



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

TIAGO BERVELIERI MADEIRA

**MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO CAFÉ  
TORRADO E MOÍDO NACIONAL POR CROMATOGRÁFIA  
LÍQUIDA DE ULTRA-ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS E ESPECTROSCOPIA NIR**

---

Londrina  
2019

TIAGO BERVELIERI MADEIRA

**MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO CAFÉ  
TORRADO E MOÍDO NACIONAL POR CROMATOGRÁFIA  
LÍQUIDA DE ULTRA-ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS E ESPECTROSCOPIA NIR**

Tese apresentada ao Departamento de Química da  
Universidade Estadual de Londrina, como requisito  
parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf

Londrina  
2019

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

M181 Madeira, Tiago Bervelieri.  
Métodos para Avaliação da Qualidade do Café Torrado e Moído Nacional por Cromatografia Líquida de Ultra-alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas e Espectroscopia NIR / Tiago Bervelieri Madeira. - Londrina, 2019.  
161 f.

Orientador: Suzana Lucy Nixdorf.  
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.  
Inclui bibliografia.

1. Café - Tese. 2. Cromatografia - Tese. 3. Espectrometria de massas - Tese. 4. Adulteração - Tese. I. Lucy Nixdorf, Suzana. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

TIAGO BERVELIERI MADEIRA

**MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO CAFÉ  
TORRADO E MOÍDO NACIONAL POR CROMATOGRFIA  
LÍQUIDA DE ULTRA-ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS E ESPECTROSCOPIA NIR**

Tese apresentada ao Departamento de Química da  
Universidade Estadual de Londrina, como requisito  
parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Evandro Bona  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -  
UTFPR

---

Prof. Dr. Fábio Yamashita  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Maria Josefa Santos  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Dionísio Borsato  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina 09 de maio de 2019.

*Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais José e Neusa, que me apoiaram durante toda minha trajetória acadêmica, e a todos aqueles que depositaram a confiança neste trabalho na busca de um país melhor.*

## AGRADECIMENTOS

Faltam-me palavras para descrever a alegria que sinto neste momento da minha trajetória pessoal e acadêmica. Esta tese não é fruto somente do meu trabalho pessoal, mas de muitos parceiros que durante anos acreditaram neste trabalho, abrindo mão de períodos importantes das suas vidas como feriados e finais de semana, para possibilitar a conclusão desta tese.

Agradeço em primeiro lugar à minha querida orientadora Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf, sem ela esse trabalho jamais teria saído do campo das ideias e do sonho. Su, você foi mais que uma orientadora para mim, só tenho a agradecer por todos os ensinamentos, toda dedicação, por todos os períodos de folga e férias que você não hesitou em nos ajudar, até mesmo em período de licença. Obrigado por todas as viagens, momentos de diversão, sempre guardarei em meu coração todos esses momentos, tenho plena certeza que levarei esta grande amizade para toda vida.

Agradeço à minha família, em especial meus pais José e Neusa e meu irmão Marcos, que nunca mediram esforços para que eu percorresse toda minha trajetória acadêmica, sem vocês nada disso seria possível. Obrigado por todo apoio e incentivo financeiro e emocional, sem dúvida este trabalho também é fruto de todo o carinho e dedicação de vocês.

Agradeço também à minha noiva Ana Carla, que me acompanhou durante toda a trajetória de conclusão desta tese de Doutorado. Obrigado por todo apoio e todo incentivo, até mesmo me ajudando com experimentos em finais de semana e no período noturno, sempre me motivando e lembrando-me que todo o esforço valeria a pena.

Agradeço a todos os integrantes do Grupo DIA em especial a Mariana Bortholazzi Almeida por toda ajuda e incentivo na conclusão deste trabalho, o meu muito obrigado a você Mari. Um agradecimento especial para os meus amigos de grupo de pesquisa Yuri Renan Bovolenta e Alexandre Vinicius Guedes Mazalli, hoje colegas de empresa, obrigado por todo incentivo para a conclusão deste trabalho. E a todos os demais membros que ajudaram e participaram da conclusão deste trabalho Carol, Ana, Daniele, Rhye, Franciele, Letícia, Mayara, agradeço muito por todos os períodos e momentos de alegria compartilhados.

Agradeço também a toda equipe do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, nas pessoas do Sr. Francisco Barbosa Lima, Elton Massarollo e Hugo Caruso, por todo incentivo financeiro e coleta de amostras, por acreditarem em meu potencial para realização deste trabalho. Agradeço também às professoras Elisa Hirooka e Emília Kiyomi

Kuroda por toda estrutura empregada no laboratório LIM, essencial para a conclusão deste trabalho.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina e ao Departamento de Química por todo o respaldo e estrutura, e a todos os docentes do Programa de Pós-Graduação por todo o conhecimento e experiências adquiridos.

Agradeço também aos órgãos de fomento, em especial à CAPES, pela concessão de bolsa de estudos, e ao CNPq e FINEP pela estrutura relacionada à equipamentos fundamentais para conclusão desta tese.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

*“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos” (Albert Einstein)*

MADEIRA, Tiago Bervelieri. **Métodos para Avaliação da Qualidade do Café Torrado e Moído Nacional por Cromatografia Líquida de Ultra-alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas e Espectroscopia NIR**. 2019. 157 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

O café é uma *commodity* de alto valor econômico, e o Brasil é o maior produtor mundial e o 2º maior mercado consumidor. O panorama da produção aponta para a superação de recordes nos últimos anos, devido à valorização da sua bebida, tida como símbolo de receptividade em muitas culturas e países. Frente a este cenário, o café tem sido alvo de inúmeras fraudes e incorporações de produtos de mais baixo valor, visando maior lucratividade. Pelo fato de não haver um padrão oficial de identidade do café torrado e moído implementado no País, considerando as carências metodológicas, isto resulta em dificuldades nas ações de fiscalização e controle interno dos produtos comerciais. Ressalta-se que a qualidade do café está intrinsecamente relacionada a sua composição química e a etapas de manejo pré e pós-colheita. Esta combinação de fatores em conjunto com a complexidade da matriz, problematiza a sua caracterização plena por métodos convencionais, como a microscopia ou a análise sensorial. Deste modo, abre-se uma extensa demanda para o desenvolvimento de métodos que forneçam resultados com a exatidão necessária, para auxiliar as técnicas mais comumente empregadas no controle de qualidade. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos químicos para o controle da qualidade de cafés torrado e moído, traçando um panorama dos comercializados no mercado nacional. Para isso, desenvolve-se um método rápido e sensível para determinação de trigonelina e cafeína em amostras de café por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada ao arranjo de diodos (UHPLC-DAD). Sua validação atendeu a todas as figuras de mérito da RE 899/2013, sendo o mais rápido encontrado na literatura com análises inferiores a 1 minuto, tendo limite de quantificação adequado as amostras de café. O método proposto visa auxiliar na diferenciação das duas espécies de café *Coffea arabica* (arabica) e *C. canéfora* (robusta-conilon) em *blends*, cujas amostras com a maior proporção de café arábica apresentaram maiores teores de trigonelina e menores de cafeína. Com foco no consumo de café e sua metabolização, desenvolveu-se um método de determinação das metilxantinas, seguindo os princípios da química verde. Esse método foi validado de acordo com a RDC 166/2017 e aplicado à quantificação da cafeína e seus metabólitos em amostras reais de plasma, possibilitando auxiliar no entendimento dos efeitos do consumo aliado a latenciação de outros fármacos no organismo. Considerando as aplicações metabólicas da planta e do alimento, desenvolveu-se um método para quantificação de 21 compostos com atividades funcionais benéficas a saúde humana empregando a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS). O método proposto foi validado segundo a RDC 166/2017 e EC/657/2002 e aplicado ao estudo de metabolômica de amostras de café para possíveis impurezas e adulterantes. Este possibilita separar diferentes matrizes, se mostrando como uma importante ferramenta para detecção de adulterantes e da impureza casca em amostras de café torrado e moído. Visando garantir a pureza das amostras de café comerciais frente à possíveis adulterações, aplicou-se a técnica de cromatografia iônica por amperometria pulsada (HPAEC-PAD) para quantificação de carboidratos totais. Observou-se que as diferentes matrizes de cafés, adulterantes e impurezas apresentam perfis cromatográficos distintos, o que possibilita a diferenciação entre amostras de cafés puras e adulteradas. A detecção de adulteração por cereais maltados misturados a amostras de café torrado e moído se deu em nível de 1% (m/m), e das impurezas, cascas e paus, em nível de 5% (m/m). Como

método rotineiro de triagem investigou-se o potencial da espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) no controle de qualidade de amostras de café torrado e moído comerciais para a detecção de adulterantes e impurezas, frente à sua qualidade sensorial. As matrizes de café e demais adulterantes puderam ser discriminadas por NIR e tratamentos quimiométricos, possibilitando separar amostras com indício de adulteração, além de categorizá-las quanto à classificação em cafés tradicionais e premiados. Este trabalho destaca o potencial das diversas metodologias desenvolvidas em fazerem frente à complexidade de matrizes alimentares como o café, demonstrando a viabilidade de aplicação desta abordagem para o controle de qualidade do torrado e moído brasileiro.

**Palavras-chave:** Café torrado e moído. Adulteração. Controle de qualidade. Cromatografia líquida. Metabolômica. Quimiometria.

MADEIRA, Tiago Bervelieri. **Methods to Evaluate the Quality of National Ground Roasted Coffee by Ultra High-Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry and NIR Spectroscopy**. 2019. 157 p. Thesis (PhD in Chemistry) - Londrina State University, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

Coffee is a commodity of high economic value, and Brazil is the world's largest producer and the 2<sup>nd</sup> largest market of consumer. The production overview points to the records overcoming in the last years, due to the valuation of its beverage, considered as a symbol of receptivity in many cultures and countries. Against this background, coffee ends up being the target of numerous counterfeits with incorporations of products of lower value, aiming at greater profitability. Since, there are methodological lacks; this fact creates a gap by no having an official standard implemented for the identity of Brazilian ground-roasted coffee, which implies in difficulties to exercise control of the commercial products in the internal market. It must be emphasized that coffee quality is intrinsically related to its chemical composition and to pre and post-harvest management stages. This combination of factors, together with the complexity of the matrix, problematizes its full characterization by conventional methods, such as microscopy or sensorial analysis. Therefore, there is an extensive demand for methods development that provides accurate and reliable results, aiming to assist the most commonly techniques applied in quality control. Hence, the objective of this study was to develop chemical methods to be using in the quality control of the ground-roasted coffee, drawing a panorama of those samples commercialized in the national market. For this, we developed a fast and sensitive method for determination of trigonelline and caffeine in coffee samples by using high performance liquid chromatography coupled to the diode array (UHPLC-DAD). Its validation met all the figures of merit of RE 899/2013, being the fastest found in the literature with chromatographic run less than 1 minute, having adequate limit for coffee samples quantitation. This proposed method aims to support in the differentiation in blends of the two coffee species *Coffea arabica* (arabica) and *C. canephora* (robusta-conilon), whose samples with the highest proportion of arabica coffee had higher levels of trigonelline and lower caffeine. With focus on the consumption of coffee and its metabolization, a method was developed for determining the methylxanthines, following the principles of green chemistry. This method was validated according to RDC 166/2017 and was applied to caffeine and its metabolites quantitation in real plasma samples, making it possible to understand the effects of associated consumption and latency of other drugs in the body. Considering the plant and food metabolic applications, a method was developed to quantify 21 compounds with functional activities that are beneficial to human health by using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The proposed method was validated according to RDC 166/2017 and EC/657/2002 and was applied to the metabolomics study of coffee samples for possible impurities and adulterants. This makes it possible to separate different matrices, showing itself as an important tool for detection of adulterants and husk impurity in samples of ground-roasted coffee. In order to guarantee the purity of commercial coffee samples in the face of possible adulterations, the pulsed amperometric ion chromatography (HPAEC-PAD) technique was used to quantify total carbohydrates. It was observed that the different matrices of coffee, adulterants and impurities present different chromatographic profiles, which allows the differentiation between pure and adulterated coffee samples. The detection of adulteration by malted cereals mixed with samples of ground-roasted coffee was done at a level of 1% (w/w), and impurities, husks and sticks at a level of 5% (w/w). The potential of near-infrared spectroscopy (NIR) to be use as a routine screening method was investigated for detecting adulterants and impurities in the quality control

of commercial ground-roasted coffee samples relating it to their sensorial quality. Coffee and other adulterants matrices could be discriminated by NIR and chemometric treatments, which allow separating samples with indication of adulteration and can categorize them according to traditional and award-winning coffees classification. This work highlights the potential of several methodologies developed to deal with the complexity of food matrices such as coffee, demonstrating the feasibility of applying this approach to quality control of Brazilian ground-roasted coffee.

**Keywords:** Ground roasted coffee. Counterfeit. Quality control. Liquid chromatography. Metabolomics. Chemometric.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

- Figura 1** - Cromatograma dos padrões de trigonelina 0,5 %(m/m) (pico 1) e cafeína 2,0 %(m/m) (pico 2) com seus respectivos espectros de absorção molecular empregando UHPLC-DAD ..... 62
- Figura 2** - Curvas analíticas (a, b) e análises de resíduos (c, d) para trigonelina e cafeína..... 65
- Figura 3** - (a) Cromatogramas referentes às análises de 20 amostras de cafés torrado e moído comerciais com seus respectivos espectros de absorção dos analitos (b) trigonelina e (c) cafeína, visando verificar a aplicabilidade do método em análises de rotina de controle de qualidade..... 66

### CAPÍTULO 3

- Figure 1** - Analytical curve for the analyte Theobromine and their residual chart .. 77
- Figure 2** - Total ion chromatograms of methylxanthines: (a) caffeine, (b) theophylline, (c) paraxanthine and (d) theobromine at the concentration of 10.0 µg L<sup>-1</sup> ..... 78

### CAPÍTULO 4

- Figure 1** - The (a) PDA (272nm) and (b) mass spectrometer Chromatogram of the 22 standard pool 10 mg/L and 0,05 mg/L, respectively, resulting from the chromatographic gradient proposed..... 92
- Figure 2** - Linear working range for p-Coumaric Acid and residual chart..... 99
- Figure 3** - (a) Scores Chart and (b) Hotelling's T-squared distribution for the samples in untargeted metabolomics analysis ..... 102

### CAPÍTULO 5

- Figura 1** - Cromatogramas das análises de carboidratos: (A) Mistura de padrão de carboidratos, (B) Amostra de café comercial torrado e moído, (C) Café arábica torrado e moído (D) Café conilon torrado e moído ..... 115
- Figura 2** - Cromatogramas em mesma escala das amostras de café arábica adulteradas e possíveis adulterantes puros ..... 117

<b>Figura 3 -</b>	Gráficos de dispersão referentes às concentrações dos carboidratos: manitol, arabinose, galactose, glicose, xilose, manose e frutose nas amostras de café puro (P), adulterantes (A), misturas (M) e cafés comerciais (C).....	119
<b>Figura 4 -</b>	Análise de componentes principais (gráfico de scores) referente às diferentes matrizes analisadas utilizando como variáveis de análise as concentrações dos carboidratos arabinose, galactose, glicose, xilose e manose .....	122
<b>CAPÍTULO 6</b>		
<b>Figura 1 -</b>	Espectros NIR de amostras torradas de cafés comerciais e premiados (Concurso “Café Qualidade Paraná” 2014) pela boa qualidade sensorial e de matrizes comumente utilizadas para adulteração.....	134
<b>Figura 2 -</b>	Dendrograma resultante da análise de agrupamento hierárquico dos espectros das amostras de cafés comercial e premiado pela boa qualidade sensorial (2014) e de adulterantes, utilizando como variáveis as refletâncias obtidas entre os comprimentos de 1990 nm a 2498 nm, com corte esquemático na maior distância euclidiana .....	135
<b>Figura 3 -</b>	Espectros NIR referentes as 41 amostras de cafés crus premiados pela boa qualidade sensorial e de seu blend nos Concursos “Café Qualidade Paraná” de 2012 .....	137
<b>Figura 4 -</b>	Espectros NIR das amostras de café torradas premiadas no concurso Café qualidade Paraná 2013 .....	138
<b>Figura 5 -</b>	Projeção das amostras no plano bidimensional das componentes principais 1 e 2 (gráfico de scores) referente aos dados espectrais das amostras de cafés torrados premiados (2013) com relação às suas refletâncias difusas obtidas entre os comprimentos de onda de 1990 a 2498 nm .....	139
<b>Figura 6 -</b>	Primeira derivada dos espectros NIR das amostras de café comerciais, café premiadas (Concurso “Café Qualidade Paraná” 2015), amostras de café contendo grandes quantidades de defeito e de conilon .....	142
<b>Figura 7 -</b>	Projeção das variáveis 1 e 2 no plano bidimensional (gráfico de scores) das amostras de café utilizando as variáveis selecionadas a partir da primeira derivada dos espectros NIR .....	145

<b>Figura 8 -</b>	Análise de componentes principais (gráfico de scores) dos espectros NIR das amostras analisadas utilizando correção de espalhamento MSC.....	146
<b>Figura 9 -</b>	Análise de componentes principais (gráfico de loadings) dos espectros NIR das amostras analisadas utilizando correção de espalhamento MSC.....	147
<b>Figura 10 -</b>	Tabela de saliências referente à análise de componentes comuns.....	148
<b>Figura 11 -</b>	Gráfico de scores CC1 versus CC2 da análise de componentes comuns .....	149
<b>Figura 12 -</b>	Gráfico de scores componente comum (CC1) correlacionada com a classificação sensorial.....	150

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO 2

- Tabela 1** - Proporções de água (A) e acetonitrila (B) utilizadas no método cromatográfico proposto..... 59
- Tabela 2** - Parâmetros de validação cromatográfica do método desenvolvido para a determinação de cafeína e trigonelina em amostras de cafés torrado e moído empregando UHPLC-DAD ..... 63
- Tabela 3** - Concentração de trigonelina e cafeína nas 20 amostras de cafés comerciais analisadas ..... 67

### CAPÍTULO 3

- Table 1** - Analytical parameters for the determination of caffeine and its metabolites in plasma and culture medium by ultra-high performance liquid chromatography with mass detector..... 76

### CAPÍTULO 4

- Table 1** - Chromatographic gradient composed of (A) 0.1% FA water (v / v) and (B) 0.1% FA (v / v) methanol in the proposed method ..... 89
- Table 2** - Optimized parameters of MRM for each compound in mass spectrometer..... 90
- Table 3** - Average concentrations of different compounds in coffee samples..... 101

### CAPÍTULO 5

- Tabela 1** - Misturas de café arábica com adulterantes e café conilon ..... 112
- Tabela 2** - Intervalo de concentração mínima e máxima dos teores de carboidratos que mais apresentaram variação nas amostras estudadas . 121

### CAPÍTULO 6

- Tabela 1** - Modelos preditivos e respectivos coeficientes de determinação e SEP 143
- Tabela 2** - Variáveis selecionadas para análise sensorial com relação à sua maior variância entre os valores de refletância difusa entre os espectros NIR das amostras analisadas ..... 144

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CC	Componente comum
ComDim	Common dimension
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DC	Dimensão Comum
ESI	Ionização por elétron spray, do inglês electrospray ionization
EU	European Union
EC	European Commission
HCA	Análise de agrupamento hierárquico
ID	Identificação
LC	Cromatografia líquida, do inglês Liquid Chromatography
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
m/z	Relação massa/carga, do inglês mass/charge ratio
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRM	Monitoramento de reações múltiplas, do inglês Multiple reaction Monitoring, também denominado por SRM
MS	Espectrômetro de massas, do inglês, Mass Spectrometry
NIR	Espectroscopia no infravermelho próximo
PC	Componente principal, do inglês Principal component
PCA	Análise de componentes principais, do inglês Principal Component Analysis
PDA	Detector com arranjo de fotodiodos ou DAD
RDC	Redação do colegiado
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês Relative Standard Deviation
SEM	Monitoramento de reações selecionadas, do inglês Selective reaction monitoring
TIC	Cromatograma do íon total, do inglês Total ion chromatogram
TQD	Espectrometro de massa sequencial, do inglês Tandem quadrupole mass spectrometry
tR	Tempo de retenção
UHPLC	Cromatografia de ultra desempenho (CLUE), do inglês Ultra-high- Performance Liquid Chromatography ou UPLC

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.1	Importância Econômica do Café .....	25
1.2	Espécies de Café.....	26
1.3	Composição Química do Café.....	28
1.4	Qualidade do Café .....	29
1.5	Análise Hierárquica de Agrupamentos.....	30
1.6	Análise de Componentes Principais .....	31
1.7	Análise de Dimensões Comuns (ComDim) .....	32
1.8	Impurezas em Café Torrado e Moído.....	33
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36
	<b>CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO RÁPIDO E SENSÍVEL PARA DETERMINAÇÃO DE TRIGONELINA E CAFEÍNA POR UHPLC-DAD EM CAFÉ TORRADO E MOÍDO</b> .....	52
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	56
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTAL</b> .....	58
2.1	REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS .....	58
2.2	PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE TRIGONELINA E CAFEÍNA.....	58
2.3	SISTEMA CROMATOGRÁFICO .....	58
2.4	MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	59
2.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO .....	59
2.6	APLICAÇÃO .....	60
2.8	EXTRAÇÃO DE TRIGONELINA E CAFEÍNA.....	61
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	62

<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>68</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>69</b>
	 <b>CAPÍTULO 3 - METHOD FOR QUANTIFYING OF METHYLXANTHINES IN HUMAN AND ANIMAL PLASMA AND CELL CULTURE MEDIUM BY UPLC-MS/MS .....</b>	 <b>72</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>74</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL AND METHODS.....</b>	<b>75</b>
<b>3</b>	<b>RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>76</b>
	<b>REFERENCES .....</b>	<b>80</b>
	 <b>CAPÍTULO 4 - A SIMPLE AND FAST NEW METHOD FOR ANALYSIS OF 21 PHENOLIC COMPOUNDS, METHYLXANTHINES AND FLAVONOIDS IN FOOD AND PLANT MATRICES BY UPLC-PDA-MS/MS .....</b>	 <b>82</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>85</b>
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTAL .....</b>	<b>87</b>
2.1	REAGENTS AND ANALYTICAL STANDARDS.....	87
2.2	PREPARATION OF SOLUTIONS AND ANALYTICAL STANDARDS .....	87
2.3	CHROMATOGRAPHIC SYSTEM.....	88
2.4	CHROMATOGRAPHIC METHOD .....	88
2.5	MASS SPECTROMETRY METHOD .....	89
2.6	METHOD VALIDATION.....	91
2.7	APPLICATION.....	91
<b>3</b>	<b>RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>92</b>
3.1	METHOD VALIDATION RESULTS.....	97
3.2	PRECISION .....	97
3.3	ACCURACY.....	97

3.4	SPECIFICITY.....	98
3.5	LINEARITY AND DYNAMIC RANGE.....	98
3.6	ROBUSTNESS .....	99
3.7	APPLICATION.....	100
<b>4</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>104</b>
<b>5</b>	<b>NOTES AND REFERENCES.....</b>	<b>104</b>

**CAPÍTULO 5 - POTENCIAL APLICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS NO CONTROLE DE QUALIDADE DE AMOSTRAS DE CAFÉ TORRADO E MOÍDO.....**

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>109</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>110</b>
2.1	REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS .....	110
2.2	MATÉRIA-PRIMA .....	111
2.3	PREPARO DE SOLUÇÕES PADRÃO .....	112
2.4	DETERMINAÇÃO DE UMIDADE.....	112
2.5	EXTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS.....	113
2.6	SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	113
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	114
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>115</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>124</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>124</b>

**CAPÍTULO 6 - ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO E QUIMIOMETRIA: POTENCIAL PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE CAFÉS .....**

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>129</b>
----------	-------------------------	------------

<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	131
2.1	MATÉRIA-PRIMA.....	131
2.2	DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E PROCESSAMENTO .....	131
2.3	ANÁLISE DE CAFEÍNA E TRIGONELINA .....	132
2.4	TORRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CAFÉ E ADULTERANTES.....	132
2.5	AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS NIR .....	132
2.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	133
2.7	ANÁLISE SENSORIAL .....	133
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	134
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	151
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	151
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	155
	<b>ANEXOS</b> .....	157
	ANEXO I - Árvore decisória proposta para a análise da qualidade em amostras de café torrado e moído.....	157

# **Capítulo 1**

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1. INTRODUÇÃO

O café é uma planta dicotiledônea da família das Rubiáceas e do gênero *Coffea*. Dentre as várias espécies conhecidas, as mais comercializadas são a *Coffea arabica* e a *Coffea canephora* (MONTEIRO et al., 2005(a) e (b), BABOVA, O.; OCCHIPINTI, A.; MAFFEI, M. E. 2016). Sua bebida é reconhecida mundialmente pela grande receptividade, destacando-se como um dos produtos de maior comercialização no mercado internacional (DE MARIA, 1999, BICHO et al., 2013). É um dos produtos básicos mais valiosos, constituindo-se na segunda maior mercadoria comercializada, permanecendo atrás somente do petróleo (OIC, 2018; NABAIS et al., 2008), tendo nas bolsas de “*commodities*” de Nova Iorque e Londres os maiores canais de comercialização e formação de preços no contexto mundial (NOBRE et al., 2007, BOTEZ, I.; PET, E., 2019).

O Brasil é reconhecido como um dos maiores produtores e maior exportador de grãos de café e de café processado; e o consumo interno brasileiro equipara-se à soma das exportações para os Estados Unidos, Alemanha, Itália, Japão e França, entretanto, a qualidade do produto comercializado internamente não é normatizada (RAMOS, 1997, EMBRAPA, 2019).

Os diversos constituintes físicos e físico-químicos presentes no café são os responsáveis pela aparência do grão torrado, pelo sabor e aroma característicos das bebidas. Entre esses constituintes destacam-se os compostos voláteis, fenólicos (ácido clorogênico), ácidos graxos, proteínas, açúcares, acidez, e degradação de parede celular dos grãos, com consequentes alterações em seus constituintes, e ainda algumas enzimas, cuja presença, teores e atividade, conferem ao café um sabor e aroma peculiares (PIMENTA, 2003, FERRUZI, M. Z., 2010).

O odor característico do café é proporcionado pela presença de compostos voláteis, principalmente na forma de aldeídos, cetonas e ésteres metílicos, que são formados durante a torração e ficam retidos na estrutura celular dos grãos torrados (PIMENTA, 2003).

No contexto da elevada produção e comercialização mundial, a qualidade do café tem sido considerada o principal critério de seleção no melhoramento dessa cultura (LEROY et al., 2006). A qualidade da bebida café, caracterizada por seu sabor e aroma, é influenciada por diversos fatores pré e pós-colheita que garantem a expressão final da qualidade do produto. Dentre os fatores pré-colheita são destacados a espécie e as variedades de café, o local de cultivo, a maturação dos grãos, a incidência de microrganismos e o efeito de adubações. Em relação aos fatores pós-colheita destacam-se as fermentações enzimáticas e microbianas, os processos de armazenamento do café beneficiado, as misturas (*blends*) e a torração dos grãos (CARVALHO, 1997; WORKU et al., 2018).

A qualidade final da bebida está intrinsecamente relacionada à composição dos grãos torrados. O grau de torra afeta diretamente o sabor do café, definindo os vários compostos que são extraídos durante a formação da bebida, diretamente associados com a cor do grão torrado, em condições normais de grãos de boa qualidade. Em termos da qualidade da bebida, o intervalo de temperatura entre 205°C a 220°C representa as temperaturas de torra do “pico do sabor”, na qual se terá a melhor chance para sentir o caráter original do café (MELO, 2004).

Para regulamentar as produções de café, com qualidade mínima para o consumo, o Brasil possui leis definidas para o café beneficiado e o torrado e moído. A Portaria nº 377, de 26 de abril de 1999, foi criada com o objetivo de fixar a identidade e as características mínimas de qualidade a que devem obedecer, o café torrado em grão e o café torrado e moído. A legislação especifica os requisitos obrigatórios em relação à composição, características

sensoriais e físico-químicas e estabelece normas para o uso de aditivos e para a presença de contaminantes. O teor máximo de impurezas tolerado em café torrado é de 1% (BRASIL, 1999). Entretanto, a normativa foi revogada gerando uma “lacuna” na legislação atualmente.

A importância econômica do café deixa claro que estudos relacionados à sua composição, detecção de fraudes e avaliação de sua qualidade são de suma importância (MOREIRA; TRUGO, 1997), constituindo-se em pré-requisitos à comercialização, especialmente em um mercado cada vez mais globalizado, que controla com eficácia a qualidade dos produtos (ISO 11292, 1995; ABIC, 2018).

No Brasil, as impurezas, com maior frequência, adicionadas ao café, segundo Assad et al. (2002) são cascas e paus, milho, cevada, trigoilho, açúcar mascavo e soja.

A análise microscópica é considerada como um método subjetivo e, conseqüentemente, a confiabilidade dos resultados é pequena, já que depende da experiência do analista e, por isso, está sujeita a erros humanos, além de ser demorada e onerosa (ASSAD et al., 2002).

Várias técnicas analíticas têm sido utilizadas com sucesso na investigação dos constituintes químicos do café, tais como: cromatografia líquida de alta eficiência (ANDRADE et al., 1998, MONTEIRO et al., 2019), espectroscopia nas regiões do infravermelho próximo e médio (BOUHSAIN et al., 1999, SHAN et al., 2014; ESTEBAN-DÍEZ et al., 2004), cromatografia gasosa (BICCHI et al., 1997; CARRERA et al., 1998; ALVES et al., 2003; HURTADO-BENAVIDES, A.; DORADO, D. A.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P., 2016), cromatografia líquida e gasosa acopladas à espectrometria de massas (MAEZTU et al., 2001, COPORASO et al., 2018, KUČERA et al., 2016) e a ressonância magnética nuclear (CHARLTON et al., 2002). Entretanto, a técnica de cromatografia de troca aniônica acoplada com detecção por amperometria pulsada (HPAEC-

PAD) tem sido a técnica preferencialmente adotada internacionalmente para a análise de carboidratos totais em café (ISO 11292, 1995), por exigir pouco preparo da amostra com excelente resolução e sensibilidade, quando comparada à detecção por índice de refração (RI) ou UV-VIS (COUTINHO, 2003; DIONEX, 2000).

A espectroscopia é uma técnica de uso crescente, devido à sua rapidez, simplicidade e segurança, bem como, a sua capacidade de medir vários atributos simultaneamente sem necessitar de métodos dispendiosos de preparo de amostras. Mais especificamente, os métodos de espectroscopia no visível, no infravermelho próximo (NIR) e no infravermelho médio constituem-se em técnicas rápidas, de baixo custo, e livre de produtos químicos no processamento da amostra, e portanto, não destrutivas, que tem sido amplamente utilizada para detectar a composição química dos materiais alimentares, o que as torna adequadas para implementação na rotina analítica (PEDRO, FERREIRA, 2005; YAN-DE et al., 2007; JING et al., 2010; SANTOS et al., 2012).

Atualmente, as técnicas analíticas vêm sendo cada vez mais associadas a estudos quimiométricos, visando maximizar os resultados. Estes estudos, baseados na estatística, permitem avaliar a qualidade da matriz de forma planejada e detectar a existência de correlações entre diferentes perfis de matéria-prima, valendo-se de técnicas de agrupamento. Segundo Reis e Andrade (1996), o propósito geral em um experimento de misturas é tornar possível, por meio de superfícies de respostas, a estimativa das propriedades de um sistema multicomponente a partir de um número limitado de observações. Estas observações são obtidas de combinações pré-selecionadas dos componentes com o intuito de se determinar quais delas, de alguma maneira, otimizam a resposta.

### 1.1. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO CAFÉ

As bolsas de “commodities” de Nova Iorque e Londres são os maiores canais de comercialização e de formação de preços do café no contexto mundial (NOBRE et al., 2007, BOTEZ, I.; PET, E., 2019). O café é a segunda *commodity* mundial (OIC, 2018; NABAIS et al., 2008) e o Brasil destaca-se como maior produtor mundial de café, com uma produção correspondente a cerca de 30% de todo o café comercializado no mercado internacional (USDA, 2018).

O consumo de café apresenta contínuo crescimento mundial e também entre os brasileiros. Atendendo a esta crescente demanda pelo consumo desta *commodity*, o mercado mundial tem premiado cafés com elevado padrão de qualidade, sendo o segmento de cafés especiais o que apresenta o maior crescimento dos últimos anos (BORÉM et al., 2008).

No Brasil, as principais áreas cafeeiras estão concentradas nas regiões centro-oeste e sul, onde se destacam quatro estados produtores: Minas Gerais, Paraná, São Paulo, Espírito Santo e Rio de Janeiro. As regiões Nortes e Nordeste do País também apresentam lavouras de café concentradas predominantemente nos estados de Rondônia e Bahia, respectivamente (CONAB, 2018; MAPA, 2018).

Dentre os estados brasileiros, São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Bahia e parte do Espírito Santo possuem lavouras de café dedicadas predominantemente à produção do tipo arábica, enquanto os estados do Espírito Santo e Rondônia dedicam-se predominantemente a produção do tipo robusta (CAFÉ PINDENSE, 2012; CONAB, 2018; MAPA, 2018).

