relação às mudanças metabólicas nos cafés do que o processamento. Os escores para o solvente isopropanol:etanol:água (1:1:1, v:v:v) - *iea* mostram que os extratos de *C. canephora* apresentaram valores positivos na CP1 (Fig. 6A).

Tabela 2 – Parâmetros obtidos pela ASCA conforme as análises adicionais de isopropanol, etanol e água.

Fatores	CPs	Efeitos	<i>p</i> -valor
Espécie	1	58,40	0,0001
Processamento	1	14,83	0,0005
Interação (espécie x processamento)	1	5,56	0,0166
Média	-	0,00	-
Resíduo	-	21,21	-

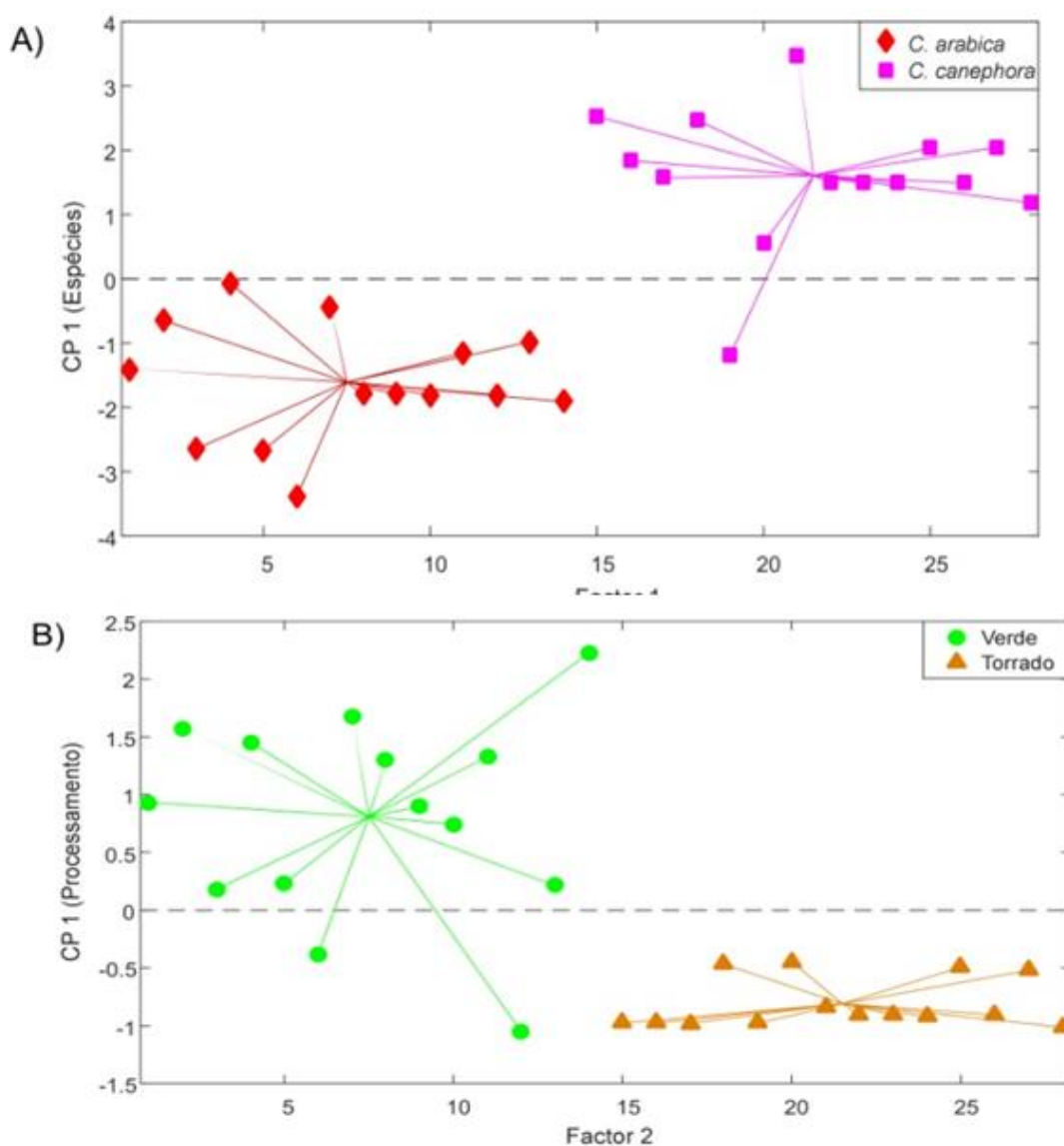
Figura 5 A) Gráfico dos escores da Análise de Variância por Análise de Componentes Simultâneos (ASCA) (CP1 x F1) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. arabica* e *C. canephora* obtidos a partir das réplicas de *ea*. B) Gráfico dos escores da Análise de Variância por Análise de Componentes Simultâneos (ASCA) (CP1 x F2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos verdes e torrados obtidos a partir das réplicas de *ea*. C) Gráfico dos *loadings* para as bandas de maior relevância para as espécies e processamento.

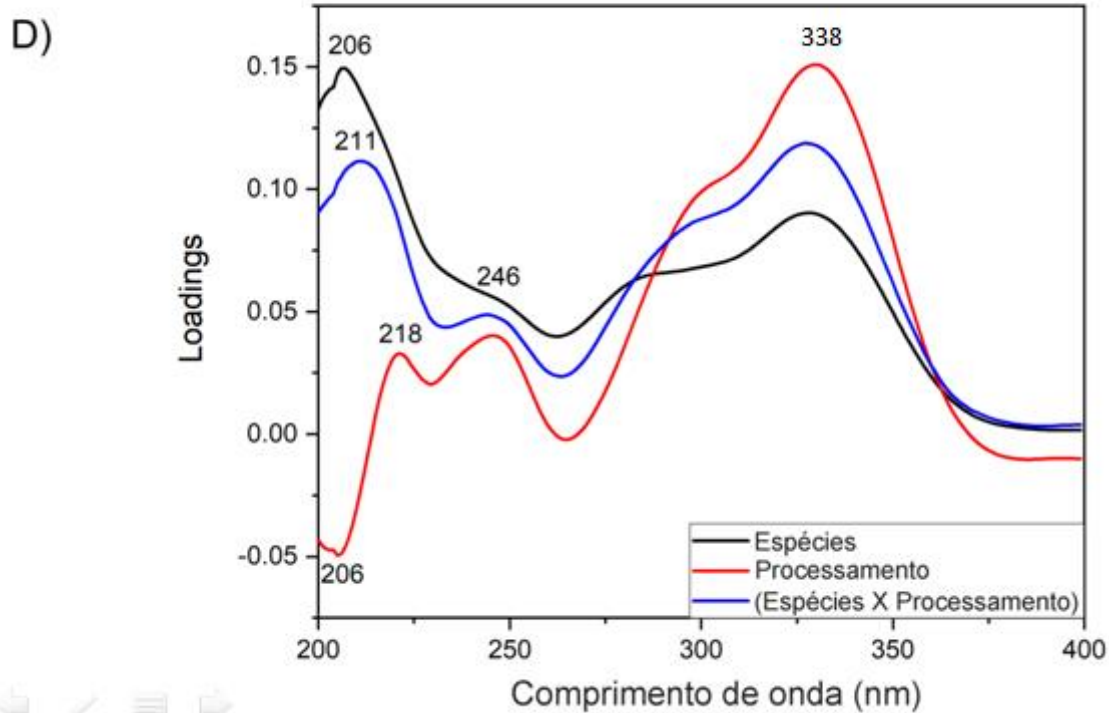
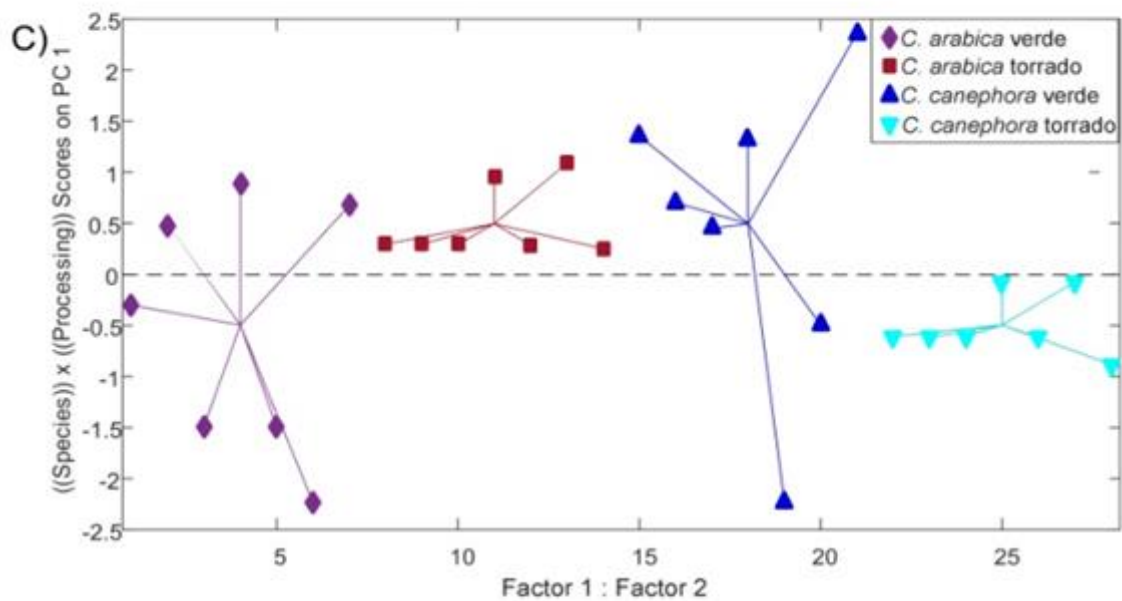


