



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCELA BREVES DE ABREU

**DIFERENCIAÇÃO DE CAFÉS ESPECIAIS E TRADICIONAIS
POR MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS**

Londrina
2018

MARCELA BREVES DE ABREU

**DIFERENCIAÇÃO DE CAFÉS ESPECIAIS E TRADICIONAIS
POR MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik

Londrina
2018

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

Abreu, Marcela Breves.

Diferenciação de cafés especiais e tradicionais por métodos quimiométricos / Marcela Breves Abreu. - Londrina, 2018.

78 f. : il.

Orientador: Maria Luiza Zeraik.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Quimiometria - Tese. 2. Café - Pesquisa - Tese. 3. Análise cromatográfica - Tese. 4. Química analítica - Tese. I. Zeraik, Maria Luiza. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

MARCELA BREVES DE ABREU

**DIFERENCIAÇÃO DE CAFÉS ESPECIAIS E TRADICIONAIS POR
MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Marta de Toledo Benassi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 22 de fevereiro de 2019.

À minha família e aos amigos que ofereceram todo apoio e estímulo para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos membros da banca por terem aceitado o convite e pelas contribuições que serão de suma importância para este trabalho.

À professora Dra. Maria Luiza Zeraik pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, permitir a realização desse trabalho e pela orientação durante o Mestrado.

Ao Instituto Federal do Paraná, pela concessão do afastamento parcial, que foi fundamental para a participação no Programa de Pós-Graduação.

À professora Dra. Ieda Scarminio por ceder materiais, reagentes e equipamentos para o desenvolvimento da pesquisa e também ao seu orientando Me. Gustavo por todos os ensinamentos que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ao professor Dimas Zaia pela cessão do espectrofotômetro de infravermelho e também ao seu orientando Murilo, por toda ajuda na realização das análises.

À professora Suzana Nixdorf por permitir a utilização do cromatógrafo e ao seu orientando Me. Tiago que juntamente com a Giselle foram de grande importância para execução dessas análises.

À Ivanira pela ajuda técnica no laboratório, pelas conversas, pela convivência e amizade.

Aos amigos do laboratório 339 e do Mestrado, mas principalmente aos mais presentes: Letícia, George, Ingrid, Max, Jackson, Fabiano, Sannah, Anna, Elis, Tamires e Suelen, pelos momentos compartilhados no laboratório, estudos em grupo e alegrias vivenciadas dentro e fora da UEL ao longo desses anos.

Aos amigos do IFPR que foram minha base e companhia em Jacarezinho, essenciais durante essa jornada.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina e aos docentes que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação acadêmica e também àquelas pessoas que por ventura não tenham sido mencionadas, mas que também não deixaram de ser importantes nessa trajetória.

**“We must believe that we are gifted
for something, and that this thing, at
whatever cost, must be attained.”**

Marie Curie

ABREU, Marcela Breves. **Diferenciação de cafés especiais e tradicionais por métodos quimiométricos**. 2018. 78 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2019.

RESUMO

O café é um dos produtos mais tradicionais da agricultura brasileira, o país é considerado o maior produtor e exportador de grãos especiais do mundo. O café especial é descrito principalmente por um sabor excelente e único, embora seu consumo ainda seja reduzido no Brasil, devido seu alto custo. Os cafés são classificados como especiais por meio de uma avaliação sensorial conhecida como "SCAA cupping method", que expressa a qualidade da bebida do café em uma escala numérica, sendo necessário alcançar pelo menos 80 pontos para ser considerado um café especial. O objetivo deste estudo foi diferenciar os cafés comerciais, torrados e moídos, tradicionais e especiais a partir da análise de seus constituintes químicos, usando diferentes técnicas analíticas, cromatográficas (CLAE-UV/DAD) e espectroscópicas (UV-Vis, IV), comparando a viabilidade destes métodos combinados à ferramentas quimiométricas para promover tal diferenciação das amostras. Para a escolha do método e solvente de extração das amostras realizou-se um planejamento estatístico associado, combinando-se planejamento fatorial 2^2 , variando método (agitadora orbital e ultrassom) e tempo (30 e 120 minutos) e um planejamento de misturas (simplex centroide), trabalhando-se com água, etanol, diclorometano e suas misturas binárias e ternárias. A partir dos resultados da otimização do processo de extração escolheu-se trabalhar com dois solventes puros: água e diclorometano; e como método de extração a agitadora orbital por 30 minutos. Os resultados das análises de fatores mostraram que a técnica de espectrofotometria de absorção no UV-Vis, aplicada às amostras extraídas com água, seria uma ferramenta adequada para a discriminação das amostras de cafés especiais e tradicionais, podendo ser usada para o controle de qualidade desse tipo de amostra. Em suma, este estudo apresentou pela primeira vez a diferenciação de cafés tradicionais e especiais comerciais, usando diferentes técnicas analíticas, através de seus perfis metabolômicos e de suas impressões digitais, juntamente com ferramentas quimiométricas. Este trabalho mostrou-se ainda eficiente na discriminação dos cafés tradicionais e especiais por meio de uma técnica simples e de baixo custo, corroborando também com a química verde pelo uso de água na extração.

Palavras-chave: UV-Vis. Infravermelho. Cromatografia. Planejamento fatorial. Planejamento de misturas. Análise de fatores.

ABREU, Marcela Breves. **Differentiation of special and traditional coffees by chemometric methods**. 2018. 78 p. Dissertation (Master's degree in chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2019..

ABSTRACT

Coffee is one of the most traditional products of Brazilian agriculture, the country is considered the largest producer and exporter of special beans the world. The special coffee is described mainly by an excellent and unique flavor, although its consumption is still reduced in Brazil, due to its high cost. Coffees are classified as special by a sensory evaluation known as "SCAA cupping method", which expresses the quality of the coffee brew on a numerical scale, being necessary to reach at least 80 points to be considered a special coffee. The main objective of this study was to differentiate the commercial, roasted and ground coffee, traditional and special, from the analysis of its chemical constituents, using different analytical, chromatographic (HPLC-UV/DAD) and spectroscopic techniques (UV-Vis, IR), comparing the feasibility of these combined methods to the chemometric tools to promote the differentiation of the samples. For the choice of method and sample extraction solvent, an associated statistical planning was performed, combining factorial design 2^2 , varying method (orbital and ultrasound) and time (30 and 120 minutes) and a mixture design (simplex centroid), working with water, ethanol, dichloromethane and their binary and ternary mixtures. From the results of the optimization of the extraction process it was chosen to work with two pure solvents: water and dichloromethane; and as an extraction method the orbital shaker for 30 minutes. The results of the factor analysis showed that the UV-Vis absorption spectroscopy technique, applied to samples extracted with water, would be an adequate tool for discriminating samples of special and traditional coffees, and could be used for the quality control of these type of samples. In short, this study presented for the first time the differentiation of traditional and commercial coffee, using different analytical techniques, through its metabolomic profiles and fingerprints, with chemometric tools. This work has shown to be efficient in discriminating traditional and special coffees by a simple and low cost technique, also corroborating with the green chemistry by the use of water in the extraction.

Key words: UV-Vis. Infrared. Chromatography. Factorial design. Mixture design. Factor analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Principais alcaloides encontrados nos grãos de café	19
Figura 2	– Principais ácidos clorogênicos encontrados nos grãos de café	20
Figura 3	- Classificação do café especial a partir da metodologia SCAA.....	21
Figura 4	– Método de preparo das amostras para obtenção dos extratos de café.	29
Figura 5	– Representação do planejamento fatorial 2^2 para otimização da extração.	30
Figura 6	– Representação do planejamento de misturas simplex centroide.	30
Figura 7	– Média dos rendimentos das extrações para cada ponto do planejamento estatístico.	34
Figura 8	– Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 2^2 aplicado aos rendimentos de extração	35
Figura 9	– Superfície de resposta para as respostas do planejamento fatorial 2^2 aplicado aos rendimentos de extração.	36
Figura 10	– Triângulo de seletividade de Snyder, baseado nos parâmetros solvatocrômicos dos solventes.	37
Figura 11	– Impressões digitais dos extratos obtidas por espectrofotometria UV-Vis.....	38
Figura 12	– Intensidade de absorção obtida em 275 nm a partir dos extratos para cada ponto do planejamento estatístico.	39
Figura 13	– Curvas de nível para os diferentes métodos e tempos empregados para o planejamento de misturas aplicado às respostas de intensidade de absorção obtidas em 275 nm por espectrofotometria UV-Vis.	42
Figura 14	– Gráficos de Pareto para os diferentes métodos e tempos empregados para o planejamento de misturas aplicado às respostas de intensidade de absorção obtidas em 275 nm por espectrofotometria UV-Vis.	43
Figura 15	– Valores previstos vs. observados para os diferentes métodos e tempos empregados para o planejamento de misturas aplicado às respostas de intensidade de absorção obtidas em 275 nm por espectrofotometria UV-Vis.	44

Figura 16 - Impressões digitais dos extratos obtidas por espectroscopia de IV.	46
Figura 17 – Projeção dos <i>scores</i> do Fator 1 vs. Fator 2 obtidos das análises dos extratos para as impressões digitais obtidas por espectroscopia de IV (A).....	47
Figura 18 – Impressões digitais das amostras extraídas com diclorometano (a) e água (b) para os diferentes métodos e tempos empregados no planejamento experimental.	48
Figura 19 – <i>Loadings</i> do Fator 2 obtido da análise dos dados por espectroscopia de IV.	49
Figura 20 – Cromatogramas dos extratos aquosos das amostras de cafés especiais (a) e tradicionais (b).	50
Figura 21 – Espectros Ultravioleta-Visível dos picos obtidos nos cromatogramas dos extratos aquosos de café.	51
Figura 22 – Projeção dos <i>scores</i> do Fator 1 vs. Fator 3 dos cromatogramas obtidos das análises dos extratos aquosos.	52
Figura 23 – Projeção dos <i>Loadings</i> do Fator 1 vs. <i>Loadings</i> do Fator 3 obtidos da análise dos dados por CLAE.	52
Figura 24 – Abundâncias relativas dos metabólitos identificados nas análises cromatográficas dos extratos aquosos.	53
Figura 25 – Cromatogramas dos extratos diclorometânicos das amostras de cafés especiais (a) e tradicionais (b).....	55
Figura 26 – Espectro ultravioleta do pico obtido no cromatograma dos extrato diclorometânico.....	56
Figura 27 – Abundância relativa do metabólito cafeína extraída por diclorometano.	56
Figura 28 – Impressões digitais dos extratos aquosos obtidas por espectroscopia de IV.	57
Figura 29 – Projeção dos <i>scores</i> do Fator 1 vs. Fator 2 dos espectros obtidos das análises dos extratos aquosos obtidos por espectroscopia de IV.	58
Figura 30 – <i>Loadings</i> do Fator 2 obtido da análise dos extratos aquosos por espectroscopia de IV.	58

Figura 31	- Média das impressões digitais das duplicatas 5 e 6, 33 e 34 dos extratos aquosos obtidas por espectroscopia de IV.....	60
Figura 32	- Impressões digitais dos extratos diclometânicos obtidas por espectroscopia de IV.	61
Figura 33	- Projeção dos <i>scores</i> do Fator 1 vs. Fator 2 dos espectros obtidos das análises dos extratos diclorometânicos obtidos por espectroscopia de IV.	62
Figura 34	- <i>Loadings</i> dos Fatores 1 e 5 obtido da análise dos extratos diclorometânicos por espectroscopia de IV.	62
Figura 35	- Média das impressões digitais das duplicatas 23 e 24, 47 e 48 dos extratos diclorometânicos obtidas por espectroscopia de IV.....	64
Figura 36	- Impressões digitais dos extratos aquosos na região de absorção do UV-Vis.	65
Figura 37	- Projeção dos <i>scores</i> do Fator 1 vs. Fator 2 dos espectros obtidos das análises dos extratos aquosos na região de absorção do UV-Vis.	65
Figura 38	- <i>Loadings</i> do Fator 2 obtido da análise dos extratos aquosos por espectrofotometria UV-Vis.	66
Figura 39	- Média das impressões digitais das duplicatas 3 e 4, 7 e 8, 33 e 34, 35 e 36 dos extratos aquosos obtidos por UV-Vis.	67
Figura 40	- Impressões digitais dos extratos diclorometânicos na região de absorção do UV-Vis.	68
Figura 41	- Projeção dos <i>scores</i> do Fator 1 vs. Fator 2 dos espectros obtidos das análises dos extratos diclometânicos na região de absorção do UV-Vis.	68
Figura 42	- <i>Loadings</i> do Fator 2 obtido da análise dos extratos diclorometânicos por espectrofotometria UV-Vis.	69
Figura 43	- Média das impressões digitais das duplicatas 15 e 16, 49 e 50 dos extratos diclorometânicos obtidos por UV-Vis.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Especificações das amostras de cafés especiais estudadas.....	28
Tabela 2	- Planejamento de misturas simplex centroide para três componentes: água (a), etanol (e) e diclorometano (d).	30
Tabela 3	– ANOVA do planejamento fatorial 2^2 aplicado aos rendimentos de extração	35
Tabela 4	– ANOVA para o planejamento de misturas aplicado para as respostas de intensidade de absorção obtidas em 275 nm por espectrofotometria UV-Vis.	40
Tabela 5	– Modelos matemáticos para os diferentes métodos e tempos empregados para o planejamento de misturas aplicado às respostas de intensidade de absorção obtidas em 275 nm por espectrofotometria UV-Vis.	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	O CAFÉ	16
1.1.1	Composição Química do Café Cru e Torrado.....	17
1.1.2	Café Especial.....	20
1.2	QUIMIOMETRIA	22
1.2.1	Planejamento Experimental	24
1.2.2	Análise Multivariada.....	25
2	OBJETIVOS	27
2.1	OBJETIVO GERAL	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3	PARTE EXPERIMENTAL	28
3.1	AMOSTRAS DE CAFÉ.....	28
3.2	PREPARO DOS EXTRATOS DE CAFÉ	28
3.3	OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR PLANEJAMENTO FATORIAL E PLANEJAMENTO DE MISTURAS.....	29
3.4	ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS	31
3.4.1	Ultravioleta-visível (UV-Vis)	31
3.4.2	Infravermelho (IV)	31
3.5	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	32
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO A PARTIR DOS DADOS ESPECTRAIS.....	34
4.1.1	Planejamento Fatorial – Usando como Resposta os Rendimentos das Extrações	34
4.1.2	Planejamento de Misturas – Usando como Resposta os Espectros de Absorção no UV-Vis.....	37

4.2	DISCRIMINAÇÃO DE CAFÉS ESPECIAIS E TRADICIONAIS A PARTIR DA ANÁLISE DE FATORES DE DADOS ESPECTROSCÓPICOS E CROMATOGRÁFICOS	46
4.2.1	Análise de Fatores Aplicada aos Extratos do Planejamento Estatístico Associado – Usando como Respostas os Espectros de Espectroscopia de IV	46
4.2.2	Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	49
4.2.2.1	Perfil metabolômico – extrato aquoso.....	49
4.2.2.2	Perfil metabolômico – extrato diclorometânico.....	54
4.2.3	Análises por Espectroscopia de Infravermelho	57
4.2.3.1	Impressões digitais – extrato aquoso.....	57
4.2.3.2	Impressões digitais – extrato diclorometânico	61
4.2.4	Análises por Espectrofotometria de Ultravioleta-visível	64
4.2.4.1	Impressões digitais - extrato aquoso	64
4.2.4.2	Impressões digitais - extrato diclorometânico	67
5	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

O café (*Coffea sp*) é um dos produtos mais tradicionais da agricultura no Brasil, com o desenvolvimento das primeiras lavouras cafeeiras no país datado há mais de 200 anos. Com o passar do tempo e o desenvolvimento de tecnologias, diversas mudanças alcançaram esse setor e pesquisas têm sido acentuadas a fim de melhorar a qualidade do café e possibilitar atender às demandas do mercado por produtos diferenciados (CARVALHO, 2002). Desde os anos 90, a qualidade do café vem sendo intimamente relacionada aos termos "cafés especiais" ou "café gourmet", sendo que esses cafés são descritos principalmente por um sabor excelente e único e a maioria deles pertencem à espécie arábica (PICCINO et al., 2014).

Os brasileiros têm a sua disposição diversas marcas de cafés especiais disponíveis em todo país e apesar do consumo ser reduzido, comparando-se aos cafés tradicionais, a estimativa de crescimento para o segmento é de 15 a 20% ao ano, desde 2010 (ABIC 2017a). Além disso, atualmente, o Brasil é considerado o país produtor que mais fornece grãos especiais e de alta qualidade para todo o mundo. Os principais compradores são Japão, Estados Unidos e União Europeia (NETO, 2017).

A Associação Americana de Cafés Especiais (SCAA - Specialty Coffee Association of América) surgiu em paralelo ao desenvolvimento dos cafés especiais, e foi fundada em 1982 por um grupo de industriais norte-americanos com o intuito de “estimular a produção e consumo de cafés especiais” no país. No Brasil, instituiu-se a BSCA ou ABCE – Associação Brasileira de Cafés Especiais no Brasil, em razão da difusão dos conceitos da SCAA e para reunir os produtores com foco no cultivo de grãos de alta qualidade (NETO, 2017).

Além de associar todos os segmentos da cadeia dos cafés especiais, a SCAA contribuiu para esse mercado criando uma metodologia de avaliação sensorial, conhecida como “SCAA cupping method” (Metodologia SCAA de avaliação de café). Esta metodologia de avaliação expressa à qualidade da bebida do café por meio de uma escala numérica, de forma que denomina-se café especial todo aquele que atingir no mínimo 80 pontos SCAA. Os atributos pontuados pela metodologia SCAA de avaliação sensorial compreendem: fragrância/aroma, uniformidade, ausência de defeitos, doçura, sabor, acidez, corpo, finalização,

equilíbrio e conceito global (SAATH, 2010; NETO, 2017).

Além dos atributos sensoriais, somados a eles, as características físico-químicas do café são imprescindíveis para definir os fatores que influenciam na qualidade final do produto. Os diversos constituintes químicos são determinantes para obtenção de um café de excelência, pois são eles que especificam a aparência do grão torrado e o sabor e aroma característico desta bebida (PIMENTA, 2003; LIMA FILHO et al., 2013). Nos grãos de café estão em predominância os açúcares, os compostos nitrogenados e os ácidos clorogênicos. Os açúcares, apesar de serem encontrados em pequenas quantidades no café cru, tendem a aumentar com o processo de torração do café. Além disso, durante esse processo, a reação desses açúcares com aminoácidos é responsável pela formação dos compostos que caracterizam o sabor e aroma da bebida (FLAMENT, 2002; RODARTE, 2008).

Devido ao fato de a análise sensorial do café depender do homem como instrumento de medida, são necessárias pesquisas com o objetivo de relacionar as características sensoriais da bebida com os componentes químicos, a fim de complementar análise sensorial e comprovar a qualidade do café especial. Independente de sua natureza, formas de cultivo, industrialização e preparo, a qualidade final da bebida depende diretamente da sua composição química e todos os atributos pontuados pela metodologia SCAA de avaliação sensorial (fragrância/aroma, uniformidade, defeitos, doçura, sabor, acidez, corpo, finalização, equilíbrio) são consequências da presença, da combinação ou transformação dos componentes químicos e suas proporções no grão torrado.

Como há uma infinidade de componentes químicos presentes nos grãos de café cru que dão origem a milhares de outros compostos após a torração do café e preparação da bebida e com a crescente demanda global por cafés especiais, pretende-se utilizar técnicas analíticas e ferramentas quimiométricas, por meio da análise multivariada, para extrair esses elementos químicos do café torrado e moído e posteriormente analisá-los verificando se há diferença entre a composição química dos cafés classificados como especiais, frente aos tradicionais, e, ainda, aplicar um método quimiométrico para realizar essa diferenciação e a avaliação da qualidade do café.

1.1 O CAFÉ

O café (*Coffea sp*) é um produto de grande importância econômica no Brasil, através do levantamento realizado pela Organização Internacional do Café, em janeiro de 2017, em relação ao consumo mundial de café entre 2015 e 2016, o Brasil aparece como maior exportador, dentre todos os países, totalizando 20500 sacas exportadas e seguido pela Indonésia com 4500 sacas. Dados desse mesmo período mostram que no mesmo ano, 2016, foi produzido um total de 55000 sacas dessa commodity, mostrando que além de maior exportador o Brasil também é o maior produtor mundial de café (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, 2017).

Em relação aos cafés especiais as exportações geraram US\$ 1,57 bilhão em 2016, com alta de 152,4% quando comparado aos US\$ 622 milhões registrados no ano anterior. Essas exportações ocorrem para 78 países diferentes e o principal comprador desses grãos especiais são os Estados Unidos, que investiram cerca de US\$ 388,2 milhões na aquisição do produto. Além disso o mercado de cafés especiais cresce cerca de 15% ao ano no Brasil, tendo o título de maior produtor e exportador desses grãos no mundo, atrás da Colômbia que ainda detém a maior produção, mas não supera a exportação brasileira desses grãos (BSCA, 2017).

A bebida do café é preparada de diversas formas, sendo que todas elas envolvem grãos de café torrados e moídos que entram em contato com água quente, seguida ou não por filtração. Independente do método de preparo, a bebida e o café torrado compartilham de diversos compostos, com algumas alterações de aroma devido a mudanças nas concentrações das substâncias químicas durante a infusão (Belitz et al., 2009). Além das alterações que ocorrem no preparo da bebida, mais importante são as diferenças no modo de cultivo e as bebidas distintas que se obtém quando se varia as espécies de cafés existentes no mercado.

A composição química do café verde e após o processo de torra também são de suma importância para a obtenção de uma bebida com alta qualidade e a diferença desses compostos é que diferem um café tradicional de um especial, sendo que o especial além de ser constituído de 100% da espécie *Coffea arabica* deve ser ausente de defeitos (como grãos pretos, verdes e ardidos) para permitir a obtenção de uma bebida com alta pontuação de classificação sensorial.

1.1.1 Composição Química do Café Cru e Torrado

O grão de café verde é a matéria-prima do café e contém uma mistura complexa de centenas de compostos orgânicos diferentes que serão transformadas no processo de torrefação para determinar o sabor e aroma da bebida. O processo de torrefação rompe a estrutura celular dos grãos de café verde, que ao entrar em contato com o calor, libera água e substâncias voláteis, o aquecimento dos grãos ainda promovem a pirólise – decomposição térmica e mudança química - e a caramelização do açúcar, tornando os grãos castanhos (DEFERNEZ et al., 2017; BHUMIRATANA, ADHIKARI e CHAMBERS IV, 2011).

Os polissacarídeos, solúveis e insolúveis, são constituintes importantes dos grãos de café verde e torrado, atuam no desenvolvimento da cor e do aroma no processo de caramelização, contribuem para a percepção da viscosidade da bebida, representam cerca de 50% p/p dos grãos verdes (BRADBURY, 2001; FLAMENT et al., 1968; KÖLLING-SPEER e SPEER, 2005; ESQUIVEL e JIMÉNEZ, 2012; BUFFO E CARDELLI-FREIRE, 2004). Em relação às duas principais espécies de cafés, os polissacarídeos são 44% da matéria seca no *C. arabica*, sendo 9% de sacarose, e 47% da matéria seca no *C. canephora* que é constituído de aproximadamente 4,5% de sacarose, composto esse que contribuirá positivamente para o aroma e a doçura na bebida do café (FARAH 2012).

Na bebida do café a doçura é correlacionada com a acidez e, portanto, o café da espécie *C. arabica* apresenta menores valores de pH, entre 4,85 a 5,15, quando comparado ao *C. canephora* que possui pH entre 5,25 e 5,40 (VITZTHUM, 1976). No grão de café verde o conteúdo de ácidos é cerca de 11% enquanto no grão torrado há uma redução para 6%, esse percentual compreende os ácidos não voláteis como o ácido cítrico, málico, quínico e clorogênicos, que permanecem após torração apesar de parte ser degradada, os ácidos voláteis como o acético, propanóico, butanóico, isovalérico, hexanóico e decanóico, e ainda, àqueles ácidos que se formam ou aumentam sua concentração de acordo com o grau de torração como os ácidos fórmico, acético, glicólico e láctico (GINZ et al., 2000, SUNARHARUM, WILLIAMS e SMYTH, 2014; ESQUIVEL e JIMÉNEZ, 2012).

Os lipídios do café, ou óleo de café, é o constituinte majoritário dos grãos de café verde, tanto da espécie *C. arabica* quanto da *C. canephora*, os quais destacam-se os triglicerídeos, os diterpenos da família caurina, esteróis totais livres

e esterificados e uma pequena quantidade de outros tipos lipídicos, como os tocoferóis (KAUFMANN e GUPTA, 1964; KAUFMANN e HAMSAGAR, 1962; SPEER e KÖLLING-SPEER, 2006). Após o processo de torrefação os esteróis e a maioria dos triglicerídeos aumentam proporcionalmente e a fração lipídica total varia consideravelmente entre as espécies *C. arabica* e *C. canephora*, sendo o teor nos grãos do arábica correspondente a 14g/100g de matéria seca, enquanto nos grãos robusta tem-se aproximadamente 7g/100g de matéria seca. (MAIER, 2005; STEPHANUCCI, 1979)

Embora a composição total de aminoácidos nas espécies de cafés seja semelhante, o teor de proteína do café robusta é levemente maior ao do café arábica, os compostos nitrogenados totais, excluindo a cafeína e trigonelina, equivalem entre 9 a 16% da composição química do café verde (WASSERMAN, 1992; FARAH, 2012). Esses compostos nitrogenados tem considerável importância para o desenvolvimento do sabor, aroma e da cor característica do café, pois participam das reações de Maillard, quando o grupo amina presente em suas moléculas ligam-se ao grupo carboxila de açúcares redutores, hidróxi-ácidos e fenóis, dando origem as melanoidinas (LIU e KITTS, 2011; BUFFO e CARDELLI-FREIRE, 2004).

