

Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

# Utilização de Métodos Quimiométricos Aliados a RMN na Caracterização dos Diferentes Tipos de Cafés Comerciais

**LEILA ALEY TAVARES \***

Tese apresentada como parte dos requisitos  
para a obtenção do título de **DOUTOR EM  
CIÊNCIAS**, área de concentração: **QUÍMICA**.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira

\* Bolsista CAPES

São Carlos - SP  
2007

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

T231um

Tavares, Leila Aley.

Utilização de métodos quimiométricos aliados a RMN na  
caracterização dos diferentes tipos de cafés comerciais /  
Leila Aley Tavares. -- São Carlos : UFSCar, 2008.  
169 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2007.

1. Química. 2. Ressonância magnética nuclear. 3.  
quimiometria. 4. Café. 5. Controle de qualidade. I. Título.

CDD: 540 (20<sup>a</sup>)

*Dedico esse trabalho...*

*...À minha família pelo incentivo à minha  
formação e por propiciarem a minha busca  
pelo crescimento profissional.*

## *Agradeco*

*Principalmente a Deus, pela vida e por me dar forcas para superar cada obstaculo.*

*Ao professor Dr. Antonio Gilberto Ferreira, pelos ensinamentos transmitidos e pela orientaco deste trabalho.*

*Aos amigos do laborat6rio de RMN: Elisangela, Glaucia, Katyúscya, Vladimir, Luciano, Angela, Maiara, Lucinéia, Cristina, Anderson, Mário, Luciana e Paulo, pela convivência e companheirismo durante esse período.*

*À professora Dra. Márcia M. Ferreira do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pelos ensinamentos quimiométricos, empréstimo do software e fornecimento de amostras.*

*Ao Dr. Luis Henrique Mattoso da Embrapa Instrumentação de São Carlos-SP e à Dra. Alessandra Corrêa pela parceria e fornecimento de amostras.*

*À Ednéia Almeida da COCAPEC - Cooperativa dos cafeicultores e agropecuaristas de Franca-SP, pela prestatividade e fornecimento de amostras.*

*À Andréa Pires Fernandes do grupo de análise instrumental aplicada, DQ-UFSCar pela amizade e parceria.*

*Aos professores do Departamento de Química da UFSCar pelos ensinamentos transmitidos.*

*A toda a minha família que sempre incentivou o meu crescimento pessoal e profissional, em especial à minha mãe e à minha irmã Neusa que mesmo distantes sempre estiveram presentes nos momentos difíceis dando todo o apoio que sempre precisei.*

*A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.*

*E à CAPES, pelo auxílio financeiro através da bolsa concedida.*

## LISTA DE ABREVIATURAS

AQ	Tempo de aquisição ( <i>Acquisition Time</i> )
$B_0$	Campo magnético estático de um espectrômetro
COSY	<i>CO</i> rrelation <i>S</i> pectroscop <i>Y</i>
CPMG	Seqüência Car-Purcell-Meiboom-Gill
$d$	Dupleto
$dd$	Duplo dupleto
$F_1$	Eixo vertical no espectro bidimensional
$F_2$	Eixo horizontal no espectro bidimensional
FID	Decaimento livre de indução ( <i>Free Induction Decay</i> )
$g$ HMBC	<i>gradient - Heteronuclear Multiple Bonds Correlations</i>
$g$ HSQC	<i>gradient - Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
HR-MAS	<i>High Resolution Magic Angle Spinning</i>
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente ( <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> )
KNN	<i>K- Nearest Neighbor</i>
LB	Função matemática empregada no aumento da relação sinal/ruído ( <i>Line Broadening</i> )
NS	Número de aquisições ( <i>Number of Scans</i> )
P1	Pulso de $90^\circ$ com alta potência aplicado no canal f1
PCA	<i>Principal Components Analysis</i>
PCR	<i>Principal Components Regression</i>
PL9	Potência utilizada na supressão do sinal selecionado
PLS	<i>Partial Least Square</i>
PRESS	<i>Predicted Residual Error Sum of Squares</i>
QSINE	Multiplicação matemática utilizando a função $\text{seno}^2$
$r$	Coefficiente de regressão
$rf$	Radiofrequência
RG	Ganho do receptor ( <i>Receiver Gain</i> )
RMN de $^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
SEV	<i>Standard Error of Validation</i>
SI	Número de pontos utilizados no processamento do espectro
SIMCA	<i>Soft Independent Modeling of Class Analogy</i>
SSB1	Parâmetro envolvido na multiplicação matemática $\text{seno}$ e $\text{seno}^2$ ao longo de F1

SSB2	Parâmetro envolvido na multiplicação matemática <i>seno</i> e <i>seno</i> <sup>2</sup> ao longo de F2
SW	Janela espectral ( <i>Spectral Width</i> )
<i>t</i>	Tripleto
$T_1$	Tempo de relaxação longitudinal (spin-rede)
$T_2$	Tempo de relaxação transversal (spin-spin)
TD	Número de pontos utilizados na aquisição do espectro 1D ( <i>Time Domain</i> )
TD1	Número de experimentos ao longo de F1 no espectro de 2D
TD2	Número de pontos utilizados na aquisição ao longo de F2 no espectro de 2D
TMSP	TriMetilSililPropionato de sódio 2,2,3,3-d <sub>4</sub>
$\delta^{13}_C$	Deslocamento químico de carbono treze
$\delta^1_H$	Deslocamento químico de hidrogênio
2D	Bidimensional

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.2.1:	Composição química do grão de café cru.....	4
TABELA 1.2.5.1:	Descrição das categorias de classificação oficialmente utilizadas na prova de xícara dos cafés.....	12
TABELA 2.2.1.1:	Amostras de misturas de cafés contendo diferentes percentagens das espécies arábica e robusta e analisadas em equipamentos de RMN de diferentes campos magnéticos.....	26
TABELA 2.3.1.1:	Resíduo entre as classes arábica (2) e robusta (1), para os dados de cafés crus obtidos em equipamento de 9,4T.....	38
TABELA 2.3.1.2:	Distância entre as classes arábica (2) e robusta (1), para os dados de cafés crus obtidos em equipamento de 9,4T.....	38
TABELA 2.3.1.3:	Previsão de classe para as amostras teste a partir dos métodos de classificação KNN e SIMCA aplicados aos dados de cafés crus obtidos em equipamento de 9,4T.....	40
TABELA 2.3.1.4:	Previsão de classe para amostras desconhecidas a partir do método KNN aplicados aos dados de cafés crus obtidos em equipamento de 9,4T.....	41
TABELA 2.3.1.5:	Previsão do teor de café da espécie arábica nas misturas a partir dos modelos de calibração PLS e PCR aplicados aos dados de cafés crus obtidos em equipamento de 9,4T.....	44
TABELA 2.3.1.6:	Previsão do teor de café arábica em amostras desconhecidas a partir dos modelos PLS e PCR aplicados aos dados de cafés crus obtidos em equipamento de 9,4T.....	45
TABELA 2.3.2.1:	Resíduo entre as classes arábica (2) e robusta (1), para os dados de cafés crus obtidos em equipamento de 4,7T.....	50
TABELA 2.3.2.2:	Distância entre as classes arábica (2) e robusta (1), para os dados de cafés crus obtidos em equipamento de 4,7T.....	50
TABELA 2.3.2.3:	Previsão de classe obtido para amostras teste a partir dos métodos de classificação KNN e SIMCA aplicados aos dados de cafés crus obtidos em equipamento de 4,7T.....	51
TABELA 2.3.2.4:	Previsão do teor de café da espécie arábica em amostras teste feita pelos modelos de calibração PLS e PCR aplicados aos dados de cafés crus obtidos em equipamento de 4,7T.....	52
TABELA 2.3.3.1:	Resíduo entre as classes arábica (2) e robusta (1), para os dados de cafés torrados.....	56
TABELA 2.3.3.2:	Distância entre as classes arábica (2) e robusta (1), para os dados de cafés torrados .....	56

TABELA 2.3.3.3:	Previsão de classe obtido para amostras teste a partir dos métodos de classificação KNN e SIMCA aplicados aos dados de café torrado.....	56
TABELA 2.3.3.4:	Previsão do teor de café torrado da espécie arábica em amostras teste feita pelos modelos de calibração PLS e PCR. ....	57
TABELA 3.2.1.1:	Composições das misturas de café/cevada utilizadas nas análises via RMN e Infravermelho.....	57
TABELA 3.3.1.1:	Previsão de classe obtido para as amostras de café/cevada a partir do método de classificação KNN, aplicado aos dados de RMN de <sup>1</sup> H.....	63
TABELA 3.3.1.2:	Previsão do teor de café em misturas café/cevada feita pelos métodos PLS e PCR, aplicados aos dados de RMN de <sup>1</sup> H.....	72
TABELA 3.3.2.1:	Previsão do teor de café em misturas de café/cevada feita pelos métodos de calibração PLS e PCR aplicados aos dados de infravermelho.....	78
TABELA 4.2.1.1:	Intervalo de tempo e temperatura utilizados na torrefação das amostras analisadas.....	83
TABELA 5.3.1.1.1.1:	Atribuição dos sinais de RMN encontrados para a molécula de sacarose.....	101
TABELA 6.2.1.1:	Modo de cultivo das amostras estudadas.....	109
TABELA 6.2.1.2:	Programa de aquecimento em forno de microondas Multiwave (Anton Paar) com recipientes fechados, programa para 6 amostras.....	110
TABELA 6.2.1.3:	Concentrações das soluções de referência.....	111
TABELA 6.2.2.1:	Parâmetros operacionais para determinação dos constituintes inorgânicos em condições robustas.....	112
TABELA 6.3.1.1:	Previsão de classe obtido para as amostras teste a partir do método de classificação KNN aplicado aos dados de RMN de <sup>1</sup> H obtidos para cafés produzidos convencionalmente e organicamente.....	121
TABELA 7.3.1.1:	Previsão de classe para as amostras teste a partir do método KNN, aplicado aos dados dos cafés crus (na forma de bebida) com diferentes qualidades na prova de xícara.....	139
TABELA 7.3.3.1.1:	Composição (%) dos ácidos graxos presentes nos grãos de café cru....	152
TABELA 7.3.3.1.2:	Atribuição dos sinais de RMN para os ésteres de ácidos graxos de grãos de café cru.....	157

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.2.1.1:	Estrutura dos ácidos clorogênicos <b>(1)</b> .....	6
FIGURA 1.2.1.2:	Estrutura da trigonelina <b>(2)</b> e sacarose <b>(3)</b> .....	6
FIGURA 1.3.1:	Esquema ilustrativo do giro do rotor no ângulo mágico.....	17
FIGURA 2.3.1.1:	Espectros de RMN de <sup>1</sup> H de café cru das espécies arábica (A), 70% arábica + 30% robusta (B), 30% arábica + 70% robusta (C) e robusta (D), obtidos em um equipamento de 9,4T .....	30
FIGURA 2.3.1.2:	Região de 6,1 – 9,3 ppm dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H de café cru das espécies arábica (A) e robusta (B), obtidos em um equipamento de 9,4T .....	32
FIGURA 2.3.1.3:	Região de 6,0 - 9,0 ppm do espectro de RMN de <sup>1</sup> H antes (A) e após (B) aplicação da primeira derivada.....	34
FIGURA 2.3.1.4:	Gráfico da variância acumulada versus o número de componentes principais.....	34
FIGURA 2.3.1.5:	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 das misturas de cafés crus das espécies arábica e robusta, cujos espectros de RMN de <sup>1</sup> H foram obtidos em equipamento de 9,4T.....	35
FIGURA 2.3.1.6:	Gráfico de <i>loadings</i> mostrando a complexidade da análise da influência das variáveis em PC1, após o autoescalamento dos dados.....	36
FIGURA 2.3.1.7:	Dendrograma obtido do HCA das misturas de cafés crus das espécies arábica e robusta, cujos espectros de RMN de <sup>1</sup> H foram obtidos em equipamento de 9,4T.....	37
FIGURA 2.3.1.8:	Previsão de classe obtida pelo modelo SIMCA (amostras em vermelho próximas à classe 1, amostras em azul próximas à classe 2).....	40
FIGURA 2.3.1.9:	Teores de café arábica medidos versus teores estimados na validação cruzada, para o modelo PLS.....	42
FIGURA 2.3.1.10:	Teores de café arábica medidos versus teores estimados na validação cruzada, para o modelo PCR.....	43
FIGURA 2.3.2.1:	Região de 6,0 – 9,4 ppm dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H das espécies de café arábica (A) e robusta (B), adquiridos em um equipamento de 4,7T .....	46
FIGURA 2.3.2.2:	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 das misturas de cafés crus das espécies arábica e robusta, analisadas num equipamento de 4,7T.....	47
FIGURA 2.3.2.3:	Dendrograma obtido do HCA a partir das misturas de cafés crus das espécies arábica e robusta, analisadas num equipamento de	

	4,7T.....	48
FIGURA 2.3.2.4:	Ampliação da parte superior do dendrograma obtido do HCA a partir das misturas de cafés crus das espécies arábica e robusta, analisadas num equipamento de 4,7T.....	49
FIGURA 2.3.2.5:	Ampliação da parte inferior do dendrograma obtido do HCA a partir das misturas de cafés crus das espécies arábica e robusta, analisadas num equipamento de 4,7T.....	49
FIGURA 2.3.2.6:	Gráfico do Kth vizinho mais próximo versus o número de erros cometidos na previsão das amostras de treinamento para o conjunto de dados de RMN de $^1\text{H}$ obtidos em equipamento de 4,7T para amostras de cafés crus das espécies arábica e robusta.....	51
FIGURA 2.3.3.1:	Região de 6,0 – 9,4 ppm do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de cafés torrados das espécies arábica (A) e robusta (B) adquiridos em um equipamento de 9,4T.....	53
FIGURA 2.3.3.2:	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 das misturas de cafés torrados arábica e robusta, cujos espectros de RMN de $^1\text{H}$ foram obtidos em equipamento de 9,4T.....	54
FIGURA 2.3.3.3:	Dendrograma obtido do HCA das misturas de cafés torrados das espécies arábica e robusta, para os espectros de RMN de $^1\text{H}$ adquiridos num equipamento de 9,4T.....	55
FIGURA 3.3.1.1:	Espectros de RMN de $^1\text{H}$ de café (A), 70% café + 30% cevada (B), 30% café + 70% cevada (C) e cevada (D), mostrando em cinza as regiões excluídas das análises quimiométricas.....	66
FIGURA 3.3.1.2:	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos dados obtidos via RMN de $^1\text{H}$ para as amostras de café/cevada.....	67
FIGURA 3.3.1.3:	Gráfico do K-ésimo vizinho mais próximo versus o número de erros de previsão para as amostras de treinamento, obtido pelo modelo KNN aplicado aos dados de RMN para amostras de café/cevada.....	68
FIGURA 3.3.1.4:	Teores de café medidos versus teores estimados para amostras de café/cevada, obtidos pelo modelo PLS aplicado aos dados de RMN .....	70
FIGURA 3.3.1.5:	Teores de café medidos versus teores estimados para amostras de café/cevada, obtidos pelo modelo PCR aplicado aos dados de RMN.....	71
FIGURA 3.3.2.1:	Espectros na região do infravermelho para amostras de café (A) e cevada (B), mostrando em cinza as regiões excluídas das análises quimiométricas.....	73

FIGURA 3.3.2.2:	Gráfico de linhas mostrando o aumento da intensidade das absorções de estiramentos dos grupos etílicos com o aumento do teor de café....74
FIGURA 3.3.2.3:	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos dados obtidos via infravermelho para as amostras de café/cevada.....75
FIGURA 3.3.2.4:	Teores de café medidos versus teores estimados para amostras de café/cevada, obtidos pelo modelo PLS aplicado aos dados de infravermelho.....76
FIGURA 3.3.2.5:	Teores de café medidos versus teores estimados para amostras de café/cevada, obtidos pelo modelo PCR aplicado aos dados de infravermelho.....77
FIGURA 3.3.2.6:	Espectro na região do infravermelho da amostra de café comercial caRen.....79
FIGURA 3.3.2.7:	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra de café comercial caRen.....79
FIGURA 4.3.1:	Região de 6,2 a 9,2 ppm dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ dos cafés torrados a 215 $^{\circ}\text{C}$ e durante 10,0 min (A), 17,5 min (B) e 25,0 min (C).....86
FIGURA 4.3.2:	Região de 6,2 a 9,2 ppm dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ dos cafés torrados a 17,5 min e nas temperaturas de 200 $^{\circ}\text{C}$ (A), 215 $^{\circ}\text{C}$ (B) e 230 $^{\circ}\text{C}$ (C).....86
FIGURA 4.3.3:	Região de 0,1 a 4,5 ppm dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ dos cafés torrados a 215 $^{\circ}\text{C}$ e durante 10,0 min (A), 17,5 min (B) e 25,0 min (C).....88
FIGURA 4.3.4:	Gráfico de <i>scores</i> dos cafés torrados em diferentes condições de tempo e temperatura.....89
FIGURA 5.3.1.1.1:	Espectros de RMN de $^1\text{H}$ de cafés crus sem defeito (A) e com defeitos do tipo ardido (B), verde (C) e preto (D).....95
FIGURA 5.3.1.1.2:	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos dados de RMN de $^1\text{H}$ dos cafés crus sem defeitos e com os defeitos do tipo preto, verde e ardido.....96
FIGURA 5.3.1.1.3:	Dendograma dos dados de RMN de $^1\text{H}$ dos cafés crus sem defeitos e com os defeitos do tipo preto, verde e ardido.....97
FIGURA 5.3.1.1.1.1:	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do café (A), do café acrescido de sacarose (B) e da sacarose (C).....98
FIGURA 5.3.1.1.1.2:	Espectro de RMN de <i>g</i> COSY da extração aquosa do café cru, evidenciando as correlações observadas para a sacarose.....99
FIGURA 5.3.1.1.1.3:	Espectro de RMN de <i>g</i> HSQC da extração aquosa do café cru, evidenciando as correlações observadas para a sacarose.....100
FIGURA 5.3.1.1.1.4:	Espectro de RMN de <i>g</i> HMBBC da extração aquosa do café cru,

	evidenciando as correlações observadas para a sacarose.....	100
FIGURA 5.3.1.1.2.1:	Espectro de RMN de <i>g</i> HSQC (A) e <i>g</i> HMBC (B) da extração aquosa do café cru, evidenciando as correlações observadas para a alanina e o ácido acético.....	102
FIGURA 5.3.2.1:	Espectros de RMN de <sup>1</sup> H de cafés torrados sem defeito (A) e com defeitos do tipo ardido (B), verde (C) e preto (D) .....	103
FIGURA 5.3.2.2:	Gráfico de <i>scores</i> dos dados de RMN de <sup>1</sup> H dos cafés torrados sem e com os defeitos do tipo preto, verde e ardido.....	104
FIGURA 5.3.2.3:	Dendograma dos dados de RMN de <sup>1</sup> H dos cafés torrados sem e com os defeitos do tipo preto, verde e ardido.....	105
FIGURA 6.3.1.1:	Espectros de RMN de <sup>1</sup> H dos cafés crus cultivados do modo orgânico (A) e convencional (B).....	113
FIGURA 6.3.1.2:	Ampliação da região de 2,30 a 3,00 ppm (A) e da região de 1,80 a 2,20 ppm (B) do gráfico de linhas contendo todos os espectros e mostrando as diferenças entre os cafés orgânicos e convencionais .....	114
FIGURA 6.3.1.3:	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos dados de RMN de <sup>1</sup> H dos cafés crus produzidos convencionalmente e organicamente.....	115
FIGURA 6.3.1.4:	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC3 dos dados de RMN de <sup>1</sup> H dos cafés crus produzidos convencionalmente e organicamente .....	115
FIGURA 6.3.1.5:	Região do gráfico de linhas característica do modo de produção, mostrando as semelhanças entre as amostras dos cafés crus orgânico BourO e convencional BourC .....	116
FIGURA 6.3.1.6:	Dendrograma obtido a partir dos dados de RMN de <sup>1</sup> H dos cafés crus produzidos do modo orgânico e convencional.....	117
FIGURA 5.3.1.7:	Ampliação do ramo A do dendrograma, mostrando os cafés orgânicos .....	117
FIGURA 6.3.1.8:	Ampliação do ramo B do dendrograma, mostrando cafés orgânicos e convencionais.....	118
FIGURA 6.3.1.9:	Ampliação do ramo C do dendrograma, mostrando cafés convencionais .....	118
FIGURA 6.3.1.10:	Ampliação do ramo D do dendrograma, mostrando cafés convencionais .....	119
FIGURA 6.3.1.11:	Ampliação do ramo E do dendrograma, mostrando café convencional .....	119
FIGURA 6.3.1.12:	Região espectral do gráfico de linhas evidenciando pequenas diferenças entre a amostra convencional SPrat e as demais de mesmo modo de produção .....	120

FIGURA 6.3.1.13:	Gráfico dos erros de previsão para as amostras do conjunto de treinamento do modelo KNN, aplicado aos dados de RMN de $^1\text{H}$ obtidos para cafés produzidos convencionalmente e organicamente.....	120
FIGURA 6.3.2.1:	Gráfico de linhas correspondente às concentrações dos constituintes inorgânicos determinados por ICP OES em amostras de café cru produzidos convencionalmente e organicamente.....	122
FIGURA 6.3.2.2:	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos dados de ICP OES dos cafés crus produzidos convencionalmente e organicamente.....	123
FIGURA 6.3.2.3:	Gráfico de <i>loadings</i> de PC1 x PC2 mostrando a influência das variáveis para a discriminação entre os modos de produção.....	123
FIGURA 6.3.2.4:	Dendrograma mostrando a discriminação entre os cafés crus produzidos do modo orgânico e convencional, para o conjunto de dados de ICP OES.....	124
FIGURA 6.3.2.5:	Expansão superior do dendrograma, mostrando o grupo para cafés produzidos convencionalmente .....	124
FIGURA 6.3.2.6:	Expansão inferior do dendrograma, mostrando o grupo para cafés produzidos organicamente .....	125
FIGURA 6.3.2.7:	Gráfico dos erros de previsão para as amostras do conjunto de treinamento do modelo KNN, aplicado aos dados de ICP OES obtidos para cafés produzidos convencionalmente e organicamente.....	126
FIGURA 7.3.1.1:	Espectros de RMN de $^1\text{H}$ dos cafés crus dos tipos mole (A), duro (B) e rio (C) .....	133
FIGURA 7.3.1.2:	Gráfico de linhas mostrando as diferenças espectrais nas regiões dos açúcares (A) e dos ésteres de ácidos graxos (B) para os cafés com diferentes qualidades: mole, duro e rio.....	134
FIGURA 7.3.1.3:	Gráfico de linhas da região de açúcares, mostrando a similaridade entre os sinais apresentados pelas amostras de café mole Le3 e rio c1.....	135
FIGURA 7.3.1.4:	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos cafés crus que apresentam diferentes qualidades na prova de xícara: mole, duro e rio.....	136
FIGURA 7.3.1.5:	Dendrograma obtido para os cafés crus que apresentam diferentes qualidades na prova de xícara: mole, duro e rio.....	137
FIGURA 7.3.1.6:	Ampliação da parte superior do dendrograma mostrando a discriminação de dois grupos, um para cafés do tipo duro e outro para cafés do tipo rio.....	137
FIGURA 7.3.1.7:	Ampliação da parte inferior do dendrograma mostrando um terceiro grupo de café onde não houve discriminação e que contém todos os tipos analisados.....	138

FIGURA 7.3.1.8:	Gráfico dos erros de previsão para as amostras do conjunto de treinamento do método KNN, aplicado aos dados obtidos por RMN de $^1\text{H}$ para cafés crus com diferentes qualidades na prova de xícara .....139
FIGURA 7.3.2.1:	Espectros de RMN de $^1\text{H}$ de cafés torrados dos tipos mole (A) e duro (B) .....140
FIGURA 7.3.2.2:	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos cafés torrados dos tipos mole e duro.....141
FIGURA 7.3.2.3:	Dendrograma obtido para os cafés torrados que apresentam classificação mole e duro na prova de xícara.....142
FIGURA 7.3.2.4:	Ampliação da parte superior do dendrograma mostrando que não houve discriminação entre os cafés do tipo mole e duro.....142
FIGURA 7.3.2.5:	Ampliação da parte inferior do dendrograma mostrando que não houve discriminação entre os cafés do tipo mole e duro.....143
FIGURA 7.3.3.1:	Espectros de RMN de $^1\text{H}$ de café cru adquiridos na sonda HR-MAS utilizando-se as seqüências de pulsos CPMG (A) e zgcprr (B).....145
FIGURA 7.3.3.2:	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 de alguns cafés crus dos tipos mole e duro cujos espectros de $^1\text{H}$ HR-MAS foram obtidos a partir da seqüência de pulsos CPMG.....146
FIGURA 7.3.3.3:	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 de alguns cafés crus dos tipos mole e duro cujos espectros de $^1\text{H}$ HR-MAS foram obtidos a partir da seqüência de pulsos zgcprr.....146
FIGURA 7.3.3.4:	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos cafés crus que apresentam diferentes qualidades na prova de xícara: mole, duro e rio. Dados de HR-MAS.....148
FIGURA 7.3.3.5:	Dendrograma obtido para os cafés crus que apresentam diferentes qualidades na prova de xícara: mole, duro e rio. Dados de HR-MAS.....149
FIGURA 7.3.3.6:	Ampliação da parte superior do dendrograma mostrando a formação de um grupo para os cafés do tipo duro.....149
FIGURA 7.3.3.7:	Ampliação da parte inferior do dendrograma mostrando a formação de um grupo para os cafés do tipo mole e outro para os do tipo rio.....150
FIGURA 7.3.3.8:	Gráfico dos erros de previsão para as amostras do conjunto de treinamento do modelo KNN, aplicado aos dados obtidos por RMN de $^1\text{H}$ HR-MAS para cafés com diferentes qualidades na prova de xícara .....150
FIGURA 7.3.3.1.1:	Estruturas dos ácidos graxos saturados, oleico, linoleico e linolênico e da unidade de glicerol .....151

FIGURA 7.3.3.1.2:	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ HR-MAS obtido diretamente de grãos de café cru.....	152
FIGURA 7.3.3.1.3:	Espectro de RMN de $g\text{COSY}$ HR-MAS de grãos de café cru.....	154
FIGURA 7.3.3.1.4:	Expansão das regiões de 0,7 – 2,9 e 3,4 – 5,7 ppm do espectro de RMN de $g\text{HSQC}$ HR-MAS de grãos de café cru.....	156
FIGURA 7.3.3.1.5:	Espectro de RMN de $g\text{HMBC}$ HR-MAS de grãos de café cru.....	156
FIGURA 7.3.3.1.6:	Expansão da região de 0,8 – 2,9 ppm do espectro de RMN de $g\text{HMBC}$ HR-MAS de grãos de café cru.....	157

## RESUMO

UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS ALIADOS A RMN NA CARACTERIZAÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE CAFÉS COMERCIAIS. O café é um importante produto do agronegócio brasileiro. Entretanto, a avaliação comercial da sua qualidade é feita por métodos subjetivos, tornando-se necessário o desenvolvimento de metodologias que sejam capazes de atuar no controle de qualidade e ao mesmo tempo fornecer informações a respeito das diferenças na composição química dos cafés com diferentes características. O presente trabalho descreve a aplicação de métodos de análise multivariada, principalmente, em dados de RMN de  $^1\text{H}$  com o objetivo de verificar as diferenças químicas relacionadas a certos atributos determinantes da qualidade do café.

Nesse trabalho, foram estudados a espécie utilizada na preparação da bebida, grãos de café defeituosos, a adulteração com cevada, o efeito da temperatura e do tempo na composição dos cafés torrados, a classificação sensorial da bebida e o modo de produção. No primeiro estudo, determinou-se as principais diferenças na composição química das duas espécies de maior importância comercial, arábica e robusta, discriminando-as e determinando o teor delas em diferentes misturas. Em estudo semelhante, discriminou-se misturas de café contendo diferentes teores de cevada, além de determinar o teor adicionado ao café. Nesse caso, em comparação com a RMN, a espectroscopia de infravermelho mostrou eficiência similar para o mesmo propósito. No estudo dos cafés com defeitos, verificou-se uma maior alteração na composição química dos grãos com defeitos do tipo preto em relação ao café de boa qualidade, além da discriminação entre todos os tipos analisados; verdes, ardidos e pretos. Quanto ao modo de produção, cafés produzidos convencionalmente e organicamente foram discriminados entre si, sendo o maior teor de ácido acético nos cafés orgânicos a principal diferença apontada nas amostras estudadas. Quanto à classificação sensorial, foi possível construir modelos quimiométricos capazes de atribuir corretamente a qualidade de amostras com diferentes classificações na prova de xícara. Dentre os compostos responsáveis por essa classificação estão os lipídeos, os quais foram identificados com a utilização da técnica HR-MAS. Com relação ao grau de torra, além de verificar uma maior influência da temperatura na alteração da composição do café torrado, foi possível discriminar amostras torradas em diversas condições de tempo e temperatura.

## ABSTRACT

THE USE OF CHEMOMETRIC METHODS AND NMR IN THE CHARACTERIZATION OF DIFFERENT TYPES OF COMMERCIAL COFFEES. Coffee is an important product of Brazilian agribusiness. Nevertheless, the commercial evaluation of its quality is based upon subjective methods and this requires the methodologies development that provides information on differences of coffee chemical composition of different traits. The current work describes the application of multivariate analysis methods, mainly in NMR data, in order to verify chemical differences related to certain attributes that determine the coffee quality. In this work, the specie used in the brew preparation, defective coffee beans, adulteration with barley, the effect of temperature and time on the roasted coffee composition, cup quality and production mode were studied. In the first study, it was determined the main differences between the composition of arabica and robusta coffee discriminating both species and was determined the content of each one in blends. In similar study, were discriminated blends of coffee and barley and was determined the percentage of this adulterant added to the coffee. In this case, comparing to NMR, the infrared spectroscopy also shows great efficiency for the same purpose. In the study of defective coffee beans were verified greater changes in the chemical composition of black beans compared to the non-defective coffee besides the discrimination of all kinds of defective beans analyzed; green, sour, and black. Considering the production mode, were discriminated coffees produced conventionally and organically. The higher acetic acid content in the organic samples was determinant to this discrimination. Considering the cup quality, efficient chemometric models were obtained to classify the samples with different qualities - soft, hard, and rio. The lipid compounds were important to this classification and were identified by using HR-MAS technique. In the study of roast degree it was verified greater influence of the temperature in the chemical composition changes from roasted coffees and it was possible to discriminate samples that were submitted to several conditions of time and temperature during roast process.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	2
1.1 - A importância do café na economia brasileira.....	2
1.2 - Avaliação da qualidade do café.....	3
1.2.1 - Espécie de café.....	4
1.2.2 - Presença de grãos com defeitos do tipo verdes, ardidos e pretos.....	7
1.2.3 - Adulteração de café com substituintes mais baratos.....	9
1.2.4 - Efeito do grau de torra na composição química do café.....	9
1.2.5 - Classificação sensorial da bebida.....	11
1.2.6 - Modo de cultivo: orgânico e convencional.....	13
1.3 - Ressonância magnética nuclear.....	14
1.4. - Métodos quimiométricos.....	18
1.4.1 - Métodos não supervisionados.....	18
1.4.2 - Métodos supervisionados.....	20
1.2.3 - Métodos de calibração.....	21
 CAPÍTULO 2: MISTURAS DE CAFÉS DAS ESPÉCIES. <i>Coffea arabica</i> L. e <i>Coffea canephora</i> P.....	24
2.1 - OBJETIVOS.....	25
2.2 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
1.2.1 - Amostras.....	26
1.2.2 - Medidas espectroscópicas.....	27
1.2.3 - Análise quimiométrica.....	28
2.3. - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
2.3.1 - Estudo das misturas de cafés crus das espécies arábica e robusta utilizando-se espectros de RMN de <sup>1</sup> H obtidos em um equipamento de 9,4T .....	29
2.3.2 - Estudo de misturas de cafés crus das espécies arábica e robusta utilizando espectros de RMN de <sup>1</sup> H obtidos em um equipamento de 4,7T.....	45
2.3.3 - Estudo de misturas de cafés torrados das espécies arábica e robusta utilizando-se espectros de RMN de <sup>1</sup> H obtidos em um equipamento de 9,4T.....	53
2.4 – CONCLUSÕES.....	59

CAPÍTULO 3: ADULTERAÇÃO DE CAFÉ PELA ADIÇÃO DE CEVADA.....	60
3.1 – OBJETIVOS.....	61
3.2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
3.2.1 – Amostras.....	62
3.2.2 - Medidas espectroscópicas.....	63
3.2.3 - Análise quimiométrica.....	64
3.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
3.3.1 – Análise do conjunto de dados obtidos por RMN de <sup>1</sup> H.....	65
3.3.2 - Análise do conjunto de dados obtidos por infravermelho.....	72
3.4 – CONCLUSÕES.....	80
CAPÍTULO 4: EFEITOS DO TEMPO E DA TEMPERATURA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ TORRADO.....	81
4.1 – OBJETIVOS.....	82
4.2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	83
4.2.1 – Amostras.....	83
4.2.2 - Medidas espectroscópicas.....	84
4.2.3 - Análise quimiométrica.....	84
4.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
4.4 – CONCLUSÕES.....	90
CAPÍTULO 5: CAFÉS COM DEFEITOS: “PRETOS, VERDES E ARDIDOS”.....	91
5.1 - OBJETIVOS.....	92
5.2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	93
5.2.1 - Amostras .....	93
5.2.2 - Medidas espectroscópicas .....	93
5.2.3 - Análise quimiométrica.....	93
5.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	94
5.3.1 – Análise de café cru com defeitos - pretos, verdes e ardidos.....	94
5.3.1.1 - Identificação de alguns compostos importantes na discriminação dos cafés crus com defeitos - pretos, verdes e ardidos.....	98
5.3.1.1.1- Sacarose.....	98
5.3.1.1.2 - Alanina e ácido acético.....	101
5.3.2 - Análise de cafés torrados com defeitos - pretos, verdes e ardidos ...	102
5.4 – CONCLUSÕES.....	106

CAPÍTULO 6: CAFÉS PRODUZIDOS CONVENCIONAL E ORGANICAMENTE.....	107
6.1 – OBJETIVOS.....	108
6.2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	109
6.2.1 – Amostras.....	109
6.2.2 - Medidas experimentais.....	111
6.2.3 - Análise quimiométrica.....	112
6.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	113
6.3.1 – Análise dos dados de cafés de diferentes modos de produção obtidos por RMN.....	113
6.3.2 – Análise dos dados de cafés de diferentes modos de produção obtidos por ICP OES.....	121
6.4 – CONCLUSÕES.....	127
CAPÍTULO 7: CAFÉS APRESENTANDO DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES NA PROVA DE XÍCARA: MOLE, DURO E RIO.....	128
7.1 – OBJETIVOS.....	129
7.2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	130
7.2.1 – Amostras.....	130
7.2.2 - Medidas espectroscópicas.....	130
7.2.3 - Análise quimiométrica.....	132
7.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	133
7.3.1 – Análise dos dados obtidos por RMN de $^1\text{H}$ de líquidos para cafés crus.....	133
7.3.2 – Análise dos dados obtidos por RMN de $^1\text{H}$ de líquidos para cafés torrados.....	140
7.3.3 – Análise dos dados obtidos por RMN de $^1\text{H}$ HR-MAS para cafés crus.....	143
7.3.3.1 – Análise da composição de cafés crus por RMN de $^1\text{H}$ HR-MAS.....	151
7.4 – CONCLUSÕES.....	159
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	160
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	161
APÊNDICE A - Análises quali e quantitativa de cafés comerciais via ressonância magnética nuclear.	

# ***CAPÍTULO 1***

## **INTRODUÇÃO**

## **1 - INTRODUÇÃO**

### **1.1 – A importância do café na economia brasileira**

O café foi introduzido no Brasil em 1727, quando o Sargento-Mór do exército, Francisco de Melo Palheta, em uma visita a Guiana Francesa, retornou com algumas sementes do fruto do café. Porém, somente no início do século XIX, a cultura despertou interesse nos grandes proprietários e tornou-se rapidamente a principal atividade agrícola do país, sendo responsável por mais da metade das divisas oriundas das exportações brasileiras. Nas primeiras décadas do século XIX, o Brasil dominou o cenário mundial respondendo, em média, por 70% da produção de café. Ainda hoje ele é o maior produtor e responde por cerca de 30% da produção mundial (EPAMIG, 2006), sendo os principais estados produtores: Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Paraná e Bahia (CONAB, 2006).

O declínio da participação brasileira nesse mercado pode ser atribuído a uma falta de padrão de qualidade do produto nacional, não atendendo às exigências crescentes do mercado internacional. Por outro lado, alguns de nossos concorrentes, como a Colômbia, perceberam mais rapidamente a importância da qualidade do produto e introduziram modificações significativas no plantio, como a colheita seletiva, na qual somente os grãos maduros são colhidos, garantindo maior homogeneidade e qualidade (CARVALHO e CHALFOUN, 1985). Além disso, a Colômbia investe cerca de US\$ 30 milhões ao ano em *marketing* para promover o seu produto no mercado mundial, contra somente US\$ 2,45 milhões de investimentos do Brasil (SINDICAFESP, 2006).

Visando melhorar sua competitividade, o Brasil, desde a década de 80, vem implementando ações, como a criação de selos de qualidade e ampliação dos investimentos em propaganda, além de aumentar a oferta de cafés especiais, como o orgânico, o “gourmet”, o expresso, entre outros. Outro aspecto significativo é a introdução de novas técnicas de plantio e colheita, bem como incrementos consideráveis nas pesquisas da área (SINDICAFESP, 2006).

## 1.2 – Avaliação da qualidade do café

Os procedimentos tradicionais da avaliação comercial da qualidade do café não levam em consideração as diferenças em sua composição química. A avaliação da qualidade é feita através da prova de xícara e testes visuais, onde se avaliam o sabor e aroma da bebida, a coloração do produto final e a presença de impurezas e grãos de café defeituosos antes da torra (CHAGAS, 1994).

A qualidade do café depende de vários fatores, que iniciam desde os cuidados na pré-colheita, passando pelo armazenamento, que dependendo da umidade e temperatura propiciam infecções microbianas e fermentações indesejáveis, até o processamento dos grãos.

É conhecido que a qualidade do café se acha estreitamente relacionada aos diversos constituintes químicos dos grãos crus, que após torrados conferem sabor e aroma característicos à bebida, determinando os diversos tipos de cafés encontrados no comércio. Destes constituintes podemos citar os alcalóides, ácidos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, compostos fenólicos, e algumas enzimas cuja presença, teores e atividades conferem ao café um sabor e aroma peculiares, dentre outros (CARRERA *et al.*, 1998 e BELTON *et al.*, 1998). A tabela a seguir apresenta a porcentagem de algumas substâncias comumente encontradas no café cru.

TABELA 1.2.1 – Composição química do grão de café cru

<b>Classes e substâncias</b>	<b>% no café cru</b>
Carboidratos	
Açúcares redutores	1,0
Sacarose	7,0
Amido	10,0
Óleos	13,0
Proteínas	13,0
Ácidos	
Clorogênicos	7,0
Oxálico	0,2
Málico	0,3
Cítrico	0,3
Tartárico	0,4
Trigonelina	1,0
Cafeína	Arábica: 1,0 Robusta: 2,0

Fonte: CARVALHO *et al.* (1997)

Vários estudos têm sido realizados na tentativa de correlacionar a composição química do grão com a qualidade final do produto. Nesse trabalho, foram estudados alguns parâmetros envolvidos na qualidade dos cafés, como a espécie utilizada na preparação da bebida, a presença de grãos defeituosos e substituintes mais baratos, o efeito da temperatura e do tempo na composição de cafés torrados, a classificação sensorial da bebida e o modo de produção.

### 1.2.1 – Espécie de café

O cafeeiro é uma planta que pertence à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea* que contém cerca de 60 espécies (GRAF, 1982), dentre as quais são de maior importância comercial a espécie *C. arabica* L., conhecida popularmente como arábica e a *C. canephora* P., conhecida como robusta (MAZZAFERA *et al.*, 1999). O café arábica produz uma bebida de sabor e aroma mais requintados, enquanto o robusta com sabor menos apreciado, é usado em *blends*, ou seja, em misturas de cafés de diferentes espécies e na produção do café solúvel por possuir maior teor de

sólidos solúveis (CARRERA, 1998). As misturas são produzidas de acordo com as exigências de uma determinada região, podendo assim possuir maiores teores de arábica ou robusta, conforme a demanda do consumidor. As misturas que contêm maior teor da espécie arábica resultam em bebidas de sabor mais suave e agradável ao paladar, em contrapartida, as misturas com maior teor de robusta podem ser comercializadas a um custo inferior. Entretanto, a adição de robusta ao arábica pode ser feita com o propósito de obter maiores lucros em função do baixo custo do primeiro, tornando-se necessário o desenvolvimento de metodologias capazes de caracterizar a composição da mistura. Nesse sentido, vários estudos têm sido realizados com o propósito de determinar diferenças químicas para a discriminação entre as duas espécies.

Segundo SALDAÑA *et al.* (1997) e CARVALHO *et al.* (1997), as duas espécies apresentam teores de cafeína distintos, sendo que a *C. arabica* (arábica) contém em média 1% do alcalóide e a *C. canephora* (robusta) em torno de 2%. MARTÍN *et al.* (1998), verificaram que o teor de cafeína é um importante fator na discriminação dessas espécies de café.

Os diterpenos cafestol e kahweol, que têm sido relacionados com o aumento de colesterol no organismo humano, também podem ser usados para distinguir as espécies, sendo o primeiro presente em ambas, embora com maior teor no arábica, enquanto o kahweol ocorre no arábica, mas somente em traços no robusta (ROOS *et al.*, 1997). O maior teor de kahweol na fração lipídica extraída de cafés arábica permitiu RUBAYIZA e MEURENS (2005) discriminar cafés das duas espécies por análise de componentes principais.

Outros compostos que variam com a espécie são os ácidos clorogênicos, os quais têm chamado a atenção devido à sua atividade anticancerígena comprovada para alguns tipos de câncer (MATTILA e KUMPULAINEN, 2002), e a sua ação benéfica no combate a doenças cardiovasculares devido às suas propriedades antioxidantes (DEL CASTILLO *et al.*, 2002). Os ácidos clorogênicos, FIGURA 1.2.1.1, são formados principalmente pela esterificação do ácido quínico com os ácidos cafeico, ferúlico ou *p*-cumárico. A esterificação pode ainda ocorrer entre o ácido quínico e dois ácidos cafeicos, ou ainda, entre o ácido quínico com um ácido cafeico e um ferúlico. Os principais grupos de ácidos clorogênicos são os cafeoilquínicos, que contêm os ácidos cafeicos alternando-se nas posições 3, 4 e 5 do ácido quínico; os feruloilquínicos (3,

4, 5), e os dicafeoilquínicos cujos isômeros principais são 3, 4; 3, 5 e 4, 5. O teor total desses ácidos no café cru é de aproximadamente 6,0% para a espécie arábica e 9,5% para a robusta (MOREIRA *et al.*, 2000), muito embora se encontrem somente traços dos ácidos livres nos grãos de café cru (CLARKE e MACRAE, 1985).

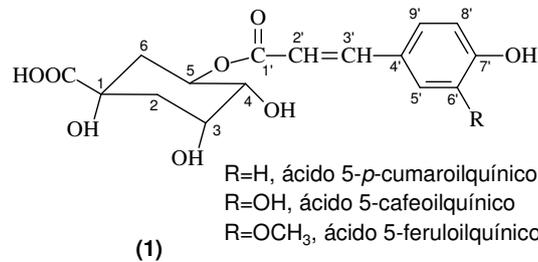


FIGURA 1.2.1.1 – Estrutura dos ácidos clorogênicos (1)

Segundo CAMPA *et al.* (2004), o conteúdo de trigonelina e sacarose, FIGURA 1.2.1.2, também variam dependendo da espécie, e podem apresentar teores de 0,95 - 1,29 e 7,99 - 11,0%, respectivamente, para a espécie arábica e de 0,52 - 1,06 e 5,94 - 6,47% para a espécie robusta. A importância do teor de trigonelina na discriminação entre as espécies, utilizando métodos quimiométricos, foi confirmada por CASAL *et al.* (2000). Outros compostos também têm tido sua importância demonstrada, por exemplo, o teor de lipídeos totais (MAZZAFERA *et al.*, 1999), esteróis (CARRERA *et al.*, 1998), ácidos graxos (MARTÍN *et al.*, 2001), teor de metais (MARTÍN *et al.*, 1998), dentre outros.

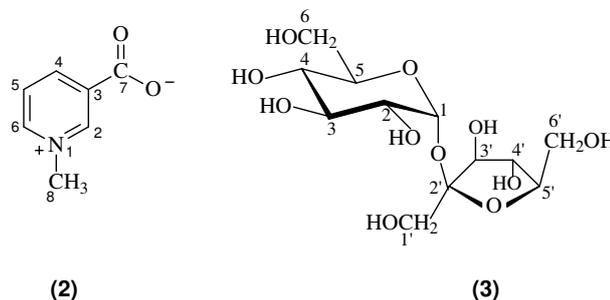


FIGURA 1.2.1.2 – Estrutura da trigonelina (2) e sacarose (3)

### 1.2.2 – Presença de grãos com defeitos do tipo verdes, ardidos e pretos

A melhor qualidade da bebida é propiciada por grãos que atingem um estágio de maturidade ideal, grãos cereja, no qual a casca, a polpa e a semente se encontram com composição química adequada a proporcionar ao fruto seu máximo de qualidade. Quando esse estágio não é atingido ou há a supermaturação dos frutos, são produzidos os grãos defeituosos, cujas características químicas e físicas são diferentes e exercem uma influência prejudicial para o aspecto e, principalmente, para o sabor da bebida de café.

Os conceitos e denominações para cafés defeituosos ainda não são bem consolidados. No Brasil, a terminologia defeito preto é usada para designar dois tipos de grãos, aqueles que caem naturalmente pela ação da chuva, elevado grau de maturação ou durante a colheita e permanecem em contato com o solo favorecendo fermentações microbianas, e aqueles grãos que são provenientes de um estágio anterior ao de maturação daqueles denominados de “café verde” (imaturos) (MAZZAFERA, 1999). A principal diferença entre eles é a presença de uma película prata brilhante e aderente na superfície dos grãos pretos imaturos. Esses são também conhecidos como “verdes-pretos”. Os grãos ardidos estão associados a uma fermentação intensa (FRANCA *et al.*, 2005) e são encontrados em maior frequência na fração seca no chão (CHAGAS, 1994).

Após o amadurecimento total dos frutos, inicia-se o período de senescência, onde ocorrem fermentações com produção de álcoois e ácidos indesejáveis. De acordo com FELDMAN *et al.* (1965), citado por CARVALHO *et al.* (1997), a fração ácida do café é constituída, basicamente, por ácidos não voláteis (oxálico, málico, cítrico e tartárico) e ácidos voláteis (acético, propiônico, valérico e butírico). Alguns desses ácidos dependendo de suas concentrações, conferem sabor e odor desagradável à bebida do café. A presença dos defeitos possivelmente acarreta um desequilíbrio quanto à existência e proporção desses ácidos, ocasionando redução na qualidade do café.

COELHO *et al.* (2002) verificaram alteração significativa nos valores de acidez titulável, após a inclusão de grãos com defeitos verde, ardido e preto no café cru estritamente mole. Houve um declínio nesses valores com a adição de grãos verdes, pois eles não possuem a composição química completa do grão maduro. Ocorreu aumento nos valores de acidez quando foram incluídos grãos ardidos e

pretos, provavelmente em decorrência de fermentações indesejáveis ocorridas nos frutos. O autor explica que os grãos pretos oriundos de fermentações mais intensas que os ardidos exibiram valores de acidez titulável menores, por causa da possibilidade de ocorrência de uma maior volatilização e/ou lixiviação de ácidos em virtude de degradações mais intensas que tenham ocorrido nas membranas. Os menores valores de acidez titulável apresentados pelos grãos verdes foi atribuída à ausência de mucilagem.

CHAGAS (1994) encontrou uma associação positiva entre a qualidade da bebida e o teor de açúcares em grãos de cafés brasileiros de três regiões. Os maiores valores foram encontrados em cafés do Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba onde as condições climáticas levaram a uma maturação mais gradual e uniforme, enquanto os cafés produzidos na Zona da Mata tiveram os menores teores de açúcares.

Com relação ao teor dos ácidos clorogênicos, MENEZES (1994) mostrou que a inclusão de grãos parcialmente maduros afeta negativamente o aroma da bebida de café devido à baixa quantidade do ácido monocafeoilquínico em relação aos dicafeoilquínicos, que conferem adstringência à bebida.

De acordo com MAZZAFERA (1999), o teor de cafeína não apresentou variação significativa entre cafés defeituosos e bons, e portanto não foi responsável por nenhuma mudança na qualidade da bebida associada com a maturidade da fruta.

Os grãos de café defeituosos representam em torno de 20% do total da produção do nosso café e são separados dos grãos saudáveis antes da comercialização no mercado internacional, sendo inteiramente destinados ao mercado interno (FRANCA *et al.* 2005). Entretanto, recentemente, pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais comprovaram a viabilidade de se converter o óleo do café (defeituoso ou não) em biodiesel. A novidade surgiu justamente no momento em que o governo começa a apostar na produção do diesel a partir de óleo vegetal para reduzir a dependência externa do país e incentivar o agronegócio brasileiro (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

### 1.2.3 – Adulteração de café com substituintes mais baratos

A detecção de impurezas e misturas no pó de café torrado e moído é uma preocupação constante no que diz respeito, principalmente, à certificação da qualidade do produto.

No Brasil, as impurezas ou misturas encontradas com maior frequência no café torrado e moído são: cascas do fruto, gravetos ou fragmentos do cafeeiro, milho, cevada, açúcar, café esgotado, entre outros. Um dos principais problemas encontrados na identificação desses materiais refere-se aos métodos analíticos empregados, que são subjetivos.

Para se detectar a adulteração com cevada, o processo convencionalmente utilizado consiste no tratamento com reagentes químicos e análise visual de uma pequena porção do pó com o auxílio da lupa (20x). A quantificação das impurezas é baseada na comparação do percentual do extrato aquoso da amostra que está sendo analisada com o extrato aquoso do café puro. Entretanto, esse método exige do analista que ele conheça bem o aspecto do café sob suas diferentes formas: café de baixa qualidade, cafés demasiadamente torrados ou pouco torrados, moagem em moinho tradicional ou de rolos etc.

Nesse trabalho, a detecção e quantificação de cevada adicionada em pós de café torrado são descritas utilizando-se métodos espectroscópicos, tais como, infravermelho e RMN. A técnica de espectroscopia na região do infravermelho representa uma opção atrativa na verificação da qualidade por ser rápida, de baixo custo e não destrutiva. O espectro na região do infravermelho contém absorções originadas de vibrações de ligações moleculares e a região de  $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  é, particularmente, muito sensível à composição química de uma amostra. Existem diversos estudos que confirmam a utilidade dessa técnica na análise da autenticação do café, como BRIANDET *et al.* (1996), KEMSLEY *et al.* (1995) e SUCHANEK *et al.* (1996), dentre outros. As vantagens da técnica de RMN serão descritas posteriormente.

### 1.2.4 – Efeito do grau de torra na composição química do café

O sabor e o aroma da bebida de café são influenciados por vários fatores que vão desde a colheita até o preparo da mesma. Mas o grande

responsável pelas características gustativas da bebida é o processo de torra dos grãos. A torrefação provoca mudanças físicas e químicas devido principalmente às reações pirolíticas que ocorrem nos compostos orgânicos do grão cru gerando produtos, tais como; ácidos voláteis, sulfetos e outros. É através da pirólise que ocorre o desenvolvimento do sabor do café, acontecendo simultaneamente degradações e sínteses de novos compostos (CARVALHO *et al.*, 1997). Mais de 800 compostos voláteis de várias classes já foram identificados no café torrado.

Além disso, o grau de torra tem impacto na concentração de vários compostos importantes, como por exemplo, o guaiacol e 2-furfuriltiol, cuja concentração aumenta com o grau de torra, enquanto que a 2,3-butanodiona e 2,3-pentanodiona apresentam um máximo de concentração para um grau de torra médio e exibem concentração mínima em cafés com alto grau de torra (SCHENKER *et al.*, 2002).

Além desses, outros compostos de grande interesse são os ácidos clorogênicos que degradam durante a torrefação produzindo compostos fenólicos de baixa massa molecular, tais como: 1,2,3-triidroxibenzeno (pirogalol), 1,2-diidroxibenzeno (catecol), 4-vinilbenzeno-1,2-diol (4-vinilcatecol), entre outros, que apresentam características sensoriais bem variadas, como odores de especiarias, cravo, fumo e, também, sensação de amargor e adstringência. Além da importância para a formação do sabor e aroma do café, os ácidos clorogênicos exercem atividade biológica. Segundo ROBINSON *et al* (1996) citado por TOCI *et al.* (2006) o ácido 3,5-dicafeoilquínico é um potente inibidor da integrase do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), uma enzima necessária para a infecção das células. O ácido 5-cafeoilquínico, o ácido cafeico e toda família destes ácidos mostraram-se potentes antioxidantes em eritrócitos humanos. Entretanto, esse efeito benéfico pode ser perdido após a torrefação. TRUGO e MACRAE (1984), determinaram uma perda de 60,9% e 59,7% desses ácidos para as espécies arábica e robusta respectivamente, após torrefação leve do café verde (205 °C – 7min).

Outra substância presente no café e que tem despertado interesse é a trigonelina, importante não pela sua presença em si, mas principalmente, pelos produtos da sua degradação que podem ser gerados no processo de torra. Além de gerar uma importante classe de compostos, os pirróis, que são de relevante importância para o aroma do café, também produz o ácido nicotínico, que permite a estimativa do grau de torra, estabelecendo-se a relação do seu teor com o teor de

trigonelina não degradada (CLARKE e MACRAE, 1985). O ácido nicotínico ou niacina é uma importante vitamina para o metabolismo humano, podendo ser encontrado em quantidades que chegam próximo a 20 mg para cada 100 g de café torrado, dependendo evidentemente, do grau de torra do café.