Os *loadings* (Fig. 6D) desses escores não apresentaram banda na região negativa, logo, os sinais em 206 e 287 nm (possivelmente de metilxantinas), 246 e 328 nm (ACGs) referem-se ao *C. canephora*, confirmando que essa espécie possui maiores teores destes metabólitos. Já na comparação em razão do processamento, os extratos verdes dispuseram-se na CP1 positiva, o que nos *loadings* expressam os sinais em 218, 246 e 338 nm, reforçando que os metabólitos presentes nessas regiões são mais relevantes para os grãos verdes (Fig. 6D). Os extratos torrados ficaram na CP1 negativa (Fig. 6B), por isso, são relacionados a 206 nm, que pode ser de açúcares, ácidos orgânicos ou metilxantinas (VELOSO et al., 2013; NAVARRA et al., 2017; SUHANDY et al., 2016).

Ao analisar as interações entre verde x torrado e *C. arabica* x *C. canephora* pode-se inferir que *C. arabica* torrado e *C. canephora* verde possuem os sinais mais positivos da CP1, com maiores valores de *loadings* em 211, 246 e 328 nm, sendo 211 nm referente à metilxantinas (SUHANDY et al., 2016). Desse modo, a partir das réplicas dessa mistura verificou-se um efeito significativo da interação. Em outras palavras, houve uma mudança nos metabólitos que foi dependente de ambos os fatores (espécie e processamento).

Figura 6 A) Gráfico dos escores da Análise de Variância por Análise de Componentes Simultâneos (ASCA) (CP1 x F1) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. arabica* e *C.canephora* obtidos a partir das réplicas de isopropanol, etanol e água (*iea*). B) Gráfico dos escores da Análise de Variância por Análise de Componentes Simultâneos (ASCA) (CP1 x F2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos verdes e torrados obtidos a partir das réplicas de isopropanol, etanol e água (*iea*). C) Gráfico dos escores da Análise de Variância por Análise de Componentes Simultâneos (ASCA) (CP1 x F1x F2) das impressões digitais espectrais na região do UV dos grãos de *C. arabica*, *C.canephora*, verde e torrado obtidos a partir das réplicas de isopropanol, etanol e água (*iea*). D) Gráfico dos *loadings* para as bandas de maior relevância para as espécies e processamento.



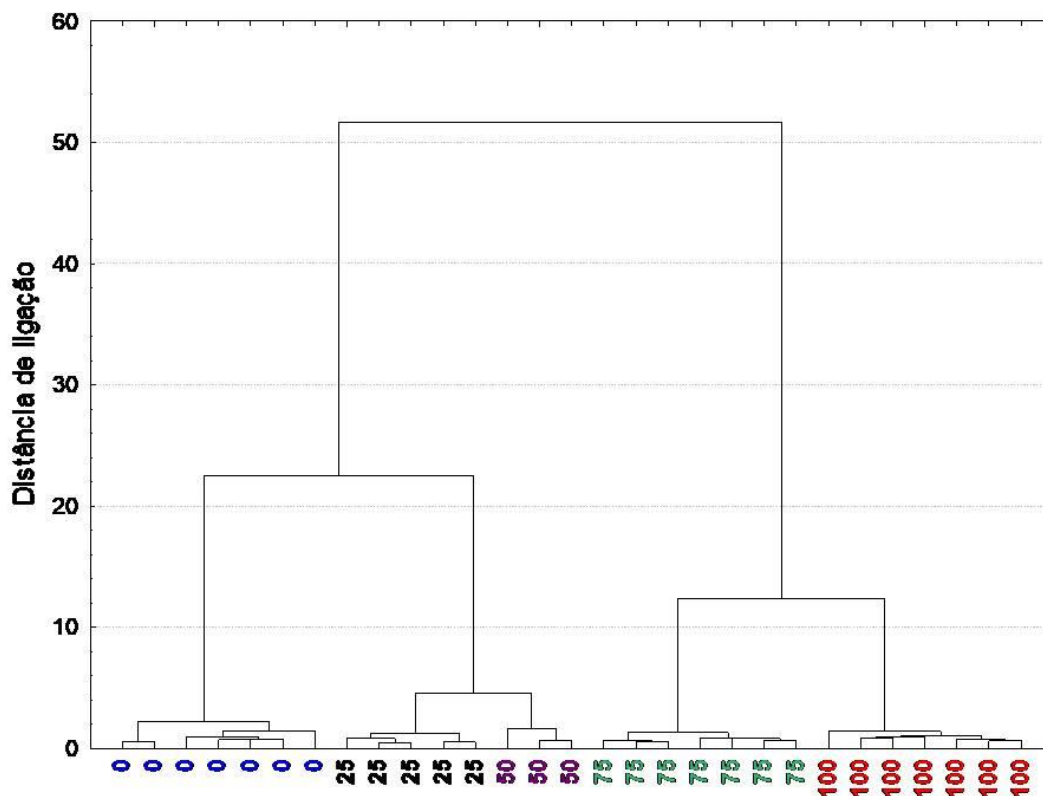


4.2 ESTUDO DAS PROPORÇÕES ENTRE AS ESPÉCIES *C. ARABICA* E *C. CANEPHORA*

4.2.1 Análise Exploratória Das Misturas De *C. Arabica* E *C. Canephora* Para Grãos De Café Verde

As impressões digitais espectrais na região do UV dos extratos preparados em mistura binária de etanol:isopropanol (1:1 v:v) – *ei* foram inicialmente submetidas à Análise de *Clusters*, cujo dendrograma está apresentado na Fig. 7. Observa-se na Fig. 7a formação de 4 grupos na distância de ligação 12, na qual os extratos de 25 e 50% de *C. arabica* apresentaram maior similaridade, uma vez que dentre os grupos eles tiveram o menor distanciamento.

Figura 7 - Dendrograma obtido pelo método de Ward das impressões digitais espectroscópicas na região do UV da mistura *C. arabica*:*C. canephora* para grãos verdes. Os números referem-se à proporção de *C. arabica*.



As impressões digitais espectrais na região do UV preparadas em mistura binária etanol:isopropanol (1:1 v:v) - *ei* também foram submetidas à Análise das Componentes Principais. ACP1, na Fig. 8 se relaciona principalmente com a concentração dos metabólitos que absorvem entre 275 – 332 nm. A CP2 discrimina nos escores positivos as maiores proporções de *C. canephora* e negativos para as maiores proporções de *C. arabica*.