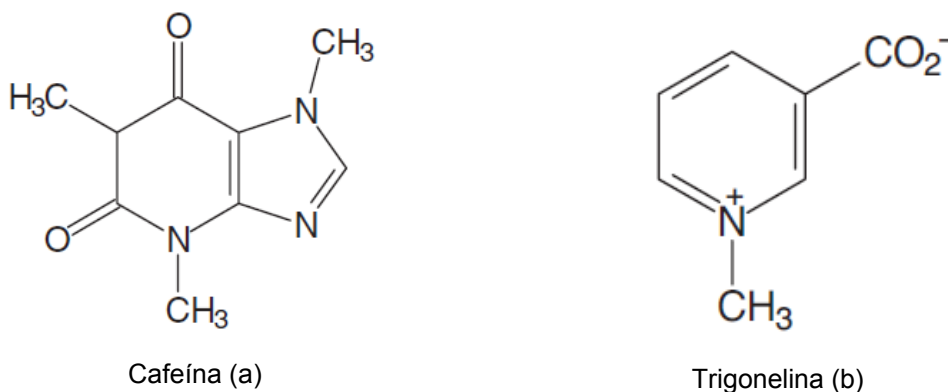
Os minerais, apesar de constituintes minoritários (3 a 5%) do café, atuam como catalisadores de reações que dão origem a componentes aromáticos no grão de café durante seu processamento (Janzen, 2010). Dentre os vários elementos – fósforo, manganês, ferro, cobre, sódio, magnésio, cálcio e enxofre – o potássio é o mineral de maior importância por constituir cerca de 1 a 2 g/100g do café verde e 40% do conteúdo mineral do café moído (CLARKE, 2003; ANTONIO et al., 2011).

Dentre os compostos nitrogenados presentes no café, podemos citar a cafeína e a trigonelina (Figura 1). A cafeína destaca-se por possuir propriedades estimulantes e relativa estabilidade na torração, mesmo em altas temperaturas. E a trigonelina, que constitui cerca de 1% do grão cru, após o processo de torração tende a formar niacina, uma vitamina do complexo B, e compostos voláteis responsáveis pelo aroma da bebida (RODARTE, 2008; DE MARIA, MOREIRA e TRUGO, 1999; VIANI e HORMAN, 1974).

A cafeína (Figura 1-a), uma metilxantina com características amargas, é o principal alcaloide nos grãos de café verde, constituindo cerca de 0,8-

1,4% no *C. arabica* e de 1,7-4,0% no *C. canephora* e, após processo de torração, essas quantidade passam para cerca de 1,0% para o primeiro e 2,0% para o último, contribuindo de forma direta para a qualidade das bebidas provenientes de cada uma das espécies, com menor intensidade de amargor quando utiliza-se somente grãos da espécie arábica para o preparo da bebida do café (HECIMOVIC et al. 2011; FARAH, 2012). A trigonelina (Figura 1-b) é outro alcaloide presente no café que, ao contrário da cafeína, apresenta os mais elevados níveis na espécie arábica, cujo percentual nos grãos verdes correspondem a 0,6-2,0% reduzindo para 0,2-1,2% após processo de torra, enquanto o percentual encontrado na espécie robusta varia de 0,6-0,7% nos grãos verdes e de 0,3-0,7% nos grãos torrados (WASSERMAN, 1992; FARAH, 2012).

Figura 1 – Principais alcaloides encontrados nos grãos de café



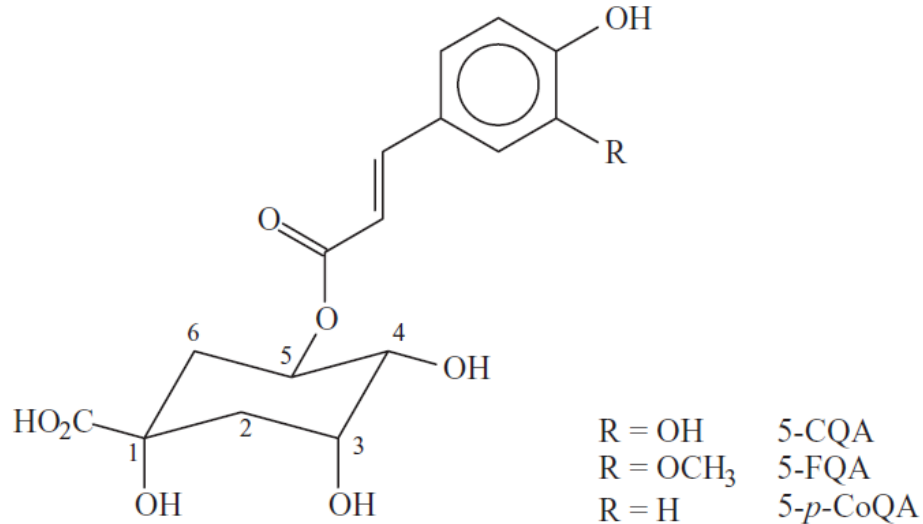
Fonte: FARAH (2012).

Os fenóis são compostos aromáticos dentre os quais estão os ácidos clorogênicos (Figura 2), principais compostos fenólicos não voláteis encontrados em grande quantidade no café, representando cerca de 6-12% dos constituintes do café em massa; o ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA – Figura 2) constitui o representante majoritário do grupo dos ácidos clorogênicos.

No café torrado encontra-se uma grande variedade de compostos fenólicos: fenol, 2-metil-fenol, 3-metil-fenol, 3-etil-fenol, 4-vinil-fenol, guaiacol, 4-etil-guaiacol, 4-vinil-guaiacol, catecol, 4-metil-catecol, 4-etil-catecol, 4-vinil-catecol, entre outros. Durante o processo de torração uma fração dos fenóis é degradada, originando pigmentos e componentes voláteis do aroma. Em relação aos ácidos clorogênicos, metade do que se perde na torra é encontrada nas formas de ácido

quínico livre, compostos fenólicos de baixo peso molecular e pigmentos (MOREIRA, TRUGO e DE MARIA, 2000).

Figura 2 – Principais ácidos clorogênicos encontrados nos grãos de café



Fonte: FARAH (2012).

O teor de ácido clorogênico em *C. canephora* é geralmente maior que em *C. arabica*, mas essa concentração varia consideravelmente em ambas as espécies e de acordo com o grau da torra. No café verde o percentual de ácidos clorogênicos está entre 4,1-7,9% para o arábica e 6,1-11,3% para o robusta, enquanto que no grão torrado há redução nesse percentual para 1,9-2,5% para primeira espécie e 3,3-3,8% para a segunda (FARAH, 2012).

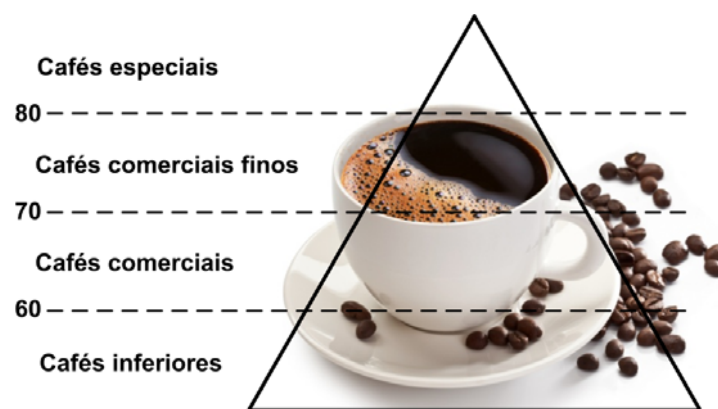
1.1.2 Café Especial

A preferência dos consumidores por produtos de melhor qualidade vem impulsionando o crescimento do mercado dos cafés especiais. Segundo a BSCA (2017) para a definição de um café especial os atributos de qualidade abrangem vários conceitos como as características físicas dos grãos, como a origem, a espécie, a cor e o seu tamanho, aliado às preocupações de ordem ambiental e social, como os sistemas de produção e as condições de trabalho da mão-de-obra cafeeira. Sendo considerado café gourmet (ou especial) os grãos de café da espécie arábica, com peneira maior que 16 e de alta qualidade e quase isento de defeitos.

O Protocolo de Cupping da Associação Americana de Cafés

Especiais (SCAA, 2017), fornece um padrão internacional para a avaliação de cafés que, além de aroma e sabor, também considera o tipo de torrefação, a preparação da xícara, entre outros fatores. A avaliação dos atributos sensoriais consiste em pontuar o aroma, por meio da fragrância da amostra seca moída e a infusão de água (Passos 1 e 2) e o sabor e outros atributos como a acidez, o corpo e o equilíbrio, é avaliado provando a bebida após infusão (Passo 3) (BRESSANELO et al., 2017). E a partir dessa análise o café é classificado de acordo com Figura 3.

Figura 3 - Classificação do café especial a partir da metodologia SCAA



Fonte: GRÃO GOURMET (2017).

Entretanto, a avaliação sensorial é dispendiosa, considerando-se que leva meses de treinamento especializado para estar apto a realizá-la, e embora siga um conjunto específico de diretrizes detalhadas está sujeita a múltiplas fontes de erros (como a falta de treinamento ou prática, falsas expectativas, falta de reprodutibilidade), podendo levar a conclusões inconsistentes. Essa técnica ainda é difícil de ser executada quando muitas amostras precisam ser analisadas durante o pico da produção cafeeira (ESTEBAN-DÍEZ, GONZÁLEZ-SÁIZ e PIZARRO, 2004; TOLESSA et al., 2016). Assim para realizar a diferenciação do café especial e tradicional é importante o desenvolvimento de métodos de avaliação mais apropriados e confiáveis neste segmento (SMRKE et al., 2015).

Ribeiro et al. (2012) propuseram uma previsão para a qualidade da bebida de cafés da espécie arábica, baseadas em perfis cromatográficos de compostos voláteis do café torrado, viabilizando a metodologia desenvolvida para prever a qualidade sensorial desse café, relacionando os picos cromatográficos para prever scores de acidez, amargor, sabor, corpo e qualidade geral da bebida,

por meio de ferramentas quimiométricas. Piccino et al. (2014), realizaram a diferenciação de variedades de cafés especiais comerciais provenientes da variedade “*Bourbon Pointu*”, utilizando-se a extração em fase sólida (EFS) e identificação por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM), identificando compostos voláteis característicos de cada amostra estudada.

Tolessa et al. (2016) desenvolveram um modelo capaz de prever a qualidade da xícara de cafés especiais com base nos espectros de infravermelho próximo (NIR) de grãos de café verde, utilizando o método de regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) para desenvolver um modelo correlacionando dados espectrais com dados de pontuação sensorial para a qualidade da bebida do café. Bressanelo et al. (2017) também utilizaram CG-EM para desenvolver uma abordagem de análise instrumental complementar ao perfil sensorial humano de maneira a descrever quimicamente as propriedades sensoriais de amostras de cafés torrados, prevendo seu sabor e aroma através de ferramentas quimiométricas.

Vários estudos têm sido realizados para tentar compreender a química que determina a percepção sensorial quando se toma a bebida do café, buscando identificar os compostos responsáveis para a determinação do sabor e aroma que o caracterizam. A maioria desses estudos compreendem os compostos voláteis e, por isso, pesquisas envolvendo a composição química relacionada aos compostos solúveis da bebida do café podem contribuir como um método de diferenciação de cafés especiais e tradicionais.

1.2 QUIMIOMETRIA

A quimiometria pode ser definida como a aplicação da estatística para a análise de dados químicos e o planejamento de experimentos químicos e simulações (IUPAC, 2017). O uso da quimiometria ocorreu principalmente pelas áreas da química orgânica e analítica, entre os anos de 1960 e 1970, pelo acesso aos computadores nos laboratórios de pesquisa e pelo surgimento da instrumentação e suas respostas multivariadas para as análises e os experimentos químicos (GELADI, 2003).

As análises cromatográficas, espectroscópicas e espectrométricas de amostras complexas são frequentes na área de química, e obter uma boa separação desses analitos para posterior análise qualitativa ou quantitativa, é

essencial para atingir bons resultados e, por isso, a busca pela otimização das condições analíticas utilizadas é crescente entre os pesquisadores dessa área. A Quimiometria auxilia na organização dos dados para seu melhor entendimento, por meio de modelos matemáticos e estatísticos, que irão descrever a relação entre os parâmetros analíticos e as respostas dos experimentos, o que é possível somente pelo seu perfil multicritério (KUMAR, et al., 2014).

Os métodos quimiométricos são aplicáveis de maneira eficiente devido à representação vetorial dos dados ser bem adequada à química, pois os dados analíticos são geralmente obtidos como uma matriz \mathbf{X} ($n \times p$) de n objetos (amostras ou compostos) e p características medidas (analitos ou propriedades) (SZYMAŃSKA et al., 2015). Esses métodos, usados para identificar as semelhanças e diferenças em vários tipos de amostras, para agrupá-las e classificá-las, ainda estão divididos em dois grupos: os métodos “supervisionados”, e os métodos “não supervisionados”. Nos primeiros, cada amostra analisada provém de uma classe preestabelecida, e essa informação é utilizada durante a análise dos dados e na construção dos modelos de classificação. Já os métodos não supervisionados, ou métodos de análise exploratória de dados, não requerem nenhum conhecimento prévio a respeito da classificação das amostras (FERREIRA, 2015).

Bhumiratana, Adhikari e Chambers IV (2011) utilizaram a análise de variância (ANOVA) e a análise de componentes principais (PCA) para avaliar o impacto do grau de torração, moagem e preparação da bebida na evolução dos atributos sensoriais de aroma em grãos de café da Etiópia, Havaí e El Salvador. Garret et al. (2013) desenvolveram uma metodologia para identificação e discriminação de cultivares de café de acordo com sua genética aliando dados de Espectrometria de massas com PCA e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA).

Moreira e Scarminio (2013) usaram delineamento estatístico multivariado (planejamento de misturas simplex centróide, ANOVA, superfície de resposta, PCA) para estudar a composição do solvente extrator e promover a discriminação de cultivares de *Coffea arabica*, tradicionais ou geneticamente modificados. Kitzberger, Scholz e Benassi (2014) também utilizaram PCA para estudar o teor de compostos bioativos em cafés torrados da espécie arábica de cultivares tradicionais e geneticamente modificados.

Monakhova et al. (2015) empregaram PCA na análise de espectros

de RMN de H^1 de extratos lipofílicos e aquosos de amostras autênticas de cafés das espécies arábica e robusta, conseguindo discriminá-las. Smrke et al. (2015) estudaram a diferenciação dos graus de maturação através de marcadores químicos em café verde de duas espécies utilizando-se PCA aplicada a diferentes técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia de interação hidrofílica, fração de alto peso molecular, cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho e cromatografia gasosa de extração em fase sólida headspace/espectrometria de massa.

Com isso, comprova-se que a Quimiometria como ferramenta para otimização de método de extração, separação e/ou discriminação de amostras, identificação de espécies, entre outros propósitos, vem sendo muito utilizada com sucesso em pesquisas recentes, justificando-se sua utilização nesse estudo.

1.2.1 Planejamento Experimental

A extração é uma etapa muito importante nas análises químicas e suas condições nem sempre são as mesmas para os diversos tipos de materiais. O conteúdo do extrato é afetado por diversos parâmetros como: a natureza química das amostras, solubilidade, polaridade, razões dos solventes utilizados, velocidade de agitação, temperatura, além do tempo e método de extração. O planejamento experimental é um método eficaz para a determinação dos efeitos desses parâmetros de extração sobre o conteúdo do extrato, e, além disso, pode ser usado para desenvolver, aperfeiçoar, otimizar processos e avaliar a interação entre as variáveis (USLU et al, 2013; ALBERTI et al., 2014).

Os planejamentos fatoriais são adequados para estimar as interações entre as variáveis, explorando a influência de todas as combinações dos fatores (MARINI, 2013; GEMPERLINE, 2006). Os planejamentos fatoriais 2^k são os mais simples possíveis, exigindo um número de experimentos igual a 2^k , em que k é o número das variáveis em estudo, sendo que cada variável possui dois níveis, codificados como -1 e +1 (ou nível inferior e superior), e podem ser quantitativas (temperatura, pressão, etc.) ou qualitativas (tipo de catalisador, tipo de equipamento, etc.) (MARINI, 2013). Os planejamentos fatoriais de dois níveis, por exemplo, são utilizados em estudos preliminares, nos quais deseja-se apenas averiguar a influência de determinados fatores sobre a resposta, sem que seja

necessário explicá-los (BOX, HUNTER E HUNTER, 1978; NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2001).

A metodologia de modelagem de superfície de resposta (ou RSM - *Response Surface Methodolgy*) divide-se em três áreas: o planejamento de experimentos, o ajuste de modelos e a otimização de processos ou produtos. Os planejamentos experimentais descrevem como planejar e conduzir experimentos, em diferentes combinações entre as variáveis estudadas, para obter o máximo de informações possíveis realizando um mínimo de experimentos. O ajuste de modelos estatísticos às superfícies de resposta é possível quando os princípios da RSM são utilizados a partir de experimentos adequadamente projetados. O conjunto das condições operacionais ótimas para o objetivo proposto pode então ser encontrado a partir da obtenção do modelo estatisticamente adequado (GEMPERLINE, 2006).

A análise de variância (ANOVA) é uma técnica para comparação de métodos ou tratamentos, de forma que a variação nas respostas é utilizada para decidir se o efeito daquele tratamento da amostra é significativo. O princípio desse método envolve basicamente a comparação do tamanho dos erros, a variância total é dividida em componentes – devido a erro aleatório (dentro de grupos) e devidos a diferenças entre médias (entre grupos) – e posteriormente faz-se o teste quanto a significância estatística, usando o valor de F (razão entre o modelo e seu erro) e sendo significativo, rejeita-se a hipótese nula e conclui-se que há diferença entre as populações – o modelo apresenta falta de ajuste (HANRAHAN, 2009; BRERETON, 2007).

1.2.2 Análise Multivariada

A análise multivariada consiste na avaliação de dados provenientes da medida de um grande número de variáveis e a partir de um número específico de amostras, objetivando determinar todas as relações entre as amostras e as variáveis nesse conjunto de dados, convertendo-os em novas variáveis latentes (KUMAR et al., 2014). As variáveis, normalmente são medidas simultaneamente e estão correlacionadas entre si, e a análise multivariada procura desvendar as informações sobrepostas fornecidas por essas variáveis, por meio de simplificações e de maneira exploratória, ou seja, gerando hipóteses (RENCHER, 2002).

Do ponto de vista matemático, a análise exploratória parte de uma

matriz com os dados originais pré-tratada, matriz \mathbf{X} ($i \times j$), em que i linhas correspondem ao número de amostras e j colunas o número de variáveis, e o procedimento para a PCA pode ser descrito como a decomposição da matriz \mathbf{X} em um produto de duas outras matrizes, uma de escores \mathbf{T} e outra de pesos \mathbf{L} (*loadings*), como segue:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{L}^T,$$

Sendo que os escores expressam as relações entre as amostras, enquanto os pesos indicam as relações entre as variáveis. Após a escolha do número de componentes principais significativas, que expliquem a maior parte da variância dos dados, as outras componentes podem ser expressas através da matriz de resíduos (\mathbf{E}) e a partir dessa informação a matriz original pode ser reescrita como (FERREIRA, 2015; GEMPERLINE, 2006):

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{L}^T + \mathbf{E}$$

Tanto a ACP quanto a AF são técnicas multivariadas de projeção dos dados e por isso seus resultados são relativamente fáceis de serem interpretados. Essa projeção, acaba evidenciando a estrutura dos dados, por meio dos agrupamentos de amostras ou variáveis (SZYMANSKA et al., 2015). O gráfico de *scores* apresenta as projeções das amostras em um espaço, que pode ser bi ou tridimensional, e o gráfico dos *loadings* mostra a correlação entre as variáveis no espaço das componentes ou fatores, e para a caracterização dos grupos formados entre as amostras faz-se a interpretação correlacionando as informações contidas nesses dois gráficos (ABDI e WILLIAMS 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a análise química e a diferenciação de cafés especiais e tradicionais por meio de técnicas cromatográficas e espectroscópicas, com o auxílio de ferramentas quimiométricas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar um método de extração que possibilite a obtenção de maior informação química por meio das impressões digitais e perfil metabolômico de amostras de cafés comerciais;
- Utilizar ferramentas quimiométricas para avaliar os efeitos do método, tempo e solvente extrator na obtenção das respostas;
- Analisar as amostras de café por meio das técnicas espectroscópicas (UV-Vis e IV) e cromatográficas (CLAE-UV/DAD);
- Aplicar análise de fatores às respostas de diferentes técnicas analíticas para averiguar a possibilidade de separação entre os dois tipos de amostras;
- Comparar as técnicas e métodos para diferenciação dos tipos de cafés e selecionar aquela que melhor diferencia os cafés especiais e tradicionais comerciais.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 AMOSTRAS DE CAFÉ

Os cafés especiais cereja descascados, torrados e moídos (torra média 55 Agrton), foram adquiridos na cidade de Jacarezinho-PR, em março de 2016, e as 7 amostras selecionadas foram previamente classificadas como cafés especiais pela metodologia SCAA, na FICAFE (Feira Internacional de Cafés Especiais) de 2016, e suas pontuações são apresentadas na Tabela 1. Para comparação foram também selecionadas 7 amostras de cafés tradicionais comerciais torrados e moídos (torra média) de marcas variadas, adquiridos em supermercado da cidade de Londrina-PR, em março de 2016.

Tabela 1 – Especificações das amostras de cafés especiais estudadas.

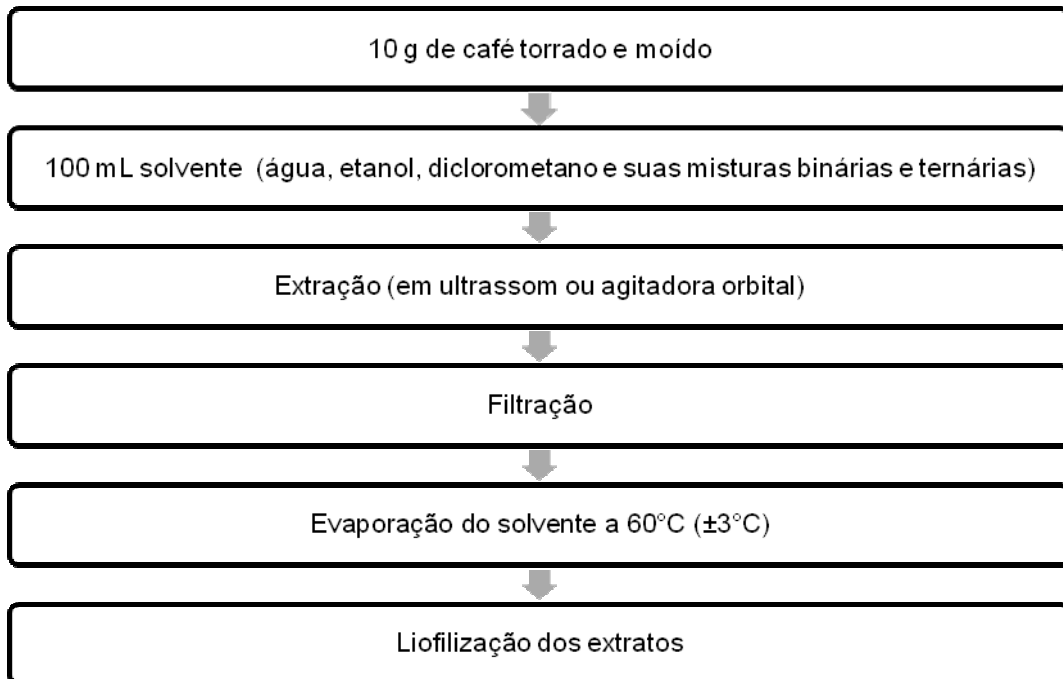
Amostras	Classificação	Pontuação SCAA	Origem
1	Especial	83,38	Joaquim Távora - PR
2	Especial	83,50	Joaquim Távora – PR
3	Especial	82,38	Santa Mariana - PR
4	Especial	82,63	Tomazina - PR
5	Especial	85,00	Japira – PR
6	Especial	83,50	Japira - PR
7	Especial	82,50	Carlópolis - PR

Fonte: O próprio autor.

3.2 PREPARO DOS EXTRATOS DE CAFÉ

Os extratos foram preparados utilizando-se 10,0 g de cafés tradicionais ou especiais comerciais torrados e moídos e 100,0 mL de solvente conforme recomendação da Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC, 2017b) para o preparo da bebida do café. Após extração e filtração, as misturas foram concentradas em evaporador rotativo (Fisatom 802) a 60°C e posteriormente foram liofilizadas (Virtis SP Scientific). Um fluxograma ilustrando o preparo das amostras é mostrado da Figura 4.

Figura 4 – Método de preparo das amostras para obtenção dos extratos de café.



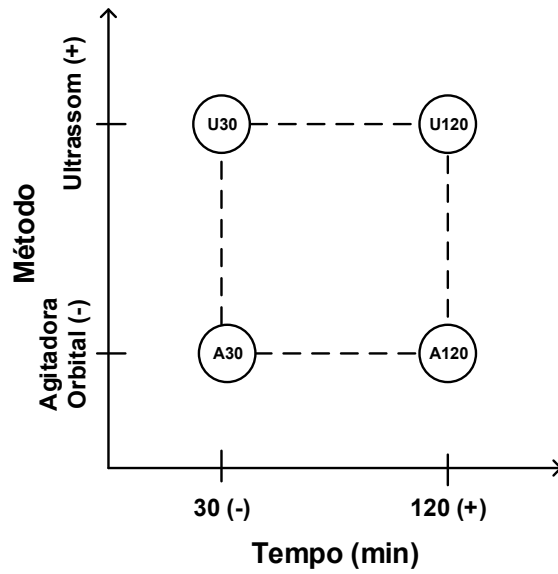
Fonte: O próprio autor.

