



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RENAN SILVA MARIANO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA  
DE IMPRESSÃO DIGITAL ESPECTROSCÓPICA PARA  
ANÁLISE DE METABÓLITOS EM GRÃOS VERDES E  
TORRADOS DE *Coffea arabica* E *Coffea canephora***

---

Londrina  
2021

RENAN SILVA MARIANO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA  
DE IMPRESSÃO DIGITAL ESPECTROSCÓPICA PARA  
ANÁLISE DE METABÓLITOS EM GRÃOS VERDES E  
TORRADOS DE *Coffea arabica* E *Coffea canephora***

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

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ieda Spacino Scarminio.

Londrina  
2021

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

M333 Mariano, Renan Silva.

Desenvolvimento de Metodologia Analítica de Impressão Digital para Análise de Metabólitos em Grãos de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* / Renan Silva Mariano. - Londrina, 2021.  
74 f. : il.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.  
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2021.  
Inclui bibliografia.

1. Quimiometria - Tese. 2. *C. arabica* e *C. canephora* - Tese. 3. FT-IR - Tese. 4. Raman - Tese. I. Spacino Scarminio, Ieda. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

RENAN SILVA MARIANO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA  
DE IMPRESSÃO DIGITAL ESPECTROSCÓPICA PARA  
ANÁLISE DE METABÓLITOS EM GRÃOS VERDES E  
TORRADOS DE *Coffea arabica* E *Coffea canephora***

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ieda Spacino Scarminio  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elen Juciléia Romão Sartori Braz  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Valderrama  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -  
(UTFPR) – Câmpus Campo Mourão

Londrina, 05 de março de 2021

Dedico esse trabalho a Deus e  
minha família.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a Deus por ter abençoado minha trajetória até o presente momento.

A minha família, pelo incentivo e apoio.

A minha orientadora Dra. Ieda Spacino Scarminio, por me proporcionar uma excelente orientação.

Aos amigos de laboratório de quimiometria em ciências naturais (LQCN), em especial a Me. Gustavo Galo Marcheafave, Me. Cláudia Domiciano Tormena, Dra. Elis Daiane Pauli e Jaqueline Munise Guimarães da Silva pela contribuição e conhecimento compartilhados.

Ao professor Dr. Roy Edward Bruns pelo auxílio nas atividades.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química

Ao departamento de Química, professores, técnicos e funcionários.

Aos membros da banca por aceitarem participar desse trabalho.

**A ciência não é acumulação de fatos, mas  
resolução de mistérios**

Matt Ridley

MARIANO, Renan Silva. **Desenvolvimento de metodologia analítica de impressão digital espectroscópica para análise de metabólitos em grãos verdes e torrados de *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2021. 74 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

As espécies de café mais consumidas pela população mundial são o *C. arabica* e o *C. canephora* (*robusta* ou *conilon*). Essas espécies apresentam diferenças quanto a concentração de metabólitos secundários que foram investigados tanto em grãos verdes como torrados. O efeito do processamento de torra foi investigado em ambas as espécies de café por espectroscopia Raman e Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) combinadas com ferramentas quimiométricas de Análise das Componentes Principais (ACP) e ANOVA-Análise de Componentes Simultâneos (ASCA). As impressões digitais foram obtidas através de um planejamento estatístico de mistura de 4 componentes (isopropanol, etanol, água e hexano). A mistura binária etanol/água (1:1 v:v) promoveu maiores discriminações e forneceu informações químicas relevantes quanto ao processamento do café (verde × torrado) de *C. canephora*, enquanto que a mistura ternária isopropanol/etanol/água (1:1:1 v:v:v) foi importante na discriminação das espécies (*C. arabica* × *C. canephora*). Na análise exploratória dos espectros Raman o método ASCA mostrou que a mistura etanol/água (1:1 v:v) permite visualizar mudanças espectrais da composição química relacionadas ao processamento (verde × torrado), discriminação das espécies e a interação entre processamento e espécie. A mistura ternária isopropanol/etanol/água (1:1:1 v:v:v) mostrou que o processamento foi o único fator que apresentou efeito significativo na discriminação das espécies. Na análise dos espectros FT-IR por ACP a mistura binária etanol/água (1:1 v:v) discriminou a espécie *C. canephora* em relação ao processamento (verde × torrado) enquanto que a mistura ternária isopropanol/etanol/água (1:1:1 v:v:v) discriminou as espécies torradas de *C. arabica* e *C. canephora*.

**Palavras-chave:** *C. arabica*; *C. canephora*; espectroscopia Raman; espectroscopia FT-IR; análises quimiométricas; planejamento de misturas; efeitos; processamento.

MARIANO, Renan Silva. **Desenvolvimento de metodologia analítica de impressão digital espectroscópica para análise de metabólitos em grãos verdes e torrados de *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2021. 74 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

### ABSTRACT

The coffee species most consumed by the world population are *C. arabica* and *C. canephora* (robusta or conilon). These species have differences in the concentration of secondary metabolites that were investigated in both green and roasted grains. The effect of roasting processing was investigated in both coffee species by Raman and Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy combined with chemometric tools of Principal Component Analysis (PCA) and ANOVA-Simultaneous Component Analysis (ASCA). The fingerprints were obtained through statistical mixture design of 4 components (isopropanol, ethanol, water and hexane). The binary mixture ethanol / water (1: 1: v: v) promoted greater discrimination and provided relevant chemical information regarding the processing of coffee (green × roasted) of de *C. canephora*, while the ternary mixture isopropanol / ethanol / water (1: 1: 1 v: v: v) was important in discriminating roasted species (*C. arabica* × *C. canephora*). In the exploratory analysis of Raman spectra, the ASCA method showed that the ethanol / water mixture (1: 1 v: v) allows visualization of spectral changes in the chemical composition related to processing (green × roasted), species discrimination and the interaction between processing and species. The isopropanol / ethanol / water (1: 1: 1 v: v: v) ternary mixture showed that processing was the only factor that had a significant effect on species discrimination. In the analysis of FT-IR spectra by PCA the binary mixture ethanol / water (1: 1 v: v) discriminated against *C. canephora* in relation to processing (green × roasted) while the ternary mixture isopropanol / ethanol / water (1: 1: 1 v: v: v) discriminated the roasted species of *C. arabica* and *C. canephora*.

Keywords: *C. arabica*; *C. canephora*; Raman spectroscopy; FT-IR spectroscopy; chemometric analysis; statistical mixture design; processing.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Reações Químicas do ácido clorogênico após a torrefação.....22
- Figura 2 -** Planejamento experimental para estudo de misturas de quatro componentes centroide-simplex.....29
- Figura 3 -** Planejamento Estatístico de Misturas de componentes com replicação no ponto central.....33
- Figura 4 -** a) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos verdes de café das espécies *C. arabica* (●) e *C. canephora* (▲) obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas de 4 componentes. b) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes. c) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos de café verde das espécies *C. arabica* (●) e *C. canephora* (▲) obtidos a partir dos solventes etanol (*e*) e etanol/hexano (*eh*). d) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes para os solventes etanol (*e*) e etanol/hexano (*eh*). e) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos de café verde das espécies *C. arabica* (●) e *C. canephora* (▲) obtidos a partir dos solventes isopropanol/água (*ia*) e isopropanol/etanol/água (*iea*). f) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes para os solventes isopropanol/água (*ia*) e isopropanol/etanol/água (*iea*).....42
- Figura 5 -** a) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos torrados de café das espécies *C. arabica* (◆) e *C. canephora* (■) obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas de 4 componentes. b) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos torrados. c) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos de café torrado das espécies *C. arabica* (◆) e *C. canephora* (■) obtidos a partir dos solventes etanol (*e*), etanol/hexano (*eh*) e etanol/água (*ea*). d) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos torrados para os solventes etanol (*e*), etanol/hexano (*eh*) e etanol/água (*ea*). e) Gráfico dos escores da Análise das

Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos de café torrado *C. arabica* (◆) e *C. canephora* (■) obtidos a partir dos solventes isopropanol/água (*ia*) e isopropanol/etanol/água (*iea*). f) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes para os solventes isopropanol/água (*ia*) e isopropanol/etanol/água (*iea*). .....44

**Figura 6 -** a) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos verdes (●) e torrados (◆) de café *C. arabica* obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas. b) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de *C. arabica*. .....46

**Figura 7 -** a) Gráfico dos escores Análise das Componentes Principais (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos de café *C. arabica* verde (●) e torrado (◆) obtidos a partir dos solventes isopropanol/água (*ia*), isopropanol/etanol/água (*iea*) e isopropanol/água/hexano (*iah*). b) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de *C. arabica*. c) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos de café *C. arabica* verde (●) e torrado (◆) obtidos a partir dos solventes isopropanol/água (*ia*), isopropanol/etanol/água (*iea*) e isopropanol/água/hexano (*iah*). d) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de *C. arabica*. .....47

**Figura 8 -** a) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos da espécie *C. canephora* verdes (▲) e torrados (■) obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas. b) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de *C. canephora*. .....48

**Figura 9 -** a) Gráfico dos escores Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos verdes (▲) e torrados (■) da espécie *C. canephora* obtidos a partir dos extratos selecionados etanol/água (*ea*) e etanol/água/hexano (*eah*). b) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de *C. canephora* para etanol/água (*ea*) e etanol/água/hexano (*eah*). c) Gráfico

dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos verdes (▲) e torrados (■) da espécie *C. canephora* obtidos a partir dos extratos selecionados isopropanol/água (*ia*), isopropanol/etanol/água (*iea*) e isopropanol/água/hexano (*iah*). d) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de *C. canephora* para isopropanol/água (*ia*), isopropanol/etanol/água (*iea*) e isopropanol/água/hexano (*iah*).....49

**Figura 10 -** a) Gráfico dos escores da ANOVA-Análise de Componentes Simultâneos das impressões digitais espectrais Raman das espécies *C. arabica* (◆) × *C. canephora* (■) e obtidos a partir dos extratos selecionados etanol/água (*ea*). b) Gráfico dos escores da ANOVA-Análise de Componentes Simultâneos das impressões digitais espectrais Raman de processamento verde (●) × torrado (▲) e obtidos a partir dos extratos selecionados etanol/água (*ea*). c) Gráfico dos escores da ANOVA-Análise de Componentes Simultâneos das impressões digitais espectrais Raman da interação (espécie × processamento) e obtidos a partir dos extratos selecionados etanol/água (*ea*). d) Gráfico dos *loadings* para CP1 relacionado ao fator espécie, processamento e interação (espécie × processamento).....51

**Figura 11 -** a) Gráfico dos escores ANOVA-Análise de Componentes Simultâneos das impressões digitais espectrais Raman dos grãos de café verde (●) × café torrado (▲) das espécies *C. arabica* × *C. canephora* obtidos a partir dos extratos selecionados isopropanol/etanol/água (*iea*). b) Gráfico dos *loadings* para CP1 relacionado ao fator processamento.....53

**Figura 12 -** Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais FT-IR dos grãos verdes de café das espécies *C. arabica* (●) e *C. canephora* (▲) obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas de 4 componentes. ....56

**Figura 13 -** a) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais FT-IR dos grãos verdes de café das espécies *C. arabica* (●) e *C. canephora* (▲) obtidos a partir dos extratos selecionados. b) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes de café das espécies *C. arabica* e *C. canephora* obtidos a partir dos extratos selecionados. ....57

<b>Figura 14 -</b>	Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais FT-IR dos grãos torrados de café das espécies <i>C. arabica</i> (♦) e <i>C. canephora</i> (■) obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas de 4 componentes. ....	58
<b>Figura 15 -</b>	a) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais FT-IR dos grãos torrados de café das espécies <i>C. arabica</i> (♦) e <i>C. canephora</i> (■) obtidos a partir dos extratos selecionados. b) Gráfico dos <i>loadings</i> para CP1 e CP2 dos grãos torrados de <i>C. arabica</i> e <i>C. canephora</i> obtidos a partir dos extratos selecionados.....	59
<b>Figura 16 -</b>	Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais FT-IR dos grãos da espécie <i>C. arabica</i> verdes e torrados obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas de 4 componentes. ....	60
<b>Figura 17 -</b>	a) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais FT-IR dos grãos verdes (●) e torrados (♦) da espécie <i>C. arabica</i> obtidos a partir dos extratos selecionados. b) Gráfico dos <i>loadings</i> para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de <i>C. arabica</i> .....	61
<b>Figura 18 -</b>	Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP3) das impressões digitais espectrais FT-IR dos grãos da espécie <i>C. canephora</i> verdes (●) e torrados (♦) obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas de 4 componentes .....	62
<b>Figura 19 -</b>	a) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais FT-IR dos grãos verdes (▲) e torrados (■) da espécie <i>C. canephora</i> obtidos a partir dos extratos selecionados. b) Gráfico dos <i>loadings</i> para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de <i>C. canephora</i> .....	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Composição química dos cafés crus arábica e conilon (g/100g).....	23
<b>Tabela 2 -</b>	Proporções relativas dos solventes água ultrapura ( <i>a</i> ), etanol ( <i>e</i> ), hexano ( <i>h</i> ) e isopropanol ( <i>i</i> ) para planejamento estatístico de misturas de componentes com replicação no ponto central .....	34
<b>Tabela 3 -</b>	Resultados da análise ASCA com efeito percentual e p-valor para <i>C. arabica</i> e <i>C. canephora</i> relacionados a mistura isopropanol/etanol/água ( <i>ea</i> ). .....	51
<b>Tabela 4 -</b>	Resultados da análise ASCA com efeito percentual e p-valor para <i>C. arabica</i> e <i>C. canephora</i> relacionados a mistura isopropanol/etanol/água ( <i>iea</i> ) .....	52
<b>Tabela 5 -</b>	Atribuições espectro-estrutura para espectroscopia Raman .....	54
<b>Tabela 6 -</b>	Atribuições espectro-estrutura para espectroscopia FT-IR .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>a</i>	Água
ACP	Análise das componentes principais
<i>ae</i> <i>h</i>	Água/etanol/hexano
<i>ae</i> <i>hi</i>	Água/etanol/hexano/isopropanol
<i>ah</i>	Água/hexano
ASCA	Anova- <i>simultaneous component analysis</i>
CP	Componente principal
<i>e</i>	Etanol
<i>ea</i>	Etanol/água
<i>eh</i>	Etanol/hexano
FT-IR	Infravermelho com transformada de fourier
<i>h</i>	Hexano
<i>i</i>	Isopropanol
<i>ia</i>	Isopropanol/água
<i>iah</i>	Isopropanol/água/hexano
<i>ie</i>	Isopropanol/etanol
<i>iea</i>	Isopropanol/etanol/água
<i>ieh</i>	Isopropanol/etanol/hexano
<i>ih</i>	Isopropanol/hexano
<i>P</i>	Polaridade
$X_d$	Acidicidade
$X_e$	Basidicidade
$X_n$	Dipolaridade

A presente dissertação de mestrado é constituída por 5 capítulos. No Capítulo 1 é abordada uma introdução, objetivos gerais e objetivos específicos.

O capítulo 2 apresenta os métodos quimiométricos utilizados: Análise das Componentes Principais e ANOVA-Análise de Componentes Simultâneos.

O capítulo 3 apresenta os materiais e métodos utilizados no material vegetal.

O capítulo 4 apresenta os resultados e discussões em relação ao desenvolvimento da dissertação.