Os gráficos dos escores, Fig. 8 e *loadings* na Fig. 9, sugerem que existem duas classes de metabólitos na região de sobreposição entre 250 - 350 nm fortemente associada com ácidos. Os ácidos, maiores constituintes do café são os clorogênicos e seus isômeros. Esses ácidos compreendem alguns grupos de compostos formados principalmente por esterificação de ácidos quínico com qualquer um dos seguintes ácidos, cafeico, ferúlico ou p-cumarico (FARAH, 2012).

A Fig. 9 mostra que as bandas de absorção em 219 nm e 332 nm são responsáveis pela discriminação dos escores na CP2 positiva, anticorrelacionada com as bandas em 259 e 301 nm, responsáveis pela discriminação na CP2 negativa.

As absorções em 219 e 332 nm podem estar associadas aos ACGs ou derivados (SOUTO et al., 2010). Segundo pesquisas realizadas por Belay e Gholap (2009), os ACGs podem apresentar absorções com picos máximos próximas a 217 nm, logo, 219 nm pode ser atribuído a uma transição eletrônica dos elétrons do orbital π ligante e π^* anti-ligante presente no anel benzeno de ACGs. Segundo esses autores, os ACGs também apresentam absorções em aproximadamente 329 nm, sugerindo a possibilidade de a banda localizada em 332 nm estar associada aos ACGs.

Figura 8 - Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP1 X CP2) das impressões digitais espectrais da região do UV para os grãos verdes nas proporções de 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 e 100:0 (%) de *C. arabica*.

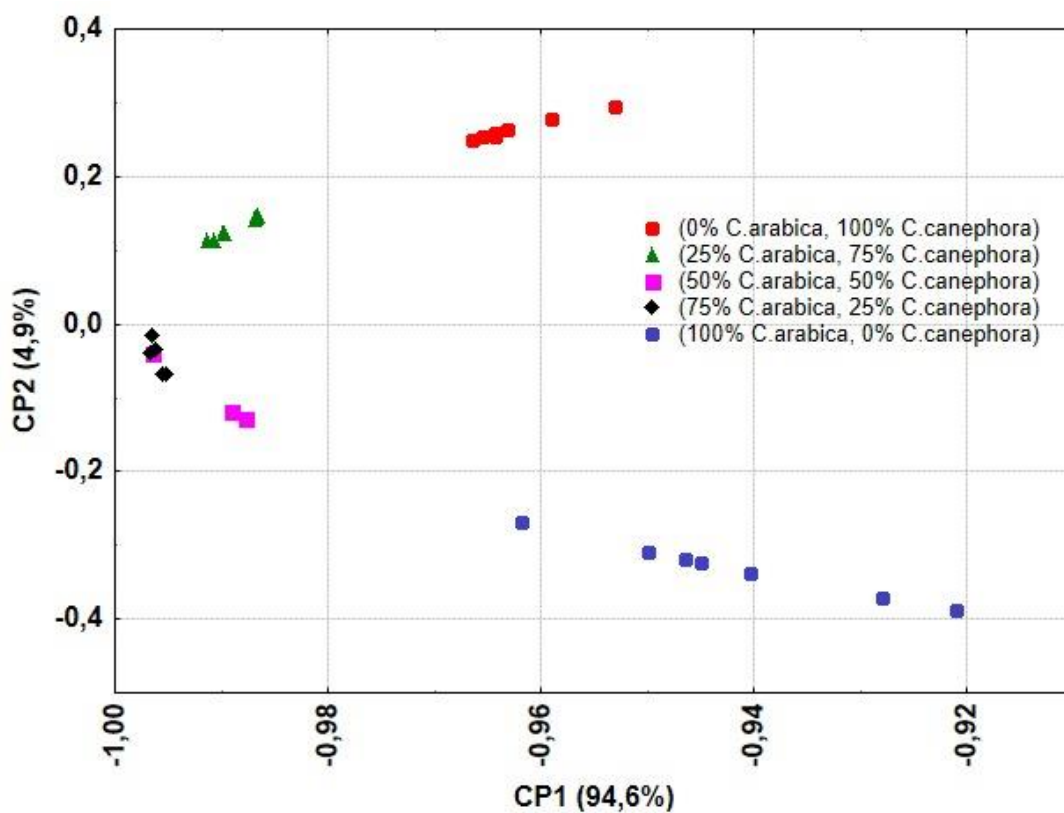
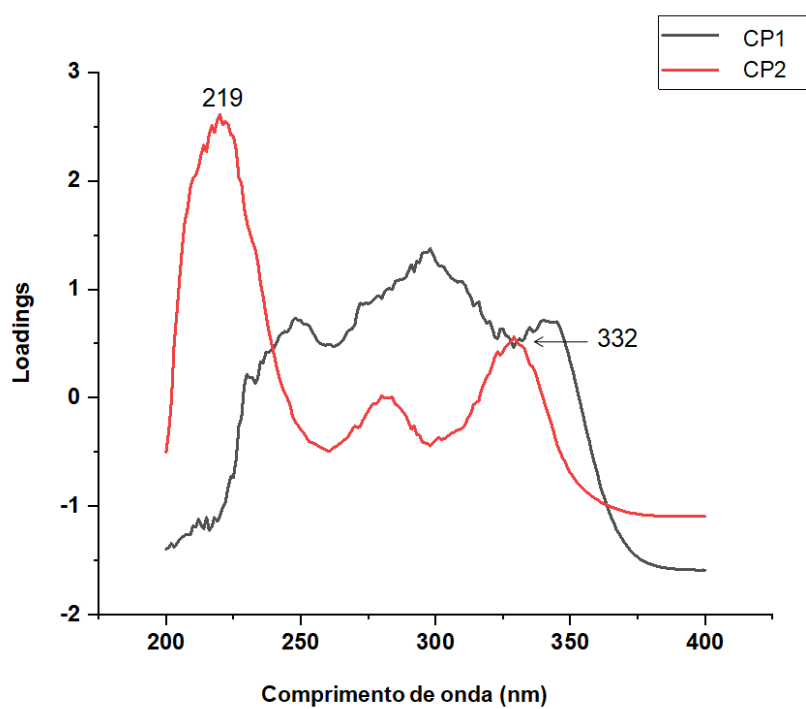


Figura 9 – Gráfico dos *loadings* da CP1 X CP2 para as impressões digitais de UV para as diferentes proporções de 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 e 100:0 (%) de *C. arabica*.



Estudos realizados por Ky et al., 2001 mostram que os ACGs podem apresentar isômeros, além de derivados distintos, por isso há sinais desse metabólito secundário em regiões diferentes. Esses autores estimam que para *C. arabica* o número de estruturas oriundas de degradação varia entre 40 – 50 e no *C. canephora* varia entre 70 – 80. Essa afirmação de Ky et al. 2001 reforça a possibilidade do sinal corresponder aos ACGs e das espécies com maior proporção de *C. canephora* apresentarem sinais mais intensos desse metabólito.

A Fig. 10 mostra os espectros dos extratos da mistura binária etanol:isopropanol (1:1 v:v) - *ei*, com 100% de *C. arabica* e 100% de *C. canephora* verdes. Observa-se maior abundância relativa de metabólitos com o máximo de absorção em 328 nm para *C. arabica* provavelmente de ácidos, enquanto para o *C. canephora* maior abundância relativa em 275 nm, provenientes das metilxantinas, principalmente a cafeína. Observa-se um ponto isobéstico em 284 nm, sugerindo que as concentrações dos metabólitos nesse ponto são iguais.

A Fig. 11 mostra os espectros médios para *C. arabica* e *C. canephora* verdes puros conforme a mistura binária etanol:isopropanol (1:1 v:v) - *ei* (ponto central do planejamento experimental da Tabela 3). Na Fig. 11 observa-se que à medida que aumenta a proporção de *C. canephora* aumenta a absorvância em 284 nm. Para 100% de *C. arabica* a razão a_{328}/a_{284} é 1,09 unidades de absorvância. Para 100% de *C. canephora* é 0,91. Esse resultado corrobora com os resultados da ACP.