3.3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR PLANEJAMENTO FATORIAL E PLANEJAMENTO DE MISTURAS

A otimização do preparo dos extratos de café para investigação das variáveis de extração foi realizada por meio do planejamento experimental, com variação do efeito do tempo, método e solvente extrator.

Os parâmetros experimentais investigados através do planejamento fatorial 2^2 aplicado ao procedimento de extração foram os tempos de 30 minutos e 120 minutos, e os métodos de extração, utilizando-se uma agitadora orbital ACB Labor (com velocidade de agitação de 150 rpm e temperatura de 25°C) e ultrassom (Unique 1400). Esse planejamento fatorial foi desenvolvido nos níveis máximo (ultrassom, 120 minutos) e mínimo (agitadora orbital, 30 minutos) – Figura 5. A fim de verificar o efeito de diferentes solventes na extração também foi realizado um planejamento de misturas simplex centroide usando os seguintes solventes: água Milli-Q (a), etanol (e) Impex (São Paulo, Brasil) e diclorometano (d) Anidrol (São Paulo, Brasil) puros, suas misturas binárias e ternárias, apresentado na Tabela 2 e representado na Figura 6.

Figura 5 – Representação do planejamento fatorial 2^2 para otimização da extração.



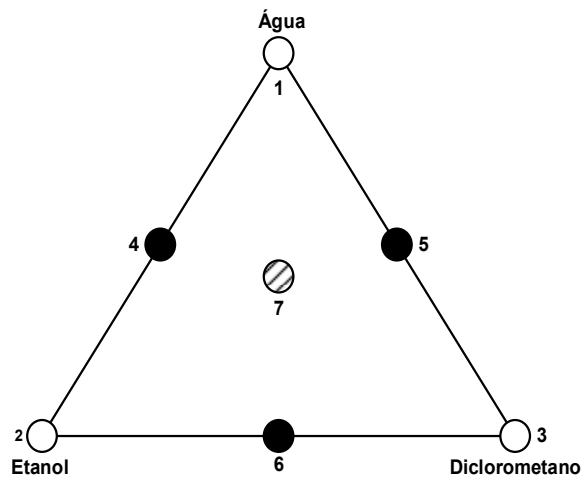
Fonte: Adaptado de NETO, SCARMINIO e BRUNS (2001)

Tabela 2 - Planejamento de misturas simplex centroide para três componentes: água (a), etanol (e) e diclorometano (d).

Planejamento de misturas	Numeração Correspondente (Figura 6)	Solventes		
		Água	Etanol	Diclorometano
a	1	1	0	0
e	2	0	1	0
d	3	0	0	1
ae	4	0,50	0,50	0
ad	5	0,50	0	0,50
ed	6	0	0,50	0,50
aed	7	0,333	0,333	0,333

Fonte: O próprio autor.

Figura 6 – Representação do planejamento de misturas simplex centroide.



Fonte: O próprio autor.

Para selecionar o método, o tempo e o solvente extrator foram analisados e discutidos como respostas o rendimento de extração (análise gravimétrica) e os espectros obtidos por espectrofotometria de UV-Vis e IV, utilizando-se uma única amostra de café comercial tradicional.

Na análise gravimétrica, calculou-se o rendimento de extração por meio da comparação da massa de extrato obtida com a massa de café torrado e moído utilizada no início dos experimentos. Através da técnica instrumental de espectrofotometria no Ultravioleta-Visível (UV-Vis) utilizou-se a banda específica (275 nm) obtida por impressão digital dos extratos brutos, e por meio da espectroscopia no IV, aplicou-se a análise de fatores. A combinação dos resultados dessas análises estatísticas foi usada para a seleção dos parâmetros de extração.

Após a escolha do método e solvente extrator, pelo planejamento fatorial, planejamento de misturas e análise de fatores, todas as quatorze amostras foram preparadas em duplicata e analisadas utilizando métodos espectroscópicos (UV-Vis e IV), além de serem analisadas seus perfis metabolômicos obtido por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-UV/DAD).

3.4 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS

3.4.1 Ultravioleta-visível (UV-Vis)

As análises para obtenção dos espectros de absorção no UV-Vis foram realizadas em equipamento Thermo Scientific (Evolution 60), sendo que foi pesada 0,02 g de cada extrato de café foram e diluídas para um volume total de 2,0 mL do mesmo solvente utilizado para extração e posteriormente realizou-se uma diluição de 100 vezes no mesmo solvente. Para as medições utilizou-se uma cubeta de quartzo com percurso óptico de 10 mm e uma resolução espectral de 1 nm, com varredura de 190-800 nm, utilizando-se os solventes puros ou misturas binárias e ternárias de acordo com o procedimento de extração como linha de base (ou branco).

3.4.2 Infravermelho (IV)

As análises de absorção na região do IV também foram utilizadas

para seleção dos parâmetros de extração. Os espectros (FT-IR) foram obtidos utilizando um espectrofotômetro da Bruker, modelo Vertex 70, com acessório de refletância total atenuada (Platinum ATR), sendo os extratos liofilizados colocados em contato com a superfície do cristal de selenito de zinco (ZnSe) e a leitura dos espectros foram realizadas na região de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} e utilizando-se a média de 16 varreduras para obtenção dos espectros.

3.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Para as análises cromatográficas por CLAE-UV/DAD utilizou-se um cromatógrafo Alliance (Waters) com detector de arranjo de diodos. A separação foi realizada em coluna Phenomenex® C₁₈-Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 μm), com temperatura de 35°C e o sistema de solventes da fase móvel consistiu de água (A) e acetonitrila (B), com modo gradiente de eluição de 20 a 80% de B em 20 minutos; as amostras, na concentração de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, foram injetadas automaticamente (20 μL) com vazão de 0,4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e os cromatogramas foram registrados com varredura espectral de comprimento de onda na faixa de 190 à 400 nm, com monitoramento dos picos individuais a partir dos espectros de Ultravioleta (UV), foi feita seleção do comprimento de onda fixo de 272 nm para as análises.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise para a avaliação dessas respostas foi feita aplicando-se o Teste t pareado, comparando-se os pares de dados, e por meio do *software* Statística 10.0, utilizando-se as ferramentas ANOVA (Análise de Variância), superfície de resposta, gráfico de Pareto e gráfico dos valores previstos *versus* observados. A análise de fatores, pelo *software* Statística 10.0, também foi utilizada para avaliação dos solventes extratores e as respostas espectrais obtidas.

A análise de fatores foi utilizada para avaliar os dados espectroscópicos e cromatográficos através do *software* Statística 10.0. O *software* OriginPro 8.5 foi usado para a plotagem dos gráficos dos espectros UV-Vis e de IV e para o gráfico dos *loadings* dos fatores obtidos nas análises estatísticas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE I

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO A PARTIR DOS DADOS ESPECTRAIS

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

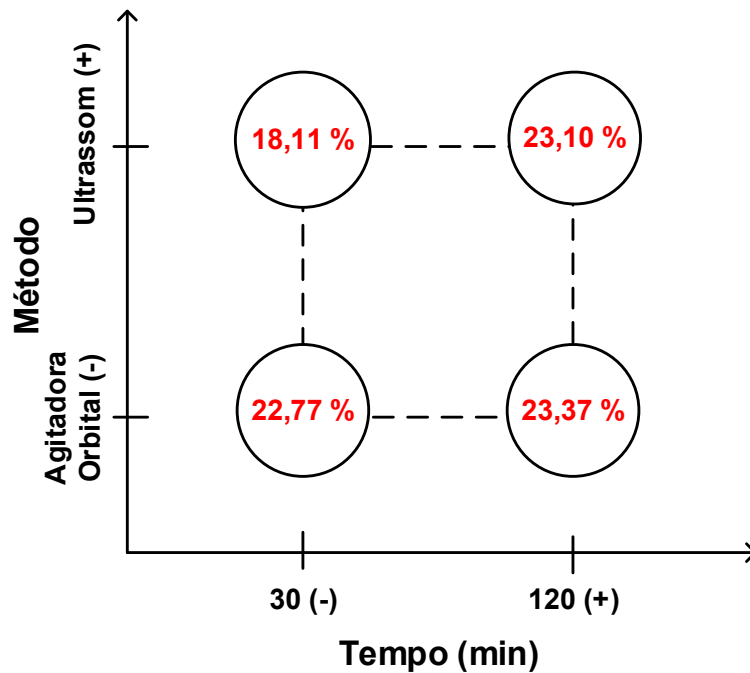
4.1 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO A PARTIR DOS DADOS ESPECTRAIS

4.1.1 Planejamento Fatorial – Usando como Resposta os Rendimentos das Extrações

O planejamento fatorial 2^2 foi utilizado para estudar a influência dos fatores método e tempo de extração sobre a resposta (neste caso o rendimento dos extratos), utilizando-se uma amostra e um modelo estatístico para prever as interações.

A Figura 7 apresenta a média dos valores de rendimentos (em %), destacados em vermelho, obtidos pela análise gravimétrica dos extratos em cada ponto do planejamento fatorial realizado em triplicata, utilizando-se a mistura ternária como solvente extrator.

Figura 7 – Média dos rendimentos das extrações para cada ponto do planejamento estatístico.



Fonte: O próprio autor.

A significância dos efeitos das variáveis e das possíveis interações entre elas foi checada, através do Software Statistica 10.0, pela aplicação da análise de variância (ANOVA) – Tabela 3, e com base nos gráficos de Pareto (Figura 8) e por meio da construção de superfície de resposta (Figura 9).

Tabela 3 – ANOVA do planejamento fatorial 2² aplicado aos rendimentos de extração

Fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	F _{cal}	p
(1) Método	20,86935	1	20,86935	37,70742	0,000472
(2) Tempo	16,21422	1	16,21422	29,29639	0,000995
1 por 2 (Efeito)	12,89689	1	12,89689	23,30252	0,001905
Erro Puro	3,87418	7	0,55345		
Total	59,15105	10			

SQ (Soma quadrática), g.l. (graus de liberdade), MQ (média quadrática);

% variação explicada = $SQ_{\text{regressão}}/SQ_{\text{total}}$,

% máxima de variação explicável = $(SQ_{\text{total}} - SQ_{\text{erropuro}})/SQ_{\text{total}}$

(NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2001)

Fonte: O próprio autor.

Figura 8 – Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 2² aplicado aos rendimentos de extração

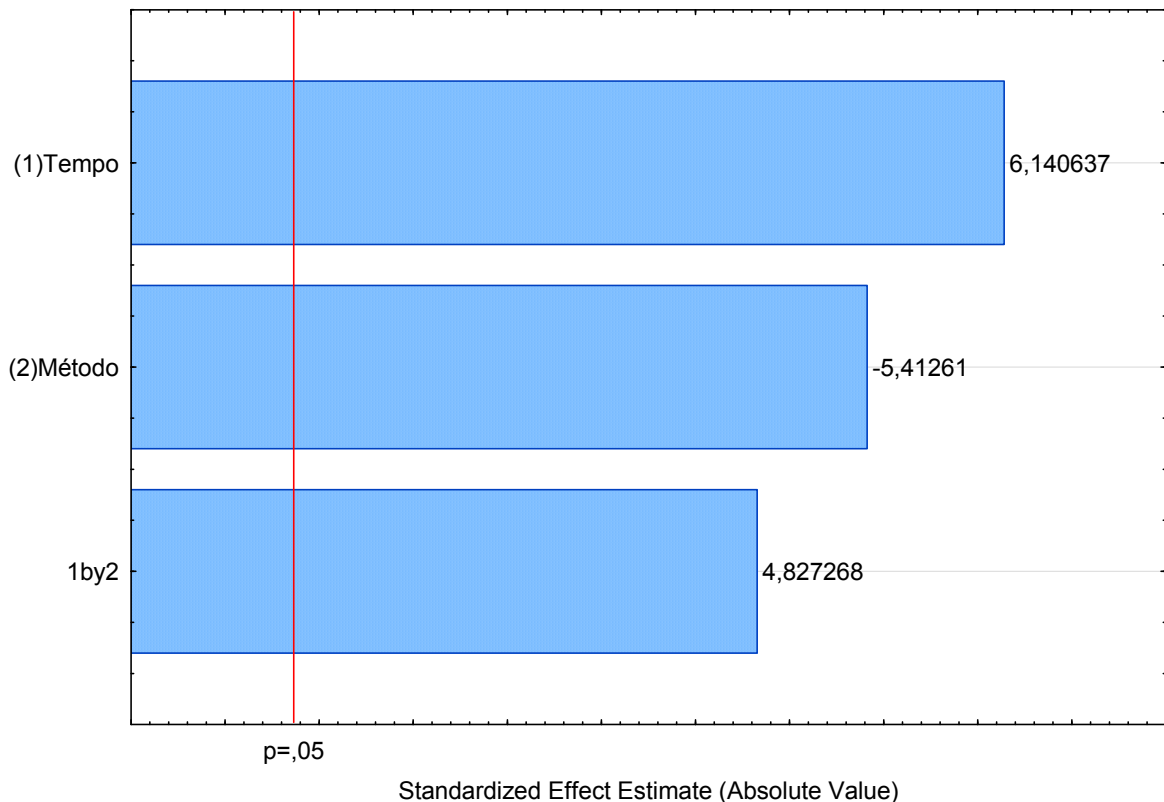
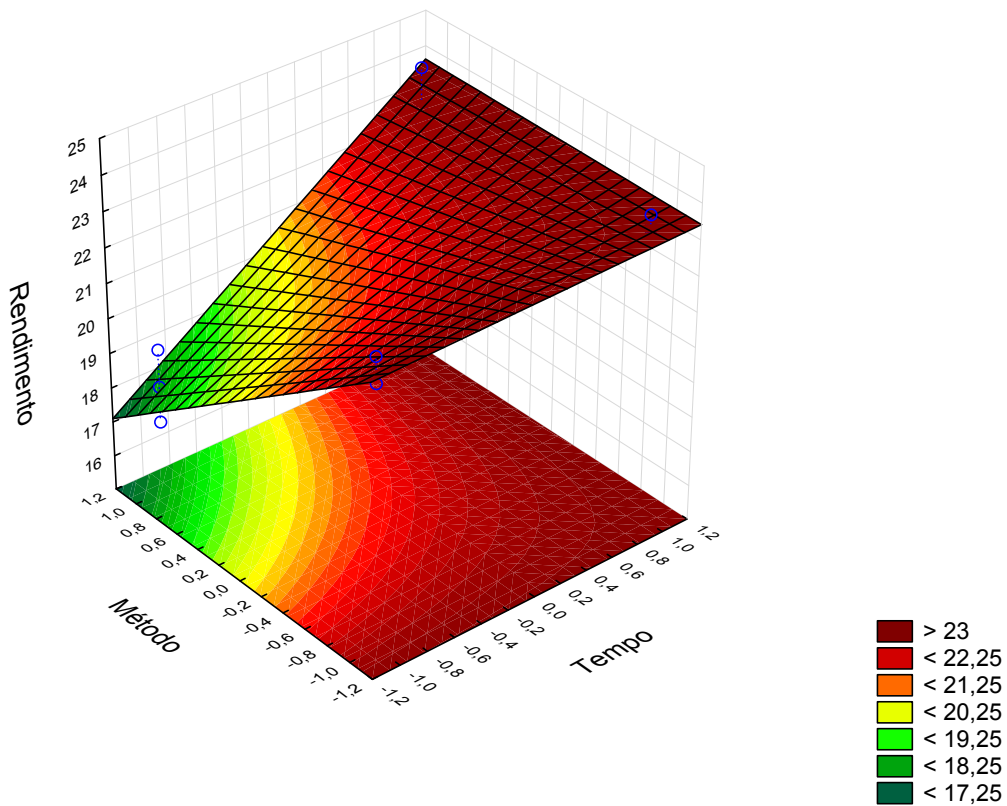


Figura 9 – Superfície de resposta para as respostas do planejamento fatorial 2^2 aplicado aos rendimentos de extração.



Verifica-se pela Análise de Variância (Tabela 3) que as duas variáveis e a interação entre elas são estatisticamente significativas, pois obteve-se $F_{\text{calculado}}$ para todos os casos (37,71; 29,30; 23,30) maiores que o valor de $F_{\text{tabelado}}=5,59$, com 95% de confiança. O que pode ser confirmado pelo gráfico de Pareto (Figura 8), que apresenta todas as variáveis como significativas a 95% de confiança.

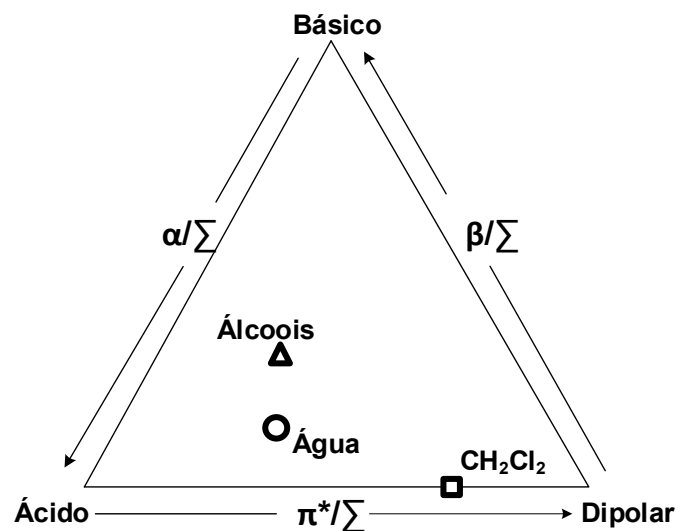
Para a variável tempo o valor de $t=6,14$, apresentado na Figura 8 sendo positivo, temos que o rendimento é diretamente proporcional ao aumento do tempo de extração, e tendo $t=-5,41$ para variável método, esse valor negativo indica que o rendimento aumentará utilizando a agitadora orbital como método de extração.

Observando-se somente a superfície de resposta (Figura 9) conclui-se ainda que além de se obter maiores rendimentos com a agitadora orbital, ainda há a possibilidade de se trabalhar com a redução do tempo de extração, visto que com a diminuição do tempo de 120 para 30 minutos manteve-se as maiores porcentagens de rendimento, o que é mostrado pela coloração avermelhada em todo o eixo correspondente a variável tempo da Figura 9.

4.1.2 Planejamento de Misturas – Usando como Resposta os Espectros de Absorção no UV-Vis

Através do planejamento de misturas podemos avaliar de que maneira cada solvente extrator, em diferentes proporções, afetam a quantidade e a variedade de metabólitos extraídos. O efeito do solvente extrator sobre a extração de metabólitos secundários foi proposto utilizando-se solventes escolhidos de acordo com o triângulo de seletividade de Snyder - Figura 10 (propriedades de polaridade e seletividade), sendo os índices de polaridade variados de 3,4, 5,2 e 9,0 para o diclorometano, etanol e a água, respectivamente (MARKOM et al., 2007). Além disso, como a análise sensorial para a classificação do café pela metodologia SCAA utiliza o preparo da bebida com água, seria indispensável o uso desse solvente. O metanol seria um solvente a ser escolhido por sua polaridade intermediária (6,6) entre o diclorometano e a água, porém devido a sua toxicidade optou-se por sua substituição pelo etanol com índice de polaridade e características moleculares próximas, mesmo grupo funcional. O diclorometano, apesar de tóxico, por sua seletividade para a extração da cafeína, sendo o solvente mais utilizado para a descafeinização nas indústrias brasileiras (TOCI, FARAH e TRUGO, 2006) não foi substituído, além disso, sua importância também está relacionada ao emprego de um solvente apolar frente aos outros dois solventes polares utilizados, para maior variedade de compostos extraídos.

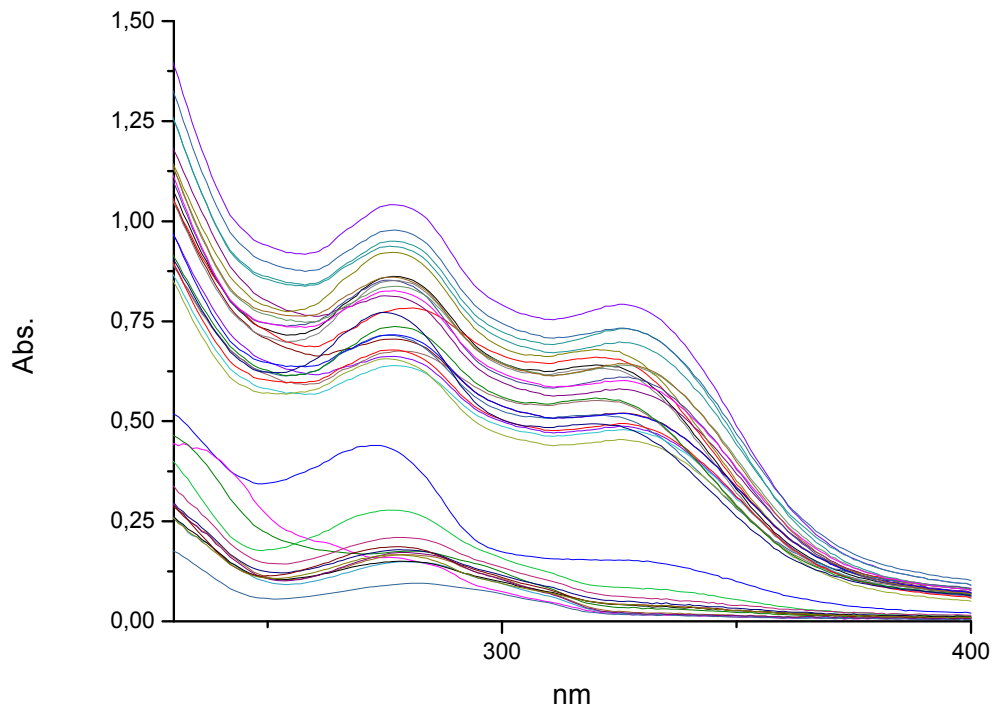
Figura 10 – Triângulo de seletividade de Snyder, baseado nos parâmetros solvatocrômicos dos solventes.



Fonte: Snyder (2000).

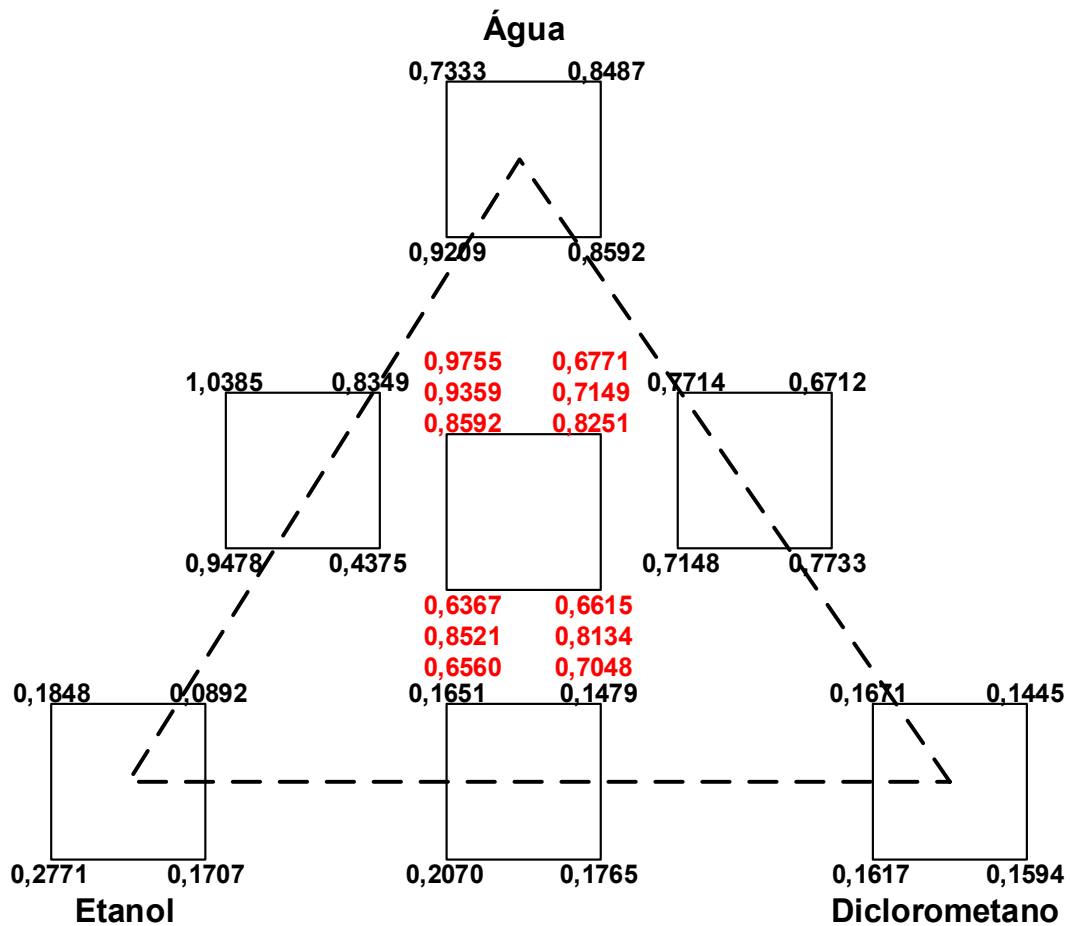
As impressões digitais obtidas dos trinta e seis extratos obtidos por meio dos planejamentos, analisados por espectrofotometria de absorção no UV-Vis, com janela espectral de 190 a 400 nm, estão apresentadas na Figura 11.

