



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



LEANDRO BATISTA MACHADO

USO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELETROS-
PRAY NO ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA IRRIGAÇÃO E DA RESISTÊNCIA AO
FUNGO *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br. EM GRÃOS VERDES DE *Coffea arabica*.

UBERLÂNDIA

2018

LEANDRO BATISTA MACHADO

USO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY NO ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA IRRIGAÇÃO E DA RESISTÊNCIA AO FUNGO *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br. EM GRÃOS VERDES DE *Coffea arabica*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para a obtenção do Título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes

Coorientador: Prof. Dr. Francisco José Torres de Aquino

UBERLÂNDIA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M149u Machado, Leandro Batista, 1979-
2018 Use da espectrometria de massas com ionização por eletrospray no estudo da influência da irrigação e da resistência ao fungo *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br. em grãos verdes de *Coffea arabica* / Leandro Batista Machado. - 2018.
94 f. : il.

Orientador: Sérgio Antônio Lemos de Moraes.
Coorientador: Francisco José Torres de Aquino.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Química.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1106>
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Café - Irrigação - Teses. 3. Estatística - Análise - Teses. I. Moraes, Sérgio Antônio Lemos de. II. Aquino, Francisco José Torres de. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU: 54



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 283/PPQUI.

DATA: 03/05/2018

DISCENTE: Leandro Batista Machado

MATRÍCULA: 11612QMI006

TÍTULO DO TRABALHO: Uso da espectrometria de massas com ionização por eletrospray no estudo da influência da irrigação e da resistência ao fungo *Hemileia Vastatrix* Berk. Et Br. em grãos verdes de *Coffea arabica*.

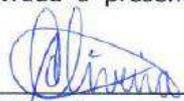
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Química de Produtos Naturais

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Estudo da composição química, atividade antioxidante e poder odorífico de um café arábica e seu PVA provenientes do cerrado

Às quatorze horas do dia cinco de março do ano dois mil e dezoito, no(a) Auditório Prof. Dr. Manuel Gonzalo Hernández-Terrones, piso superior do Bloco 5I no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelo Prof. Dr. Alberto de Oliveira, Universidade Federal de Uberlândia, Prof. Dr. Luis Carlos Scalon Cunha, Instituto Federal do Triângulo Mineiro e Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e Aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será O mesmo.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 16 horas e 45 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Alberto de Oliveira


Prof. Dr. Luis Carlos Scalon Cunha


Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que permitiu que este momento fosse vivido por mim, trazendo alegria aos meus pais e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Química pelo excelente ambiente oferecido e os profissionais qualificados que disponibiliza para nos ensinar.

Ao Professor Doutor Sérgio Antônio Lemos de Moraes, meu Orientador, por toda sua atenção e confiança em mim depositadas.

Agradeço também ao meu Coorientador, Professor Doutor Francisco José Torres de Aquino, por sua sábia e inestimável contribuição na realização deste trabalho.

Não posso também me esquecer da Professora Doutora Kátia Roberta Anacleto Belaz, sem a qual eu não faria a análise estatística contida nesse trabalho. Muito obrigado pelos ensinamentos sobre espectrometria de massas e quimiometria e, além disso, por ter se prontificado a nos ajudar com a escrita e submissão do artigo.

À Fundação Comunitária Educacional e Cultural de Patrocínio, na pessoa do seu superintendente, Fabiano Felipe Caldeira, pela doação das amostras de cafés utilizadas na realização deste trabalho.

Aos Professores José da Cruz Pereira, da Escola Agrotécnica Sérgio de Freitas Pacheco, e Dr. Aquiles Júnior da Cunha, coordenador do curso de Tecnologia em Cafeicultura do UNICERP, pelo apoio e pelas inúmeras conversas sobre o tema café, que tivemos.

Às colegas Elaine, Maryana e Sandra, por terem realizado a prova de xícaras.

Aos meus colegas de laboratório, Marcus, Thamires, Vanessa, Marília, Tiara, Eder, John Kenedy, Rafael, Alana, Flávia, Karine e Michele pela amizade e a todos aqueles com os quais convivi nesse período de tempo.

Aos meus pais, por terem feito de mim o cidadão de bem que sou hoje. Pelo amor, carinho, paciência e seus ensinamentos. Devo tudo a eles.

“[...] um dos fatos mais interessantes na história do café é que, seja onde for, haja sido usado, provocou revoluções. Tem sido a bebida mais radical do Universo, no sentido que sua função foi sempre fazer os povos pensar. E quando um povo começa a pensar torna-se perigoso aos tiranos e aos inimigos da liberdade de ação e de pensamento”.

Ukers.

RESUMO

O crescimento das zonas agrícolas de café irrigado e o desenvolvimento de novas tecnologias vem proporcionando o aumento da produtividade e qualidade do produto final. Entretanto, uma modelagem precisa da influência da irrigação sobre as alterações químicas do café arábica é limitada. Neste estudo, foram analisadas por espectrometria de massas com ionização por eletrospray por infusão direta (EM-IES), dez diferentes variedades de *Coffea arabica* L., cultivadas sob regimes distintos de água (irrigado e sequeiro). Os principais constituintes identificados nos extratos metanólicos dos grãos verdes, nos modos positivo e negativo, foram: colina; trigonelina; sacarose; β N-araquinoil-5-hidroxitriptamida; β N-behenoil-5-hidroxitriptamida; palmitoil-linoleoil (PL); dilinoleoil (LL); dipalmitoil-linoleoil (PPL); palmitoil-dilinoleoil (PLL), ácido quínico, ácido cafeoilquínico, ácido dicafeoilquínico e três novos compostos identificados pela primeira vez na matriz café verde: triacilglicerol (TG, 54:6), fosfoetanolamina (PE, 40:7) e 1-hexadecil-2-dodecanoil-glicero-3-fosfato. Foi possível classificar eficientemente os grupos de cafés irrigado e de sequeiro a 95% de confiança, usando PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis), a fim de se obter todos os requisitos mínimos para a avaliação da eficiência do modelo de classificação dos cafés. A Sacarose (íon m/z 381) e o íon m/z 431 (não identificado) sofreram uma influência negativa da irrigação, enquanto a trigonelina (íon m/z 138 e íon m/z 176) e o íon m/z 723 (não identificado) foram correlacionados positivamente com a irrigação. O teste de xícaras mostrou que o café cultivado em regime de sequeiro apresentou notas de classificação ligeiramente maiores que as observadas no café cultivado sob irrigação, provavelmente por apresentarem maior teor de sacarose. Adicionalmente, foi avaliada a influência da resistência das variedades estudadas ao fungo *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br. na composição química dos grãos verdes. Observou-se que o perfil químico dos grãos das variedades resistentes não muda consideravelmente do perfil das variedades suscetíveis.

Palavras-chave: Fingerprint, EM-IES, café verde, análise estatística multivariada, teste de xícaras, influência da irrigação.

ABSTRACT

The growth of irrigated coffee farming areas and the development of new technologies comes providing increased productivity and quality of the final product. However, a precise modelling of irrigation influence on the chemical changes of the Arabica coffee is limited. In this study, were analyzed by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), ten different varieties of *Coffea arabica* L., cultivated under distinct water regimes (irrigated and not-irrigated). The major constituents identified in the methanolic extracts of green beans, in positive and negative modes, were: choline; trigonelline; sucrose; β N-arachinoyl-5-hydroxytryptamide; β N-behenoyl-5-hydroxytryptamide; palmitoyl-linoleoyl (PL); dilinoleoyl (LL); dipalmitoyl-linoleoyl (PPL); palmitoyl-dilinoleoyl (PLL), quinic acid, cafeoilquinic acid, dicafeoilquinic acid and three new compounds identified for the first time in the green coffee matrix: triacylglycerol (TG 54:6), phosphoethanolamine (PE, 40:7) and 1-hexadecyl-2-dodecanoyl-glycero-3-phosphate. It was possible to efficiently sort the groups of irrigated and non-irrigated at 95% of confidence using PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis), in order to obtain all the minimum requirements for evaluation of efficiency of the rating model of coffees. The sucrose (ion m/z 381) and the ion m/z 431 (not identified) suffered a negative influence of irrigation, while trigonelline (ion m/z 138 and ion m/z 176) and the ion m/z 723 (not identified) were correlated positively with irrigation. The cup test showed that the coffees cultivated in not-irrigated regime had slightly larger cupping notes that the ones cultivated under irrigation, probably because they presented higher sucrose content. Additionally, it was evaluated the influence of resistance of studied varieties to the fungus *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br. on chemical composition of green beans. It was observed that the chemical profile of grains of resistant varieties does not change significantly from profile of susceptible varieties.

Key-words: Fingerprint, ESI-MS, green coffee, multivariate statistical analysis, cup quality, influence of irrigation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Imagens de cafés amarelos e vermelhos e da inflorescência do cafeeiro.	20
Figura 2	Esquema básico de processamento (preparo) do café.	23
Figura 3	Imagem de frutos em diferentes estágios de maturação, mostrando frutos verdes, maduros e em passas.	24
Figura 4	Imagens de diferentes modos de colheita: (a) colheita manual não seletiva; (b) colheita semimecanizada; (c) colheita mecanizada.	25
Figura 5	Imagem das partes do fruto do café.	26
Figura 6	Imagem do processamento de cafés naturais por “via seca”.	27
Figura 7	Imagem de padrões de torra do disco Agtron.	31
Figura 8	Esquema em pirâmide para avaliação sensorial de café.	32
Figura 9	Estrutura química da cafeína.	34
Figura 10	Estruturas químicas da trigonelina (A) e ácido nicotínico (B).	35
Figura 11	Estruturas químicas de ácidos clorogênicos e compostos relacionados. (A) Compostos base, (B) monoésteres de ácido quínico com ácido hidroxicinâmico, (C) di-ésteres de ácido quínico com ácido cafêico e ésteres mistos. AdiCQ, ácidos dicafeoilquínicos; AFQ, ácidos feruloilquínicos; <i>A_p</i> -CoQ ácidos <i>p</i> -cumaroilquínicos.	37
Figura 12	Imagem da forma de irrigação por gotejamento na lavoura de café.	38
Figura 13	Imagem da ferrugem do cafeeiro.	40

Figura 14	Imagem de diferentes níveis de resistência a <i>H. vastatrix</i> apresentados pelas cultivares Obatã – altamente resistente (A) e Caturai Vermelho – suscetível (B).	42
Figura 15	Espectros de massa com ionização por eletrospray típicos dos extratos metanólicos de grãos verdes de café no modo positivo: (A) sequeiro e (B) irrigado.	48
Figura 16	Espectro de massa com ionização por eletrospray do extrato metanólico de café verde expandido na região de 100-400, no modo positivo.	50
Figura 17	Espectro de massa com ionização por eletrospray do extrato metanólico de café verde expandido na região de 400-600, no modo positivo.	51
Figura 18	Estrutura base de β N-alcanoil-5-hidroxitriptamidas.	52
Figura 19	Espectro de massa com ionização por eletrospray do extrato metanólico de café verde expandido na região de 600-700, no modo positivo.	52
Figura 20	Espectro de massa com ionização por eletrospray do extrato metanólico de café verde expandido na região de 700-900, no modo positivo.	53
Figura 21	Estrutura química base dos gliceróis.	53
Figura 22	Espectro de EM/EM do íon m/z 138.	55
Figura 23	Proposta de fragmentação do íon m/z 138.	56
Figura 24	Espectro de EM/EM do íon m/z 176.	57
Figura 25	Proposta de fragmentação do íon m/z 176.	57
Figura 26	Espectro de EM/EM do íon m/z 381.	58

Figura 27	Proposta de fragmentação do íon m/z 381.	58
Figura 28	Espectro de EM/EM do íon m/z 893.	59
Figura 29	Proposta de fragmentação do íon m/z 893.	60
Figura 30	<i>Score Plot</i> (A) e <i>Loading Plot</i> (B) da PCA para influência da irrigação.	62
Figura 31	Gráfico de <i>scree plot</i> da PCA.	63
Figura 32	Dendrograma da análise da influência da irrigação, modo positivo.	64
Figura 33	<i>Score Plot</i> (A) e <i>Loading Plot</i> (B) do PLS-DA para a influência da irrigação.	65
Figura 34	<i>VIP Plot</i> das variáveis de maior influência no modelo PLS-DA.	68
Figura 35	<i>Score Plot</i> (A) e <i>Loading Plot</i> (B) do PCA para a influência da resistência à ferrugem.	69
Figura 36	Janelas PC1 x PC2 x PC3 da PCA da influência da resistência à ferrugem.	70
Figura 37	<i>Score Plot</i> (A) e Janelas PC1 x PC2 x PC3 da PLS-DA da análise de influência da resistência à ferrugem.	71
Figura 38	Espectro de massa com ionização eletrospray típico do extrato metanólico de grãos verdes de café, no modo negativo.	72
Figura 39	Espectro de EM/EM do íon m/z 191.	73
Figura 40	Proposta de fragmentação do íon m/z 191.	74
Figura 41	Espectro de EM/EM do íon m/z 353, referente ao ácido 3-O-cafeoilquínico.	74

Figura 42	Proposta de fragmentação do íon m/z 353, referente ao ácido 3-O-cafeoilquínico.	75
Figura 43	Espectro de EM/EM do íon m/z 353, referente ao ácido 5-O-cafeoilquínico.	76
Figura 44	Proposta de fragmentação do íon m/z 353, referente ao ácido 5-O-cafeoilquínico.	76
Figura 45	Score plot do PCA (A) e dendrograma (B), no modo negativo.	77
Figura 46	<i>Score plot</i> (A) e <i>loading plot</i> (B) da PCA, modo negativo.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tabela oficial para classificação de café.	29
Tabela 2	Equivalência dos defeitos do café, para sua classificação pelo tipo.	29
Tabela 3	Principais defeitos do café, causas, modo de evitar e prejuízos na qualidade.	30
Tabela 4	Descrição das categorias de classificação oficialmente utilizadas na prova de xícara.	31
Tabela 5	Composição química de sementes verdes de <i>Coffea arabica</i> e <i>Coffea canephora</i> .	33
Tabela 6	Códigos das amostras de cafés.	44
Tabela 7	Compostos caracterizados por EM-IES nos extratos metanólicos do café verde, no modo positivo.	54
Tabela 8	Parâmetros estatísticos de avaliação do modelo PLS-DA (irrigação).	66
Tabela 9	Parâmetros estatísticos de avaliação do modelo PLS-DA (ferrugem).	71
Tabela 10	Compostos caracterizados por EM-IES nos extratos metanólicos do café verde, no modo negativo.	73
Tabela 11	Notas atribuídas aos cafés estudados pelos provadores e nota média da prova de xícaras pela metodologia SCAA.	79
Tabela 12	Pontuação final das bebidas dos cafés estudados utilizando-se a metodologia SCAA em função de cultivares de cafeeiro.	80
Tabela 13	Pontuação final da bebida dos cafés estudados utilizando-se a metodologia SCAA em função do sistema de condução da lavoura cafeeira.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIC	Associação Brasileira da Indústria do Café
AC	Ácido cafeico
ACG	Ácidos clorogênicos
ACQ	Ácido cafeoilquínico
AdiCQ	Ácido dicafeoilquínico
AF	Ácido ferúlico
AFQ	Ácido feruloilquínico
Ap-Co	Ácido <i>p</i> -cumárico
Ap-CoQ	Ácido <i>p</i> -curmaroilquínico
C5HT	β N-alcanoil-5-hidroxitriptamidas
COB	Classificação Oficial Brasileira
cv.	cultivar
EM-IES	Espectrometria de massas com ionização eletrospray
ESI-QTOF	Electrospray ionization quadrupole time of flight
ESI-MS	Electrospray ionization mass spectrometry
Funcecp	Fundação Comunitária Educacional e Cultural de Patrocínio
HCA	Hierarchical Cluster Analysis
IAC	Instituto Agrônomo de Campinas
LDA	Análise discriminante linear
LOOCV	Leave One Out Cross-Validation
mm	milímetros
<i>m/z</i>	relação massa/carga
NPK	nitrogênio-fósforo-potássio

OIC	Organização Internacional do Café
PCA	Principal Component Analysis
PLS-DA	Partial Least Squares Discriminant Analysis
SCAA	Specialty Coffee Association of America
var.	variedade
VIP	Variable Influence on Projection

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 O café e o Brasil, em linhas gerais	19
3.2 Colheita e pós-colheita do café	22
3.3 Classificação do café	28
3.4.1 Cafeína	33
3.4.2 Trigonelina.....	35
3.4.3 Ácidos Clorogênicos	35
3.5 Influência da irrigação	37
3.6 Cafés resistentes e suscetíveis à ferrugem	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Obtenção e preparo das amostras	43
4.2 Preparo dos extratos.....	44
4.3 Espectrometria de massas com ionização por eletrospray por infusão direta	44
4.4 Torra e análise sensorial da bebida	45
4.5 Tratamento dos dados e análise estatística.....	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
5.1 Caracterização química de cafés por Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (EM-IES), no modo positivo	48
5.1.1 Análise estatística dos dados de EM-IES no modo positivo sobre a influência da irrigação.....	61

5.1.2 Análise estatística dos dados de EM-IES no modo positivo sobre a influência da resistência à ferrugem	69
5.2 Caracterização química de cafés por Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (EM-IES), no modo negativo	72
5.2.1 Análise estatística dos dados de EM-IES no modo negativo de cafés irrigados e não irrigados.....	77
5.2.2 Análise estatística dos dados de EM-IES no modo negativo sobre a influência da resistência à ferrugem	78
5.3 Caracterização sensorial das cultivares de cafés arábicas pelo teste de xícaras.	79
6 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	83
ANEXOS.....	91
ANEXO A – Planilha de avaliação sensorial da SCAA.....	91
ANEXO B – Certificado Proveedor 1	92
ANEXO C – Certificado Proveedor 2	93
ANEXO D – Certificado Proveedor 3	94

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil é o maior produtor mundial de café, com um volume de 26,594 milhões de sacas de 60 kg exportadas, no período de outubro de 2016 a julho de 2017 (OIC, 2017a). É também o segundo maior consumidor da bebida, ficando atrás apenas dos Estados Unidos da América (OIC, 2017b). E, segundo dados do Conselho Nacional de Abastecimento brasileiro, no ano de 2015, aproximadamente $\frac{3}{4}$ da produção nacional era da espécie arábica, tendo o estado de Minas Gerais como seu principal produtor, e respondendo por cerca de $\frac{2}{3}$ de toda a produção de café do país (ABIC, 2015).

Estudos realizados por Davis et al. (2012) mostraram que a produtividade do café arábica pode ser reduzida em função de mudanças climáticas aceleradas, uma vez que a radiação solar e a umidade relativa influenciam muitos processos fisiológicos da planta do café. Além de um resultado negativo para a indústria cafeeira, tais fatores também podem elevar o custo da produção, devido à intensificação do gerenciamento da lavoura, por exemplo, com o uso da irrigação. Neste contexto, áreas consideradas boas para o cultivo do café, poderão se tornar impróprias para o plantio do café arábica.

A qualidade da bebida do café é influenciada diretamente pela composição química dos grãos verdes. Durante a torra desses grãos, diversos compostos que formam o sabor e o aroma são formados, sendo responsáveis pelas qualidades ou defeitos da bebida (DART; NURSTEN, 1985 apud DE MARIA; MOREIRA; TRUGO, 1999). Em um trabalho de correlação entre precursores e voláteis em café arábica, Arruda e colaboradores (2012) observaram uma forte influência do pré-processamento dos cafés arábica crus no teor dos principais precursores de voláteis.

Dada a diversidade do parque cafeeiro e o elevado nível tecnológico da cafeicultura, o Brasil possui condições favoráveis para aumentar sua participação no mercado de cafés de qualidade (GIOMO; BORÉM, 2011). Historicamente, a qualidade da bebida não foi o foco nos programas de melhoramento do café arábica no Brasil. Até a década de 1960, esses programas de melhoramento estavam ligados à produção em larga escala e à capacidade de adaptação da planta do café em diferentes regiões. Após 1970, com o aparecimento da ferrugem e sua rápida dispersão nas lavouras brasileiras, enorme ênfase foi dada ao melhoramento para resistência a essa doença.

Na década de 1980, estudos sobre a resistência aos nematoides e ao bicho mineiro receberam mais atenção, além disso as pesquisas sobre a qualidade da bebida também foram otimizadas, verificando-se assim que além das condições de cultivo e processamento dos grãos na pós-colheita, a constituição genética da planta também tem um papel importante na determinação da qualidade final da bebida (MEDINA FILHO; BORDIGNON; CARVALHO, 2008).

Assim, o estudo da relação entre a composição química do grão cru, a irrigação e a resistência a doenças das variedades de café arábica aqui propostas visa corroborar para a melhoria da qualidade do café do início do processo de produção ao consumo da bebida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a composição química dos grãos verdes de cultivares de *Coffea arabica* L. – Paraíso H419-1, Catiguá MG s3, Catiguá MG s2, Rubi JM MG 1192, Topázio MG1190, IBC 12 IAC 125 RN, Acauã, Catuaí 144, Catuaí 99 e Catuaí 62 – plantados nos regimes de sequeiro e irrigação por gotejamento.

2.2 Objetivos específicos

- Diferenciar os cafés plantados no regime de sequeiro e no regime de irrigação com base nos perfis químicos dos mesmos através do uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray por infusão direta.

- Identificar quais compostos sofrem maior influência da irrigação e estabelecer uma relação destes com a qualidade do café.

- Discriminar, com o auxílio da técnica de espectrometria de massas, os cafés suscetíveis ao fungo *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br. (causador da ferrugem) dos que são resistentes com base em seus perfis químicos.

- Detectar a relação entre resistência/suscetibilidade à ferrugem e qualidade de bebida do café.

- Realizar o teste de xícaras e correlacionar os dados da análise sensorial com os dados obtidos na análise estatística.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O café e o Brasil, em linhas gerais

O cafeeiro apresenta sua classificação botânica como sendo uma planta da família das Rubiaceas, que se caracterizam por possuir folhas simples, e pertence ao gênero *Coffea*, onde as flores apresentam anteras e estigmas proeminentes (BRIDSON, 1987 apud GUERREIRO FILHO et al., 2008a). É uma planta de tamanho arbustivo ou arbóreo, de raiz pivotante e de caule lenhoso, com formato quase cilíndrico. Seus ramos podem crescer no sentido vertical, formando as hastes ou troncos, ou no sentido horizontal, onde ocorre a formação das gemas florais, que dão origem à floração e frutificação. As folhas são opostas e inteiras. Já o fruto é uma drupa, normalmente com duas sementes (MATIELLO et al., 2016).

Embora existam diversas espécies do gênero *Coffea*, apenas duas se destacam – *Coffea arábica* L. e *Coffea canephora*. Juntas elas representam quase a totalidade do café cultivado e comercializado no mundo (GUERREIRO FILHO et al., 2008a). A espécie *Coffea arabica* L. é comercialmente chamada de café arábica e a espécie *Coffea canephora*, café robusta. Segundo a Organização Internacional do Café (OIC, 2017c), no ano de 2016 foram produzidas 153,869 milhões de sacas de 60 kg de café, das quais 97,269 milhões são de cafés arábicas e 56,600 milhões referem-se aos cafés robustas. Nota-se, portanto, que o café arábica responde por aproximadamente dois terços da produção mundial de cafés.

Para Sakiyama (2015), o café arábica é uma planta perene, alotetraploide, de ramos dimórficos e crescimento contínuo. A inflorescência ocorre nos nós de ramos laterais novos. Seus frutos, quando maduros, são conhecidos como cerejas, e podem apresentar o exocarpo de cor vermelha ou amarela (Figura 1).

Figura 1 – Imagens de cafés amarelos e vermelhos e da inflorescência do cafeeiro.



Fonte: O autor.

O café arábica apresenta melhor qualidade de bebida, de caráter mais refinado e diferentes nuances de doçura e acidez, ao passo que o café robusta tem bebida com menos peculiaridades e por isso é muito usado em misturas (“blends”) e na indústria de cafés solúveis (MATIELLO et al., 2016). Em estudos realizados por Ribeiro et al. (2014), blends de *Coffea canephora* Pierre e *Coffea arabica* L. mostraram mudanças nos atributos sensoriais à medida em que houve aumento na proporção de café robusta no blend. Houve aumento do atributo corpo e diminuição da acidez. O amargor intensificou-se, devido, em parte, à maior quantidade de cafeína presente na espécie *Coffea canephora* Pierre. Houve redução no teor de açúcares totais e não redutores, assim como redução das notas para os atributos fragrância e aroma. Ainda, para Giomo e Borém (2011), dentre as muitas espécies do gênero *Coffea*, a espécie *C. arabica* L. é a única capaz de produzir cafés com bebidas aromáticas e saborosas. Bebidas de qualidade superior são inerentes à espécie *C. arabica*, sendo que os processos de produção, colheita e pós-colheita devem ser bem executados apenas para manter essa característica. Falhas nesses processos, bem como problemas relacionados ao meio ambiente, podem impedir a manifestação da capacidade genética das cultivares da espécie *Coffea arabica*.

A introdução do cafeeiro no Brasil ocorreu no ano de 1727, como pode-se ver nesse texto de Eccardi e Sandalj (2003, p. 50):

“Em 1727, um oficial brasileiro em visita à Guiana Francesa ganhou da mulher do governador, como sinal de amizade, um maço de flores que trazia escondida uma muda de café. Dessa homenagem nasceu o império cafeeiro brasileiro”.

As plantas introduzidas no estado do Pará eram da espécie *C. arabica*, e foram descritas em 1913 por Cramer que propôs a denominação típica (*Coffea arabica* L.

var. típica Cramer) por ser a cultivar que representa as características típicas da espécie *C. arabica*. Essa cultivar de frutos vermelhos foi, praticamente, a única cultivar explorada comercialmente até meados do século XIX (MENDES et al., 2008).

Do estado do Pará, o café seguiu para o Maranhão e daí se expandiu, em pequenas plantações, para os estados vizinhos, tendo alcançado a Bahia no ano de 1770. Já em 1774, o café desceu do Maranhão para o Rio de Janeiro, estado onde os cafezais se ampliaram, atingindo o Vale do Paraíba em 1825, de onde seguiu para os estados de São Paulo e Minas Gerais. Em Ribeirão Preto chegou em 1835, no noroeste paulista e norte do Paraná entre 1928 e 1930. No Espírito Santo, chegou a partir de 1920 (MATIELLO et al., 2016; MENDES et al., 2008).

A primeira plantação de café em larga escala foi empreendida no Rio de Janeiro pelo médico francês Louis François Lecesne, em 1816, com 50 mil pés de café. Lecesne trouxe para o Rio sua inestimável experiência na lavoura cafeeira, baseada no sistema dominicano de plantio, limpeza, colheita e secagem (FERRÃO, 2004). Assim, as primeiras exportações de café em quantidade ocorreram a partir de 1820 e 25 anos depois, em 1845, o Brasil já era considerado o principal produtor, colhendo 45% da produção mundial da época (MATIELLO et al., 2016).