Figura 10 - Espectros dos extratos de *C. arabica* e *C. canephora* verdes em mistura binária etanol:isopropanol (1:1 v:v)

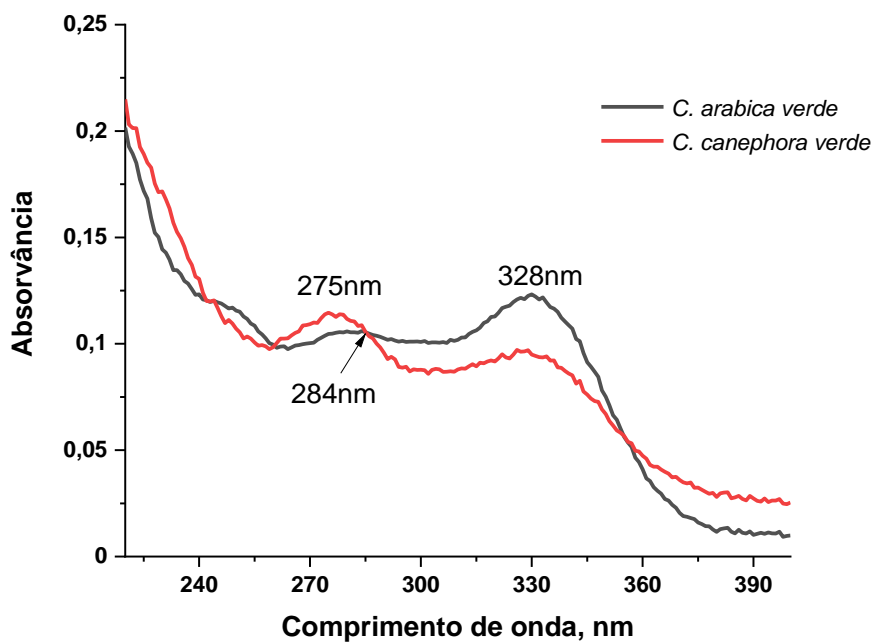
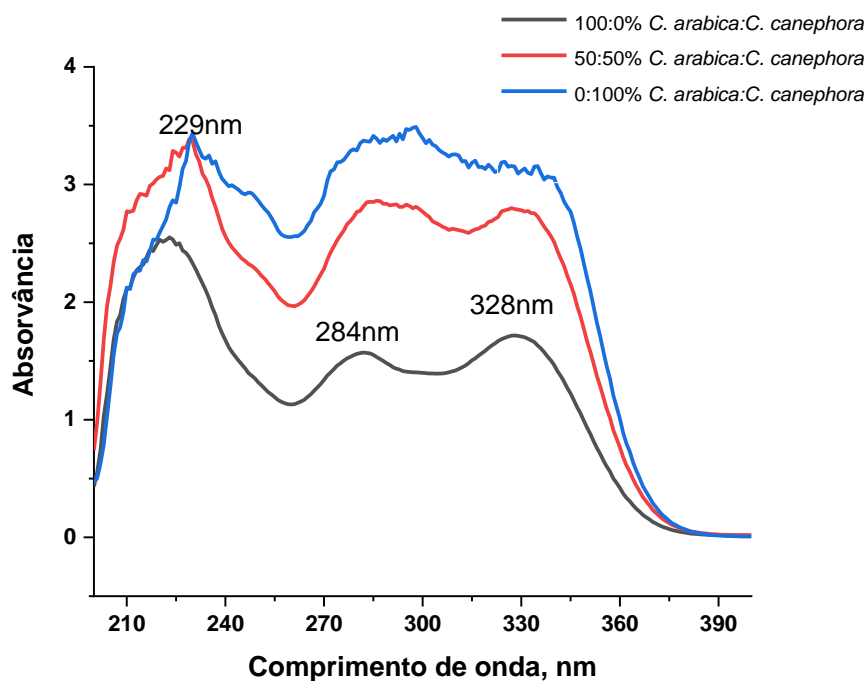
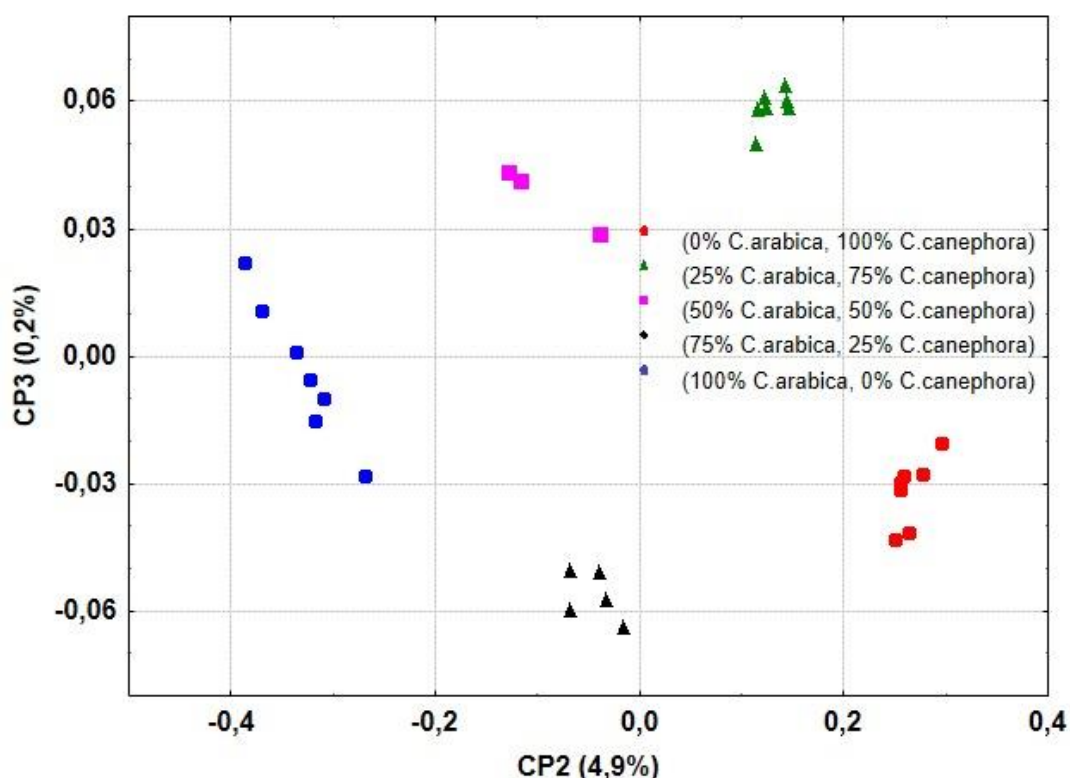


Figura 11 - Espectros dos extratos médios das proporções de *C. arabica* e *C. canephora* verdes em mistura binária etanol:isopropanol (1:1 v:v).



A Fig. 12, gráfico dos escores da CP2 com CP3 mostra a formação de cinco grupos distintos das diferentes proporções. A CP2 separa na região positiva amostras com maiores proporções de *C. canephora* e no lado esquerdo (negativo) amostras com maiores proporções de *C. arabica*. Pelos *loadings* pode-se observar que na comparação CP2 x CP3 (Fig. 13) as amostras com 25% e 100% de *C. canephora* são discriminadas pela banda em 205 nm. Na CP2 os *loadings* são interpretados como na Fig. 9.