Figura 11 – Impressões digitais dos extratos obtidas por espectrofotometria UV-Vis.



Para estudar o efeito das variáveis do planejamento na composição química do extrato escolheu-se a banda de absorção no comprimento de onda de 275 nm que está relacionada à absorção da ligação dupla da carbonila (C=O), existente nas moléculas de xantinas, como a cafeína (LÓPEZ-MARTÍNEZ et al., 2003). As absorbâncias obtidas são apresentadas na Figura 12, nela fica exemplificado o planejamento estatístico associado realizado no trabalho, tendo-se o planejamento fatorial realizado para os sete sistemas extratores do planejamento de misturas. Então, para cada ponto do planejamento de misturas tem-se quatro respostas do planejamento fatorial, totalizando-se trinta e seis ensaios com triplicata no ponto central (destacada em vermelho).

Figura 12 – Intensidade de absorção obtida em 275 nm a partir dos extratos para cada ponto do planejamento estatístico.



A Análise de Variância (ANOVA) – Tabela 4, foi utilizada para avaliar se havia diferenças significativas entre os sistemas do planejamento de mistura simplex centroide ou se existiam evidências de falta de ajustes. Para um nível de confiança de 95%, os valores tabelados de F foram 9,01 ($F_{5,3,5\%}$) e 18,51 ($F_{1,2,5\%}$) para o modelo cúbico especial. Portanto, ao analisar a Tabela 4, verifica-se que a regressão foi significativa para todos os métodos e tempos estudados ($F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$) e que os modelos são adequados para descrever os métodos já que a falta de ajuste não foi significativa ($F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$).

Tabela 4 – ANOVA para o planejamento de misturas aplicado para as respostas de intensidade de absorção obtidas em 275 nm por espectrofotometria UV-Vis.

Absorção a 275 nm	Fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	F _{cal}	p
Agitadora Orbital 30 minutos	Regressão	0,727252	5	0,145450	15,30477	0,024039
	Resíduos	0,028511	3	0,009504		
	Falta de ajuste	0,000103	1	0,000103	0,00722	0,940039
	Erro Puro	0,028408	2	0,014204		
	Total	0,755763	8	0,094470		
		% de variação explicada	96,23			
	% máxima de variação explicável	96,24				
Ultrassom 30 minutos	Regressão	1,081683	5	0,216337	91,78822	0,001767
	Resíduos	0,007071	3	0,002357		
	Falta de ajuste	0,000078	1	0,000078	0,02245	0,894646
	Erro Puro	0,006992	2	0,003496		
	Total	1,088753	8	0,136094		
		% de variação explicada	99,35			
	% máxima de variação explicável	99,36				
Agitadora Orbital 120 minutos	Regressão	0,683334	5	0,136667	33,23908	0,007889
	Resíduos	0,012335	3	0,004112		
	Falta de ajuste	0,000087	1	0,000087	0,01427	0,915823
	Erro Puro	0,012247	2	0,006124		
	Total	0,695669	8	0,086959		
		% de variação explicada	98,23			
	% máxima de variação explicável	98,24				
Ultrassom 120 minutos	Regressão	0,830087	5	0,166017	39,94529	0,006031
	Resíduos	0,012468	3	0,004156		
	Falta de ajuste	0,000643	1	0,000643	0,10870	0,772955
	Erro Puro	0,011826	2	0,005913		
	Total	0,842556	8	0,105319		
		% de variação explicada	98,52			
	% máxima de variação explicável	98,60				

SQ (Soma quadrática), g.l. (graus de liberdade), MQ (média quadrática);

% variação explicada = $SQ_{\text{regressão}}/SQ_{\text{total}}$.

% máxima de variação explicável = $(SQ_{\text{total}} - SQ_{\text{erropuro}})/SQ_{\text{total}}$ (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2001)

Fonte: O próprio autor.

As equações da Tabela 5 mostram como o solvente ou suas misturas influenciam na intensidade de absorção das bandas das xantinas, como a cafeína, nos extratos, ou seja, qual a contribuição desses solventes e se eles são significativos (valores em vermelho são considerados significativos) para a intensidade de absorção no comprimento de onda estudado. Os erros padrões estimados para os modelos estão abaixo de cada termo da equação. Pelos modelos apresentados, a água é o extrator que é significativo para ambos os métodos nos dois tempos estudados, sendo também o solvente que resulta em extratos que apresentam maior abundância relativa desse metabólito.

Tabela 5 – Modelos matemáticos para os diferentes métodos e tempos empregados para o planejamento de misturas aplicado às respostas de intensidade de absorção obtidas em 275 nm por espectrofotometria UV-Vis.

Absorção a 275 nm	$\hat{Y}_{MÁX. ABS. 275NM}$
Aagitadora Orbital 30 minutos	$0,92\alpha + 0,27e + 0,16d + 1,40ae + 0,70ad + 0,83aed$ (±0,10) (±0,09) (±0,09) (±0,47) (±0,47) (±2,29)
Ultrassom 30 minutos	$0,73\alpha + 0,18e + 0,16d + 2,32ae + 1,29ad + 4,38aed$ (±0,05) (±0,04) (±0,04) (±0,23) (±0,23) (±1,14)
Aagitadora Orbital 120 minutos	$0,86\alpha + 0,17e + 0,16d - 0,32ae + 1,05ad + 6,65aed$ (±0,06) (±0,06) (±0,06) (±0,31) (±0,31) (±1,51)
Ultrassom 120 minutos	$0,85\alpha + 0,10e + 0,15d + 1,44ae + 0,68ad + 3,66aed$ (±0,06) (±0,06) (±0,06) (±0,31) (±0,31) (±1,51)

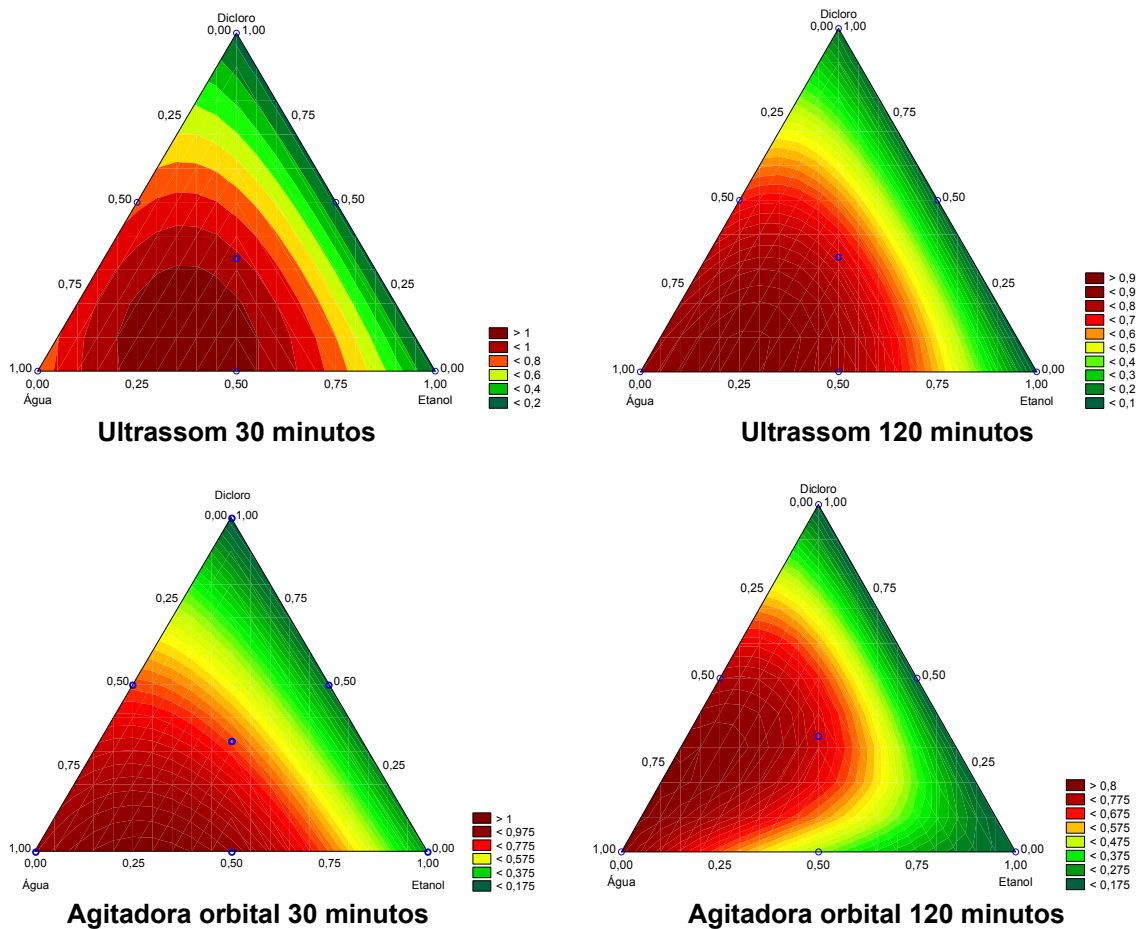
a – extração com água; e – extração com etanol; d – extração com diclorometano; ae – extração com água e etanol; ad – extração com água e diclorometano; aed – extração com água, etanol e diclorometano.

Fonte: O próprio autor.

A Figura 13 apresenta as superfícies de respostas para os solventes estudados no planejamento de misturas (água, etanol e diclorometano). As curvas predizem máximos de absorção, e portanto maior extração do metabólito quando utiliza-se a mistura binária de água e etanol, para todos os métodos e tempos, com exceção da utilização da agitadora orbital por 120 minutos, que exibe máximos de absorção com extração feita com água ou mistura binária de água e diclorometano. Embora a mistura binária seja aquela que apresente os máximos de absorção, em todos os casos a água possui coeficientes significativos para as regressões e

utilizando-a como solvente extrator é possível investigar as amostras da mesma maneira que o café é extraído para a análise sensorial (da forma como as amostras foram previamente classificadas) e ainda trabalhar de acordo com a química verde, reduzindo a utilização de solventes nocivos.

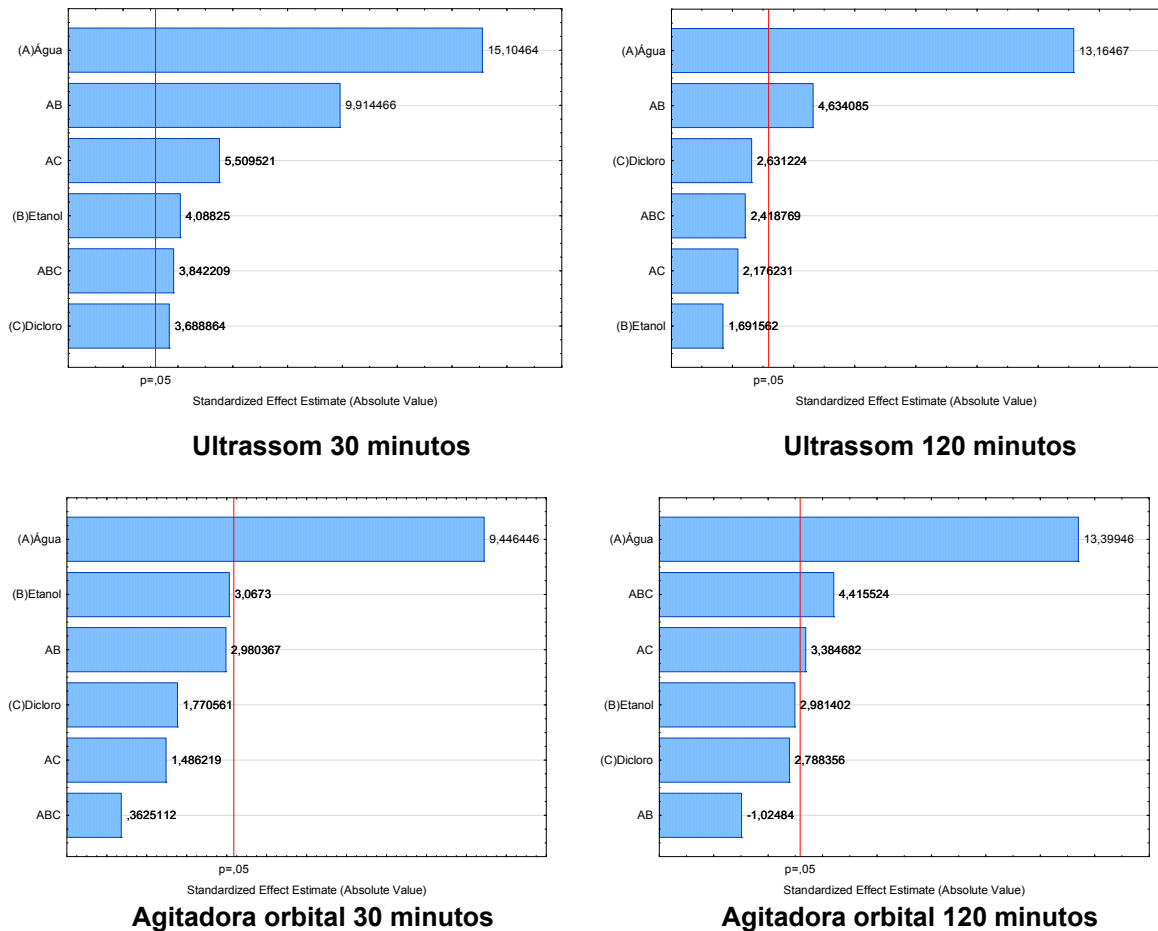
Figura 13 – Curvas de nível para os diferentes métodos e tempos empregados para o planejamento de misturas aplicado às respostas de intensidade de absorção obtidas em 275 nm por espectrofotometria UV-Vis.



Os gráficos de Pareto para os métodos e tempos estudados são apresentados na Figura 14. Verifica-se que em todos os modelos a água é significativa e com a maior contribuição se comparada aos outros solventes. Na utilização do método de extração por ultrassom o maior tempo faz com que os outros solventes, também significativos percam sua relevância. Já na utilização do método com a agitadora orbital, o efeito da mistura ternária e da mistura água e diclorometano tornam-se significativos com o aumento do tempo. Ainda é possível observar que o efeito de interação de pelo menos uma das misturas binárias são

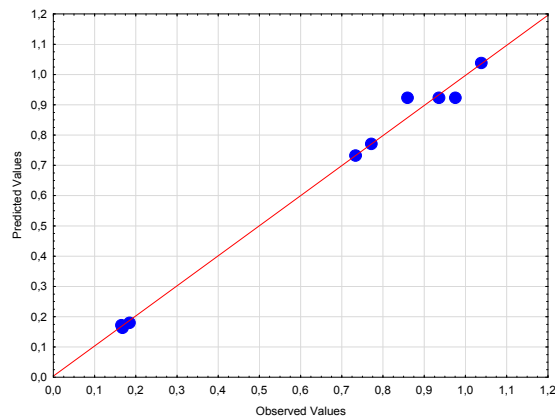
significativos para todos os métodos e tempos com exceção da agitadora orbital em 30 minutos.

Figura 14 – Gráficos de Pareto para os diferentes métodos e tempos empregados para o planejamento de misturas aplicado às respostas de intensidade de absorção obtidas em 275 nm por espectrofotometria UV-Vis.

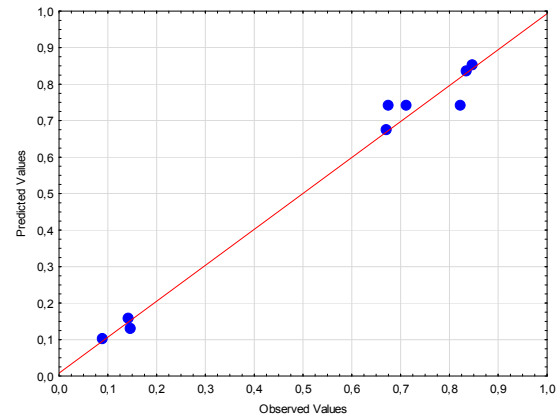


Pelas análises dos gráficos da Figura 15 verificou-se que os resíduos seguem uma distribuição normal, com ausência de tendências, e que não há diferença entre os valores previstos e observados, apesar de alguns pontos estarem um pouco mais afastados dos modelos ajustados, verificando-se a adequação desses modelos para o estudo realizado.

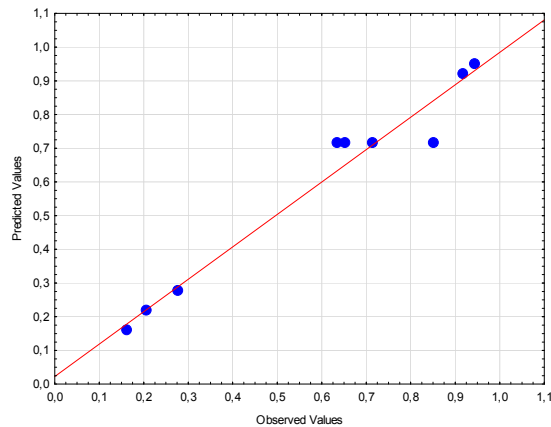
Figura 15 – Valores previstos vs. observados para os diferentes métodos e tempos empregados para o planejamento de misturas aplicado às respostas de intensidade de absorção obtidas em 275 nm por espectrofotometria UV-Vis.



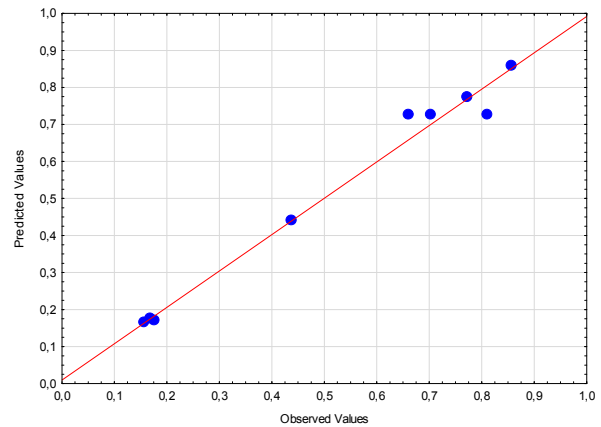
Ultrassom 30 minutos



Ultrassom 120 minutos



Agitadora orbital 30 minutos



Agitadora orbital 120 minutos

Em suma, após o planejamento fatorial, utilizando como resposta o rendimento das extrações, escolheu-se trabalhar com a agitadora orbital por 30 minutos. Já observando o planejamento de misturas simplex centroide de três componentes para as xantinas (caféina), 275 nm – UV-Vis, a água ou as misturas binárias mostraram-se os solventes que mais contribuiriam para a obtenção ou intensificação dessa banda, escolhendo-se a água para a extração das amostras para se trabalhar em conformidade com a extração para análise sensorial do café e de acordo com a química verde.

RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE II

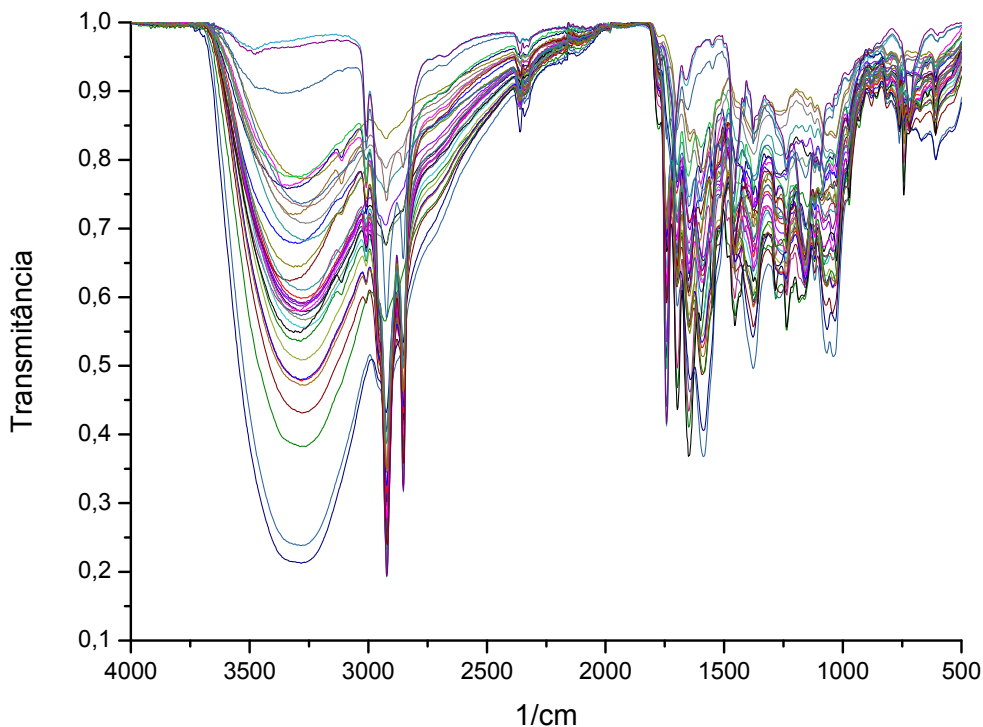
DISCRIMINAÇÃO DE CAFÉS ESPECIAIS E TRADICIONAIS A PARTIR DA
ANÁLISE DE FATORES DE DADOS ESPECTROSCÓPICOS E
CROMATOGRÁFICOS

4.2 DISCRIMINAÇÃO DE CAFÉS ESPECIAIS E TRADICIONAIS A PARTIR DA ANÁLISE DE FATORES DE DADOS ESPECTROSCÓPICOS E CROMATOGRÁFICOS

4.2.1 Análise de Fatores Aplicada aos Extratos do Planejamento Estatístico Associado – Usando como Respostas os Espectros de Espectroscopia de IV

A análise de fatores foi aplicada aos dados obtidos por espectroscopia de infravermelho (Figura 16) para explorar as diferenças nas composições químicas, através da impressão digital dos extratos, e determinar quais solventes foram os mais adequados para mostrar essas diferenças, a partir do planejamento de misturas simplex centróide de três componentes, sendo as variáveis estudadas àquelas apresentadas na Tabela 2. A matriz de dados estudada foi composta por 36 extratos e 1867 variáveis (números de onda provenientes da impressão digital).

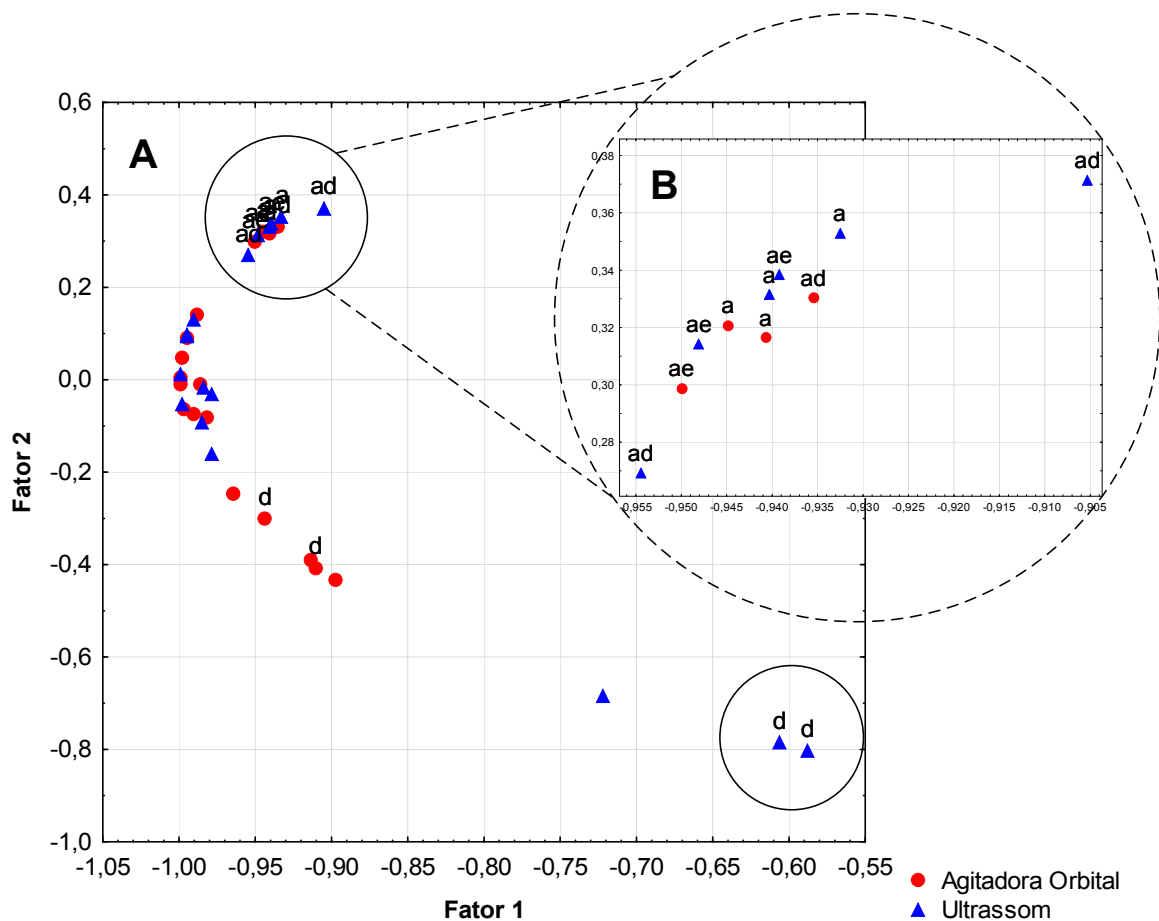
Figura 16 - Impressões digitais dos extratos obtidas por espectroscopia de IV.