No Capítulo 5 é apresentado uma conclusão geral sobre o desenvolvimento da dissertação.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO I</b> .....	20
1.	INTRODUÇÃO.....	20
2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
	<b>CAPÍTULO II</b> .....	28
1.	QUIMIOMETRIA.....	28
1.1.	Planejamento Estatístico de Misturas .....	28
1.2.	Análise das Componentes Principais .....	29
1.3.	Análise de Variância (ANOVA)-Análise de Componentes Simultâneos.....	30
	<b>CAPÍTULO III</b> .....	33
1.	MATERIAL VEGETAL.....	33
1.1.	Preparo das frações metabólicas .....	33
1.2.	Aquisição espectroscópica Raman .....	35
1.3.	Aquisição espectroscópica FT-IR.....	35
1.4.	Análise Estatística .....	36
	<b>CAPÍTULO IV</b> .....	38
1.	IMPRESSÃO DIGITAL ESPECTROSCÓPICA RAMAN.....	38
1.1.	Análise exploratória do efeito do solvente extrator nas impressões digitais de grãos de café das espécies C. arabica .....	38
1.2.	Análise exploratória do efeito do solvente extrator nas impressões digitais de grãos de café em verdes × torrados .....	45
1.3.	Análise exploratória do efeito do solvente extrator ea e iea através da Anova-Análise de Componentes Simultâneos (ASCA) .....	49
	<b>CAPÍTULO V</b> .....	55
2.	<b>IMPRESSÃO DIGITAL ESPECTROSCÓPICA FT-IR</b> .....	55
2.1.	ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO EFEITO DO SOLVENTE EXTRATOR NAS IMPRESSÕES DIGITAIS DE GRÃOS DE CAFÉ DAS ESPÉCIES C. ARABICA × C.CANEPHORA.....	55

2.2.	ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO EFEITO DO SOLVENTE EXTRATOR NAS IMPRESSÕES DIGITAIS DE GRÃOS DE CAFÉ EM VERDES × TORRADOS.....	60
	<b>CAPÍTULO V</b> .....	66
	CONCLUSÃO.....	66
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68

# Capítulo I

## *Introdução e Objetivos*



## 1. INTRODUÇÃO

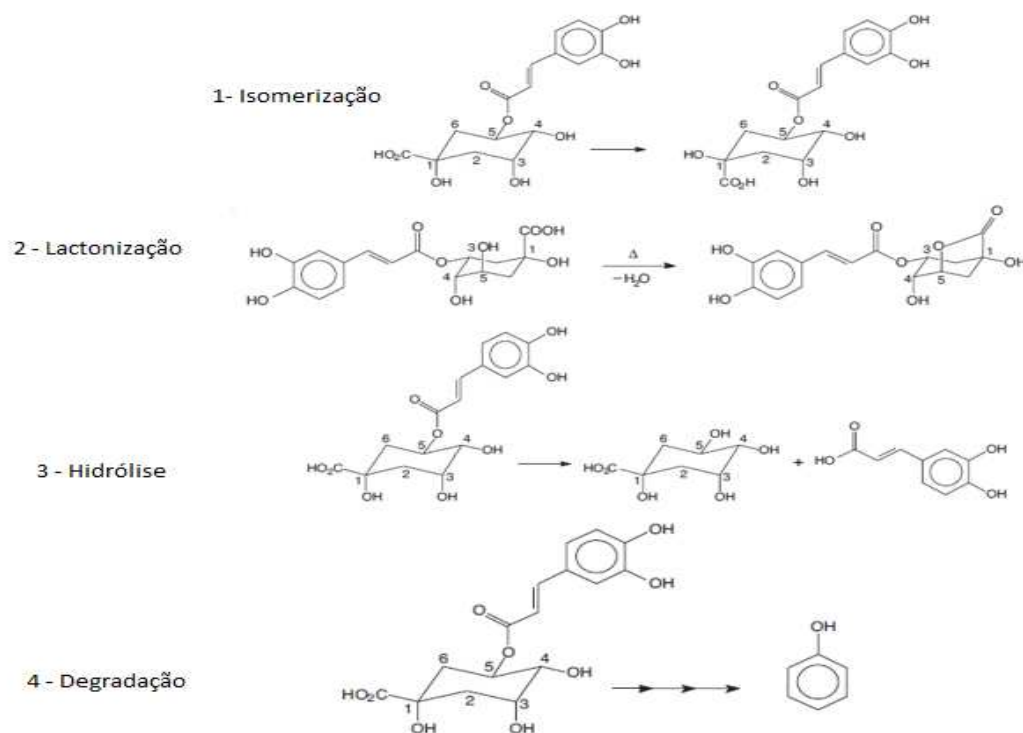
A extração de metabólitos em materiais vegetais apresentou um crescimento expressivo nos últimos anos, fato justificado pelas diversas aplicações a que vêm sendo destinados, como cosméticos, suplementos alimentares e farmacêuticos<sup>1</sup>, além dos sistemas analíticos de controle de qualidade na indústria de alimentos e investigações quimiotaxonômicas.<sup>2</sup> Existe uma ampla variedade de métodos que podem ser empregados para a extração de metabólitos secundários, desde aqueles cujo processo ocorre em sistemas fechados ou abertos, como a quente ou a frio.<sup>3,4</sup> Dentre esses, a extração sólido-líquido quando combinada com técnicas de análise qualitativa e/ou quantitativa, favorece de forma significativa a identificação de metabólitos, como exemplo no café.<sup>5</sup>

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo e cerca de 80 % dos adultos da população mundial fazem o uso da bebida energética.<sup>6</sup> O Brasil corrobora com um terço da produção mundial e é o maior exportador no mercado internacional.<sup>7</sup> Segundo dados estatísticos da Companhia Nacional de Abastecimento<sup>8</sup> a estimativa de produção da safra de café em 2019 foi equivalente a 48,99 milhões de sacas de 60 kg. Desse total, 34,47 milhões de sacas foram da espécie arábica e 14,52 milhões da espécie conilon, o que representou uma redução de aproximadamente 20,5 % em relação a 2018, no qual o país colheu um volume de 61,66 milhões de sacas.<sup>9</sup>

A planta do cafeeiro pertence à família *Rubiceae* e Gênero *Coffea*. As espécies predominantes na produção mundial são *Coffea arabica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café robusta ou conilon). A diferença entre as espécies arábica e conilon se dá tanto geneticamente (número de cromossomos, 44 e 22 respectivamente) como no aspecto físico e composição química. O *Coffea arabica* possui características ácidas e aromas intensos enquanto que o *Coffea canephora* apresenta amargor mais intenso.<sup>10,11</sup> O processo de torra é um dos fatores mais importantes relacionados à qualidade do café,

uma vez que a composição química do grão verde, ao ser torrado, é alterada.<sup>12</sup> Diterpenos como cafestol e kahweol sofrem alterações em diferentes níveis de torrefação. Estudos indicam que à medida que se aumenta a intensidade da torrefação, as concentrações de kahweol diminuem significativamente. Em torrefações leves, por exemplo, a concentração de cafestol e kahweol é mais alta em relação a torrefações médias e elevadas.<sup>6</sup>

Os aspectos sensoriais como aroma, sabor e corpo do café estão relacionados a substâncias voláteis e não voláteis produzidos durante o processo de torrefação. Os grãos de café sofrem diversas alterações físicas e químicas quando submetidos a torrefação e, conseqüentemente o sabor e a bioatividade da bebida também se alteram. A composição final do café varia conforme a matéria prima, grau de torra e outras variáveis de torrefação (fluxo de ar e temperatura).<sup>12,13</sup> O processo de torra, principalmente em temperaturas acima de 180° C, leva a alteração de compostos orgânicos como ácido clorogênico, sacarose, trigonelina e alguns aminoácidos. A diminuição de compostos fenólicos que ocorrem através da torrefação é identificada na degradação do ácido clorogênico. Devido à instabilidade térmica, o ácido clorogênico sofre isomerização, lactonização, hidrólise e degradação em compostos de baixo peso molecular, dentre outras reações e modificações químicas, o que contribui para o desenvolvimento de cor e sabor<sup>14</sup>. A Figura 1 ilustra as reações químicas supracitadas.



**Figura 1** - Reações químicas do ácido clorogênico após a torrefação<sup>14</sup>

Condições de plantio tais como clima, posição geográfica e disposição do plantio estão diretamente relacionados aos metabólitos primários e secundários no café e influenciam na qualidade do produto final<sup>15</sup>. Metabólitos são definidos como produtos intermediários ou finais em uma amostra biológica e o conjunto de metabólitos de baixa massa molecular em um sistema biológico corresponde a um metaboloma.<sup>16</sup>

Ambas as espécies apresentam uma gama de compostos biologicamente ativos como ácido nicotínico, trigonelina, ácido quinolínico, ácido tânico, ácido pirogálico e cafeína. O café possui também alguns compostos fenólicos antioxidantes como ácido cafeico e ácido clorogênico. Os ácidos clorogênicos ainda incluem alguns subprodutos de isômeros como ácidos cafeoilquímicos e dicafeoilquímicos.<sup>17,18</sup>

A Tabela 1 apresenta a composição química de grãos crus de café do tipo arábica e conilon. As duas espécies se diferenciam nos teores de cafeína, ácidos clorogênicos totais, sacarose e lipídeos.

**Tabela 1** - Composição química dos cafés crus arábica e conilon (g/100g)<sup>14</sup>

<b>Componentes</b>	<b>Arábica</b>	<b>Conilon</b>
Cafeína	0,9-1,30	1,5-2,50
Trigonelina	0,6-2,0	0,6-0,70
Ácidos Clorogênicos	4,10-7,90	4,40-4,50
Ácidos Alifáticos	1,50-1,90	0,90-1,40
Ácido quínico	0,47-0,57	0,31-0,39
Açúcares redutores	0,10-0,80	0,31-0,40
Sacarose	6,25-8,45	0,90-4,85
Polissacarídeos	43,0-45,0	46,9-48,3
Proteínas	10,0-11,0	11,0-15,0
Lipídeos	15,0-17,0	7,0-10,0

O consumo de café no mundo tem como característica a diversidade da afinidade de aroma e gosto por parte dos consumidores e para atender a essa necessidade misturas ou *blends* de *C. canephora* e *C. arabica* são feitas uma vez que cada espécie contribui com suas características específicas.<sup>19</sup> Nesse sentido, a indústria do café tem investido em métodos analíticos a fim de identificar e diferenciar metabólitos entre as espécies já que valor comercial do café arábica é em média duas vezes maior em relação ao café conilon.<sup>19,20</sup>

Métodos analíticos têm contribuído no desenvolvimento de abordagens metabolômicas para o controle de qualidade e, segundo a literatura científica as principais são: impressão digital metabólica, metabolômica não-alvo e metabolômica alvo. A primeira e a segunda contribuem na classificação de amostras com origens biológicas diferentes<sup>21,22</sup>, enquanto que a terceira visa quantificar metabólitos com propriedades químicas semelhantes, os chamados biomarcadores.<sup>22,23</sup> Os metabólitos mencionados podem ser classificados em primários, que contribuem no desenvolvimento de funções básicas de um organismo como respiração celular e síntese de aminoácidos<sup>24</sup> e secundários, que são aqueles metabólitos que desempenham funções que permitem que o

organismo resista aos fenômenos físicos que o meio ambiente exerce sobre ele, como luz solar, excesso e escassez hídrica e também a patógenos, produzindo antifúngicos e antivirais<sup>25</sup> Dentre os principais metabólitos investigados no café, destacam-se a cafeína e compostos fenólicos, como ácido clorogênico e seus isômeros, bem como diterpenos, trigonelina e açúcares.<sup>13</sup>

Com a finalidade de identificar e quantificar os metabólitos do café, várias técnicas analíticas têm sido utilizadas como exemplo a espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-Vis)<sup>26</sup>, espectroscopia no infravermelho próximo (NIR, *near infrared spectroscopic*)<sup>27</sup>, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, *Fourier transform infrared spectroscopy*)<sup>28</sup> e espectroscopia Raman.<sup>29</sup> Quando essas técnicas são trabalhadas concomitantemente com ferramentas quimiométricas o monitoramento e análise do café se tornam mais eficazes no que se diz respeito a identificação e, porventura, quantificação dos metabólitos secundários.<sup>30</sup>

O café apresenta uma composição complexa, contendo açúcares, aldeídos, cetonas, lipídeos, compostos fenólicos, ácidos e demais compostos que asseguram os aspectos sensoriais e farmacológicos deste material.<sup>13,31</sup> Como estratégia analítica, a extração por solventes pode ser delineada com um planejamento estatístico de mistura, de modo a utilizar solventes puros e/ou combinados, para maximizar a extração qualitativa e quantitativa dos compostos de interesse. No que se refere ao planejamento de mistura e a escolha dos solventes, os parâmetros de Snyder (polaridade, acidez, basicidade e dipolaridade)<sup>32</sup> auxiliam na escolha dos solventes que potencializam a obtenção de estruturas e moléculas com distintos comportamentos químicos. Frente a complexidade metabólica dessas espécies, nosso grupo através da pesquisa em ciências naturais, tem buscado desenvolver metodologia analítica para investigar metabólitos que promovem discriminações de *Coffea arabica* sujeitas ao aumento de

CO<sub>2</sub><sup>33</sup>, estresse hídrico<sup>27</sup>, adensamento<sup>20</sup>, entre outros. Para isso, planejamento estatístico de misturas são usados com diferentes solventes com propriedades químicas distintas.

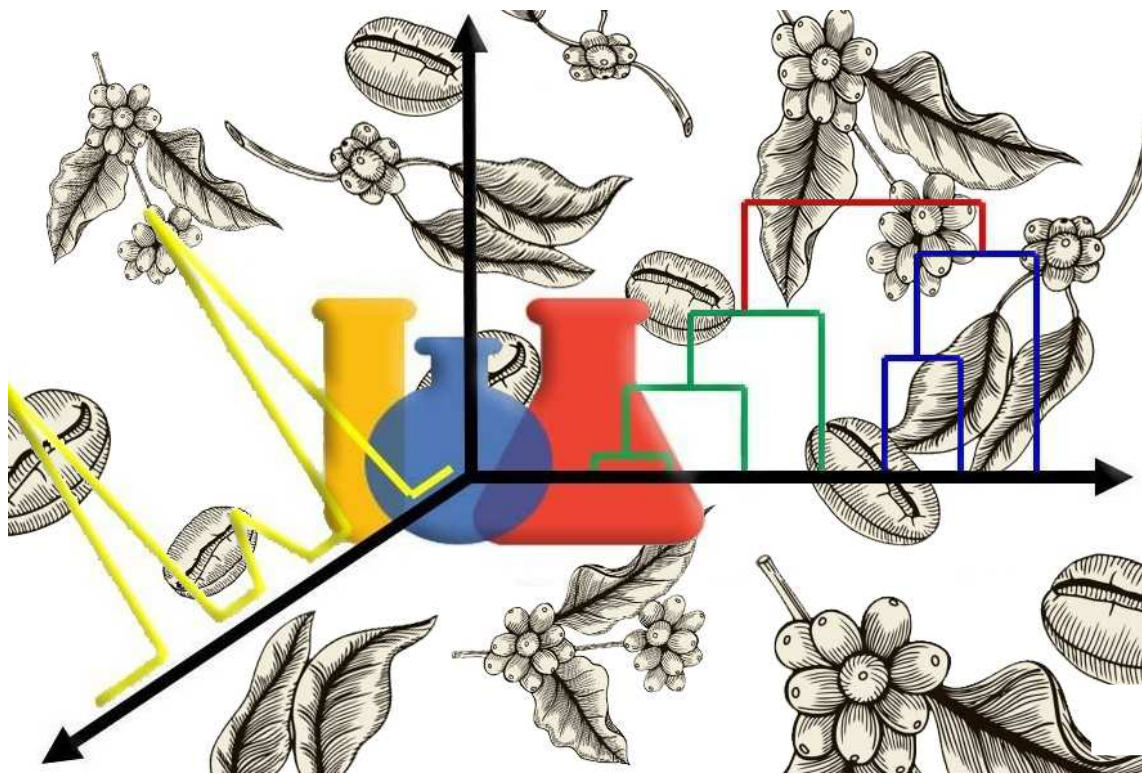
Diante do exposto, o objetivo geral dessa pesquisa foi verificar a diversidade metabolômica de grãos de cafés verde e torrado das espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* por meio de técnicas analíticas e ferramentas quimiométricas.

## 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o solvente ou mistura de solvente que discrimina as amostras de *C. arabica* e *C. canephora* verdes e torrados.
- Identificar metabólitos ou grupo de metabólitos nos extratos que discriminam tanto as espécies como o processamento (verde × torrado) do café por meio de impressão digital espectroscópica.

# Capítulo II

## *Métodos Quimiométricos*



## QUIMIOMETRIA

Quimiometria é a disciplina da química que usa métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar condições ótimas de medidas e experimentos e extrair o máximo de informação de dados químicos.<sup>34</sup> É uma disciplina interdisciplinar que permite alcançar e contribuir para áreas como Engenharia, Biologia, Ciências Sociais, Economia e Agronomia entre outras diversas áreas do conhecimento<sup>35</sup>. A fim de realizar uma redução do número de variáveis geradas pelas técnicas analíticas, os métodos de análise multivariada são amplamente utilizados.<sup>36</sup> Uma análise multivariada pode ser explorada de maneira supervisionada ou não-supervisionada. O método supervisionado utiliza de ferramentas matemáticas para classificação por meio do conjunto de dados, enquanto que o método não-supervisionado realiza agrupamentos ou *clusters* entre amostras sem que haja necessidade de ter conhecimento prévio sobre elas.<sup>37</sup>

### 1.1. Planejamento Estatístico de Misturas

As propriedades de uma mistura são determinadas pelas proporções de seus ingredientes e não em sua totalidade. A soma de todas elas sempre equivale a 100 %, neste sentido, para uma mistura de  $q$  componentes é certo que:

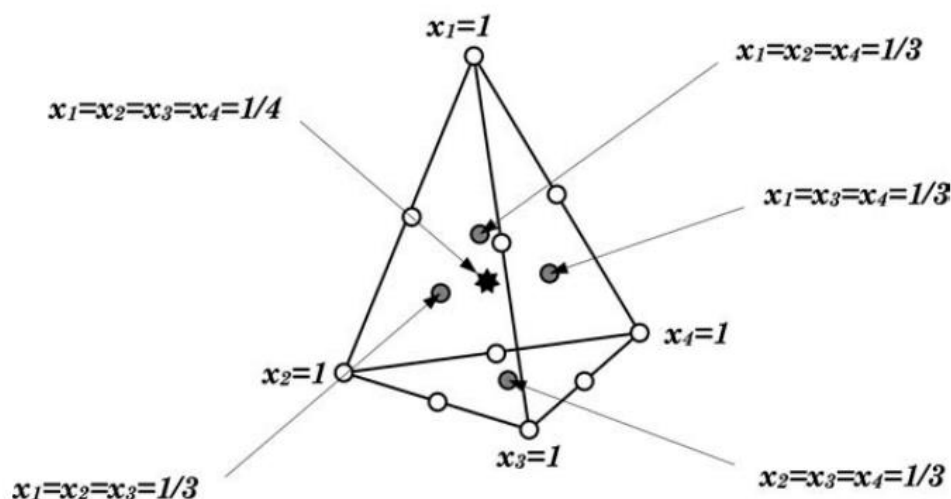
$$\sum_{i=1}^q x_i = 1 \quad \text{Eq. 1}$$

no qual  $x_i$  representa a proporção do  $i$ -ésimo componente em uma escala em que 100 % equivale a um. A equação possui um grau de liberdade a menos das proporções, no entanto, é necessário conhecer apenas as proporções de  $q-1$  componentes, então, a quantidade do último componente irá corresponder ao que restar para completar 100 %.<sup>38</sup>

Em sistemas que contêm três fatores independentes, os experimentos obedecem à equação:

$$x_1 + x_2 + x_3 = 1 \quad \text{Eq.2}$$

que define um triângulo equilátero inscrito no cubo.<sup>38</sup> Em uma mistura de quatro componentes o modelo possui dez termos em um planejamento do tipo centroide-simplex, disposto em um tetraedro (Fig. 2).