Em 1864, em face do declínio da produção cafeeira por área e, sabendo da importância da cultura para o país, o governo brasileiro providenciou a introdução da cultivar Bourbon Vermelho (*C. arabica* L. var. Bourbon), da Ilha de Reunião (antiga Ilha de Bourbon), considerada de alta produtividade. Em 1870, na Bahia, a cultivar Maragogipe (*C. arabica* L. var. Maragogipe) foi encontrada por Erisógono José Fernandes; tratava-se de uma mutação dominante, ocorrida na cultivar Típica. Um ano depois, em 1871, outra mutação também surgiu em Botucatu, estado de São Paulo – era o Amarelo de Botucatu. Por volta de 1896, a cultivar Sumatra foi introduzida no Brasil por Fonseca Costa e Cia, vinda da ilha de mesmo nome, na Indonésia. E já no século da frente, em 1930, surgem, independentemente, duas novas cultivares, o Bourbon Amarelo, no município paulista de Pederneiras e a cultivar Caturra, na Serra do Caparaó, ambas tendo como origem a cultivar Bourbon Vermelho. Ainda no início da década de 1930, com o estabelecimento do plano geral de melhoramento do cafeeiro pela Seção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), o melhoramento genético foi abordado de forma bastante completa, contando com o apoio de pesquisadores de áreas como citologia, fisiologia e estatística. E a partir de 1943 teve início

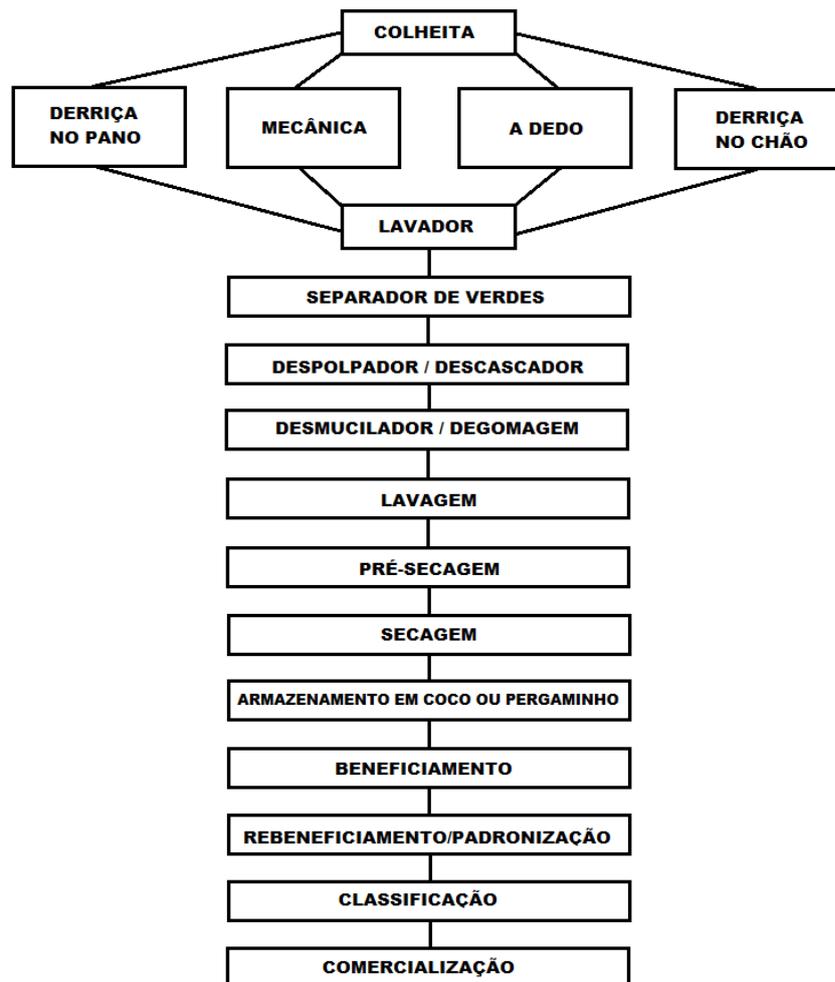
a seleção da cultivar Mundo Novo e, em 1949, da cultivar Catuaí. Com a renovação das lavouras, no final dos anos 1960 e 1970, praticamente todo o parque cafeeiro brasileiro, cerca de 90% da área hoje cultivada com arábica, passou a ser constituída por linhagens selecionadas dessas duas cultivares (MATIELLO et al., 2016; MENDES et al., 2008).

3.2 Colheita e pós-colheita do café

A cultura do café é caracterizada por ser muito exigente de recursos financeiros e requer um enorme uso de mão-de-obra durante todo o seu ciclo. As operações mais onerosas e complexas ocorrem no período da colheita e pós-colheita dos frutos de café. A colheita do café é mais complexa, difícil e cara de ser realizada que a de outros produtos, haja vista a altura e arquitetura da planta, a desuniformidade da maturação e o enorme teor de água presente nos frutos. Durante essa etapa, tem-se cerca de 30% do custo de produção e 40% da mão-de-obra empregada (TEIXEIRA et al., 2015).

Para Matiello et al. (2016), a colheita e pós-colheita estão entre os três principais fatores dos quais depende a qualidade do café, sendo o primeiro a composição química dos grãos e o terceiro o processo de industrialização e preparo da bebida.

As etapas que envolvem o processamento dos grãos de café se iniciam na colheita. Na Figura 2, a seguir, é possível observar a sequência de etapas envolvidas na produção dos grãos de café verde.

Figura 2 – Esquema básico de processamento (preparo) do café¹.

Fonte: MATIELLO et al., 2016.

A colheita de café ocorre em épocas diferentes nos dois hemisférios. Devido à grande diversidade de condições ambientais em que o café é cultivado, sua colheita se estende, *grosso modo*, de setembro a março no hemisfério Norte e de abril a agosto no hemisfério Sul (ECCARDI; SANDALJ, 2003). Como a maturação dos grãos não é uniforme (Figura 3), alguns agricultores começam a colheita antecipadamente, antes da maioria dos frutos completarem o ciclo de maturação, pelo fato de estarem quase sempre descapitalizados. Outros produtores, para realizarem a colheita em uma única vez, praticam-na tardiamente, onde haverá uma maior quantidade de grãos passas e secos, proporcionando um produto de baixa qualidade pelo aumento do número de defeitos e bebida inferior. Embora mais trabalhosa e onerosa, o que se recomenda é

¹ Observação: De acordo com os processos usados, algumas etapas desse esquema podem ser puladas.

a realização de uma colheita seletiva, iniciando quando as plantas tiverem pelo menos 50% de frutos maduros, se constituindo num método de colheita que contribui em muito para melhorar o padrão de qualidade do café e conseqüentemente proporcionar um diferencial na valorização do produto (SANTOS, 2005).

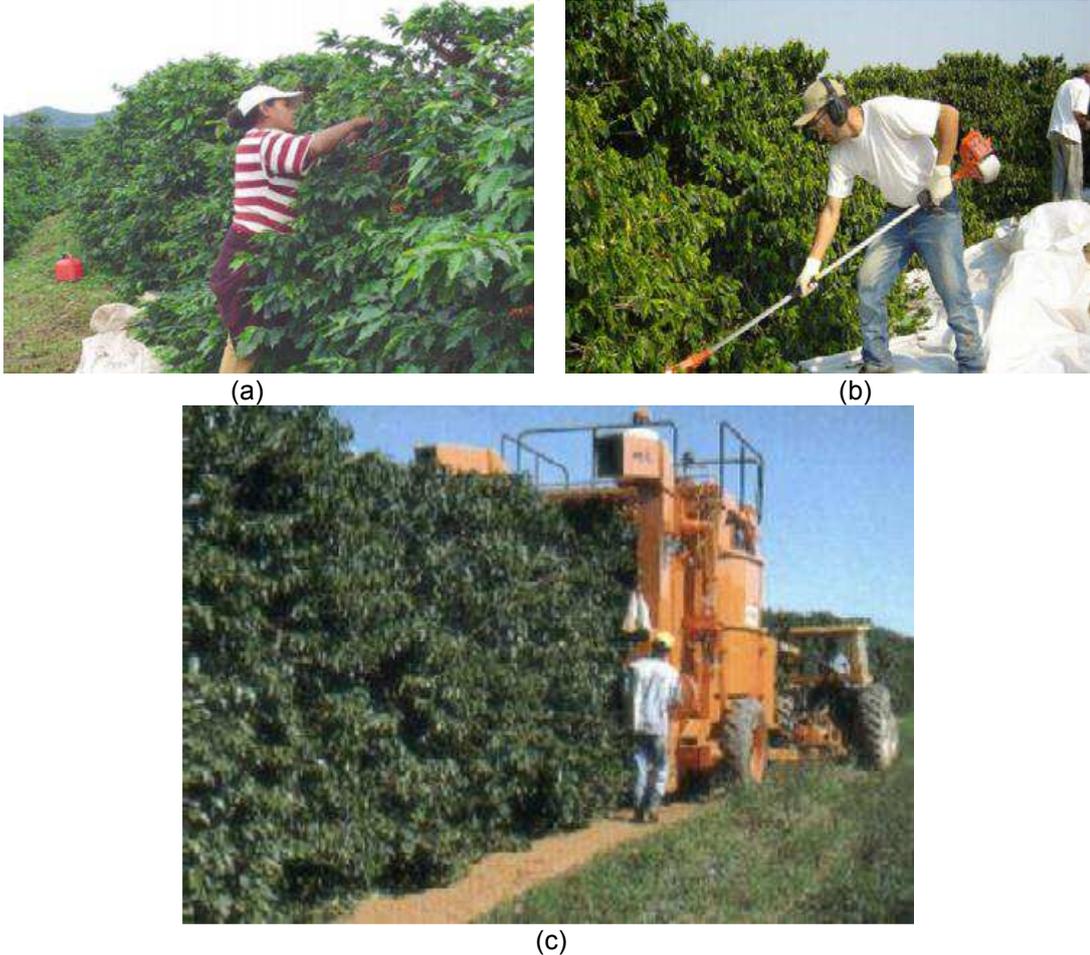
Figura 3 – Imagem de frutos em diferentes estágios de maturação, mostrando frutos verdes, maduros e em passas.



Fonte: O autor.

A colheita de café pode ser realizada de forma manual, semimecanizada ou mecanizada. A colheita manual compreende a derriça total dos frutos do cafeeiro ou pode ocorrer de forma seletiva, onde apenas os frutos maduros são retirados. No modo semimecanizado, a colheita é feita empregando-se as máquinas derriçadoras portáteis, que são operadas manualmente e acionadas por pequenos motores de combustão a gasolina, com ciclo de dois ou de quatro tempos. Nas regiões de topografia plana existe a opção do uso da mecanização, onde máquinas colhedoras substituem com vantagens o emprego da mão de obra nas lavouras para a colheita (MATIELLO et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2015). Na Figura 4 são apresentados modos diferentes de colheita.

Figura 4 – Imagens de diferentes modos de colheita: (a) colheita manual não seletiva; (b) colheita semimecanizada; (c) colheita mecanizada.



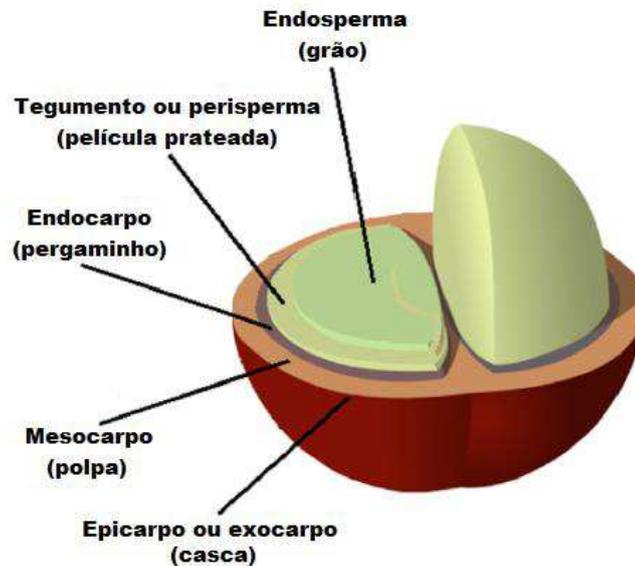
Fonte: Brasil, 2016.

Após a colheita, inicia-se uma série de etapas para o preparo do café que constituem o processamento chamado de pós-colheita. Essas etapas são basicamente: limpeza, lavagem, separação, secagem, armazenagem, descascamento, padronização e classificação. Essas operações não têm por objetivo melhorar a qualidade do café, mas tentar mantê-la muito próxima daquela existente antes da colheita (TEIXEIRA et al., 2015).

O processo de beneficiamento do fruto do café pós-colheita pode ser feito de dois modos: por via seca, resultando nos “cafés de terreiro” ou “cafés naturais”, ou por via úmida dando os “cafés despulpados” e os “cafés cerejas descascados” (MATIELLO et al., 2016).

Na Figura 5 pode-se visualizar as diferentes partes constituintes dos frutos do café, o que facilita o entendimento sobre as operações necessárias no processamento pós-colheita.

Figura 5 – Imagem das partes do fruto do café.



Fonte: adaptação de FARAH; SANTOS, 2014.

O beneficiamento do café por via seca, com o qual se obtêm os cafés naturais, é o método tradicional, em que o fruto é colocado para secar e somente então são eliminadas a casca e a polpa (Figura 6). Os frutos são espalhados ao sol, em terreiros de cimento, asfalto ou terra batida, e constantemente revolvidos por um período de dez a trinta dias. Nesse método, uma secagem correta é a condição necessária para obter um produto sem defeitos ou características negativas (ECCARDI; SANDALJ, 2003). A preparação por via seca predomina em cerca de 90% da cafeicultura brasileira (MATIELLO et al., 2016).

Em estudos realizados variando-se o método de processamento, pôde-se observar que os cafés naturais apresentam, de forma geral, menores teores de açúcares não redutores, quando comparados aos cafés despulpados e os desmucilados, independentemente do método de secagem (CLEMENTE et al., 2015). Uma vez que os açúcares são precursores do sabor e aroma do café torrado, pode-se considerar que esse fator mantém a qualidade do café ou possibilita a obtenção de uma bebida de qualidade superior (BORÉM et al., 2006).

Figura 6 – Imagem do processamento de cafés naturais por “via seca”.



Fonte: O autor.

O processamento úmido é mais sofisticado e tende a gerar uma bebida de qualidade superior. Existem muitas versões diferentes deste método, mas, em geral, apenas cerejas maduras são usadas. Elas podem ser selecionadas e separadas mecanicamente ou em tanques de flutuação. A classificação é seguida por despulpção mecânica, imersão, e fermentação em um tanque, normalmente de 12-36 h. Durante a fermentação, que pode ocorrer naturalmente ou com a adição de microrganismos ou enzimas, a polpa remanescente é removida², a acidez aumenta, e pode diminuir o pH para 4,5. As sementes nuas (café pergaminho) em seguida são extensivamente lavadas em tanques de água limpa ou em máquinas de lavar específicas. A seguir, os grãos são secos em terreiros ou em tabelas suspensas (ventiladas); isso às vezes é combinado com ar quente de secagem. Após a secagem, a parte restante da casca é removida mecanicamente. O processamento úmido frequentemente é usado em lugares onde o café é colhido por colheita manual, tais como Colômbia, Ásia e América Central, embora por causa do valor de mercado superior, várias explorações em países que produzem volumes maiores, como o Brasil, também o tenham adotado (FA-RAH; SANTOS, 2014).

² Por isso esses cafés são chamados de “cafés despulpados”.

O preparo dos cafés “cereja descascados” vem crescendo no Brasil. Essa técnica é uma variável no processo “via úmida”, onde os cafés maduros são apenas descascados e não passam pelo processo de degomagem, indo direto para a secagem. Dessa forma se produz um café com características de cor e corpo semelhantes ao café natural, porém com maiores possibilidades de obtenção de melhores padrões de bebida (MATIELLO et al., 2016).

Em estudos sobre a germinação de sementes de café e seu significado para a qualidade da bebida, Selmar et al. (2006) concluíram que a diferença de qualidade no processamento “via seca” e no processamento “via úmida” pode ser correlacionada com eventos metabólicos relacionados aos metabolismos de germinação ou estresse.

O café natural, chamado também de café em coco e o café pergaminho, ainda necessitam passar pelo processo de beneficiamento ou descasque, onde, com a retirada das cascas e separação dos grãos, dá origem ao café beneficiado ou café verde, que é destinado à indústria ou ao comércio (MATIELLO et al., 2016).

3.3 Classificação do café

A avaliação da qualidade do café compreende dois tipos de classificação: a classificação por tipos e a classificação pela bebida. Ela deve ser feita por profissional habilitado (classificador-provador), especialmente no que se refere à determinação da bebida do café. A classificação é importante para a definição de preço do produto, para a formação de lotes para a comercialização e para caracterizar a matéria prima desejada na industrialização (MATIELLO et al., 2016).

A classificação por tipos adotada compreende sete tipos de valores decrescentes, de 2 a 8, determinados em uma amostra de 300 gramas de café verde, segundo as normas estabelecidas pela Tabela Oficial Brasileira de Classificação (Tabela 1). A cada tipo corresponde um maior ou menor número de defeitos (grãos imperfeitos ou impurezas).

Tabela 1 – Tabela oficial para classificação de café

Defeitos	Tipos	Pontos	Defeitos	Tipos	Pontos	Defeitos	Tipos	Pontos
4	2	+ 100	28	4 - 5	- 5	100	6 - 10	- 110
4	2 - 5	+ 95	30	4 - 10	- 10	108	6 - 15	- 115
5	2 - 10	+ 90	32	4 - 15	- 15	115	6 - 20	- 120
6	2 - 15	+ 85	34	4 - 20	- 20	123	6 - 25	- 125
7	2 - 20	+ 80	36	4 - 25	- 25	130	6 - 30	- 130
8	2 - 25	+ 75	38	4 - 50	- 30	138	6 - 35	- 135
9	2 - 30	+ 70	40	4 - 35	- 35	145	6 - 40	- 140
10	2 - 35	+ 65	42	4 - 40	- 40	153	6 - 45	- 145
11	2 - 40	+ 60	44	4 - 45	- 45	160	7	- 150
12	3	+ 50	46	5	- 50	180	7 - 5	- 155
13	3 - 5	+ 45	49	5 - 5	- 55	200	7 - 10	- 160
15	3 - 10	+ 40	53	5 - 10	- 60	220	7 - 15	- 165
17	3 - 15	+ 35	57	5 - 15	- 65	240	7 - 20	- 170
18	3 - 20	+ 30	61	5 - 20	- 70	260	7 - 25	- 175
19	3 - 25	+ 25	64	5 - 25	- 75	280	7 - 30	- 180
20	3 - 30	+ 20	68	5 - 30	- 80	300	7 - 35	- 185
22	3 - 35	+ 15	71	5 - 35	- 85	320	7 - 40	- 190
23	3 - 40	+ 10	75	5 - 40	- 90	340	7 - 45	- 195
25	3 - 45	+ 5	86	6	- 100	360	8	- 200
26	4	BASE	93	6 - 5	- 105			

Fonte: BRASIL, 1978.

Os defeitos podem ser de natureza intrínseca, constituindo-se de grãos alterados (os pretos, os ardidos, os verdes, os chochos e os mal granados), ou de natureza extrínseca, compondo-se de elementos estranhos ao café beneficiado (coco, marinho, cascas, paus e pedras).

Cada defeito possui sua equivalência, como pode ser visto na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2 – Equivalência dos defeitos do café, para sua classificação pelo tipo.

NATUREZA DAS IMPERFEIÇÕES	NÚMERO DE DEFEITOS
1 grão preto	1
1 pedra, pau ou torrão grande	5
1 pedra, pau ou torrão regular	2
1 pedra, pau ou torrão pequeno	1
1 coco	1
1 casca grande	1
2 ardidos	1
2 marinheiros	1
2/3 cascas pequenas	1
2/5 brocados	1
3 conchas	1
5 verdes	1
5 quebrados	1
5 chochos e mal granados	1

Fonte: BRASIL, 1978.

O conhecimento do número e do tipo de defeitos pode revelar também como se deu o manejo da lavoura, como pode ser visto na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3 – Principais defeitos do café, causas, modo de evitar e prejuízos na qualidade.

NATUREZA	CAUSAS	MODO DE EVITAR E ELIMINAR	PREJUÍZOS NA QUALIDADE
Preto	Permanência prolongada dos frutos no pé, contato com o chão.	Colheita racional, catação manual ou eletrônica.	Aspecto, cor, torração e bebida.
Ardido	Colheita de frutos verdes e permanência prolongada dos frutos no pé ou em contato com o chão.	Colheita racional, catação manual ou eletrônica.	Aspecto, cor, torração e bebida.
Verde	Colheita de frutos verdes.	Colheita em época certa, emprego de separador de verdes, catação.	Aspecto, cor, torração e bebida.
Concha	Problemas genéticos da variedade e efeito climático.	Manejo racional da cultura, no beneficiamento e na catação manual ou mecânica.	Aspecto e torração.
Chocho	Problema genéticos, climáticos ou (seca) carência nutricional	Troca de variedade, manejo racional da cultura, ventilação adequada no benefício, catação manual ou mecânica.	Aspecto e torração.
Mal granado	Problema climático (seca) ou carência nutricional ou ataque de cercospora.	Nutrição adequada, irrigação. Separação no beneficiamento. Catação manual ou mecânica.	Aspecto e torração.
Brocado	Ataque da broca do café.	Controle da broca. Catação manual ou mecânica	Aspecto.
Quebrado	Seca inadequada e má regulação do descascador.	Secagem adequada, regulação dos ventiladores. Catação manual ou mecânica.	Aspecto e torração.
Coco e marinheiro	Má regulação do descascador.	Regulação do descascador, separação no beneficiamento e catação manual.	Aspecto e torração.
Paus, pedras, torrões e cascas	Colheita por derrça no chão e abanação malfeita.	Colheita por derrça no pano, emprego de lavadores e seletores, regulação do catador e da ventilação no beneficiamento, catação manual.	Aspecto e torração.

Fonte: MATIELLO et al., 2016.

A classificação da bebida é feita pela análise sensorial da bebida dos grãos torrados e são avaliados atributos como aroma, acidez, amargor, corpo, entre outros. A metodologia tradicional de avaliação sensorial, como definida na COB – Classificação Oficial Brasileira, é feita com uma torra denominada “americana”, que é uma torra

clara ou leve (BRASIL, 2010). No Brasil, o teste da bebida é comumente chamado de “prova de xícara” e os cafés são classificados em sete categorias (Tabela 4).

Tabela 4 – Descrição das categorias de classificação oficialmente utilizadas na prova de xícara.

Padrão de Classificação	Características
Estritamente mole	Bebida de sabor suavíssimo e adocicado; todos os requisitos de aroma e sabor “mole” mais acentuado.
Mole	Bebida de sabor suave, agradável, brando e adocicado.
Apenas mole	Bebida de sabor levemente doce e suave, mas sem adstringência ou aspereza de paladar.
Dura	Bebida de sabor acre, adstringente e áspero, porém não apresenta paladares estranhos.
Riada	Bebida apresentando sabor típico de iodofórmio.
Rio	Bebida com sabor típico e acentuado de iodofórmio.
Rio Zona	Sabor muito acentuado, assemelhando ao iodofórmio ou ao ácido fênico.

Fonte: BRASIL, 2010.

A metodologia da Associação de Cafés Especiais da América (do inglês: Specialty Coffee Association of America – SCAA) no entanto, tem como objetivo identificar todo o potencial de qualidade de um café e, desse modo, o ponto de torra recomendado é o mesmo dos produtos comerciais, com ponto de torra entre os discos #65 e #55 da escala Agtron, mostrado na figura abaixo (LINGLE, 2011) (Figura 7).

Figura 7 – Imagem de padrões de torra do disco Agtron.



Fonte: <https://www.cafepoint.com.br/noticias/mercado/sutilezas-do-tonsurton-da-torra-do-cafe-41147n.aspx>

Os atributos avaliados são fragrância/aroma, uniformidade, ausência de defeitos (xícara limpa), doçura, sabor, acidez, corpo, finalização, equilíbrio, defeitos e avaliação global (ANEXO A). Se a nota atribuída à bebida for de 80 a 85, o café é considerado especial, como mostra a Figura 8 abaixo.

Figura 8 – Esquema em pirâmide para avaliação sensorial de café.



Fonte: SCAA, 2009.

3.4 Composição química dos grãos de café verde

A composição química básica do café verde depende de aspectos genéticos, como a espécie, e de aspectos fisiológicos, como o grau de maturação. Além desses fatores intrínsecos, fatores extrínsecos como a composição do solo, clima, práticas agrícolas e condições de estocagem afetam a fisiologia e a composição química das sementes, mas em menor intensidade (FARAH, 2012).

Ácidos clorogênicos, cafeína, trigonelina, extrato aquoso, aminoácidos e polifenóis foram analisados em 41 amostras de café verde e usados como descritores químicos para diferenciar variedades de arábica e robusta. Estes estudos mostraram que essas duas espécies podem ser facilmente diferenciadas com relação aos seus conteúdos de cafeína e aminoácidos livres (MARTÍN; PABLO; GONZÁLEZ, 1998).

Segundo Farah (2009), a fração não-volátil de café verde é composta principalmente por água, carboidratos e fibras, aminoácidos livres, proteínas, lipídios, minerais, ácidos orgânicos, ácidos clorogênicos, trigonelina e cafeína. Desses componentes, cafeína, trigonelina e os ácidos clorogênicos são compostos bioativos característicos do café que contribuem muito para o sabor da bebida após a torrefação dos grãos. Na Tabela 5 são apresentados a composição química de sementes verdes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*.

Tabela 5 – Composição química de sementes verdes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*

Componentes	Concentração (g/100g)	
	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>
Hidratos de carbono/fibra		
Sacarose	6.0–9.0	0.9–4.0
Açúcares redutores	0.1	0.4
Polissacarídeos	34–44	48–55
Lignina	3.0	3.0
Pectina	2.0	2.0
Compostos nitrogenados		
Proteínas/peptídeos	10.0–11.0	11.0–15.0
Aminoácidos livres	0.5	0.8–1.0
Cafeína	0.9–1.3	1.5–2.5
Trigonelina	0.6–2.0	0.6–0.7
Lipídios		
Óleo de café (triglicerídeos com insaponificáveis, esteróis/tocoferóis)	15–17.0	7.0–10.0
Diterpenos (livres e Esterificados)	0.5–1.2	0.2–0.8
Minerais	3.0–4.2	4.4–4.5
Ácidos e ésteres		
Ácidos clorogênicos	4.1–7.9	6.1–11.3
Ácidos alifáticos	1.0	1.0
Ácido quínico	0.4	0.4

Fonte: FARAH, 2012.

3.4.1 Cafeína

A cafeína é uma metilxantina de sabor amargo embora, no entanto, não seja responsável por mais que 10% da amargura percebida na bebida do café. Este alcaloide é estável ao calor e sua concentração é aproximadamente duas vezes maior na espécie *C. canephora* que a encontrada na espécie *C. arabica* (FARAH, 2012).

