



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

IVANIRA MOREIRA

ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE CULTIVARES DE *Coffea arabica* POR IMPRESSÃO DIGITAL ESPECTROSCÓPICA E CROMATOGRÁFICA



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



IVANIRA MOREIRA

ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE CULTIVARES DE *Coffea arabica* POR IMPRESSÃO DIGITAL ESPECTROSCÓPICA E CROMATOGRÁFICA

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

Orientadora: Dra. Ieda Spacino Scarmi

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M838a Moreira, Ivanira.

Análise exploratória de cultivares de *Coffea arabica* por impressão digital espectroscópica e cromatográfica / Ivanira Moreira. – Londrina, 2013.
115f. : il.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.

Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica – Teses. 2. Análise cromatográfica – Teses. 3. Café arábica – Teses. 4. Elementos químicos – Espectros – Teses. 5. Solução (Química) – Teses. 6. Café – Cultivo – Teses. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. IV. Universidade Estadual do Centro-Oeste. V. Título.

CDU 543

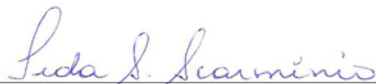
IVANIRA MOREIRA

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE CULTIVARES DE *Coffea arabica* POR
IMPRESSÃO DIGITAL ESPECTROSCÓPICA E CROMATOGRÁFICA**

**Análise Exploratória de Cultivares de *Coffea arabica* por Impressão
Digital Espectroscópica e Cromatográfica**

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

BANCA EXAMINADORA



Orientadora: Profa. Dra. Ieda Spacino Scarmínio
Universidade Estadual de Londrina



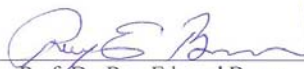
Profa. Dra. Yohandra Reyes Torres
Universidade Estadual do Centro Oeste



Profa. Dra. Márcia Helena Pontieri
Universidade Federal da Paraíba



Profa. Dra. Patrícia Valderrama
Universidade Tecnológica Federal do Paraná



Prof. Dr. Roy Edward Bruns
Universidade Estadual de Campinas

Londrina, 25 de outubro 2013.

Dedico este trabalho a minha mãe Petrena (**in memorian**)
e meu esposo Miguel com todo amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus pela força e coragem durante mais esta etapa em minha vida.

A Profa. Ieda Spacino Scarminio, pela oportunidade, paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dionísio Borsato, que está sempre disponível para conversas que aliviam alma e sempre me impulsionam seguir em frente.

A Profa. Keiko que sempre me incentivou em todos os momentos da minha trajetória na pós graduação.

A pesquisadora do IAPAR Maria Brígida dos Santos Scholz pelas amostras de café e a Cintia Sorane Kitzberger pelos primeiros artigos sobre café.

Aos professores do programa de Doutorado em Química que, ao longo do período de pós graduação, contribuíram para a minha formação.

Ao Departamento de Química pela oportunidade para o curso de doutorado.

Aos amigos do grupo LQCN, pelo apoio e pela ajuda nas horas mais difíceis e agradáveis também em especial a Elis, Fernanda e Sabrina.

Ao meu esposo Miguel e toda a minha família, por todo apoio, carinho, paciência e dedicação.

Aos amigos da primeira turma do Doutorado Associado, Danilo, Jurandir, Cristine e Milena, e aos amigos do laboratório 339 Eduardo, Kris e Marcela pelos bons momentos que passamos juntos.

E a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, colaboraram para a execução e conclusão deste trabalho.

Eterno, é tudo aquilo que dura uma fração de segundo, mas com tamanha intensidade, que se petrifica, e nenhuma força jamais o resgata...

Carlos Drummond de Andrade

MOREIRA, I. **Análise Exploratória de Cultivares de *Coffea arabica* por Impressão Digital Espectroscópica e Cromatográfica**. 2013. 115 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Quatro cultivares de café arábica o Bourbon e outras três com cruzamentos modernos Iapar 59, IPR101 e IPR108 foram analisados por impressão digital espectroscópica e cromatográfica. Planejamentos estatísticos de misturas foram usados para investigar a influência da composição da fase móvel e do meio extrator na qualidade da impressão digital. Para a extração foram usados os solventes puros e misturas binárias, ternárias e quaternárias de etanol, acetato de etila, diclorometano e hexano. Análise de componentes principais (ACP) e análise hierárquica (AH) foram aplicadas aos dados cromatográficos, bem como espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e espectros na região ultravioleta-visível (UV-Vis). Os extratos que apresentaram maiores rendimentos foram preparados em misturas binárias etanol:acetato de etila, etanol:diclorometano e etanol:hexano. A análise das componentes principais associadas aos espectros de infravermelho mostrou que não há discriminação das cultivares preparados em etanol. As duas fases móveis que apresentaram os melhores resultados foram, ACN:MeOH:H₂O (26:51:23v/v/v) e ACN: H₂O (64,5:35,5 v/v). Os melhores sistemas extratores para obter uma impressão digital de qualidade na fase ACN:MeOH:H₂O 26:51:23 (v/v/v) foram as misturas ternárias etanol:diclorometano:hexano (1:1:1 v/v/v) e etanol:acetato de etila:diclorometano (1:1:1 v/v/v), misturas binária de volumes iguais de etanol:acetato de etila, acetato de etila:hexano, diclorometano:hexano. As diferenças na composição química dos principais metabolitos estudados mostraram que os estudos utilizando impressão digital cromatográficas e espectroscópicas são importantes no desenvolvimento de novas cultivares com melhoria das características sensoriais e químicas.

Palavras-chave: Café arábica. Impressão digital. Planejamento de misturas. Análise de componentes principais. Análise hierárquica.

MOREIRA, I. **Análise Exploratória de Cultivares de *Coffea arabica* por Impressão Digital Espectroscópica e Cromatográfica**. 2013. 115 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Four cultivars of Arabica coffee, Bourbon and three developed in Instituto Agronômico do Paraná, Iapar 59, IPR101 IPR108 were analyzed by spectroscopic and chromatographic fingerprints. Statistical mixtures designs were used to investigate the influence of the composition of the mobile phase and the extractor solvent on the quality of the fingerprint. The solvents used were ethanol, ethyl acetate, dichloromethane and hexane. Principal component analysis (PCA) and hierarchical analysis (HA) were applied to chromatographic data, Fourier transform infrared (FTIR) and ultraviolet-visible (UV - Vis) spectra. The results showed that binary mixtures prepared in ethanol: ethyl acetate, ethanol: dichloromethane and ethanol: hexane presented higher yields. It showed also that there is no discrimination of cultivars using the extracts prepared in ethanol. Two mobile phases for high performance chromatography in reverse phase showed better results, ACN:MeOH:H₂O (26:51:23 v/v/v) and ACN:H₂O (64,5:35,5 v/v). The best systems for obtains a fingerprint of quality in ACN:MeOH:H₂O 26:51:23 (v/v/v) the phase were ternary mixtures of the 1:1:1 v/v/v ethanol:dichloromethane:hexane, 1:1:1v/v/v ethanol:ethyl acetate:dichloromethane, binary mixtures of equal volumes of ethanol:ethyl acetate, ethyl acetate:hexane and dichloromethane:hexane. The IPR108 contains a higher relative abundance of caffeine and chlorogenic acids while IPR 101 showed lower relative abundance of these metabolites. Bourbon and IAPAR 59 showed similar relative abundances and were intermediate to IPR101 and IPR 108. The differences in chemical composition of the major metabolites studied showed that chromatographic and spectroscopic fingerprints are important in the development of new cultivars with improved chemical and sensorial characteristics.

Keywords: *Arabic coffea*. Fingerprint. Mixture design. Principal component analysis. Hierarchical analysis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição dos extratos preparados com solventes puros e misturas de etanol, acetato de etila, diclorometano e hexano de acordo com o planejamento estatístico	25
Tabela 2 – Proporções e forças cromatográficas utilizadas como fase móvel na análise cromatográfica dos extratos dos cafés.....	28
Tabela 3 – Peso dos rendimentos dos extratos (g/10g) para cada solvente extrator usando o sistema simplex centróide para as quatro cultivares de café.....	30
Tabela 4 – Análise de variância para o ajuste do modelo cúbico especial aos rendimentos dos extratos brutos das amostras das quatro cultivares de café.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estruturas dos principais ácidos clorogênicos encontrados no café	18
Figura 2 –	Estrutura da cafeína.....	19
Figura 3 –	Estrutura da trigonelina.....	19
Figura 4 –	Fotografias das quatro cultivares de cafés estudados	22
Figura 5 –	Planejamento de misturas Centróide-Simplex.....	24
Figura 6 –	Esquema do procedimento para o preparo dos extratos brutos.....	26
Figura 7 –	riângulo dos solventes (H ₂ O), (MeOH) e (ACN)	28
Figura 8 –	Gráfico de superfície de respostas para as amostras das quatro cultivares analisadas.....	33
Figura 9 –	Espectro de UV-Vis de todas as amostras de café Iapar 59 , Bourbon, IPR 101 e IPR 108	35
Figura 10 –	Gráfico dos escores para as componentes principais do fator 2 e fator 3 dos dados de espectroscopia no UV-Vis.....	36
Figura 11 –	Gráfico dos <i>loadings</i> fator 2 x fator 3 para os dados espectrais na região de 240-400 nm	38
Figura 12 –	Dendrograma obtido baseado nos espectros de absorção das quatro cultivares de café Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108	38
Figura 13 –	Espectro de infravermelho das quatro cultivares de café Iapar 59, Bourbon, IPR101, IPR108	39
Figura 14 –	Gráfico dos <i>loadings</i> dos cinco fatores para as quatro cultivares de café.....	40
Figura 15 –	Gráfico dos escores para as componentes do fator 2 x fator 3 dos dados de espectroscopia no infravermelho para as amostras das cultivares de café Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108	41
Figura 16 –	Gráfico dos <i>loadings</i> do Fator 2 x Fator 3 para as quatro cultivares de café.....	42
Figura 17 –	Dendrograma obtido baseado nos espectros de infravermelho das quatro cultivares de café, Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108.....	43
Figura 18 –	Espectro de infravermelho da cultivar IPR 108 com diferentes solventes extratores.....	44
Figura 19 –	Espectro de infravermelho das cultivares IPR 101 e IPR 108 com diferentes solventes extratores	45

Figura 20 – Espectro de infravermelho das quatro cultivares de café com etanol.....	46
Figura 21 – Gráfico dos escores do Fator 2 x Fator 3 para as quatro cultivares de café com extrator etanol:diclorometano.....	47
Figura 22 – Espectro IV original das quatro cultivares de café com extrator etanol:diclorometano.....	47
Figura 23 – Gráfico dos loadings do Fator 2 x Fator 3 para as quatro cultivares de café com solvente extrator etanol:diclorometano	48
Figura 24 – Planejamento para as fases móveis 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 combinadas com o planejamento experimental do tipo Centróide Simplex dos extratos.....	49
Figura 25 – Planejamento com os resultados obtidos na análise cromatografia com os números de picos cromatográficos com as nove fases no comprimento de onda 210 nm para a cultivar Iapar 59	50
Figura 26 – Planejamento com os resultados obtidos na análise cromatografia com os números de picos cromatográficos com as nove fases no comprimento de onda 210 nm para a cultivar Bourbon.....	51
Figura 27 – Planejamento com os resultados obtidos na análise cromatografia com os números de picos cromatográficos com as nove fases no comprimento de onda 210 nm para a cultivar IPR 101	52
Figura 28 – Planejamento com os resultados obtidos na análise cromatografia com os números de picos cromatográficos com as nove fases no comprimento de onda 210 nm para a cultivar IPR 108	53
Figura 29 – Planejamento com os resultados obtidos na análise cromatografia com os números de picos cromatográficos com a fase H ₂ O:MeOH 66,5:33,5 (v/v) no comprimento de onda 240 nm para as quatro cultivares de café estudados.....	54
Figura 30 – Planejamento com os resultados obtidos na análise cromatografia com os números de picos cromatográficos com a fase H ₂ O:MeOH 66,5:33,5 (v/v) no comprimento de onda 254 nm para as quatro cultivares de café estudados.....	55
Figura 31 – Gráfico dos escores para os fatores 2 e 3 dos dados de cromatografia líquida de alta eficiência para a fase ACN:H ₂ O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) no comprimento de onda de 210 nm , para Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108	56

Figura 32 – Dendrograma obtido baseado nos dados cromatográficos da fase ACN:H ₂ O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) das quatro cultivares de café Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 com todos os solventes extratores.....	57
Figura 33 – Gráfico do espectro de CLAE para IPR101, IPR108, Iapar 59 e Bourbon com a Fase E ACN:H ₂ O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator 6 etanol:acetato no comprimento de onda de 210 nm.....	58
Figura 34 – Gráfico do espectro de CLAE para as cultivares IPR 101 e IPR 108 com a Fase ACN:H ₂ O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator (etanol:acetato) no comprimento de onda de 240 nm.....	59
Figura 35 – Gráfico do espectro de CLAE para as cultivares Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 com a fase ACN:H ₂ O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator etanol:diclorometano no comprimento de onda de 210 nm	60
Figura 36 – Gráfico do espectro de CLAE para as cultivares Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 com a fase ACN:H ₂ O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator etanol:hexano no comprimento de onda de 210 nm.....	61
Figura 37 – Gráfico do espectro de CLAE para as cultivares Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 com a fase ACN:H ₂ O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator acetato:diclorometano no comprimento de onda de 210 nm.....	63
Figura 38 – Gráfico do espectro de CLAE para as cultivares Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 com a fase ACN:H ₂ O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator etanol:acetato de etila no comprimento de onda de 210 nm	64
Figura 39 – Gráfico do espectro de CLAE para as cultivares Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 com a fase ACN:H ₂ O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator acetato de etila:hexano no comprimento de onda de 210 nm.....	65
Figura 40 – Gráfico do espectro de CLAE para as cultivares Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 com a fase ACN:H ₂ O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator diclorometano:hexano no comprimento de onda de 210 nm	66
Figura 41 – Gráfico do espectro de CLAE para as cultivares Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 com a fase ACN:H ₂ O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator etanol:acetato de etila:hexano no comprimento de onda de 210 nm	67
Figura 42 – Gráfico do espectro de CLAE para as cultivares Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 com a fase ACN:H ₂ O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator etanol no comprimento de onda de 210 nm nm	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IAC	Instituto Agronômico de Campinas
BAGs	Bancos Ativos de Germoplasma
IAPAR	Instituto Agronômico do Paraná
ACGs	Ácidos clorogênicos
CG/EM	Cromatografia em Fase Gasosa Acoplado a Espectrometria de Massa
UV-Vis	Ultravioleta e Visível
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
CLAE (HPLC)	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography)
CLAE-UV/DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada detector de arranjo de fotodiodos
ACP	Análise das Componentes Principais
AH	Análise Hierárquica
MeOH	Metanol
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de Variância
UA	Unidades de Absorvância
S	Força do solvente
MQ	Média quadrática
MQep	Média quadrática devida ao erro puro
MQfaj	Média quadrática devida à falta de ajuste do modelo
MQr	Média quadrática residual
MQR	Média quadrática devida à regressão
MQT	Média quadrática total
SQT	Soma dos quadrados total
SQE	Soma dos quadrados explicada
SQR	Soma dos quadrados dos resíduos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVO GERAL	21
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
2	MATERIAIS E MÉTODO	22
2.1	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	23
2.1.1	Reagentes.....	24
2.1.1.1	Equipamentos	24
2.2	SISTEMA EXTRATOR.....	24
2.2.1	Preparo dos Extratos Brutos	26
2.3	ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRA VIOLETA VISÍVEL (UV-Vis).....	26
2.4	ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURRIER (FTIR).....	27
2.5	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	27
3	RESULTADOS	29
3.1	ANÁLISE DOS RENDIMENTOS.....	30
3.2	ANÁLISE DOS ESPECTROS DE ULTRA VIOLETA VISÍVEL (UV-Vis).....	34
3.3	ANÁLISE DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO (FTIR)	39
3.4	ANÁLISES DA CROMATOGRAFIA LIQUÍDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE/UV-DAD).....	48
4	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICES	78
	APÊNDICE A – Chemometric discrimination of genetic modified Coffea arabica cultivars using spectroscopic and chromatographic fingerprints	79
	APÊNDICE B – Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em Coffea arábica	99



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O café chegou ao norte do Brasil, em 1727, mais precisamente em Belém. Já naquela época o café possuía grande valor comercial. Devido às nossas condições climáticas, o cultivo de café se espalhou rapidamente, com produção voltada para o mercado doméstico. Em sua trajetória pelo Brasil o café passou pelo Maranhão, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Minas Gerais. Num espaço de tempo relativamente curto, o café passou de uma posição relativamente secundária para a de produto-base da economia brasileira. Desenvolveu-se com total independência, ou seja, apenas com recursos nacionais, sendo afinal, a primeira realização exclusivamente brasileira que visou à produção de riquezas^{1,2}.

O café pertence ao gênero *Coffea* e à família das rubiaceae. Esta família engloba mais de quinhentos gêneros e seis mil espécies. Dentro do gênero *Coffea* existem duas espécies principais, *Coffea arabica* variedade arábica e o *Coffea canephora* variedade robusta. O *Coffea arabica* produz o café de melhor qualidade do mundo, e as duas variedades mais conhecidas são a Típica e a Bourbon³.

Hoje no Brasil, os principais estados produtores são Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Paraná e Rondônia e, que juntos respondem por mais de 95% da produção brasileira⁴.

A cafeicultura brasileira tem experimentado melhorias, decorrentes de pesquisas realizadas por várias Instituições, principalmente na área de melhoramento e desenvolvimento de novas cultivares, adaptadas às diferentes condições de cultivo, de alto padrão genético e elevado potencial de produção. O Brasil é o país que soma o maior número de contribuições ao melhoramento genético do cafeeiro. Desde o início da década de 1930 a Seção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) vem desenvolvendo um vasto programa de genética e melhoramento do cafeeiro, tendo realizado quase todos os estudos de genética de café e lançado as mais importantes cultivares plantadas nas várias regiões cafeeiras do Brasil e mesmo de outros países; os estudos são concentrados na espécie *Coffea arabica*. A partir da década de 1970, outras instituições de ensino e pesquisa somaram-se ao IAC, nos vários Estados, num trabalho integrado e cooperativo. Os trabalhos atuais de melhoramento visam, além de aumento da produtividade, a melhoria de outras características agrônomicas como qualidade da bebida, atributo importante diante de mercados cada vez mais exigentes e seleção de cultivares adaptadas às diferentes condições e sistema de cultivo, aliadas a resistência às pragas e doenças⁵.

O melhoramento genético de plantas pode ser conceituado como sendo a ciência para desenvolver plantas geneticamente superiores em benefício do homem, sendo um dos fatores que mais influencia o sucesso na produção de café. Com a obtenção de novas cultivares adaptadas aos mais diferentes tipos de ecossistemas, sistemas de cultivo, resistência a pragas e doenças, maturação uniforme e qualidade no sabor, iniciou-se pesquisas para o melhoramento genético. O melhoramento genético é essencial para que o Brasil continue no posto de maior produtor mundial de café, pois com estas pesquisas, foram introduzidas no mercado 16 novas cultivares de café com características agronômicas desejáveis. Com a contribuição dessas cultivares melhoradas, o país pode aumentar sua produtividade média em até 20%, contribuir para a preservação do meio ambiente com a utilização de menos agrotóxico e fertilizante, aumentando assim a rentabilidade do agricultor ⁶.

A pesquisa brasileira em genética e melhoramento do cafeeiro é de suma importância porque além de possibilitar ganhos na qualidade e produtividade, obtêm-se cafés especiais com aromas e sabores de acordo com o paladar do consumidor ⁷.

O sucesso da produção brasileira de café se dá através do uso de cultivares adaptadas aos diferentes ecossistemas do país e sobretudo, altamente produtivas. Para que seja feito o melhoramento e desenvolvimento de novas cultivares, é necessária a obtenção de genes presentes em espécies não cultivadas de *Coffea arabica* ⁸. Para isso o Brasil conta com os bancos ativos de germoplasma (BAGs) que são locais onde são mantidas coleções de indivíduos visando preservar a variabilidade genética existente em uma ou mais espécies. Em um banco de germoplasma, a manutenção da variabilidade pode ser feita utilizando sementes, propágulos ou o próprio indivíduo. Em relação ao café, as espécies de *Coffea* são, tradicionalmente, conservadas como plantas vivas e mantidas em coleções de germoplasma a campo, devido à rápida perda de viabilidade das sementes no armazenamento ^{9,10}.

Um dos mais importantes bancos de germoplasmas é o Banco de Germoplasma de *Coffea* do Instituto Agrônomo de Campinas - IAC que foi implantado em 1932 e desenvolve extenso programa de melhoramento genético do cafeeiro há 80 anos. Neste período muitas linhagens foram desenvolvidas, selecionadas e várias cultivares lançadas e recomendadas para plantio nas diversas regiões cafeeiras do País. Estima-se que 90% dos cafeeiros tipo arábica no Brasil sejam provenientes de cultivares desenvolvidas no Instituto. O Paraná conta também com o Instituto Agrônomo do Paraná (Iapar), onde o Banco de Germoplasma de Café foi implantado e vem sendo ampliado desde 1974 na sede do Instituto, na cidade de Londrina, Estado do Paraná. A coleção é composta principalmente por germoplasma de *Coffea arabica*, contendo mais de mil acessos dessa espécie e outras espécies

do gênero tais como *C. canephora*, *C. kapakata*, *C. eugenioides*, *C. stenophylla*, *C. racemosa*, *C. liberica*, *C. dewevrei*, *C. congensis* e *Psilanthus bengalensis*, além de híbridos inter e intra-específicos. A coleção tem sido utilizada como base para estudos de melhoramento genético na Instituição, e deu origem a diversas cultivares lançadas pelo Instituto. A preocupação com a qualidade da bebida nessas novas cultivares é uma constante e toda a coleção vem sendo caracterizada quanto aos teores de ácidos clorogênicos, cafeína, trigonelina, óleo, açúcar, minerais e sabores diferentes em termos de acidez, corpo, doçura, aroma e sabor residual ¹¹.

A maioria dos cafés disponíveis no comércio consiste de grãos pertencentes à variedade arábica, robusta ou *blends* destes dois. O café arábica tem um valor de mercado mais alto comparado a robusta. Como a qualidade está diretamente relacionada com as características de sabor e aroma, é crescente o interesse da comunidade científica em relacionar as diferentes variedades de café com sua composição química ¹².

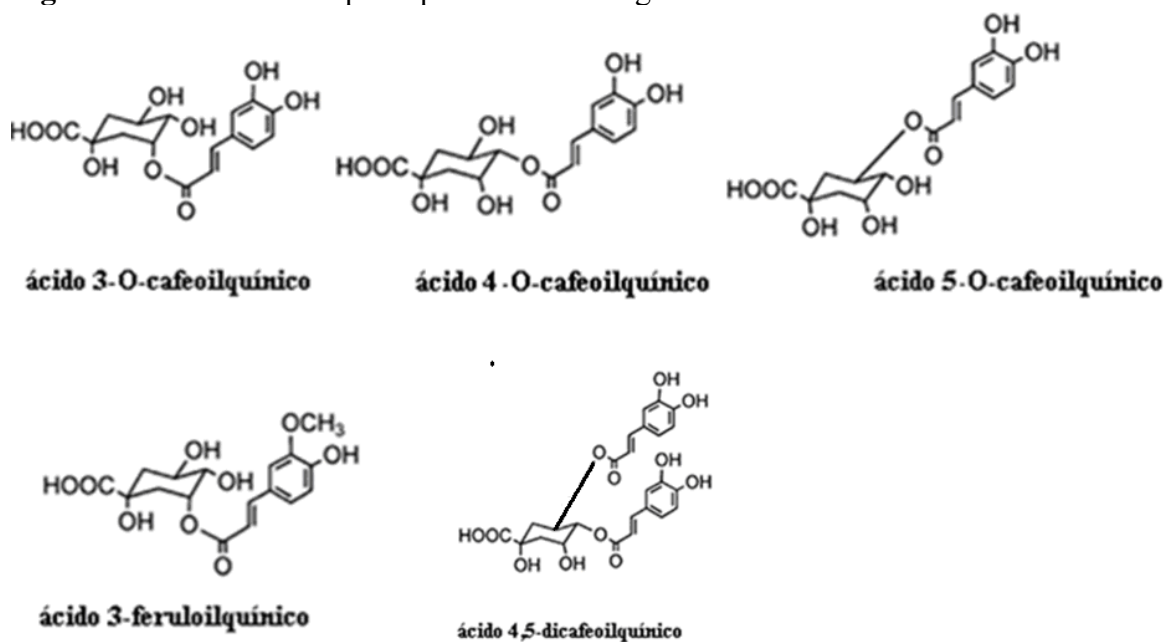
A composição química do grão cru de café depende de fatores como a espécie, variedade, das práticas agrícolas, grau de maturação e condições de estocagem dos grãos. Durante o processo de torração do café alguns componentes sofrem degradação alterando assim sua composição final ¹³. E conseqüentemente, a qualidade e aceitabilidade do café dependem de fatores genéticos, sistema de cultivo, altitude, temperatura, demanda hídrica, tipos e níveis de adubação, época de colheita, preparo, armazenamento e processo de torração ^{14, 15, 16}.

Em geral os cafeeiros arábica são menos resistentes ao ataque de pragas e doenças e desenvolvem-se melhor em temperaturas entre 15 a 24 °C e altitudes elevadas (1000 a 2000 m). Já os cafeeiros robusta são mais resistentes a pragas e doenças, preferem temperaturas mais altas 24 a 30 °C e altitudes até 700 m ¹⁷. Embora os programas de melhoramento genético do café têm desenvolvido cultivares de maior produtividade, resistentes às pragas e doenças, plantas com porte baixo e adaptadas às diversas condições de clima e solo ^{18, 19}, a modificação genética afeta a composição do produto e conseqüentemente seus atributos sensoriais ²⁰. Entretanto, estudos avaliando a composição química dos grãos para verificar a qualidade destas são relativamente escassos ²¹. A influência de fatores como a composição química dos grãos, determinada por fatores genéticos, ambientais e culturais, os métodos de colheita, processamento e armazenamento, são importantes por afetarem diretamente a qualidade da bebida do café. A procura por um parâmetro químico de boa precisão para determinar a qualidade da bebida do café tem sido intensa, mas até então sem resultados comprovadamente positivos ²².

O sabor característico do café deve-se à presença e aos teores de muitos constituintes químicos, destacando-se os ácidos clorogênicos, aldeídos, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos e compostos fenólicos²³.

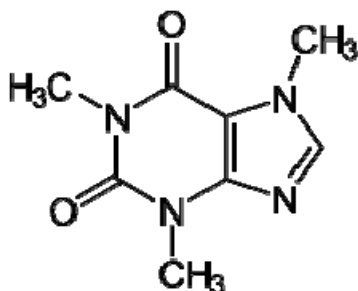
Os compostos fenólicos, são metabólitos secundários que se encontram distribuídos por todo o reino vegetal e estão envolvidos na adaptação a condições de estresse ambiental. Nas plantas os ácidos clorogênicos (ACG) mostrado na Figura 1, são um conjunto de compostos fenólicos e seus isômeros que se formam, principalmente, pela esterificação do ácido quínico com um dos seguintes derivados do ácido cinâmico: ácido cafeico, ferúlico, ou o p- cumarico e outros compostos fenólicos encontram-se armazenados nos vacúolos das células das raízes, caules, folhas, flores e frutos²⁴, participando numa série de funções biológicas, como na resistência a pragas e doenças (como insetos, fungos, vírus e bactérias), resposta à seca e proteção contra a radiação solar²⁵. Os ácidos clorogênicos (ACG) são os principais constituintes da fração fenólica do grão de café e seu conteúdo pode ser usado para caracterizar grãos de café verde e torrado de diferentes variedades e qualidades. Este conteúdo, em conjunto com o de cafeína, tem sido usado para caracterizar cafés comerciais e não comerciais, detectando possíveis fraudes, e também para avaliar o grau de torra dos grãos²⁶. Estes compostos encontram-se também presentes na bebida, sendo importantes para a sua qualidade e aceitabilidade, já que participam na formação da cor, aroma e *flavour* dos grãos de café durante a torra²⁷.

Figura 1 - Estruturas dos principais ácidos clorogênicos encontrados no café.



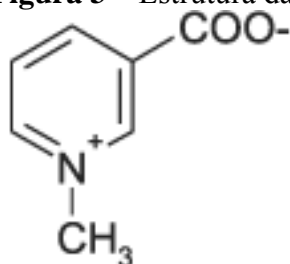
A cafeína²⁸, mostrada na Figura 2, é um alcalóide pertencente ao grupo das xantinas, inodora e possui sabor amargo bastante característico, contribuindo com uma nota de amargor importante para o sabor e aroma da bebida do café²⁹. É o componente mais conhecido do café, devido às suas propriedades fisiológicas e farmacológicas³⁰.

Figura 2 – Estrutura da cafeína



A trigonelina é uma base nitrogenada fortemente polar presente no café verde, e em algumas espécies de frutos e sementes³¹. Durante a torra do café, ela sofre pirólise convertendo-se a vários subprodutos, sendo um deles o ácido niacínico, neste caso o grupamento metila da trigonelina é removido resultando na formação desse ácido. A estrutura química da trigonelina é mostrada na Figura 3³². A degradação da trigonelina gera uma série de compostos voláteis. Alguns derivados do pirrol foram identificados por CG/EM após o aquecimento da trigonelina em um tubo selado (180-230°C por 15-16 min.)³³. Por outro lado, poderiam ocorrer também reações secundárias entre a trigonelina e outros constituintes, particularmente com os glicídios que estão presentes em grandes quantidades no café.

Figura 3 – Estrutura da trigonelina.



Vários trabalhos tentam correlacionar a qualidade final da bebida do café com a composição química do grão cru, sugerindo que cafés de qualidade inferior apresentam menores teores de açúcar e proteínas e maiores teores de acidez total titulável e, principalmente, maiores concentrações de compostos fenólicos^{34,35,36}. Mas nenhum trabalho compara as novas cultivares de café desenvolvido nos programas de melhoramento moderno

por impressão digital. Considerando o aumento da produção de café no Brasil e com uma estimativa de 48,59 milhões de sacas de 60 kg no ano de 2013, faz com que pesquisas nesta área sejam cada vez mais importantes para que o Brasil continue a destacar-se no cenário mundial na produção e comercialização dos melhores cafés.

1.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as características composicionais por meio de impressão digital de quatro cultivares de café arábica; um tradicional Bourbon e três modernos, desenvolvidos pelo Iapar: Iapar 59, IPR 101 e IPR 108, através de métodos espectroscópicos e cromatográficos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Usar métodos quimiométricos de planejamento experimental de misturas para investigar a variação composicional das diferentes cultivares de café.
- 2) Aplicar métodos quimiométricos de análise multivariada associados a dados espectroscópicos para comparar a variação composicional das quatro cultivares de cafés usando os diferentes extratores.
- 3) Investigar a influência da força da fase móvel na separação cromatográfica. Aplicar métodos quimiométricos de análise multivariada associados a dados espectroscópicos e cromatográficos para a busca da impressão digital do material vegetal.



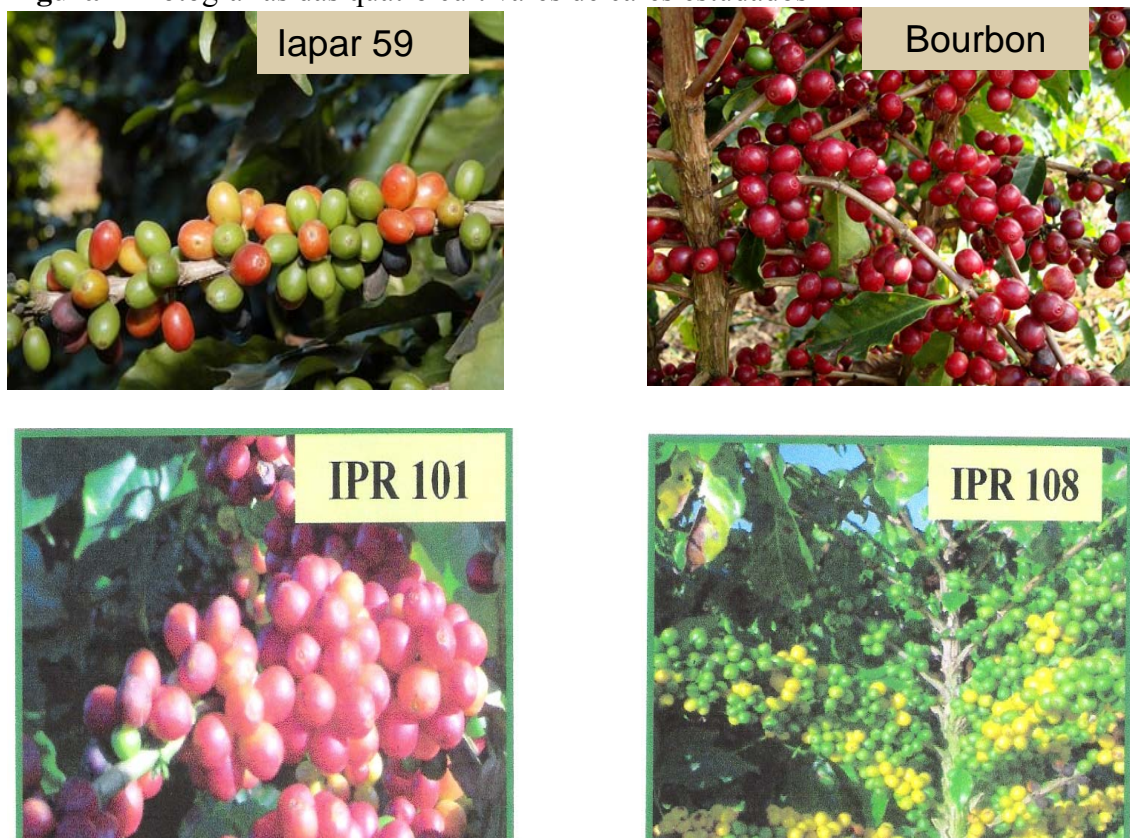
DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

2 MATERIAIS E MÉTODO

2.1 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Foram analisadas 04 cultivares de *Coffea arabica*: Bourbon, Iapar 59, IPR 101 e IPR 108 . A cultivar Bourbon é uma cultivar tradicional ou seja arábica puro e as outras três de cruzamentos modernos. A cultivar Iapar 59 originou-se do cruzamento entre *Coffea arabica*, *Villa Sarchi 971/10* e o Híbrido de Timor 832/2; a cultivar IPR101 originou-se do cruzamento cultivar *Catuaí x Sarchimor 2 Sarchimor 3* e a cultivar IPR 108 originou-se do cruzamento cultivar Iapar 59 x (*Catuaí x Icatu*). A Figura 4 mostra as fotografias das quatro cultivares de cafés estudados. Todas as amostras foram cedidas pelo Instituto Agrônômico do Paraná, IAPAR ³⁷.