**Figura 2** - Planejamento experimental para estudo de misturas de quatro componentes – centroide-simplex<sup>38</sup>

### 1.2. Análise das Componentes Principais

A Análise das componentes principais (ACP) é uma ferramenta capaz de reduzir a quantidade de variáveis através de combinações lineares no qual a importância de cada variável é representada pelos pesos ou *loadings*. A ACP também maximiza a variância da combinação linear das variáveis.<sup>39,40</sup>

Os dados espectroscópicos e cromatográficos podem ser dispostos em uma matriz  $M$  de  $n$  linhas (amostras) e  $p$  colunas (variáveis). A primeira componente principal

contém a maior informação estatística que a segunda componente, e assim por diante.<sup>41</sup>

No tratamento matemático a matriz  $M$  é convertida em três matrizes de acordo com a Equação 3.

$$\mathbf{M} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 3}$$

No qual  $T$  corresponde a matriz dos escores,  $P'$  a matriz transposta dos *loadings* e  $E$  a matriz dos resíduos.<sup>35</sup>

### 1.3. Análise de Variância (ANOVA)-Análise de Componentes Simultâneos

Existe uma gama de ferramentas estatísticas capaz de aprimorar estudos metabolômicos. Dentre elas, a extensão Análise Multivariada de Variância (MANOVA) permite a redução da dimensão de dados com a finalidade de destacar grupos que têm efeitos e interações significativos, porém essa ferramenta não se aplica a dados em que o número de variáveis é superior às amostras.<sup>41</sup>

A Análise de Variância (ANOVA) – Análise de Componentes Simultâneos (ASCA, do inglês ANOVA-*Simultaneous Component Analysis*) é usada para quantificar as fontes de variação dos dados. Para isso um planejamento fatorial tem que ser usado como estratégia experimental, e a partir dos resultados as matrizes dos efeitos são obtidas. A análise das componentes principais é executada na soma das matrizes dos efeitos segundo o planejamento experimental empregado, identificando as fontes de variação relacionados aos efeitos específicos. Desta maneira, efeitos sutis que provavelmente não seriam identificados pela ACP podem ser detectados pelo ASCA.<sup>27,42</sup> Para iniciar a análise ASCA, deve-se selecionar um modelo linear e, logo após, a ACP é aplicada às matrizes de efeito a fim de verificar as respostas metabólicas associadas a um efeito

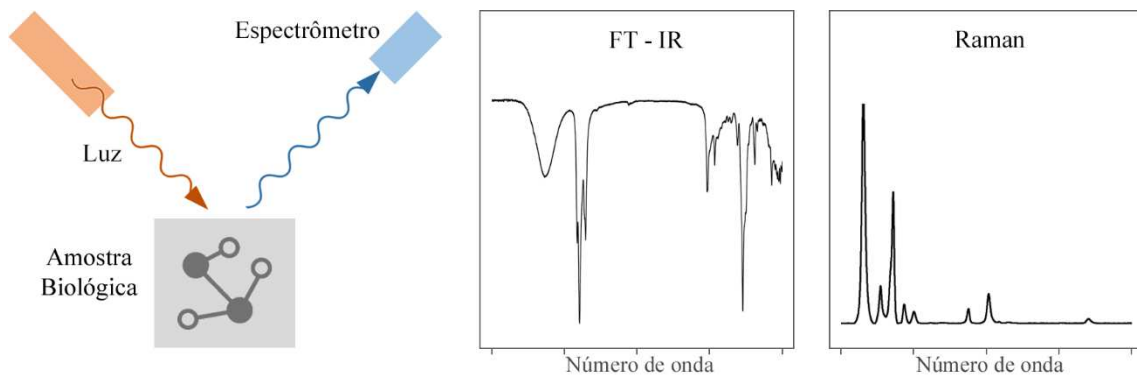
principal ou interações no gráfico dos escores, de acordo com a Equação 4.<sup>42</sup>

$$\mathbf{Y} = \mathbf{M}_m + \mathbf{T}_a \mathbf{P}_a^T + \mathbf{T}_b \mathbf{P}_b^T + \mathbf{T}_{ab} \mathbf{P}_{ab}^T + \mathbf{Y}_e \quad \text{Eq.4}$$

No qual  $T_a$ ,  $T_b$  e  $T_{ab}$  correspondem aos escores das respectivas submatrizes de efeito e as colunas em  $P_a$ ,  $P_b$  e  $P_{ab}$  correspondem aos *loadings*.<sup>42</sup>

# Capítulo III

## *Materiais e métodos*



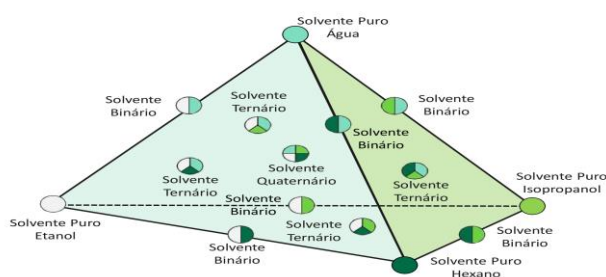
## MATERIAL VEGETAL

Os grãos de café verde e torrado das espécies *C. arabica* e *C. canephora* foram cedidos pela Companhia Cacique de Café Solúvel (polo Londrina – Paraná – Brasil) no 1º semestre de 2019. As amostras foram fornecidas de acordo com o padrão de processamento industrial (beneficiamento). Em laboratório, foram moídos (aparelho IKA – A11), peneirados (0,710 mm) e armazenados em recipientes fechados e alocados com temperatura média de 16° C.

### 1.1. Preparo das frações metabólicas

Para o preparo das frações metabólicas os reagentes utilizados foram a água ultrapura (18,2 MΩ.cm, 25°C - purificação no equipamento Millipore Milli-Q Gradient - Bedford, EUA), etanol Impex (São Paulo, Brasil), hexano Anidrol (São Paulo, Brasil) e isopropanol Impex (São Paulo, Brasil), todos de grau analítico.

Um planejamento estatístico de mistura do tipo centroide-simplex (Fig. 3) com 4 solventes: água, etanol, isopropanol e hexano e suas combinações binárias (1:1 v:v), terciárias (1:1:1 v:v:v) e quaternárias (1:1:1:1 v:v:v:v) conforme a Tabela 2 foi delineado a fim de verificar o comportamento extrativo, com base nos parâmetros de Snyder.<sup>32,43</sup> As proporções foram estabelecidas com volume normalizado em 60 mL.



**Figura 3** - Planejamento estatístico de misturas de componentes com replicação no ponto central.

**Tabela 2** - Proporções relativas dos solventes água ultrapura (*a*), etanol (*e*), hexano (*h*) e isopropanol (*i*) para planejamento estatístico de misturas de componentes com replicação no ponto central e volume total normalizado em 60 mL.

Extrato	Solventes				Parâmetros Solvatocrômicos de Snyder <sup>32</sup>			
	<i>i</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>h</i>	$x_d$	$x_e$	$x_n$	<i>P</i>
<i>i</i>	1	0	0	0	0,57	0,17	0,26	3,92
<i>e</i>	0	1	0	0	0,52	0,19	0,29	4,4
<i>a</i>	0	0	1	0	0,43	0,18	0,45	10,2
<i>h</i>	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>ie</i>	1/2	1/2	0	0	0,55	0,18	0,27	4,1
<i>ia</i>	1/2	0	1/2	0	0,5	0,18	0,35	7,06
<i>ih</i>	1/2	0	0	1/2	0,28	0,08	0,13	1,89
<i>ea</i>	0	1/2	1/2	0	0,48	0,19	0,37	7,3
<i>eh</i>	0	1/2	0	1/2	0,26	0,09	0,15	2,2
<i>ah</i>	0	0	1/2	1/2	0,21	0,09	0,2	6,1
<i>iea</i>	1/3	1/3	1/3	0	0,51	0,17	0,33	6,17
<i>ieh</i>	1/3	1/3	0	1/3	0,55	0,18	0,27	2,74
<i>aeh</i>	0	1/3	1/3	1/3	0,32	0,12	0,25	4,8
<i>iah</i>	1/3	0	1/3	1/3	0,33	0,12	0,27	4,7
<i>aehi 1</i>	1/4	1/4	1/4	1/4	0,38	0,4	0,25	4,6
<i>aehi 2</i>	1/4	1/4	1/4	1/4	0,38	0,4	0,25	4,6
<i>aehi 3</i>	1/4	1/4	1/4	1/4	0,38	0,4	0,25	4,6

<sup>1</sup>

Para extração, pesou-se em balança analítica (Schimadzu AY 220) 2,50 g de cada café, sendo transferido para um erlenmeyer de 250 mL, onde 60 mL de solvente/mistura foram adicionados segundo a Tabela 2. Os erlenmeyers foram submetidos à agitação (*Shaker* ACB Labor) durante 30 minutos a 150 rpm e temperatura constante à 25° C. Posteriormente a mistura foi filtrada. Esse mesmo procedimento foi

<sup>1</sup>  $x_d$ : acidez;  $x_e$ : basicidade;  $x_n$ : dipolaridade; *P*: polaridade

realizado outras 6 vezes. Após a última filtragem, as soluções ficaram expostas a ventilação forçada até a volatilização completa dos solventes, e por fim, liofilizadas em liofilizador Virtis SP Scientific, a  $-81,5 \pm 0,1$  °C e  $20 \pm 2$  mTorr até massa constante em balança analítica. Para a solução extrativa, 1 mL de cada solvente/mistura foi adicionado ao extrato seco.

### 1.2. *Aquisição espectroscópica Raman*

Na aquisição dos espectros de Raman utilizou-se o espectrômetro Raman portátil Advantage532<sup>®</sup> da empresa Delta Nu (Midland, Canadá) e o *software* da respectiva marca. O monitoramento foi de 200 a 3500  $\text{cm}^{-1}$  e o intervalo de 800 – 1800  $\text{cm}^{-1}$  é tido como de impressão digital para o café.<sup>29</sup> O equipamento foi excitado em 532 nm (laser alto) com resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$  e tempo de integração de 1 – 5 s. O experimento foi executado em ambiente sem luminosidade com temperatura média de 20° C, a partir de 1 mL da solução extrativa.

### 1.3. *Aquisição espectroscópica FT-IR*

O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro infravermelho por transformada de Fourier Shimadzu modelo IR PRESTIGE-21. A fonte de infravermelho é de cerâmica estabilizada por sistema air cooled. O detector é do tipo DLATGS (Deuterated Triglycine Sulfate Doped with L-Alanine) de alta sensibilidade, mantendo o controle de temperatura. O sistema óptico é composto por feixe único, sendo o divisor de feixe constituído de KBr revestido com germânio. Para o controle do equipamento e tratamento dos dados durante as medidas, foi utilizado o software Shimadzu modelo IR

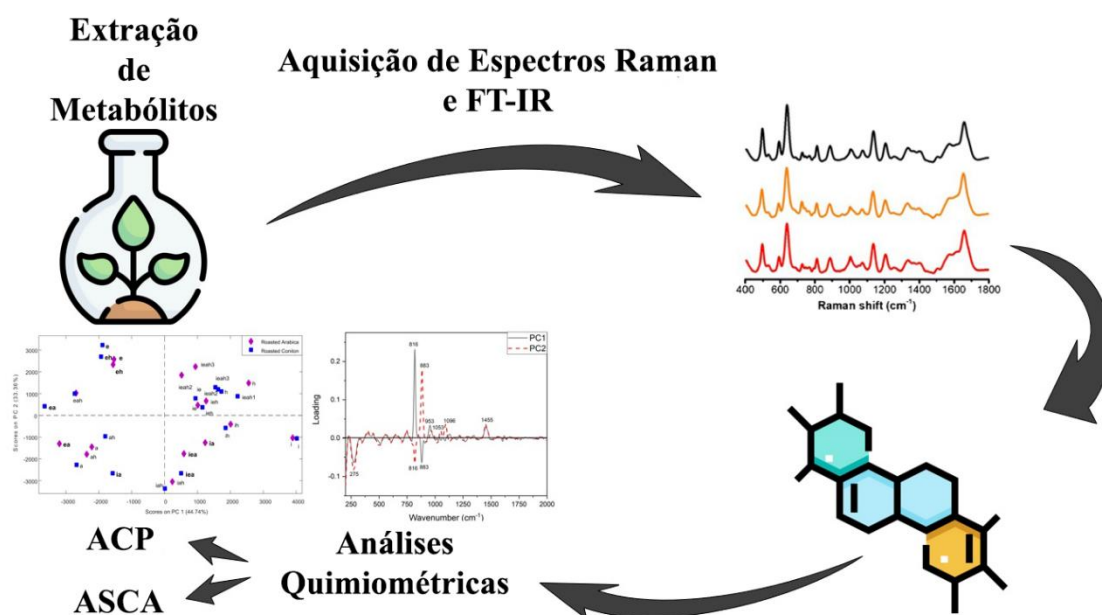
SOLUTION. O experimento foi executado com monitoramento entre 400 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , em ambiente sem luminosidade com temperatura média de 20° C, a partir de 10  $\mu\text{L}$  da solução extrativa que foram colocadas em pastilhas de KBr.

#### *1.4. Análise Estatística*

Os *softwares* Statistica 10.0 e Matlab 2016 foram usados para a análise quimiométrica dos dados espectroscópicos. Os espectros foram pré-processados e suavizados com janela de tamanho 9 (filtro de Savitzky-Golay) e centrados na média. O *software* Origin 2018 foi utilizado na plotagem dos gráficos dos *loadings*.

# Capítulo IV

## *Resultados e Discussões*



## 1. IMPRESSÃO DIGITAL ESPECTROSCÓPICA RAMAN

As impressões digitais de espectros Raman para os cafés verdes e torrados de *C. arabica* e *C. canephora* foram submetidas à análise exploratória por ACP para verificar o comportamento extrativo das diferentes misturas e componentes puros obtidas pelo planejamento de misturas. Além da análise entre as espécies (*C. arabica* × *C. canephora*) investigou-se o processamento da torra sobre a variação do perfil metabólico (verde × torrado). Como estratégia de mineração de dados, na análise exploratória, foram analisados todos os espectros Raman das misturas provenientes da Tabela 2, e na sequência analisou-se as impressões digitais com maior discriminação entre as classes.

### 1.1. Análise exploratória do efeito do solvente extrator nas impressões digitais de grãos de café das espécies *C. arabica* × *C. canephora*.

As duas primeiras componentes principais (CP) dos escores de café verde para ambas as espécies (Fig. 4a) indicaram o agrupamento de extratos em virtude do solvente extrator. Na região negativa da CP1 que explicou 51,66 % da variância total dos dados, formaram-se 3 grupos. Com maiores valores negativos na CP1, observa-se um agrupamento constituído predominantemente de etanol (Grupo 1), que por meio dos *loadings* (Fig. 4b) estão relacionados com metabólitos com grupos funcionais com bandas de absorção em 883, 1053 e 1096  $\text{cm}^{-1}$ , na qual 883  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a  $=\text{CH}_2$  da estrutura  $\text{R}_2\text{C}=\text{CH}_2$  de cadeias alifáticas conjugadas e de aromáticos que pode estar associado, por exemplo, a cafeína, 1053  $\text{cm}^{-1}$  a C – O de  $\text{CH}_2 - \text{OH}$  e 1096  $\text{cm}^{-1}$  a C – O de  $\text{R}_2\text{CH} - \text{OH}$ , que é característico de ácido quínico/ácido clorogênico, por exemplo.<sup>44</sup> Apresentando maiores valores positivos na segunda componente principal (CP2), os escores para as

misturas quaternárias (Grupo 2), estão relacionadas com os *loadings* com a bandas de absorção em 747, 816, 883, 1053 e 1455  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 4b), no qual 747  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a ligação -CH de um anel aromático orto ou meta-substituído, 816  $\text{cm}^{-1}$  é característico de =CH da estrutura  $\text{R} - \text{CH} = \text{CR}_2$  e 1455  $\text{cm}^{-1}$  é associado a -CH<sub>2</sub> de um carboidrato que é uma biomolécula presente no café, tais como xilose, glucose e ribose.<sup>44,45</sup> A água pura e a mistura binária água/hexano (*ah*) agruparam-se na região mais negativa da CP2 (Grupo 3 – Fig. 4a), logo estão associadas a absorção em 275  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 4b), que pode estar associada a um óxido metálico (metal-oxigênio-metal).<sup>46</sup> Vale salientar que em análises metabolômicas de alimentos a região abaixo de 500  $\text{cm}^{-1}$  espectroscópica é pouco explorada.