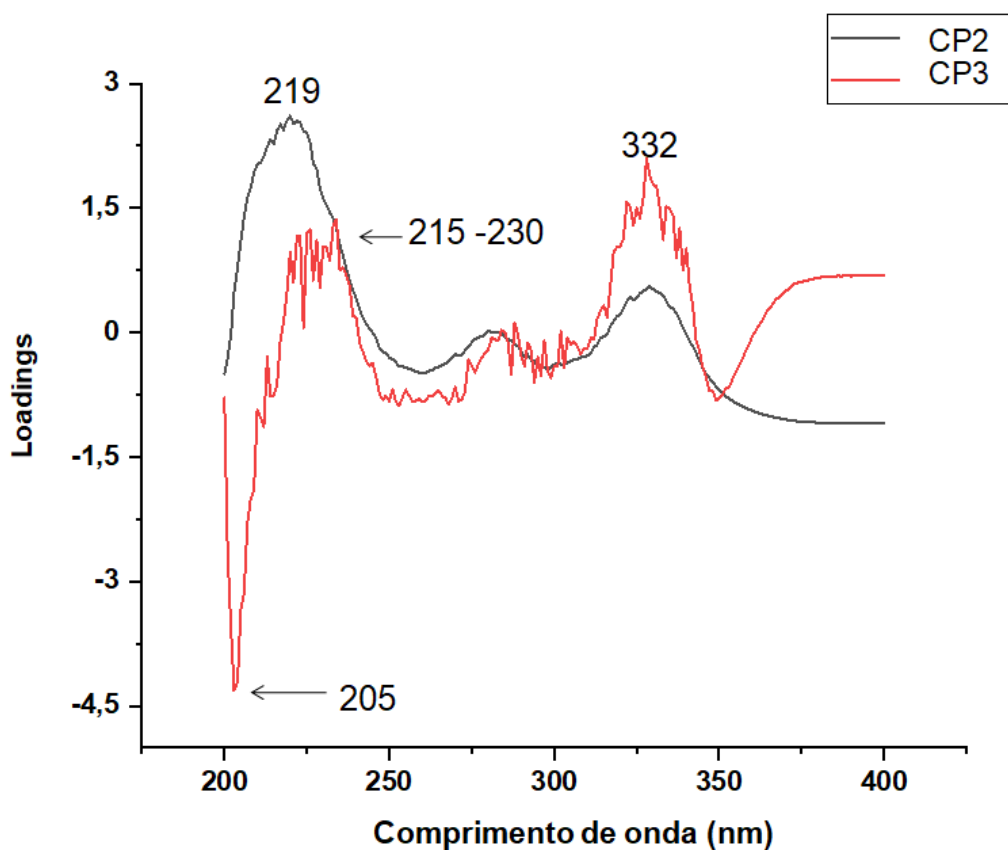
Figura 12 - Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP2 X CP3) das impressões digitais espectrais da região do UV para os grãos verdes nas proporções de 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 e 100:0 (%) de *C. arabica*:*C. canephora*.



Em estudo com padrão de ácidos com o solvente etanol, Terrile (2016) verificou que sinais em 215 nm correspondem a ácidos cítrico ou málico. Autores confirmam a existência desses ácidos no café (ELIXABET et al., 2019), logo, as absorções em torno de 215 nm podem estar associadas a essas estruturas.

A faixa entre 190 – 210 nm abrange as absorções de açúcares ou ácidos orgânicos (VELOSO et al., 2013). Dessa forma, a disposição dos escores na CP3 negativa indica que os extratos de 100 e 25% de *C. canephora* apresentam maior abundância relativa de ácidos orgânicos ou açúcares.

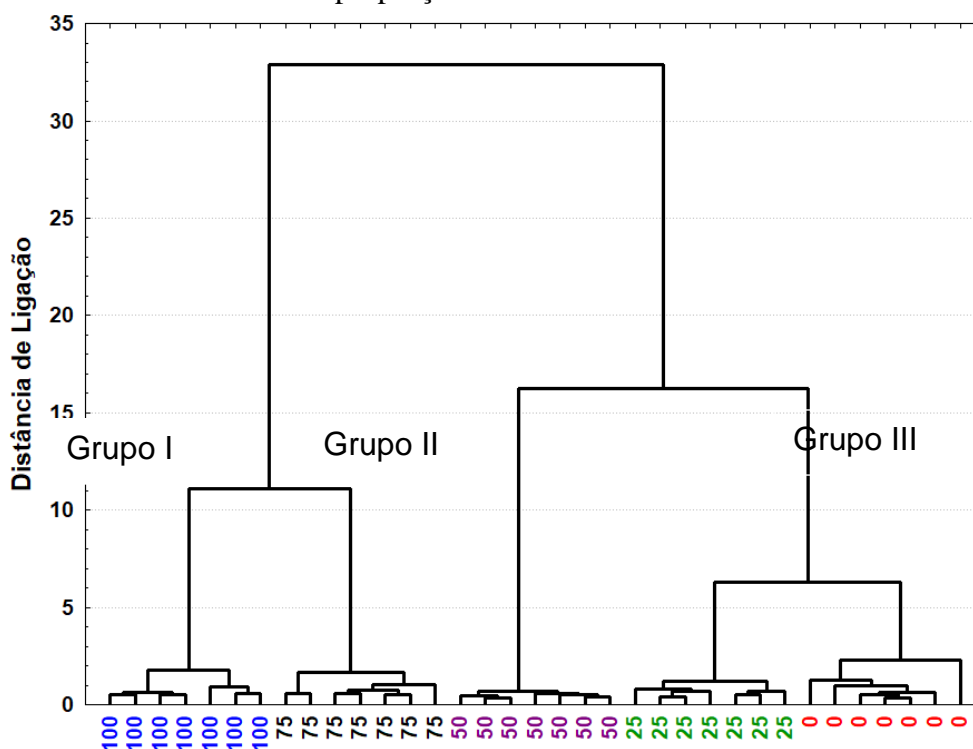
Figura 13 - Gráfico dos *loadings* da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP2 X CP3) das impressões digitais espectrais da região do UV para os grãos verdes nas proporções de 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 e 100:0 (%) de *C. arabica*:*C. canephora*.



4.2.2 Análise exploratória das misturas de *C. arabica* e *C. canephora* para grãos de café torrado

As impressões digitais espectrais na região do UV preparadas em mistura binária etanol:isopropanol (1:1 v:v) – *ei* foram inicialmente submetidas à Análise Hierárquica para observar a formação de agrupamentos naturais. O dendograma (Fig. 14) mostra a formação de três maiores grupos na distância de ligação 15. Observa-se no grupo I amostras com teores mais elevados de *C. arabica*, no grupo II (centro do dendrograma) amostras com proporções iguais de *C. arabica*:*C. canephora* e no Grupo III amostras com teores mais elevados de *C. canephora*. Vale ressaltar que os espectros 0 e 25% de *C. arabica* torrado apresentaram maior similaridade.

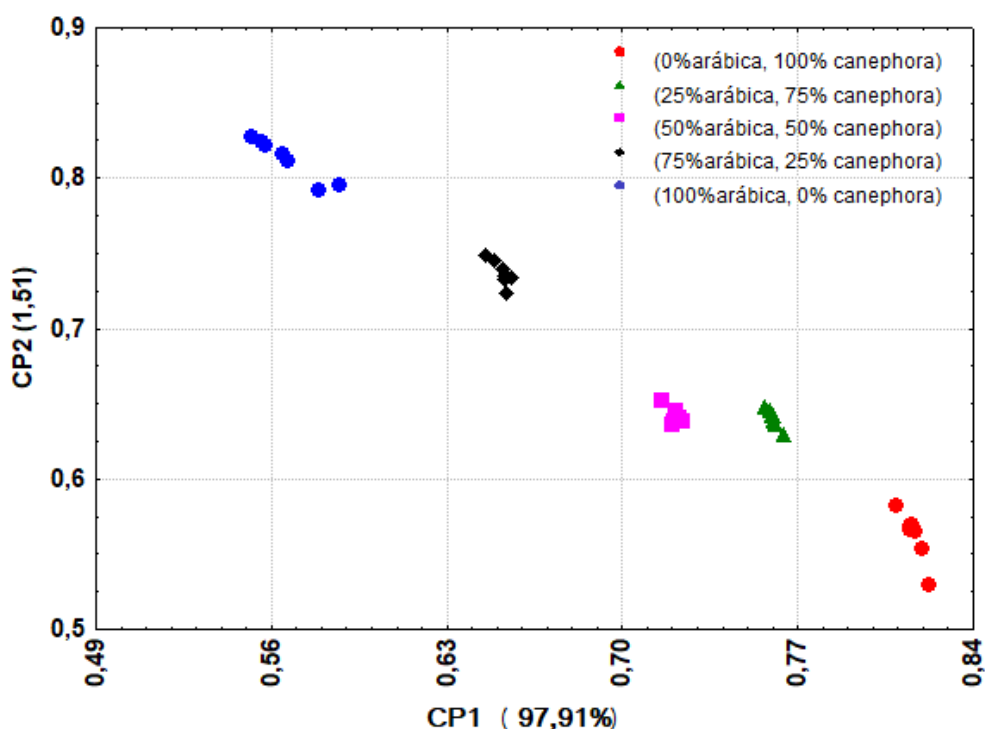
Figura 14 - Dendograma obtido pelo método de Ward das impressões digitais espectroscópicas na região do UV da mistura *C. arabica*:*C. canephora* para grãos de café torrado. Os números referem-se à proporção de *C. arabica*.