Figura 4- Fotografias das quatro cultivares de cafés estudados



2.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados foram Álcool etílico comercial dR, Acetato de etila P.A. Vetec 99,5%, Hexano P.A. Vetec 99,5%, Diclorometano P.A. F Maia 99,5%, Clorofórmio P.A. Vetec 99,8%, KBr P.A. Synth 99,0% de pureza, Acetonitrila e Metanol grau cromatográfico Vetec, água ultrapura Milli-Q.

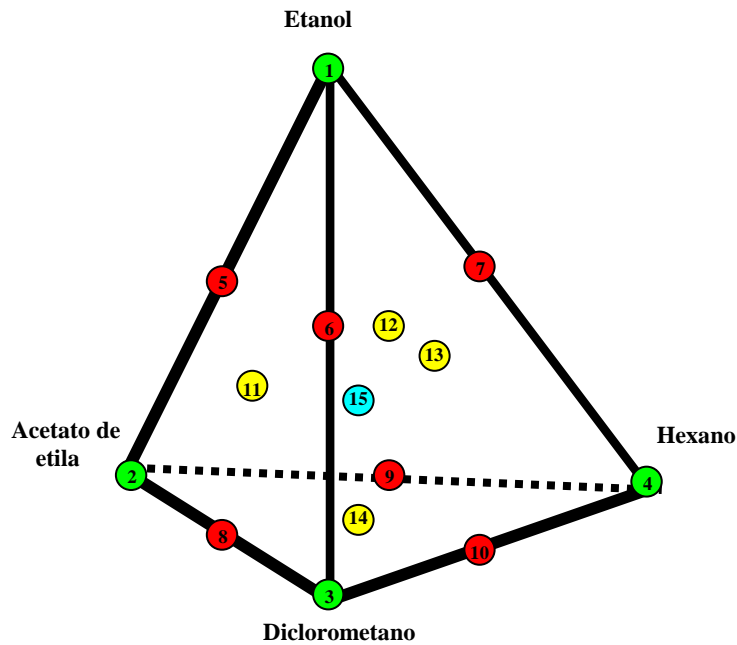
2.1.1.1 Equipamentos

Os equipamentos e aparelhos utilizados foram: balança Analítica Shimadzu AY220, evaporador rotativo Fisaton 801, aparelho de ultrason Labstore Maxiclean 800, moinho de disco Perten-3600, peneira Granutest ABNT 25 abertura em mm 0,71, espectrofotômetro Shimadzu FTIR-8300, espectrofotômetro UV-VIS Genesys2 Thermo Spectronic, purificador de água Millipore Plus, cromatógrafo líquido de alta eficiência SPD-M10AV Finnigan Surveyor com detector de arranjo de fotodiodo (PDA) Termo-Electro Corporation.

2.2 SISTEMA EXTRATOR

Os extratos brutos foram preparados de acordo com o planejamento de mistura do tipo Centróide Simplex³⁸ com quatro solventes: etanol, acetato de etila, diclorometano e hexano, mostrado na Figura 5, totalizando 15 diferentes composições de solventes extratores que podem ser vistos na Tabela 1.

Figura 5- Planejamento de misturas do tipo Centróide Simplex com quatro componentes.



Geralmente o processo de maceração é utilizado para a extração dos constituintes químicos existentes nas plantas. A maceração é a operação na qual a extração da matéria prima vegetal é realizada em recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um período prolongado, sem renovação do líquido extrator. Pela sua natureza, não conduz ao esgotamento da matéria prima vegetal, seja devido à saturação do líquido ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula³⁹.

Tabela 1 - Composição dos extratos preparados com solventes puros e misturas de etanol, acetato de etila, diclorometano e hexano de acordo com o planejamento estatístico da Figura 5.

Extratos	Etanol	Acetato de etila	Diclorometano	Hexano
1	1	0	0	0
2	0	1	0	0
3	0	0	1	0
4	0	0	0	1
5	1/2	1/2	0	0
6	1/2	0	1/2	0
7	1/2	0	0	1/2
8	0	1/2	1/2	0
9	0	1/2	0	1/2
10	0	0	1/2	1/2
11	1/3	1/3	1/3	0
12	1/3	1/3	0	1/3
13	1/3	0	1/3	1/3
14	0	1/3	1/3	1/3
15	1/4	1/4	1/4	1/4

Neste trabalho optamos pelo método de remaceração ou seja, a operação é repetida várias vezes utilizando o mesmo material renovando-se apenas o líquido extrator, com a finalidade de aumentar o rendimento nas extrações.

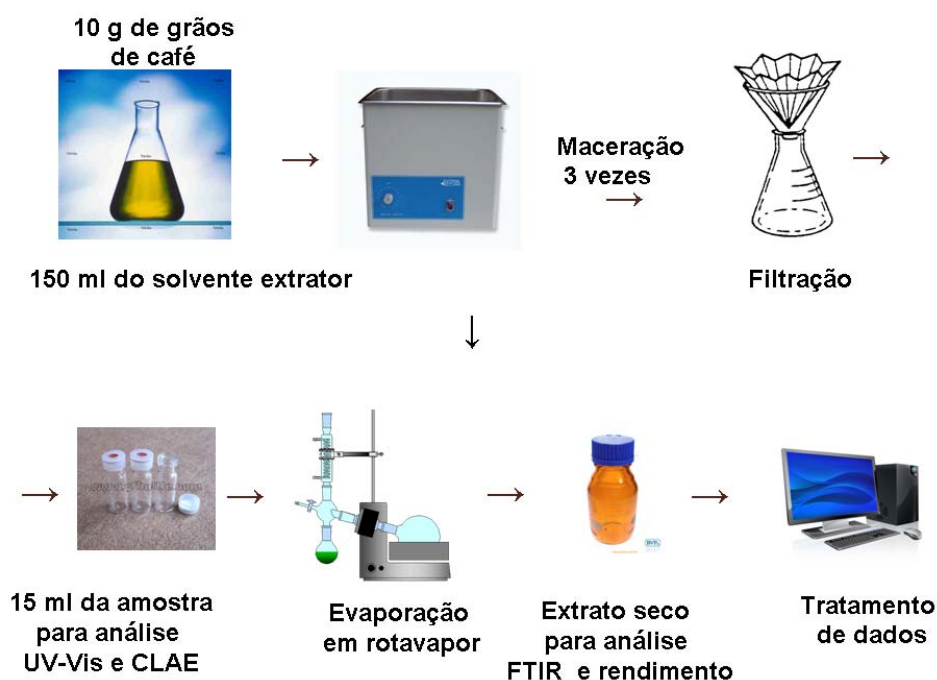
2.2.1 Preparo dos Extratos Brutos

Os grãos verdes dos cafés foram previamente imersos em nitrogênio líquido para torná-los friáveis, facilitando a sua moagem e evitando a possível oxidação dos compostos químicos, e em seguida peneirados. Para a extração foi escolhido o sistema extrator baseado num planejamento experimental do tipo Centróide-Simplex com quatro componentes, totalizando 15 misturas, como mostra a Tabela 1.

A Figura 6 mostra o desenvolvimento experimental. Para cada amostra de café foram pesadas 10 g, em seguida a mistura de solvente foi adicionada em cada amostra. Com o auxílio do ultrasson foram feitas as extrações com 150 mL da respectiva mistura por 3

vezes durante 30 minutos. A cada 15 minutos a água do ultrasson foi substituída para evitar o aquecimento do mesmo, e a cada 30 minutos a amostra foi filtrada e novamente colocada uma porção da mistura extratora. Ao final do processo de extração foram obtidos 60 extratos brutos, sendo 15 de cada amostra. Após a extração foi retirada uma alíquota de 15 mL do extrato bruto e guardado sob refrigeração em frasco com tampa para análise posterior em espectrofotometria de absorção molecular (UV-Vis) e cromatografia líquida fase reversa (CLAE). O restante foi evaporado em evaporador rotativo, armazenado em frasco aberto e colocado sob o ventilador para retirar-se todo o solvente ainda presente na amostra. Após atingir peso constante foram pesados para determinar os rendimentos dos extratos brutos e utilizados para análise de espectroscopia no infravermelho (FTIR).

Figura 6- Esquema do procedimento para o preparo dos extratos brutos



2.3 ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-Vis)

Para a análise por espectrofotometria no UV-Vis, foram usados 3 mL do extrato bruto antes da evaporação. Os espectros foram registrados no intervalo de comprimento de onda de 200-900 nm, com resolução de 1 nm, utilizando o espectrofotômetro de UV-Vis Genesys2 da Thermo Spectronic.

2.4 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Para a análise de infravermelho foram pesados 1,5 mg do extrato bruto seco com 0,3 g de KBr sólido e macerado em um gral de ágata com algumas gotas de clorofórmio. Os espectros foram registrados na região de 4000-400 cm^{-1} , em resolução 4 cm^{-1} , número de varreduras 90, usando um espectrofotômetro Shimadzu FTIR-8300.

2.5 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As amostras para análises cromatográficas foram coletadas do extrato bruto antes da evaporação. Pipetou-se uma alíquota de 20 μL de cada extrato bruto e adicionou-se 800 μL de cada fase móvel. Após este procedimento as amostras foram filtrados em filtro Milipore Millex de 0,22 μm e as análises cromatográficas realizadas logo em seguida.

As condições cromatográficas foram: coluna Phenomenex C18, Kinetex 2,6 μm Hilic 100Å, com dimensões de 150 mm x 4,6 mm, volume de injeção de 20 μL , vazão da fase móvel a 1,0 mL min^{-1} , eluição monitorada nos comprimentos de onda em 210, 240 e 254 nm. Para o processamento de dados foi utilizado o Software ChromQuest 4.2.

Cada extrato preparado foi analisado em cada uma das fases móveis preparadas seguindo o planejamento experimental mostrado na Figura 7, totalizando 135 diferentes cromatogramas para cada cultivar dos cafés em estudo. No planejamento experimental apresentado na Figura 7, a força do solvente foi variada para avaliar a melhor separação. Todas as fases móveis foram sonicadas por 30 minutos antes das análises, para degaseificação, ou seja, eliminar os gases dissolvidos na fase móvel que poderiam causar instabilidade no detector.

Figura 7 - Triângulo dos solventes água (H₂O), metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN). A região estudada é determinada pelo trapézio cujos vértices estão marcados pelos números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9.

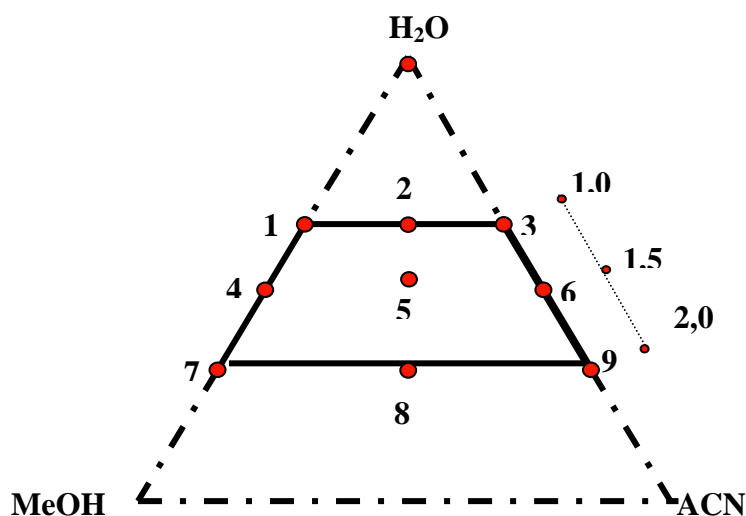


Tabela 2 - Proporções e forças cromatográficas utilizadas como fase móvel na análise cromatográfica dos extratos dos cafês .

Fase	Acetonitrila	Água	Metanol	Força Cromatográfica
1	0	66,5	33,5	1,0
2	16	67,0	17	1,0
3	32	68	0	1,0
4	0	50	50	1,5
5	26	51	23	1,5
6	48	52	0	1,5
7	0	33	67	2,0
8	35	35	30	2,0
9	64,5	35,5	0	2,0

O índice de polaridade foi utilizado para calcular a força da fase móvel através da equação 1, onde os parâmetros usados para a CLAE de fase reversa são: água ($S_i = 0$), metanol ($S_i = 3,0$), acetonitrila ($S_i = 3,1$).

$$S = \sum S_i \phi_i \quad (1)$$

A força do solvente na fase móvel é expressa pela somatória do produto da força do solvente puro (S_i) pela fração de volume (ϕ_i).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises dos Rendimentos

As composições das misturas, bem como os rendimentos das amostras das cultivares Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Peso dos rendimentos dos extratos (g/10g) para cada solvente extrator usando o sistema simplex centróide para as quatro cultivares de café.

Extrato	Etanol	Acetato de Etila	Diclorometano	Hexano	Iapar 59	Bourbon	IPR101	IPR108
1	1	0	0	0	1,5	1,39	1,56	1,26
2	0	1	0	0	0,87	0,81	0,91	0,83
3	0	0	1	0	1,06	1,05	1,17	1,07
4	0	0	0	1	0,846	0,82	0,94	0,83
5	0,5	0,5	0	0	1,49	1,61	1,74	1,86
6	0,5	0	0,5	0	2,17	2,01	1,7	1,5
7	0,5	0	0	0,5	1,83	1,69	1,8	1,47
8	0	0,5	0,5	0	0,91	0,87	0,95	0,83
9	0	0,5	0	0,5	0,97	0,89	1,01	0,84
10	0	0	0,5	0,5	0,94	1,03	1,11	1,23
11	0,34	0,33	0,33	0	1,46	1,27	1,65	1,31
12	0,34	0,33	0	0,33	1,27	1,26	1,28	1,18
13	0,34	0	0,33	0,33	1,29	1,3	1,36	1,23
14	0	0,34	0,33	0,33	0,94	0,97	1,08	0,92
15	0,25	0,25	0,25	0,25	1,14	1,13	1,15	1,19

Para investigar o efeito dos solventes nos rendimentos foram usados os modelos de misturas. Como os valores de resposta para as misturas binárias são maiores do que para os valores dos componentes puros, os modelos quadráticos e cúbicos especiais foram

usados para ajustar os dados dos rendimentos dos extrato brutos das quatro cultivares. Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para testar a falta de ajuste do modelo.

Como o modelo quadrático apresentou falta de ajuste no nível de 95% confiança, foi aplicado aos dados o modelo cúbico especial. Os dados experimentais são bem reproduzidos pelas equações cúbicas especiais simplificadas, onde são utilizados apenas os coeficientes significativos ao nível de 95% confiança. As equações de predição para os rendimentos são:

$$\hat{Y}_{\text{Iapar59}} = 1,50 e + 0,87 a + 1,06 d + 0,84 h + 1,20 ea + 3,54 ed + 2,60 eh - 5,10 ead - 7,41 eah - 14,18 edh \quad (2)$$

$(\pm 0,06) \quad (\pm 0,06) \quad (\pm 0,06) \quad (\pm 0,06) \quad (\pm 0,30) \quad (\pm 0,30) \quad (\pm 0,30) \quad (\pm 2,0)$
 $(\pm 2,0) \quad (\pm 2,0)$

$$\hat{Y}_{\text{Bourbon}} = 1,38 e + 0,82 a + 1,05 d + 0,82 h + 2,01 ea + 3,14 ed + 2,34 eh - 9,36 ead - 7,02 eah - 11,60 edh \quad (3)$$

$(\pm 0,04) \quad (\pm 0,04) \quad (\pm 0,04) \quad (\pm 0,04) \quad (\pm 0,19) \quad (\pm 0,19) \quad (\pm 0,19) \quad (\pm 1,31)$
 $(\pm 1,31) \quad (\pm 1,31)$

$$\hat{Y}_{\text{IPR101}} = 1,56 e + 0,92 a + 1,16 d + 0,94 h + 2,03 ea + 1,41 ed + 2,24 eh - 11,24 eah - 9,00 edh \quad (4)$$

$(\pm 0,05) \quad (\pm 0,05) \quad (\pm 0,05) \quad (\pm 0,05) \quad (\pm 0,27) \quad (\pm 0,27) \quad (\pm 0,27) \quad (\pm 1,83)$
 $(\pm 1,83)$

$$\hat{Y}_{\text{IPR108}} = 1,36 e + 0,75 a + 1,16 d + 0,92 h + 2,98 ea + 1,23 eh - 8,34 eah \quad (5)$$

$(\pm 0,10) \quad (\pm 0,09) \quad (\pm 0,08) \quad (\pm 0,09) \quad (\pm 0,51) \quad (\pm 0,51) \quad (\pm 3,45)$

onde \hat{Y} é a resposta prevista pelo modelo, e, a, d, h, são as proporções dos solventes etanol, acetato de etila, diclorometano e hexano respectivamente e os valores entre parênteses representam as estimativas do erro padrão dos coeficientes.

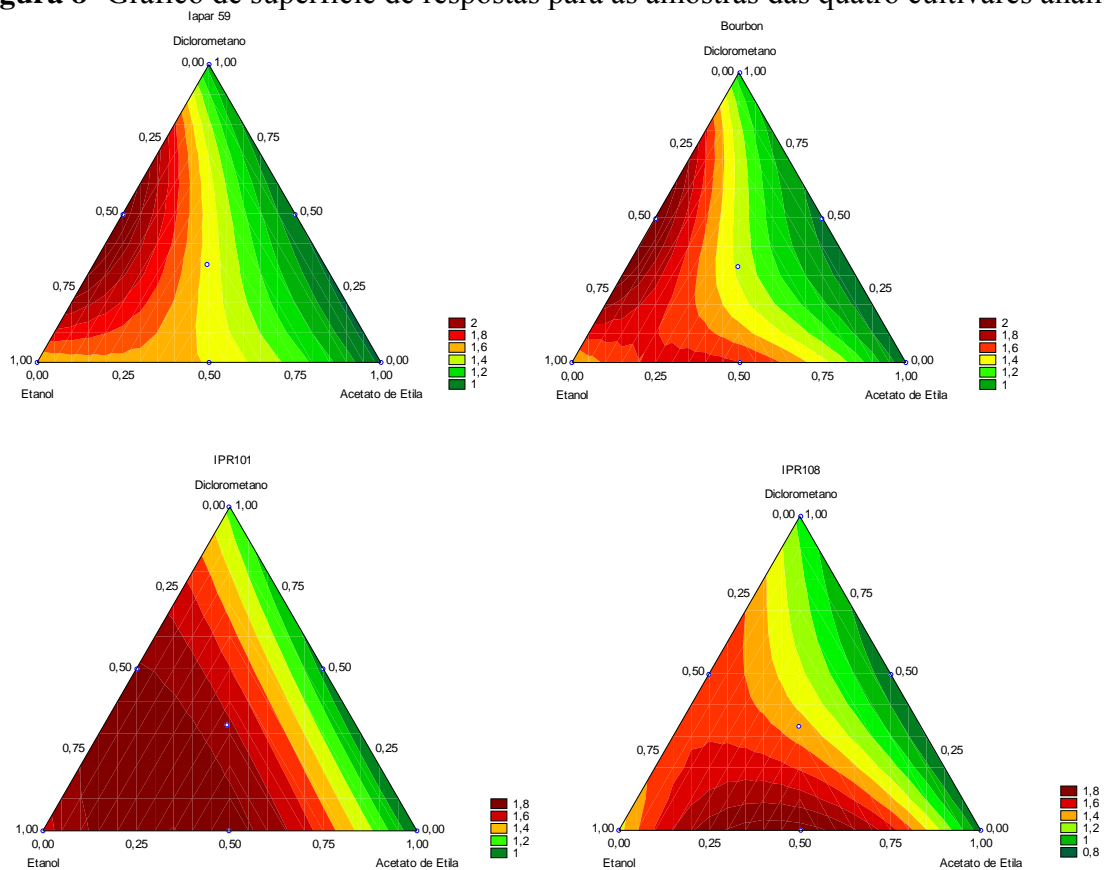
Analisando os coeficientes das equações verifica-se que para todos os quatro modelos às misturas apresentam valores significativamente maiores do que os solventes puros. Dos solventes puros, o etanol é o extrator mais eficiente seguido do diclorometano, como pode ser visto na Tabela 3. Pela equação observa-se também que os coeficientes com interações positivas indicam sinergismo e podem contribuir para rendimentos mais elevados, enquanto que os coeficientes negativos indicam antagonismo, como no caso das misturas

ternárias de etanol:acetato de etila: diclorometano, etanol:acetato de etila:hexano, etanol:diclorometano:hexano onde estas interações resultam em rendimentos mais baixos e as misturas quaternárias não foram significativas.

Os gráficos de contorno para o rendimento previsto pelas equações (2) a (5) são dados na Figura 8. Como pode ser observado, o gráfico de contorno para as cultivares Bourbon e Iapar 59 são muito semelhantes. Rendimentos mais elevados podem ser conseguidos com misturas binárias de etanol: diclorometano. Os modelos prevêem que 2,0 g podem ser extraídos tanto para as cultivares Iapar 59 quanto para a Bourbon. Estes resultados vão de encontro com os resultados experimentais de 2,17 e 2,01 g .

Os resultados previstos pelo modelo e representados na Figura 8 para as cultivares IPR 101 e IPR 108 foram muito semelhantes aos dados experimentais 1,74 e 1,86 g, respectivamente. Por outro lado os modelos são bem diferentes das cultivares Iapar 59 e Bourbon, principalmente devido às grandes interações sinérgicas entre etanol:diclorometano para essas duas cultivares. Este coeficiente é pequeno para o modelo IPR101 e não significativo no nível de 95% de confiança para o modelo IPR108.

Pela análise do gráfico de superfície de resposta Figura 8, para a cultivar Iapar 59 e Bourbon, observa-se que o maior rendimento dos extratos está localizado na aresta etanol:diclorometano e para as cultivares IPR 101 e IPR 108 o melhor rendimento está na aresta etanol:acetato de etila.

Figura 8- Gráfico de superfície de respostas para as amostras das quatro cultivares analisadas.

A análise de variância (ANOVA) para as regressões das equações 2 a 5 é mostrada na Tabela 4. Para a cultivar Iapar 59 o valor da razão da MQ_{faj}/MQ_{ep} é 0,637 enquanto o valor da distribuição F com 5 e 15 graus de liberdade é de 2,90 no nível de 95%. Como o valor de F crítico no nível de 95% de confiança é maior que a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} , não há indicação de falta de ajuste para o modelo cúbico especial.

Tabela 4 - Análise de variância para o ajuste do modelo cúbico especial aos rendimentos dos extratos brutos das amostras das quatro cultivares de café.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	Probabilidade
Iapar 59					
Modelo	4,154	9	0,461	62,91	0,000
Erro total	0,147	20	0,007		
Falte de ajuste	0,025	5	0,005	0,637	0,674
Erro puro	0,121	15	0,008		
Total	4,300	29	0,148		
Bourbon					
Modelo	3,401	9	0,378	84,791	0,000
Erro total	0,089	20	0,004		
Falte de ajuste	0,004	5	0,008	2,558	0,072

Erro puro	0,041	15	0,003		
Total	3,496	29	0,120		
IPR101					
Modelo	2,765	8	0,345	54,55	0,000
Erro total	0,133	21	0,006		
Falte de ajuste	0,050	6	0,008	1,529	0,235
Erro puro	0,082	15	0,005		
Total	2,898	29	0,099		
IPR108					
Modelo	2,150	6	0,359	13,652	0,000
Erro total	0,604	23	0,026		
Falte de ajuste	0,333	8	0,042	2,308	0,077
Erro puro	0,271	15	0,018		
Total	2,754	29	0,096		

Além disso, o valor da razão $MQ_R/MQ_T = 62,91$ é maior se comparada ao valor da distribuição F com o mesmo número de graus de liberdade 9 e 20 que é 2,39 no mesmo nível de confiança, indicando que o modelo é significativo, o mesmo ocorre para as outras três cultivares analisadas. O coeficiente de determinação R^2 para este ajuste é calculado pela razão SQ_R/SQ_T que é igual a 0,96 e o valor máximo que R^2 poderia explicar é dado por $(SQ_T - SQ_{ep}) / SQ_T$ que corresponde a 0,99. Os valores de F críticos correspondentes ao nível de 95% de confiança para modelos cúbicos especiais são $F_{9,20,0.05} = 2,39$; $F_{8,21,0.05} = 2,42$; $F_{6,23,0.05} = 2,53$. Os valores de F calculado são maiores que os valores de F críticos para o ajuste da regressão.

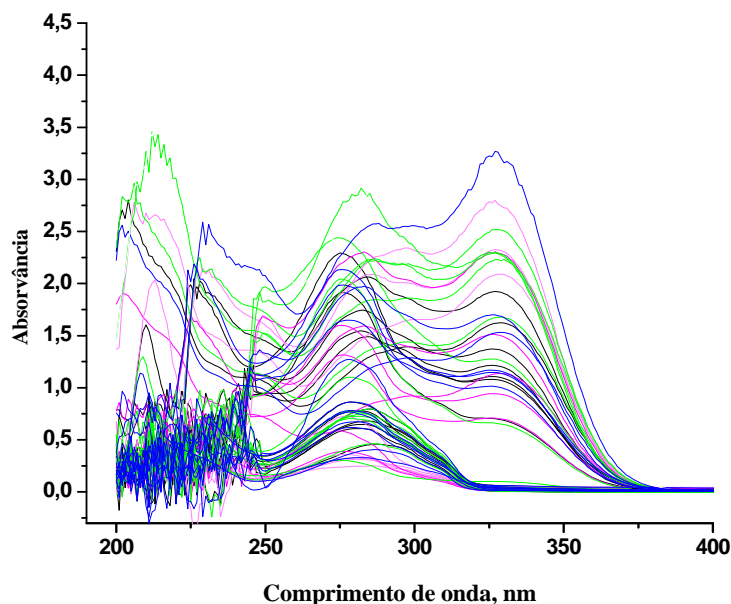
3.2 ANÁLISES DOS ESPECTROS NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

Os espectros dos 60 extratos referentes as 4 cultivares de café foram registrados na faixa espectral de 200 a 900 nm. Para a análise quimiométrica somente a região compreendida entre 240 a 400 nm foi utilizada num total 153 variáveis. Considerando que os espectros na região espectral abaixo de 240 nm apresentaram ruído instrumental e acima de 400 nm não verificou-se a presença de bandas, estas regiões foram descartadas, pois não apresentaram informação relevante.

A Figura 9 mostra os espectros de absorção na região de 200 a 400 nm dos 60 extratos, sendo 15 para cada cultivar de café. Observa-se significativa sobreposição entre os espectros de todas as amostras analisadas. Neste caso, a aplicação de técnicas

quimiométricas auxilia a interpretação dos dados com mais qualidade, possibilitando a classificação e a discriminação entre as amostras.

Figura 9 - Espectro de UV-Vis de todas as amostras de café Iapar 59 , Bourbon, IPR 101 e IPR 108.

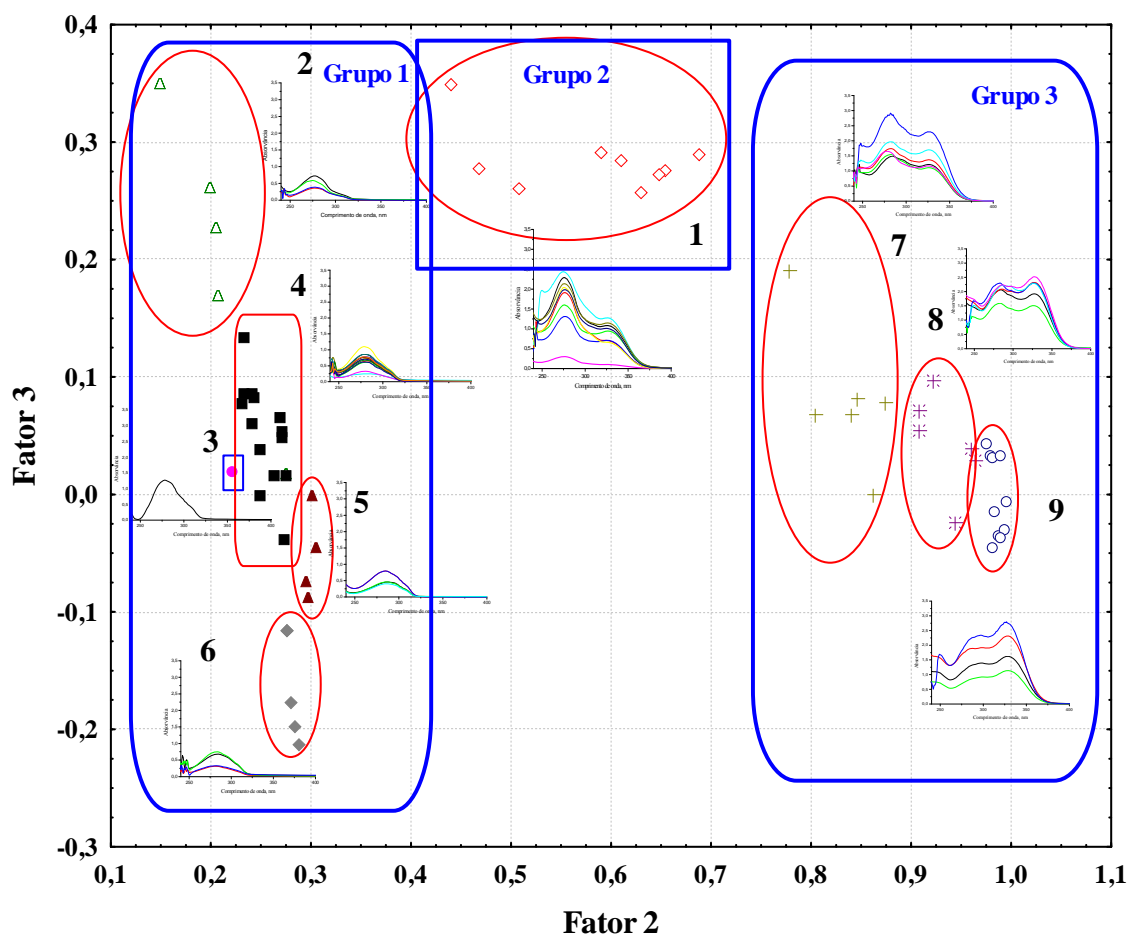


Para a Análise de Componentes Principais (ACP), os espectros foram colocados na forma de uma matriz contendo 60 linhas (amostras) e 153 colunas para as absorvâncias nos diferentes comprimentos de onda. As cinco primeiras componentes principais (CPs) explicam em torno de 99% da informação contida nos dados. O fator 1 explica 79,03%, o fator 2 explica 19,0% e o fator 3 com 1,7%. Embora o fator 1 explique a maior parte da variância, ele não fornece informação química das amostras para diferenciação das cultivares.

O gráfico da projeção dos escores dos fatores 2 e 3, que juntos explicam 20,7% da variância total dos dados está representado na Figura 10. Neste gráfico notam-se três grandes grupos que podem ser desdobrados em nove grupos menores. De acordo com os máximos dos picos de absorvância dos espectros, o fator 2 separa o grupo 3 com os subgrupos 7, 8 e 9, que está localizado na parte mais positiva do gráfico dos escores. O grupo 2 com o subgrupo 1 localizado na parte central do fator 2 e, na região menos positiva, está o grupo 1 com os subgrupos 2, 3, 4, 5 e 6. O fator 2 com valores acima de 0,5 que contém os subgrupos 1, 7, 8, 9, onde se observa duas bandas, uma na região de 240-300 nm e outra em 300-400 nm.

Observa-se que no subgrupo 1 o máximo de absorção está localizado na região 240-300 nm enquanto que deslocando mais para a direita do fator 2 o máximo localiza-se na região de 300-400 nm. Os máximos na região de 240-400 nm podem ser atribuídos aos ácidos carboxílicos, trigonelina e cafeína. E quando associados a uma banda na região de 300-400 nm pode ser atribuído aos ácidos clorogênicos.

Figura 10 - Gráfico dos escores para as componentes principais do fator 2 x fator 3 dos dados de espectroscopia no UV-Vis.



Sendo assim, as amostras com valores de escores acima de 0,5 contêm os principais metabolitos do café, ou seja cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos.

No fator 3 temos os subgrupos 2, 3, 4, 5 e 6 que contêm os extratos com escore menor que 0,5 e com concentrações bem menores que os subgrupos localizados no fator 2 maior que 0,5, com somente uma banda entre 240-300 nm característicos de ácidos de baixo peso molecular.

Por meio deste gráfico podemos ainda observar que o fator 3 negativo discrimina o subgrupo 5, que contém amostras da cultivar Iapar 59 e IPR 101 com solvente

extrator diclorometano:hexano e IPR 108 com hexano puro, com espectro de absorção UV característico da cafeína e trigonelina e o subgrupo 6 que contém as amostras das quatro cultivares Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 com o solvente extrator acetato de etila puro, com espectro de absorção característico de ácidos de baixo peso molecular.

No subgrupo 2 temos a separação do cultivar Bourbon com os solventes extratores diclorometano, acetato de etila:hexano, diclorometano:hexano e acetato de etila:diclorometano:hexano. Com o auxílio dos espectros de absorção observamos o máximo em 275 nm característico da cafeína. No subgrupo 3 temos os espectros dos extratos da cultivar IPR 108 com o solvente extrator diclorometano:hexano, com máximo de absorção em 277 nm característico de ácidos de baixo peso molecular. No subgrupo 4 temos as quatro cultivares com os solventes extratores diclorometano, hexano, etanol:acetato de etila, acetato de etila:diclorometano, acetato de etila:hexano, acetato de etila:diclorometano:hexano, com o auxílio do espectro de absorção observamos o máximo em 275 nm característico da cafeína.