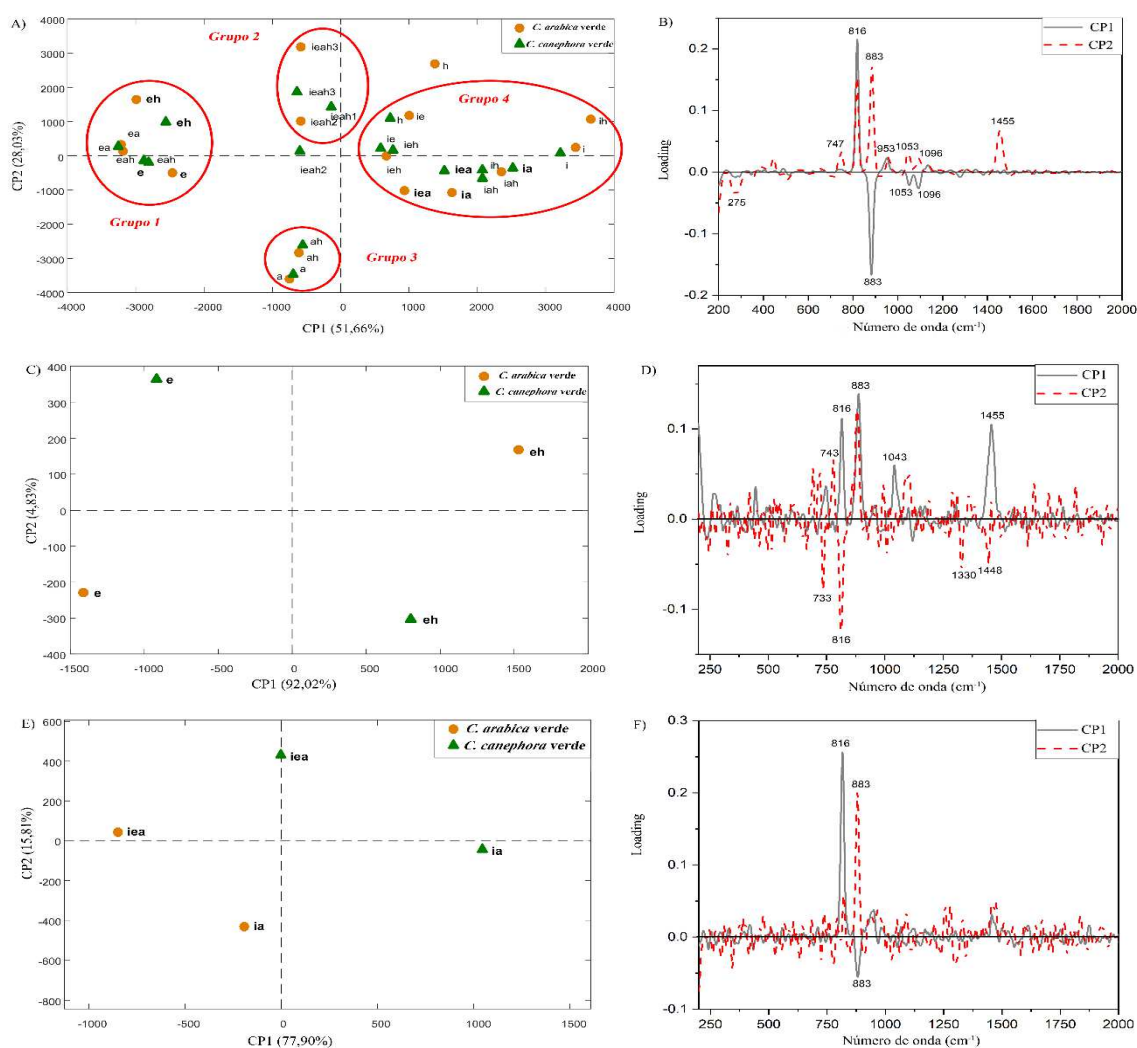
Na parte positiva da CP1 (Fig. 4a) há uma maior predominância de extratos com isopropanol (Grupo 4), sendo estes com os maiores valores dessa componente. As misturas com igual ou acima de 33 % de isopropanol apresentam acidez superior as misturas da CP1 negativa.<sup>47</sup> Desta forma misturas isopropílicas foram relacionadas com as bandas de absorção em 816, 953 e 1096  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 4b), na qual a banda em 816  $\text{cm}^{-1}$  é característico de =CH do fragmento  $\text{R} - \text{CH} = \text{CR}_2$  e a banda em 953  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao grupo OH de ácido carboxílico, o que pode indicar a presença de ácido quínico/ácido clorogênico.<sup>44</sup> Na CP2 observou-se uma discriminação pela polaridade dos solventes, já que em média a polaridade dos solventes na CP2 negativa (6,20) é superior às misturas que estão na CP2 positiva (3,30). Dessa forma, estima-se que as estruturas absorvidas pelos solventes localizados na CP2 negativa tenham caráter mais polar do que aquelas encontradas na CP2 positiva.<sup>47</sup> Essa discrepância é causada principalmente pela presença da água na CP2 negativa, que além da água pura (*a*) é encontrada nas misturas binárias água/hexano, isopropanol/água (*ah*, *ia*) e terciárias isopropanol/etanol/água, isopropanol/água/hexano e etanol/água/hexano (*iea*, *iah*, *eah*).

A maior variância entre as impressões digitais investigadas entre os grãos verdes foi dada pelas características do solvente extrator, de acordo com os escores da ACP, porém inspeções nos grupos de solventes similares são necessários a fim de encontrar os sistemas discriminadores que evidenciem as diferenças entre as espécies de café. No Grupo 1 as misturas etanol/hexano (*eh*) e etanol (*e*), e no Grupo 4 isopropanol/etanol/água (*iea*) e isopropanol/água (*ia*) apresentaram um distanciamento que na ACP pode indicar uma informação relevante na discriminação das classes de café. Deste modo, a fim de maximizar essa discriminação e explorar esses dados, uma nova ACP foi realizada com as impressões digitais  $eh \times e$  e  $iea \times ia$ .

A comparação entre  $eh \times e$  indicou pela CP1 (92,02 %) a discriminação das impressões digitais em virtude da característica do solvente extrator, visto que na região positiva da CP1 localizaram-se as impressões digitais *eh* e na negativa as impressões digitais *e* (Fig. 4c). A acidez, basicidade, e dipolaridade do solvente *e* são respectivamente: 0,52; 0,19 e 0,29 enquanto que da mistura *eh* são, respectivamente: 0,26; 0,09 e 0,15 o que indica que os parâmetros químicos supracitados do *e* são em média duas vezes maiores em relação a *eh*.<sup>47</sup> Ambos os escores *eh* tiveram os maiores valores positivos na CP1, por isso as bandas de absorção em 816, 883, 1043 e 1455  $\text{cm}^{-1}$  tiveram maior relevância para estes solventes nos *loadings*, no qual 1043  $\text{cm}^{-1}$  pode representar uma ligação C-H fora do plano de um anel piridínico, característico da trigonelina, alcaloide presente no café<sup>44</sup> (Fig.4d). Já a CP2 discriminou as espécies de café a partir das impressões digitais *e* e *eh* (Fig. 4c). Na CP2 (4,83 %) a impressão digital *e* para *C. canephora* e *eh* para *C. arabica* tiveram valor positivo nesta CP, logo, os metabólitos com banda de absorção em 743 e 883  $\text{cm}^{-1}$  são responsáveis pela diferenciação entre as espécie de café, que por sua vez refere-se ao H adjacente ligado a um aromático, que podem estar

associados, por exemplo, a cafeína, ácido cafeico, e compostos oriundos da degradação do ácido quínico/ácido clorogênico.<sup>44,48</sup> Na região negativa da CP2 localizaram-se a impressão digital *eh* de *C. canephora* e *e* para *C. arabica*. Por meio dos *loadings*, as bandas de absorção em 816 e 733  $\text{cm}^{-1}$  foram as mais importantes na separação das classes nessa CP (Fig. 4d). Em adição, metabólitos com bandas em 1330 e 1448  $\text{cm}^{-1}$  também foram responsáveis nesta separação.

A análise exploratória entre as impressões digitais *iea*  $\times$  *ia* para ambas as espécies de café indicou pela CP1 (77,90 %) a separação entre as espécies, na qual na parte negativa ficaram os extratos de *C. arabica* e na região positiva os de *C. canephora* (Fig. 4e). A CP2 (15,81 %) mostrou a diferenciação pelos solventes, sendo a parte negativa composta pela impressão digital por *ia*, e a positiva por *iea*. O escore *iea* de *C. canephora* teve o maior valor na CP2 positiva, desta forma esta mistura é responsável pelo sinal em 883  $\text{cm}^{-1}$ . O *ia* da mesma espécie teve o maior ponto na CP1 na qual se atribui o sinal em 816  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 4f), enquanto que *ia* da espécie *C. arabica* foi disposto na região de maior valor negativo da CP1, sendo associada com número de onda em 883  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 4** - a) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos verdes de café das espécies *C. arabica* (●) e *C. canephora* (▲) obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas de 4 componentes. b) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes. c) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos de café verde das espécies *C. arabica* (●) e *C. canephora* (▲) obtidos a partir dos solventes etanol (*e*) e etanol/hexano (*eh*). d) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes para os solventes etanol (*e*) e etanol/hexano (*eh*). e) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos de café verde das espécies *C. arabica* (●) e *C. canephora* (▲) obtidos a partir do solventes isopropanol/água (*ia*) e isopropanol/etanol/água (*iea*). f) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes para os solventes isopropanol/água (*ia*) e isopropanol/etanol/água (*iea*).

A ACP das impressões digitais das espécies de café torrado apresentou comportamento similar aos grãos verdes por parte das misturas. A CP1 negativa foi

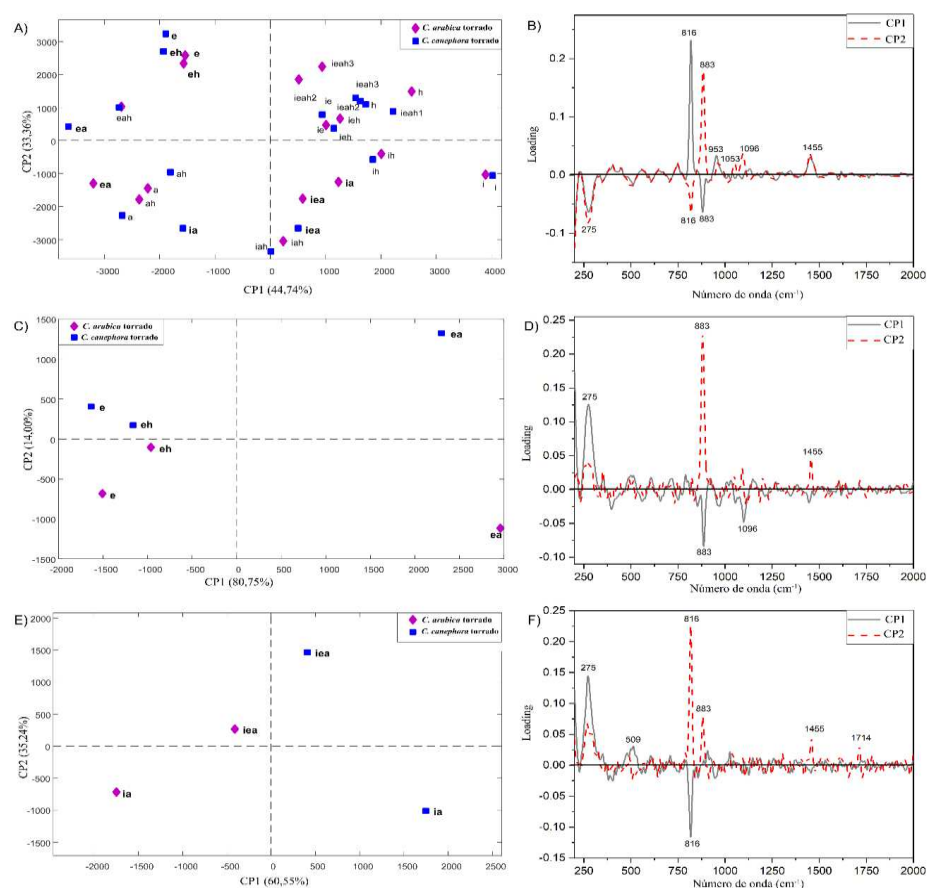
composta por misturas que apresentaram no mínimo 33 % de etanol ou água em sua composição. Na CP1 positiva ficaram as misturas com isopropanol (Fig. 5a), sendo o solvente puro de isopropanol de ambas espécies com o maior valor nesta CP. Por meio dos *loadings* da CP1 (Fig. 3b) as bandas de absorção em 816, 953 e 1455  $\text{cm}^{-1}$  são relacionadas a esses solventes na região positiva. O etanol puro (*e*) e a mistura binária *eh* tiveram os maiores valores positivos na CP2 (33 %), onde foram importantes nessa CP (Fig. 3b) para os sinais em 883, 1053 e 1096  $\text{cm}^{-1}$ . A mistura binária de etanol/água (*ea*) apresentou o maior valor negativo da CP1, na qual é atribuído o sinal em 275  $\text{cm}^{-1}$ . Já as misturas ternárias isopropanol/água/hexano (*iah*) apresentaram os maiores valores negativos na CP2, por isso são atribuídos a 816 e 275  $\text{cm}^{-1}$ .

Considerando que a distância entre os pares de escores sugerem uma separação entre as classes (*C. canephora*  $\times$  *C. arabica*), pode-se verificar que expressaram uma separação discreta entre as espécies, enquanto que na região positiva *ia* e *iea* tiveram este comportamento de discriminar as espécies. Com o intuito de visualizar essa tendência, cada conjunto foi submetido a um novo modelo de ACP.

A comparação entre *e*, *eh* e *ea* apresentou uma separação das espécies pela CP2 (14,00 %), no qual na região negativa ficaram os extratos de *C. arabica* e na positiva, os de *C. canephora* e a mistura *ea* obteve o maior valor nesta CP, responsável pelo número de onda 883  $\text{cm}^{-1}$ . Pela CP1 (80,75 %) houve uma discriminação dos escores pelos solventes onde na parte negativa ficaram as misturas sem a água (*a*) e na parte positiva ficaram as misturas com a água (*a*) (Fig. 5c). As soluções etanólicas, *e* e *eh* concentraram-se na região mais negativa da CP1, assim, esse grupo é responsável pelas bandas de absorção em 883 e 1096  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 5d).

Os escores da mistura ternária *iea* e binária *ia* das espécies torradas tiveram discriminação análoga às espécies verdes, sendo na CP1 (60,55 %) a separação entre as

espécies e na CP2 (35,24 %) a discriminação pelos solventes. O *iea* de *C. canephora* apresentou impressão digital de maior valor na CP2 positiva (Fig. 3e) que corresponde aos sinais 816 e 883  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 5f). A estas misturas também são atribuídas as bandas de absorção em 1455 e 1714  $\text{cm}^{-1}$ , na qual 1714  $\text{cm}^{-1}$  é característico de C=O de uma cetona.<sup>44</sup> Os escores *ia* do *C. arábica* apresentou valores negativos na CP1, que nos *loadings* estão associados a 816  $\text{cm}^{-1}$ .

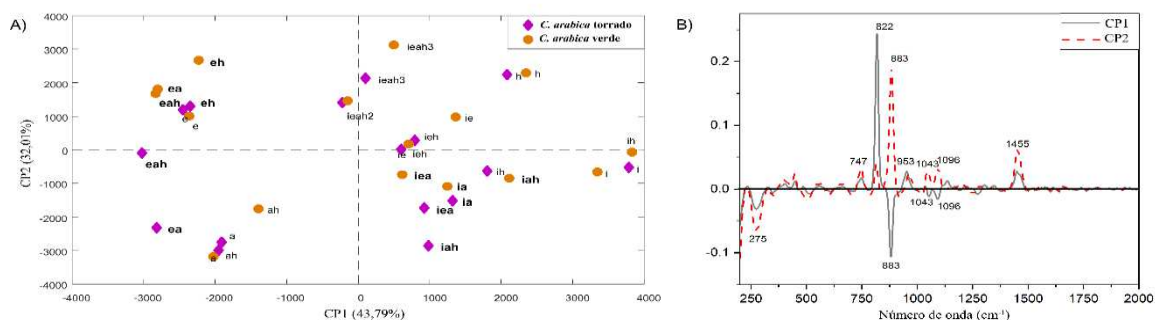


**Figura 5** - a) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos torrados de café das espécies *C. arabica* (♦) e *C. canephora* (■) obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas de 4 componentes. b) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos torrados. c) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos de café torrado das espécies *C. arabica* (♦) e *C. canephora* (■) obtidos a partir dos solventes etanol (*e*), etanol/hexano (*eh*) e etanol/água (*ea*). d) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos torrados para os solventes etanol (*e*), etanol/hexano (*eh*) e etanol/água (*ea*). e) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos de café torrado *C. arabica* (♦) e *C. canephora* (■) obtidos a partir dos solventes isopropanol/água (*ia*) e isopropanol/etanol/água (*iea*). f) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes para os solventes isopropanol/água (*ia*) e isopropanol/etanol/água (*iea*).

## 1.2. Análise exploratória do efeito do solvente extrator nas impressões digitais de grãos de café verdes × torrados

Ao explorar as impressões digitais Raman por ACP em razão do processamento do grão (verde x torrado) nota-se que ocorreu a separação dos escores pelos solventes, em virtude do solvente extrator. Ao analisar os extratos verdes e torrados de *C. arabica* nota-se que solventes aquosos e etanólicos dispuseram-se na CP1 negativa que explica 43,79 % da variabilidade dos dados (Fig. 6a). Essas misturas com os maiores valores negativos da CP1 expressaram nos *loadings* o sinal na banda de absorção em 883  $\text{cm}^{-1}$ . Os escores mais positivos da CP1 correspondem às misturas isopropílicas, que apresentaram maior peso na absorção em 822  $\text{cm}^{-1}$ , dessa forma, ainda que as misturas tenham propriedades distintas, como polaridade, extraíram o mesmo fragmento para ambos cafés, embora o sinal analítico das misturas isopropílicas seja superior. A estrutura absorvida em 822  $\text{cm}^{-1}$  é análoga a 816  $\text{cm}^{-1}$  <sup>44</sup>, no entanto, pela ação dos solventes possivelmente ocorreu este deslocamento.