Os fatores 1 e 2 explicaram respectivamente 88,95% e 9,90% de variância, resultando em 98,85% da variância total dos dados. O gráfico apresentado

na Figura 17, mostra a dispersão dos *scores* em formato que se assemelha a uma parábola. No centro dessa parábola podemos encontrar amostras sobrepostas indicando que seus espectros possuem perfis químicos semelhantes, enquanto que os espectros que possuem maior diferença na impressão digital estão localizados nos dois limites extremos dessa parábola, superior e inferior, com a maior diversidade química entre si. Na extremidade superior do fator 2 (valores positivos), encontram-se os extratos aquosos e as misturas binárias que possuem água em sua composição; na extremidade inferior do mesmo fator, valores negativos, estão extratos diclometânicos obtidos pelo método de extração com ultrassom.

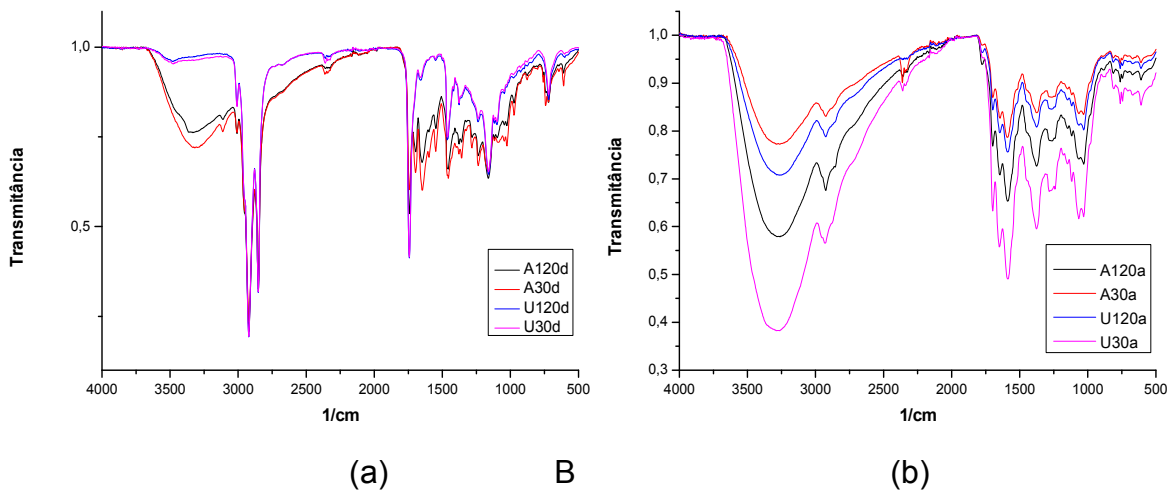
Figura 17 – Projeção dos *scores* do Fator 1 vs. Fator 2 obtidos das análises dos extratos para as impressões digitais obtidas por espectroscopia de IV (A). Ampliação dos *scores* positivos do fator 2 (B).



O perfil das amostras extraídas com diclorometano, utilizando-se a agitadora orbital, obtido com a técnica de espectroscopia no IV, estão indicadas na Figura 18. Observou-se que apesar de as amostras não se encontrarem todas na extremidade inferior do fator 2, estas estão tendendo à essa região do gráfico,

estando no mesmo lado desta “parábola” pode-se considerar que as amostras não possuem diferença significativa de perfil. Essa tendência pode ser comprovada quando observa-se as impressões digitais obtidas pelos espectros de infravermelho mostradas na Figura 18. As amostras de diclorometano apresentadas na Figura 18-a possuem perfis semelhantes entre si, porém com diferenças de intensidade das bandas entre os extratos preparados em agitadora orbital e ultrassom, sendo mais acentuadas para esse último método de extração. Já se compararmos a impressão digital obtida dos extratos diclorometânicos (Figura 18-a) e os aquosos (Figura 18-b) podemos verificar que se tratam de perfis distintos, assim como previsto pela análise dos fatores (Figura 17).

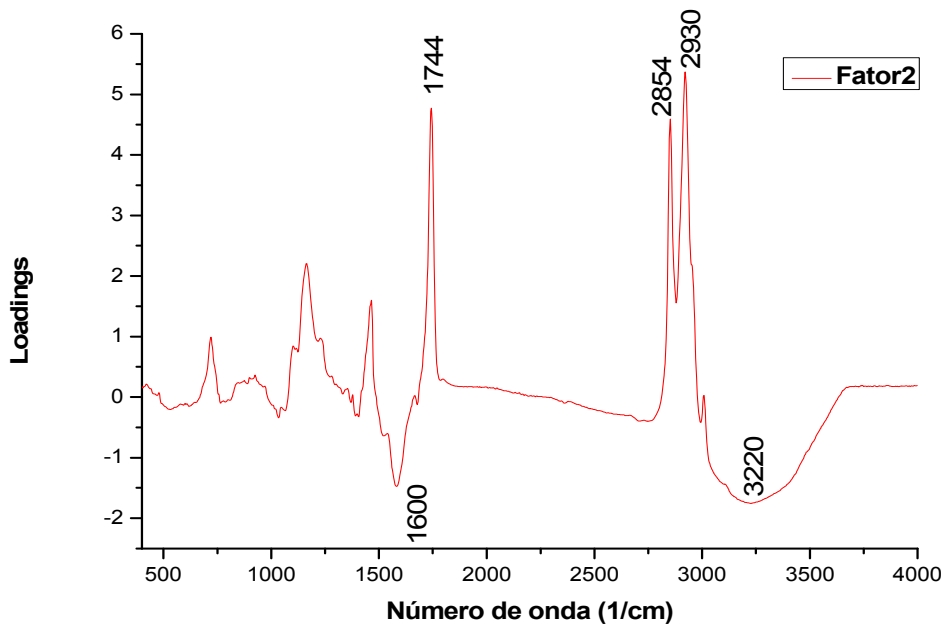
Figura 18 – Impressões digitais das amostras extraídas com diclorometano (a) e água (b) para os diferentes métodos e tempos empregados no planejamento experimental.



Os *loadings* do fator 2, Figura 19, apresentam cinco bandas que são as principais responsáveis pela diferenciação das amostras. Segundo Ribeiro et al. (2010), números de onda entre 1600 e 1700 cm^{-1} são altamente correlacionados aos ácidos clorogênicos dos cafés. Kemsley, Ruault e Wilson, (1995) estudou o sinal em 1744 cm^{-1} para cafés, indicando essa banda como sendo a vibração da carbonila (C=O) de ésteres alifáticos em cafés torrados. O mesmo autor relatou as duas bandas que podem ser vistas na faixa de 3000-2800 cm^{-1} , especificamente em 2930 e 2854 cm^{-1} para as amostras estudadas, como sendo sinais específicos para amostras de café torrado, tanto da espécie *C. arabica* quanto da *C. canephora*. E

para identificação dessas bandas, os estudos de Paradkar e Irudayaraj (2002) relatam dois picos estreitos a 2882 e 2829 cm^{-1} , correspondentes ao alongamento assimétrico do grupo de ligações C-H no grupo metil ($-\text{CH}_3$) da molécula de cafeína. A banda em 3220 cm^{-1} , é relacionada com as ligações nos grupos O-H (3650-2400 cm^{-1}) de álcoois, fenóis, ou ácidos carboxílicos, ou ainda, aos grupos N-H (3500-3100 cm^{-1}) de amins e amidas primárias e secundárias (PAVIA et al., 2010).

Figura 19 – *Loadings* do Fator 2 obtido da análise dos dados por espectroscopia de IV.



Todas as amostras em estudo foram extraídas em duplicata com diclorometano e água, e usando a agitadora orbital com agitação por 30 minutos. E os extratos brutos, foram analisados por CLAE e espectroscopia de IV e UV-Vis.

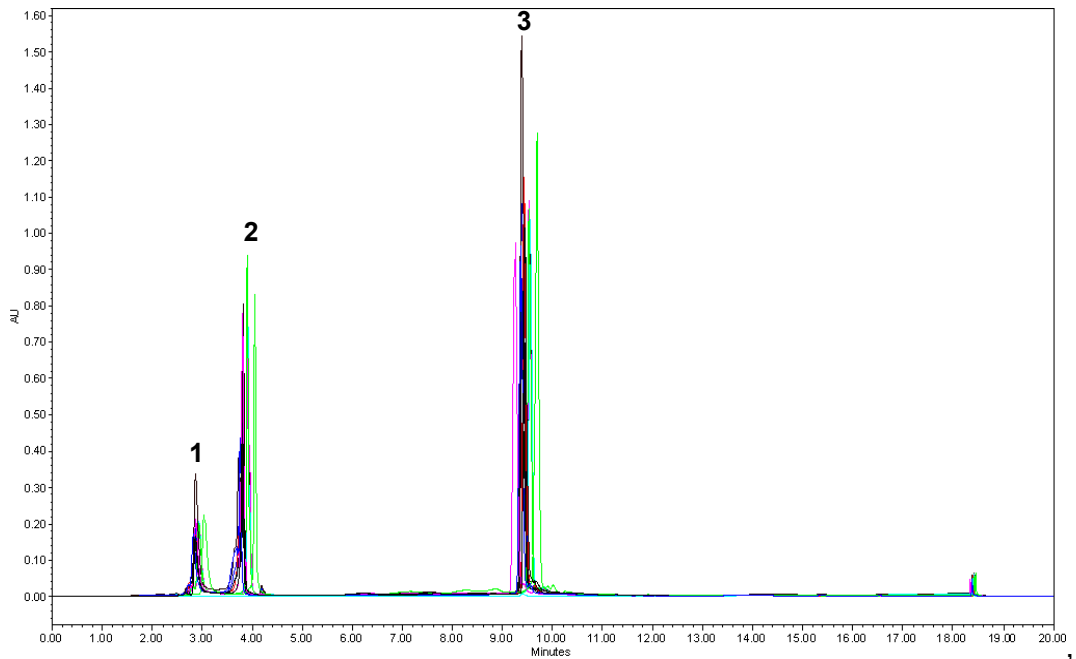
4.2.2 Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.2.2.1 Perfil metabolômico – extrato aquoso

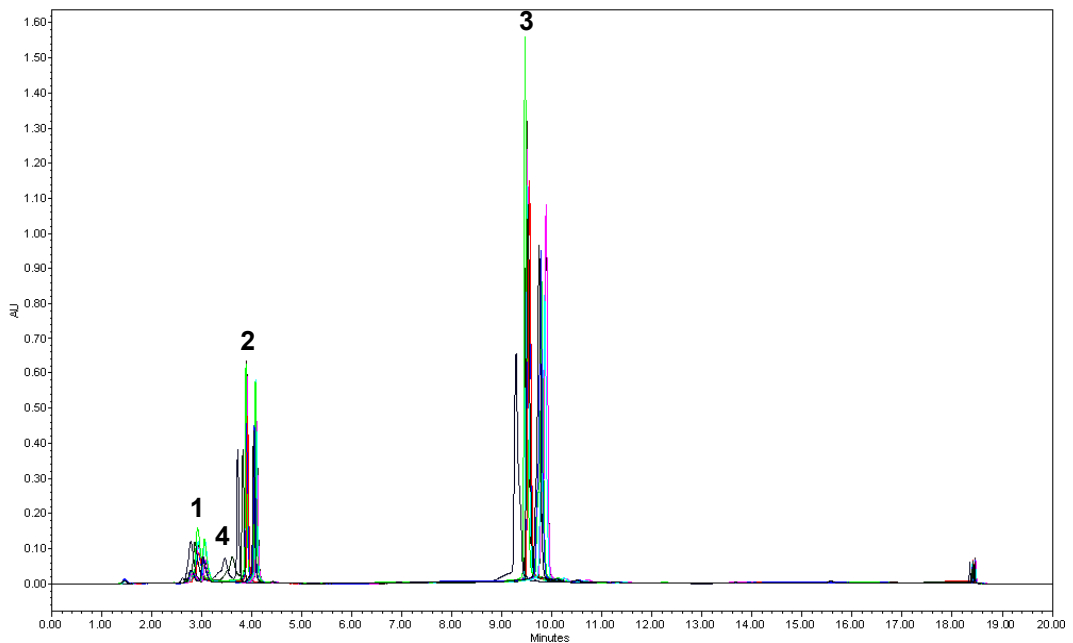
Os cromatogramas das amostras estão apresentados separadamente na Figura 20, primeiramente as quatorze amostras em duplicata dos cafés especiais (Figura 20-a) e, posteriormente, as quatorze amostras dos cafés tradicionais (Figura 20-b), totalizando vinte e oito perfis em cada caso. Podemos

observar que os cromatogramas dos extratos de cafés especiais apresentam um total de três picos distribuídos uniformemente no cromatograma, enquanto, que nos extratos dos cafés tradicionais há o aparecimento de um quarto metabólito secundário entre os picos 1 e 2.

Figura 20 – Cromatogramas dos extratos aquosos das amostras de cafés especiais (a) e tradicionais (b).



Especiais (a)

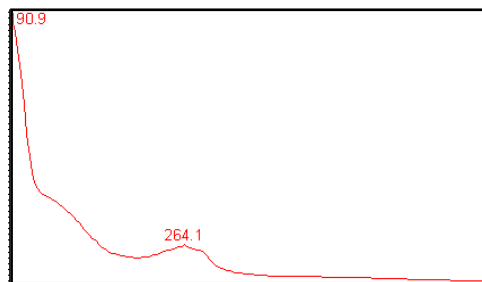


Tradicionais (b)

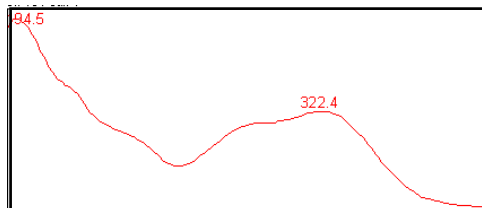
Os picos correspondem as seguintes substâncias: 1- trigonelina, 2- ácido clorogênico, 3- cafeína.

A identificação das substâncias presentes no cromatograma foi realizada por meio da injeção de padrões e comparação do tempo de retenção e espectros de absorção no UV-Vis. Os espectros ultravioleta de cada pico pode ser visto na Figura 21, sendo que o quarto pico foi o único não identificado, pois pode ser qualquer outro metabólito do café, principalmente da espécie *C. canephora*.

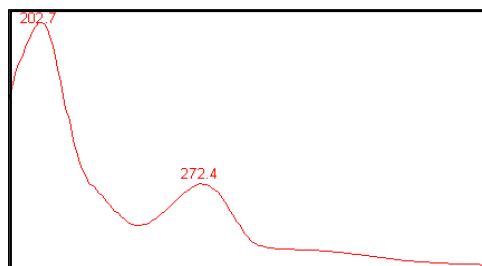
Figura 21 – Espectros Ultravioleta-Visível dos picos obtidos nos cromatogramas dos extratos aquosos de café.



Pico 1: trigonelina



Pico 2: ácidos clorogênicos



Pico 3: cafeína

Como podemos observar o perfil metabolômico das amostras apresentam muita sobreposição de sinais, ou seja, coeluição de substâncias, e para melhor discriminação entre elas, todos os dados foram avaliados de uma única vez, por meio da análise de fatores aplicada às áreas dos picos.

A matriz utilizada para a análise correspondeu a 28 amostras (extratos aquosos) e quatro variáveis (área dos picos), que no caso das amostras de cafés especiais foi considerada zero, pela inexistência deles. Com a plotagem do fator 1 (96,96%) *versus* o fator 3 (1,00%), que explicam 97,96% de variância total

dos dados, foi possível verificar a maior discriminação entre os dados.

Figura 22 – Projeção dos scores do Fator 1 vs. Fator 3 dos cromatogramas obtidos das análises dos extratos aquosos.

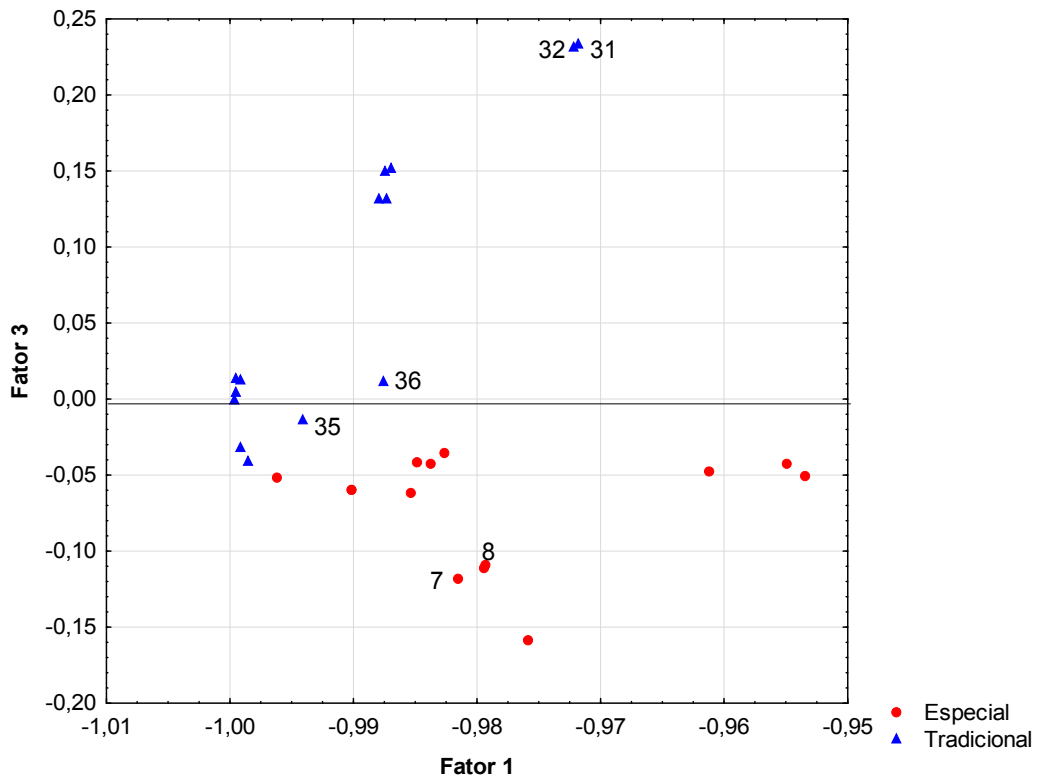
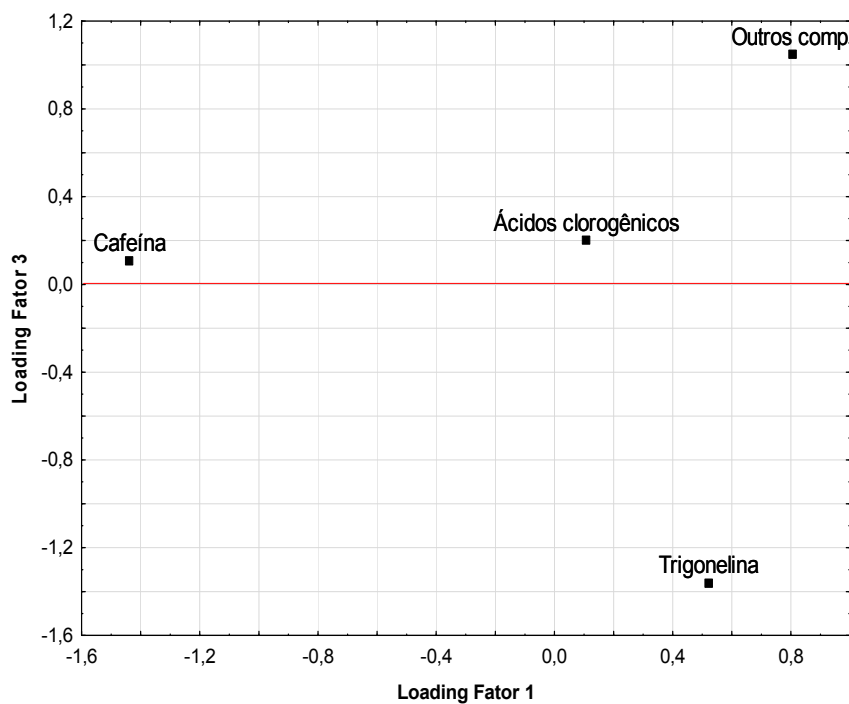
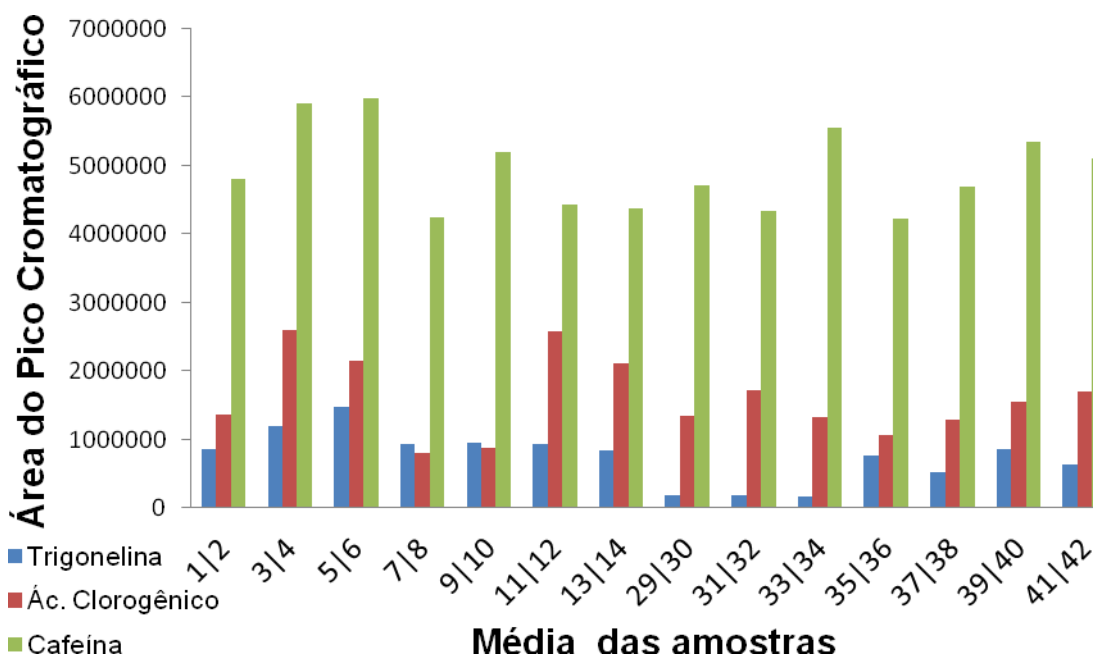


Figura 23 – Projeção dos Loadings do Fator 1 vs. Loadings do Fator 3 obtidos da análise dos dados por CLAE.



A partir dos gráficos de *scores* (Figura 22) e *loadings* (Figura 23), obtidos da análise de fatores, foi possível notar que as amostras de cafés especiais têm a maior concentração de trigonelina, um precursor para a formação de diferentes classes de compostos voláteis típicos dos cafés torrados - como pirróis (3%), piridinas (46%), pirazinas e nicotinato de metila (FLAMENT et al., 1968; TRUGO e MACRAE, 1984; DE MARIA, MOREIRA e TRUGO, 1999). Sendo que este metabólito foi o responsável, de maior peso, para a discriminação das amostras, o que pode ser comprovado, observando a Figura 24, se compararmos as amostras 7 e 8, cafés especiais, com a 31 e 32, cafés tradicionais, podemos verificar claramente essa diferença. Além disso, na análise de fatores aplicada aos dados cromatográficos, a cafeína e os ácidos clorogênicos tiveram menor peso para a discriminação das amostras, resultados que também estão de acordo com a Figura 24, observando as duplicatas marcadas 7 e 8, 31 e 32, 35 e 36, podemos perceber que quase não há diferença nas abundâncias relativas do metabólito cafeína. E quanto aos ácidos clorogênicos, os cafés especiais, em geral, possuem maior concentração desses compostos, o que está de acordo com o estudo de Zanin et al. (2016), que afirmam que estes compostos não são depreciativos, sendo possível obter bebidas de boa qualidade mesmo com altos teores de ácidos clorogênicos.

Figura 24 – Abundâncias relativas dos metabólitos identificados nas análises cromatográficas dos extratos aquosos.



Cafés especiais: 1 a 14; cafés tradicionais: 29 a 42.