O subgrupo 1 contém as amostra das quatro cultivares com os solventes extratores etanol:acetato de etila:hexano, etanol:acetato de etila:diclorometano:hexano e etanol:diclorometano:hexano, com o auxílio do espectro de absorção com máximo em 275 e 324 nm característicos de ácidos clorogênicos. O subgrupo 7 contém as amostras das cultivares Iapar 59 e IPR 108 com os solventes extratores etanol:acetato de etila, etanol:acetato de etila:diclorometano e etanol:acetato de etila:hexano, com o auxílio do espectro de absorção pode-se observar uma banda em 280 e 326 nm. O subgrupo 8 contém as amostras das cultivares Iapar 59 e Bourbon e com os solventes extratores etanol:acetato de etila, etanol:diclorometano, etanol:acetato de etila:diclorometano e etanol:acetato de etila:hexano, com o auxílio do espectro de absorção observamos uma banda em 280 e 326 nm também característico de ácidos clorogênicos. O subgrupo 9 contém as amostras das quatro cultivares com os solventes extratores etanol, etanol:acetato de etila, etanol:diclorometano e etanol:hexano, com o auxílio do espectro de absorção observamos o máximo em 280 e 328 nm característicos de ácidos clorogênicos.

A Figura 11 mostra os loadings das componentes principais 2 e 3. A região compreendida entre 225-350 nm está associada com as transições eletrônicas $n \rightarrow \pi^*$ das moléculas de cafeína, ácidos clorogênicos, trigonelina e ácidos de baixo peso molecular. Com o auxílio dos loadings podemos concluir que no fator 2 mais positivo com absorvância na faixa de 324-328 indicam a presença e o aumento da concentração de ácidos clorogênicos.

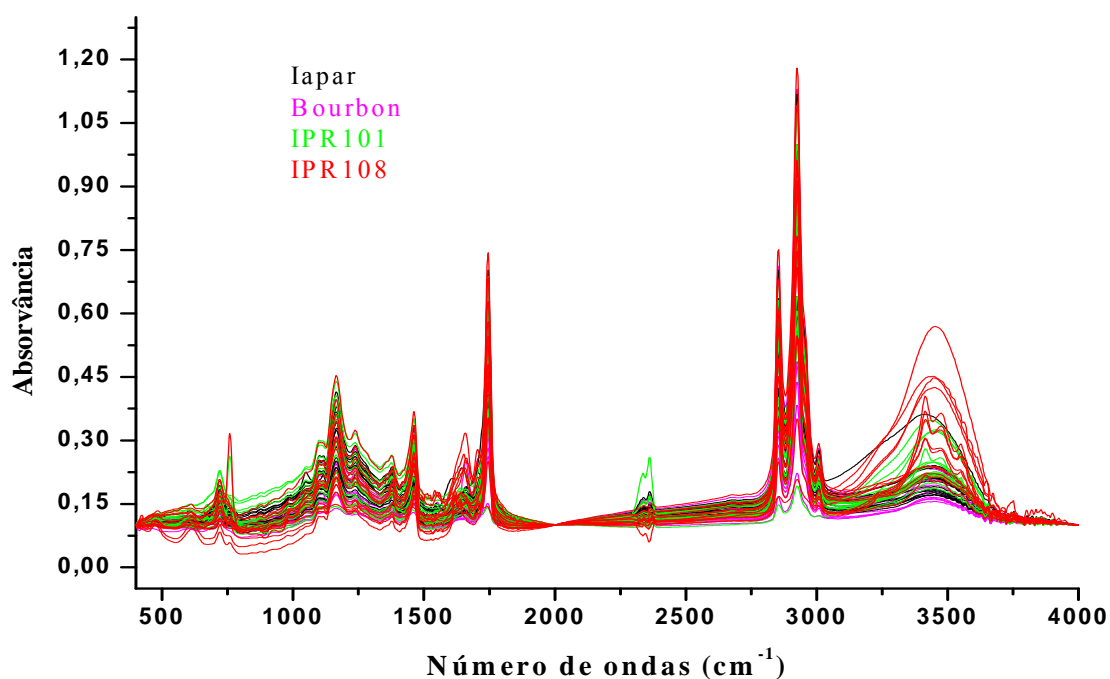
A Análise Hierárquica (AH) foi feita para a confirmação dos resultados encontrados nos gráficos dos escores das componentes principais. O dendrograma obtido para

3.3 ANÁLISES DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO (FTIR)

A Figura 13 mostra os espectros de FTIR de 400-4000 cm^{-1} dos 60 extratos, sendo 15 para cada cultivar de café. Por esta Figura é praticamente impossível diferenciar visualmente os espectros com relação aos solventes extratores bem como a cultivar de café, porque não existe diferença nas características das bandas, somente nas intensidades.

Devido à dificuldade na discriminação e identificação visual das amostras, os métodos quimiométricos de Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise Hierárquica (AH) foram usados para auxiliar a interpretação dos resultados.

Figura 13 - Espectro de infravermelho das quatro cultivares de café Iapar 59, Bourbon, IPR101, IPR108.

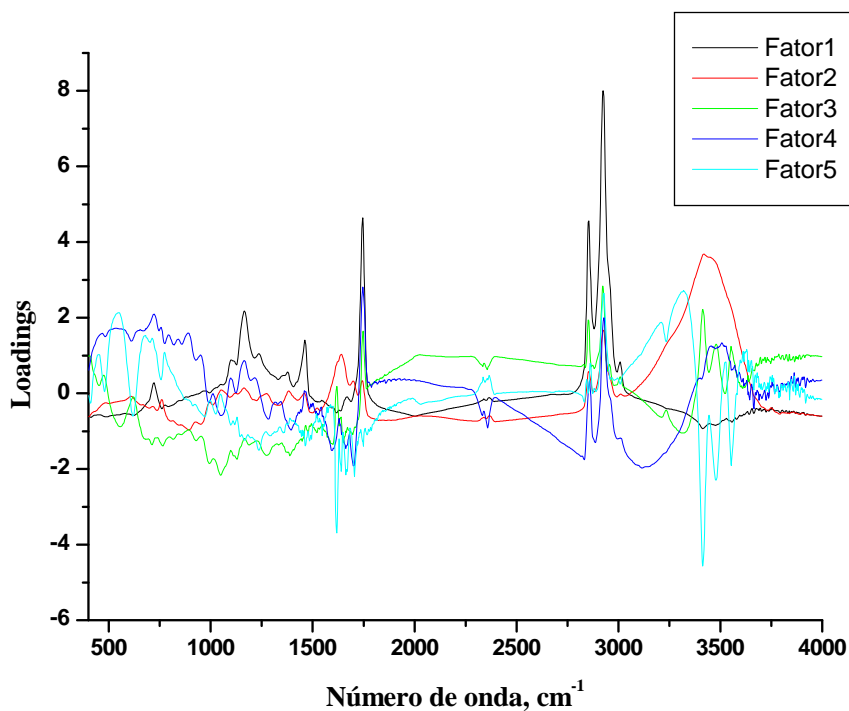


Para ACP e AH os valores de absorvância dos 60 espectros foram colocados na forma de uma matriz de 60x1866 (número de onda cm^{-1}). Nenhum pré-processamento foi usado antes da análise de componentes principais.

Os loadings das cinco primeiras componentes principais mostradas na Figura 14, explicam em torno de 99% da informação contida nos dados, sendo que o fator 1 explica 89,9%, o fator 2 explica 7,9% e o fator 3 explica 1,2% da variância contida nos dados. Embora o fator 1 explique a maior parte da variância, ele não fornece informação química

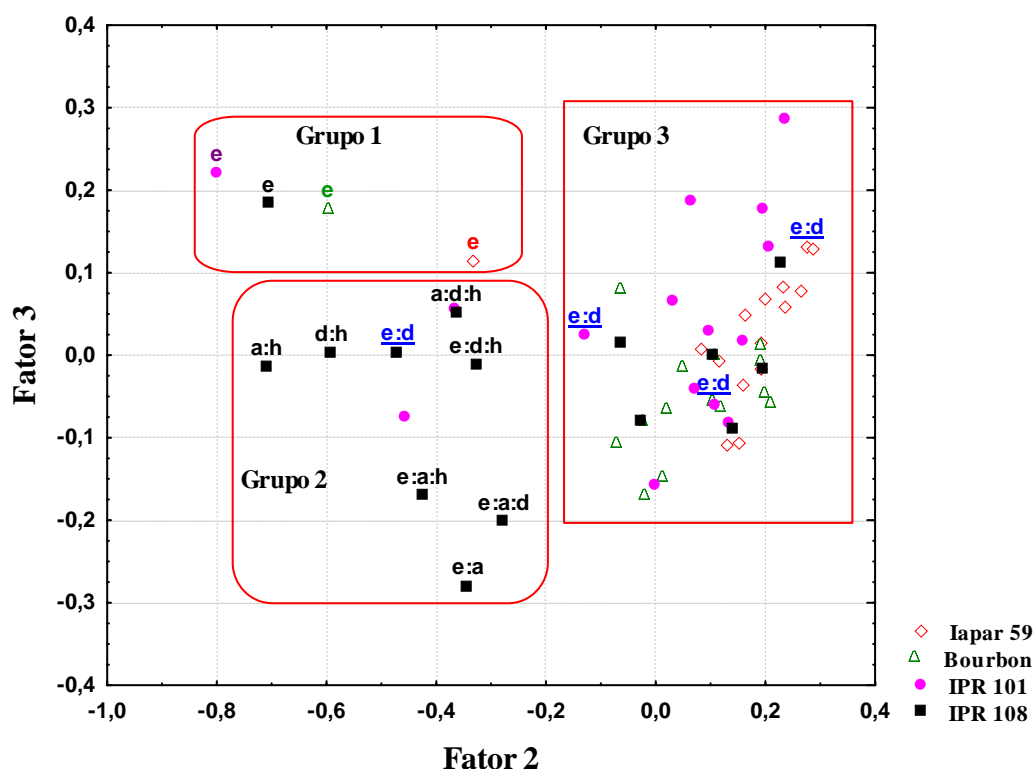
para a discriminação das amostras. As outras quatro componentes principais mesmo que com baixos valores de variância apresentam informação química relevante para a classificação.

Figura 14 - Gráfico dos loadings dos cinco fatores para as quatro cultivares de café.



A Figura 15 mostra o gráfico dos escores onde observa-se a formação de três grupos. O grupo 1 localizado na parte positiva do fator 3 e negativa do fator 2 contém os espectros das quatro cultivares com extrator etanol. O grupo 2 localizado na parte negativa do fator 2 e fator 3 contém oito das quinze amostras da cultivar IPR 108 com os solventes extratores etanol:acetato de etila, etanol:diclorometano, acetato de etila:hexano, diclorometano:hexano, etanol:acetato de etila:diclorometano, etanol:acetato de etila:hexano, etanol:diclorometano:hexano e acetato de etila:diclorometano:hexano. O grupo 3 localizado mais a direita do fator 2 contém majoritariamente os espectros das três cultivares Iapar 59, Bourbon e IPR 101 com praticamente todos os solventes extratores.

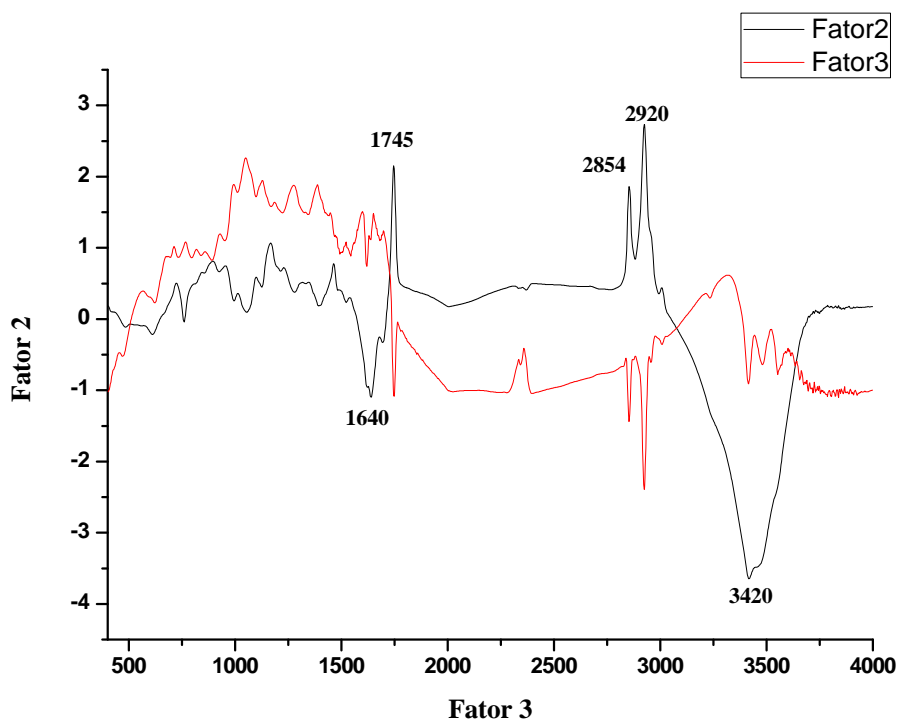
Figura 15 - Gráfico dos escores para as componentes do fator 2 x fator 3 dos dados de espectroscopia no infravermelho para as amostras das cultivares de café Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108



Observa-se também na Figura 15 que os escores dos espectros nos extratos preparados em etanol:diclorometano é o que melhor discrimina as quatro cultivares.

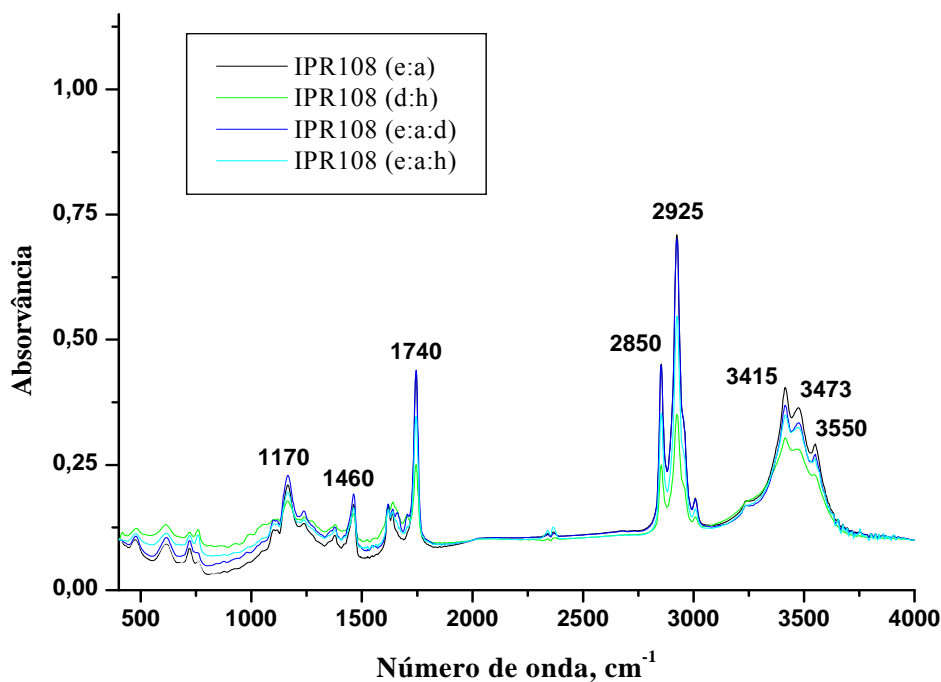
A Figura 16 mostra o Gráfico dos loadings dos fatores 2 e 3, que explicam 9,0% da variância total, reduzindo o arranjo de 1866 variáveis para um espaço de duas dimensões, com informações relevantes para a interpretação dos dados. Nesta Figura é possível ter uma visão geral das regiões que permitem a discriminação entre os três grupos formados na Figura 15. Os loadings do fator 2 negativo mostram que as amostras do grupo 2 formado pela cultivar IPR 108 com valores de escores negativos sofrem maior influência das absorvâncias caracterizados pelos grupos funcionais com números de ondas em 1640 e 3420 cm^{-1} que são característicos de amidas secundárias e ácidos carboxílicos, respectivamente.

Figura 16 - Gráfico dos loadings do fator 2 e fator 3 para as quatro cultivares de café.



Com a análise hierárquica mostrada na Figura 17 observa-se que o grupo 2 com os espectros da cultivar IPR 108 foram subdivididos em dois grupos menores localizados nos dois extremos do dendrograma, um grupo é formado pelos solventes extratores etanol:diclorometano, etanol:diclorometano:hexano e acetato de etila:diclorometano:hexano, acetato de etila:hexano do lado esquerdo do dendrograma enquanto que o segundo grupo está localizado do lado direito e é formado pelos solventes extratores etanol:acetato de etila, etanol:acetato de etila:hexano, diclorometano:hexano e etanol:acetato de etila:diclorometano. Esta divisão pode ser explicada pela perda de informação dos pontos na ACP em que fator 2 explica 7,9% e o fator 3 explica 1,2%.

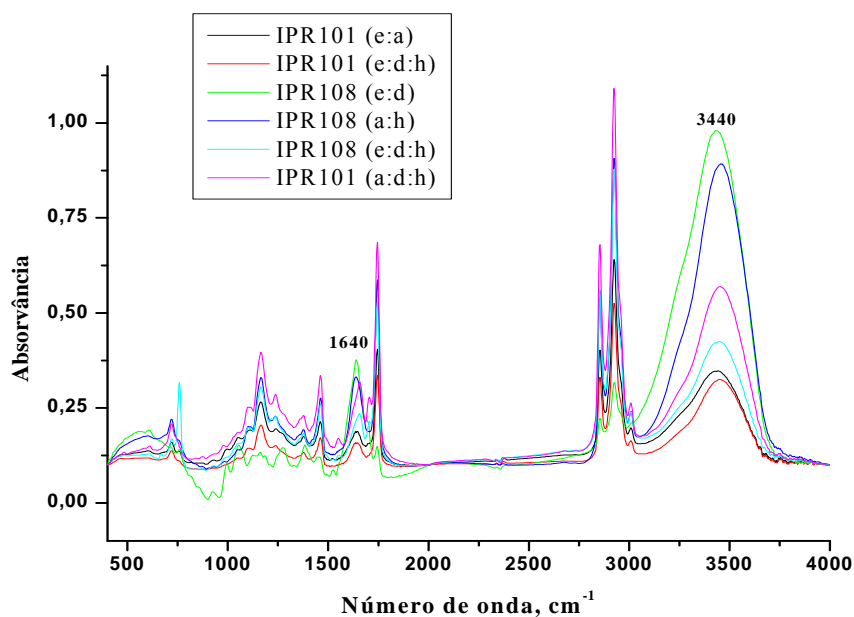
Figura 18 - Espectro de infravermelho da cultivar IPR 108 com diferentes solventes extratores.



A trigonelina caracterizada por Silverstein & Webster ³⁹, é um composto formado por uma piridina e apresenta quatro bandas entre 1600 e 1300 cm^{-1} . As bandas na região entre 1520 e 1460 cm^{-1} podem ser atribuídas as ligações de C=C e C=N ⁴⁰.

A Figura 19 mostra os espectros da cultivar IPR101 com os extratores etanol:acetato de etila e etanol:diclorometano:hexano e também da cultivar IPR108 com os extratores etanol:diclorometano, acetato de etila:hexano, etanol:diclorometano:hexano e acetato de etila:diclorometano:hexano, localizados do lado direito do dendrograma. Nota-se a presença de uma banda mais intensa em torno de 3440 cm^{-1} característica de ácidos carboxílicos. As amidas secundárias absorvem entre 3330-3060 cm^{-1} devido a vibrações de deformação axial e angular de N-H, e em 1640 cm^{-1} devido à deformação axial de C=O ⁴¹.

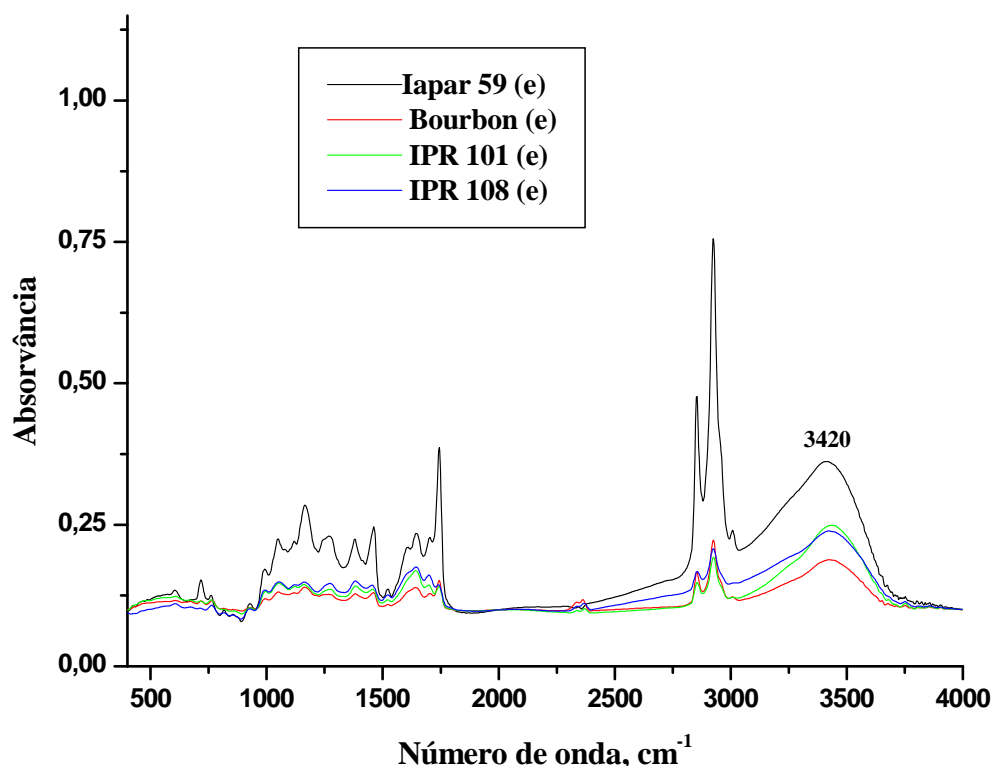
Figura 19 - Espectro de infravermelho das cultivares IPR 101 e IPR 108 com diferentes solventes extratores.



É interessante observar pelas Figuras 18, 19 e 20 a influência dos solventes na extração dos metabolitos predominantes nos grãos de café.

A Figura 20 apresenta os espectros das quatro cultivares em etanol puro. Nota-se que os espectros em etanol puro são diferentes daqueles preparados em misturas binárias etanol:acetato de etila, etanol:hexano, diclorometano:hexano e ternárias etanol:acetato de etila:diclorometano e etanol:acetato de etila:hexano para as cultivares IPR 101 e IPR 108 principalmente na região de 2750-4000 cm^{-1} . Observa-se também que a cultivar Iapar 59 apresenta maior concentração dos metabólitos em etanol. Houve também o aparecimento de uma banda em 3420 cm^{-1} que pode ser característica de ácidos carboxílicos que absorvem na região de 3400-2500 cm^{-1} ^{40,41}.

Figura 20 - Espectro de infravermelho das quatro cultivares de café com o extrator etanol.



Para a busca da impressão digital escolheu-se o melhor solvente extrator que discrimina as quatro cultivares de café. Pela Figura 15 e a análise hierárquica, observou-se que a mistura 50:50 v/v de etanol:diclorometano poderia discriminar os espectros dos extratos das quatro cultivares de café. Para confirmação dos resultados foram preparados sextuplicatas de cada cultivar e posteriormente foram sujeitas a análise das componentes principais. A Figura 21 mostra os escores dos fatores 2 e 3 para as quatro cultivares, onde é possível visualizar que o fator 2 negativo discrimina a cultivar IPR108. O Iapar 59 é discriminado no fator 2 e 3 positivos, o cultivar Bourbon e IPR 101 são discriminados no fator 2 positivo e são mais semelhantes entre si. Na Figura 22 nota-se no espectro para a cultivar IPR 108 a presença de uma banda mais intensa e alargada em torno de 3440 cm⁻¹ característica de ácidos carboxílicos. As amidas secundárias absorvem entre 3330-3060 cm⁻¹ devido a vibrações de deformação axial e angular de N-H, e em 1640 cm⁻¹ devido à deformação axial de C=O⁴¹. Estes dados podem ser confirmados por meio do gráfico dos loadings na Figura 23. As cultivares Bourbon e IPR 101 não foram bem discriminadas com esse solvente extrator e ficaram juntas no fator 2 positivo.

Figura 21 - Gráfico dos escores do Fator 2 x Fator 3 para as quatro cultivares de café com extrator etanol:diclorometano.

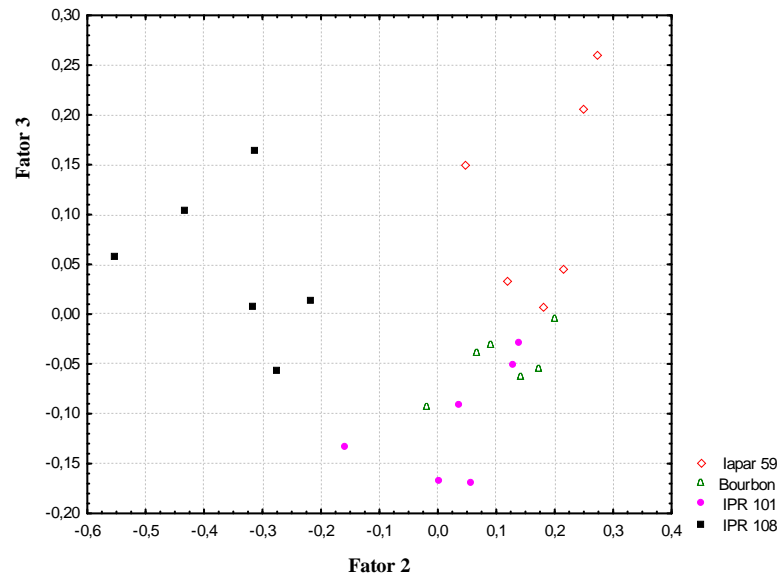
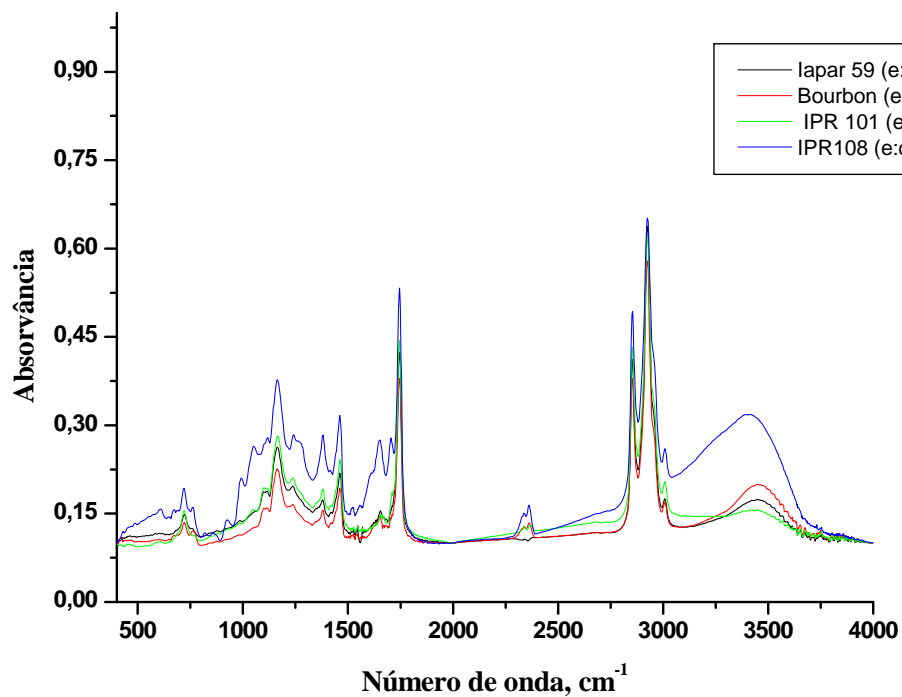
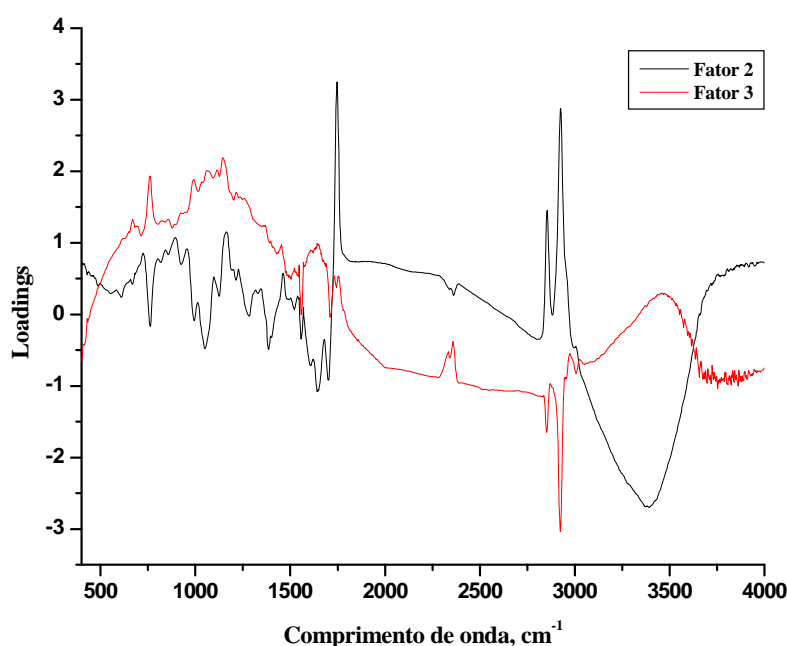


Figura 22 - Espectro IV original das quatro cultivares de café com extrator etanol:diclorometano.



Com o auxílio do Gráfico dos loadings Figura 23 e Figuras 21 e 22, pode-se constatar que no fator 2 negativo que a cultivar IPR 108 contém compostos com grupos funcionais na região de $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ característica de compostos contendo nitrogênio (N-H) em 3440 cm^{-1} . A região de $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ atribuída aos ácidos clorogênicos. A cafeína com banda em 1745 cm^{-1} é mais pronunciada para a cultivar IPR 108 no fator 2 positivo mostrando que essa mistura de solventes é um bom discriminador para essa cultivar.

Figura 23 - Gráfico dos loadings do fator 2 e fator 3 para as quatro cultivares de café com solvente extrator etanol:diclorometano.



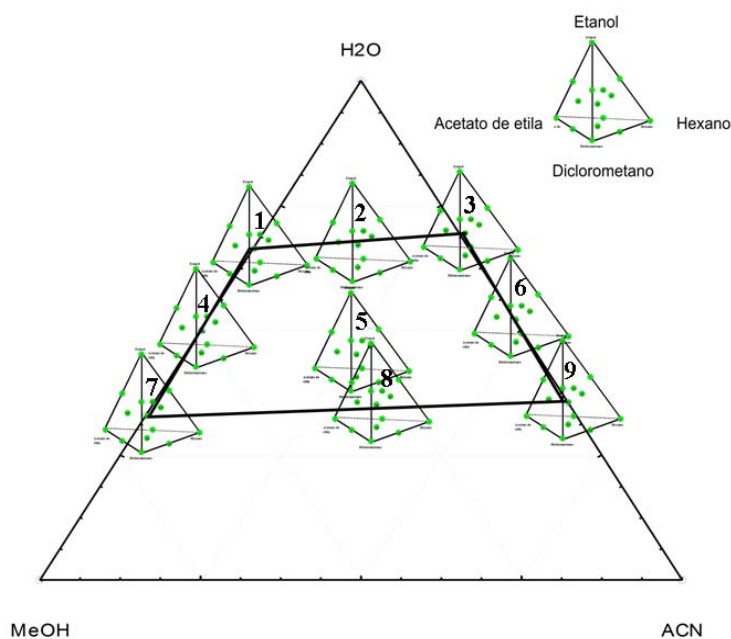
Os resultados da análise de componentes principais mostraram que os extratos preparados em etanol:acetato de etila, etanol:diclorometano e etanol-hexano discriminam as quatro variedades estudadas. Não houve separação das quatro cultivares com extratos preparados em etanol.

3.4 ANÁLISES DA CROMATOGRAFIA LIQUÍDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE/UV-DAD)

Considerando que melhor extrator nem sempre é aquele que fornece o maior rendimento, mas sim o que extrai maior diversidade de metabólitos os 60 extratos foram submetidos à análise cromatográfica. Uma forma de avaliar a eficiência do sistema extrator é por meio do número de picos cromatográficos. Neste trabalho foi utilizada a cromatografia

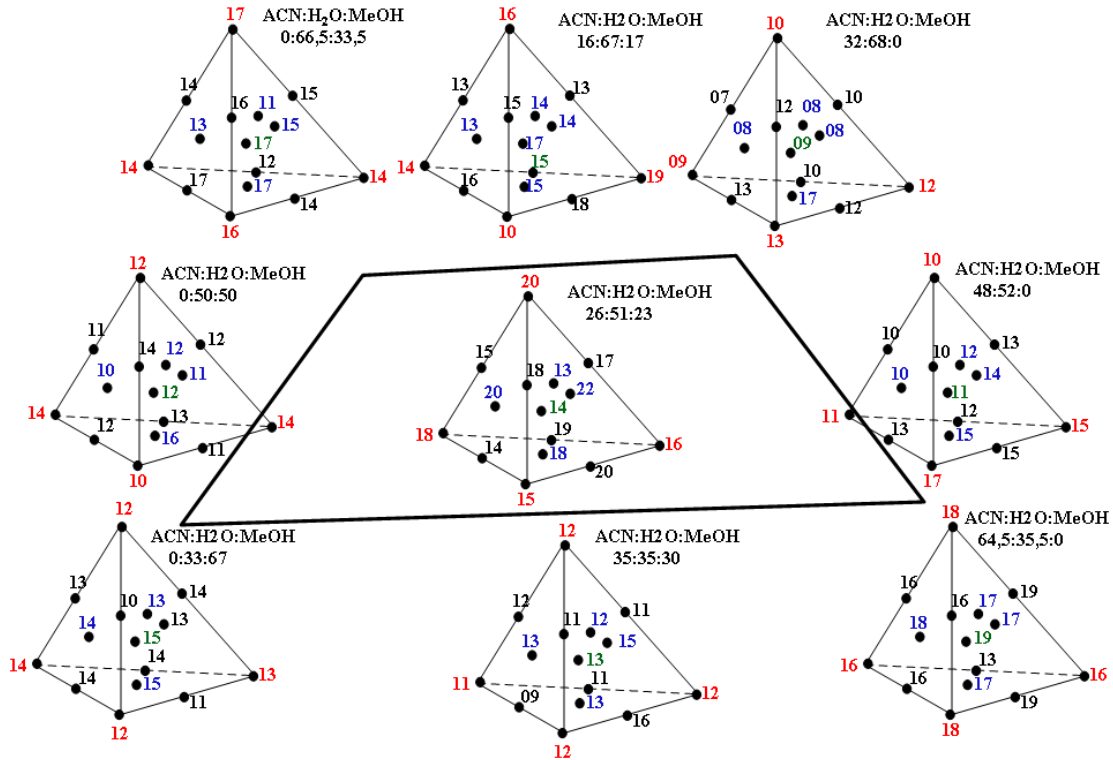
líquida de alta eficiência em fase reversa para avaliar o melhor sistema extrator. As análises de CLAE foram realizadas usando o planejamento experimental, Figura 24. Com 15 combinações diferentes para cada extrato, quatro cultivares de café e 9 diferentes fases móveis, este experimento totalizou 540 diferentes cromatogramas.