As impressões digitais espectrais na região do UV preparadas em mistura binária etanol:isopropanol (1:1 v:v) também foram submetidas a Análise de Componentes

Principais. O gráfico dos escores da CP1 x CP2 está apresentado na Fig.15. Ao contrário dos escores para os grãos verdes que não houve significância sequencial nas proporções, os pontos para os grãos verdes estão em uma linha reta, consequência de haver exatamente dois metabólitos dialmetralmente opostos, ou seja, correlacionados negativamente. Em outras palavras, quando a concentração de um metabólito aumenta, a concentração do outro diminui. Observa-se que as duas CPs estão associadas às concentrações de pelo menos dois principais metabólitos que estão anticorrelacionados. Verifica-se que as amostras de *C.arabica* puro se posicionam no gráfico dos escores em baixo valor de *loading* na CP1 e alto na CP2, enquanto que *C. canephora* se posiciona em alto valor de *loading* na CP1 e baixo na CP2.

Figura 15 – Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (ACP) (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais da região do UV para os grãos de café torrado nas proporções de 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 e 100:0 (%) de *C. arabica*:*C. canephora*.



Examinando as Fig. 15 e 16, pode-se observar quais os comprimentos de onda estão associados aos metabólitos ou classes de metabólitos. A posição das proporções na CP1 (Fig. 15) está associada com metabólitos que absorvem em 227, 270 e 328 nm (positivos) e 295 nm (negativo). Na CP2 os *loadings* com comprimentos de onda na região positiva estão associados com metabólitos que absorvem em 215 e 289 nm. Analisando as Fig. 15 e 16, observa-se que os escores na CP1 mais a direita tem maior contribuição dos *loadings* dos metabólitos que absorvem em 227 e 328 nm. Sendo assim, pode-se inferir que à medida que aumenta a proporção de *C. canephora* aumenta as abundâncias relativas dos ácidos (328nm). Na CP2 mais positiva tem maior contribuição dos *loadings* dos metabólitos que absorvem em 215 nm e 289 nm, sendo que 270 nm está sobreposto com metabólitos que absorvem entre 280 – 300 nm. Sendo assim, pode-se inferir que à medida que aumenta a proporção de *C. arabica* aumentam as abundâncias relativas das metilxantinas e dos metabólitos que absorvem em 289 nm na CP2 e 295 nm na CP1. A banda em 270 nm pode estar associada à cafeína, uma vez que em amostras de café esse metabólito possui picos máximos entre 270 – 280 nm (SUHANDY et al., 2016; TERRILE et al., 2016)

Para extrair maiores informações sobre os metabólitos, os *loadings* foram interpretados com o auxílio dos espectros médios das proporções. A Fig. 17 mostra os espectros médios para *C. arabica* e *C. canephora* torrados puros e para a mistura binária etanol:isopropanol (1:1 v:v) - *ei* (ponto central do planejamento experimental da Tabela 3). Observa-se na Fig. 17, que quando *C. canephora* é adicionado na mistura, há diminuição das intensidades das bandas em torno de 280 nm e aumento em 328 nm. Assim, pode-se inferir que esses são os dois metabólitos ou classes de metabólitos que diferenciaram a mudança da composição das misturas. Ressalta-se que como destacado por Belay et al., (2011), os sinais no UV absorvem vários tipos de moléculas nessa região, portanto, para inferir acerca desses metabólitos é necessária a aplicação de técnicas quantitativas, como cromatografia.

Figura 16 - Gráfico dos *loadings* da Análise das Componentes Principais das impressões digitais espectrais da região do UV para os grãos de café torrado nas proporções de 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 e 100:0 (%) de *C. arabica*:*C. canephora*.

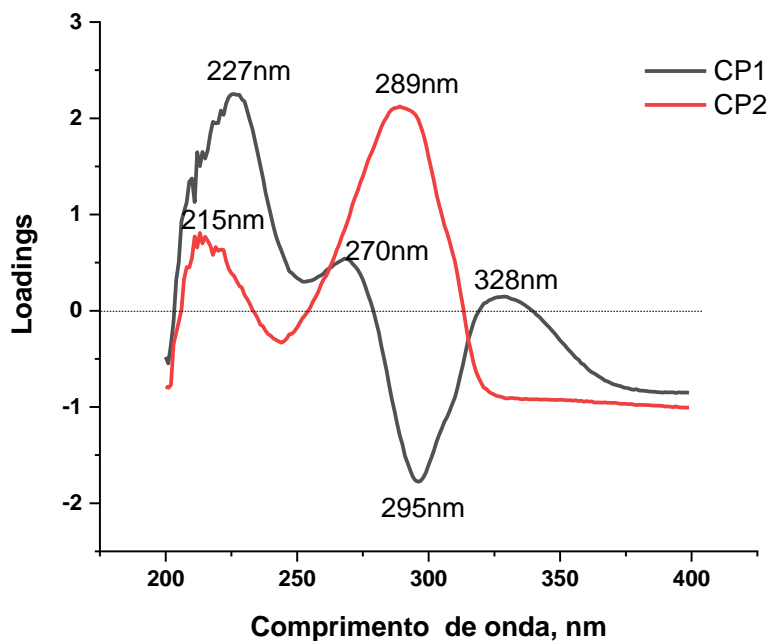
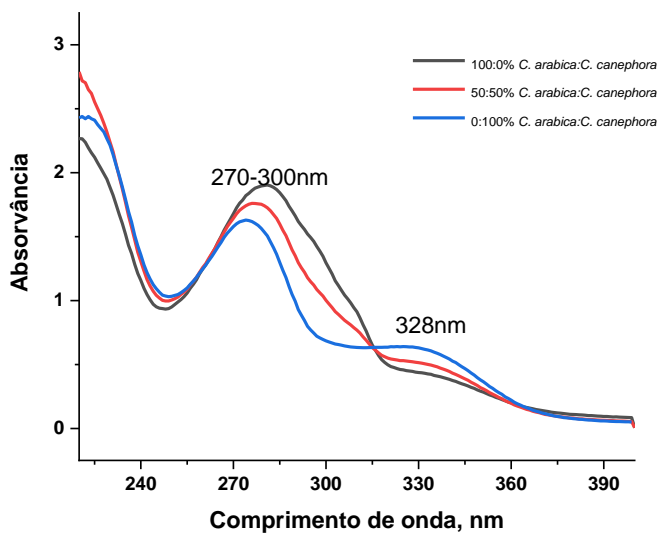


Figura 17 - Espectros dos extratos médios das proporções de *C. arabica* e *C. canephora* torrados em mistura binária etanol:isopropanol (1:1 v:v).





Capítulo 5

Conclusão



5. CONCLUSÃO

5.1 CONCLUSÃO

A partir dos experimentos e análises quimiométricas com 4 solventes, conclui-se a partir da ACP que para as amostras comerciais em estudo, a mistura binária (etanol:água 1:1 v:v) – *ea* e terciária (isopropanol:etanol:água 1:1:1 v:v:v) – *iea* são boas extratoras de metabólitos que discriminan os cafés, sendo ACGs e metilxantinas esses possíveis metabólitos. Os resultados da Análise de Variância por Componentes Simultâneos indicaram a partir da mistura binária que os fatores torra (processamento) e espécie são significativos para a discriminação dos cafés, e para a mistura ternária, os fatores espécie, processamento e a interação entre ambos foram significativos para a discriminação.

Nas misturas de *C. arabica*:*C. canephora* de grãos verdes e torrados a ACP dos grãos verdes sugere que a medida com que se aumenta a proporção de *C. canephora* a abundância relativa de ACGs (219 e 332 nm) também aumenta. Essa conclusão coincide com o estudo com 4 solventes, reafirmando que na espécie *C. canephora* verde os teores de ACGs são superiores ao *C. arabica*.