Os polissacarídeos e outros glicídios como a sacarose, são de grande importância para o sabor e aroma do café. A sacarose é o açúcar de baixo peso molecular mais abundante no café, sendo encontrado em torno de 7% no café cru. Além disso, seu teor é extremamente relevante para a formação de pigmentos e outros compostos de alto peso molecular, formados pela condensação e caramelização durante o processo de torra (TOCI *et al.*, 2006).

Durante a torrefação, as proteínas são desnaturadas e degradadas em moléculas menores. Algumas proteínas ou aminoácidos livres também podem reagir com carboidratos ou com compostos fenólicos e polimerizarem-se formando produtos caramelizados e de coloração escura, os quais contribuem para a qualidade do café torrado.

Sabe-se que os lipídeos atuam como protetores de substâncias aromáticas. Entretanto, com o processo de torrefação, eles sofrem degradação oxidativa, gerando componentes voláteis como aldeídos e álcoois alifáticos (metanol e etanol) e aromáticos, provocando, dessa forma, a perda do aroma (CARVALHO *et al.*, 1997).

Considerando-se a diversidade dos compostos gerados durante a torrefação do café cru tornam-se necessários estudos que se dediquem a um maior entendimento sobre os efeitos da temperatura e do tempo na composição do grão, visto que, uma torrefação inadequada pode levar à perda de aroma, depreciando a qualidade da bebida.

### **1.2.5 – Classificação sensorial da bebida**

A qualidade do café é comumente avaliada de acordo com critérios, tais como, o tamanho do grão, a forma, o aroma e a presença de defeitos. Dentre eles, o aroma, avaliado pela prova de xícara, é o mais importante critério empregado em todo o mercado mundial. No Brasil, os cafés são oficialmente classificados em seis categorias como indicado na TABELA 1.2.5.1 (CHAGAS, 1994).

TABELA 1.2.5.1 – Descrição das categorias de classificação oficialmente utilizadas na prova de xícara dos cafés

Aroma/sabor	Características
<b>Estritamente mole:</b>	bebida de sabor suavíssimo e adocicado
<b>Mole:</b>	bebida de sabor suave acentuado e adocicado
<b>Apenas mole:</b>	bebida de sabor suave, porém com leve adstringência
<b>Duro:</b>	bebida com sabor adstringente e gosto áspero
<b>Riada:</b>	bebida apresentando leve sabor de iodofórmio ou ácido fênico
<b>Rio:</b>	bebida com sabor forte e desagradável lembrando iodofórmio ou ácido fênico

Segundo CHAGAS (1994), a prova de xícara surgiu no Brasil no século XX e foi adotada pela Bolsa Oficial do Café e Mercadorias de Santos, a partir de 1917, pouco depois de sua instalação em 1914. Tal procedimento de avaliação comercial da qualidade do café não leva em consideração as diferenças em suas constituições químicas. Os inúmeros constituintes químicos, voláteis ou não, presentes no café são responsáveis por lhe conferir sabor e aroma característicos, sendo que estes constituintes variam tanto qualitativamente como quantitativamente quando comparamos cafés de diferentes qualidades (CARRERA *et al.*, 1998).

Existem diversos trabalhos que relatam a preocupação por parte dos pesquisadores em auxiliar o atual método de avaliação, reduzindo sua subjetividade, e fornecendo métodos analíticos baseados na constituição química dos cafés. Dentre esses trabalhos, um grande número refere-se à enzima polifenoloxidase (OLIVEIRA *et al.*, 1997; CHAGAS, 1994). Segundo CARVALHO *et al.* (1994), a determinação da atividade da polifenoloxidase permite avaliar, de modo objetivo, a qualidade do café. Nesse trabalho, os autores elaboraram uma tabela de classificação complementar à prova de xícara, na qual o café classificado como estritamente mole apresenta atividade da polifenoloxidase superior a 67,66 U/min/g de amostra; mole e apenas mole apresentam atividade de 62,99 a 67,66 U/min/g de amostra; duro, atividade de 55,99 a 62,99 U/min/g de amostra e riada e rio apresentam atividade inferior a 55,99 U/min/g de amostra. Segundo MAZZAFERA e ROBINSON (2000) os compostos fenólicos, principalmente os ácidos clorogênico e cafeico, exercem uma ação protetora, antioxidante dos aldeídos. Quando há qualquer condição adversa aos grãos, ou seja, colheita inadequada, problemas no processamento e armazenamento, as polifenoloxidases agem sobre os polifenóis diminuindo sua ação antioxidante sobre os aldeídos, facilitando a oxidação destes,

ao mesmo tempo que produz quinonas, as quais agem como substrato inibidor da ação da polifenoloxidase. Dessa forma, os cafés de pior qualidade, os quais tiveram seu sabor afetado por condições adversas apresentam baixa atividade dessa enzima.

### **1.2.6 – Modo de cultivo: orgânico e convencional**

O termo “alimento organicamente produzido” é atribuído ao alimento que foi cultivado de acordo com os princípios e práticas da agricultura orgânica. Dentre os princípios da agricultura orgânica pode-se destacar o melhor aproveitamento dos recursos naturais renováveis, conservação dos recursos não renováveis, além da não utilização de fertilizantes de alta solubilidade, agrotóxicos, antibióticos, hormônios, aditivos artificiais, organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes. Uma agricultura orgânica é definida como sistema de manejo sustentável da unidade de produção, com enfoque na preservação ambiental, agrobiodiversidade, ciclos biológicos e qualidade de vida do homem.

A produção do café orgânico vem se constituindo uma tendência do agronegócio brasileiro. Atualmente, a maior parte da produção do café orgânico se destina ao mercado internacional, principalmente Japão, Estados Unidos e Europa, onde se consegue preços de 15 a 50% superiores ao convencional. Esse processo de produção tem atraído grande interesse e vem apresentando uma taxa de crescimento superior à média dos cafés convencionais. Isso ocorre pelo fato de estar baseado em práticas ecologicamente sustentáveis, e por estar relacionado com a produção de alimentos mais saudáveis (WOESE *et al.*, 1997).

Com relação à qualidade, diversos alimentos orgânicos têm sido analisados caso a caso, sendo verificado tanto atributos negativos quanto positivos. No tomate orgânico, os degustadores encontraram uma melhor qualidade sensorial quando comparada ao convencional, por outro lado, no trigo orgânico houve uma diminuição no teor de proteínas provocando conseqüências indesejáveis no crescimento do pão (BOURN e PRESCOTT, 2002).

Existem vários estudos que visam diferenciar os alimentos produzidos convencionalmente dos produzidos organicamente. Entretanto, mesmo encontrando diferenças entre os modos de produção, os resultados não são conclusivos e não podem ser generalizados, pois em muitos não existe nenhum detalhe sobre a

variedade da planta ou grau de maturidade do alimento em questão, variáveis que podem influenciar mais na concentração dos constituintes químicos que o próprio modo de cultivo (MAGKOS *et al.*, 2006).

Em recente trabalho, analisando cafés crus (*Coffea arabica*) produzidos em Minas Gerais, FERNANDES *et al.* (2002) discriminaram cafés produzidos organicamente dos convencionalmente. Nesse trabalho, os autores mediram o teor de diversos elementos e encontraram como marcadores para a discriminação o teor de Br, Ca, Cs, Mn e Rb. Por outro lado, até o presente momento não se tem conhecimento, na literatura, de nenhum trabalho em que os compostos orgânicos foram utilizados para discriminar cafés dos dois modos de produção.

### 1.3 – Ressonância magnética nuclear

A RMN é uma das mais poderosas ferramentas espectroscópicas para investigação de propriedades químicas e físicas em misturas complexas, podendo ser aplicada tanto na elucidação estrutural de compostos orgânicos como na quantificação desses compostos.

Várias técnicas analíticas têm sido utilizadas com sucesso na investigação dos constituintes químicos do café, tais como: cromatografia líquida de alta eficiência (ANDRADE *et al.*, 1998 e DEL CASTILLO *et al.*, 1999) espectroscopia nas regiões do infravermelho (BOUHSAIN *et al.*, 1999 e BRIANDET *et al.*, 1996) e infravermelho próximo (DOWNEY e BOUSSION, 1996 e ESTEBAN-DÍEZ *et al.*, 2004), cromatografia gasosa (BICCHI *et al.*, 1997 e CARRERA *et al.*, 1998), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (DE MARIA *et al.*, 1998 e MAEZTU *et al.*, 2001) e a ressonância magnética nuclear (BOSCO *et al.*, 1999 e CHARLTON *et al.*, 2002). Entretanto, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear comparada às outras técnicas, apresenta a vantagem de ser um método de análise simples, rápido e não degradativo, além de fornecer em um único espectro um grande número de informações.

A maioria dos trabalhos envolvendo a RMN no estudo de cafés tem utilizado essa técnica para identificação de substâncias isoladas ou que constituem um pequeno grupo de substâncias numa fração extraída do café. Nesse sentido, D'AGOSTINA *et al.* (2004), investigaram os compostos poliméricos da fração espumante de cafés expressos recém preparados e caracterizaram o material

protéico e os polissacarídeos que mostraram ser derivados dos açúcares manose, glucose e galactose. STADLER *et al.* (2002a e 2002b) determinaram e quantificaram os produtos de degradação térmica da trigonelina em sistemas modelos. NAVARINI *et al.* (1999), analisaram a fração aquosa de cafés torrados e identificaram os polissacarídeos presentes, enquanto, WECKERLE *et al.*, 2002, identificaram os dissacarídeos isolados de cafés verdes.

No entanto, a aplicação dessa técnica não requer nenhum procedimento específico para extração e purificação das substâncias para posterior análise, sendo o principal atrativo e um dos motivos pelos quais tem sido utilizada cada vez mais na análise de alimentos, tais como, na determinação da origem geográfica e autenticidade de diversos tipos de alimentos como: suco de laranja (VOGELS *et al.*, 1996 e PUPIN *et al.*, 1998), óleo de oliva (VLAHOV, 1999 e MANNINA *et al.*, 2003.), cerveja (DUARTE *et al.*, 2002), óleo de mostarda (REMAUD *et al.*, 1997), queijo (BRESCIA *et al.*, 2005), carne (BROWN *et al.*, 2000) dentre outros.

A RMN tem tido grandes avanços nos últimos anos podendo destacar a técnica de HR-MAS ou *High Resolution Magic Angle Spinning* (Giro no Ângulo Mágico com Alta Resolução no espectro) que é empregada no estudo de amostras heterogêneas ou “semi-sólidas”.

Uma amostra é considerada heterogênea ou “semi-sólida” quando apresenta certo grau de mobilidade, como por exemplo, tecidos vegetal ou animal. Quando tais amostras são analisadas via a RMN tradicional, utilizando-se as sondas convencionais para amostras líquidas, a resolução espectral é limitada por fatores relacionados ao movimento molecular restrito como: o acoplamento dipolar, o deslocamento químico anisotrópico e as diferenças na susceptibilidade magnética da amostra. Todos esses fatores contribuem para o aumento da largura de linha, dificultando a análise espectral. Em amostras líquidas, tais efeitos são desprezíveis devido à rápida movimentação molecular (CLARIDGE, 1999).

O acoplamento dipolar é a interação entre spins nucleares através do espaço, sem o intermédio de nenhum outro átomo ou elétron e depende da posição relativa entre dois núcleos. Em uma determinada posição, o campo magnético gerado pelo spin de um núcleo pode aumentar ou diminuir a intensidade do campo magnético aplicado ( $B_{loc}$ ) num outro núcleo vizinho. Este campo magnético no qual os spins ficam sujeitos implica na obtenção de uma extensa banda de frequências

para um único núcleo. O efeito do acoplamento dipolar depende do movimento rotacional das moléculas que estão interagindo e também do tempo do campo flutuante ao qual estão sujeitos. Dessa forma, amostras que apresentam movimento molecular livre, como líquidos não viscosos, têm tais efeitos anulados devido ao rápido movimento molecular (CLARIDGE,1999).

As amostras com mobilidade restrita apresentam deslocamentos químicos diferenciados para núcleos correspondentes, que são os deslocamentos químicos anisotrópicos, produzidos pelas diversas orientações das moléculas em relação ao campo magnético principal ( $B_0$ ) do equipamento. O efeito disso é o alargamento dos sinais devido aos vários deslocamentos produzidos por um mesmo núcleo. Em solução, o movimento randômico da molécula faz com que apenas uma única frequência média, a frequência isotrópica, seja observada para cada local distinto quimicamente (CLARIDGE,1999).

As diferenças na susceptibilidade magnética ocorrem devido à heterogeneidade física das amostras sólidas. Assim, dependendo da posição em que se encontram na amostra, núcleos quimicamente idênticos podem apresentar diversas frequências de ressonância, o que implica num grande alargamento de linha dos sinais.

A diferença entre os campos magnéticos locais,  $B_{loc}$ , experimentada por spins nucleares equivalentes é responsável pela contribuição do acoplamento dipolar e do deslocamento químico anisotrópico para o alargamento dos sinais. Os campos magnéticos locais estão relacionados ao momento magnético dos spins segundo a equação (1):

$$B_{loc} = \pm \mu_S r_{IS}^{-3} (3 \cos^2 \Theta - 1) \quad (1)$$

Onde:  $B_{loc}$  corresponde ao campo magnético local experimentado por um núcleo  $I$  e gerado por um núcleo  $S$ ,  $\mu_S$  ao momento magnético do núcleo  $S$ ,  $r_{SI}$  à distância internuclear,  $\Theta$  ao ângulo entre o vetor internuclear e o campo  $B_0$  e  $\pm$  à orientação dos spins em relação ao campo aplicado. Quando o ângulo  $\Theta$  é igual a  $54,74^\circ$ , o termo  $3 \cos^2 \Theta - 1$  torna-se zero, e o momento magnético é teoricamente anulado reduzindo-se assim os efeitos relacionados ao campo magnético local ( $B_{loc}$ ).

Dessa forma, com a utilização da técnica HR-MAS ocorre a redução da largura de linha e o aumento significativo da qualidade do espectro produzido pelo giro rápido da amostra no ângulo de  $54,74^\circ$  (ângulo mágico). O giro da amostra a uma velocidade de aproximadamente 5 KHz, para um equipamento de 9,4T, e no ângulo mágico (FIGURA 1.3.1) diminui significativamente os efeitos do acoplamento dipolar e do deslocamento químico anisotrópico, assim como a diferença das susceptibilidades magnéticas oriundas da heterogeneidade da amostra (SANDERS e HUNTER, 1987) obtendo, assim, espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com resolução semelhante à encontrada para líquidos.

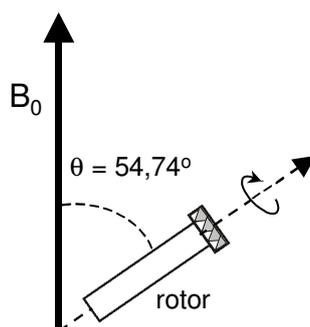


FIGURA 1.3.1: Esquema ilustrativo do giro do rotor no ângulo mágico.

Por permitir que espectros de amostras heterogêneas tenham resolução semelhante à de líquidos e também por não requerer nenhum pré-tratamento das amostras, o que consome tempo e reagentes, essa técnica tem sido cada vez mais aplicada na análise de alimentos.

Em 2000, GIL *et al.*, com o objetivo de acompanhar as mudanças na composição da manga durante o seu amadurecimento, aplicaram a técnica HR-MAS em conjunto com a análise de líquidos e tiveram ótimos resultados, os quais permitiram identificar diversos constituintes como ácidos, aminoácidos e outros compostos minoritários, além de determinar as principais diferenças devido ao amadurecimento da fruta.

Em 2003, BRESCIA *et al.* aplicaram essa técnica em amostras de farinha de trigo e pão, e identificaram um grande número dos componentes presentes nas amostras. Em trabalho anterior, SACCO *et al.* (1998), também analisando farinha de trigo, de diferentes regiões do sul da Itália, além de obter informações sobre os constituintes químicos das amostras, verificaram tendências de discriminação quanto à origem geográfica das mesmas.

A técnica HR-MAS também se mostrou uma ferramenta poderosa no controle de qualidade de queijos fornecendo informações sobre a caracterização organoléptica, origem e idade das amostras (SHINTU *et al.*, 2004).

Entretanto, o poder e a eficiência das análises por RMN em geral podem ser intensificados pela aplicação dos métodos de análise multivariada, ou seja, métodos quimiométricos. Devido à riqueza de informações freqüentemente gerada nos espectros de RMN, torna-se necessário a aplicação conjunta de métodos que possam reduzir a complexidade dos dados e ao mesmo tempo evidenciar as informações mais importantes.

#### **1.4. – Métodos quimiométricos**

A quimiometria é uma área da química que emprega métodos matemáticos para extrair o máximo de informação dos dados, apresentando-a de forma mais simplificada. Dentre os métodos quimiométricos mais utilizados em conjunto com a RMN estão os métodos de análise por reconhecimento de padrões não supervisionados, supervisionados e de calibração multivariada.

##### **1.4.1 - Métodos não supervisionados:**

O objetivo desses métodos é verificar se existe agrupamento em um conjunto de dados sem utilizar, nos cálculos, informação a respeito das classes. O sistema é examinado para revelar algum agrupamento natural das amostras definido pelas medidas experimentais (BEEBE, 1998). Dentre esses métodos destacam-se a análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamentos hierárquicos (HCA).

##### *Análise de componentes principais:*

A análise de componentes principais (PCA) é uma técnica que reduz a dimensionalidade de um conjunto de dados complexo apontando as informações importantes em poucas variáveis derivadas do conjunto de dados originais. Além disso, estabelece a viabilidade do conjunto de dados com respeito à construção de modelos de classificação e calibração.

Na análise por PCA, a matriz original passa a ser representada por novas variáveis que são chamadas de componentes principais, fatores ou variáveis latentes. A primeira componente principal é situada na direção da maior variação dos dados, a segunda é ortogonal à primeira e numa direção que descreva a segunda maior variação nos dados, e assim por diante. Dessa forma, as informações mais relevantes ficam concentradas nas primeiras componentes e as de menor importância, nas últimas. Isso implica numa das principais vantagens desse método que é a eliminação de grande parte dos ruídos experimentais, pois tais ruídos constituem uma população de erros aleatórios e não são correlacionados com as informações contidas na matriz de dados (ALAN e ALAN, 2005).

Na análise por PCA, a interpretação dos resultados é facilitada por gráficos bidimensionais ou tridimensionais. Os gráficos de *scores* representam as amostras projetadas no novo sistema de eixos das componentes principais, sendo possível verificar o agrupamento daquelas que são semelhantes entre si, e a discriminação em classes daquelas diferentes. Os gráficos de *loadings* indicam quais variáveis do conjunto original contribuem para a discriminação observada nos gráficos de *scores*, evidenciando as diferenças na composição química das amostras.

#### *Análise de agrupamentos hierárquicos:*

O objetivo deste método é agrupar os objetos com atributos semelhantes. Para isso, as distâncias entre todas as amostras são calculadas num conjunto de dados onde os parâmetros são as coordenadas num espaço multidimensional de  $n$  variáveis. Estas distâncias possibilitam verificar como estão distribuídas espacialmente as amostras, ou seja, se estão próximas umas das outras e se formam grupos.

A equação (2) apresenta a fórmula para o cálculo da distância  $r_{ab}$  entre duas amostras  $a$  e  $b$ :

$$r_{ab} = \left[ \sum_{i=1}^{n_{\text{var}}} (x_a(i) - x_b(i))^2 \right]^{1/2} \quad (2)$$

Onde,  $x_a(i)$  e  $x_b(i)$  são as  $i$ -ésimas coordenadas das amostras  $a$  e  $b$ , respectivamente. Essas distâncias calculadas podem ser comparadas diretamente

ou podem ser normalizadas para criar uma matriz de similaridade,  $S_{ab}$ , entre dois pontos  $a$  e  $b$ , usando a equação 3:

$$S_{ab} = 1 - \left( \frac{r_{ab}}{r_{\max}} \right) \quad (3)$$

Onde  $r_{ab}$  é a distância entre o par de amostras selecionado e  $r_{\max}$  a distância máxima encontrada entre os pontos no conjunto de dados. Os dois pontos mais distantes no conjunto de dados (mais dissimilar) tem  $S = 0,0$ , enquanto os dois pontos idênticos tem  $S = 1,0$ .

Na análise por HCA, os resultados são apresentados na forma de dendrogramas. Na construção desses gráficos, inicialmente cada amostra é assumida ser um grupo. Os grupos com maior similaridade, menor distância, são ligados em um novo grupo. A matriz de similaridade é recalculada, e o processo é repetido até permanecer somente um grupo. Os grupos podem ser ligados utilizando-se diferentes métodos como o método de conexão simples, que liga os grupos baseando-se na distância ao vizinho mais próximo; conexão completa, que se baseia na distância ao vizinho mais distante e conexão incremental, que utiliza a média ponderada no cálculo da distância, considerando-se o número de amostras no grupo. Os dendrogramas resultantes permitem que diferentes ligações sejam visualizadas, onde o comprimento dos ramos é proporcional à distância entre os grupos ligados (Pirouette, 1990 - 2003).

#### 1.4.2 - Métodos supervisionados:

Os métodos supervisionados são usados quando o objetivo é construir um modelo para classificar amostras desconhecidas. Esses métodos requerem o uso de amostras com características conhecidas para “treinar” o computador.

Os métodos de classificação mais comuns são o *Soft Independent Modeling of Class Analogy* (SIMCA) e o *K- Nearest Neighbor* (KNN).

### *Soft independent modeling of class analogy:*

O SIMCA é um método de classificação supervisionado baseado na análise de componentes principais. Para cada classe conhecida de amostras, um modelo de PCA é criado. Em torno de cada classe são geradas hipercaixas, em que os limites são definidos para o nível de confiança desejado, que geralmente é 95%. A atribuição de amostras desconhecidas a uma determinada classe é baseada na projeção da mesma, no espaço dos *scores* e sua distância das fronteiras da classe em questão. Isto é feito para todas as classes e, se os modelos não tiverem poder de discriminação suficiente, a amostra pode ser membro de mais de uma classe, ou ainda, quando a amostra é anômala em relação ao conjunto de treinamento, ela não será atribuída a nenhuma das classes (BEEBE *et al.*, 1998).

O poder de discriminação do modelo SIMCA pode ser verificado pela distância entre as classes. Quanto maior a distância entre duas classes mais separadas elas estarão, e portanto menores as chances de atribuições errôneas.

### *K-nearest neighbors*

O KNN é um método de classificação que determina a classe de uma amostra desconhecida com base na distância entre ela e seus vizinhos mais próximos, cujas classes são conhecidas. A distância entre ela e o conjunto das amostras com classe conhecida é calculada, e por comparação, os k-vizinhos mais próximos dessa amostra são usados para fazer a classificação, onde cada um dá um voto para sua classe. No final, a amostra é atribuída à classe que obtiver mais votos. Em caso de empate, a classe com menor distância acumulada fica com a amostra.

A principal diferença entre esse método e o SIMCA consiste no fato de que ele obrigatoriamente classifica a amostra como pertencente a uma das classes existentes no conjunto.

### **1.2.3 - Métodos de calibração**

Nos métodos de calibração, o teor de um ou mais constituintes numa mistura pode ser determinado fazendo-se uma única medida espectroscópica (PEDRO, 2005). Esses métodos apresentam a vantagem de permitir o estudo com

várias espécies presentes ao mesmo tempo, não importando a existência ou ausência de diferenças marcantes entre elas, nem a existência de alta correlação nos dados. Dois métodos de calibração comumente usados são o *Partial Least Squares* (PLS) e o *Principal Components Regression* (PCR) que variam basicamente na forma de decompor a matriz de dados.

Os métodos de calibração visam encontrar um algoritmo matemático que relacionam as respostas de um instrumento com as propriedades de interesse. Uma vez encontrado, a concentração de um componente químico de interesse poderá ser prevista, usando a resposta instrumental das amostras.

O processo geral de calibração consiste de duas etapas: a modelagem, que estabelece uma relação matemática entre as variáveis independentes (X) e a propriedade de interesse (Y) e a validação, que otimiza a relação buscando uma melhor descrição dos analitos de interesse. Uma vez concluída a calibração, o modelo construído a partir dos dados originais está apto a ser aplicado para a previsão em amostras desconhecidas.

#### *Principal components regression:*

A decomposição da matriz de dados X é feita usando etapas semelhantes ao PCA seguida por uma etapa de regressão, onde os resultados são relacionados com as variáveis dependentes (Y).

#### *Partial least square:*

No método PCR, os *scores* e *loadings* são calculados usando estritamente a informação espectral, o que pode resultar numa fragilidade do método. Quando o analito de interesse apresenta um sinal muito fraco, e portanto não influencia fortemente as primeiras componentes principais, isso pode levar à necessidade de incluir um maior número delas na construção do modelo. No método PLS, esse problema é contornado, pois a informação sobre a concentração é incluída durante o cálculo dos *scores* e *loadings* (FERREIRA *et al.*, 1999). Durante a decomposição da matriz de dados, as informações extraídas das variáveis independentes são passadas ao vetor y e vice-versa (BRERETON, 2002).

Recentemente a técnica de RMN, como ferramenta analítica, e a quimiometria como instrumento estatístico de análise multivariada de dados, têm sido aplicadas com grande sucesso no controle de qualidade, na determinação da origem geográfica e autenticidade de diversos tipos de alimentos.

DUARTE *et al.* (2002) aplicaram a análise por PCA em espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de cervejas, e discriminaram quatro grupos de acordo com as diferenças em suas composições, mostrando o potencial do método em fornecer informação rápida sobre os fatores que afetam a produção das mesmas.

BELTON *et al.* (1998) aplicaram a análise quimiométrica em espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de sucos de maçãs, e mostraram ser possível identificar a variedade da maçã utilizada no preparo do suco e ainda determinar os principais responsáveis por essa discriminação.

OGRINC *et al.* (2001) aplicaram métodos quimiométricos aos dados de RMN e de espectroscopia de massas (não diretamente aos espectros, mas às razões isotópicas de D/H,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  e  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ) e mostraram ser possível a detecção de fraudes no vinho, como a adição de açúcar para acelerar o processo de fermentação ou a adição de água.

Em relação ao café, DANHO *et al.* (1992) aplicaram a análise multivariada de dados nas razões isotópicas de  $^2\text{H}/^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  de cafeína extraída do café e sintetizada e obtiveram grande sucesso na discriminação quanto à sua origem, permitindo avaliar se a cafeína originou-se de um café americano, africano ou ainda, se foi sintetizada.

Nesse trabalho, os métodos quimiométricos são aplicados diretamente em dados espectroscópicos, especialmente de RMN, para avaliar diversos parâmetros relacionados à qualidade do café.

## ***CAPÍTULO 2***

**MISTURAS DE CAFÉS DAS ESPÉCIES. *Coffea arabica* L. e  
*Coffea canephora* P.**

## **2.1 - OBJETIVOS**

Fazer uma análise exploratória dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  em misturas de café das espécies arábica e robusta, bem como construir modelos de classificação e calibração capazes de distinguir amostras de diferentes composições e determinar o teor de cada espécie em amostras desconhecidas.

## 2.2 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1 - Amostras

Foram estudadas misturas de duas amostras de café cedidas pela EMBRAPA Instrumentação de São Carlos, uma da espécie arábica e outra da robusta. As amostras foram analisadas tanto na forma de café cru como torrado. Para isso, o café arábica foi torrado à temperatura de 215°C por 17,5 min e o robusta a 225°C durante 24 min. As amostras de café cru e torrado foram moídas em moinho de facas e analisadas separadamente. Para os grãos crus foi utilizado nitrogênio líquido para auxiliar o processo de moagem.

As amostras das duas espécies foram misturadas nas proporções indicadas na TABELA 2.2.1.1.

TABELA 2.2.1.1 - Amostras de misturas de cafés contendo diferentes percentagens das espécies arábica e robusta e analisadas em equipamentos de RMN de diferentes campos magnéticos.

<b>Café cru (9,4T)</b>	<b>Café cru (4,7T)</b>	<b>Café torrado (9,4T)</b>	<b>% Arábica</b>	<b>% Robusta</b>
A0R10	A00cd	A0	0	100
A1R9	A10cd	A1	10	90
A2R8	A20cd	A2	20	80
A25	---	---	25	75
A3R7	A30cd	A3	30	70
A35	---	---	35	65
A4R6	A40cd	A4	40	60
A5R5	A50cd	A5	50	50
A6R4	A60cd	A6	60	40
A65	---	---	65	35
A7R3	A70cd	A7	70	30
A75	---	---	75	25
A8R2	A80cd	A8	80	20
A9R1	A90cd	A9	90	10
A10R0	A100cd	A10	100	0
AX	---	---	desconhecida	desconhecida
AY	---	---	desconhecida	desconhecida

As amostras foram preparadas em uma cafeteira própria para café expresso (Marca *Oster*) passando-se 60,0 mL de água sob pressão através de 10,00 g de pó da mistura homogeneizada.

### 2.2.2 - Medidas espectroscópicas

As medidas espectroscópicas foram obtidas em triplicata, sendo que para a obtenção de cada espectro foram adicionadas três gotas da solução do sal trimetilsililpropionato de sódio (TMSP-2,2,3,3-d<sub>4</sub>) em D<sub>2</sub>O, em 0,6 mL da solução de café. O TMSP foi utilizado como referência interna para o deslocamento químico dos sinais de ressonância nos espectros, sendo a ele atribuído o valor de 0,0 ppm. Com exceção das medidas realizadas no estudo comparativo do campo magnético, todos os espectros foram obtidos em um equipamento de 9,4 Tesla (400,13 MHz para a frequência do hidrogênio), marca Bruker e modelo DRX400, usando uma sonda BBI de 5 mm a 298 K. A seqüência de pulsos utilizada na aquisição dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H com supressão do sinal do solvente foi a zgcprr. Os espectros foram adquiridos com 64 FIDs (NS), largura de pulso de 8,5µs (P1), janela espectral de 8117 Hz (SWH), tempo de aquisição de 4,0 s (AQ), tempo de espera entre cada aquisição de 2 s (D1), 65536 pontos digitalizados, fator de ganho do receptor de 64 (RG) e atenuação da potência para supressão do sinal da água de 55 dB (PL9).

Para os cafés torrados, os espectros de <sup>1</sup>H foram adquiridos com fator de ganho do receptor de 128, mantendo-se os demais parâmetros utilizados para as amostras cruas.

As medidas executadas no estudo comparativo entre campos magnéticos foram realizadas em um equipamento de 4,7 Tesla (200,13 MHz para a frequência do hidrogênio), marca Bruker e modelo ARX200, usando uma sonda BBI de 5 mm a 298 K. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H foram adquiridos utilizando a mesma seqüência de pulsos e os seguintes parâmetros: NS: 64, P1: 5,12 µs, SWH: 4065 Hz, AQ: 8,1 s, D1:1,8 s, RG: 180 e PL9: 55 dB.

Após a aquisição dos espectros fez-se o processamento dos mesmos utilizando o software XWINNMR versão 3.1, executando em uma estação de trabalho Silicon Graphics Indigo. Aos FIDs foram aplicados transformada de *Fourier* utilizando 32768 pontos e fator de alargamento de 0,3 Hz (LB). Em seguida, a fase e a linha de base foram ajustadas para cada espectro o mais uniforme possível. Os

espectros resultantes foram salvos como arquivos ASCII e transferidos para um PC para análise dos dados.

### 2.2.3 - Análise quimiométrica

A matriz de dados foi construída utilizando o software Origin versão 5,0. Os métodos quimiométricos (PCA, KNN, SIMCA, PLS e PCR) foram aplicados à matriz de dados utilizando-se o software Pirouette® versão 2.02.

As variáveis e os parâmetros que resultaram em uma melhor discriminação entre as amostras foram selecionados a partir da análise de componentes principais, sendo então, usados na aplicação dos demais métodos.

Na aplicação dos métodos de classificação e calibração, as amostras foram divididas em conjuntos, definindo aquelas utilizadas na construção dos modelos, na validação externa e na previsão de amostras desconhecidas.

Na construção dos modelos, foram utilizadas as amostras que variam a sua composição em porcentagem de dez em dez em relação ao teor das espécies arábica e robusta (TABELA 2.2.1.1), exceto aquelas contendo 20 e 80%, que foram utilizadas para a validação externa de todos os modelos de classificação e calibração. No estudo dos cafés crus utilizando o equipamento de 9,4T, foram usadas também, para a validação externa, as amostras A25, A35, A65 e A75, e para a previsão das propriedades em amostras desconhecidas, AX e AY.

## **2.3. – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.3.1 - Estudo das misturas de cafés crus das espécies arábica e robusta utilizando-se espectros de RMN de $^1\text{H}$ obtidos em um equipamento de 9,4T**

O café arábica produz uma bebida de sabor e aroma mais apreciados, sendo o seu custo cerca de 2 a 3 vezes maior que o robusta (RUBAYIZA e MEURENS, 2005). Por essa razão, existem vários estudos que visam propor metodologias capazes de discriminá-las (CASAL *et al.*, 2000, MARTIN *et al.*, 1998, ANDRADE, *et al.*, 1998). Com o objetivo de assegurar a autenticidade da espécie comercializada e propor uma metodologia para a discriminação entre elas, amostras dessas duas espécies foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$  e os espectros foram tratados por métodos quimiométricos.

Os espectros individuais dos cafés das espécies arábica (A) e robusta (D) e de duas misturas (B e C) com diferentes proporções dessas são apresentados na FIGURA 2.3.1.1, que mostram diferenças principalmente nos teores de cafeína e ácidos clorogênicos. Outras diferenças menos expressivas entre essas duas espécies são observadas na região de 2,0 - 3,0 ppm que provavelmente se referem a compostos lipídicos como ésteres de ácidos graxos.

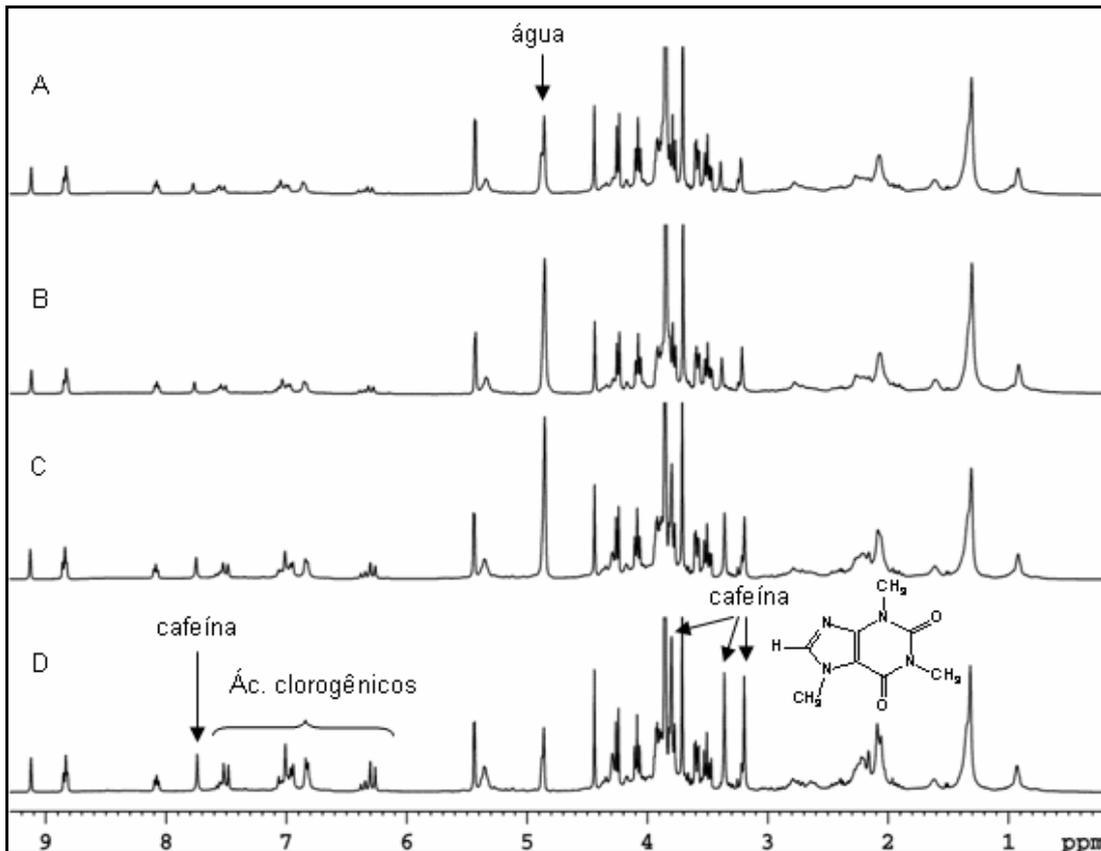


FIGURA 2.3.1.1 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de café cru das espécies arábica (A), 70% arábica + 30% robusta (B), 30% arábica + 70% robusta (C) e robusta (D), obtidos em um equipamento de 9,4T

O café cru apresenta em sua composição muitos dos constituintes presentes no café torrado como a trigonelina, cafeína, ácidos clorogênicos e outros. Uma completa atribuição dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dessas substâncias podem ser encontrados em TAVARES e FERREIRA (2006), apêndice A, e TAVARES (2002).

Antes de executar a análise quimiométrica foi feita uma análise visual dos dados, com o objetivo de verificar as diferenças entre os espectros. Quando se trabalha com dados de RMN é importante fazer essa análise, pois, é necessário verificar se as diferenças espectrais são originadas realmente das diferenças entre as composições das amostras ou se são relacionadas com problemas nas medidas espectroscópicas tais como, *shimming*, eficiência da pré-saturação do sinal de  $\text{H}_2\text{O}/\text{HDO}$ , correções de fase e linha de base etc. É preciso tomar cuidado para que variações nesses parâmetros não levem a erros nas análises, pois quando existem diferenças entre os espectros, sejam elas devido às diferenças nas composições das amostras ou outros fatores, a análise quimiométrica fará distinção entre elas,

classificando-as em grupos diferentes. Entretanto, no conjunto de dados em questão nenhuma amostra apresentou problemas visíveis.

A análise por componentes principais foi feita para reduzir a complexidade dos dados, verificar o agrupamento natural das amostras e otimizar os parâmetros matemáticos a serem utilizados na matriz durante a aplicação dos métodos de classificação e calibração.

Uma forma de otimizar as análises quimiométricas é sem dúvida a seleção das variáveis mais importantes para a discriminação entre os grupos ou classes de amostras (AIRIAU *et al.*, 2001, PEDRO e FERREIRA, 2005). Inicialmente, a análise foi feita em toda a região espectral, exceto na região dos sinais dos hidrogênios da referência TMSP, e da água (H<sub>2</sub>O/HDO). Essa primeira análise apresentou uma discriminação razoável entre as amostras contendo diferentes proporções de cafés das espécies arábica e robusta. Entretanto, o uso de todo o espectro acarreta na inclusão de variáveis desnecessárias à análise, tornando a matriz de dados complexa e demandando maior tempo na execução dos cálculos. Por essa razão, seguiu-se a exclusão das regiões contendo apenas ruídos e repetiu-se a análise por PCA. Novamente, verificou que há uma certa distinção entre as amostras. Entretanto, uma seleção mais criteriosa das variáveis foi feita dividindo-se o espectro em três regiões (0,5 - 3,0 ppm; 3,0 - 5,5 ppm e 6,1 - 9,3 ppm) e analisando-as individualmente ou em combinação entre elas. A melhor discriminação entre as amostras foi obtida utilizando-se somente a região de 6,1 - 9,3 ppm. Ainda excluindo-se variáveis, agora somente na região de 6,1 - 9,3 ppm, foi verificado uma maior importância da cafeína e dos ácidos clorogênicos nessa discriminação, e apenas uma pequena contribuição da trigonelina, pois quando os sinais referentes a essa substância foram retirados da análise a discriminação ficou levemente pior. A FIGURA 2.3.1.2 mostra a região do espectro que gerou a melhor distinção entre as amostras, onde pode-se observar um maior teor de cafeína e ácidos clorogênicos para o café da espécie robusta, corroborando com a maior importância desses compostos na discriminação entre as amostras.

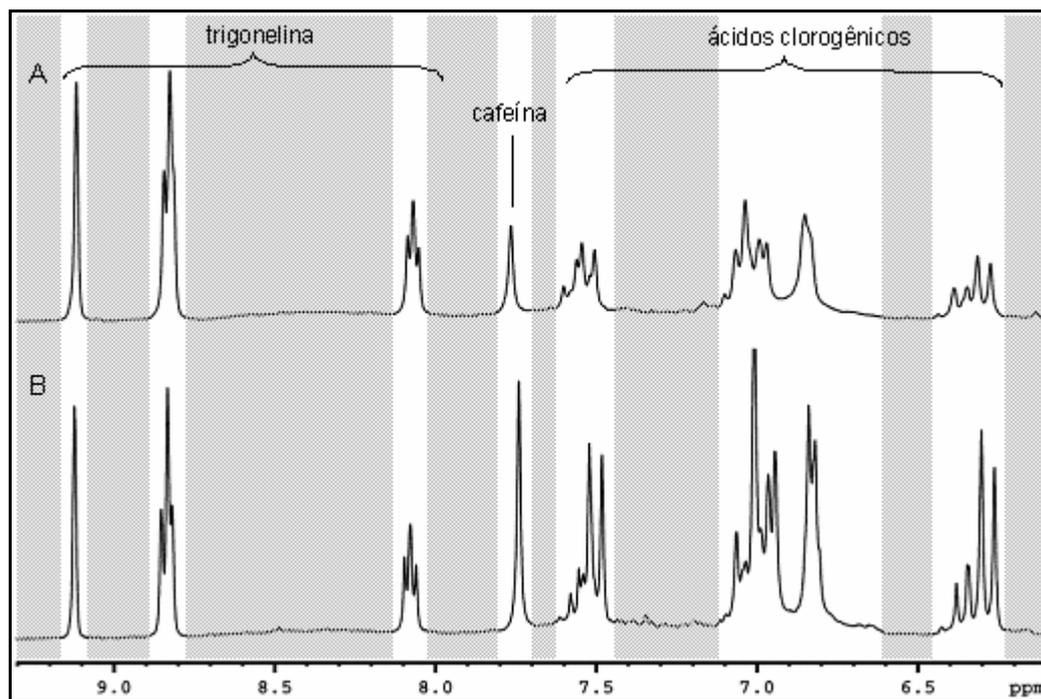


FIGURA 2.3.1.2 - Região de 6,1 – 9,3 ppm dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de café cru das espécies arábica (A) e robusta (B), obtidos em um equipamento de 9,4T

Com relação à escolha dos melhores parâmetros para a discriminação entre as amostras, várias formas de pré-processamentos e transformações matemáticas foram verificadas na análise por PCA. O pré-processamento, que é uma função matemática aplicada às variáveis, apresentou melhor resultado quando o autoescalamento dos dados foi utilizado. Já nos métodos de transformação, que são funções aplicadas às amostras, uma melhor discriminação entre as amostras foi obtida quando utilizou-se a normalização para um valor máximo de 100 e primeira derivada em um intervalo de quinze pontos.

O autoescalamento foi aplicado para que os sinais menos intensos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  tenham a mesma importância que os mais intensos. Esse pré-processamento é particularmente útil quando constituintes minoritários são de interesse, pois atribui a mesma influência a todos os sinais do espectro. Sem esse tratamento, os sinais mais intensos teriam maior importância na discriminação entre as amostras, sendo um problema quando dados de RMN são tratados, já que a intensidade dos sinais é proporcional ao número de núcleos envolvidos. Dessa forma, sinais originados de grupos metila seriam considerados mais importantes na análise quimiométrica que aqueles de grupos metilênicos, e esses por sua vez mais importantes que os de grupos metínicos, o que não é necessariamente verdade. Todavia, quando o autoescalamento dos dados é aplicado é importante fazer a

exclusão prévia dos ruídos para que, na análise, não seja atribuída a eles a mesma importância que os sinais.

A normalização foi utilizada para corrigir eventuais erros nas concentrações dos compostos, nesse caso cada elemento foi dividido por um fator constante, e em seguida incluído um parâmetro de escala igual a 100 para o sinal mais intenso.

A primeira derivada, em um intervalo de 15 pontos, foi aplicada para corrigir pequenas variações na linha de base dos espectros e contribuiu especialmente no agrupamento entre as replicatas. A aplicação da primeira derivada em dados espectroscópicos é limitada, primeiro porque aumenta a complexidade dos cálculos pois requer um cálculo para cada ponto dos dados no espectro e segundo, porque aumenta significativamente os ruídos. Muitos programas computacionais, como o utilizado nesse trabalho, têm esses problemas minimizados com a utilização de filtros polinomiais como o de Savitzky/Golay que simplificam os cálculos e fornecem espectros derivados com menos ruídos (BRERETON, 2003). A FIGURA 2.3.1.3 mostra o espectro de hidrogênio de uma amostra de café antes (A) e após (B) a aplicação da primeira derivada, onde pode ser observado que o aumento dos ruídos não foi expressivo, podendo ser aplicada sem grandes problemas.

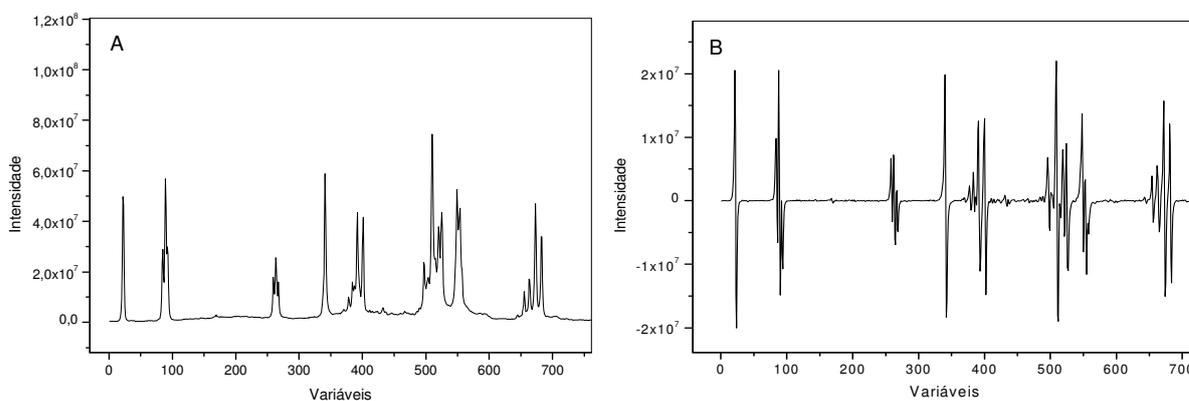


FIGURA 2.3.1.3 – Região de 6,0 - 9,0 ppm do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , antes (A) e após (B) aplicação da primeira derivada

O número de componentes principais necessário para descrever o sistema de dados foi selecionado com base na variância acumulada pelos novos fatores, sendo quatro componentes o suficiente e descrevendo 97,56% dos dados. A FIGURA 2.3.1.4 mostra o gráfico de variância acumulada no qual observa-se que a

variação nos dados após a quarta componente principal é pequena ou praticamente constante.

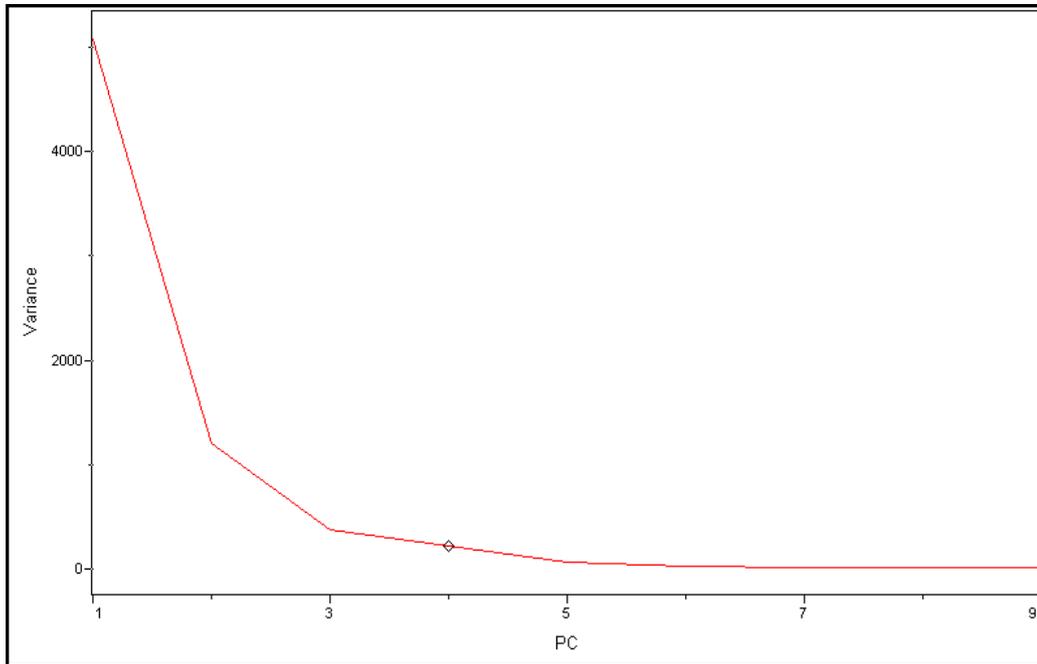


FIGURA 2.3.1.4 - Gráfico da variância acumulada versus o número de componentes principais

A análise por PCA distinguiu as amostras de café contendo diferentes proporções das espécies arábica e robusta em dois grupos. A FIGURA 2.3.1.5 mostra essa discriminação em PC1 versus PC2, na qual observa-se a formação de um grupo para as misturas de cafés contendo maior porcentagem da espécie robusta, à esquerda (vermelho) e de outro, contendo maior porcentagem da espécie arábica, à direita (azul).

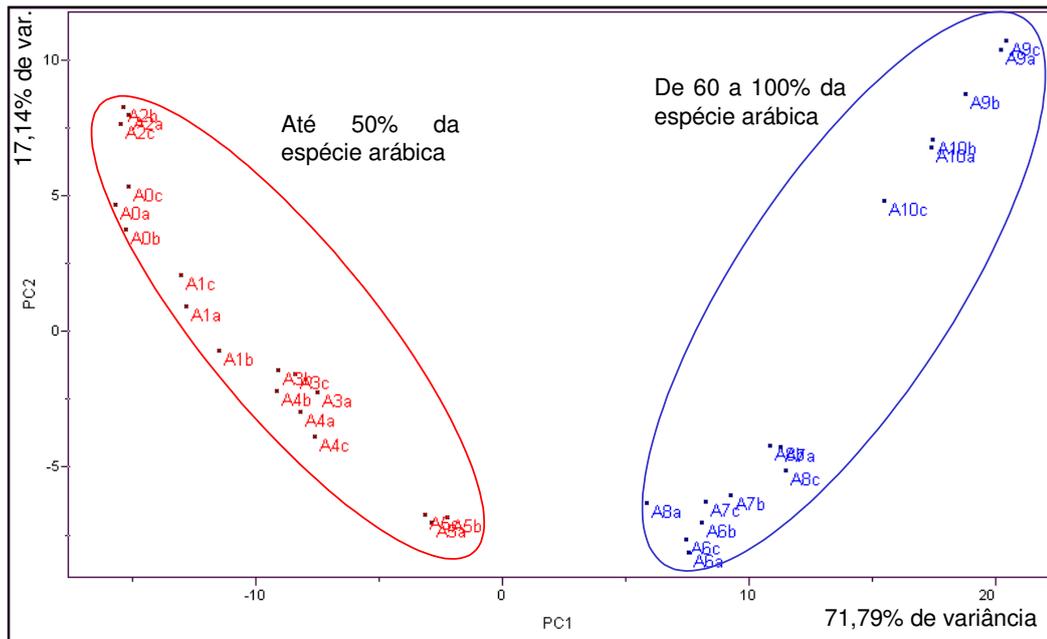


FIGURA 2.3.1.5 - Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 das misturas de cafés crus das espécies arábica e robusta, cujos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos em equipamento de 9,4T

No gráfico de *scores* pode ser observado que as amostras se distribuem ao longo de PC1 conforme aumenta o teor da espécie arábica em sua composição. Amostras com teores maiores que 50% de arábica apresentam valores de *scores* positivos, enquanto as que apresentam até 50% apresentam valores negativos. A amostra contendo 50% da espécie arábica e 50% da espécie robusta fica localizada próxima do zero em PC1, ou seja, ela fica localizada entre as amostras com maior e menor teor de arábica (ou robusta) em sua composição. Uma explicação desse agrupamento em função do gráfico de *loadings* não foi possível devido à sua complexidade, como mostra a FIGURA 2.3.1.6. Entretanto, pode-se dizer que as amostras localizadas em *scores* negativos, em PC1, e que compreendem as misturas com maior teor da espécie robusta, estão relacionadas a um maior nível de cafeína e ácidos clorogênicos, visto que o café robusta apresentou sinais mais intensos para essas substâncias no espectro de hidrogênio (FIGURA 2.3.1.2).

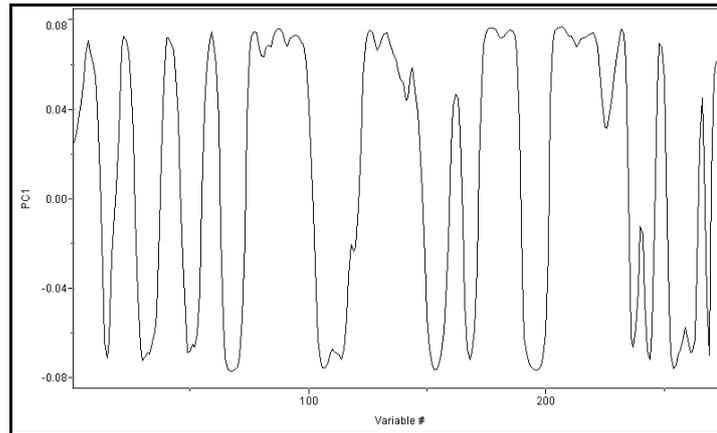


FIGURA 2.3.1.6 - Gráfico de *loadings* mostrando a complexidade da análise da influência das variáveis em PC1, após o autoescalamento dos dados

Além da discriminação das amostras com relação às espécies presentes, a análise por PCA possibilitou verificar que nenhuma amostra estudada apresentou comportamento anômalo (*outlier*), não sendo necessário nenhuma exclusão.