A área plantada para a safra 2019 prevê uma produção total de 50,48 a 54,48 milhões de sacas beneficiadas em uma área total de 1842,2 mil hectares, sendo que do total a produção de café arábica e conilon correspondam a 38,16 milhões e 16,33 milhões, respectivamente

de sacas beneficiadas. Sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor nacional com 26,42 a 27,68 milhões de sacas, seguido por Espírito Santo com 12,48 a 14,73 milhões de sacas e São Paulo com produção estimada de 4,23 a 4,4 milhões de sacas de café beneficiadas (CONAB, 2019).

## 1.2. ESPÉCIES DE CAFÉ

Atualmente são conhecidas cerca de 100 espécies pertencentes ao gênero *Coffea* L. (Rubiácea). Dentre as quais, as mais importantes são *Coffea arabica* (arábica) e *Coffea canephora* (conilon), genericamente conhecido por robusta que correspondem, respectivamente, a 70% e 30% da produção mundial (BRAGANÇA, et al. 2001; ALVES, DIAS, BENASSI, 2006; CARVALHO et al., 2001; CASTRO, MARRACCINI, 2006). Produzem flores com aroma de jasmim e frutos conhecidos como cerejas, onde dentro de cada fruto há dois invólucros, uma polpa e um pergaminho, e ainda, dentro de cada fruto há dois grãos de café (MARTINS, 2008).

Existem várias formas de diferenciação entre as duas espécies de café citadas anteriormente. A espécie *C. arabica* é um tetraploide ( $2n = 44$  cromossomos), é autocompatível, reproduzindo-se por meio de autofecundação. Esta é cultivada em altitudes mais elevadas com temperaturas entre 18 e 22°C em climas mais amenos. Tem um grão verde claro, de formato ovalar, que pode ser comercializado puro, sem mistura ou *blend*. Já a espécie *Coffea canephora* é um diploide ( $2n = 22$  cromossomos) que se reproduz por meio de fecundação cruzada, principalmente pela ação do vento e dos insetos polinizadores. É adaptada a regiões de baixa altitude e temperaturas elevadas, de grande rusticidade, oferece maior resistência às pragas, e seu grão é arredondado e de coloração castanho (AGUIAR et

al., 2005; CASTRO; MARRACCINI, 2006; CLARINDO; CARVALHO, 2009; GASPARI-PEZZOPANE, 2007; ALVES; DIAS; BENASSI, 2006, MARTINS, 2008). Os pés de café em geral atingem de 2 a 2,5 metros, podendo chegar a 10 metros de altura (MARTINS, 2008).

Outros aspectos devem ainda ser considerados dentro do cultivo de café quanto à escolha da espécie a ser cultivada, como boa adaptação e produtividade nas condições ecológicas regionais. Além disso, há outras características agronômicas importantes na sua utilização como: a maturação dos frutos; arquitetura e porte das plantas; e a tolerância às pragas, doenças e deficiências. Diante desses aspectos, as variedades comerciais de café arábica recomendadas atualmente são: Mundo Novo, Catuaí e Tupi, sendo que, para a escolha das linhagens mais adaptadas, deve-se levar em conta as informações obtidas nas estações experimentais mais próximas e em condições semelhantes da área de plantio do cafezal (ACA, 2012).

As espécies *C. arábica* e *C. canephora* não apresentam somente diferenças botânicas, mas também acerca dos seus valores comerciais, onde o *C. arabica* tem valores de 20 a 25% maiores que o *C. canephora* (PIZARRO; ESTEBAN-DÍEZ; GONZÁLEZ-SÁIZ, 2007). Esta valorização se deve ao *C. arabica* produzir um café fino, de aroma e sabor mais apreciado no mundo. O *C. canephora* produz um café com sabor mais adstringente e amargo, é muito usado em *blends*, é considerado neutro e tem maior concentração de sólidos solúveis, resultando em um maior rendimento industrial (MARTINS, 2008).

De acordo com a classificação para o café arábica há sete subgrupos de bebida, sendo os primeiros quatro subgrupos de bebidas finas e os três últimos de bebidas fenicadas: estritamente mole; mole; levemente mole; dura; riado; rio e riozona. O grupo robusta é classificado em quatro subgrupos: excelente; boa; regular e anormal (BRASIL, 2003).

### 1.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ

O café pode ter sua composição química alterada de acordo com a variedade e espécie estudada. Esta variação também pode ocorrer devido a condições ambientais como: solo, clima, altitude, e condições de tratamento pós-colheita como: tipo de manejo, grau de maturação, e do tipo de acondicionamento dado ao grão (COFFEE BREAK, 2013).

O café torrado e moído apresenta composição típica na ordem de 5,2 a 9,6% de umidade, 13,8 a 17,7% de proteínas, 6,9 a 11,1% de lipídios, 62,7 a 72,0% de carboidratos, 4,6 a 5,0% de cinzas, 14,6 a 21,5% de fibras (SILVA, ASCHERI e PEREIRA, 2007). Observando esses dados pode-se notar que os carboidratos são os compostos químicos presentes em maior quantidade na matriz do grão de café, portanto, merecem um destaque especial no estudo da formação de sabor e, conseqüente, da qualidade da bebida.

Nos grãos de café verde a glicose corresponde 0,03%, a frutose a 0,04%, e sacarose de 5 a 12% do peso seco (ROGERS et al., 1999). Os polissacarídeos da parede celular representam 50% do peso seco do grão de café verde e consistem em três principais estruturas: mananas ou galactomananas, arabinogalactanas - proteínas e celulose. Além disso, existem pequenas quantidades de pectinas e xiloglucanas (FISCHER et al., 2001; REDGWELL; FISCHER, 2006). Os arabinogalactanas são depósitos de polímeros derivados das pectinas, enquanto as mananas e xiloglucanas são depósitos de polímeros de hemicelulose (BUCKERIDGE et al., 2000).

No caso dos grãos de café torrado e moído, ocorrem importantes alterações na estrutura dos compostos responsáveis pela formação de sabor e do aroma da bebida. A coloração do grão pode ser considerada como um indicativo do grau de torrefação, ao qual o grão foi submetido. O processo de torrefação favorece também o aumento da extração de

açúcares devido a modificações causadas na microestrutura dos grãos, como o aumento do volume e conseqüentemente dos microporos presentes na parede celular do grão, o que favorece a acessibilidade dos polímeros da parede celular ao solvente extrator ocasionando maior solubilização de polissacarídeos (REDGWELL; FISCHER, 2006; REDGWELL et al., 2002).

#### 1.4. QUALIDADE DO CAFÉ

O aroma do café é composto por uma complexa mistura de inúmeros compostos presentes em diferentes concentrações e diferentes poderes odoríficos (BUFFO, CARDELLI-FREIRE, 2004). A qualidade da bebida pode ser afetada por diversos fatores, dentre estes, pode-se destacar fatores climáticos e condições de armazenamento pós-colheita dos grãos (MARTINS, 2003).

O método de avaliação da qualidade do café mais empregado mundialmente se baseia na avaliação sensorial. Neste método, procede-se a seleção de provadores treinados para desenvolver um perfil sensorial de aroma e sabor da bebida através da prova de xícara (DELLA MODESTA et al., 2000). Estudos demonstraram que, de acordo com a classificação sensorial, a qualidade e o corpo da bebida do café arábica não apresentaram alterações após 150 dias de armazenamento convencional (PADUA et. al., 2002).

O sabor doce e desejado da bebida do café está diretamente relacionado com a presença de açúcares dos grãos após o processo de torrefação. Verificou-se que os cafés considerados como de melhor qualidade possuem também os maiores teores de açúcares totais, indicando que o teor de carboidratos pode ser considerado como um bom marcador químico para a qualidade do café (CHAGAS et. al., 1996, SILVA et al., 2002, SILVA, 1999).

Também em relação à qualidade da bebida, esta pode estar relacionada a outros fatores como a umidade relativa do ar e aos sistemas de colheita e de derricha no pano. Altas umidades relativas do ar aliadas a altas temperaturas, demonstraram ser condições desfavoráveis para a obtenção de um produto de melhor qualidade (CARVALHO, CHAGAS, SOUZA, 1997, THEODORO, 2001, MARTINS, 2003, REINATO, 2006).

Devido à alta complexidade da bebida de café, ao grande número de atributos em questão e à subjetividade de provadores e consumidores, tem sido difícil estabelecer uma definição de qualidade do café (MONTEITO et al. 2005). Desta forma há uma demanda por métodos menos subjetivos de caracterização da qualidade do café, visando atender à crescente demanda do mercado consumidor por produtos de melhor qualidade.

#### 1.5. ANÁLISE HIERÁRQUICA DE AGRUPAMENTOS

O termo *cluster analysis* ou análise de agrupamentos engloba um número de diferentes algoritmos e métodos de agrupamento de objetos de diferentes tipos em categorias ou classes. Ou seja, é uma ferramenta de análise exploratória de dados, que tem como objetivo agrupar diferentes dados em grupos, de modo a que o grau de associação seja máximo, se estes pertencerem ao mesmo grupo, e mínima se não pertencerem (STATSOFT, 2004). No algoritmo do vizinho mais próximo, a distância entre dois *clusters* é determinada pela distância dos dois objetos mais próximos nos diferentes *clusters*. Esta regra irá, de certa forma, ligar objetos de modo a formarem *clusters*, e os *clusters* resultantes tendem a representar longas cadeias. O algoritmo começa com  $k$  *clusters* aleatórios, movendo depois os objetos entre esses *clusters*, com o objetivo de minimizar a variabilidade nos *clusters* e

maximizar a variabilidade entre *clusters* (MILLER et al., 2005). A representação gráfica dos objetos de acordo com o seu grau de semelhança designa-se por dendrograma.

#### 1.6. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

*PCA* (*Principal Component Analysis*) ou Análise de Componentes Principais (ACP) é um método matemático para reorganizar informação de um conjunto de dados de amostragem. Torna-se muito útil quando o conjunto de amostras possui informação de um grande número de variáveis. O que um *PCA* faz é descobrir novas variáveis, os *Principal Components* (*PCs*), ou “componentes principais”, que consigam reunir a maioria da variabilidade dos dados. Assim, cada componente principal é calculado de forma a reter a maior quantidade de variância presente nas variáveis originais. Isto permite descrever a informação, com consideravelmente menos variáveis, do que as originalmente presentes (DAVIES, FEARN, 2004).

Um *PCA* consiste numa decomposição de vetores próprios da matriz de covariância ou correlação dos dados originais (WISE et al., 2003).

O primeiro *PC* é a direção através dos dados que captura a maior fração de variabilidade destes dados. O segundo e o terceiro *PCs* são ortogonais em relação ao *PC* anterior e descrevem a maior fração da variabilidade restante. Uma vez que sabemos as direções dos *PCs*, é possível expressar os valores das amostras individuais em termos de *PCs* como somatórios lineares destes multiplicados por coeficientes que descrevem o peso (*loadings*) de cada *PC*. Estes novos valores (coeficientes) são os *scores* e cada amostra terá um *score* para cada *PC* (tal como teria um valor de absorvância para cada comprimento de onda nos dados originais) (DAVIES, FEARN, 2004). Estes *scores* podem ser representados

graficamente num Mapa de Componentes Principais (*score plot*). Uma vez que, na maioria dos casos uma grande parte da variância é retida nos primeiros componentes principais, os dados após um *PCA* podem ser representados num mapa de componentes principais em duas ou três dimensões, descrevendo a maioria da informação presente nos dados e facilitando a sua interpretação (OTTO, 1999).

### 1.7. ANÁLISE DE DIMENSÕES COMUNS (COMDIM)

A análise de dimensões comuns (ComDim) é um método multi-tabela (do inglês, *common dimension*) baseado na análise de pesos específicos. É uma ferramenta estatística utilizada para avaliação de diferentes tabelas de dados adquiridos para um mesmo número de amostras. A aplicação deste método não exige que as tabelas contenham, necessariamente, o mesmo número de variáveis. O método *ComDim* se baseia na soma ponderada das matrizes de variância-covariância de um mesmo grupo amostral para extração da primeira dimensão comum (DC) ou componente comum (CC), sendo que a cada bloco do *CC* calculado é atribuído um peso, ou saliência). Assim, a porcentagem de variância amostral explicada por cada *CC* pode ser calculada (QANNARI et al., 2000; BOUVERESSE et al., 2011).

A aplicação deste método multi-tabela é interessante, pois leva ao agrupamento de dados dispersos em uma série de tabelas distintas, a resultados gráficos altamente informativos, facilitando a análise e interpretação de dados complexos. O resultado expressa a variação de cada amostra com relação aos componentes comuns pelo gráfico de *scores* e *loadings*, permitindo avaliar qual tabela é mais importante para explicação da variância em um conjunto de dados (QANNARI et al., 2000).

## 1.8. IMPUREZAS EM CAFÉ TORRADO E MOÍDO

A detecção de impurezas e misturas no café é uma preocupação constante no que diz respeito principalmente à garantia da qualidade do produto. Considera-se fraude a mistura, intencional ou não, de materiais estranhos ao produto, normalmente de baixo custo, que alterem a sua qualidade e causem danos ao consumidor, especialmente, os de ordem econômica (ASSAD et al., 2002). A *International Organization for Standardization (ISO)*, define impurezas ou “defeitos” como sendo: madeira, gravetos, cascas (ou palha), ou cerejas inteiras, que podem estar presentes no café (ISO 3509, 2003). No Brasil, as impurezas, com maior frequência, adicionadas ao café são cascas e paus, milho, cevada, trigoilho, açúcar mascavo e soja (ASSAD et al., 2002).

A Portaria nº 377, de 26 de abril de 1999 (Brasil 1999), foi criada com o objetivo de fixar a identidade e as características mínimas de qualidade a que devem obedecer, os cafés torrado em grão e torrado e moído. A legislação especifica os requisitos obrigatórios em relação à composição, características sensoriais e físico-químicas e estabelece normas para o uso de aditivos e para a presença de contaminantes. O teor máximo de impurezas tolerado em café torrado é de 1%.

O processo convencionalmente utilizado para detecção de fraudes em café torrado e moído por laboratórios credenciados no Brasil consiste na preparação de lâminas microscópicas e na sua análise visual. Por se tratar de análise microscópica, este processo constitui-se em um método subjetivo e, conseqüentemente, a confiabilidade dos resultados é pequena, já que depende da experiência do analista e, por isso, está sujeita a erros humanos (ASSAD et al., 2002). Assad et al. (2002) usaram princípios físicos de sensoriamento remoto empregando comportamento espectral e análises de imagens digitais para quantificar

impurezas e misturas adicionadas ao pó de café puro. Entretanto, ainda há carência de métodos analíticos mais rápidos, de maior facilidade de execução e não destrutíveis para sua completa implementação em análises de triagem.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver métodos analíticos para auxiliar no controle de qualidade do café torrado e moído, empregando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada ao arranjo de diodos e à espectrometria de massas e a espectroscopia NIR, traçando um panorama dos produtos comercializados no Brasil.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método cromatográfico rápido empregando UHPLC-DAD para análise de cafeína e trigonelina em amostras de cafés comerciais para auxiliar na identificação de *blends* das espécies arábica e conilon;
- Desenvolver um método cromatográfico sensível para detecção em plasma dos metabólitos da cafeína - paraxantina, teofilina e teobromina por UPLC-MS/MS, visando auxiliar o entendimento dos efeitos do consumo de café no organismo;
- Desenvolver e validar um método cromatográfico utilizando UPLC-MS/MS com foco na investigação do perfil metabólico do café;
- Aplicar a metodologia de cromatografia iônica líquida de alta eficiência com detecção por amperometria pulsada (HPAEC-PAD) em amostras de cafés comerciais, visando à detecção de possíveis adulterantes;
- Criar um banco de dados no espectrômetro NIR de cafés premiados e comerciais, analisados por técnicas primárias anteriormente, com foco utilização de método rápido para auxiliar do controle de qualidade do café do torrado e moído.

## REFERÊNCIAS

**ABIC** – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em:

<<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

**ABNT** - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Especificação e de cores de acordo com o sistema de notação de Munsell. **NBR 12694**. Rio de Janeiro: ANBT, 1992.

**ACA** – Associação dos Cafeicultores de Araguari. Disponível em:

<<http://www.aca.com.br>>. Acesso em: 14 fev. 2012.

AGUIAR, A. T. E.; SALVA, T. J. G.; FAZUOLI, L. C.; FAVARIN, J. L. Variação no Teor de Lipídeos em Grãos de Variedades de *Coffea canephora*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.12, p.1251-1254, 2005.

ALVES, S. T.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. T. Metodologia para Análise Simultânea de Ácido Nicotínico, Trigonelina, Ácido Clorogênico e Cafeína em Café Torrado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.6, p.1164-1168, 2006.

ALVES, M. R.; CASAL, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERREIRA M. A. Contribution of FA profile obtained by high-resolution GC/chemometric techniques to the authenticity of green and roasted coffee varieties. **Journal of the American Oil Chemists’ Society**, v. 80 (6), p. 511 – 517, 2003.

ANDRADE, P. B.; LEITÃO, R.; SEABRA, R. M.; OLIVEIRA, M. B.; FERREIRA, M. A.; *Coffea canephora* variation robusta and *Coffea arabica*. **Food Chemistry**, v.61,n.511, 1998.

ANDRADE-EIROA, A.; ERUSTES, J. A.; FORTEZA, R.; CERDÁ, V.; LIMA, J. L. F. C. Determination of chloride by multisyringe flow injection analysis and sequential injection analysis with potentiometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 467 (1-2), p. 25-33, 2002.

ASSAD, E.D.; CORREA, T.B.S.; CUNHA, S. A. R. Identificação de impurezas e misturas em pó de café por meio de comportamento espectral de imagens digitais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.2, p.211-216, 2002.

ATAPATTU, S. N.; ROSENFELD, J. M. Solid phase analytical derivatization as a sample preparation method. **Journal of Chromatography A**. 1296, 204, 2013.

BARTH, H. G.; BARBER, W. E.; LOCHMUELLER, C. H. MAJORS, R. E.; REGNIER, F. E. Column liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 12, p. 387-485, 1988.

BABOVA, O.; OCCHIPINTI, A.; MAFFEI, M. E. Chemical partitioning and antioxidant capacity of green and coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different regional origin. **Phytochemistry**, v. 123, p. 33-39, 2016.

BICCHI, C. P.; PANERO, O. M.; PELLEGRINO, G. M. VANNI, A. C.; Characterization of roasted coffee and coffee beverages by solid phase microextraction-gas chromatography

and principal component analysis. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.4680, 1997.

BICHO, N. C.; LIDON, F. C.; RAMALHO, J. C.; LEITAO, A. E. Quality assessment of Arabica and Robusta green and roasted coffees – a Review. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 25, p. 945-950, 2013.

BORÉM, M. F., NOBRE G. W., FERNANDES, S. M. PEREIRA, R. G. F. A., OLIVEIRA, P. D. Avaliação sensorial do café cereja descascado, armazenado sob atmosfera artificial e convencional. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.6, p. 1724-1729, 2008.

BOTEZ, I.; PET, E., Study regarding consumers preferences in choosing the product. **Lucrări Științifice**, s. 1, v. 21 (3), 2019.

BOUHSAIN, Z.; GARRIGUES, J. M.; GARRIGUES, S. GUARDIA, M.; Flow injection Fourier transform infrared determination of caffeine in coffee. **Vibrational Spectroscopy**, v.21, n.143, 1999.

BOUVERESSE, D. J.-R.; PINTO, R. C.; SCHMIDTKE, L. M.; LOCQUET, N.; RUTLEDGE, D. N. Identification of significant factors by an extension of ANOVA-PCA based on multi-block analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 106, p. 173-182, 2011.

BRAGANÇA, S. M.; CARVALHO, C. H. S.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G. Variedade Clonais de Café Conilon para o Estado do Espírito Santo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 5, p. 765-770, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº377 de 26 de abril de 1999. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n.80, p.22-29, 1999. Seção 1.

BUCKERIDGE, M. S.; TINÉ, M. A. S.; SANTOS, H. P.; LIMA, D. U. Polissacarídeos de Reserva da Parede Celular em Semente, Estruturas, Metabolismo, Funções e Aspectos Ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Paulo, v. 12, edição especial, p.137-162, 2000.

BUFFO, R. A.; CARDELLI-FREIRE, C. Coffee flavour: an overview. **Flavour and Fragrance Journal**, John Wiley & Sons, London Library, v.19, n.2, p.99-104, 2004.

CAFÉ PINDENSE – Despertando Sabor. Disponível em: <<http://www.cafepindense.com>>.

ABIC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 6 jan. 2014.

CARRERA, F.; LEÓN-CAMACHO, M.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ A. G.; Authentication of green coffee varieties according to their sterolic profile. **Analytica Chimica Acta**, v.370, n.131,1998.

CARVALHO, V. D.; CHAGAS, S.J.R.; SOUZA, S.M.C. Fatores que afetam a qualidade do café. **EPAMIG – Informe Agropecuário** v.18, n.187, p.5-20, 1997.

CARVALHO, L. M.; SILVA, E. A. M.; AZEVEDO, A. A.; MOSQUIM, P. R.; CECON, P. R. Aspectos Morfofisiológicos dos Cultivares de Cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.3, p.411-419, 2001.

CASAL, S.; OLIVEIRA, M. B.; FERREIRA, M. A. Development of a HPLC/DIODE-ARRAY detector method for simultaneous determination of trigonelline, nicotinic acid, and

caffeine in coffee. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v. 21, n. 20, p. 3187-3195, 1998.

CASTRO, R. D.; MARRACCINI, P. Cytology, Biochemistry and Molecular Changes During Coffee Fruit Development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.1, p.175-199, 2006.

CHAGAS, S. J. R., CARVALHO, V. D., COSTA, L. Caracterização química e qualitativa de cafés de alguns municípios de três regiões produtoras de Minas Gerais. II. Valores de acidez titulável e teores de açúcares (reduzidos, não reduzidos e totais). **Ciência e Agrotecnologia**, v.20, p.224-231, 1996.

CHARLTON, A. J.; Farrington, W. H. H.; BRERETON, P.; Application of  $H^1$  NMR and multivariate statistics for screening complex mixtures: quality control and authenticity of instant coffee. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.3098, 2002.

CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R. Comparison of the *Coffea canephora* and *C. arabica* karyotype based on chromosomal DNA content. **Plant Cell Reports**, v.28, p.73-81, 2009.

CLARKE, R. J.. Grading, storage, pre-treatments and blending. In R. J. Clarke & R. Macrae (Eds.), **Coffee volume 2: technology** (p. 35–58). Amsterdam: Elsevier Applied Science, 1987.

CNC – CONSELHO NACIONAL DO CAFÉ. Disponível em:

<<http://www.cncafe.com.br>>. Acesso em: 26 jun. 2012.

**COFFEE BREAK.** Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S.; **Introdução a métodos cromatográficos.** Campinas: UNICAMP, 279 p., 1995.

**CONAB** – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em <<https://www.conab.gov.br/>>. Acesso em dezembro de 2018.

**CONAB** – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <[file:///C:/Users/pc/Downloads/BoletimZCafeZjaneiroZ2019\\_1.pdf](file:///C:/Users/pc/Downloads/BoletimZCafeZjaneiroZ2019_1.pdf)>. Acesso em: 1 abr. 2019.

COPORASO, N.; WHITWORTH, M. B.; CUI, C.; FISK, I. D. Variability of single bean coffee volatile compounds of Arabica and robusta roasted coffees analysed by SPME-GC-MS. **Food Research International**, v. 108, p. 628-640, 2018.

COUTINHO, L. F. M. **Desenvolvimento de Sistema Instrumental para Determinação de Carboidratos em Café Solúvel Utilizando HPAE-PAD.** Trabalho de Conclusão de Curso em Química, UEL, 2003.

COUTINHO, L. F. M. **Desenvolvimento de instrumentação dedicada a Cromatografia Líquida Capilar (cLC).** Tese (Doutorado em Química – Química Analítica), Universidade de São Paulo. São Carlos, 2008.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C. Componentes voláteis do café torrado. Parte I: Compostos heterocíclicos. **Química Nova**, v.22, n.2, p.209-217, 1999.

DELLA MODESTA, R. C.; GONÇALVES, E. B.; FERREIRA, J. C. S. Desenvolvimento e validação do perfil sensorial para bebida de café brasileiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Resumos expandidos**. Brasília: Embrapa Café; MINASPLAN, v.1, p.716-719, 2000.

DIONEX. Technical Note 20. **Analysis of carbohydrates by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD)**.

Disponível na Internet via URL

<<http://www.dionex.com/servletw11/FileDownloader/slot114/77786/TN20releasedJC120600.pdf>>. Acesso e download em: 23 mar. 2000.

**EMBRAPA** – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Brasil - maior produtor mundial de café - exporta 35,15 milhões de sacas com média mensal de 2,92 milhões de sacas em 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/41551077/brasil---maior-produtor-mundial-de-cafe---exporta-3515-milhoes-de-sacas-com-media-mensal-de-292-milhoes-de-sacas-em-2018>. Acesso em: 24 jun. 2019.

**EMBRAPA** – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa Café. Disponível em: <<http://www22.sede.embrapa.br/cafe/>>. Acesso em: 28 out. 2018.

ESTEBAN-DÍEZ, I.; GONZÁLEZ- SÁIZ, J. M.; PIZZARRO, C.; An evaluation of orthogonal signal correction methods for the characterization of Arabica and Robusta coffee varieties. **Analytica Chimica Acta**, v.514, n.57, 2004.

FERRUZZI, M. G.; The influence of beverage composition on delivery of phenolic compounds from coffee and tea. **Physiology & Behavior**, v. 100 (1), p. 33 – 41, 2010.

FISCHER, M.; REIMANN, S.; TROVATO, V.; REDGWELL, R.J.; Polysaccharides of green Arabica and Robusta coffee beans. **Carbohydrates Research**, v.330, p.93-101, 2001.

GASPARI-PEZZOPANE, C. **Atributos Fenológicos, Agronômicos e Expressão Gênica Durante a Frutificação do Cafeeiro**. 2007. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

GOLAY, M. J. E. Gas Chromatography. London: Butterwords, 36 p., 1958.

HURTADO-BENAVIDES, A.; DORADO, D. A.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P. Study of the fatty acid profile and the aroma composition of oil obtained from roasted Colombian coffee beans by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 113, p. 44-52, 2016.

Instrução normativa nº 8, de 11 de junho de 2003. **Regulamento técnico de identidade e de qualidade para a classificação do café beneficiado grão cru**. Disponível em: <[http://www.abic.com.br/arquivos/leg\\_instnormativa08\\_2003.pdf](http://www.abic.com.br/arquivos/leg_instnormativa08_2003.pdf)>. Acesso em: 28 jan. 2013.

JING, M., CAI, W., SHAO, X. Quantitative determination of the components in corn and tobacco samples by using near-infrared spectroscopy and multiblock partial least squares. **Analytical Letters** 43 (12), 1910-1921, 2010.

KUČERA, L.; PAPOUŠEK, R.; KURKA, O.; BARTÁK, P.; BEDNÁŘ, P. Study of composition of espresso coffee prepared from various roast degrees of *Coffea arabica* L. coffee beans. **Food Chemistry**, v. 199, p. 727-735, 2016.

JOHNSON, D. C.; LACOURSE, W.R. Liquid chromatography with pulsed electrochemical detection at gold and platinum electrodes. **Analytical Chemistry**. v. 62, p. 589 A–597 A, 1990.

KAPINUS, E. N.; REVELSKY, I. A.; ULOGOV, V. O.; LYALIKOV, YU. A. Simultaneous determination of fluoride, chloride, nitrite, bromide, nitrate, phosphate and sulfate in aqueous solutions at  $10^{-9}$  to  $10^{-8}$  % level by ion chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 800 (1-2), p. 321-323, 2004.

LANÇAS, F. M. The role in the separation sciences in the 21 (th) century. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.14, n.2, p 183-197, 2003.

LANÇAS, F. M. Packed capillary liquid chromatography. In: CAZES, J. (Ed.). Encyclopedia of chromatography. New York. Marcel Dekker, v.1, 2000.

LÄMMERHOFERA, M.; SVEC, F.; FRÉCHET, J. M. J.; LINDNERC, W. CAPILLARY. Electrochromatography in anion-exchange and normal-phase mode using monolithic stationary phases. **Journal of Chromatography A**, 925, 265–277, 2001.

LINGLE, T. R. The basics of cupping coffee. Long Beach: **Specialty Coffee Association of America**, 1993.

MAEZTU, L.; SANZ, C.; ANDUEZA, S.; DE PEÑA, M. P.; BELLO, J.; CID, C.;  
Characterization of espresso coffee aroma by HS-GC-MS and sensory flavor profile.  
**Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.5437, 2001.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.  
Agrostat: Estatísticas de Comercio Exterior do Agronegócio Brasileiro. Disponível em:  
<<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/AGROSTAT.html>>. Acesso em: 11 dez.  
2018.

MARTÍN, M. J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A. G. Characterization of arabica and robusta  
roasted coffee varieties and mixture resolution according to their metal content. **Food  
Chemistry**, v.66, n.365-370, 1999.

MARTINS, A. L. **História do Café**. São Paulo: Contexto, 2008. 320 p.

MARTINS, D. R.. **Estado Nutricional e Qualidade de Bebida em Cafeeiros Tratados  
Com Lodo de Esgoto**. Campinas SP. Instituto Agrônomo(IAC). Jul-2003. Disponível  
em:<<http://www.iac.sp.gov.br>>. Acesso em: 16 out. 2012.

MELO, W. L. B. A importância da informação sobre do grau de torra do café e sua  
influência nas características organolépticas da bebida. **Embrapa: Comunicado Técnico  
58**, São Carlos, 2004.

MESQUITA, R. B. R.; FERNANDES, S. M. V.; RANGEL, A. O. S. S. Turbidimetric  
determination of chloride in different types of water using a single sequential injection  
analysis system. **J. Environ. Monit.**, 4, 458-461, 2002.

MONTEIRO M. C.; TRUGO L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.4, p.637-641, 2005 (a).

MONTEIRO, M.A.M., MINIM, V. P. R., SILVA, A. F., CHAVES, J. B. P., CARDELLO, H. M. A. B. Perfil sensorial da bebida café (*Coffea arabica* L.) determinado por análise tempo-intensidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.4, p.772-780, 2005 (b).

MONTEIRO, P. I.; SANTOS, J. S.; RODIONOVA, O. Y; POMERANTSEV, A.; CHAVES, E. S.; ROSSO, N. D.; GRANATO, D. Chemometric Authentication of Brazilian Coffees Based on Chemical Profiling. **Journal of Food Science**, v. 84 (11), p. 3099-3108, 2019.

MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C. Aplicação da cromatografia por exclusão e da cromatografia gasosa de alta resolução na análise do café. **Química Nova**, São Paulo, v.20, n.1, p.5-8, 1997.

NABAIS, J.V.; CARROTT, P.; CARROTT, M. M. L. R.; LUZ, V.; ORTIIZ, A. L. Influence of Preparation Conditions in the Textural and Chemical Properties of Activated Carbons from a Novel Biomass Precursor: The Coffee Endocarp. **Bioresource Technology**, v.99, p.7224-7231, 2008.

NEAL, M.; NEAL, C.; WICKHAM, H.; HARMAN, S. Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate and sulphate by ion chromatography: comparisons of methodologies for rainfall, cloud water and river waters at the plynlimon catchments of

mid-Wales. **Hydrology and Earth System Sciences Discussions**, v. 11 (1), p. 294-300, 2007.

NOBRE, G. W.; BORÉM, F. M.; FERNANDES, S. M.; PEREIRA, R. G. F. A. Alterações Químicas do Café-Cereja Descascado Durante o Armazenamento. **Coffee Science**, v.2, n.1, p.1-9, 2007.

OIC – ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ. Disponível em:  
<<http://www.ico.org>>. Acesso em: 22 dez. 2018.

OZEKIN, K.; WESTERHOFF, P.; AMY, G. L.; SIDDIQUI, M. Molecular ozone and radical pathways of bromate formation during ozonation. **Journal of Environmental Engineering**, May, 456. 1998

PÁDUA, F. R. M. PEREIRA, R. G. F. A., LOPES, L. M. V., MORAIS, A. R., MELO, W. C., FERNANDES, S. M. Avaliação sensorial e da composição química, durante o armazenamento, do café torrado e moído. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.5, p.15-21, 2002. Especial café.

PAPADASKI, S. E.; MALEK, S. A.; KAMDEM, R. E.; YAM, K. L. A Versatile and Inexpensive Technique for Measuring Color of Food. **Food Technology Magazine**, v. 54, n. 12, dez, 2000.

Pedro, A.M.K.; Ferreira, M.M.C. 2005. Nondestructive determination of solids and carotenoids in tomato products by near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Analytical Chemistry** 77, 2505–2511.

PIMENTA, C.J. **Qualidade de café**. Lavras: UFLA. 304p., 2003.