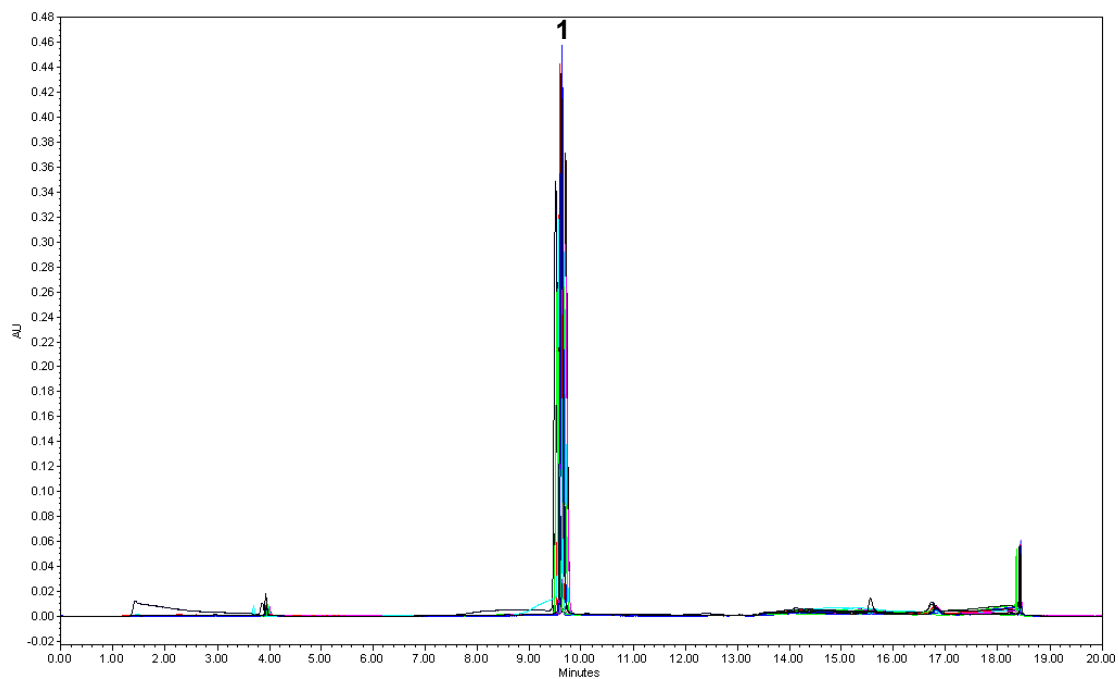
Casal et al. (2000) aplicaram a análise de componentes principais para discriminar cafés torrados, arábica e robusta, pelo conteúdo de ácido nicotínico, trigonelina e cafeína. Analisando os resultados verificaram que somente os dois últimos metabólitos são capazes de discriminar essas duas espécies, sendo que, os cafés arábica possuíram maior conteúdo de trigonelina, enquanto o café robusta maiores teores de cafeína. Como os cafés especiais, são todos da espécie *C. arabica* provenientes de grãos de alta qualidade, e os cafés tradicionais são, em sua maioria, compostos por *blends* de cafés, ou seja, misturas de diferentes variedades de café (incluindo o café robusta), percebemos que os resultados obtidos corroboram com o estudo anteriormente citado.

Além da discriminação dos cafés especiais e tradicionais, a análise de fatores nesse caso, foi útil para comprovar a pré-classificação sensorial feita dos cafés especiais, visto que as amostras estão discriminadas pelo fator 3, estando todos os cafés especiais na parte negativa e a maioria dos tradicionais na parte positiva desse fator (Figura 22). E a partir desses resultados, realizou-se análises por espectroscopia de absorção no IV e UV que constituem técnicas e equipamentos menos onerosos (se comparados às técnicas cromatográficas) e podem ser utilizados com maior rapidez em análises de rotina para a classificação do café.

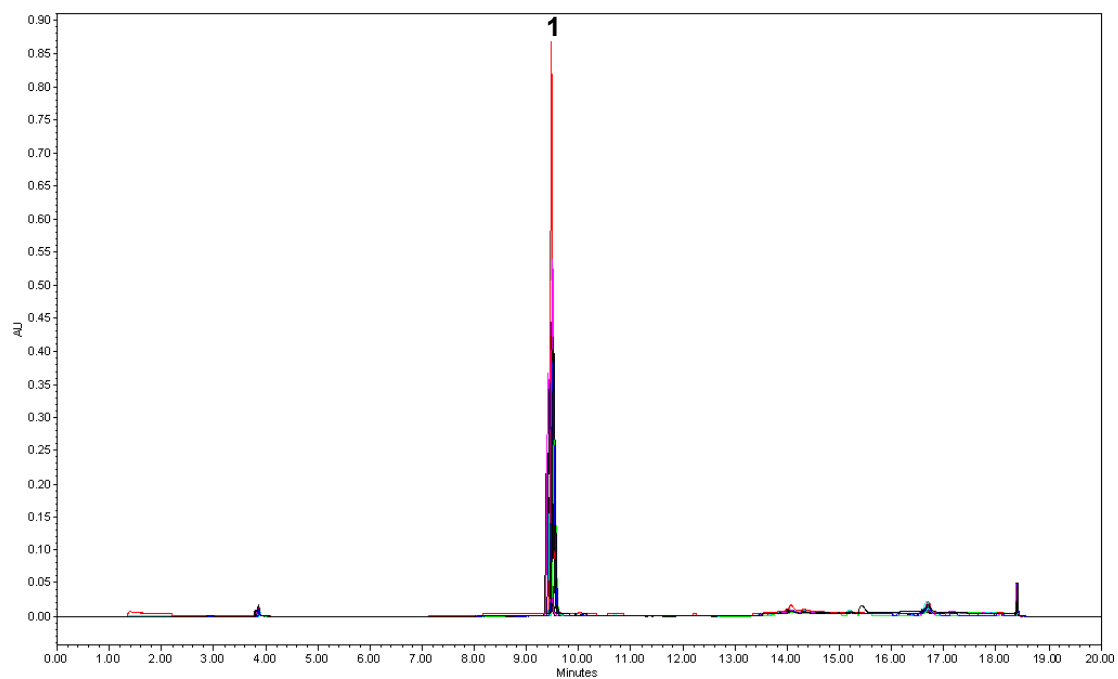
4.2.2.2 Perfil metabolômico – extrato diclorometânico

O solvente diclorometano, como já comentado, é muito seletivo para extração da cafeína (TOCI FARAH e TRUGO, 2006) e ao analisarmos os extratos de café obtidos com esse solvente por cromatografia pode-se confirmar essa seletividade, observando-se um único pico no cromatograma para o método utilizado. Os cromatogramas também são apresentados separadamente para cada tipo de amostra, especial e tradicional, bem como a impressão digital em UV, correspondente à cafeína – Figuras 25-a e 25-b e Figura 26.

Figura 25 – Cromatogramas dos extratos diclorometânicos das amostras de cafés especiais (a) e tradicionais (b).

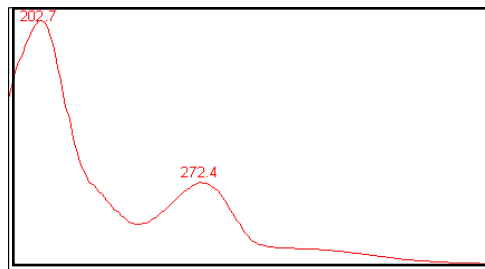


Especiais (a)



Tradicionais (b)

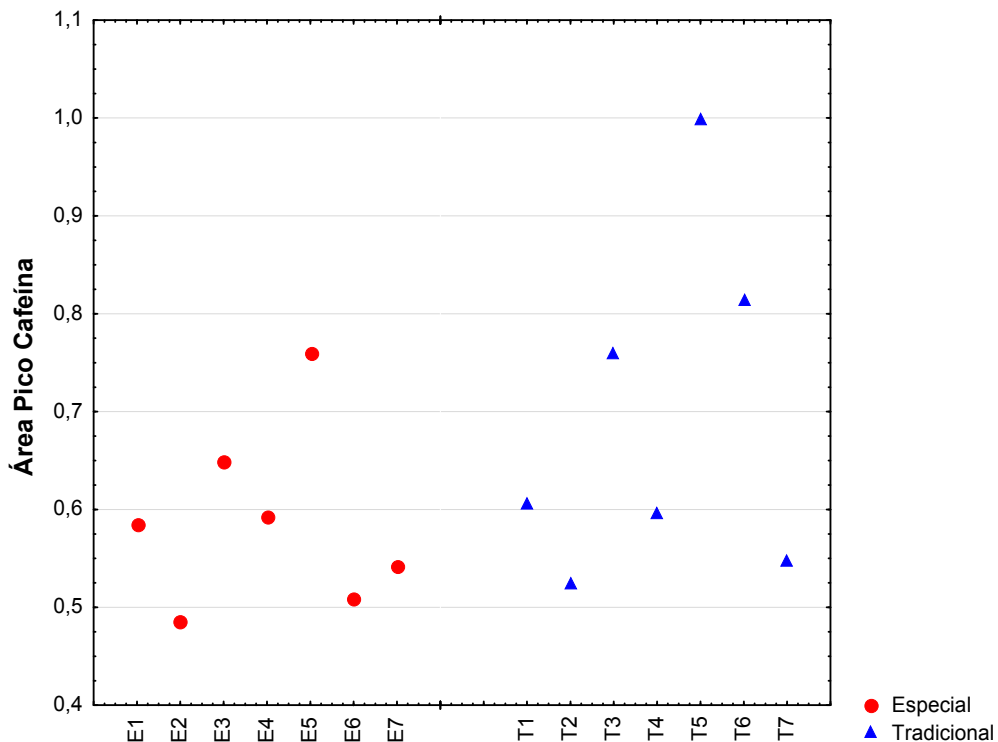
Figura 26 – Espectro ultravioleta do pico obtido no cromatograma dos extrato diclorometânico.



Pico 1: Cafeína

Com a obtenção de uma única variável (um único pico) inviabilizou-se a aplicação da análise de fatores, de modo que para melhor comparação entre esses dados, realizou-se a projeção das médias obtidas para a área do pico da cafeína de cada amostra, após normalização – Figura 27.

Figura 27 – Abundância relativa do metabólito cafeína extraída por diclorometano.



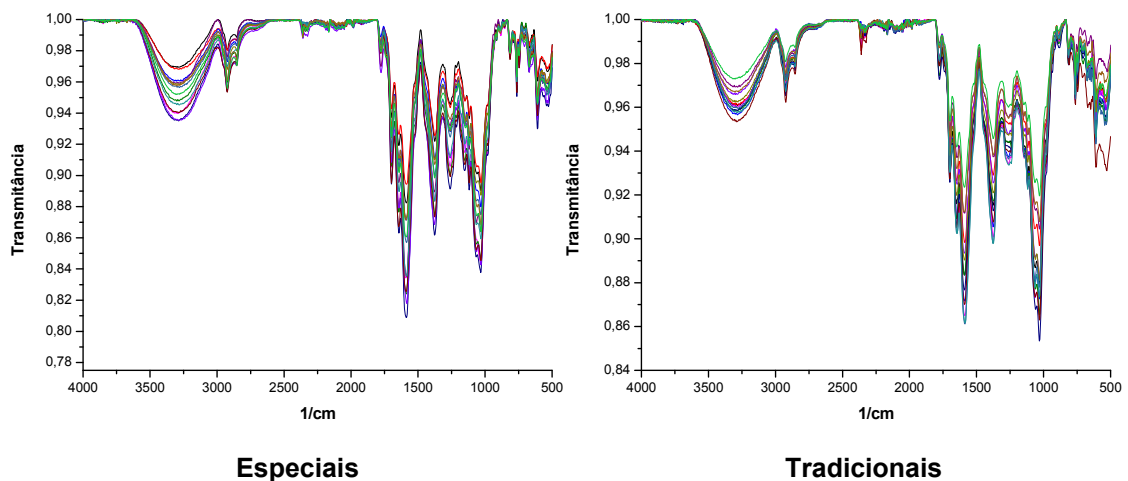
No geral podemos perceber que as amostras de cafés tradicionais, quando extraídas com diclorometano, resultam em maior abundância relativa do metabólito cafeína, quando comparadas aos cafés especiais, estando de acordo com resultados apresentados na literatura Casal et al. (2000).

4.2.3 Análises por Espectroscopia de Infravermelho

4.2.3.1 Impressões digitais – extrato aquoso

A Figura 28 apresenta as impressões digitais obtidas por espectroscopia de infravermelho, com varredura de 400 a 4000 cm^{-1} dos vinte e oito extratos aquosos para os dois tipos de cafés, especiais e tradicionais.

Figura 28 – Impressões digitais dos extratos aquosos obtidas por espectroscopia de IV.



Para melhor visualização das diferenças entre as amostras, transformou-se esses dados em uma matriz (28 x 1867), a qual foi aplicada uma análise de fatores, transformando-se esses dados em novas variáveis. Os dois primeiros fatores obtidos explicaram 99,43% da variância total dos dados, o fator 1 explicou 99,10% enquanto que o fator 2 explicou 0,33%. O gráfico dos *scores* e *loadings* desses dois fatores são apresentados na Figura 29 e 30.

Figura 29 – Projeção dos scores do Fator 1 vs. Fator 2 dos espectros obtidos das análises dos extratos aquosos obtidos por espectroscopia de IV.

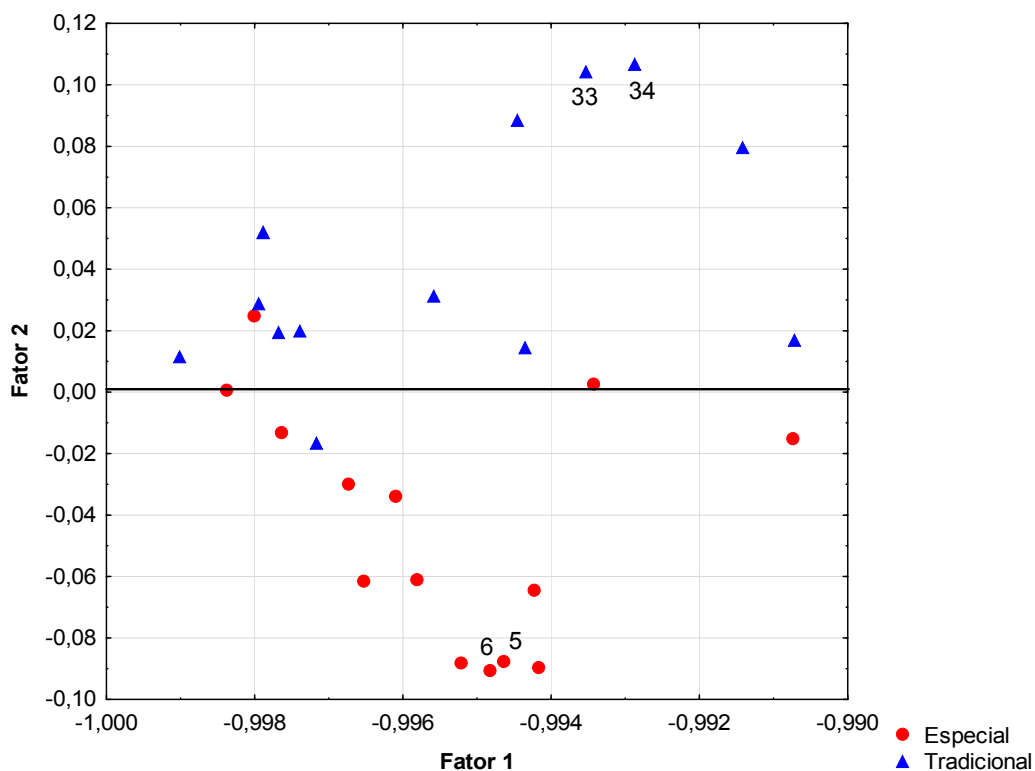
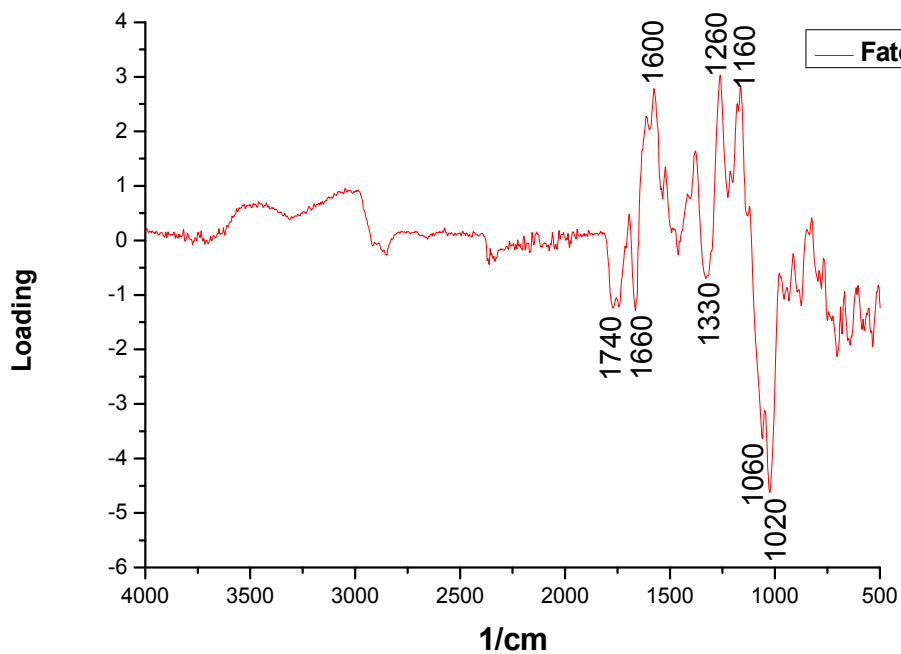


Figura 30 – Loadings do Fator 2 obtido da análise dos extratos aquosos por espectroscopia de IV.



Podemos observar uma separação entre os dois tipos de cafés, apesar de algumas amostras encontrarem-se sobrepostas, considerando o fator 2. Dessa forma, buscou-se entender através do gráfico de *loadings* as bandas que mais tiveram peso para promover a separação das amostras, que estão mais anticorrelacionadas pelo fator 2. Assim, considera-se as seguintes bandas: 1740, 1660, 1600, 1330, 1260, 1160, 1060 e 1020 cm^{-1} – Figura 30.

As bandas em 1740 e 1660 cm^{-1} foram observadas por Wang, Fu e Lim (2011) que analisaram cafés torrados da espécie arábica por espectroscopia de infravermelho, sendo que no estudo citado as bandas em questão apareceram em 1739 e 1660 cm^{-1} , especificamente, e os autores afirmam consistirem do alongamento da ligação C=O de polissacarídeos e C=C de lipídios e ácidos graxos, respectivamente. Além disso, Ribeiro et al. (2010) relataram que números de onda entre 1600 e 1700 cm^{-1} são altamente relacionados aos ácidos clorogênicos dos cafés.

Em 1330 cm^{-1} temos o sinal que pode estar especificamente relacionada a trigonelina, outro dos principais compostos do café, por ser uma molécula formada por uma piridina, apresenta bandas entre 1300 e 1600 cm^{-1} (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2005).

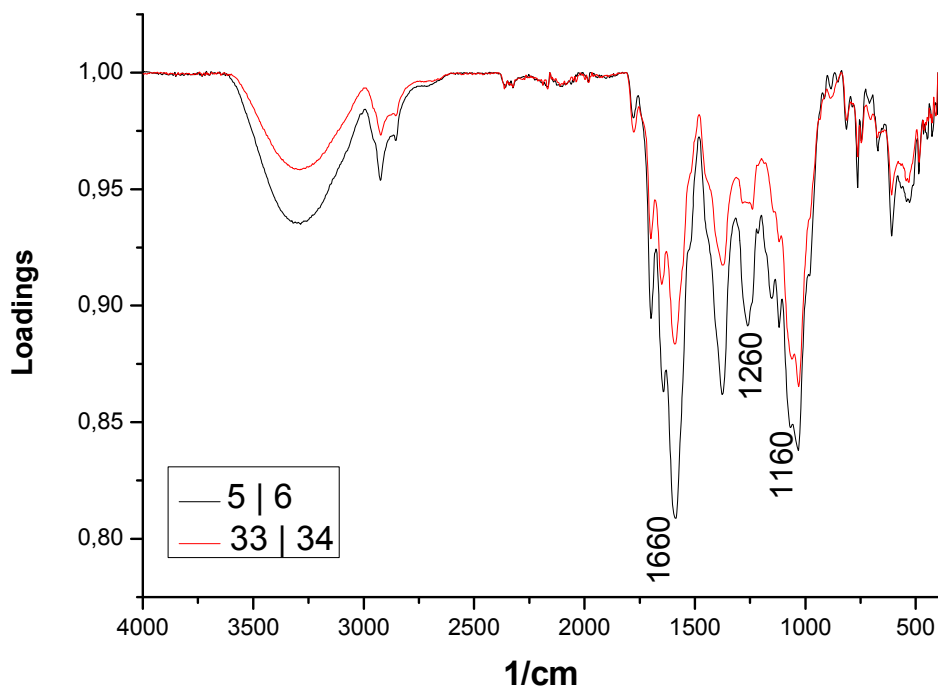
A partir dos estudos de Craig, Franca e Oliveira (2012) que avaliaram o potencial da técnica de espectroscopia de infravermelho para a separação de cafés defeituosos e não defeituosos pode-se correlacionar as bandas em 1260, 1160 e 1060 cm^{-1} aos ácidos clorogênicos, pois relataram bandas próximas a essas em 1153, 1161 e 1053 cm^{-1} , e de acordo com Kemsley, Ruault e Wilson (1995), Briandet, Kemsley e Wilson (1996) e Lyman et al. (2003), os ácidos clorogênicos apresentaram forte absorção na região de 1300-1150 cm^{-1} .

De acordo com Barbin et al. (2014), em um trabalho de revisão sobre a aplicação da técnica de espectroscopia de infravermelho para avaliação da qualidade e composição de cafés, mostra a banda em 1020 cm^{-1} que pode estar relacionada a vibração das ligações nos grupos RNH ou ROH, como não se relataram aminas alifáticas em amostras de café torrado, a banda pode ser associada a ligação R-OH, mais precisamente dos carboidratos, provavelmente tratando-se das ligações C-O ou C-H. Assim, como é relatado por Sablinskas, Steiner e Hof (2003) e Wang et al. (2009), com números de onda de 1400-900 cm^{-1} , as bandas são caracterizadas por vibrações de vários tipos de ligações, incluindo C-

H, C-O, C-N e P-O, e ainda observado por Briandet, Kemsley e Wilson, (1996) e Kemsley, Ruault e Wilson (1995) a ocorrência de carboidratos com várias bandas de absorção nessa região.

Observando-se a Figura 31, destaca-se as bandas 1160, 1260 e 1600 cm^{-1} que ao analisar a Figura 30, são bandas que correspondem aos *loadings* positivos do fator 2. Por se tratar de dados em transmitância, que é inversamente proporcional a concentração, podemos concluir que essas bandas estarão em maior intensidade nas amostras de cafés especiais (duplicata 5 e 6), o que é comprovado pela Figura 31. Assim, concluí-se que os cafés especiais possuem maior concentração de ácidos clorogênicos, pela maior intensidade das bandas 1160 e 1260 cm^{-1} , ou ainda devido a banda em 1660 cm^{-1} , que pode estar relacionada tanto aos ácidos clorogênicos como aos lipídios e ácidos graxos.

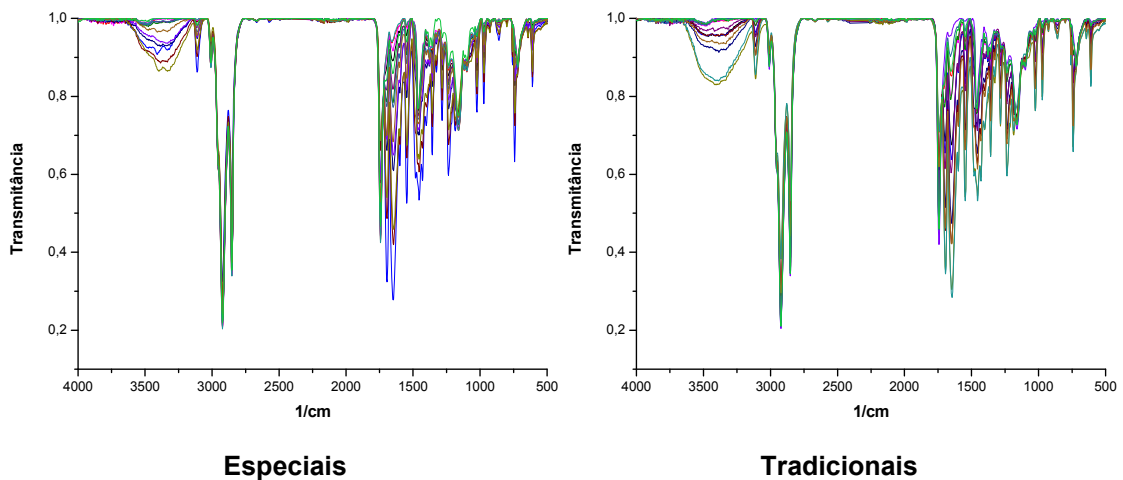
Figura 31 - Média das impressões digitais das duplicatas 5 e 6, 33 e 34 dos extratos aquosos obtidas por espectroscopia de IV.



4.2.3.2 Impressões digitais – extrato diclorometânico

A Figura 32 traz os espectros de infravermelho de 400 a 4000 cm^{-1} das vinte e oito amostras extraídas com diclorometano para os dois tipos de cafés, especiais e tradicionais.

Figura 32 – Impressões digitais dos extratos diclorometânicos obtidas por espectroscopia de IV.



A partir dos dados espectroscópicos obteve-se uma matriz composta por 28 amostras (extratos) e 1867 variáveis (números de onda provenientes da impressão digital), a qual foi aplicada a análise de fatores para tentar discriminar ou identificar alguma banda que promova diferenciação entre as amostras extraídas com diclorometano. A projeção do fator 1 (90,50%) com o fator 5 (0,04%) foi a que melhor resultou na separação entre os dois tipos de cafés, explicando 90,54% da variância total dos dados. Nas Figuras 33 e 34 encontram-se os gráficos de *scores* e *loadings*.

Figura 33 – Projeção dos scores do Fator 1 vs. Fator 2 dos espectros obtidos das análises dos extratos diclorometânicos obtidos por espectroscopia de IV.