Fatores ambientais e agrícolas parecem ter um efeito mínimo sobre a quantidade de cafeína presente no café. Durante a torrefação, não há nenhuma perda significativa em termos de cafeína. Um copo da bebida de café normalmente contém 70-

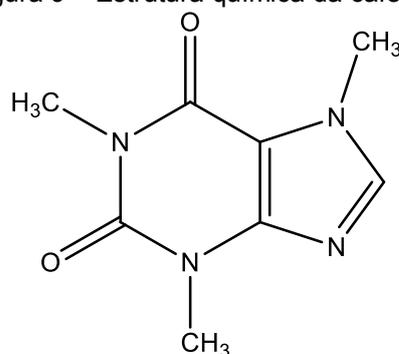
140 mg de cafeína, dependendo do tamanho do copo, do blend de café e da preparação (WEI; TANOKURA, 2014)

Dentre as substâncias contidas no café, a cafeína foi a primeira a ser identificada por um químico alemão chamado Ferdinand Runge, no ano de 1820. As propriedades estimulantes desse alcaloide, fizeram do café umas das bebidas mais consumidas no mundo. Ainda devido às suas propriedades, a cafeína ou 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1-*H*-purina-2,6-diona, como é sistematicamente chamada, foi uma das substâncias mais estudadas em toda a história da medicina. A sua ingestão, entretanto, é segura na dose existente em 3 ou 4 xícaras diárias (até 500 mg/dia), e estudos demonstram que nessa concentração, a cafeína tem um papel importante no rendimento escolar (ENCARNAÇÃO; LIMA, 2003).

A elucidação da estrutura demorou um pouco mais; sendo que até 1873 a opinião sobre a fórmula molecular da cafeína era de que poderia ser $C_{16}H_{10}N_4O_4$. A cafeína ocorre tanto em chá de folhas verdes de *Camellia sinensis* L. (até 5%), quanto em sementes de café *Coffea arabica* L. (até 1,5%). E, ao contrário do que se acreditava, não há diferenças entre a “teína” do chá e a “cafeína” do café, sendo a mesma substância. Outras fontes estão em chá mate (erva mate) (1%), guaraná, nozes de cola e sementes de cacau (0,2%) (BERGER; SICKER, 2009).

Hoje já se sabe sua fórmula molecular ($C_8H_{10}N_4O_2$), sua massa exata (194,0804) e ela é comercialmente disponível (Figura 9).

Figura 9 – Estrutura química da cafeína.

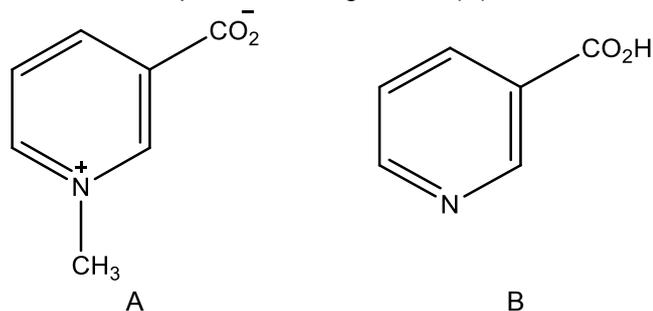


Fonte: O autor

3.4.2 Trigonelina

A trigonelina (Figura 10 A) é um alcaloide biologicamente derivado da metilação enzimática do ácido nicotínico (Figura 10 B). Ela também contribui para a amargura da bebida e é um precursor para a formação de diferentes classes de compostos voláteis durante a torra dos grãos como pirróis e piridinas, alguns dos quais podem conferir sabor desagradável (FARAH, 2012).

Figura 10 – Estruturas químicas da trigonelina (A) e ácido nicotínico (B).



Fonte: O autor.

Análises laboratoriais indicaram que os ácidos clorogênicos, o ácido nicotínico e a trigonelina, todos componentes do café verde ou torrado, possuem propriedades bactericida e adesiva. Tais resultados permitiram a hipótese de que essas substâncias, efetivamente, podem prevenir a formação de cáries dentárias (ENCARNAÇÃO; LIMA, 2003).

3.4.3 Ácidos Clorogênicos

Os ácidos clorogênicos (ACGs) compreendem um grupo majoritário de compostos fenólicos que derivam da esterificação de um ou mais resíduos de ácidos fenólicos (principalmente o cafêico, ferúlico, ou ácido *p*-cumárico) com o (-)-ácido quínico e que são comumente encontrados e diferentemente distribuídos em plantas superiores (BICCHI et al., 1995; FARAH et al., 2008).

Em um estudo de correlação entre o teste de xícara e os atributos químicos de café arábica brasileiro, Farah et al. (2006), identificaram 8 ácidos clorogênicos. Os

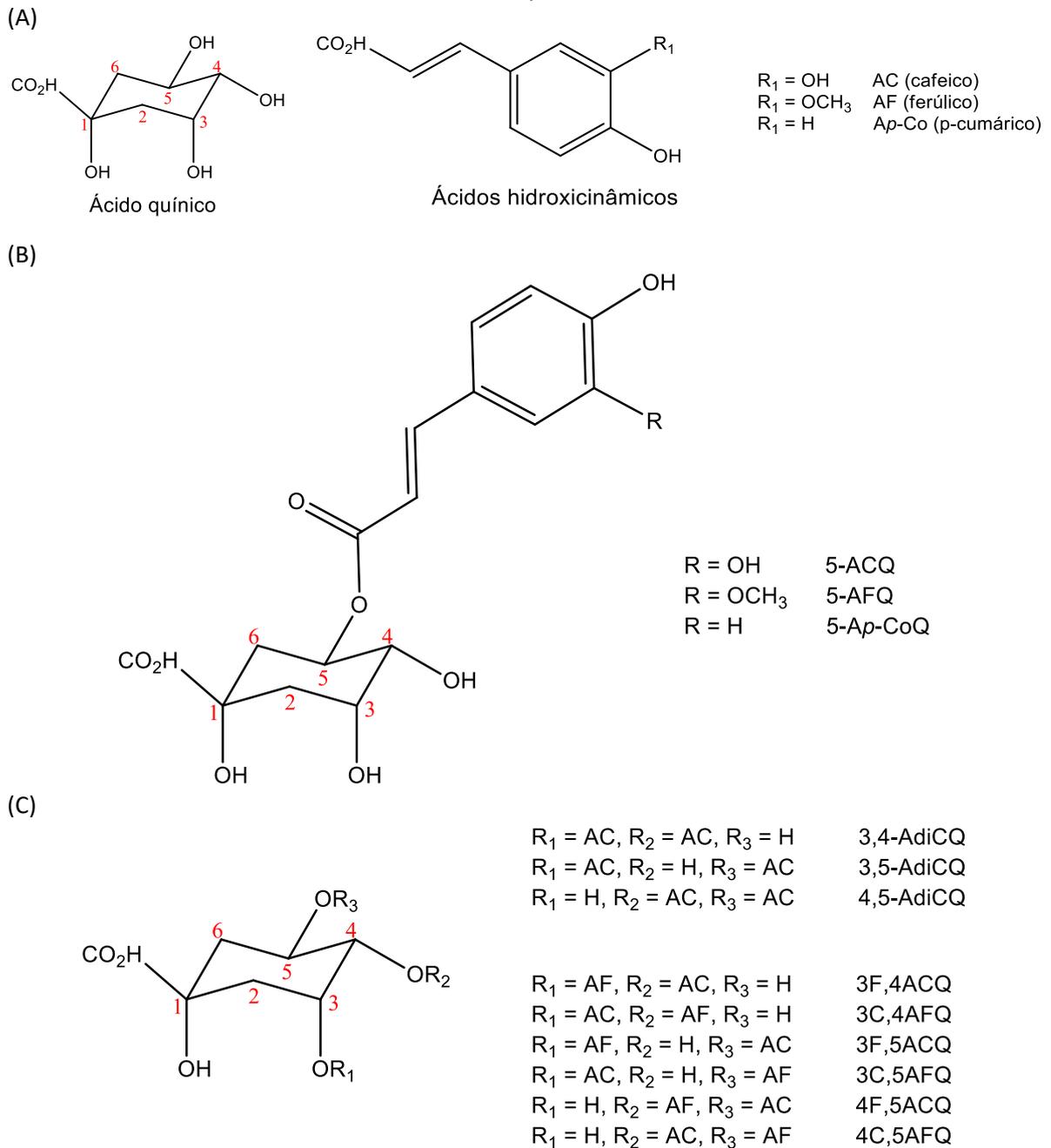
ácidos cafeoilquínicos corresponderam a 83% do total de ácidos clorogênicos nos grãos verdes. O maior teor de ácidos clorogênicos totais nos grãos verdes foi correlacionado com o café de pior qualidade, Rio zona, e o menor teor correlacionado com a amostra de melhor qualidade na prova de xícara, Mole.

As reações químicas que ocorrem durante a torra dos grãos de café, transformam os ácidos clorogênicos em compostos que operam no sistema nervoso central e estão ligados ao estado de humor, prevenindo sensações de depressão e suas consequências como o desejo de ingerir outras drogas. Além disso, esses compostos exercem um importante papel na prevenção de infarto do miocárdio. Ademais, os ácidos clorogênicos apresentam importante função como antioxidantes naturais. E, apesar do café ser a maior fonte de ácidos clorogênicos, eles também podem ser encontrados em algumas frutas, chocolate e alguns chás (ENCARNAÇÃO; LIMA, 2003).

Em um estudo do efeito do processamento de cafés comerciais no teor de ácidos clorogênicos, Mills et al. (2013), encontraram a presença de oito ácidos fenólicos majoritários em todos os extratos analisados. Esses compostos foram identificados como sendo os ácidos 3,4 e 5-cafeoilquínicos, 4 e 5-feruloilquínicos e 3,4, 3,5 e 4,5-dicafeoilquínicos. Os dados mostraram também que os ácidos cafeoilquínicos foram os mais abundantes, com o ácido 5-cafeoilquínico respondendo por cerca de 25 a 30% do total de ácidos clorogênicos em todas as amostras analisadas. O estudo conclui também que torras mais acentuadas provocam uma diminuição no teor de ácidos clorogênicos, mas que não há uma diferença significativa quando comparados os cafés comuns, os descafeinados e os solúveis (instantâneos).

Os ácidos clorogênicos são subdivididos de acordo com a natureza e número de substituintes cinâmicos e da posição da esterificação no anel cicloexânico do ácido quínico. Os ésteres são formados preferencialmente com as hidroxilas localizadas nos carbonos 3, 4 ou 5. Menos comuns, alguns ésteres podem ser formados com a hidroxila do carbono 1 (Figura 11). Assim, as principais subclasses dos ácidos clorogênicos nos grãos verdes de café são os ácidos cafeoilquínicos, ácidos dicafeoilquínicos, ácidos feruloilquínicos e, menos abundantes, ácidos *p*-cumaroilquínicos e ácidos cafeoilferuloilquínicos (FARAH, 2012).

Figura 11 – Estruturas químicas de ácidos clorogênicos e compostos relacionados. (A) Compostos base, (B) monoésteres de ácido quínico com ácido hidroxicinâmico, (C) di-ésteres de ácido quínico com ácido cafêico e ésteres mistos. AdiCQ, ácidos dicafeoilquínicos; AFQ, ácidos feruloilquínicos; *Ap*-CoQ ácidos *p*-cumaroilquínicos.



Fonte: FARAH, 2012.

3.5 Influência da irrigação

Há tempos a irrigação era usada apenas como uma técnica de combate à seca. Hoje, no entanto, insere-se em um conceito mais abrangente de agricultura irrigada,

onde é uma estratégia para o aumento da produção, da produtividade e da rentabilidade da propriedade agrícola, de forma sustentável e criando condições para permanência do homem no campo (MANTOVANI; VICENTE; SOUZA, 2004).

No Brasil, a cafeicultura irrigada ocupa cerca de 260 mil hectares, sendo a maior parte em regiões de Cerrado e representando mais de 10% da área plantada e mais de 25% da produção de café no país. Os sistemas de irrigação mais utilizados são de aspersão (convencional, em malha ou pivô central) e os localizados (gotejamento e modificados) (FERNANDES; LIMA, 2013) (Figura 12).

Figura 12 – Imagem da forma de irrigação por gotejamento na lavoura de café.



Fonte: FERNANDES; LIMA, 2013.

Embora a maior parte das áreas irrigadas estejam em regiões com restrições hídricas consideráveis em períodos extensos do ano, é notável também a implantação de projetos de irrigação em áreas tradicionais de cafeicultura de sequeiro, onde os avanços da irrigação têm propiciado vantagens competitivas, traduzidas em maior produtividade da lavoura e melhor qualidade do produto final (MANTOVANI; VICENTE; SOUZA, 2004). Na lavoura cafeeira a água tem papel indispensável no desenvolvimento e na produção das plantas. Sem a água a planta de café murcha e perde folhas, tornando reduzida a produção de energia para o pé de café. Isso leva à diminuição do pegamento da florada e, conseqüentemente, a carga de frutos fica prejudicada (MATIELLO et al., 2016).

O objetivo central na irrigação do cafeeiro é o acréscimo de produtividade e melhoria em alguns parâmetros de qualidade do café, como classificação por penei-

ras, rendimento e qualidade de bebida. Entretanto, é necessário considerar a importância da implantação de uma cafeicultura irrigada em bases técnicas e ter claro que o sucesso depende de um planejamento que leve em conta o conceito de que cafeicultura irrigada é diferente de cafeicultura de sequeiro mais água (MANTOVANI; VICENTE, 2015).

Os efeitos da irrigação na composição química dos grãos de café e sua relação com a qualidade final do produto, na prova de xícara, ainda não foram extensivamente estudados, apesar da importância agrônômica dessa commodity. Silva et al. (2005), realizaram um estudo da influência da irrigação na composição química e na qualidade da bebida do café, onde analisaram uma única cultivar, *Coffea arabica* L. cv. Obatã IAC 1669-20, em três diferentes regiões do estado de São Paulo, sob diferentes médias anuais de chuvas e temperaturas e em uma única colheita. Tal trabalho mostrou que o teor de sacarose foi maior em grãos de cafés de plantas não irrigadas e cultivadas em regiões mais quentes, enquanto o teor de açúcares redutores foi maior nas regiões de temperaturas menores. Já o teor de cafeína, em qualquer tratamento, mostrou-se diminuído com a irrigação. O composto ácido 5-cafeoilquínico, principal isômero dos ácidos clorogênicos encontrados no café, não variou seu teor significativamente entre os tratamentos e localidades. Três testadores treinados analisaram os cafés para a qualidade da bebida e, embora a classificação tenha mostrado o café de uma localidade melhor que o das outras duas, não teve uma forte influência para distinguir os cafés por análise de componentes principais (PCA – do inglês). O teste de qualidade também foi realizado com a ajuda de uma língua eletrônica, que também mostrou que a irrigação não afetou significativamente a composição química dos cafés e a qualidade da bebida.

Em um trabalho recente, Vinecky et al. (2017), avaliaram a influência da irrigação controlada e da fertilização na composição bioquímica e na qualidade dos grãos de café arábica. Nesse trabalho, a mesma cultivar, *Coffea arabica* L. cv. Rubi MG1192, foi submetida a diferentes regimes de água e diferentes doses anuais de nitrogênio-fósforo-potássio (NPK) por três anos consecutivos. Na análise discriminante linear (LDA – do inglês), foi possível separar os cafés plantados no regime de sequeiro de outros quatro tratamentos com diferentes regimes de irrigação, com 95% de confiança. O teor de sacarose se mostrou maior nas plantas onde não houve irrigação e, em um dos anos analisados, a diferença foi de 10%. Para os três anos, incrementos

significativos nos teores de ácidos clorogênicos foram observados com o aumento do tempo de irrigação na estação seca. Trigonelina e lipídios totais também foram afetados pela seca nos três anos de testes; seus teores aumentaram com a diminuição da irrigação. Segundo os autores, independentemente da fertilização, a ausência de uma irrigação controlada durante o desenvolvimento dos grãos de café é nitidamente inapropriada para a cultura do café sob o clima do Cerrado brasileiro. Diminuindo os teores de cafeína e ácidos clorogênicos e aumentando os teores de lipídios e sacarose, o stress hídrico controlado durante a estação seca altera a qualidade do café positivamente. E, embora a qualidade da bebida não tenha sido avaliada, os autores sustentam que os grãos colhidos de uma lavoura com suspensão controlada de água durante a estação seca levam a uma melhor qualidade de bebida, quando comparados com grãos produzidos sob irrigação contínua.

3.6 Cafés resistentes e suscetíveis à ferrugem

Foi a partir da década de 1970, após a constatação da ferrugem alaranjada no país, que várias instituições brasileiras se lançaram na busca de cultivares de café portadoras de resistência ao fungo *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br., agente causador da ferrugem do cafeeiro (PEREIRA; BAIÃO, 2015) (Figura 13).

Figura 13 – Imagem da ferrugem do cafeeiro.



Fonte: <http://www.gfcafe.com.br/single-post/2015/03/20/Veranico-n%C3%A3o-para-a-ferrugem-do-cafeeiro>. Acesso em: out. 2017.

A ferrugem é a doença mais importante do cafeeiro, pois ao atingir com gravidade grandes áreas, provoca enormes prejuízos na produtividade. O fungo *H. vastatrix* é um parasita que sobrevive sobre o tecido vivo da folhagem do café. Se desenvolve em lesões, nas folhas, onde esporula e daí se dissemina (MATIELLO; ALMEIDA, 2006). Os prejuízos nas regiões cafeeiras brasileiras, onde a doença encontra condições climáticas favoráveis, podem variar de 35 a 50%. Os estragos mais importantes causados pelo fungo são a desfolha precoce das plantas e a seca dos ramos que, conseqüentemente, não produzirão frutos no ano seguinte (ZAMBOLIM, 2015).

O controle da ferrugem pode ser de forma natural ou por controle químico. O controle natural inclui o controle genético, com variedades resistentes; o controle biológico, pela ação de inimigos naturais; e as práticas de manejo da lavoura. Ainda, pode-se incluir a indução de resistência através de produtos biológicos, que propiciam a produção de fito-alexinas pelo cafeeiro. O controle químico é adotado extensivamente no Brasil e vem se mostrando muito eficiente e econômico, tendo que, para isso, ser adotado com critérios corretos de seleção dos fungicidas, doses, épocas e tecnologias de aplicação (MATIELLO et al., 2016).

Todavia, o controle genético, com o uso de variedades resistentes, é o método mais econômico de controle de uma doença (MATIELLO; ALMEIDA, 2006). Existem variedades altamente resistentes ao fungo, ou seja, plantas consideradas imunes à doença. Em geral, as cultivares derivadas de ‘Híbrido de Timor’ – Catimores ou Sarchimores – apresentam alta resistência à ferrugem (Figura 14A). Outras cultivares, em que há ocorrência da doença, mas as pústulas são pequenas e em número reduzido, são consideradas moderadamente resistentes. Geralmente, essa resistência é oriunda de *C. canephora*, como por exemplo, nas cultivares Icatu e Catucaí. Já as cultivares em que a ferrugem causa dano econômico são consideradas suscetíveis. Nessa categoria, encontram-se as cultivares Bourbon, Catucaí (Figura 14B), Rubi, Topázio, entre outras (GUERREIRO FILHO et al., 2008b).

Figura 14 – Imagem de diferentes níveis de resistência a *H. vastatrix* apresentados pelas cultivares Obatã – altamente resistente (A) e Catuaí Vermelho – suscetível (B).



Fonte: (GUERREIRO FILHO et al., 2008b).

O estudo feito por Mendonça e colaboradores (2007), avaliou a influência da espécie *Coffea canephora*, utilizada na obtenção de nove cultivares com resistência à ferrugem, através da composição química dos grãos crus. Tal estudo mostrou que as cultivares suscetíveis ao fungo estudadas, apresentaram maiores teores de açúcares totais que as cultivares resistentes; uma característica que pode ter sido herdada dos cafés robustas, que possuem menores teores desses constituintes. Na avaliação dos teores de polifenóis, apenas quatro cultivares resistentes mostraram correlação com o café robusta, que contem maiores teores desses compostos. Com relação aos teores de cafeína no grão cru, esperava-se que todas as cultivares originadas de cruzamentos com a espécie robusta apresentassem os maiores teores. Contudo, 'Mundo Novo' e 'Rubi', cultivares 100% arábica, também tiveram os maiores valores deste alcaloide. Ainda, em outro estudo, Fassio et al. (2015) avaliam a influência da resistência ao *H. vastatrix* nos teores de ácidos graxos nos grãos de sete cultivares de *Coffea arabica* L. resistentes à ferrugem e duas cultivares susceptíveis, utilizadas como testemunhas. O teor de ácidos graxos no café verde foi eficiente na discriminação da maioria das cultivares resistentes à ferrugem.

Na relação entre análise sensorial e resistência à ferrugem, FASSIO et al. (2016), correlacionaram os teores de cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos de cultivares resistentes cultivadas em duas localidades e suas provas de xícara, por análise de componentes principais. Os resultados mostraram que não houve uma boa relação entre os teores desses compostos e os atributos sensoriais. Os compostos discriminaram as localidades, mas não foram capazes de discriminar as cultivares.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção e preparo das amostras

As amostras de *Coffea arabica* L. das cultivares Paraíso H419-1, Catiguá MG s3, Catiguá MG s2, Rubi JM MG 1192, Topázio MG1190, IBC 12 IAC 125 RN, Acauã, Catuaí 144, Catuaí 99 e Catuaí 62 foram cedidas pela Fundação Comunitária Educacional e Cultural de Patrocínio (Funcecp), de sua Fazenda Experimental.

A Fazenda Experimental da Funcecp está situada no limite urbano da cidade de Patrocínio, Minas Gerais, a uma altitude de 948 metros e coordenadas 18°57'21.3" S (latitude) e 46°58'44.2" W (longitude). A temperatura média anual da região é de 22 °C e a precipitação média anual é de 1.193 mm. Os cafés estão plantados numa área de 3 hectares, nos sistemas de sequeiro e irrigação por gotejamento.

Nove litros de cada cultivar de café foram colhidos no mês de junho de 2017. Os cafés plantados no regime sequeiro foram colhidos nos dias 05, 06 e 07 do referido mês e os cafés plantados no regime de irrigação (por gotejamento) foram colhidos uma semana depois, nos dias 13 e 14 do mesmo mês. A colheita foi manual do tipo seletiva, onde apenas os grãos maduros ou cerejas foram colhidos.

Utilizou-se o processamento “via seca”, em que os cafés foram secos em terreirão de cimento da própria Funcecp, por um período de aproximadamente 15 dias, obtendo-se, dessa forma, o café natural. Os cafés foram secos até apresentarem um percentual de aproximadamente 12% de umidade.

Depois de secos, os cafés foram separados em dois lotes – um para a torra e outro para a análise dos grãos verdes. O lote destinado à torra foi devidamente armazenado na forma de café em coco (sem descascar). O lote para análise dos grãos verdes foi descascado e selecionado. Foram selecionados os grãos das peneiras 16, 17 e 18. Os grãos mocos, os grãos mal granados, quebrados e os grãos brocados foram descartados. As amostras então, constituem-se de grãos de peneira 16 acima.

Após a classificação, os cafés foram congelados e triturados a frio, para evitar oxidação de material. Depois de triturados, todos foram peneirados em peneira de 42 meshes (0,355 mm de abertura). Na sequência foram liofilizados por um período de 8

horas em liofilizador LS 3000 (Terroni Equipamentos Científicos), e armazenados congelados até o momento das análises.

As amostras de cafés receberam códigos de identificação, como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Códigos das amostras de cafés.

Amostras	
Coffee 03 = Acauã	Coffee 19 = Acauã
Coffee 04 = Catiguá MG S2	Coffee 20 = Catiguá MG S2
Coffee 05 = Catiguá MG S3	Coffee 21 = Catiguá MG S3
Coffee 06 = IBC 12 IAC 125 RN	Coffee 22 = IBC 12 IAC 125 RN
Coffee 08 = Paraíso H 419-1	Coffee 24 = Paraíso H 419-1
Coffee 12 = Topázio MG 1190	Coffee 28 = Topázio MG 1190
Coffee 13 = Catuaí 62	Coffee 29 = Catuaí 62
Coffee 14 = Catuaí 99	Coffee 30 = Catuaí 99
Coffee 15 = Catuaí 144	Coffee 31 = Catuaí 144
Coffee 16 = Rubi	Coffee 32 = Rubi
SEQUEIROS	IRRIGADOS
RESISTENTES	SUSCETÍVEIS
(Ao fungo <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. Et Br.)	(Ao fungo <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. Et Br.)

Fonte: O autor.

4.2 Preparo dos extratos

A extração metanólica foi conduzida segundo a metodologia adaptada de Aquino et al. (2014). Os extratos dos grãos de café verde foram preparados em triplicata, usando-se 1,0 grama de cada cultivar e 15,0 mL de metanol grau HPLC, em refluxo por 2 horas. Em seguida, os extratos foram filtrados com filtro de papel comum (qualitativo). Logo após as amostras foram mantidas em freezer até o momento das análises.

4.3 Espectrometria de massas com ionização por eletrospray por infusão direta

Os grãos de café sadios foram caracterizados quimicamente por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (EM-IES) através de seus extratos metanólicos injetados diretamente no equipamento nos modos positivo e negativo, sem separação cromatográfica, obtendo o “fingerprint” de cada amostra.

O espectrofotômetro de massa ESI-Q-TOF (Quadropole Time of Flight) da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por eletrospray (ESI) que se encontra no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (IGEB-UFU), foi usado para adquirir espectros de massas e os experimentos MS/MS. Os extratos metanólicos foram injetados a uma taxa de 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando um injetor automático. As condições gerais do equipamento Agilent® foram: temperatura da fonte de 80°C, 2.500V como a voltagem do capilar e 40 V de voltagem do cone. Os espectros de massa foram adquiridos e acumulados no modo de varredura (scan) de m/z 100 a 1.000 com o auxílio do software *MassHunter Workstation Qualitative Analysis* (Agilent®). A identificação dos compostos foi realizada comparando os valores de íons m/z obtidos por ESI-QTOF-MS com aqueles relatados na literatura e plataformas online (www.lipidmaps.org; <https://metlin.scripps.edu>). Uma correspondência entre o valor de íons m/z experimental e teórica da biblioteca foi considerada verificando o menor valor de erro, em ppm, tanto para o modo positivo quanto para o modo negativo, de acordo com a Equação 1.

$$E_{\text{ppm}} = \left[\frac{(\text{massa exata} - \text{massa experimental})}{\text{massa exata}} \right] 10^6, \quad \text{Equação 1}$$

4.4 Torra e análise sensorial da bebida

A torra dos grãos e a análise sensorial foram realizados com grãos retidos na peneira 16 e acima, com base em protocolos descritos pela Associação de Cafés Especiais da América (do inglês, Specialty Coffee Association of America — SCAA). O lote destinado à prova de xícara foi torrado em um torrador comercial elétrico de bancada (Pinhalense, modelo TC-0, Brasil) à temperatura de 190 ± 10 °C, por um período de 10 ± 2 minutos. A cor da torra foi determinada visualmente usando o disco de torra (AGTRON-SCAA, 1995) (MORAIS et al., 2009). A temperatura e o tempo de torra foram monitorados com termômetros e cronômetros.

Para a análise sensorial, três provadores treinados (ANEXOS B, C e D) avaliaram dez atributos sensoriais (fragrância/aroma, consistência, ausência de defeitos, doçura, sabor, acidez, corpo, equilíbrio, finalização e impressão global), que foram

registrados em uma escala de 0 a 10 pontos, de acordo com a SCAA (LINGLE, 2011). O placar final sensorial foi gerado a partir da soma dos atributos avaliados. As descrições das características sensoriais de cada amostra analisada pelos provadores, de acordo com os protocolos da SCAA, também foram registradas (ANEXO A).

Os dados gerados no teste de xícaras foram submetidos à análise estatística univariada usando a plataforma on-line Sisvar (FERREIRA, 2014).