PIZARRO, C.; ESTEBAN-DÍEZ, I.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M. Mixture resolution according to the percentage of robusta variety in order to detect adulteration in roasted coffee by near infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.585, p.266-276, 2007.

QANNARI, E. M.; WAKELING, I.; COURCOUX, P.; MACFIE, H. J. H. Defining the underlying sensory dimensions. **Food Quality and Preference**, v.11, p.151-154, 2000.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quim. Nova**, v. 24, n.1, 68-76, 2001.

RAHMAN, I. M. M.; BEGUM, Z. A.; HASEGAWA, H.; Selective separation of elements from complex solution matrix with molecular recognition plus macrocycles attached to a solid-phase: A review. **Microchem. J.**,110, 485. 2013.

RAMOS W. O mercado interno e a qualidade do café (entrevista) **EPAMIG - Informe Agropecuário**, v.18, n.187, p.73-76, 1997.

REDGWELL, R. J.; TROVATO, V.; CURTI, D. FISCHER, M. Effect of roasting on degradation and structural features of polysaccharides in Arabica coffee beans. **Carbohydrate Research**, v.337, p.421-431, 2002.

REDGWELL, R.J.; FISCHER, M.; Coffee carbohydrates. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18 n.1, p.165 - 174, 2006.

REINATO, C. H. R. Secagem e armazenamento do café: aspectos qualitativos e sanitários 2006. 111 p. **Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)**. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2006.

REIS, C.; ANDRADE, J. C. Planejamento Experimental para Misturas Usando Cromatografia em Papel. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 3, 1996.

RIBEIRO, J. S.; AUGUSTO, F. e FERREIRA, M. M. C; SALVA, T. J. G. Uso de perfis cromatográficos de voláteis de cafés arábicas torrados para a diferenciação das amostras segundo o sabor, o aroma e a qualidade global da bebida. **Química Nova**, v.33, n.9, p.1897-1904, 2010.

ROGERS, W. J.; MICHAUX, S.; BASTIN, M.; BUCHELI, P. Changes to the Content of Sugars, Sugars Alcohols, Myo-Inositol, Carboxylic Acids and Inorganic Anions in Developing Grains Form Different Varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) Coffees. **Plant Science**, v.149, p.115-123, 1999.

SANTOS, K. M.; MOURA, M. F. V.; AZEVEDO, F. G.; LIMA, K. M. G.; RAIMUNDO JR., I. M.; PASQUINI, C. Classification of Brazilian Coffee Using Near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Calibration. **Analytical Letters** 45, (7) 774-781. 2012

SHAN, J.; SUZUKI, T.; SUHANDY, D.; OGAWA, Y.; KONDO, N. Chlorogenic acid (CGA) determination in roasted coffee beans by Near Infrared (NIR) spectroscopy. **Engineering in Agriculture, Environment and Food**, v. 7 (4), 2014.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8 ed. São Paulo: Thomson, 2006.

SILVA, E. B. NOGUEIRA, F. D., GUIMARÃES, P. T. G.. Qualidade de grãos de café beneficiados em resposta à adubação potássica. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59, n.1, p.173-179, 2002.

SILVA, J. S.; BERBERT, P.A. **Colheita, secagem e armazenamento do café**. Viçosa. Aprenda Fácil, 1999. 146 p.

SILVA, R. F. da; ASCHERI, J. L. R.; PEREIRA, R. G. F. A. Composição centesimal e perfil de aminoácidos de arroz e pó de café. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**. v.18, n.3, p. 325-330, 2007.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3 ed. New Jersey: John Willey & Sons, 2010.

SOUZA, R. M. N. **Caracterização e Discriminação de Cafés Torrados e Moídos Comerciais pela Composição de Substâncias Bioativas**. 2009. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

STOCKWELL, P. B. The role of flow injection analysis within the framework of an automated laboratory. **The Journal of Automatic Chemistry**, v.12, n.3, p. 95-103, 1990.

THEODORO, V.C.A. Caracterização de sistemas de produção de café orgânico, em conversão e convencional. 2001. 214f. **Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia)** – Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2001.

LEROY T. ; RIBEYRE F. ; BERTRAND B. ; CHARMETANT P. ; DUFOUR M. ; MONTAGNON C. ; MARRACCINI P. ; POT, D. Genetics of coffee quality. **Brazil Journal of Plant Physiology**, v.18, n., p.229-242, 2006.

**USDA** – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Disponível em:  
<<http://www.usda.gov>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

**VALCO INSTRUMENTS CO** ®. Disponível em: <[http://www.vici.com/vval/hplc\\_int\\_16-40.php#six](http://www.vici.com/vval/hplc_int_16-40.php#six)>. Acesso em: 1 jul. 2018.

WORKU, M.; MEULENAER, B.; DUCHATEAU, L.; BOECKX, P. Effect of altitude on biochemical composition and quality of green arabica coffee beans can be affected by shade and postharvest processing method. **Food Research International**, v. 105, p. 278 – 275, 2018.

YAN-DE, L., YI-BIN, Y., XIAPING, F. AND GUIBAN, L. (2007). Experiments on predicting sugar content in apples by FT-NIR technique. **Journal of Food Engineering** 80, 986–989.

YANG, F. J. **Microbore column chromatography**. New York: Marcel Dekker, 1989, 405 p.

**Capítulo 2**

**DESENVOLVIMENTO,  
VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE  
UM MÉTODO RÁPIDO E SENSÍVEL  
PARA DETERMINAÇÃO DE  
TRIGONELINA E CAFEÍNA POR  
UHPLC-DAD EM CAFÉ TORRADO  
E MOÍDO**

**Desenvolvimento, validação e aplicação de um método rápido e sensível para determinação de trigonelina e cafeína por UHPLC-DAD em café torrado e moído**

Development, validation and application of a rapid and sensitive method for determining trigonelline and caffeine by UHPLC-DAD present in roasted and ground coffee

Tiago Bervelieri Madeira, Giselle Lopes Silva, Lycio Shinji Watanabe, Caroline Teixeira Lopes, Alexandre Vinicius Guedes Mazalli, Mariana Bortholazzi Almeida, Suzana Lucy Nixdorf.\*

Laboratório de Desenvolvimento de Instrumentação, Automação e Metodologia Analítica (DIA), Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia CID, PR 445, Km 380 CEP 86.057-970- Londrina, PR, Brasil.

\*snixdorf@uel.br

**Recebido: 04/09/2017**

**Aceito: 01/11/2017**

Scientia Chromatographica 2017; 9(3):160-170

<http://dx.doi.org/10.4322/sc.2017.013> ISSN 1984-4433

## Resumo

A trigonelina e a cafeína são alcaloides do grupo das xantinas de grande importância biológica. Estão presentes em inúmeros alimentos e fármacos, atuando de diferentes maneiras, com ação estimulante, sendo precursores de compostos bioativos e, como pró-fármacos. Despertam crescente interesse na determinação de seus teores pela diversidade de aplicações, sendo utilizados, por exemplo, como marcadores na diferenciação entre café arábica (*Coffea arabica*) e robusta (*Coffea canephora*). Por este motivo, este trabalho propõe o desenvolvimento de um método cromatográfico sensível para determinação rápida de trigonelina e cafeína em café por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (UHPLC-DAD). O método desenvolvido foi validado segundo a RE 899/2003 da ANVISA e, aplicado na análise de cafés do tipo torrado e moído comerciais. O método mostrou-se adequado para todas as figuras de mérito, com faixa linear de trabalho de 0,20 a 2,00 % (m/m) para a trigonelina e de 0,60 a 6,00 % (m/m) para a cafeína, com limites de quantificação de 0,03 e 0,06 % (m/m) e de detecção de 0,01 e 0,02 % (m/m), respectivamente. Quanto a precisão apresentou repetitividade com desvio padrão relativo (DPR) de 0,12% para a trigonelina e 0,55% para a cafeína, e DPR para a precisão intermediária respectivamente de 0,52 e 1,14% (m/m), apresentando exatidão média de 99,80% em 3 níveis de concentração baixa, média e alta, para ambos os compostos. O método destina-se a auxiliar no controle de qualidade de cafés torrado e moído comerciais.

**Palavras-chave:** *Coffea arabica*, blends de café, desenvolvimento de métodos, validação.

## Abstract

Trigonelline and caffeine are alkaloids from the group of xanthines of great biological importance. They are found in numerous foods and drugs, acting in different ways, with stimulating action, being precursors of bioactive compounds and, as prodrugs. They arouse growing interest in their contents determination by the diversity of applications, being used, for example, as markers in the differentiation between arabica coffee (*Coffea arabica*) and robusta (*Coffea canephora*). For this reason, this study proposed the development of a sensitive chromatographic method for the rapid determination of trigonelline and caffeine in coffee by ultra high-performance liquid chromatography with diode array detection (UHPLC-DAD). The developed method was validated according to ANVISA RE 899/2003 and applied in the analysis of commercial roasted and ground coffee. The method was suitable for all merit figures, with a linear working range of 0.20 to 2.00 % (w/w) for trigonelline and from 0.60 to 6.00 % (w/w) for caffeine, with limits of quantification of 0.03 and 0.06 % (w/w) and detection of 0.01 and 0.02% (w/w), respectively. It presented precision as repeatability with relative standard deviation (RSD) of 0.12% for trigonelline and 0.55% for caffeine, with RSD for the intermediate precision of 0.52 and 1.14%, respectively, with average accuracy of 99.80% in 3 levels of low, medium and high concentration, for both compounds. The method intends to assist in the quality control of commercial roasted and ground coffee.

**Keywords:** *Coffea arabica*, coffee blends, method development, validation.

## 1. INTRODUÇÃO

A trigonelina e a cafeína são alcaloides do grupo das xantinas e apresentam grande importância biológica, principalmente considerando ser a trigonelina precursora de compostos bioativos e a cafeína um estimulante (1). Pelo fato destes compostos serem considerados pró fármacos, atuam na latenciação e formas avançadas de transporte de princípios ativos dos fármacos, como em antirretrovirais (2), ou intensificam a ação de alguns medicamentos para o tratamento do câncer. Por isso, são muito utilizados em associações farmacêuticas.

A trigonelina está presente em diversos alimentos amplamente consumidos pela população mundial como cevada, melão, milho, cebola, ervilha, soja, tomate, crustáceos, peixes, mexilhões e em maior concentração no café (3). Nesta planta, a importância biológica da trigonelina se deve, principalmente, ao fato de a mesma ser precursora da niacina no processo de torrefação do café, e precursora do ácido nicotínico durante o processo de desmetilação, ambos correspondentes à vitamina B3, aumentando o valor nutricional da bebida (1).

A cafeína por sua vez, é considerada uma droga estimulante, utilizada em fármacos e bebidas energéticas. Os efeitos comportamentais mais notáveis ocorrem após a ingestão de doses baixas a moderadas deste composto, verificando-se uma melhoria no desempenho cognitivo e psicomotor do consumidor. Essa melhora seu estado de alerta, energia, capacidade de concentração e do desempenho em tarefas simples, diminuindo a sonolência e o cansaço, isto é, atuando na estimulação do sistema nervoso central de maneira geral. Porém, a cafeína ingerida em excesso pode ser prejudicial à saúde (4, 5). Portanto, efetuar sua quantificação é primordial.

O café destaca-se por ser uma das bebidas mais consumidas no mundo, um produto básico valioso, sendo a 2ª commodity básica de maior valor econômico, permanecendo somente atrás do petróleo (6). Entre os seus constituintes destacam-se os carboidratos, a cafeína e a trigonelina, que podem ser considerados como potenciais marcadores de qualidade (4, 5). Marcucci et al. (2013) (7) observaram que a espécie de café arábica apresenta, relativamente, menor concentração de cafeína e maior concentração de trigonelina quando comparada ao café robusta(conilon), ressaltando o potencial destes compostos em fornecer informações a cerca da qualidade e, da possível composição de bebidas provenientes de blends de café arábica e conilon (8, 9, 10).

Inúmeros métodos têm sido descritos para análise simultânea destas xantinas na literatura (5, 11, 12, 13), predominando o emprego da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa. Porém, ainda se tem explorado pouco os benefícios da cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) que utiliza colunas cromatográficas com partículas de tamanho menor do que 2,0  $\mu\text{m}$ , em geral de 1,7  $\mu\text{m}$ . Esta técnica possibilita a injeção de volumes menores de amostra, com análises mais rápidas (inferiores a 3 min) com maior sensibilidade e resolução, ocasionando maior demanda para o desenvolvimento de métodos analíticos que utilizem esta nova tecnologia.

Neste panorama, este trabalho visou desenvolver um método cromatográfico rápido e eficiente para determinação de trigonelina e cafeína empregando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos. O método foi validado segundo a normativa da ANVISA RE no 899/2003 e utilizado para analisar amostras de cafés torrado e moído comerciais.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS

As etapas de extração e preparo dos padrões analíticos foram realizadas com água ultrapura Milli-Q® (18,2 MΩ cm<sup>-1</sup> a 25 °C, Simplicity 185, Millipore, Billerica, MA, EUA). As fases móveis utilizadas durante o processo de separação foram água ultrapura e acetonitrila (ACN) grau HPLC (J.T. Baker, Center Valley, PA, EUA). Foram utilizados padrões de trigonelina e cafeína com 99,99% de pureza, obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

### 2.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE TRIGONELINA E CAFEÍNA

Para trigonelina preparou-se uma solução estoque de concentração 100,0 mg L<sup>-1</sup>, pesando-se 0,01000 g de trigonelina anidra em balança analítica de 5 casas (XS205, Mettler-Toledo Columbus, OH, EUA). Uma solução estoque de cafeína na concentração de 300 mg L<sup>-1</sup> foi preparada, pesando-se 0,0300 g de cafeína anidra. Os padrões foram dissolvidos em água ultrapura Milli-Q®.

### 2.3 SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Utilizou-se um sistema cromatográfico de ultra alta performance (UPLC, Acquity Ultra Performance LC, Waters, Milford, EUA) composto por: bomba binária, sistema de gerenciamento de solventes e degaseificador, injetor automático e detector de arranjo de diodo. Para injeção da amostra otimizou-se o volume de 1,0 µL no modo *Partial Loop With Needle Overfill*, com solventes de lavagem fraca (H<sub>2</sub>O) e forte (ACN), tendo as amostras sido mantidas a 10 °C. A coluna utilizada foi uma Acquity UPLC® BEH C18 (2,1 x 50 mm; 1,7 µm; Waters) mantida a 40 °C durante toda análise. Para detecção dos analitos empregou-

se um detector do tipo Acquity® Ultra Performance LC (Waters) e  $\lambda$  DAD no modo 3D, com varredura espectral de 190 a 400 nm, com comprimento de onda fixo em 272 nm.

#### 2.4 MÉTODO CROMATOGRÁFICO

O método cromatográfico desenvolvido utilizou como fase móvel água (A) e acetonitrila (B) e eluição por gradiente, conforme as proporções descritas na Tabela 1.

**Tabela 1** Proporções de água (A) e acetonitrila (B) utilizadas no método cromatográfico proposto.

	Tempo	Vazão	% A	% B	Curva
1	Inicial	0,4	99,0	1,0	6
2	1,00	0,4	50,0	50,0	6
3	1,01	0,4	5,0	95,0	6
4	1,10	0,4	5,0	95,0	6
5	1,11	0,4	99,0	1,0	6
6	3,00	0,4	99,0	1,0	6

#### 2.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

O método cromatográfico foi validado segundo a normativa da ANVISA (RE nº 899/2003) sendo avaliados os parâmetros de especificidade, seletividade, precisão (repetitividade intra-dia), precisão intermediária (reprodutibilidade inter-dias), faixa dinâmica de trabalho e linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão (adição e recuperação) e robustez.

A especificidade e a seletividade do método proposto foram avaliadas considerando-se a ausência de sinais analíticos nos tempos de retenção dos padrões de trigonelina e cafeína no

solvente extrator e na amostra de café. Esses parâmetros foram ainda confirmados pela porcentagem de recuperação, considerando-se a amostra de café sem adição de padrão e, a amostra de café adicionada de padrão. Como último recurso, utilizou-se a pureza espectral característica ao longo dos picos dos analitos, nos seus respectivos comprimentos de onda de máxima absorção.

A precisão foi avaliada para as concentrações de 0,8 % (m/m) para trigonelina e de 2,5 % (m/m) para cafeína pela repetitividade de 10 análises consecutivas da amostra e, a precisão intermediária de 2 análises consecutivas da amostra em 3 dias distintos (n=6) (Tab. 2).

A linearidade foi avaliada para a faixa de trabalho de 0,2 a 2,0 % (m/m) para a trigonelina e de 0,6 a 6,0 % (m/m) para a cafeína, utilizando o detector DAD (Acquity Ultra Performance LC, Waters, Milford, EUA).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir das equações das retas dos 2 compostos para o detector DAD.

A exatidão foi determinada pelo ensaio de recuperação para as concentrações de 0,2; 1,2 e 2,0 % (m/m) para a trigonelina e de 0,6; 3,0 e 6,0 % (m/m) para a cafeína utilizando o DAD.

A robustez do método cromatográfico foi avaliada para variações: na proporção do gradiente da fase móvel em  $\pm 1,0\%$  da composição dos solventes A e B; de  $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  da temperatura da coluna; e utilizando-se o solvente B de diferentes marcas (J. T. Baker e Fischer, ambos de grau HPLC).

## 2.6 APLICAÇÃO

Aplicou-se o método desenvolvido em 20 amostras de café torrado e moído comerciais, obtidas em mercados da região de Londrina (Paraná), visando sua futura aplicação em análises de rotina de controle de qualidade.

## 2.7 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

Para caracterização das amostras e cálculo da concentração dos componentes em base seca, avaliou-se a umidade das amostras de café torrado e moído utilizando analisador de umidade com lâmpada halógena (OHAUSMB 45, Parsippany, EUA). Na determinação, utilizou-se programação de modo normal a 105 °C durante 7 minutos, empregando 2,000 g de amostra e considerando-se 0,01 g, como diferença de perda de massa (DIAS, 2005; MARCUCCI et al., 2013). As análises foram realizadas em triplicata.

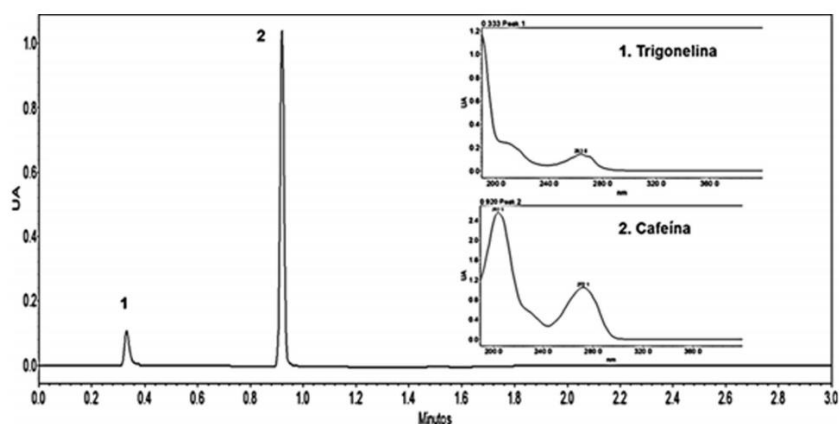
## 2.8 EXTRAÇÃO DE TRIGONELINA E CAFEÍNA

Para o preparo das amostras de cafés comerciais, adaptou-se as condições de extração da ISO 20481:2008. Após a determinação da umidade, pesou-se o equivalente a 0,50000 g de amostra, em base seca, em balança analítica (AX200, Shimadzu, Quioto, Japão). Foram adicionados às amostras 2,00 g de óxido de magnésio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 100,00 mL de água ultrapura em Erlenmeyer de 500 mL. A massa do Erlenmeyer, juntamente com as massas da amostra, do MgO e da água foram anotadas (massa inicial). Fechou-se o frasco com a mistura, homogeneizou-se e aqueceu-se em chapa aquecedora (NT339, Nova Técnica, Piracicaba SP) até a fervura por 20 minutos, sendo homogeneizadas a cada 5 minutos. Após o resfriamento, pesou-se o frasco novamente e adicionou-se a água apenas para recompor a massa, perdida por evaporação. O extrato foi filtrado em papel filtro

qualitativo e o sobrenadante passado em membrana de acetato celulose 0,22  $\mu\text{m}$  (Sartorius Stedim, Göttingen, Alemanha) para ser injetado no sistema cromatográfico.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta um cromatograma obtido a partir do método proposto para uma mistura de padrões de trigonelina e cafeína em concentrações próximas às encontradas em amostras de café, 0,5 % (m/m) e 2,0 % (m/m), respectivamente.



**Figura 1.** Cromatograma dos padrões de trigonelina 0,5 % (m/m) (pico 1) e cafeína 2,0 % (m/m) (pico 2) com seus respectivos espectros de absorção molecular empregando UHPLC-DAD.

Pode-se observar, a partir da Figura 1, que o método proposto atende à proposta de rapidez, sendo que os dois analitos são detectados em menos de 1 minuto, sendo os tempos de retenção da trigonelina e cafeína de 0,33 e 0,93 minutos, respectivamente. A parte final do cromatograma de 1 a 3 min corresponde às etapas de limpeza e reequilíbrio das condições iniciais das proporções das fases móveis (Tab. 1). O método foi desenvolvido visando sua

aplicação em todos os tipos de equipamento de UHPLC, tanto nos que fazem a mistura da fase móvel á base de volume quanto à base de tempo. Porém, esta etapa pode ser otimizada diminuindo o tempo de análise para 1,5 min, empregando um sistema de UHPLC binário, como deste trabalho, em virtude do seu menor volume morto. O mesmo vale para a etapa de gradiente. O método cromatográfico proposto pode ser considerado o mais rápido encontrado na literatura para detecção simultânea dos dois compostos, sem assimetria de picos, com elevada resolução e sensibilidade. Comparativamente, o método proposto por O'Driscoll (2014) (11) apresentou tempos de retenção para trigonelina de 1,00 e para a cafeína de 6,46 minutos, apresentando em média tempo de análise 5 vezes maior.

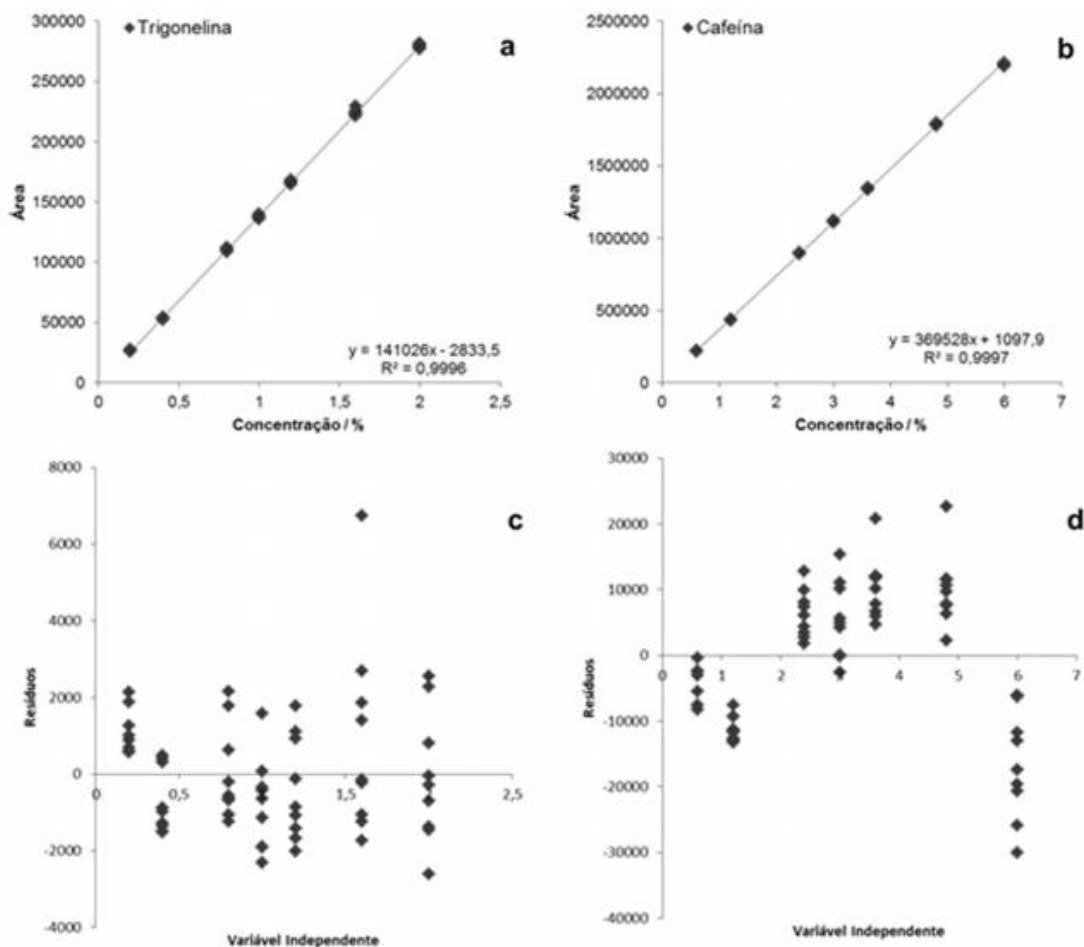
O método foi validado de acordo com a RE 899/2003 da ANVISA e as figuras de mérito da validação do método estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Parâmetros de validação cromatográfica do método desenvolvido para a determinação de cafeína e trigonelina em amostras de cafés torrado e moído empregando

Parâmetros de Validação	Trigonelina	Cafeína
Faixa dinâmica de trabalho (% m/m)	0,2 a 2,0	0,6 a 6,0
Equação da reta	$y = 141026x - 2833,5$	$y = 369528x + 1097,9$
Coefficiente de correlação linear, r	0,9999	0,9999
Coefficiente de determinação, R <sup>2</sup>	0,9996	0,9997
Limite de detecção, LD (% m/m)	0,01	0,02
Limite de quantificação, LQ (% m/m)	0,03	0,06
Precisão [0,8; 2,5 % (m/m)] n=10(DPR%)	0,12	0,55
Precisão intermediária, n=6 (DPR%)	0,52	1,14
	[0,2; 0,6 % (m/m)]	92,50
Exatidão (% de recuperação)	[1,2; 3,0 % (m/m)]	104,10
	[2,0; 6,0 % (m/m)]	100,50

\*DPR: Desvio Padrão Relativo

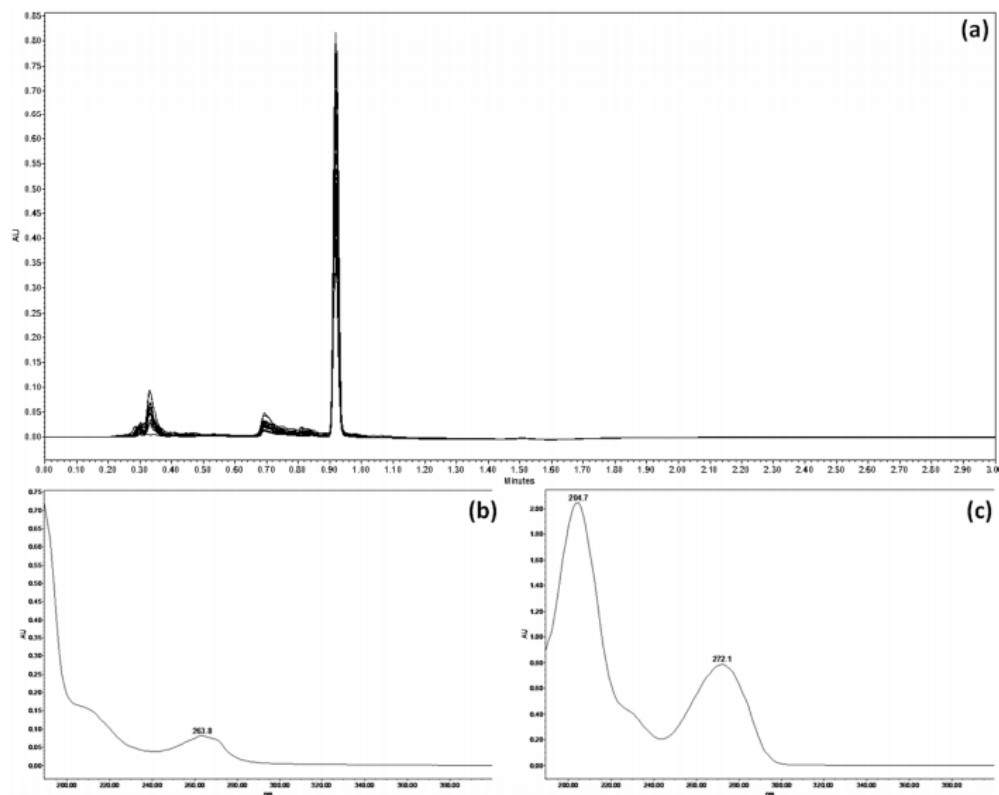
O método desenvolvido mostrou-se: linear ( $r > 0,99$ ) na faixa dinâmica de trabalho proposta para a trigonelina (0,2 a 2,0 % (m/m) (Fig. 2a) e para a cafeína (0,6 a 6,0% (m/m) (Fig. 2b); apresentando limites de detecção e quantificação adequados, considerando as concentrações das amostras de cafés torrado e moído comerciais; preciso (DPR < 1%) com dados aleatorizados, sem tendência e, com baixa dispersão nos gráficos de resíduos (Fig. 2c e 2d); e exato, com uma taxa de recuperação média para as concentrações de ambos os compostos na ordem de 99,80%, considerando-se os três níveis de concentração: baixo, médio e alto.



**Figura 2.** Curvas analíticas (a, b) e análises de resíduos (c, d) para trigonelina e cafeína.

A especificidade e seletividade foram avaliadas pelo perfil dos espectros de absorção dos analitos (Fig. 3) nos tempos de retenção de 0,33 min para a trigonelina e em 0,93 min para cafeína. As especificidade e seletividade do método foram também confirmadas pela adição de padrão na amostra, onde os picos dos analitos tiveram suas áreas acrescidas proporcionalmente à concentração dos padrões adicionados. Uma vez que os dois analitos apresentam comprimentos máximos de absorção relativamente próximos, a análise dos dois analitos foi realizada em 272 nm, sem prejuízo de sensibilidade para a trigonelina, com comprimento de absorção máximo de 264 nm. O método mostrou-se robusto frente às

variações aplicadas de proporção de fase móvel ( $\pm 1\%$ ), temperatura da coluna ( $\pm 5^\circ \text{C}$ ), e variação de 2 marcas de acetonitrila, apresentando taxas de recuperação adequadas, próximas a 100% e, portanto, dentro da faixa recomendada pela ANVISA, de 70 a 120%.



**Figura 3.** (a) Cromatogramas referentes às análises de 20 amostras de cafés torrado e moído comerciais com seus respectivos espectros de absorção dos analitos (b) trigonelina e (c) cafeína, visando verificar a aplicabilidade do método em análises de rotina de controle de qualidade

Após a validação do método realizou-se a análise de 20 amostras de cafés torrado e moído comerciais dos tipos superior, tradicional e extraforte, adquiridas em supermercados da região metropolitana de Londrina – PR, visando observar a aplicabilidade do método proposto em análises de rotina para estes analitos (Fig. 3).

Os espectros de absorção dos analitos trigonelina e cafeína das amostras analisadas (Fig. 3b e 3c) foram comparados com os espectros dos padrões analíticos (Fig. 1) a fim de se observar possíveis indícios de coeluição de picos cromatográficos pela modificação ou surgimento de novas bandas de absorção. Pode se observar que em ambos os casos os espectros foram idênticos, indicando ausência de coeluições que poderiam ser ocasionadas por possíveis interferentes nas matrizes amostrais. Os resultados de quantificação das amostras comerciais estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Concentração de trigonelina e cafeína nas 20 amostras de cafés comerciais analisadas

Amostra	Tipo	Trigonelina (n = 2)		Cafeína (n = 2)	
		Media (%) ± DP	CV (%)	Media (%) ± DP	CV (%)
1	EF	0,65 ± 0,00	0,00	2,33 ± 0,01	0,36
2	EF	0,14 ± 0,00	0,00	1,61 ± 0,00	0,00
3	EF	0,29 ± 0,00	0,00	1,64 ± 0,00	0,00
4	EF	0,14 ± 0,00	2,48	1,61 ± 0,01	0,39
5	NI	0,03 ± 0,00	0,00	1,12 ± 0,00	0,00
6	EF	0,40 ± 0,00	0,00	1,75 ± 0,00	0,00
7	T	0,34 ± 0,00	0,00	2,08 ± 0,00	0,00
8	T	0,51 ± 0,01	2,36	1,11 ± 0,00	0,38
9	EF	0,49 ± 0,02	3,74	1,59 ± 0,00	0,00
10	S	0,41 ± 0,01	2,41	1,60 ± 0,00	0,04
11	T	0,34 ± 0,00	0,00	1,75 ± 0,00	0,00
12	T	0,62 ± 0,02	3,42	1,54 ± 0,00	0,05
13	T	0,36 ± 0,01	1,62	1,77 ± 0,00	0,00

<b>14</b>	T	0,40 ± 0,00	0,00	1,69 ± 0,00	0,00
<b>15</b>	NI	0,40 ± 0,00	1,23	1,70 ± 0,08	5,00
<b>16</b>	T	0,54 ± 0,00	0,00	1,49 ± 0,00	0,00
<b>17</b>	NI	0,37 ± 0,01	1,91	1,12 ± 0,01	0,82
<b>18</b>	G	1,07 ± 0,00	0,00	1,67 ± 0,00	0,00
<b>19</b>	NI	0,36 ± 0,00	0,00	1,75 ± 0,00	0,00
<b>20</b>	G	1,04 ± 0,05	4,78	1,41 ± 0,02	1,20

Informações na embalagem - T: tradicional; EF: extraforte; S: superior; NI: não informada; G: Gourmet

Dentre as amostras analisadas (Tab. 3), observou-se que houve elevada variação de trigonelina e cafeína, com concentrações entre 0,03 - 1,07%(m/m) e 1,11 – 2,33%(m/m), respectivamente, indicando, que a maioria das amostras são compostas por *blends* de café arábica e café robusta (conilon).