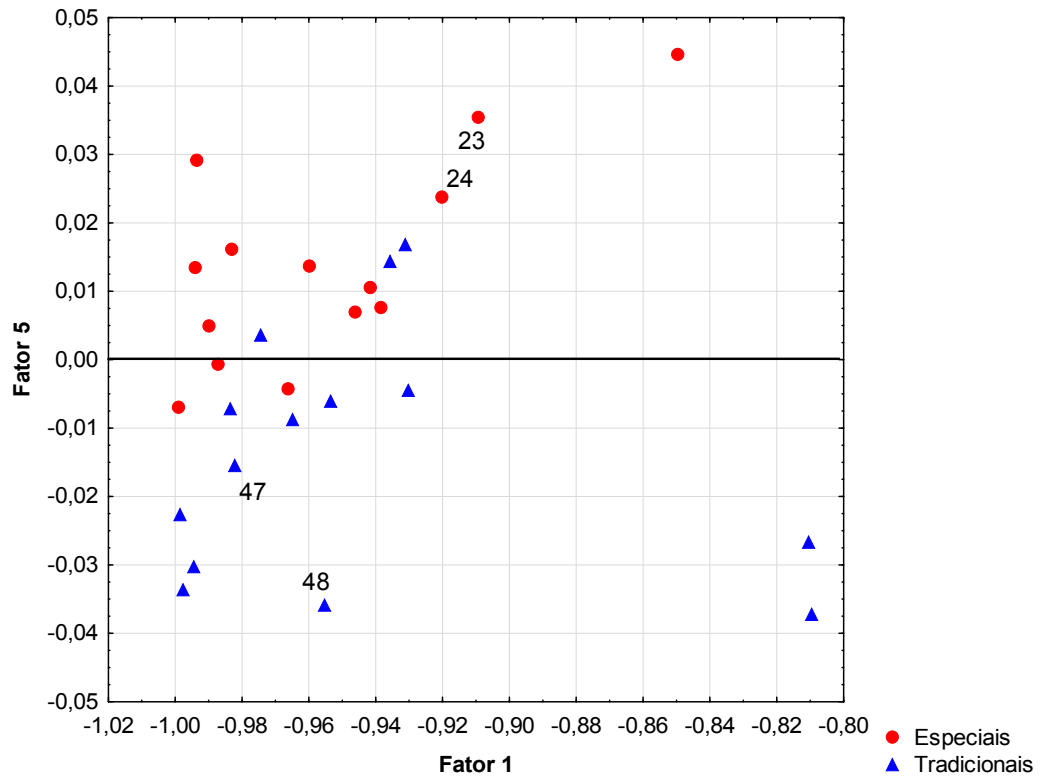
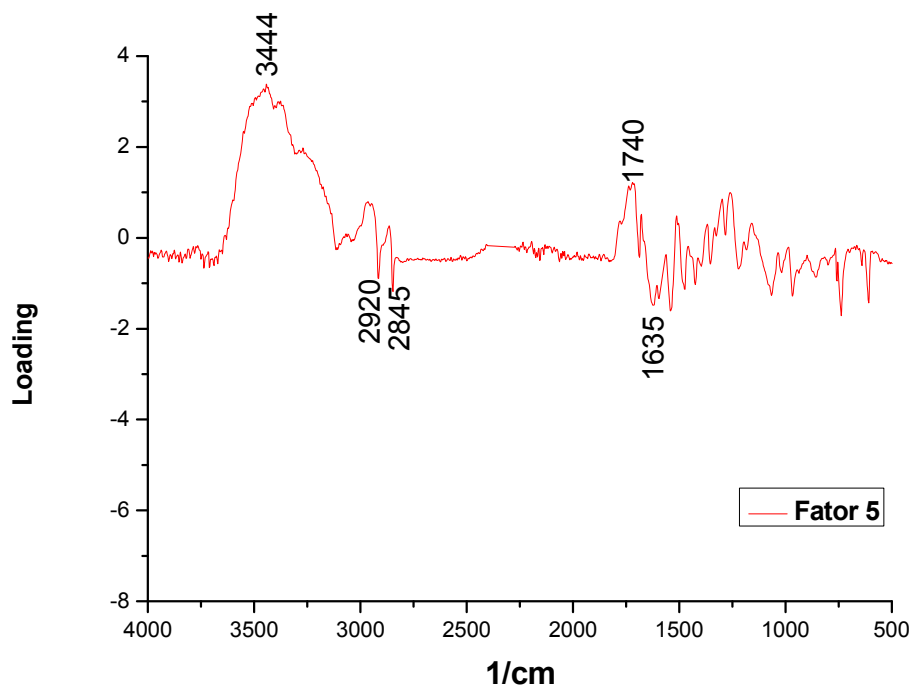


Figura 34 – Loadings dos Fatores 1 e 5 obtido da análise dos extratos diclorometânicos por espectroscopia de IV.



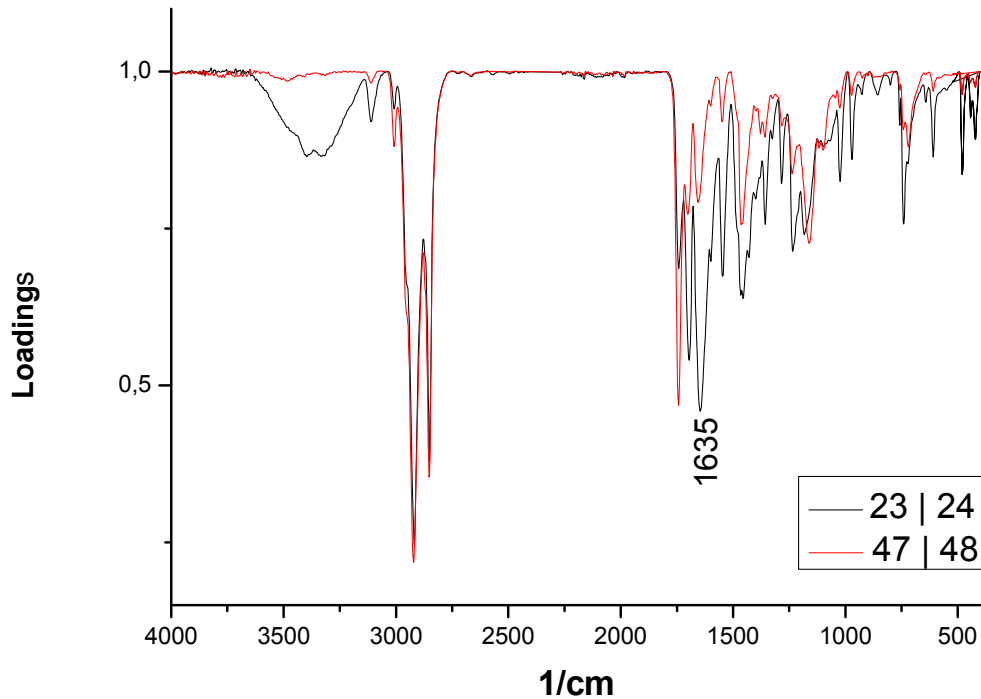
Nesse caso observa-se uma menor discriminação entre os dois tipos de amostras (cafés especiais e tradicionais), se comparada a análise de fatores dos extratos aquosos, com maior sobreposição de alguns *scores* – Figura 33. Para entender a separação que ocorre nesse caso, analisou-se os *loadings* do fator 5 (Figura 34) em que são evidenciadas, principalmente, as seguintes bandas: 3444, 2920, 2845, 1740 e 1635 cm^{-1} , pelo fator 1.

A banda em 3444 cm^{-1} , é a de maior peso para as amostras que estão anticorrelacionadas pelo fator 5, ou seja, as amostras que estão em valores negativos desse fator discriminam-se daquelas que estão em valores positivos em decorrência da correlação dessa banda com as ligações nos grupos O-H (3650-2400 cm^{-1}) de álcoois, fenóis, ou ácidos carboxílicos, ou ainda, nos grupos N-H (3500-3100 cm^{-1}) de amins e amidas primárias e secundárias (PAVIA et al., 2010). Considerando-se os compostos geralmente encontrados no café, provavelmente essa banda corresponde aos compostos fenólicos que possuem diversas hidroxilas em sua composição.

Ainda observando os *loadings* do mesmo fator, porém com menor intensidade, as bandas em 2920-2845 cm^{-1} relacionadas ao estiramento assimétrico de ligações C-H do grupo metil da molécula da cafeína (2800 – 3000 cm^{-1}) confirmado por Craig, Franca e Oliveira (2012). Em 1740 cm^{-1} , correlaciona-se com as bandas encontradas em cafés torrados, relacionadas a vibração da carbonila C=O, para ésteres alifáticos ou lipídios, sendo os últimos associados à carbonila da função éster nos triglicerídeos ou a carbonila dos ácidos carboxílicos nos ácidos graxos livres (WANG, FU e LIM, 2011).

E a banda em 1635 cm^{-1} , associa-se aos ácidos clorogênicos, assim como relata Ribeiro et al. (2010) que números de onda entre 1600 e 1700 cm^{-1} são altamente relacionados a esses compostos nos cafés. Essa banda foi destacada na Figura 35, em que é possível comprovar que os cafés especiais (duplicata 23 e 24), que estão em valores positivos do fator 5 (Figura 34), possuem maior concentração desses compostos, dados que corroboram com os *loadings* negativos do fator 5 para essa banda em específico (dados em transmitância, inversamente proporcionais a concentração desse metabólito).

Figura 35 - Média das impressões digitais das duplicatas 23 e 24, 47 e 48 dos extratos diclorometânicos obtidas por espectroscopia de IV.



4.2.4 Análises por Espectrofotometria de Ultravioleta-visível

4.2.4.1 Impressões digitais - extrato aquoso

As impressões digitais das vinte e oito amostras extraídas com água foram registradas também usando a espectrofotometria de absorção no UV-Vis, na faixa espectral de 190 a 800 nm (Figura 36).

Para auxiliar na interpretação dos resultados elaborou-se uma matriz composta por 28 extratos e 800 variáveis, correspondentes aos comprimentos de onda em nm, obtidos do espectro de ultravioleta-visível com os quais obteve-se a análise de fatores. A projeção do fator 1 (99,59%) com o fator 2 (0,40%) é apresentada na Figura 37, e esses fatores juntos explicam 99,99% da variância total dos dados obtidos. O espectro que representa os *loadings* é apresentado na Figura 38.

Figura 36 – Impressões digitais dos extratos aquosos na região de absorção do UV-Vis.

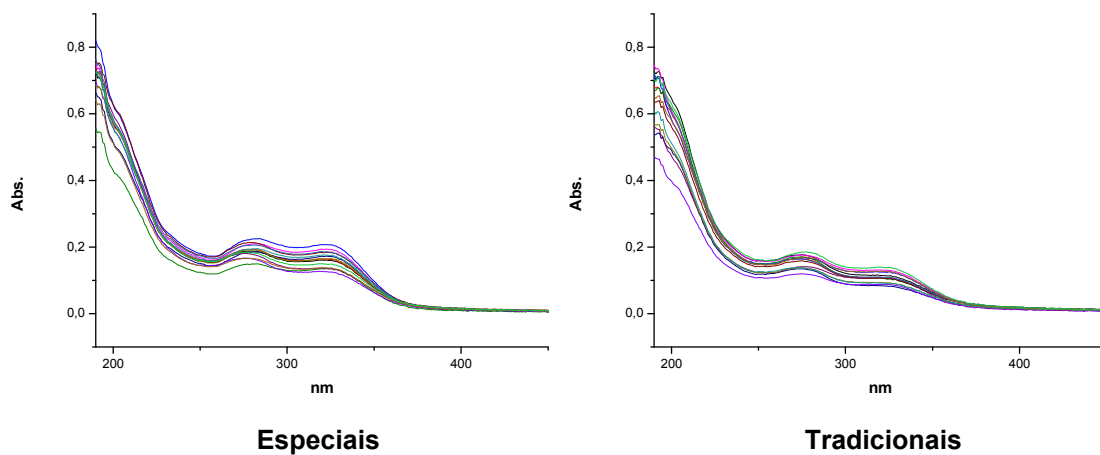
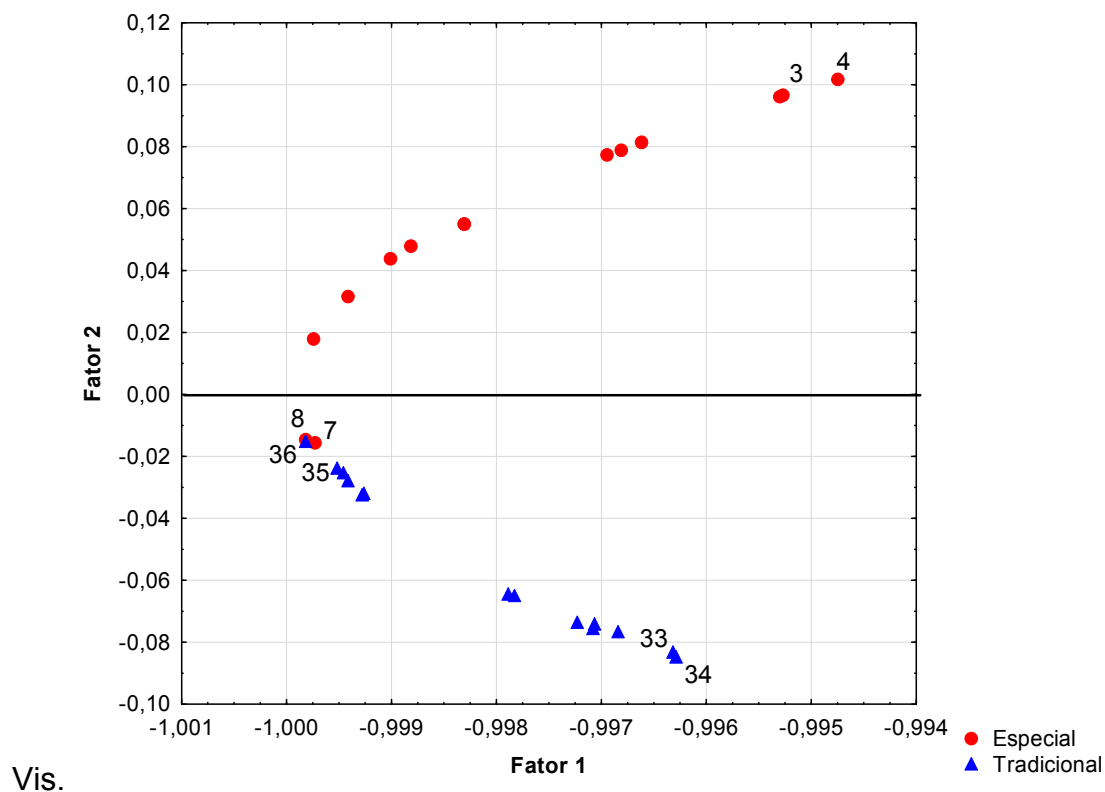
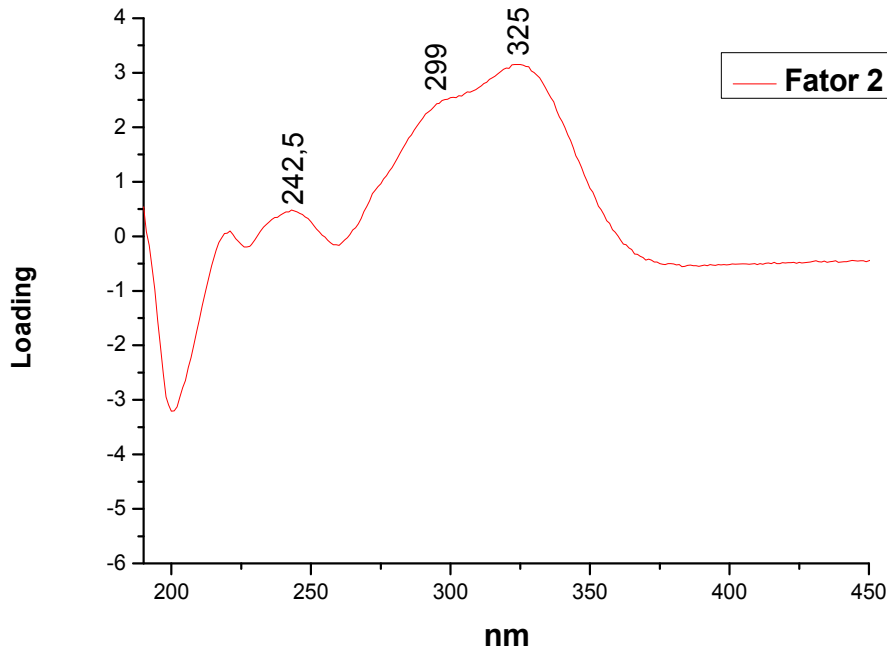


Figura 37 – Projeção dos scores do Fator 1 vs. Fator 2 dos espectros obtidos das análises dos extratos aquosos na região de absorção do UV-



Vis.

Figura 38 – *Loadings* do Fator 2 obtido da análise dos extratos aquosos por espectrofotometria UV-Vis.



Ao analisar a projeção do fator 1 *versus* fator 2 (Figura 37) verificamos alta separação entre as amostras de café especial e tradicional, sendo o fator 2 àquele que resulta nessa diferenciação, ou seja, contém a informação química responsável pela discriminação entre os tipos de cafés.

Verifica-se, pelo espectro que representa os *loadings* do fator 2 (Figura 38), três máximos que se destacam: 242,5, 299 e 325 nm. Um estudo realizado por Belay et al. (2008) traz que o espectro de absorção UV-Vis de um padrão de cafeína, solubilizado em água, encontra-se na região de 243-302 nm, à temperatura ambiente, com máximo em 272 nm, o que explicaria a banda em 242,5.

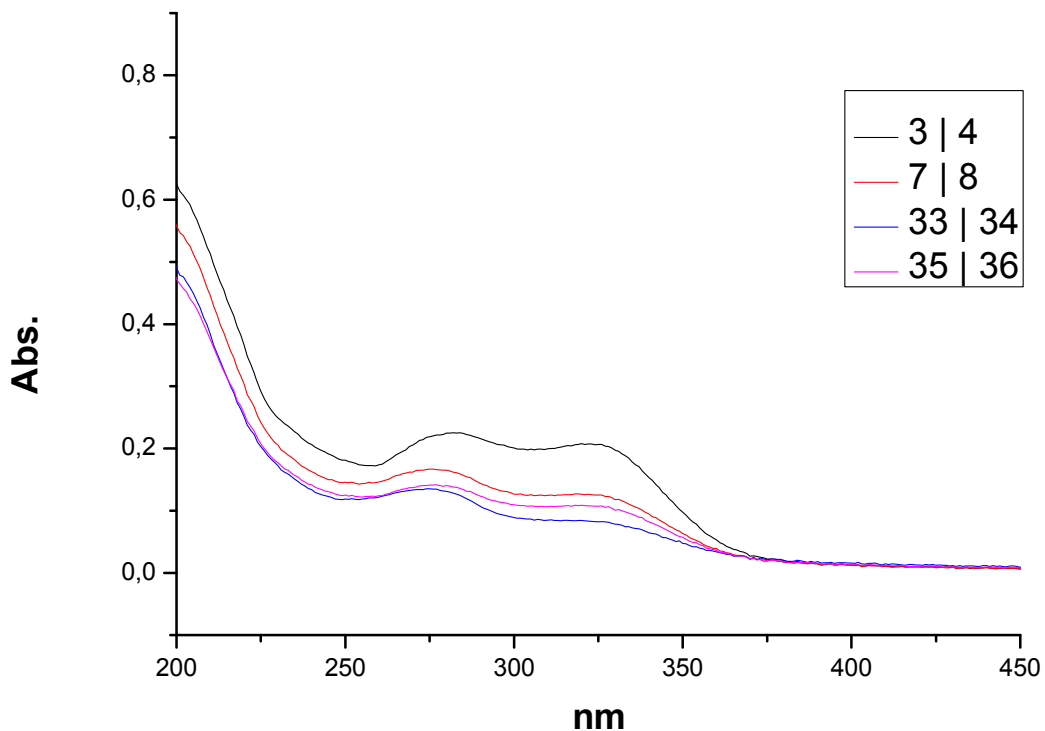
Segundo Souto et al. (2010) a região entre 225-353 nm está associadas à absorção de cafeína, ácidos clorogênicos e trigonelina. Sendo utilizado, para análise desses metabólitos separadamente os seguintes comprimentos de onda: 326 (máximo) e 300 nm para os ácidos clorogênicos; 272 nm para a cafeína; e 265 (máximo) e 272 nm para trigonelina (MOREIRA et al., 2014; AMUTA et al., 2011; WAKSMUNDZKA-HAJNOS e SHERMA, 2011; MACRAE e BEAUMONT, 1987).

Como a trigonelina apresenta sobreposição com a cafeína, de acordo com os autores já citados e pelo máximo dos *loadings* corresponder a banda

em 325 nm, pode-se concluir que a concentração de ácidos clorogênicos foi o responsável pela discriminação entre os cafés especiais e tradicionais, o que corrobora com as impressões digitais apresentadas na Figura 39, que apresentam algumas duplicatas (identificadas na Figura 37) e com o estudo de Guizzellini et al. (2018) que relacionam os ácidos clorogênicos à boa qualidade da bebida do café.

Em comparação com a análise utilizando-se o espectro na região do infravermelho, provavelmente obteve-se melhor separação e discriminação por análises com absorção no UV-Vis devido a não absorção dos carboidratos nessa região do espectro, entre 240-325 nm.

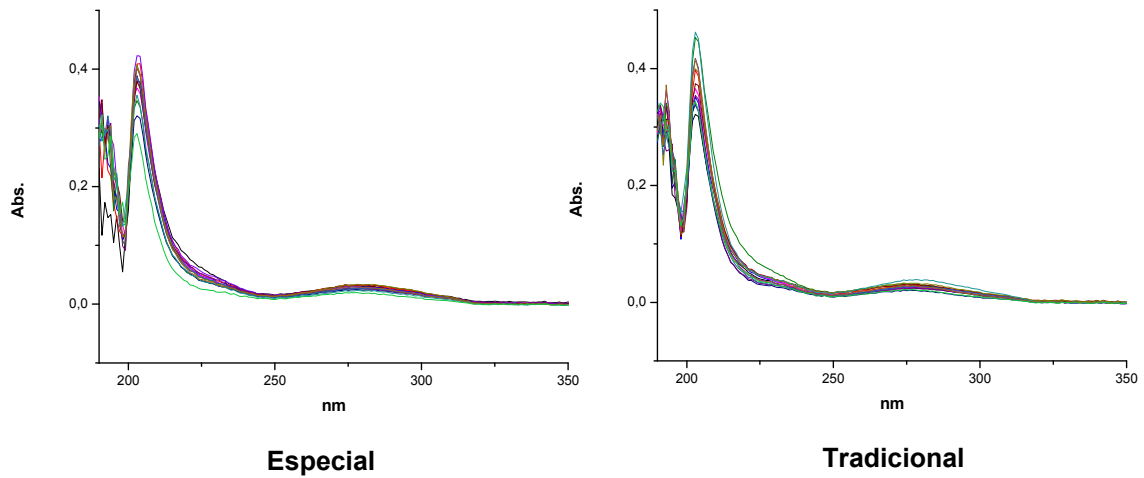
Figura 39 - Média das impressões digitais das duplicatas 3 e 4, 7 e 8, 33 e 34, 35 e 36 dos extratos aquosos obtidos por UV-Vis.



4.2.4.2 Impressões digitais - extrato diclorometânico

Os espectros obtidos das análises dos extratos diclorometânicos das vinte e oito amostras na região de absorção no UV-Vis, de 190 a 800 nm, são mostrados na Figura 40.

Figura 40 – Impressões digitais dos extratos diclorometânicos na região de absorção do UV-Vis.



Devido a sobreposição dos espectros, aplicou-se então a análise de fatores para os dados, constituídos de uma matriz (28 x 800), sendo que os fatores 1, 2, explicaram 98,96 e 0,65% da variância dos dados respectivamente, a projeção desses dados é apresentada na Figura 41, e o espectro que representa os *loadings* é apresentado na Figura 42.

Figura 41 – Projeção dos scores do Fator 1 vs. Fator 2 dos espectros obtidos das análises dos extratos diclorometânicos na região de absorção do UV-Vis.