A ACP dos grãos torrados mostrou que as maiores proporções de *C. arabica* apresentam abundância relativa de metabólitos que absorvem em 289 nm. Os extratos com maiores proporções de *C. canephora* torrado mostrou que 227 e 289 nm são regiões espectrais de metabólitos que discriminan as espécies torradas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, G. F.; BORÉM, F. M.; OLIVEIRA, L. F. C.; ALMEIDA, M. R.; ALVES, A. P. C. Raman spectroscopy: A new strategy for monitoring the quality of Green coffee beans during storage. **Food Chemistry**. v. 287, p. 241–248, 2019.
- AGNOLETTI, B. Z.; OLIVEIRA, E. C. S.; PINHEIRO, P. F.; SARAIVA, S. H. Discriminação de Café Arábica e Conilon Utilizando Propriedades Físico-Químicas Aliadas à Quimiometria. **Virtual Magazine of Chemistry**. v. 11, p. 785 - 805, 2019.
- AMUTA, O. P.; NNAMANI, O. O.; MUSA, A. D; NWODO, F. C . Three pyridinium alkaloids may account for the antibiotic effect of the seed of *Abrus precatorius*. **Der Chemica Sinica**, v.2, p. 42- 45, 2011.
- ARRUDA, N. P.; HOVEL, A. M. C.; REZENDE, C. M.; FREITAS, S. P.; COURI, S.; BIZZO, H. R. Correlação entre precursores e voláteis em café arábica brasileiro processado pelas vias seca, semiúmida e úmida e discriminação através da análise por componentes principais. *Química Nova*, v.35, p. 2044 -2051, 2012.
- ATOMSSA, T.; GHOLAP, A. V. Characterization of caffeine and determination of caffeine in tea leaves using uv-visible spectrometer. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**. v. 5, p. 1 – 8. 2011.
- AYSELI, M. T.; KELEBEK, H.; SELLI, S. Elucidation of aroma-active compounds and chlorogenic acids of Turkish coffee brewed from médium and dark roasted *Coffea arábica* beans. **Food Chemistry**. v. 338, p. 1 – 10 , 2021.
- BADMOS, S.; KUHNERT, N. Classification of Brazilian roasted coffees from different geographical origins and farming practices based on chlorogenic acid profiles. **Food Research International**. v.134, 2012.
- BADMOS, S.; LEE, S. L.; KUHNERT, N. Comparação e quantificação de ácidos clorogênicos para diferenciação de grãos verdes robusta e arábica. *Food Res Int*, 2019.
- BARWICK, V. J. Strategies for solvent selection — a literature review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 16, p. 293 – 309, 1997.
- BELAY, A.; GHOLAP, A. V. Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**. v. 3, 234 – 240, 2009.

BELAY, A.; TURE, K.; REDI, M.; ASFAW, A. Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. **Food Chemistry** v.108, p. 310–315, 2008.

BELAY, A. Some biochemical compounds in coffee beans and methods developed for their analysis. **International Journal of the Physical Sciences**, v. 6, p. 6373 – 6378, 2011.

BLUM, J.; LEMAIRE, B.; LAFAY, S. Effect of a Green de caffeinated on glycaemia: a pilot prospective clinical study. **Research Nutrafoods**, v. 6, p. 13 – 17 , 2007.

BELL, L. N.; WETZEL, C. R.; GRAND, A. N. Teor de cafeína no café como influenciado pelas técnicas de moagem e fabricação. **Food Research International**. v. 29, p. 785 – 789, 1996.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Café. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/cafe>>, Acessado em 18 de março de 2020.

BUDRYN, G.; ZYZELEWICZ, D.; NEBESNY, E; ORACZ, J.; KRYSIAK, W. Influence of addition of green tea and green coffee extracts on the properties of fine yeast pastry fried products. **Food Research International** t.v.50,p. 149–160, 2013.

CANUTO, G. A. B.; DA COSTA, J. L.; DA CRUZ, P. L. R.; DE SOUZA, A. R. L.; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e apresentações representativas. **Química Nova**, v. 41, p. 75 – 91, 2018.

CENTRO COMERCIAL DE CAFÉ DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Disponível em <Exportações dos Cafés do Brasil em setembro de 2020 batem recorde histórico – Centro do Comércio de Café do Estado de Minas Gerais (cccmg.com.br)>. Acesso em 25 de janeiro de 2021.

CHU, Y.F. Coffee: emerging health effects and disease prevention, John Wiley and Sons, 2012.

COELHO et al., Nature of Phenolic Compounds in Coffee Melanoidins. **J. Agric. Food Chem**, v. 62, 7843-78, 2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Safra Brasileira do café. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/cafe>>, Acessado em 25 de março de 2020.

CORNARD, J. P.; LAPOUGE, C.; DANGLETERRE, L.; ALLET-BODELOT, C.

Complexation of lead(II) by chlorogenic acid: Experimental and theoretical study. **Journal of Physica Chemistry**, n. 48, v. 112, p. 12475–12484, 2008.

CROZIER, T. W. M.; STALMACH, A.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Espresso coffees, caffeine and chlorogenic acid intake: potential health implications, **Food & Function**, v. 3, p. 30– 33, 2012.

DAGLIA, M.; TARSI, R.; PAPETTI A.; GRISOLI, P. et al. Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans*' adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1225–1229, 2012.

DANKOWSKA, A.; DOMAGAŁA, A.; KOWALEWSKI, W. Quantification of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. *robusta* concentration in blends by means of synchronous fluorescence and UV-Vis spectroscopies. **Talanta**, v. 172, o. 215–220, 2017.

DIAS, R. C. E.; FARIA, A. F.; MERCADANTE, A. Z.; BRAGAGNOLO, 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.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Método para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 24, p. 586 – 592, 2004.

ELIXABET, D. et al. Analytical approaches in coffee quality control. In: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M. Caffeinated and Cocoa Based Beverages. Estados Unidos: Woodhead Publishing, 2019. p. 285-336.

ELLIS, D. I.; DUNN, W. B.; GRIFFIN, J. L.; ALLWOOD, J. W.; GOODACRE, R. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. **Pharmacogenomics**, v.8, p. 1243 – 1266, 2007.

FARAH, A. Coffee constituents. In: CHU, Y. F. **Coffee: Emerging health effects and disease prevention**. New Jersey: Blackwell Publishing Ltd., 2012. p. 21 – 58.

FARAH, A.; DE PAULIS, T.; TRUGO, L. C.; MARTIN, P. R. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1505–1513, 2005.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v. 18, p. 23 – 36, 2006.

FARAH, A.; MONTEIRO, M. C.; CALADO, V. FRANCA, A. S.; TRUGO, L. C. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chem.** v. 98, p. 373 - 380, 2006.

FERREIRA, M. M. C. Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações, 2014.
GARG, S. K. Green Coffee Beans. In: GUPTA, R. C. (Org.). **Nutraceuticals:**

GINZ, M.; BALZER, H. H.; BRADBURY, A. G. W.; MAIER, H. G. Formation of aliphatic acids by carbohydrate degradation during roasting of coffee. **Eur Food Res Technol**, v. 211, p. 404–10, 2001.

GNIECHWITZ, D. et al., Isolation and characterisation of a coffee melanoidin fracti. *Revista da Ciência da Alimentação e Agricultura*, v. 88, p. 2153-2160, 2008.

JANSEN, J.; ENGEL, J. **ASCA: The Implementation of Design of Experiments Into Multivariate Modelling in Chemometrics.** 1 ed. Elsevier, 2018.

KY, C.; LOUARN, J.; DUSSERT, S.; GUYOT, B.; HAMON, S.; NOIROT, M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild coffee arabica L. and C. canephora. **Food Chemistry.** v. 75, p. 223-230, 2001.

LIM, L. T.; ZWICKER, M.; WANG, X. **Coffee: One of the Most Consumed Beverages in the World.** Elsevier, 2019. p. 278 – 285.

LOCAS, C. P.; YAYLAYAN, V. A. Isotope labeling studies on the formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) from sucrose by pyrolysis-GC/MS. *J Agric Food Chem*, v. 56, p. 6717–23, 2008.

LÓPEZ, L. M.; DE ALBA, P. L. L.; CAMPOS, R. G.; RODRÍGUEZ, L. M. L. Simultaneous determination of methylxanthines in coffees and teas by UV-Vis spectrophotometry and partial least squares. **Analytica Chimica Acta**, v. 493, p. 83 – 94, 2003.