Após a análise por PCA, foi aplicado um segundo método de reconhecimento de padrões não supervisionado, o HCA, que foi utilizado para confirmar o agrupamento natural entre as amostras.

Além dos parâmetros quimiométricos otimizados no PCA, no HCA foi usada a distância euclidiana para o cálculo da distância entre amostras e variáveis e foi aplicado o método de conexão incremental, o qual utiliza a média ponderada no cálculo da distância intergrupos.

A análise por HCA confirmou os resultados obtidos na análise por PCA e também discriminaram dois grupos de amostras. A FIGURA 2.3.1.7 apresenta o dendrograma resultante dessa análise, que mostra com um índice de similaridade de 0,447 a separação das amostras contendo maior teor da espécie arábica daquelas contendo até 50%. Novamente, nota-se que o agrupamento entre as amostras ocorreu gradativamente conforme varia o teor das espécies em sua composição, sendo as misturas com menor teor de arábica localizadas na parte inferior do dendrograma (vermelho), e aquelas contendo maior teor, na parte superior (azul). Além disso, uma boa repetitividade das medidas foi observada. Com um índice de similaridade em torno de 0,91, observa-se que cada triplicata forma um subgrupo, mostrando maior similaridade entre elas que com outras amostras. Com exceção

das replicatas 7a e 8a, todas tiveram variabilidade menor quando comparadas com amostras de composições diferentes.

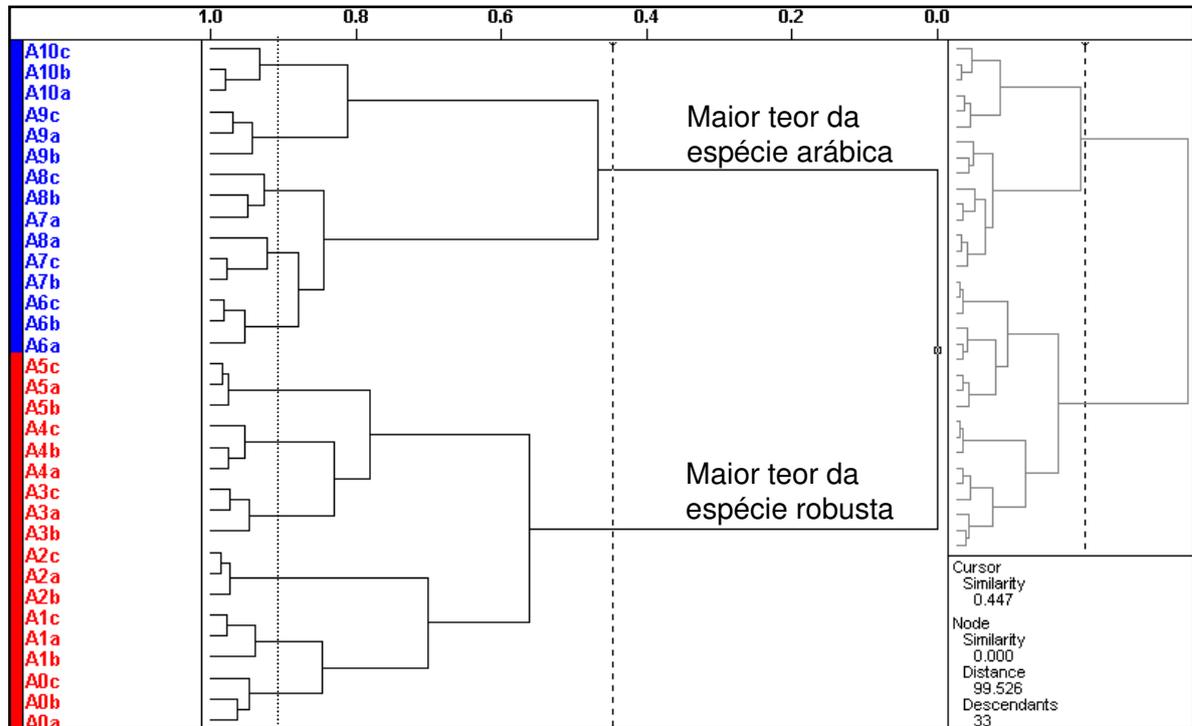


FIGURA 2.3.1.7 - Dendrograma obtido do HCA das misturas de cafés crus das espécies arábica e robusta, cujos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos em equipamento de 9,4T

Para a classificação das amostras em duas categorias, estabelecidas a partir do teor das espécies de café arábica e robusta presentes, foram aplicados dois métodos de reconhecimento de padrões supervisionados, SIMCA e KNN, os quais são mais seguros para a verificação da classe de amostras desconhecidas quando comparados com os métodos até o momento utilizados, pois usam a informação de amostras com características conhecidas para a atribuição da classe.

Ambos os modelos foram construídos a partir das variáveis selecionadas e os parâmetros matemáticos otimizados no PCA.

No método SIMCA, cada classe foi autoescalada separadamente (*scope local*), sendo utilizado para a classificação um limite de confiança de 95%. O número ótimo de componentes principais necessário para descrever cada classe foi escolhido individualmente, e foi igual a 2 para ambas as classes. Para verificar o poder de discriminação do modelo construído foram utilizados os resíduos e as distâncias entre as classes, os quais representam o quanto cada classe é compacta e o quão distantes elas estão uma das outras, respectivamente. Um bom modelo

exige que as classes sejam compactas e estejam distantes entre si, pois dessa forma a atribuição da classe de uma amostra desconhecida se torna mais fácil e inequívoca. As TABELAS 2.3.1.1 e 2.3.1.2 mostram os resíduos e as distâncias entre as classes, respectivamente. Nos resíduos pode-se verificar que as classes são razoavelmente compactas, pois o resíduo dentro de cada classe é pequeno comparado aos resíduos interclasses. Analisando as distâncias, observa-se que as classes são suficientemente separadas para fornecer um bom modelo de classificação. Segundo consta no Manual do software Pirouette (1990-2003) as classes são consideradas separadas quando apresentam distâncias maior que 3, e nesse caso a distância entre as classes foi de 13,502.

TABELA 2.3.1.1 - Resíduo entre as classes arábica (2) e robusta (1), para os dados de cafés crus obtidos em equipamento de 9,4T

	<b>Classe 1</b>	<b>Classe 2</b>
<b>Classe 1</b>	0,493	6,775
<b>Classe 2</b>	5,151	0,318

TABELA 2.3.1.2 - Distância entre as classes arábica (2) e robusta (1), para os dados de cafés crus obtidos em equipamento de 9,4T

	<b>Classe 1</b>	<b>Classe 2</b>
<b>Classe 1</b>	0,000	13,502
<b>Classe 2</b>	13,502	0,000

No método KNN, o número ótimo de vizinhos mais próximos  $k$  foi selecionado verificando-se o sucesso na classificação das amostras de treinamento quando diferentes valores de  $k$  foram usados. Isso foi feito a partir do método da validação cruzada, onde cada amostra do conjunto de treinamento é excluída uma vez, e então, classificada usando o restante das amostras como conjunto de treinamento. O processo é repetido para diferentes valores de  $k$ . As previsões com menor número de erros na classificação dão o número ótimo de vizinhos mais próximo,  $k$ . Como no modelo em questão não houve nenhum erro o número de vizinhos mais próximos escolhido foi três.

A eficiência desses modelos de classificação foi avaliada utilizando-se amostras testes, ou seja, amostras com características conhecidas pelo analista,

mas não pelos modelos. Foram usadas seis amostras em triplicata, sendo três da classe 1 contendo maior teor de robusta e três da classe 2 contendo maior teor de arábica. Como mostra a TABELA 2.3.1.3, o modelo KNN foi mais eficiente determinando a classe correta para 83,3% das amostras, enquanto o SIMCA fez a previsão de classe corretamente apenas para 38,9% das amostras. Para o KNN, houve erro apenas na classificação da amostra com 65% de arábica em sua composição, mostrando uma maior dificuldade do modelo em discriminar amostras com teores semelhantes de arábica e robusta (próximas a 50%). Esses resultados mostraram que inicialmente podemos utilizar esse modelo para a previsão da classe de amostras desconhecidas para determinar qual a espécie predominante em sua composição, desde que essa não esteja próximo de 50%, o que é sem dúvida de grande importância para o controle de qualidade.

O SIMCA mostrou uma baixa eficiência para a classificação das amostras das misturas de café arábica e robusta, quando um limite de confiança de 95% foi usado. Entretanto, pode ser verificado na FIGURA 2.3.1.8 que, com exceção da amostra A65, todas ficaram localizadas próximas aos limites definidos para a sua verdadeira classe. A amostra A65 apresentou-se mais próxima à classe 1, corroborando com a atribuição feita pelo modelo KNN. Algumas tentativas foram feitas para incluir as amostras dentro dos limites de cada classe e com isso melhorar a classificação obtida pelo modelo SIMCA, como alterar o número de fatores em cada classe e diminuir o intervalo de confiança para 90%, mas nenhuma melhora foi alcançada. Dessa forma, pode-se dizer que diante de uma amostra desconhecida o modelo KNN deverá ser melhor para informar a qual classe ela pertence, ou seja, se ela contém maior proporção de café da espécie robusta ou da espécie arábica.

TABELA 2.3.1.3 - Previsão de classe obtida para as amostras teste a partir dos métodos de classificação KNN e SIMCA aplicados a cafés crus arábica/robusta

Amostra	Classe	KNN	SIMCA
A2a	1	1	0
A2b	1	1	0
A2c	1	1	0
A25a	1	1	1
A25b	1	1	1
A25c	1	1	1
A35a	1	1	1
A35b	1	1	1
A35c	1	1	1
A65a	2	1	0
A65b	2	1	0
A65c	2	1	0
A75a	2	2	2
A75b	2	2	0
A75c	2	2	0
A8a	2	2	0
A8b	2	2	0
A8c	2	2	0

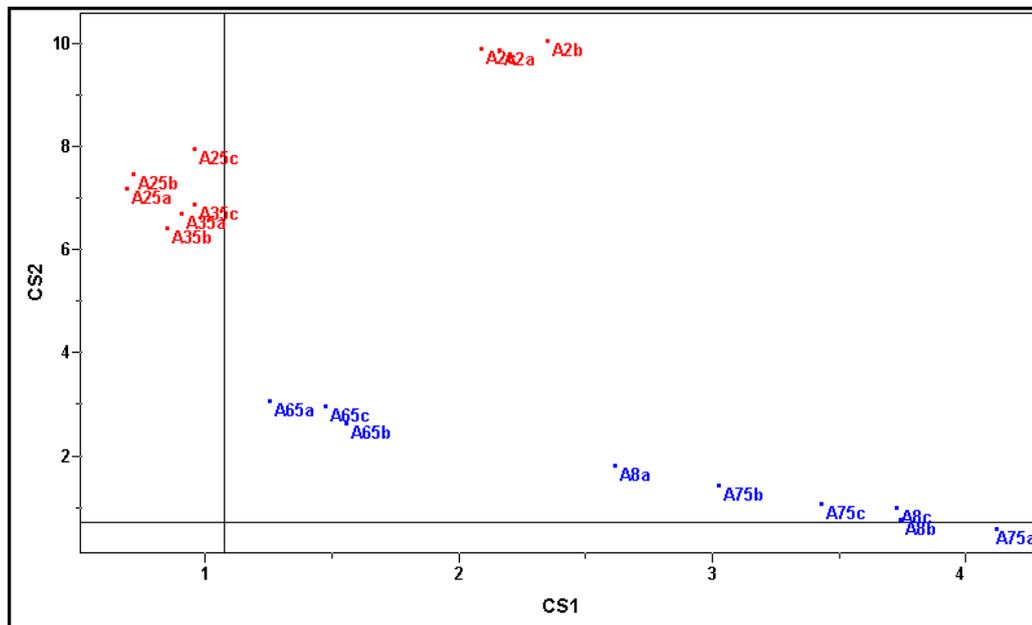


FIGURA 2.3.1.8 - Previsão de classe obtida pelo modelo SIMCA (amostras em vermelho próximas à classe 1, amostras em azul próximas à classe 2)

Após verificar a eficiência dos modelos de classificação com amostras teste, o modelo KNN foi utilizado para fazer a previsão de amostras desconhecidas também ao analista. Duas amostras foram analisadas AX e AY. Essas tiveram suas composições preparadas por outro operador, que pesou os cafés crus moídos das espécies arábica e robusta em diferentes proporções, mas mantendo uma massa total de 10,0g. Os resultados da previsão de classe obtidos para essas amostras estão apresentados na TABELA 2.3.1.4.

TABELA 2.3.1.4 - Previsão de classe obtida para amostras desconhecidas a partir do método de classificação KNN aplicado a cafés crus arábica/robusta

Amostra	KNN
AXa	1
AXb	1
AXc	1
AYa	1
AYb	1
AYc	1

O modelo KNN atribuiu as duas amostras à classe 1. Entretanto, esse resultado será verificado pelos métodos de calibração, que determinam o teor de cada espécie na mistura.

Na construção dos modelos de calibração (PLS e PCR), foram utilizados os mesmos parâmetros matemáticos otimizados no PCA, sendo o número ótimo de fatores selecionado a partir do método de validação cruzada, no qual se avalia a magnitude dos erros de previsão para um dado conjunto de amostras usado na construção do modelo de calibração. Na validação cruzada, uma amostra é deixada fora uma vez e sua concentração e erro de previsão são calculados por um modelo construído com as amostras remanescentes. Isso é repetido até que todas as amostras são deixadas fora uma vez. A soma do quadrado dos erros de previsão é calculada de acordo com a equação 2.3.1.1 e o desvio padrão, com a equação 2.3.1.2:

$$PRESS = \sum_{i=1}^m (\hat{c}_i - c_i)^2 \quad (2.3.1.1)$$

$$SEV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (\hat{c}_i - c_i)^2}{n}} \quad (2.3.1.2)$$

Onde  $m$  é o número total de amostras,  $\hat{c}_i$  é a concentração estimada,  $c_i$  a concentração de referência e  $n$  o número de amostras de calibração (MOREIRA *et al.*, 2005, FERREIRA, 1999). O número ótimo de fatores é o correspondente ao menor valor de PRESS (*Predicted Residual Error Sum of Squares*) e SEV (*Standard Error of Validation*). Para os modelos em questão, foram necessárias cinco componentes principais para o PLS que apresentaram valor de PRESS de 2,050; SEV de 0,276 e coeficiente de regressão  $r$  de 0,9963. Para o PCR, também foram necessárias cinco componentes, apresentando valores de PRESS de 3,933; SEV de 0,382 e  $r$  de 0,9929. A quantidade de variância descrita pelos cinco primeiros fatores dos modelos PLS e PCR foi de 98,6 e 97,9%, respectivamente. As FIGURAS 2.3.1.9 e 2.3.1.10 mostram os teores estimados versus os teores medidos da espécie arábica contida nas amostras para os modelos PLS e PCR, respectivamente. Essas curvas permitem observar como as amostras de calibração se ajustam ao modelo. Comparando as duas curvas, observa-se um melhor ajuste das amostras ao modelo PLS, o que é confirmado por um maior valor de  $r$ .

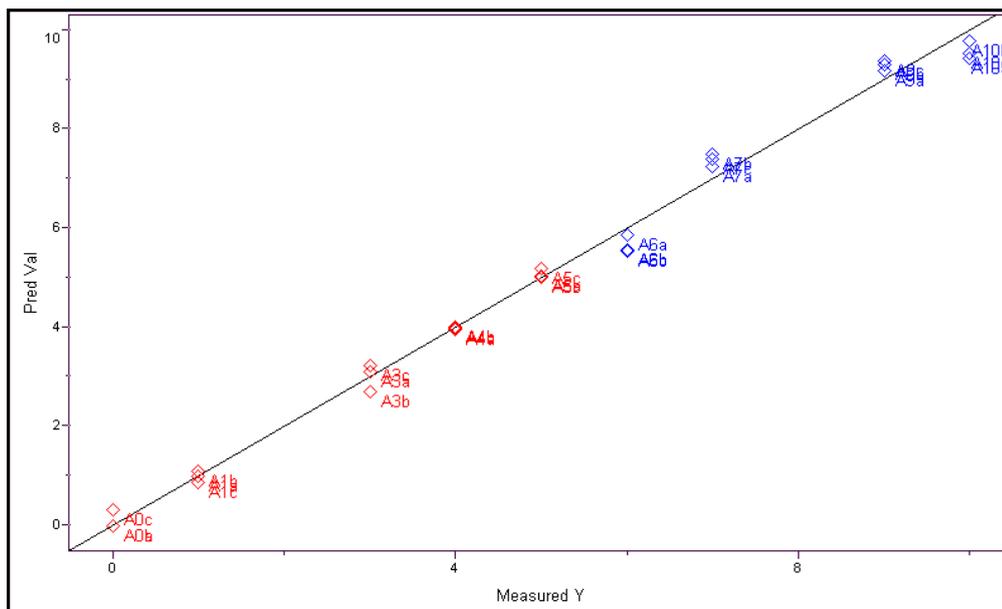


FIGURA 2.3.1.9 – Teores de café arábica medidos versus teores estimados na validação cruzada, para o modelo PLS

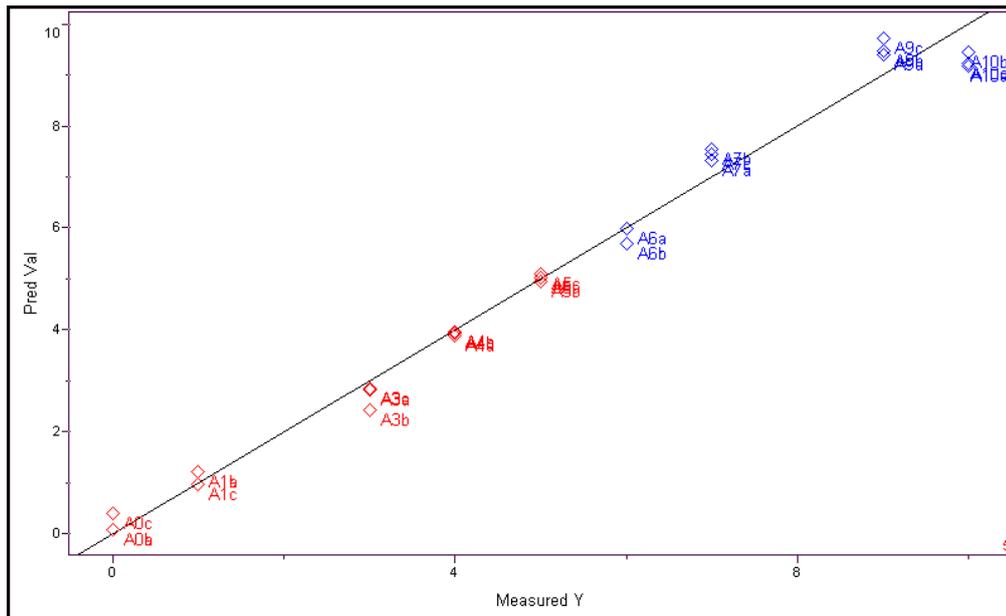


FIGURA 2.3.1.10 - Teores de café arábica medidos versus teores estimados na validação cruzada, para o modelo PCR

Para avaliar a eficiência de predição dos modelos, as mesmas amostras teste usadas anteriormente foram analisadas. A TABELA 2.3.1.5 apresenta os teores de café arábica determinados para essas amostras, pelos métodos PLS e PCR.

Os modelos de calibração mostraram eficiência semelhante na previsão dos teores de café arábica nas misturas, determinando valores relativamente próximos. O modelo PLS foi levemente melhor, cometendo menores erros de previsão para um maior número de amostras (A2, A65, A75 e A8), enquanto o modelo PCR foi melhor apenas na previsão do teor da amostra A25. Para a amostra A35, o erro de previsão cometido pelos dois métodos foi da mesma grandeza. SIVAKESAVA (2001), também verificou que o método de calibração multivariada PLS forneceu resultados mais exatos que o PCR, na determinação de açúcares em suco de frutas.

Considerando-se a viabilidade do uso desses modelos em situações reais para a previsão em amostras desconhecidas, pode-se dizer que são confiáveis nos casos em que as misturas contenham acima de 25% da espécie arábica, cometendo erros médios em torno de 2,95 e 3,74%, para PLS e PCR, respectivamente. Caso contrário, a previsão pode ocorrer com erros mais elevados, como para a amostra A2, que foram em torno de 5,0% usando o método PLS e 25%

usando PCR e para a amostra A25, que foram de 8,0% para o PCR, e de 16,0% para o PLS.

TABELA 2.3.1.5 - Previsão do teor de café arábica nas misturas a partir dos modelos PLS e PCR aplicados aos dados de cafés crus obtidos em equipamento de 9,4T

<b>Amostra</b>	<b>PLS (%)</b>	<b>PCR (%)</b>	<b>Teor real (%)</b>
A2a	18,8	25,2	20,0
A2b	19,6	25,9	20,0
A2c	18,1	25,3	20,0
A25a	20,6	22,0	25,0
A25b	19,6	22,9	25,0
A25c	21,6	25,0	25,0
A35a	33,8	35,8	35,0
A35b	33,0	35,6	35,0
A35c	34,2	36,5	35,0
A65a	65,5	70,0	65,0
A65b	63,1	66,6	65,0
A65c	62,0	67,4	65,0
A75a	77,3	77,3	75,0
A75b	78,1	79,0	75,0
A75c	75,9	77,3	75,0
A8a	81,6	83,1	80,0
A8b	83,5	83,2	80,0
A8c	77,3	79,9	80,0

Após a validação utilizando as amostras teste, os modelos foram aplicados em duas amostras de café com proporções das espécies arábica e robusta desconhecidas (AX e AY) para a determinação do teor das espécies presente. A TABELA 2.3.1.6 apresenta os teores de café da espécie arábica determinados para tais amostras.

TABELA 2.3.1.6 - Previsão do teor de café arábica em amostras desconhecidas a partir dos modelos PLS e PCR aplicados aos dados de cafés crus obtidos em equipamento de 9,4T

<b>Amostra</b>	<b>PLS (%)</b>	<b>PCR (%)</b>
AXa	57,1	45,1
AXb	56,1	44,3
AXc	57,2	45,2
AYa	26,5	18,9
AYb	27,3	20,3
AYc	26,1	19,1

A composição real da espécie arábica em AX foi declarada ser 55,0%, e em AY, 30,0%. Os modelos PLS e PCR previram teores médios para AX, de 56,8 e 44,9%, respectivamente, e para AY de 26,6 e 19,4%. Dessa forma, os erros cometidos para AX foram de 3,27 e 18,42%, para o modelo PLS e PCR, respectivamente, e para a amostra AY foram de 11,23 e 35,23%. Mostrando uma eficiência muito melhor na previsão pelo método PLS.

Os métodos de calibração também auxiliaram a confirmar a classe das amostras AX e AY. Segundo os teores previstos, AY teve sua classe atribuída corretamente, pelo modelo KNN. Entretanto, verificou-se novamente a dificuldade do método em classificar amostras contendo quantidades próximas a 50% de cada espécie, como é o caso da amostra AX, não sendo capaz de classificá-la com eficiência.

### **2.3.2. Estudo de misturas de cafés crus das espécies arábica e robusta utilizando espectros de RMN de <sup>1</sup>H obtidos em um equipamento de 4,7T**

Sabe-se que uma característica importante nos equipamentos de ressonância magnética nuclear é a intensidade do campo magnético, já que dela depende a separação e a intensidade dos sinais. Segundo MANNINA *et al.* (2003), a intensidade do sinal é dependente da intensidade do campo por uma razão de 3/2. Assim, aumenta-se a eficiência aumentando-se o campo magnético, apesar dos custos crescerem significativamente.

Com o intuito de verificar se o uso de um equipamento com menor campo magnético também seria eficiente, assim como o de 9,4T, a análise foi feita

utilizando-se a mesma metodologia, mas, em um equipamento de 4,7T para a aquisição dos espectros de  $^1\text{H}$ .

A FIGURA 2.3.2.1 mostra os espectros das amostras de café das espécies arábica (A) e robusta (B) adquiridos em um equipamento de 4,7T. A análise visual da região 6,0 – 9,4 ppm permitiu verificar o mesmo perfil observado anteriormente, onde o café robusta apresentou maiores teores de cafeína e ácidos clorogênicos. Entretanto, como era esperado houve uma pequena perda na resolução dos sinais quando esses espectros são comparados aos obtidos em um equipamento de 9,4T (FIGURA 2.3.1.2, p. 32), especialmente para os sinais em 8,90 e 7,05 ppm.

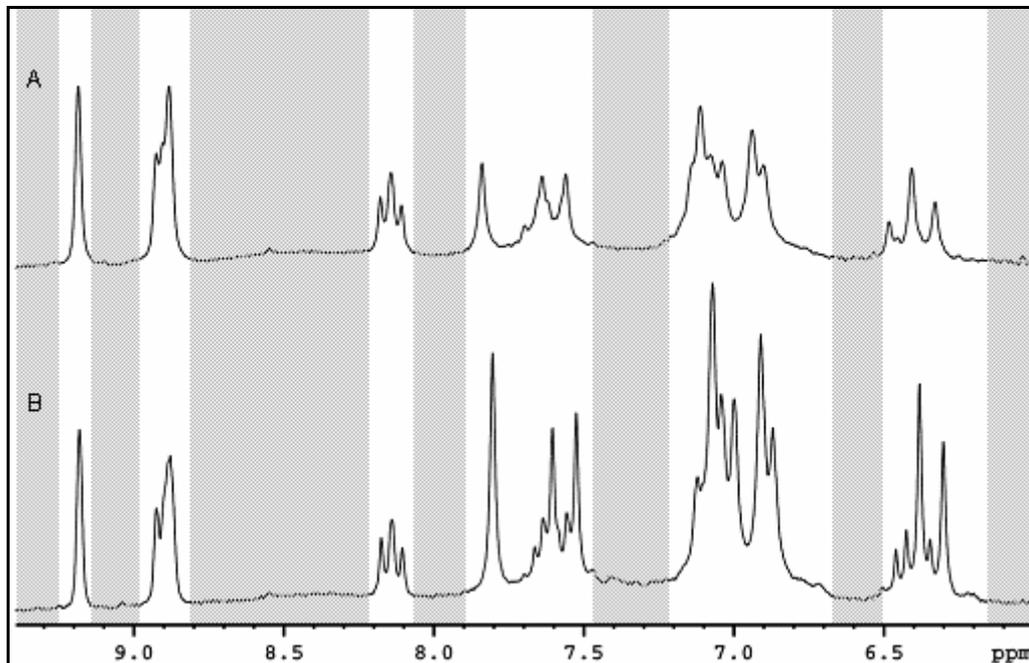


FIGURA 2.3.2.1 - Região de 6,0 – 9,4 ppm dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das espécies de café arábica (A) e robusta (B), adquiridos em um equipamento de 4,7T

Assim como para os dados adquiridos no equipamento de 9,4T, foi feita primeiramente uma análise de componentes principais para otimizar os parâmetros matemáticos e selecionar as variáveis a serem utilizadas na construção dos modelos de classificação e calibração. Novamente, verificou-se que os parâmetros utilizados na análise anterior forneciam a melhor discriminação entre as espécies de café em estudo e as variáveis mais importantes também foram as mesmas, sendo aquelas não destacadas em cinza na FIGURA 2.3.2.1.

O número ótimo de fatores foi três, e juntos descreveram 85,8% de variância dos dados originais.

A FIGURA 2.3.2.2 mostra o gráfico de *scores* da análise por PCA aplicada aos espectros obtidos no equipamento de 4,7T. Foi possível observar a discriminação das amostras em dois grupos: um à esquerda, contendo as amostras com até 30% da espécie arábica em sua composição, e outro à direita, contendo as amostras com 40 a 100% dessa espécie.

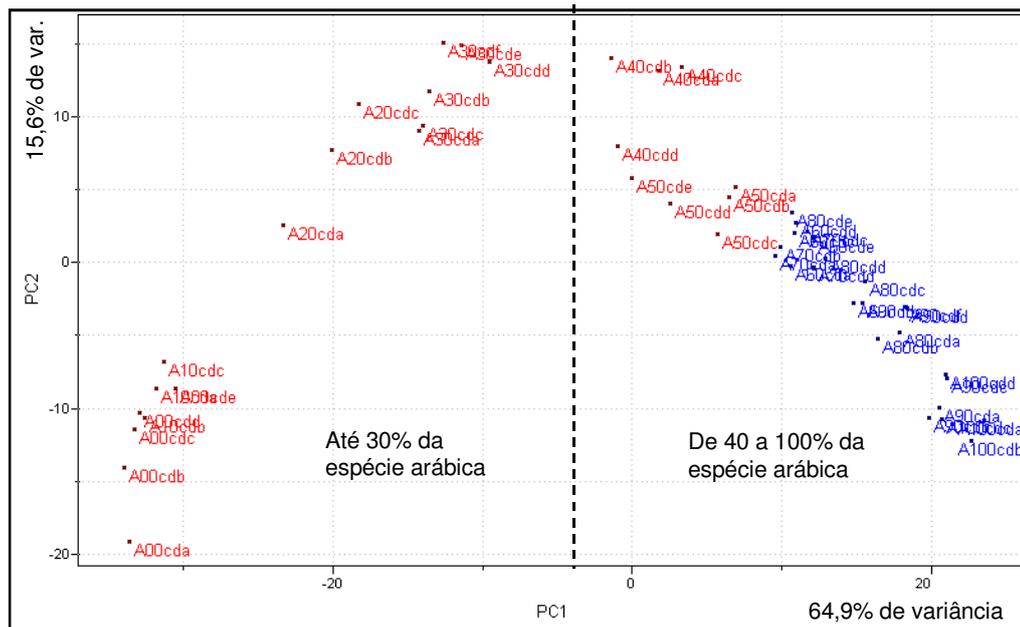


FIGURA 2.3.2.2 - Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 das misturas de cafés crus das espécies arábica e robusta, analisadas num equipamento de 4,7T

A análise por HCA corroborou com o método PCA, e com um índice de similaridade de 0,471, discriminou as amostras nos mesmos grupos observados. O dendrograma apresentado na FIGURA 2.3.2.3 e suas ampliações nas FIGURAS 2.3.2.4 e 2.3.2.5 mostram essa discriminação, sendo as amostras localizadas na parte superior do dendrograma aquelas contendo de 40 a 100% de café arábica, e na parte inferior, as amostras contendo de 0 a 30%.

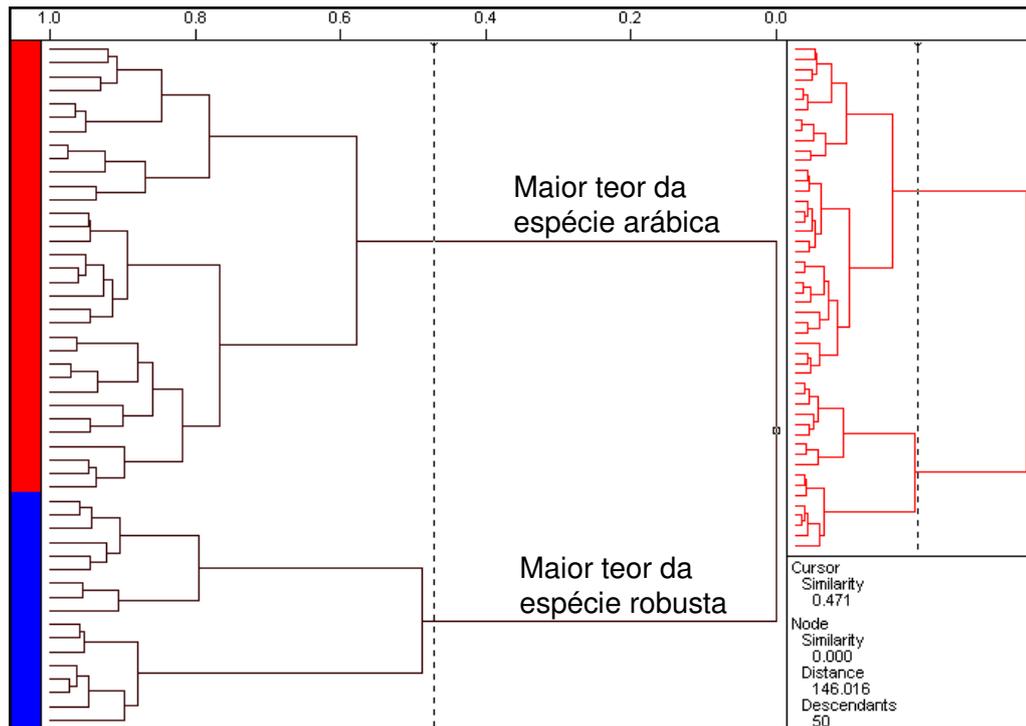


FIGURA 2.3.2.3 - Dendrograma obtido do HCA a partir das misturas de cafés crus das espécies arábica e robusta, analisadas num equipamento de 4,7T

Com relação à repetitividade da técnica, observou-se uma maior dificuldade em repetir a supressão do sinal da água nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ . Para certificar-se de que isto não seria um problema nas análises quimiométricas um maior número de replicatas foi feito para as amostras mais problemáticas. Entretanto, nas ampliações do dendrograma, observou-se que a variação entre as replicatas foi menor que a variação devido à composição química das amostras, apresentando boa repetitividade das medidas, com exceção das amostras A60 e A70, que apresentaram maior variabilidade.

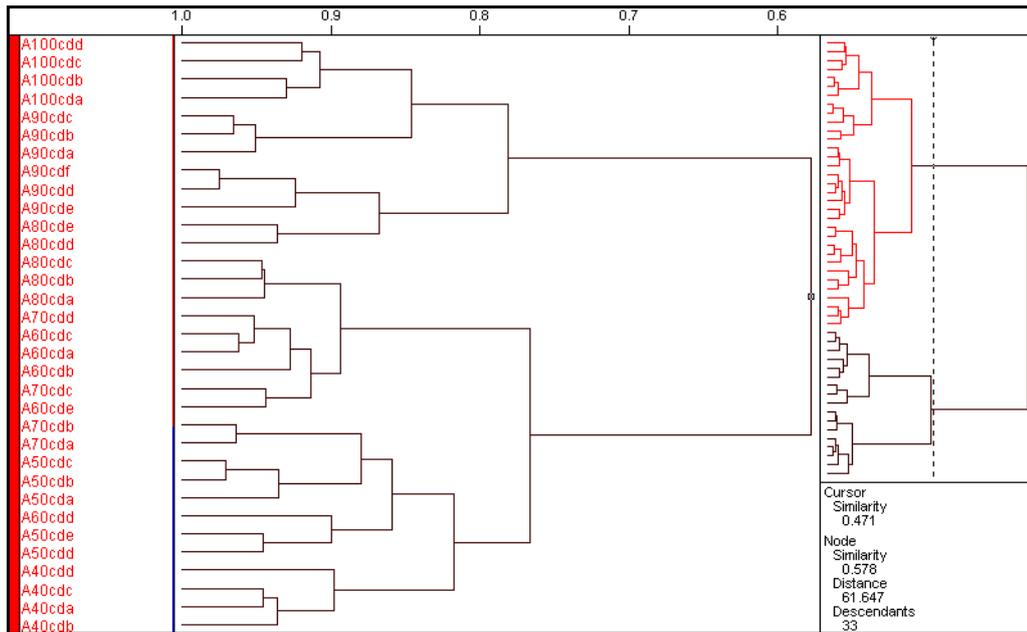


FIGURA 2.3.2.4 - Ampliação da parte superior do dendrograma obtido do HCA a partir das misturas de cafés crus das espécies arábica e robusta, analisadas num equipamento de 4,7T

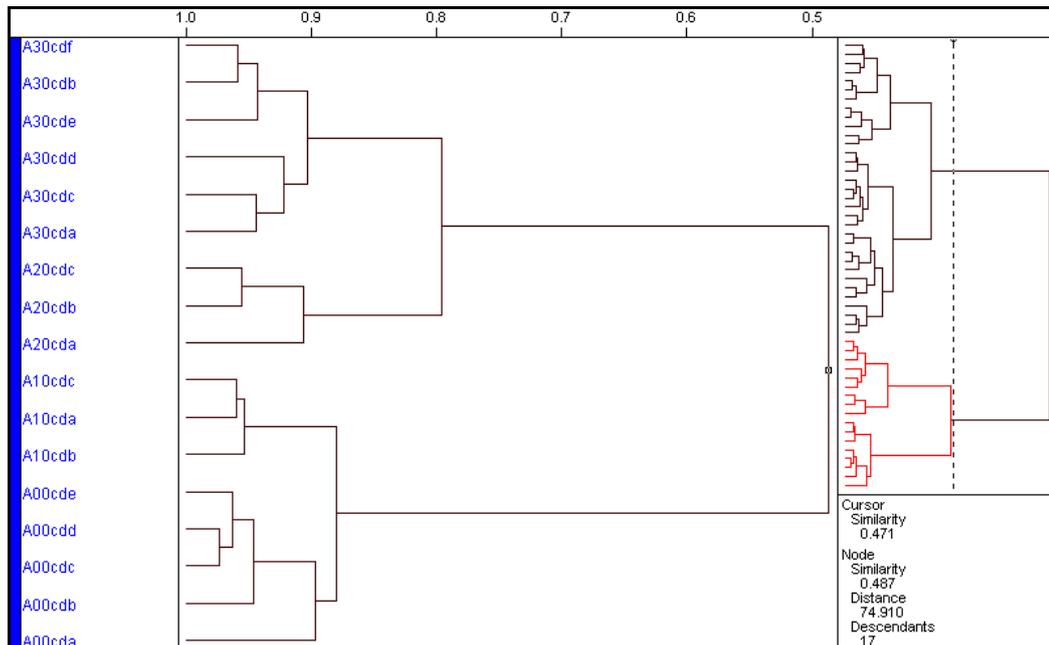


FIGURA 2.3.2.5 - Ampliação da parte inferior do dendrograma obtido do HCA a partir das misturas de cafés crus das espécies arábica e robusta, analisadas num equipamento de 4,7T

O modelo de classificação SIMCA foi construído da mesma forma que para os espectros obtidos em equipamento de 9,4T. O número ótimo de fatores foi igual a 5 para ambas as classes, os quais acumularam 80,6 e 74,3% de variância

para as classes 1 (amostras contendo  $\leq 50\%$  de café arábica) e 2 (amostras contendo  $> 50\%$  de café arábica), respectivamente. Para verificar o poder de discriminação do modelo considere as TABELAS 2.3.2.1 e 2.3.2.2, que mostram os resíduos e distâncias entre as classes de amostras. Comparando as tabelas dos resíduos entre classes obtidos para a análise dos espectros obtidos em equipamento de 9,4T (TABELA 2.3.1.1, p. 38) e 4,7T (TABELA 2.3.2.1) pode ser observado que os resíduos intraclasse são maiores e interclasses menores, indicando classes menos compactas para esse último. Além disso, a distância entre as classes também foi menor (ver TABELAS 2.3.1.2 e 2.3.2.2), porém, ainda maior que 3 sendo consideradas suficientemente separadas para fornecer um bom modelo de classificação.

TABELA 2.3.2.1 - Resíduo entre as classes arábica (2) e robusta (1), para os dados de cafés crus obtidos em equipamento de 4,7T

	<b>Classe 1</b>	<b>Classe 2</b>
<b>Classe 1</b>	0,503	4,103
<b>Classe 2</b>	1,147	0,599

TABELA 2.3.2.2 - Distância entre as classes arábica (2) e robusta (1), para os dados de cafés crus obtidos em equipamento de 4,7T

	<b>Classe 1</b>	<b>Classe 2</b>
<b>Classe 1</b>	0,000	4,449
<b>Classe 2</b>	4,449	0,000

O modelo KNN também foi construído da mesma forma que para os espectros obtidos em equipamento de 9,4T. A escolha do melhor número de vizinhos a ser utilizado na previsão da classe de amostras futuras foi feita com base no gráfico da FIGURA 2.3.2.6, que mostra os erros cometidos na classificação das amostras de treinamento versus o número de vizinhos mais próximos. Dessa forma, foi selecionado um número de três vizinhos. Qualquer valor de k maior que 4 não seria adequado, já que o modelo comete três erros de previsão.

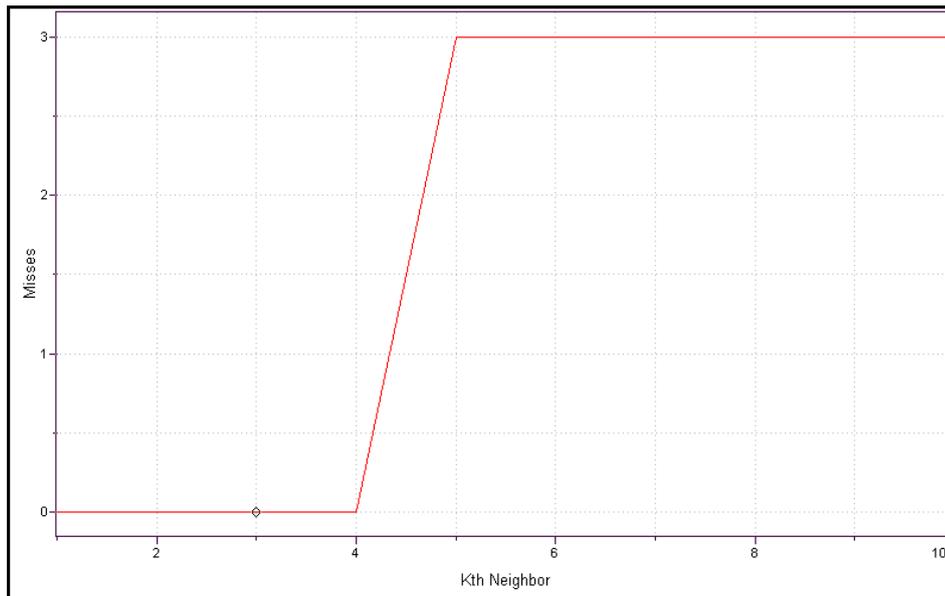


FIGURA 2.3.2.6 - Gráfico do Kth vizinho mais próximo versus o número de erros cometidos na previsão das amostras de treinamento para o conjunto de dados de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos em equipamento de 4,7T para amostras de cafés crus das espécies arábica e robusta

Para verificar a eficiência dos modelos de classificação (KNN e SIMCA) duas amostras teste foram utilizadas. O resultado da atribuição da classe feita por esses modelos está apresentado na TABELA 2.3.2.3. Novamente, observou-se um melhor resultado aplicando-se o método KNN, que obteve 100% de acertos contra 50% do SIMCA.

TABELA 2.3.2.3 - Previsão de classe obtido para amostras teste a partir dos métodos de classificação KNN e SIMCA aplicados aos dados de cafés crus obtidos em equipamento de 4,7T

Amostra	Classe	KNN	SIMCA
A20cda	1	1	1
A20cdb	1	1	1
A20cdc	1	1	1
A80cda	2	2	0
A80cdb	2	2	0
A80cdc	2	2	0
A80cdd	2	2	0
A80cde	2	2	2

Para determinar o teor de café arábica nas misturas, foram utilizados os modelos de calibração PLS e PCR, que foram construídos com as mesmas variáveis e parâmetros matemáticos aplicados aos dados obtidos em equipamento de 9,4T. Isso foi feito com o intuito de comparar os resultados e verificar qual o método mais eficiente (PLS/PCR aplicados aos espectros obtidos em equipamento de 9,4T ou de 4,7T). O número ótimo de fatores selecionados para o modelo PLS foi de 5, e para o PCR foi de 7, descrevendo 70,9 e 81,6% de variância dos dados, respectivamente. Para o PLS foram obtidos: PRESS de 8,908; SEV de 0,574 e  $r$  de 0,9985, e para o PCR foram obtidos: PRESS de 9,800; SEV de 0,602 e  $r$  de 0,9932. Novamente observa-se um maior coeficiente de regressão para o modelo PLS, mostrando um melhor ajuste dos teores estimados com os teores reais de café arábica presente nas amostras de calibração.

Os teores de café arábica previstos para as amostras teste estão apresentados na TABELA 2.3.2.4. Considerando as amostras contendo 20 e 80% de café arábica, observa-se que os modelos PLS e PCR tiveram maior eficiência quando foram construídos a partir dos espectros obtidos num equipamento de 9,4T (TABELA 2.3.1.5, p. 44). Os teores de café arábica nas misturas foram previstos com erros de 3,42 e 14,97% para o PLS e PCR, respectivamente, já para os modelos construídos a partir dos espectros obtidos em equipamento de 4,7T (TABELA 2.3.2.4), os erros foram relativamente maiores, de 9,25 e 18,19% para PLS e PCR.

TABELA 2.3.2.4 - Previsão do teor de café da espécie arábica em amostras teste feita pelos modelos de calibração PLS e PCR aplicados aos dados de cafés crus obtidos em equipamento de 4,7T

<b>Amostra</b>	<b>PLS (%)</b>	<b>PCR (%)</b>
A20cda	16,6	14,4
A20cdb	18,1	13,8
A20cdc	16,5	12,8
A80cda	74,5	77,7
A80cdb	77,7	77,2
A80cdc	77,6	75,7
A80cdd	78,6	79,4
A80cde	76,2	71,1

### 2.3.3 - Estudo de misturas de cafés torrados das espécies arábica e robusta utilizando-se espectros de RMN de $^1\text{H}$ obtidos em um equipamento de 9,4T

Ainda com o objetivo de encontrar uma melhor metodologia para determinar e quantificar a presença de um café de pior qualidade em cafés arábica comerciais decidiu-se fazer um estudo comparativo utilizando-se cafés torrados, os quais tiveram os espectros obtidos em equipamento de 9,4T.

A FIGURA 2.3.3.1 mostra a região dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  analisada, na qual as regiões em cinza foram excluídas. Assim como para as amostras de café cru, nos espectros das amostras de café torrado observam-se diferenças principalmente nos teores dos ácidos clorogênicos, apresentando sinais mais intensos para o café robusta puro (B). Pequenas diferenças são também observadas no teor de trigonelina, que parece ter um menor teor relativo no café arábica, provavelmente devido a maior degradação dessa substância, durante a torra, levando a formação de outros compostos. Essa hipótese é confirmada pelo aparecimento dos sinais em 8,80; 8,55 e 8,05 ppm que se referem aos hidrogênios da *N*-metilpiridina, um produto da degradação térmica da trigonelina (STADLER *et al.*, 2002a e 2002b). Uma diferença marcante entre os espectros de café cru (FIGURA 2.3.1.2, p. 32) e torrado (FIGURA 2.3.3.1) é o aparecimento do sinal em 8,50 ppm, referente ao hidrogênio do ácido fórmico e que é mais intenso para o café robusta, provavelmente porque é um produto da degradação térmica dos ácidos clorogênicos, os quais são mais abundantes nessa espécie.

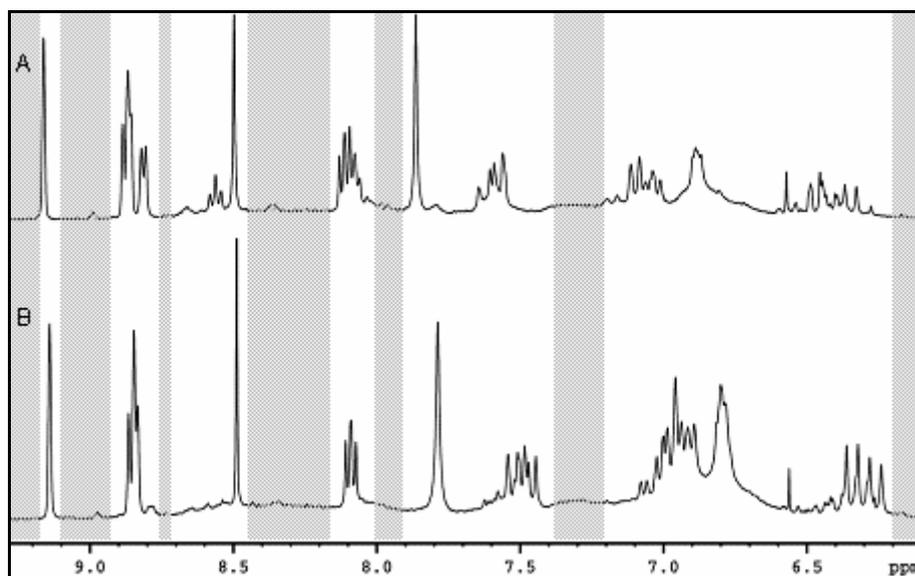


FIGURA 2.3.3.1 - Região de 6,0 – 9,4 ppm do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de cafés torrados das espécies arábica (A) e robusta (B) adquiridos em um equipamento de 9,4T.

A análise por PCA foi feita aplicando-se os parâmetros quimiométricos utilizados nas análises anteriores. O número ótimo de fatores foi três e juntos descreveram 82,3% da variância dos dados.

A FIGURA 2.3.3.2 mostra o gráfico de *scores* da análise por PCA aplicada aos espectros dos cafés torrados. As amostras podem ser discriminadas em dois grupos: um à esquerda, em PC1, contendo aquelas com até 60% da espécie arábica, e outro grupo à direita, contendo as amostras com 70 a 100% dessa espécie. Ao contrário do que foi observado para as amostras cruas, o gráfico de *scores* para as amostras de cafés torrados não deixou clara a distinção pelo teor das espécies nas misturas. Sendo encontrados cafés que não contém a espécie arábica em sua composição (A0a - c) próximo ao um contendo 50% dessa espécie (A5a - c), enquanto amostras contendo 10 (A1a - c) e 20% (A2a - c) ficaram mais distantes indicando maiores diferenças. Esse comportamento pode ser atribuído à alteração da composição dos cafés causada pela torrefação dos grãos, que influencia em maior ou menor extensão a composição dos mesmos, deixando claro que o uso de cafés torrados não é uma boa opção para esse tipo de análise. Outros testes foram feitos excluindo-se as regiões contendo os sinais da *N*-metilpiridina e ácido fórmico, entretanto os resultados não foram melhores.

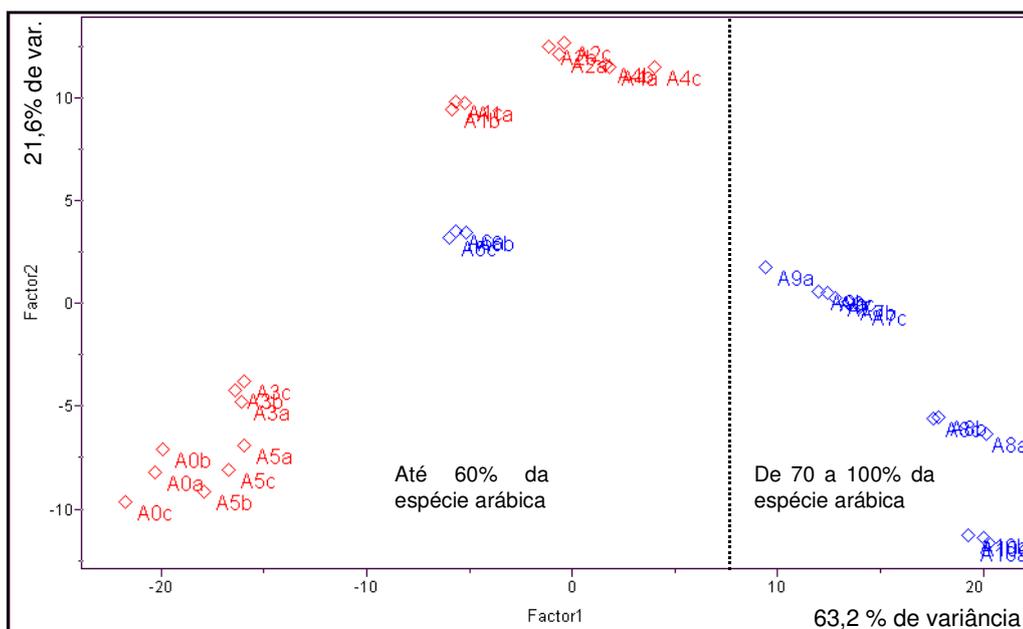


FIGURA 2.3.3.2 - Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 das misturas de cafés torrados arábica e robusta, cujos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos em equipamento de 9,4T

A análise por HCA reforçou os resultados da análise por PCA. Na FIGURA 2.3.3.3 pode ser verificado que, com um índice de similaridade de 0,251, as amostras são discriminadas nos mesmos grupos observados em PC1 x PC2: um grupo contendo amostras com 0 a 60% da espécie arábica e outro com 70 a 100%. Da mesma forma, não foi observada uma tendência gradativa do agrupamento das amostras com relação ao teor das espécies. O agrupamento de cada amostra à outra não se deu entre aquelas com composições mais semelhantes como ocorreu para as amostras de café cru, reafirmando uma diminuição na eficiência do método quando cafés torrados são utilizados. Um exemplo disso é a formação do ramo A (FIGURA 2.3.3.3), que primeiramente deveria ter agrupado a amostra contendo 10% de café arábica à outra amostra contendo teor semelhante, como por exemplo 20%, mas ao invés disso, primeiro houve o agrupamento das amostras contendo 20 e 40% da espécie arábica, e posteriormente, com um índice de similaridade menor ocorreu o agrupamento com a amostra contendo 10%. Já na análise dos cafés crus, as amostras foram primeiramente ligadas à outra com teores de café arábica semelhante.