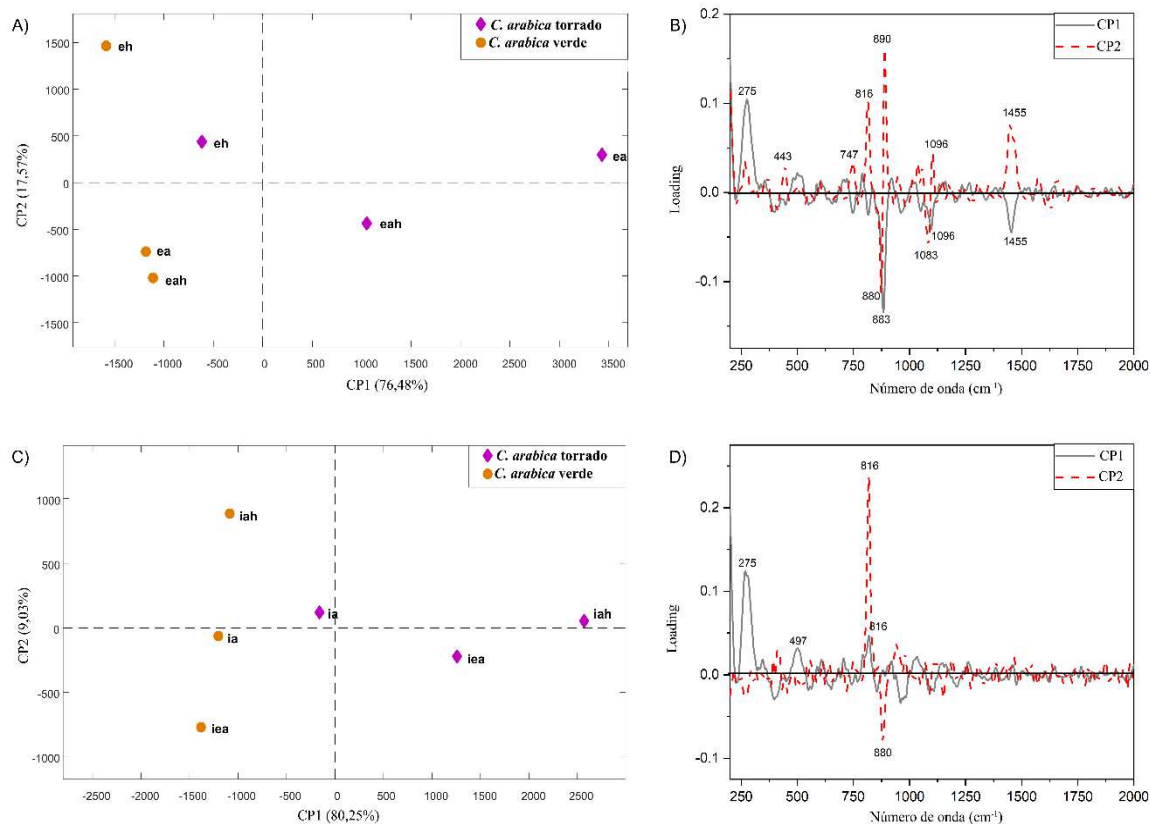
As soluções com no mínimo 25 % de etanol tiveram os maiores valores na CP2 positiva, com exceção do escore hexano puro (*h*) (Fig. 6a), e foram atribuídos aos sinais com absorção em 747, 883, 1043, 1096 e 1455  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 6B). Os escores com igual ou acima de 33 % de água na CP2 tiveram os maiores valores negativo (Fig.6a), logo são relacionados ao sinal em 275  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 6** - a) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos verdes (●) e torrados (◆) de café *C. arabica* obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas. b) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de *C. arabica*.

Apesar da variabilidade de todos os pontos do planejamento, observa-se que os escores *ea*, *eh*, *eah*, *iah*, *iea* e *ia* tanto para o café verde como no torrado tiveram as maiores separações. Pelo modelo com os solventes selecionados *eh*, *ea*, e *eah*, verifica-se pela CP1 (76,48 %) uma discriminação dos cafés (Fig. 7a), sendo que os extratos de café torrado tiveram os maiores pontos na CP1, o que permite atribuir a estes cafés a maior frequência em 275 cm<sup>-1</sup>, já que ele possui o maior valor na CP1 positiva. Os escores relacionados ao café verde ficaram localizados na região mais negativa da CP1, no entanto, é possível associá-los às bandas em 883 e 1455 cm<sup>-1</sup>. O *eh* do café verde teve o maior valor na CP2 (17,57 %), mostrando que a mistura etanol/hexano (1:1 v:v) extraiu metabólitos com grupos funcionais com bandas de absorção em 443, 747, 816, 890, 1096 e 1455 cm<sup>-1</sup>, nota-se nos *loadings* (Fig. 7b) que 275 cm<sup>-1</sup> também está relacionado com esse solvente extrator para o café verde.

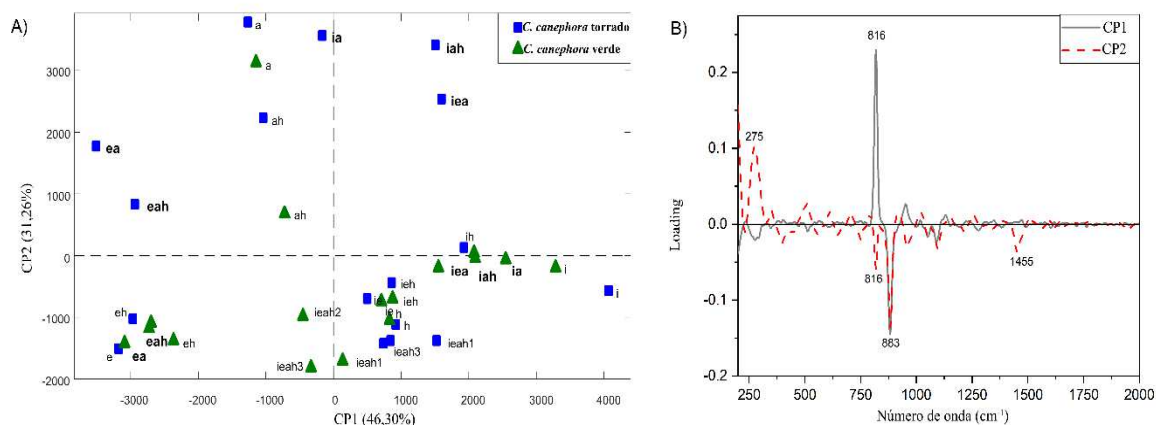
Os escores relacionados aos solventes *ia*, *iea* e *iah* (Fig. 7c) também mostraram os cafés torrados com valores mais positivos na CP1, sendo relacionados às bandas de absorção em 275 e 497 cm<sup>-1</sup> nos *loadings* (Fig. 7d). O *iah* do *C. arabica* verde apresentou o maior valor positivo na CP2, enquanto o *iea* do mesmo café apresentou maior valor na região negativa dessa CP, então as misturas representam, respectivamente os sinais em 816, região positiva, e 880 cm<sup>-1</sup> na negativa.



**Figura 7** - a) Gráfico dos escores Análise das Componentes Principais (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos de café *C. arabica* verde (●) e torrado (◆) obtidos a partir dos solventes isopropanol/água (*ia*), isopropanol/etanol/água (*iea*) e isopropanol/água/hexano (*iah*). b) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de *C. arabica*. c) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 x CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos de café *C. arabica* verde (●) e torrado (◆) obtidos a partir dos solventes isopropanol/água (*ia*), isopropanol/etanol/água (*iea*) e isopropanol/água/hexano (*iah*). d) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de *C. arabica*.

As impressões digitais Raman para o *C. canephora* verde e torrado (Fig. 8a) mantiveram o mesmo comportamento por parte dos solventes na CP1 (46,30 %) quando confrontada com as demais. Enquanto que nas comparações discutidas anteriormente as misturas aquosas ficaram na parte mais negativas na CP2, nesta análise, a misturas aquosas (pura e com proporções relativas) apresentaram os maiores valores positivos, que por sua vez estão relacionadas ao sinal em 275  $\text{cm}^{-1}$ . Pela CP1, confirmou-se que as

misturas isopropílicas apresentam o maior sinal em  $816\text{ cm}^{-1}$  e que, na região negativa tanto da CP1 como da CP2, misturas etanólicas estão associados ao sinal em  $883\text{ cm}^{-1}$ .

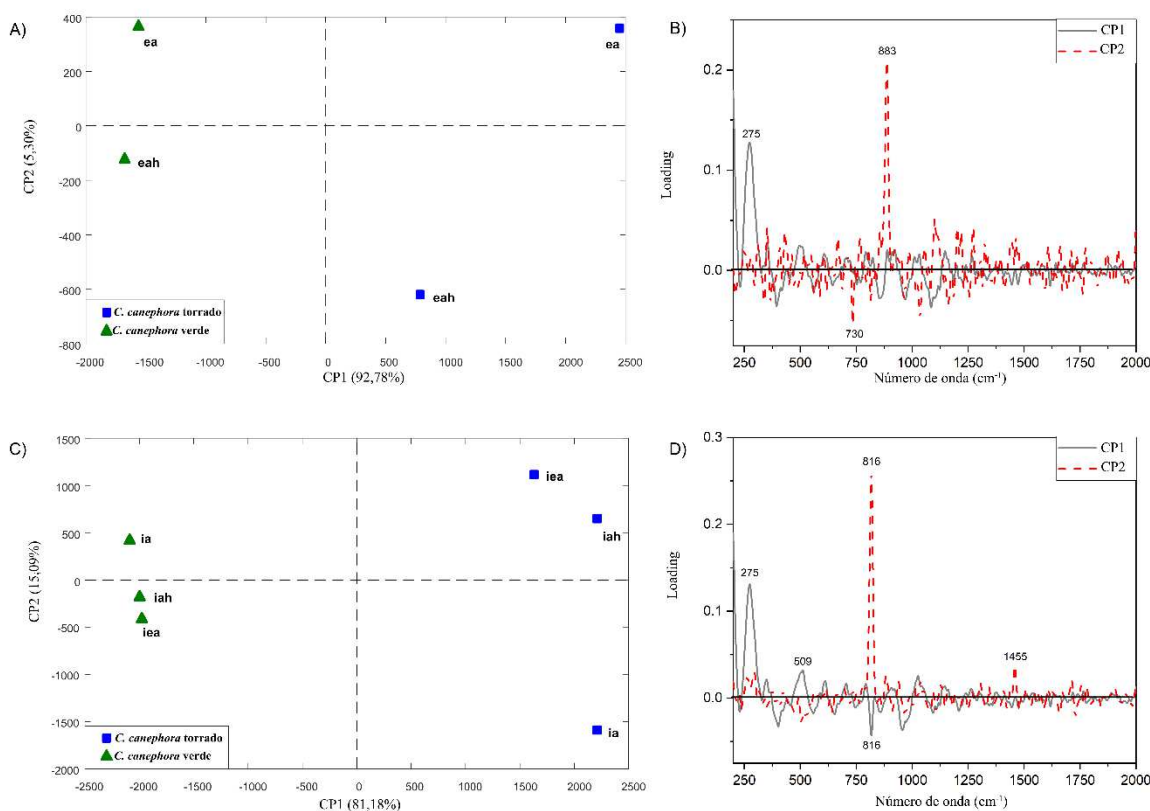


**Figura 8** - a) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos da espécie *C. canephora* verdes (▲) e torrados (■) obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas. b) Gráfico dos loadings para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de *C. canephora*.

A CP1 entre *ea* e *eah* (92,76 %) expressou a diferenciação dos cafés pela torra (processamento), já que os cafés torrados apresentaram os maiores valores na CP1 positiva enquanto que os cafés verdes ficaram nas regiões mais negativas desta componente (Fig. 9a). Como o *ea* torrado apresentou o maior ponto na CP1 positiva, a este solvente é atribuído ao sinal com absorção em  $275\text{ cm}^{-1}$ . Na parte negativa da CP2 (5,30 %) o maior valor negativo é de *eah* que é expresso nos loadings (Fig. 9b) em  $730\text{ cm}^{-1}$ , no qual pode estar associado a se ao H adjacente fora do plano ligado a um aromático.<sup>44</sup>

A ACP das misturas *iea*, *iah* e *ia* mostrou na CP1 (81,18 %) a separação dos cafés pelo processamento, na qual na parte positiva ficaram os extratos torrados e na região negativa os grãos verdes (Fig. 9c), portanto  $275\text{ cm}^{-1}$  teve maior relevância para o café torrado. O sinal mais evidente do loading também é atribuído ao café torrado, visto que os extratos desta amostra tiveram os maiores valores na CP2 (15,09 %). Os extratos de café verde também absorveram em  $816\text{ cm}^{-1}$  na CP2 positiva, porém, seu sinal analítico

sugere que a concentração neste tipo é menor, já que a intensidade do sinal é inferior (Fig. 9d).



**Figura 9** - a) Gráfico dos escores Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos verdes (▲) e torrados (■) da espécie *C. canephora* obtidos a partir dos extratos selecionados etanol/água (ea) e etanol/água/hexano (eah). b) Gráfico dos loadings para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de *C. canephora* para etanol/água (ea) e etanol/água/hexano (eah). c) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais Raman dos grãos verdes (▲) e torrados (■) da espécie *C. canephora* obtidos a partir dos extratos selecionados isopropanol/água (ia), isopropanol/etanol/água (iea) e isopropanol/água/hexano (iah). d) Gráfico dos loadings para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de *C. canephora* para isopropanol/água (ia), isopropanol/etanol/água (iea) e isopropanol/água/hexano (iah).

### 1.3. Análise exploratória do efeito do solvente extrator ea e iea através da Anova-Análise de Componentes Simultâneos (ASCA)

Os resultados da análise das ACPs dos extratos de café obtidos a partir das misturas binária etanol/água (1:1 v:v) e ternária isopropanol/etanol/água (1:1:1 v:v:v)

forneceram importantes informações espectroscópicas e promoveram maior discriminação tanto das espécies como pelas propriedades químicas entre os cafés analisados. Nesse contexto, a Análise de Variância (ANOVA)-Análise de Componentes Simultâneos foi aplicada à matriz de espectros Raman relacionados a essas misturas em 7 análises adicionais a fim de determinar a significância dos efeitos relativos aos fatores (processamento e espécie) sobre o conjunto de impressões digitais espectrais. Os *p*-valores foram calculados com base no teste de permutação com 10.000 randomizações. Nessa análise a mistura binária *ea* proporcionou efeitos significativos em relação à espécie, ao processamento e na interação (espécie × processamento) (Tabela 3), uma vez que os *p*-valores foram inferiores a 0,05. O fator com maior efeito foi o processamento (35,41 %). Isso indica que o processo de torra provocou mudanças nas impressões digitais metabólicas.

O processamento (verde × torrado) (Fig.10b) mostrou uma discriminação no qual os grãos verdes ficaram na CP1 positiva e os grãos torrados na região negativa dessa CP. Os *loadings* apresentaram sinais evidentes apenas na CP1 positiva onde se localizam os escores relacionados ao café verde e mostraram bandas de absorção na região positiva em 236, 883, 1049, 1087, 1273, 1452, 2931 e 2880  $\text{cm}^{-1}$  o que dá evidências de perda de metabólitos do café verde no processo de torra. As bandas 2880 e 2931  $\text{cm}^{-1}$  correspondem do estiramento -OH de um ácido carboxílico.<sup>44</sup>

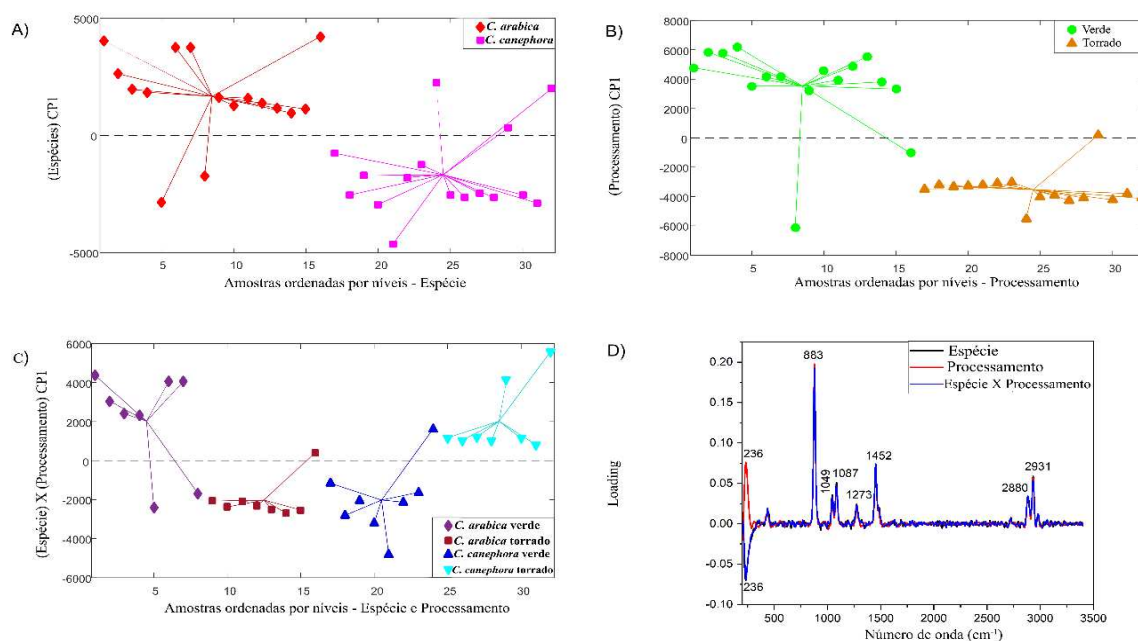
Em relação as espécies houve uma discriminação (Fig. 10a) no qual *C. arabica* se concentrou na CP1 positiva e o *C. canephora* na CP1 negativa. Nos *loadings* (Fig. 10d) a banda em 236  $\text{cm}^{-1}$  foi importante para o *C. canephora*, enquanto que as bandas de absorção em 883, 1049, 1087, 1273, 1452, 2880 e 2931  $\text{cm}^{-1}$  foram relacionadas ao *C. arabica*.