Figura 24 - Planejamento para as fases móveis 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 combinadas com o planejamento experimental do tipo Centróide Simplex dos extratos.



A Figura 25 mostra a eficiência das nove fases móveis para a cultivar Iapar 59 no comprimento de onda de 210 nm, onde podemos observar que a melhor fase móvel foi ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v), pois apresentou maior eficiência na separação com maior número de picos cromatográficos.

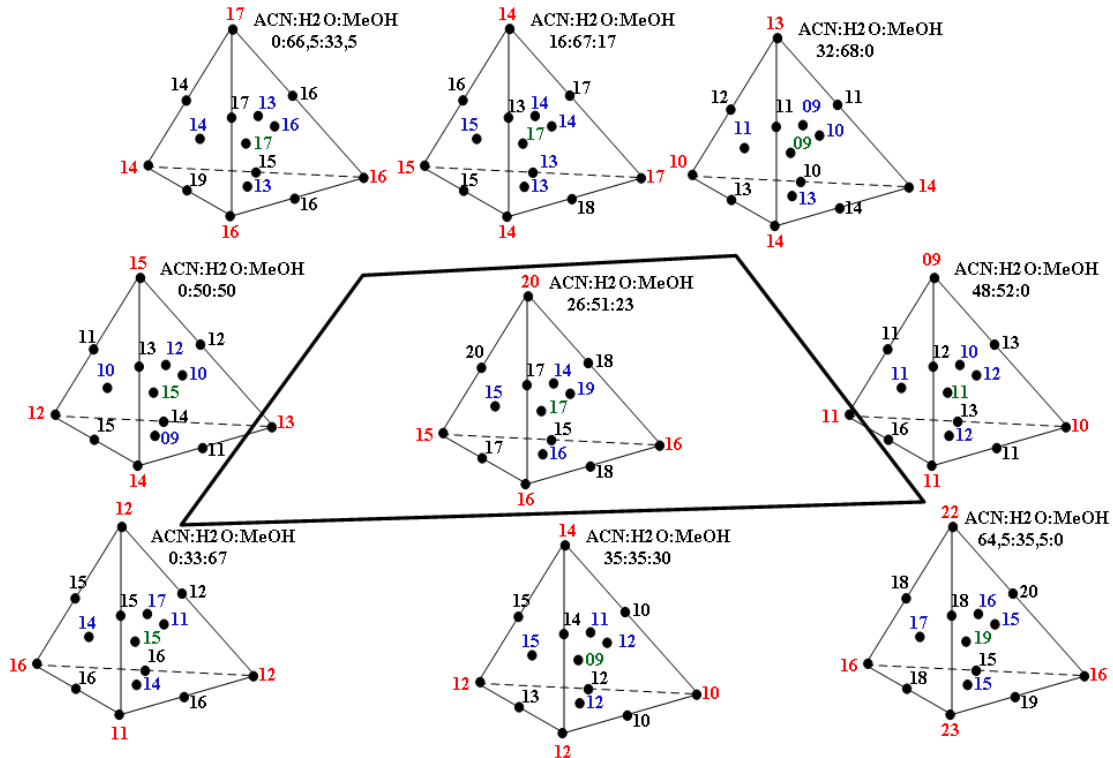
Figura 25 - Planejamento com os resultados obtidos na análise cromatografia com os números de picos cromatográficos com as nove fases no comprimento de onda 210 nm para a cultivar Iapar 59.



O melhor solvente extrator foi a mistura ternária 1:1:1(v/v/v) etanol:diclorometano:hexano com 22 picos; seguida da fase ACN:H₂O:MeOH 64,5:35,5:0 (v:v:v), onde os melhores solventes extratores foram as misturas binárias 1:1(v/v) de etanol:hexano e diclorometano:hexano, mistura quaternária 1:1:1:1(v/v/v/v) etanol:acetato de etila:diclorometano:hexano com 19 picos.

Mesma avaliação foi feita para as outras cultivares onde a Figura 26 mostra a eficiência das nove fases móveis para a cultivar Bourbon no comprimento de onda de 210 nm, onde podemos observar que a melhor fase móvel ACN:H₂O:MeOH 64,5:35,5:0 (v:v:v).

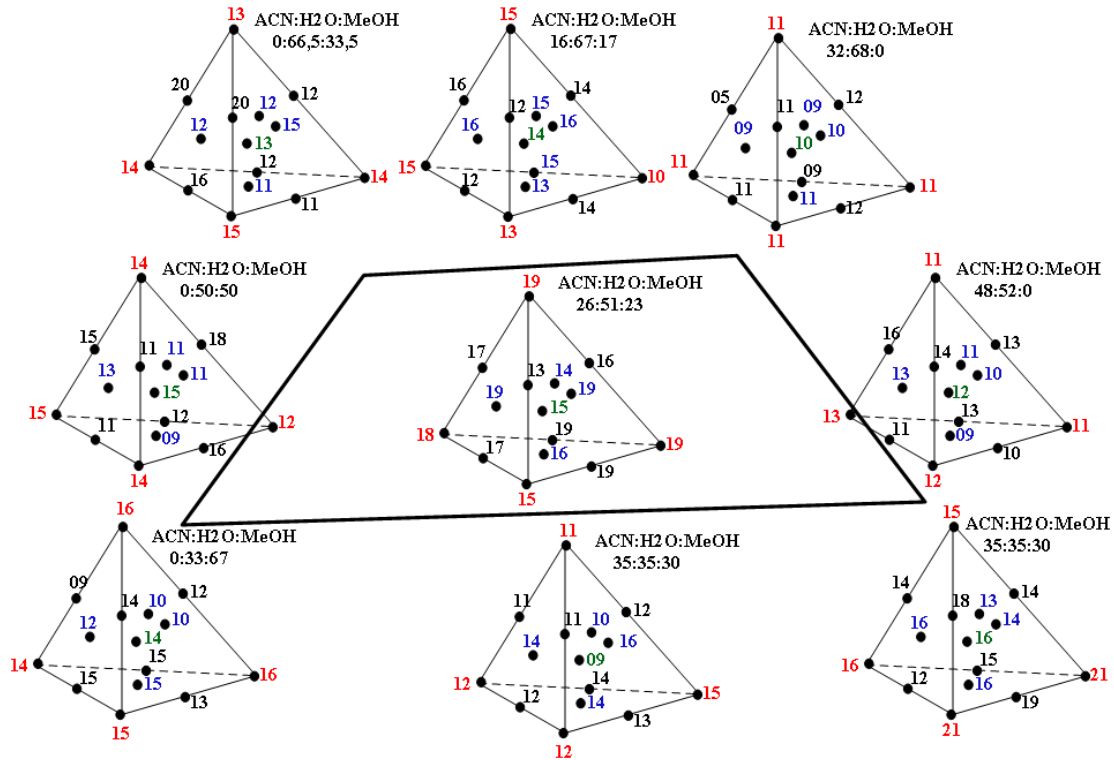
Figura 26 - Planejamento com os resultados obtidos na análise cromatografia com os números de picos cromatográficos com as nove fases no comprimento de onda 210 nm para a cultivar Bourbon.



O melhor solvente extrator foi o diclorometano puro com 23 picos; seguida da fase ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v), sendo que o melhor solvente extrator foi o etanol puro e a mistura binária de volumes iguais 1:1 (v/v) etanol:acetato de etila com 20 picos.

A Figura 27 mostra a eficiência das nove fases móveis para a cultivar IPR 101 no comprimento de onda de 210 nm, onde podemos observar que a melhor fase móvel foi ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v).

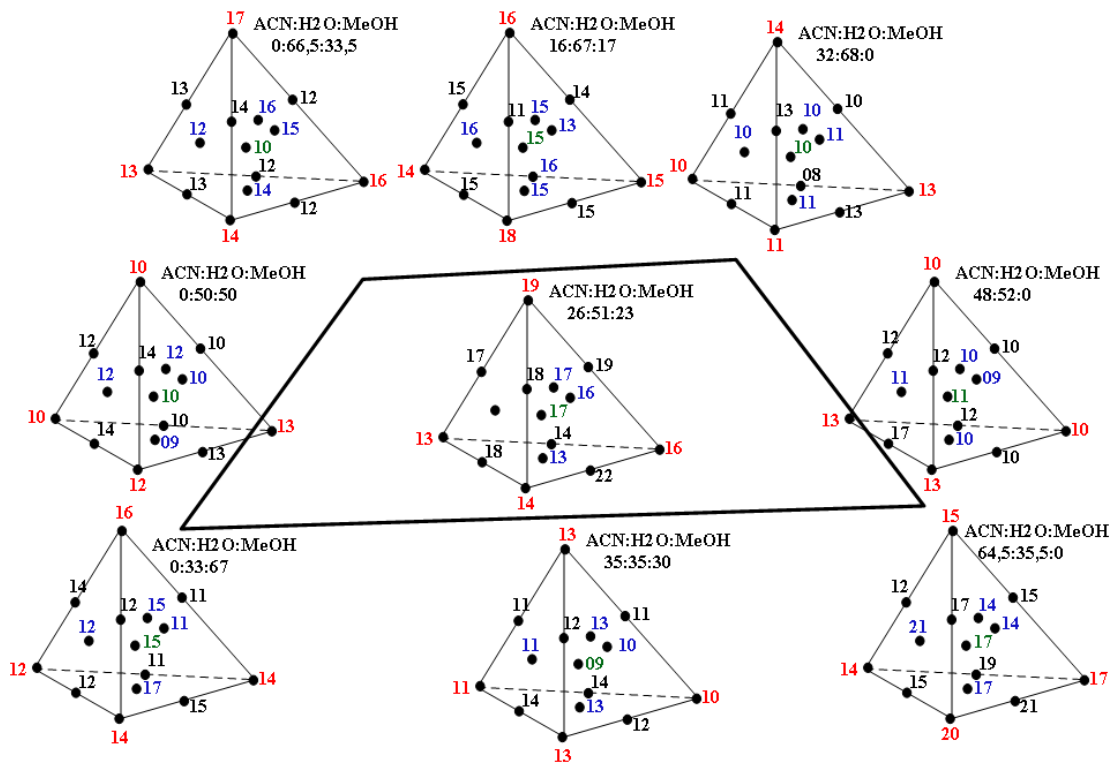
Figura 27 - Planejamento com os resultados obtidos na análise cromatografia com os números de picos cromatográficos com as nove fases no comprimento de onda 210 nm para a cultivar IPR 101.



O melhor solvente extrator foi o etanol puro, as misturas binárias de volumes iguais 1:1 (v/v) de acetato de etila:hexano, diclorometano:hexano e a mistura ternária 1:1:1 (v/v/v) de etanol:acetato de etila:diclorometano e etanol::diclorometano:hexano com 19 picos; seguida da fase ACN:H₂O:MeOH 35:35:30 (v:v:v), onde os melhores solventes extratores foram os solventes puros diclorometano e hexano com 21 picos.

A Figura 28 mostra a eficiência das nove fases móveis para a cultivar IPR 108 no comprimento de onda de 210 nm, onde podemos observar que a melhor fase móvel foi ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v).

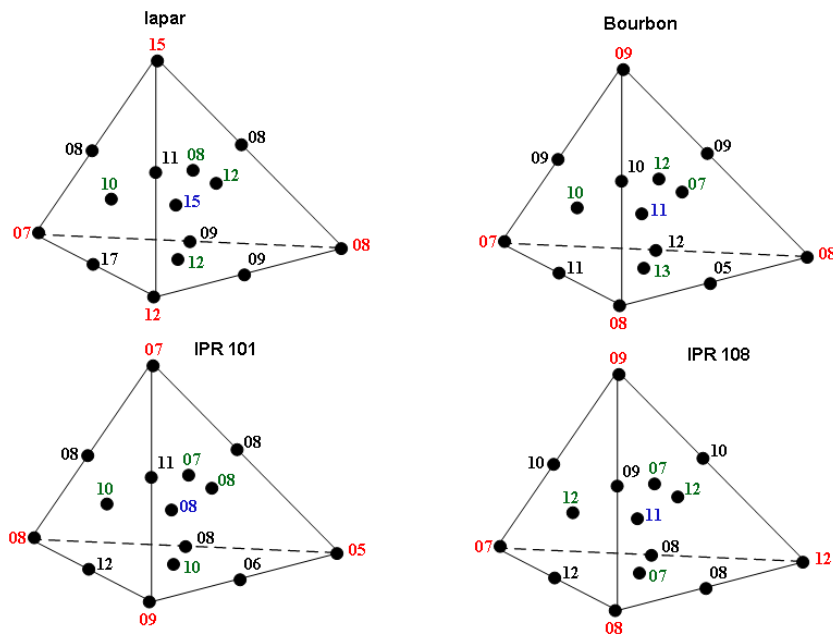
Figura 28 - Planejamento com os resultados obtidos na análise cromatografia com os números de picos cromatográficos com as nove fases no comprimento de onda 210 nm para a cultivar IPR 108.



O melhor solvente extrator foi a mistura binária de volumes iguais 1:1 (v/v) de diclorometano:hexano com 22 picos; seguida da fase ACN:H₂O:MeOH 64,5:33,5:0 (v:v:v), o melhor solvente extrator foi a mistura binária 1:1 (v/v) diclorometano:hexano e a mistura ternária contendo etanol:acetato de etila:diclorometano com 21 picos cromatográficos.

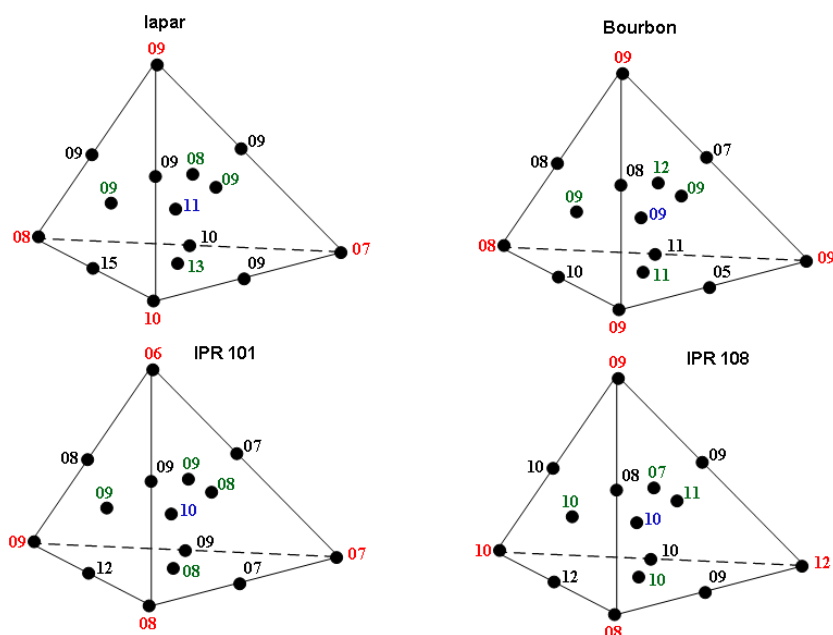
Como observado os melhores solventes extratores para as análises cromatográficas foram o diclorometano e hexano, puros ou em misturas. A melhor fase cromatográfica foi ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) no comprimento de onda de 210 nm. Nas Figuras 29 e 30 estão apresentados os resultados com as melhores fases obtidas nas análises cromatográficas para as quatro cultivares de cafés estudados, com seus respectivos números de picos cromatográficos no comprimento de onda de 240 e 254 nm.

Figura 29 - Planejamento com os resultados obtidos na análise cromatografia com os números de picos cromatográficos com a fase H₂O:MeOH 66,5:33,5 (v/v) no comprimento de onda 240 nm para as quatro cultivares de café estudadas.



Para todas as cultivares, a melhor fase contendo H₂O:MeOH 66,5:33,5 (v:v) com força cromatográfica 1,0, apresentou cromatogramas com o maior número de picos.

Figura 30 - Planejamento com os resultados obtidos na análise cromatografia com os números de picos cromatográficos com a fase H₂O:MeOH 66,5:33,5 (v/v) no comprimento de onda 254 nm para as quatro cultivares de café estudadas.



Analisando a Figura 31, gráfico dos escores fatores 2 e 3 dos dados de cromatografia líquida de alta eficiência para a fase ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) no comprimento de onda de 210 nm, para Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108, observamos a formação de três grupos. O grupo 1 parte positiva do fator 3, contém as quatro cultivares de café Iapar 59, Bourbon, IPR101 e IPR108 com o extrator etanol, e pode-se concluir que este extrator não é um bom discriminador pois não separa as diferentes cultivares. Por outro lado na mistura etanol:diclorometano ocorre à separação das quatro cultivares: no grupo1, IPR 108 e Iapar 59, parte positiva do fator 3, grupo 2 IPR 101 parte positiva do fator 2 e Bourbon localizada no grupo 3, parte negativa do fator 3, podendo esta mistura ser um bom discriminador. No grupo 3 das 18 amostras ali separadas 11 são da cultivar Bourbon. O grupo 2 é o maior grupo contendo a maioria das cultivares. O extrator etanol:acetato de etila discriminou a cultivar Bourbon localizado no grupo 3 na parte negativa do fator 2. Não houve discriminação das outras cultivares com este extrator ficando todas localizadas no grupo 2, parte positiva do fator 3. O extrator etanol:hexano discriminou no grupo 2 a cultivar IPR 108 na parte positiva do fator 3, pois as outras cultivares ficaram muito próximas localizadas no grupo 1. O extrator acetato de etila:diclorometano discriminou no grupo 3 a cultivar Bourbon

na parte intermediária do fator 2. O extrator acetato de etila:hexano discriminou no grupo 3 a cultivar Bourbon na parte intermediária do fator 2. O extrator diclorometano:hexano discriminou no grupo 3 a cultivar Bourbon localizada na parte negativa do fator 2, enquanto que as outras três cultivares ficaram localizadas na parte intermediária do fator 2. O extrator etanol:acetato de etila:hexano discriminou no grupo 3 a cultivar Bourbon localizada na parte intermediária do fator 2, enquanto que as outras cultivares ficaram localizadas no grupo 2 fator 3 positivo.

Através do gráfico dos escores dos fatores 2 e 3 é possível observar que houve influência das características da composição dos constituintes químicos para a separação das cultivares estudadas e a maioria dos extratos da cultivar Bourbon ficaram agrupadas no grupo 3, enquanto que os outros extratos das três outras cultivares ficaram separados entre os três grupos formados. Por ser a cultivar Bourbon uma cultivar arábica pura e as demais com cruzamento como descrito anteriormente, podemos concluir que as análises cromatográficas aliadas a análise dos escores foi uma metodologia adequada para a diferenciação das cultivares de cafés em estudo.

Figura 31 - Gráfico dos escores para os fatores 2 x 3 dos dados de cromatografia líquida de alta eficiência para a fase ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) no comprimento de onda de 210 nm, para Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108.

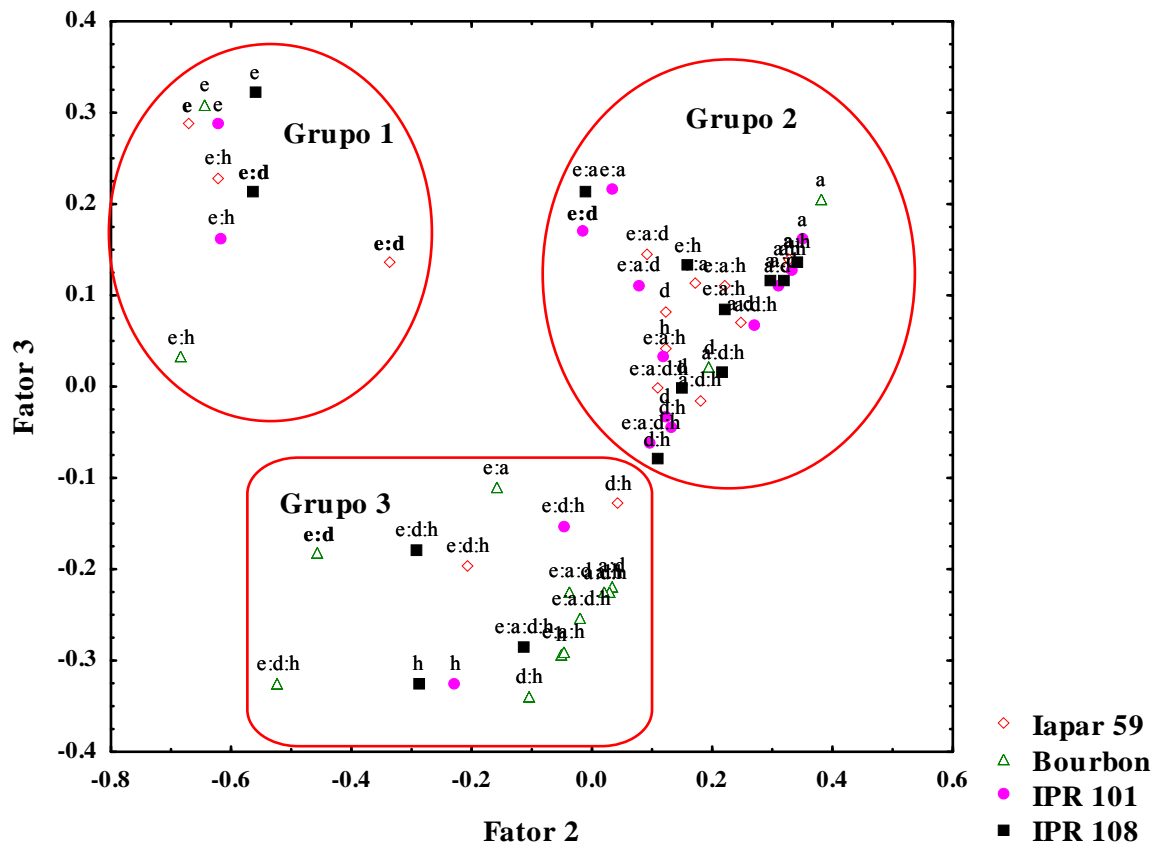
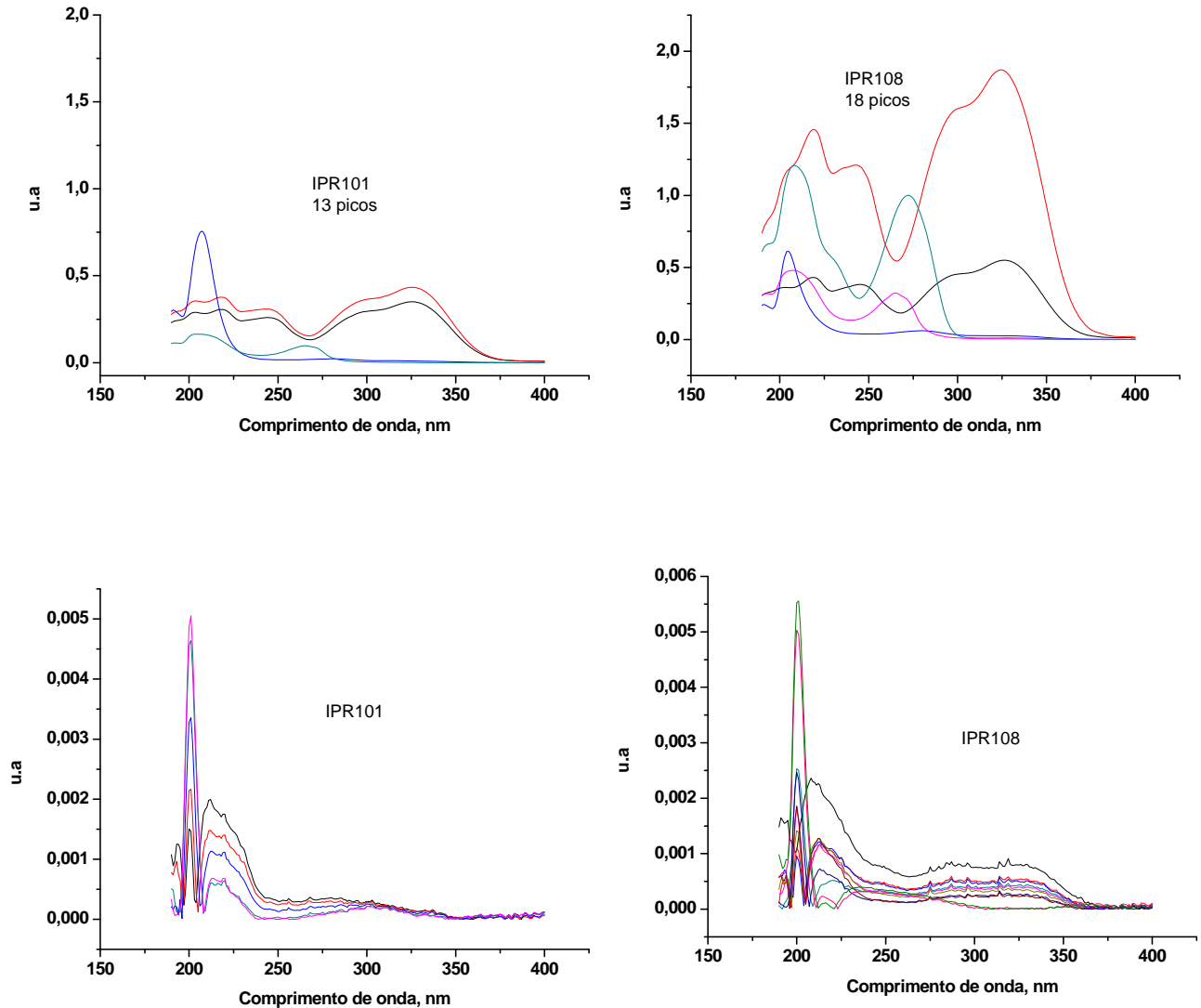
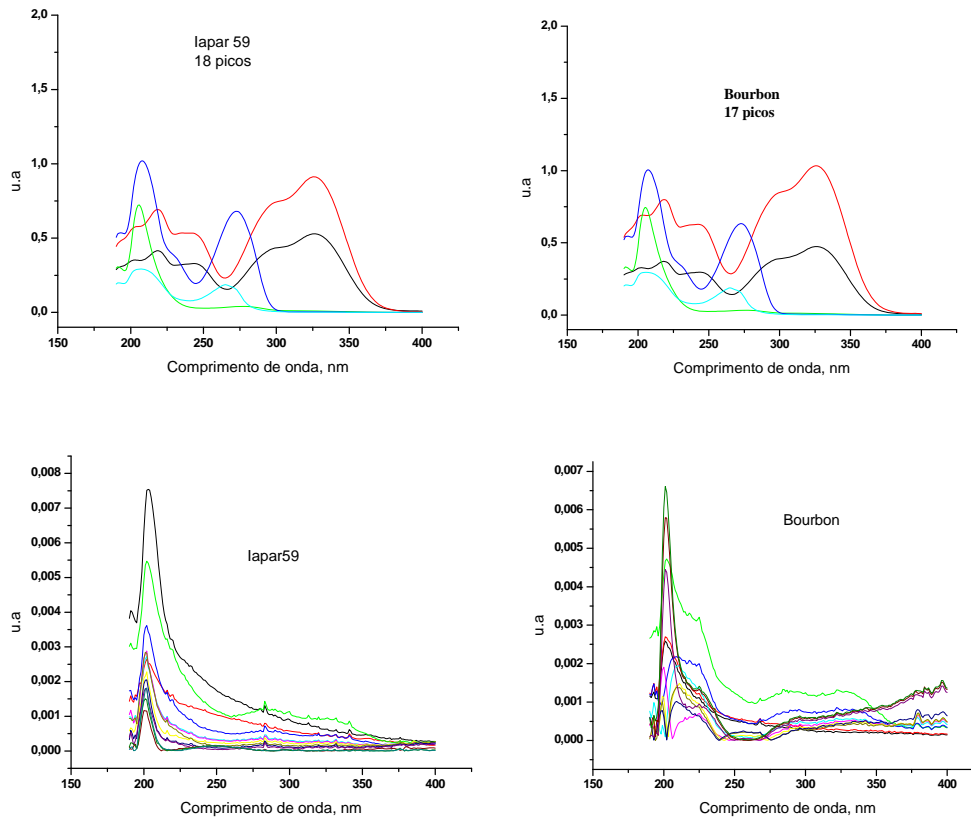


Figura 33 - Gráfico do espectro de CLAE para IPR101 e IPR108 com a Fase E ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator 6 etanol:diclorometano no comprimento de onda de 210 nm.



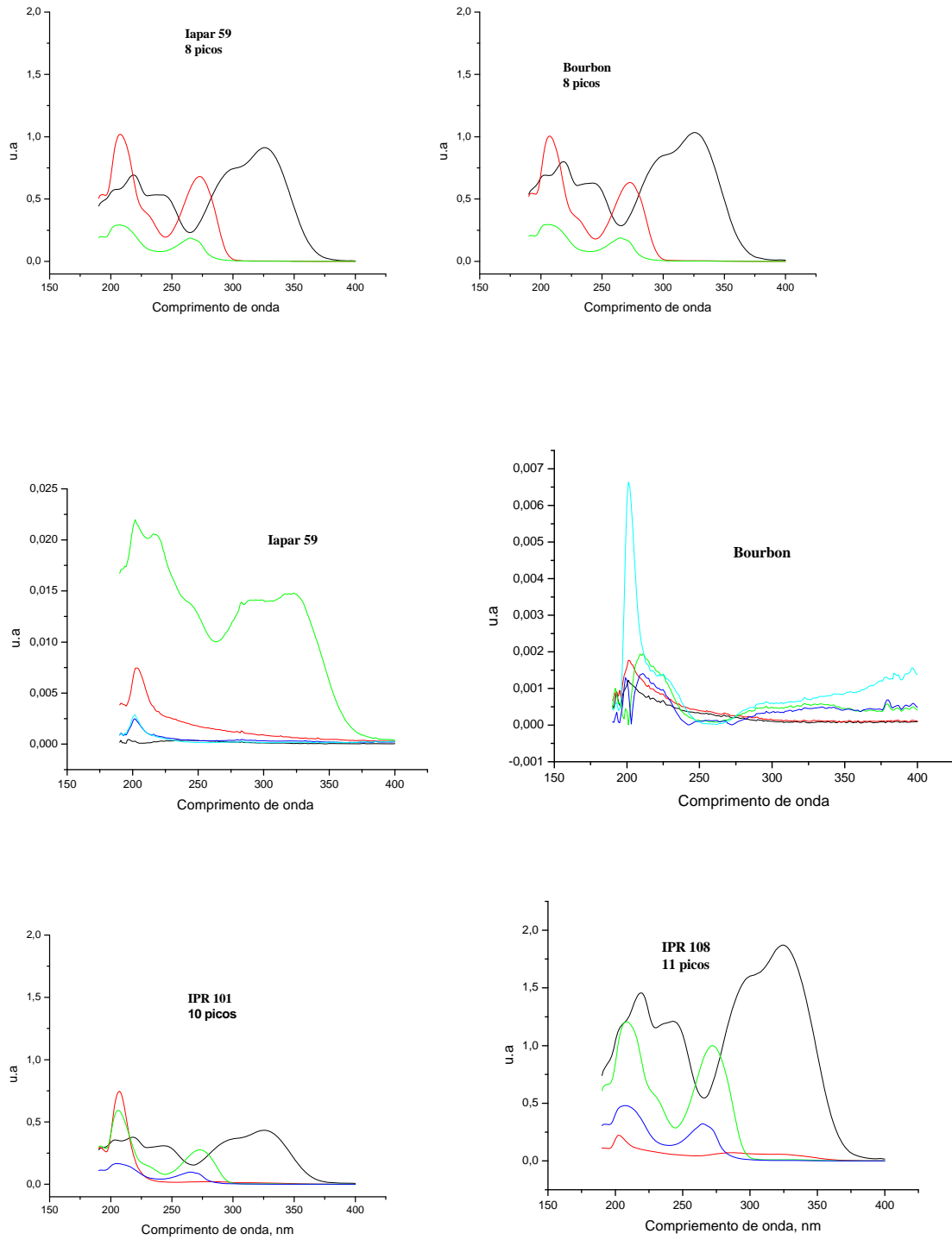
Assim também a Figura 34 mostra os espectros CLAE/UV-DAD para cultivar Iapar 59 e Bourbon com a fase ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator etanol:diclorometano no comprimento de onda de 210 nm. Podemos observar que a variação de intensidade de sinal não é tão intensa como no caso da cultivar IPR 108, mas também apresentam intensidades de sinal maiores que a cultivar IPR 101.

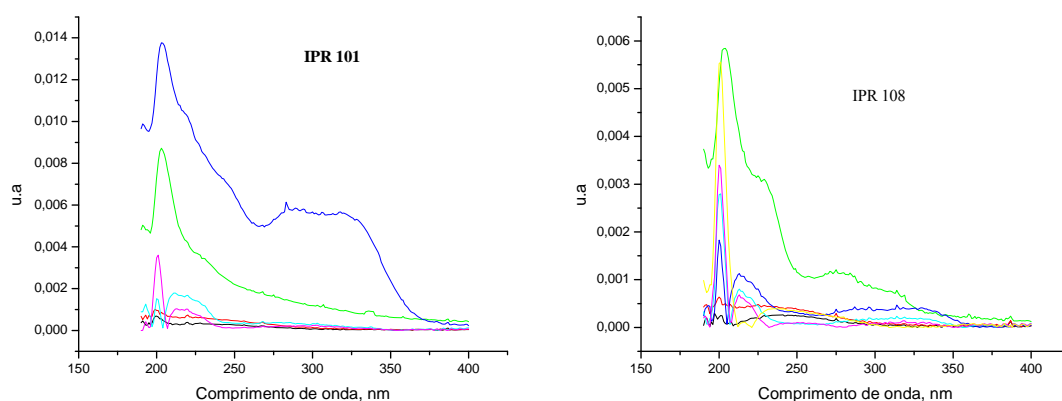
Figura 34 - Gráfico do espectro de CLAE para Iapar 59 e Bourbon com a fase ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator etanol:diclorometano no comprimento de onda de 210 nm.