4.5 Tratamento dos dados e análise estatística

Com o uso do software *MassHunter Workstation Qualitative Analysis* (Agilent®), obteve-se um espectro resultante da média de nove leituras (*scans*) do intervalo de 0,290 a 0,440 minutos (modo positivo), e da média de 28 leituras (*scans*) do intervalo de 0,230 a 0,680 minutos (modo negativo) do cromatograma de íons obtido na análise de cada extrato. Picos de íon com intensidade relativa inferior a 5% em uma amostra foram considerados como ruído para o estudo e, portanto, foram descartados. Embora os dados tenham sido obtidos em um analisador de alta resolução, foram considerados valores de *m/z* com apenas duas casas decimais após a vírgula. Os dados, então, foram exportados para planilhas eletrônicas em forma de uma tabela de relação massa/carga (*m/z*) e abundância absoluta e salvos como Arquivos de Valores Separados por Vírgulas (*.csv). Os arquivos *.csv foram agrupados em quatro pastas distintas, a saber: cafés sequeiros (*non-irrigated coffee*), cafés irrigados (*irrigated coffee*), cafés resistentes (*resistant coffee*) e cafés suscetíveis (*susceptible coffee*). Posteriormente essas pastas foram agrupadas de acordo com cada análise e compactadas para o formato de arquivo .ZIP.

Antes das análises estatísticas os dados foram pré-processados. Foi feita a estimativa de valores ausentes (do inglês, *Missing value estimation*) e, embora existam vários métodos diferentes para essa finalidade, foi aplicado o método padrão (STACKLIES et al., 2007). O método padrão substitui todos os valores ausentes por valores pequenos (a metade dos valores mínimos positivos nos dados originais) assumindo ser o limite de detecção. Após isso, os dados foram escalados utilizando o auto dimensionamento ou unidade de dimensionamento de variância (do inglês, *auto scaling*), onde o desvio padrão é usado como fator de escala (VAN DEN BERG, et al.,

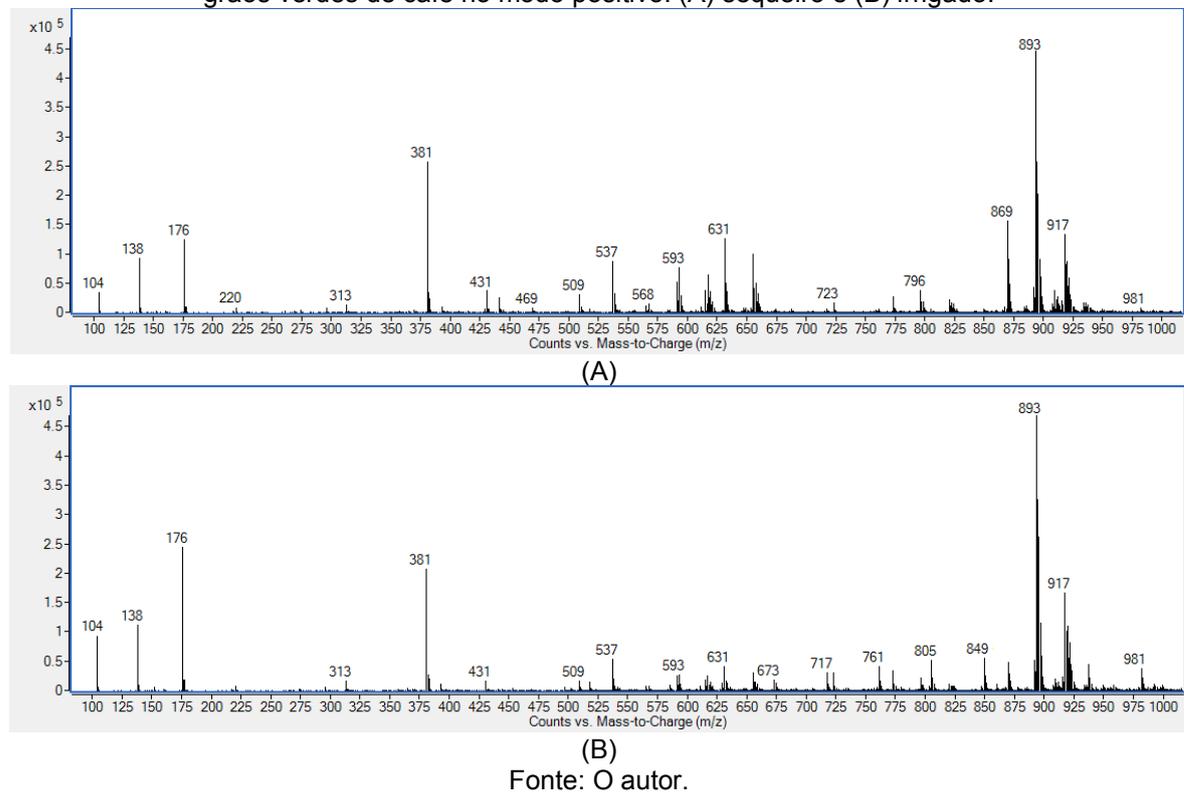
2006). Os dados escalados foram inicialmente submetidos à análise exploratória de dados utilizando os métodos não supervisionados de Análise de Componentes Principais (PCA – do inglês, *Principal Component Analysis*) (HOTELLING, 1933) e Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA – do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis*) (BRIDGES, 1966). Por fim, foi empregada a análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA – do inglês, *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) (BARKER; RAYENS, 2003), um método supervisionado de classificação para identificar os metabólitos alterados entre os grupos e estabelecer os potenciais marcadores químicos. O modelo resultante desta análise foi validado utilizando validação cruzada e a capacidade de predição do modelo foi avaliada utilizando os parâmetros de exatidão, R² e Q². Foram considerados potenciais marcadores as variáveis localizadas longe do agrupamento central da maioria das variáveis no *loading plot* bem como os resultados fornecidos pelo índice VIP. O pré-processamento dos dados como normalização e escalamento e ainda, as análises estatísticas, foram realizadas utilizando a plataforma online MetaboAnalyst 3.0 (www.metaboanalyst.ca) (XIA; WISHART, 2016).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização química de cafés por Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (EM-IES), no modo positivo

Os espectros de massas típicos, gerados no modo positivo pelo analisador de alta resolução ESI-QTOF, mostraram íons m/z de moléculas da matriz característica para cada uma das amostras de cafés verdes (Figura 15).

Figura 15 – Espectros de massa com ionização por eletrospray típicos dos extratos metanólicos de grãos verdes de café no modo positivo: (A) sequeiro e (B) irrigado.



Todos os espectros gerados mostram o mesmo conjunto de íons, uma vez que as amostras são de cafés da mesma espécie (*Coffea arabica*) e cultivados sob as mesmas condições edafoclimáticas. A diferença, no entanto, aparece na abundância dos íons mostrados em cada espectro, em função dos diferentes regimes de água – sequeiro e irrigado.

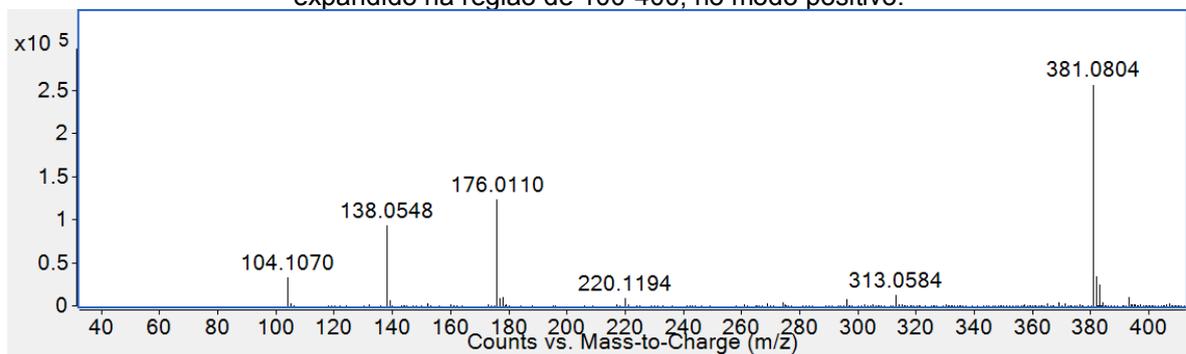
Apesar da espectrometria de massas ser uma técnica analítica amplamente utilizada na caracterização química e análise em diferentes áreas, especialmente amostras de alimentos (ALVES et al., 2010; SANTOS, et al., 2006; CHANDRASEKARA, SHAHIDI, 2011), na literatura são relatados poucos trabalhos que analisam a composição química do café verde por espectrometria de massas e estes normalmente tratam da constituição do café verde da espécie *Coffea arabica* (Arabica) e (ou) *Coffea Canephora* (Robusta) (ALONSO-SALCES, GUILLOU, BERRUETA, 2009; JAISWAL, KUHNERT, 2010; AMORIM et al., 2009; MENDONÇA et al., 2008; GARRETT et al., 2012; GARRETT et al., 2014; GARRETT, REZENDE, IFA, 2013) ou alguns poucos cultivares (DA ROSA et al., 2016; GARRETT et al., 2013). Para variedades do café arábica em ambiente irrigado e de sequeiro não foram encontrados na literatura trabalhos que analisam, por espectrometria de massas, a influência da irrigação na composição dos grãos verdes.

Na região de menor massa molecular, íons m/z 100 - 400 (Figura 16), os principais íons observados no extrato metanólico de *Coffea arabica* L. foram os íons m/z 104,1070 relativo a um possível candidato a colina (NIKOLIC et al., 2012); m/z 138,0548 e m/z 176,0110 associados à molécula protonada de trigonelina e seu aduto de potássio, respectivamente e, por fim, o íon m/z 381,0804 relativo a um aduto de potássio da sacarose (AMORIM et al., 2009). Aquino e colaboradores (2014), relacionaram o íon m/z 104 à molécula protonada do ácido gama-amino butanoico (do inglês *GABA – gama-aminobutanoic acid*), embora, para o presente estudo, o erro calculado (349,76 ppm) refute essa possibilidade presente no café.

No final do desenvolvimento dos grãos de café verdes, a sacarose torna-se 100% do açúcar total livre nos grãos maduros, com 5 a 12% do peso seco, enquanto as concentrações de glicose e frutose diminuem para 0,03 a 0,04% do peso seco, respectivamente (REDGWELL; FISCHER, 2006). Isto, sem dúvida, explica o estudo de Garrett, Rezende e IFA (2016), que em um trabalho de imageamento por DESI-MS (do inglês *desorption electrospray ionization mass spectrometry*), observaram que a sacarose está distribuída em todo o endosperma do grão de café. Ainda, segundo os autores, a sacarose e os ácidos clorogênicos são compostos facilmente ionizáveis pelas técnicas de ionização suave, como por exemplo a ionização por eletrospray e assim, geralmente aparecem com abundâncias relativas elevadas nos espectros de massas.

A espectrometria de massas com ionização por eletrospray com infusão direta apresenta vantagens como pouco preparo de amostras e uma imediata informação composicional da matriz analisada para os compostos ionizados pelo eletrospray (AMORIM et al., 2009). Com o uso dessa técnica, diferentes trabalhos analisaram grãos verdes de café: onde os grãos são previamente desengordurados antes da extração (MENDONÇA et al., 2008) e onde a extração é realizada com os grãos *in natura* (AMORIM et al., 2009; DA ROSA et al., 2016). Entretanto, tais trabalhos não mostraram resultados referentes aos trigliceróis em seus espectros de massas, o que pode ser explicado pelo tipo de extração e solvente utilizados. Fatores como tamanho da partícula, escolha do solvente e tempo de extração são determinantes no rendimento da fração oleosa dos grãos de café (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006). Assim, o sinal referente à cafeína, que aparece como molécula protonada, íon m/z 195 e (ou) um aduto de potássio, íon m/z 233 (AMORIM et al., 2009; GARRETT; REZENDE; IFA, 2013; DA ROSA et al., 2016), pode ter sido suprimido pelo aparecimento, no presente trabalho, de trigliceróis como íons m/z com maior abundância relativa. Ainda, o trabalho de Mendonça e colaboradores, 2008, mostra a ausência de cafeína na análise de café arábica sem defeitos.

Figura 16 – Espectro de massa com ionização por eletrospray do extrato metanólico de café verde expandido na região de 100-400, no modo positivo.



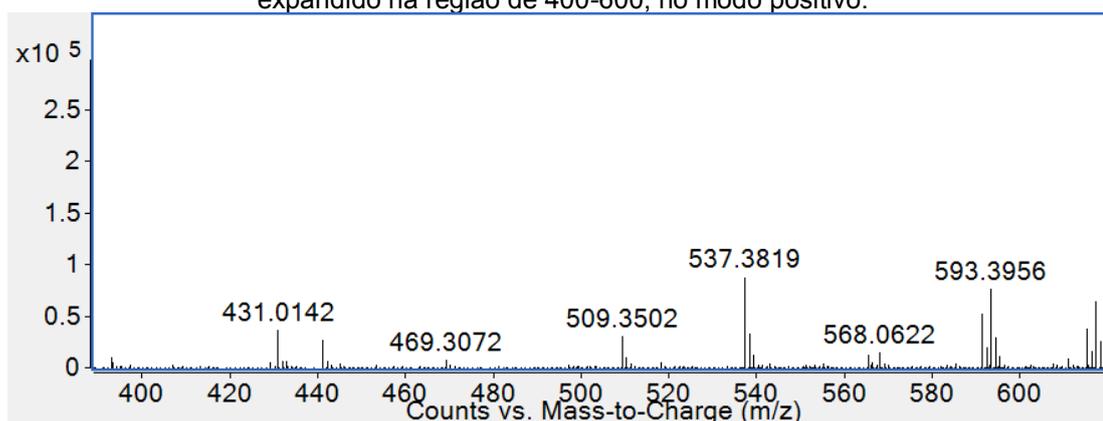
Fonte: O autor.

A região de íons m/z 400 - 600 do espectro de massas (Figura 17) caracteriza-se pela presença dos principais íons m/z 431, 509, 537 e 593. O íon m/z 431,0142, segundo Mendonça et al. (2008) é o principal cátion diagnóstico de grãos pretos e tem sua relação de intensidade ligada ao aumento da fermentação nos grãos de café. Nesse mesmo trabalho, o íon-cátion m/z 431 foi reportado como sendo um possível

fragmento dos compostos Kaempferol-3-O- α -L-ramnosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo, Kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo e Kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosídeo-7-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-ramnopiranosídeo. Esta região ainda mostrou β N-alcanoil-5-hidroxitriptamidas (C5HT), derivados de ácidos graxos. Aparecem β N-araquinoil-5-hidroxitriptamida, m/z 509,3502 e β N-behenoil-5-hidroxitriptamida, m/z 537,3819 (DA ROSA et al., 2016). Entretanto, Garret et al. (2014), sugere a identificação do íon m/z 537 como sendo um éster diterpênico do cafestol (palmitato) obtido por $[M + H - H_2O]^+$ que, para o presente trabalho, apresenta erro em ppm muito elevado. O íon m/z 593 não foi identificado.

Os compostos β N-alcanoil-5-hidroxitriptamidas (C5HT) estão presentes na parte cerosa dos grãos de café, mais especificamente, nas camadas externas das sementes, tanto dos grãos verdes quanto dos grãos torrados. Entretanto, os processos industriais de produção do café descafeinado e do café sob tratamento de vapor (do inglês *steaming*), provocam uma diminuição no teor dessas substâncias (LAGANA et al., 1989; PEHL et al., 1997; SPEER, KÖLLING-SPEER, 2006). Estudos conduzidos por Lang et al. (2009) com café arábica filtrado e em baixas concentrações de triptamidas, concluíram que estes compostos são capazes de induzir a secreção gástrica. Assim, soluções contendo as quatro triptamidas predominantes no café arábica (C₁₈-5HT, C₂₀-5HT, C₂₂-5HT, C₂₄-5HT), em concentrações reais e a linha de célula gástrica humana HGT-1 (do inglês *human gastric cell line*), foi possível evidenciar que os compostos β N-alcanoil-5-hidroxitriptamidas são capazes de induzir alguma secreção gástrica.

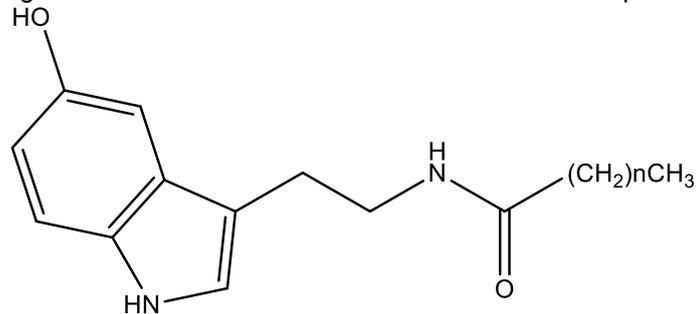
Figura 17 – Espectro de massa com ionização por eletrospray do extrato metanólico de café verde expandido na região de 400-600, no modo positivo.



Fonte: O autor.

A Figura 18 mostra a estrutura base para as β N-alcanoil-5-hidroxitriptamidas.

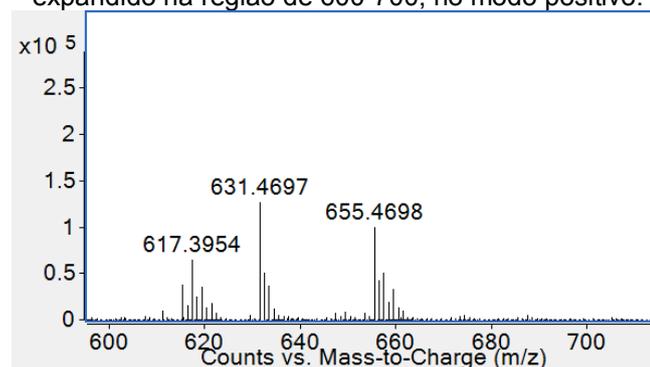
Figura 18 – Estrutura base de β N-alcanoil-5-hidroxitriptamidas.



Onde: $n = 16$ - β N-estearoil-5-hidroxitriptamida (C_{18} -5HT)
 $n = 18$ - β N-araquinoil-5-hidroxitriptamida (C_{20} -5HT)
 $n = 20$ - β N-behenoil-5-hidroxitriptamida (C_{22} -5HT)
 $n = 22$ - β N-lignoceroil-5-hidroxitriptamida (C_{24} -5HT)
 Fonte: DA ROSA et al., 2016.

A região de íons m/z 600-900 é característica dos ácidos clorogênicos, acilgliceróis e outros oligômeros (DA ROSA et al., 2016; AQUINO et al., 2014). Assim, foram observados os diacilgliceróis palmitoil-linoleoil (PL; m/z 631,4697), e dilinoleoil (LL; m/z 655,4698) (Figura 19). O íon m/z 617 ainda não foi relatado para amostras de café, mas pode ser sugestivamente atribuído ao aduto de potássio de 1-hexadecil-2-dodecanoil-glicero-3-fosfato, em virtude do baixo valor de erro em ppm (1,78) e de fosfolipídeos já terem sido reportados na matriz do café (SPEER, KÖLLING-SPEER, 2006).

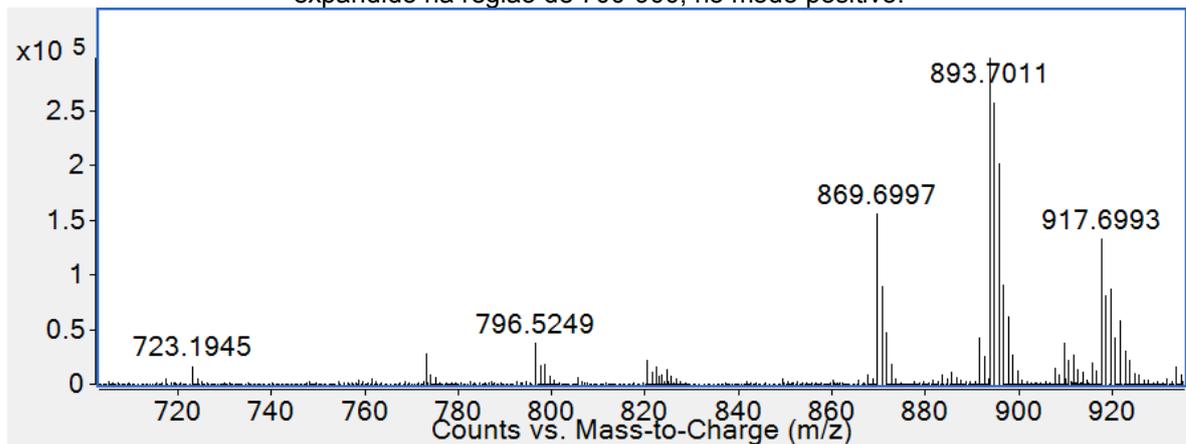
Figura 19 – Espectro de massa com ionização por eletrospray do extrato metanólico de café verde expandido na região de 600-700, no modo positivo.



Fonte: O autor.

Na região dos triacilgliceróis (Figura 20), apareceram o dipalmitoil-linoleoil-glicerol (PPL; m/z 869,6997) e o palmitoil-dilinoleoil-glicerol (PLL; m/z 893,7011) (DA ROSA et al., 2016). Além disso, os íons m/z 796 e m/z 917 foram sugestivamente atribuídos aos adutos de moléculas sodiada e potassíada de PE (40: 7) e TG (54: 6), respectivamente.

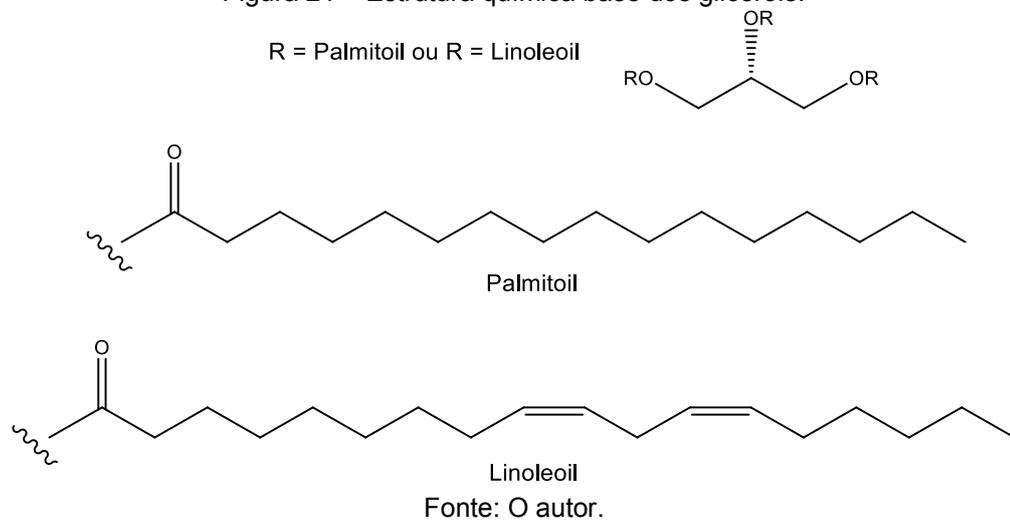
Figura 20 – Espectro de massa com ionização por eletrospray do extrato metanólico de café verde expandido na região de 700-900, no modo positivo.



Fonte: O autor.

A Figura 21 mostra a estrutura base dos gliceróis.

Figura 21 – Estrutura química base dos gliceróis.



Os erros, em ppm, também foram calculados e podem ser observados na Tabela 7, a seguir.

Tabela 7 – Compostos caracterizados por EM-IES nos extratos metanólicos do café verde, no modo positivo.

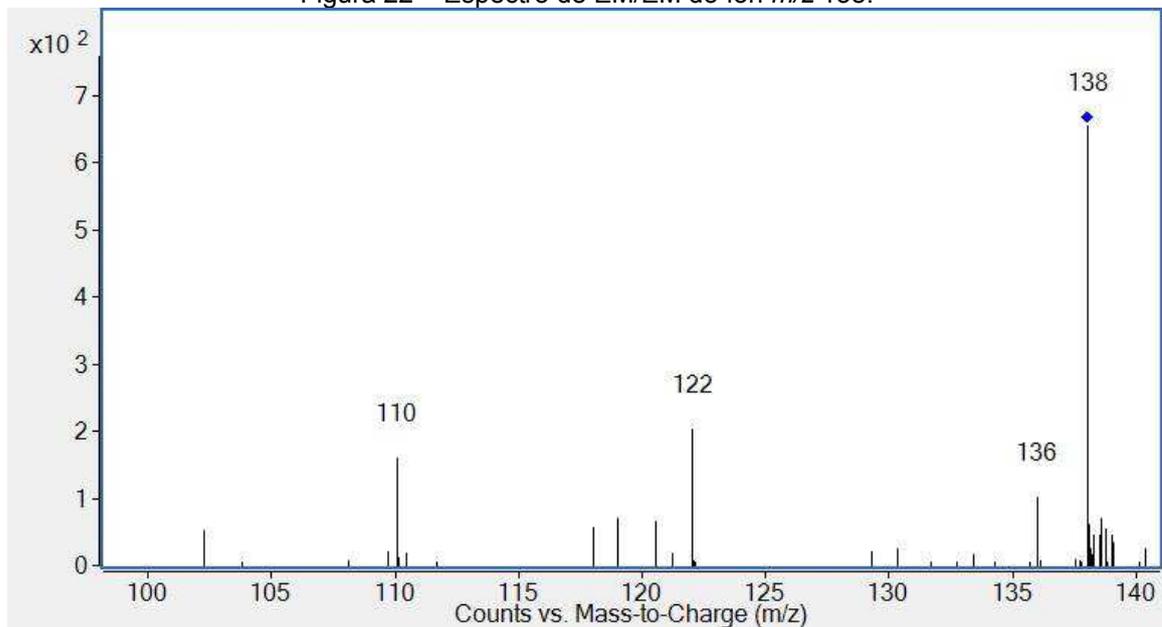
Experimental <i>m/z</i>	Teórico <i>m/z</i>	Erro (ppm)	Fórmula Molecular	Aduto	Composto sugerido	Referências
104,1070	104,1073	-2,88	C ₅ H ₁₄ NO ⁺	[M] ⁺	Colina	NIKOLIC et al., 2012
138,0548	138,0549	0,72	C ₇ H ₇ NO ₂	[M+H] ⁺	Trigonelina	AMORIM et al., 2009
176,0110	176,0108	1,13	C ₇ H ₇ NO ₂	[M+K] ⁺		
381,0804	381,0793	2,88	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	[M+K] ⁺	Sacarose	AMORIM et al., 2009
509,3502	509,3509	-1,37	C ₃₀ H ₅₀ N ₂ O ₂	[M+K] ⁺	^β N- araquinoil-5-hidroxitriptamida	DA ROSA et al., 2016
537,3819	537,3822	-0,55	C ₃₂ H ₅₄ N ₂ O ₂	[M+K] ⁺	^β N-behenoil-5-hidroxitriptamida	DA ROSA et al., 2016
617,3954	617,3943	1,78	C ₃₁ H ₆₃ O ₇ P	[M+K] ⁺	1-hexadecil-2-dodecanoil-glicerol-3-fosfato	https://metlin.scripps.edu
631,4697	631,4704	-1,10	C ₃₇ H ₆₈ O ₅	[M+K] ⁺	palmitoil-linoleoil (PL)	DA ROSA et al., 2016
655,4698	655,4704	-0,91	C ₃₉ H ₆₈ O ₅	[M+K] ⁺	dilinoleoil (LL)	DA ROSA et al., 2016
796,5249	796,5252	-0,37	C ₄₅ H ₇₆ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	PE (40:7) ^a	https://lipidmaps.org
869,6997	869,7000	-0,34	C ₅₃ H ₉₈ O ₆	[M+K] ⁺	dipalmitoil-linoleoil (PPL)	DA ROSA et al., 2016
893,7011	893,7000	1,23	C ₅₅ H ₉₈ O ₆	[M+K] ⁺	palmitoil-dilinoleoil (PLL)	DA ROSA et al., 2016
917,6993	917,6995	-0,21	C ₅₇ H ₉₈ O ₆	[M+K] ⁺	TG (54:6) ^a	https://lipidmaps.org

^aCN:DB, número de carbonos/ligação dupla; PE, fosfoetanolaminas; TG: Triacilgliceróis

Fonte: O autor.