A interação (espécie x processamento) (Fig. 10c) forneceu importantes

informações a respeito das discriminações. Na CP1 positiva se dispuseram o *C. arabica* verde e o *C. canephora* torrado, enquanto que na CP1 negativa ficaram o *C. arabica* torrado e o *C. canephora* verde. De acordo com os *loadings* (Fig. 8d) a banda em  $236\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída ao *C. arabica* torrado e ao *C. canephora* verde, enquanto que os sinais 883, 1087, 1273, 1452, 2880 e  $2931\text{ cm}^{-1}$  foram relacionados ao *C. arabica* verde e o *C. canephora* torrado.

**Tabela 3** - Resultados da análise ASCA com efeito percentual e *p*-valor para *C. arabica* e *C. canephora* relacionados a mistura etanol/água (1:1 v:v)

	CPs	Efeito (%)	<i>p</i> -valor
Espécie	1	7,95	0,0164
Processamento	1	35,41	0,0001
Interação (Espécie×Processamento)	1	11,59	0,001
Média	-	0	-
Resíduos	-	45,05	-

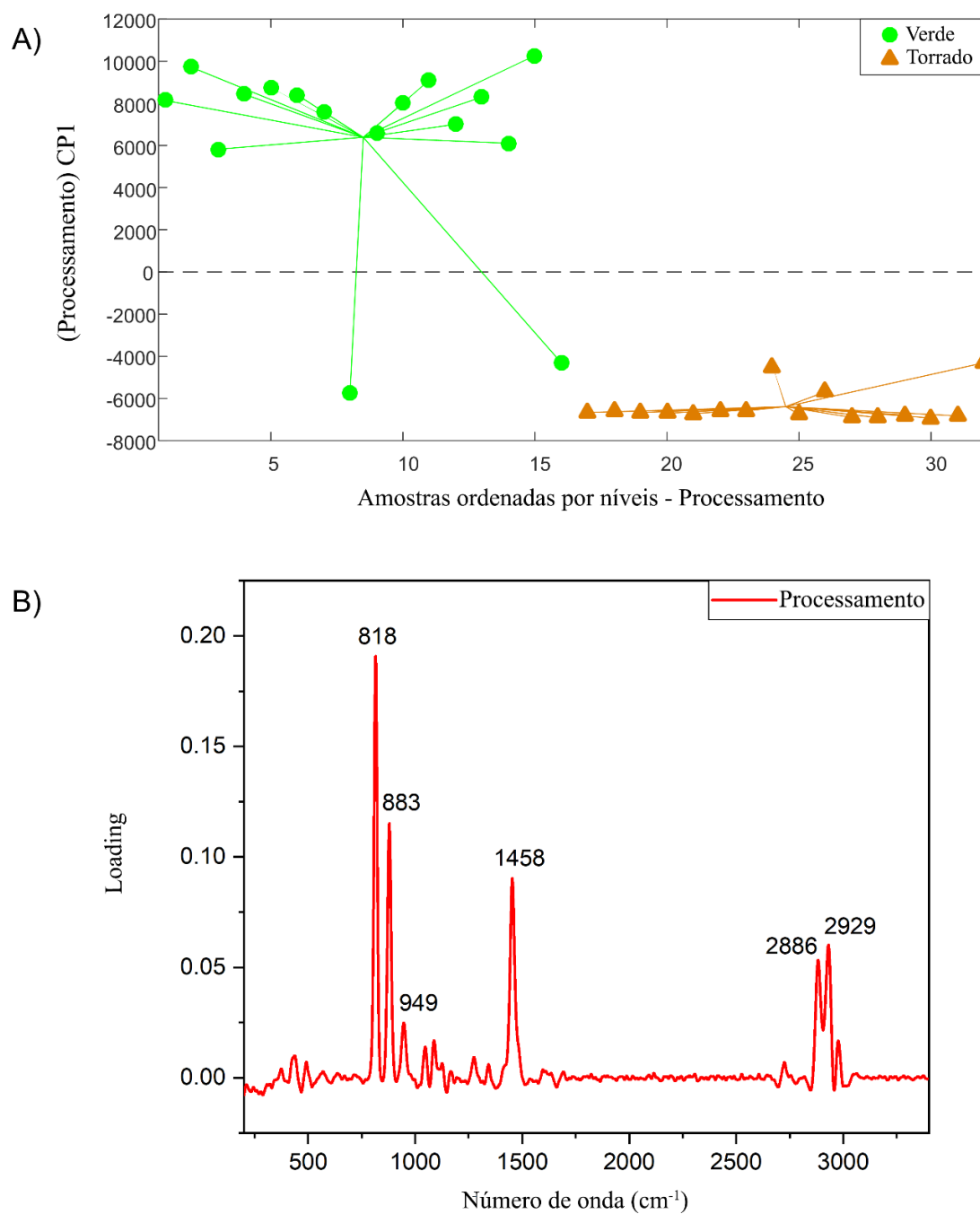


**Figura 10** – a) Gráfico dos escores da ANOVA-Análise de Componentes Simultâneos das impressões digitais espectrais Raman das espécies *C. arabica* (♦) × *C. canephora* (■) e obtidos a partir dos extratos selecionados etanol/água (*ea*). B) Gráfico dos escores da ANOVA-Análise de Componentes Simultâneos das impressões digitais espectrais Raman de processamento verde (●) × torrado (▲) e obtidos a partir dos extratos selecionados etanol/água (*ea*). c) Gráfico dos escores da ANOVA-Análise de Componentes Simultâneos das impressões digitais espectrais Raman da interação (espécie × processamento) e obtidos a partir dos extratos selecionados etanol/água (*ea*). d) Gráfico dos *loadings* para CP1 relacionado ao fator espécie, processamento e interação (espécie × processamento).

A mistura *iea* demonstrou significância estatística apenas em relação a processamento (verde × torrado) com 61,69 % de efeito para esse fator e *p*-valor de 0,0001. (Tabela 4). Nesse sentido o processo de torra também provocou mudanças nas impressões digitais metabólicas. Os escores relacionados ao processamento mostraram uma discriminação entre os grãos de café verdes e torrados, onde na CP1 positiva se localizaram os verdes e na CP1 negativa os torrados (Fig. 11a). Os *loadings* (Fig. 11b) apresentaram bandas de absorção apenas na CP1 positiva, em 818, 883, 949, 1458, 2886, e 2929  $\text{cm}^{-1}$ , no qual 2929  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a um estiramento assimétrico do da estrutura R-CH<sub>2</sub>-R de cadeias alifáticas. <sup>44</sup>

**Tabela 4** - Resultados da análise ASCA com efeito percentual e *p*-valor para *C. arabica* e *C. canephora* relacionados a mistura isopropanol/etanol/água (1:1:1 v:v:v)

	CPs	Efeito (%)	<i>p</i> -valor
Espécie	1	2,97	0,0743
Processamento	1	61,69	0,0001
Espécie x Processamento	1	2,52	0,1094
Média	-	0	-
Resíduos	-	32,82	-



**Figura 11** – a) Gráfico dos escores ANOVA-Análise de Componentes Simultâneos das impressões digitais espectrais Raman dos grãos de café verde (●) × café torrado (▲) das espécies *C. arabica* × *C. canephora* obtidos a partir dos extratos selecionados isopropanol/etanol/água (*iea*). B) Gráfico dos *loadings* para CP1 relacionado ao fator processamento.

**Tabela 5** - Atribuições espectro-estrutura para espectroscopia Raman

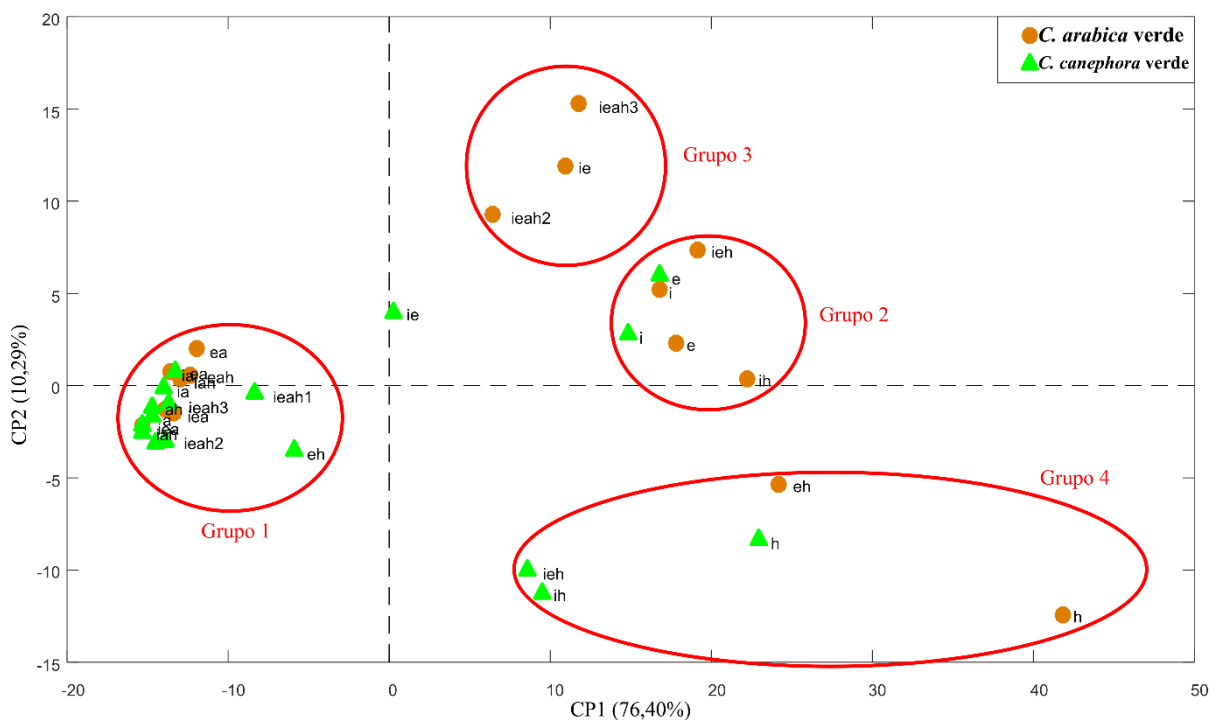
Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Banda de vibração	Estrutura/molécula
275	óxidos metálicos	<i>Não atribuído</i>
730 e 747	H “wag” fora do plano	Anel piridínico
743	H adjacente	Anel aromático
816	=CH “wag”	R-CH=CR <sub>2</sub>
883	=CH <sub>2</sub>	R <sub>2</sub> C=CH <sub>2</sub>
953	OH	Ácido carboxílico
1043	2-CH mono-substituído “rock”no plano	Anel piridínico
1053	Estiramento C-O	CH <sub>2</sub> -OH
1096	Estiramento C-O	R <sub>2</sub> CH-OH
1455	-CH <sub>2</sub>	carboidratos
1714	Estiramento C=O	cetona
2880 e 2931	Estiramento -OH	Ácido carboxílico
2929	Estiramento assimétrico	R-CH <sub>2</sub> -R de cadeias alifáticas

## 2. IMPRESSÃO DIGITAL ESPECTROSCÓPICA FT-IR

Para as impressões digitais de FT-IR os cafés verdes e torrados de *C. arabica* e *C. canephora* também foram submetidos a análise exploratória por ACP para verificar o comportamento extrativo em virtude do planejamento de misturas. Assim como para análise de Raman, as análises das componentes principais para FT-IR foram realizadas entre as espécies e o processamento da torra na variação do perfil metabólico (verde × torrado). Todos os espectros são provenientes de extratos preparados de acordo com a Tabela 2.

### 2.1. Análise exploratória do efeito do solvente extrator nas impressões digitais de grãos de café das espécies *C. arabica* × *C. canephora*

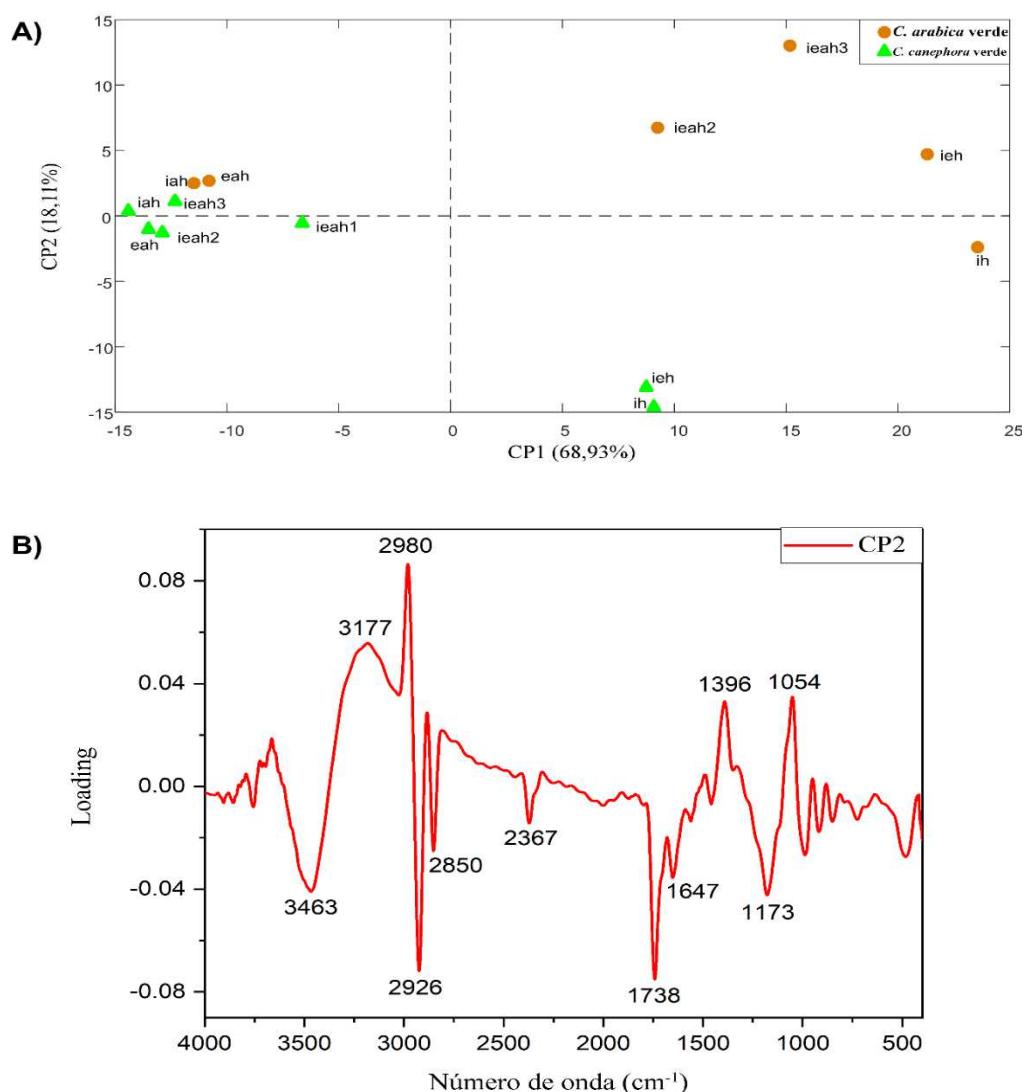
Os escores de café verde para ambas as espécies (Fig. 12) mostraram a formação de quatro grupos. Na região negativa da CP1 (76,40 %) observa-se um agrupamento constituído predominantemente por água, tanto de maneira pura como nas misturas binárias (1:1 v:v), terciárias (1:1:1 v:v:v) e quaternárias (1:1:1:1 v:v:v:v) (Grupo 1). Já na região positiva da CP1 ficaram dispostas misturas e solventes puros contendo isopropanol, etanol e hexano (Grupo 2). Na região mais positiva da CP2 (10,29 %) as misturas com no mínimo 25 % de álcoois (Grupo 3) tiveram maior importância enquanto que na região mais negativa dessa CP as misturas com no mínimo 33 % de hexano (Grupo 4) tiveram maior peso. A discrepância entre o Grupo 2 e 4 se dá em função da presença do hexano no Grupo 4 o que contribui na diferença das médias de polaridade. Segundo os parâmetros de Snyder a média de polaridade das misturas do Grupo 2 é 4,35 enquanto que do Grupo 4 é 1,70.<sup>49</sup>



**Figura 12** - Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais FT-IR dos grãos verdes de café das espécies *C. arabica* (●) e *C. canephora* (▲) obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas de 4 componentes.