Mesma avaliação foi feita para o comprimento de onda em 240 nm mostrada na Figura 35 e observou-se que os números de picos foram menores e que as intensidades dos sinais também diminuiram com relação ao comprimento de onda de 210 nm. Este resultado mostra que para monitorar os constituintes químicos para essas cultivares de café o melhor comprimento de onda é o de 210 nm.

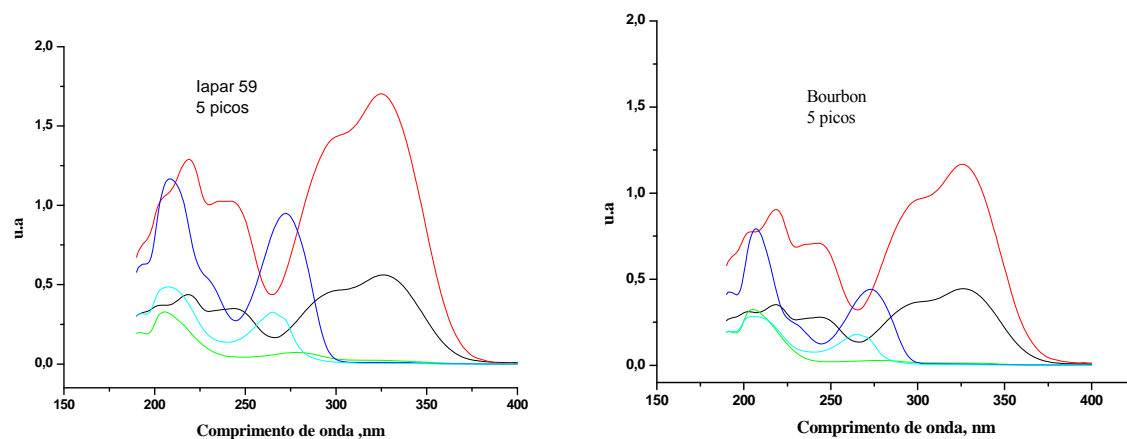
Figura 35 - Gráfico do espectro de CLAE para as cultivares IPR 101 e IPR 108 com a Fase ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator etanol:diclorometano no comprimento de onda de 240 nm.

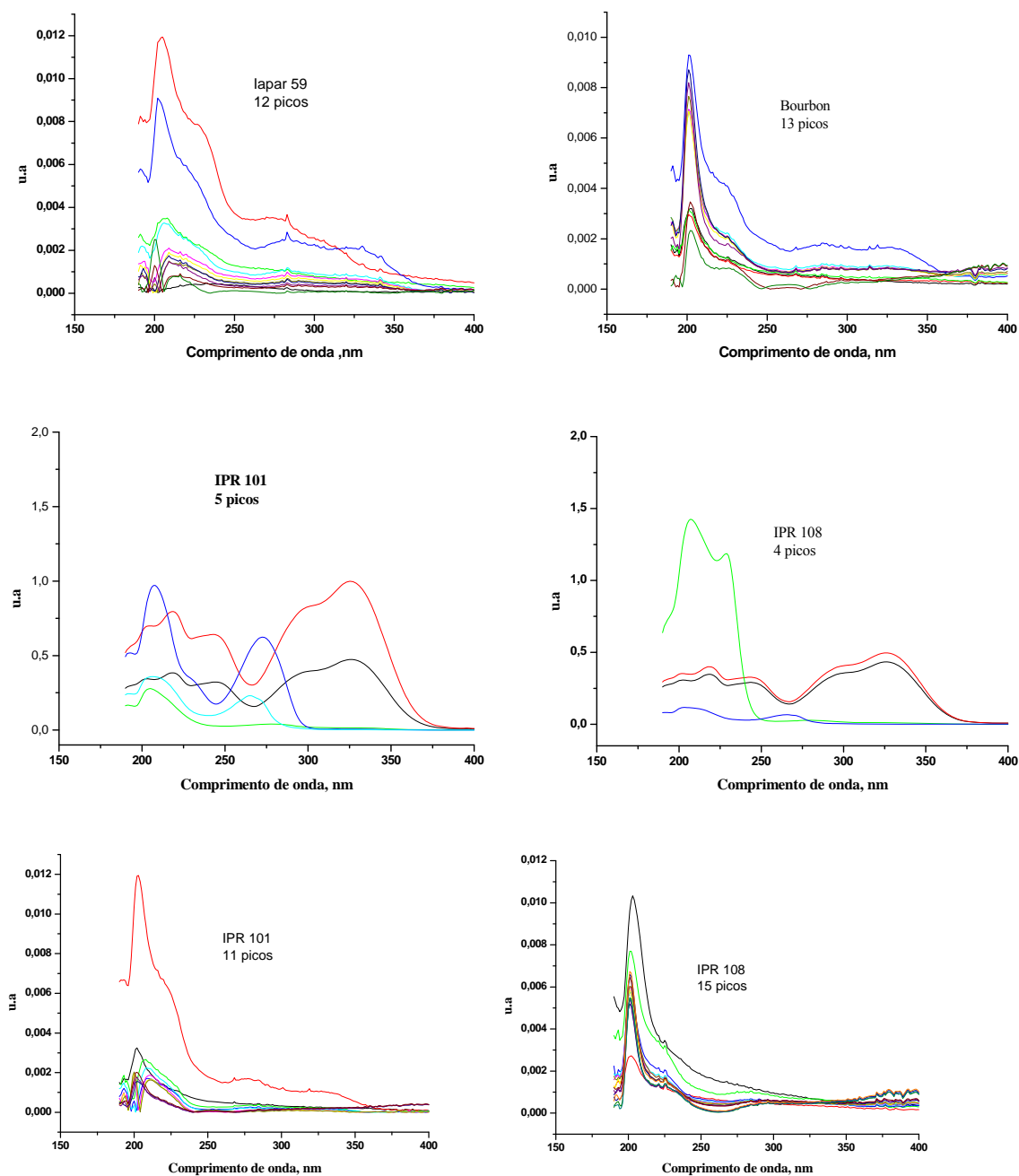




A Figura 36 mostra os espectros CLAE/UV-DAD para cultivar Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 com a fase ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator etanol:hexano no comprimento de onda de 210 nm. Podemos observar que a variação de intensidade de sinal foi maior para a cultivar Iapar 59 e IPR 108 e para as cultivares Bourbon e IPR 101 a intensidade foi praticamente a mesma, com relação ao número de picos foram bem semelhantes.

Figura 36 - Gráfico do espectro de CLAE para as cultivares Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 com a fase ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator etanol:hexano no comprimento de onda de 210 nm.

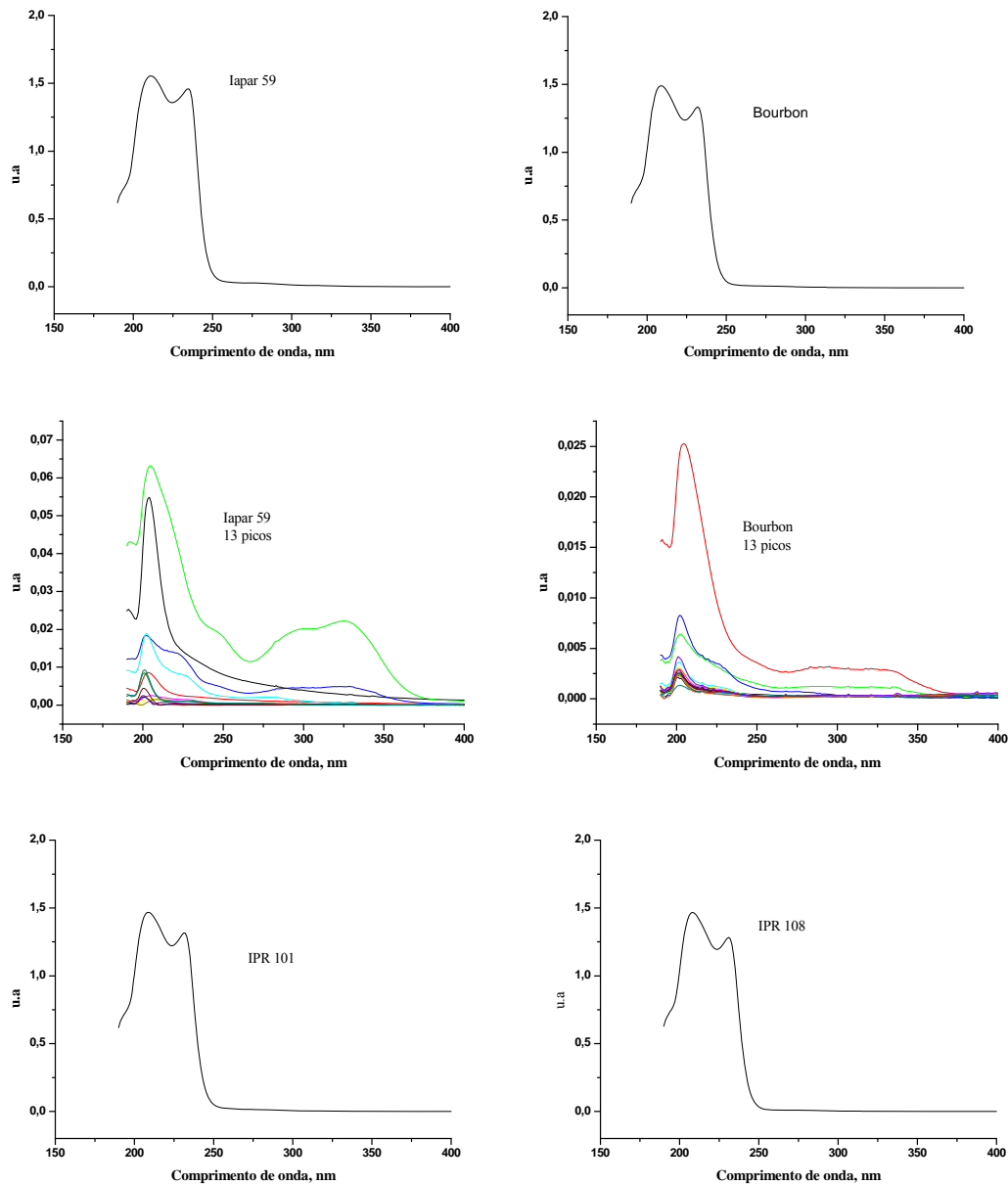


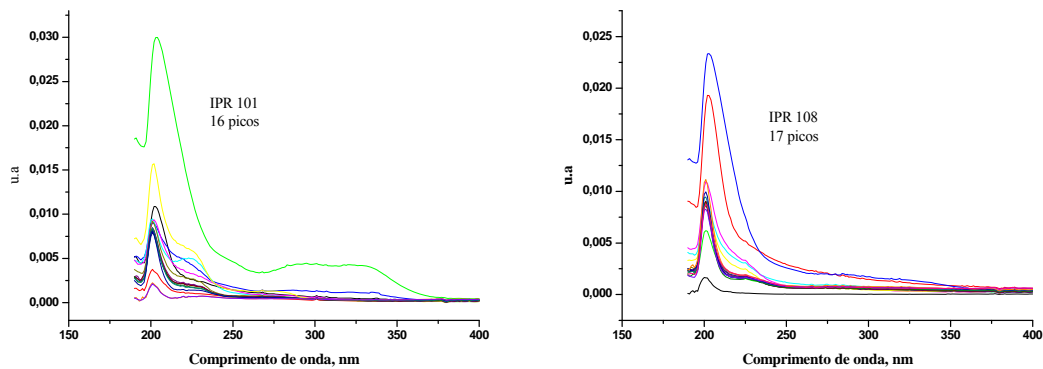


A Figura 37 mostra os espectros CLAE/UV-DAD para cultivar Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 respectivamente com a fase ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator acetato de etila:diclorometano no comprimento de onda de 210 nm. Podemos observar que não houve variação de intensidade de sinal cromatográfico dos principais metabólitos em maior concentração para nenhuma das cultivares estudadas. O cromatograma ficou bem definido e conseguiu separar os ácidos clorogênicos. Com relação aos metabólitos que apresentaram menor concentração houve também pequena diferença nas intensidades

entre as cultivares Bourbon, IPR 101 e IPR 108 em relação a cultivar Iapar 59 que apresentou maior intensidade nos picos.

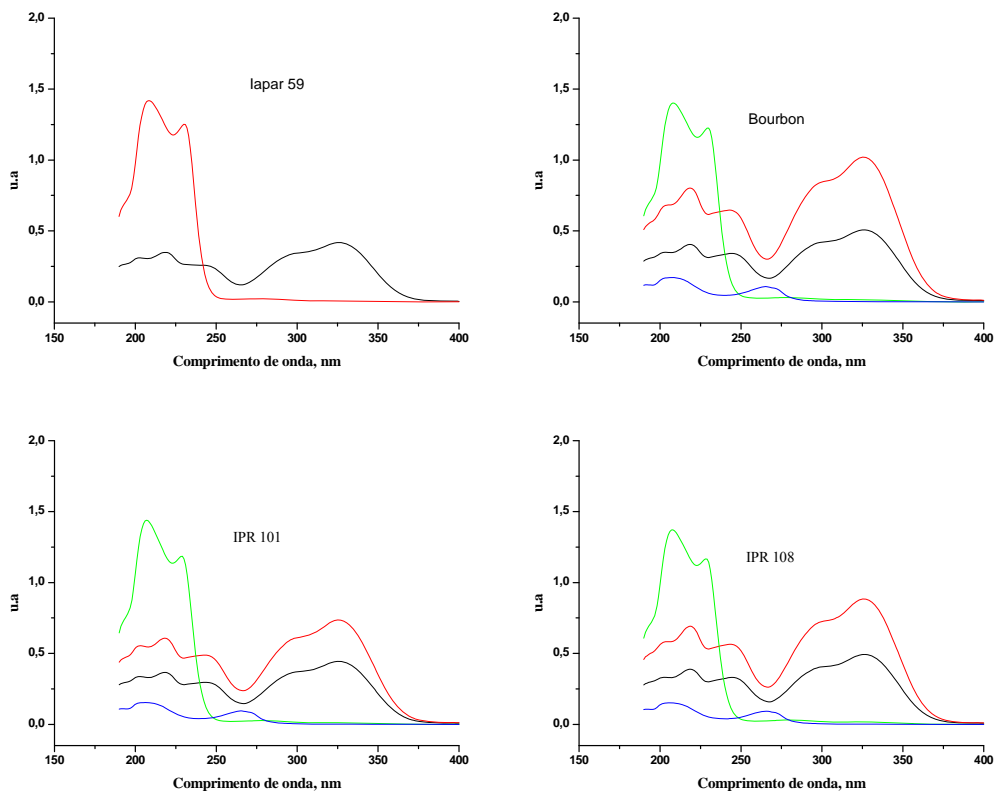
Figura 37 - Gráfico do espectro de CLAE para as cultivares Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 com a fase ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator acetato de etila:diclorometano no comprimento de onda de 210 nm.





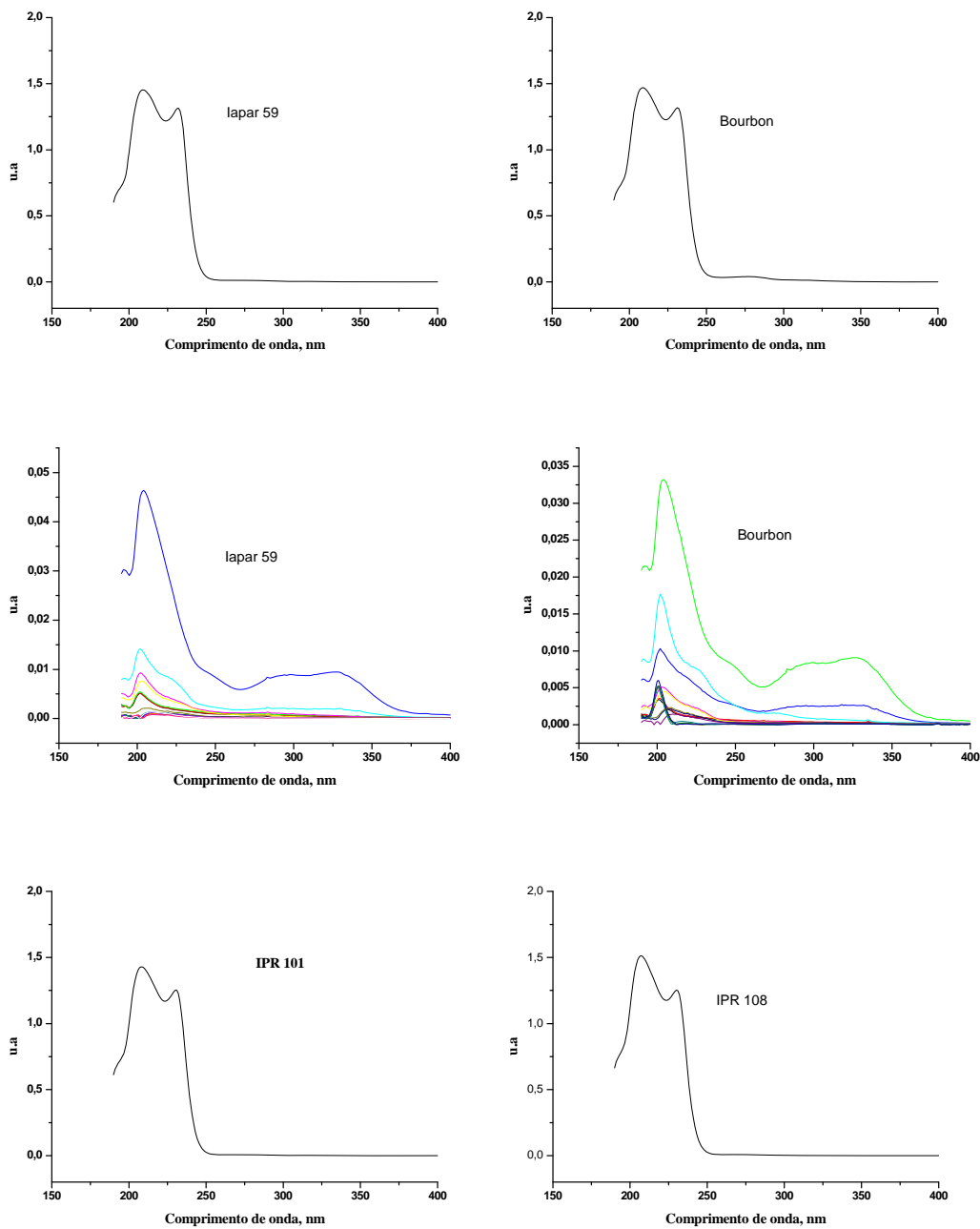
A Figura 38, mostra os espectros CLAE/UV-DAD para os extratos preparados em etanol:acetato de etila para as cultivares Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 respectivamente. Nesta figura estão apresentados os espectros com os metabólitos em maior concentração e pode-se observar que a cultivar Bourbon, IPR 101 e IPR 108 apresentou maior concentração para os principais metabólitos do café e que para a cultivar Iapar 59 esta fase e extrator não conseguiram extrair os mesmos metabólitos como para as demais cultivares.

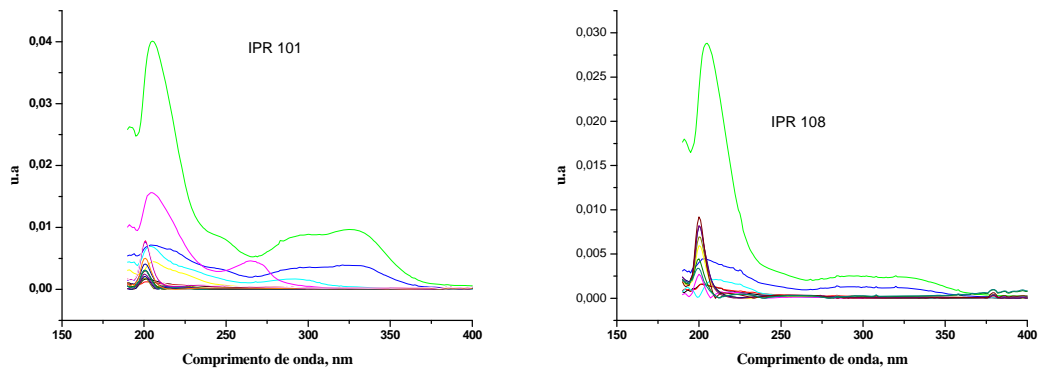
Figura 38 - Gráfico do espectro de CLAE para as cultivares Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 com a fase ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator etanol:acetato de etila no comprimento de onda de 210 nm.



Observando a Figura 39 gráfico dos espectros também com as quatro cultivares e com a fase ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator acetato de etila:hexano no comprimento de onda de 210 nm, podemos observar comportamento muito semelhante com a mesma fase e com extrator etanol:acetato de etila:diclorometano nos gráficos apresentados na Figura 37.

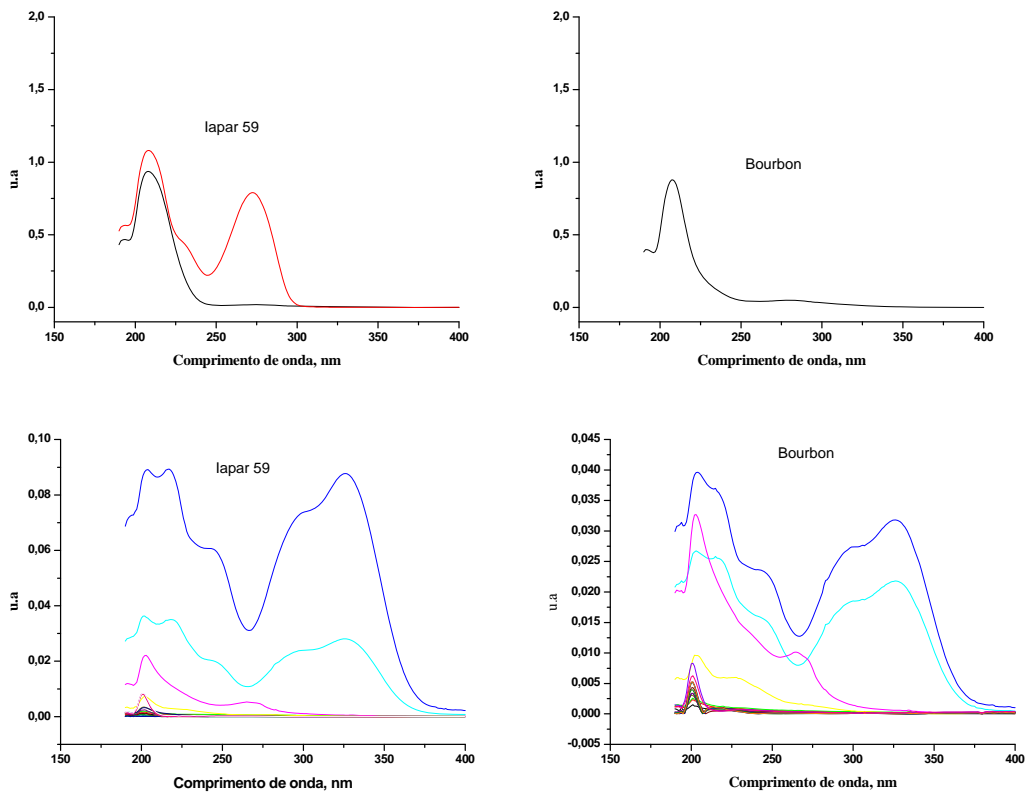
Figura 39 - Gráfico do espectro de CLAE para as cultivares Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 com a fase ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator acetato de etila:hexano no comprimento de onda de 210 nm.

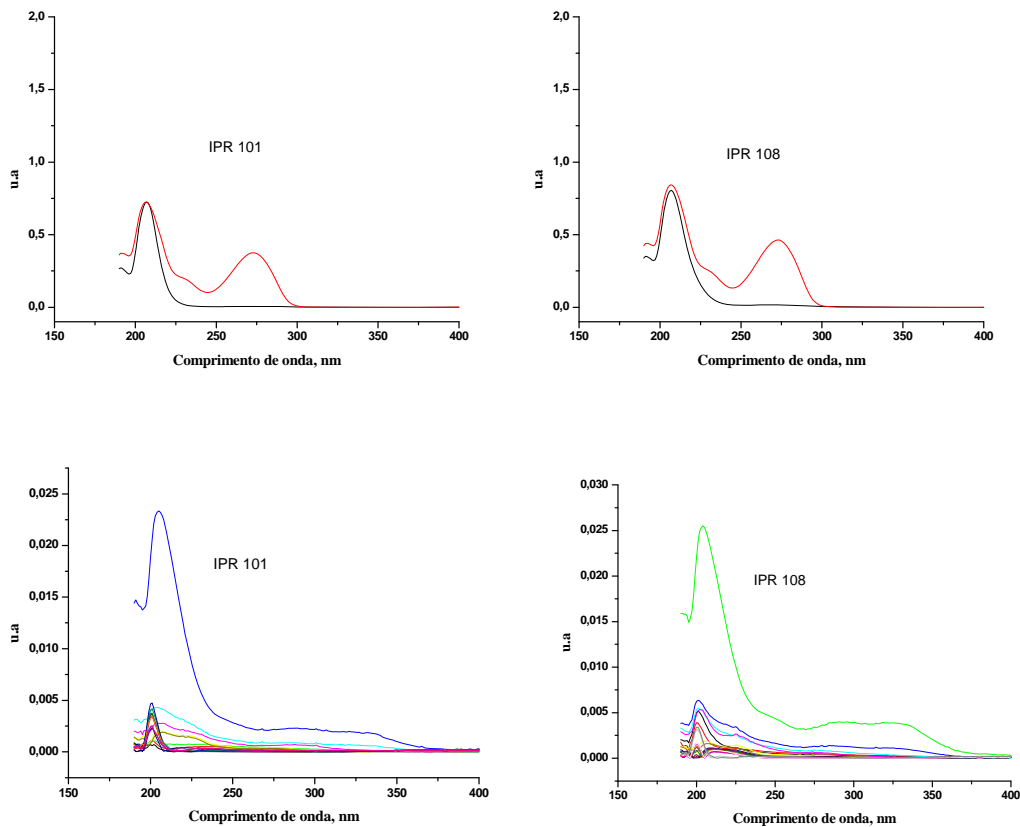




Com relação à Figura 40 para as quatro cultivares com a fase ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) e extrator diclorometano:hexano podemos observar que a intensidade do sinal cromatográfico diminui em relação ao extrator acetato de etila:hexano com a mesma fase, principalmente para os metabólitos de interesse que são a cafeína, ácidos clorogênicos e trigonelina.

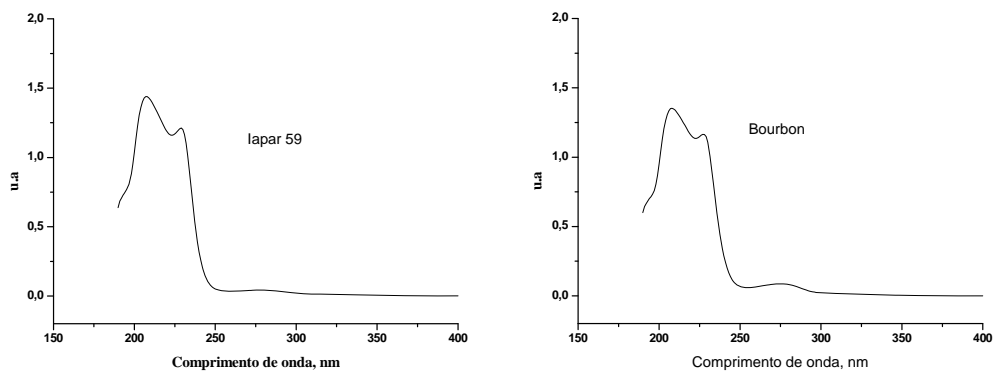
Figura 40 - Gráfico do espectro de CLAE para as cultivares Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 com a fase ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator diclorometano:hexano no comprimento de onda de 210 nm.

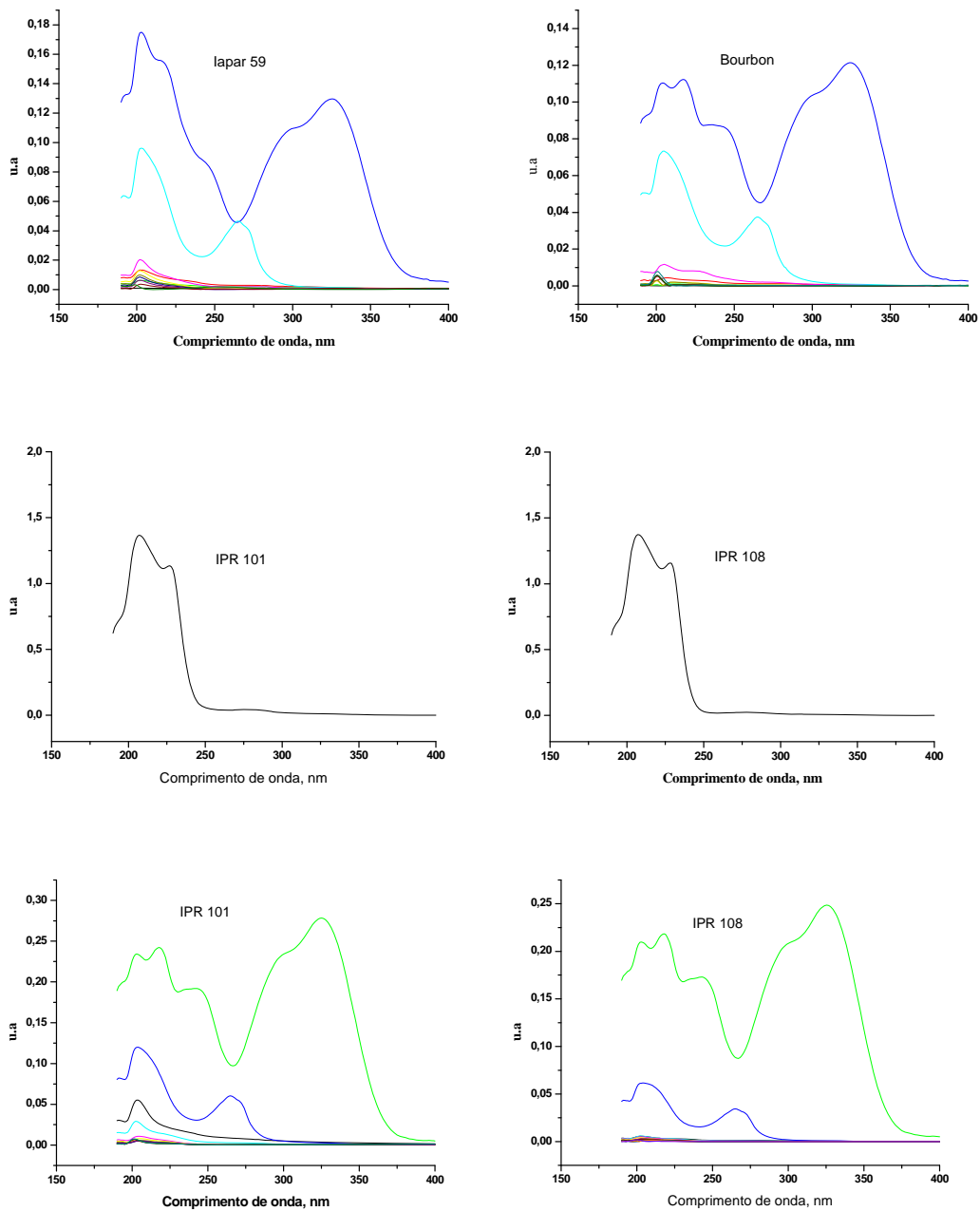




E com a fase ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) e o extrator etanol:acetato de etila:hexano mostrados na Figura 41 a-h, os espectros tiveram comportamento semelhante as amostras com extrator acetato de etila:hexano e acetato de etila:diclorometano.

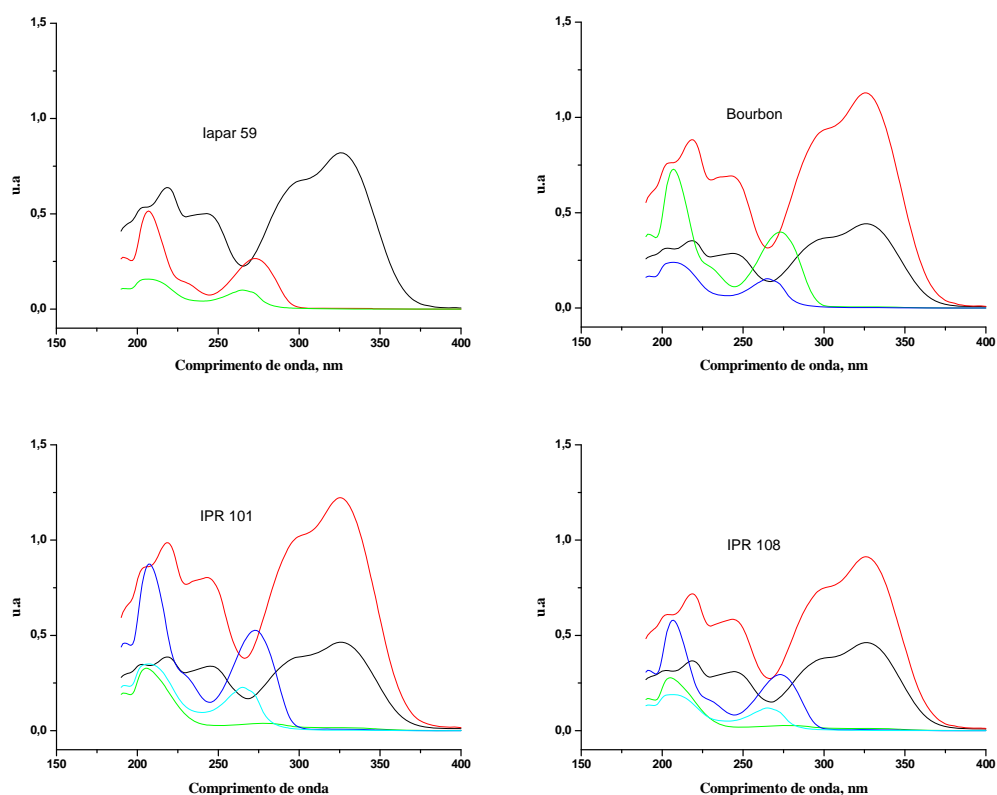
Figura 41 - Gráfico do espectro de CLAE para as cultivares Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 com a fase ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator etanol:acetato de etila:hexano no comprimento de onda de 210 nm.