#### 4. CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido para análise de trigonelina e cafeína nas matrizes de cafés comerciais por UHPLC-DAD foi considerado rápido, seletivo, preciso, linear, com limites de detecção e quantificação adequados e robusto, garantido a quantificação dos compostos com confiabilidade na faixa de concentração analítica dos cafés torrado e moído comerciais.

## **Agradecimentos**

À CAPES pelo UPLC-DAD-MS/MS – Projeto AUXPE-NANOBIOTEC-710/2009 - PROCESSO. no. 23038.019085/2009-14; pelas bolsas de doutorado do Programa de Pós-Graduação de Química Associação UEL-UEPG-Unicentro; e pelas bolsas de IC concedidas pelo Projeto PROCAD/2013 – Processo no. 3007/2014.

## **Referências**

- [1] Nogueira M, Trugo LC. Distribuição de Isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros, *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2003; 23(2): 296-299.
- [2] Chung MC, Silva ATA, Castro LF, Güido RVC, Nassute JC, Ferreira, EI. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 2005; 41 (2): 28036.
- [3] Perrone D, Marino Donangelo C, Farah A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chem*, 2008; 110: 1030- 1035.
- [4] Alves RC, Casal S, Oliveira B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade? *Quim. Nova*, 2009; 32 (8): 2169-2180.

[5] Jesus JS. Determinação e identificação de impurezas em café torrado e moído em Anápolis – GO [Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Exatas e Tecnológicas]. Anápolis: Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas (UNUCET); 2014.

[6] International Coffee Organization (ICO). Londres [atualizado em 30 ago. 2017]. Disponível em: <http://www.ico.org/>

[7] Marcucci CT, Benassi MT, Almeida MB, Nixdorf SL. Teores de trigonelina, ácido 5-cafeoilquínico, cafeína e melanoidinas em cafés solúveis comerciais brasileiros. Quím. Nova, 2013; 36 (4): 544-548.

[8] Associação Brasileira da Indústria De Café (ABIC). Rio de Janeiro [atualizado em 29 ago. 2017a]. História do café. Disponível em: <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38>.

[9] Associação Brasileira da Indústria De Café (ABIC). Rio de Janeiro [atualizado em 29 ago. 2017b]. Espécies de café. Disponível em: <http://www.abic.com.br>.

[10] Associação Brasileira da Indústria De Café (ABIC). Rio de Janeiro [atualizado em 29 ago. 2017c]. Café e composição química. Disponível em: <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=279>.

[11] O'Driscoll DJ. Analysis of coffee bean extracts by use of ultra-performance liquid chromatography coupled of quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *MethodsX*, 2014; 1: 264–268.

[12] Cheng ZX, Wu JJ, Liu ZQ, Lin N. Development of a hydrophilic interaction chromatography-UPLC assay to determine trigonelline in rat plasma and its application in a pharmacokinetic study. *Chin. J. Nat. Medicines*, 2013; 11 (2): 164–170.

[13] Meyer S, Dunkel A, Hofmann T. Sensomics-Assisted Elucidation of the Tastant Code of Cooked Crustaceans and Taste Reconstruction Experiments. *J. Agric. Food Chem.* 2016; 64: 1164–1175.

## **Capítulo 3**

# **METHOD FOR QUANTIFYING OF METHYLXANTHINES IN HUMAN AND ANIMAL PLASMA AND CELL CULTURE MEDIUM BY UPLC- MS/MS**

**METHOD FOR QUANTIFYING OF METHYLXANTHINES IN HUMAN AND  
ANIMAL PLASMA AND CELL CULTURE MEDIUM BY UPLC-MS/MS**

Tiago Bervelieri Madeira<sup>1</sup>, Caroline Teixeira Lopes<sup>1</sup>, Mariana Bortholazzi Almeida<sup>1</sup>, Suzana  
Lucy Nixdorf <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Chemistry Department, Londrina State University (UEL), Rod. Celso Garcia, Km 380,  
86051-990 Londrina, PR, Brazil; \*s.nixdorf@hotmail.com*

Submetido ao *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* - Manuscript ID BJPS-2019-  
0232 em 28 de fevereiro de 2019, aguardando parecer.

## **ABSTRACT**

Caffeine and its metabolites, paraxanthine, theobromine and theophylline play an important role in human body. They can act as stimulants, precursors of bioactive compounds and even to boost the pharmacological effects in innumerable treatments. Hence, these xanthines have been targets of many investigative studies aiming to elucidate their functions in biological organisms; this requires sensitive and selective approaches. Therefore, this study proposes a method to determine caffeine and its metabolites in biological fluids such as plasma and culture medium using ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The validated developed method presents adequate figures of merit for all evaluated parameters according to RDC 166/2017 and CE 657/2002.

**Keywords:** chromatography; xanthines; prodrugs; paraxanthine; fast method

**RUNNING TITLE: Quantitation of xanthines in biological matrices by LC-MS**

### **1. INTRODUCTION**

Among methylxanthines, caffeine is one of the most consumed in the world, due to its presence in many beverages such as coffee, teas, and soft drinks (Avisar, Avisar, Weinberger, 2002). In the human organism, it is rapidly metabolized in the intestinal tract in paraxanthine, theobromine, and theophylline (Jodynis-Liebert et al., 2004). Due to the great biological importance of xanthines, mainly due to the stimulating action and precursor of bioactive (Chung et al., 2005) compounds, there are descriptions in the literature, as applying in Alzheimer's disease treatment and for neural protection against neurotoxins (Xu et al., 2010; Chen, Ghribi, Geiger, 2010). In addition, because xanthines are prodrugs, they act in the latency and transport of the drug active principles, even intensifying the action of some cancer medications. Thus, these compounds are widely used in pharmaceutical applications, being its quantification primordial for this purpose (Chung et al., 2005). As a result, it is

necessary to have analytical methods that allow the quantitation of these compounds with low limits of detection despite the many interferents for application in biological models.

The objective of this study was to develop an efficient analytical method for the caffeine and its metabolites paraxanthine, theobromine and theophylline determination, which are found in low concentrations in human and animal plasma and culture medium, by using ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole mass spectrometer.

## 2. MATERIAL AND METHODS

Plasmas samples of human and mice and also of culture medium DMEM (10% fetal bovine serum) were subjected to the 250,000 G (Hitachi CP100NX) ultracentrifugation step for 3 min at 4 °C. The supernatant (200 µL) was diluted in 800 µL of ultrapure water, which are added to a C18 solid phase extraction cartridge (Sep-Pack Vac 3cc, 500 mg, Waters), previously conditioned with 2 mL of methanol and 2 mL of ultrapure water. The cartridge was then washed with 2 mL of 5% (v/v) methanol solution and 2 mL of 5% (w/v) ammonium hydroxide. Elution of the analytes of interest was carried out with 1.0 mL of a methanol solution containing 5% (v/v) of formic acid. The samples were filtered through a 0.22 µm PTFE/L membrane and stored at -20 °C until the injection in the chromatographic system.

The ultra-high performance chromatographic system consisted of an Acquity UPLC I Class (Waters) with a HSS C18 (2.1 x 100 mm, 1.8 µm) column maintained at 40 °C, flow rate of 0.45 mL min<sup>-1</sup> in an isocratic run using 85:15 (A:B, V/V) being the mobile phases: (A) Ultrapure water with 0.1% (v/v) formic acid and (B) methanol with 0.1% (v/v) formic acid.

For the detection and quantitation the array detector (PDA) was set at 270 nm and the Acquity Tandem Quadruple mass spectrometer using electrospray in positive ionization mode adjusted for source capillary voltage (1 kV at 120 °C with 800 L h<sup>-1</sup> of Nitrogen as desolvation gas) and sample cone (50 L h<sup>-1</sup> at 400 °C). The parameters of multiple reaction monitoring mode (MRM) such a mass transition, sample cone and collision energy values were optimized for each analyte (Table I). The total time of analysis was 5 minutes and the injection volume was 5.0 µL.

**Table 1.** Analytical parameters for the determination of caffeine and its metabolites in plasma and culture medium by ultra-high performance liquid chromatography with mass detector

Compound	Retention time window (min)	1 <sup>st</sup> mass transition (m/z)	2 <sup>nd</sup> mass transition (m/z)	Dwell time (s)	Sample cone (V)	Collision Energy (V)
Theobromine	0.8-1.7	181.00>108.00		0.258	38	22
			181.00> 84.00	0.258	38	16
Paraxanthine	1.4-2.4	180.97> 96.06		0.195	36	24
			180.97>124.02	0.195	36	20
Theophylline	1.7-2.5	181.03> 96.06		0.195	36	24
			181.03>124.08	0.195	36	20
Caffeine	3.2-4.0	195.05> 42.03		0.395	38	24
			195.05>138.01	0.395	38	18

*m/z*: mass-to-charge ratio.

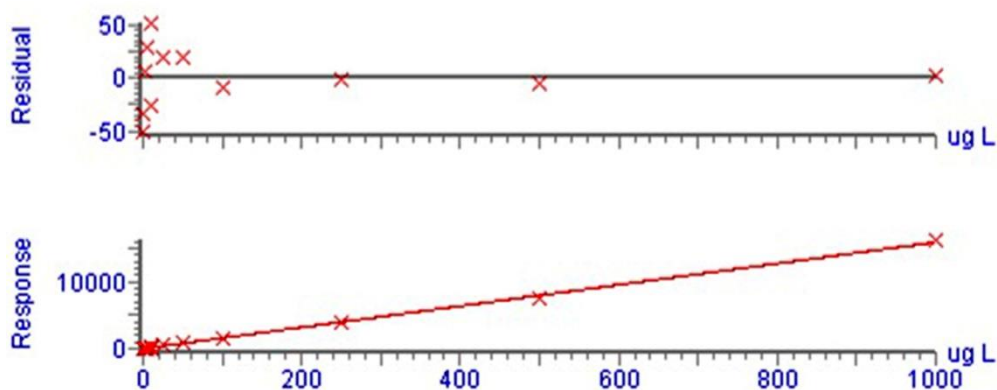
The developed analytical method was validated according to ANVISA RDC 166/2017 and European Commission legislation (EC 657/2002).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

The developed method fits all the figures of merit required by both legislations. The linear dynamic working range was from 0.1 to 1000.0 µg L<sup>-1</sup> (Figure 1) for all analytes. It presented coefficients of determination higher than 0.99, without trends in the residue

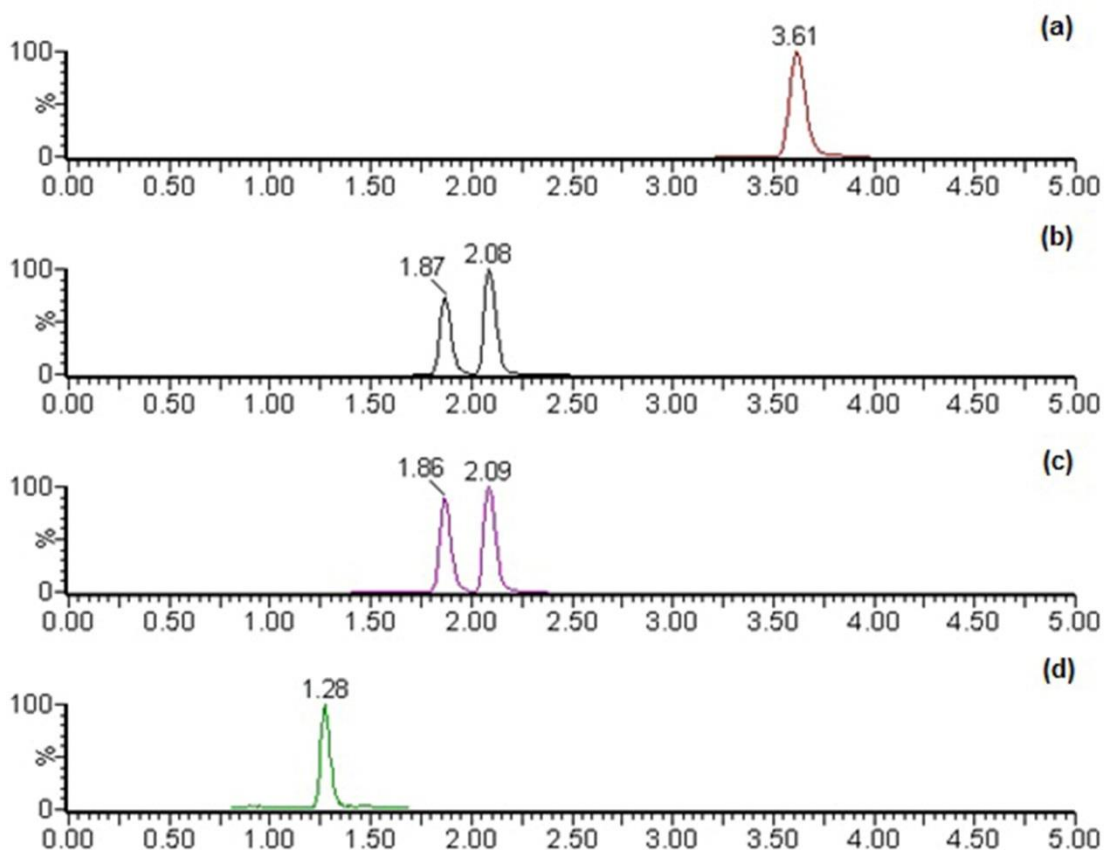
chart. Although the matrix effect is considered, the proposed method showed low limits of detection ( $0.03 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and quantitation ( $0.09 \mu\text{g L}^{-1}$ ). The recovery rates were among 80% and 120% tested for the 3 levels of concentrations 0.1; 50.0 and 250.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

**Figure 1.** Analytical curve for theobromine and their residual chart



Taking into account the high degree of clean-up obtained in the matrices tested (plasma and culture medium) intermediary precision, measured by the difference between areas with the same concentration on two different days, presented adequate results ( $\text{RSD} < 5\%$ ). Robustness was performed by changing 1% up and down of the flow rate in isocratic run,  $\pm 5^\circ\text{C}$  in the column temperature and by using solvents of different brands. In all the tests the method was robust and did not impact directly on the quantitation of the critical pair theophylline and paraxanthine, maintaining chromatographic resolution higher than 0.9. Therefore, the proposed method can be applied in the quantitation of these analytes in complex biological matrices such as human and animal plasma. Figure 2 shows the chromatogram of the standards on the plasma matrix.

**Figure 2.** Total ion chromatograms of methylxanthines: (a) caffeine, (b) theophylline, (c) paraxanthine and (d) theobromine at the concentration of  $10.0 \mu\text{g L}^{-1}$



It is worth to observe that chromatograms (b) and (c) are identical, even referring to two different compounds. This occurs due to the fact that both theophylline and paraxanthine have the same molecular mass-to-charge ratio in the most intense mass transitions, highlighting the importance of the LC-MS coupling for the detection of molecules in biological matrices.

Considering a significant part of the extraction and determination methods for these compounds described in the literature (Schreiber-Deturmeny, Bruguerolle, 1996;

Martínez-López *et al.*, 2014) the proposed method presents some advantages. First, it follows the precepts of green chemistry without the use of highly toxic reagents for clean-up steps for protein precipitation. Second, it shows high recoveries even at low concentrations. Third, it requires relatively few steps in sample preparation, virtually eliminating the effects of complex biological matrices due to the presence of phospholipids, carbohydrates and glycoproteins, increasing ionic suppression. Methods for detection of the same metabolites in DMEM cell culture media (10% fetal bovine serum) were not found in the literature.

The results indicate that sample preparation approach and the chromatographic method developed were efficient for the determination of methylxanthines in human and animal plasma, including DMEM cell culture medium samples. The developed UHPLC-MS/MS method was fast and sensitive for reliable quantification, contributing in the monitoring of these analytes in biological models and pharmacotherapy studies.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 for doctoral fellowships in Chemistry-UEL.

We would like to thank also CAPES (Project n. 88881.068504/2014-01, PROCAD/2013, Edital 071/2013, Process n. 3007/2014) for financial support providing the chromatographic column and (Project n. AUX-PE-NANOBIOTEC-710/2009 - Process Nanobio 23/2008 n.23038.019085/2009-14) for the LC-MS/MS.

Our gratitude also to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Brazil (CNPq) by the fellowships - Bolsa Produtividade DT-2 Química (Processo no. 309762/2017) and PIBIC.

#### 4. REFERENCES

Avisar R, Avisar E, Weinberger D. Effect of coffee consumption on intraocular pressure. *Ann Pharmacother*, 2002, 36, 992–99.

Chen X, Ghribi O, Geiger JD. Caffeine protects against disruptions of the blood-brain barrier in animal models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2010;20 Suppl. 1:S127-41.

Chung M-C, Silva ATA, Castro LF, Güido RVC, Nassute JC, Ferreira EI. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. *Rev Bras Cienc Farm*, 2005, 41, 2.

Jodynis-Liebert J, Flieger J, Matuszewska A, Juszczak J. Serum metabolite/caffeine ratios as a test for liver function. *J. Clin. Pharmacol.*, 2004, 44, 338–347.

Martínez-López S, Sarriá B, Gómez-Juaristi M, Goya L, Mateos, R, Bravo-Clemente L. Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different methylxanthine contents. *Food Res Int*. 2014, 63 C, 446-455.

Schreiber-Deturmeny E, Brugueroles B, Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of caffeine and theophylline for routine drug monitoring in human plasma. *J Chromatogr B*, 1996, 677, 305-312.

Xu K, Xu Y H, Chen JF, Schwarzschild MA. Neuroprotection by caffeine: time course and role of its metabolites in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2010, 167, 2, 475-81.

**Capítulo 4**

**A SIMPLE AND FAST NEW  
METHOD FOR ANALYSIS OF 21  
PHENOLIC COMPOUNDS,  
METHYLXANTHINES AND  
FLAVONOIDS IN FOOD AND  
PLANT MATRICES BY UPLC-PDA-  
MS/MS**

**A simple and fast new method for analysis of 21 phenolic compounds, methylxanthines and flavonoids in food and plant matrices by UHPLC-PDA-MS/MS**

Tiago Bervelieri Madeira<sup>a</sup>, Mariana Bortholazzi Almeida<sup>a</sup>, Marcela Moreira Terhaag<sup>b</sup>, Natália Rezende Mudenuiti<sup>b</sup>, Adriano Costa Camargo<sup>b</sup>, Leonel Vinicius Constantino<sup>a</sup>, Lycio Shinji Watanabe<sup>a</sup>, Suzana Lucy Nixdorf<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>*Chemistry Department, Londrina State University (UEL), Rod. Celso Garcia, Km 380, 86051-990 Londrina, PR, Brazil;*

<sup>b</sup>*Department of Food Science and Technology, Londrina State University (UEL), Rod. Celso Garcia, Km 380, 86051-990 Londrina, PR, Brazil.*

*\*s.nixdorf@hotmail.com*

**A simple and fast new method for analysis of 21 phenolic compounds, methylxanthines and flavonoids in food and plant matrices by UHPLC-PDA-MS/MS**

**Abstract**

Compound separation of complex matrices like food and plants is the greatest challenges for current chromatography. Quantitation of the functional compounds is essential for assessing the quality and benefits of this food. However, even with all the development of modern techniques such as ultra-high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometer, there is still a demand for applications that involve the separation and quantitation of compounds of different classes naturally present in such matrices. Observing this demand, the objective of this work was to develop a fast chromatographic method for the separation of 21 phenolic compounds, xanthines and flavonoids commonly found in food matrices. The method developed was validated according to EC / 657/2002 and RDC 166/17 in all figures of merit. The analytical method was applied to the metabolic study of coffee samples, impurities, and possible adulterants, aiming to distinguish them. Matrices were separated into different groups by multivariate analyzes combined with the metabolomics indicating that the proposed method shows great potential for the quality control of coffee samples.

**Keywords:** functional compounds; coffee; metabolomics; xanthines; quality control.

## 1. INTRODUCTION

Food matrices are very complex and the quantification of functional compounds is a current challenge for analytical chemistry and can often correspond to the state of the art of sample preparation and chromatographic techniques<sup>1-3</sup>.

Nowadays, many classes of compounds with biological beneficial functions to the human health are known, such as phenolic compounds, methylxanthines and flavonoids<sup>4,5</sup>. These compounds occur very frequently in nature and in plants of several species, usually linked to defense mechanisms due to their antioxidant, antifungal and anticarcinogenic action<sup>5</sup>.

Due to the complexity of the plant matrices and the natural concentration range of these compounds, chromatographic techniques coupled with mass spectrometry have been frequently used for the quantification of these compounds due to their high sensitivity, specificity and selectivity<sup>1-3</sup>.

However, these techniques can be costly depending on the number of compounds to be determined, the concentration range and the type of matrix. In this context, ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) has been shown to be an important tool for increasing the sensitivity, selectivity and speed of chromatographic methods, requiring smaller amounts of sample and promoting the separation of compounds in highly complex matrices with significant decrease in the analysis time<sup>6</sup>.

However, due to the wide range of possibilities opened by this technique, there is still a lack of methods able to contemplate all its benefits as the great variety and selectivity of chromatographic columns and equipment models combined with a large numbers of mobile phases, which can be used to solve many problems related to separation and quantification of compounds in the most varied and complex matrices such as biological and alimentary<sup>7</sup>.

Observing this demand, the objective of this work was to develop a rapid and sensitive method for the detection of total of 21 compounds, including phenolics, methylxanthines and flavonoids in food plant matrices.

## 2. EXPERIMENTAL

The proposed method was developed using ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) simultaneously being detected by photo photodiode array (PDA) and tandem quadrupole mass spectrometer detector (TQD) and validated according to the analytical guides RDC 166/17 and European Decision Commission 657/2002 (2002/657/EC).

### 2.1 REAGENTS AND ANALYTICAL STANDARDS

The utilized reagents and analytical standards were of high purity following the characteristics required for the application of mass spectrometry technique. LC-MS grade methanol (JT Baker, Phillipsburg, USA) and formic acid 98-100% HPLC grade (Merck, Kenilworth, USA). All the used standards were of analytical grade (Sigma Aldrich, ST Louis, USA).

### 2.2 PREPARATION OF SOLUTIONS AND ANALYTICAL STANDARDS

A stock solution of the 22 analytical standards (including the internal standard) at the concentration of 100.00 mg L<sup>-1</sup> in methanol (stable for 1 month at -20°C) was prepared with the aid of analytical balance of 5 decimal places (Mettler Toledo model XSE), then diluted to 1.00 mg L<sup>-1</sup> in ultrapure water (Elga Purelab®). From the diluted aqueous solution, the analytical curve was prepared (stable for 2 days at 4°C).

The mobile phases for the chromatographic system were prepared by adding 1.0 mL of formic acid in 1000.0 mL of methanol and of water (formic acid 0.1%). Subsequently the solution was sonicated (Elma P30H) at 37 Hz for elimination of possible air macrobubbles.

### 2.3 CHROMATOGRAPHIC SYSTEM

The equipment used consisted of an I-Class ultra-high-performance liquid chromatographic system (Acquity UPLC, Waters, Milford, USA), consisting of a binary solvent manager pump (BSM), automatic sample injection system (maintained at 4°C) and photodiode array detector (PDA) coupled to the tandem mass spectrometer quadrupole (Acquity TQD, Waters, Milford USA). The sample injection volume was 1.0 µL in partial loop with needle overfill mode with weak (WW) and strong (SW) washing solvent composed of water and methanol, respectively. The used column consisted of a HSS C18 2.1 x 100 mm 1.8 µm (maintained at 30°C). For the detection of the analytes in the PDA and TQD detector, the wavelength was maintained at 270 nm and the working conditions adjusted for each compound, respectively.

### 2.4 CHROMATOGRAPHIC METHOD

The chromatographic method developed used the mobile phases water (A) and methanol (B) both with the addition of 0.1% formic acid (v/v) in gradient mode (Table 1).

**Table 1.** Chromatographic gradient composed of (A) 0.1% formic acid in water (v/v) and (B) 0.1% FA (v/v) methanol in the proposed method.

Time (min)	Flow rate (mL/min)	%A	%B	Curve gradient
<b>Initial</b>	0.400	95.0	5.0	7
<b>10.00</b>	0.400	5.0	95.0	7
<b>12.00</b>	0.400	5.0	95.0	7
<b>12.10</b>	0.400	95.0	5.0	7
<b>15.00</b>	0.400	95.0	5.0	7

## 2.5 MASS SPECTROMETRY METHOD

The tuning parameters of the mass spectrometer were adjusted in order to maximize the sensitivity for detection of each compound. For this, the capillary voltage was maintained at 1 kV, the voltage of the extractor cone at 3 V, the voltages of the RF lens at 0.1 V, electrospray positive ionization source (ESI+) temperature at 150°C, desolvation gas temperature at 400°C. Flow of desolvation gas at 800 L/h and Sample cone gas of 50 L/h. The working mode was the Multiple Reactions Monitory (MRM) or Selected Reactions Monitory (SRM) and the parameters of voltage of sample cone, collision energy and mass transitions was optimized for each compound (Table 2).

**Table 2.** Optimized parameters of MRM for each compound in mass spectrometer

Compound Name	RT Window (min)	Parent (m/z)	Daughter (m/z)	Dwell (s)	Cone (V)	Collision (V)
Trigonelline	0.30 – 1.00	137.63	94.16 94.68	0.261	40	18
Ascorbic Acid	0.40 – 1.10	176.68	95.15 141.12	0.261	22	12 8
Nicotinic Acid	0.50 – 1.50	123.62	80.20 106.14	0.261	40	20 16
Gallic Acid	1.10 – 1.20	170.67	127.15 153.13	0.529	24	14 10
Protocatechuic Acid	2.50 – 3.50	154.61	93.12	0.258	34	8
Acetaminophen (IS)	2.60 – 3.60	151.71	93.08 110.17	0.258	32	24 16
Theobromine	3.00 – 4.00	180.65	96.16 108.12 163.11	0.258	34 38 38	22 6 14
Paraxanthine	3.90 – 4.90	180.65	96.16 124.17 149.07	0.117	34	22 18 6
Theophylline	4.00 – 5.00	180.65	96.16 124.17	0.117	34	22 18
Epigallocatechin	4.15 – 5.15	306.79	139.13 151.08	0.117	24	14 12
Catechin	4.20 – 5.20	290.79	123.14 139.13	0.117	24	30 14
Chlorogenic Acid	4.70 – 5.70	354.87	89.20 163.10	0.117	20	58 14
Caffeic Acid	5.00 – 6.00	180.75	117.18 145.20 163.14	0.166	22	24 16 10
Caffeine	5.10 – 6.10	194.73	42.22 138.17	0.166	38	32 18
Epicatechin	5.50 – 6.50	290.79	123.14 139.13	0.221	24	16 18
p-Coumaric Acid	6.10 – 7.10	164.63	91.18 147.09	0.171	22	26 10
Ferulic Acid	6.40 – 7.40	194.83	117.16 145.18	0.171	24	10 16

			149.21			20
Sinapic Acid	6.50 – 7.26	224.72	175.11 207.16	0.171	18	14 10
Rutin	7.00 – 8.00	611.12	303.10 465.09	0.171	22	20 12
Myricetin	7.20 – 8.50	318.75	69.19 153.10	0.171	46	48 34
Quercetin	7.8 – 8.8	302.82	137.11 153.10	0.307	52	32 32
Kaempferol	8.4 – 9.1	286.76	121.13 153.11	0.307	48	34 40

The acetaminophen compound does not occur naturally in plant and food matrices, its choice for internal standard was due to its structure similarity and mass/ratio with the other analyzed analytes

## 2.6 METHOD VALIDATION

The chromatographic method was evaluated according to the merit figures of RDC 166/17 and European Decision Commission 657/2002. Thus, it was evaluated according to precision, accuracy, limit of detection, limit of quantitation, specificity, linearity, dynamic range and robustness.

## 2.7 APPLICATION

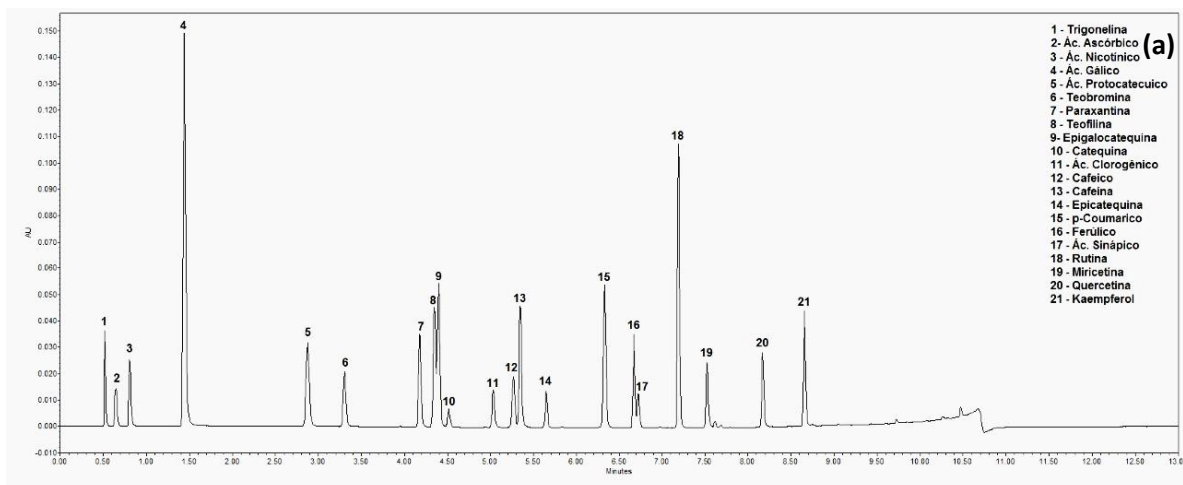
The method developed and validated was applied to the potential quality control of coffee samples through the metabolomics study using the target and untargeted approaches. For this, the samples of raw and roasted coffees were extracted by weighing the 10.00 mg mass in a

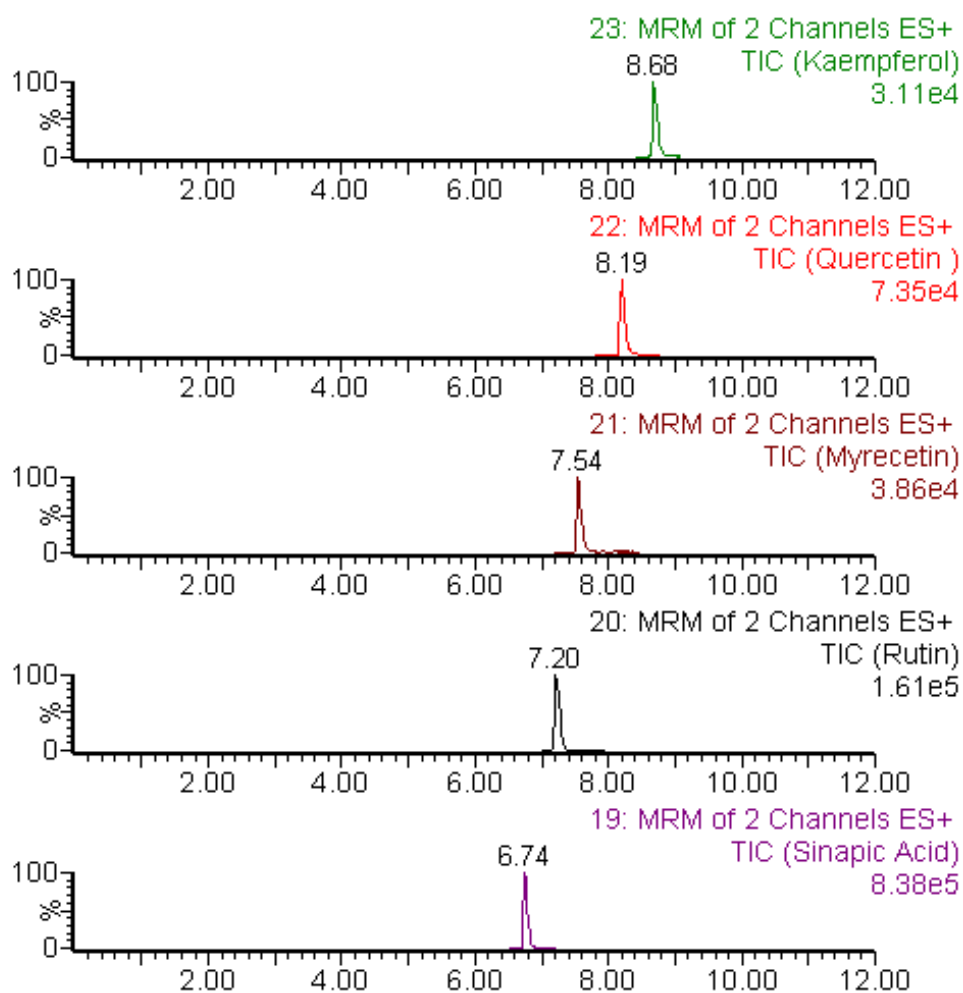
capped flask and adding 1.0 mL of methanol. The samples were then sonicated for 15 min at 25 °C, filtered through an 0.22 µm PVDF membrane (Merck Millipore), diluted 1:10 (v/v) with water and taken to the chromatographic system for injection. Data analyses were processed in MassLynx software (Waters, Milford, USA) in the modules QuanLynx and MarkerLynx.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

Observing the large number and different classes of compounds to be separated, the chromatographic gradient method was chosen. In order to maximize the interaction of the polar compounds with the C18 reverse phase column, we selected the gradient curve 7. This curve provides a very mild gradient rise at the start of the chromatographic run and at the same time increases the rate of change of phase at the end of the run, optimizing the time elution of the most non polar compounds and therefore, more retained in the column (Figure 1).