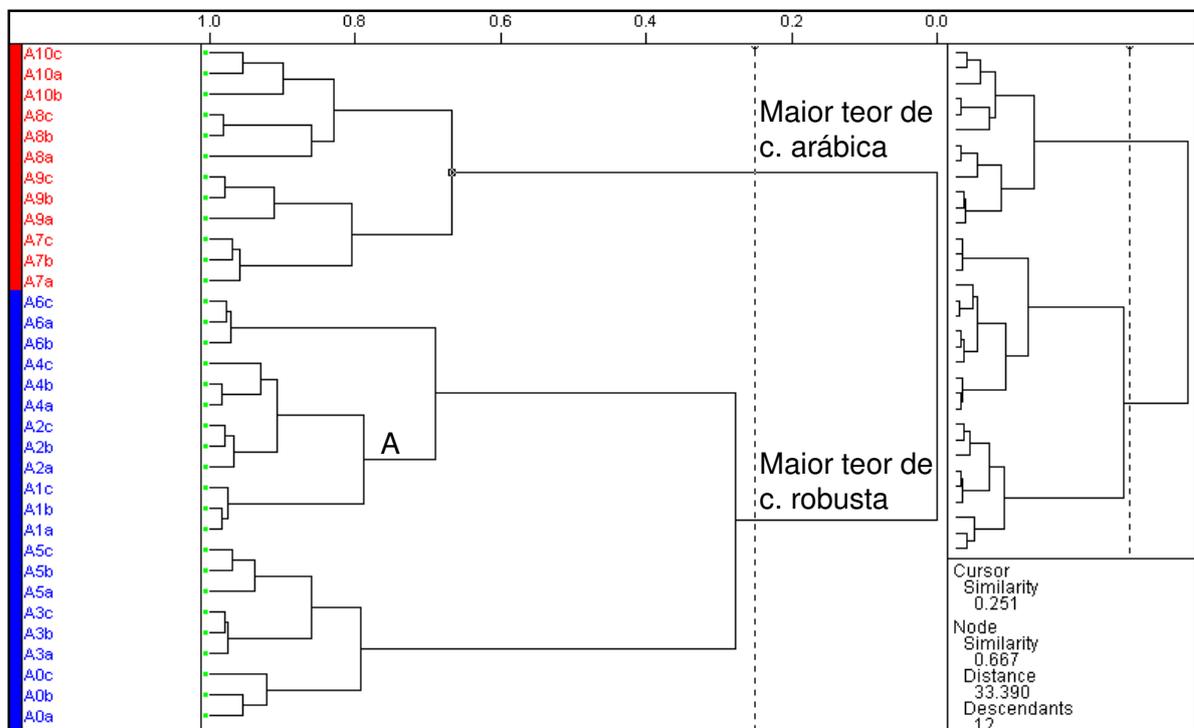


FIGURA 2.3.3.3 - Dendrograma obtido do HCA das misturas de cafés torrados das espécies arábica e robusta, para os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos num equipamento de 9,4T

Mesmo não tendo obtido bons resultados na análise exploratória usando cafés torrados, os modelos de classificação e calibração foram construídos para comparação. No modelo KNN, foram selecionados três vizinhos mais próximos para serem utilizados na previsão da classe de amostras futuras. Pois, quando  $k=3$  não ocorre nenhum erro de previsão para as amostras de treinamento.

No modelo de classificação SIMCA, foram necessárias sete componentes principais para descrever a classe 1, e cinco, a classe 2, representando 80,6 e 74,3% de variância, respectivamente. As TABELAS 2.3.3.1 e 2.3.3.2 mostram os resíduos e distâncias entre as classes das amostras, os quais indicam que as mesmas são compactas e distantes entre si, pois apresentam resíduos intraclasse pequenos comparados aos interclasses, e a distância entre as classes é maior que 3.

TABELA 2.3.3.1 - Resíduo entre as classes arábica (2) e robusta (1), para os dados de cafés torrados

	<b>Classe 1</b>	<b>Classe 2</b>
<b>Classe 1</b>	0,132	2,309
<b>Classe 2</b>	2,772	0,190

TABELA 2.3.3.2 - Distância entre as classes arábica (2) e robusta (1), para os dados de cafés torrados

	<b>Classe 1</b>	<b>Classe 2</b>
<b>Classe 1</b>	0,000	14,615
<b>Classe 2</b>	14,615	0,000

Para verificar a eficiência dos modelos foram utilizadas duas amostras teste. A TABELA 2.3.3.3 mostra o resultado da atribuição da classe por ambos os métodos. Pode ser observado que o modelo KNN atribuiu corretamente a classe para 100% das amostras. Ao contrário, o modelo SIMCA não se mostrou eficiente e classificou corretamente somente 33,3%.

TABELA 2.3.3.3 - Previsão de classe obtido para amostras teste a partir dos métodos de classificação KNN e SIMCA aplicados aos dados de café torrado

<b>Amostra</b>	<b>Classe</b>	<b>KNN</b>	<b>SIMCA</b>
A20cda	1	1	0
A20cdb	1	1	0
A20cdc	1	1	0
A80cda	2	2	0
A80cdb	2	2	2
A80cdc	2	2	2

Para os modelos de calibração, o número ótimo de fatores selecionado foi de 4 para o PLS, e de 6 para o PCR, os quais descreveram 85,9 e 83,6% de variância dos dados, respectivamente. Considerando o número de componentes selecionado, para o modelo PLS foram obtidos: PRESS de 9,961; SEV de 0,607 e  $r$  de 0,9818, e para o PCR foram obtidos: PRESS de 11,327; SEV de 0,648 e  $r$  de 0,9793.

Os teores de café arábica nas amostras teste, previstos por esses métodos, estão apresentados na TABELA 2.3.3.4.

TABELA 2.3.3.4 - Previsão do teor de café torrado da espécie arábica em amostras teste feita pelos modelos de calibração PLS e PCR.

<b>Amostra</b>	<b>PLS (%)</b>	<b>PCR (%)</b>
A20cda	21,2	17,2
A20cdb	22,3	19,5
A20cdc	24,0	19,8
A80cda	78,2	81,1
A80cdb	89,6	93,0
A80cdc	90,0	92,1

Os modelos de calibração construídos para os cafés torrados fizeram a previsão com eficiência semelhante ao melhor método (PLS) aplicado nos espectros de café crus obtidos em equipamento de 4,7T, e determinaram o teor de café arábica nas misturas com erros de 9,95 e 8,38% para PLS e PCR, respectivamente.

Comparando todas as metodologias para a determinação do teor de café da espécie arábica em misturas, e considerando somente as amostras contendo 20 e 80% dessa espécie, as quais foram utilizadas como teste em todos os conjuntos de dados, o melhor resultado foi obtido pela aplicação do método PLS nos dados espectrais de cafés crus analisados no equipamento de 9,4T, o qual cometeu erro médio de somente 3,42%.

## **2.4 – CONCLUSÕES**

A aplicação conjunta das técnicas de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e quimiometria tornou possível a análise rápida e eficiente na discriminação das espécies de café arábica e robusta, as quais apresentam maior interesse comercial. Além da discriminação entre as espécies também foi possível determinar a proporção de cada uma contida em diferentes misturas.

Quanto à otimização da metodologia, as condições que mostraram melhores resultados tanto na discriminação, usando os métodos de classificação, quanto na determinação do teor de café arábica nas misturas foram a utilização de amostras de café cru, em comparação com os cafés torrados, e a obtenção dos espectros em equipamento de 9,4T, em comparação ao equipamento de 4,7T. Quanto aos métodos quimiométricos, o KNN mostrou ser mais eficiente na atribuição da classe das amostras apresentando maior número de acertos e o PLS mostrou ser mais eficiente na determinação do teor das espécies presentes cometendo menores erros de previsão.

## ***CAPÍTULO 3***

**ADULTERAÇÃO DE CAFÉ PELA ADIÇÃO DE CEVADA**

### **3.1 - OBJETIVOS**

Propor uma metodologia para a determinação direta da adulteração de café pela adição de cevada e a quantificação do teor adicionado em cafés comerciais, utilizando-se medidas espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$  e infravermelho juntamente com métodos quimiométricos.

## **3.2 – MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.2.1 - Amostras:

Foram utilizadas amostras de café e cevada torrados e moídos. As amostras padrões de café foram fornecidas pela cooperativa dos cafeicultores e agropecuaristas, COCAPEC, localizada em Franca/SP. As amostras de cevada e cafés comerciais (CaCBD, CaArl, CaRen e CaSeGr) foram obtidas em supermercados da cidade de São Carlos/SP. As composições das amostras usadas nas análises por RMN e por infravermelho são apresentadas na TABELA 3.2.1.1. As amostras de 2 a 13 foram obtidas a partir da mistura de diferentes proporções de uma única amostra padrão de café e cevada. As amostras 19, CBDC, e 20, CBD, foram preparadas a partir de um mesmo café comercial, sendo a primeira preparada com 20% de cevada para verificar o comportamento de amostras desconhecidas e adulteradas.

TABELA 3.2.1.1: Composições das misturas de café/cevada utilizadas nas análises via RMN e Infravermelho.

Amostra	Cód. amostra	RMN		IV	
		teor de café (%)	teor de cevada (%)	teor de café (%)	teor de cevada (%)
1	Ca100	100	0	100	0
2	Ca90	90	10	84,9	15,1
3	Ca80	80	20	76,2	23,8
4	Ca70	70	30	67,3	32,7
5	Ca60	60	40	59,4	40,6
6	Ca50	50	50	52,5	47,5
7	Ca40	40	60	42,2	57,8
8	Ca30	30	70	32,7	67,3
9	Ca20	20	80	21,5	78,5
10	Ca10	10	90	14,4	85,6
11	Ce100	0	100	0	100
12	Ce10	90	10	90,2	9,8
13	Ce70	30	70	33,7	66,3
14	Ca2049	100	0	100	0
15	Ca6693	100	0	100	0
16	Ca9832	100	0	100	0
17	CaB056	100	0	100	0
18	CaB129	100	0	100	0
19*	CaCBDC	desc.	20	desc.	20,6
20**	CaCBD	desc.	desc.	desc.	desc.
21**	CaArl	desc.	desc.	desc.	desc.
22**	CaRen	desc.	desc.	desc.	desc.
23**	CaSeGr	desc.	desc.	desc.	desc.

\* Amostra comercial preparada com 20% de cevada, \*\* amostras comerciais preparadas conforme obtidas e sem adição de adulterantes. (desc.: teor desconhecido)

### 3.2.2 - Medidas espectroscópicas:

Para as análises de RMN de  $^1\text{H}$ , as amostras foram preparadas e os espectros adquiridos e processados conforme descrito no capítulo 2 para as amostras de café cru. Os parâmetros que diferiram daqueles descritos para essas

amostras foram: janela espectral de 6410 Hz (SWH), tempo de aquisição de 5,1 s (AQ) e fator de ganho do receptor de 92 (RG).

Para as análises de infravermelho, as pastilhas foram preparadas contendo 1% de amostra (café/cevada), nas proporções indicadas na TABELA 3.2.1.1, e 99% de KBr. Os espectros foram registrados em um espectrômetro BOMEM Hartmann & Braun (modelo MB - Series), sendo realizados em triplicata, com resolução de  $4\text{cm}^{-1}$  e 24 varreduras. A região espectral registrada foi de  $4000 - 400\text{cm}^{-1}$ .

Após a obtenção dos espectros por ambas as técnicas, fez-se a correção de fase e linha de base para minimizar os erros provenientes de seus processamentos.

### 3.2.3 - Análise quimiométrica:

A análise quimiométrica, aplicada separadamente aos dados de RMN e infravermelho, foi feita conforme descrito no capítulo 2. As amostras 1 a 11 da TABELA 3.2.1.1 foram usadas na construção dos modelos de classificação (KNN) e calibração (PLS e PCR); as amostras 12 a 18, na validação externa, e de 19 a 23, que são comerciais, foram usadas na previsão dos teores de café.

### 3.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cevada é uma das principais impurezas usadas para a adulteração do café no Brasil. Por isso, esse trabalho teve o objetivo de desenvolver uma metodologia baseada nas diferenças químicas entre o café e a cevada para determinar a autenticidade de amostras comerciais. Portanto, foram feitos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de infravermelho para amostras de café puro, comerciais, cevada pura e misturas de ambos em diferentes proporções, e em seguida, esses dados de ambas as técnicas foram tratados separadamente por métodos quimiométricos.

#### 3.3.1 – Análise do conjunto de dados obtidos por RMN de $^1\text{H}$ :

A FIGURA 3.3.1.1 mostra que a composição química do café torrado difere significativamente em relação a da cevada. No espectro do café pode ser observado uma maior diversidade e quantidade de compostos, como por exemplo os compostos aromáticos (ácidos clorogênicos, cafeína, trigonelina, *N*-metilpiridina), e ácido fórmico, na região de 6,0 a 9,3 ppm e compostos lipídicos, aminoácidos e ácidos alifáticos, na região de 0,7 a 3,0 ppm. Em contrapartida, o espectro de cevada mostra que essa é composta praticamente por carboidratos.

Na análise por componentes principais efetuou-se a otimização dos parâmetros quimiométricos para obter uma melhor discriminação entre amostras, bem como a seleção das variáveis com maior poder de discriminação.

Para seleção das variáveis, tomaram-se diferentes regiões do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , combinando-as entre si. A região de 0,8 a 5,6 ppm, que inclui os sinais não destacados na FIGURA 3.3.1.1, apresentou melhores resultados do que aqueles observados para a região de hidrogênios aromáticos (6,2 a 9,3 ppm). Entretanto, o resultado mais significativo foi obtido com o uso de todos os sinais do espectro, excluindo-se apenas os sinais referentes às regiões da referência interna (TMSP), do resíduo de  $\text{H}_2\text{O}/\text{HDO}$  e dos ruídos. A FIGURA 3.3.1.1 mostra os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do café (A), da cevada (D) e de algumas misturas (B e C) com diferentes proporções de cevada e café, e em cinza estão as regiões excluídas da análise.

Os parâmetros utilizados na análise por componentes principais que conduziram a uma melhor discriminação entre as amostras de café/cevada foram o pré-processamento autoescalado, e as transformações: normalização para um valor máximo de 100 e primeira derivada aplicada em um intervalo de quinze pontos.

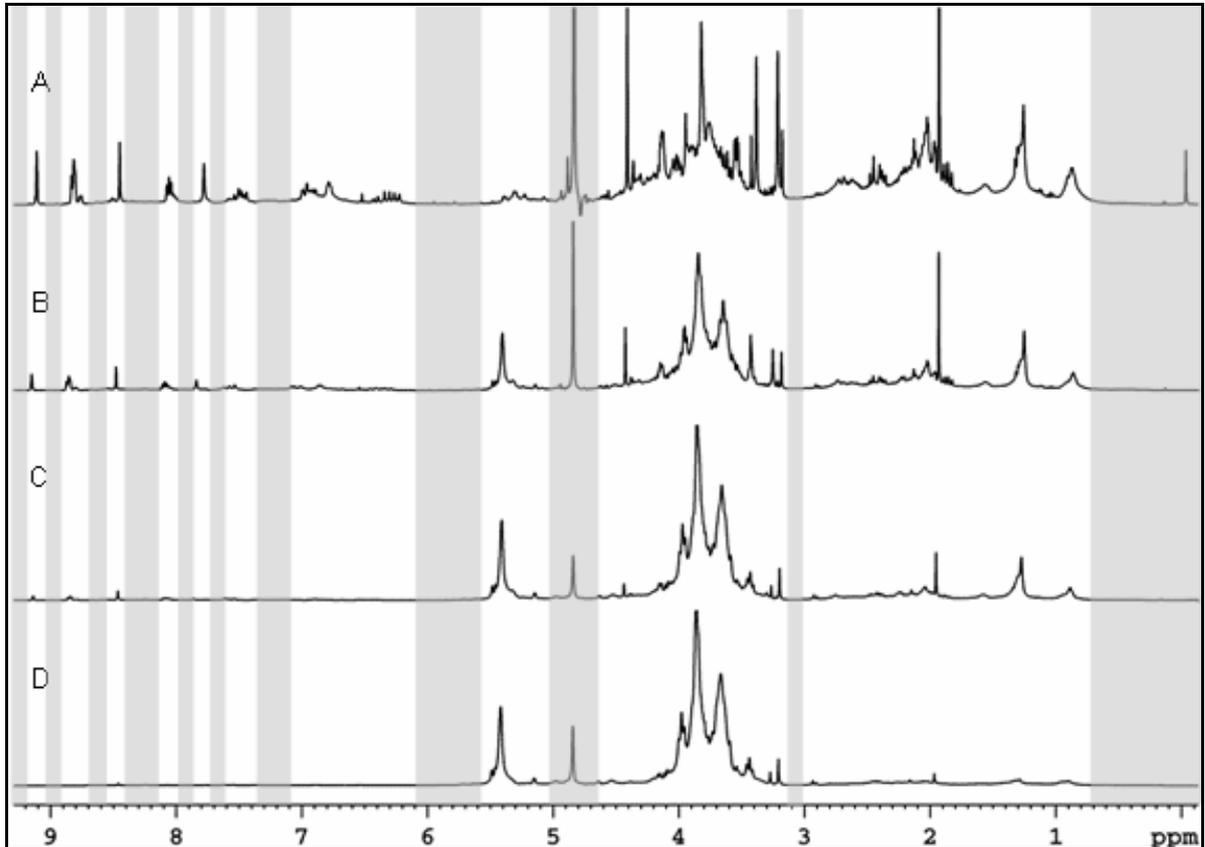


FIGURA 3.3.1.1 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de café (A), 70% café + 30% cevada (B), 30% café + 70% cevada (C) e cevada (D), mostrando em cinza as regiões excluídas das análises quimiométricas.

O número de componentes principais necessárias para descrever o sistema de dados foi quatro, explicando 77,0% da variância do conjunto de dados originais.

A FIGURA 3.3.1.2 apresenta o gráfico de *scores* das duas primeiras componentes principais, onde observa-se uma discriminação entre as amostras em dois grupos, em PC1. Um, à direita, contendo as misturas com maior teor de café e outro, à esquerda, contendo as amostras com maior teor de cevada. Pode ser verificado também que a amostra com maior teor de cevada (100%) em sua composição, ce100, está localizada em valores mais negativos de *scores* em PC1, e conforme o teor de cevada vai diminuindo e o de café vai aumentando, as amostras

são distribuídas em valores de *scores* mais positivos. As variáveis responsáveis por esse comportamento não puderam ser identificadas no gráfico de *loadings*, pois após o autoescalamamento ele não retém a mesma escala que os dados originais, sendo de difícil interpretação. Entretanto, por comparação entre os espectros originais, pode-se dizer que as amostras localizadas à direita, em PC1, estão relacionadas a um alto teor dos compostos presentes no café (cafeína, trigonelina, ácidos clorogênicos, ácido quínico, ésteres de ácidos graxos, etc.) e as amostras localizadas à esquerda, a um baixo teor desses compostos e alto teor daqueles presentes na cevada (polissacarídeos).

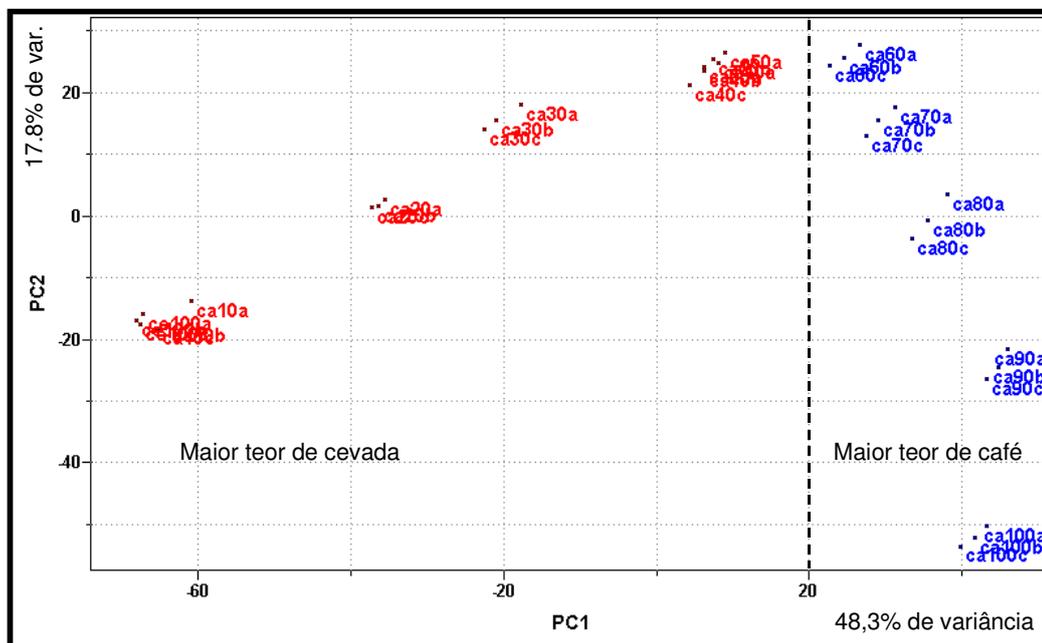


FIGURA 3.3.1.2 – Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos dados obtidos via RMN de  $^1\text{H}$  para as amostras de café/cevada.

Após a análise exploratória no conjunto de dados contendo as amostras de treinamento, de 1 a 11, seguiu-se às análises de classificação e de calibração para determinar de forma mais segura a que grupo ou classe pertencem as amostras comerciais e também o teor de café contido em cada uma.

O método de classificação SIMCA não apresentou resultados eficientes, mesmo após várias tentativas de otimização do modelo. Portanto, a classificação das amostras foi feita através do método KNN.

O modelo KNN foi construído a partir das variáveis e os parâmetros selecionados na análise por PCA. O número de vizinhos mais próximos escolhido foi

três, pois utilizando-se três vizinhos não ocorre nenhum erro de previsão para as amostras de treinamento (FIGURA 3.3.1.3).

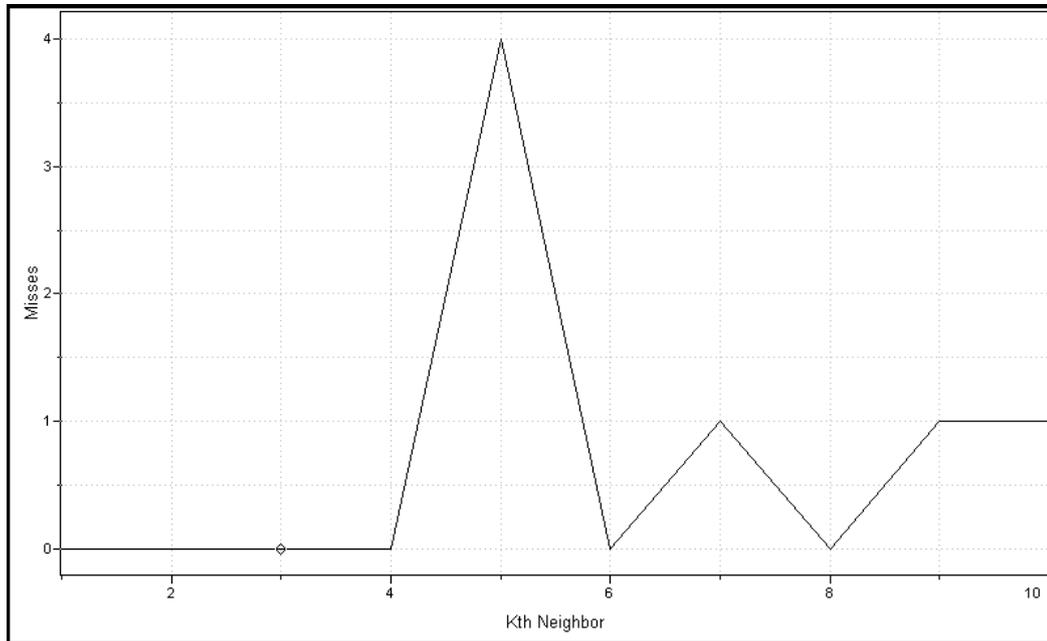


FIGURA 3.3.1.3 – Gráfico do K-ésimo vizinho mais próximo versus o número de erros de previsão para as amostras de treinamento, obtido pelo modelo KNN aplicado aos dados de RMN para amostras de café/cevada

O modelo construído mostrou grande eficiência na previsão da classe das amostras teste (12 - 18), apresentando um número de acertos de 100% (TABELA 3.3.1.1). Tendo a alta eficiência do modelo, esse foi aplicado às amostras comerciais (19 - 23). O resultado, indicado na TABELA 3.3.1.1, mostra que todas elas foram atribuídas à classe contendo maior teor de café, não sendo detectada nenhuma irregularidade.

TABELA 3.3.1.1 - Previsão de classe obtido para as amostras de café/cevada a partir do método de classificação KNN

Amostra*	Cód. Amostra	Classe	KNN
12	ce10	2	2
13	ce70	1	1
14	ca2049	2	2
15	ca6693	2	2
16	ca9832	2	2
17	caB056	2	2
18	caB129	2	2
19	caCBDC	desc.	“2”
20	caCBD	desc.	2
21	caArl	desc.	2
22	caRen	desc.	2
23	caSeGr	desc.	2

\*Medidas feitas em triplicata. Todas as replicatas de uma mesma amostra foram atribuídas à uma única classe. “.” Classe esperada considerando-se a amostra autêntica

Para determinar o teor de café nas misturas café/cevada foram utilizados os métodos de regressão multivariada PLS e PCR, os quais foram aplicados nas variáveis selecionadas na análise por PCA e utilizando-se os mesmos parâmetros também otimizados nesse método. O número ótimo de componentes principais, como descrito no capítulo 2, foi estabelecido para um valor mínimo de PRESS VAL e SEV.

No modelo PLS, foram selecionadas quatro componentes principais. O valor de PRESS VAL e SEV foram da ordem de 17,5032 e 0,7283, respectivamente. Os primeiros quatro fatores explicaram 72,7% da variância total dos dados e o coeficiente de regressão foi de 0,99994, o qual representa uma boa concordância entre os valores preditos pelo modelo e os valores medidos experimentalmente, como mostra a FIGURA 3.3.1.4.

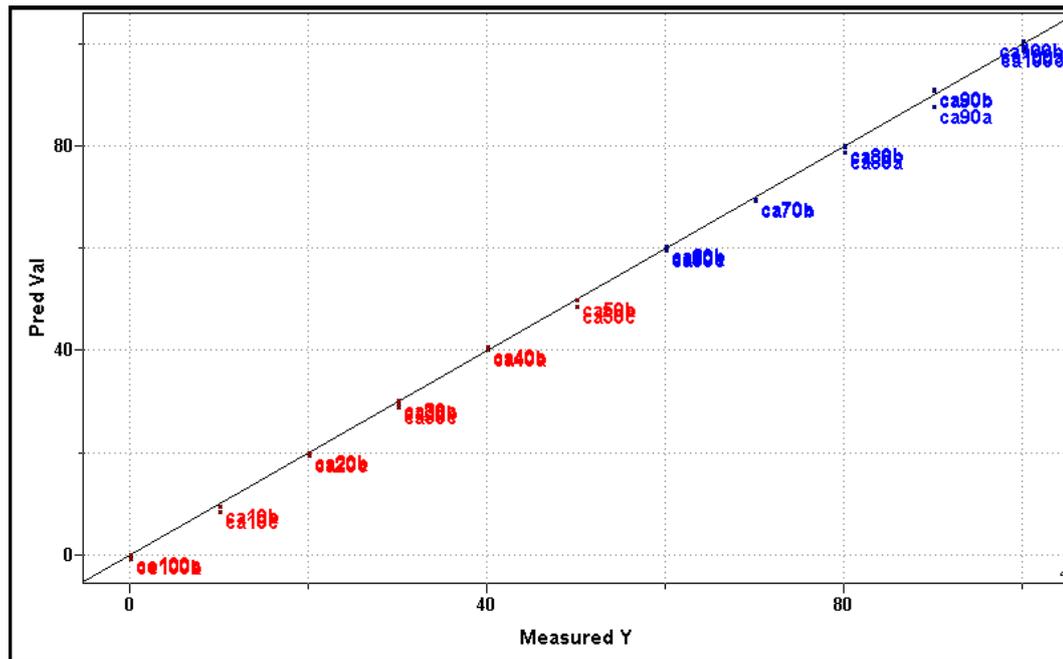


FIGURA 3.3.1.4 - Teores de café medidos versus teores estimados para amostras de café/cevada, obtidos pelo modelo PLS aplicado aos dados de RMN

Quando o método de regressão utilizado foi o PCR, oito componentes principais foram necessárias para descrever 89,7% da variância total. Os valores mínimos de PRESS VAL e SEV foram de 26,2819 e 0,8924, respectivamente, e o coeficiente de regressão foi de 0,99987. Apesar do coeficiente de regressão ser levemente inferior ao obtido pelo método PLS, a FIGURA 3.3.1.5 mostra que há uma boa concordância entre os valores estimados pelo modelo e os valores experimentais (informados ao modelo).

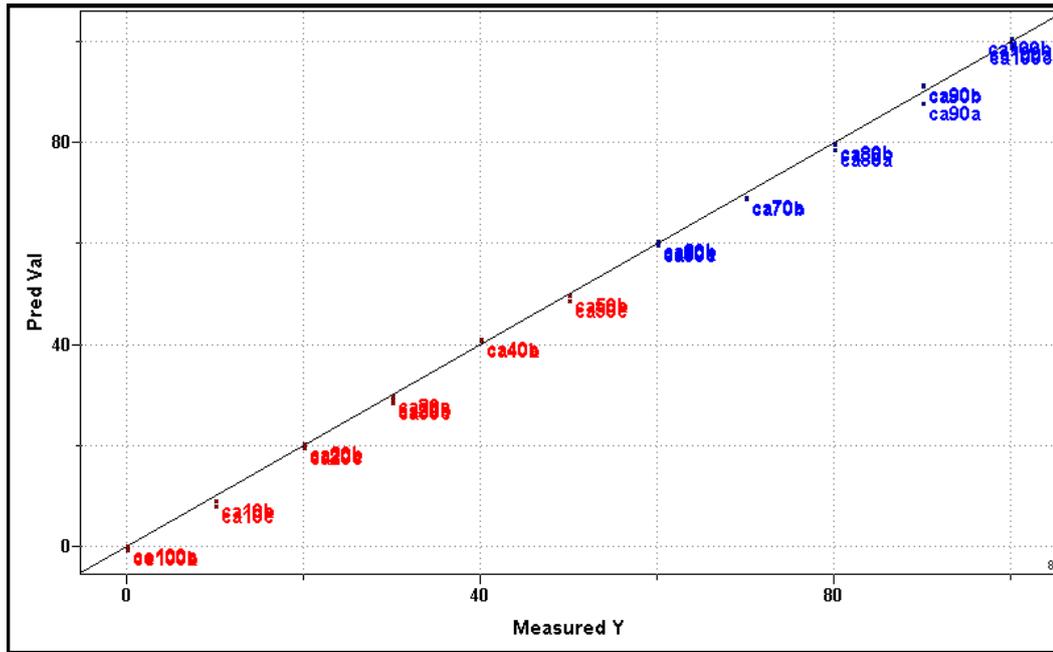


FIGURA 3.3.1.5 - Teores de café medidos versus teores estimados para amostras de café/cevada, obtidos pelo modelo PCR aplicado aos dados de RMN

Ambos os modelos foram igualmente eficientes e previram os teores de café para as amostras teste com erros médios de 5,3% e 5,6% para PLS e PCR, respectivamente. Os resultados determinados para as amostras teste e amostras comerciais encontram-se indicados na TABELA 3.3.1.2. Com relação às amostras comerciais, essas apresentaram teores de café em torno de 100%, considerando-se os erros médios mencionados. A única amostra que teve seu teor de café estimado abaixo do valor considerado no erro de previsão, e portanto a única suspeita de conter impurezas como a cevada adicionada, foi a caRen, cujo teor médio ficou em torno de 94,2%.

TABELA 3.3.1.2: Previsão do teor de café em misturas café/cevada feita pelos métodos PLS e PCR, aplicados aos dados de RMN de  $^1\text{H}$ .

Amostra	Cód. Amostra	PLS (%)	PCR (%)	Teor real (%)
12	ce10	84,6 ± 1,80	84,1 ± 2,15	90,0
13	ce70	30,8 ± 0,25	30,6 ± 0,25	30,0
14	ca2049	97,4 ± 0,25	96,8 ± 0,40	100,0
15	ca6693	88,6 ± 0,44	88,0 ± 0,31	100,0
16	ca9832	94,0 ± 0,70	93,3 ± 0,60	100,0
17	caB056	96,7 ± 0,21	96,5 ± 0,12	100,0
18	caB129	91,2 ± 0,51	90,7 ± 0,46	100,0
19*	caCBDC	78,7 ± 0,44	78,8 ± 0,55	“80,0”
20**	caCBD	98,3 ± 0,50	98,1 ± 0,36	-
21**	caArl	95,9 ± 1,18	96,0 ± 1,18	-
22**	caRen	94,2 ± 1,10	94,8 ± 1,10	-
23**	caSeGr	94,9 ± 0,61	95,0 ± 0,49	-

\* Amostra comercial preparada com 20% de cevada, \*\* amostras comerciais preparadas conforme obtidas e sem adição de adulterantes. “.” Teor esperado considerando-se a amostra autêntica

### 3.3.2 - Análise do conjunto de dados obtidos por infravermelho:

Sabe-se que a técnica de infravermelho apresenta como uma de suas diversas vantagens o baixo custo, tanto no que se refere ao valor do equipamento como à preparação das amostras. Nessa etapa do trabalho, a espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada de forma semelhante à de ressonância magnética nuclear mencionada no item anterior, com o intuito de detectar adulterações com adição de cevada em cafés comerciais, bem como quantificá-la.

A FIGURA 3.3.2.1 ilustra os espectros na região do infravermelho para amostras de café (A) e de cevada (B). As principais diferenças observadas entre eles foram: a presença da absorção em  $1744\text{ cm}^{-1}$ , no espectro de café, a qual segundo KEMSLEY *et al.* (1995) e RUBAYIZA e MEURENS (2005), são atribuídas aos estiramentos da ligação C=O da carbonila de ésteres dos ácidos graxos linoleico e palmítico, que são os lipídeos majoritários presentes no café. A maior intensidade de outras absorções no espectro de café também são observadas, tais como em  $2854\text{ cm}^{-1}$  e  $2924\text{ cm}^{-1}$  que correspondem aos estiramentos simétricos e assimétricos da ligação C-H. Além dessas, podem ainda ser observadas absorções

em  $1654\text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos da dupla ligação C=C, em  $1457\text{ cm}^{-1}$  atribuída a deformações de ligações H-C  $\text{sp}^3$  e em  $1384$ ,  $1157$ ,  $1079$  e  $1026\text{ cm}^{-1}$  que, de acordo com KEMSLEY *et al.* (1995) se localizam na região característica de carboidratos, devido aos estiramentos da ligação C-O.

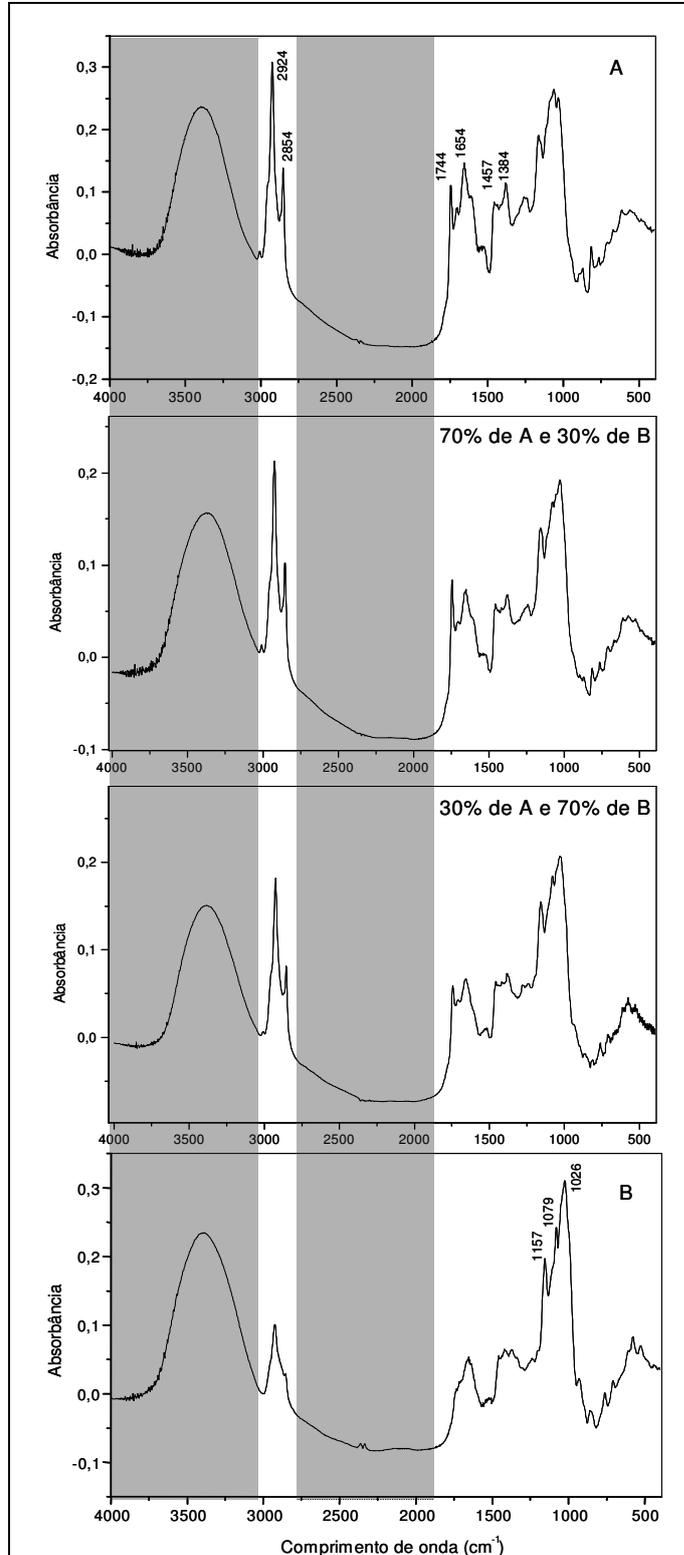


FIGURA 3.3.2.1 - Espectros na região do infravermelho para amostras de café (A) e cevada (B), mostrando em cinza as regiões excluídas das análises quimiométricas.

A análise visual de todos os espectros sobrepostos permitiu encontrar uma região essencial para a distinção entre amostras de café e cevada; de 2750 a 3000  $\text{cm}^{-1}$ . A FIGURA 3.3.2.2 mostra tal região, na qual pode ser observado que conforme aumenta o teor de café nas amostras, as absorções referentes aos estiramentos simétricos e assimétricos da ligação C-H dos grupos etílicos apresentam-se mais intensas.

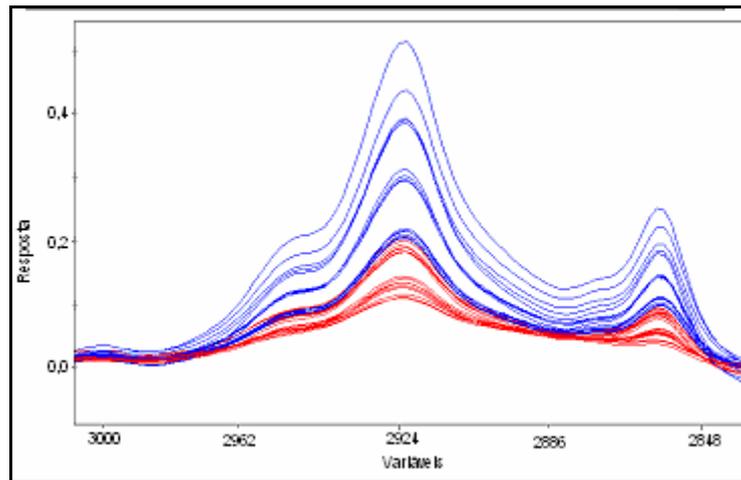


FIGURA 3.3.2.2 – Gráfico de linhas mostrando o aumento da intensidade das absorções de estiramentos dos grupos etílicos com o aumento do teor de café. (●) café e (●) cevada

A seleção de variáveis realizada a partir da aplicação da análise por PCA em diferentes regiões do espectro confirmou a maior importância das bandas em 2924 e 2854  $\text{cm}^{-1}$  para a discriminação entre as amostras e permitiu verificar uma contribuição menos significativa das demais absorções. Como todas elas contribuíram para um melhor resultado, somente foram excluídas da análise as regiões em cinza na FIGURA 3.3.2.1, que se referem aos ruídos e absorções de estiramentos antissimétricos de C=O, da molécula de  $\text{CO}_2$  proveniente do ambiente, e de estiramentos da ligação O-H, da água, possivelmente de umidade.

Os parâmetros utilizados na análise de componentes principais e que levaram a uma melhor discriminação entre as amostras foram: centralizar os dados na média e normalizar para um valor máximo de 100.

O número de componentes principais necessárias para descrever o sistema de dados foi quatro, explicando 96,2% de variância.

A discriminação das amostras está apresentada na FIGURA 3.3.2.3. Observa-se que em PC1 versus PC2 as amostras são discriminadas em dois grupos

como ocorre no estudo por RMN (FIGURA 3.3.1.2, p. 67). Também é possível observar claramente a tendência das amostras em se localizar em *scores* mais positivos em PC1, quando o teor de café é aumentado. Dessa forma, a amostra contendo 100% de café (Ca100) se localizou em *scores* mais positivos, enquanto a que contém 100% de cevada (Ce100) se localizou em *scores* mais negativos.

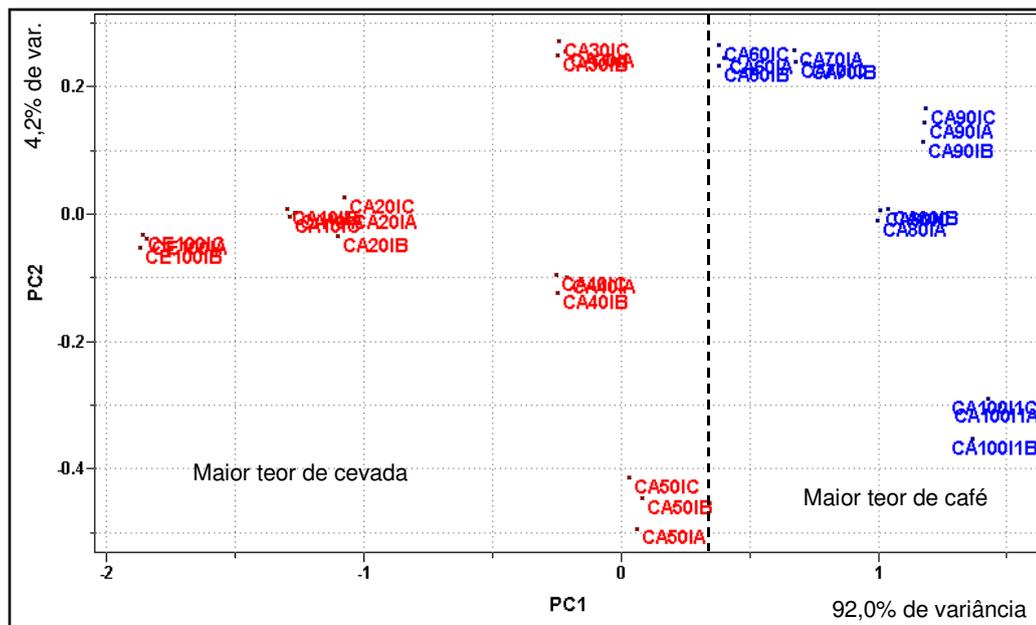


FIGURA 3.3.2.3 - Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos dados obtidos via infravermelho para as amostras de café/cevada.

No modelo de classificação KNN não houve nenhum erro de predição de classe para o conjunto de amostras de treinamento quando foram considerados diferentes números de vizinhos mais próximos ( $1 \leq k \leq 10$ ). Dessa forma, o número de  $k$  vizinhos mais próximos selecionado para o modelo foi três.

Com relação à eficiência do modelo, esse foi bastante satisfatório atribuindo a classe corretamente para 100% das amostras teste. Tendo uma ótima capacidade preditiva, o método foi aplicado para determinar a classe de amostras comerciais (19 - 23). Os resultados mostraram que, com exceção da amostra caRen, todas foram atribuídas à classe daquelas com maior teor de café. Acredita-se que a amostra caRen foi atribuída de forma errônea. Pois, não houve concordância com os métodos de classificação e calibração por RMN, tendo esses assegurado um maior teor de café em sua composição e em torno de 94,2%. De fato, o teor de café determinado pelos métodos de calibração usando a técnica RMN teve o menor valor dentre as amostras comerciais analisadas. Mas, ainda mostrou-se bem acima do

limite de 50%. O mesmo também pode ser observado para os métodos aplicados aos dados de infravermelho, os quais serão discutidos adiante, e que determinaram o teor de café em torno de 72,7 e 69,2% para PLS e PCR, respectivamente, confirmando assim um maior teor de café e não de cevada nessa amostra.

O modelo de calibração PLS foi construído utilizando-se três componentes principais, as quais explicaram 97,0% da variância total dos dados. O valor de PRESS VAL foi da ordem de 235,947; o SEV de 2,674 e o coeficiente de regressão foi de 0,9975, o qual apresentou uma boa concordância entre os valores preditos pelo modelo e os valores experimentais para o teor de café nas amostras, como mostra a FIGURA 3.3.2.4.

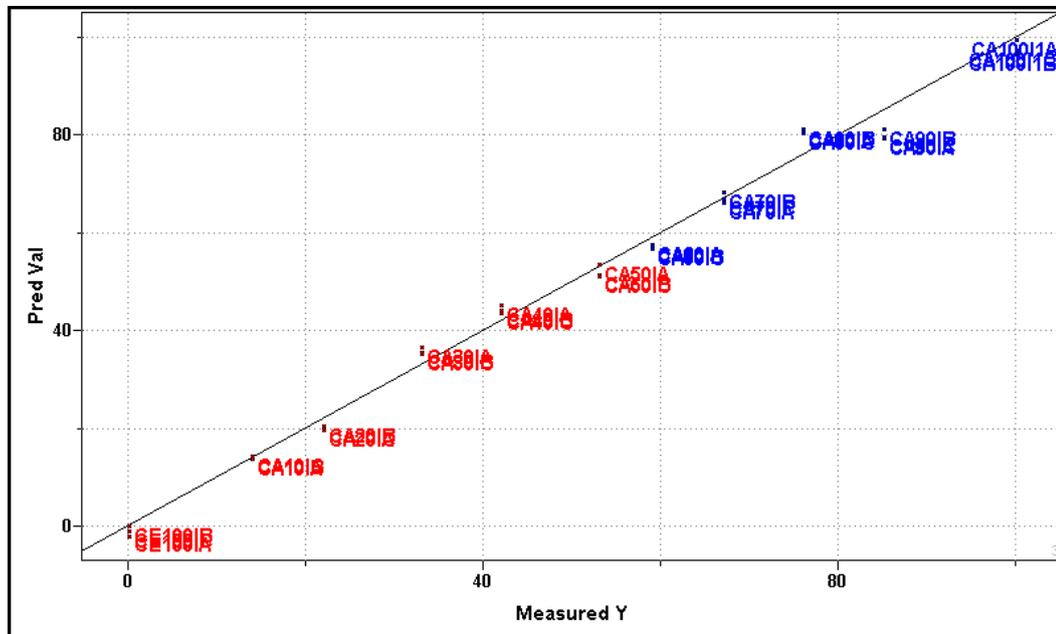


FIGURA 3.3.2.4 - Teores de café medidos versus teores estimados para amostras de café/cevada, obtidos pelo modelo PLS aplicado aos dados de infravermelho.

Quando o método de regressão utilizado é o PCR, duas componentes principais foram necessárias para descrever 96,2% da variância total. Os valores mínimos de PRESS VAL e SEV foram de 546,603 e 4,070, respectivamente, e o coeficiente de regressão foi de 0,9927.

A FIGURA 3.3.2.5 mostra os valores medidos e os valores previstos pelo modelo PCR, onde observa-se uma concordância razoável entre os mesmos.

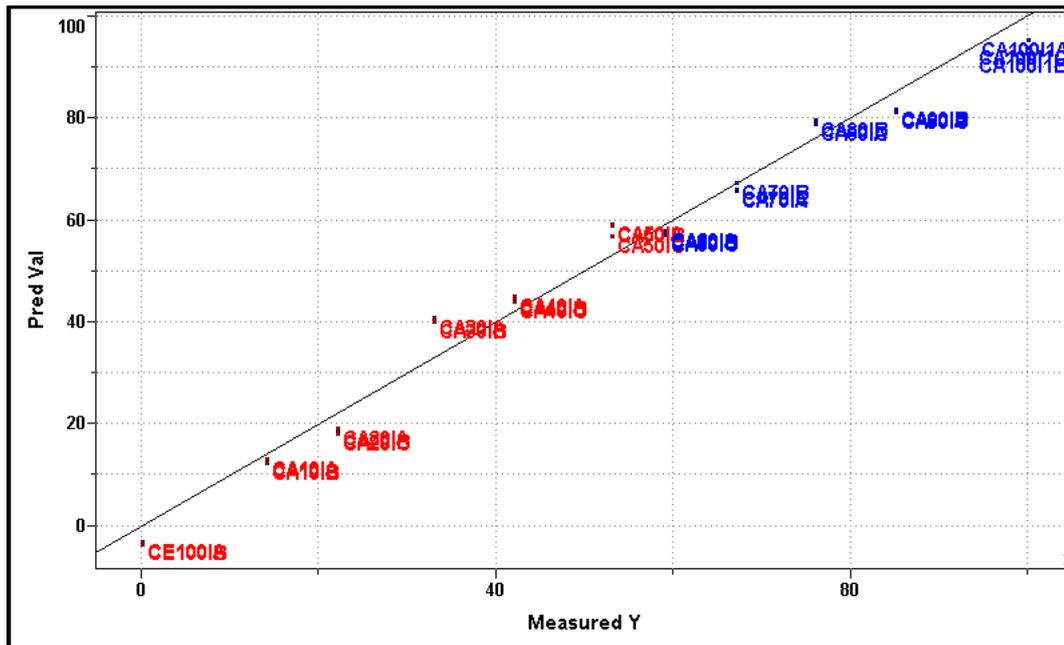


FIGURA 3.3.2.5 - Teores de café medidos versus teores estimados para amostras de café/cevada, obtidos pelo modelo PCR aplicado aos dados de infravermelho

Considerando-se as amostras teste (12 - 18) indicadas na TABELA 3.3.2.1, os dois modelos de calibração tiveram eficiência semelhante na determinação do teor de café, sendo as previsões feitas pelo PLS com erro médio de 2,9% e pelo PCR de 4,6%. Esses modelos foram aplicados às amostras comerciais e os resultados também se encontram na TABELA 3.3.2.1. Apesar de apresentarem, na validação externa, erros de previsão médios menores que aqueles observados para os dados de RMN, acredita-se que para as amostras comerciais os erros cometidos foram maiores, considerando-se que elas sejam autênticas. Isso também seria esperado para as amostras teste, já que os coeficientes de regressão para PLS e PCR aplicados aos dados de infravermelho foram inferiores aos de RMN. Mais uma vez verifica-se a necessidade de construir modelos com maior número de amostras para torná-los mais representativos e seguros, garantindo a aplicabilidade em sistemas reais. Outro fator que confirma essa necessidade é a observação de um teor superior a 100% de café (TABELA 3.3.2.1), para a amostra 20 (caCBD), o que provavelmente se deve ao fato dessa apresentar absorções mais intensas que aquelas observadas nos espectros das amostras utilizadas na construção dos modelos quimiométricos.

De acordo com a TABELA 3.3.2.1, das cinco amostras comerciais estudadas (19 - 23), quatro (20 - 23) tiveram seus teores de café abaixo dos

estabelecidos dentro do erro relativo calculado para os modelos. Nesse sentido, a amostra caRen apresentou o menor teor, o que corrobora com os resultados previamente apresentados, tornando-se questionável a autenticidade dessa amostra.

TABELA 3.3.2.1: Previsão do teor de café em misturas de café/cevada feita pelos métodos de calibração PLS e PCR aplicados aos dados de infravermelho.

Amostra	Cód. Amostra	PLS (%)	PCR (%)	Teor real (%)
12	ce10	84,9 ± 1,00	84,1 ± 1,31	90,2
13	ce70	33,5 ± 1,15	34,2 ± 0,84	33,7
14	ca2049	92,6 ± 0,85	87,8 ± 1,04	100,0
15	ca6693	96,7 ± 2,58	94,7 ± 2,90	100,0
16	ca9832	99,2 ± 1,50	99,8 ± 1,03	100,0
17	caB056	99,1 ± 1,17	98,7 ± 0,85	100,0
18	caB129	97,5 ± 0,50	95,1 ± 1,04	100,0
19*	caCBDC	77,8 ± 0,15	80,1 ± 0,32	“79,4”
20**	caCBD	100,0 ± 0,81	102,1 ± 0,40	-
21**	caArl	90,5 ± 1,26	84,4 ± 1,68	-
22**	caRen	72,7 ± 1,26	69,2 ± 0,74	-
23**	caSeGr	94,6 ± 0,25	90,9 ± 0,71	-

\* Amostra comercial preparada com 20% de cevada, \*\* amostras comerciais preparadas conforme obtidas e sem adição de adulterantes. “.” Teor esperado considerando-se a amostra autêntica

Comparando os espectros na região do infravermelho da amostra caRen (FIGURA 3.3.2.6) com aqueles do café padrão e da cevada (FIGURA 3.3.2.1, p. 73) pode ser verificada uma característica intermediária às duas amostras, sugerindo ter em sua composição a adição de cevada. Entretanto, a análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H (FIGURA 3.3.2.7 e 3.3.1.1, p. 66) exclui essa hipótese, pois o mesmo não é observado. Uma evidência de que não houve adição de cevada é a ausência do sinal em 5,45 ppm, presente e com intensidade considerável no espectro da cevada pura. Por outro lado, algumas diferenças podem ser notadas em relação ao espectro do café autêntico (FIGURA 3.3.1.1 A), como por exemplo, a baixa concentração relativa dos compostos aromáticos, principalmente, dos ácidos clorogênicos, o alto teor de ácido fórmico (simpleto em 8,49 ppm), alanina (duplete em 1,48 ppm) e ácido quínico livre (1,85 – 2,30 ppm) e ainda, a alta intensidade do sinal em 6,55 ppm.

Todas essas alterações na composição da amostra caRen, no entanto, não sugerem a adição de nenhum adulterante. Como será discutido no capítulo 4, essas mesmas mudanças são verificadas para cafés que foram submetidos a um processo drástico de torrefação.