A Figura 42 mostra os espectros CLAE/UV-DAD para cultivar Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 com a fase ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator etanol no comprimento de onda de 210 nm. Podemos observar que a variação de intensidade de sinal foi maior para a cultivar IPR 101 e Bourbon e a menor intensidade foi para a Iapar 59. Nesta fase e extrator também foi possível observar o aparecimento dos principais metabólitos presentes no café em quantidades significativas.

Figura 42 - Gráfico do espectro de CLAE para as cultivares Iapar 59, Bourbon, IPR 101 e IPR 108 com a fase ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) extrator etanol no comprimento de onda de 210 nm.



A análise cromatográfica mostrou que as melhores fases móveis para a análise no comprimento de onda em 210 nm foram a fase ACN:MeOH:H₂O 26:51:23 (v/v/v) e ACN:H₂O 64,5:35,5 (v/v), com as misturas ternárias 1:1:1 etanol:diclorometano:hexano e etanol:acetato de etila:diclorometano, misturas binárias de volumes iguais de etanol:acetato de etila, acetato de etila:hexano e diclorometano:hexano.

Usando a fase móvel ACN:H₂O:MeOH 26:51:23 (v:v:v) e comprimento de onda 210 nm na análise da cultivar Iapar 59 o melhor solvente extrator foi a mistura ternária 1:1:1(v/v/v) etanol:diclorometano:hexano com 22 picos; para a Bourbon o melhor solvente extrator foi a mistura binária de volumes iguais de etanol:acetato de etila com 20 picos, para o IPR 101 obtivemos seis diferentes extratores com mesmo número de picos que foram etanol puro, as misturas binárias de volumes iguais de acetato de etila:hexano, diclorometano:hexano e as misturas ternárias 1:1:1 (v/v/v) etanol:acetato de etila: diclorometano, etanol:diclorometano:hexano com 19 picos para cada extrato. Para a cultivar IPR 108 o melhor solvente extrator foi a mistura binária de volumes iguais de diclorometano:hexano com 22 picos.

Usando a fase móvel ACN:H₂O 64,5:35,5 (v:v) com força cromatográfica 2,0 e a análise no comprimento de onda 210 nm para a cultivar Iapar 59 os melhores solventes extratores foram as misturas binárias 1:1 (v/v) de etanol:hexano, diclorometano:hexano e a mistura ternária 1:1:1(v/v/v) etanol:acetato de etila:diclorometano com 19 picos. Para a Bourbon o melhor solvente extrator foi o solvente puro diclorometano com 23 picos , para o IPR 101 foram com os solventes extratores puros diclorometano e hexano mesmo número de picos 21. Para a cultivar IPR 108 o melhor solvente extrator foi a mistura binária 1:1 (v/v) de diclorometano:hexano e a mistura ternária 1:1:1(v/v/v) de etanol:acetato de etila:diclorometano com 21 picos.



CONCLUSÃO

4 CONCLUSÕES

Os modelos de misturas foram usados para investigar o efeito dos solventes nos rendimentos. Os dados experimentais foram bem reproduzidos pelas equações cúbicas especiais simplificadas, no nível de 95% de confiança. Quando comparados os rendimentos dos extratos brutos em (g/10g) da amostra os extratos preparados em etanol puro apresentaram rendimentos maiores que aqueles preparados em diclorometano, enquanto que em acetato de etila e hexano os rendimentos ficaram semelhantes e menores que os preparados em etanol e diclorometano puros.

Analisando os coeficientes das equações observou-se que as misturas binárias apresentaram valores significativamente maiores que os solventes puros e os maiores rendimentos foram obtidos para os extratos preparados com as misturas binárias etanol:acetato de etila, etanol:diclorometano e etanol:hexano. A mistura etanol:acetato de etila, foi o melhor extrator para a cultivar IPR 108, a mistura etanol:diclorometano para a cultivar Iapar 59 e a mistura etanol:hexano para as cultivares Iapar 59 e IPR 101 com rendimentos muito semelhantes.

Com relação aos espectros na região UV-Vis os extratos preparados em etanol puro ou em misturas, os espectros de absorção apresentaram o máximo de absorção em 280-328 nm indicando que este solvente é um bom extrator para ácidos clorogênicos. Os extratos preparados em diclorometano e suas misturas apresentaram espectros de absorção em 275 nm, sendo o melhor extrator para a cafeína. Os extratos preparados em hexano puro e em mistura com diclorometano apresentam espectros de absorção característico da cafeína. Os extratos preparados em hexano puro e em mistura com diclorometano apresentam espectros de absorção em 250-325 nm indicando serem bons extratores para a cafeína e trigonelina. Os espectros de misturas com acetato de etila apresentam o máximo de absorção em 280 nm característicos de ácidos de baixo peso molecular.

Os espectros de infravermelho indicaram que o extrato preparado em etanol:diclorometano é o melhor extrator para discriminar as quatro cultivares estudadas. O etanol não é bom extrator para discriminar as cultivares estudadas. Por meio dos espectros de FTIR foi possível discriminar a cultivar IPR 108 e os melhores extratores foram etanol:acetato de etila, diclorometano:hexano, etanol:acetato de etila:diclorometano e etanol:acetato de etila:hexano.

Com relação aos resultados das análises cromatográficas das quatro cultivares concluiu-se que a melhor fase móvel foi ACN:MeOH:H₂O (26:51:23v/v) e

comprimento de onda de 210 nm. Os melhores sistemas extratores para a qualidade da impressão digital nesta fase foram as misturas ternárias 1:1:1 v/v/v etanol:diclorometano:hexano e etanol:acetato de etila:diclorometano, misturas binárias de volumes iguais de etanol:acetato de etila, acetato de etila:hexano, diclorometano:hexano. O extrator etanol:diclorometano foi um bom extrator para os ácidos clorogênicos principalmente para a cultivar IPR 108. O extrator diclorometano puro ou mistura diclorometano:hexano são os melhores extratores para a cafeína e para a trigonelina as misturas de etanol:diclorometano, etanol:hexano e etanol puro.

Por meio da impressão digital cromatográfica conclui-se que a cultivar IPR108 contém maior abundância relativa de cafeína e ácidos clorogênicos, enquanto que a cultivar IPR101 apresentou mais baixa abundância relativa destes metabólitos quando comparadas as outras cultivares. As cultivares IAPAR 59 e Bourbon apresentaram abundâncias relativas semelhantes.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 1) NEVES, C. A estória do café. Rio de Janeiro, **Instituto Brasileiro do Café**, 52 p, 1974.
- 2) TAUNAY, A. E. História do Café no Brasil. Rio de Janeiro: **Departamento Nacional do Café**, 558 p, 1939.
- 3) BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic resources of *Coffea*. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee**. London: Elsevier Applied Science, v.4, p.1-42, 1988.
- 4) CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO **Acompanhamento da Safra Brasileira Café Safra 2013 segunda estimativa, maio/2013**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 15 agosto 2013.
- 5) MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, R. J. **Genética e melhoramento do cafeeiro**. Lavras: UFLA, 99 p. 1998.
- 6) CARVALHO, A.; MEDINA FILHO, H.P.; FAZUOLI, L.C.; GUERREIRO FILHO, O.; LIMA, M.M.A. Aspectos genéticos do cafeeiro (Genetic Aspects of the coffee tree). **Revista Brasileira de Genética** , v.14, p. 135-183, 1991
- 7) CONAGIN, C.H.T.M; MENDES, A.J.T.. Pesquisas citológicas e genéticas de três espécies de *Coffea*- autoincompatibilidade em *C. canephora*. **Bragantia**, v.20, p. 787-804, 1961.
- 8) FAZUOLI, L.C.; MALUF, M.P.; GUERREIRO FILHO, O.; MEDINA FILHO, H.P.; SILVAROLLA, M.B. **Melhoramento clássico do cafeeiro relacionado com a biotecnologia moderna**. In: Seminário Internacional sobre Biotecnologia na Agroindústria Cafeeira, Londrina, PR, p. 217-229, 1999.
- 9) RONZELLI JÚNIOR, P. Capítulo III: Introdução e adaptação de plantas. **Melhoramento genético de plantas**. Curitiba, P. Ronzelli Jr., p. 25-40, 1996.
- 10) MONTALVÁN, R.; FARIA, R.T. Capítulo 3: Variabilidade genética e germoplasma. In: DESTRO, D; MONTALVÁN, R. **Melhoramento genético de plantas**. Editora UEL, p. 27-38, 1999.
- 11) EIRA, M. T. S. et al. Bancos de germoplasma de café no Brasil. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Ed. Brasília DF, 18 p., 2007.
- 12) DART, S.K.; NURSTEN, H. E.. Volatile components; In: **Coffee Chemistry**. London: Clarke and Macrae Eds., v. 1, p. 233, 1985.
- 13) MONTEIRO, M.; TRUGO, L. C.; Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**, v.28, p.637-641, 2005.
- 14) CARVALHO, V. D.; CHALFOUN, S. M. **Aspectos qualitativos do café**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 79-92, 1985.

- 15) PIMENTA, C. J.; VILELA, E. R. Efeito do tipo e época de colheita na qualidade do café (*Coffea arabica*, L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 131-136, 2003.
- 16) ARAÚJO, F. A. **Café (*Coffea arabica*, L.) Submetido a Diferentes Condições de Torrefação: Caracterização Química e Avaliação da Atividade Antioxidante e Sensorial**. 2007. 130 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- 17) ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R.G.F.A.; DUARTE, S.M.S.; LIMA, A.R.; ALVARENGA, D.J.; FERREIRA, E.B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 34, n. 2, p. 414-420, 2010.
- 18) SERA, T. Coffee genetic breeding at Iapar. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.1, n.2, p. 179-200, 2001.
- 19) PETEK M. R.; SERA, T.; SERA, G.H.; FONSECA, I.C.B.; ITO, D.S. Seleção de progênies de *Coffea arabica* com resistência simultânea à mancha aureolada e à ferrugem alaranjada **Bragantia**, Campinas, vol. 65, n.1, p. 65-73, 2006.
- 20) KITZBERGER, C.S.G.; SCHOLZ, M.B.S.; SILVA, J.B.G.D.; BENASSI, M.T. Caracterização sensorial de cafés arábica de diferentes cultivares produzidos nas mesmas condições edafoclimáticas. **Brazilian Journal of Food Technology**, 14, p. 38-49, 2011.
- 21) LOPES, L.M.V.; PEREIRA, R.G.F.A.; MENDES, A.N.G. Teor de sólidos solúveis totais, acidez total titulável e pH de grãos crus e torrados de sete cultivares de café *Coffea arabica* L. e suas variações com o processo de torração. Poços de Caldas (Brasil), **Ministerio da Agricultura e do Abastecimento**, p 4, 2000.
- 22) PEREIRA, R. C .A; SOUZA, J. M. L. ; AZAVEDO, K. S.; SALES, F. Obtenção de café com qualidade no Acre. **Embrapa Acre, Circular Técnica**, 34, p 27, 2000.
- 23) SARRAZIN, C.; LEQUÉRE, J. L.; GRETSCH, C.; LIARDON, R. Representativeness of coffee aroma extracts: a comparison of different extraction methods, **Food Chemistry**, v.70, p.99-106, 2000.
- 24) ATTITALLA, I. H. Biological and molecular characteristics of microorganism stimulated defense response in *Lycopersicon esculentum* L. **Acta Universitatis Upsaliensis**. Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Science and Technology 943, 82p 2004.
- 25) MONDOLOT, L; LA FISCA, P.; BUATOIS, B.; TALANSIER, E.; DE KOCHKO, A.; CAMPA, C. - Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *coffea canephora* leaf development. **Annals of Botany**, 98: 33–40, 2006.
- 26) BICCHI, C. P.; BINELLO, A. E.; PELLEGRINO, G. M.; VANNI, A. C. - Characterization of green and roasted coffees through the chlorogenic acid fraction by HPLC-UV and principal component analysis. **J. Agric. Food Chem.**, 43, p.1549-1555, 1995.

- 27) 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**, 3 (11), p. 234-240, 2009.
- 28) ARNAUD, M. J.; CABALLERO, B.; SADLER, M. J.; STARIN, J. **Encyclopedia of Human Nutrition**; eds.; Academic Press: London, England, , vol. 1, p. 206, 1999.
- 29) TRUGO, L.; **High Performance Liquid Chromatography in coffee analysis**. PhD Thesis, University of Reading, England, 1984.
- 30) NEHLIG, A.; Exploring Biotechnology. **Chemtech** , 29, 30, 1999.
- 31) Budavary, S. (Ed.); **The Merck Index**. 11th Edition, Merck & Co., Rahway, New Jersey, 1525, 1989.
- 32) Macrae, R.; **In Coffee Chemistry (vol. 1)**; Clarke, R.J.; Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers; London, p. 115, 1985.
- 33) VIANI, R.; HORMAN, I. Thermal behaviour of trigonelline **Journal Food Sci.** 39, 1216, 1974.
- 34) BASSOLI, P.G. **Avaliação da qualidade de cafés verdes brasileiros: uma análise multivariada**. 1992. 110p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1992.
- 35) PEREIRA, R.G.F.A. **Efeito da inclusão de grãos defeituosos na composição química e qualidade do café (Coffea arabica L.) “Estritamente Mole”** 1997. 96p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.
- 36) PINTO, N.A.V.D.; FERNANDES, S.M.; PIRES, T.C.; PEREIRA, R.G.F.A.; CARVALHO, V.D. Avaliação dos polifenóis e açúcares em padrões de bebida do café torrado tipo expresso. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7, n.3, p.193-195, 2001.
- 37) SERA, T; SHIGUEOKA, L. H.; SERA, G. H.; AZEVEDO, J. A.; CARVALHO, F. G., ANDREAZI, E. **Nova seleção da cultivar de café Iapar 59 com grãos mais graúdos**. In Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil (7.:2011: Araxá, MG). Anais Brasília, D.F: Embrapa- Café, 2011 (1 CD-ROM), 6p.
- 38) NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; **Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 4^a Ed. Bookman: Porto Alegre, 2010.
- 39) SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; et al; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**; 4^o ed.; Porto Alegre, Florianópolis: Editora Universidade UFRGS, Ed. da UFSC, 2002.
- 40) SILVERSTEIN, M. R.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6^a Ed. Rio de Janeiro: LTC. Livros Técnicos e Científicos Editora, 460 p, 2000.
- 41) BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Editora UFV, 2008. 189 p.



APÊNDICES

APÊNDICE A

Chemometric discrimination of genetically modified *Coffea arabica* cultivars using spectroscopic and chromatographic fingerprints

Ivanira Moreira, Ieda Spacino Scarminio^{1*}

ABSTRACT

Multivariate statistical design and principal component analysis (PCA) applied to RP-HPLC-DAD and FTIR spectroscopic data were performed to investigate the fingerprints of four coffee cultivars, traditional red bourbon and three genetically modified cultivars. The design and response surface results showed that extraction dependence on solvent composition of one of the genetically modified cultivars, IAPAR 59, was very similar to that found for the red bourbon standard. PCA of the FTIR spectra obtained from all of the simplex centroid design mixtures indicated that the 1:1 binary ethanol-dichloromethane solution resulted in the best separation of the four cultivars. The IPR 108 cultivar has more intense vibrational bands in the 3200-3600 cm^{-1} and 1100-1600 cm^{-1} regions indicating higher acid and fat levels than those of the other cultivars. The UV absorptions close to 275 nm of the RP-HPLC-DAD spectra are correlated with the strengths of the infrared absorptions between 3400 and 3460 cm^{-1} and can be explained by varying caffeine concentrations in the four cultivars.

Keywords: Fingerprints. *Coffea Arabica*. Genetic improvement. HPLC. FTIR

1 Introduction

It is well known that coffee is one of the most popular beverages consumed worldwide. It is one of the firmest pillars of the economy in several Brazilian states and in the first week of August/2012 the daily revenue with coffee exports reached U.S. \$ 21.5 million. The two most important varieties of commercial coffee are *Coffea arabica* and *Coffea canephora* syn. *Coffea robusta*. Commercial coffee beverage is made from arabica or robusta beans or blends of them, but *C. arabica* is of superior quality. For this reason several papers report methods to discriminate the two species [1-6]. Although there are thousands of papers in the literature about defective and non-defective coffees [7,8] its antioxidant properties [9], the effects of drinking coffee on health [10-12] and the effect of roasting coffee beans [9],

¹ Laboratório de Quimiometria em Ciências Naturais, Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-990, Londrina, PR, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55 43 33714811; fax +55 43 33714286
e-mail: ieda@uel.br

among others, few reports on the genetic variability of the *Coffea* genus can be found. Furthermore no published work on the discrimination of different *C. Arabica* cultivars in terms of genetic variability was encountered. Genetic variability of coffee promotes gains in productivity and desirable agronomical characteristics while also affecting the chemical composition of the product and consequently its attributes and sensory qualities [13].

The Agronomic Institute of Paraná (IAPAR), located in Londrina, Brazil was established in 1974, and contains a gene bank of *Coffea arabica* with over a thousand hits of this kind. The database also contains a collection of 144 accessions of *C. arabica* collected in Ethiopia, region of the species' origin. This collection has been used as the basis for genetic improvements at IAPAR and resulted in many cultivars with rust resistant genes as well as some with resistance to nematodes [14]. The chemical composition of grain and, consequently, the quality and acceptability of coffee depends on genetic factors, cropping systems, altitudes, temperatures, water demands, types and levels of fertilization, harvesting times, preparation methods, storage and roasting processes [13].

High Performance liquid chromatographic (HPLC) and Fourier Transform Infrared Spectroscopic (FTIR) studies in combination with chemometric techniques have been successfully applied for food quality assessment as well as the detection of food adulteration [15]. Fourier transform infrared spectroscopy is a method that reveals information about the functional groups present in the sample and the relative changes in their amounts.

Recently, fingerprint techniques have become one of the most powerful approaches for the quality control of foods. It describes a variety of analytical methods that can provide the identification and approximate quantification of a group of metabolites associated to specific pathways. Metabolite variations are observed principally by total spectroscopic or chromatographic pattern changes without previous knowledge of the identities of the investigated compounds. Generally, samples with similar spectroscopic or chromatographic fingerprints have similar compositions.

In the last few years, our group has shown that statistical mixture designs permit the development of rigorous but economical procedures for demonstrating the effects of solvent changes on the extracted metabolites of plant material [16-21]. Considering the difficulties in chemically differentiating cultivars by conventional means, this research uses a statistical mixture design [22] for four components, (1) ethanol, (2) ethyl acetate, (3) dichloromethane and (4) hexane, to find adequate extraction mixture compositions and experimental conditions for discriminating the traditional cultivar (red Bourbon) from

cultivars developed by the Agronomic Institute of Paraná, IAPAR 59, IPR 101 and IPR 108. All these cultivars were produced under the same climatic conditions.

The main objective here was to apply multivariate statistical designs and models associated with liquid chromatographic and spectroscopic data to compare the fingerprints of the four coffee cultivars obtained from different extraction mixtures. As a consequence, method development can be undertaken using experimental conditions capable of differentiating genetically modified cultivars from the traditional cultivar (bourbon) that is of superior quality.

2 Materials and methods

2.1 *Coffee Samples*

The green grains of four different cultivars, the traditional red Bourbon cultivar (used as a standard) and cultivars developed by the Instituto Agronômico do Paraná were investigated. IAPAR 59 carries the *Coffea Arabica* genes, Villa Sarchi x Hibrido de Timor (Sarchimor), IPR 101 has Catuaí x Sarchimor (with S_{H2} , S_{H3} rust resistant genes) and IPR 108, the Iapar59 x (Catuaí x Icatu) genes. All samples were kindly provided by the Agronomic Institute of Paraná.

2.2 *Reagents*

HPLC grade acetonitrile and methanol were purchased from VETEC Química Fina (Rio de Janeiro, Brazil). Mobile phase mixture preparations were made using water prepared with the Millipore Milli-Q purification system. Hexane, dichloromethane, ethyl acetate and ethanol were also purchased from VETEC and were of analytical grade.

2.3 *Extract preparation*

The grains of green coffees were previously immersed in liquid nitrogen to make them brittle, facilitating their crushing, and then were sieved. The extraction mixtures were chosen according to a Simplex-Centroid Design for four components, amounting to 15 mixtures. Figure 1 shows the compositions of the experimental extraction mixtures. Each extract was prepared by weighing 10g and adding 150 mL of one of the solvent mixtures

listed in Table 1. These mixtures were placed in an ultrasonic bath (Unique, model Ultracleaner 1400) for 30 min with the bathwater being changed every 15 min to avoid heating. The extracts were filtered through filter paper to separate the solution from the coffee samples. This procedure was repeated two more times. Then an extraction solution of 15 mL was removed and stored in a capped vial under refrigeration for subsequent HPLC analysis. The remainder was evaporated in a rotary evaporator, removing all of the solvent still present in the sample, until attaining constant weight. Then the yield of the crude extract was determined and used for chromatographic and spectral analysis.

2.4 *Analysis by infrared spectroscopy*

For Fourier transform infrared analysis (FTIR) 1.5 mg of the crude extract were weighed with 0.3 g of dry solid KBr that was then homogenized in an agate mortar with a few drops of chloroform. The spectra were recorded in the 4000-400 cm^{-1} region, with 4 cm^{-1} resolution and 90 scans, using a Shimadzu FTIR-8300 spectrophotometer. The data analysis was performed using the entire infrared spectra.

2.5 *Sample preparation for HPLC analysis*

A 20 μL aliquot was pipetted from each 15 mL extraction solution and added to 800 μL of mobile phase. The samples were filtered through 0.22 micron Millex Millipore paper and analyzed immediately. The chromatographic conditions were: Phenomenex C18 column, 2.6 mM Kinetex HILIC 100A, with dimensions of 150 mm x 4.6 mm, 20 μL injection volume and 1.0 mL min^{-1} mobile phase flow rate. HPLC analysis was conducted on a Finnigan Surveyour 61607 liquid chromatograph equipped with a Finnigan Surveyour PDA Plus diode array detector. Elution was monitored at the 210, 240 and 254 nm wavelengths. The data were processed using ChromQuest 4.2 software.

2.6 *Software*

Statistical models and principal components (PC) were calculated using the Statistica 6.0 software (Statistica for Windows 6.0, Statsoft, Tulsa, OK, USA, 1999).

3 Results

The compositions of the mixtures as well as the average yields of the Bourbon, Iapar 59, IPR 101 and IPR 108 cultivars are given in Table 1. Since the average response values for the binary mixtures are larger than the values for the pure components, quadratic and special cubic models were used to fit the crude extract and cultivar data. Analysis of variance (ANOVA) was used to test for model lack of fit and regression significance. The quadratic models presented lack of fit at the 95% confidence level, so consequently, special cubic models were used. Table 2 summarizes the ANOVA results, sums of squares, mean squares, F values, and the significance probabilities for all the fitted models at the 95% confidence level. Since the lack of fit mean square/pure error mean square ratios are less than the F distribution critical values at the 95% confidence level, these results validate all the models. The experimental data are well reproduced by the simplified special cubic equations, where only coefficients significant at the 95% confidence level are used. The prediction equations for the yields are:

$$\begin{aligned} \hat{y}_{Bourbon} = & 1.39e + 0.82a + 1.06d + 0.88h + 1.99ea + 3.11ed \\ & (\pm 0.047) \quad (\pm 0.038) \quad (\pm 0.038) \quad (\pm 0.038) \quad (\pm 0.038) \quad (\pm 0.038) \\ & + 2.21eh - 9.86ead - 6.11eah - 10.27edh \\ & (\pm 0.038) \quad (\pm 1.40) \quad (\pm 1.40) \quad (\pm 1.40) \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \hat{y}_{IAPAR59} = & 1.50e + 0.89a + 1.03d + 0.88h + 1.16ea + 3.60ed \\ & (\pm 0.06) \quad (\pm 0.05) \quad (\pm 0.05) \quad (\pm 0.05) \quad (\pm 0.29) \quad (\pm 0.29) \\ & + 2.53eh - 5.42ead - 6.16eah - 14.21edh \\ & (\pm 0.29) \quad (\pm 1.40) \quad (\pm 1.40) \quad (\pm 1.40) \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \hat{y}_{IPR101} = & 1.56e + 0.92a + 1.67d + 1.00h + 2.05ea + 1.44ed \\ & (\pm 0.056) \quad (\pm 0.046) \quad (\pm 0.046) \quad (\pm 0.046) \quad (\pm 0.046) \quad (\pm 0.25) \\ & + 2.53eh - 10.18eah - 8.26edh \\ & (\pm 0.27) \quad (\pm 1.71) \quad (\pm 1.71) \end{aligned} \quad (3)$$

$$\hat{y}_{IPR108} = 1.37e + 0.75a + 1.16d + 0.92h + 3.00ea + 1.23eh - 8.11eah \quad (4)$$

$(\pm 0.047) \quad (\pm 0.038) \quad (\pm 0.038) \quad (\pm 0.038) \quad (\pm 0.038) \quad (\pm 0.038) \quad (\pm 1.40)$

where e, a, d and h represent the ethanol, ethyl acetate, dichloromethane and hexane proportions, respectively. Standard error estimates are given in parentheses below the corresponding model coefficients.

Note that for all four models, Equations 1-4, the ethanol and dichloromethane linear blending coefficients are significantly larger than the ones for ethyl acetate and hexane. Of the pure solvents, ethanol is the most effective extractor, as can be seen in Table 1. Of the six binary coefficients, Equation 1 (bourbon) and Equation 2 (IAPAR 59) have higher coefficients for the ethanol:dichloromethane cross terms followed by those for ethanol:hexane and ethanol:ethyl acetate. In general, positive interaction coefficients indicate synergism contributing to higher yields whereas negative coefficients indicate antagonism, as in the case of the ternary ethanol:ethyl acetate:dichloromethane interaction that results in lower yields. Equation 3 (IPR 101) has its highest binary interaction coefficient for the ethanol:hexane pair followed by the ethanol:ethyl acetate and ethanol:dichloromethane terms with antagonistic ternary ethanol:ethyl acetate:hexane and ethanol:dichloromethane:hexane effects. Interestingly, a somewhat different pattern was found for IPR 108, where the highest binary interaction coefficient occurs for the ethanol:ethyl acetate pair and only one antagonistic ternary interaction involving ethanol:ethyl acetate:hexane was found, Equation 4.

The contour plots for yields predicted by Equations (1-4) are given in Fig. 2. As can be seen there, the contour plots for the Bourbon and IAPAR 59 cultivars are very similar. Higher yields can be achieved with 1:1 binary mixtures of ethanol: dichloromethane. The models predict that 2.00 g and 2.17 g will be extracted by this mixture for Bourbon and IAPAR 59, respectively. These results are consistent with the experimental yield averages of 2.01g and 2.17g. The contour plots for the IPR 101 and IPR 108 samples in Fig. 2 fit the experimental data very well and are quite different from those for Bourbon and IAPAR 59, mostly due to the large ethanol-dichloromethane synergic interactions in Eqs. 1 and 2. This coefficient is small for the IPR 101 model and not significant at the 95% confidence level for the IPR 108 model. For IPR 101, the model predicts significantly lower yields, 1.72 g with a binary 1:1 ethanol: dichloromethane mixture and 1.75 g with an 1:1 ethanol: ethyl acetate binary mixture compared to the experimental values of 1.71 and 1.74 g, respectively. This is also true for the IPR 108 model, for which a predicted yield of 1.79 g is obtained for the 1:1 ethanol:ethyl acetate binary mixture extract corresponding to an experimental yield of 1.87 g. The 50%-50% ethanol – dichloromethane mixture results in an even lower experimental yield, just 1.51 g.

The FT-IR spectra of the extracts obtained with different solvent proportions for the four cultivars were compared by principal component analysis (PCA) to investigate their similarities and/or dissimilarities. The chemometric data matrix, \mathbf{X} , consisted

of 60 rows and 1866 columns. Each row corresponds to a spectrum of an extract obtained using a simplex centroid mixture and each column contains the absorbance values at the different wavelengths. The results obtained from the PCA show that the first component explains 89.9% of the variance, but does not contain useful information for discriminating samples of the different coffee cultivars. Although the second and third components only account for 7.9% and 1.1 % of the total variance, respectively, they do contain useful information. In the score plot in Fig. 3, the samples are clearly separated along factor 2 into two clusters, one on the right (positive side) and the other on the left (negative side). Figure 3 shows that extracts prepared in ethanol do not discriminate the four cultivars. Of the eight experimental conditions containing hexane, for the IPR108 samples, five are located on the negative side of factor 2 (**ah**, **dh**, **adh**, **edh**, and **eah**), as are **e**, **ea**, and **ead**. This separation suggests different extraction efficiencies for the metabolites. Examination of the factor 2 loadings suggests that this separation is due to spectral domains situated around $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ and 3432 cm^{-1} (See Fig. 4). Heterocyclic compounds containing N-H groups have N-H stretching bands in the $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ region. On the other hand, caffeine molecules absorb infrared radiation at 1656 cm^{-1} . Thus, the factor 2 scores and loadings suggest that mixtures positioned on the left hand side of Fig. 3 extract higher relative amounts of nitrogen-containing compounds, such as alkaloids, than those on the right. Positive factor 3 loadings suggest that this separation was due to domains situated in the $\sim 600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ and $3000\text{-}3800\text{ cm}^{-1}$ ranges. These are large regions that can characterize different stretching vibrations. For example, the absorption of the OH stretching for hydroxyl groups is in the $3650\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ range whereas the N-H stretching vibrations show absorptions between $3500\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$. Absorptions between $1500\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ provide information on C-H bending vibrations and the symmetrical stretching vibration of benzene. The $910\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ interval is an important region for determining the positions of substituted groups on benzene [23].

Figure 3 also shows that extracts prepared in binary mixtures of ethanol: dichloromethane are furthest apart when compared with separations occurring for other solvent mixtures of the simplex centroid design. Since one of the intentions of this work is to establish a fingerprint in order to discriminate among the cultivars, six samples of each cultivar were prepared with this mixture. Figure 5 shows the scores of the second and fourth principal components for which the best PCA separation of sample points was observed. As shown there, the IPR108 samples are clearly discriminated on the left of factor 2 with the IPR101 sample points located in the middle. The separation of the IPR101 samples from the

Bourbon and IAPAR 59 points is diagonal, meaning that both components are important for discrimination. Also on the right of factor 2 bourbon and IAPAR 59 exhibit similar patterns.

The IPR 108 spectrum is significantly different from the others, specially the stronger absorption peaks in 3000-3600 cm^{-1} and 700-1700 cm^{-1} regions. The stronger absorption peak at 1742 cm^{-1} can be attributed to carbonyl bond stretching from lipids and fatty acids [24], whereas bands in the 1500-1250 cm^{-1} range might be attributed to acids owing to vibrational coupling between a base and a sugar. The band at $\sim 2928 \text{ cm}^{-1}$ can be attributed to the asymmetric stretch of methylene groups and the one at $\sim 1465 \text{ cm}^{-1}$ to the methylene scissoring vibration. Comparing the spectra of Fig. 6, one can conclude that IPR 108 has larger amounts of acids and fats than the others.

RP-HPLC-DAD mobile phase and detection wavelength conditions were investigated to obtain more information about the metabolic classes for each cultivar. The effects of nine mobile phase compositions on chromatographic separation were first investigated. Three wavelengths, 210, 240 and 254 nm, were also investigated to compare the number of eluted peaks. The largest number of peaks was observed with the 51:23:26 (v/v/v) water: MeOH: ACN mobile phase at 210 nm and these conditions were selected for obtaining the RP-HPLC-DAD data.

Fig. 7 shows the DAD spectra of the chromatographic peaks obtained from the four different cultivars of *C. Arabica*. Differences can be observed among these spectra mainly for IPR 108 and IPR 101. IPR 108 contains stronger absorptions which indicates higher concentrations of chlorogenic acids and caffeine. Moreover the IPR 101 cultivar has lower concentrations of these metabolites. Bourbon and IAPAR 59 exhibit similar patterns that are intermediate between those of IPR 108 and IPR 101. This behavior is similar to the one found for the infrared spectra. The UV absorptions close to 275 nm are correlated with the strengths of the infrared absorptions between 3400 and 3460 cm^{-1} and can be explained by varying caffeine concentrations in the four cultivars. The strong infrared absorptions at 1163, 1464 and 1742 cm^{-1} may be related to the very strong DAD band between 275 and 325 nm. These results are consistent with sensory characteristics of different arabica coffee cultivars described in reference [13]. There the IAPAR 59 cultivar was described as being similar to Bourbon while the IPR 101 cultivar with Catuai genes, was distinguished by its less intense acidic taste.

4 Conclusions

Principal component analysis of the FTIR spectra of fifteen different simplex centroid design mixtures involving ethanol, ethyl acetate, hexane and dichloromethane indicated that the 1:1 binary mixture is most adequate for discriminating and fingerprinting the red Bourbon and three genetically modified coffee cultivars. UV absorptions close to 275 nm of RP-HPLC-DAD spectra are correlated with the intensities of infrared absorptions between 3400 and 3460 cm^{-1} and can be explained by varying caffeine concentrations in the four cultivars. Quantitative analytical determinations of caffeine and other important metabolites for these cultivars are currently underway in our laboratory.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian granting agencies, CNPq and Fundação Araucária. The authors would like to acknowledge IAPAR and Maria Brigida dos Santos Scholz for their generous donation of the samples. Finally we thank Prof. Roy Bruns for a complete revision of the English grammar.

References

- [1] S. Casal, M.B. Oliveira, M.R. Alves, M.A. Ferreira, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 3420–3424.
- [2] A.G. González, F. Pablos, M.J. Martín, M. León-Camacho, M.S. Valdenebro, *Food Chem.* 73 (2001) 93-101.
- [3] C. P. Bicchi, A.E. Binello, G.M. Pellegrino, A.C. Vanni, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1995) 1549-1555.
- [4] R.C. Alves, S. Casal, M.R. Alves, M.B. Oliveira, *Food Chem.* 114 (2009) 295-299.
- [5] S.Casal, M.R. Alves, E. Mendes, M. Beatriz, P.P. Oliveira, M.A. Ferreira, *J. Agric. Food Chem.* 51(2003) 6495–6501.
- [6] M.J. Martín, F. Pablos, A.G. Gonzalez, *Food Chem.* 66 (1999) 365–370.
- [7] A.P. Craig, A.S. Franca, L. S. Oliveira, *Food Chem.* 132 (2012) 1368-1374
- [8] A.P. Craig, A.S. Franca, L. S. Oliveira, *Food Sci. technol.* 47 (2012) 505-511.
- [9] M.C. Nicole, M. Anese, L. Manzocco, C.R. Lerici, *Food Sci. technol.* 30 (1997) 292-297.