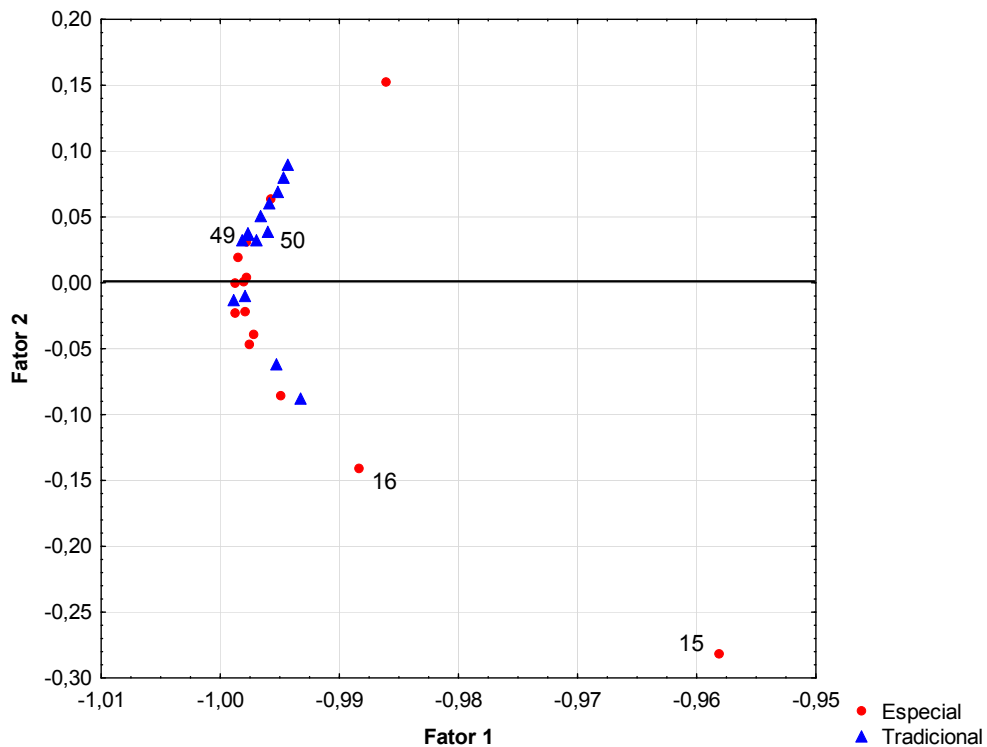
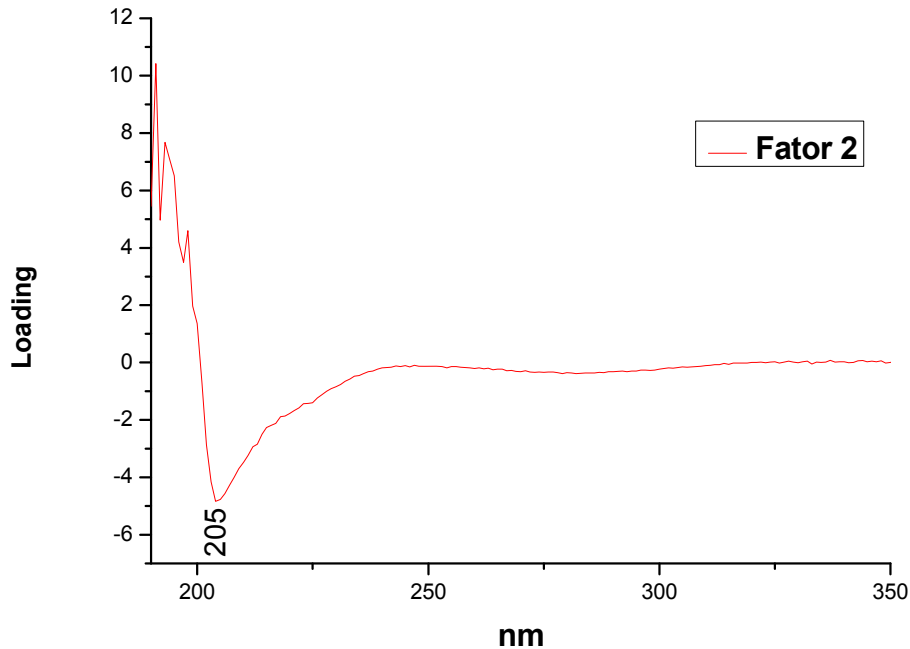


Figura 42 – *Loadings* do Fator 2 obtido da análise dos extratos diclorometânicos por espectrofotometria UV-Vis.

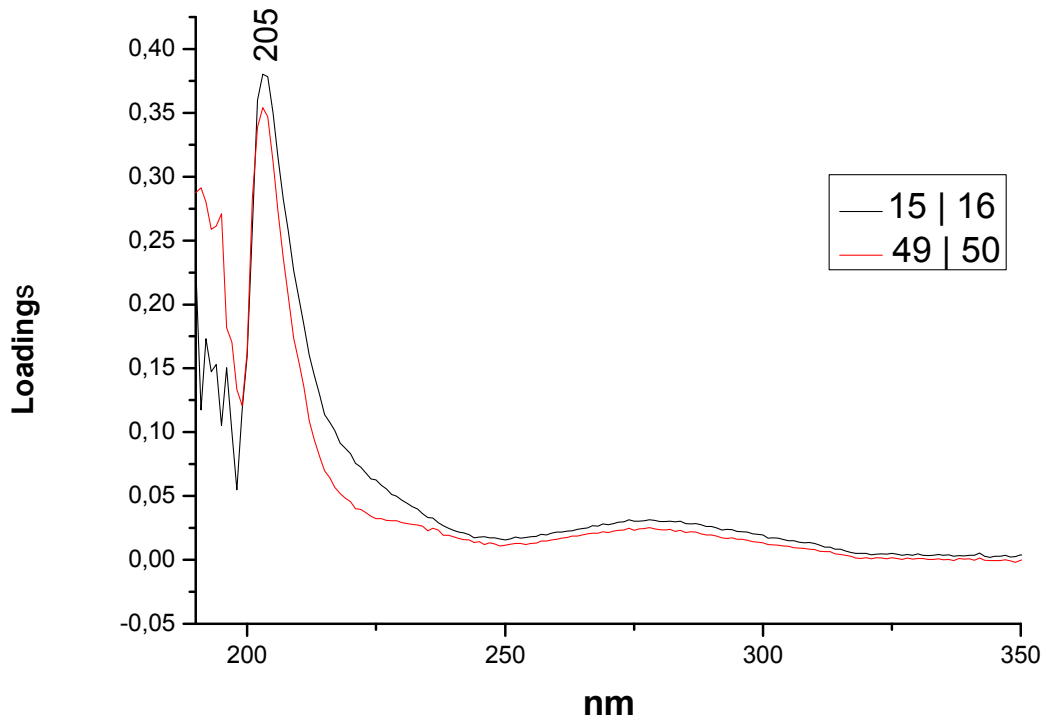


Como pode-se observar pelas projeções do fator 1 versus fator 2, Figura 41, ocorre uma singela separação entre os dois tipos de amostras estudadas. Segundo Veloso et al. (2012) os espectros de absorvância entre 190 a 210 nm são atribuídos aos ácidos orgânicos e lipídios, no caso dos dados analisados mais especificamente os lipídios, pelo caráter apolar do solvente extrator (diclorometano), de modo que a existência desses picos de alta intensidade no início do espectro – Figura 42, estão de acordo com os resultados obtidos dos espectros de IV, principalmente relacionados a banda em 1740 cm^{-1} , correspondente aos lipídios. Esses dados estão de acordo com o *loading* do fator 2 (Figura 42) e das médias das impressões digitais das amostras assinaladas na Figura 41 que são apresentadas na Figura 43, com maiores valores de lipídios para a duplicata dos cafés especiais (15 e 16), sendo o conteúdo lipídico também relacionado à boa qualidade da bebida por Guizellini et al. (2018).

Além disso, o solvente diclorometano foi responsável por extrair majoritariamente a cafeína, sendo as abundâncias relativas muito próximas desse metabólito para os dois tipos de cafés, Figura 27, concluindo-se que ele não pode ser usado para discriminação das amostras, quando a extração é feita somente com diclorometano puro, devendo-se seguir métodos de extrações específicos para

esse metabólito para confirmar seu potencial como marcador para diferenciação de cafés especiais e tradicionais.

Figura 43 - Média das impressões digitais das duplicatas 15 e 16, 49 e 50 dos extratos diclorometânicos obtidos por UV-Vis.



5 CONCLUSÃO

Com os resultados da análise de fatores para o planejamento de misturas escolheu-se então trabalhar com os dois solventes que mais apresentaram diferenças de perfis químicos pela impressão digital obtida por espectroscopia de infravermelho: diclorometano e água. A água, mostrou-se, por meio da aplicação das análises quimiométricas nos dados espectroscópicos e cromatográficos das amostras, ser o solvente que melhor resultou na discriminação entre as amostras de cafés especiais e tradicionais. Este resultado vem de encontro com a Química Verde, que visa a não utilização de solventes clorados, além disso a água é o solvente usado para a preparação da bebida do café e também na avaliação sensorial para sua classificação.

A partir do planejamento fatorial, com a avaliação dos fatores método e tempo de extração, concluiu-se que além de se obter maiores rendimentos com a agitadora orbital, ainda havia a possibilidade de se trabalhar com a redução do tempo de extração, optando-se por tempos de 30 minutos para a extração das amostras.

Provavelmente pela diversidade de compostos que podem haver nessas amostras, a espectroscopia de absorção no IV acaba sendo uma técnica investigativa, pois abrange a detecção de diversos grupos funcionais, por absorção da radiação característica das ligações das diversas moléculas constituintes do extrato e que podem ser utilizadas como impressão digital, mas que não é tão eficiente quanto a espectrofotometria UV-Vis para a discriminação das amostras de cafés especiais e tradicionais, realizada por meio da análise de fatores (ferramenta quimiométrica). Assim como a espectroscopia de IV, a cromatografia líquida de alta eficiência não foi tão eficiente quanto a espectrofotometria UV-Vis para a discriminação das amostras.

Embora a espectrofotometria de absorção UV-Vis não seja uma ferramenta para elucidação estrutural, o espectro traz informações relacionadas à composição molecular dos extratos e a partir dos resultados obtidos nesse trabalho demonstra ser a técnica mais adequada, entre as estudadas, para a discriminação de amostras de cafés torrados especiais e tradicionais, sendo uma ferramenta potencial para ser utilizada no controle de qualidade nas indústrias e torrefações.

REFERÊNCIAS

- ADBI, H.; WILLIAMS, L. J. **Principal component analysis**. 2010 John Wiley & Sons, Inc. v. 2. Disponível em: <www.wiley.com/wires/compstats> Acesso em: 20 mar 2018.
- ABIC – Associação Brasileira da Indústria de Café. **Brazilian Association of Coffee Industry** (Technical information). Disponível em:<<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#1389>>. Acesso em: 12 jan. 2017a.
- ABIC – Associação Brasileira da Indústria de Café. **Dicas do café**. Disponível em:<<http://abic.com.br/cafe-com/dicas-do-cafe/>>. Acesso em: 12 jan. 2017b.
- AKIYAMA, M.; MURAKAMI, K.; IKEDA, M.; IWATSUKI, K.; KOKUBO, S.; WADA, A.; TOKUNO, K.; ONISHI, M.; IWABUCHI, H.; TANAKA, K. Characterization of Flavor Compounds Released During Grinding of Roasted Robusta Coffee Beans. **Food Sci. Technol. Res.**, v. 11, n. 3, p. 298-307. 2005.
- ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; ZARDO, D. M.; DEMIATE, I. M.; NOGUEIRA, A.; MAFRA, L. I. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 149, p. 151-158, 2014.
- AMUTA, O. P.; NNAMANI, P. O.; MUSA, A. D.; NWODO, O. F. C. Three pyridinium alkaloids may account for the antibiotic effect of the seed of *Abrus precatorius*. **Der Chemica Sinica**, v. 2, p. 42-45, 2011.
- ANTONIO, A. G.; I'ORIO, N. L. P.; PIERRO, V. S. S.; CANDREVA, M. S.; FARAH, A.; DOS SANTOS K. R. N.; MAIA, L. C. Inhibitory properties of *Coffea canephora* extract against oral bacteria and its effect on demineralisation of deciduous teeth. **Arch. Oral Biol.**, v. 56, n. 6, p. 556–564, 2011.
- BARBIN, D. F.; FELICIO, A. L. S. M.; SUN, D.; NIXDORF, S. L.; HIROOKA, E. Y. Application of infrared spectral techniques on quality and compositional attributes of coffee: An overview. **Food Research International**, v. 61, p. 23–32, 2014.
- BELAY, A.; TURE, K.; REDDI, M.; ASFAW, A. Measurement of caffeine in coffee beans with UV/Vis spectrometer. **Food Chemistry**, v. 108, n. 1, p. 310–315, 2008.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food chemistry**. 4 ed. Heidelberg: Springer (Chapter 21), 2009.
- BHUMIRATANA, N.; ADHIKARI, K.; CHAMBERS IV, E. Evolution of sensory aroma attributes from coffee beans to brewed coffee. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 2185-2192, 2011.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G. e HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building**. New York, Wiley, 1978.

BRADBURY, A.G.W. **Chemistry I:Non-volatile compounds**. Chapter 1. In R. J. Clarke, & O.G. Vitzhum (Eds.), *Coffee: Recent developments* (pp. 1–17). Oxford: Blackwell Science, 2001.

BRERETON, R. G. *Applied chemometrics for scientists*. University of Bristol, UK. 2007.

BRESSANELLO, D.; LIBERTO, E.; CORDERO, C.; RUBIOLO, P.; PELLEGRINO, G.; RUOSI, M. R.; BICCHI, C. Coffee aroma: Chemometric comparison of the chemical information provided by three different samplings combined with GC–MS to describe the sensory properties in cup. **Food Chemistry**, v. 214, p. 218-226, 2017.

BRIANDET, R.; KEMSLEY, E. K.; WILSON, R. H. Approaches to adulteration detection in instant coffees using infrared spectroscopy and chemometrics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 71, p. 359-366, 1996.

BSCA. Cafés especiais do Brasil. Disponível em:<<http://bsca.com.br/cafes-especiais.php>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

BUFFO, R. A.; CARDELLI-FREIRE, C. Coffee flavour: An overview. **Flavour and Fragrance Journal**, v.19, n. 2, p. 99–104, 2004.

CARVALHO, G. R. **Avaliação de sistemas de produção de café na região sul de Minas Gerais: um modelo de análise de decisão**. 2002. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Econômicas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil, 2002.

CASAL, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; ALVES, M. R.; FERREIRA, M. A. Discriminate Analysis of Roasted Coffee Varieties for Trigonelline, Nicotinic Acid, and Caffeine Content. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 3420-3424. 2000.

CLARKE, R. J. **Coffee: green coffee/roast and ground**. In: *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, 2 ed., Caballero, B., Trugo, L. C., Finglas, P., eds. Oxford: Academic Press, v. 3, 2003.

CRAIG, A. P.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S. Evaluation of the potential of FTIR and chemometrics for separation between defective and non-defective coffees. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1368–1374. 2012.

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, p. 209-217, 1999.

DEFERNEZ, M.; WREN E.; WATSON, A. D.; GUNNING, Y.; COLQUHOU, I. J.; GALL, G. L.; WILLIAMSON, D.; KEMSLEY, E. K. Low-field ¹H NMR spectroscopy for distinguishing between arabica and robusta ground roast coffees. **Food Chemistry**, v. 216, p. 106-113, 2017.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, v. 46, p. 488–495. 2012.

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**, v. 525, p. 171-182, 2004.

FARAH, A. **Coffee Constituents**. Chu, Y. Blackwell Publishing Ltd. 2012.

FLAMENT, I. **Coffee flavor chemistry**, Chichester: J. Wiley, 2002.

FLAMENT, I.; GAUTSCHI, F.; WINTER, M.; WILLHALM, B.; STOLL, M. Les composants furanniques de l'arôme café: quelques aspects chimiques et spectroscopiques. Proc. 3rd Coll. Int. Coffee Sci. **ASIC**, p. 197–215. 1968.

FERREIRA, M. M. C.; **Quimiometria: conceitos métodos e aplicações**, 1 ed. Editora Unicamp: Campinas, 2015.

GARRETT, R.; SCHMIDT, E. M.; PEREIRA, L. F. P.; KITZBERGER, C. S. G.; SCHOLZ, M. B. S.; EBERLIN, M. N.; REZENDE, C. M. Discrimination of arabica coffee cultivars by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and chemometrics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 496-502, 2013.

GELADI, P. Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics. **Spectrochimica Acta**, v. 58, p. 767-782, 2003.

GEMPERLINE, P. J.; Practical guide to chemometrics, 2nd ed., New York: CRC Press Taylor & Francis. 2006.

GINZ, M., BALZER, H. H., BRADBURY, A. G.W., MAIER, H. G. Formation of aliphatic acids by carbohydrate degradation during roasting of coffee. **Eur. Food Res. Technol**, 211, 404–410, 2000.

GRÃO GOURMET. **Série post#3: saindo da fazenda**. Disponível em: <<https://www.graogourmet.com/blog/serie-post3-saindo-da-fazenda/>>. Acesso em: 30 jan. 2017.

GUIZELLINI, F. C.; MARCHEAFAVE, G. G.; RAKOCEVIC, M.; ROY BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; SOARES, P. K. PARAFAC HPLC-DAD metabolomic fingerprint investigation of reference and crossed coffees. **Food Research International**, v. 113, p. 9–17. 2018.

HANRAHAN, G. Environmental Chemometrics: Principles and Modern Applications. CRC Press, 2009.

HECIMOVIĆ, I.; Belščak-Cvitanović, A.; Horzic, D.; Komes, D. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. **Food Chemistry**, v. 129, p. 991–1000, 2011.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Trade Statistics Tables**. Disponível em: <http://www.ico.org/trade_statistics.asp>. Acesso em: 12 fev. 2017.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**, 2 ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).

XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/CT06948.html>>. Acesso em: 02 fev. 2017.

KAUFMANN, H. P.; GUPTA, A. K. S. Über die lipoide der kaffeebohne V: die triterpene und kohlenwasserstoffe. **Fette Seifen Anstrichm**, v. 66, p. 461–466, 1964.

KAUFMANN, H. P.; HAMSAGAR, R. S. Zur kenntnis der lipoide der kaffeebohne I: Über fettsäure-ester des cafestols. **Fette Seifen Anstrichm**, v. 64, p. 206–213, 1962.

KEMSLEY, E. K.; RUAULT, S.; WILSON, R. H. Discrimination between *Coffea arabica* and *Coffea canephora* variant *robusta* beans using infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 54, p. 321–326, 1995.

KITZBERGER, C. S. G.; SCHOLZ, M. B. S.; BENASSI, M. T. Bioactive compounds content in roasted coffee from traditional and modern *Coffea arabica* cultivars grown under the same edapho-climatic conditions **Food Research International**, v. 61, p. 61-66, 2014.

KÖLLING-SPEER, L., SPEER, K. The Raw Seed composition. In: Espresso Coffee, the Science of Quality. Illy, A., Viani, R., eds. **Italy: Elsevier Academic Press**, p. 148–178, 2005.

KUMAR, N.; BANSAL, A.; SARMA, G. S.; RAWAL, R. K. Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. **Talanta**, v. 123, p. 186-199, 2014.

LIMA FILHO, T.; LUCIA, S. M. D.; SARAIVA, S. H.; SARTORI, M. A. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1723-1730, 2013.

LIU, Y.; KITTS, D. D. Confirmation that the Maillard reaction is the principle contributor to the antioxidant capacity of coffee brews. **Food Research International**, v. 44, n. 8, p. 2418–2424, 2011.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, L.; LÓPEZ-DE-ALBA, P. L.; GARCÍA-CAMPOS, R.; LEÓN-RODRÍGUEZ, L. M. D. Simultaneous determination of methylxanthines in coffees and teas by UV–Vis spectrophotometry and partial least squares. **Analytica Chimica Acta**, v. 493, n. 1, p. 83–94, 2003.

LYMAN, D. J., BENCK, R., DELL, S., MERLE, S., & MURRAY-WIJELATH, J. FTIR-ATR analysis of brewed coffee: Effect of roasting conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3268–3272, 2003.

MACRAE, R.; BEAUMONT, J. **Coffee: Related Beverages**; Clarke, R. J.; Macrae, R., eds.; Elsevier: London, cap. 4 , 1987.

MAIER, H. G. Chapter 4. **Roasting**, 4.3 **Changes produced by roasting**. In A. Illy, e R. Viani (Eds.), Espresso coffee: The science of quality, p. 191–197, 2 ed. London, UK: Elsevier Academic Press, 2005.

MARINI, F. Chemometrics in Food Chemistry. Department of Chemistry, University of Rome “La Sapienza”, Rome, Italy. 2013.

MARKOM, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R. W.; SINGH, H.; JAHIM, J. M. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, v. 52, p. 487–496, 2007.

MONAKHOVA Y. B.; RUGE W.; KUBALLA T.; ILSE M.; WINKELMANN O.; DIEHL B.; THOMAS F.; LACHENMEIER D. W. Rapid approach to identify the presence of Arabica and Robusta species in coffee using ¹H NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 182, p. 178-184, 2015.

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

MOREIRA, I.; SCARMINIO, I. S. Chemometric discrimination of genetically modified *Coffea arabica* cultivars using spectroscopic and chromatographic fingerprints. **Talanta**, v. 107, p. 416-422, 2013.

MOREIRA, I.; SCHEEL, G. L.; HATUMURA, P. H.; SCARMINIO, I. S. Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em *coffea arabica*. **Quim. Nova**, v. 37, n. 1, p. 39-43, 2014.

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; DE MARIA, C. A. B. Compostos voláteis do café torrado: parte II, compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 195-203, 2000.

NETO, E. **Desvendando os cafés especiais I**. Disponível em: <<https://www.cafepoint.com.br/noticias/mercado/desvendando-os-cafes-especiais-i-34425n.aspx>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4 ed. São Paulo: Bookman Companhia Editora, 413 p, 2001.

OLIVEIRA, R. C. S.; OLIVEIRA, L. S.; FRANCA, A. S.; AUGUSTI, R. Evaluation of the potential of SPME-GC-MS and chemometrics to detect adulteration of ground roasted coffee with roasted barley. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 257–261, 2009.

PARADKAR, M.M.; IRUDAYARAJ, J. A Rapid FTIR Spectroscopic Method for Estimation of Caffeine in Soft Drinks and Total Methylxanthines in Tea and Coffee. **Journal of food science**, v. 67, n. 7, 2002.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PICCINO, S.; BOULANGER, R.; DESCROIX, F.; SING, A. S. C. Aromatic composition and potent odorants of the “specialty coffee” brew “Bourbon Pointu” correlated to its three trade classifications. **Food Research International**. v. 61, p. 264 -271, 2014.

PIMENTA, C. J. **Qualidade de café**. 3 ed. Lavras: Editora UFLA, 2003.

RENCHER, A. C. **Methods of Multivariate Analysis**, 2 ed. Wiley, 2002.

RIBEIRO, J. S.; AUGUSTO, F.; SALVA, T. J. G.; FERREIRA, M. M. C. Prediction models for Arabica coffee beverage quality based on aroma analyses and chemometrics. **Talanta**, v. 101, p. 253-260, 2012.

RIBEIRO, J. S.; SALVA, T. J.; FERREIRA, M. M. Chemometric studies for quality control of processed Brazilian coffees using DRIFTS. **Journal of Food Quality**, v. 33, p. 212–227, 2010.

RODARTE, M. P. **Análise sensorial, química e perfil de constituintes voláteis de cafés especiais**. 2008. 147 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2008.

SAATH, R. **Qualidade do café natural e despulpado em diferentes condições de secagem e tempos de armazenamento**. 2010. 229 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

SABLINSKAS, V.; STEINER, G.; HOF, M. **Applications**. In **G. Gauglitz, & T. Vo-Dinh, Handbook of spectroscopy**, p. 89-168. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2003.

SCAA - Specialty Coffee Association of América. **SCAA Protocols | Cupping Specialty Coffee**. Disponível em: <<http://www.scaa.org/PDF/resources/cupping-protocols.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2017.

SALVA, T. J. G.; LIMA, V. B. A composição química do café e as características da bebida e do grão. **O Agrônomo**, v. 59, n. 1, p. 57-59, 2007.

SILVERSTEIN, M. R.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. **Spectrometric identification of organic compounds**. Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2005.

SMRKE, S.; KROSLAKOVA, I.; GLOESS, A. N.; YERETZIAN C. Differentiation of degrees of ripeness of Catuai and Tipica green coffee by chromatographical and statistical techniques. **Food Chemistry**, v. 174, p. 637-642, 2015.

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

SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 201–216, 2006.

STEPHANUCCI, A., Clinton, W. P., Hamel, M. Kirk-Othmer Encyclo. **Chem. Technol. New York: John Wiley & Son**, v. 6, p. 511–512, 1979.

SUNARHARUM. W B.; WILLIAMS, D. J.; SMYTH, H. E. Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective. **Food Research International**, v. 62, p. 315–325. 2014.

SNYDER L. R. HPLC: past and present. **Anal Chem**, v. 72, p 412A - 420A, 2000.

SZYMÁNSKA, E.; GERRETZEN, J.; ENGEL, J.; GEURTS, B.; BLANCHET, L.; BUYDENS, L. M. Chemometrics and qualitative analysis have a vibrant relationship. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 69, p. 34-51, 2015.

TOCI, A.; FARAH, A.; TRUGO, L. C. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após a torração. **Quim. Nova**, v. 29, n. 5, p. 965-971, 2006.

TOLESSA, K.; RADEMAKER, M.; DE BAETS, B.; BOECKX, P. Prediction of specialty coffee cup quality based on near infrared spectra of green coffee beans. **Talanta**, v. 150, p. 367-374, 2016.

TRUGO, L. C., MACRAE R. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. **Food Chem.**, v. 15, p. 219-227, 1984.

USLU, M. E.; ERDOGAN, I.; BAYRAKTAR, O.; ATES, M. Optimization of extraction conditions for active components in Equisetum arvense extract. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 18, n. 2, 2013.

VELOSO, A. C. A.; RODRIGUES, L. R.; DIAS, L. G.; PERES, A. M. **UV Spectrophotometry Method for Dietary Sugars**; Preedy, V. R., ed.; RSC Publishing: Cambridge, UK, cap. 14, 2012.

VIANI, R.; HORMAN, I. Thermal behavior of trigonelline. **Journal Food Science**, v. 39, p.1216-1217, 1974.

VITZTHUM, O. G. Chemie und bearbeitung des kaffees. In O. Eichler (Ed.), Kaffee und Coffein. **Berlin: Springer**, 2 ed., p. 3-64, 1976.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J. High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis, **CRC Press**, 2011.

WANG, N.; FU, Y.; LIM, L.-T. Feasibility Study on Chemometric Discrimination of Roasted Arabica Coffees by Solvent Extraction and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **J. Agric. Food Chem**, v. 59, p. 3220-3226, 2011.

WANG, J.; JUN, S.; BITTENBENDER, H. C.; GAUTZ, L.; LI, Q. X. Fourier transform infrared spectroscopy for Kona coffee authentication. **Journal of Food Science**, v. 74, p. 385-391, 2009.

WASSERMAN, G. **Coffee**. In Kirk-Othmer, 4 ed., Kirk-Othmer Encyclopedia Of Chemical Technology, Vol. 6, John Wiley & Sons, Inc, 1992.

ZANIN, R. C.; CORSO, M. P.; KITZBERGER, C. S. G.; SCHOLZ, M. B. S.; BENASSI, M. T. Good cup quality roasted coffees show wide variation in chlorogenic acids content. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 480-483, 2016.