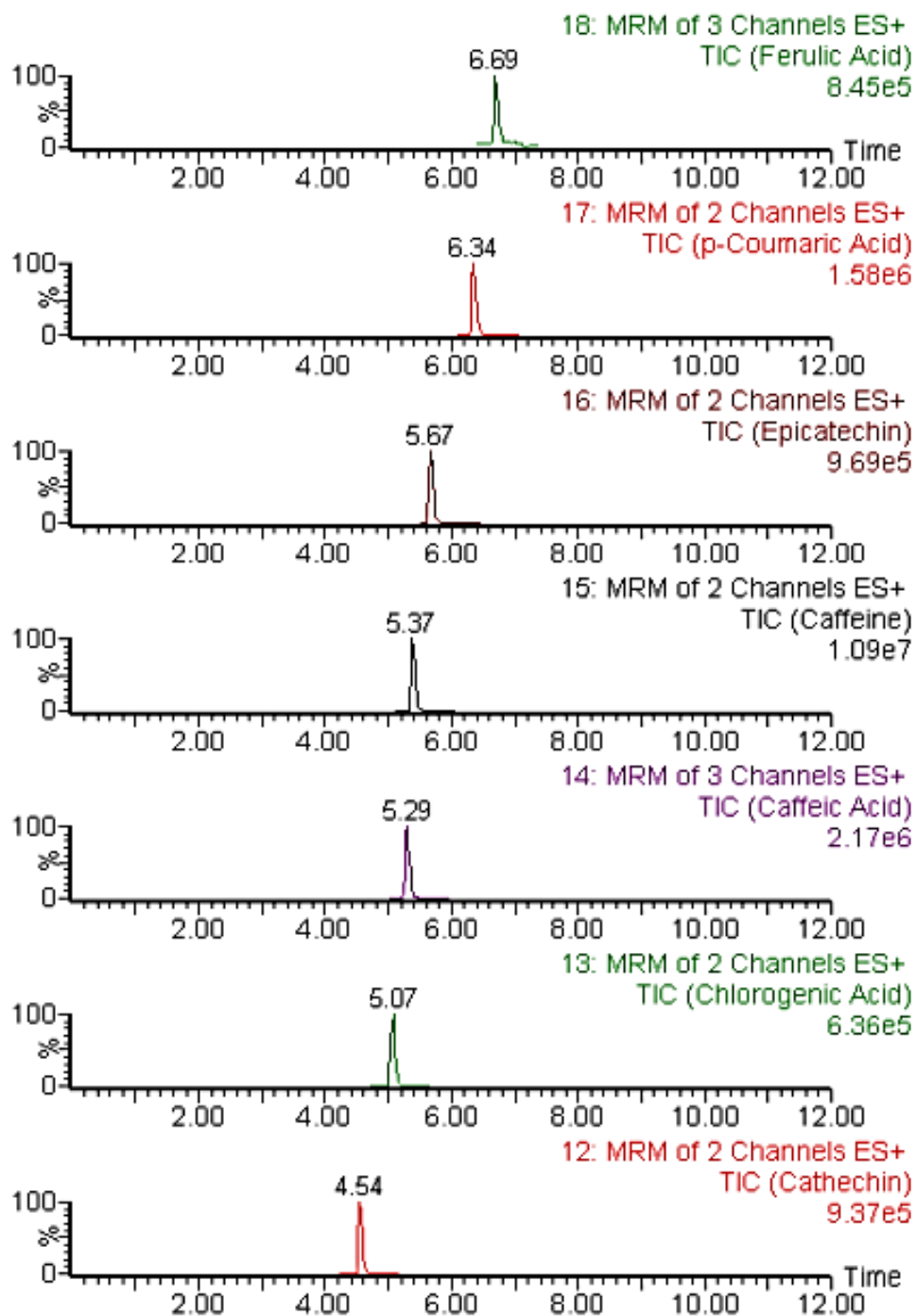
**Figure 1.** The chromatogram of the 22 standard pool as proposed gradient at: **(a)** 10.00 mg L<sup>-1</sup> in PDA (272 nm) and **(b)** 0.05 mg L<sup>-1</sup> in mass spectrometer



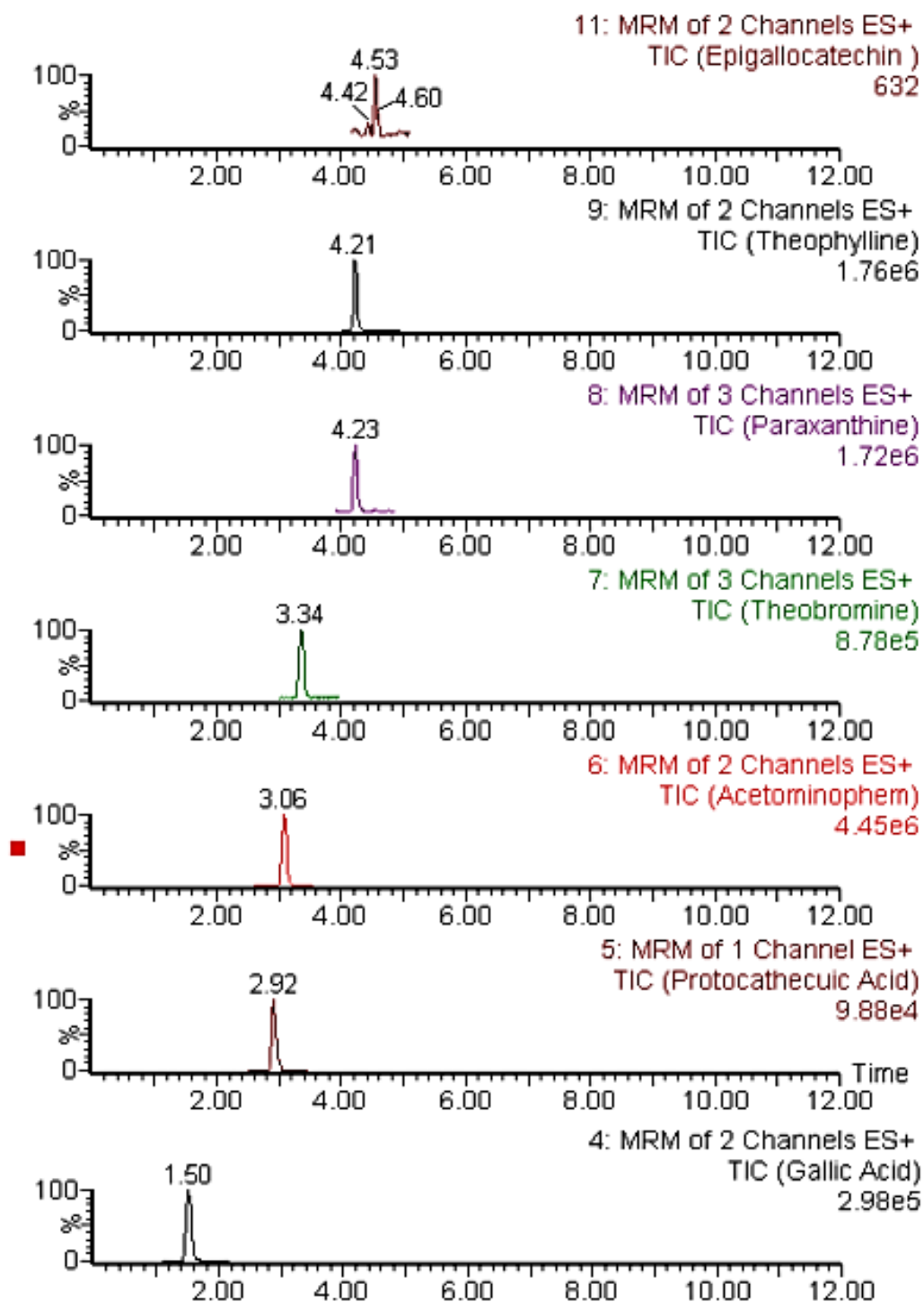
**(b)**

*Continuation of Figure 1.* The chromatogram of the 22 standard pool as proposed gradient at: **(a)**  $10.00 \text{ mg L}^{-1}$  in PDA (272 nm) and **(b)**  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  in mass spectrometer

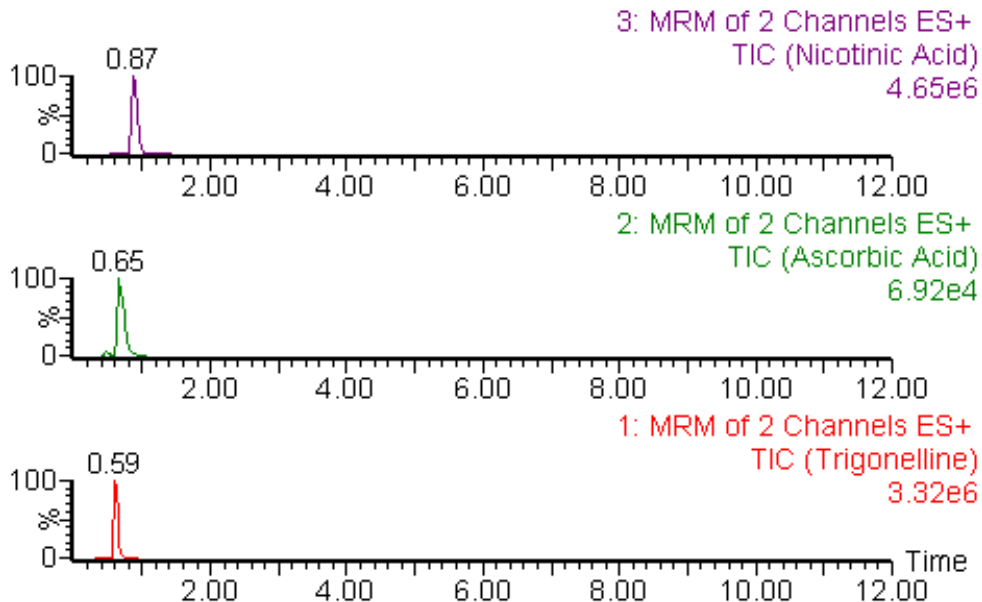
**(b)**



*Continuation of Figure 1.* The chromatogram of the 22 standard pool as proposed gradient at: **(a)** 10.00 mg L<sup>-1</sup> in PDA (272 nm) and **(b)** 0.05 mg L<sup>-1</sup> in mass spectrometer



*Continuation of Figure 1.* The chromatogram of the 22 standard pool as proposed gradient at: (a)  $10.00 \text{ mg L}^{-1}$  in PDA (272 nm) and (b)  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  in mass spectrometer (b)



From Figure 1(a), it can be observed, considering the high number of compounds present in the chromatogram of the PDA at 272 nm, that there are only three critical pairs with a chromatographic resolution lower than 1 ( $R < 1$ ) formed by theophylline and epigallocatechin, caffeic acid and caffeine, ferulic acid and sinapic acid. However, the presence of critical pairs does not impair the quantification of the compounds in real samples due to the possibility of using different integration techniques.

In the mass spectra chromatograms 1(b), it can be seen that all compounds are entirely separated by channels, following the same retention times as in PDA chromatogram 1(a). The advantage of the LC-MS coupling occurs in this case due to the presence of molecules having the same mass and the same mass transition (paraxanthine, theophylline and theobromine) in real samples, so that only the use of the mass spectrometer is not sufficient for the complete separation of all compounds present in the method.

The proposed method was efficient for the separation and quantitation of all 22 compounds (21 analytes plus internal standard), and no chromatographic methods were

found in the literature for the separation of all analyzed analytes. Compared to other methods for the quantitation of compounds in plant or food matrices<sup>8</sup>, the proposed method is able to promote the separation of more analytes in relatively less time, making their use advantageous in many applications.

### 3.1 METHOD VALIDATION RESULTS

The proposed method was validated observing de RDC 116/17 and EC/657/2002 validation guides attending to all the figures of merit of both legislations.

### 3.2 PRECISION

The method precision was estimated by repeatability and intermediate precision, in three levels with three repetitions each, at concentrations of 10.00 mg L<sup>-1</sup>, 5.00 mg L<sup>-1</sup> and 1.00 mg L<sup>-1</sup> in the PDA and 10.00 µg L<sup>-1</sup>, 50.00 µg L<sup>-1</sup> and 100.00 µg L<sup>-1</sup> in the mass detector in the same day and in three different days for both detectors. The relative standard deviation (% RSD) was less than 2% for phenolic compounds and xanthines, and less than 5% for flavonoids in PDA. In the mass detector all the analytes had RSD less than 5%.

### 3.3 ACCURACY

The accuracy was measured in the same concentrations of precision test for PDA detector and in concentration of 5.00 µg L<sup>-1</sup>, 100.00 µg L<sup>-1</sup> and 500.00 µg L<sup>-1</sup> for mass detector. All compounds showed recoveries among 80 and 120%, except at the concentration of 5.00 µg

$L^{-1}$  for the mass detector where the compounds showed recovery between 50 and 150%. However, these recoveries values are adequate for quantification of compounds below  $5.00 \mu g L^{-1}$  according to EC/657/2002 legislation.

### 3.4 SPECIFICITY

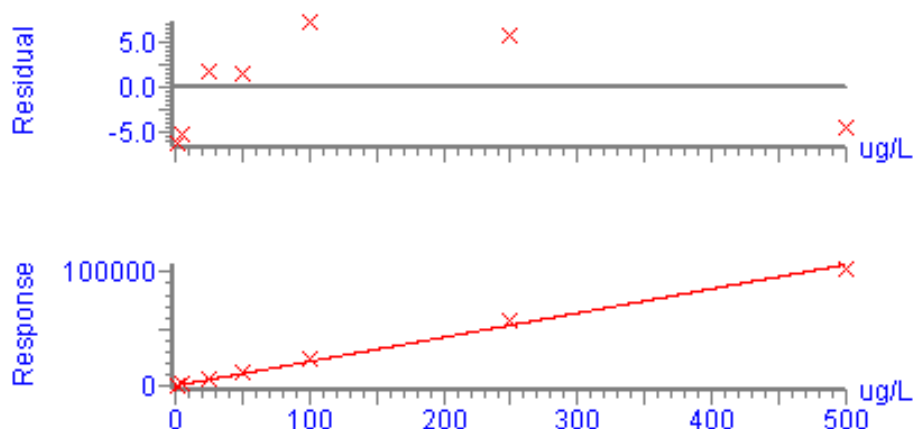
The specificity was determined by the spectral purity of the peaks in the chromatogram of the PDA detector. It was observed that for all the components, the angle was below threshold, indicating purity. For mass detector specificity was determined by the choice of two mass transitions for each compound and the ion ratio relation among them. All compounds presented variations in ion ratio below to 5% in all tested concentrations.

### 3.5 LINEARITY AND DYNAMIC RANGE

For the PDA detector the linear working range tested was  $1.00 mg L^{-1}$  to  $10.00 mg L^{-1}$  and for the mass detector, from  $1.00$  to  $500.00 \mu g L^{-1}$  for all analytes, except for myricetin, which had a linear range of work above  $10.00 \mu g L^{-1}$  in the mass detector. The residual chart did not show proportional trends to the concentration variations, example shows in Figure 2.

**Figure 2.** Linear working range for p-coumaric acid and residual chart

Compound name: p-Coumaric Acid  
 Correlation coefficient:  $r = 0.998657$ ,  $r^2 = 0.997315$   
 Calibration curve:  $213.364 * x + 86.9355$   
 Response type: External Std, Area  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting:  $1/x$ , Axis trans: None



Quantification (LQ) and detection limit (LD) were calculated statistically from the analytical curves of each compound. In *PDA* detector, the limit of detection was  $0.024 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0.033 \text{ mg L}^{-1}$  and  $0.038 \text{ mg L}^{-1}$  for methylxanthines, phenolics, and flavonoids, respectively. For the mass detector, the *LD* was less than  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  for all elements. By definition, for both legislations, the quantitation limit was considered as the lower point of the analytical curve.

### 3.6 ROBUSTNESS

The robustness was evaluated by varying the wavelength (265, 272, 280 nm) in *PDA* detector. In *UHPLC* variation of the flow rate ( $0.38$ ,  $0.40$ ,  $0.42 \text{ mL min}^{-1}$ ), column temperature ( $35$ ,  $40$ ,  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ ) and the injection volume ( $0.8$ ,  $1.0$ ,  $1.2 \mu\text{L}$ ) were performed and

2% variation in the gradient composition. The parameters that presented variation greater than 5% in the response were flow rate and gradient composition, but they did not make it impossible to use the method within the conditions analyzed. For the mass spectra, the parameters capillary voltage and sample cone voltage have a significant impact on the analyte response, so better responses are obtained by working from 1.0 to 1.5 kV and with variations of 10 V, respectively.

### 3.7 APPLICATION

The central focus of this application (target) is to find relative differences between different types of coffee and possible adulteration. The extraction method used focused on the speed and simplicity and was not optimized for the total extraction of the compounds from the coffee.

For this, were analyzed award-winning roasted coffee samples of “Concurso Café Qualidade Paraná 2018”, commercial gourmet, traditional commercial, containing defects (black, green and sour) coffee samples, impurities (husk) and possible adulterants (barley, wheat, and corn) (Table 3).

**Table 3.** Average concentrations of different compounds in coffee samples

Sample Type	Trigonelina ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )*	Nicotinic Acid ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )*	Protocatechuic Acid ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )*	Catechin ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )*
Award-Winning (n=30)	24051.11 $\pm$ 2641.8 (CV = 10.98%)	117.8 $\pm$ 48.7 CV = 41.37%)	38.7 $\pm$ 18.7 (CV = 48.36%)	LOQ
Riado (n=3)	38174.30 $\pm$ 4996.6 (CV = 13.08%)	119.3 $\pm$ 21.2 (CV = 11.80%)	63.0 $\pm$ 15.50 (CV = 24.74%)	LOQ
Commercial Gourmet (n=4)	17818.50 $\pm$ 2806.6 (CV = 15.7%)	395.50 $\pm$ 333.02 (CV = 84.41%)	71.5 $\pm$ 30.94 (CV = 43.28%)	LOQ
Air Cushion (n=7) "Almofada"	10810.0 $\pm$ 4252.0 (CV = 39.33%)	2034.86 $\pm$ 510.61 (CV = 25.09%)	184.71 $\pm$ 45.06 (CV = 24.39%)	25.00 $\pm$ 5.2 (CV = 25.8%)
Defect (n = 4)	18768.50 $\pm$ 6619.2 (CV = 35.36%)	219.50 $\pm$ 63.27 (CV = 28.82%)	143.75 $\pm$ 42.53 (CV = 29.58%)	LOQ
Robusta (n = 2)	13413.50 $\pm$ 2200 (CV = 16.41%)	595.0 $\pm$ 234.75 (CV = 39.45%)	159.50 $\pm$ 4.94 (CV = 3.10 %)	LOQ
Husk (n=1)	35680.00	147.00	1160.00	88.00
Adulterants	740.33 $\pm$ 626.11 (CV = 84.12 %)	122.66 $\pm$ 13.01 (CV = 10.60%)	24.30 $\pm$ 21.11 (CV = 86.82%)	LOQ

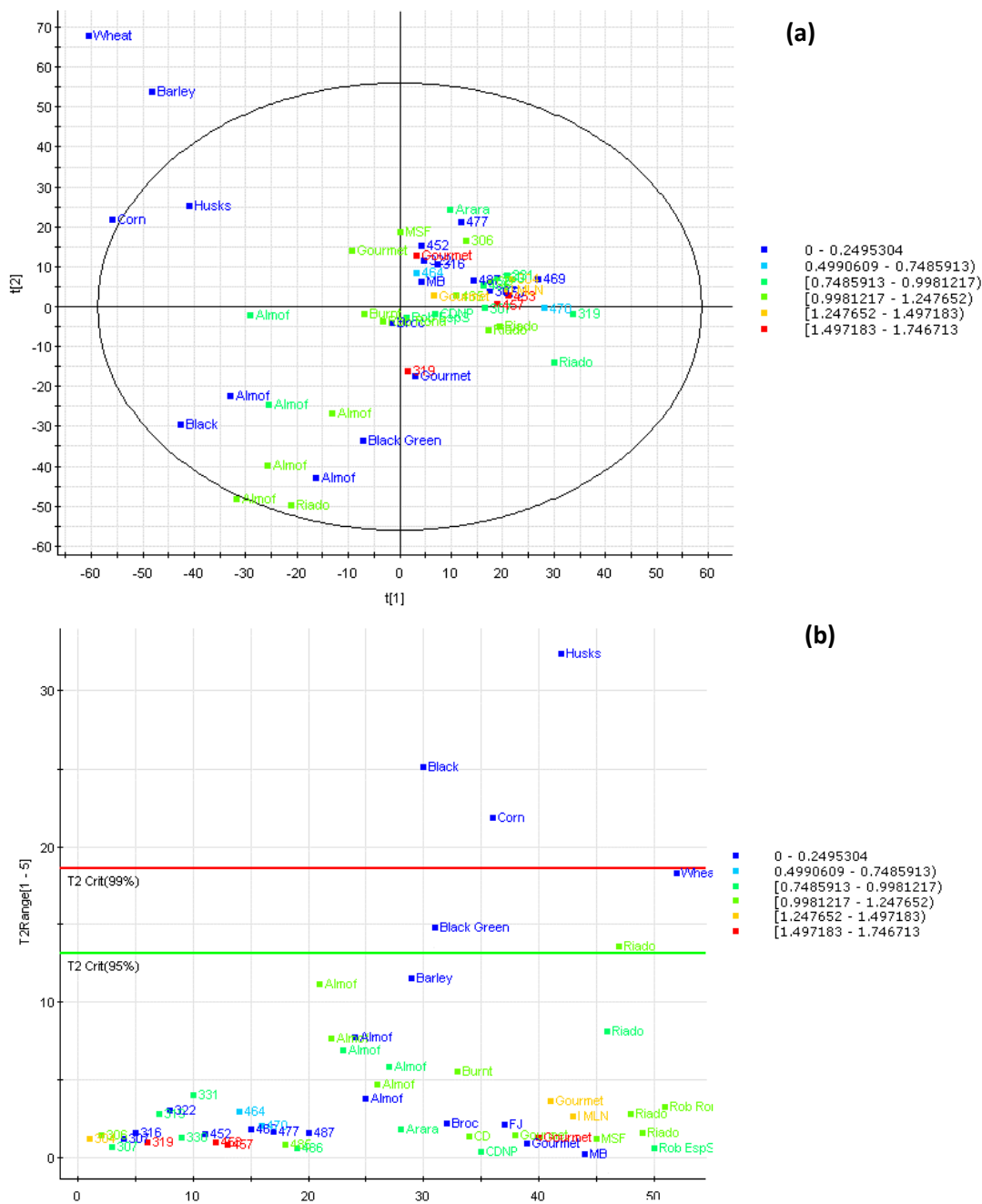
\*Values already considering the dilution; n: number of repetitions; CV: coefficient of variation (%); LOQ: low of quantification limit.

Theophylline and paraxanthine compounds were not shown in Table 3 due to their relatively low concentration against the other compounds. Even at low concentration, the husk impurity presented levels of paraxanthine four times higher than those found in the average of the analyzed coffee samples. The concentrations of chlorogenic acid in the award-winning coffee presented average values of 55.66 mg L<sup>-1</sup> (SD = 18.92 mg L<sup>-1</sup>) and Caffeine 47.32 mg L<sup>-1</sup> (SD = 4.53 mg L<sup>-1</sup>), values relatively close to commercial gourmet coffee samples. Samples of commercial cushions showed significantly higher values of caffeine (59.91 mg L<sup>-1</sup>  $\pm$  5.19), close to those found in the robust coffee, indicating that these samples have a high proportion of this coffee specie in their composition. The husk impurity presented the rutin and myricetin compounds, in concentrations of 57.00 mg L<sup>-1</sup> and 97.00 mg L<sup>-1</sup>,

respectively. Two samples of commercial coffee presented this biomarkers indicating that the coffee sample may be adulterated with husks.

Combining the data obtained using the target metabolomics model, with all the compounds within the spectral range between  $m/z=100$  and  $m/z=800$ , multivariate analysis techniques can help in differentiating the matrices analyzed (Figure 3).

**Figure 3. (a) Scores Chart and (b) Hotelling's T-squared distribution for the samples in untargeted metabolomics analysis**



From Figure 3, it can be observed that it was possible to perform the separation of the different coffee matrices, impurities and adulterants using the developed chromatographic method and untargeted metabolic analysis.

#### 4. CONCLUSION

The developed chromatographic method promoted the separation and quantitation of the 21 functional compounds analyzed, contemplating all validation figures of RDC 166/17 and EC / 657/2002.

The developed chromatographic method with target and untargeted metabolomics analysis promoted the discrimination between coffee matrices, possible adulterants, and impurities, showing great potential for the quality control of roasted and ground coffee samples.

#### 5. NOTES AND REFERENCES

<sup>1</sup> Mattila, P.; Astola, J.; Kumpulainen, J. Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 5834-5841.

<sup>2</sup> Proestos C., Chorianopoulos N., Nychas G.-J. E., and Komaitis M. RP-HPLC Analysis of the Phenolic Compounds of Plant Extracts. Investigation of Their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53,(4), 1190-1195 DOI: 10.1021/jf040083t

<sup>3</sup> Rajan M., Barbosa P. F., Gualberto N. C., de Oliveira C. S., Neta M. T. S. L. & Narain N. Optimization and method validation of determining polyphenolic compounds by UFLC-DAD system using two biphenyl and pentafluorophenylpropyl column J Liq Chrom & Rel Tech, **2019**. DOI: [10.1080/10826076.2019.1598429](https://doi.org/10.1080/10826076.2019.1598429).

- <sup>4</sup> Kalia, V. C. Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnology Advances*, 31(2), 224-245. **2013**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.10.004>. PMID:23142623.
- <sup>5</sup> Savoia, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiology*, 7(8), 979-990. **2012**. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.12.68>. PMID:22913356.
- <sup>6</sup> Silva M. F. S., Silva, L. M. A., Quintela A. L., Santos, A. G., Silva F. A. N., de Oliveira, F. C. E., Filho E. G. A., Brito E. S., Canuto K. M., Pessoa, C., Zocolo, G. J. UPLC-HRMS and NMR applied in the evaluation of solid-phase extraction methods as a rational strategy of dereplication of *Phyllanthus* spp. aiming at the discovery of cytotoxic metabolites, *J. Chrom B*, **2019**. DOI:10.1016/j.jchromb.2019.04.029
- <sup>7</sup> Sontag G., Pinto M. I., Noronha J. P., and Burrows, H. D. Analysis of Food by High Performance Liquid Chromatography Coupled with Coulometric Detection and Related Techniques: A Review. *J Agric Food Chem* **2019** 67 (15), 4113-4144 DOI: 10.1021/acs.jafc.9b00003
- <sup>8</sup> C. H. Blum-Silva, A. B. G. Luz, M. V. P.S. Nascimento, B. M. de C. Facchin, B. Baratto, T. S. Fröde, L. P. Sandjo, E. M. Dalmarco, F. H. Reginatto. Qualitative and quantitative Analysis data of the major constituents of *Ilex paraguariensis* leaves by UPLC-PDA and QTOF-MS. *Data in Brief*. **2016**, 295–299. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.04.027

**Capítulo 5**

**POTENCIAL APLICAÇÃO DA**

**CONCENTRAÇÃO DE**

**CARBOIDRATOS TOTAIS NO**

**CONTROLE DE QUALIDADE DE**

**AMOSTRAS DE CAFÉ TORRADO E**

**MOÍDO**

# POTENCIAL APLICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS NO CONTROLE DE QUALIDADE DE AMOSTRAS DE CAFÉ TORRADO E MOÍDO

## Resumo

O café ganhou espaço econômico rapidamente na sociedade brasileira e, atualmente é um dos principais produtos agrícolas do País. Sua importância não é apenas econômica, mas pelos seus compostos bioativos, capazes de gerar significativos benefícios a saúde humana, é uma das bebidas mais consumidas do mundo. Por consequência este é alvo de muitas fraudes. Este fato desperta preocupações em relação a sua qualidade quanto á detecção de impurezas e matérias estranhas que são dificilmente perceptíveis a olho nu, especialmente após a torra e a moagem dos grãos, forma em que 97% do café é consumido no Brasil. A qualidade do pó de café costuma ser avaliada pela análise sensorial, que afere o sabor e o aroma da bebida. Entretanto, considerando que o grão de café é majoritariamente composto por carboidratos, a proposição desse trabalho é utilizar sua composição química para criar um perfil característico, buscando marcadores capazes de auxiliar na avaliação de sua qualidade. Para isso, a determinação dos carboidratos empregou a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência por troca aniônica com amperometria pulsada, que se mostrou efetiva na quantificação de 7 monossacarídeos, possibilitando caracterizar os perfis das matrizes estudadas. Avaliaram-se os carboidratos de 76 amostras torradas e moídas de diferentes tipos: cafés puros das espécies *Coffea arabica* (arábica) e *Coffea canephora* (robusta-conilon); adulterantes puros (cascas, paus, trigoilho e arroz) e misturas de 5% de adulterantes em café arábica. Observou-se que os cafés puros torrados apresentaram elevadas quantidades de galactose e manose, intermediária de arabinose e, baixos conteúdos de xilose, glicose e frutose. Já, as cascas de café contribuíram com o aparecimento de manitol e aumentaram os teores de xilose. Adulterantes como o trigoilho e arroz apresentaram elevados teores de glicose. Portanto, a elevação de alguns carboidratos como manitol, xilose e glicose evidenciam adições de adulterantes em alguns cafés comerciais. Assim, aplicando-se as análises de agrupamento hierárquico e análises de componentes principais (ACP) foi possível verificar que os adulterantes puros se distinguiram dos cafés puros e comerciais. Embora, fazendo parte do mesmo grupo, observam-se estratificações entre as misturas, o café arábica, o café conilon e os cafés torrado e moído comerciais, estes últimos apresentando maior dispersão. Isso permite inferir que a maioria dos cafés comerciais possui maior similaridade com o café conilon, do que com o arábica. Foi possível identificar ainda, duas amostras que apresentaram indícios de impurezas de cascas e paus em sua composição. Os dados deste estudo demonstram elevado potencial da técnica em auxiliar no controle de qualidade em amostras de café torrado e moído comerciais especialmente no quesito de adulterantes.

**Palavras-Chave:** marcadores químicos, HPAEC-PAD, adulteração.

## POTENTIAL APPLICATION OF CARBOHYDRATE CONCENTRATION IN QUALITY CONTROL OF GROUND-ROASTED COFFEE SAMPLE

### Abstract

Coffee has gained economic highlight quickly in Brazil and is currently one of the main agricultural products of the country. Its importance is not only economic, nevertheless by its bioactive compounds are able to generating significant benefits to human health, being one of the most consumed beverages in the world. Consequently, it is subject of many frauds. This fact raises concerns about its quality in the detection of impurities and foreign matters that are hardly noticeable to the naked eye, especially after the roasting and grinding of the grains, the form most consumed in Brazil by 97% of population. Usually the quality of the coffee powder is also evaluated by sensory analysis, which measures the beverage flavor and aroma. However, considering that the coffee bean is mainly composed by carbohydrates, the proposition of this study is to use its chemical composition to create a distinctive profile, looking for markers that can assist in the evaluation of its quality. For this, the determination of total carbohydrate employed high-performance liquid chromatography anion exchange with pulsed amperometric detection, which was effective in quantifying 7 monosaccharides, enabling to characterize the profiles of the matrices studied. Carbohydrate content were evaluated of 76 samples of ground-roasted of different types of pure coffee species like the *Coffea arabica* (arabica) and *Coffea canephora* (robusta-conilon); pure adulterants (husks, sticks, rice and wheat middling) and mixtures of 5% of adulterants in arabica coffee. It was observed that pure roasted coffee showed high amounts of galactose and mannose, intermediate level of arabinose and low content of xylose, glucose and fructose. Already, coffee husks contributed to the increase of mannitol and xylose content. Adulterants like wheat middling and rice showed high glucose content. Therefore, elevation of some carbohydrates like mannitol, xylose and glucose showed adulterants additions in some commercial coffees. Thus, applying the hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) was verified that the pure adulterants distinguished themselves from the pure and commercial coffees. Although, even part of the same group, it was observed stratifications between the mixtures, arabica coffee, conilon coffee and ground-roasted commercial coffee, the latter ones presenting greater dispersion. This allows us to infer that most commercial coffees have greater similarity with conilon coffee than with arabica coffee. It was also possible to identify two samples with impurities of husks and sticks indication in their composition. Data from this study demonstrate high potential of the technique to assist in quality control of ground-roasted commercial samples, especially in the matter of counterfeit.