- [10] A.V.Mattioli, A. Farinetti, C. Mirolo, P. Pedrazzi, G. Mattioli, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 21 (2011) 412-417.
- [11] S. Gallus, A. Tavani, E. Negri, C. La Vecchia, *Ann. Epidemiol.* 12 (2002) 202-205.
- [12] N. J. Frost-Meyer, J.V. Logomarsino, *J. Funct. Foods* 4 (2012) 819-830.
- [13] C. S. G. Kitzberger, M.B. dos S.Scholz, J.B.G.D da Silva, M. de Benassi, *Braz. J. Food Technol.* 6 (2010) 39-48.
- [14] D.S. Ito, T. Sera, G.H. Sera, L.D. Grossi, F.S. Kanayama, *Crop Breeding and Appl. Biotechnol.* 8 (2008) 99-103.
- [15] L.E Rodriguez-Saona, M.E. Allendorf, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2 (2011) 467-483.
- [16] E.B.R. de Souza, R.R. da Silva, S. Afonso, I.S. Scarminio, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 4176-4185.
- [17] L.M.Z. Garcia, E.P. Daiane, C.A.P. da Câmara, I.S. Scarminio, S.L. Nixdorf, *J. Chromatogr. Sci.* 47 (2009) 825-832.
- [18] P.K. Soares, R.E. Bruns, I.S. Scarminio, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 644-652.
- [19] P.K. Soares, I.S. Scarminio, *Phytochem. Anal.* 19 (2008) 78-85.
- [20] F. Delaroza, I.S. Scarminio, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1034-1041.
- [21] L.M.Z. Garcia; R.E.Bruns, I.S. Scarminio, *Chemom. Intell. Lab. Sys.* 103, (2010) 1-7.
- [22] B.B Barros, R.E.Bruns, I.S. Scarminio. *Statistical design – Chemometrics*, Elsevier: Amsterdam, 2006, pp. 313-340.
- [23] W.J.H. Liu (Ed.), *Traditional Herbal Medicine Research Methods: Identification, Analysis, Bioassay and Pharmaceutical and Clinical Study*, John Wiley & Sons, 2011, pp. 150-174.
- [24] M. Kansiz, P. Heraudn, B. Woodn, F. Burdenn, J. Beardalln, D. McNaughton, *Phytochem.* 52 (1999) 407-417.

Figure Captions

Fig. 1. The simplex centroid mixture design for the ethanol, ethyl acetate, dichloromethane and hexane solvents. Open circles represent pure solvents and binary mixtures, the darkened circles ternary mixtures, and the star a quaternary mixture. Numbers correspond to those in the extract column of Table 1.

Fig. 2. Mixture response surfaces for each coffee cultivar obtained for the ethanol, dichloromethane and ethyl acetate proportions. The hexane proportion was zero for all these surfaces.

Fig. 3. Principal component score graph of the FTIR spectra of the extracts obtained from the simplex centroid design mixtures. e, d, a and h represent the ethanol, dichloromethane, ethyl acetate and hexane solvents.

Fig. 4. Loading plots of the second and third principal components of the FTIR spectra of the extracts obtained using the simplex centroid design mixtures.

Fig. 5. Score graph of the second and fourth principal components of the FTIR spectra of extracts obtained from samples of the four coffee cultivars with a 1:1 binary mixture of ethanol and dichloromethane.

Fig. 6. FTIR spectra of sample extracts of the four coffee cultivars with a 1:1 binary mixture of ethanol and dichloromethane.

Fig. 7. RP-HPLC-DAD spectra of the various chromatographic peaks for each of the four coffee cultivars. The spectra corresponding to the different peaks are characteristic of different metabolites, such as caffeine, trigonelline and chlorogenic acids.

Table 1

Extract yields (in grams) of the four coffee cultivars for the simplex centroid design mixtures.

Extract	Ethanol	Ethyl acetate	Dichloro methane	hexane	Bourbon	Iapar 59	IPR 101	IPR 108
1	1	0	0	0	1.390	1.505	1.565	1.265
2	0	1	0	0	0.820	0.870	0.920	0.835
3	0	0	1	0	1.050	1.065	1.170	1.070
4	0	0	0	1	0.820	0.850	0.945	0.830
5	0.5	0.5	0	0	1.610	1.490	1.740	1.865
6	0.5	0	0.5	0	2.010	2.170	1.710	1.510
7	0.5	0	0	0.5	1.695	1.830	1.805	1.475
8	0	0.5	0.5	0	0.870	0.915	0.960	0.830
9	0	0.5	0	0.5	0.890	0.975	1.010	0.840
10	0	0	0.5	0.5	1.030	0.940	1.125	1.240
11	0.333	0.333	0.333	0	1.275	1.465	1.650	1.310
12	0.333	0.333	0	0.333	1.255	1.270	1.280	1.185
13	0.333	0	0.333	0.333	1.305	1.290	1.365	1.240
14	0	0.333	0.333	0.333	0.970	0.940	1.090	0.930
15	0.25	0.25	0.25	0.25	1.130	1.145	1.155	1.190

Table 2

Analysis of Variance (ANOVA) results for the reduced mixture models obtained for the four coffee cultivars.

Variation source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	Calculated ^a F-value	Probability ^b
Bourbon					
Model	3.416	9	0.379	86.99	0.000
Total Error	0.087	20	0.004		
Lack of Fit	0.038	5	0.008	2.364	0.090
Pure Error	0.049	15	0.003		
Total	3.503	29	0.121		
IAPAR 59					
Model	4.140	9	0.460	61.84	0.000
Total Error	0.149	20	0.007		
Lack of Fit	0.026	5	0.005	0.644	0.670
Pure Error	0.122	15	0.008		
Total	4.289	29	0.148		
IPR 101					
Model	2.739	8	0.342	53.12	0.000
Total Error	0.135	21	0.006		
Lack of Fit	0.055	6	0.009	1.703	0.188
Pure Error	0.080	15	0.005		
Total	2.874	29	0.099		
IPR 108					
Model	2.161	6	0.360	13.51	0.000
Total Error	0.613	23	0.027		
Lack of Fit	0.339	8	0.042	2.320	0.076
Pure Error	0.274	15	0.018		
Total	2.774	29	0.096		

^a) Lack of fit mean square/pure error mean square ratio. Corresponding critical F values at the 95% confidence level for special cubic model fits are $F_{9,20,0.05} = 2.39$; $F_{8,21,0.05} = 2.395$; $F_{6,23,0.05} = 2.395$; $F_{5,15,0.05} = 2.90$ and $F_{6,23,0.05} = 2.545$;

^b) Significance probability level.

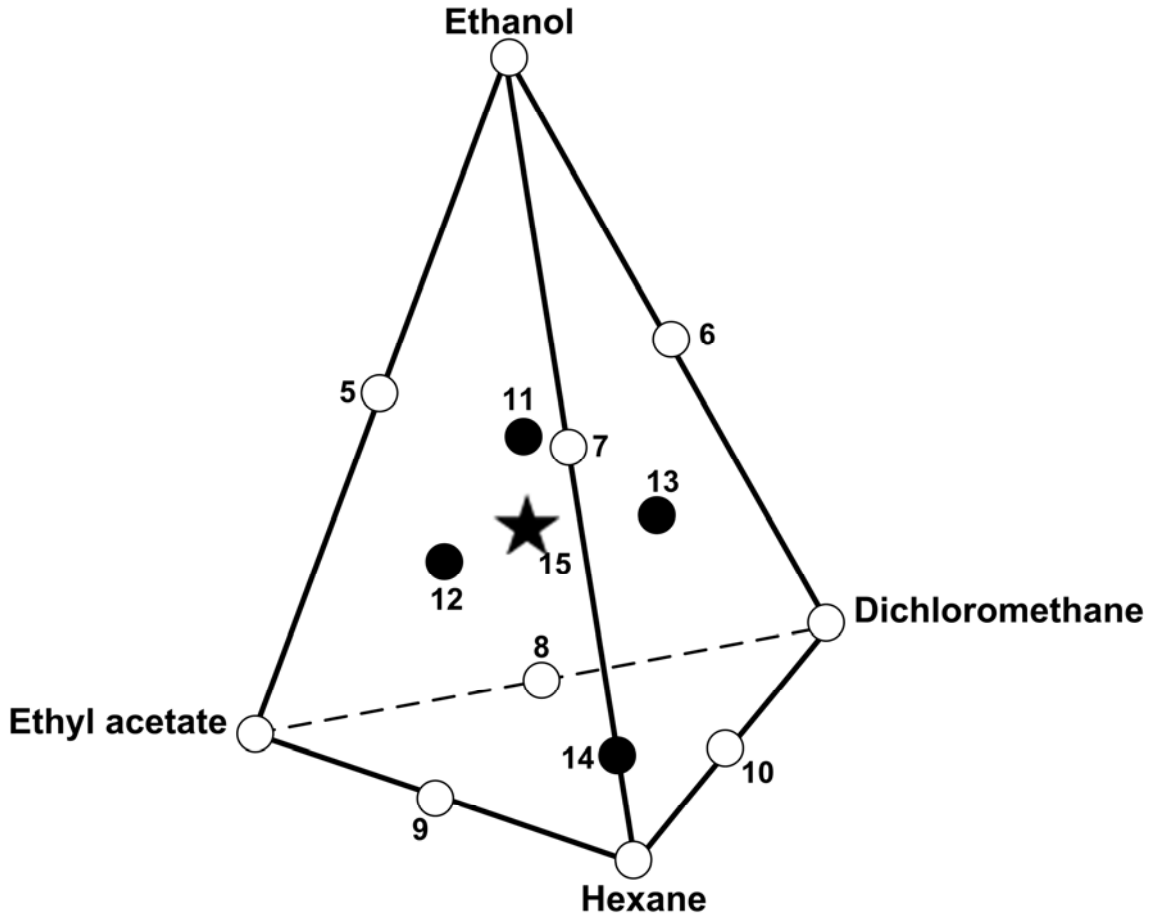


Fig. 1

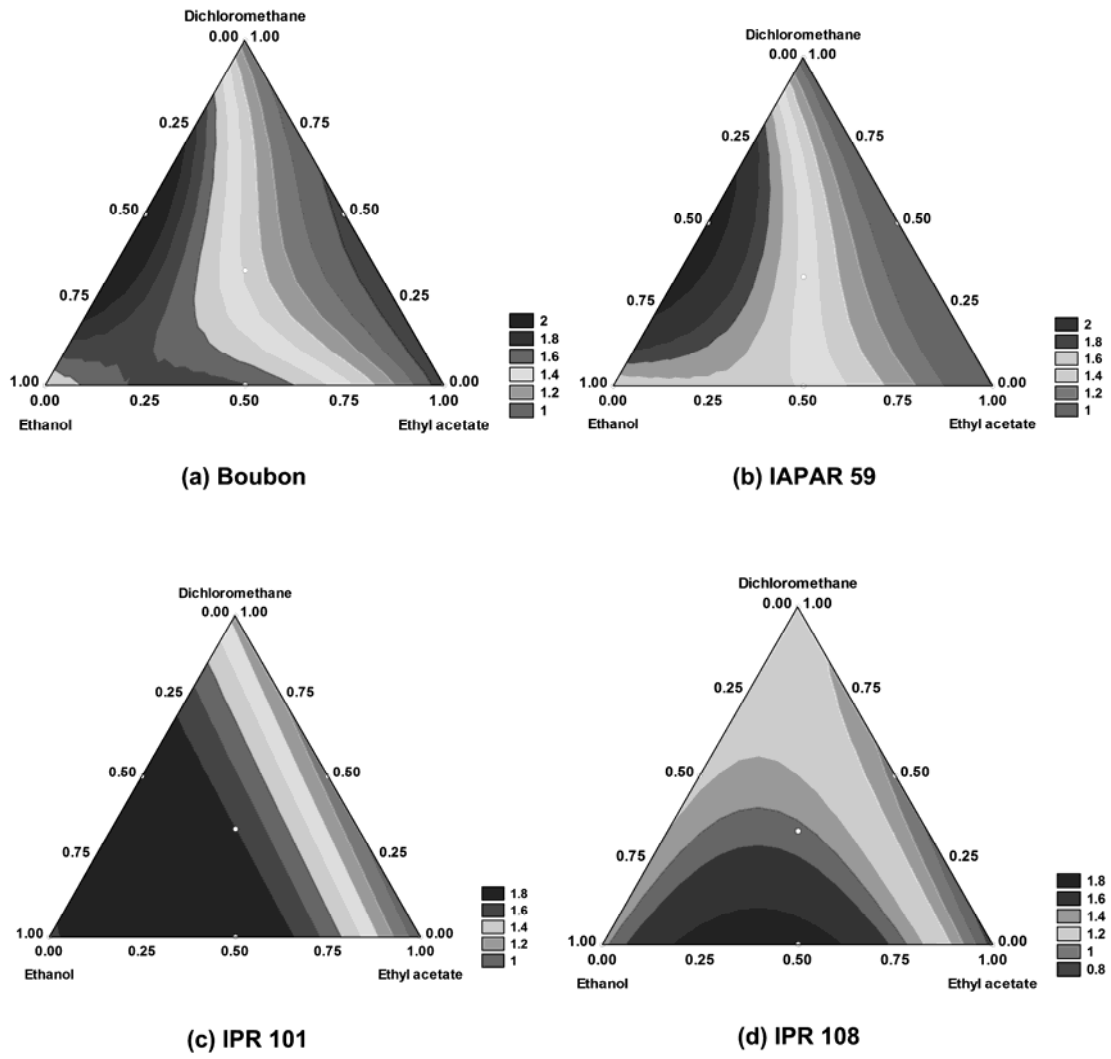


Fig. 2

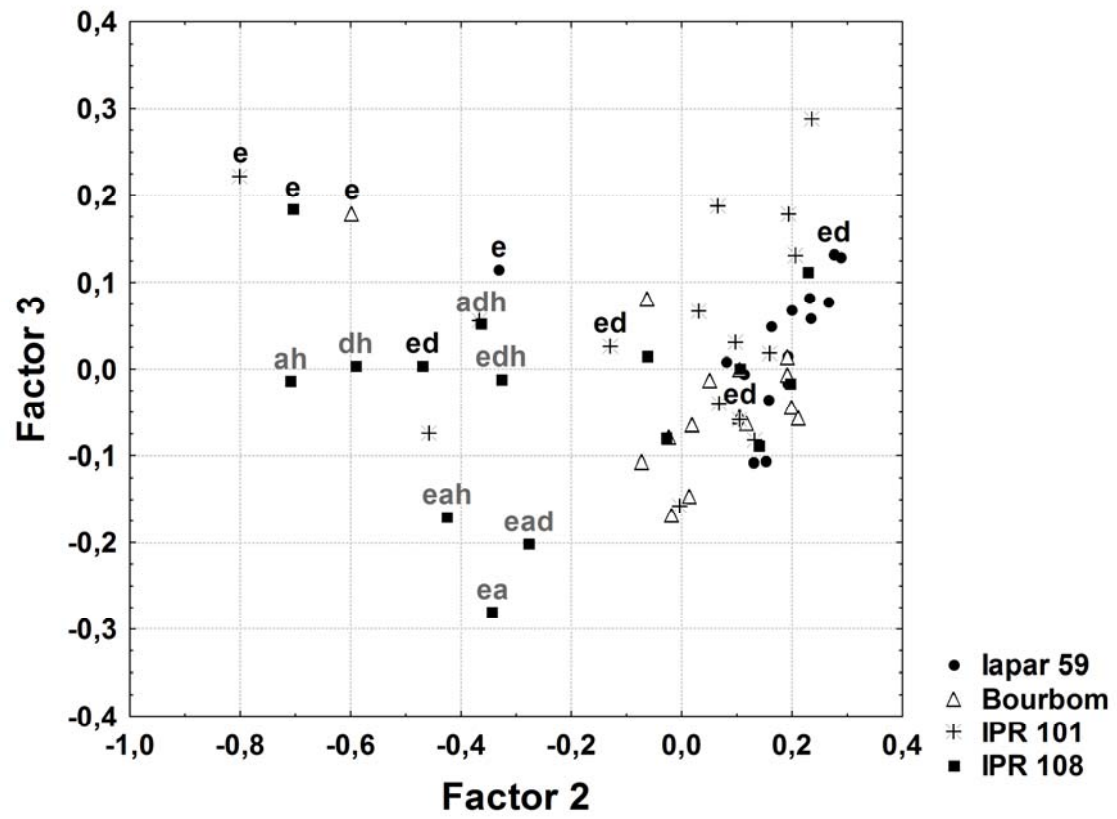


Fig. 3

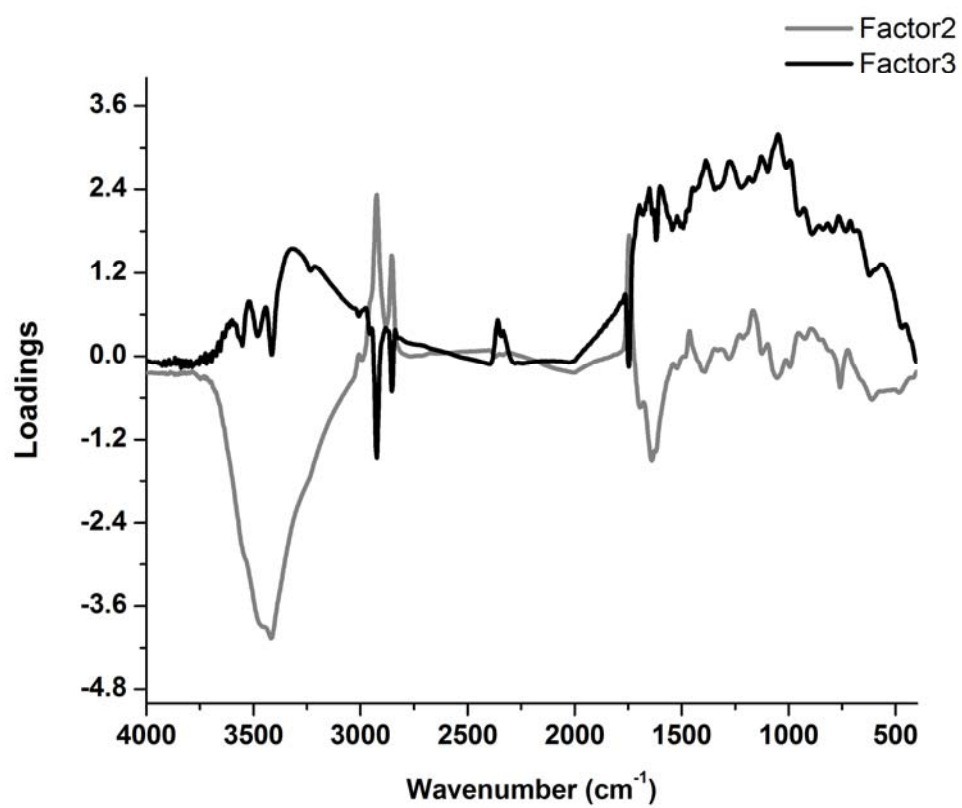


Fig. 4

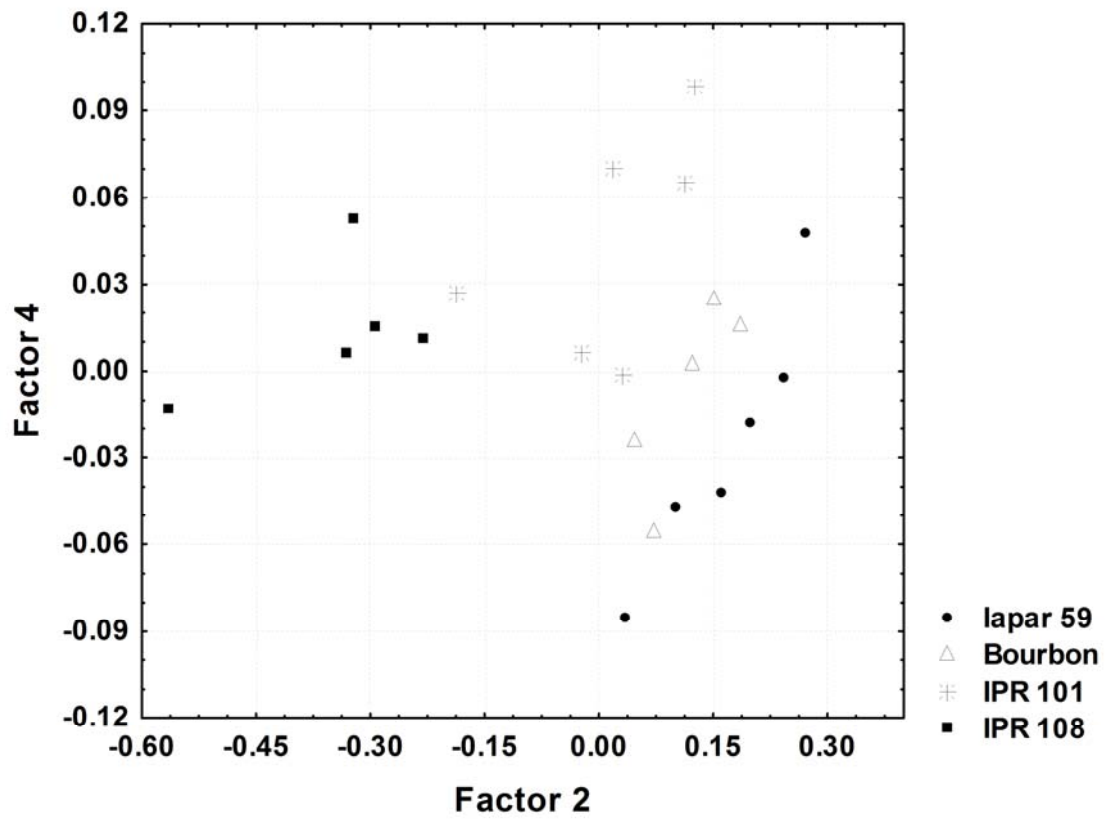


Fig. 5

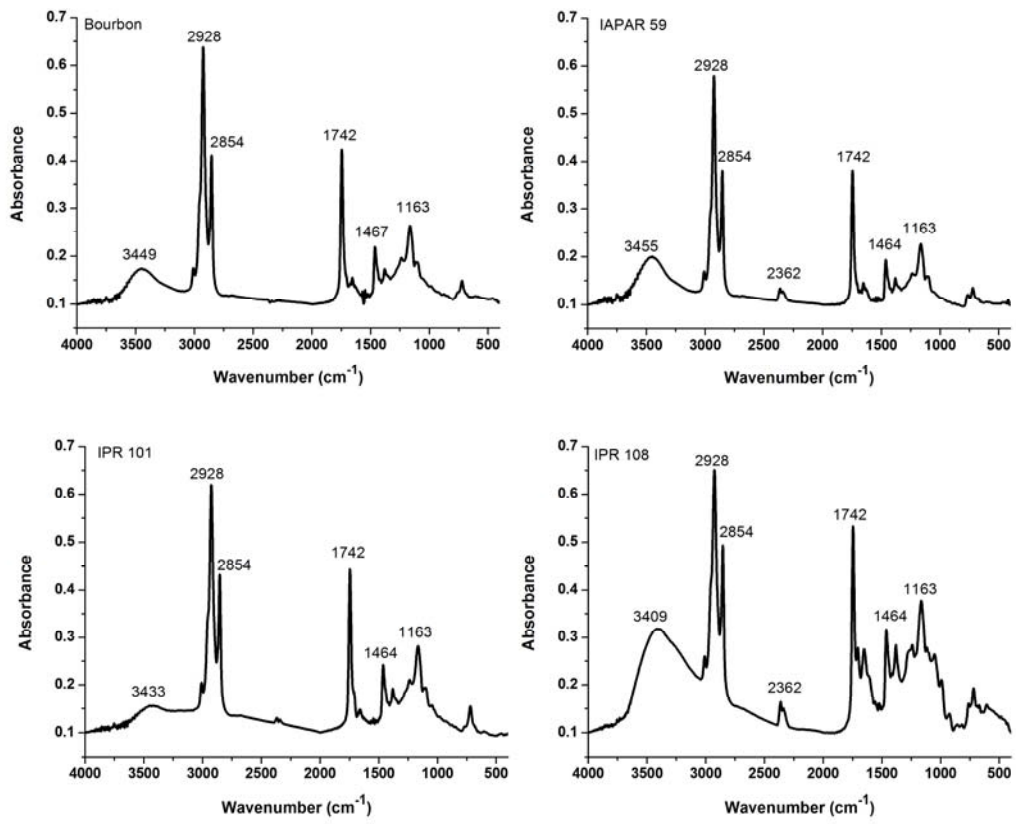
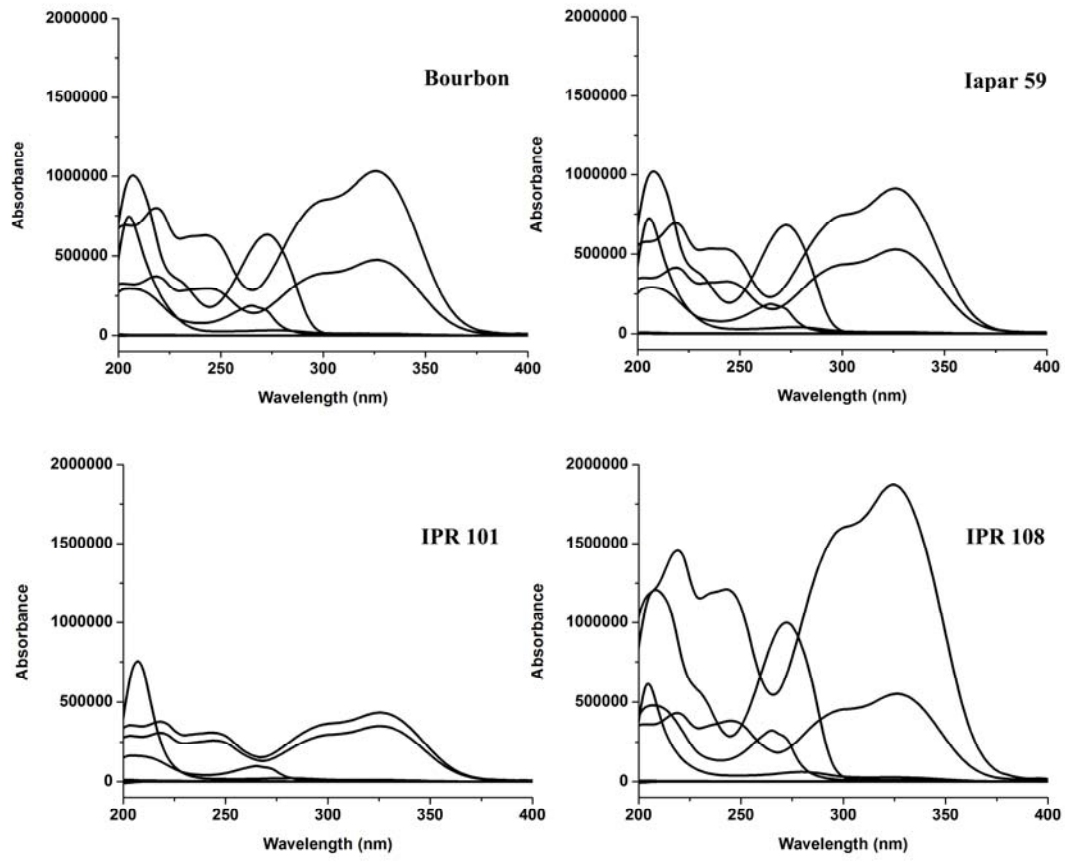


Fig. 6



APÊNDICE B

Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em *Coffea arabica*

Ivanira Moreira, Guilherme Luiz Scheel, Pedro Henrique Hatumura, Ieda Spacino Scarminio*
Laboratório de Quimiometria em Ciências Naturais, Departamento de Química, Universidade
Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-990, Londrina, PR, Brazil *

Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em *Coffea arabica*

Abstract

In this research work the effects of four solvents and their mixtures on the extraction of chlorogenic acids, caffeine and trigonelline in crude extracts of four coffee cultivars, traditional red bourbon, IAPAR59, IPR101 and IPR108 cultivars, were investigated by UV spectrophotometry and UV spectra obtained from RP-HPLC-DAD. The experimental results and the principal component analysis of UV spectra showed that the effect of solvent extraction of the metabolites does not depend on cultivars, because the spectral characteristics are similar, but the concentrations are different. The UV and UV-DAD spectra for four simplex centroid design mixtures were also similar but the concentrations of caffeine, trigonelline and the chlorogenic acids are different and depend on the solvent used in the extraction.

Keywords: Impressão digital. Planejamento de misturas. *Coffea arabica*

INTRODUÇÃO

Os grãos do café contêm proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, carboidratos, clorofila, carotenóides, enzimas e hormônios. Quando torrados, estes constituintes são destruídos ou podem ser transformados em uma grande variedade de novos compostos.¹ Os grãos do café verde também contêm compostos biologicamente ativos como a cafeína, ácidos clorogênicos (ACG), trigonelina, entre outros. Estes metabólitos são alguns dos precursores do aroma do café.² A trigonelina é rapidamente decomposta na torra do café em muitos componentes voláteis, mas mesmo assim é encontrada no café torrado em concentrações mais baixas.¹ Os ACG são os principais compostos fenólicos encontrados no café, sendo ésteres de

* e-mail:ieda@uel.br

ácidos trans-cinâmico tais como, ácidos cafeico, ferúlico e p-cumárico com ácido quínico.³ São metabólitos secundários de grande interesse econômico porque também contribuem na formação de pigmentos e sabor dos grãos do café, determinando assim a qualidade e aceitação da bebida. A cafeína por ser o principal metabólito fisiologicamente ativo e o alcalóide quantitativamente mais importante do café, foi e ainda é o mais estudado desde a sua descoberta e identificação.¹

As duas variedades comerciais mais importantes de café são a *Coffea arabica* e a *Coffea canephora* syn. *Coffea robusta*, sendo *C. arabica* de qualidade superior. Por esta razão, vários trabalhos relatam métodos para discriminar as duas espécies.⁴⁻⁹ Embora existam milhares de artigos na literatura sobre cafés defeituosos e não-defeituosos,^{10,11} propriedades antioxidantes dos metabólitos,¹² os efeitos do café na saúde,¹³⁻¹⁵ os efeitos da torrefação dos grãos de café,¹² a qualidade da bebida,¹⁶⁻²⁰ entre outros, mas poucos são os relatos na literatura sobre o efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina, principalmente na variedade *Coffea arabica*.

Nos programas de melhoramento genético do café o objetivo é desenvolver diferentes cultivares para promover ganhos na produtividade e também agregar características agronômicas de resistência às pragas e doenças. Por outro lado, a composição química e atributos sensoriais destes novos cultivares poderão ser afetados.

Muitos métodos tem sido desenvolvidos para a determinação de cafeína em café e outras bebidas, sendo os mais frequentemente usados a cromatografia líquida de alta eficiência²¹ (CLAE) e as espectroscopias no infravermelho com transformada de Fourier²² e UV/Vis²³. Para os ACG os métodos mais usados são CLAE²⁴ e eletroforese capilar²⁵ com espectroscopia UV/Vis é a técnica analítica hifenada mais popular baseada na cromatografia. O espectro UV-Vis de cada pico cromatográfico pode ser uma ferramenta útil para a identificação dos componentes da amostra.

Atualmente, uma das abordagens mais poderosas para o controle de qualidade de alimentos são as técnicas de impressão digital. Ela descreve uma variedade de métodos de análise que podem fornecer a identificação e quantificação aproximada de um grupo de metabólitos. As variações dos metabólitos são observadas principalmente por variações nos padrões espectroscópicos ou cromatográficos, sem o conhecimento prévio das identidades dos compostos investigados. Geralmente, amostras com impressões digitais espectroscópica ou cromatográfica semelhantes têm composições similares.

Para a identificação de marcadores de qualidade para o café é necessário examinar os componentes que determinam as características aromáticas na matéria prima,

juntamente com os componentes gerados durante o processo de torra. Esta não é uma tarefa fácil, porque na torrefação não ocorre somente a transformação dos compostos originais individuais, mas eles também se combinam de forma sinérgica e antagônica contribuindo para a determinação do aroma final da bebida. Mesmo assim, a análise química de cafeína e ACG nos grãos é usada como ferramenta adicional para avaliar a qualidade do café.

Nos últimos anos, o nosso grupo tem mostrado que os planejamentos estatísticos de misturas permitem desenvolver procedimento de análise rigoroso mas econômico, para mostrar os efeitos das variações dos solventes na extração de metabólitos em material vegetal.²⁶⁻³¹ Considerando a importância dos ácidos clorogênicos e cafeína como padrão de qualidade do café, nesta pesquisa foi utilizado um planejamento estatístico de mistura de quatro componentes etanol, acetato de etila, diclorometano e hexano para encontrar o solvente extrator mais adequado para a extração destes metabólitos. Foram comparados grãos de cafés verdes da cultivar Bourbon vermelho e outras três cultivares desenvolvidos no Instituto Agrônomo do Paraná, são elas IPR 101, IPR 108 e IAPAR 59. Todas as cultivares foram produzidas sob as mesmas condições.

O objetivo principal desta pesquisa foi usar planejamento estatístico de misturas e análise de componentes principais associados aos espectros UV, para avaliar o efeito do solvente na extração de ACG, cafeína e trigonelina em quatro cultivares de café, Bourbon, IAPAR59, IPR101 e IPR108.

PARTE EXPERIENTAL

Amostras de café

Foram analisados os grãos verdes de quatro diferentes cultivares de *Coffea arabica*, a cultivar Bourbon vermelho, e três cultivares desenvolvidas pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Iapar59, IPR101, IPR108. Na cultivar Bourbon não há cruzamento com outras cultivares e foi usada como referência neste trabalho. A cultivar Iapar 59 originou-se do cruzamento entre *Coffea arabica*, Villa Sarchi 971/10 e o Híbrido de Timor 832/2 (Sarchimor); a cultivar IPR101 originou-se do cruzamento cultivar Catuaí x Sarchimor (com genes S_H2 , S_H3 resistentes a ferrugem); a cultivar IPR 108 originou-se do cruzamento cultivar Iapar59 x (Catuaí x Icatu). Todas as amostras foram cedidas pelo Instituto Agrônomo do Paraná, IAPAR.