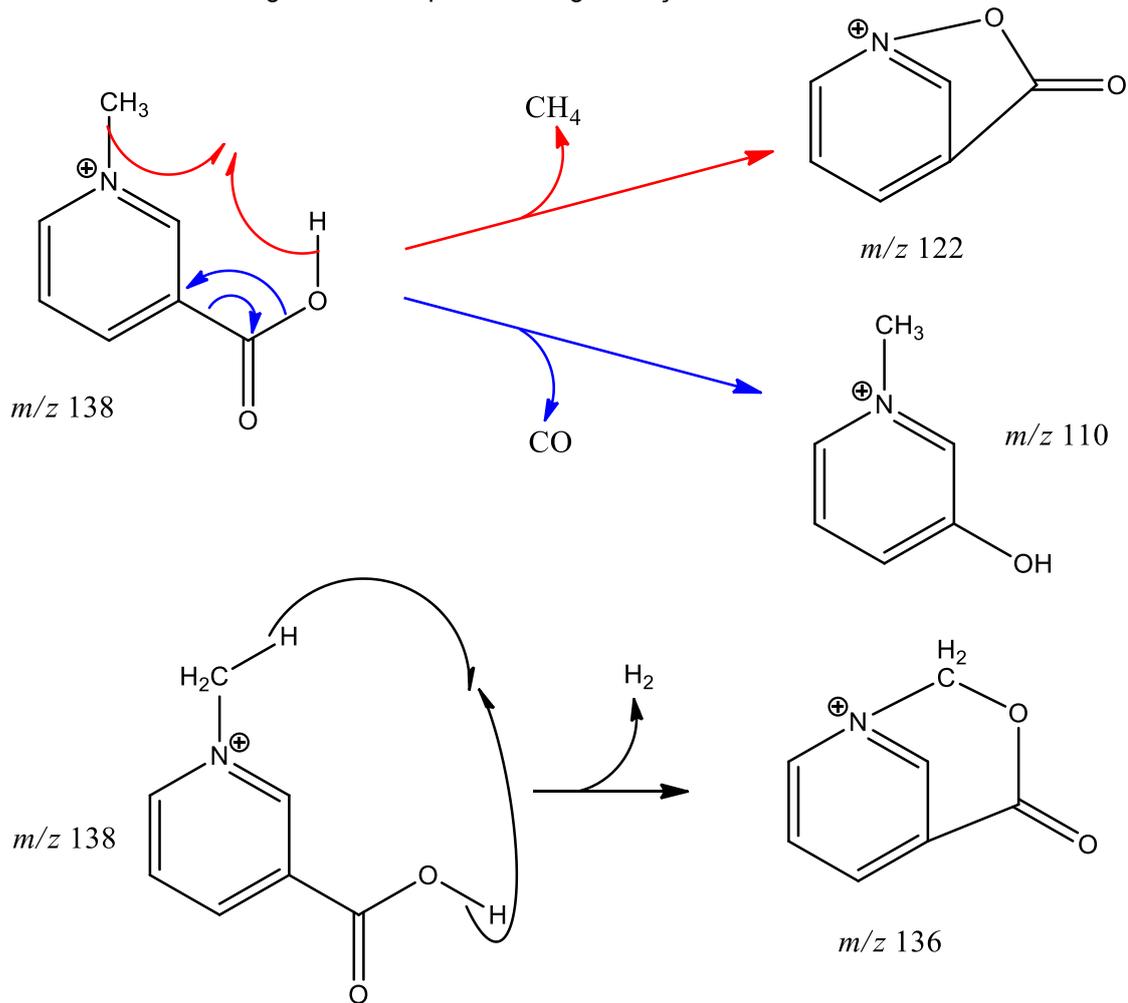
A seguir, são apresentadas as propostas de mecanismos de alguns compostos caracterizados na análise por espectrometria de massas do extrato metanólico dos grãos de café verde, no modo positivo. Na Figura 22, tem-se o espectro de massas EM/EM do íon m/z 138, relativo à molécula protonada de trigonelina e, na Figura 23, a proposta de fragmentação deste íon.

Figura 22 – Espectro de EM/EM do íon m/z 138.



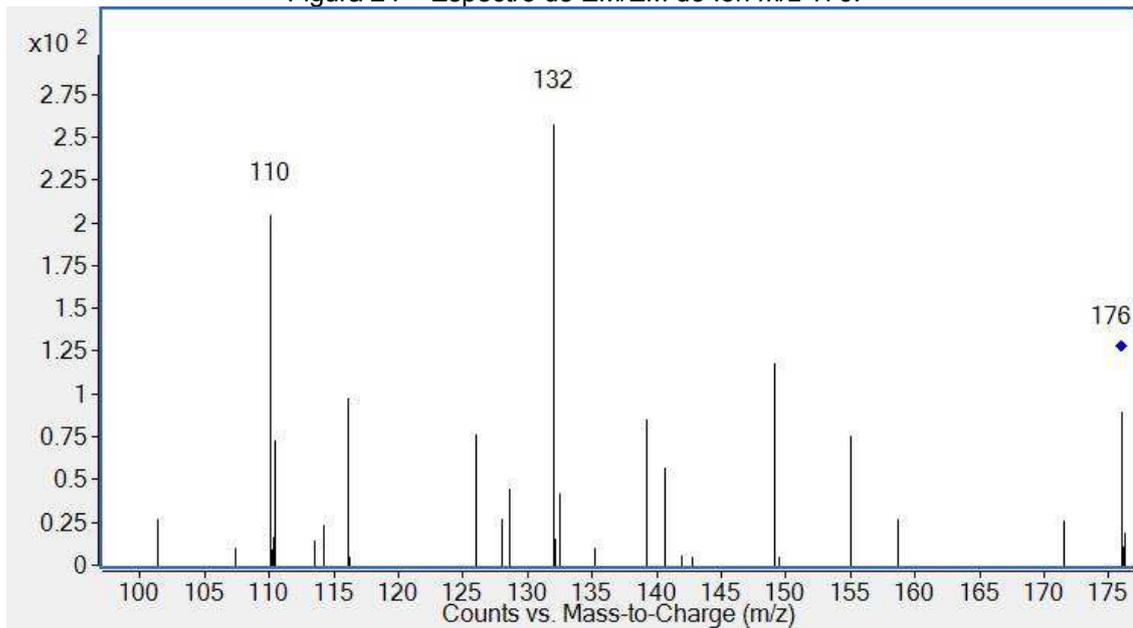
Fonte: O autor.

Figura 23 – Proposta de fragmentação do íon m/z 138.



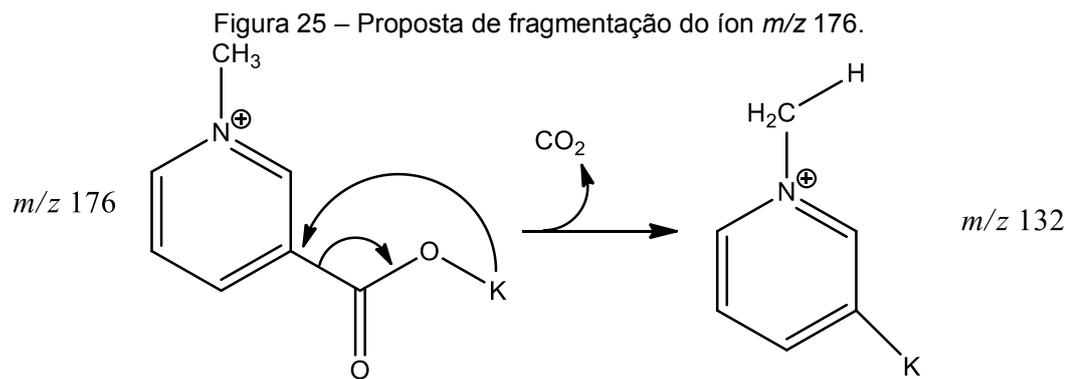
Fonte: O autor.

Na Figura 24, temos o espectro de fragmentação do íon m/z 176, também relativo à molécula de trigonelina, mas agora como aduto de potássio.

Figura 24 – Espectro de EM/EM do íon m/z 176.

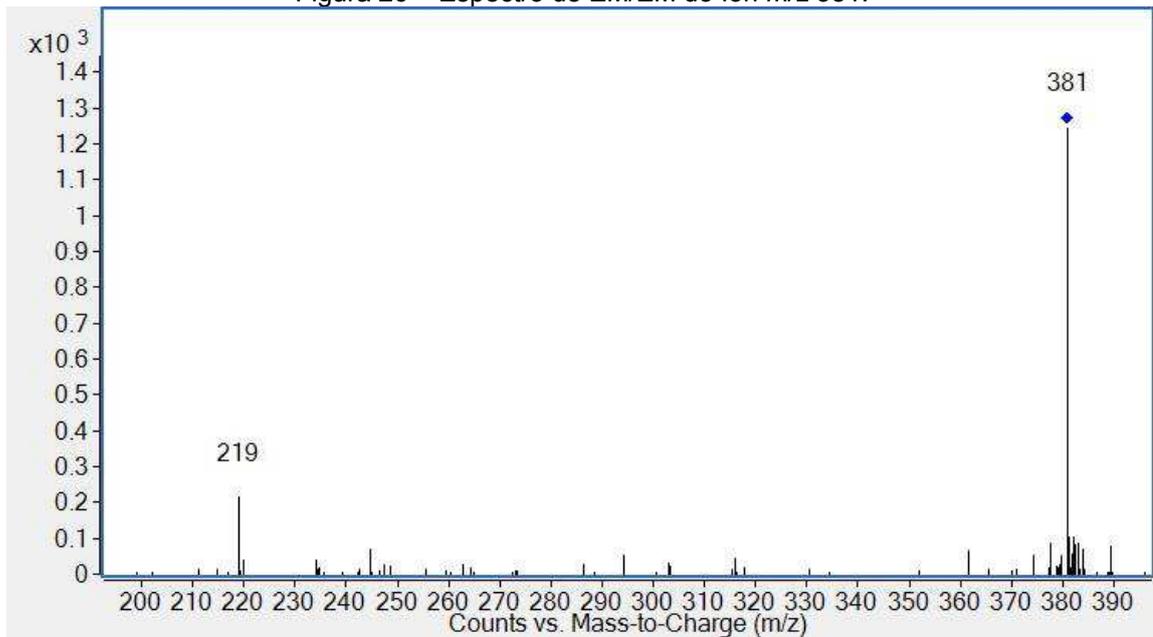
Fonte: O autor.

A seguir, na Figura 25, temos a proposta de fragmentação do íon m/z 176.

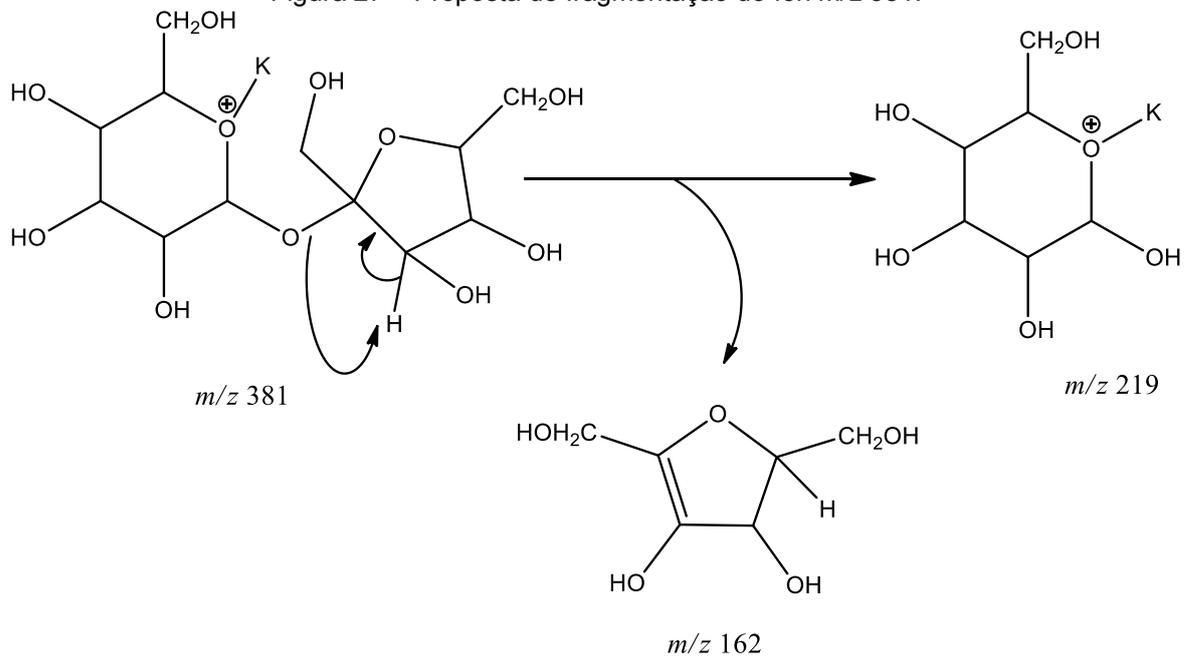


Fonte: O autor.

O íon m/z 381, relativo a um aduto de sacarose, tem seu espectro de EM/EM e sua proposta de mecanismo representados nas Figura 26 e 27, respectivamente.

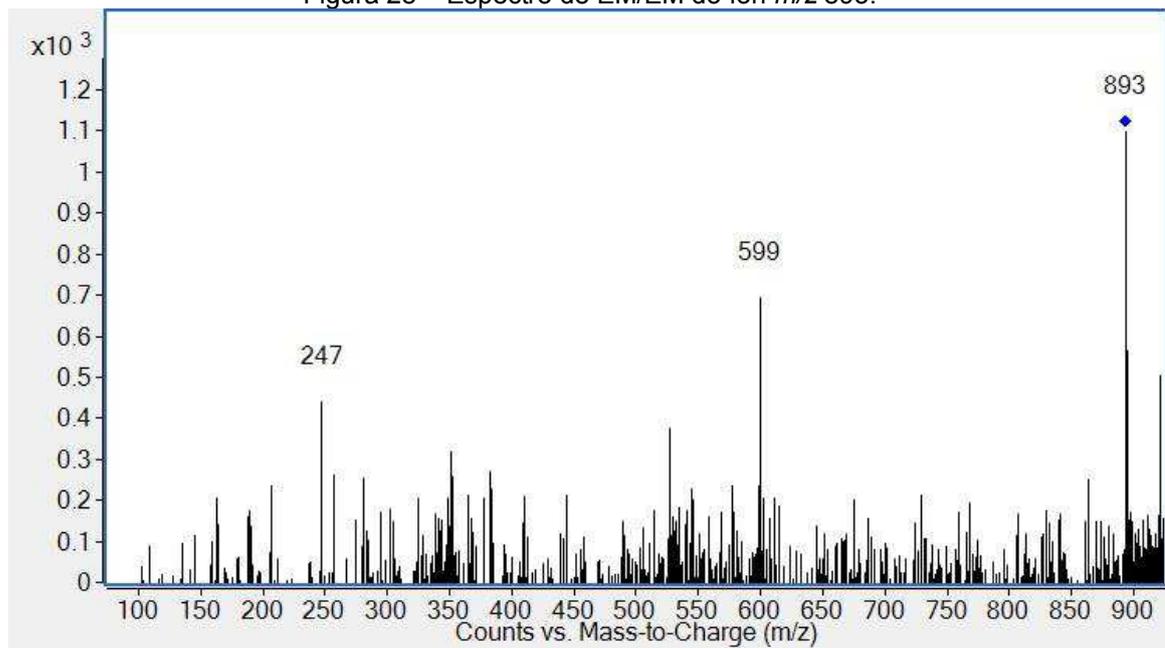
Figura 26 – Espectro de EM/EM do íon m/z 381.

Fonte: O autor.

Figura 27 – Proposta de fragmentação do íon m/z 381.

Fonte: O autor.

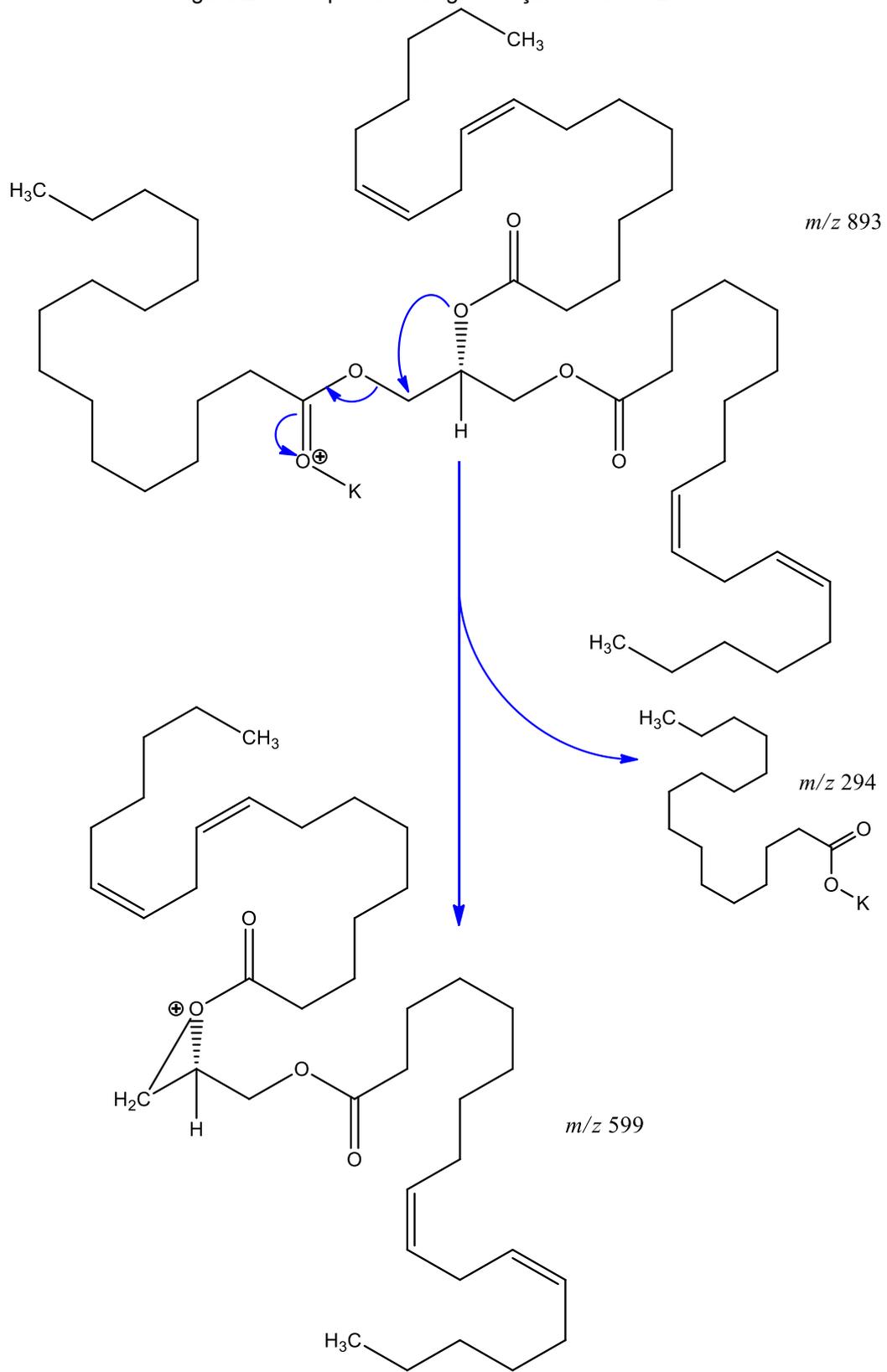
A seguir, temos o espectro de EM/EM do íon m/z 893, que foi atribuído ao aduto de potássio do composto palmitoi-dilinoleoil (PLL) (Figura 28).

Figura 28 – Espectro de EM/EM do íon m/z 893.

Fonte: O autor.

Na Figura 29, temos a proposta de mecanismo de fragmentação do íon m/z 893.

Figura 29 – Proposta de fragmentação do íon m/z 893.

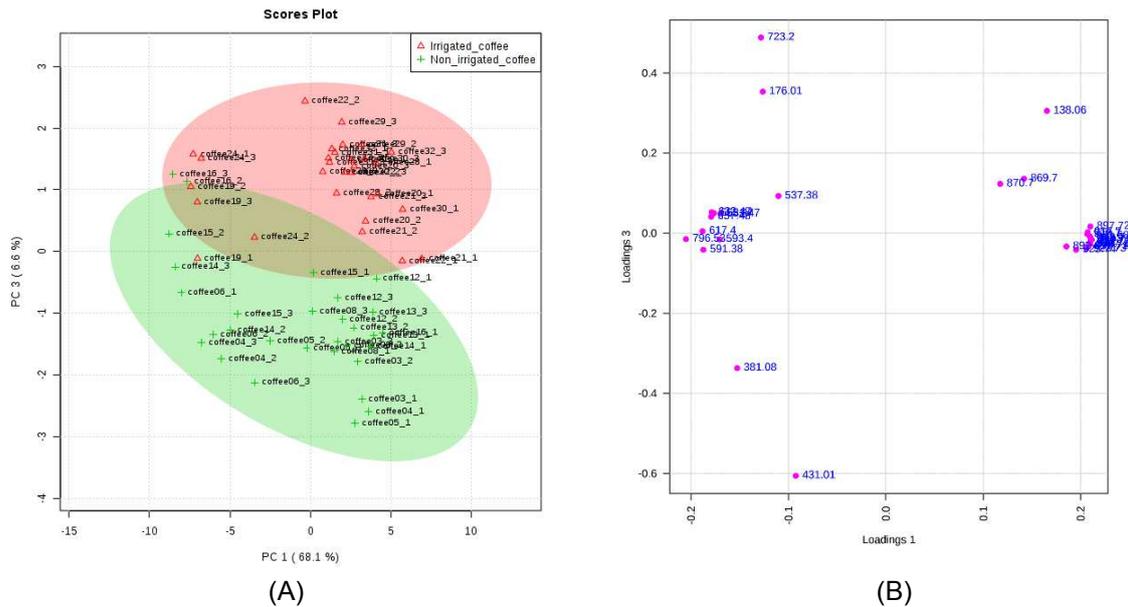


5.1.1 Análise estatística dos dados de EM-IES no modo positivo sobre a influência da irrigação.

A primeira análise aplicada foi a análise exploratória multivariada não supervisionada dos dados de EM-IES, utilizando-se a análise de componentes principais (PCA – do inglês, *Principal Component Analysis*) com o intuito de verificar as variáveis responsáveis pela maior variância entre os dados, isto é, se é possível distinguir grupos de cafés irrigados de grupos de cafés não irrigados. A PCA é um método utilizado para projetar os dados multivariados em um espaço de dimensão reduzida. Essa redução é denominada “compressão dos dados” e é obtida fazendo combinações lineares das variáveis originais, de maneira a agrupar aquelas que fornecem informações semelhantes. O resultado é o surgimento de um novo conjunto de variáveis, chamadas de componentes principais, PCs. As componentes principais são “não” correlacionadas e ortogonais entre si, ou seja, a informação contida em uma delas não está contida em outra. Assim, em análises dessa natureza, as amostras são agrupadas de acordo com sua semelhança, sem informação prévia sobre os grupos, apenas utilizando os dados instrumentais fornecidos (FERREIRA, 2015).

Desta forma, temos os gráficos de *score plot* e *loading plot*, gerados pela PCA (Figura 30). O *score plot* mostra as coordenadas das amostras no novo sistema de eixos/variáveis formado pelas componentes principais. E o *loading plot* pode ser usado para julgar a importância das próprias variáveis originais escolhidas, ou seja, as variáveis originais com maior peso (*loadings*) na combinação linear dos primeiros componentes principais são as mais importantes do ponto de vista estatístico (MOITA NETO e MOITA, 1998).

Figura 30 – Score Plot (A) e Loading Plot (B) da PCA para influência da irrigação.

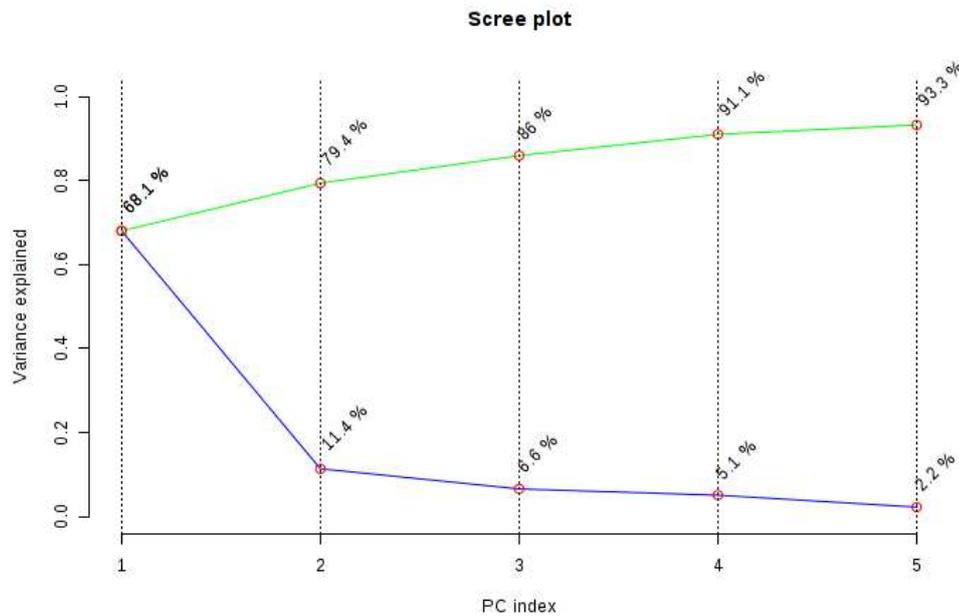


Fonte: O autor.

No *score plot* (Figura 30A) foi possível observar que as amostras similares de cafés irrigados e não irrigados foram agrupadas. No entanto, não houve uma distinção completa entre os grupos de cafés estudados. Isto, talvez, possa ser explicado pelo fato das amostras pertencerem a uma única espécie de café, ou ainda, pelo fato de que algumas cultivares são mais resistentes à seca. Um outro fator importante é que, dentro do grupo de amostras analisadas, existem cultivares que são suscetíveis e outras que são resistentes ao fungo *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br., o agente causador da ferrugem do cafeeiro. Geralmente, essa resistência é conseguida pelo cruzamento com café robusta que, conhecidamente, possui teores de compostos químicos diferentes do arábica.