**Keywords:** chemical markers, HPAEC-PAD, adulteration, chemometric.

## 1. INTRODUÇÃO

O café é uma bebida não alcoólica e estimulante, símbolo de receptividade em diversas culturas, que conquistou espaço econômico rapidamente e, atualmente ocupa a primeira posição entre as *commodities* agrícolas mundiais (MARTINS, 2008; RICCI et al., 2008). Destacam-se duas espécies de café, responsáveis por praticamente a totalidade de todo o comércio mundial, o *Coffea arábica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café robusta), que tem como seu principal expoente o café conilon, sendo que o café arábica apresenta características sensoriais mais desejáveis pelo mercado consumidor, com melhor aroma e sabor (NASCIMENTO, 2006; ICO, 2018).

O café é também conhecido por estudos relacionados a seus benefícios para a saúde, como no auxílio à prevenção de diabetes, depressão, problemas cardíacos e hipertensivos (ALVES et al., 2009, HIGDON; FREI, 2006, RICCI et al., 2008) possuindo assim, elevado valor econômico, e portanto, é alvo de fraudes e adulterações (ASSAD et al., 2002).

No Brasil, o cultivo do café ganhou força rapidamente, principalmente devido às condições climáticas favoráveis para o cultivo do grão. Atualmente o país é o maior produtor mundial da bebida, responsável por 30% do mercado internacional, volume que equivale à soma da produção dos outros seis maiores produtores (ABIC, 2018). Porém, a qualidade da bebida dentro do mercado nacional vem sofrendo acentuado decréscimo. Isto se deve principalmente ao aumento da exigência para exportação, fazendo com que o produto de menor qualidade permaneça no país, assim como pela falta de normativas que regulamentem a qualidade mínima do produto.

Atualmente o controle de qualidade do café torrado e moído utiliza duas técnicas, a análise sensorial, que se baseia na qualidade da bebida, e a microscopia, para avaliar amostras supostamente adulteradas (SILVA, 2004). Por ambas as técnicas, necessitam de recursos

humanos altamente treinados, tem sido consideradas subjetivas por órgãos de fiscalização, dificultando uma regulação efetiva do produto interno.

No café existem mais de 800 compostos responsáveis pelas características de sabor, cor e aroma da bebida, dentre os quais pode se destacar os carboidratos, que constituem aproximadamente 50% em massa da matriz do grão de café em base seca (RODRIGUES, 2012). Desta forma, os carboidratos podem constituir importantes marcadores químicos de supostas adulterações e também da qualidade do café.

Considerando a importância do tema exposto, realizou-se a análise e caracterização da concentração de carboidratos totais em amostras de cafés de diferentes qualidades sensoriais, visando à diferenciação de matrizes puras e com suspeita de adulteração.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS**

Foram utilizados como solventes para as etapas de extração e preparo da fase móvel: ácido clorídrico (Synth, Brasil); hidróxido de sódio (Fluka, Saint Louis, MO, EUA). A água empregada no preparo de padrões e soluções foi ultrapura produzida pelo sistema Milli-Q® (Millipore, Billerica, EUA). As fases móveis foram degaseificadas antes de sua utilização em ultrassom Elmasonic P (Elma, Alemanha) e bomba de vácuo (Gast, EUA).

Os padrões empregados (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram: D(-) – manitol, D(-) – arabinose, D(+) – galactose, D(+) – glicose, D(+) – xilose, D(+) manose, D(-) – frutose, com purezas de 99,90%; 99,90%; 98,00%; 99,50%; 99,00%; 99,50%; 99,45% e 99,90%,

respectivamente, mantidos em dessecador com pentóxido de fósforo (Merck, Darmstadt, Alemanha) devido à sua higroscopicidade, por 1 semana antes do preparo da solução padrão.

## 2.2 MATÉRIA-PRIMA

Foram analisadas 54 amostras de café torrado e moído comerciais; 10 amostras de café premiados pela boa qualidade sensorial em Concurso; 3 amostras de café arábica adulteradas; 4 amostras de possíveis adulterantes torrados (indistinguíveis do café a olho nu): casca (AP1), pau (AP2), triguilho (AP4) e arroz (AP7); 1 amostra de café conilon; e 1 amostra de escolha de resíduo de eletrônica de café arábica, totalizando 76 amostras.

Todas as amostras foram obtidas junto ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), exceto as amostras de café comerciais, as quais foram coletadas pelo MAPA (Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento) em mercados do Estado do Paraná no ano de 2015, como parte do acordo de cooperação técnica firmado entre a Universidade Estadual de Londrina e a Superintendência Federal da Agricultura no Paraná junto ao Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Vegetal (SIPOV/SFA-PR) sob memorando nº 127/2015. Realizou-se também, diversas misturas, simulando possíveis adulterações em cafés arábica e *blends* de café arábica com conilon (Tabela 1).

**Tabela 1.** Misturas de café arábica com adulterantes e café conilon

<b>Código</b>	<b>Tipo</b>	<b>Massa (g)</b>
M1	Arábica + Cascas + Paus	2,850 + 0,075 + 0,075
M3	Arábica + Triguilho	2,850 + 0,150
M4	Arábica + Arroz	2,850 + 0,150

Em todas as misturas a soma das massas de todos os adulterantes misturados nas matrizes de café foi igual ou inferior a 5%, enquanto que a massa de conilon foi inferior a 30%.

### 2.3 PREPARO DE SOLUÇÕES PADRÃO

Considerando a massa de 0,3000 g de café torrado e moído em base seca utilizada na extração, preparou-se uma solução estoque com os 7 padrões de monossacarídeos nas proporções de 1,00% (m/m) de manitol; 10,00% (m/m) de arabinose; 40,00% (m/m) de galactose; 15,00% (m/m) de glicose; 4,0% (m/m) de xilose; 30,00% (m/m) de manose e 15,00% (m/m) de frutose. A solução estoque foi então diluída 10 vezes, obtendo-se como concentração final dos padrões analíticos 0,10% (m/m) de manitol; 1,00% (m/m) de arabinose; 4,00% (m/m) de galactose; 1,50% (m/m) de glicose; 0,40% (m/m) de xilose; 3,00% (m/m) de manose; 1,50% (m/m) de frutose.

### 2.4 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

A umidade das amostras de café torrado e moído foi determinada utilizando analisador de umidade com lâmpada halógena (OHAUS-MB 45, Parsippany, EUA) a 105 °C, por 7 minutos, com 2,000 g de amostra e precisão de 0,01 g (MARCUCCI et al., 2013), em análises realizadas em triplicata.

## 2.5 EXTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS

Para extração, utilizou-se a norma Padrão Internacional ISO 11292:1995, com adaptações. Pesou-se 0,3000 g de amostra de café em base seca em erlenmeyer de 500 mL com tampa rosqueável (Schott Duran<sup>®</sup>, Elmsford, NY, EUA). Posteriormente, acrescentou-se 50 mL de ácido clorídrico 1,0 mol L<sup>-1</sup> mantendo-se o sistema fechado em aquecimento por 150 min, com agitação periódica a cada 30 min. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, a amostra foi filtrada através de papel pregueado em balão volumétrico de 100,0 mL, completando-se o volume com água ultrapura. O filtrado foi extraído em fase sólida utilizando cartuchos Sep-Pak<sup>®</sup> Vac 3cc (500 mg) C18 (Waters<sup>®</sup>, Milford, EUA), pré-condicionados com metanol e água ultrapura. O filtrado foi coletado em eppendorf de 2 mL e armazenado sob refrigeração até o momento da injeção das amostras no sistema cromatográfico.

## 2.6 SISTEMA CROMATOGRÁFICO

As amostras foram analisadas em um sistema instrumental constituído de um cromatógrafo líquido inerte de PEEK contendo dois frascos inertes (Nalgene, Rochester, NY, EUA) para armazenagem da fase móvel: eluente (NaOH 1,4 mmol L<sup>-1</sup>) e regeneradora (NaOH 300,0 mmol L<sup>-1</sup>); bomba de alta pressão inerte LC-10Ai (Shimadzu, Quioto, Japão) à 1,0 mL min<sup>-1</sup>; uma válvula solenoide de baixa pressão de 3 vias NResearch - 1367-72 com um circuito externo de acionamento de válvula solenoide “lab-made” para troca de eluentes; uma válvula de alta pressão de 10 vias com acionamento eletrônico VICI - C2-2340 EP, para introdução da amostra em um *loop* de 20,0 µL; uma pré-coluna (CarboPac PA1 – Dionex) e uma coluna de troca iônica aniônica de alta performance de resina de poliestireno-

divinilbenzeno (CarboPac PA1, 250 mm x 4 mm, 10  $\mu$ m, Dionex, Sunnyvale, CA, EUA); um forno termostaticado para coluna (Waters<sup>®</sup>, Milford, EUA) mantido a 28 °C, por um controlador de temperatura CHX 650 Pickering Laboratories; um amplificador de corrente - Stanford Research System RS570; uma fonte simétrica de  $\pm$  12 V utilizada para o acionamento de um circuito externo de transmissão de sinais elétricos “lab-made”; uma célula eletroquímica ED-50 – Dionex com eletrodo de ouro; um potenciostato Autolab PGStat 30 – Eco- 42 Chemie; uma interface Autolab – Eco Chemie; um sistema de aquisição e tratamento de dados composto por um microcomputador Pentium IV, atuando com o programa GPES (General Purpose Electrochemical System) – Eco. A aquisição e tratamento de dados foi realizada pelo software Integra<sup>®</sup>.

Utilizou-se também sistema cromatográfico comercial Dionex modelo ED 50, operando nas mesmas condições cromatográficas e voltamétricas descritas para o sistema *lab-made*. A aquisição e processamento de dados se deu pelo software Peaknet<sup>®</sup> (Dionex, USA)

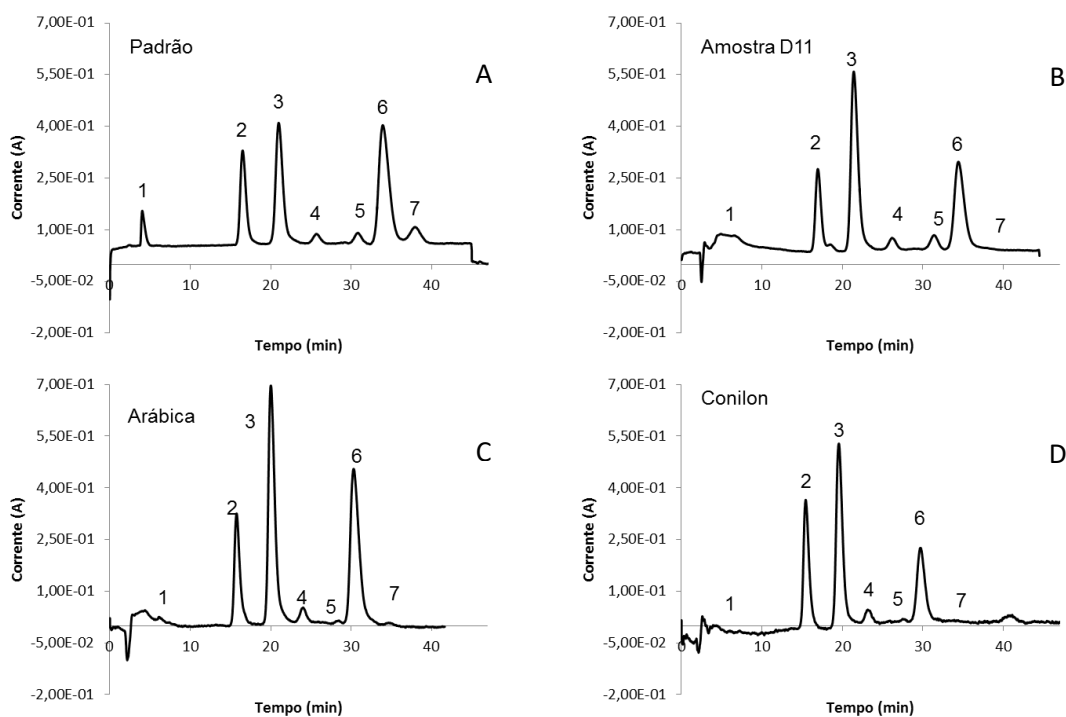
## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A concentração dos carboidratos foi expressa em g 100 g<sup>-1</sup> (%) e analisadas estaticamente com o auxílio do *software* Statistica 8.0 (Statsoft, EUA).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras foram caracterizadas com base no perfil cromatográfico (Figura 1) considerando os sete monossacarídeos presentes em maior quantidade na matriz do café: manitol, arabinose, galactose, glicose, xilose, manose e frutose (DOMINGUES et al. (2014).

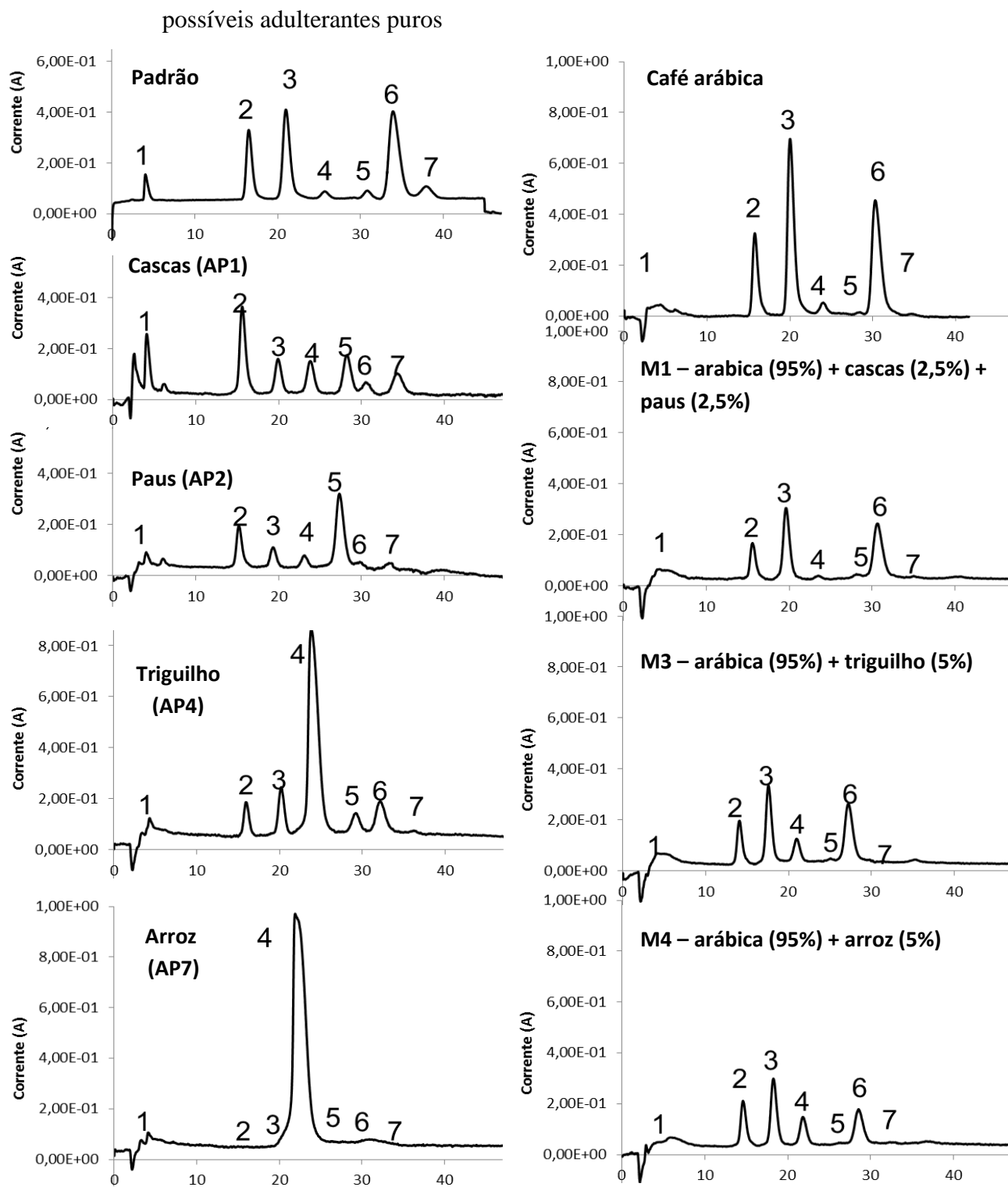
**Figura 1.** Cromatogramas das análises de carboidratos: (A) Mistura de padrão de carboidratos, (B) Amostra de café comercial torrado e moído, (C) Café arábica torrado e moído (D) Café conilon torrado e moído



**Picos:** (1) Manitol, (2) Arabinose, (3) Galactose, (4) Glicose, (5) Xilose, (6) Manose e (7) Frutose. Fase móvel – corrida isocrática: NaOH 1,4 mmol L<sup>-1</sup> (eluente: 0 – 49 min e reequilíbrio: 64–72,6 min) e NaOH 300 mmol L<sup>-1</sup> (regeneração: 49-64 min). Vazão: 0,8 mL min<sup>-1</sup>; vol. injeção: 20,0 µL; pré-coluna e coluna: CarboPac PA-1 a 25°C; forma do pulso amperométrico - ED-50 Au: + 0,20 V (400 ms); + 0,65 V (200 ms) e - 0,20 V (400 ms).

Pôde-se observar a partir da Figura 1, que todas as amostras analisadas apresentaram o mesmo perfil cromatográfico com relação aos monossacarídeos detectados, apresentando apenas diferenças em suas concentrações. Observa-se ainda, que existe uma relativa diferença entre as concentrações dos carboidratos analisados nas amostras de café conilon e arábica. Entretanto, mais estudos serão feitos considerando um número maior de amostras para observar possíveis correlações entre esses marcadores químicos e as duas variedades de café. Por fim, ainda com relação a Figura 1, a amostra D11 apresentou o pico referente à xilose, visivelmente mais acentuado que os presentes nas amostras de arábica e conilon, o que pode estar relacionado à presença de impurezas ou ainda ser um indício de adulteração.

Analisaram-se também as misturas (Tabela 1) e os possíveis adulterantes da matriz do café, buscando encontrar diferenças nos perfis cromatográficos que possibilitem a distinção entre as matrizes (Figura 2).

**Figura 2.** Cromatogramas em mesma escala das amostras de café arábica adulteradas e

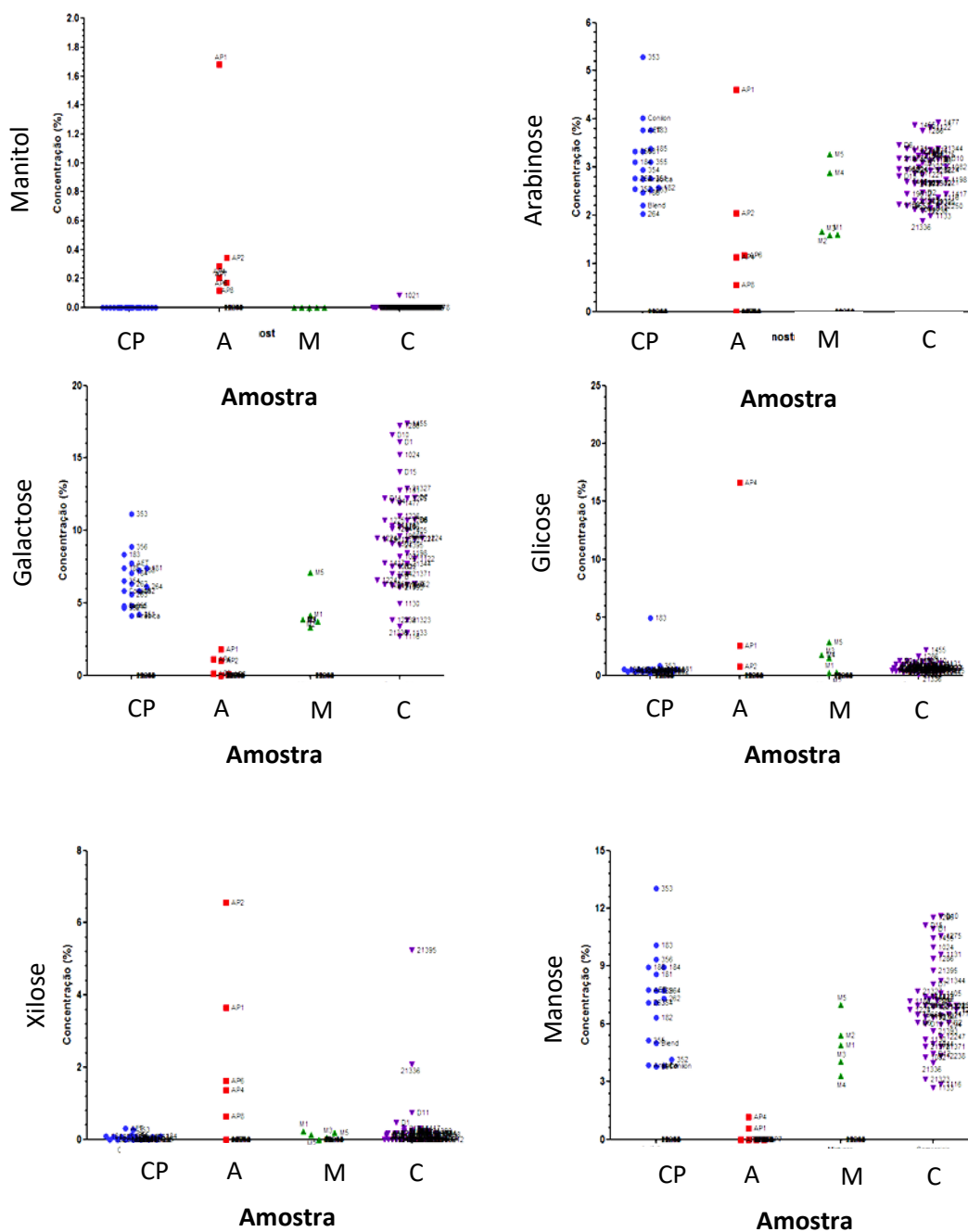
**Picos:** (1) Manitol, (2) Arabinose, (3) Galactose, (4) Glicose, (5) Xilose, (6) Manose e (7) Frutose. Fase móvel – corrida isocrática: NaOH 1,4 mmol L<sup>-1</sup> (eluente: 0 – 49 min e reequilíbrio: 64–72,6 min) e NaOH 300,0 mmol L<sup>-1</sup> (regeneração: 49- 64 min). Vazão: 0,8 mL min<sup>-1</sup>; vol. injeção: 20,0 µL; pré-coluna e coluna: CarboPac PA-1 à T: 25°C; forma do pulso amperométrico - ED-50 Au: + 0,20 V (400 ms); + 0,65 V (200 ms) e - 0,20 V (400 ms).

Analisado os cromatogramas da Figura 2, pode-se observar que mesmo uma adição, relativamente pequena de trigoilho (M3) e arroz (M4) na amostra de café arábica, acarreta uma acentuada elevação do nível de glicose (pico 4). Este fato está relacionado à grande concentração deste carboidrato nas respectivas matrizes, conforme os cromatogramas AP4 e AP7, também presentes na Figura 2, ressaltando o potencial da técnica para a investigação de possíveis adulterações em café. Pode-se observar também que as impurezas - cascas e paus, quando adicionadas a matriz do café, devem ocasionar o aumento da concentração dos carboidratos xilose e frutose, conforme observado no cromatograma referente à M1.

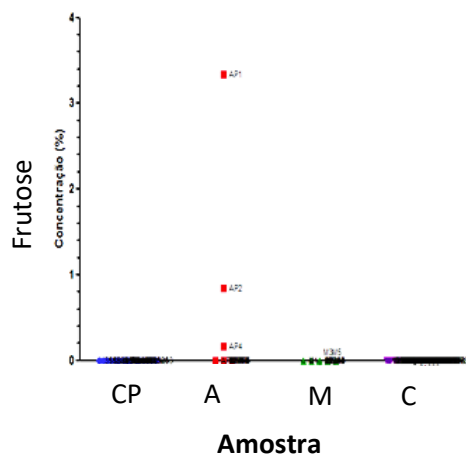
Realizou-se então adulterações quantitativas às amostras de café visando determinar qual o limite de adulteração capaz de ser detectada pela metodologia. Para cereais maltados (trigo, cevada, arroz) e milho, pode-se detectar adulterações em nível de 1% (m/m). Para as impurezas cascas e paus o limite de detecção aumenta para 10% (m/m) devido à presença de componentes endógenos do café.

Foram analisadas também amostras de café comercial, visando caracterizar o seu perfil de carboidratos e encontrar diferenças e semelhanças com as amostras de café arábica, conilon e amostras de adulterantes. Para uma melhor visualização da variância dos dados amostrais, devido à grande quantidade de amostras analisadas, os resultados foram expressos através de gráficos de dispersão (Figura 3).

**Figura 3.** Gráficos de dispersão referentes às concentrações dos carboidratos: manitol, arabinose, galactose, glicose, xilose, manose e frutose nas amostras de café puro (CP), adulterantes (A), misturas (M) e cafés comerciais (C).



**Continuação - Figura 3.** Gráfico de pontos referente à concentração dos carboidratos: manitol, arabinose, galactose, glicose, xilose, manose e frutose nas amostras de café puro (CP), adulterantes (A), misturas (M) e cafés comerciais (C).



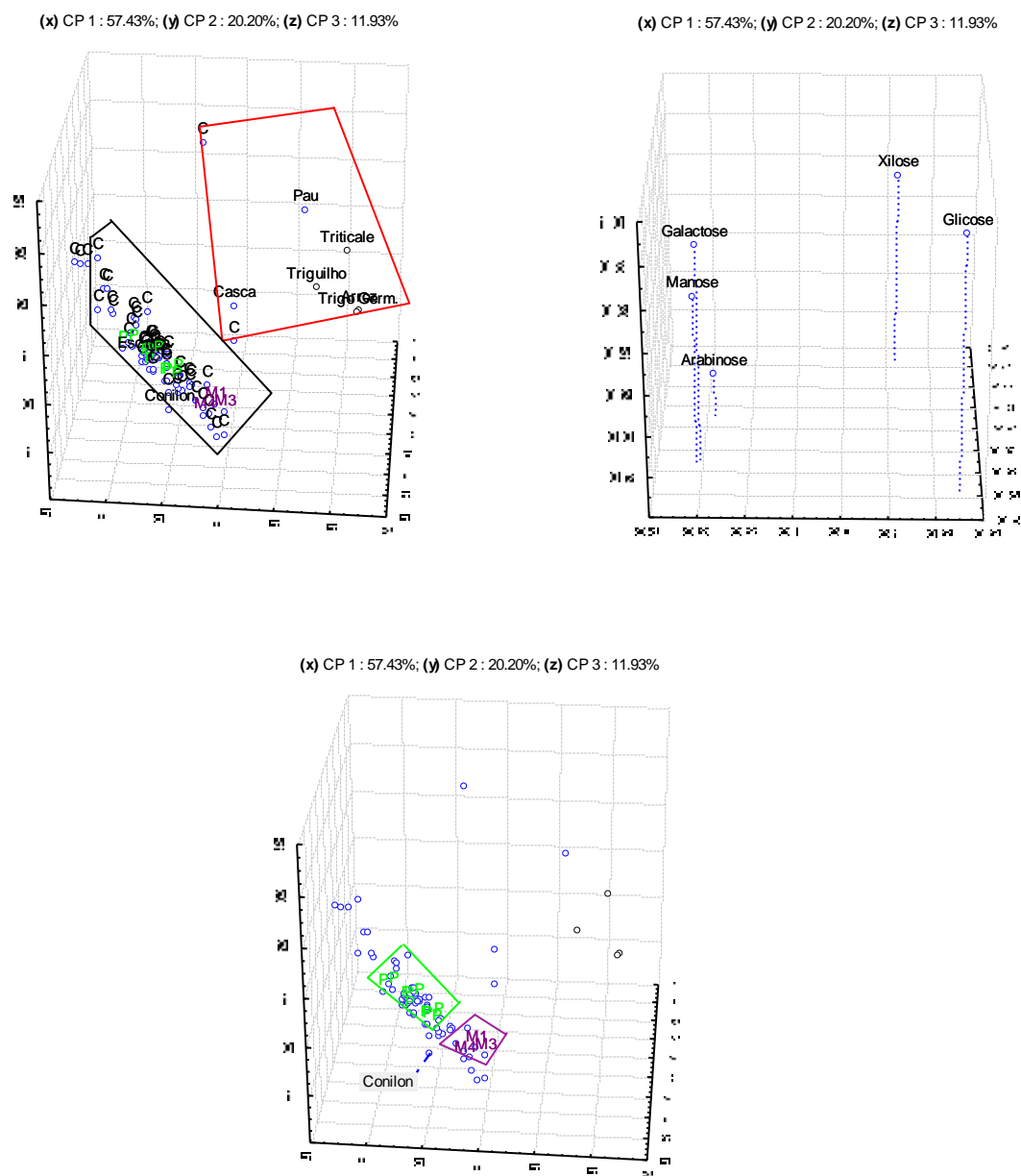
Verificou-se que os carboidratos manitol, xilose e frutose apresentaram as menores concentrações. Enquanto, os demais carboidratos mostraram variação significativa ( $p < 0,05$ ) em sua concentração para as diferentes matrizes analisadas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Intervalo de concentração mínima e máxima dos teores de carboidratos que mais apresentaram variação nas amostras estudadas de café torrado e moído

<b>Cafés</b>	<b>Arabinose</b> % (m/m)	<b>Galactose</b> % (m/m)	<b>Glicose</b> % (m/m)	<b>Manose</b> % (m/m)
Arábica	2,03 - 4,02	4,10 - 11,12	0,23 - 4,97	3,78 - 13,04
Comerciais	1,31 - 3,39	2,71 - 11,61	0,23 - 2,19	2,69 - 11,61
Adulterantes e misturas	0,00 - 4,61	0,00 - 7,09	0,21 - 23,08	0,00 - 6,98

A partir da Tabela 2 verifica-se que a concentração dos carboidratos sofreu elevada variação dentro dos grupos amostrais, mostrando que os dados apresentam relativa complexidade de análise de forma univariada. Portanto, para melhor explicar a variância dos dados amostrais, recorreu-se a técnicas de análise multivariada. Optou-se então, pela análise de agrupamento hierárquico juntamente com a análise de componentes principais, devido à maior facilidade de compreensão dos resultados (Figura 4).

**Figura 4.** Análise de componentes principais (gráfico de *scores*) referente às diferentes matrizes analisadas utilizando como variáveis de análise as concentrações dos carboidratos arabinose, galactose, glicose, xilose e manose.



Cafés Premiados (P) – Verde; Cafés comerciais (C) e Adulterantes – Preto e Misturas (Tabela 1) – Roxo.

Observando-se a Figura 4, verifica-se que a concentração de carboidratos totais, foi suficiente para separar e agrupar as matrizes de: cafés premiados; de café conilon; das amostras de café arábica adulteradas (Tab. 1). Já as amostras de cafés comerciais se apresentaram em posições intermediárias às diferentes matrizes. As amostras de café foram direcionadas no sentido dos carboidratos galactose e manose. Duas amostras de café contendo possivelmente impurezas de casca e pau, em proporção maior que a mistura testada (M1), foram direcionadas no sentido dos carboidratos xilose e glicose. Isto confirma as observações acerca do cromatograma dessas matrizes, que apresentam elevada concentração de xilose e glicose, tendendo a aumentar a concentração desses monossacarídeos, quando esses são adicionados na amostra. Contudo, apesar do grande potencial da técnica na elucidação de possíveis adulterações em café torrado e moído, recomenda-se a determinação de outros marcadores químicos, como cafeína e trigonelina, tendo em vista a complexidade e semelhança da matriz, para corroborar no controle de qualidade de amostras de café torrado e moído comerciais.