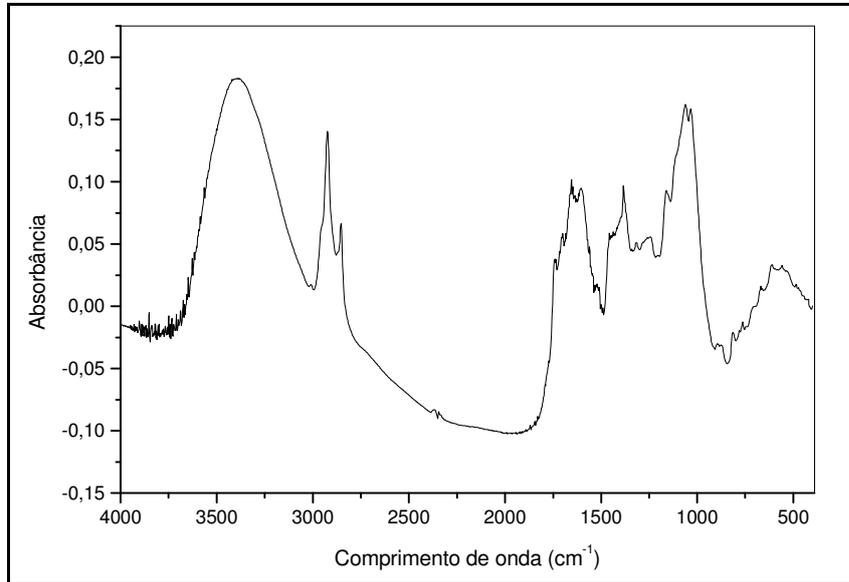


FIGURA 3.3.2.6 - Espectro na região do infravermelho da amostra de café comercial caRen.

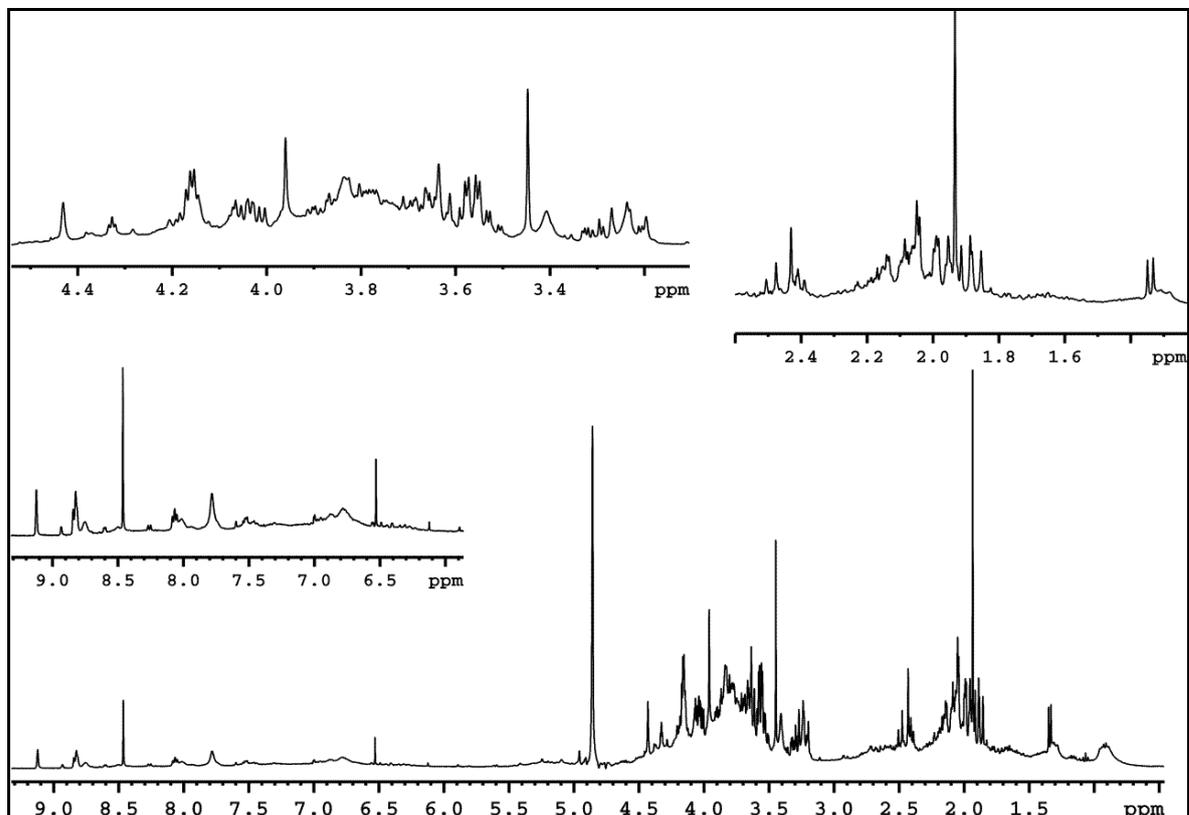


FIGURA 3.3.2.7 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da amostra de café comercial caRen.

### **3.4 – CONCLUSÕES**

O uso das técnicas de RMN e infravermelho juntamente com métodos quimiométricos mostrou-se uma poderosa ferramenta na análise da adulteração de cafés com a adição de cevada. O método PCA permitiu discriminar as amostras contendo maior teor de café daquelas contendo maior teor de cevada, sendo possível determinar os sinais/absorções responsáveis por essa discriminação. A construção e aplicação dos modelos de classificação e calibração permitiram definir de forma mais segura a qual classe pertence cada amostra, além de determinar seu teor de café/cevada. O modelo KNN apresentou grande eficiência, atribuindo a classe corretamente para 100% das amostras teste. Os modelos de calibração envolvendo dados de infravermelho apresentaram menores erros de previsão para as amostras teste, no entanto, os de RMN apresentaram melhores resultados para amostras comerciais, indicando a necessidade da inclusão de um número maior de amostras para a construção de modelos mais representativos para a aplicação em sistemas reais. No entanto, acredita-se que tanto a análise quimiométrica dos dados de RMN quanto de infravermelho pode ser aplicada com sucesso no controle de qualidade de cafés com a possível presença de adulterantes.

# ***CAPÍTULO 4***

**EFEITOS DO TEMPO E DA TEMPERATURA NA COMPOSIÇÃO  
QUÍMICA DO CAFÉ TORRADO**

#### **4.1 - OBJETIVOS**

Verificar a influência da temperatura e do tempo de torrefação na variação da composição química dos cafés e discriminar aqueles com diferentes graus de torra, a partir da aplicação do método PCA diretamente nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ .

## 4.2 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.2.1 - Amostras:

Foram analisadas 11 amostras de cafés provenientes do Sul de Minas Gerais, as quais foram fornecidas já torradas e na forma de bebida, pelo Dr. Luiz Henrique Mattoso, pesquisador da Embrapa Instrumentação de São Carlos. Os cafés foram processados em diferentes graus de torra, segundo um planejamento experimental que compreende as condições utilizadas nas indústrias brasileiras de torrefação. Os parâmetros de temperatura e tempo de torrefação foram variados conforme indicado na TABELA 4.2.1.1.

TABELA 4.2.1.1 – Intervalo de tempo e temperatura utilizados na torrefação das amostras analisadas

<b>Amostra</b>	<b>Tempo de torra (min)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
E1	12,15	204,3
E2	22,85	204,3
E3	12,15	225,7
E4	22,85	225,7
E5	17,50	215,0
E6	17,50	215,0
E7	17,50	215,0
E8	10,00	215,0
E9	17,50	230,0
E10	25,00	215,0
E11	17,50	200,0

As bebidas foram preparadas passando-se 500,0 mL de água em ebulição através de 50,00g de pó de café torrado, utilizando-se uma cafeteira comum com filtro de papel.

#### 4.2. 2 - Medidas espectroscópicas:

Os espectros foram obtidos e processados utilizando-se os parâmetros descritos no capítulo 2 para cafés crus, com exceção do solvente deuterado utilizado, que foi DMSO-d<sub>6</sub> (três gotas).

#### 4.2.3 - Análise quimiométrica:

O método de análise por PCA foi aplicado à matriz de dados contendo os espectros de RMN de <sup>1</sup>H das onze amostras, obtidos em triplicata. A análise foi feita utilizando-se o software AMIX VIEWER versão 3.2.2.

### 4.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma análise detalhada dos espectros de hidrogênio dos cafés torrados sob diferentes condições de temperatura e tempo permitiu verificar as principais alterações na composição química dos mesmos. As maiores alterações foram observadas na região aromática dos espectros. A atribuição completa dos deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para os constituintes majoritários presentes no café torrado pode ser encontrada em TAVARES e FERREIRA, (2006), apêndice A.

Para a análise do efeito do tempo de torra na constituição dos cafés torrados considere a FIGURA 4.3.1, a qual mostra os espectros de três amostras torradas na temperatura de 215 °C. Observa-se que quando os grãos foram torrados durante 10,0 min (A) ainda houve um alto teor de trigonelina e ácidos clorogênicos, quando o café foi submetido por período de tempo um pouco maior, de 17,5 min (B), ocorreu uma pequena degradação desses compostos e um pequeno aumento na produção de *N*-metilpiridina, que é um dos produtos majoritários da degradação térmica da trigonelina. Aumentando um pouco mais, para 25,0 min (C), observou-se uma maior degradação desses compostos e um aumento na produção de *N*-metilpiridina.

Para a análise do efeito da temperatura, considere a FIGURA 4.3.2, a qual mostra os espectros de três amostras torradas em um intervalo de 17,5 min. Da mesma forma que na análise do efeito do tempo, quando os grãos foram submetidos a uma temperatura de torra baixa, 200 °C (A), ainda verificou-se um alto teor de trigonelina e ácidos clorogênicos. Com o aumento da temperatura para 215 °C (B), houve a degradação desses compostos e um pequeno aumento na formação de *N*-metilpiridina. Quando a temperatura foi aumentada para 230 °C, houve uma maior degradação da trigonelina e ácidos clorogênicos e maior formação de *N*-metilpiridina. Comparando os espectros dos cafés torrados em um período maior de tempo (FIGURA 4.3.1 C) com aquele torrado a temperatura mais elevada (FIGURA 4.3.2 C) pôde ser verificado que a relação entre o teor de trigonelina e seu produto de degradação, *N*-metilpiridina, foi menor para o café submetido à temperatura mais elevada, indicando que esse parâmetro teve uma maior influência na alteração dos compostos durante a torra.

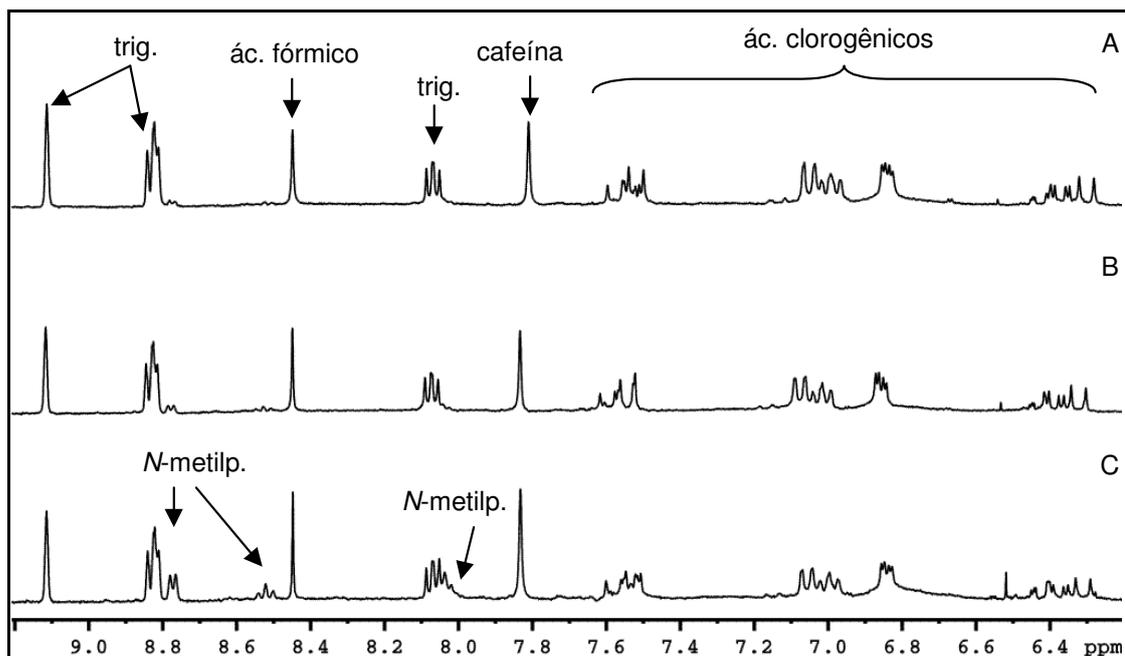


FIGURA 4.3.1 – Região de 6,2 a 9,2 ppm dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos cafés torrados a  $215\text{ }^\circ\text{C}$  e durante 10,0 min (A), 17,5 min (B) e 25,0 min (C)

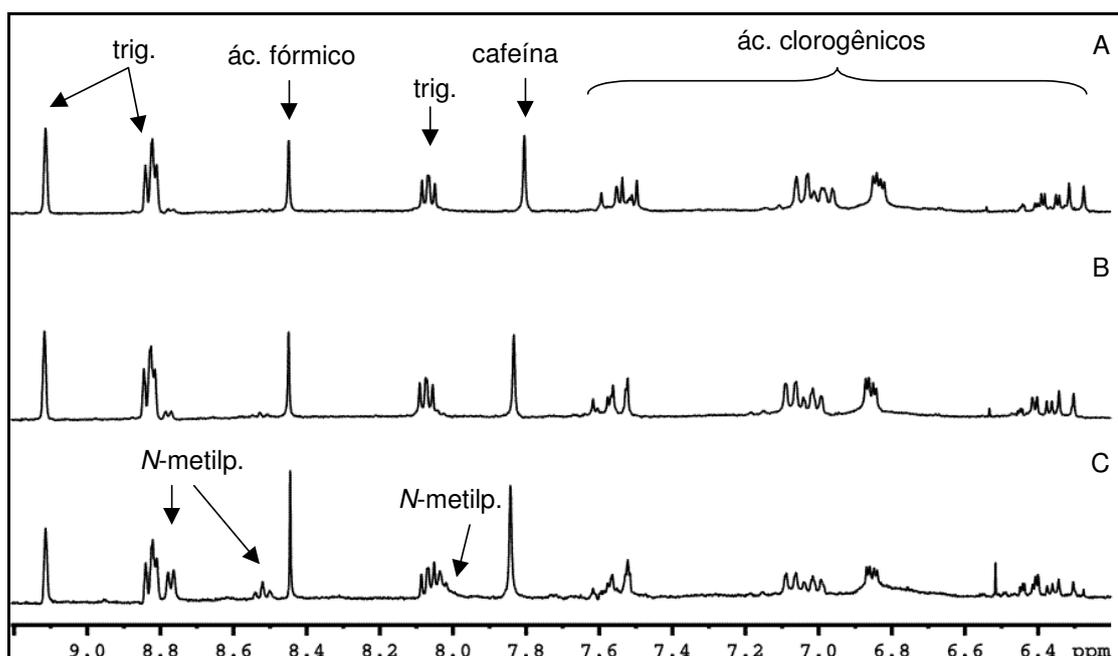
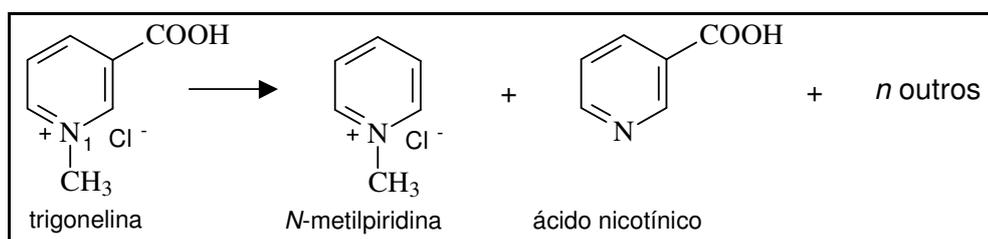


FIGURA 4.3.2 - Região de 6,2 a 9,2 ppm dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos cafés torrados a 17,5 min e nas temperaturas de  $200\text{ }^\circ\text{C}$  (A),  $215\text{ }^\circ\text{C}$  (B) e  $230\text{ }^\circ\text{C}$  (C)

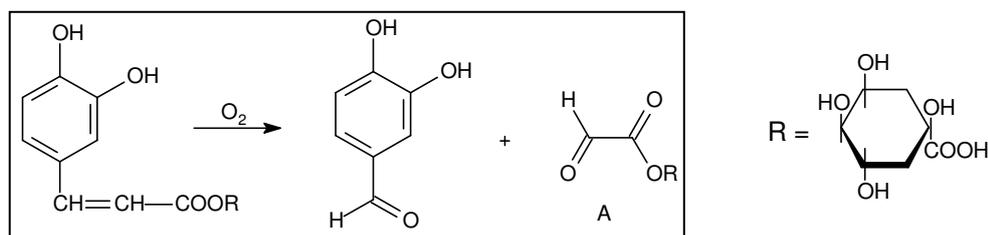
O processo de degradação térmica da trigonelina gera como produtos majoritários o ácido nicotínico (niacina) e a *N*-metilpiridina (esquema 4.3.1). Entretanto, muitos autores afirmam que o grau de torra pode ser verificado a partir da relação do teor de trigonelina com o teor de niacina formado, e poucas

referências mencionam a mesma relação para a *N*-metilpiridina, como foi feito em nosso trabalho. STADLER *et al.* (2002a) estudaram o efeito do tempo e da temperatura na formação e degradação da niacina e *N*-metilpiridina em sistemas modelo e verificaram que a niacina é mais resistente a condições severas de torrefação. Entretanto, nas condições utilizadas em nosso trabalho, a *N*-metilpiridina também pode ser utilizada para comparação do grau de torra sem grandes problemas, já que sua degradação foi verificada iniciar-se somente após 30 min sob aquecimento à temperatura de 230 °C, ou após 20 min a 240 °C.



Esquema 4.3.1 – Degradação térmica da trigonelina.

Devido ao aumento do grau de torra (tempo x temperatura) observou-se, ainda, um aumento na intensidade do simpleto em 8,45 ppm, que corresponde ao ácido fórmico e de um simpleto, não identificado, em 6,52 ppm. De acordo com BOSCO *et al.* (1999) o ácido fórmico é produzido pela degradação oxidativa dos ácidos clorogênicos, conforme o esquema 4.3.2. Após a oxidação, o fragmento A é degradado produzindo ácido fórmico, dióxido de carbono e ácido quínico livre.



Esquema 4.3.2 – Degradação oxidativa dos ácidos clorogênicos

Com relação ao sinal em 7,82 ppm, referente à cafeína, não se observou grandes variações na sua intensidade, houve um pequeno aumento, mas provavelmente não está relacionado com um aumento real no teor de cafeína e sim a um aumento relativo devido à perda de massa que ocorre neste processo (perda de umidade e voláteis).

Outras alterações na composição química dos cafés devido ao processo de torra também podem ser verificadas na região de 0,1 a 4,5 ppm como mostram os espectros apresentados na FIGURA 4.3.3. Conforme aumenta o tempo de torra (de A para C) ocorre um aumento no teor de alanina, o qual pode ser verificado pelo aumento do duplete em 1,45 ppm. Outra alteração é o aumento no teor de ácido quínico, provavelmente devido à degradação dos ácidos clorogênicos, que pode ser verificado pelo aumento na intensidade dos sinais em 4,15; 4,02; 3,55 e 1,80 – 2,10 ppm, dentre outras alterações.

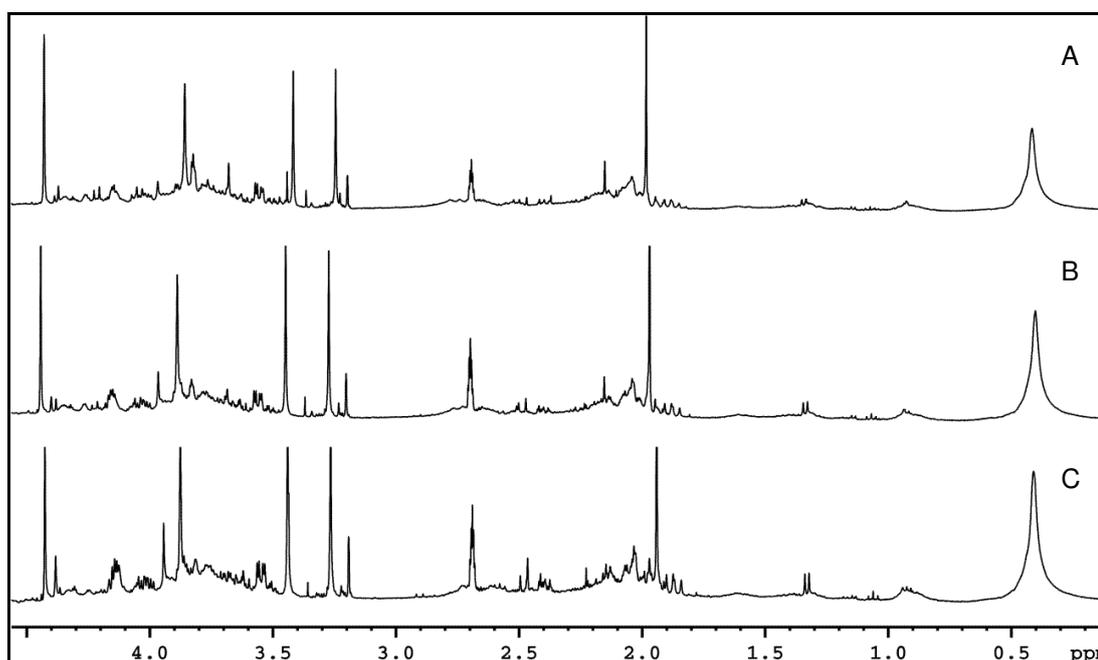


FIGURA 4.3.3 – Região de 0,1 a 4,5 ppm dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos cafés torrados a  $215\text{ }^\circ\text{C}$  e durante 10,0 min (A), 17,5 min (B) e 25,0 min (C)

Na análise quimiométrica, a seleção das variáveis para a discriminação entre os cafés com diferentes graus de torra corroborou com a análise visual dos espectros mostrando maior importância para a região de 6,00 a 10,00 ppm, a qual inclui os sinais dos hidrogênios referentes à trigonelina, *N*-metilpiridina, ácido fórmico, ácidos clorogênicos e cafeína.

Para a análise por PCA, utilizando o programa AMIX-VIEWER, a região do espectro analisada foi dividida em pequenos intervalos (*buckets*) de 0,50 ppm, os quais foram integrados e escalados pela intensidade total. O número ótimo de fatores selecionado foi cinco e descreveram 96,16 % de variância.

A FIGURA 4.3.4 mostra a discriminação dos cafés torrados em diferentes condições de tempo e temperatura. Observa-se que a maioria dos cafés formou um grupo à esquerda, em PC1. Enquanto, as amostras E3, E4 e E9, que foram submetidas a temperaturas mais elevadas que a dos cafés com torra ideal (E5, E6 e E7), se localizaram mais distantes, demonstrando maiores alterações em suas características. No grupo formado pela maioria das amostras, ainda pode ser verificado que os cafés E2 e E10, submetidos a um período maior de tempo em relação aqueles com torra ótima, também tendem a se afastar do grupo, mas de forma bem menos expressiva, ou seja, suas composições não foram alteradas tanto quanto aquelas submetidas a temperaturas mais elevadas.

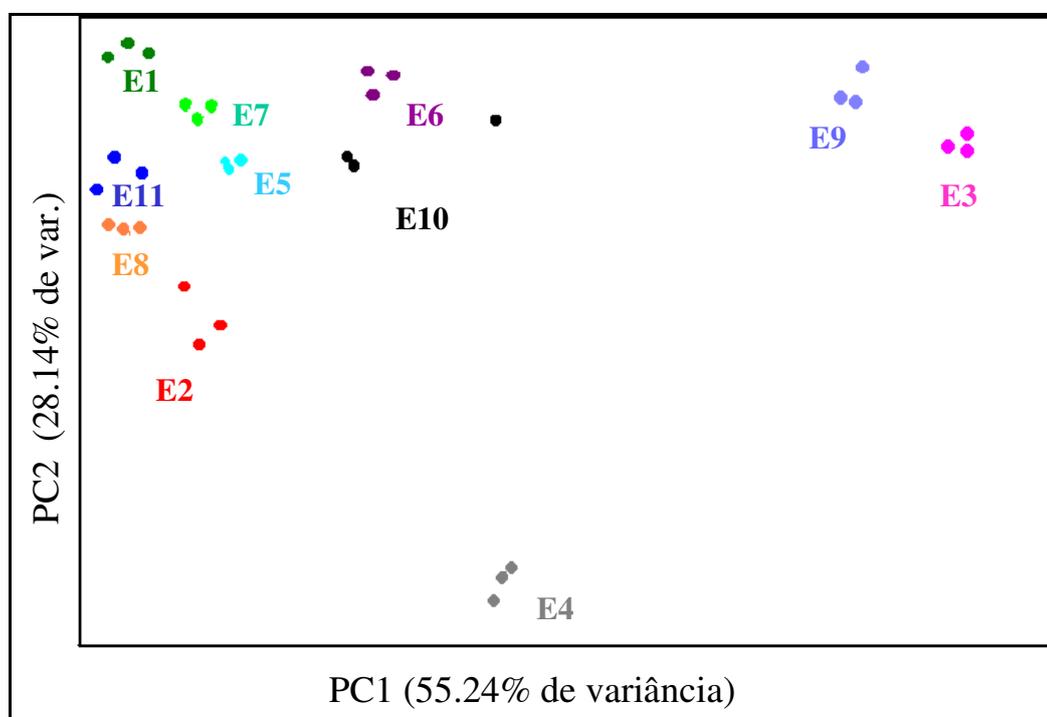


FIGURA 4.3.4 - Gráfico de *scores* dos cafés torrados em diferentes condições de tempo e temperatura, conforme TABELA 4.2.1.1, p. 83.

A fim de verificar essa maior contribuição da temperatura no grau de torra dos cafés analisados nesse trabalho mediu-se a razão do teor de trigonelina/*N*-metilpiridina, a qual foi obtida a partir da integração dos sinais em 8,80 - 8,86 e 8,77 ppm (ambos referentes a dois átomos de hidrogênios). Para o café torrado a temperatura mais elevada (E9) a razão foi de 1,92 e para o café torrado durante maior tempo de aquecimento (E10) foi de 2,69, confirmando-se assim uma maior degradação da trigonelina para cafés torrados a temperaturas mais elevadas.

#### **4.4 – CONCLUSÕES**

A análise por PCA dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  mostrou ser uma ferramenta atrativa no controle do grau de torra dos cafés, discriminando as amostras que foram submetidas a diferentes condições de tempo e temperatura. Além disso, indicou que as alterações mais importantes decorrentes do processo de torrefação dos grãos ocorreram nos teores de trigonelina, *N*-metilpiridina, ácidos fórmico e clorogênicos, e também mostrou que o parâmetro temperatura foi mais importante que o tempo de torra, causando maiores diferenças nas composições das amostras.

## ***CAPÍTULO 5***

**CAFÉS COM DEFEITOS: “PRETOS, VERDES E ARDIDOS”**

## **5.1 - OBJETIVOS**

Fornecer uma ferramenta capaz de discriminar grãos de café, cru ou torrado, apresentando diferentes tipos de defeitos tais como grãos pretos, ardidos e verdes, utilizando-se a técnica de RMN de  $^1\text{H}$  juntamente com métodos de reconhecimento de padrões não supervisionados.

## **5.2 – MATERIAIS E MÉTODOS**

### 5.2.1 - Amostras:

As amostras, provenientes de uma mesma fazenda na região de Águas da Prata, foram fornecidas pela cafeicultora Angela Maria Peral Valente. Foram utilizadas quatro amostras, sendo uma de café bom, ou seja, sem nenhum tipo de defeito (DOrg), e três de cafés defeituosos dos tipos grãos pretos imaturos (DPre), ardidos (DVar) e verdes (DVer). Uma parte de cada amostra foi submetida ao processo de torra, sendo todas nas mesmas condições de temperatura e tempo (215°C/5min). As amostras foram analisadas puras, ou seja, nenhuma mistura entre cafés com defeitos e sem defeitos foi obtida. Dessa forma, a amostra DPre, por exemplo, continha 100% de grãos defeituosos do tipo preto. Misturas não foram consideradas devido à pequena quantidade disponível das amostras.

O procedimento de moagem e preparação das amostras foi feito como descrito no capítulo 2.

### 5.2. 2 - Medidas espectroscópicas:

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos e processados conforme descrito no capítulo 2, diferindo somente no fator do ganho do receptor (RG) que foi calculado automaticamente para cada amostra, fornecendo um valor de 102 para os cafés crus, e de 64 para os torrados.

### 5.2.3 - Análise quimiométrica:

Os métodos de análise por PCA e HCA foram aplicados à matriz de dados contendo os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos quatro tipos de café, e em triplicata.

## 5.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 – Análise de cafés crus com defeitos - pretos, verdes e ardidos:

Os defeitos do café tais como grãos pretos, verdes e ardidos afetam a qualidade da bebida. Entretanto, existem poucos estudos que os correlacionam com as características físicas e químicas dos grãos, dificultando a comparação com os resultados obtidos nesse trabalho. Um perfil químico dos compostos presentes nesses cafés pode ser visualizado nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  apresentados na FIGURA 5.3.1.1, os quais permitem observar uma maior diferença na composição dos grãos pretos, em relação à composição do café sem defeitos. Os sinais na região de 3,10 a 5,50 ppm, referentes aos açúcares, apresentaram menor intensidade indicando um menor teor desses compostos e corroborando com o trabalho de MAZZAFERA (1999), que verificou um aumento do conteúdo dos açúcares associado com o estágio de amadurecimento, encontrando os menores teores de sacarose em grãos pretos imaturos. Pôde ser observado ainda que o teor de açúcares para os demais cafés não teve variação significativa. Uma outra característica apresentada pelo café preto foi o maior teor de ácido fórmico, verificado a partir do simpleto em 8,50 ppm (FIGURA 5.3.1.1). Considerando-se a região de 0,50 a 3,10 ppm dos espectros dos cafés, a qual contém sinais de grupos alifáticos de ácidos orgânicos (por ex. ácido acético), aminoácidos (por ex. alanina) e ácidos graxos, o defeito preto também apresentou maior teor desses compostos. Com relação aos ácidos clorogênicos totais (região de 6,0 a 7,6 ppm), os grãos pretos apresentaram o menor teor, enquanto grãos sem defeitos e com o defeito tipo ardido apresentaram os maiores teores. FRANCA *et al.* (2005) em trabalho semelhante, analisaram, além de outros compostos, o ácido 5-cafeoilquínico e também verificaram os menores níveis para os grãos pretos.

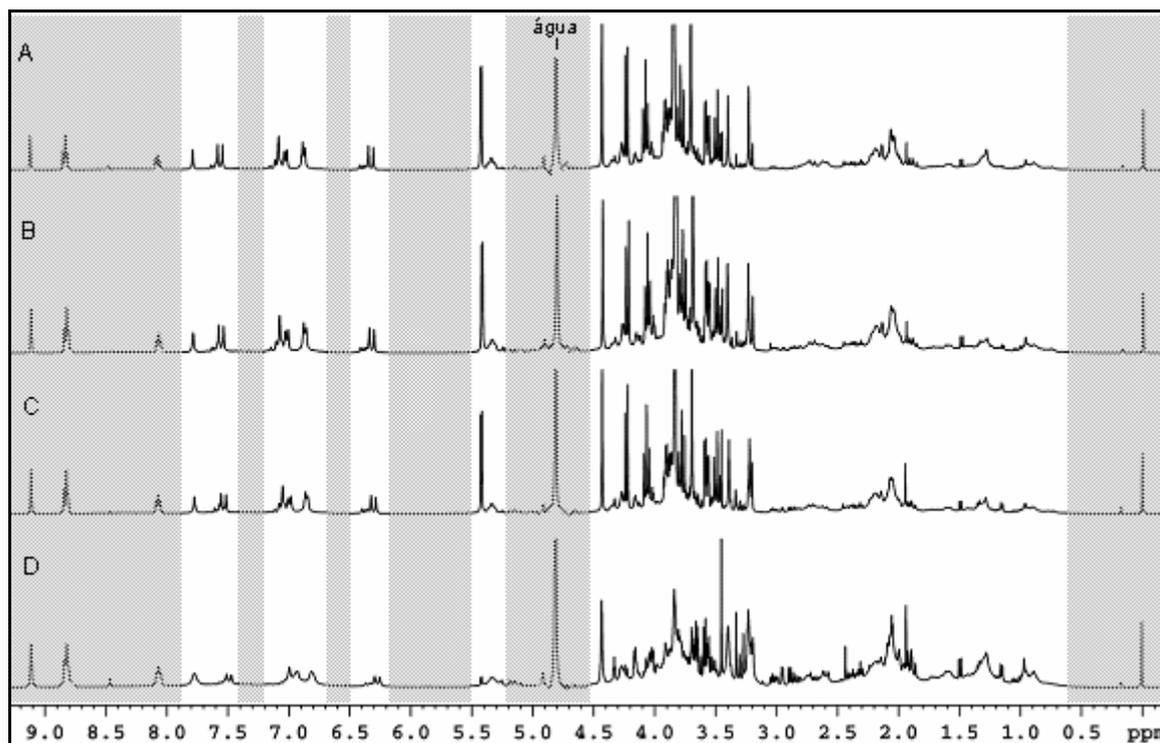


FIGURA 5.3.1.1 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de cafés crus sem defeito (A) e com defeitos do tipo ardido (B), verde (C) e preto (D)

Para a análise quimiométrica, a seleção das variáveis foi executada combinando diferentes regiões do espectro e fazendo-se a análise por PCA. Verificou-se uma maior importância das variáveis correspondentes aos sinais dos hidrogênios dos açúcares, na região de 3,10 a 5,50 ppm, em seguida dos compostos alifáticos, na região de 0,50 a 3,10 ppm e por último dos ácidos clorogênicos e cafeína. Os sinais referentes à hidrogênios da trigonelina e *N*-metilpiridina não mostraram relevância aparente na discriminação das amostras. As variáveis selecionadas são mostradas na FIGURA 5.3.1.1, onde as regiões em cinza foram excluídas.

Os parâmetros otimizados na análise por componentes principais foram o autoescalamamento, normalização para um valor máximo de 100 e primeira derivada aplicada em um intervalo de 15 pontos.

O número de componentes principais necessárias para descrever o sistema de dados foi cinco, contendo 97,4% de variância.

No gráfico de *scores* da análise por PCA, FIGURA 5.3.1.2, pode ser observado que a amostra de café com defeito preto (DPre) apresentou-se num grupo mais distante, confirmando ter uma composição química muito diferente daquela apresentada pelo café sem defeitos (DOrg). Os demais grupos se

localizaram relativamente próximos, em PC1, porém observou-se que o café com o defeito verde (DVer) apresentou-se mais distante de DOrg que o café com defeito ardido (DVar), sugerindo uma maior diferença na sua composição. Entretanto, era esperado que cafés do tipo ardido apresentassem alterações mais significativas em relação ao sem defeitos, pois eles são caracterizados por cafés que sofreram fermentações intensas, sendo encontrados em maior frequência na fração seca no chão (CHAGAS, 1994). Por isso, acredita-se que a amostra DVar apresentou composição similar a DOrg por ter sido recolhida do chão antes que esse processo se iniciasse, mantendo a sua composição. Dessa forma, acredita-se que essa amostra não se trata de um café com defeito tipo ardido e sim de um café de varrição, que se caracteriza pelos grãos caídos durante o processo de colheita por derrça no pano, e embora tenham qualidade inferior à do café sem defeitos não são considerados como grãos defeituosos.

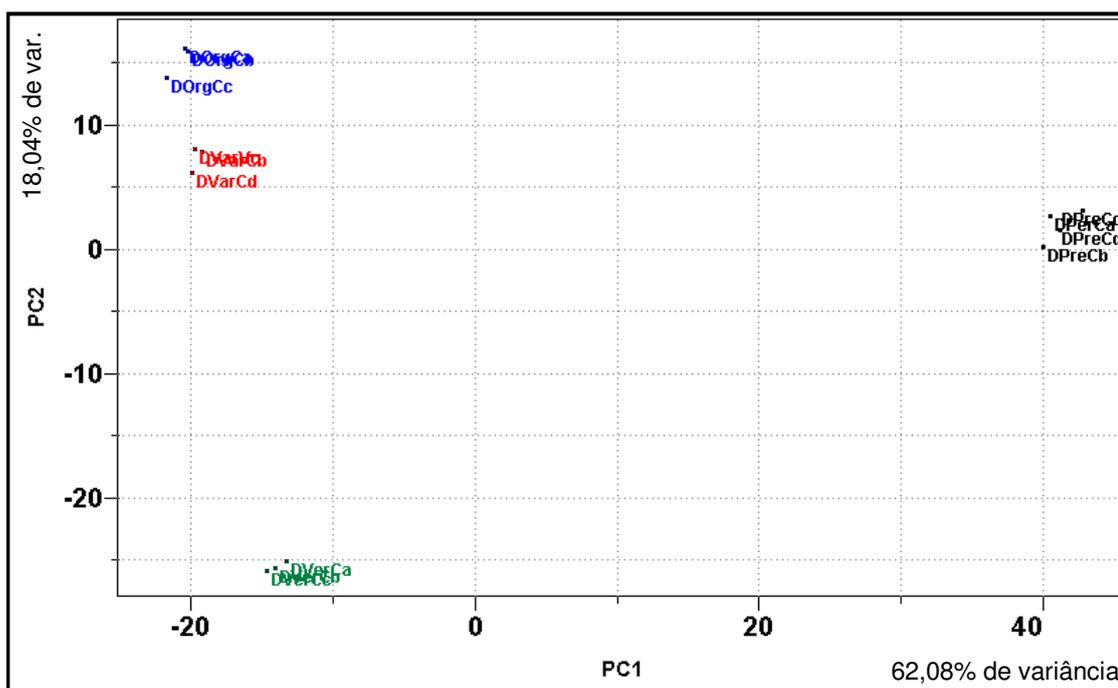


FIGURA 5.3.1.2 - Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  dos cafés crus sem defeitos (•) e com os defeitos do tipo preto (•), verde (•) e ardido (•).

Na análise por HCA, foram utilizados os parâmetros quimiométricos otimizados na análise por PCA, método de ligação incremental e a distância euclidiana para o cálculo da distância entre as amostras.

O resultado da análise por HCA concordou com o obtido pelo PCA. O dendrograma, apresentado na FIGURA 5.3.1.3, mostra, com um índice de similaridade de 0,736, a formação de quatro grupos discriminando as amostras de café com os defeitos preto, verde e ardido entre si e também daquela de café sem defeitos.

A observação, notada no PCA, quanto à semelhança entre as amostras foi reafirmada na análise por HCA. Considerando-se um índice de similaridade em torno de 0,580, a amostra de café sem defeitos (DOrg) e a de café ardido (DVar) seriam agrupadas, confirmando uma maior semelhança nas suas composições químicas. Com um índice de similaridade um pouco menor, em torno de 0,455, outro grupo é unido a esse, o grupo da amostra de café verde (DVer). E por fim, com um índice ainda menor (menor semelhança), em torno de zero, o grupo composto pelas replicatas da amostra de café preto (DPre) é agrupado a esse formado pelas outras três amostras. Esse resultado confirma o que já foi verificado por outros pesquisadores, que o defeito preto é o que mais afeta a composição química do grão com uma maturação adequada, portanto é o mais indesejado em misturas (FRANCA *et al.*, 2005 e MAZZAFERA, 1999).

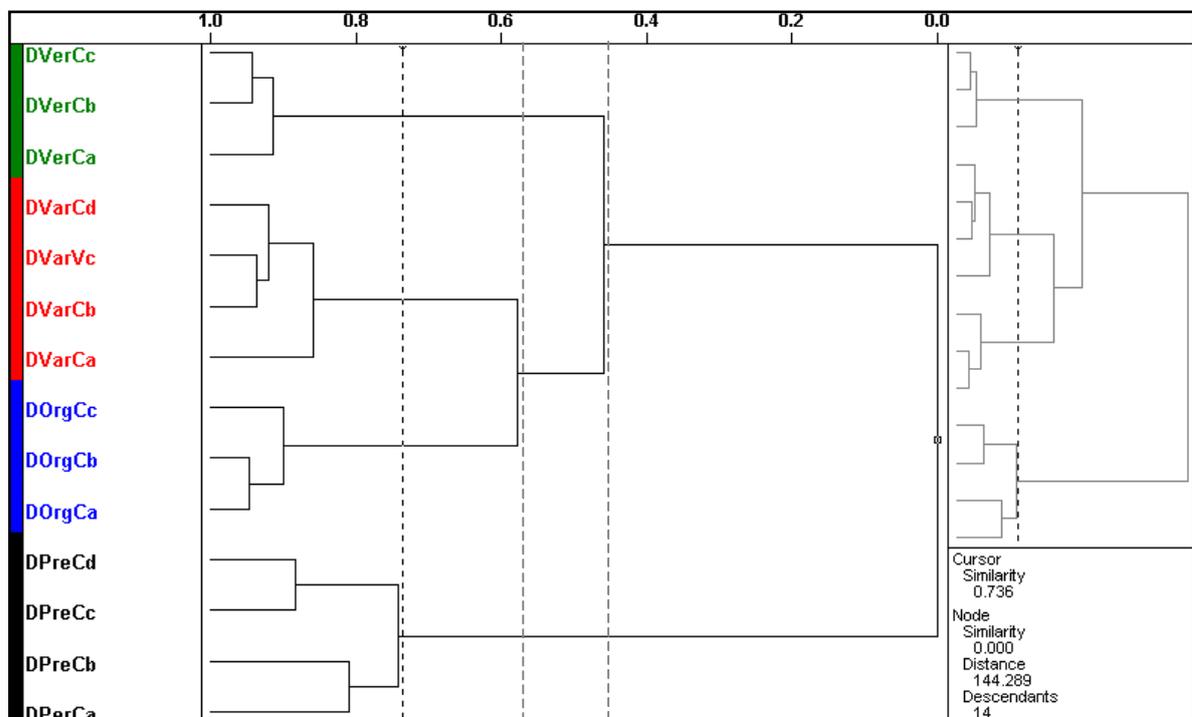


FIGURA 5.3.1.3 - Dendrograma dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  dos cafés crus sem defeitos (●) e com os defeitos do tipo preto (●), verde (●) e ardido (●)

### 5.3.1.1 – Identificação de alguns compostos importantes na discriminação dos cafés crus com defeitos - pretos, verdes e ardidos

#### 5.3.1.1.1 - Sacarose

A atribuição dos deslocamentos químicos da sacarose, açúcar majoritário presente no café cru, foi possível a partir dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $g\text{COSY}$ ,  $g\text{HSQC}$  e  $g\text{HMBC}$  realizados em amostras de café cru, adição de padrão e dados da literatura (WECKERLE *et al.*, 2002).

A FIGURA 5.3.1.1.1.1 mostra os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para uma amostra de sacarose (A), de café (B) e de café acrescido de sacarose (C), na qual os sinais da sacarose são claramente observados no espectro do café, visto que houve aumento na intensidade desses quando a mesma foi adicionada ao café.

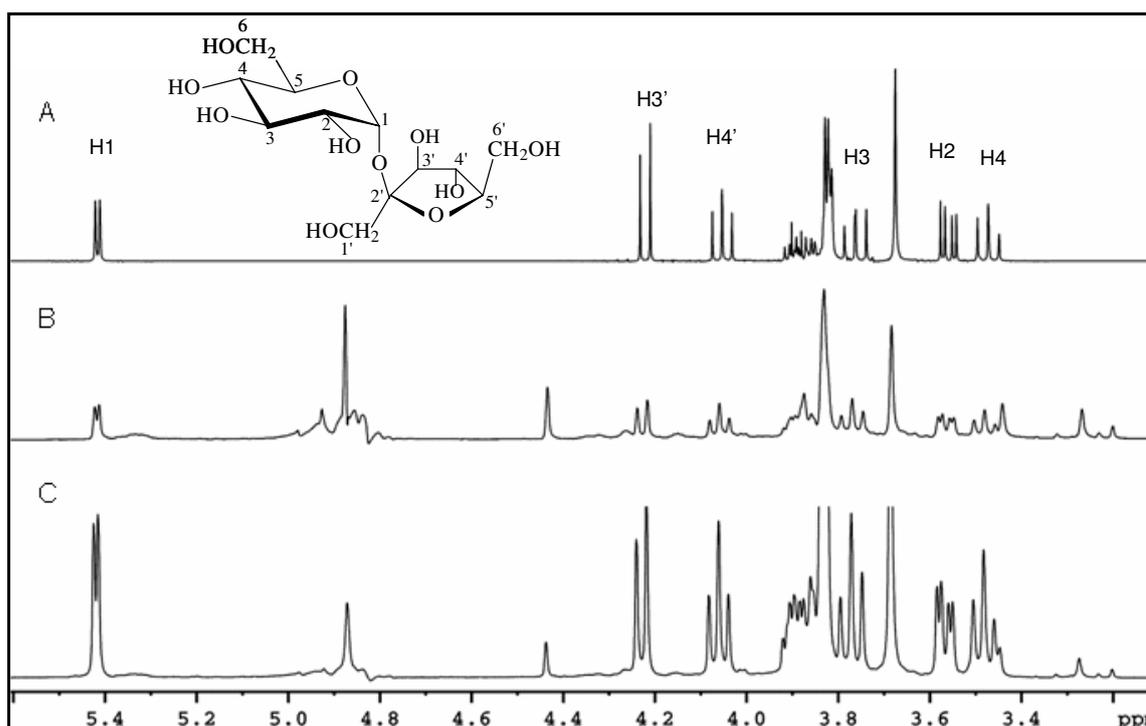


FIGURA 5.3.1.1.1.1 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da sacarose (A), do café (B) e de café acrescido de sacarose (C)

Com exceção de H5 e H5' todos os hidrogênios dos anéis da glicose e frutose puderam ser atribuídos a partir dos experimentos de  $^1\text{H}$  e  $g\text{COSY}$  (FIGURA 5.3.1.1.1.2). O sinal do hidrogênio anomérico (H1) em 5,42 ppm apresentou correlação com o sinal em 3,56 ppm referente a H2. Esse por sua vez correlacionou-

se com o sinal em 3,76 ppm, referente a H3. No anel da frutose, o sinal em 4,22 ppm referente a H3' correlacionou-se com H4' em 4,05 ppm, e esse último com outro sinal na região de 3,84 - 3,93 ppm, posteriormente atribuído a H5'.

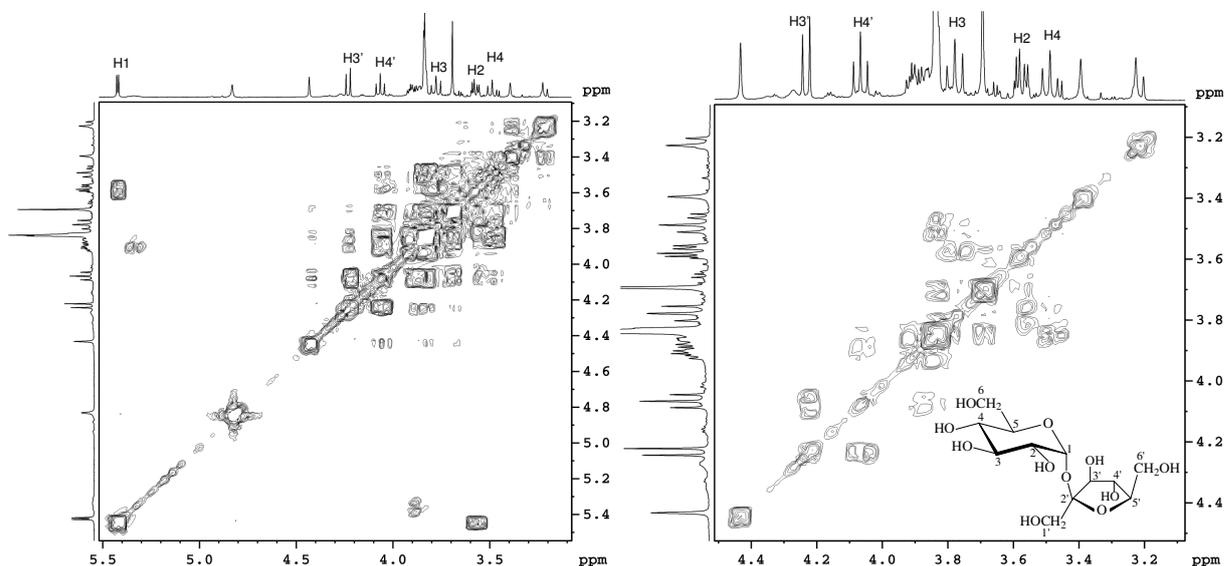


FIGURA 5.3.1.1.1.2 - Espectro de RMN de *g*COSY da extração aquosa do café cru, evidenciando as correlações observadas para a sacarose

Os hidrogênios metilênicos (H6, H1' e H6'), H5, H5' e os deslocamentos químicos dos carbonos puderam ser atribuídos com o auxílio dos experimentos de *g*HSQC (FIGURA 5.3.1.1.1.3) e *g*HMBC (FIGURA 5.3.1.1.1.4). Nesses experimentos pôde ser observado que o sinal em 5,42 ppm referente ao hidrogênio anomérico mostrou correlação  $^1J_{CH}$  em 95,1 ppm e  $^nJ_{CH}$  em 75,4 e 106,6 ppm, esse último referente a C2', o que confirma a conexão entre os anéis da glicose e frutose. O sinal de H2 em 3,56 ppm apresentou correlação  $^1J_{CH}$  em 74,1 ppm e  $^nJ_{CH}$  em 75,6 ppm, referente a C3. O sinal de H3 em 3,76 ppm apresentou correlação  $^1J_{CH}$  em 75,6 ppm e  $^nJ_{CH}$  em 72,2 ppm referente a C4. O sinal de H4 em 3,47 ppm apresentou correlação  $^1J_{CH}$  em 72,2 ppm e  $^nJ_{CH}$  em 63,1 ppm, permitindo a atribuição de C6, e em 75,6 ppm. O sinal de H3' em 4,22 ppm mostrou correlação  $^1J_{CH}$  em 79,3 ppm e  $^nJ_{CH}$  em 64,3, permitindo a atribuição de C1', e em 77,0 e 84,4 ppm, referente C4' e C5', respectivamente. O sinal referente a H4' em 4,05 ppm apresentou correlação  $^1J_{CH}$  em 77,0 ppm e  $^nJ_{CH}$  em 65,6; 79,3 e 84,4 ppm, permitindo a atribuição de C5'. Os hidrogênios metilênicos H1' foram atribuídos ao sinal em 3,68 ppm e apresentaram correlação  $^1J_{CH}$  em 64,3 ppm e  $^nJ_{CH}$  em 79,3 e 106,6 ppm referente a C3' e C2' respectivamente.

A TABELA 5.3.1.1.1 mostra a atribuição dos sinais de RMN encontrados para a sacarose.

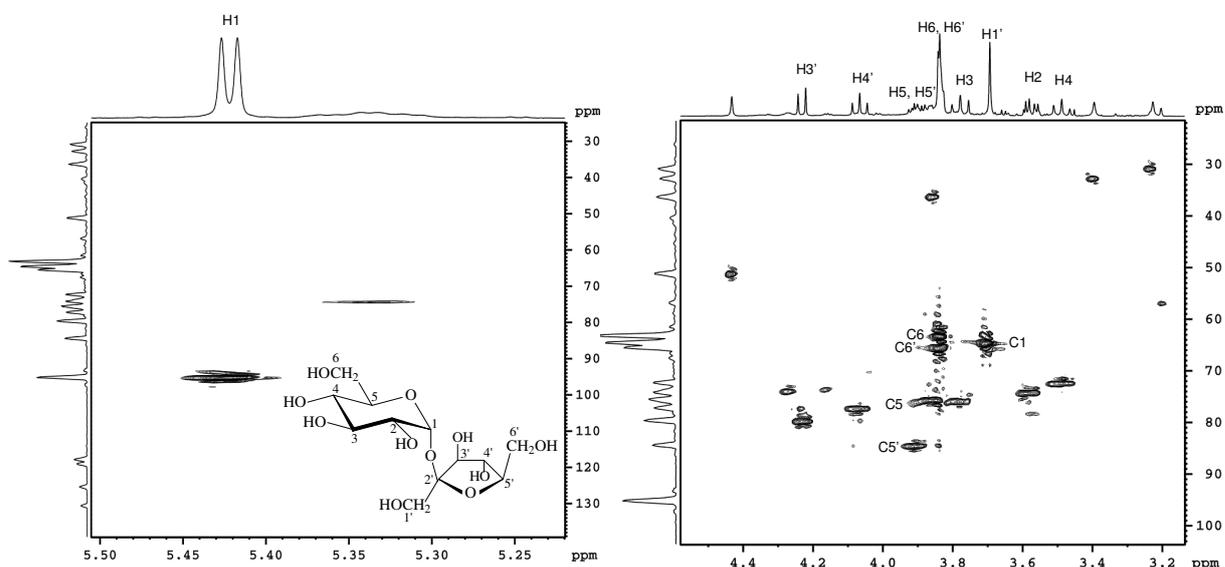


FIGURA 5.3.1.1.1.3 - Espectro de RMN de gHSQC da extração aquosa do café cru, evidenciando as correlações observadas para a sacarose

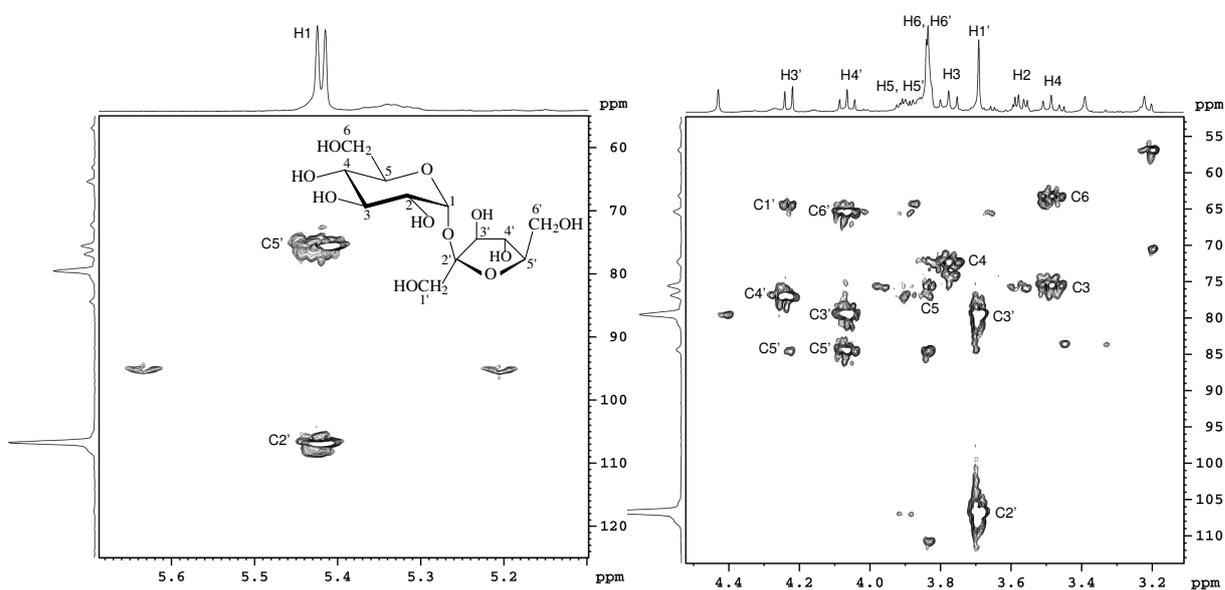


FIGURA 5.3.1.1.1.4 - Espectro de RMN de gHMBC da extração aquosa do café cru, evidenciando as correlações observadas para a sacarose

TABELA 5.3.1.1.1.1 - Atribuição dos sinais de RMN encontrados para a molécula de sacarose.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidade e constante de acoplamento (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	HMBC
1	5,42	<i>d</i> ( $J_{1,2}$ 3,9 )	95,1	75,4 e 106,6
2	3,56	<i>dd</i> ( $J_{2,3}$ 10,0 )	74,1	75,6
3	3,76	<i>t</i> ( $J_{3,4}$ 10,0 )	75,6	72,2
4	3,47	<i>t</i> ( $J_{4,5}$ 10,0 )	72,2	63,1 e 75,6
5	3,84 - 3,93	<i>m</i>	75,4	77,0
6	3,80 – 3,84	<i>m</i>	63,1	75,4 e 84,4
1'	3,68	<i>s</i>	64,3	79,3 e 106,6
2'	---	---	106,6	---
3'	4,22	<i>d</i> ( $J_{3',4'}$ 8,7 )	79,3	64,3; 77,0 e 84,4
4'	4,05	<i>t</i> ( $J_{4',5'}$ 8,7 )	77,0	65,6; 79,3 e 84,4
5'	3,84 - 3,93	<i>m</i>	84,4	77,0
6'	3,80 – 3,84	<i>m</i>	65,5	75,4 e 84,4

## 5.3.1.1.2 – Alanina e ácido acético

A partir dos experimentos de *g*HSQC e *g*HMBC e por comparação com a literatura (GIL, 2000 e BOSCO, 1999) foi possível atribuir os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a alanina e o ácido acético.