MARCUCCI, C. A. et al., Teores de trigonelina, ácido 5-cafeoilquínico, cafeína e melanoidinas em cafés solúveis comerciais brasileiros. **Química Nova**, v. 36, p. 544-548, 2013.

MACRAE, R.; BEAUMONT, J.. **Coffee: Related Beverages; Clarke, R. J.; Macrae, R., eds.;** Elsevier, London, England, 1987.

MARCHEAFAVE, G. G.; PAULI, E. D.; TORMENA, C. D.; RAKOCEVIC, M.; BRUNS,

R. E.; SCARMINIO, I. S. Experimental design solvent effects on pigment extraction and antioxidant activity of Arabica L. Leaves. **Microchemical Journal**, v. 152, p. 713 – 721, 2019.

MATULOVÁ, M.; CAPEK, P.; KANEKO, S.; NAVARINI, L.; LIVERANI, F. Structure of arabinogalactan oligosaccharides derived from arabinogalactan-protein of Coffea arabica instant coffee powder. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 1029 – 1036, 2011.

MESQUITA, C. M. de.; REZENDE, J. E. de.; MORAES, N. C.; DIAS, P. T.; CARVALHO, R. M. de. Manual do café : colheita e preparo Belo Horizonte : EMATER-MG, 2007. 47 p.

MORAES, S. A. L. et al. Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 28, p. 198-207, 2008.

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.

MOREIRA, A. S. P. et al. Chlorogenic acid–arabinose hybrid domains in coffee melanoidins: Evidences from a model system. *Food Chemistry*, v. 185, o. 135-144, 2015.

MOREIRA, I.; SCHEEL, G. L.; HATUMURA, P. H.; SCARMINIO, I. S. Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em coffee arábica. *Quim. Nova*, v. 37, p. 39-43, 2014.

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; DE MARIA, C. A. B. Componentes voláteis do café torrado. parte II: compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticoS. **Química Nova**, v. 22, p. 195 – 203, 2000.

MUMIN, M. A.; AKHTER, K.F.; ABEDIN, M. Z.; HOSSAIN, M. Z. Determination and characterization of caffeine in tea coffee and soft drink by solid phase extraction and HPLC, **Malaysian J. Chem**, v.1, p. 45- 51, 2006.

NAKABAYASHI T. Chemical studies on quality of coffee. 7. Formation of organic-acids from sucrose by roast. *J Jpn Soc Food Sci Technol – Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, v.25, p. 257–61, 1978.

NAVARRA, G.; MOSCHETTI, M.; GUARRASI, V.; MANGIONE, M. R.; MILITELLO, V.; LEONE, M. Simultaneous Determination of Caffeine and Chlorogenic Acids in Green Coffee by UV/Vis Spectroscopy. **Journal of Chemistry**. v. 2017, p. 1 – 8, 2017.

NUNES, F. M.; COIMBRA, M. A. Melanoidinas de Infusões de Café. Fracionamento, caracterização química e efeito do grau de assado. **Revisões de fitoquímica**, v. 9, p. 171-185, 2010.

OIC, Organização Internacional Do Café. Estatísticas comerciais. Disponível em <International Coffee Organization - What's New (ico.org)>. Acesso em 25 de janeiro de 2021

OIC, ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ. Estatísticas. Disponível em: <International Coffee Organization - Dados estatísticos da Organização Internacional do Café>. Acessado em 22 de março de 2020.

PAULI, E. D.; CRISTIANO, V.; NIXDORF, S. L. Método para determinação de carboidratos empregado na triagem de adulterações em café. **Química Nova**, n. 4, v. 34, p. 689-694, 2011.
PERRONE, D.; FARAH, A.; DONANGELO, C. M. DE PAULIS, T.; MARTIN, P. R. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. *Food Chemistry*, v. 106, p. 859-867, 2008.

ROGERS, P. J. et al., Association of the anxiogenic and alerting effects of caffeine with ADORA2A and ADORA1 polymorphisms and habitual level of caffeine consumption, *Neuropsychopharmacology*, v. 35, p. 1973–1983, 2010.

SANZ, C.; MAEZTU, L.; ZAPELENA, M. J.; BELLO, J.; CID, C. Profiles of volatile compounds and sensory analysis of three blends of coffee: influence of different proportions of Arabica and Robusta and influence of roasting coffee with sugar. **Journal of Science ph Food and Agriculture**. v. 82, p. 840 – 847, 2002.

SCHOLZ, B.; ERNST, L.; MAIER, H. G. New stereoisomers of quinic acid and their lactones. **Liebigs Ann Che**, p.1029–36, 1991.

SILVA, A. C. R.; SILVA, C. C. ; GARRETT, R.; REZENDE, C. M. Comprehensive lipid analysis of green Arabica coffee beans by LCHRMS/MS. **Food Research International**, v. 137, 2020.

SILVA, S. J. N. DA; SCHUCH, P. Z.; VAINSTEIN2, M. H.; JABLONSK, A. Determinação do 5-hidroximetilfurfural em méis utilizando cromatografia eletrocínética capilar micelar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 46 – 50, 2008.

SILVAROLLA, B.; MAZZAFERA, B.; FAZUOLI, L. C. Bioquímica vegetal - Um café arábica naturalmente descafeinado. **Nature Publishing Group**, V. 429, p. 826, 2004.

SOARES, P. K.; BRUNS, R. E.; SCARMÍNIO, I.S. Statistica l mixture design – principal component optimization for selective compound extraction from plant material. **J.Sep.Sci**, v, 30, p. 302–331, 2007.

SOUTO, U. T. C. P.; PONTES, M. J. C.; SILVA, E.C.; GALVÃO, R. K. H.; ARAÚJO, M. C. U.; SANCHES, F. A. C.; CUNHA, F. A. S.; OLIVEIRA, M. S. R. UV-Vis spectrometric classification of coffees by SPA-LDA. **Food Chemistry**. v.119, p.368– 371, 2010.

SUHANDY, D. et al., The potential use of ultraviolet-visible spectroscopy and soft independent modelling of class analogies (simca) for classification of indonesian palm civet coffee (kopi luwak). **International Seminar on Food Security**, p.245 – 235, 2016.

TERRILE, A. E.; MARCHEAFAVE, G. G.; OLIVEIRA, G. S.; RAKOCEVIC, M.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Análise quimiotométrica do perfil característico UV e variações de impressão digital infravermelha de feijão verde *Coffea arábica* sob diferentes tratamentos de gerenciamento espacial. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 27, , p. 1254 – 1263, 2016.

TERRILE, A. E. 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. 40.

TOCI, A.; FARAH, A. TRUGO, L. C. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após a torração. **Química Nova**, v. 29, p. 965-971, 2006.

VELOSO, A. C. A.; RODRIGUES, L. R.; DIAS, L. G.; PERES, A. M. **UV Spectrophotometry Method for Dietary Sugars**, 1 ed.; PREEDY, V. R. (eds). Royal Society of Chemistry, London, England, 2013, p. 229.

VIANI, R.; HORMAN, I. Thermal-behavior of trigonelline. **J Food Sci**. v.39, p. 1216–7, 1974.

WEI, F.; FURIHATA, K.; HU, F.; MIYAKAWA, T.; TANOKURA, M. Twodimensional (1)H-(13)C nuclear magnetic resonance (NMR)-based comprehensive analysis of roasted coffee bean extract. **J Agric Food Chem**. V. 59, p. 9065–73, 2011.

WEI, F et al. 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.

WEI, F.; TANOKURA, M. Organic compounds in green coffee beans. In: **Coffee in health and disease prevention**. New Jersey: Blackwell Publishing Ltd., 2015. p. 149 – 162.

WONGSA, P.; KHAMPA, N.; HORADEE, S.; CHAIWARITH, J.; RATTANAPANONE, N. Quality and bioactive compounds of blends of Arabica and Robusta spraydried coffee. **Food Chemistry**, v. 283, p. 579 – 587, 2019.

ZHANG, Q. L.; LIAN, H. Z.; WANG, W. H.; CHEN, H. Y. Separation of caffeine and theophylline in poly (dimethylsiloxane) micro channel electrophoresis with electrochemical detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1098, p. 172–176, 2005.