Observando o *loading plot* (Figura 30B) é possível notar também a formação de dois grupos distintos com mais variáveis. Há, entretanto, algumas variáveis que se distanciam do centro e são elas as que exercem uma maior contribuição para a separação dos grupos no *score plot* e na construção de cada componente principal em questão.

A componente principal PC1, juntamente com a componente principal PC3, explicam, juntas, 74,7% da variância total do conjunto de dados, como pode ser visto no gráfico de porcentagem de variância em função do número de componentes principais (Figura 31).

Figura 31 – Gráfico de *scree plot* da PCA.

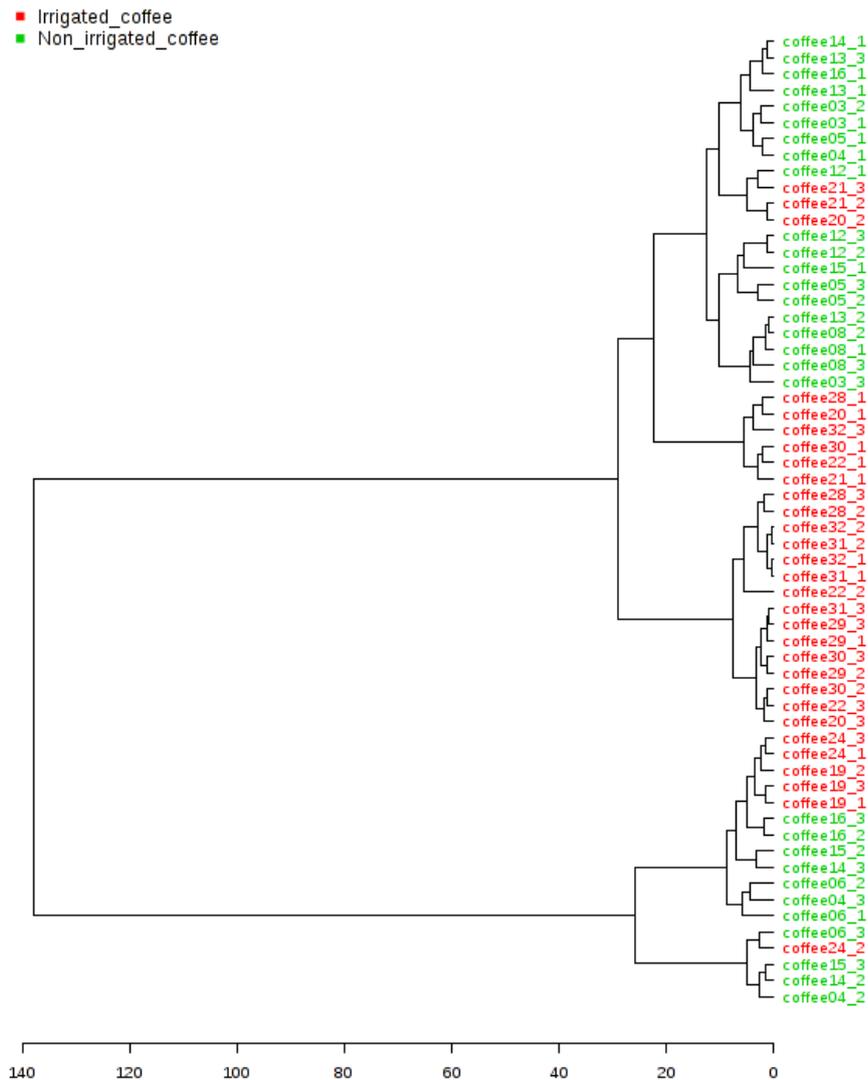
Fonte: O autor.

O gráfico de *scree plot* (Figura 31) nos permite visualizar o número de componentes principais necessárias para descrever de forma adequada a variância do conjunto de dados. A linha verde mostra a variância acumulada e a linha azul mostra a variância de cada componente principal, individualmente. Utilizando-se 5 componentes principais é possível explicar 93,3% da variância total do conjunto. Segundo RajalahTI e Kvalheim (2011), a matriz de dados é decomposta em um número de componentes principais (PCs) que maximizam a variância explicada nos dados em cada componente sucessiva sob a restrição de ser ortogonal para os PCs anteriores, isto é, onde a componente principal (PC1) detém mais informação estatística que a PC2, e assim por diante.

Ainda dentro da análise da influência da irrigação, o conjunto de dados foi submetido à Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA – do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis*). Este também é um método não supervisionado onde as amostras são divididas em grupos com base na distância entre eles, sem levar em conta rótulos de classe. Se os dados se dividem em grupos ao longo das linhas de rótulos de classe então isto é uma forte indicação de que a divisão de classe é refletida nos dados. A

HCA faz uma análise exploratória dos dados por meio da redução da dimensionalidade de informação e, como resultado gerado, o chamado dendrograma, mostra na forma de um gráfico bidimensional a estrutura hierárquica dos dados que apresenta a similaridade entre as amostras (BLEKHERMAN, 2011). O resultado desta análise é apresentado na Figura 32.

Figura 32 – Dendrograma da análise da influência da irrigação, modo positivo.



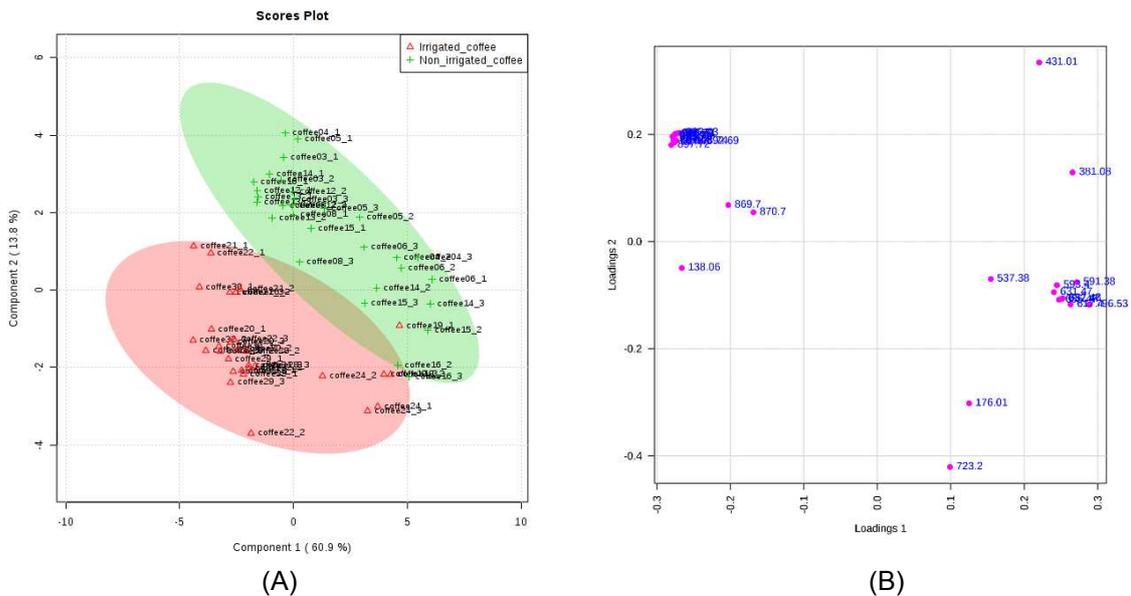
Fonte: O autor.

Observando o dendrograma apresentado é possível notar que as amostras não se agrupam totalmente dentro dos respectivos grupos de cafés irrigados e não irrigados. Há, no entanto, a formação de outros pequenos grupos formados mostrando a

proximidade entre esses cafés. Embora uma análise mais aprofundada seja necessária, é possível sugerir que esses grupos tenham sido formados em função da introgressão de genes de cafés resistentes ao fungo *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br., agente causador da ferrugem do cafeeiro, nos cafés suscetíveis.

Após o tratamento, o conjunto de dados também foi submetido à análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais (PLS-DA – do inglês, *Partial Least Squares Discriminant Analysis*). Este é um método de análise supervisionado tendencioso cuja motivação é aproximar o espaço das medidas originais por um de dimensão reduzida, mas com a diferença de que alguma restrição é imposta na decomposição da matriz de dados, direcionando-a para uma solução cujo alvo é a propriedade de interesse (FERREIRA, 2015). Ou seja, a redução da dimensão fornecida pelo PLS em uma aplicação discriminante é guiada explicitamente pela variabilidade entre os grupos, enquanto a redução da dimensão fornecida pelo PCA é guiada apenas pela variabilidade total (BARKER; RAYENS, 2003). A Figura 33 mostra os resultados obtidos no *score plot* e no *loading plot* do PLS-DA.

Figura 33 – Score Plot (A) e Loading Plot (B) do PLS-DA para a influência da irrigação.



Fonte: O autor.

No *score plot* podemos observar uma quase total separação dos grupos, uma vez que este método de análise tem por objetivo tornar evidentes similaridades ou

diferenças específicas, através da organização preferencial de componentes principais que se mostrem correlacionadas com variáveis classificatórias de interesse (para este caso, os grupos cafés irrigado e de cafés não irrigado).

No *loading plot*, podemos observar claramente a formação de dois grupos de variáveis, e outras que permaneceram isoladas nos extremos e exercem uma contribuição maior na construção das componentes principais como potenciais marcadores químicos.

O modelo de classificação estabelecido para o conjunto de dados foi avaliado utilizando validação cruzada. Nessa abordagem, uma ou mais amostras do conjunto de calibração são excluídas, e o modelo é construído sem essas amostras. A seguir os valores da propriedade de interesse das amostras excluídas são estimados e comparados com os respectivos valores experimentais. No processo de validação cruzada, cada amostra do conjunto de calibração é excluída uma única vez (FERREIRA, 2015). Dentre os diferentes métodos disponíveis para a realização da validação cruzada, a escolha adequada do método irá depender basicamente da quantidade de amostras disponíveis. Para o conjunto de dados deste estudo foi utilizado o método de LOOCV (do inglês, *Leave One Out Cross-Validation*) com o intuito de evitar sobre ajuste e estimar a qualidade da análise por PLS-DA (GARRET et al., 2013). A Tabela 8 mostra os resultados para os parâmetros estatísticos considerados na validação do modelo em função do número de componentes principais utilizadas para descrever os dados.

Tabela 8 – Parâmetros estatísticos de avaliação do modelo PLS-DA (irrigação).

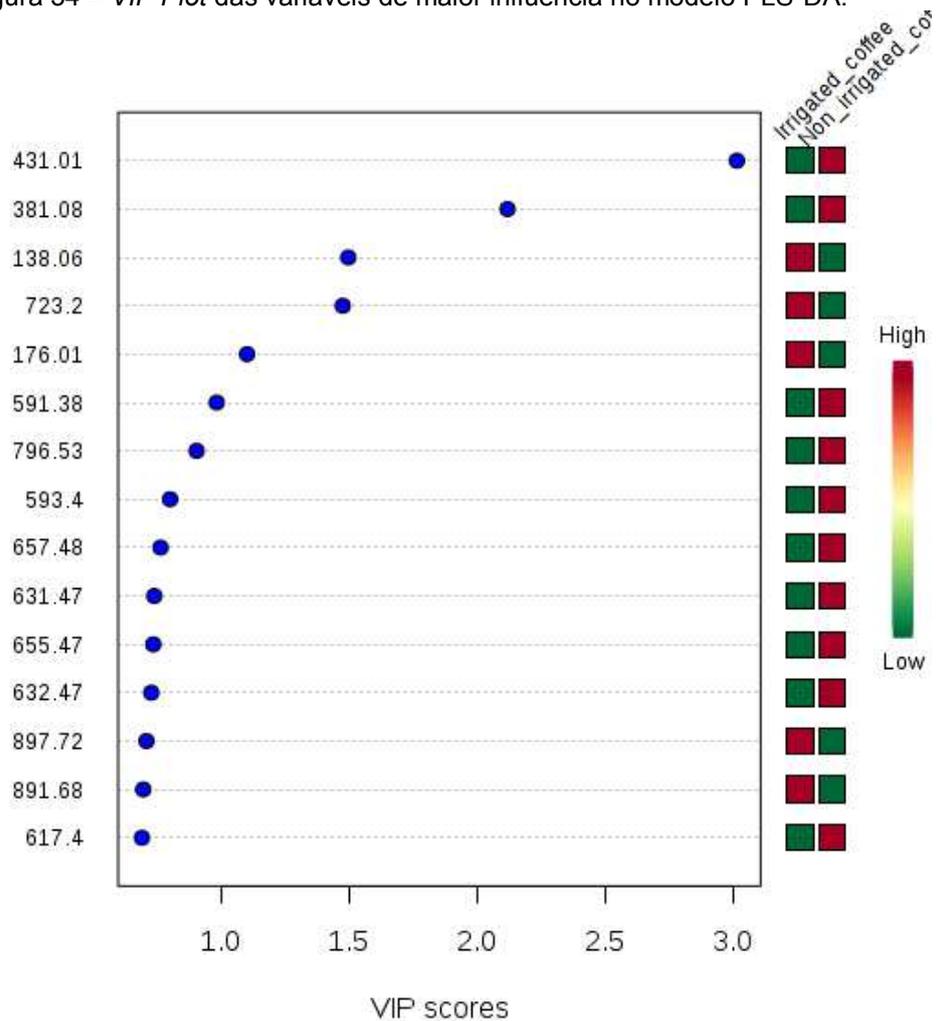
Medida	1 comps	2 comps	3 comps	4 comps	5 comps
Exatidão	0.65	0.93333	0.95	0.93333	0.93333
R ²	0.25975	0.80477	0.83127	0.87039	0.87554
Q ²	0.19908	0.74366	0.77692	0.80492	0.80479

Fonte: O autor.

Com apenas duas componentes principais, os valores de R² e Q² são 0,80477 e 0,74366, respectivamente. O modelo será bem avaliado quando apresentar elevados valores de R² e Q², e que não apresentem diferenças significativas de valor. Assim, quando Q² apresentar valores iguais ou maiores que 0,7 já é o indicativo de que

o modelo possui boas habilidades preditivas. O poder de predição do modelo ou “qualidade de predição” (do inglês *goodness of prediction*), dado por Q^2 , é um parâmetro usado como uma medida da capacidade do modelo de avaliar novos experimentos (ERIKSSON et al., 2008). O parâmetro R^2 é chamado de “qualidade do ajuste” (do inglês *goodness of fit*) e tem seu valor ajustado para próximo de 1 com a inclusão de mais componentes principais ao modelo, como pode ser visto na Tabela 8. No entanto, isso pode acarretar um fator chamado de sobre ajuste (do inglês *overfitting*), em que o modelo serve apenas para a base de dados em questão (MEHMOOD et al., 2012). Também com apenas duas componentes, a exatidão apresentou um valor de 0,93333. A exatidão representa o número de instâncias corretamente preditas relativas ao número total de ocorrências no conjunto de dados de teste (LIU et al., 2016). Em geral, quando se possui uma matriz de dados de alta complexidade e muitos parâmetros, o que se recomenda é simplificar o modelo, ou seja, usar o menor número possível de componentes principais na construção do modelo. Isso posto, buscando-se valores próximos de 1 para os parâmetros de avaliação do modelo e a exatidão, sem que haja um ganho significativos nos mesmos, é possível construir um modelo ajustado. O incremento de qualquer parâmetro ao modelo, se o mesmo pode ser retirado sem qualquer impacto significativo, pode levar ao sobre ajuste e comprometer a capacidade preditiva do modelo (DUARTE, 2016). Assim, os elevados valores observados nos parâmetros R^2 , Q^2 e exatidão garantem a racionalidade do modelo construído para o presente estudo.

Uma outra medida importante fornecida pela PLS-DA são os resultados do *VIP score* (do inglês *Variable Influence on Projection*). A ideia por trás desta medida está em acumular a importância de cada variável sendo refletida por cada componente. Valores mais distantes de 1 apresentam uma maior influência na separação dos grupos (MEHMOOD et al., 2012). A Figura 34 mostra o resultado desta análise com os maiores valores de *VIP*, onde as caixas coloridas indicam a concentração relativa da variável em questão para cada um dos grupos estudados.

Figura 34 – *VIP Plot* das variáveis de maior influência no modelo PLS-DA.

Fonte: O autor.

A Figura 34 mostra as 15 variáveis que mais se destacam na separação dos grupos. Entretanto, considerando apenas valores acima de 1, temos 6 variáveis que apresentam por sua vez maior influência na separação dos grupos. Observando mais atentamente, vemos que duas delas se afastam das demais; são os íons m/z 431 e m/z 381, que sofrem uma influência negativa da irrigação. O íon m/z 381 refere-se a um aduto da sacarose $[M + K]^+$, e sua relação negativa com a irrigação corrobora com os resultados obtidos por Silva et al., (2005) e Vinecky et al., (2017). Ainda em uma intensidade bem menor que os dois primeiros, o íon m/z 591, também sofre influência negativa da irrigação.

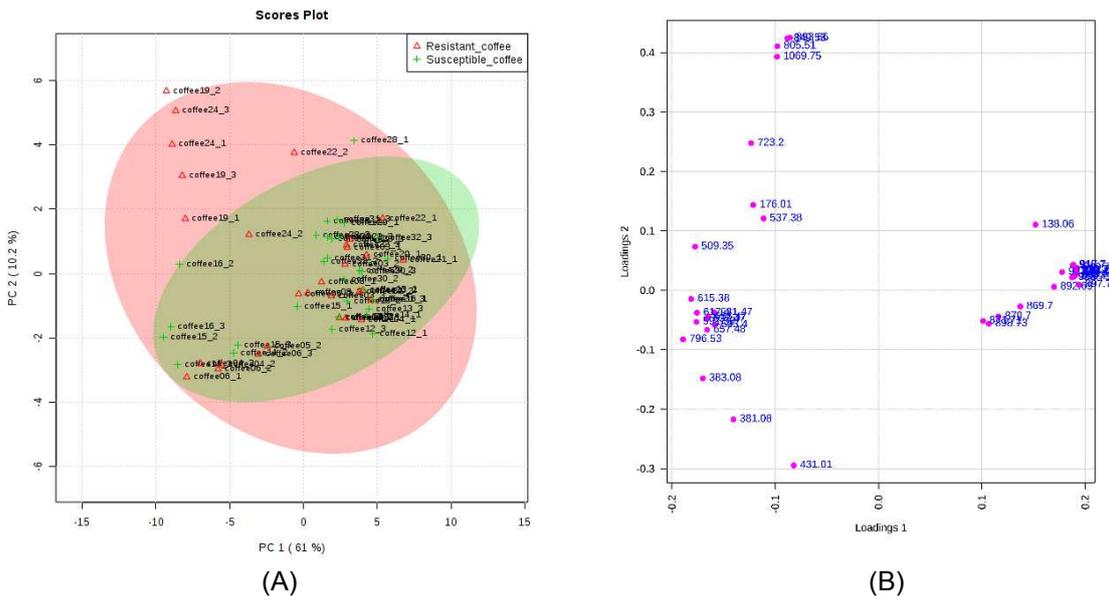
Os íons m/z 138, m/z 723 e m/z 176, são todos influenciados positivamente com relação à irrigação. Os íons m/z 138 e m/z 176 referem-se a uma molécula protonada e um aduto de trigonelina, $[M + H]^+$ e $[M + K]^+$, respectivamente. Vinecky et al.,

(2017), observou que os teores de trigonelina e de lipídeos totais aumentaram com a diminuição da irrigação. Essa diferença, no entanto, pode ter se apresentado pelo fato do presente trabalho ter sido feito com várias cultivares, diferentemente do outro onde apenas a cultivar *Coffea arabica* L. cv. Rubi MG1192 foi analisada.

5.1.2 Análise estatística dos dados de EM-IES no modo positivo sobre a influência da resistência à ferrugem

Assim como na análise da influência da irrigação, os dados foram submetidos aos métodos quimiométricos pertinentes para a análise da influência da resistência ao fungo *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br., agente causador da ferrugem do cafeeiro. A Figura 35 exibe os resultados *score plot* e *loading plot* da análise de PCA.

Figura 35 – Score Plot (A) e Loading Plot (B) do PCA para a influência da resistência à ferrugem.

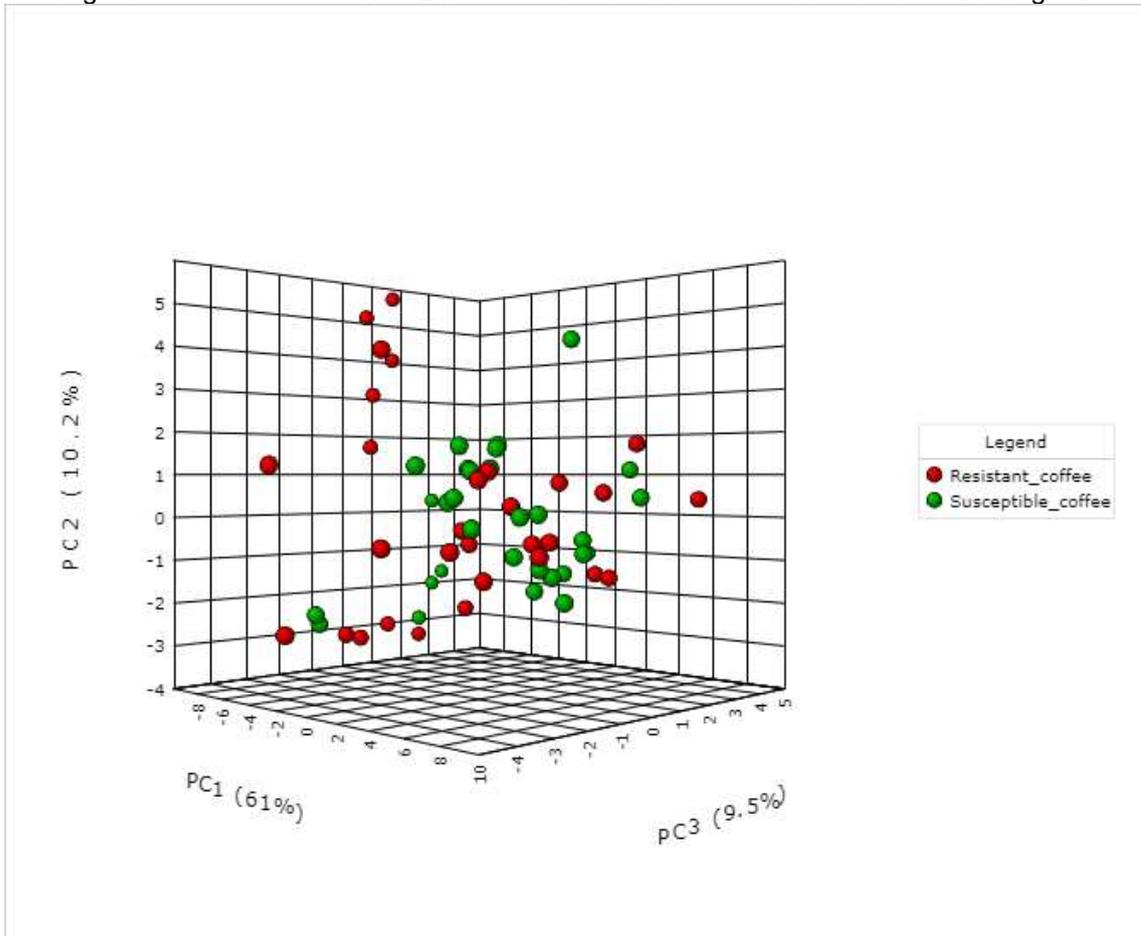


Fonte: O autor.

Observando o *score plot* da Figura 35 é possível notar que houve uma grande sobreposição das elipses a 95% de confiança entre os grupos resistente e suscetível. Essa similaridade também é observada no *loading plot*, onde poucas variáveis se mostram como possíveis marcadores químicos. Com o uso da PCA-tridimensional, onde vemos as janelas PC1 x PC2 x PC3, temos uma visão ainda mais clara de como

os dados se comportaram (Figura 36). Podemos perceber que mesmo com três componentes principais, ainda não há uma separação dos grupos, mostrando que em um conjunto maior de cultivares, a constituição química dos grãos de café verde não sofre uma acentuada influência da resistência ao fungo causador da ferrugem.

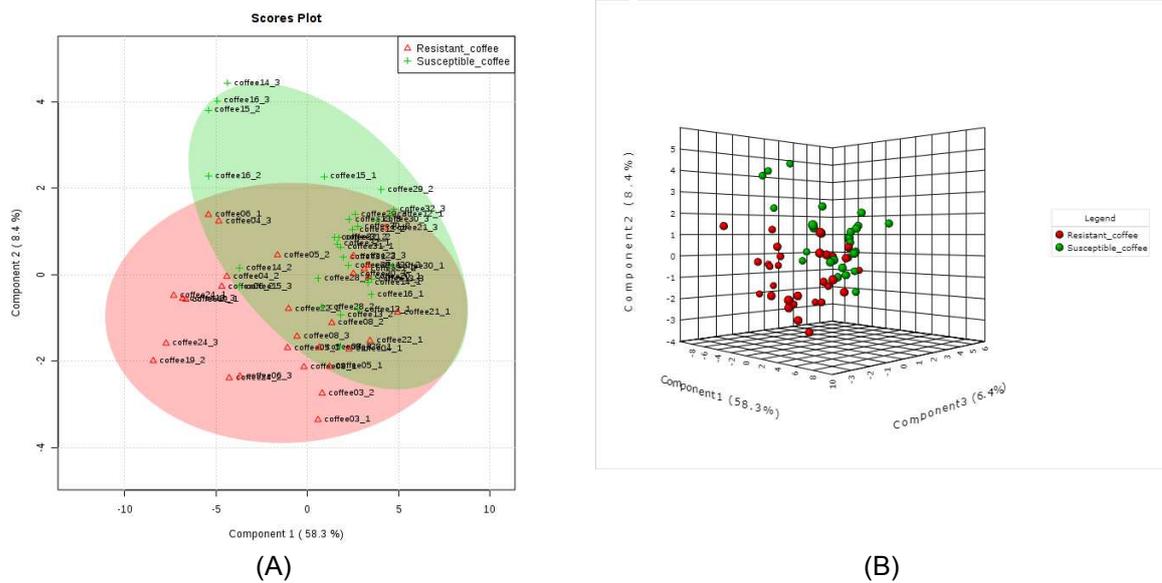
Figura 36 – Janelas PC1 x PC2 x PC3 da PCA da influência da resistência à ferrugem.



Fonte: O autor.

O conjunto de dados também foi submetido à análise por PLS-DA. Na Figura 37 podemos observar o score plot (A) e o gráfico tridimensional (B), onde os grupos foram melhor separados que na análise por PCA.

Figura 37 – Score Plot (A) e Janelas PC1 x PC2 x PC3 da PLS-DA da análise de influência da resistência à ferrugem.



Fonte: O autor.

Mesmo sendo a PLS-DA uma ferramenta de análise supervisionada, ainda há uma grande sobreposição das elipses a 95% de confiança dos grupos resistente e suscetível. Os resultados obtidos para os parâmetros de validação são exibidos na Tabela 9 e mostram que o modelo proposto não foi satisfatório para garantirmos a capacidade de predição do modelo.

Tabela 9 – Parâmetros estatísticos de avaliação do modelo PLS-DA (ferrugem).