A FIGURA 5.3.1.1.2.1 mostra os experimentos de *g*HSQC (A) e *g*HMBC (B) que permitiram essa atribuição.

Para a alanina, o duplete em 1,48 ppm, atribuído aos hidrogênios do grupo metílico, mostrou correlação  $^1J_{\text{CH}}$  com o carbono em 19,2 ppm e correlações  $^nJ_{\text{CH}}$  com os carbonos em 53,6 e 178,8 ppm, atribuídos ao carbono ligado diretamente ao nitrogênio e à carboxila, respectivamente.

Para o ácido acético, o simpleto em 1,95 ppm apresentou correlação  $^1J_{\text{CH}}$  com o carbono em 26,2 ppm e correlação  $^nJ_{\text{CH}}$  com o carbono da carboxila em 184,1 ppm.

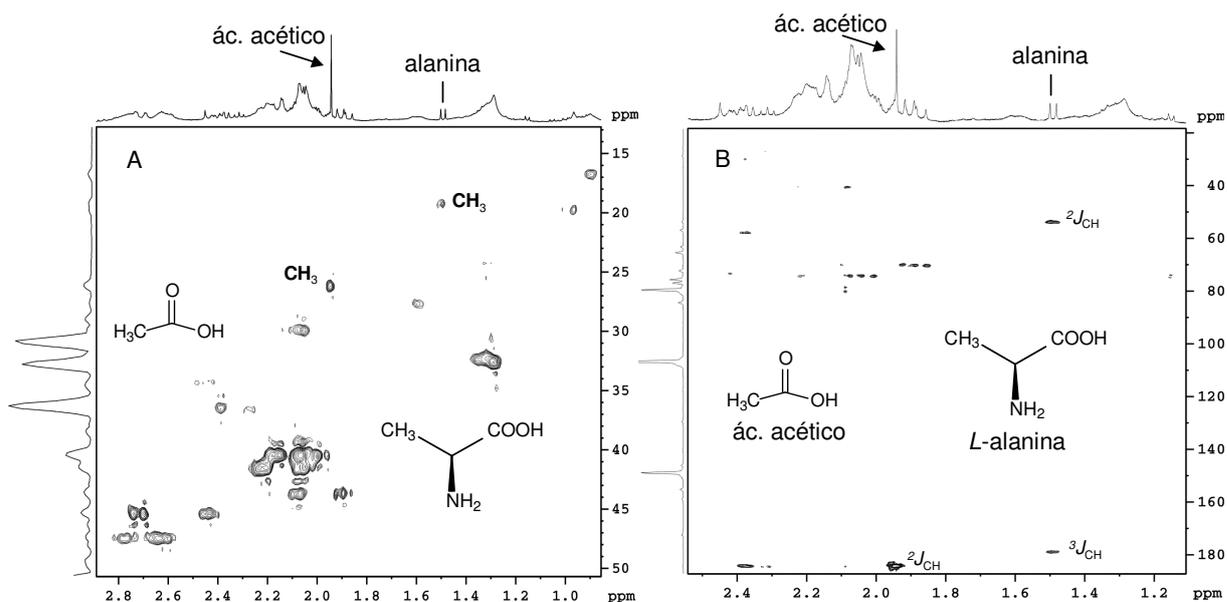


FIGURA 5.3.1.1.2.1 - Espectro de RMN de  $g$ HSQC (A) e  $g$ HMBC (B) da extração aquosa do café cru, evidenciando as correlações observadas para a alanina e o ácido acético

### 5.3.2 – Análise de cafés torrados com defeitos - pretos, verdes e ardidos:

A FIGURA 5.3.2.1 mostra os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos cafés torrados sem e com os defeitos do tipo verde, ardido e preto. Da mesma forma que para os cafés crus, o defeito tipo preto apresentou maiores diferenças espectrais em relação ao café sem defeitos. Na região de 6,4 a 9,2 ppm, exibiu sinais menos intensos, além de apresentar um perfil químico diferente na região de açúcares, de 3,0 a 4,5 ppm. Os outros defeitos mostraram mudanças menos significativas, basicamente uma diminuição dos sinais na região dos açúcares. Porém, em comparação com os cafés crus (FIGURA 5.3.1.1, p. 95), observa-se que o processo de torra afetou a composição química daqueles cafés mais semelhantes ao sem defeitos, ardido e verde, evidenciando suas diferenças.

Assim como na análise dos cafés crus, foram aplicados os métodos PCA e HCA nos espectros dos cafés torrados para verificar o agrupamento natural entre as amostras e reduzir a complexidade dos dados facilitando, assim, a sua análise. Os parâmetros quimiométricos otimizados nesses métodos foram os mesmos para os cafés crus. Com relação às variáveis que contribuíram para a discriminação entre as amostras, uma maior importância foi verificada para a região dos açúcares (3,10 a 4,60 ppm), e em seguida para os compostos alifáticos (0,70 a 3,00 ppm). Ao contrário da análise dos cafés crus, também foi verificada uma

pequena contribuição dos sinais da trigonelina e *N*-metilpiridina. As variáveis selecionadas e utilizadas nas análises quimiométricas estão apresentadas na FIGURA 5.3.2.1, onde as regiões destacadas em cinza foram excluídas.

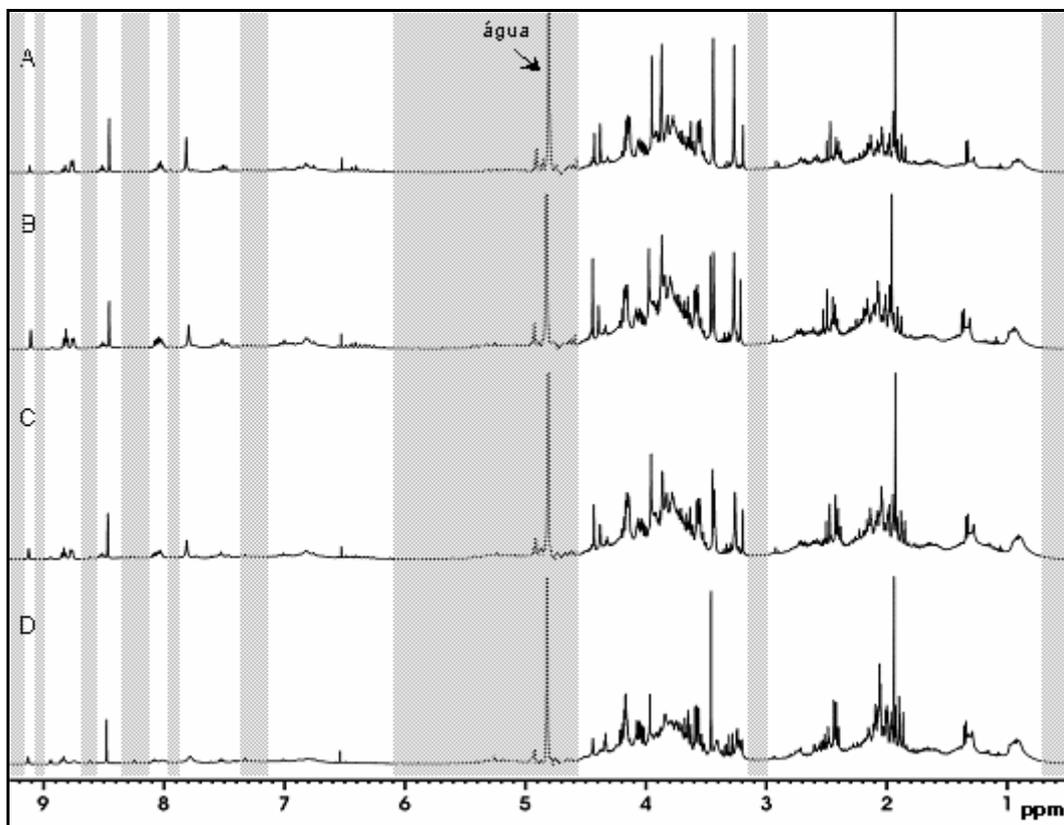


FIGURA 5.3.2.1: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de cafés torrados sem defeito (A) e com defeitos do tipo ardido (B), verde (C) e preto (D)

O número de componentes principais necessárias para descrever o sistema de dados foi quatro, descrevendo 94,4% da variância total.

A discriminação entre as amostras de cafés torrados com diferentes tipos de defeitos foi semelhante à obtida para os cafés crus. No gráfico de *scores*, foi observada a mesma seqüência na disposição das amostras, (FIGURA 5.3.2.2) sendo o café com defeito preto o que mais se distanciou daquele que não apresentava defeitos, e em seguida o café verde e ardido, respectivamente. Além disso, comparando-se à análise dos cafés crus (FIGURA 5.3.1.2, p. 96) e verificando o eixo PC1, as amostras de café ardido e verde se localizaram mais distantes da amostra do café sem defeitos, confirmando que suas composições foram alteradas de maneira diferente pelo processo de torra, mesmo sendo submetidas às mesmas condições.

A comparação da razão de trigonelina/*N*-metilpiridina nos espectros dos diferentes tipos de café permitiu verificar que os cafés com defeitos foram torrados em menor extensão. De acordo com a integração dos sinais em 8,80 - 8,86 e 8,77 ppm as razões foram as seguintes: 0,55 para o café sem defeitos; 0,77 para o verde; 1,42 para o ardido e 1,45 para o preto. Esses resultados concordaram com FRANCA *et al.* (2005), que em análise semelhante e usando cromatografia líquida de alta eficiência verificaram a menor extensão de torra para cafés com o defeito preto.

No dendrograma (FIGURA 5.3.2.3), considerando-se um índice de similaridade em torno de 0,814, quatro grupos foram formados para os diferentes tipos de café: sem defeitos, ardido, verde e preto. Novamente, o grupo formado pelas replicatas do café com defeito preto apresentou maior diferença em suas características, unindo-se ao grupo formado pelas demais amostras com o menor índice de similaridade, em torno de zero. Ainda nessa análise, foi possível confirmar que o processo de torrefação afetou a composição química das amostras de forma diferente evidenciando as diferenças entre DVerT e DVarT e DOrgT, pois se agruparam com um menor índice de similaridade (FIGURA 5.3.2.3), quando comparado com as mesmas amostras de café cru (FIGURA 5.3.1.3, p. 97). Esse comportamento pode implicar em uma torrefação não homogênea quando os grãos defeituosos são misturados com cafés bons, contribuindo para a depreciação da qualidade da bebida.

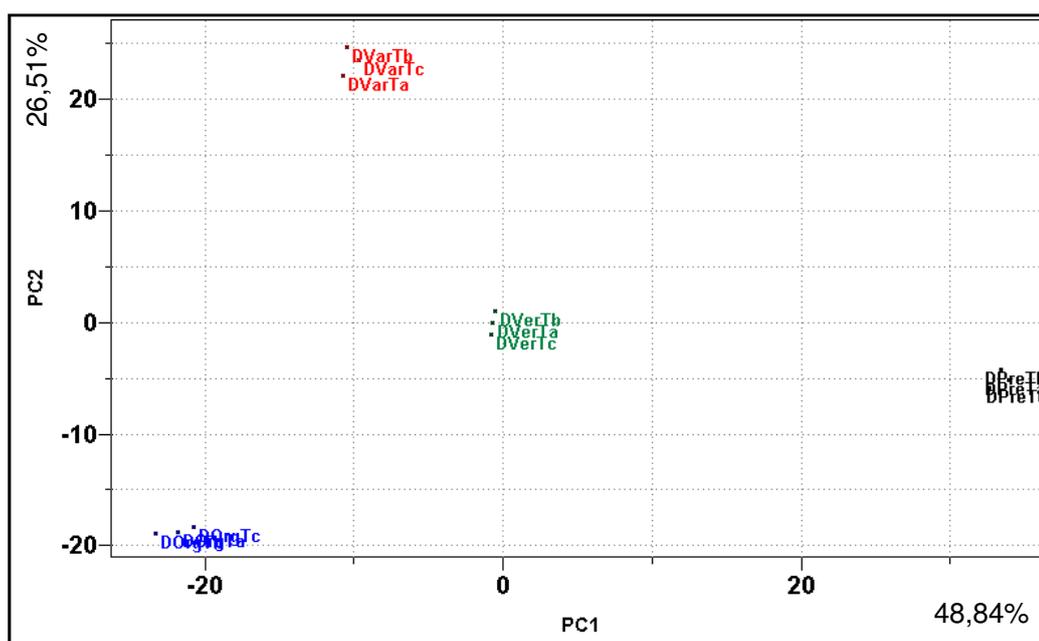


FIGURA 5.3.2.2 - Gráfico de *scores* dos dados de RMN de <sup>1</sup>H dos cafés torrados sem (●) e com os defeitos do tipo preto (●), verde (●) e ardido (●).

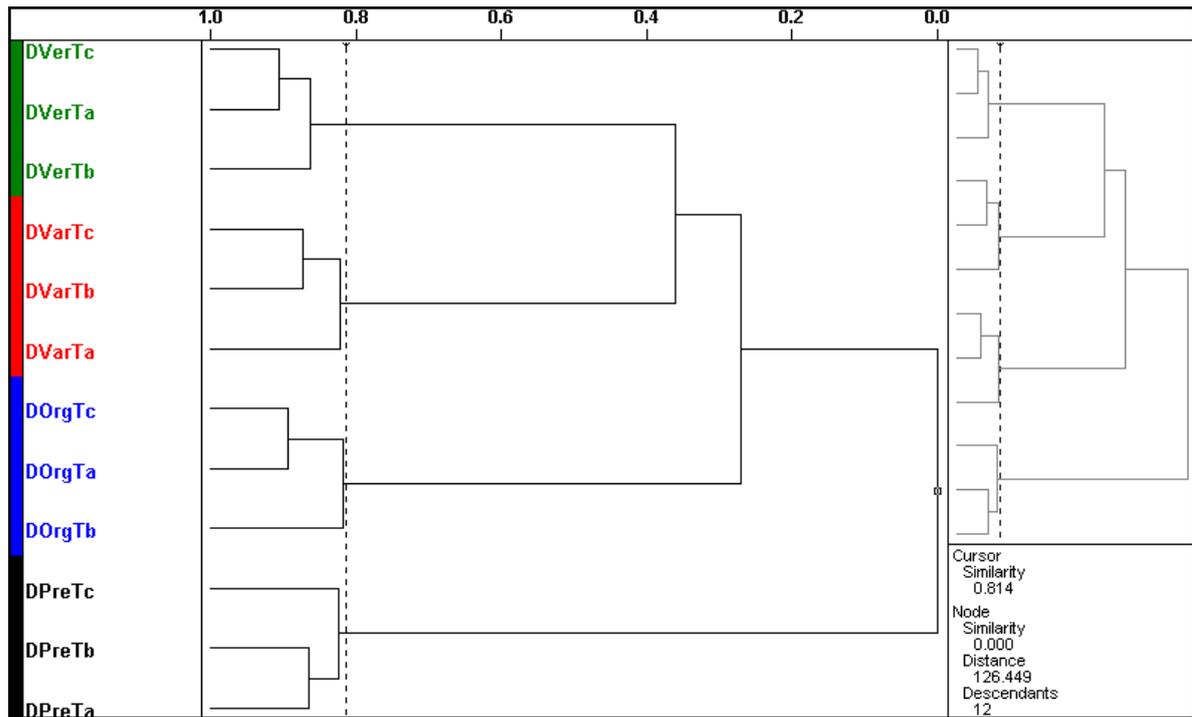


FIGURA 5.3.2.3 - Dendrograma dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  dos cafés torrados sem (•) e com os defeitos do tipo preto (•), verde (•) e ardido (•)

## **5.4 – CONCLUSÕES**

A aplicação dos métodos quimiométricos PCA e HCA diretamente nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  permitiu discriminar as amostras de café, cru ou torrado, de acordo com o tipo de defeito apresentado pelos grãos: pretos, verdes, ardidos ou sem defeitos. Além disso, apontou as diferenças entre as composições químicas dos grãos defeituosos e sem defeitos, sendo a maior variação observada para os grãos pretos.

A análise dos grãos torrados, sob as mesmas condições, também possibilitou verificar uma menor extensão de torra para os grãos defeituosos, corroborando com dados da literatura.

# ***CAPÍTULO 6***

**CAFÉS PRODUZIDOS CONVENCIONAL E ORGANICAMENTE**

## **6.1 - OBJETIVOS**

Discriminar os cafés produzidos do modo convencional daqueles produzidos organicamente e determinar as suas características diferenciais aplicando-se métodos de análise quimiométrica em dados de RMN de  $^1\text{H}$  e do teor de constituintes inorgânicos, determinados por ICP OES.

## 6.2 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.2.1 - Amostras:

Nesse estudo, foram utilizadas 26 amostras de cafés crus, sendo 14 de cafés produzidos do modo convencional e 12 do orgânico, TABELA 6.2.1.1. Todos os cafés foram cultivados na mesma região, Minas Gerais, a fim de evitar que a origem geográfica pudesse influenciar na classificação por modos de produção.

TABELA 6.2.1.1 – Modo de cultivo das amostras estudadas

Código da Amostra		Modo de cultivo
RMN	ICP OES	
NOrgD	01	convencional
NOrg	02	convencional
FBot	03	convencional
BourC	04	convencional
S2Am	07	convencional
SGua	08	convencional
SVAle	09	convencional
SSSeb	10	convencional
SSOn	11	convencional
SPin	12	convencional
SPrat	13	convencional
FMBE	14	convencional
SMDen	15	convencional
SBCr	16	convencional
BourO	05	orgânico
Org	06	orgânico
CO46	46	orgânico
CO47	47	orgânico
CO48	48	orgânico
CO50	50	orgânico
CO51	51	orgânico
CO52	52	orgânico
CO54	54	orgânico
CO55	55	orgânico
CO56	56	orgânico
CO57	57	orgânico

Os grãos de café foram moídos em moinho de facas, com o auxílio de nitrogênio líquido, e passados em uma peneira de 100 Mesh para obter uma mesma granulometria.

Para a análise de RMN, as bebidas foram preparadas numa cafeteira própria para café expresso, como descrito no capítulo 2, mas utilizando-se 5,00 g de pó de café e 36,0 mL de água.

A análise por ICP OES foi executada pela Dra. Andréa Pires Fernandes sob a orientação do Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega, responsável pelo grupo de análise instrumental aplicada desse departamento (DQ-UFSCar). Para medir a concentração dos constituintes inorgânicos, foi feita a digestão das amostras assistida por radiação microondas. Cerca de 0,25 g de pó de café cru foram pesados diretamente nos frascos reacionais de PTFE (politetrafluoretileno) modificado, e juntamente foram adicionados 3,0 mL de  $\text{HNO}_3$  2,0 mol  $\text{L}^{-1}$  + 1,0 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Em seguida, os frascos foram fechados e executou-se o programa de aquecimento apresentado na TABELA 6.2.1.2. Após a digestão, os digeridos e o branco analítico foram transferidos para frascos volumétricos e os volumes ajustados para 10,0 mL com água deionizada (FERNANDES, 2006).

TABELA 6.2.1.2 - Programa de aquecimento em forno de microondas Multiwave (Anton Paar) com recipientes fechados, programa para 6 amostras.

<b>Etapa</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Potência (W)</b>	<b>Intensidade de Ventilação</b>
1	2	291	1
2	3	0	1
3	4	640	2
4	5	872	2
5	5	1000	3
ventilação	15	0	3

Para a digestão das amostras foi utilizado um forno de microondas Multiwave (Anton Paar/Perkin Elmer, Áustria), equipado com frascos de alta pressão (75 bar) de PTFE quimicamente modificado da Hoechst e frascos de quartzo, ambos com volume de 50,0 mL. O sistema possui potência variável de 0 a 1000 W e permite a decomposição de até seis amostras por programa de aquecimento. Sendo este equipado com sensores de temperatura e pressão, que permitem medir as temperaturas de cada frasco e a pressão média do conjunto de frascos.

A curva analítica empregada na análise dos digeridos por ICP OES foi preparada com soluções analíticas de referência no branco da digestão. Para a definição de quais elementos seriam determinados nas amostras, fez-se um *rapid quanti* dos elementos. Para as amostras de café verde as soluções de referência foram preparadas empregando-se quatro diferentes concentrações para os elementos conforme indicadas na TABELA 6.2.1.3. (FERNANDES, 2006).

TABELA 6.2.1.3 – Concentrações das soluções de referência

Elemento	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )			
K	25,0	50,0	100,0	200,0
S	12,5	25,0	50,0	100,0
Ca, Mg e P	7,25	15,0	30,0	60,0
Fe, Na e Rb	0,5	1,0	2,0	4,0
Al, Cu, Mn, Si, Sn, Sr e Zn	0,25	0,50	1,0	2,0
Ba	0,125	0,25	0,50	1,00
Cr	0,012	0,025	0,050	0,100

### 6.2.2 - Medidas experimentais

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H, realizados por mim, foram adquiridos e processados conforme descrito no capítulo 2 para as amostras de café cru, diferindo somente no fator de ganho do receptor (RG), que foi calculado automaticamente fornecendo um valor igual a 102 para todas as amostras.

O espectrômetro utilizado (espectrômetro simultâneo de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com configuração axial) possibilitou medidas em ampla faixa espectral (167 a 785 nm), o qual possui sistema ótico purgado com argônio que possibilita a leitura em regiões abaixo de 190 nm e policromador termostatizado a 34<sup>o</sup> C. Nesse equipamento com configuração axial, a região fria do plasma foi removida do caminho ótico por um fluxo contracorrente de argônio (*end-on gas*) utilizado para purgar a interface entre o plasma e o espectrômetro. Os parâmetros operacionais utilizados para condições robustas (alta potência e baixa vazão do gás de nebulização) estão listados na TABELA 6.2.2.1. O controle das condições robustas foi realizado medindo-se a razão Mg II/Mg I. Se a razão fosse menor que 8, o plasma estava sendo operado em condições não

robustas e se a razão fosse maior 8 o plasma estava sendo operado em condições robustas.

TABELA 6.2.2.1 - Parâmetros operacionais para determinação dos constituintes inorgânicos em condições robustas.

Parâmetros Operacionais	Condições de operação robusta
Rádio-freqüência do gerador (MHz)	40
Potência (kW)	1,3
Vazão do gás do plasma (l min <sup>-1</sup> )	15
Vazão do gás auxiliar (l min <sup>-1</sup> )	1,5
Vazão do gás de nebulização (l min <sup>-1</sup> )	0,9
Replicatas	2
Diâmetro interno do tubo central (mm)	2,4
Linhas espectrais (nm) para amostras de café verde	Al II 167,019; Ba II 455,405; Ca I 317,933; Cu I 324,752; Fe II 238,204; K I 766,491; Mg I 285,213; Mn II 257,610; Na I 588,995; P I 213,618; Rb I 780,026; S I 180,669; Si I 251,611; Sr II 421,552; Zn 213,857.

\* I: linha atômica; II: linha iônica.

### 6.2.3 - Análise quimiométrica:

Os métodos de análise quimiométrica PCA, HCA e KNN foram aplicados à matriz de dados contendo os espectros de RMN de <sup>1</sup>H das 26 amostras, em triplicata e, separadamente, também foram aplicados à matriz contendo as medidas, em duplicata, dos constituintes inorgânicos. As análises dos dados de ambas as técnicas, RMN e ICP-OES, foram realizadas em conjunto com a Dra. Andréa Pires Fernandes.

### 6.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 6.3.1 – Análise dos dados de cafés de diferentes modos de produção obtidos por RMN:

A análise visual dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos cafés produzidos do modo orgânico e convencional, apresentados na FIGURA 6.3.1.1, permitiu verificar que a composição química dos dois tipos de cafés são muito semelhantes, somente são observadas pequenas variações na região de 1,80 a 3,00 ppm. Essas diferenças são evidenciadas quando observamos a ampliação dessa região no gráfico de linhas da matriz contendo todos os espectros, na FIGURA 6.3.1.2. Os cafés produzidos organicamente apresentaram maiores teores de algum(s) constituinte(s), como mostrado em A, e também de ácido acético, indicado em B.

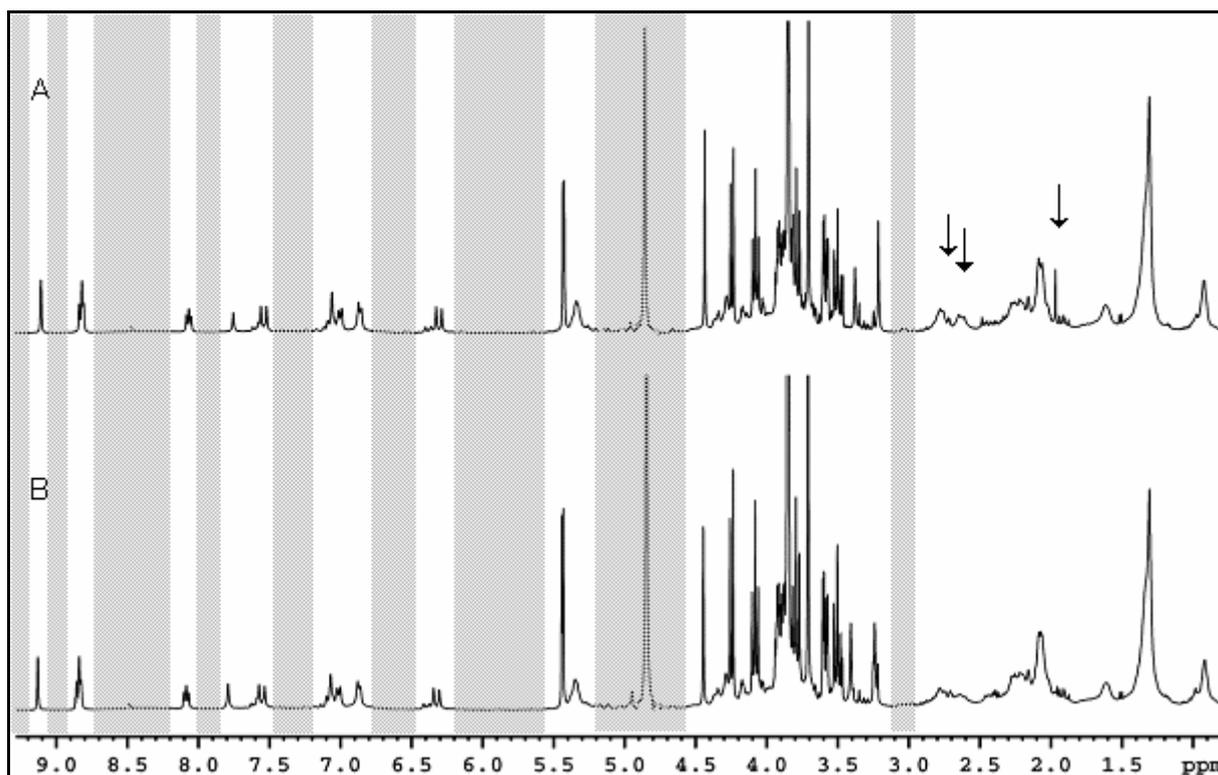


FIGURA 6.3.1.1 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos cafés crus cultivados do modo orgânico (A) e convencional (B)

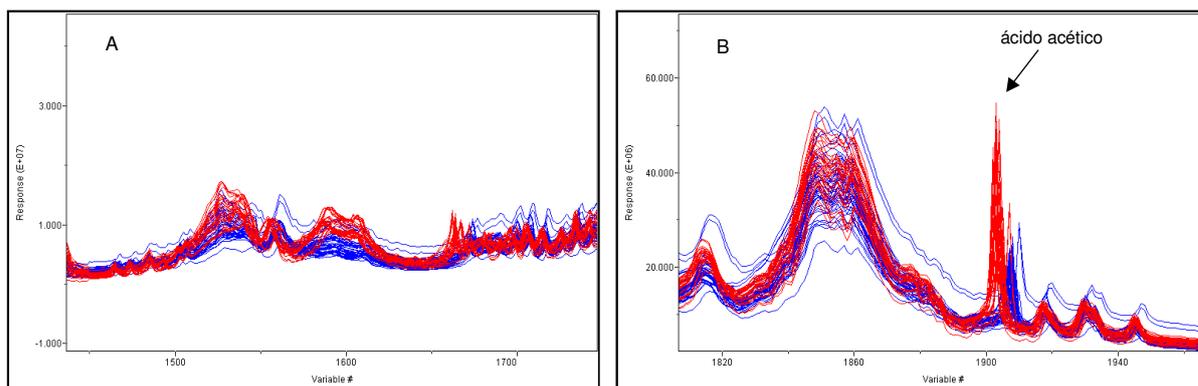


FIGURA 6.3.1.2 – Ampliação da região de 2,30 a 3,00 ppm (A) e da região de 1,80 a 2,20 ppm (B) do gráfico de linhas contendo todos os espectros e mostrando as diferenças entre os cafés orgânicos (●) e convencionais (●).

Um maior conteúdo de ácido acético foi verificado para todos os cafés produzidos organicamente, e embora esses sejam comercializados com valores bem superiores aos convencionais, isso não pode ser atribuído necessariamente a uma característica que lhes confira qualidade adicional. O ácido acético presente nos grãos de café cru é originado principalmente devido à fermentação dos açúcares. Por outro lado, sua presença nesses cafés pode estar relacionada a um controle de pragas não efetivo, pois a aplicação de inseticidas nessas culturas é substituída por métodos alternativos, que não sendo eficazes deixam os grãos expostos a ataques de pragas, e conseqüentemente de fungos, bactérias e leveduras causando as fermentações.

Na análise por PCA, a melhor discriminação entre os modos de produção foi obtida utilizando-se toda a região espectral, a qual está apresentada na FIGURA 6.3.1.1. Entretanto, uma maior importância foi verificada para as regiões mostradas na FIGURA 6.3.1.2, confirmando a análise visual prévia.

Os parâmetros otimizados para a análise em questão foram o autoescalamamento dos dados, normalização para um valor máximo de 100 e primeira derivada aplicada em um intervalo de quinze pontos.

O número ótimo de fatores selecionados foi seis, descrevendo 76,6% da variância total dos dados.

A FIGURA 6.3.1.3 mostra o gráfico de *scores* das duas primeiras componentes principais, no qual observa-se uma clara tendência de discriminação entre os modos de produção, onde os cafés orgânicos se localizam à esquerda, com valores mais negativos em PC1, e os convencionais à direita, com valores mais



No gráfico *scores* de PC1 versus PC3, os cafés produzidos convencionalmente tendem a ter valores mais positivos em PC1 e também em PC3 e os produzidos organicamente, valores mais negativos. A maioria das amostras dos cafés de produção orgânica é discriminada com sucesso daqueles de produção convencional. Entretanto, algumas amostras de café orgânico (CO54, Org e CO56) se localizam próximo às convencionais e, somente a amostra BourO foi agrupada erroneamente. Esse comportamento pode ser explicado devido à semelhança de seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com o de outras amostras de café de produção convencional. A FIGURA 6.3.1.5 mostra o gráfico de linhas representando as regiões espectrais mais importantes na discriminação dos modos de produção, a qual deixa evidente a semelhança do café orgânico BourO com outro do tipo convencional, justificando assim o seu agrupamento a essas amostras, no gráfico de *scores*.

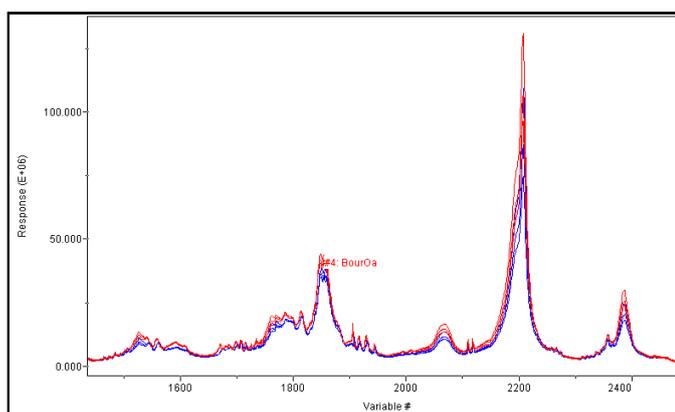


FIGURA 6.3.1.5 – Região do gráfico de linhas característica do modo de produção, mostrando as semelhanças entre as amostras dos cafés crus orgânico BourO e convencional BourC

Na análise por HCA, obteve-se uma discriminação semelhante à observada na análise por PCA. Com um índice de similaridade em torno de 0,195, observou-se a formação de um grupo contendo somente cafés de produção orgânica, e outro contendo todos os de produção convencional mais quatro amostras de café orgânico, CO56, Org, CO54 e BourO. Uma análise visual dos espectros de tais amostras revelou um perfil muito semelhante ao das amostras de cafés convencionais, explicando assim seu agrupamento junto a essas amostras.

O dendrograma resultante está apresentado na FIGURA 6.3.1.6, e para uma melhor visualização das amostras as expansões são mostradas nas FIGURAS 6.3.1.7 a 6.3.1.11.

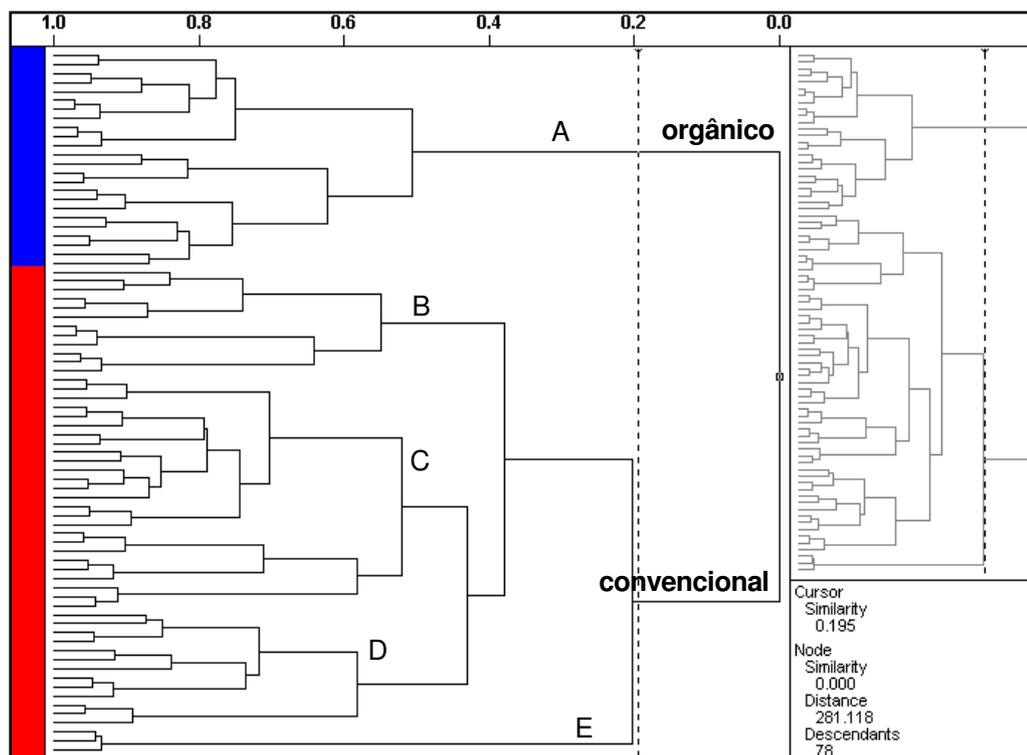


FIGURA 6.3.1.6 - Dendrograma obtido a partir dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  dos cafés crus produzidos do modo orgânico e convencional

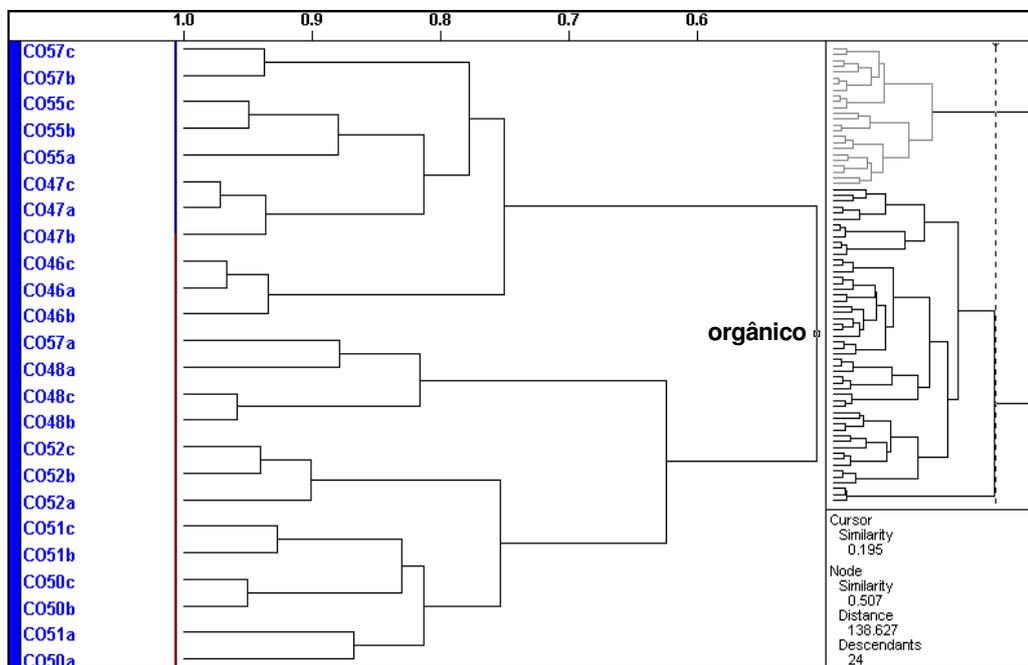


FIGURA 6.3.1.7 - Ampliação do ramo A do dendrograma, mostrando os cafés orgânicos

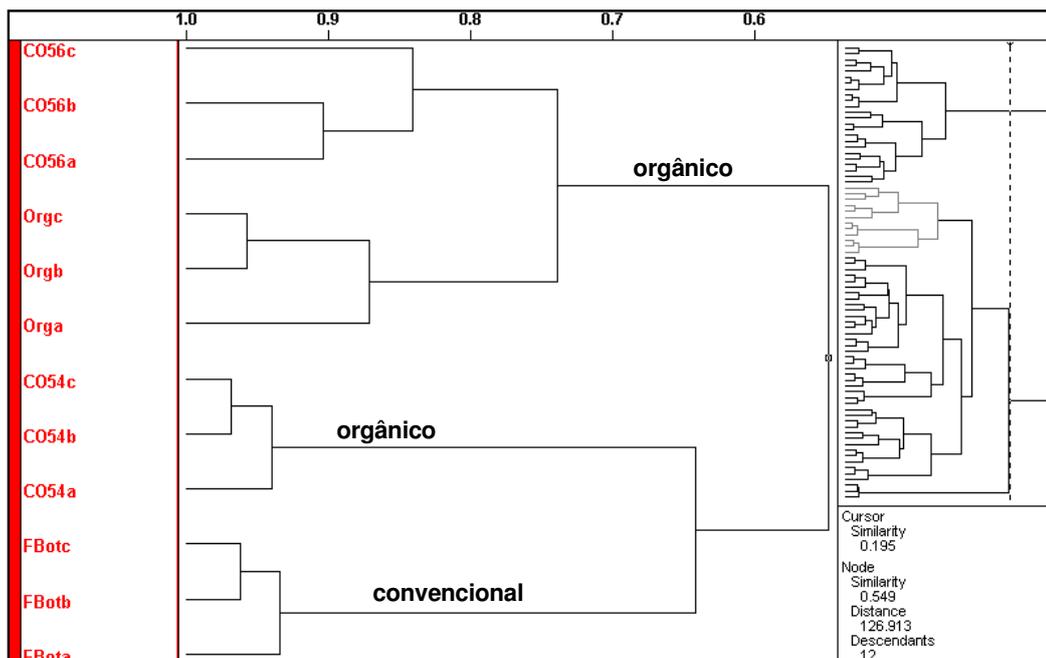


FIGURA 6.3.1.8 - Ampliação do ramo B do dendrograma, mostrando cafés orgânicos e convencionais

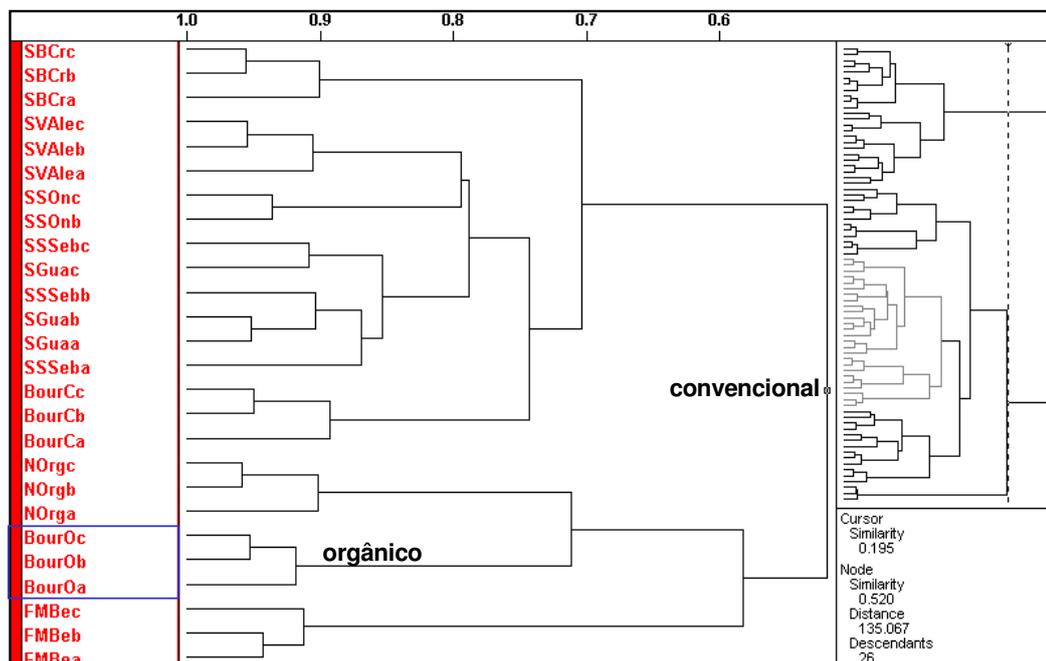


FIGURA 6.3.1.9 - Ampliação do ramo C do dendrograma, mostrando cafés convencionais

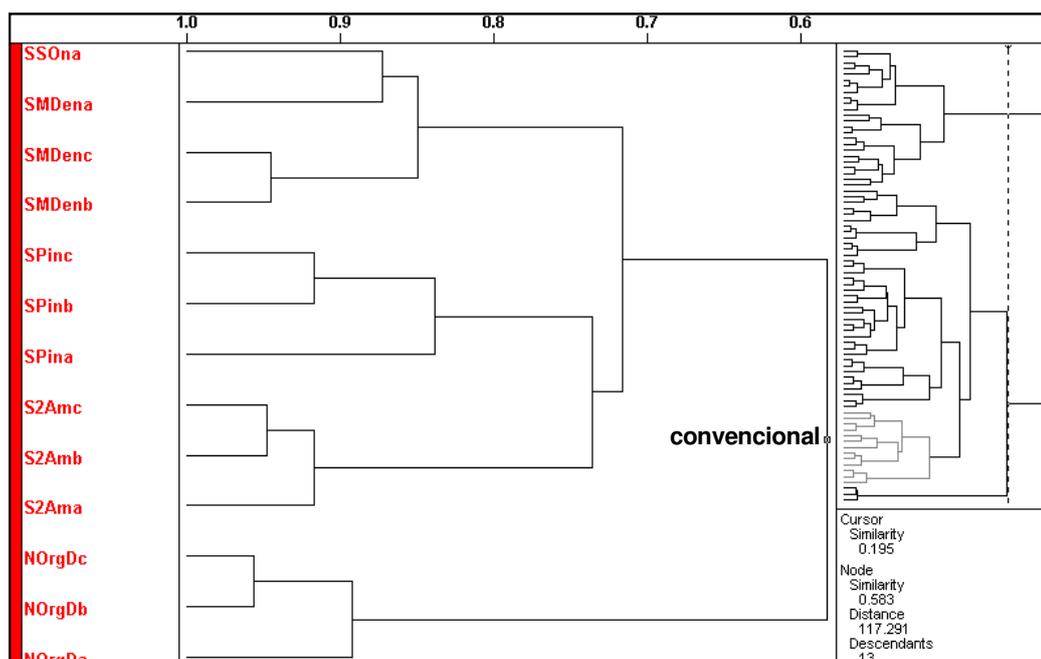


FIGURA 6.3.1.10 - Ampliação do ramo D do dendrograma, mostrando cafés convencionais

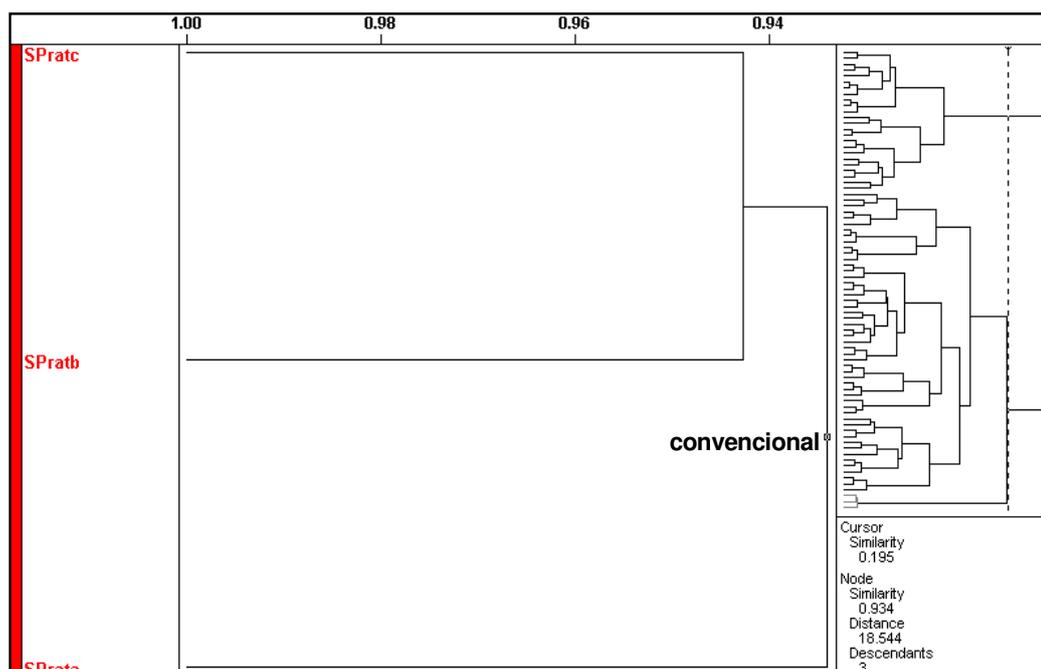


FIGURA 6.3.1.11 - Ampliação do ramo E do dendrograma, mostrando café convencional

Considerando somente o grupo dos cafés convencionais, a amostra SPrat foi agrupada às demais com um índice de similaridade menor, indicando maiores diferenças em suas características. Uma análise detalhada de seu espectro (FIGURA 6.3.1.12) permitiu observar a presença de um sinal, não identificado, somente nessa amostra. Entretanto, essa diferença não afetou o seu agrupamento

quanto à classificação entre os modos de produção, não representando comportamento anômalo e cuja exclusão fosse necessária.

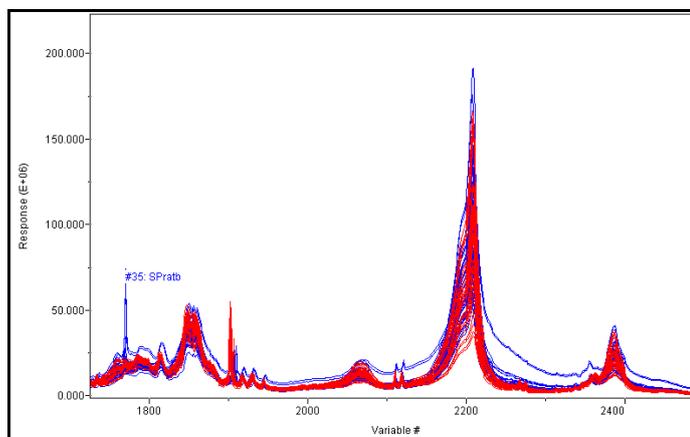


FIGURA 6.3.1.12 – Região espectral do gráfico de linhas evidenciando pequenas diferenças entre a amostra convencional SPrat e as demais de mesmo modo de produção

Tendo uma discriminação razoável entre as amostras de cafés de diferentes modos de produção a partir das análises por PCA e HCA, foi aplicado o método KNN para a classificação das amostras nas categorias orgânica e convencional. O modelo foi construído a partir das variáveis selecionadas e os parâmetros otimizados na análise por PCA.

Com o objetivo de se fazer a previsão de classe para amostras futuras, o número ótimo de vizinhos foi escolhido com base no gráfico da FIGURA 6.3.1.13, sendo selecionado k igual a um, pois não houve nenhum erro de previsão.

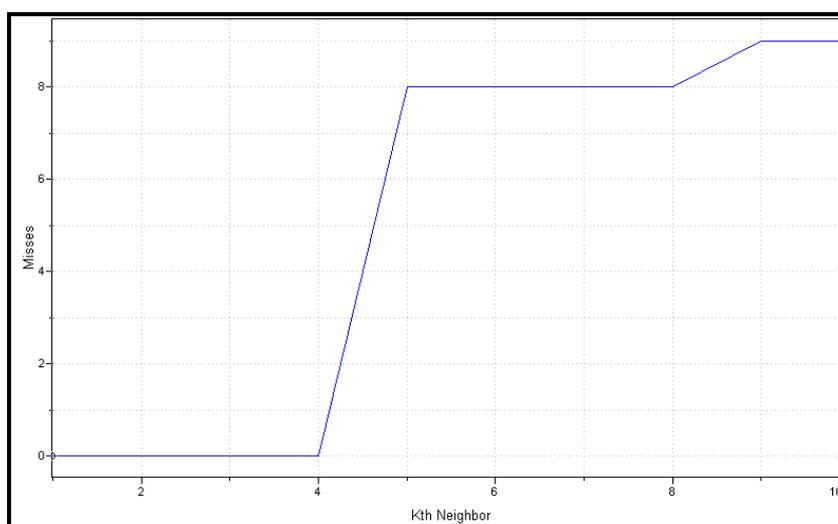


FIGURA 6.3.1.13 – Gráfico dos erros de previsão para as amostras do conjunto de treinamento do modelo KNN, aplicado aos dados de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos para cafés produzidos convencionalmente e organicamente

Considerando-se as seis amostras teste utilizadas para verificar a eficiência de previsão do modelo, esse mostrou-se bastante eficiente atribuindo a classe das amostras com 100% de acertos (TABELA 6.3.1.1). Essa alta eficiência de previsão demonstra a grande potencialidade do método em ser utilizado na verificação e distinção do modo de produção dos cafés comerciais.