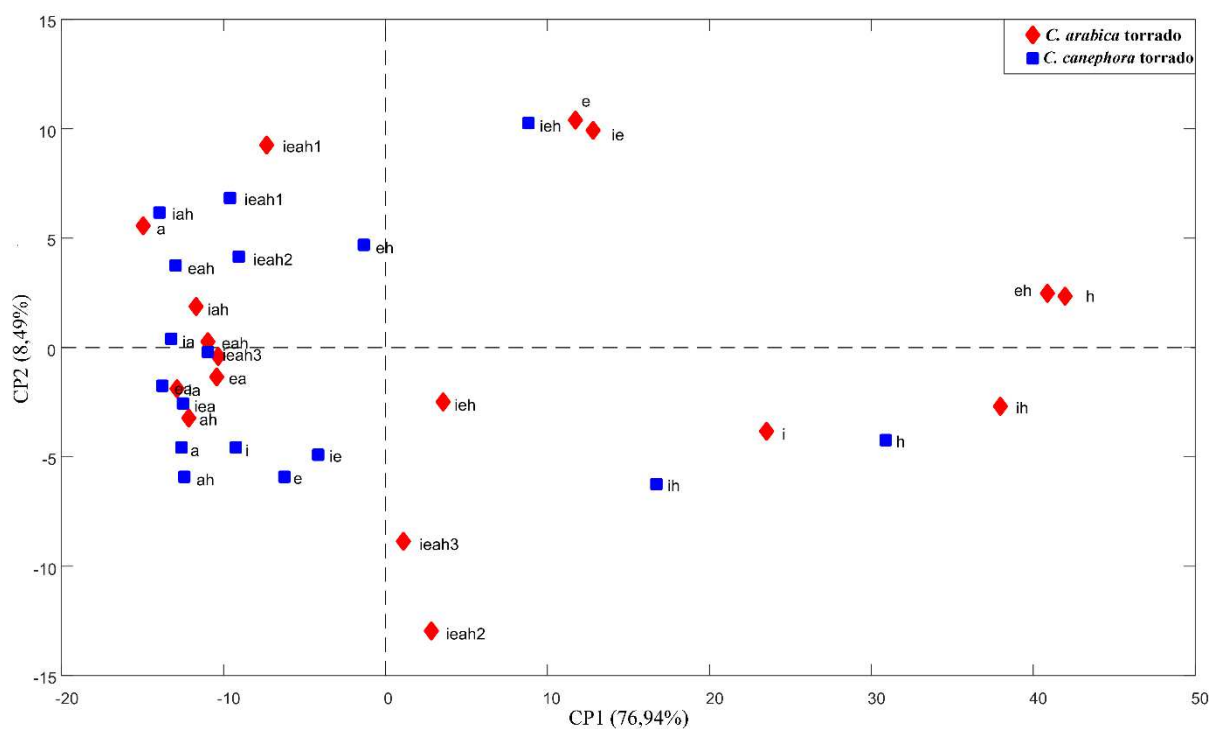
Uma vez que a variância entre as impressões digitais entre os grãos verdes foi gerada em função do solvente extrator, algumas inspeções nos grupos de solventes foram feitas a fim de encontrar os sistemas discriminadores mais específicos através de uma nova ACP. Os escores da seleção (Fig. 13a) mostraram separações em grupos de misturas. Na CP1 (68,93 %) negativa ficaram dispostas as misturas ternárias e quaternárias relacionadas a ambas as espécies de café. Na CP2 (18,11 %) positiva as misturas quaternárias relacionadas ao *C. arabica* mostraram importância nos *loadings* (Fig. 13b) associados aos metabólitos com grupos funcionais com bandas de absorção em 3177, 2980, 1396 e em 1054  $\text{cm}^{-1}$ . As misturas isopropanol/hexano (*ih*) e isopropanol/etanol/hexano (*ieh*) ficaram localizados na CP2 negativa e nos *loadings* foram atribuídas aos sinais de absorção em 3463, 2926, 2367, 1738, 1647 e 1173  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas entre 3500-3000  $\text{cm}^{-1}$  são relacionadas ao a estiramento N-H de um anel piridínico<sup>46</sup>, então 3463 e 3177  $\text{cm}^{-1}$  podem estar associadas às xantinas. O estiramento

O-H de um ácido carboxílico ocorre na região  $3200\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$ , logo  $2980$ ,  $2926$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$  podem estar relacionadas a metabólitos com esse grupo funcional, como o ácido quínico/ácido clorogênico, por exemplo. O estiramento C=N ocorre entre  $1830\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ , logo  $1647\text{ cm}^{-1}$  possivelmente corresponde a cafeína ou outra xantina.<sup>20</sup> A região  $1179\text{-}1166\text{ cm}^{-1}$  é atribuída a um estiramento C-O de ésteres<sup>20,50</sup>, por isso a banda de absorção em  $1173\text{ cm}^{-1}$  pode estar relacionada a um metabólito com esse grupo funcional. Já a banda em  $1054\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída a um estiramento C-OH de um álcool primário.<sup>50</sup>



**Figura 13** - a) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais FT-IR dos grãos verdes de café das espécies *C. arabica* (●) e *C. canephora* (▲) obtidos a partir dos extratos selecionados. b) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes de café das espécies *C. arabica* e *C. canephora* obtidos a partir dos extratos selecionados.

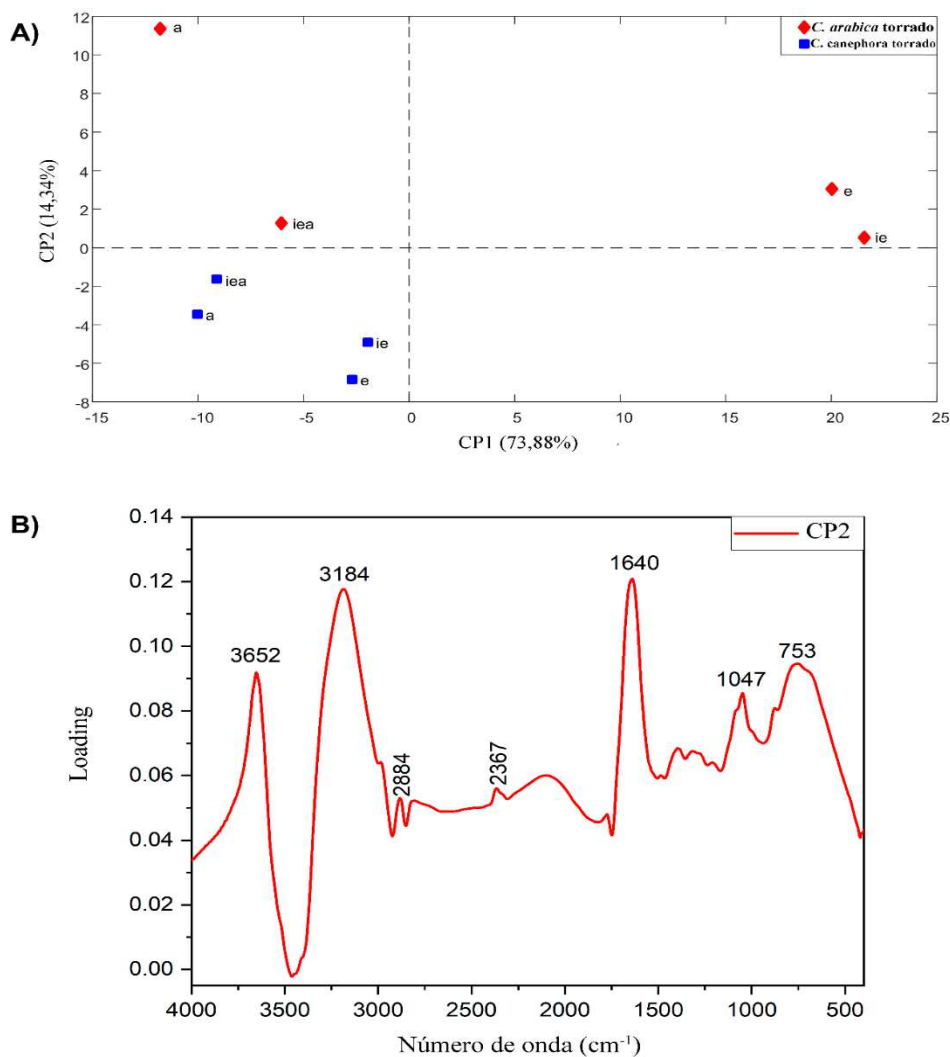
A análise das componentes principais das espécies de café torrado (Fig.14) mostrou relativas diferenças em relação aos grãos verdes. Na CP1 negativa diversos perfis de misturas ficaram dispostas e não promoveram uma discriminação metabolômica. Já na região mais positiva dessa CP misturas com no mínimo 50 % de hexano tiveram maior relevância.



**Figura 14** - Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais FT-IR dos grãos torrados de café das espécies *C. arabica* (♦) e *C. canephora* (■) obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas de 4 componentes.

Em uma nova ACP de seleção de solventes (Fig. 15a) uma separação das espécies ocorreu através da CP2 onde na parte positiva ficaram os escores do *C. arabica* e na negativa os escores do *C. canephora*. Os escores mais positivos na CP2 foram responsáveis pelas bandas de absorção em 3652, 3184, 2884, 2367, 1640, 1047 e 753  $\text{cm}^{-1}$  nos *loadings* (Fig.15b). A região entre 3670 e 3580  $\text{cm}^{-1}$  representa um estiramento O-H ligado de forma intermolecular com um hidrogênio<sup>46,50</sup>, por isso 3652  $\text{cm}^{-1}$  pode ter representado essa interação. A banda em 753  $\text{cm}^{-1}$  compreende a região entre ao H

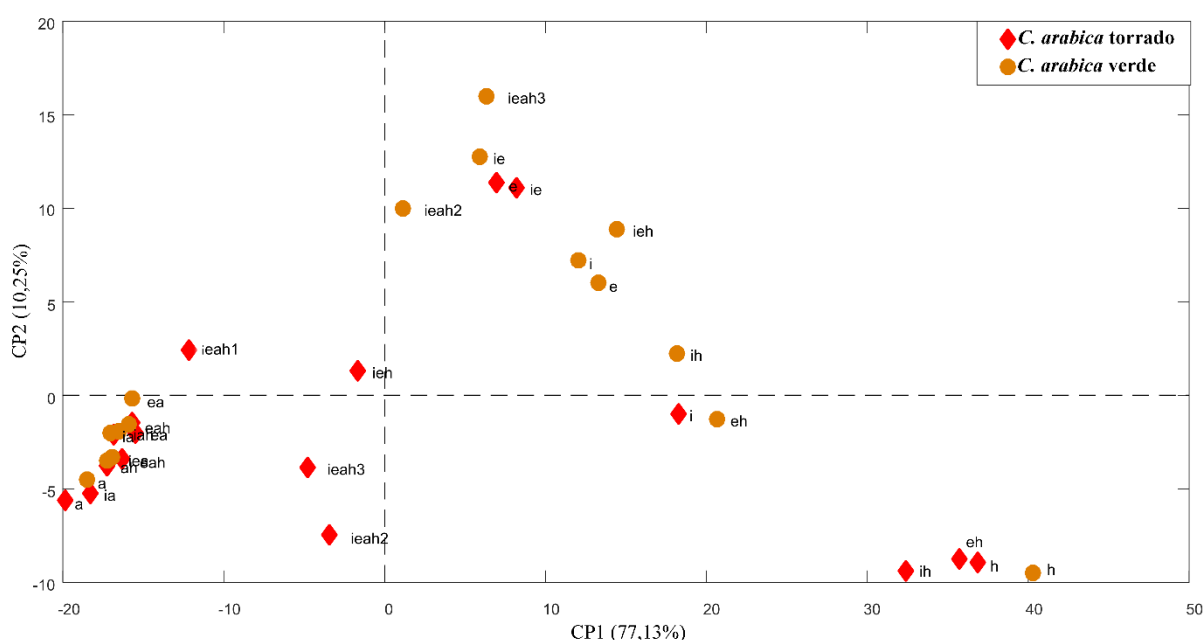
adjacente ligado a um aromático<sup>46</sup> e pode estar associada a cafeína e compostos de degradação do ácido quínico/clorogênico, por exemplo. As misturas ternárias *iea* foram importantes na separação entre as espécies e podem ter extraídos metabólitos que agiram como biomarcadores das espécies.



**Figura 15** - a) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais FT-IR dos grãos torrados de café das espécies *C. arabica* (♦) e *C. canephora* (■) obtidos a partir dos extratos selecionados. b) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos torrados de *C. arabica* e *C. canephora* obtidos a partir dos extratos selecionados.

## 2.2. Análise exploratória do efeito do solvente extrator nas impressões digitais de grãos de café em verdes × torrados

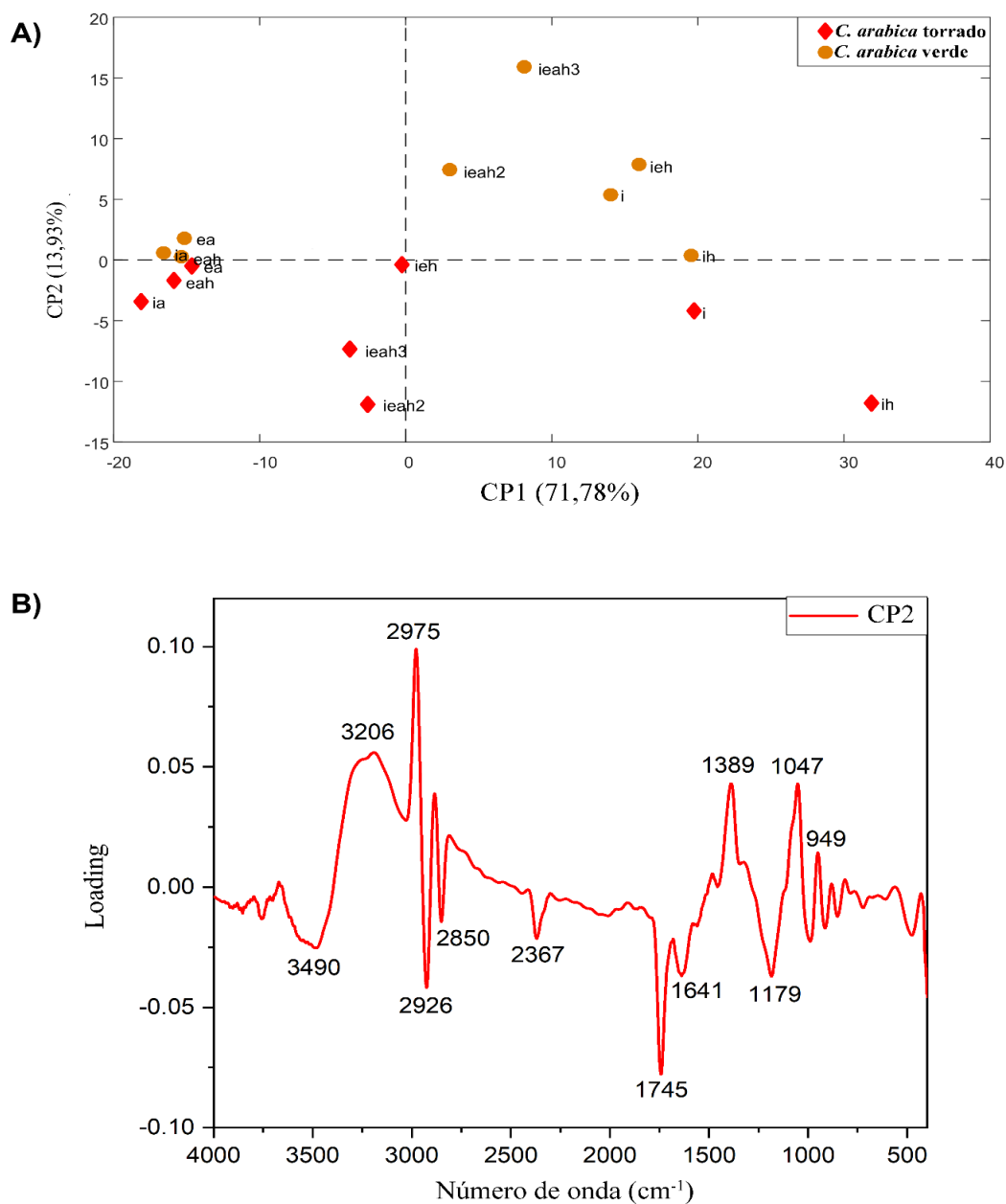
As impressões digitais FT-IR por ACP (Fig.16) em função do processamento (verde × torrado) de *C. arabica* mostraram separações dos escores através dos solventes pelo perfil químico. Na parte mais positiva da CP1 (77,13 %) e mais negativa da CP2 (10,25 %) as misturas com no mínimo 50 % de hexano tiveram os maiores valores.



**Figura 16** - Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais FT-IR dos grãos da espécie *C. arabica* verdes (●) e torrados (◆) obtidos a partir do planejamento estatístico de misturas de 4 componentes.