Medida	1 comps	2 comps	3 comps	4 comps	5 comps
Exatidão	0.63667	0.69333	0.73667	0.82667	0.87333
R ²	0.093441	0.40319	0.52948	0.6076	0.65125
Q ²	0.034261	0.14234	0.32945	0.32576	0.30944

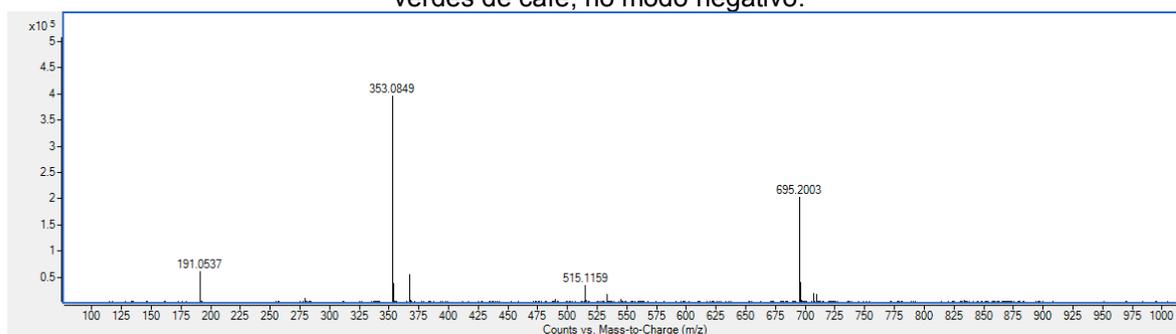
Fonte: O autor.

Como a análise por PLS-DA não pôde ser validada, não procedeu-se com a análise dos marcadores no *VIP Plot*. Esse resultado negativo, no entanto, tem um ponto positivo. Ele reforça que os marcadores químicos encontrados na análise anterior (seção 5.1.1) são todos mais fortemente influenciados pela irrigação que pela resistência à ferrugem.

5.2 Caracterização química de cafés por Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (EM-IES), no modo negativo

O espectro de massas gerado no modo negativo pelo analisador de alta resolução ESI-QTOF, também mostrou as moléculas da matriz característica do café (Figura 38).

Figura 38 – Espectro de massa com ionização por eletrospray típico do extrato metanólico de grãos verdes de café, no modo negativo.



Fonte: O autor.

Observando o espectro de massas no modo negativo (Figura 38), podemos perceber que o número de ânions detectados é menor em comparação com o número de cátions detectados no modo positivo (Figura 15).

O espectro mostra o ácido quínico, íon m/z 191,0537, o ácido cafeoilquínico, íon m/z 353,0849, o ácido dicafeoilquínico, íon m/z 515,1159 e o íon m/z 695,2003, que embora ainda não tenha sido identificado, corresponde a espécie $[M - H]^-$ (GARRET et al., 2013). Os ácidos clorogênicos, classe de que os ácidos cafeoilquínico e dicafeoilquínico fazem parte, são compostos responsáveis pela resistência a pragas que se alimentam do tecido vivo das plantas (LEISS et al., 2009). O ácido quínico e o ácido feruloilquínico estão localizados em maior abundância na região mais externa dos grãos de café, chamada de endosperma duro. Na região mais interna do grão verde de café, no chamado endosperma macio, o ácido cafeoilquínico foi encontrado em maiores teores (GARRETT; REZENDE; IFA, 2016).

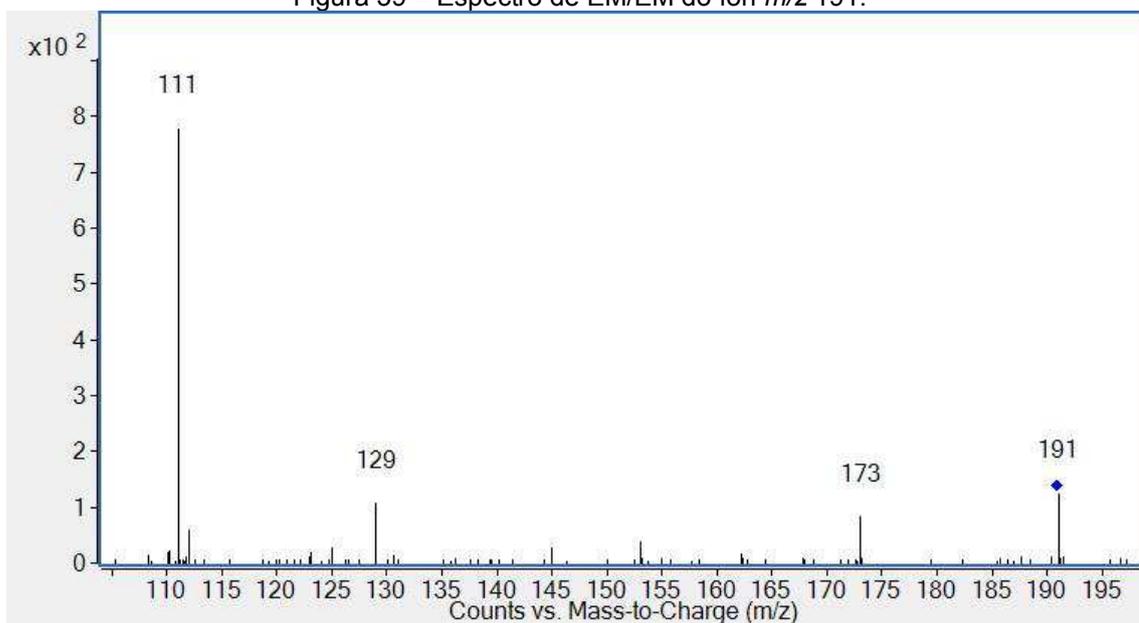
Os erros, em ppm, também foram calculados e podem ser observados na Tabela 10, a seguir.

Tabela 10 – Compostos caracterizados por EM-IES nos extratos metanólicos do café verde, no modo negativo.

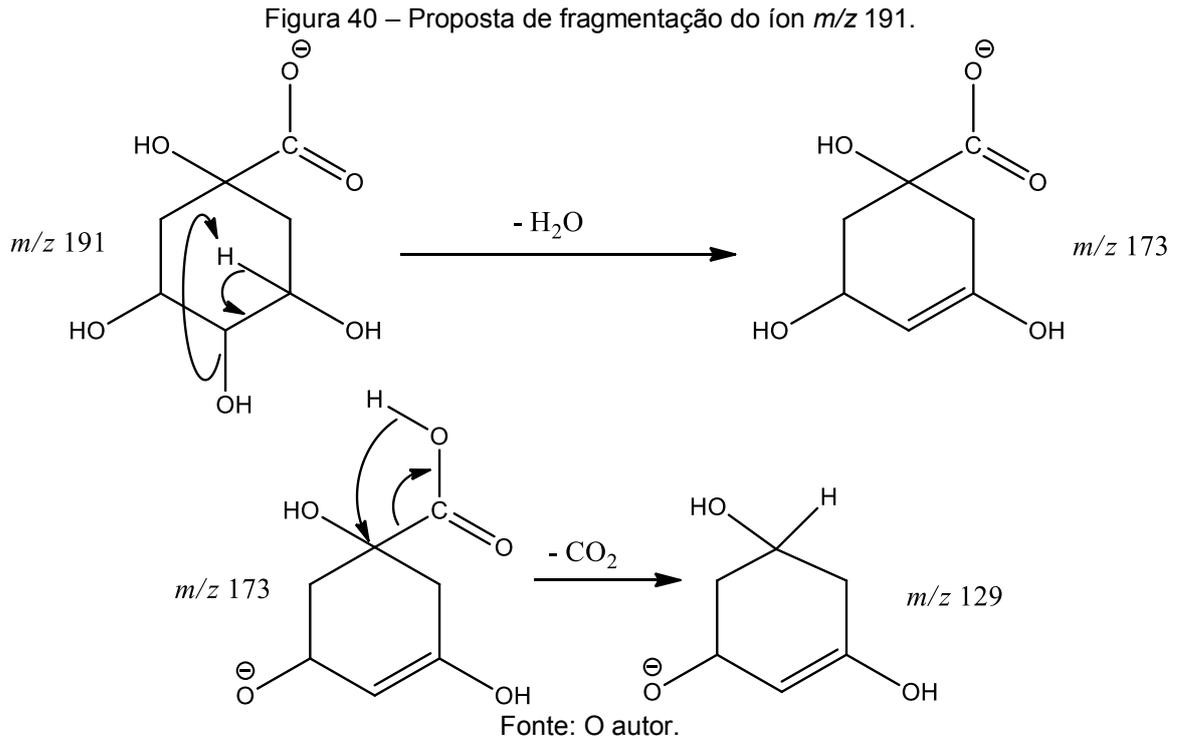
Experi- mental m/z	Teórico m/z	Erro (ppm)	Fórmula Molecu- lar	Aduto	Composto sugerido	Referências
191,0537	191,0561	-1,25	C ₇ H ₁₂ O ₆	[M – H] ⁻	Ácido quínico	GARRET et al., 2013
353,0878	353,0849	8,21	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M – H] ⁻	Ácido cafeoilquí- nico	GARRET et al., 2013
515,1159	515,1195	-6,98	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M – H] ⁻	Ácido dicafeoilquí- nico	GARRET et al., 2013

Fonte: O autor.

A seguir estão as propostas de mecanismos de alguns compostos caracterizados na análise por espectrometria de massas do extrato metanólico dos grãos de café verde, no modo negativo. Na Figura 39, temos o espectro de EM/EM do íon m/z 191, relativo à molécula desprotonada do ácido quínico e na Figura 40, sua proposta de fragmentação.

Figura 39 – Espectro de EM/EM do íon m/z 191.

Fonte: O autor.



O íon m/z 353, relativo ao ácido cafeoilquínico, tem os espectros de massas e as propostas de fragmentações relativos aos seus isômeros representados nas Figuras 41 a 44.

Figura 41 – Espectro de EM/EM do íon m/z 353, referente ao ácido 3-O-cafeoilquínico.

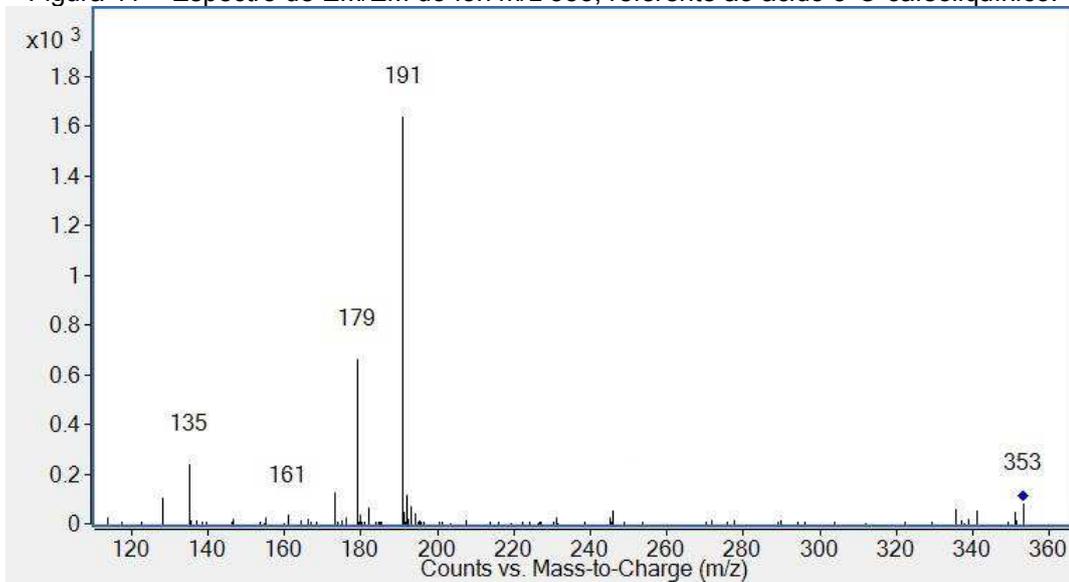
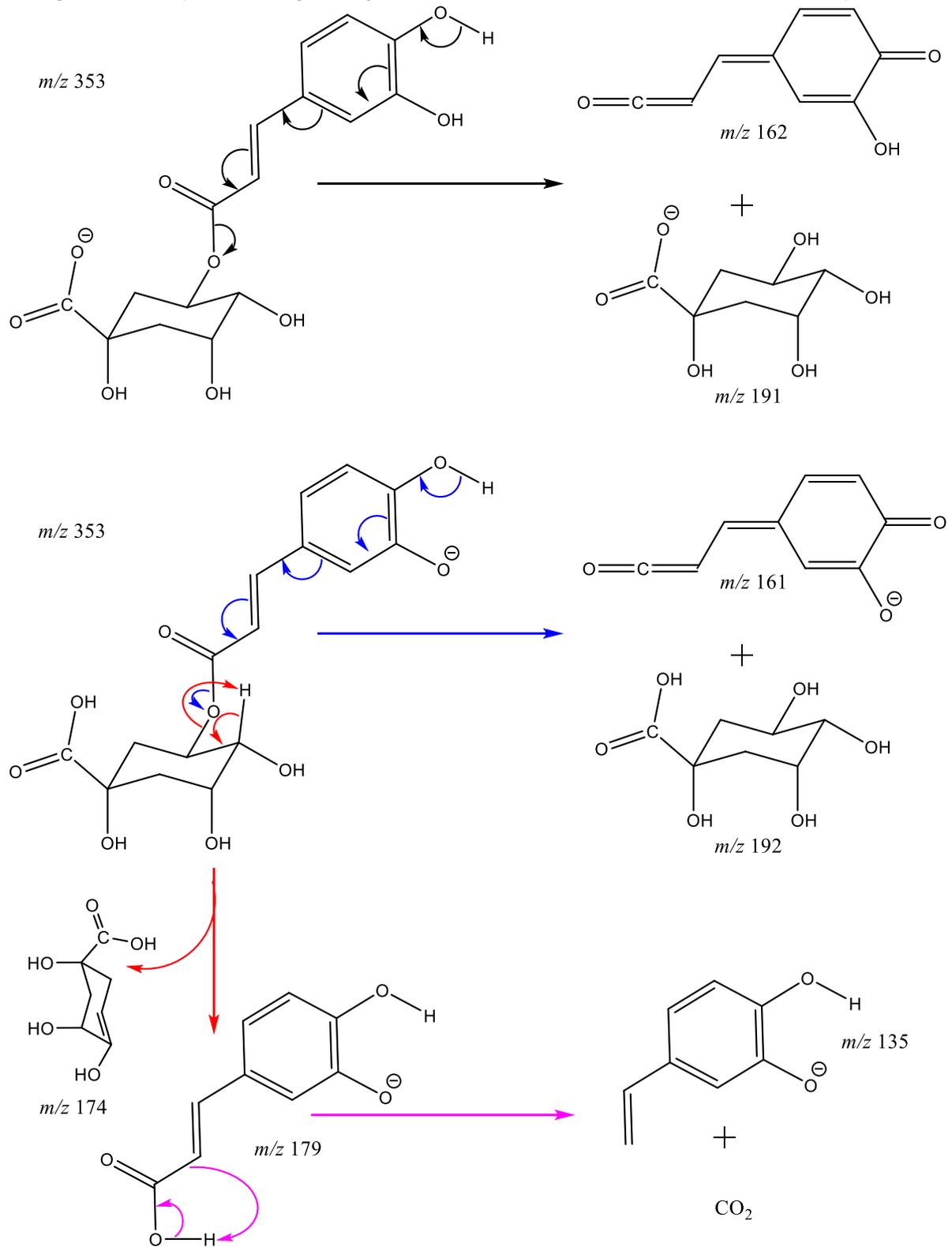
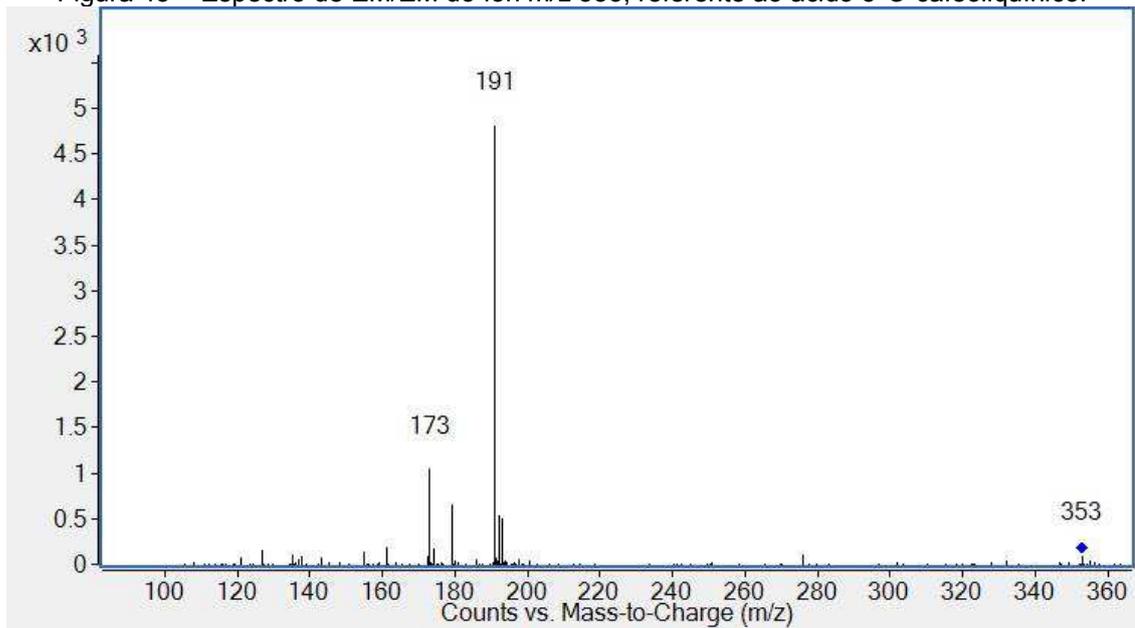


Figura 42 – Proposta de fragmentação do íon m/z 353, referente ao ácido 3-O-cafeoilquínico.



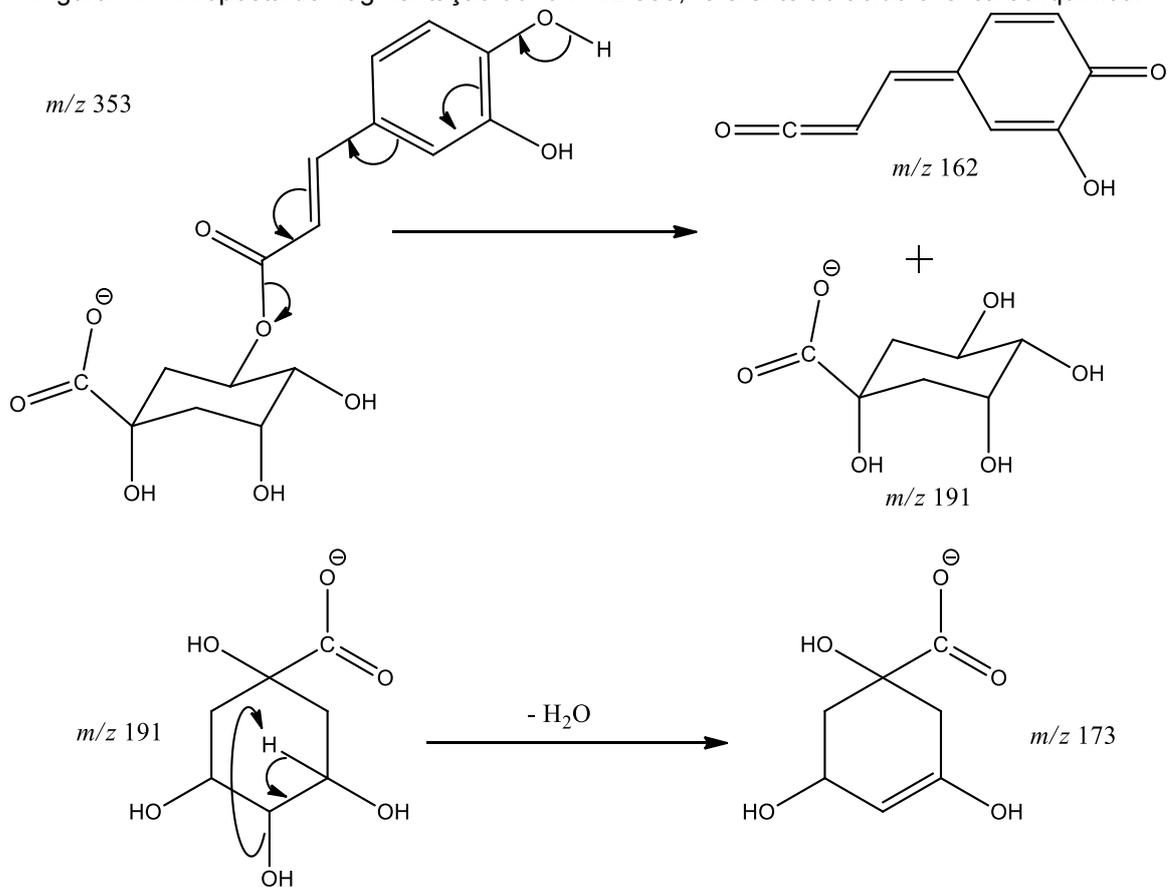
Fonte: O autor.

Figura 43 – Espectro de EM/EM do íon m/z 353, referente ao ácido 5-O-cafeoilquínico.



Fonte: O autor.

Figura 44 – Proposta de fragmentação do íon m/z 353, referente ao ácido 5-O-cafeoilquínico.

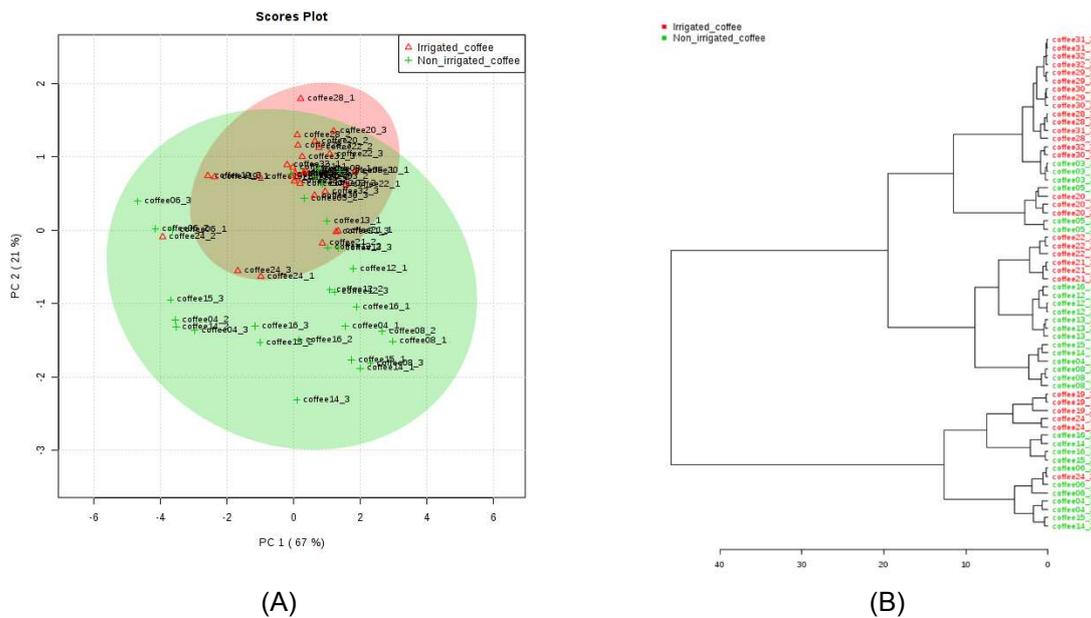


Fonte: O autor.

5.2.1 Análise estatística dos dados de EM-IES no modo negativo de cafés irrigados e não irrigados.

Assim como na análise da influência da irrigação no modo positivo, os dados obtidos no modo negativo também foram submetidos à análise quimiométrica pertinente. A Figura 45 exibe os resultados obtidos no *score plot* do PCA e o dendrograma da HCA.

Figura 45 – Score plot do PCA (A) e dendrograma (B), no modo negativo.



Fonte: O autor.

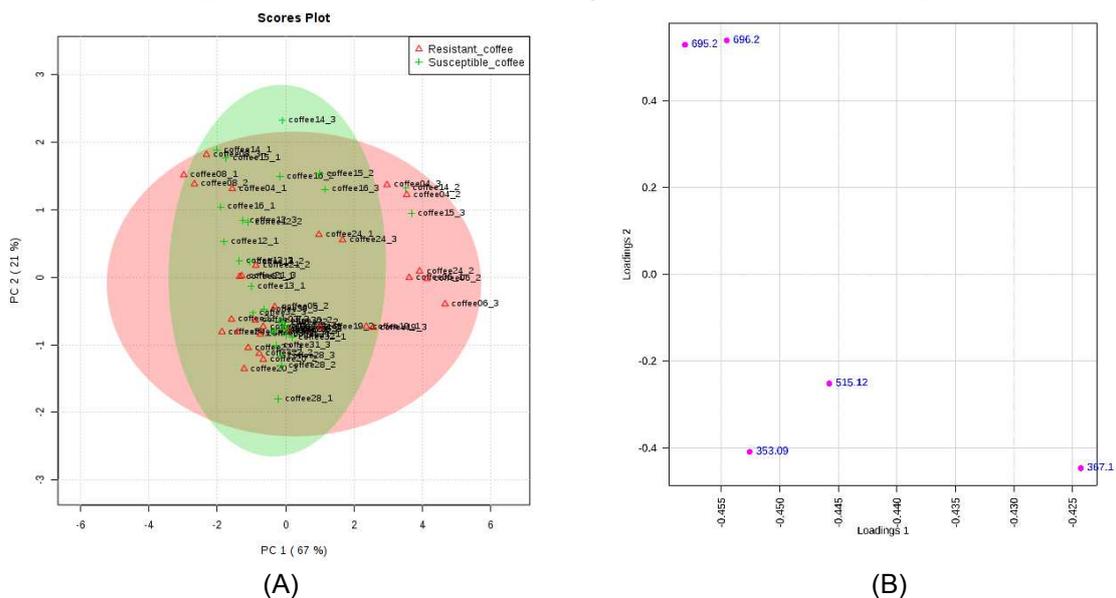
Observando o score plot da Figura 45, é possível notar que não houve praticamente nenhuma separação dos grupos, com uma sobreposição quase total do grupo de cafés não irrigados sobre o grupo de cafés irrigados, a 95% de confiança. Essa tendência de similaridade também pode ser verificada no dendrograma, onde as amostras de cafés irrigados e não irrigados foram agrupadas juntas.

O conjunto de dados também foi submetido à análise por PLS-DA, mas os resultados obtidos para os parâmetros de validação não foram suficientes para validar a análise.

5.2.2 Análise estatística dos dados de EM-IES no modo negativo sobre a influência da resistência à ferrugem

Os dados obtidos na espectrometria de massas no modo negativo, também foram submetidos à análise da influência da ferrugem. A Figura 46 mostra o *score plot* e o *loading plot* da PCA.

Figura 46 – *Score plot* (A) e *loading plot* (B) da PCA, modo negativo.



Fonte: O autor.

Observando o *score plot* é possível notar, assim como na análise da influência da irrigação (seção 5.2) que não há a formação de grupos distintos. Há, sim, uma sobreposição quase total, de um grupo sobre o outro, a 95% de confiança. Esse comportamento é também evidenciado no *loading plot*, uma vez que não há formação de nenhum grupo distinto de variáveis.

Assim como na análise anterior (seção 5.2), o conjunto de dados também foi submetido à análise por PLS-DA, e outra vez os resultados obtidos para os parâmetros de validação não foram suficientes para validar a análise.