TABELA 6.3.1.1 - Previsão de classe obtido para as amostras teste a partir do método de classificação KNN aplicado aos dados de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos para cafés produzidos convencionalmente e organicamente

<b>Amostra</b>	<b>Modo de cultivo</b>	<b>classe</b>	<b>KNN</b>
NOrgDa	convencional	1	1
NOrgDb	convencional	1	1
NOrgDc	convencional	1	1
S2Ama	convencional	1	1
S2Amb	convencional	1	1
S2Amc	convencional	1	1
SMDena	convencional	1	1
SMDenb	convencional	1	1
SMDenc	convencional	1	1
CO48a	orgânico	2	2
CO48b	orgânico	2	2
CO48c	orgânico	2	2
CO50a	orgânico	2	2
CO50b	orgânico	2	2
CO50c	orgânico	2	2
CO55a	orgânico	2	2
CO55b	orgânico	2	2
CO55c	orgânico	2	2

### **6.3.2 – Análise dos dados de cafés de diferentes modos de produção obtidos por ICP OES:**

Uma observação inicial do gráfico de linhas do conjunto de dados na FIGURA 6.3.2.1 mostra que a maior parte das variáveis indicam diferenças claras entre os dois modos de produção. Assim, inicialmente aplicou-se a análise não supervisionada de padrões no conjunto de dados autoescalados para observar

alguma característica de agrupamento natural entre as amostras e determinar as variáveis que mais contribuem para tais agrupamentos.

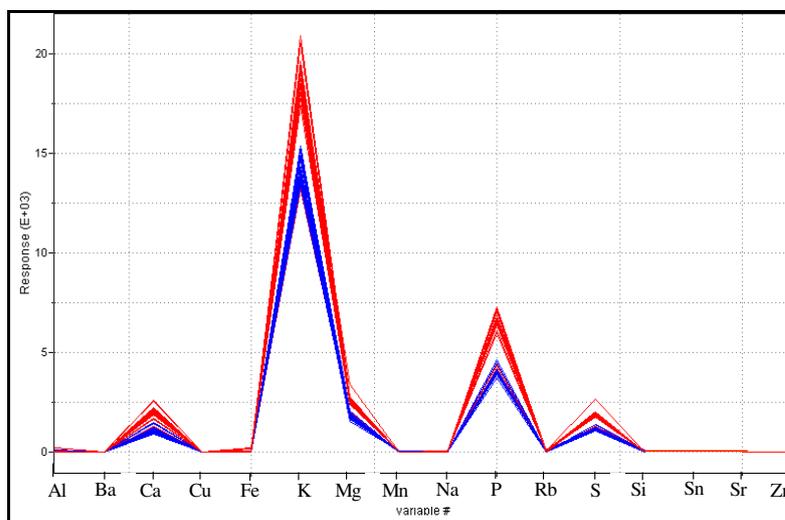


FIGURA 6.3.2.1 - Gráfico de linhas correspondente às concentrações dos constituintes inorgânicos determinados por ICP OES em amostras de café cru. (●) produzidos convencionalmente (●) produzidos organicamente.

A análise por componentes principais demonstrou que somente três fatores explicam satisfatoriamente a variabilidade total dos dados, descrevendo 92,0% de variância.

A FIGURA 6.3.2.2 mostra o gráfico de *scores* das duas primeiras componentes principais, no qual observa-se a discriminação entre as amostras dos diferentes modos de produção. A FIGURA 6.3.2.3 mostra o gráfico de *loadings* que corresponde à influência das variáveis na discriminação entre as amostras observada na FIGURA 6.3.2.2.

As amostras de café produzido organicamente estão situadas em valores de *scores* positivos em PC1, bem separadas das amostras de café produzido convencionalmente, as quais apresentaram *scores* negativos em PC1. As variáveis Ca, Cu, P e S foram as que exibiram valores de *loadings* mais positivos em PC1, enquanto Mn apresentou um valor de *loading* mais negativo nesta componente, como pode ser verificado na FIGURA 6.3.2.3. Assim, os cafés produzidos organicamente são geralmente bem caracterizados por valores relativamente altos de Ca, Cu, P e S e baixos valores de Mn. A recíproca é verdadeira para o grupo de cafés produzidos convencionalmente, situados à esquerda no gráfico.

As variáveis mais discriminantes foram Mn, Ca, Cu, P e S e os resultados indicam que utilizando apenas tais variáveis as amostras de café podem ser classificadas de acordo com o modo de produção. Em PC2 não existe separação entre os grupos. Contudo, pode ser verificado que uma amostra de café de produção orgânica (54) é caracterizada devido à maior quantidade de Al e Fe em relação aos demais cafés produzidos organicamente. Essa mesma amostra também apresentou comportamento semelhante na análise quimiométrica dos dados de RMN, se distanciando das demais de mesma categoria no gráfico de *scores*.

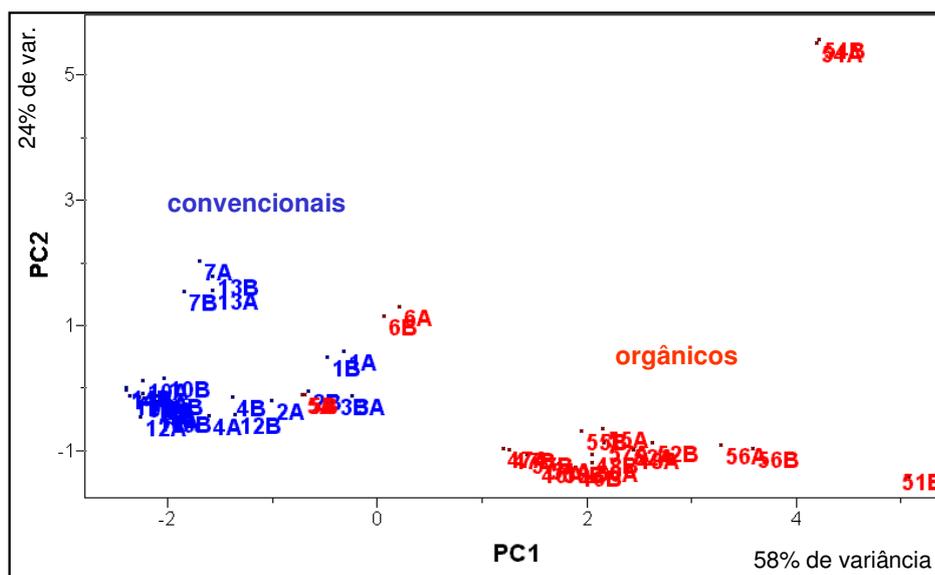


FIGURA 6.3.2.2 - Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos dados de ICP OES dos cafés crus produzidos convencionalmente (•) e organicamente (•)

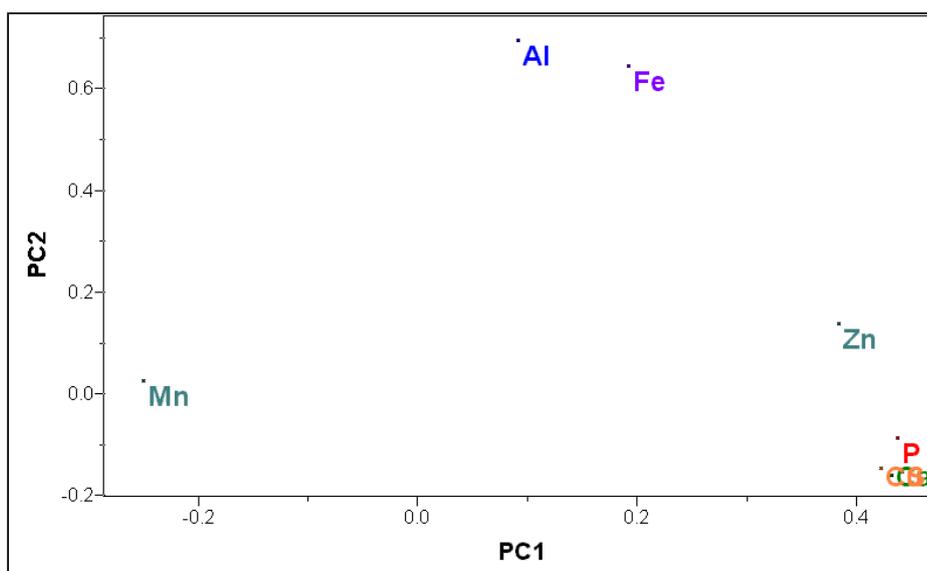


FIGURA 6.3.2.3 - Gráfico de *loadings* de PC1 x PC2 mostrando a influência das variáveis para a discriminação entre os modos de produção

A análise por HCA apresentou resultado semelhante à análise por PCA, discriminando a maioria das amostras de acordo com o modo de produção. O dendrograma resultante pode ser observado na FIGURA 6.3.2.4. Para uma melhor visualização das amostras contidas nos dois grupos foram feitas duas expansões, as quais são mostradas nas FIGURAS 6.3.2.5 e 6.3.2.6.

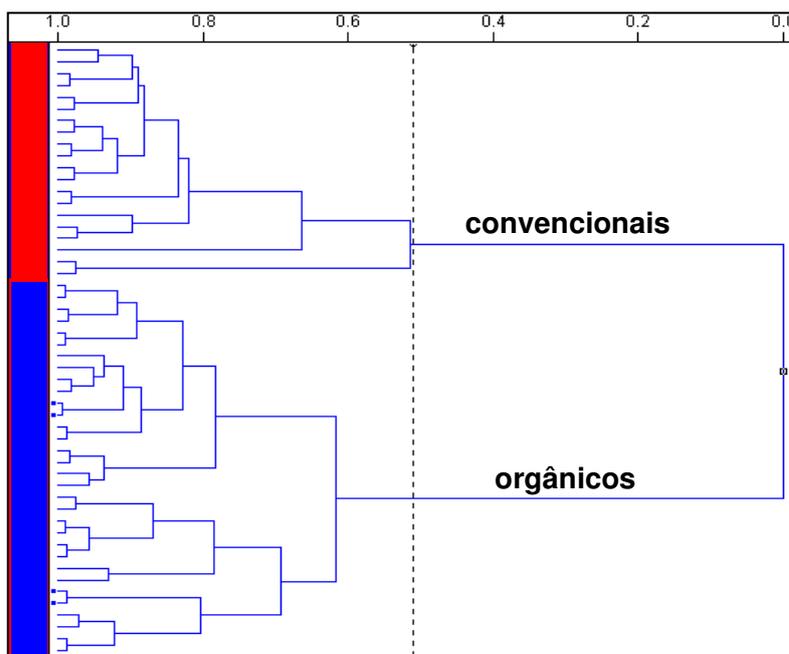


FIGURA 6.3.2.4 – Dendrograma mostrando a discriminação entre os cafés crus produzidos do modo orgânico e convencional, para o conjunto de dados de ICP OES

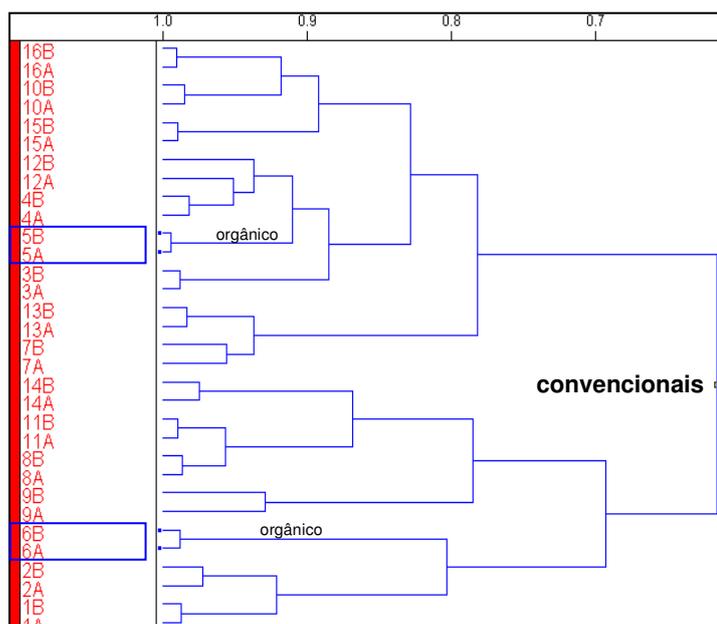


FIGURA 6.3.2.5 – Expansão superior do dendrograma, mostrando o grupo para cafés produzidos convencionalmente

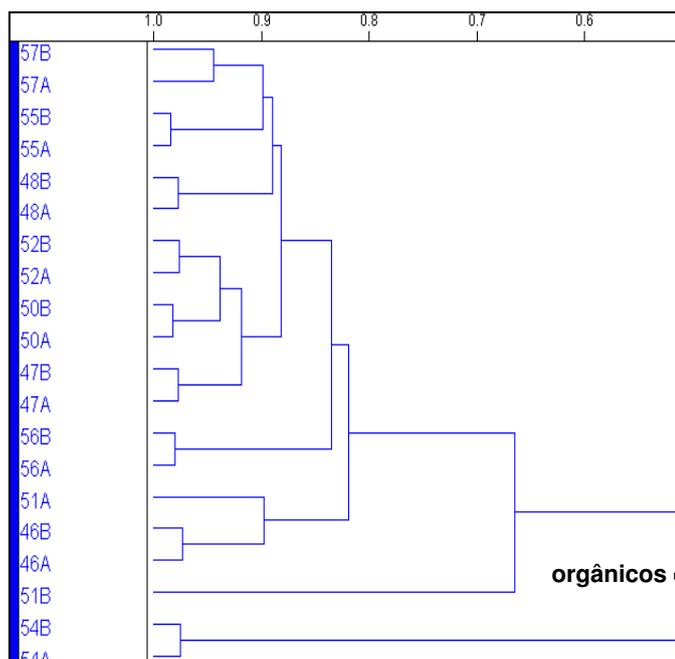


FIGURA 6.3.2.6 - Expansão inferior do dendrograma, mostrando o grupo para cafés produzidos organicamente

Dois agrupamentos separados são observados, um superior contendo as amostras de café produzido convencionalmente e um inferior, contendo a maior parte das amostras de café produzido organicamente. Isso pode ser melhor visualizado nas expansões do dendrograma, nas FIGURAS 6.3.2.5 e 6.3.2.6. Na expansão superior, que mostra o agrupamento das amostras produzidas convencionalmente, pode ser notado que duas amostras são situadas erroneamente. Essas mesmas amostras 5 e 6 que correspondem respectivamente às amostras analisadas por RMN, BourO e Org, também foram agrupadas de forma errônea utilizando essa técnica. Essa concordância entre os métodos por HCA e um maior distanciamento das amostras de mesma categoria, na análise por PCA, vem por em dúvida a veracidade dessas amostras como sendo de produção orgânica, principalmente a BourO (5) que se mostrou sempre agrupada às convencionais .

Tendo uma boa discriminação entre os modos de produção utilizando os métodos não supervisionados de reconhecimento de padrões aplicou-se o método KNN para construir um modelo de classificação. Para tal modelo, o número ótimo de vizinhos foi escolhido com base no gráfico da FIGURA 6.3.2.7, sendo selecionado k igual a um, pois não houve nenhum erro de previsão.

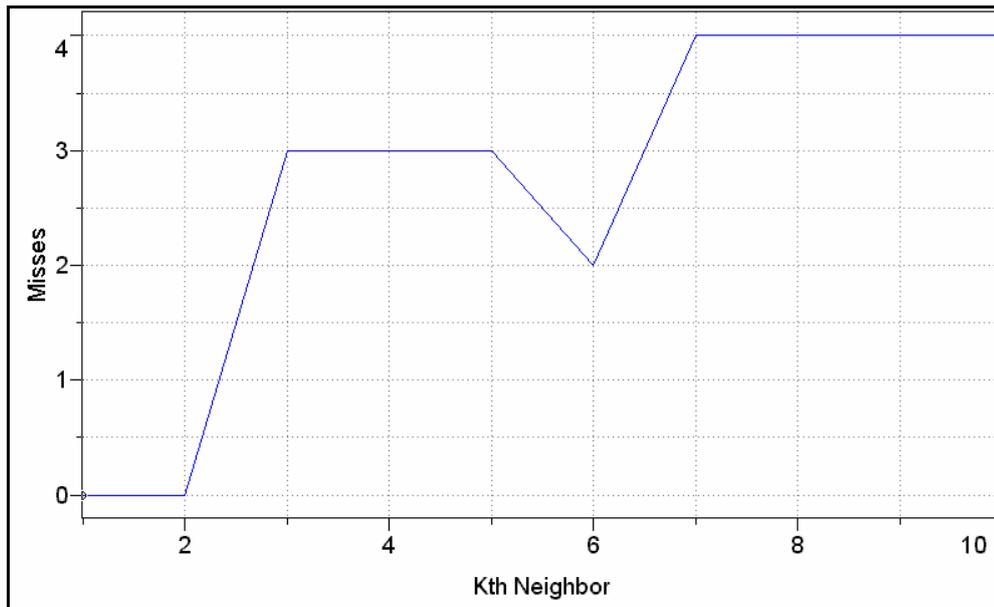


FIGURA 6.3.2.7 – Gráfico dos erros de previsão para as amostras do conjunto de treinamento do modelo KNN, aplicado aos dados de ICP OES obtidos para cafés produzidos convencionalmente e organicamente

Considerando-se as seis amostras teste utilizadas para verificar a eficiência de previsão, o modelo construído a partir das variáveis mais importantes na discriminação por PCA e HCA mostrou-se eficiente, atribuindo a classe das amostras com 87,5% de acertos. Porém, é importante ressaltar que quando o modelo de classificação foi construído com todas as variáveis, incluindo as que tiveram pequena influência na discriminação por PCA e HCA, ele foi mais eficiente que o anterior resultando em um acerto de 100% na previsão da classe das amostras. Adicionalmente ao que foi apresentado até o momento podemos verificar que neste caso um maior número de variáveis resulta em melhores modelos de classificação.

## **6.4 – CONCLUSÕES**

A análise por PCA e HCA aplicada nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de cafés crus se mostrou capaz de auxiliar na verificação e distinção do modo de produção dos cafés, pois determinaram pequenas diferenças em suas composições químicas discriminando satisfatoriamente a maioria das amostras de cafés produzidas organicamente e convencionalmente.

Adicionalmente, o método KNN mostrou uma alta eficiência, atribuindo corretamente a classe de 100% das amostras teste, e indicou ser uma ferramenta atrativa na discriminação entre os modos de produção dos cafés a serem comercializados.

Paralelamente, a análise quimiométrica dos constituintes inorgânicos determinados por ICP OES mostrou resultado semelhante à análise por RMN, discriminando eficientemente cafés produzidos organicamente dos produzidos convencionalmente. Além disso, mostrou que apenas usando os constituintes Mn, Ca, Cu, P e S essa discriminação é possível. Porém, um maior número de variáveis é necessário para fornecer modelos de classificação mais eficientes.

# **CAPÍTULO 7**

**CAFÉS APRESENTANDO DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES NA  
PROVA DE XÍCARA: MOLE, DURO E RIO**

## **7.1 - OBJETIVOS**

Auxiliar o processo de classificação do café quanto à qualidade da bebida, que atualmente é feita de forma subjetiva por degustadores, fornecendo uma metodologia com embasamento científico que seja capaz de discriminar cafés com diferentes qualidades de acordo com suas composições químicas.

## **7.2 – MATERIAIS E MÉTODOS**

### 7.2.1 - Amostras:

As amostras analisadas foram avaliadas por degustadores e receberam as seguintes classificações de acordo com a qualidade apresentada na prova de xícara: café mole (14062, 9820, 03, B056 e le3), duro (02, le2, 9819, 14420, B121 e 6693), duro fermentado (le1, 6602 e 9832), duro mole (13945), duro sujo (B129), rio (04), rio fermentado (01) e rio sujo (05). As amostras foram fornecidas pela cooperativa dos cafeicultores e agropecuaristas, COCAPEC, localizada em Franca/SP. Dentre essas, as amostras 01, 02, 03, 04 e 05 foram fornecidas apenas como café cru. As amostras torradas tiveram o padrão de torra para a degustação, ou seja, torra fraca.

As amostras de café cru e torrado, estudadas na forma da bebida e por sonda convencional de RMN, foram moídas e preparadas conforme descrito no capítulo 2.

Quanto às amostras de café cru submetidas à análise por HR-MAS, essas foram preparadas misturando-se uma pequena quantidade dos grãos moídos com 2 a 3 gotas da solução de trimetilsililpropionato de sódio (TMSP-2,2,3,3-d<sub>4</sub>) em D<sub>2</sub>O, como referência interna para os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono (TMSP: 0,00 ppm) e empacotadas em rotor esférico de 4 mm, cujo volume é de 12 µL.

### 7.2. 2 - Medidas espectroscópicas:

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H das amostras de café cru e torrado, analisadas na forma líquida, foram adquiridos conforme descrito no capítulo 2 para as amostras de café cru, sendo utilizados os mesmos parâmetros de aquisição e processamento, com exceção do fator de ganho do receptor para as amostras de café torrado, que foi de 72.

Os espectros 1D e 2D obtidos diretamente dos grãos de café cru moídos, foram adquiridos empregando-se uma sonda de alta resolução com giro no ângulo mágico (HR-MAS) para rotor de 4 mm e com gradiente de campo na direção do eixo Z. As amostras foram giradas a aproximadamente 5000 Hz.

Os espectros de  $^1\text{H}$ , obtidos diretamente dos grãos de café cru moídos, foram adquiridos com supressão do sinal da água utilizando-se a seqüência de pulsos *zgcppr* com atenuação da potência do pulso de pré-saturação de 60 dB (PL9), largura espectral de 4139 Hz (SWH), tempo de aquisição de 2,6 s (AQ), tempo de espera entre cada aquisição de 1,2 s (D1), duração do pulso de rf de 11,80  $\mu\text{s}$  (P1), 32768 pontos digitalizados (TD), fator de ganho do receptor de 181 (RG) e acúmulo de 128 FIDs (NS). O processamento foi feito com 32768 pontos (SI) e multiplicação exponencial com fator de alargamento de linha de 0,5 Hz (LB). A fim de escolher a melhor seqüência para a análise em questão, algumas amostras também tiveram seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos a partir da seqüência de pulsos CPMG, que foi aplicada com tempo de eco ( $\tau$ ) de 0,8 ms e 150 ciclos (n).

O espectro de *g*COSY foi obtido empregando-se a seqüência de pulsos *cosygspr*, com 4096 pontos (TD2) digitalizados em  $F_2$ , largura espectral em  $F_2$  e  $F_1$  de 4139 Hz (SWH), tempo de aquisição de 0,49 s (AQ), tempo de espera entre cada aquisição de 1,6 s (D1) e atenuação da potência do pulso de pré-saturação de 60 dB (PL9). Foram acumulados 16 FIDs (NS) e realizados 256 experimentos (TD1) no eixo  $F_1$ . No processamento, foram utilizados 2048 pontos (SI) em ambos os eixos.

O espectro de *g*HSQC foi obtido empregando-se a seqüência de pulsos *invietgssi*, com 4 096 pontos (TD2) digitalizados em  $F_2$ , larguras espectrais de 4139 Hz (SWH) em  $F_2$  e de 21645 Hz (SWH) em  $F_1$ , tempo de aquisição de 0,49 s (AQ) e tempo de espera entre cada aquisição de 1,2 s (D1). Foram acumulados 32 FIDs (NS) e realizados 280 experimentos (TD1) no eixo  $F_1$ . No processamento, foram utilizados 2048 pontos (SI) em  $F_2$  e  $F_1$  e empregada multiplicação de seno quadrado (QSINE) com seno (SSB) igual a 3 em ambos os eixos.

O espectro de *g*HMBC foi obtido empregando-se a seqüência de pulso *inv4gslprnd*, com 4096 pontos (TD2) digitalizados em  $F_2$ , larguras espectrais de 4139 Hz (SWH) em  $F_2$  e de 25125 Hz (SWH) em  $F_1$ , tempo de aquisição de 0,49 s (AQ), tempo para evolução do acoplamento em longa distância de 62,5 ms (D6) e tempo de espera entre cada aquisição de 1,2 s (D1). Foram acumulados 58 FIDs (NS) e realizados 300 experimentos (TD1) no eixo  $F_1$ . No processamento foram utilizados 2048 pontos (SI) em  $F_2$  e  $F_1$  e empregada multiplicação de seno quadrado (QSINE) com seno (SSB) igual a 2 em ambos os eixos.

### 7.2.3 - Análise quimiométrica

Os métodos de análise quimiométrica PCA, HCA e KNN foram aplicados à matriz de dados contendo os espectros, em triplicata, de RMN de  $^1\text{H}$  de amostras líquidas e separadamente, de amostras “semi sólidas” (dados de RMN de  $^1\text{H}$  HR-MAS).

## 7.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.3.1 – Análise dos dados obtidos por RMN de $^1\text{H}$ de líquidos para cafés crus

Atualmente, um dos mais importantes processos de avaliação da qualidade do café é a análise sensorial, feita através da prova de xícara. Na qual, degustadores treinados utilizam suas habilidades para classificar o tipo de bebida. Nesse trabalho, utilizamos amostras submetidas a esse processo de avaliação na análise por RMN e métodos quimiométricos a fim de determinar as diferenças características na composição química de cada tipo de café e correlacioná-las com a qualidade exibida.

A FIGURA 7.3.1.1 mostra os espectros dos cafés classificados por degustadores em três tipos distintos de qualidade conforme o sabor e aroma apresentados pela bebida; tipo mole (A) representando um café de melhor qualidade, tipo duro (B), um café de qualidade intermediária e tipo rio (C), um café de pior qualidade.

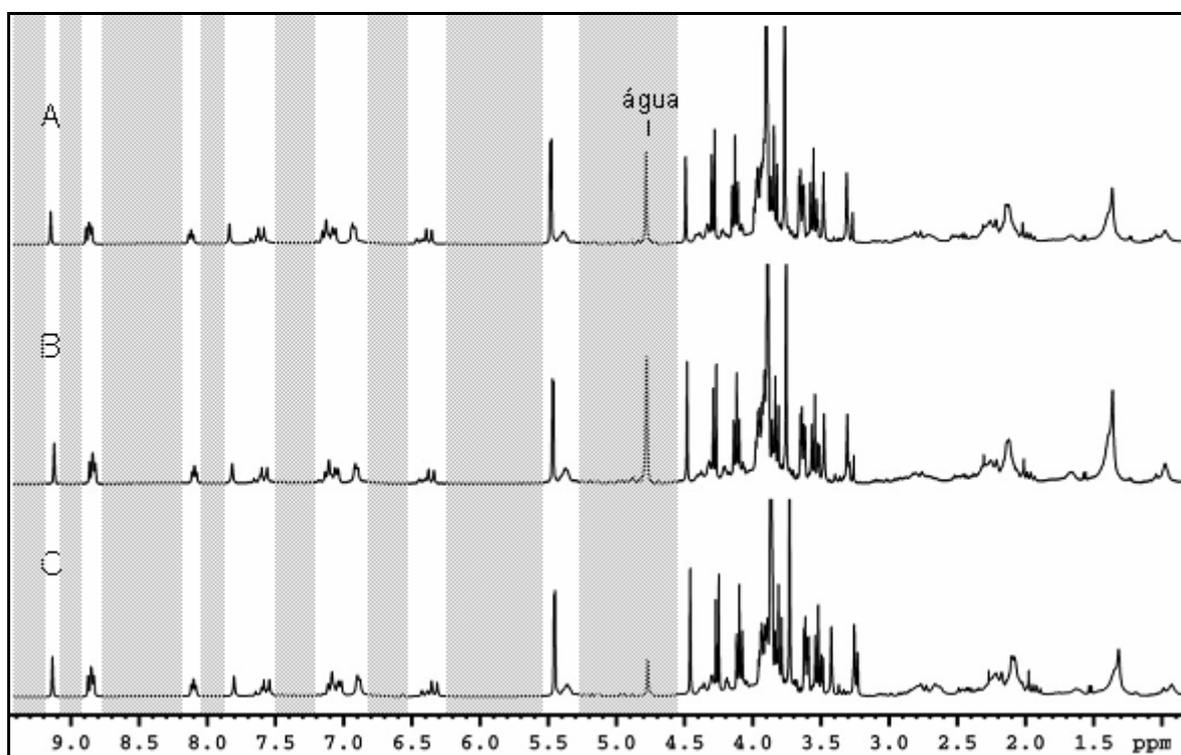
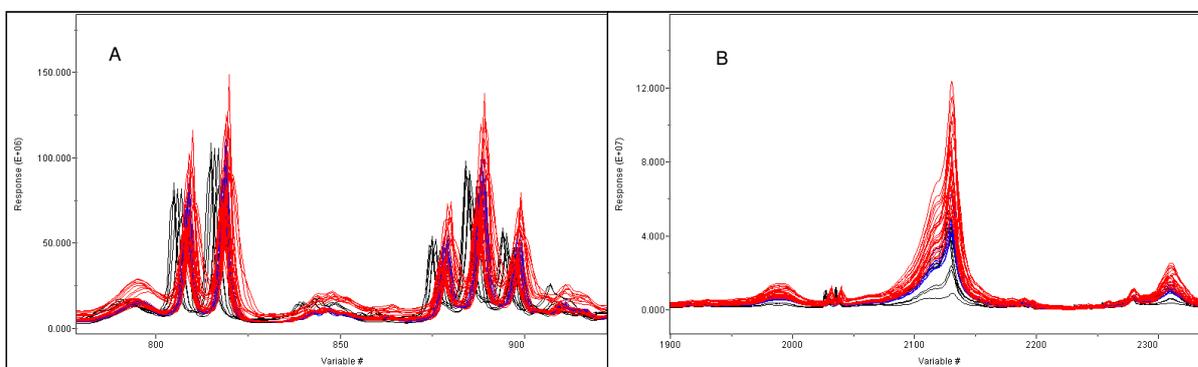


FIGURA 7.3.1.1 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos cafés crus dos tipos mole (A), duro (B) e rio (C)

A análise visual dos espectros de hidrogênio dos diferentes tipos de café não permitiu observar diferenças significativas entre eles. Dessa forma, seguiu-se a análise por PCA e HCA a fim de observar alguma tendência natural do agrupamento entre as amostras.

As variáveis mais importantes, na análise por PCA, foram àquelas contidas nas regiões características de açúcares, de 3,00 a 4,50 ppm e de ésteres de ácidos graxos, de 0,80 a 3,00 ppm. A FIGURA 7.3.1.2 mostra parte dessas regiões em que todos os espectros estão sobrepostos permitindo observar com clareza um maior teor de açúcares (A) e ésteres de ácidos graxos (B) nos cafés do tipo duro e menor nos cafés do tipo rio.



A FIGURA 7.3.1.2: Gráfico de linhas mostrando as diferenças espectrais nas regiões dos açúcares (A) e dos ésteres de ácidos graxos (B) para os cafés com diferentes qualidades: mole (●), duro (●) e rio (●).

Entretanto, todas as variáveis referentes aos sinais das amostras apresentaram uma pequena contribuição na discriminação de acordo com a qualidade da bebida, sendo assim utilizada toda a região espectral na análise quimiométrica. Somente foram excluídas as regiões destacadas em cinza, na FIGURA 7.3.1.1.

Com relação aos parâmetros utilizados na análise por componentes principais, o autoescalamento e a normalização dos dados foram suficientes para fornecer uma boa discriminação entre as amostras.

Entretanto, uma primeira análise por PCA detectou a presença de amostras com problemas na aquisição dos espectros ou que não se agruparam corretamente, considerando-se a classificação feita pelos degustadores, sendo, portanto excluídas. Dentre essas estão a replicata c1b e a amostra B056 que

apresentaram um comportamento anômalo no gráfico de *scores* devido a uma maior largura de linha observada em seus espectros. Outra amostra foi a de café mole Le3 que ficou agrupada junto aos cafés do tipo rio por apresentar espectros mais similares às amostras desse grupo. A FIGURA 7.3.1.3 confirma esse fato mostrando que o café Le3, classificado pelos degustadores como mole, apresentou sinais mais similares aos cafés do tipo rio, como o c1, que do tipo mole. Dessa forma, essas amostras “problemas” ou *outliers* foram excluídas e uma nova análise por PCA foi realizada a fim de otimizar o sistema de dados para posterior construção de modelos de classificação confiáveis.

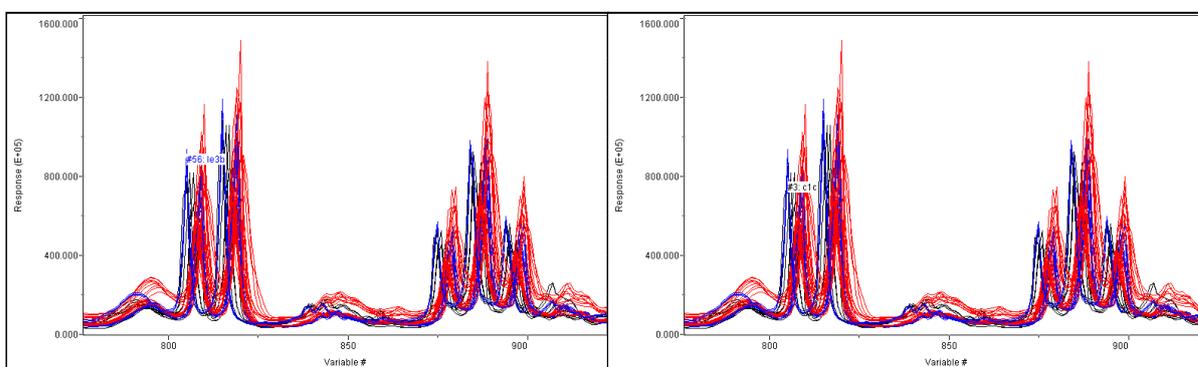


FIGURA 7.3.1.3 - Gráfico de linhas da região de açúcares, mostrando a similaridade entre os sinais apresentados pelas amostras de café mole Le3 e rio c1. O símbolo # indica a localização do sinal no espectro.

Para a nova análise por PCA foram necessários três fatores para descrever o sistema, os quais explicaram 56,80% do total de variância.

A FIGURA 7.3.1.4 mostra o gráfico de *scores* das duas primeiras componentes principais onde pode ser observada a discriminação das amostras em três grupos de acordo com a qualidade apresentada na prova de xícara. Um grupo contendo as amostras de cafés do tipo rio, que é claramente distinto daquelas dos tipos mole e duro, por PC2, e os outros dois grupos, mole e duro, distintos em PC1.

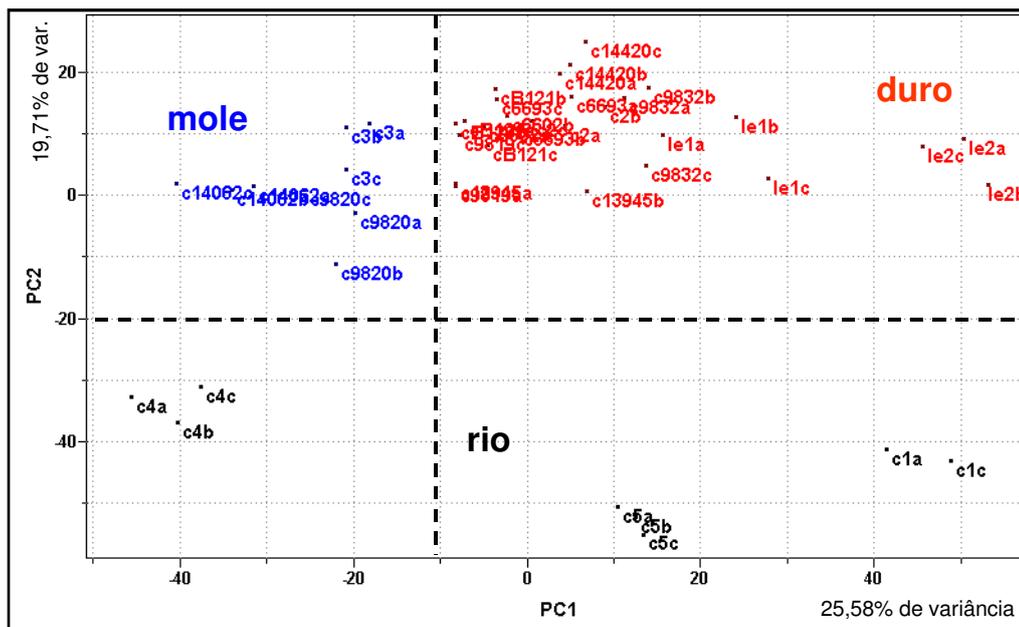


FIGURA 7.3.1.4 - Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos cafés crus que apresentam diferentes qualidades na prova de xícara: mole (●), duro (●) e rio (●).

A discriminação obtida na análise por HCA não foi tão eficiente quanto à observada pelo PCA. Com um índice de similaridade de 0,178 podem ser observados três grupos de amostras. Entretanto, dois deles contêm somente cafés dos tipos duro e rio, mas o terceiro, localizado na parte inferior do dendrograma, apresenta cafés de todos os tipos analisados, conforme pode ser notado nas FIGURAS 7.3.1.5; 7.3.1.6 e 7.3.1.7.

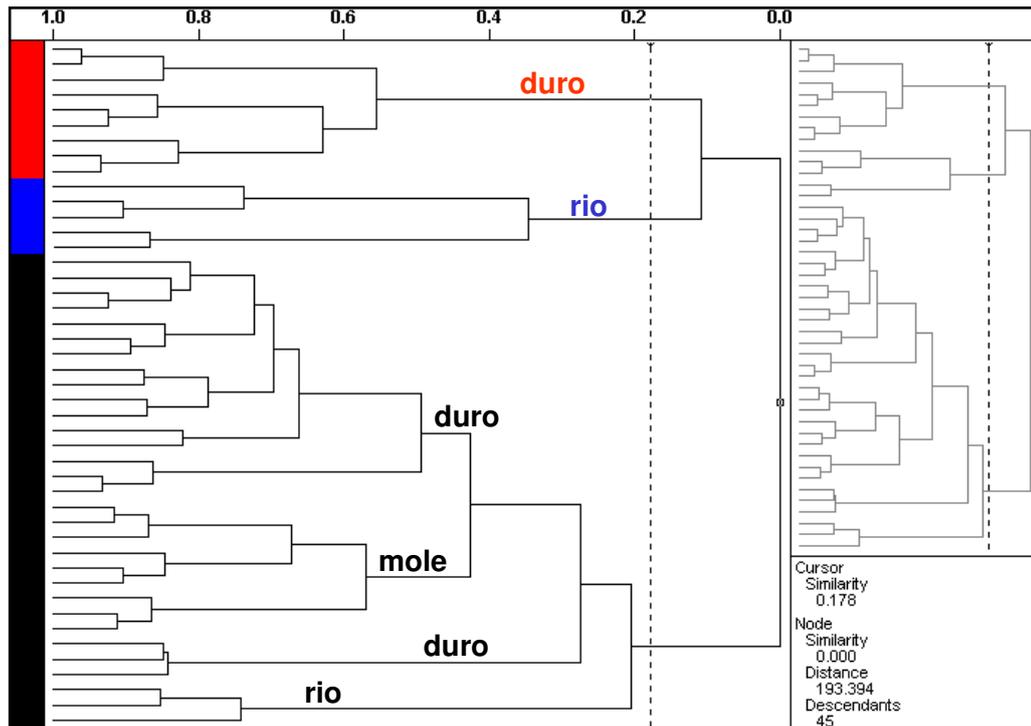


FIGURA 7.3.1.5 - Dendrograma obtido para os cafés crus que apresentam diferentes qualidades na prova de xícara: mole, duro e rio

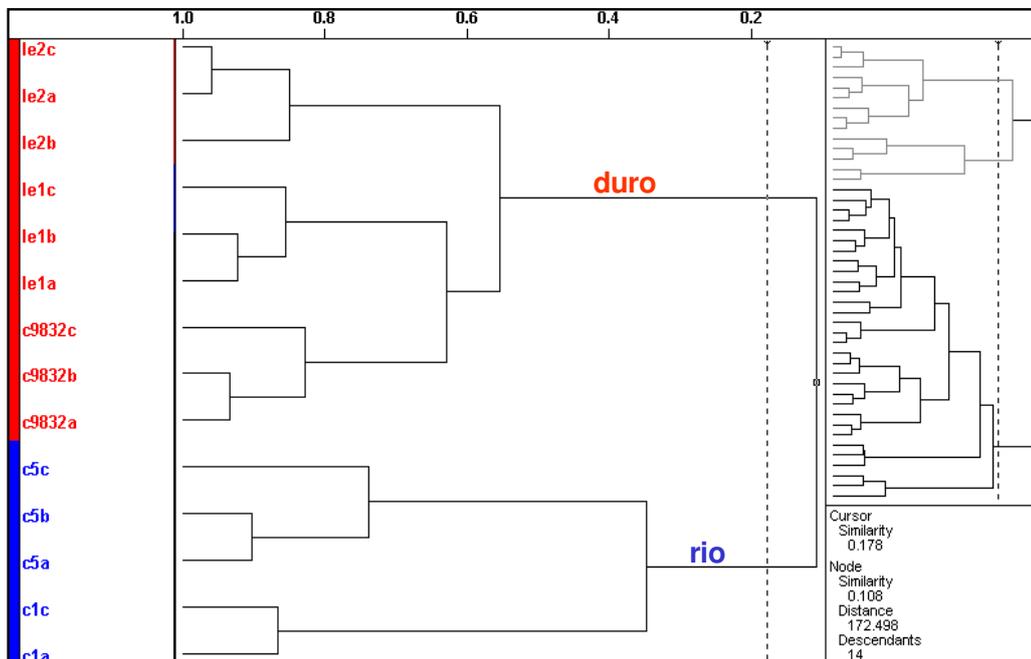


FIGURA 7.3.1.6 - Ampliação da parte superior do dendrograma mostrando a discriminação de dois grupos, um para cafés do tipo duro e outro para cafés do tipo rio

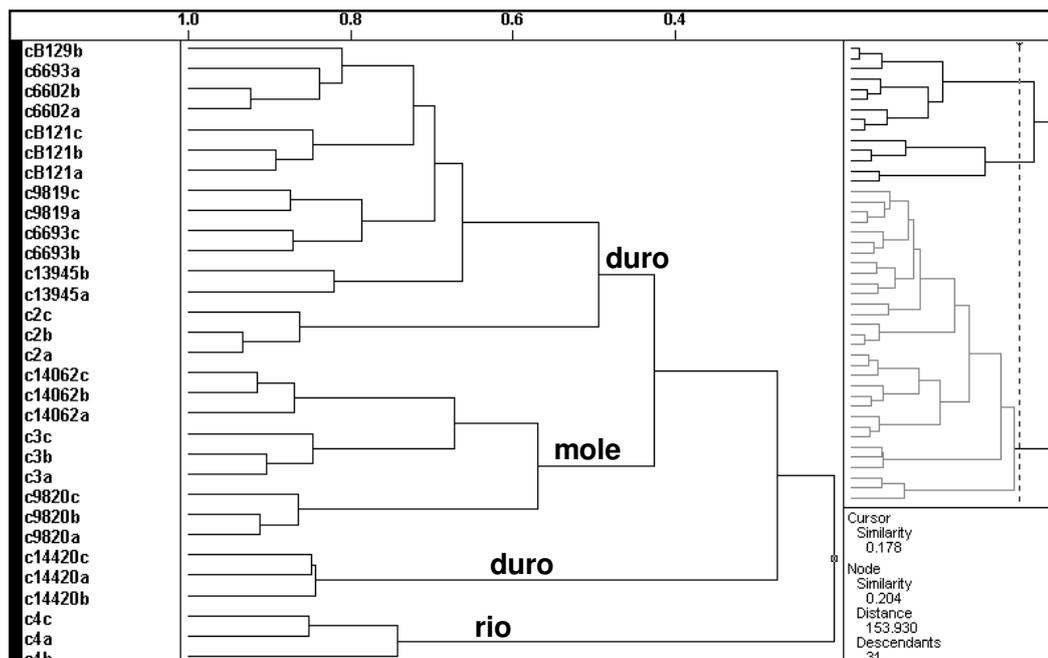


FIGURA 7.3.1.7 - Ampliação da parte inferior do dendrograma mostrando um terceiro grupo de café onde não houve discriminação e que contém todos os tipos analisados

Apesar do método HCA não apresentar uma boa discriminação entre as amostras, a análise por PCA forneceu uma discriminação considerável. A partir desse resultado decidiu-se aplicar o método de classificação ao conjunto de dados para a construção de modelos que possam classificar amostras futuras nas categorias mole, duro e rio.

Para a classificação das amostras foi usado o método KNN, cujo modelo foi construído a partir das variáveis selecionadas e parâmetros otimizados na análise por PCA. Na construção do modelo, uma amostra de cada tipo foi excluída para ter sua classe prevista pelo modelo construído a partir das demais e assim atuar como teste na verificação da eficiência preditiva do modelo.

O número ótimo de vizinhos foi escolhido com base no gráfico da FIGURA 7.3.1.8. Nesse caso, foi selecionado um, pois não houve nenhum erro de previsão quando  $k$  foi igual a 1.

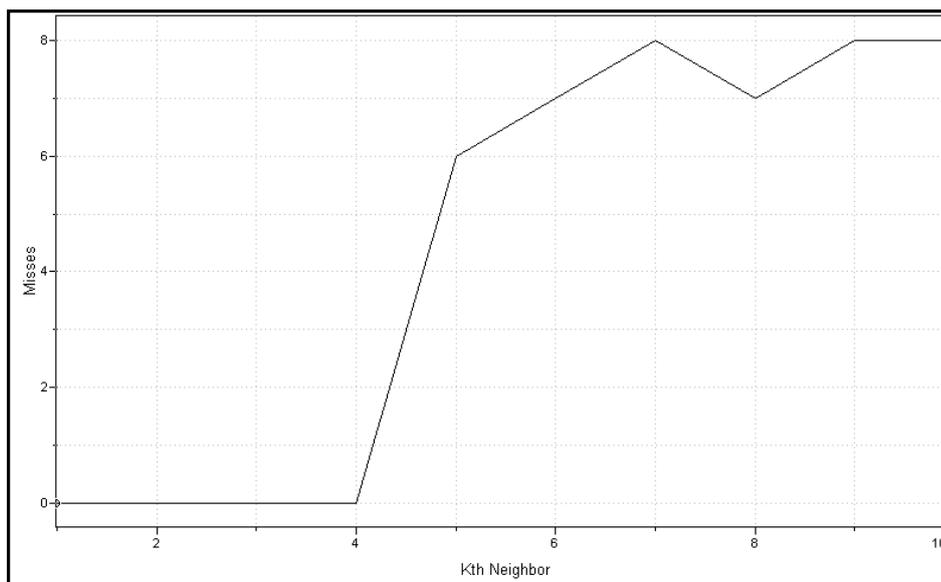


FIGURA 7.3.1.8 – Gráfico dos erros de previsão para as amostras do conjunto de treinamento do método KNN, aplicado aos dados obtidos por RMN de  $^1\text{H}$  para cafés crus com diferentes qualidades na prova de xícara

O modelo mostrou ser bastante eficiente fazendo a previsão da classe das amostras teste com 100% de acertos, TABELA 7.3.1.1. Esses resultados indicam que esse método a princípio pode auxiliar na avaliação e distinção da qualidade do café, reduzindo a subjetividade do atual teste, a “prova de xícara”, e conseqüentemente, fornecer uma avaliação baseada na composição química apresentada por cada tipo de café. Como foi verificado anteriormente, os cafés do tipo duro apresentam maiores teores de açúcares e ácidos graxos e os do tipo rio menores teores.

TABELA 7.3.1.1 - Previsão de classe para as amostras teste a partir do método KNN, aplicado aos dados dos cafés crus (na forma de bebida) com diferentes qualidades na prova de xícara

Amostra	Prova de xícara	classe	KNN
cB129	duro	1	1
c9820	mole	2	2
c1	rio	3	3

### 7.3.2 – Análise dos dados obtidos por RMN de $^1\text{H}$ de líquidos para cafés torrados

Tendo obtido sucesso na discriminação entre cafés crus de diferentes qualidades essa mesma análise foi estendida aos cafés torrados sob condições padrões para o teste da prova de xícara. Com o objetivo de correlacionar as diferenças químicas desses cafés com suas qualidades foram analisados cafés do tipo mole e duro. A FIGURA 7.3.2.1 apresenta os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de cafés torrados classificados pelos degustadores como mole (A) e duro (B). A diferença mais evidente entre tais espectros é a maior intensidade do sinal em 1,30 ppm, para o café do tipo duro, o que pode ser atribuído a um maior teor de ésteres de ácidos graxos.

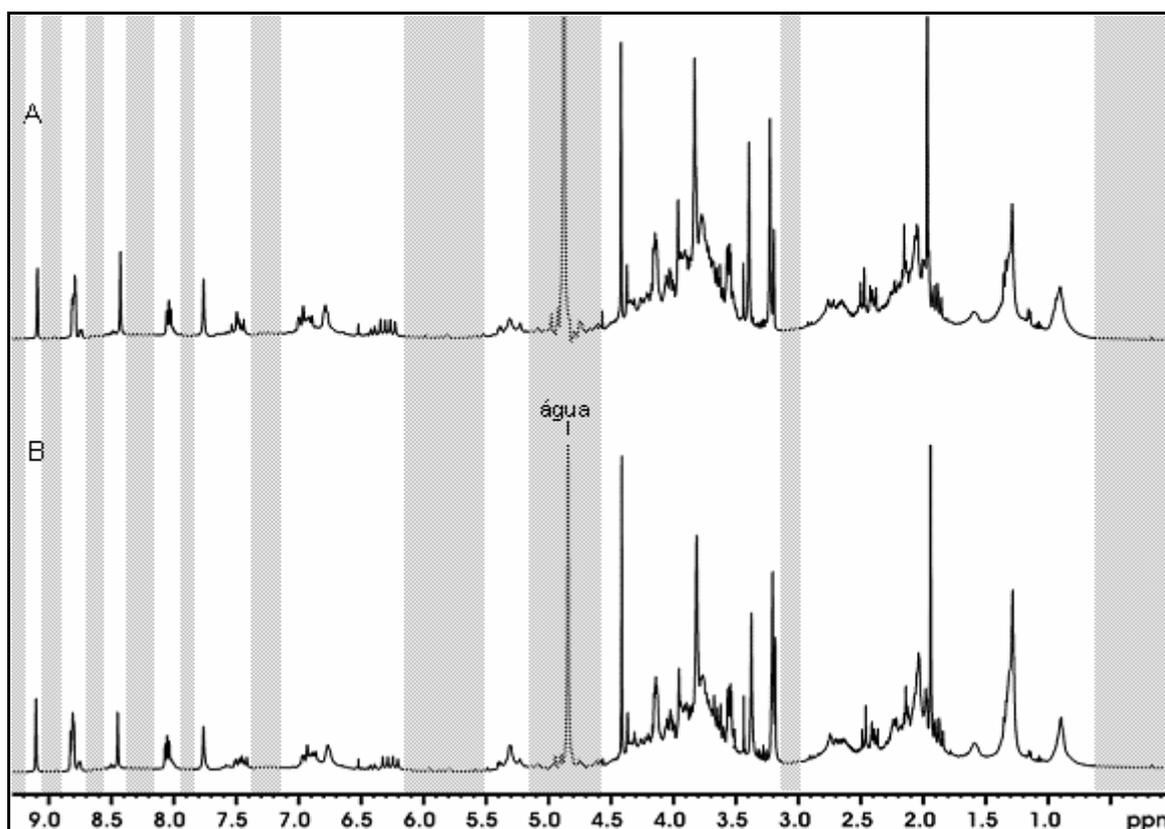


FIGURA 7.3.2.1 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos cafés torrados dos tipos mole (A) e duro (B)

Embora os espectros mostrados na FIGURA 7.3.2.1 apresentem diferenças no teor de ácidos graxos para cafés mole e duro, na análise de todas as amostras essa e outras pequenas diferenças não foram suficiente para discriminá-las conforme sua classificação na prova de xícara. Nenhuma seleção de variáveis foi

capaz de fornecer uma boa discriminação das amostras nas análises de padrões não supervisionados (PCA e HCA).

Dessa forma, em comparação com as amostras de café cru onde todos os compostos apresentaram alguma contribuição, as análises por PCA e HCA foram feitas utilizando-se todas as variáveis, as quais não foram destacadas em cinza na FIGURA 7.3.2.1.

O número de fatores necessários para descrever o sistema, na análise por PCA, foi cinco e explicaram 73,75% de variância.

No gráfico de *scores*, FIGURA 7.3.2.2, os dois tipos de cafés não formaram grupos definidos e ficaram dispersos não sendo observada nenhuma tendência quanto a um possível agrupamento. Da mesma forma, no dendrograma, FIGURAS 7.3.2.3, 7.3.2.4 e 7.3.2.5 as amostras do tipo mole ficaram localizadas entre aquelas de café duro, não sendo, portanto, discriminadas. Esses resultados mostram que o processo de torrefação afeta a composição química dos cafés de forma que minimizam as diferenças decorrentes da sua qualidade apresentada na prova de xícara e mais uma vez reforçam os melhores resultados obtidos das análises utilizando-se os cafés crus.

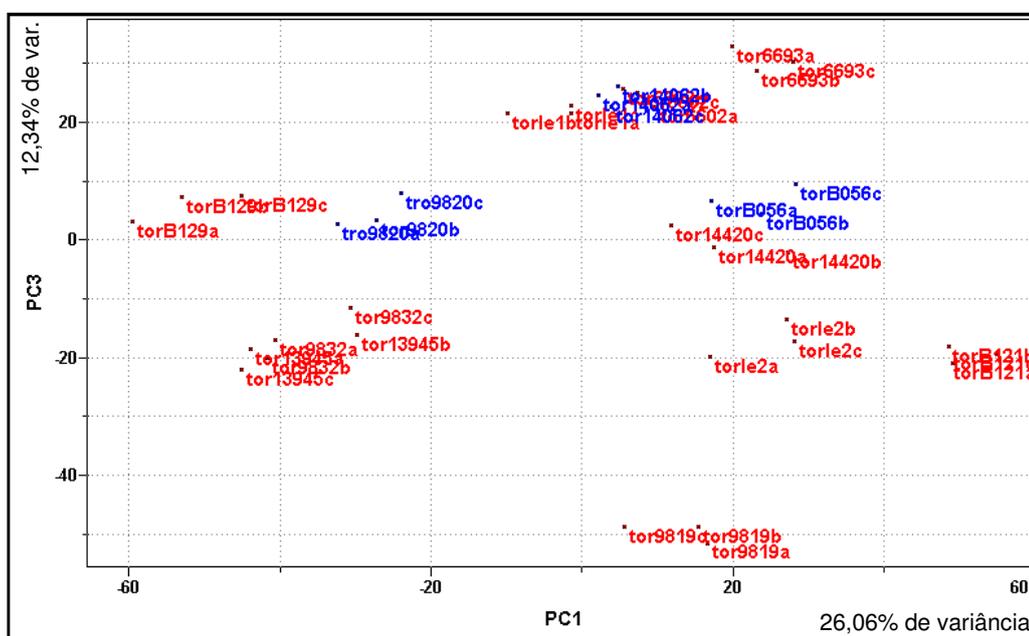


FIGURA 7.3.2.2 - Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos cafés torrados dos tipos mole (●) e duro (●).