#### 4. CONCLUSÃO

Foi possível caracterizar as matrizes de cafés torrado e moídos das espécies arábica e conilon; cafés comerciais e adulterantes por cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica com detecção por amperometria pulsada (HPAEC-PAD)

Com relação à concentração de carboidratos totais, estes permitiram realizar a diferenciação parcial e o agrupamento das matrizes de café arábica premiados, café conilon, cafés arábica adulterados e amostras de possíveis adulterantes, com o auxílio de técnicas de análise multivariada, ressaltando o potencial da técnica para o auxílio no controle de qualidade de amostras de café torrado e moído comerciais.

Foi possível ainda, verificar a existência de duas amostras comerciais que continham indícios da presença de impurezas, possivelmente relacionadas à presença de cascas e paus.

#### REFERÊNCIAS

- ABIC – Associação Brasileira de indústrias de café. Disponível em: <  
<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#5103>> Acesso em:  
10 dez. 2018.
- ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade. Quim. Nova, São Paulo, v.32, n.8, p.2169-2180, 2009.
- ASSAD, E. D.; CORREA, T. B. S.; CUNHA, S. A. R. Identificação de impurezas e misturas em pó de café por meio de comportamento espectral de imagens digitais. Pesq. Agropec. Bras., Brasília, v.37, n.2, p.211-216, 2002.
- ICO – International Coffee Organization. Estatísticas do Comércio. Disponível em:  
<<http://www.ico.org>>. Acesso em: 12 dez. 2018.

MARCUCCI, C. T.; BENASSI, M. T.; ALMEIDA, M. B.; NIXDORF S. L. Teores de trigonelina, ácido 5-cafeoilquínico, cafeína e melanoidinas em cafés solúveis comerciais brasileiros, *Quím. Nova*, v.36, n.4, p.544-548, 2013.

MARTINS, A. L. História do café. *G&DR*, Taubaté-SP, v.4, n.3 (número especial), p.170-173, ago. 2008.

NASCIMENTO, P. M. Estudo da composição química, atividade antioxidante e potencial odorífico de um café conilon, em diferentes graus de torrefação e análise comparativa com café arábica. 2006. 90 fls. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

RICCI, F. História do Café. *G&DR*, Taubaté-SP, v.4, n.3, p. 70-173, ago. 2008.

RODRIGUES, I. R. Composição química do café do Alto Vale do Jequitinhonha e comparação dos efeitos sub-crônicos da cafeína e do café em ratos. 2012. 97 fls. Dissertação (Mestrado em Química) –Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2012.

SILVA, A. F.; MINIM, V. P. R.; CHAVES, J. B. P.; Stringheta, P. C.; Ribeiro, M. M. Avaliação do gosto amargo da bebida de café (*Coffea arabica* L.) orgânico por meio da análise tempo-intensidade. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.24, n.3, p.468-472, jul./set. 2004.

**Capítulo 6**

**ESPECTROSCOPIA DE**

**INFRAVERMELHO PRÓXIMO E**

**QUIMIOMETRIA: POTENCIAL**

**PARA CONTROLE DE QUALIDADE**

**DE CAFÉS**

## ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO E QUIMIOMETRIA: POTENCIAL PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE CAFÉS

### Resumo

O NIR produz determinações rápidas, simples, repetitivas e sustentáveis, que por não exigir preparo de amostra com uso de solventes, é parte das técnicas “verdes”. Apresenta ainda a vantagem, de não ser uma técnica destrutiva, preservando amostras de alto valor, como as de cafés especiais, em ascensão mercadológica. Entretanto, pela sua matriz de dados, exige o uso de uma série de análises estatísticas. Visando agregar objetividade à detecção de fraudes do café torrado e moído, tradicionalmente avaliadas por microscopia e análise sensorial, investigou-se o potencial de uso da espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) aliada aos tratamentos quimiométricos no controle de qualidade do café. Para isso, inicialmente foi determinado um perfil de café premiados, pela boa qualidade sensorial, por provadores experientes, nos Concursos “Café Qualidade Paraná” de 2012, 2013 e 2015. As amostras foram torradas, trituradas, peneiradas e sua umidade foi determinada em termobalança. Os espectros NIR, foram adquiridos com 2,5 g de amostra em cela de quartzo *spinning* em espectrômetro de bancada. Um banco de dados foi criado para cada tipo de amostra. Os espectros sem pré-processamento matemático, e os processados com a primeira derivada e com a seleção de variáveis, foram tratados por quimiometria. Utilizou-se as análises multivariadas, análises por agrupamento hierárquico (AAH), análises de componentes principais (ACP) e a análises de componentes comuns (ComDim), as quais permitiram a correlação e a distinção das amostras. Foi possível correlacionar às amostras premiadas com sua classificação sensorial, sendo cafés premiados separados dos desclassificados do Concurso pela bebida inferior. Os espectros NIR permitiram diferenciar entre cafés premiados crus e torrados. As análises possibilitaram ainda, a separação dos adulterantes - trigo, centeio, feijão preto, milho, soja e casca dos cafés torrado e moídos comerciais. Por sua vez, os cafés comerciais puderam ainda ser agrupados pela sua nota de classificação sensorial em tradicional, superior ou gourmet. Adicionalmente, houve a distinção de amostras de cafés torrados das espécies arábica e conilon, e de amostras contendo defeitos (preto, verde, ardido, preto-verde e brocado) provenientes de resíduos de eletrônica. A quimiometria permitiu ainda realizar a criação de modelos matemáticos para quantificação de trigonelina, cafeína e umidade em amostras de café torrado e moído comerciais. A separação em grupos distintos, de acordo com as características da amostra de café, atesta o potencial uso do NIR associado à quimiometria, em endossar as avaliações feitas pelas análises sensoriais, como uma abordagem promissora para o controle de qualidade rotineiro.

**Palavras-Chave:** análise sensorial; cafés torrado e moídos comerciais; espécies de café; adulterantes; defeitos.

## NEAR INFRARED ESPECTROSCOPY AND CHEMOMETRICS: POTENTIAL FOR COFFEE QUALITY CONTROL

### Abstract

NIR produces rapid, simple, repetitive and sustainable determinations, which do not require samples preparation using solvents, being part of the "green" techniques. It also has the advantage of not being a destructive technique, preserving high-value samples, such as specialty coffees, in a growing market. However, through its big data matrix, it requires the use of a series of statistical analyzes. Aiming to aggregate objectivity in the detection of frauds in ground-roasted coffee, traditionally evaluated by microscopy and sensorial analysis, the potential of using near-infrared spectroscopy (NIR) together with chemometrics treatments was investigated for coffee quality control. For that, initially a coffee profile of a good sensorial quality samples awarded in the "Coffee Quality Paraná" Contests of 2012, 2013 and 2015 was performed by experienced tasters. The samples were roasted, ground, sieved and their moisture content was determined in thermobalance. The NIR spectra were obtained with 2.5 g of sample in a quartz cell spinning in a bench spectrometer. A database was created for each sample type. The spectra without mathematical preprocessing, and those with the first derivative and the selection of variables were treated by chemometrics. Multivariate analysis, hierarchical grouping analysis (AAH), main component analysis (PCA) and common component analysis (ComDim) were used, which allowed the correlation and the distinction of the samples. It was possible to correlate the winning samples with their sensorial classification, being prized coffees separated from the disqualified ones of the competition by its inferior drink. NIR spectra allowed differentiating between raw and roasted coffee. The analyzes also allowed for the separation of the adulterants - wheat, rye, black beans, corn, soybeans and bark from roasted and ground coffee. In turn, the commercial coffee could still be grouped by their sensorial classification mark as traditional, superior or gourmet. In addition, samples of roasted coffees from arabica and conilon species, and samples containing defects (black, green, black-green, and brocade) from electronic waste were distinguished. Chemometrics also enabled the creation of mathematical models for the quantification of trigonelline, caffeine and moisture in commercial ground-roasted coffee samples. Separation into distinct groups, according to the characteristics of the coffee sample, confirms the potential use of the NIR associated with chemometrics, in endorsing the evaluations made by the sensorial analyzes, as a promising approach to routine quality control.

**key words:** award-winning coffee; sensorial analysis; ground-roasted commercial coffee; adulterants; defects.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é reconhecido como um dos maiores produtores e exportadores de grãos de café e de café processado, com elevado consumo interno. A produção da safra de 2018 foi de 61,7 milhões de sacas, crescimento relativo de 37% em relação à safra anterior (CONAB, 2018). Pelo fato do café ser a 2ª *commodity* de maior valor agregado (OIC, 2018; NABAIS et al., 2008) exige como pré-requisito para comercialização globalizada um controle de qualidade eficaz (ABIC, 2019). Para isso, são necessários estudos de composição (MOREIRA, TRUGO, 1997) para a detecção de misturas de adulterantes, de grãos defeituosos e das *blends* das 2 espécies de café.

A qualidade da bebida café, caracterizada por seu sabor e aroma, é influenciada por diversos fatores pré e pós-colheita que garantem a expressão final da qualidade do produto. Esta também está intrinsecamente relacionada ao tipo de grão empregado como matéria-prima, sendo o sabor do café afetado diretamente pela composição química e seu grau de torra, que atinge o “pico do sabor” de 205°C a 220°C (MELO, 2004).

No Brasil, no entanto, há relatos de impurezas e adulterantes sendo adicionadas ao café, tais como, cascas e paus, milho, cevada, trigoilho, açúcar mascavo e soja. O método atualmente empregado no controle de qualidade para verificar as adulterações ainda é a análise microscópica, embora este seja considerado um método subjetivo, sujeito a erros por depender das habilidades e experiência do analista, e que não apresente confiabilidade quantitativa, além de ser demorado e oneroso (ASSAD et al., 2002). Em contrapartida, a espectroscopia é uma técnica de uso crescente, devido à sua rapidez, simplicidade e segurança, bem como a sua capacidade de medir vários atributos simultaneamente sem

necessitar de métodos dispendiosos de preparo de amostras. Mais especificamente, os métodos de espectroscopia no visível, na faixa de infravermelho próximo (NIR) e médio constituem-se em técnicas rápidas, de baixo custo e livre de produtos químicos sem a necessidade de processamento da amostra e, portanto, não destrutiva, que tem sido amplamente utilizada para detectar a composição química de alimentos, requisito que a torna adequada para ser implementada de forma rotineira (PEDRO, FERREIRA, 2005; YAN-DE et al., 2007; JING et al., 2010; SANTOS et al., 2012). Entretanto, pelo elevado número de dados gerados, as técnicas espectroscópicas, demandam tratamentos estatísticos, visando maximizar os resultados. Estas permitem avaliar a qualidade da matriz de forma planejada e detectar a existência de correlações entre diferentes perfis de matéria-prima, valendo-se de técnicas de agrupamento (REIS, ANDRADE, 1996; SOUZA; POPPI, 2012). Neste contexto, ganham destaque os métodos de pré-processamento de dados, como a correção multiplicativa de espalhamento (MSC), capaz de corrigir efeitos de reflectância difusa causadas pelos fenômenos físicos, variações no caminho óptico e por diferenças de granulometria de partículas na resposta do detector (FERREIRA, 2015).

Para uma melhor interpretação dos dados, técnicas de análise multivariada vêm ganhando grande destaque, em especial a já bastante conhecida análise de componentes principais (ACP ou do inglês PCA), e mais recentemente, a análise de componentes comuns (ComDim). A primeira técnica (PCA) visa o cálculo da matriz de variância-covariância para as variáveis de um grupo amostral. Já, a segunda técnica (ComDim) é um método multi-tabela. Nesta segunda as matrizes de variância-covariância, de mesmo tamanho, são utilizadas para obtenção da sua soma ponderada, na qual é possível realizar a extração do primeiro componente principal, normalizado como a primeira dimensão comum (DC). Assim, por meio de algoritmo pode-se calcular o peso (saliência) e a porcentagem de

variância extraída por cada *DC*, de forma a realizar agrupamentos e separação de matrizes, ocasionados por diferenças em sua composição química (BOUVERESSE et al., 2011; ROSA et al., 2017).

Visando atender a demanda de mercado na busca de métodos eficazes e rápidos para detecção e controle de fraudes no café torrado e moído, o presente trabalho objetiva demonstrar o potencial da espectroscopia NIR associado à quimiometria, como método analítico para detecção de adulterações e estudo da qualidade em café.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 MATÉRIA-PRIMA**

As amostras de cafés considerados de boa qualidade foram selecionadas por meio de sua premiação pela análise sensorial nos Concursos “Café Qualidade Paraná”. Este concurso anual é promovido pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SEAB). Foram coletadas amostras dos anos de: 2012 (41 amostras de cafés crus) e 2013 (38 amostras de café torrado e moído) e 2015 (14 amostras torradas e moídas), referentes às safras de 2011/2012, 2012/2013 e 2014/2015, respectivamente.

A coleta das amostras de café comercial torrado e moído provenientes de diferentes marcas e regiões do país foram realizadas em supermercados do Paraná pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) ao longo de 2015 e 2016.

### **2.2 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E PROCESSAMENTO**

Após a coleta das amostras procedeu-se a moagem dos grãos crus em moedor (Arbel MCF55, São José do Rio Preto, Brasil) utilizando nitrogênio líquido como agente

refrigerante, a fim de minimizar processos oxidativos e degradação térmica dos grãos crus. A amostra pulverizada foi posteriormente peneirada em granulometria de 22 *mesh* (Granutest, Paulínia, Brasil). A umidade das amostras foi determinada utilizando analisador de umidade por infravermelho a 105°C por 7 min (IV 2000, GEHAKA, SP, Brasil).

### 2.3 ANÁLISE DE CAFEÍNA E TRIGONELINA

A análise de trigonelina e cafeína foram realizadas segundo o método padrão internacional ISO 20481:2008. Os dados foram expressos em g 100 g<sup>-1</sup> e utilizados para calibração multivariada dos modelos preditivos gerados no espectrômetro NIR.

### 2.4 TORRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CAFÉ E ADULTERANTES

As amostras, classificadas como de torração clara, foram torradas em torrador convencional, e definidas segundo experiência, em função da cor visual aparente. As amostras de adulterantes foram torradas, de forma que não pudessem ser distinguidas de forma visual, das amostras de café torradas. A coloração das amostras dos cafés torrados premiados foi determinada, posteriormente, utilizando colorímetro Konica Minolta (CR-400, Quioto, Japão).

### 2.5 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS NIR

Pesou-se 2,5 g de cada amostra, adicionando-se à uma cela de quartzo do tipo *spinning*, procedendo-se a aquisição dos dados espectrais em espectrômetro NIR Foss® (XDS Rapid Analyser Content, Dinamarca). Após a leitura, realizou-se a criação de um banco de dados para cada tipo de amostra. Foram analisadas as amostras premiadas pela boa qualidade sensorial de cafés crus e torrados, e desclassificadas no Concurso do Paraná,

consideradas de qualidade sensorial inferior. Além destas, foram analisadas amostras de café puro das espécies arábica e conilon; e de café contendo defeitos - preto, verde e ardido (PVA), provenientes de resíduos da catação eletrônica de café arábica tipo exportação, denominado de “café escolha”. Adicionalmente, foram analisadas amostras de adulterantes de milho, trigo, soja, centeio, feijão preto, e de casca, como impureza todos torrados. Por fim, foram introduzidas amostras de cafés torrado e moídos comerciais fornecidas pelo MAPA. Os espectros NIR foram tratados por análises quimiométricas.

## 2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas multivariadas de componentes principais e de agrupamento hierárquico foram realizadas com o auxílio do *software* Statistica 8.0 Statsoft e MatLab R2008b (The MathWorks Inc., Natick, USA).

Com relação ao concurso de 2012, foi possível a obtenção das amostras cruas. Já no concurso de 2013 e 2015 foram obtidas as amostras cruas e torradas, com acesso à ordem de classificação apenas das amostras premiadas no Concurso “Café Qualidade Paraná” do ano de 2013.

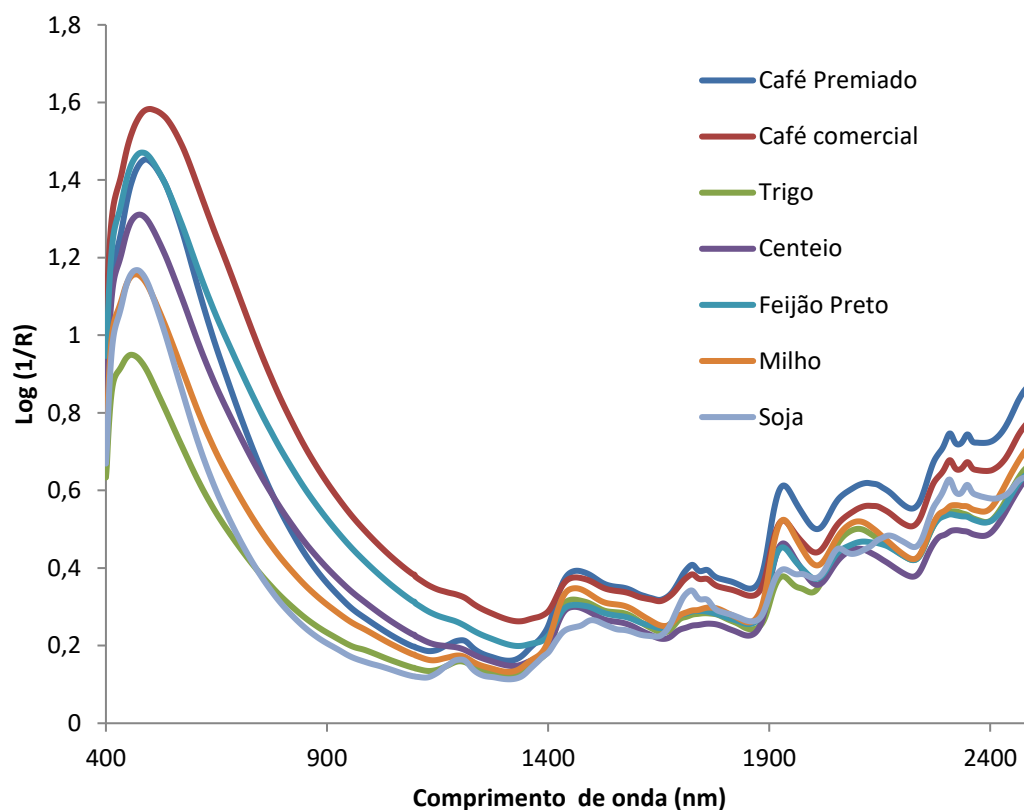
## 2.7 ANÁLISE SENSORIAL

As análises sensoriais foram realizadas com o auxílio do Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR) e pessoal do MAPA, com todos os provadores que auxiliaram nas análises presentes neste trabalho possuem certificação de excelência SCAA (*Specialty Coffee Association of America*).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

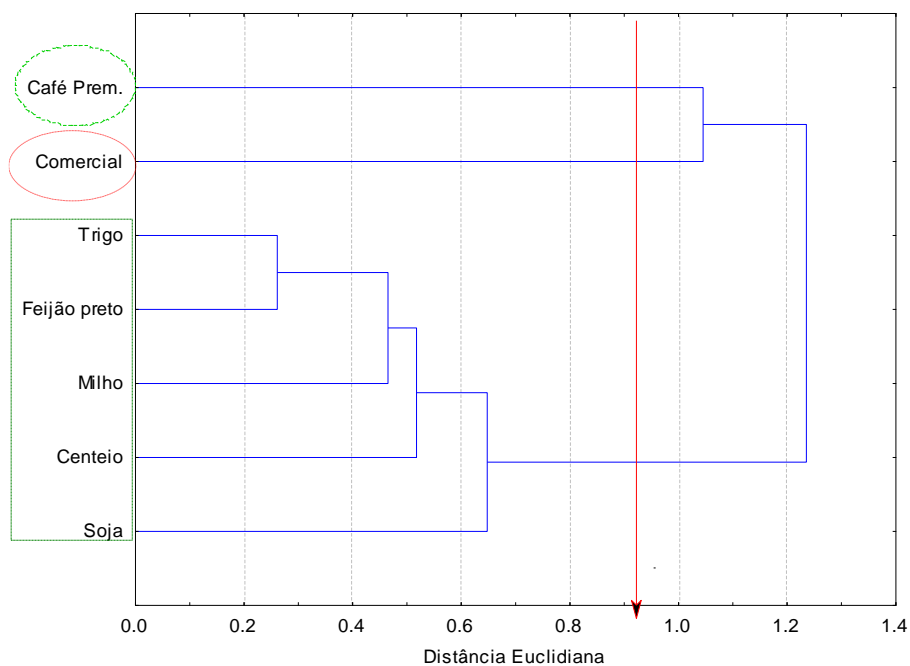
Inicialmente, o potencial da técnica NIR foi empregado visando identificação de possíveis amostras adulteradas em sua composição. Para isto, realizou-se a aquisição de dados espectrais NIR de amostras de adulterantes torrados, descritos na literatura como adicionados em cafés comerciais, comparando-se com café de boa qualidade (Figura 1).

**Figura1.** Espectros Vis-NIR de amostras torradas de cafés comerciais e premiados (Concurso “Café Qualidade Paraná” 2014) pela boa qualidade sensorial e de matrizes comumente utilizadas para adulteração



A partir da Figura 1, pode-se notar visualmente diferenças entre os espectros das matrizes analisadas, quanto à intensidade e surgimento de novas bandas. Desta forma, recorreu-se às técnicas análise multivariada análise de agrupamento hierárquico (HCA) (Figura 2) e análise de componentes principais (PCA), para melhor evidenciar a separação das matrizes.

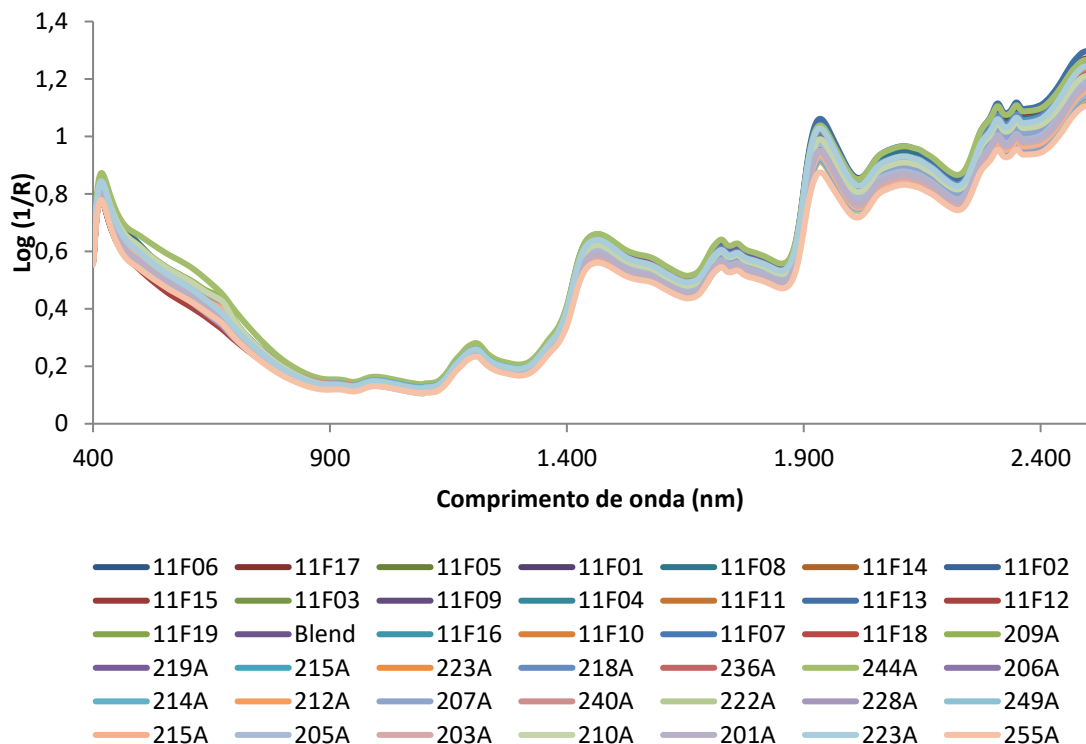
**Figura 2.** Dendrograma resultante da análise de agrupamento hierárquico dos espectros das amostras de cafés comercial e premiado pela boa qualidade sensorial (2014) e de adulterantes, utilizando como variáveis as refletâncias obtidas entre os comprimentos de 1990 nm a 2498 nm, com corte esquemático na maior distância euclidiana



Pode-se observar a partir da Figura 2 que foi possível realizar a separação e agrupamento das amostras de café premiado, comercial e possíveis adulterantes pela análise de agrupamento hierárquico.

Verificado o potencial da técnica em separar as diferentes matrizes, realizou-se a criação de um banco de dados espectral no infravermelho próximo (NIR), a partir de 41 amostras de cafés crus premiados pela boa qualidade sensorial dos Concursos “Café Qualidade Paraná” de 2012 (Fig. 3) obtendo-se acesso apenas às amostras cruas, e de uma mistura, contendo quantidades iguais de todas as amostras analisadas (*blends*), a fim de se obter um modelo representativo que descrevesse cafés crus de boa qualidade.

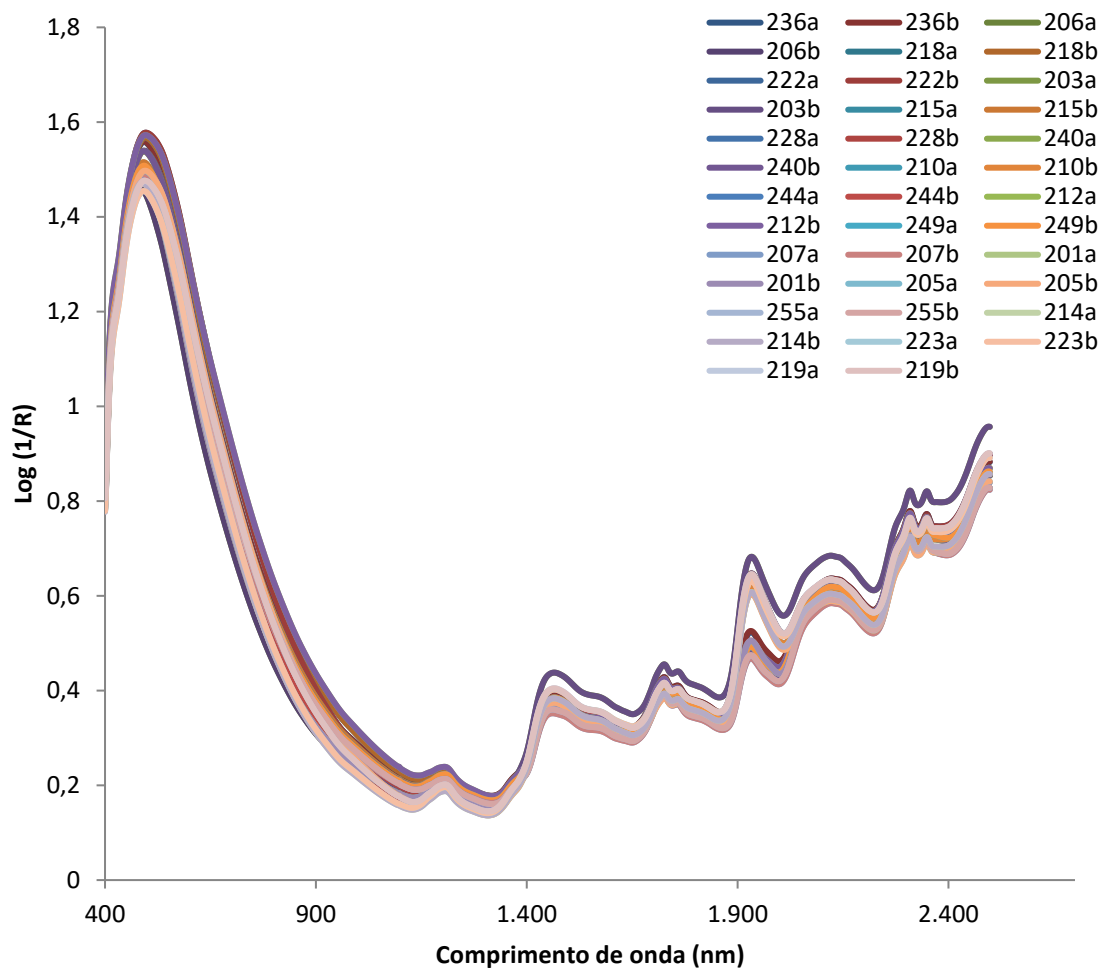
**Figura 3.** Espectros NIR referentes as 41 amostras de cafés crus premiados pela boa qualidade sensorial e de seu *blend* nos Concursos “Café Qualidade Paraná” de 2012.



A partir da Figura 3, pode-se observar que todas as amostras analisadas apresentaram o mesmo perfil espectral, diferindo apenas na intensidade de algumas bandas, relativas à refletância de algumas faixas específicas de comprimento de onda.

Realizou-se o mesmo procedimento de aquisição de dados e criação de um banco de dados espectral para as amostras de cafés torrados premiadas no Concurso “Café Qualidade Paraná” no ano de 2013, das quais se obteve acesso apenas às amostras torradas e moídas com suas respectivas classificações sensoriais. Os espectros de infravermelho próximo sem tratamento, referentes a estas amostras, estão apresentados na Figura 4.

**Figura 4.** Espectros NIR das amostras de café torradas premiadas no concurso Café qualidade Paraná 2013.

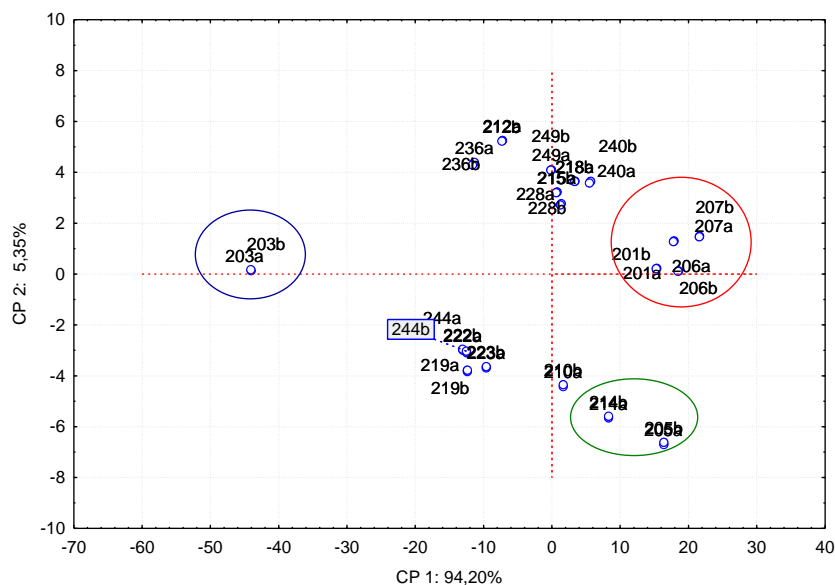


Com relação à Figura 4, observa-se que todas as amostras de cafés torrados premiados tiveram o mesmo perfil espectral apresentando apenas diferenças nas intensidades relativas de algumas bandas. Comparando-se os espectros NIR da Figura 4 com os da Figura 3, referentes às amostras de café crus premiadas, observam-se mudanças com relação ao surgimento e na intensidade de algumas bandas, principalmente na região entre 400 a 1100 nm, que podem ser atribuídas a diferença de cor entre as amostras. Após o comprimento de onda de 1100 nm, as diferenças entre os espectros das amostras crus e torradas foram de

intensidades relativas entre as bandas, porém não mostraram o surgimento marcante de novas bandas características. Isto pode ser atribuído a torra clara, utilizada para análise sensorial, propiciando assim menor formação de compostos de Maillard e reações de caramelização (MANZOCCO et al., 2000).

A Figura 5 mostra o resultado da análise de componentes principais (ACP) dos dados espectrais referentes às amostras de cafés torrados premiados no Concurso “Café Qualidade Paraná” 2013. Para esta análise utilizou-se como variáveis os valores de refletância com correção de espalhamento (MSC), na faixa compreendida entre 1990 a 2498 nm, pelo fato desta região apresentar os menores valores de correlação entre os resultados de reflectância, indicando um elevado potencial de diferenciação entre as amostras.

**Figura 5.** Projeção das amostras no plano bidimensional das componentes principais 1 e 2 (gráfico de *scores*) referente aos dados espectrais das amostras de cafés torrados premiados (2013) com relação às suas refletâncias difusas obtidas entre os comprimentos de onda de 1990 a 2498 nm.



Com relação às amostras de cafés torrados premiados pode-se observar na Figura 5, que juntos os componentes principais 1 e 2 explicam 99,55% da variância dos dados. A amostra 203 foi a que apresentou maior distância no plano bidimensional em relação às demais, seguida pelas amostras 214 e 205. Com relação à classificação dos cafés no Concurso, as amostras 203, 214 e 205 não atingiram nota mínima para classificação, sendo, portanto desclassificadas por apresentarem qualidade inferior em relação às demais, quanto à bebida. Por outro lado, ainda na Figura 5, pode-se destacar que as amostras 201, 206 e 207, foram classificadas em 1º, 2º e 3º lugares com as melhores bebidas, respectivamente, no Concurso “Café Qualidade Paraná” 2013. Essas se apresentaram relativamente próximas entre si no plano bidimensional, indicando que os espectros NIR das amostras permitem correlação com sua qualidade sensorial.