5.3 Caracterização sensorial das cultivares de cafés arábicas pelo teste de xícaras.

A análise sensorial dos cafés pela metodologia SCAA, mostrou que os cafés plantados no regime de sequeiro, obtiveram notas ligeiramente maiores que as notas dos cafés plantados no regime de irrigação por gotejamento (Tabela 11).

Tabela 11 – Notas atribuídas aos cafés estudados, pelos provadores e nota média da prova de xícaras pela metodologia SCAA.

Café	Notas obtidas							
	Provador 1		Provador 2		Provador 3		MÉDIA ± DP	
	Sequ.	Irrig.	Sequ.	Irrig.	Sequ.	Irrig.	Sequ.	Irrig.
Acauã	82	82	80	82,75	80,5	82,5	80,83 ± 0,85	82,42 ± 0,31
Catiguá MG S2	84,25	81	83	82,5	82,5	80	83,25 ± 0,73	81,17 ± 1,03
Catiguá MG S3	83,5	80	83,5	80	83	80	83,33 ± 0,23	80,00 ± 0,00
IBC 12 IAC 125 RN	83,25	81	82,5	80	82,25	83	82,67 ± 0,42	81,33 ± 1,25
Paraíso H 419-1	82,75	81,5	81,75	80	81,25	83	81,92 ± 0,62	81,42 ± 1,23
Topázio MG 1190	84	82	80	82	80,5	81	81,50 ± 1,78	81,67 ± 0,47
Catuaí 62	82	82	83	81,5	82,5	82,5	82,50 ± 0,41	82,00 ± 0,41
Catuaí 99	82,5	81	82	81	80,75	82,5	81,75 ± 0,73	81,50 ± 0,70
Catuaí 144	83	81,5	85	81,25	83	82	83,67 ± 0,94	81,58 ± 0,31
Rubi	82,5	81,5	82	81,5	82	82	82,17 ± 0,23	81,67 ± 0,23

Sequ. = Sequeiro **Irrig. = Irrigado**

Fonte: O autor.

Embora a influência da irrigação tenha discriminado os cafés por PLS-DA, a prova de xícara mostrou que todas as amostras estão na faixa de 80 a 85, faixa dos cafés especiais.

As notas mostradas na tabela anterior foram submetidas ao teste de significância. Não houve diferenças estatísticas na pontuação final da bebida do café, comparando-se as amostras de café das cultivares de cafeeiro utilizadas nesse estudo (Tabela 12).

Tabela 12 – Pontuação final das bebidas dos cafés estudados utilizando-se a metodologia SCAA em função de cultivares de cafeeiro.

Cultivares	Pontuação final da bebida *
Catuai IAC-144	82,63 a
Catuai IAC-62	82,25 a
Catiguá MG-s2	82,21 a
Tupi IAC-125 RN	82,00 a
Rubi JM MG-1192	81,92 a
Paraíso H-419-1	81,71 a
Catiguá MG-s3	81,67 a
Catuai IAC-99	81,63 a
Acauã	81,63 a
Topázio MG-1190	81,58 a
DMS	1,83

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 0,05 de significância
Fonte: O autor.

Entretanto, a análise estatística univariada das notas obtidas na análise sensorial dos cafés pela metodologia SCAA, mostrou que os cafés plantados no regime de sequeiro, obtiveram notas ligeiramente maiores que as notas dos cafés plantados no regime de irrigação por gotejamento (Tabela 13).

Tabela 13 – Pontuação final da bebida dos cafés estudados utilizando-se a metodologia SCAA em função do sistema de condução da lavoura cafeeira.

Sistema de condução	Pontuação final da bebida *
Sequeiro	82,36 a
Irrigado	81,48 b
DMS	0,49

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 0,05 de significância
Fonte: O autor.

O efeito ligeiramente inferior da irrigação na qualidade final do produto, na prova de xícara, provavelmente ocorreu devido às menores concentrações do íon m/z 381, que correspondente a um aduto da sacarose $[M + K]^+$. Os resultados corroboram com os obtidos por Silva et al. (2005), que obtiveram cafés com teores de sacarose maiores em oriundos de lavouras não irrigadas e cultivadas em regiões mais quentes, apesar da irrigação não ter afetado significativamente a qualidade da bebida.

Vinecky e colaboradores (2017), também avaliaram a influência da irrigação controlada na qualidade dos grãos de café arábica. O teor de sacarose também se mostrou maior nas plantas onde não houve irrigação. O estresse hídrico controlado

durante a estação seca altera a qualidade do café positivamente, diminuindo os teores de cafeína e ácidos clorogênicos e aumentando os teores de lipídios e sacarose. E, embora a qualidade da bebida não tenha sido avaliada, os autores sustentam que os grãos colhidos de uma lavoura com suspensão controlada de água durante a estação seca levam a uma melhor qualidade de bebida, quando comparados com grãos produzidos sob irrigação contínua.

6 CONCLUSÕES

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que verifica por análise química, usando dados de espectrometria de massas e ionização eletrospray por infusão direta, a influência da irrigação no perfil químico de grãos de café verdes de dez variedades de *Coffea arabica* L. e correlaciona esses dados com o teste de xícaras. Assim, além dos compostos já descritos na literatura, foram sugeridas as identificações de três novos compostos, no modo positivo, presentes na matriz de café – um triacilglicerol, TG (54:6); uma fosfoetanolamina, PE (40:7) e 1-hexadecil-2-dodecanoil-glicerol-3-fosfato.

A abordagem metabolômica, usando técnicas de análise multivariada PLS-DA, distinguiu com sucesso os regimes de condução da lavoura em relação ao plantio (café irrigado e café sequeiro). Além disso, o gráfico VIP score (Influência da Variável na Projeção) da análise pela PLS-DA, indicou quais compostos foram responsáveis para a discriminação.

Embora as notas do teste de xícaras de todas as cultivares (sequeiro e irrigado) tenham ficado localizadas na faixa de 80 a 85 (faixa de cafés especiais), a análise sensorial dos cafés pela metodologia SCAA indicou que os cafés plantados no regime de sequeiro têm notas de atributos de qualidade um pouco maiores do que as notas dos cafés plantados em regime de irrigação.

A resistência ao fungo *Hemileia vastatrix* não exerce influência significativa na composição química dos grãos de café estudados, que resultasse na distinção inequívoca das cultivares, utilizando-se da EM-IES nos modos positivo e negativo.

REFERÊNCIAS

- ALONSO-SALCES, Rosa Maria; GUILLOU, Claude; BERRUETA, Luis A. Liquid chromatography coupled with ultraviolet absorbance detection, electrospray ionization, collision-induced dissociation and tandem mass spectrometry on a triple quadrupole for the on-line characterization of polyphenols and methylxanthines in green coffee beans. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [S.l.], v. 23, n. 3, p. 363-383, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rcm.3884>
- ALVES, Júnia de O. et al. Extra virgin (EV) and ordinary (ON) olive oils: distinction and detection of adulteration (EV with ON) as determined by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry and chemometric approaches. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [S.l.], v. 24, n. 13, p. 1875-1880, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rcm.4590>
- AMORIM, Ana Carolina L. et al. Green and roasted arabica coffees differentiated by ripeness, process and cup quality via electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S.l.], v. 20, n. 2, p. 313-321, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532009000200017>
- AQUINO, Francisco JT et al. Direct infusion electrospray ionization mass spectrometry applied to the detection of forgeries: roasted coffees adulterated with their husks. **Microchemical Journal**, [S.l.], v. 117, p. 127-132, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.06.016>
- ARRUDA, Neusa P. et al. Correlação entre precursores e voláteis em café arábica brasileiro processado pelas vias seca, semiúmida e úmida e discriminação através da análise por componentes principais. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 10, p. 2044-2051, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012001000026>
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ (ABIC). **Café beneficiado – arábica e robusta – Safra 2014 e Safra 2015 – Parque Cafeeiro, Produção e Produtividade**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=48#6090>>. Acesso em: set. 2017.
- BARKER, Matthew; RAYENS, William. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**, [S.l.], v. 17, n. 3, p. 166-173, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cem.785>
- BERGER, Stefan; SICKER, Dieter. **Classics in Spectroscopy**. [S.l.], John Wiley & Sons, 2009.
- BICCHI, Carlo P. et al. Characterization of green and roasted coffees through the chlorogenic acid fraction by HPLC-UV and principal component analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.]: v. 43, n. 6, p. 1549-1555, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf00054a025>

BLEKHERMAN, Grigoriy et al. Bioinformatics tools for cancer metabolomics. **Metabolomics**, [S.l.], v. 7, n. 3, p. 329-343, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11306-010-0270-3>

BORÉM, Flávio Meira et al. Qualidade do café submetido a diferentes temperaturas, fluxos de ar e períodos de pré-secagem. **Coffee Science**, Lavras, v. 1, n. 1, p. 55-63, abr./jun. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v1i1.20>

BRASIL. Instrução Normativa nº 16, de 24 de maio de 2010. Regulamento técnico para o café torrado em grão e café torrado e moído. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2010. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Educação. Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica. **Caderno de aulas práticas dos Institutos Federais: cafeicultura**. Brasília, 2016. 115 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). **Normas Técnicas Especiais**. Brasília, 1978. 75 p.

BRIDGES JR, Cecil C. Hierarchical cluster analysis. **Psychological Reports**, [S.l.], v. 18, n. 3, p. 851-854, 1966. Disponível em: <https://doi.org/10.2466%2Fpr0.1966.18.3.851>

CHANDRASEKARA, Anoma; SHAHIDI, Fereidoon. Determination of antioxidant activity in free and hydrolyzed fractions of millet grains and characterization of their phenolic profiles by HPLC-DAD-ESI-MSn. **Journal of Functional Foods**, [S.l.], v. 3, n. 3, p. 144-158, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.03.007>

CLEMENTE, Aline da Consolação Sampaio et al. Operações pós-colheita e qualidade físico-química e sensorial de cafés. **Coffee Science**, Lavras, v. 10, n. 2, p. 233-241, abr./jun. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v10i2.862>

DA ROSA, Jeane Santos et al. Mass spectrometry screening of arabica coffee roasting: A non-target and non-volatile approach by EASI-MS and ESI-MS. **Food Research International**, [S.l.], v. 89, p. 967-975, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.021>

DAVIS, Aaron P. et al. The impact of climate change on indigenous arabica coffee (*Coffea arabica*): predicting future trends and identifying priorities. **PLoS One**, [S.l.], v. 7, n. 11, p. e47981, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047981>

DE MARIA, Carlos Alberto Bastos; MOREIRA, Ricardo Felipe Alves; TRUGO, Luiz Carlos. Volatile components in roasted coffee. Part I: heterocyclic compounds. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 209-217, 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421999000200013>

DUARTE, Gustavo Henrique Bueno. **Metabolômica por LC-ESI-QTOF-MS em plasma de camundongos NOD/SCID sob tratamento quimioterápico: potenciais**

biomarcadores de leucemia. 2016. 77 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, 2016.

ECCARDI, Fúlvio; SANDALJ, Vincenzo. **O café: ambientes e diversidade**. Rio de Janeiro: Casa da Palavra, 2003.

ENCARNAÇÃO, Ronaldo de Oliveira; LIMA, Darcy Roberto. **Café e saúde humana**. Brasília: Embrapa Café, 2003. 64 p.

ERIKSSON, Lennart et al. **Design of experiments: Principles and applications**. Third revised and enlarged edition. Umetrics Academy, Sweden, 2008.

FASSIO, Larissa de Oliveira et al. **Composição de ácidos graxos em grãos de café (*Coffea arabica* L.) resistentes à ferrugem cultivados em dois ambientes de Minas Gerais**. In: IX SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2015, Curitiba.

FASSIO, Larissa de Oliveira et al. Sensory description of cultivars (*Coffea arabica* L.) resistant to rust and its correlation with caffeine, trigonelline, and chlorogenic acid compounds. **Beverages**, [S.l.], v. 2, n. 1, p. 1, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/beverages2010001>

FARAH, A. et al. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 98, n. 2, p. 373-380, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.032>

FARAH, Adriana et al. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. **The Journal of Nutrition**, [S.l.], v. 138, n. 12, p. 2309-2315, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/jn.108.095554>

FARAH, A. Coffee as a speciality and functional beverage. In: **Functional and speciality beverage technology**. 2009. p. 370-395. Disponível em: <https://doi.org/10.1533/9781845695569.3.370>

FARAH, Adriana; SANTOS, Thiago Ferreira dos. The Coffee Plant and Beans: An Introduction. In: PREEDY, Victor R. (Ed.). **Coffee in Health and Disease Prevention**. [S.l.]: Academic Press, 2014. p. 5-10. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00001-2>

FARAH, Adriana. Coffee Constituents. In: CHU, Yi-Fang. **Coffee: emerging health effects and disease prevention**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2012. p. 21-58.

FERNANDES, André Luís Teixeira; LIMA, Luiz Antônio. Irrigação do Cafeeiro. **Revista do Café**, Centro do Comércio de Café do Rio de Janeiro, ano 92, n. 846, p. 44-46, jun. 2013. Disponível em: <<http://www.cccrj.com.br/revista/846/44.pdf>>. Acesso em: out. 2017.

FERRÃO, André Munhoz de Argollo. **Arquitetura do café**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2004.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedure in multiple comparisons. **Science and Agrotechnology**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, abr. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>

FERREIRA, Márcia Miguel Castro. **Quimiometria**: conceitos, métodos e aplicações. Campinas: Unicamp, 2015.

GARRETT, Rafael et al. Arabica and robusta coffees: identification of major polar compounds and quantification of blends by direct-infusion electrospray ionization–mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 60, n. 17, p. 4253-4258, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf300388m>

GARRETT, Rafael et al. Ambient mass spectrometry employed for direct analysis of intact arabica coffee beans. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S.l.], v. 25, n. 7, p. 1172-1177, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140094>

GARRETT, Rafael; REZENDE, Claudia M.; IFA, Demian R. Coffee origin discrimination by paper spray mass spectrometry and direct coffee spray analysis. **Analytical Methods**, [S.l.], v. 5, n. 21, p. 5944-5948, 2013. Disponível em: <http://doi.org/10.1039/C3AY41247D>

GARRETT, Rafael; REZENDE, Claudia M.; IFA, Demian R. Revealing the spatial distribution of chlorogenic acids and sucrose across coffee bean endosperm by desorption electrospray ionization-mass spectrometry imaging. **LWT-Food Science and Technology**, [S.l.], v. 65, p. 711-717, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.062>

GIOMO, Gerson Silva; BORÉM, Flávio Meira. Cafés especiais no Brasil: opção pela qualidade. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 32, n. 261, p. 7-00, mar/abr. 2011.

GUERREIRO FILHO, Oliveira et al. Origem e classificação botânica do cafeeiro. In: CARVALHO, Carlos Henrique Siqueira de. **Cultivares de café**: origem, características e recomendações. Brasília: Embrapa Café, 2008a. p. 27-33.

GUERREIRO FILHO, Oliveira et al. Características utilizadas para a identificação de cultivares de café. In: CARVALHO, Carlos Henrique Siqueira de. **Cultivares de café**: origem, características e recomendações. Brasília: Embrapa Café, 2008b. p. 141-155.

HOTELLING, Harold. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. **Journal of Educational Psychology**, [S.l.], v. 24, n. 6, p. 417, 1933. Disponível em: <http://psycnet.apa.org/doi/10.1037/h0071325>

JAISWAL, Rakesh; KUHNERT, Nikolai. Hierarchical scheme for liquid chromatography/multi-stage spectrometric identification of 3, 4, 5-triacyl chlorogenic acids in green robusta coffee beans. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [S.l.], v. 24, n. 15, p. 2283-2294, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rcm.4639>

LAGANA, A. et al. Rapid liquid chromatographic analysis of carboxylic acid-5-hydroxytryptamides in coffee. **Chromatographia**, [S.l.], v. 28, n. 11-12, p. 593-596, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02260684>

LANG, Roman et al. Quantitation of β N-alkanoyl-5-hydroxytryptamides in coffee by means of LC-MS/MS-SIDA and assessment of their gastric acid secretion potential using the HGT-1 cell assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 58, n. 3, p. 1593-1602, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf903612h>

LEISS, Kirsten A. et al. Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in chrysanthemum. **Plant Physiology**, v. 150, n. 3, p. 1567-1575, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.109.138131>

LINGLE, Ted R. **The coffee cupper's handbook: a systematic guide to the sensory evaluation of coffee's flavor**. Long Beach, CA: Specialty Coffee Association of America, 2011.

LIU, Huawen et al. Regularized partial least squares for multi-label learning. **International Journal of Machine Learning and Cybernetics**, [S.l.], p. 1-12, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13042-016-0500-8>

MANTOVANI, Everardo Chartuni; VICENTE, Marcelo Rossi; SOUZA, Mauricio Novaes. Caracterização técnica e perspectivas para a cafeicultura irrigada brasileira. In: ZAMBOLIM, Laércio (Ed.). **Efeitos da Irrigação sobre a qualidade e produtividade do café**. Viçosa, MG: UFV, 2004. p. 293-318.

MANTOVANI, Everardo Chartuni; VICENTE, Marcelo Rossi. Manejo da Irrigação. In: SAKIYAMA, N. S. et al, **Café Arábica: do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2015. p. 174-195.

MARTÍN, María J.; PABLOS, Fernando; GONZÁLEZ, A. Gustavo. Discrimination between arabica and robusta green coffee varieties according to their chemical composition. **Talanta**, [S.l.], v. 46, n. 6, p. 1259-1264, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(97\)00409-8](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(97)00409-8)

MASIKE, Keabetswe et al. Highlighting mass spectrometric fragmentation differences and similarities between hydroxycinnamoyl-quinic acids and hydroxycinnamoyl-isocitric acids. **Chemistry Central Journal**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 29, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0262-8>

MATIELLO, José Braz et al. **Cultura de café no Brasil: manual de recomendações**. Ed. 2015. 1. ed. São Paulo: Futurama Editora, 2016.

MATIELLO, J. B.; ALMEIDA, S. R. **A ferrugem do cafeeiro no Brasil e seu controle**. Varginha: MAPA/PROCAFÉ. 98p, 2006.

MEDINA FILHO, Herculano Penna; BORDIGNON, Rita; CARVALHO, Carlos Henrique Siqueira de. Desenvolvimento de novas cultivares de café arábica. In: CARVALHO, Carlos Henrique Siqueira de. **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, 2008. p. 79-101.

MEHMOOD, Tahir et al. A review of variable selection methods in partial least squares regression. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [S.l.], v. 118, p. 62-69, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2012.07.010>

MENDES, Antônio Nazareno Guimarães et al. História das primeiras cultivares de café plantadas no Brasil. In: CARVALHO, Carlos Henrique Siqueira de. **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, 2008. p. 69-78.

MENDONÇA, Juliana C. F. et al. Chemical characterization of non-defective and defective green arabica and robusta coffees by electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS). **Food Chemistry**, [S.l.], v. 111, n. 2, p. 490-497, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.080>

MENDONÇA, Luciana Maria Vieira Lopes et al. Composição química de grãos crus de cultivares de *Coffea arabica* L. suscetíveis e resistentes à *Hemileia vastatrix* Berg et Br. **Science and Agrotechnology**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 413-419, mar./abr., 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000200022>

MILLS, Charlotte E. et al. The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 141, n. 4, p. 3335-3340, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.014>

MOITA NETO, J. M., MOITA, Graziella Ciaramella. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, [S.l.], v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421998000400016>

MORAIS, Sérgio Antônio Lemos de et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of conilon coffee submitted to different degrees of roasting. **Química Nova**, [S.l.] v. 32, n. 2, p. 327-331, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000200011>

NIKOLIĆ, Dejan et al. Mass spectrometric dereplication of nitrogen-containing constituents of black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.). **Fitoterapia**, [S.l.], v. 83, n. 3, p. 441-460, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.12.006>

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ (OIC) **Monthly export statistics – July 2017**. Disponível em: <<http://www.ico.org/prices/m1-exports.pdf>> Acesso em: set. 2017a.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ (OIC). **World coffee consumption**. Disponível em: < <http://www.ico.org/prices/new-consumption-table.pdf> >. Acesso em: set. 2017b.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ (OIC). **Total production by all exporting countries**. Disponível em: <<http://www.ico.org/prices/po-production.pdf>>. Acesso em: set. 2017c.

PEHL, C. et al. The effect of decaffeination of coffee on gastro-oesophageal reflux in patients with reflux disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, [S.l.], v. 11, n. 3, p. 483-486, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.1997.00161.x>

PEREIRA, Antônio Alves; BAIÃO, Antônio Carlos. Cultivares. In: SAKIYAMA, N. S. et al. **Café Arábica: do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2015. p. 24-45.

RAJALAHTI, Tarja; KVALHEIM, Olav M. Multivariate data analysis in pharmaceutics: a tutorial review. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 417, n. 1, p. 280-290, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.019>

REDGWELL, Robert; FISCHER, Monica. Coffee carbohydrates. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, [S.l.], v. 18, n. 1, p. 165-174, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202006000100012>

RIBEIRO, Bruno Batista et al. Avaliação química e sensorial de blends de *Coffea canephora* Pierre e *Coffea arabica* L. **Coffee Science**, Lavras, v. 9, n. 2, p. 178-186, abr./jun. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v9i2.596>

SAKIYAMA, Ney Sussumu. O café arábica. In: SAKIYAMA, N. S. et al. **Café Arábica: do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2015. p. 9-23.

SANTOS, Júlio Cesar Freitas. Época adequada para a colheita do café. **Revista Cafeicultura**, Rio Paranaíba, dez. 2005. Disponível em: <<http://revistacafeicultura.com.br/index.php?tipo=ler&mat=3682>>. Acesso em: maio 2017.

SANTOS, L. S. et al. Chemotaxonomic markers of organic, natural, and genetically modified soybeans detected by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, [S.l.], v. 269, n. 2, p. 505-509, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10967-006-0415-z>

SCAA – **Specialty Coffee Association of America. Metodologia SCAA de avaliação de cafés especiais guia rápido – Green Coffee**. 2009. SCAA/CuppingProtocols/QuickGuidebyEnseiNeto_Portuguese/RevMar09. Disponível em: <http://coffee-traveler.net/wp-content/files/903-SCAACuppingMethod_RESUMO_3a.pdf>. Acesso em: nov. 2017.

SELMAR, D. et al. Germination of coffee seeds and its significance for coffee quality. **Plant Biology**, [S.l.], v. 8, n. 02, p. 260-264, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2006-923845>

SILVA, Emerson A. da et al. The influence of water management and environmental conditions on the chemical composition and beverage quality of coffee beans. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, [S.l.], v. 17, n. 2, p. 229-238, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202005000200006>

SPEER, Karl; KÖLLING-SPEER, Isabelle. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, [S.l.], v. 18, n. 1, p. 201-216, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202006000100014>

STACKLIES, Wolfram et al. pcaMethods — a bioconductor package providing PCA methods for incomplete data. **Bioinformatics**, [S.l.], v. 23, n. 9, p. 1164-1167, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm069>

TEIXEIRA, Mauri Martins et al. Colheita e pós-colheita. In: SAKIYAMA, N. S. et al. **Café Arábica: do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2015. p. 216-249.

UKERS W. H., **All about coffee**. Nova Iorque, 1935.

VAN DEN BERG, Robert A. et al. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, [S.l.], v. 7, n. 1, p. 142, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142>

VINECKY, Felipe et al. Controlled irrigation and nitrogen, phosphorous and potassium fertilization affect the biochemical composition and quality of Arabica coffee beans. **The Journal of Agricultural Science**, [S.l.], v. 155, n. 6, p. 902-918, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0021859616000988>

WEI, Fefei; TANOKURA, Masaru. Organic compounds in green coffee beans. In: PREEDY, Victor R. (Ed.). **Coffee in Health and Disease Prevention**. [S.l.]: Academic Press, 2014. p. 149-162. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00017-6>

XIA, Jianguo; WISHART, David S. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, [S.l.], p. 14.10.1-14.10.91, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cpbi.11>

ZAMBOLIM, Laércio. Manejo de doenças. In: SAKIYAMA, N. S. et al. **Café Arábica: do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2015. p. 129-150.

ANEXOS

ANEXO A – Planilha de avaliação sensorial da SCAA



Specialty Coffee Association of America Coffee Cupping Form

Name: _____

Date: _____

Quality scale:	
6.00 - Good	7.00 - Very Good
6.25	7.25
6.50	7.50
6.75	7.75
8.00 - Excellent	9.00 - Outstanding
8.25	9.25
8.50	9.50
8.75	9.75

Sample # _____

Roast Level or sample _____

Notes: _____

Fragrance/Aroma Score: _____	Flavor Score: _____	Acidity Score: _____	Body Score: _____	Uniformity Score: _____	Clean Cup Score: _____	Overall Score: _____	Total score _____
Dry Qualities: _____	Aftertaste Score: _____	Intensity High _____ Low _____	Level Heavy _____ Thin _____	Balance Score: _____	Sweetness Score: _____	Defects (subtract) Taint=2 _____ Fault=4 _____	# cups Intensity = _____
Final Score _____							

Sample # _____

Roast Level or sample _____

Notes: _____

Fragrance/Aroma Score: _____	Flavor Score: _____	Acidity Score: _____	Body Score: _____	Uniformity Score: _____	Clean Cup Score: _____	Overall Score: _____	Total score _____
Dry Qualities: _____	Aftertaste Score: _____	Intensity High _____ Low _____	Level Heavy _____ Thin _____	Balance Score: _____	Sweetness Score: _____	Defects (subtract) Taint=2 _____ Fault=4 _____	# cups Intensity = _____
Final Score _____							

Sample # _____

Roast Level or sample _____

Notes: _____

Fragrance/Aroma Score: _____	Flavor Score: _____	Acidity Score: _____	Body Score: _____	Uniformity Score: _____	Clean Cup Score: _____	Overall Score: _____	Total score _____
Dry Qualities: _____	Aftertaste Score: _____	Intensity High _____ Low _____	Level Heavy _____ Thin _____	Balance Score: _____	Sweetness Score: _____	Defects (subtract) Taint=2 _____ Fault=4 _____	# cups Intensity = _____
Final Score _____							

ANEXO B – Certificado Proveedor 1

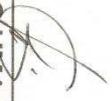


CERTIFICADO

**TREINAMENTO DE QUALIDADE EM CLASSIFICAÇÃO
E DEGUSTAÇÃO DE CAFÉ**

Certificamos que **ELAINE CRISTINA ROSA**
registro nº **552/15** , participou e obteve aproveitamento exigido no Curso de
Classificação e Degustação de Café, com um total de 40 horas realizado no
período de **06/07/2015** a **10/07/2015**.

Patrocínio, MG **10 de Julho** de **2015**


GLAUCIO LIMA FONTE BOA
Engenheiro Agrônomo
Reg. MAPA N° 3.872


ELAINE CRISTINA ROSA
Registro nº 552/15

ANEXO C – Certificado Proveedor 2



Academia
do
Café

concede a

MARYANA NOVAIS DE CASTRO

O presente Certificado pela Participação no

CURSO DE BARISTA

realizado na Academia do Café, Belo Horizonte - MG, em Março de 2014.

Carga Horária: 16 horas


Osnei Cesarino
Instrutor - Barista


Bruno Souza
Supervisor - Q Grader



Laboratório Certificado

ANEXO D – Certificado Proveedor 3