Reagentes

Todos os reagentes utilizados na extração foram de grau analítico: álcool etílico comercial (dR), acetato de etila (Vetec), hexano (Vetec), diclorometano (F Maia), clorofórmio (Vetec), KBr (Synth), Para as análises cromatográfica foram usados acetonitrila e metanol grau cromatográfico (Vetec) e água ultrapura Milli-Q.

Equipamentos

Os equipamentos e aparelhos utilizados foram: balança Analítica Shimadzu AY220, evaporador rotativo Fisaton 801, aparelho de ultra-som (Unique, modelo Ultracleaner), moinho de disco Perten-3600, peneira Granutest ABNT 25 com abertura de 0,71mm, purificador de água Millipore Plus, cromatógrafo a líquido de alta eficiência SPD-M10AV Finnigan Surveyor com detector de arranjo de fotodiodo (PDA) da Termo-Electro Corporation.

As medidas de absorção foram realizadas em uma cubeta de quartzo de 1 cm, por meio de um espectrofotômetro UV-VIS Genesys2, com varredura no intervalo de 200-900 nm e resolução de 1 nm. Não houve necessidade de diluição. Os solventes puros, bem como suas misturas apresentados na Tabela 1 foram usados como branco.

Preparo dos extratos

Os grãos verdes dos cafés foram previamente imersos em nitrogênio líquido para facilitar a sua moagem e em seguida foram peneirados.

As misturas de extração foram escolhidas de acordo com um planejamento centróide simplex para quatro componentes,³² totalizando 15 diferentes misturas, Tabela 1. Cada extrato foi preparado pesando-se 10g com adição de 150 ml de uma das misturas listadas na Tabela 1. Estas misturas foram colocadas num banho de ultra-som durante 30 min. A água do banho foi trocada a cada 15 min para evitar o aquecimento. Os extratos foram filtrados em papel de filtro para separar a solução das amostras de café. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Após a extração foi retirada uma alíquota de 15 mL do extrato bruto que foram armazenadas sob refrigeração para as análises UV-VIS e CLAE. Os extratos foram

concentrados em evaporador rotativo a uma temperatura de 60°C (± 3 °C) e mantidos sob ventilação forçada até atingir peso constante, para obtenção dos rendimentos em grama.

Inserir Tabela 1

Preparo das amostras para CLAE

Pipetou-se uma alíquota de 20 μL de cada uma das soluções de extração de 15 mL e nesta adicionou-se 800 μL da fase móvel. As amostras foram filtradas em filtro Milipore Millex de 0,22 μm e analisadas em seguida. As condições cromatográficas foram: coluna cromatográfica Phenomenex C18, Kinetex 2,6 μm Hilic 100Å, com dimensões de 150 mm x 4,6 mm, volume de injeção de 20 μL , vazão da fase móvel a 1,0 mL min^{-1} em modo isocrático. A eluição foi monitorada nos comprimentos de onda de 210, 240 e 254 nm. Os dados foram processados usando o Software ChromQuest 4.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira parte deste estudo foi avaliado o efeito das diferentes proporções dos solventes no rendimento do extrato bruto das quatro cultivares de café arábica, Figura 1. Ao se comparar os rendimentos do extrato bruto em g/10g da amostra, nota-se que aqueles preparados em etanol puro apresentaram rendimentos maiores que aqueles com diclorometano, enquanto que em acetato de etila e hexano os rendimentos foram similares e menores que em etanol e diclorometano puros.

Observou-se que os maiores rendimentos foram obtidos em extratos preparados nas misturas binárias, etanol:acetato de etila, etanol:diclorometano e etanol:hexano do que nos solventes puros. Para a mistura etanol:acetato de etila o maior rendimento foi obtido para o IPR 108, enquanto que para a mistura etanol:diclorometano o maior rendimento foi para o IAPAR 59 e o menor para o IPR 108. Na mistura binária etanol:hexano os rendimentos foram similares para o IAPAR 59 e IPR 101. Os efeitos dos solventes foram calculados no nosso trabalho anterior e mostraram-se significativos³³.

Inserir Figura 1

Embora a espectroscopia de absorção UV não seja uma ferramenta para elucidação estrutural, o espectro traz informação relacionada a estrutura dos produtos naturais.

Estas estruturas contem muitas ligações duplas e absorvem na luz ultravioleta (200-400 nm) ou na luz visível (400-800 nm).

Os espectros de absorção nas diferentes proporções dos solventes para as amostras do café Bourbon foram submetidas a análise de componentes principais (ACP).³⁴ Para ACP os dados espectrais foram colocados na forma de uma matriz 15 linhas e 201 colunas (240 a 400 nm), onde cada linha corresponde a um espectro de um extrato do planejamento e as colunas são as absorbâncias nos diferentes comprimentos de onda. Esta faixa foi escolhida devido ao ruído em alguns espectros abaixo de 240 nm e não conter informação acima de 400 nm. Os dados foram autoescalados antes da análise das componentes principais. As três primeiras componentes principais explicam 93,5% da variância total dos dados. A Figura 2 mostra o gráfico dos escores da CP1×CP3 (~83% de variância). Observam-se dois grandes grupos ao longo da CP1. O grupo 1 é formado com os espectros dos extratos que contem etanol puro ou misturas com etanol, enquanto que o grupo 2 contem os espectros dos extratos preparados em acetato de etila e diclorometano puros, suas misturas bem como misturas com hexano. O espectro preparado em hexano é discriminado na CP1 e CP3. Como os pesos característicos na região de absorção de ACG foram positivos na CP1, então quanto mais para a direita (mais positivo) na CP1 maior a concentração de ACG. Este resultado fica mais fácil de interpretar quando se associa estas informações com os espectros originais, Figura 3.

Inserir Figura 2

Os espectros preparados em etanol puro ou misturas contendo mais que 50% de etanol (parte superior do tetraedro) mostram forte absorção na região de 225-375 nm. Os espectros com forte absorção entre 220-250 nm indicam a presença de duas ligações insaturadas conjugadas, enquanto que a absorção entre 250-290 nm indica a existência de benzeno ou heterocíclico aromático. Absorção acima de 300 nm indica a existência de um sistema conjugado longo.³⁵ Para amostras de café, estas regiões estão associadas as transições eletrônicas das moléculas de trigonelina, cafeína e ácidos clorogênicos.

Inserir Figura 3

Os espectros das soluções de diclorometano ou misturas contendo mais do que 50% de diclorometano (lado direito do tetraedro) apresentam altos valores de absorção entre 225-325 nm, mas com máximo em torno de 272 nm indicando maior contribuição de cafeína e/ou trigonelina. Os espectros das soluções de acetato de etila puro ou misturas

binárias com mais de 50% de acetato de etila (lado esquerdo do tetraedro) apresentam máximos em torno de 280 nm sugerindo presença de ácidos benzóicos de baixo peso molecular. Os comprimentos de onda para análise dos principais metabólitos do café são 326 (max) e 300 nm atribuídos aos ácidos clorogênicos³⁶, à 272 nm a cafeína,³⁷ 265 (max) e 272 nm à trigonelina.³⁸

Comparando-se a razão da absorbância em $\lambda = 326$ nm para a mistura binária etanol:acetato de etila em relação ao etanol puro, ela é 2,5 vezes maior para a mistura binária, enquanto que nas misturas etanol:diclorometano e etanol:acetato de etila:hexano em relação ao etanol puro esta razão é 2,08 vezes maior. Considerando que maior o sinal analítico, maior a concentração, este resultado segue a mesma proporção. É interessante observar que misturas contendo diclorometano puro ou misturas com mais de 50% de diclorometano apresentam maiores valores de absorção em 272 nm associado a cafeína e/ou trigonelina. A razão entre a absorbância em $\lambda = 272$ nm da mistura ternária etanol:diclorometano:hexano é 2,26 vezes maior que para o diclorometano puro. Os espectros das misturas contendo acetato de etila apresentam um máximo em $\lambda = 280$ nm, associados aos ácidos de baixo peso molecular.

A Figura 4 mostra o gráfico das componentes principais CP1×CP2 incluindo todos os espectros dos extratos das quatro cultivares. Observa-se o mesmo padrão nos grupos da Figura 2, onde o grupo 1 contém os extratos preparados em etanol puro ou misturas contendo etanol, no grupo 3 estão os extratos preparados em hexano e no grupo 2 os demais extratos. O gráfico dos escores das componentes 2 e 3 embora com menor variância explicada tem uma distribuição de pontos exatamente iguais aqueles da Figura 2, mais positivo na CP2, maior a concentração do ACG.

Inserir Figura 4

Para obter mais informação sobre os metabólitos predominantes nos diferentes extratos, foi usada a cromatografia líquida em fase reversa. Nove diferentes composições de fase móvel foram testadas na separação cromatográfica, Tabela 2. Estas proporções foram escolhidas usando um planejamento de misturas de três componentes para se obter um aumento gradativo na força do solvente e variação na polaridade. Três comprimentos de onda foram usados para investigar o número de picos em cada extrato, 210, 240 e 254 nm. Em geral a fase móvel preparada com 51:23:26 (v/v/v) em água:metanol:acetonitrila apresentou maior número de picos em 210 nm, sendo assim esta fase móvel foi selecionada neste estudo.

Inserir Tabela 2

A Figura 5a mostra os espectros DAD correspondentes aos picos cromatográficos predominantes nos cromatogramas para o café Bourbon. Comparando-se os espectros de absorção UV apresentados em cada ponto do planejamento da Figura 2 com os espectros DAD dos picos predominantes dos cromatogramas apresentados na Figura 5, observamos um efeito da fase móvel nos extratos que contem acetato de etila, que não acontece com os outros solventes. A adição da fase móvel provocou uma diminuição da absorvância e mudança no comprimento de onda de absorção, inicialmente na região de 250-325 nm para 200-240 nm. Este efeito geralmente é produzido por mudanças estruturais,³⁹ efeito do solvente e efeito do pH.⁴⁰ É bem conhecido que a intensidade e a posição do comprimento de onda λ é afetada pela diferença entre os níveis de energias eletrônicas. Pelo princípio de Franck-Condon as transições eletrônicas envolvem o movimento dos elétrons, incluindo aqueles do solvente, mas não o movimento dos átomos. O aumento da polaridade do solvente provoca um desvio do espectro de absorção para o vermelho (deslocamento batocrômico) ou para o azul (deslocamento hipsocrômico). Em geral, mas nem sempre solventes polares produzem transições $\pi \rightarrow \pi^*$ com deslocamentos para o vermelho, em comprimentos de onda maiores ou seja um deslocamento batocrômico.³⁹ Por outro lado, no caso da transição $n \rightarrow \pi^*$ de uma cetona, a interação do par isolado de elétrons da carbonila no estado fundamental com um solvente polar, diminui a energia do orbital n do par isolado, e assim aumenta a energia requerida para promover um elétron para o nível de energia π^* .⁴⁰ Conseqüentemente, ocorre um deslocamento para comprimento de onda menor, ou seja, um deslocamento hipsocrômico.

Inserir Figura 5

A Figura 6 mostra os espectros DAD dos picos predominantes dos cromatogramas dos extratos do café IAPAR 59. Observa-se que a Figura 6 apresenta um perfil semelhante ao da Figura 5, inclusive o mesmo deslocamento hipsocrômico para os espectros DAD dos extratos que contem acetato de etila. Este deslocamento foi observado também para as cultivares IPR 101 e IPR 108. Os espectros DAD para os quatro planejamentos são similares ocorrendo apenas variações nas concentrações de cafeína, ACG e trigonelina. Esta diferença depende do solvente usado na extração e era esperado porque no melhoramento genético pode mudar a composição química e atributos sensoriais do café. Com exceção do IPR 108 o melhor solvente extrator para os ácidos clorogênicos foi o etanol,

por outro lado também extrai uma quantidade razoável de cafeína e trigonelina. Para o IPR 108 o melhor solvente extrator para ACG é a mistura binária etanol:diclorometano (1:1 v/v). Mistura de etanol:acetato de etila:diclorometano (1:1:1 v/v/v) também é uma opção para extração de ácidos clorogênicos. Para a cafeína os melhores extratores são diclorometano puro ou mistura diclorometano:hexano (1:1 v/v) e para a trigonelina etanol puro, etanol:diclorometano (1:1 v/v) e etanol:hexano (1:1 v/v).

CONCLUSÃO

As diferenças nas concentrações dos ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina nos extratos das quatro cultivares de café, são fortemente dependentes dos solventes usados na extração.

Em geral o melhor solvente extrator para os ácidos clorogênicos foi o etanol, ou a mistura ternária etanol:acetato de etila:diclorometano (1:1:1v/v/v). Para a cafeína os melhores extratores são diclorometano puro ou mistura diclorometano:hexano (1:1v/v e para a trigonelina etanol puro, etanol:diclorometano (1:1 v/v) e etanol:hexano (1:1 v/v). O acetato de etila mostrou-se eficiente na extração de ácidos fenólicos de baixo peso molecular mas não na extração dos metabólitos de interesse. Além de extrair baixíssima quantidade de ácidos clorogênicos, a adição de água:metanol:acetonitrila (51:23:26 v/v/v) provoca modificação estrutural em alguns metabólitos, gerando um deslocamento hipsocrômico no espectro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem os apoios financeiros do CNPq e da Fundação Araucária bem como as bolsas concedidas. Ao Instituto Agrônomo do Paraná e à Dra. Maria Brígida dos Santos Scholz pelo fornecimento das amostras de grãos de cafés usados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Arnaud, M. J. Em *Coffee: Physiology*; Clarke, R. J.; Macrae, R., eds.; Elsevier: New York, 1988, caps. 2 e 9.
2. Ky, C-L.; Louarn, J.; Dussert, S.; Guyot, B.; Hamon, S.; Noiroot, M.; *Food Chem.* **2001**, 75, 223.
3. Cliffo M. N.; *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 1033.
4. Casal, S.; Oliveira, M. B.; Alves, M. R.; Ferreira, M. A.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 3420.
5. González, A. G.; Pablos, F.; Martin, M. J.; León-Camacho, M.; Valdenebro, M. S.; *Food Chem.* **2001**, 73, 93.
6. Bicchi, C. P.; Binello, A. E.; Pellegrino, G. M.; Vanni, A.C.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 45, 1549.
7. Alves, R. C.; Casal, S.; Alves, M. R.; Oliveira, M. B.; *Food Chem.* **2009**, 114, 295.
8. Casal, S.; Alves, M. R.; Mendes, E.; Beatriz, M.; Oliveira, P. P.; Ferreira, M. A.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 6495.
9. Martin, M. J.; Pablos, F.; Gonzalez, A. G.; *Food Chem.* **1999**, 66, 365.
10. Craig, A. P.; Franca, A. S.; Oliveira, L. S.; *Food Chem.* **2012**, 132, 1368.
11. Craig, A. P.; Franca, A. S.; Oliveira, L. S.; *Food Sci. technol.* **2012**, 47, 505.
12. Nicole, M. C.; Anese, M.; Manzocco, L.; Lerici, C. R.; *Food Sci. Technol.* **1997**, 30, 292.
13. Mattioli, A.V.; Farinetti, A.; Mirolo, C.; Pedrazzi, P.; Mattioli, G.; *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2011**, 21, 412.
14. Gallus, S.; Tavani, A.; Negri, E.; La Vecchia, C.; *Ann. Epidemiol.* 2002, 12, 202.
15. Frost-Meyer, N. J.; Logomarsino, J. V.; *J. Funct. Foods* **2012**, 4, 819.
16. Araújo, J. M. A.; Sandi D.; *Food Chem.* **2007**, 101, 1087.
17. Tello, J.; Viguera, M.; Calvo, L.; *J. Supercrit. Fluids* **2011**, 59,53.
18. Mussatto, S. I.; Ballesteros, L. F.; Martins, S.; Teixeira; *J. A. Sep. Purification Techn.* **2011**, 83, 173.
19. Rodrigues, C. I.; Marta, L.; Maia, R.; Miranda, M.; Ribeirinho, M.; Máguas, C.; *J. Food Comp. Anal.* **2007**, 20, 440.
20. Zhang, C.; Linforth, R.; Fisk Ian I. D.; *Food Res. Int.* **2012**, 49, 27
21. Casal, S.; Oliveira, M. B.; Ferreira, M. A.; *Food Chem.* **2000**, 68, 481.

22. Boushain, Z.; Garrigues, J. M.; Garrigues; Garrigues, S.; Guardia, M.; *Vib. Spectrosc.* **1999**, 21, 143.
23. Belay, A.; Ture, K.; Redi, M.; Asfaw, A.; *Food Chem.* **2008**, 108, 310.
24. Pedrosa, M. M.; Muzquiz, M.; GarciaVallejo, C.; Burbano, C.; Cuadrado, C.; Ayet, G.; Robredo, L. M.; *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 459
25. Polnsek, M.; Petriska, I.; Pospisilova, M.; Jahodar, L.; *Talanta* **2006**, 69,192.
26. Souza, E. B. R. de; Silva, R. R. da; Afonso, S.; Scarminio, I. S.; *J. Sep. Sci.* **2009**, 32, 4176.
27. Garcia, L. M. Z.; Daiane, E. P.; Câmara, C. A. P.; Scarminio, I. S.; Nixdorf, S. L.; *J. Chromatogr. Sci.* **2009**, 47, 825.
28. Soares P. K.; Bruns, R. E.; Scarminio I.S.; *J. Sep. Sci.* **2009**, 32, 644.
29. Soares P. K.; Scarminio I. S.; *Phytochem. Anal.* **2008**, 19, 78.
30. Delarozza, F.; Scarminio, I. S.; *J. Sep. Sci.* **2008**, 31, 1034.
31. Garcia, L. M. Z.; Bruns, R. E.; Scarminio, I. S.; *Chemom. and Intell. Lab. Sys.* **2010**, 103, 1.
32. Neto, B. B; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; *Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, 4^a. Ed., Bookman:Porto Alegre, 2010.
33. Moreira, I.; Scarminio, I.S.; *Talanta* 2013, **107**,416.
34. Rencher, A. C.; *Methods of Multivariate Analysis*, 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York, 2002.
35. Liu, W. J. H.; *Em Traditional Herbal Medicine Research Methods: Identification, Analysis, Bioassay and Pharmaceutical and Clinical Study*; Liu, W. J. H., ed.; Wiley:Hoboken, 2011, cap. 5
36. Waksmundzka-Hajnos, M.; Sherma, J.; *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*, CRC Press, 2011.
37. Macrae, R.; Beaumont, J. *Em Coffee:Related Beverages*; Clarke, R. J.; Macrae, R., eds.; Elsevier: London, 1987, cap. 4.
38. Amuta, O. P.; Nnamani, P. O.; Musa, A. D.; Nwodo, O. F. C.; *Der Chemica Sinica*, **2011**, 2, 42.
39. Ferguson, L. N.; *Organic Analysis with ultraviolet visible absorption spectroscopy*. In Reilley C. N. *Advances in Analytical Chemistry and instrumentation*, Interscience:New York, 1965.
40. Anderson, R. J.; Bendell, D. J.; Groundwater, P. W.; *Organic spectroscopy analysis*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2004.

LEGENDA DAS FIGURAS

- Figura 1:** Rendimento dos extratos brutos em g/10g da amostra nas diferentes proporções dos solventes etanol, acetato de etila, diclorometano e hexano, para o café Bourbon, IAPAR 59, IPR 101e IPR 108.
- Figura 2:** Gráfico dos escores da CP1×CP3 dos espectros nas diferentes proporções dos solventes para o café Bourbon.
- Figura 3:** Espectros UV nas diferentes proporções dos solventes etanol, acetato de etila, diclorometano e hexano, para o café Bourbon.
- Figura 4:** Gráfico dos escores da CP1×CP2 dos espectros nas diferentes proporções dos solventes etanol, acetato de etila, diclorometano e hexano, para o café Bourbon, IAPAR 59, IPR 101e IPR 108.
- Figura 5:** Espectros UV-DAD nas diferentes proporções dos solventes etanol, acetato de etila, diclorometano e hexano, para o café Bourbon.
- Figura 6:** Espectros UV-DAD nas diferentes proporções dos solventes etanol, acetato de etila, diclorometano e hexano, para o café IAPAR 59

Tabela 1. Planejamento de mistura para a extração de cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos

Extratos	Etanol	Acetato de etila	Diclorometano	Hexano
1	1	0	0	0
2	0	1	0	0
3	0	0	1	0
4	0	0	0	1
5	1/2	½	0	0
6	1/2	0	1/2	0
7	1/2	0	0	1/2
8	0	½	1/2	0
9	0	½	0	1/2
10	0	0	1/2	1/2
11	1/3	1/3	1/3	0
12	1/3	1/3	0	1/3
13	1/3	0	1/3	1/3
14	0	1/3	1/3	1/3
15	1/4	1/4	1/4	1/4

Tabela 2. Proporções das fases móveis usadas na análise cromatográfica dos extratos dos cafês .

Fase	ACN	H ₂ O	MEOH
1	0	66,5	33,5
2	16	67,0	17
3	32	68	0
4	0	50	50
5	26	51	23
6	48	52	0
7	0	33	67
8	35	35	30
9	64,5	35,5	0

Figura 1

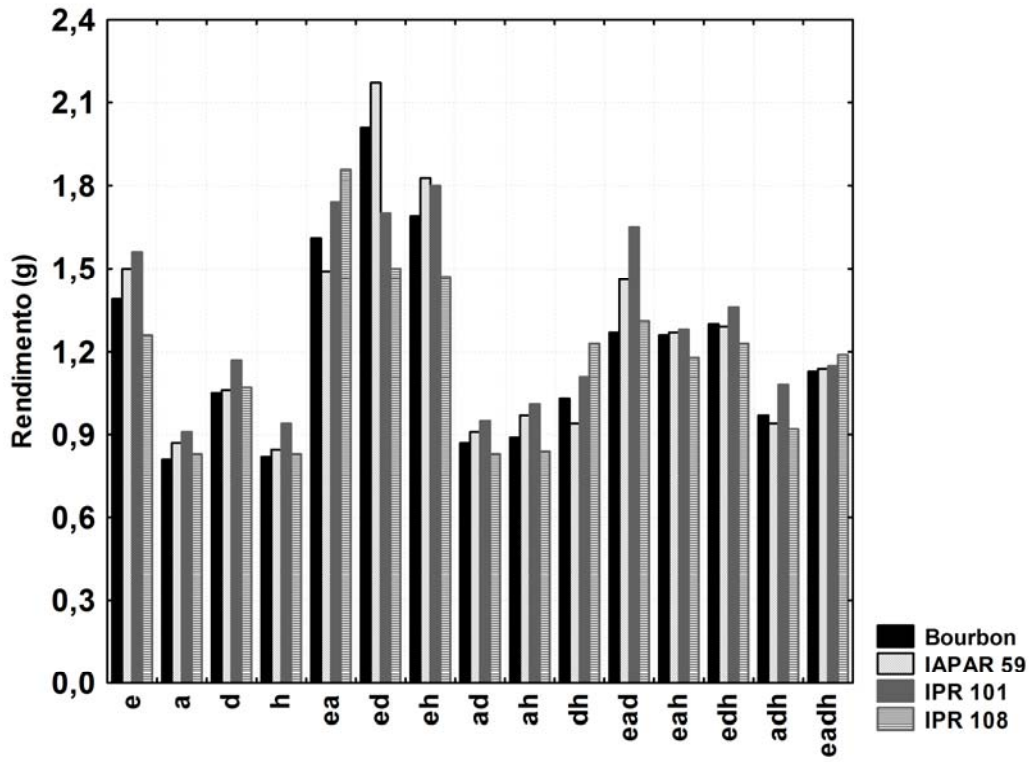


Figura 2

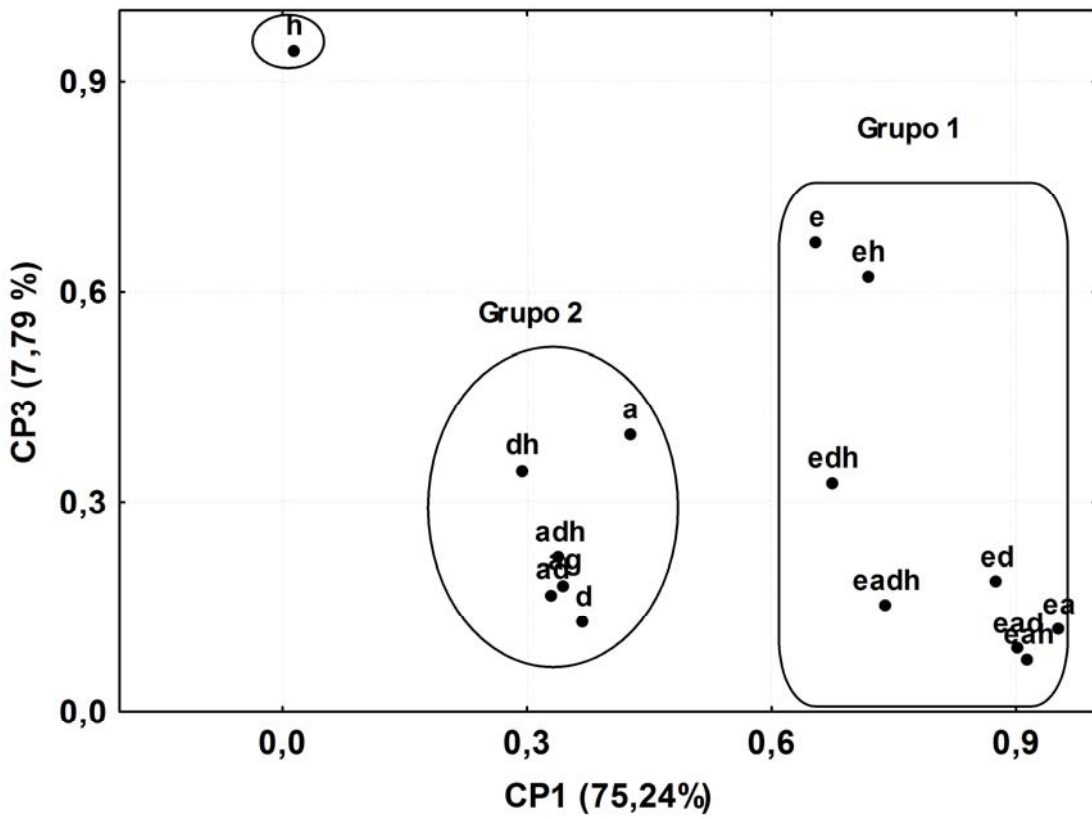


Figura 3

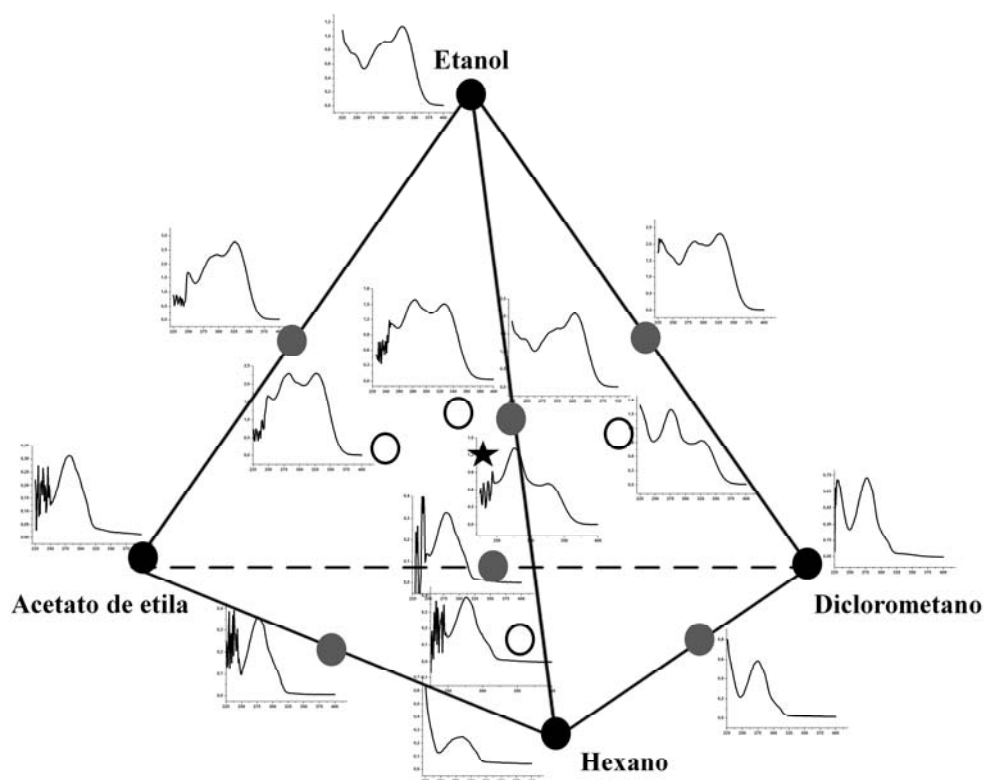


Figura 4

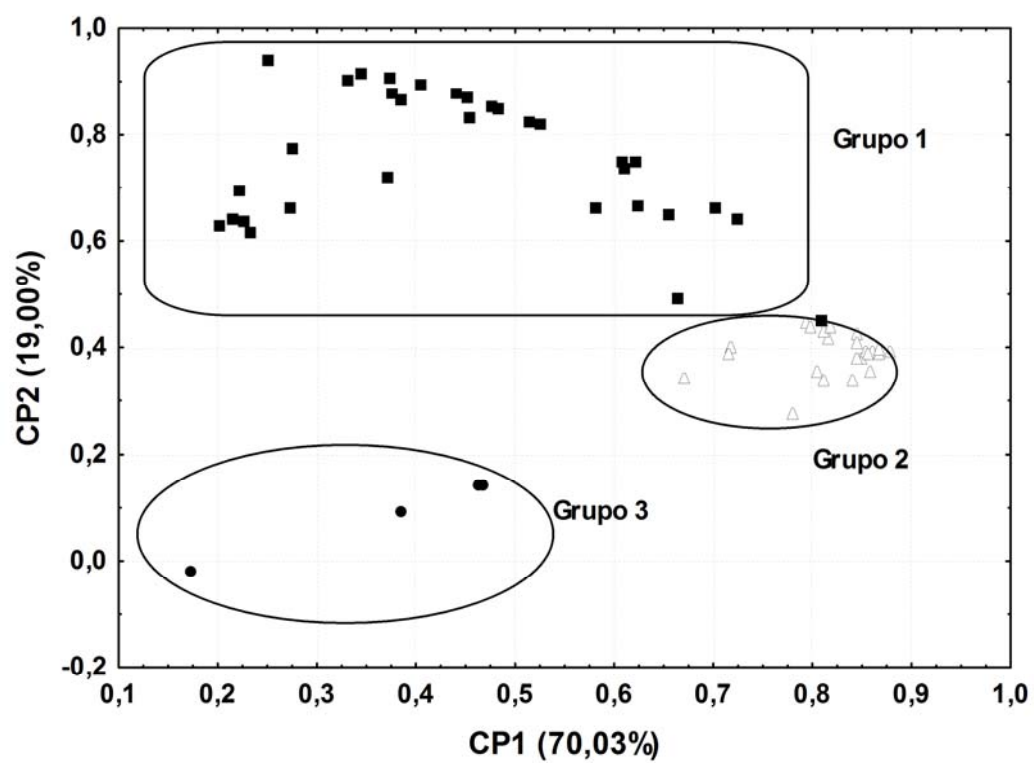


Figura 5

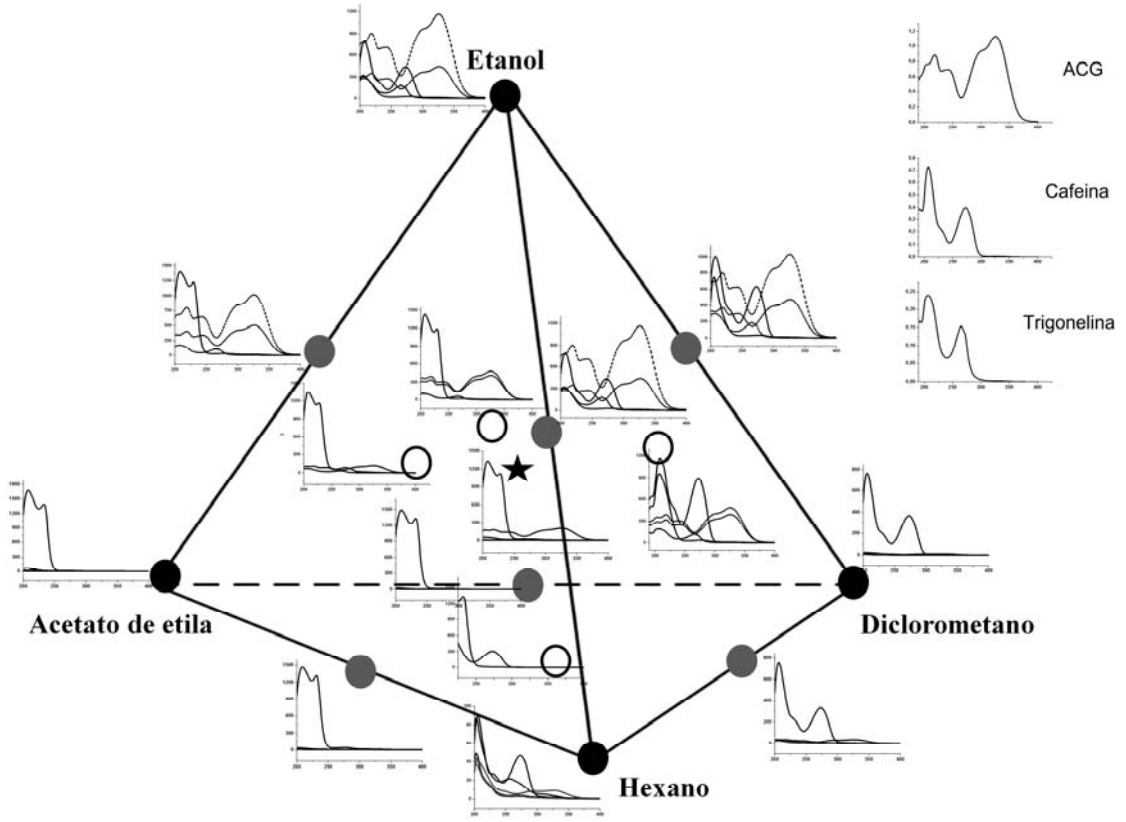


Figura 6