Para avaliar o potencial da espectroscopia NIR em auxiliar na confirmação dos resultados obtidos a partir da análise sensorial referente à qualidade dos cafés comerciais foram analisadas 14 amostras de cafés premiadas pela sua boa qualidade sensorial no Concurso “Café Qualidade Paraná” 2015, 1 amostra de café arábica puro, 1 de café conilon puro, 1 de café arábica contendo defeitos (predominantemente preto, verde, ardidos) denominada de escolha e 170 amostras de cafés comerciais. Utilizou-se como referência para boa qualidade as amostras de café arábica premiadas no Concurso “Café Qualidade Paraná” 2015, contudo, sem acesso à ordem de classificação.

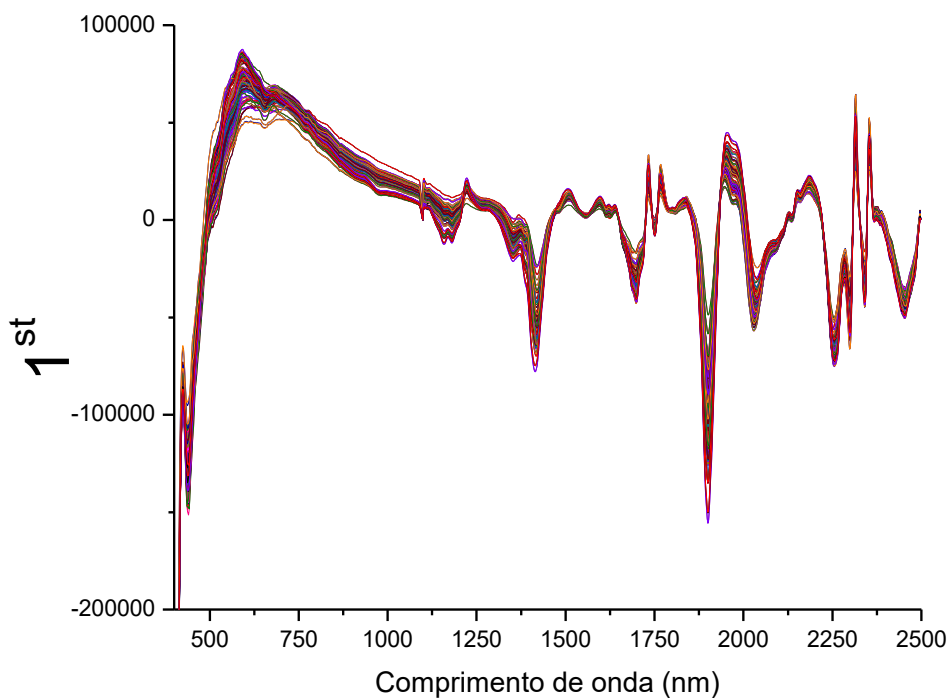
Com relação às amostras de cafés torrado e moídos classificadas e premiadas no “Concurso Café Qualidade Paraná” promovido pela SEAB no ano de 2015, foi possível realizar a coleta dos espectros NIR das amostras, com baixo ou nenhum tempo de armazenamento. Por isso, decidiu-se não incluir as amostras classificadas no concurso “Café Qualidade Paraná” 2013 nas análises de predição de qualidade sensorial, pelo fato de terem

sofrido prováveis processos de oxidação e perda de compostos voláteis, relativos ao seu maior tempo de armazenamento, enquanto que as amostras de café comerciais foram analisadas simultaneamente às análises sensoriais.

Para as análises, as amostras de café comercial foram classificadas de acordo com sua qualidade sensorial em três categorias: tradicional, superior, gourmet, conforme nomenclatura praticada pelas indústrias de café. Todas as amostras de café premiadas no concurso receberam classificação gourmet e as amostras de café contendo grande quantidade de defeitos foram denominadas como não recomendadas para o consumo, possuindo acima de 800 defeitos (preto, verde, ardido, brocado e preto-verde). A amostra de café conilon não foi classificada sensorialmente.

A coleta dos espectros NIR foi realizada com as mesmas amostras utilizada na prova de xícara. Sob os espectros realizou-se a primeira derivada e a correção de espalhamento por MSC (Figura 6).

**Figura 6.** Primeira derivada dos espectros NIR das amostras de café comerciais, café premiadas (Concurso “Café Qualidade Paraná” 2015), amostras de café contendo grandes quantidades de defeito e de conilon.



Pelos espectros NIR das amostras de café (Figura 7) realizou-se uma calibração multivariada visando à determinação de cafeína, trigonelina e umidade nas amostras. O modelo foi avaliado pela determinação dos mesmos parâmetros em 30 amostras diferentes obtendo-se erro inferior a 5% ( $p < 0,05$ ) para as variáveis cafeína e umidade e inferior a 10% ( $p < 0,1$ ) para a variável trigonelina, considerando os valores obtidos pelas técnicas primárias - cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e termobalança de lâmpada halógena. Os parâmetros estatísticos referentes aos modelos obtidos estão expressos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Modelos preditivos e respectivos coeficientes de determinação e SEP.

<b>Variável</b>	<b>Modelo</b>	<b>r<sup>2</sup> ajustado</b>	<b>SEP</b>
<b>Umidade</b>	*PLS	0,94	0,22
<b>Cafeína</b>	*PLS	0,83	0,13
<b>Trigonelina</b>	\**PCR	0,77	0,11

\*PLS: Regressão dos mínimos quadrados parciais; \*\*PCR: Regressão dos componentes principais.

Na modelagem por mínimos quadrados parciais (PLS), a matriz das variáveis independentes ( $x$ ) e o vetor das variáveis dependentes ( $y$ ) podem ser representados pelos seus *scores* e pesos conforme a Equação 1:

$$X = TP + E \quad (1)$$

As informações são incorporadas de modo que cada componente principal (*CP*) do modelo seja modificada, para que a covariância de  $T$  seja maximizada. Assim, *CP* recebe o nome de variável latente (*VL*). Quando a matriz  $X$  é decomposta,  $T$  contém os *scores*,  $P$  contém os pesos e  $E$  é a matriz de erros da decomposição de  $X$  (MARTENS; NAES, 1996).

Pode-se observar que os modelos apresentaram boa correlação com os dados experimentais e podem ser empregados em análises de triagem no controle de qualidade em amostras de café comercial. O erro relativo elevado na análise da trigonelina pode indicar que o modelo proposto não conta com uma quantidade de amostras suficientemente grande que permita a determinação dessa metilxantina com erro relativo inferior a 5%.

A partir da primeira derivada dos espectros NIR (Figura 6) realizou-se uma seleção de variáveis visando maximizar a variância entre as amostras analisadas (Tabela 2). A seleção foi realizada por análise de correlação entre os valores de reflectância difusa onde as variáveis selecionadas foram as que apresentaram os menores valores de correlação ( $C < 0,6$ ) entre as amostras analisadas.

**Tabela 2.** Variáveis selecionadas para análise sensorial com relação à sua maior variância entre os valores de refletância difusa entre os espectros NIR das amostras analisadas

Região espectral selecionada (nm)	NV	(nm)	Sobretom/Estiramento	
420 – 460	20	Azul	-	-
570 – 686	58	Laranja	-	-
1100 – 1250	75	1220	2° C-H	Celulose
		1380	O-H	Ar-OH
1376 – 1538	81	1415	1° O-H	Água
		1456	N-C	Proteínas
1680 – 1790	55	1790	1° C-H	Celulose
1880 – 1930	25	1855	1° O-H	Ácidos graxos
1950 – 1980	15	1920	2° O-H	Água
1990 – 2050	30	2000	2° O-H	Celulose
2100 – 2200	50	2180	1° C-C	Celulose
		2414	3° C-H	Celulose
2400 – 2498	49	2470	C-H	Voláteis

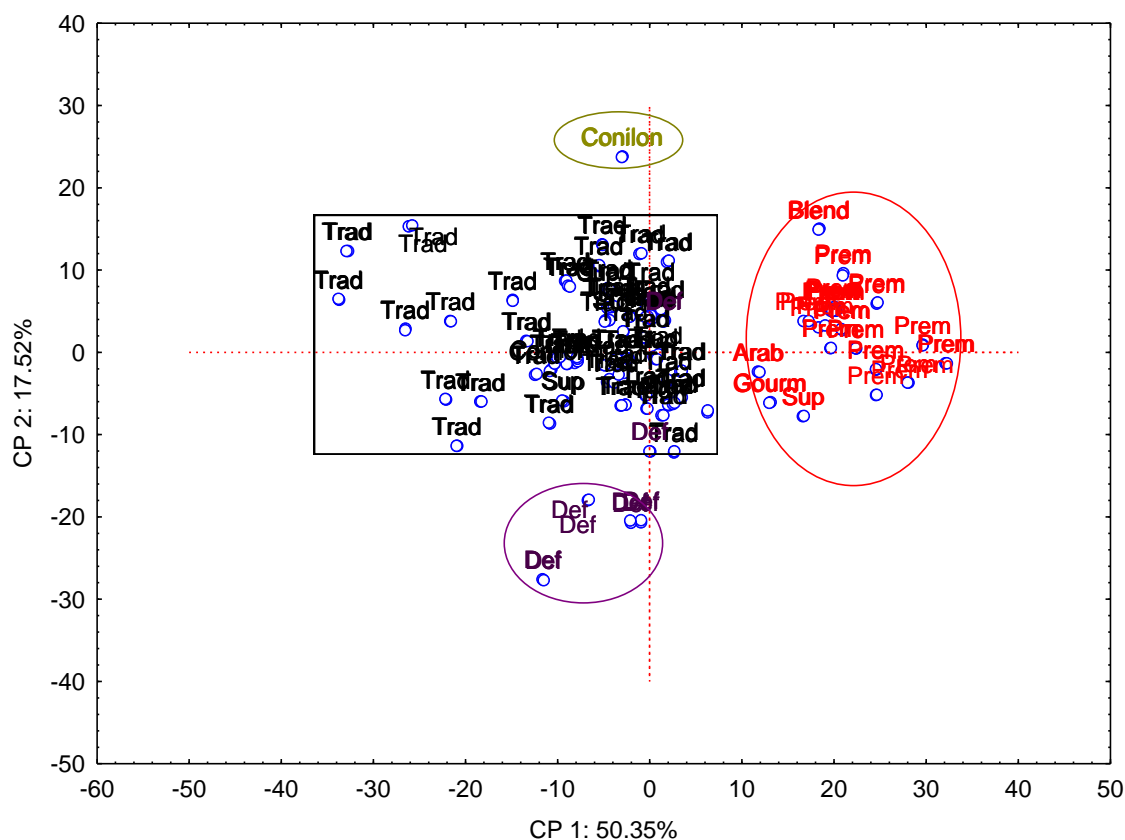
NV: número de variáveis;  $\lambda$ : comprimento de onda; Ar: aromático; Resolução do espectrômetro NIR: 2,0 nm

Fonte: Software ISIScan, Foss analytics, USA.

Observando a Tabela 2, pode-se verificar que todas as regiões espectrais selecionadas possuem coerência com compostos presentes naturalmente na matriz do café e que, portanto, estão intrinsecamente relacionados à qualidade final da bebida.

A partir da primeira derivada dos valores logarítmicos do inverso da refletância difusa ( $\log (1/R)$ ) obtidos a partir da aquisição dos espectros NIR das amostras de café nos comprimentos de onda selecionados (Tabela 2), realizou-se análise de componentes principais para melhor descrição da variância dos dados obtidos (Figura 7).

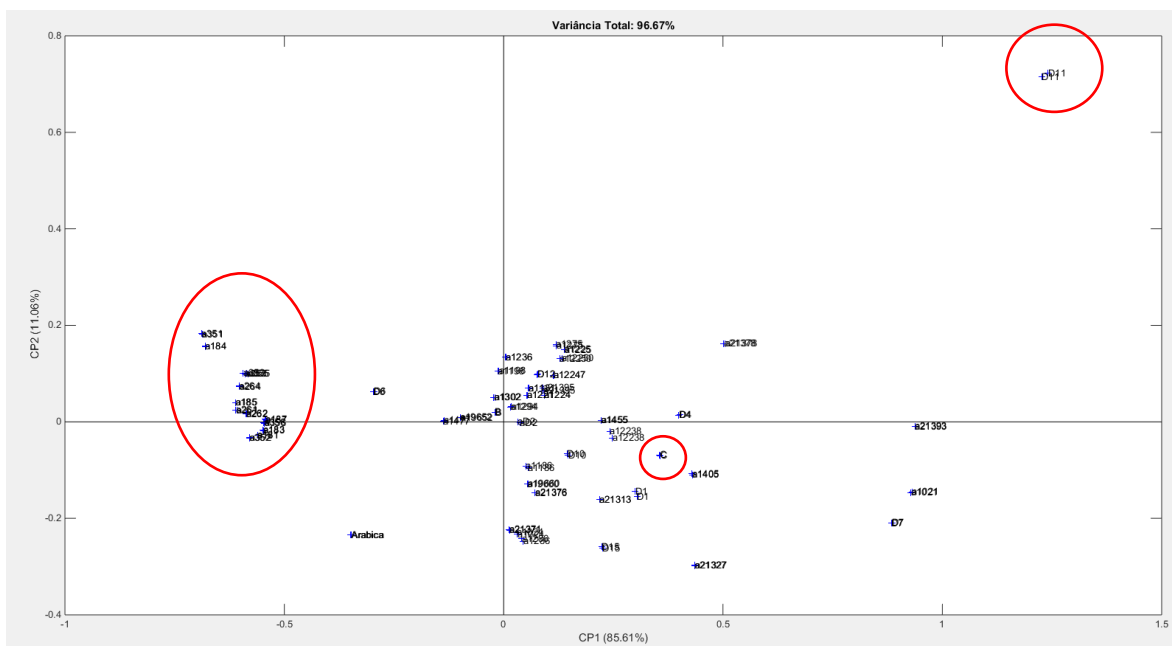
**Figura 7.** Projeção das variáveis 1 e 2 no plano bidimensional (gráfico de *scores*) das amostras de café utilizando as variáveis selecionadas a partir da primeira derivada dos espectros NIR.



Pela Figura 7, pode-se observar que o tratamento matemático aplicado sobre os espectros NIR das amostras de café foi eficiente para separar e agrupar as diferentes amostras de café, segundo sua classificação sensorial praticada pela indústria, mostrando que a técnica apresenta elevado potencial para auxiliar em análises de controle de qualidade de amostras de café torrado e moído em análise de rotina.

Visando encontrar maior correlação entre a qualidade das amostras analisadas, realizou-se então a análise de componentes principais em toda a extensão do espectro NIR (1100 – 2498 nm) utilizando correção de espalhamento (MSC) (Figura 8).

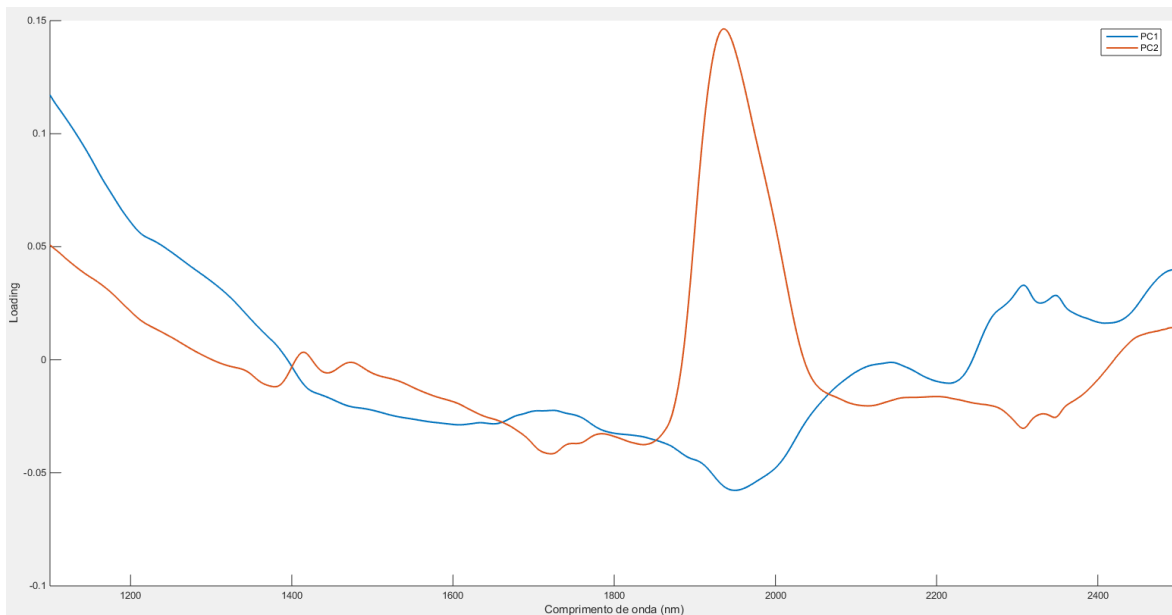
**Figura 8.** Análise de componentes principais (gráfico de *scores*) dos espectros NIR das amostras analisadas utilizando correção de espalhamento MSC



A partir da Figura 8, pode observar um grande afastamento da Amostra D11 nos quadrantes positivos PC1 e PC2, isto pode estar relacionado ao fato de a mesma amostra apresentar evidências da presença da impureza casca em concentrações superiores à 10% em

análise prévia de carboidratos totais. Destaca-se também a presença da amostra conilon (C) próxima á origem, de fato as amostras localizadas nesta região apresentaram os maiores valores de cafeína na análise cromatográfica, possuindo, provavelmente maior percentual de conilon em suas *blends*. A partir da análise do gráfico de *loadings* (Figura 9) pôde se obter maiores informações acerca da influência das variáveis na separação das amostras.

**Figura 9.** Análise de componentes principais (gráfico de *loadings*) dos espectros NIR das amostras analisadas utilizando correção de espalhamento MSC



A partir da Figura 9, pode-se observar que a região de 1150 nm (segundo *overtone* da vibração C-H em grupos CH<sub>3</sub>) apresenta, em módulo, os maiores valores de *loadings* para a *PC 1*. Esta região encontra-se altamente correlacionada com a concentração de cafeína (ESTEBAN-DÍEZ et al., 2004). Assim, os cafés com maiores valores de escores na *PC 1* devem apresentar maiores teores de cafeína e consequente, de café conilon. Pode-se observar que esta observação está de acordo com o gráfico de *scores* (Figura 8) em que a amostra de

conilon está localizada em região de *PC 1* positiva e a amostra de café arábica está localizada em região de *PC 1* negativa. Observa-se também na Figura 7 e 8 uma expressiva separação entre as amostras dos cafés premiados. Este fato pode ser explicado pela região espectral correspondente à banda de lipídios (1920 nm), a qual apresenta o maior valor em módulo para a *PC 2*. Desta forma, as amostra de café arábica, que possuem maiores concentrações de lipídios, devem estar posicionadas em direção aos valores positivos de *PC 2*, como o observado no gráfico de *scores* (Figura 8).

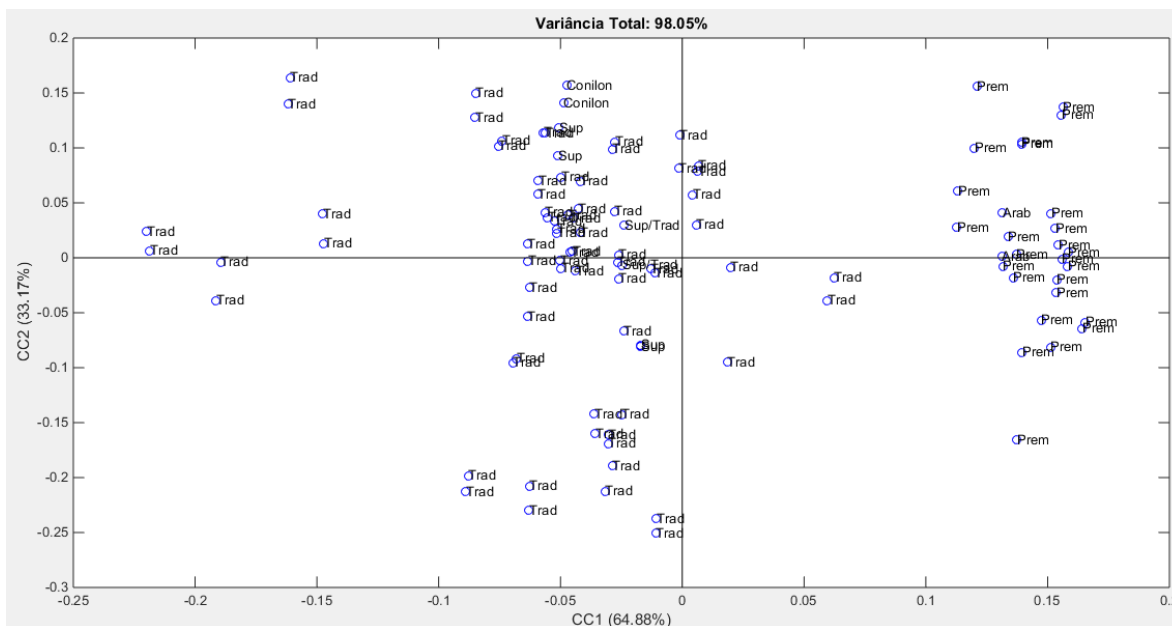
Aplicando-se sobre os dados espectrais a análise de componentes comuns (ComDim) pode-se observar que a região *VIS* e *NIR* dominam a *CC 1*, enquanto que a composição química (concentrações de cafeína, trigonelina e carboidratos, utilizadas anteriormente para calibração dos modelos NIR) domina a *CC 2* (Figura 10).

**Figura 10.** Tabela de saliências referente à análise de componentes comuns

	<b>CC1</b>	<b>CC2</b>	<b>CC3</b>	<b>CC4</b>	<b>CC5</b>
<b>NIR</b>	0.69915	0.012704	0.17442	0.096891	0.0016324
<b>VIS</b>	0.88827	0.0014467	0.08353	0.0097038	0.0018427
<b>CompQ</b>	0.11117	0.7434	0.00074185	0.0013844	0.076866

A partir do gráfico de *scores* de *CC 1* versus *CC 2* pode-se observar a separação entre as amostras premiadas e amostras classificadas como tradicionais pela análise sensorial (Figura 11).

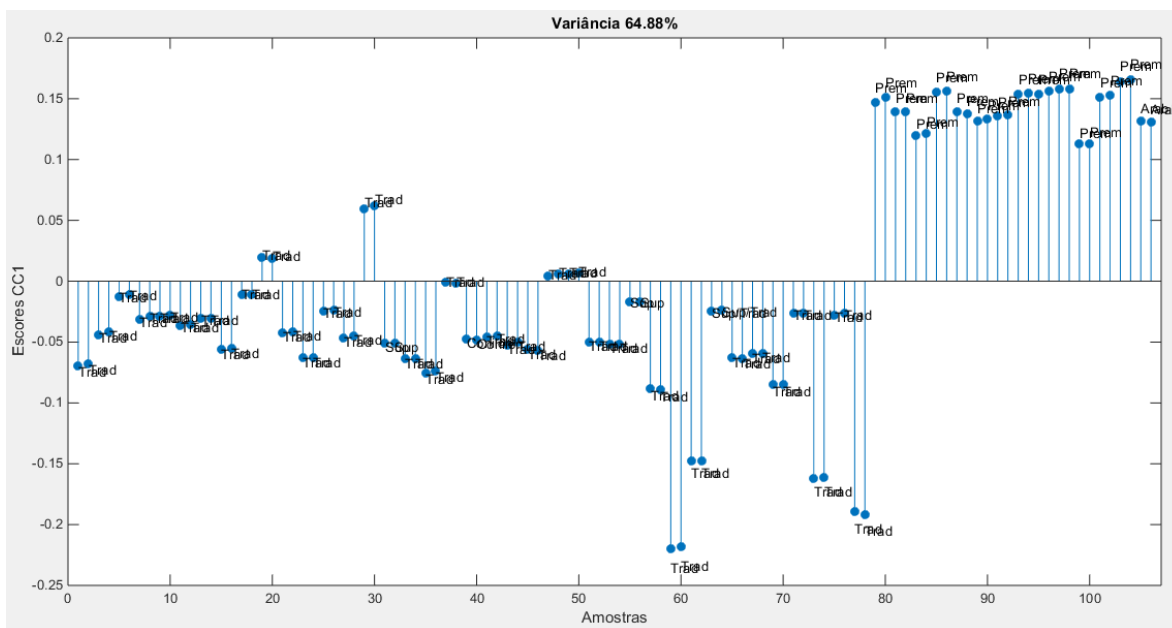
**Figura 11.** Gráfico de scores  $CC1$  versus  $CC2$  da análise de componentes comuns



Trad: cafés torrado e moídos tradicional; Prem: café premiados pela qualidade sensorial

A partir da Figura 10, pode se observar a formação de três grupos distintos, sendo que as amostras de cafés de cafés premiadas apresentaram os maiores valores para  $CC1$  sendo a maior responsável pela separação amostral observada. Novamente observando o gráfico de *scores* da componente comum 1 ( $CC1$ ) pode-se observar uma completa separação entre as amostras premiadas das tradicionais (Figura 12).

**Figura 12.** Gráfico de *scores* componente comum (CC1) correlacionada com a classificação sensorial



Observa-se que a espectroscopia NIR aliada à técnicas de análise multivariada como a análise de componentes principais (PCA) e análise de componentes comuns, apresentam grande potencial para o controle de qualidade de amostras de café torradas e moídas comerciais.

#### 4. CONCLUSÃO

Os espectros NIR das amostras, com o auxílio de técnicas de análise multivariada, mostraram correlação com suas respectivas classificações por análise sensorial.

Foi possível separar e agrupar as diferentes matrizes estudadas de adulterantes.

O estudo ainda permitiu gerar modelos matemáticos para a análise de triagem em amostras de cafés torrado e moído comerciais dos teores de trigonelina (DPR=10 %) e de cafeína e umidade com (DPR< 5%).

Portanto, considera-se que a abordagem empregando NIR e análise quimiométrica, pode ser utilizada para avaliação da qualidade do café torrado e moído em rotina.

#### REFERÊNCIAS

ABIC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em:

<<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 17 jan. 2019.

ASSAD, E.D.; CORREA, T.B.S.; CUNHA, S. A. R. Identificação de impurezas e misturas em pó de café por meio de comportamento espectral de imagens digitais. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.37, n.2, p.211-216, 2002.

BOUVERESSE, D. J.-R.; PINTO, R. C.; SCHMIDTKE, L. M.; LOCQUET, N.;

RUTLEDGE, D. N. Identification of significant factors by an extension of ANOVA-PCA based on multi-block analysis. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, v. 106, p. 173-182, 2011.

CONAB – Companhia Nacional de abastecimento. Disponível em:

<<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/2626-producao-do-cafe-em-2018-e-recorde-e-supera-61-milhoes-de-sacas>> Acesso em: 2 abr. 2019.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em:

<<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/17220176/cafes-do-brasil-batem-recorde-de-productividade-em-2016>>. Acesso em: 17 out. 2016.

ESTEBAN-DÍEZ, I., GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M., & PIZARRO, C. Prediction of sensory properties of espresso from roasted coffee samples by near-infrared spectroscopy.

*Analytica Chimica Acta*, 525(2), 171–182. 2004.

FERREIRA, M. M. C. *Quimiometria - conceitos, métodos e aplicações*. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2015.

JING, M., CAI, W., SHAO, X. Quantitative determination of the components in corn and tobacco samples by using near-infrared spectroscopy and multiblock partial least squares.

*Analytical Letters* 43 (12), 1910-1921, 2010.

MANZOCCO, L.; CALLIGARIS, S.; MASTROCOLA, D.; NICOLI, M. C.; LERICI, C. R.

Microstructure and nutritional. *Trends in Food Science and Technology*, Cambridge, v. 11, n. 9-10, p. 340-346, 2000.

MARTENS, H.; NAES, T. *Multivariate Calibration*. John Wiley & Sons, New York, 1996.

MELO, W. L. B. A importância da informação sobre do grau de torra do café e sua influência nas características organolépticas da bebida. Embrapa: Comunicado Técnico 58, São Carlos, 2004.

MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C. Aplicação da cromatografia por exclusão e da cromatografia gasosa de alta resolução na análise do café. *Química Nova*, São Paulo, v.20, n.1, p.5-8, 1997.

NABAIS, J.V.; CARROTT, P.; CARROTT, M. M. L. R.; LUZ, V.; ORTIIZ, A. L. Influence of Preparation Conditions in the Textural and Chemical Properties of Activated Carbons from a Novel Biomass Precursor: The Coffee Endocarp. *Bioresource Technology*, v.99, p.7224-7231, 2008.

OIC – ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ. Disponível em:

<<http://www.ico.org>>. Acesso em: 22 jan. 2015.

PEDRO, A.M.K.; FERREIRA, M.M.C. Nondestructive determination of solids and carotenoids in tomato products by near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Analytical Chemistry* 77, 2505–2511. 2005.

PIMENTA, C.J. *Qualidade de café*. Lavras: UFLA. 304p., 2003.

RAMOS W. O mercado interno e a qualidade do café (entrevista) EPAMIG - Informe Agropecuário, v.18, n.187, p.73-76, 1997.

REIS, C.; ANDRADE, J. C. Planejamento Experimental para Misturas Usando Cromatografia em Papel. *Química Nova*, São Paulo, v.19, n.3, 1996.

ROSA, L. N.; EMPREGO DE ANÁLISE MULTITABELAS NA AVALIAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTA, Universidade Tecnológica Federal do Paraná/UTFPR. Campo Mourão, 2017.

SANTOS, K. M.; MOURA, M. F. V.; AZEVEDO, F. G.; LIMA, K. M. G.; RAIMUNDO JR., I. M.; PASQUINI, C. Classification of Brazilian Coffee Using Near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Calibration. *Analytical Letters*, v.45, n.7, p.774-781. 2012.

SOUZA, A. M. de; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria parte I. *Química Nova*, v. 35, n. 1, p. 223–229, 2012.

LEROY, T.; RIBEYRE, F.; BERTRAND, B.; CHARMETANT, P., DUFOUR, M; MONTAGNON, C.; MARRACCINI, P.; POT, D. Genetics of coffee quality. *Brazil Journal of Plant Physiology*, v.18, n., p.229-242, 2006.

YAN-DE, L.; YI-BIN, Y. ; XIAPING, F. ; GUIBAN, L. Experiments on predicting sugar content in apples by FT-NIR technique. *Journal of Food Engineering* v.80, p.986–989, 2007.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do presente trabalho foi possível realizar o desenvolvimento e validação de um método cromatográfico rápido para determinação de cafeína trigonelina em amostras de café. Este método pode auxiliar na análise da composição das *blends* das espécies de café arábica e conilon, sendo adequado para o seu controle de qualidade.

O desenvolvimento e validação do método para análise de metabólitos de cafeína em plasma e em meio de cultura possibilita atrelar estudos de efeitos sinérgicos de latenciação da administração de outras drogas no organismo em conjunto com o café.

O método cromatográfico desenvolvido e validado para determinação de 21 compostos funcionais no organismo permitiu por meio de metabolômica a diferenciação entre o café e outras matrizes de adulterantes e impurezas. A importância desse método vai muito além deste trabalho, pois pode ser empregado em praticamente todas as matrizes alimentícias de extratos de plantas.

Foi possível caracterizar as matrizes de cafés torrado e moídos das espécies arábica e conilon; cafés comerciais e adulterantes por cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica com detecção por amperometria pulsada (HPAEC-PAD). Com relação à concentração de carboidratos totais, estes permitiram realizar a diferenciação parcial e o agrupamento das matrizes de café arábica premiados, café conilon, cafés arábica adulterados e amostras de possíveis adulterantes, com o auxílio de técnicas de análise multivariada, ressaltando o potencial da técnica, para o auxílio na detecção de fraudes no controle de qualidade de amostras de café torrado e moído comerciais.

Dentre as 170 amostras comerciais analisadas no Paraná, duas delas continham indícios da presença de impurezas, referentes à presença de cascas e paus.

Os espectros NIR das amostras, com o auxílio de técnicas de análise multivariada, mostraram correlação com suas respectivas classificações por análise sensorial.

Foi possível separar e agrupar as diferentes matrizes estudadas de adulterantes.

O estudo ainda permitiu gerar modelos matemáticos para a análise de triagem em amostras de cafés torrado e moído comerciais dos teores de trigonelina (DPR=10 %) e de cafeína e umidade com (DPR< 5%).

Portanto, considera-se que a abordagem empregando NIR e análise quimiométrica, pode ser utilizada para avaliação da qualidade do café torrado e moído em rotina.

A concepção deste trabalho tinha por objetivo a construção de uma normativa para estabelecer padrões de qualidade de amostras de cafés torrado e moído comerciais. Diante de todos os resultados advindos da aplicação de diferentes técnicas, propõe-se uma sugestão compostas de várias etapas (anexo 1), assim como já ocorre no caso do azeite de oliva, para o controle de qualidade em amostras de cafés comerciais.

## ANEXOS

ANEXO I - Árvore decisória proposta para a análise da qualidade em amostras de café

torrado e moído.