Os escores dos solventes selecionados (Fig. 17a) promoveram uma separação do processamento de *C. arabica* por meio da CP2 onde na parte positiva ficam distribuídos os extratos de café verdes e na parte negativa os torrados. O solvente isopropanol puro (*i*), as misturas isopropanol/etanol/hexano (*ieh*) e as misturas quaternárias relacionados aos escores de café verde expressaram importância nos *loadings* nas bandas de absorção em 3206, 2975, 1389, 1047 e 949  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto que o solvente puro isopropanol (*i*), a

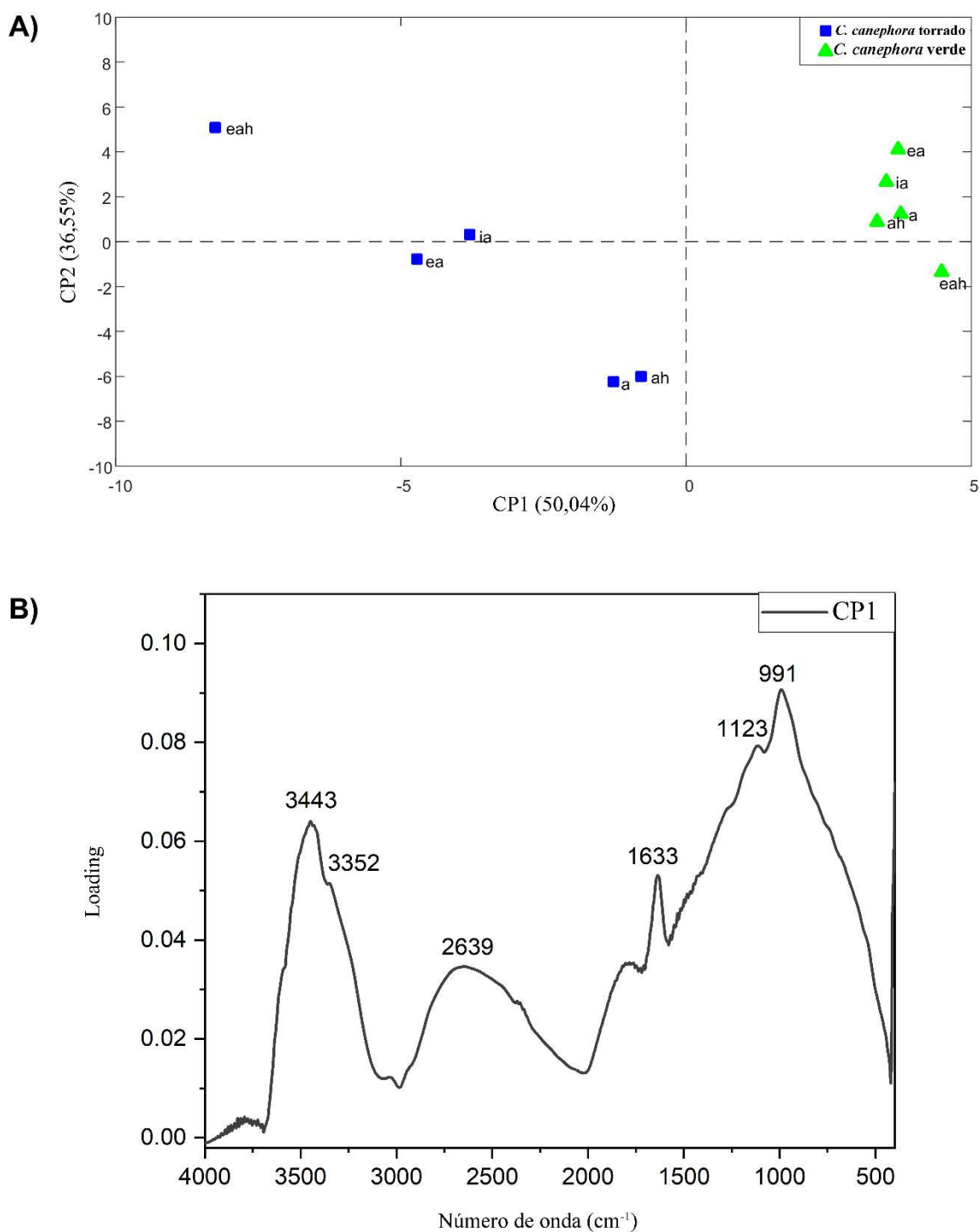
mistura binária isopropanol/hexano (*ih*) e misturas quaternárias relacionadas ao café torrado apresentaram maior importância nos *loadings* em 3490, 2926, 2850, 2367, 1745, 1641 e 1179  $\text{cm}^{-1}$ , no qual 3490 pode ser atribuído a um estiramento N-H de um anel piridínico.<sup>46</sup>



**Figura 17** - a) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1  $\times$  CP2) das impressões digitais espectrais FT-IR dos grãos verdes (●) e torrados (◆) da espécie *C. arabica* obtidos a partir dos extratos selecionados. b) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de *C. arabica*



presença do hexano nas misturas binárias e terciárias.



**Figura 19** - a) Gráfico dos escores da Análise das Componentes Principais (CP1 × CP2) das impressões digitais espectrais FT-IR dos grãos verdes (▲) e torrados (■) da espécie *C. canephora* obtidos a partir dos extratos selecionados. b) Gráfico dos *loadings* para CP1 e CP2 dos grãos verdes e torrados de *C. canephora*.

**Tabela 6** - Atribuições espectro-estrutura para espectroscopia FT-IR

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Banda de vibração	Estrutura/molécula
3670-3580	Estiramento O-H ligado de forma intermolecular com H	<i>Não atribuído</i>
3500-3000	Estiramento N-H	Anel piridínico
1830-1650	Estiramento C=N	Xantinas
1660-1630	Estiramento C=O	Cadeias alifáticas conjugadas
1054	C-OH	Álcool primário
753	H adjacente	Anel aromático

# **Capítulo V**

## ***Conclusão***

## CONCLUSÃO

As técnicas espectroscópicas Raman e FT-IR associadas às ferramentas quimiométricas mostraram, através de evidências experimentais, as principais impressões digitais na discriminação tanto das espécies de *C. arabica* e *C. canephora* como do processamento (verde × torrado). Na espectroscopia Raman, tanto a análise das componentes principais como a ANOVA-análise de componentes simultâneos promoveram informações metabólicas de grande relevância. O método ASCA confirmou, por meio das mudanças espectrais, as discriminações tanto das espécies como do processamento do café enquanto que a espectroscopia FT-IR, através dos solventes selecionados, mostraram discriminações das espécies de *C. arabica* e de *C. canephora* e do processamento somente pela ACP.

Na análise exploratória da técnica Raman, a análise das componentes principais mostrou que existem diferenças entre as espécies *C. arabica* e *C. canephora* e no processamento (verde × torra), no qual a mistura ternária etanol/água/isopropanol (1:1:1 v:v:v) promoveu separações entre as espécies de *C. canephora* e *C. arabica* enquanto que a mistura binária etanol/água (1:1 v:v) foi importante na discriminação em relação ao processamento (verde × torrado) de *C. canephora* (Fig. 7a e 9a). A Análise de Variância (ANOVA)-Análise de componentes simultâneos confirmou as diferenças identificadas pela ACP mostrando que o extrato preparado na mistura binária etanol/água (1:1 v:v) mostrou diferença nos efeitos de processamento, espécies bem como das interações entre eles, devido as mudanças espectrais dos diferentes metabólitos. O extrato da mistura ternária etanol/água/isopropanol (1:1:1 v:v:v) mostrou a diferença entre os cafés apenas no processamento, uma vez que os metabólitos extraídos por essa mistura são diferentes em relação aos metabólitos extraídos por outros solventes.

Na análise exploratória referente a espectroscopia FT-IR foi possível detectar nas ACPs dos solventes selecionados discriminações entre as espécies e também no processamento e, assim como os espectros Raman, as misturas etanol/água (1:1 v:v) e etanol/água/isopropanol (1:1:1 v:v:v) foram as misturas que promoveram maiores discriminações. As ACPs do processamento (verde × torrado) de *C. canephora* mostraram que a mistura binária etanol/água (1:1 v:v) foi um dos solventes discriminadores através da CP1 (Fig. 19a). Em relação as espécies de café torrado, a mistura ternária etanol/água/isopropanol (1:1:1 v:v:v) foi uma das misturas que promoveram a separação das espécies torradas *C. arabica* e *C. canephora* (Fig. 15a).

## REFERÊNCIAS

1. Souard, F. *et al.* Metabolomics fingerprint of coffee species determined by untargeted-profiling study using LC-HRMS. *Food Chemistry* **245**, 603-612 (2017).
2. Levi, M. A. B., Scarminio, I. S., Poppi, R. J. & Trevisan, M. G. Three-way chemometric method study and UV-Vis absorbance for the study of simultaneous degradation of anthocyanins in flowers of the *Hibiscus rosa-sinensis* species. *Talanta* **62**, 299–305 (2004).
3. Seidel, V. Initial and Bulk Extraction. *Natural Products Isolation* **20**, 27–46 (2006).
4. Al-Achi, A. *An Introduction to botanical medicines*. (Praeger Publishers, 2008)
5. Ahmad, R., Ahmad, N., Al-anaki, W. S., Ismail, F. A. & Al-jishi, F. Solvent and temperature effect of accelerated solvent extraction ( ASE ) coupled with ultra-high-pressure liquid chromatography ( UHPLC-PDA ) for the determination of methyl xanthines in commercial tea and coffee Department of Natural Products and Alterna. *Food Chemistry* **311**, 126021 (2020).
6. Sridevi, V., Giridhar, P. & Ravishankar, G. a. Evaluation of Roasting and Brewing effect on Antinutritional Diterpenes-Cafestol and Kahweol in Coffee. *Global Journal of Medical research* **11**, 1–7 (2011).
7. *Associação Brasileira da Indústria do café*. Disponível em: <https://www.abic.com.br/estatisticas/indicadores-da-industria/>. (Acessado em: 20 de julho de 2020).
8. Ruas, J., Salvador, M. & Amazonas, L. Acompanhamento da Safra Brasileira. *Companhia Nacional de Abastecimento* **7**, 1–89 (2020)

9. Brasil. *Companhia Nacional de Abastecimento*. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe>. Acessado em: 20 de julho de 2020)
10. Agnoletti, B. Z., Oliveira, E. C. da S., Pinheiro, P. F. & Saraiva, S. H. Discrimination of arabica and conilon coffee from physicochemical properties allied to chemometrics. *Revista Virtual de Química* **11**, 785–805 (2019).
11. Matulová, M., Capek, P., Kaneko, S., Navarini, L. & Liverani, F. S. Structure of arabinogalactan oligosaccharides derived from arabinogalactan-protein of *Coffea arabica* instant coffee powder. *Carbohydrate Research* **346**, 1029–1036 (2011).
12. Durán, C. A. A. *et al.* Coffee: General aspects and its use beyond drink. *Revista Virtual de Química* **9**, 107–134 (2017).
13. Farah, A. & Donangelo, C. M. Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **18**, 23–36 (2006).
14. Farah, A. *Coffe: Emerging Health Effects and Disease Prevention*. (Blackwell Publishing Ltd, 2012). doi:10.1002/9781119949893.ch2
15. Delaroza, F. Estudo Dos Metabólitos Nas Diferentes Condições De Luz E Plantios De Folhas E Grãos. (2015).
16. Canuto, G. A. B. *et al.* Metabolômica: Definições, Estado-Da-Arte E Aplicações Representativas. *Química Nova* **41**, 75–91 (2018).
17. Hečimović, I., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D. & Komes, D. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chemistry* **129**, 991–1000 (2011).
18. Nebesny, E. & Budryn, G. Evaluation of sensory attributes of coffee brews from robusta coffee roasted under different conditions. *European Food Research and Technology* **224**, 159–165 (2006).

19. Frega, N. G., Pacetti, D., Mozzon, M. & Balzano, M. *Authentication of Coffee Blends. Coffee in Health and Disease Prevention* (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/B978-0-12-409517-5.00012-7.
20. Terrile, A., Marcheafave, G.G., Oliveira, G. S., Rakocevic, M., Bruns, R. E. & Scarminio, I. S. Chemometric Analysis of UV Characteristic Profile and Infrared Fingerprint Variations of. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **27**, 1254–1263 (2016).
21. Cevallos-Cevallos, J. M., Reyes-De-Corcuera, J. I., Etxeberria, E., Danyluk, M. D. & Rodrick, G. E. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science and Technology* **20**, 557–566 (2009).
22. Ellis, D. I., Dunn, W. B., Griffin, J. L., Allwood, J. W. & Goodacre, R. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics* **8**, 1243–1266 (2007).
23. Jan, S. & Ahmad, P. Introducing Metabolomics. *Ecometabolomics* (2019). doi:10.1016/b978-0-12-814872-3.00001-1.
24. Filho, R. B. Phytochemical contribution to development of a emergent country. *Quimica Nova* **33**, 229–239 (2010).
25. Fumagali, E., Gonçalves, R. A. C., Machado, M. D. F. P. S., Vidoti, G. J. & De Oliveira, A. J. B. Production of plant secondary metabolites in plant cell and tissue culture: The example of *Tabernaemontana* and *A spidosperma* genera. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **18**, 627–641 (2008).
26. 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**, 234–240 (2009).
27. Marcheafave, G. G., Daiane, E., Tormena, C. D. & Eduarda, L. Irrigated and CO<sub>2</sub> level effects on metabolism in *Coffea arabica* beans from mixture design – near

- infrared fingerprints. *Microchemical Journal* **152**, 104276 (2020).
28. Tormena, C. D., Pauli, E.D., Marcheafave, G. G., Scheel, G. L., Rakocevic, M., Bruns, R. E. & Scarminio, I. S. FT-IR biomarkers of sexual dimorphism in yerba-mate plants: Seasonal and light accessibility effects. *Microchemical Journal* **158**, 105329 (2020).
  29. Abreu, G. F., Borém, F. M., Oliveira, L. F. C., Almeida, M. R. & Alves, A. P. C. Raman spectroscopy: A new strategy for monitoring the quality of green coffee beans during storage. *Food Chemistry* **287**, 241–248 (2019).
  30. Carlos, R. E. D. & Yeretian, C. Investigating Coffee Samples by Raman Spectroscopy for Quality Control - Preliminary Study. *International Journal of Experimental Spectroscopic Techniques* 1–5 (2016).
  31. Ivamoto, S. T. *et al.* Diterpenes biochemical profile and transcriptional analysis of cytochrome P450s genes in leaves, roots, flowers, and during *Coffea arabica* L. fruit development. *Plant Physiology and Biochemistry* **111**, 340–347 (2017).
  32. Snyder, L. R., Carr, P. W. & Rutan, S. C. Solvatochromically based solvent-selectivity triangle. *Journal of Chromatography A* **656**, 537–547 (1993).
  33. Marcheafave, G. G., Tormena, C. D., Mattos, L. E., Liberatti, V. R., Ferrari, B. S., Rakocevic, M., Bruns, R. E. & Scarminio, I. S. The main effects of elevated CO<sub>2</sub> and soil-water deficiency on <sup>1</sup>H NMR-based metabolic fingerprints of *Coffea arabica* beans by factorial and mixture design. *Science of the Total Environment* **749**, 142350 (2020).
  34. Slutsky, B. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A By D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, and J. Smeyers-Verbeke. Data Handling in Science and Technology Volume 20A. Elsevier: Amsterdam. 1997. Xvii + 867 pp. ISBN . *Journal of Chemical*

- Information and Computer Sciences* **38**, 1254–1254 (1998).
35. Terrile, A. E. Impressão Digital Espectroscópica Em Grãos Crus De Coffea Arabica , Cultivado Em Dois Tipos De Arranjo E Duas Densidades De Plantio. 133 (2016).
  36. De Andrade, E. M., Araújo, L. D. F. P., Rosa, M. F., Disney, W. & Alves, A. B. Seleção dos indicadores da qualidade das águas superficiais pelo emprego da análise multivariada. *Engenharia Agricola* **27**, 683–690 (2007).
  37. Esteki, M. *et al.* A review on the application of chromatographic methods, coupled to chemometrics, for food authentication. *Food Control* **93**, 165–182 (2018).
  38. Neto, B. B., Scarminio, I. S. & Bruns, R. E. Chapter 7 Mixture modeling. *Data Handling in Science and Technology* **25**, 313–364 (2005).
  39. Hardle, W. K. *Applied multivariate statistical analysis*. (2012).
  40. Miller, J. N. *Statistics And Chemometrics For Analytical Chemistry* (2010).
  41. Moita Neto, J. M. & Moita, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Química Nova* **21**, 467–469 (1998).
  42. Jansen, J. & Engel, J. *ASCA : The Implementation of Design of Experiments Into Multivariate Modelling in Chemometrics. Data Analysis for Omic Sciences: Methods and Applications* vol. 82 (Elsevier B.V., 2018).
  43. Barwick, V. J. Strategies for solvent selection - A literature review. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **16**, 293–309 (1997).
  44. Larkin, P. J. General Outline for IR and Raman Spectral Interpretation. *Infrared and Raman Spectroscopy* 135–151 (2018) doi:10.1016/b978-0-12-804162-8.00007-0.
  45. Wiercigroch, E. *et al.* Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*

- 185**, 317–335 (2017).
46. Larkin, P. J. *IR and Raman Spectra–Structure Correlations. Infrared and Raman Spectroscopy* (2018). doi:10.1016/b978-0-12-804162-8.00006-9.
  47. Re, B. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam -- Printed in The Netherlands. **21**, 149–150 (1983).
  48. Karpavičiūtė, D., Murkovic, M., Vinauskiene, R. & Venskutonis, R. Determination of non-polar heterocyclic aromatic amines in roasted coffee by SPE-HPLC-FLD. *Chemical Papers* **71**, 67–70 (2017).
  49. Rutan, S. C. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam -- Printed in The Netherlands. *Journal of Chromatography* **21**, 149–150 (1983).
  50. Sansonetti, J. E. *Spectroscopic data for neutral francium (Fr I)*. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* vol. 36 (2007).