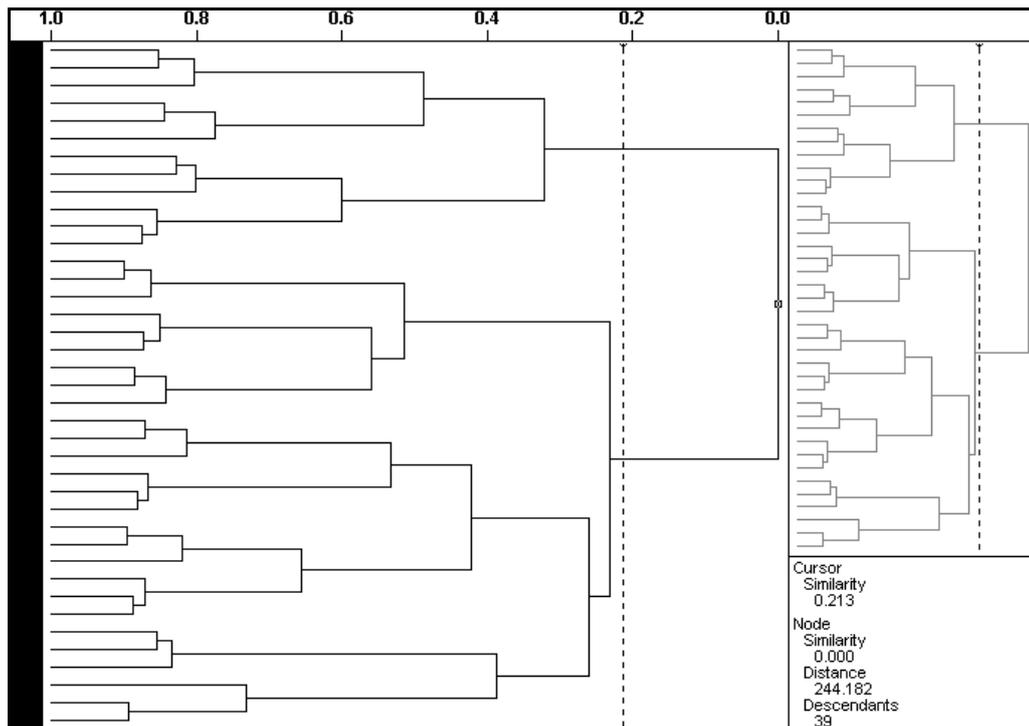


FIGURA 7.3.2.3 - Dendrograma obtido para os cafés torrados que apresentam classificação mole e duro na prova de xícara

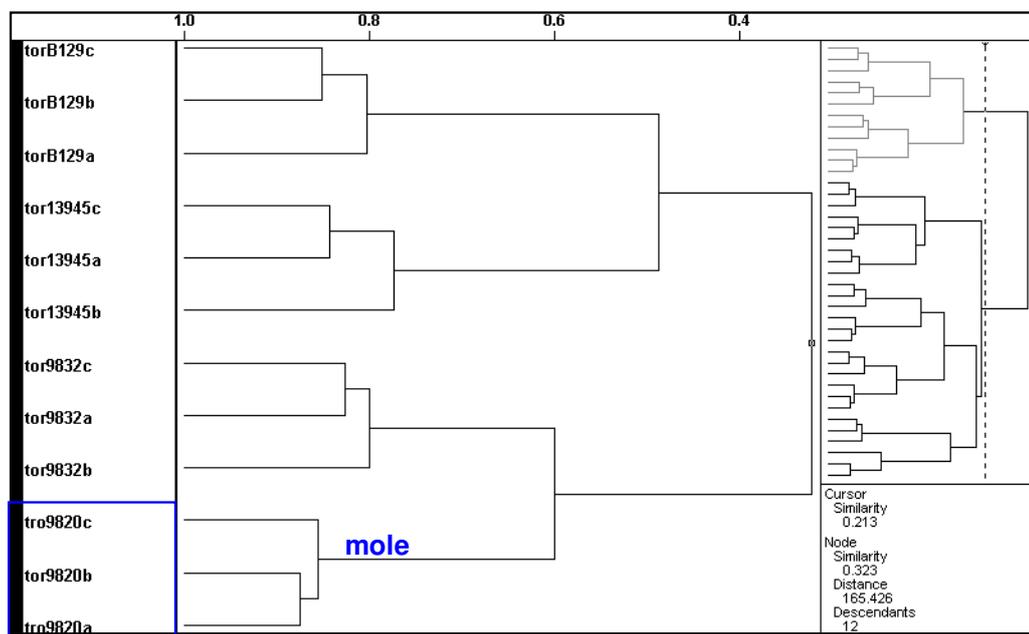


FIGURA 7.3.2.4 - Ampliação da parte superior do dendrograma mostrando que não houve discriminação entre os cafés do tipo mole e duro

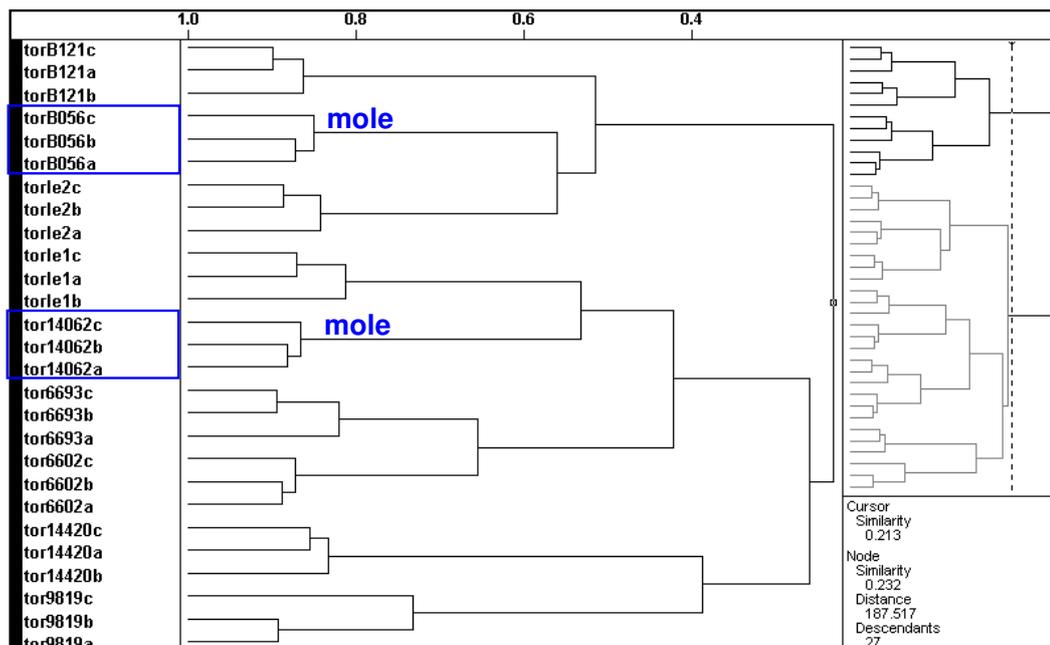


FIGURA 7.3.2.5 - Ampliação da parte inferior do dendrograma mostrando que não houve discriminação entre os cafés do tipo mole e duro

Como não houve discriminação satisfatória nos métodos de análise exploratória, os métodos de classificação não foram aplicados a esses dados já que tal verificação sugere que os mesmos não resultariam em bons modelos para a classificação de amostras futuras.

### 7.3.3 – Análise dos dados obtidos por RMN de $^1\text{H}$ HR-MAS para cafés crus

A técnica HR-MAS tem recebido grande atenção na análise de alimentos por permitir que amostras heterogêneas ou “semi-sólidas” forneçam espectros com resolução semelhantes à de líquidos. Tendo ainda como vantagem adicional, dispensar qualquer tipo de tratamento ou extração da amostra, bastando apenas a adição de algumas gotas do solvente deuterado à amostra moída.

Com o objetivo de verificar a eficiência dessa técnica na discriminação dos cafés com diferentes qualidades na prova de xícara a mesma foi utilizada para a aquisição dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de café cru anteriormente analisadas na forma líquida.

Uma seqüência de pulsos comumente empregada em análises por HR-MAS e que foi empregada para a aquisição dos espectros de algumas amostras foi a CPMG. Sua principal vantagem se deve ao fato de eliminar os sinais alargados das

moléculas com  $T_2$  curto. As moléculas de alta massa molecular têm tempo de relaxação transversal curto em relação as de baixa massa molecular, por se tratarem de sistemas rígidos e apresentarem baixa mobilidade molecular o que resulta no alargamento dos seus sinais de ressonância (CLARIDGE,1999). Esses sinais alargados podem prejudicar a análise quimiométrica por causarem sobreposição de sinais e com isso diminuir a quantidade de informação contida nos espectros.

A seqüência CPMG faz com que a magnetização seja mantida no plano xy através de sucessivos pulsos de  $180^\circ$ , seguidos por intervalos de tempo  $\tau$ , até que os spins com valores menores de  $T_2$  tenham relaxado. O espectro é então adquirido contendo apenas as ressonâncias de interesse.

Por outro lado, a manutenção dos sinais alargados pode representar uma informação importante na distinção entre os cafés com diferentes qualidades. Dessa forma, a seqüência zgcprr foi aplicada, garantindo que esses compostos também fossem verificados quanto à sua relevância na discriminação entre os cafés.

A seqüência zgcprr, obtém espectros onde somente o sinal do solvente é suprimido, permitindo assim a análise de todos os outros compostos presentes. Essa seqüência se diferencia da convencionalmente empregada para o mesmo propósito (zgpr) por substituir o pulso de  $90^\circ$ , aplicado após a irradiação contínua na freqüência do sinal da água, por um pulso composto de  $90^\circ$  com fases invertidas ( $90_x 90_y 90_{-x}$  e  $90_{-y}$ ) (BAX, 1985).

Assim, ambas as seqüências foram aplicadas na aquisição de algumas amostras de café a fim de verificar qual se mostra mais eficiente em sua discriminação de acordo com a qualidade apresentada na prova de xicara.

A FIGURA 7.3.3.1 mostra os espectros para uma amostra de café utilizando-se na aquisição as duas seqüências de pulsos. Comparando-se o espectro adquirido a partir da seqüência CPMG (A) em relação ao obtido pela seqüência zgcprr (B) observa-se que houve uma grande redução dos sinais alargados na região de 0,5 a 3,0 ppm, e uma redução menos significativa na região de 4,0 a 4,5 ppm, a qual apresenta também outros sinais referentes a moléculas de baixa massa molecular.

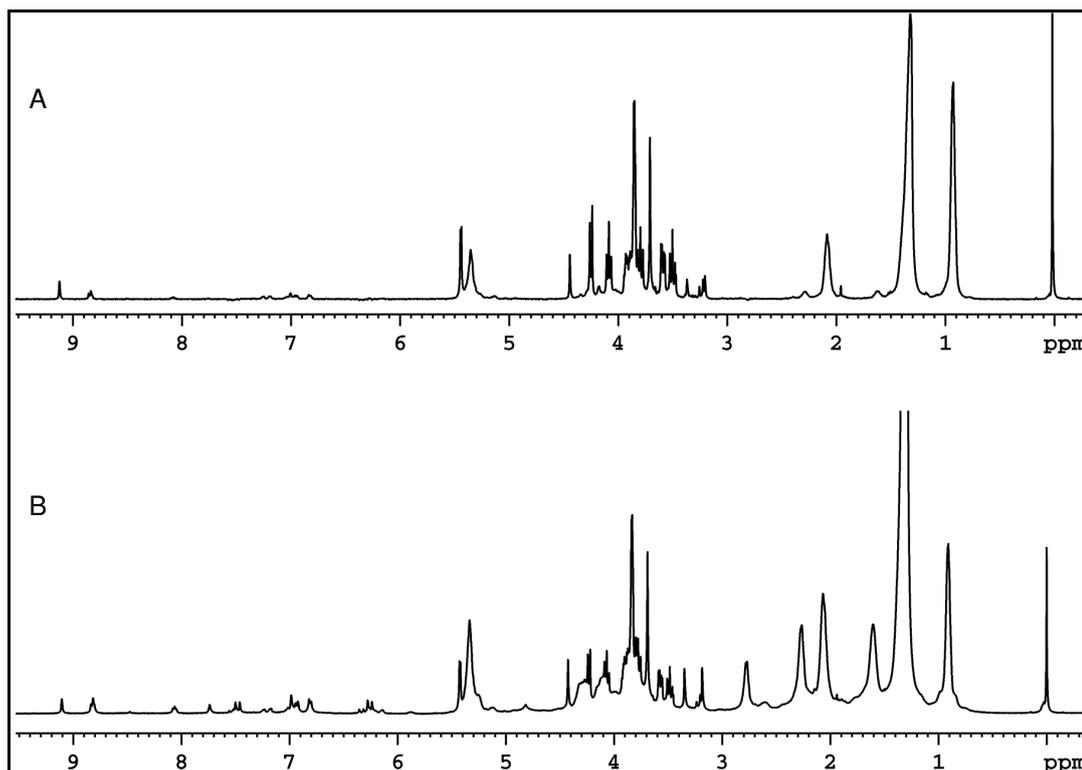


FIGURA 7.3.3.1 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de café cru adquiridos na sonda HR-MAS utilizando-se as seqüências de pulsos CPMG (A) e zgcprr (B)

A análise por PCA desses conjuntos de dados foi feita utilizando os mesmos parâmetros quimiométricos aplicados aos dados obtidos via RMN de líquidos.

Para o conjunto de dados contendo os espectros obtidos pela seqüência de pulsos CPMG o número ótimo de fatores foi cinco e essas descreveram 49,46% da variabilidade do sistema. Já para o conjunto envolvendo os espectros obtidos pela seqüência zgcprr foram necessárias apenas três componentes principais, as quais descreveram 57,61% da variância dos dados.

As FIGURAS 7.3.3.2 e 7.3.3.3 apresentam a discriminação resultante das análises por PCA dos espectros obtidos a partir das seqüências CPMG e zgcprr, respectivamente.

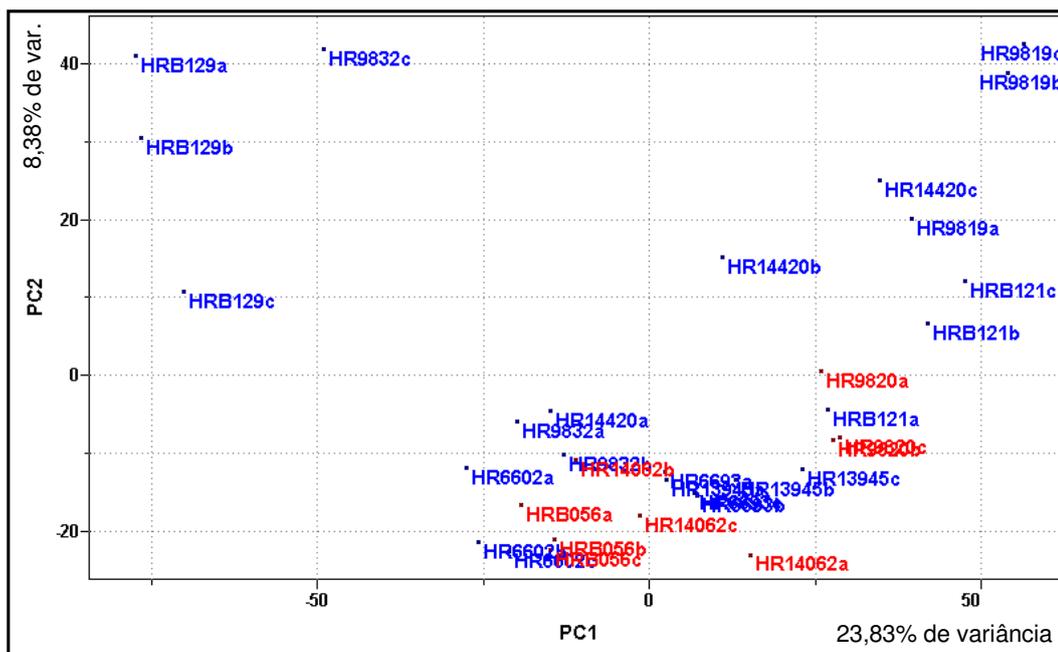


FIGURA 7.3.3.2 - Gráfico de scores de PC1 x PC2 de alguns cafés crus dos tipos mole (●) e duro (●) cujos espectros de  $^1\text{H}$  HR-MAS foram obtidos a partir da seqüência de pulsos CPMG.

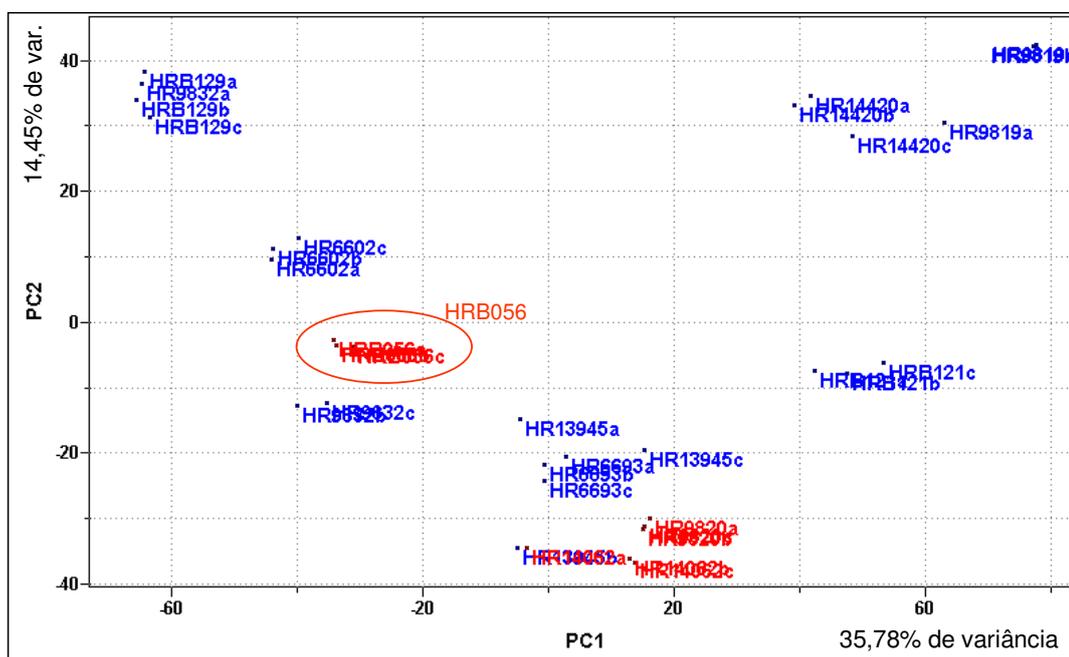


FIGURA 7.3.3.3 - Gráfico de scores de PC1 x PC2 de alguns cafés crus dos tipos mole (●) e duro (●) cujos espectros de  $^1\text{H}$  HR-MAS foram obtidos a partir da seqüência de pulsos zgcprr.

Quanto à discriminação dos cafés em mole e duro, foi observada uma maior tendência quando utilizou-se a seqüência de pulsos zgcprr, FIGURA 7.3.3.3.

Nota-se nessa figura que com exceção da amostra B056, as demais do tipo mole ficaram na parte inferior do gráfico de *scores* (valores mais negativos em PC2), enquanto as amostras de café duro tenderam a se localizar acima desses, exceto a replicata 13945b, que ficou localizada junto com a 14062a. Já para os cafés obtidos a partir da seqüência CPMG, FIGURA 7.3.3.2, essa tendência não foi verificada com clareza tendo várias amostras de cafés do tipo duro localizadas juntamente com cafés do tipo mole. Além disso, um outro fator que prejudicou essa análise foi uma menor repetitividade das medidas espectrais, demonstrada pela distância entre as replicatas (a-c) no gráfico de *scores*. Observa-se na maior parte dos casos que as replicatas de uma amostra apresentaram maior variação entre si do que em relação a outras amostras, fato esse não observado quando os espectros foram adquiridos usando a seqüência zgcprr.

Dessa forma, escolheu-se a seqüência de pulsos zgcprr para dar continuidade à aquisição dos espectros das demais amostras e prosseguir com as análises quimiométricas.

Assim como no estudo das amostras líquidas, a análise por PCA foi feita em todas as amostras estudadas, e em seguida, uma amostra de cada tipo foi excluída para a construção do modelo de classificação e usadas como teste na validação externa.

A seleção de variáveis mostrou uma maior contribuição na discriminação das amostras para os sinais entre 0,5 e 3,0 ppm, referentes aos ésteres de ácidos graxos e uma pequena contribuição também foi verificada para a região de açúcares, de 3,0 a 4,5 ppm, corroborando com as regiões de maior importância na análise via RMN de líquidos.

O número de fatores necessários para descrever o sistema foi três e descreveram 70,52% de variância.

A análise por PCA, apresentada na FIGURA 7.3.3.4, mostrou a mesma tendência de discriminação observada para as amostras líquidas, sendo os cafés do tipo rio distinguidos, em PC2, dos cafés duro e mole, e esses discriminados em PC1. Na mesma figura também pode ser observado que as amostras de café duro se mostraram bastante dispersas, o que representa uma maior variabilidade em suas composições, corroborando com as diversas classificações feitas pelos degustadores (duro, duro fermentado, duro mole e duro sujo). Com relação à amostra HR13954 uma importante constatação pôde ser feita. De acordo com a

classificação dos degustadores essa apresentou caráter de bebida dura mole, sendo essa agrupada juntamente às amostras do tipo mole na análise via HR-MAS e às do tipo duro na RMN de líquidos, e ainda nessa última, dentre as amostras do tipo duro, se localizou mais próxima às de café mole confirmando assim seu caráter ambíguo.

A amostra de café do tipo mole HRLe3, excluída da análise, foi agrupada de forma errônea aos cafés do tipo rio, considerando-se a classificação dos degustadores. Porém, esse mesmo agrupamento foi obtido a partir da análise dos cafés crus na forma líquida o que põe em dúvida a veracidade da sua classificação, dada como mole, na prova de xícara.

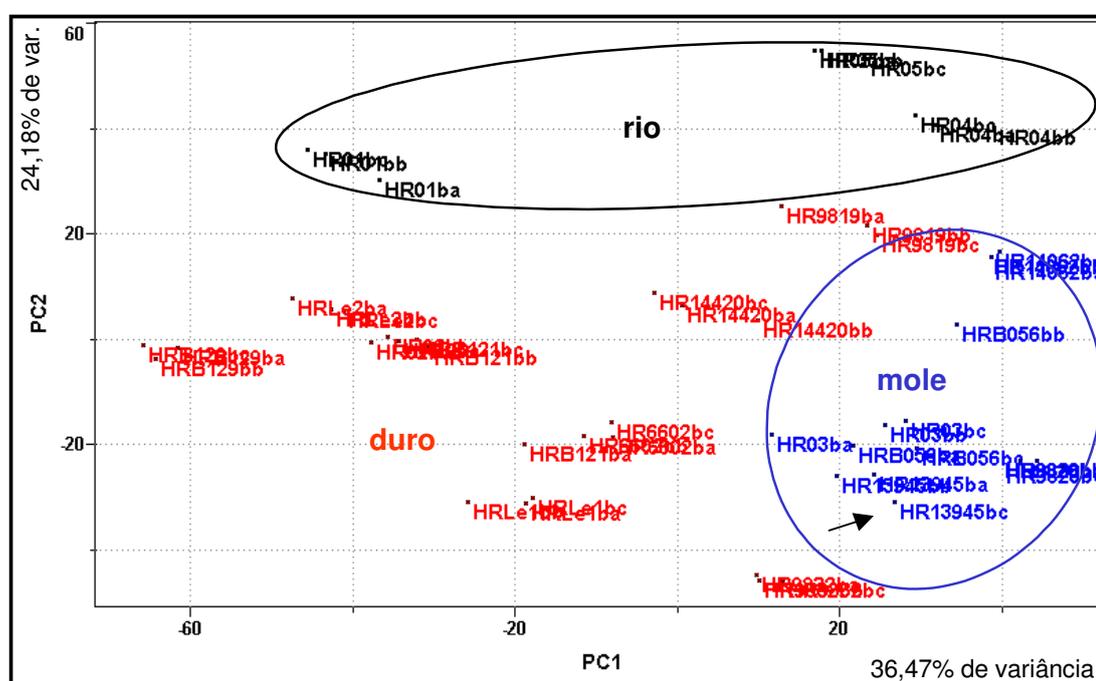


FIGURA 7.3.3.4 - Gráfico de scores de PC1 x PC2 dos cafés crus que apresentam diferentes qualidades na prova de xícara: mole (●), duro (●) e rio (●). Dados de HR-MAS

O resultado da análise por HCA, aplicada nas mesmas condições descritas anteriormente, corroborou com a análise por PCA indicando uma discriminação considerável entre as amostras dos diferentes tipos. Com um índice de similaridade de 0,363 observa-se a formação de três grupos. Na parte inferior do dendrograma (FIGURAS 7.3.3.5 e 7.3.3.7) estão localizados os cafés do tipo rio. Na parte superior (FIGURAS 7.3.3.5 e 7.3.3.6), um grupo é formado predominantemente por cafés duros, somente uma amostra de café rio HR01 foi agrupada erroneamente nesse grupo. E, um último grupo localizado entre esses contém todas as amostras do tipo mole e apenas duas de café duro HR14420 e HR9819.

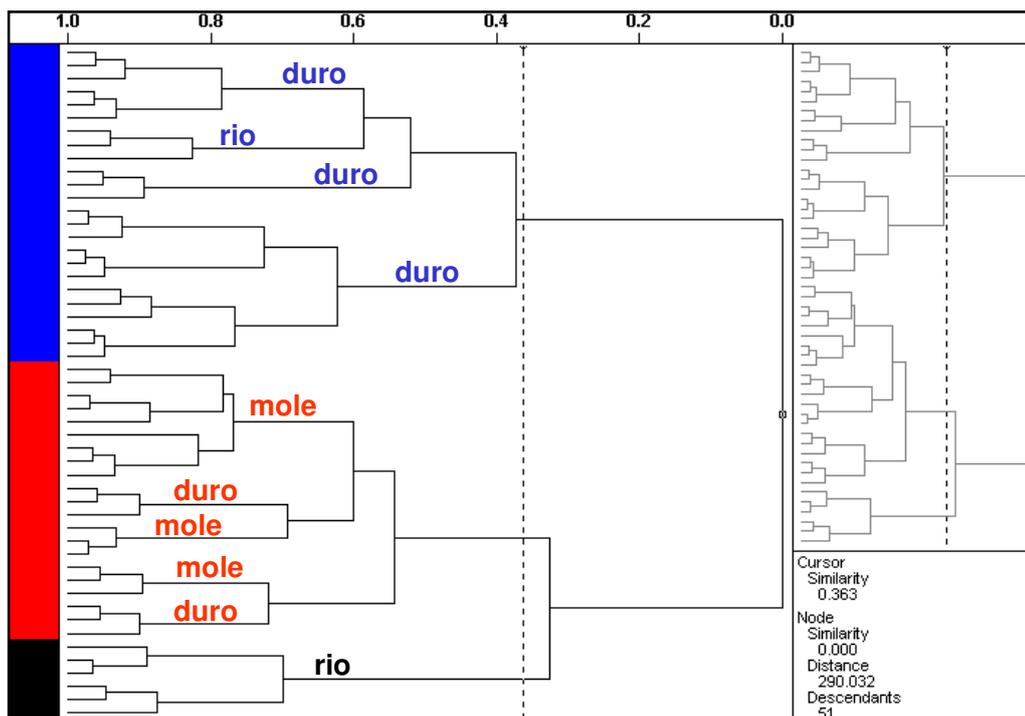


FIGURA 7.3.3.5 - Dendrograma obtido para os cafés crus que apresentam diferentes qualidades na prova de xícara: mole, duro e rio. Dados de HR-MAS

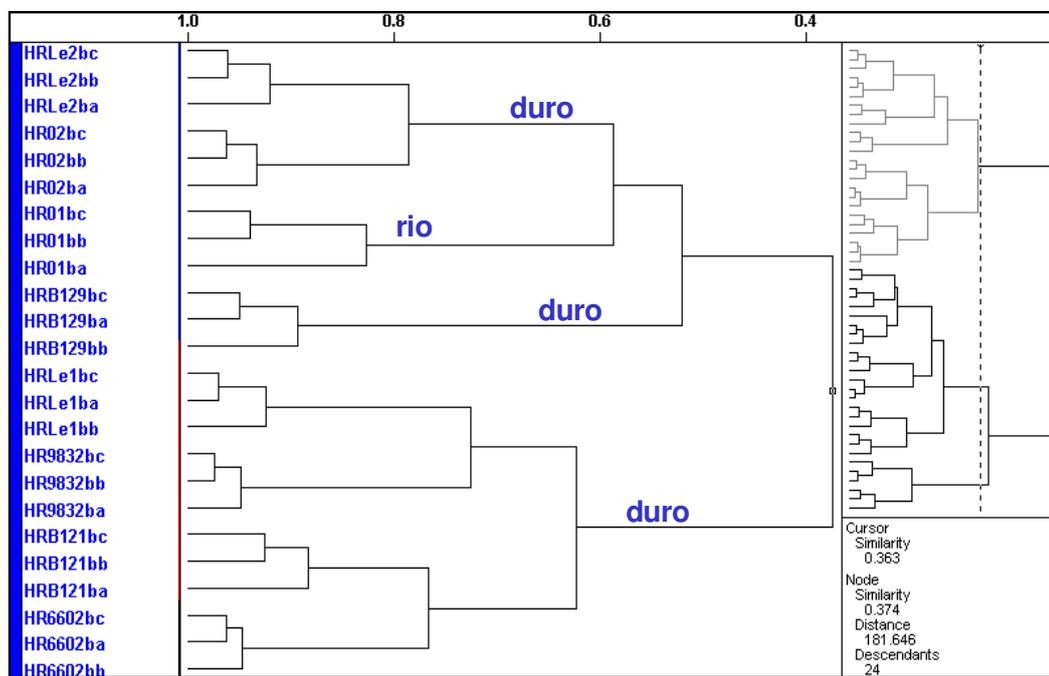


FIGURA 7.3.3.6 - Ampliação da parte superior do dendrograma mostrando a formação de um grupo para os cafés do tipo duro

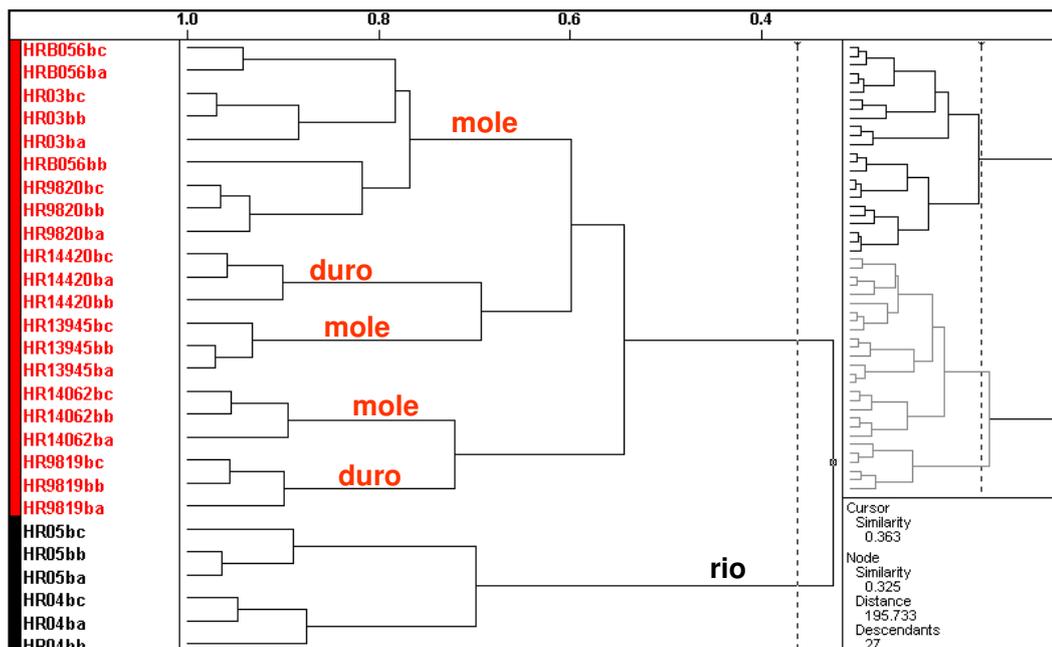


FIGURA 7.3.3.7 -: Ampliação da parte inferior do dendrograma mostrando a formação de um grupo para os cafés do tipo mole e outro para os do tipo rio

O modelo KNN foi construído conforme descrito para os cafés crus analisados na forma líquida e as mesmas amostras teste foram usadas para verificar a eficiência preditiva do modelo.

O número ótimo de vizinhos selecionados para votar foi um, pois não houve nenhum erro de classificação como pode ser verificado na FIGURA 7.3.3.8.

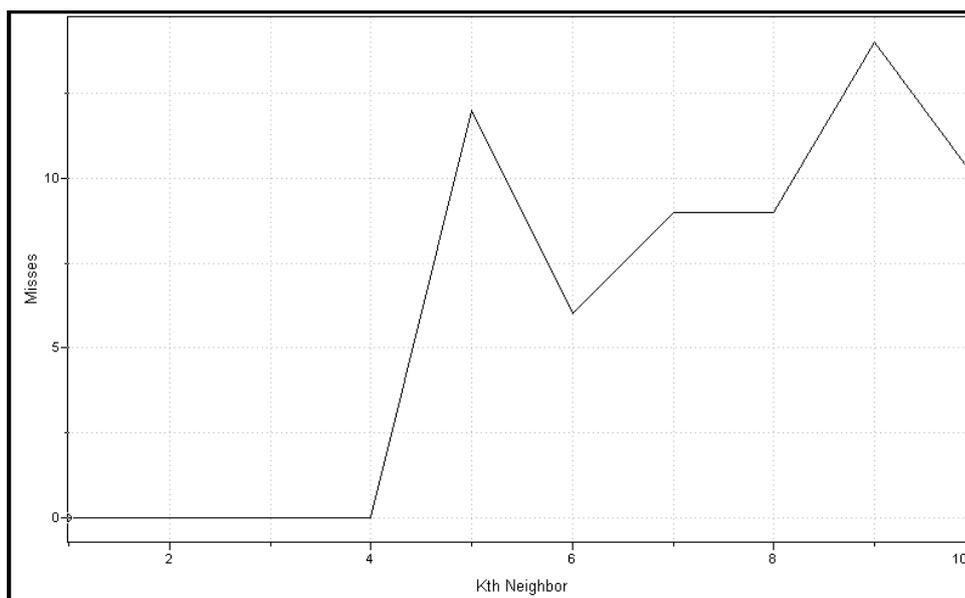


FIGURA 7.3.3.8 – Gráfico dos erros de previsão para as amostras do conjunto de treinamento do modelo KNN, aplicado aos dados obtidos por RMN de  $^1\text{H}$  HR-MAS para cafés com diferentes qualidades na prova de xícara.

O modelo KNN se mostrou bastante eficiente, fazendo a previsão da classe das amostras teste com 100% de acertos. Assim como no estudo dos cafés crus na forma líquida, esses resultados indicam que esse método é capaz de fornecer uma avaliação baseada na composição química de cada tipo de café podendo auxiliar na atribuição da sua qualidade e reduzir a subjetividade do atual teste.

### 7.3.3.1 – Análise da composição de cafés crus por RMN de $^1\text{H}$ HR-MAS

A análise visual dos espectros de hidrogênio obtido a partir da técnica HR-MAS (FIGURA 7.3.3.1 B, p. 145) permitiu notar um perfil espectral diferente daquele observado para as amostras líquidas (FIGURA 7.3.1.1, p. 133), especialmente na região de 0,5 a 3,0 ppm.

De acordo com KEMSLEY *et al.* (1995), entre os compostos majoritários presentes no grão de café cru estão os lipídeos com cerca de 9 - 14% e variam de acordo com a espécie (MAZZAFERA *et al.*, 1999). Os ácidos graxos estão presentes no extrato lipídico na forma livre ou, principalmente, esterificados com glicerol ou álcoois diterpênicos como o cafestol e kawool. Segundo CLARKE e MACRAE (1985) os triglicerídeos, ácidos graxos esterificados ao glicerol, (FIGURA 7.3.3.1.1) são os compostos presentes em maior proporção e constituem cerca de 75% da fração lipídica do grão do café cru.

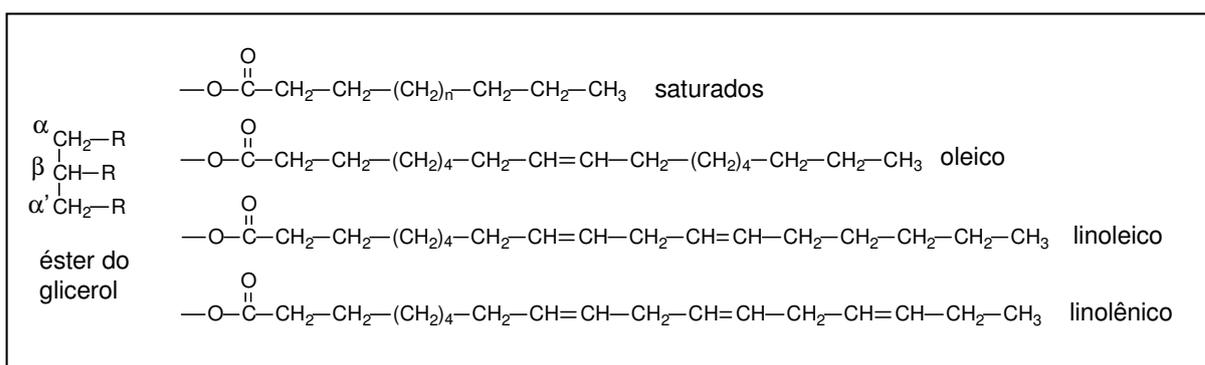


FIGURA 7.3.3.1.1- Estruturas dos ácidos graxos saturados, oleico, linoleico e linolênico e da unidade de glicerol

Segundo CLARKE E MACRAE (1985), os principais ácidos graxos presentes no óleo do café são o linoleico e o palmítico, com cerca de 70%. Outros ácidos também podem ser encontrados em menor quantidade. A TABELA 7.3.3.1.1

mostra os ácidos graxos encontrados no café e suas composições (CLARKE e MACRAE, 1985).

TABELA 7.3.3.1.1 - Composição (%) dos ácidos graxos presentes nos grãos de café cru.

ácido	teor
mirístico - C <sub>14:0</sub>	traços
palmítico - C <sub>16:0</sub>	30,7 - 35,3
palmitoleico - C <sub>16:1</sub>	traços
margárico - C <sub>17:0</sub>	traços
esteárico - C <sub>18:0</sub>	6,6 - 9,0
oleico - C <sub>18:1</sub>	7,6 - 10,1
linoleico - C <sub>18:2</sub>	43,5 - 45,9
linolênico - C <sub>18:3</sub>	1,1 - 1,7
araquídico - C <sub>20:0</sub>	2,7 - 3,3
gadoleico - C <sub>20:1</sub>	---
behenico - C <sub>22:0</sub>	0,3 - 0,5

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H HR-MAS obtido diretamente dos grãos de café apresenta sinais característicos dos triglicerídeos, os quais foram atribuídos com o auxílio da literatura (VLAHOV, 1999 e MANNINA *et al.*, 1999). A FIGURA 7.3.3.1.2 mostra um espectro com a atribuição desses sinais.

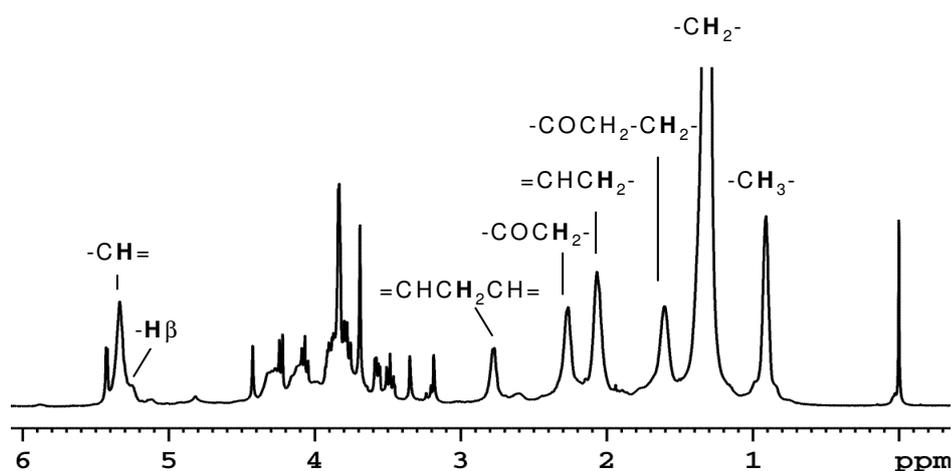


FIGURA 7.3.3.1.2 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H HR-MAS obtido diretamente de grãos de café cru

O sinal em 5,34 ppm foi atribuído aos hidrogênios olefínicos dos ésteres de ácidos graxos insaturados e 5,30 ppm ao hidrogênio da posição β da

molécula de glicerol. O sinal em 2,78 ppm foi atribuído aos hidrogênios metilênicos localizados entre os grupos olefínicos dos ésteres graxos dos ácidos linoleico e linolênico. O sinal em 2,27 ppm foi atribuído aos hidrogênios metilênicos  $\alpha$  à carbonila de todos os ésteres graxos. O sinal em 2,07 ppm foi atribuído aos hidrogênios  $\alpha$  aos grupos olefínicos dos ésteres graxos insaturados. O sinal em 1,61 ppm foi atribuído aos hidrogênios metilênicos  $\beta$  em relação à carbonila de todos os ésteres graxos. O sinal em 1,30 ppm foi atribuído aos hidrogênios metilênicos restantes de todos os ésteres graxos. O sinal em 0,91 ppm foi atribuído aos hidrogênios das metilas terminais dos ésteres dos ácidos graxos oleico, linoleico e todos os ácidos saturados. O sinal referente aos hidrogênios da metila terminal do éster do ácido linolênico não foi observada no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Segundo VLAHOV (1999) esse sinal aparece em deslocamento químico um pouco maior, devido ao efeito de desproteção sentido pelos hidrogênios da metila próximos a dupla ligação na molécula do éster do ácido linolênico.

Além do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  unidimensional também foram realizados experimentos bidimensionais homo e heteronucleares a fim de confirmar a atribuição dos sinais de hidrogênio, determinar os sinais da posição  $\alpha$  do glicerol que aparecem numa região de muitas sobreposições no espectro, 3,50 - 4,50 ppm, e também obter os deslocamentos químicos para  $^{13}\text{C}$ .

No experimento de gCOSY (FIGURA 7.3.3.1.3) pode ser observado que o sinal em 5,34 ppm, referente aos hidrogênios olefínicos dos ésteres graxos insaturados, apresenta uma correlação com o sinal em 2,78 ppm referente aos hidrogênios metilênicos localizados entre os grupos olefínicos dos ésteres graxos dos ácidos linoleico e linolênico, e outra correlação com o sinal em 2,07 ppm referente aos hidrogênios  $\alpha$  aos grupos olefínicos. Os hidrogênios da posição  $\alpha$  da unidade do éster do glicerol foram atribuídos a partir das correlações observadas do sinal em 5,30 ppm referente aos hidrogênios da posição  $\beta$  com dois sinais alargados em 4,30 e 4,10 ppm que também apresentaram correlação entre si. Observou-se ainda uma correlação do sinal em 2,27 ppm referente aos hidrogênios metilênicos  $\alpha$  à carbonila com o sinal em 1,61 ppm dos hidrogênios metilênicos  $\beta$  em relação à carbonila, e deste último com o sinal em 1,30 ppm dos hidrogênios metilênicos alifáticos e esse por sua vez apresentou uma correlação com o sinal em 2,07 ppm referente aos hidrogênios  $\alpha$  aos grupos olefínicos dos ésteres graxos insaturados e com os hidrogênios metílicos em 0,91 ppm. Apesar da metila terminal do éster do

ácido linolênico não ter sido observada claramente no espectro de  $^1\text{H}$ , sendo observada como uma pequena saliência na base do sinal em 0,91 ppm, no espectro de *g*COSY foi observada uma correlação entre essa “saliência” e o sinal em 2,07 ppm referente aos hidrogênios  $\alpha$  aos grupos olefínicos, permitindo assim a sua atribuição.

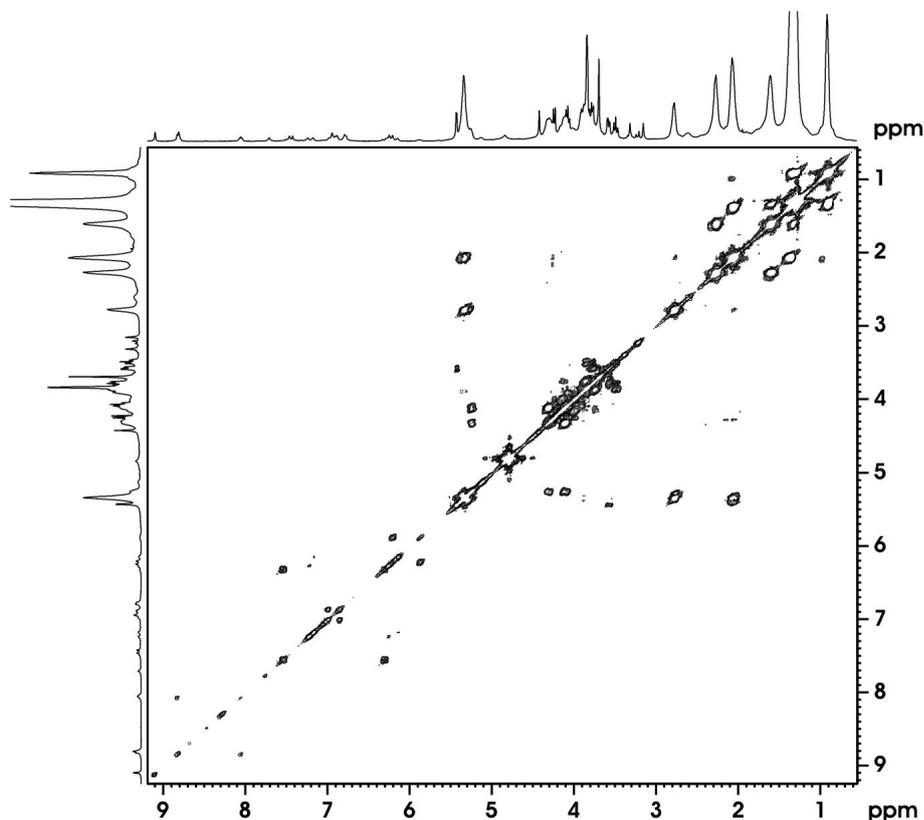


FIGURA 7.3.3.1.3 - Espectro de RMN de *g*COSY HR-MAS de grãos de café cru

A atribuição dos deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  dos triglicerídeos foi possível a partir dos experimentos bidimensionais heteronucleares *g*HSQC (FIGURA 7.3.3.1.4), que possibilitou a atribuição dos carbonos que têm hidrogênios ligados diretamente ( $^1J_{\text{CH}}$ ), e do *g*HMBC (FIGURAS 7.3.3.1.5 e 7.3.3.1.6), que permitiu a observação de correlações à longa distância ( $^nJ_{\text{CH}}$ ).

No experimento de *g*HSQC, o sinal em 5,34 ppm referente aos hidrogênios olefínicos apresentou correlações  $^1J_{\text{CH}}$  em 130,8 e 132,4 ppm e  $^nJ_{\text{CH}}$ , no *g*HMBC, em 28,4 e 30,1 ppm referente aos carbonos  $\alpha$  olefínicos.

O sinal em 5,30 ppm referente ao hidrogênio da posição  $\beta$  da molécula de glicerol apresentou uma correlação  $^1J_{\text{CH}}$  em 71,9 ppm, e ambos os hidrogênios  $\alpha$  em 4,30 e 4,10 ppm mostraram correlação com o mesmo carbono em 64,8 ppm, revelando os deslocamentos químicos da parte do glicerol dos triglicerídeos.

Os hidrogênios metilênicos localizados entre os grupos olefínicos dos ésteres graxos dos ácidos linoleico e linolênico em 2,78 ppm apresentaram correlações  $^1J_{CH}$  em 28,4 ppm e  $^nJ_{CH}$  em 130,9 e 132,4 ppm dos carbonos olefínicos, sendo a correlação  $^nJ_{CH}$  mais intensa observada com o sinal em 130,9 ppm, indicando ser essa referente aos carbonos olefínicos internos nas cadeias alquílicas dos ésteres de ácidos graxos. Enquanto, os hidrogênios  $\alpha$  aos grupos olefínicos em 2,07 ppm mostraram correlação  $^nJ_{CH}$  mais intensa com o sinal em 132,4 ppm que com o sinal em 130,9 ppm confirmando sua atribuição. Esse sinal ainda apresentou correlações  $^nJ_{CH}$  adicionais com os sinais em 32,5 e 34,7 ppm, e  $^1J_{CH}$  em 30,1 ppm.

Os hidrogênios metilênicos  $\alpha$  a carbonila em 2,27 ppm apresentaram correlação  $^1J_{CH}$  em 36,6 ppm e  $^nJ_{CH}$  em 27,7; 32,5 e 174,9 ppm, sendo esse último referente ao carbono da carbonila dos ésteres lipídicos.

O sinal dos hidrogênios metilênicos  $\beta$  em relação à carbonila em 1,61 ppm apresentou correlação  $^1J_{CH}$  em 27,7 ppm, enquanto nenhuma correlação  $^nJ_{CH}$  foi observada.

O sinal em 1,30 ppm referente aos hidrogênios metilênicos alifáticos mostrou correlações  $^1J_{CH}$  em 25,6 e 32,5 ppm e  $^nJ_{CH}$  em 25,6; 31,5; 32,0; 32,5; 34,7 e 35,2 ppm indicando, que embora no espectro de hidrogênio seja observado um único sinal, os grupos metilênicos alifáticos apresentam carbonos com vários deslocamentos diferentes.

O sinal referente aos hidrogênios das metilas terminais dos ésteres dos ácidos graxos em 0,91 ppm mostrou correlação  $^1J_{CH}$  em 16,7 ppm e  $^nJ_{CH}$  com carbonos em 25,6; 34,5 e 35,2 ppm.

O sinal referente aos hidrogênios da metila terminal do éster do ácido linolênico não apresentou correlações nos experimentos *g*HSQC e *g*HMBC, devido a baixa intensidade desse sinal, sendo necessário um maior tempo de aquisição para a observação de suas correlações.

No entanto, foi possível confirmar a atribuição para a maioria dos deslocamentos químicos de hidrogênios dos ésteres de ácidos graxos e também fazer a correta atribuição dos sinais de  $^{13}C$ , que estão apresentados na TABELA 7.3.3.1.2.

Dos diversos trabalhos encontrados sobre o estudo dos lipídeos do café, nenhum deles descreve a atribuição de  $^1H$  e  $^{13}C$  em seu ambiente natural, o grão, como foi feito nesse trabalho.

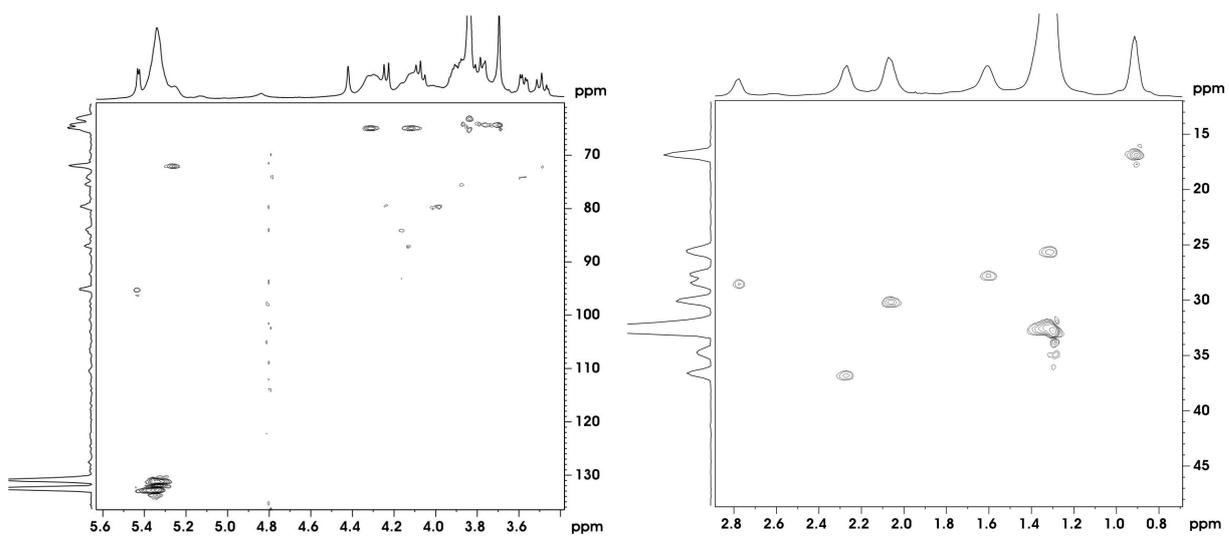


FIGURA 7.3.3.1.4 - Expansão das regiões de 0,7 – 2,9 e 3,4 – 5,7 ppm do espectro de RMN de *g*HSQC HR-MAS de grãos de café cru

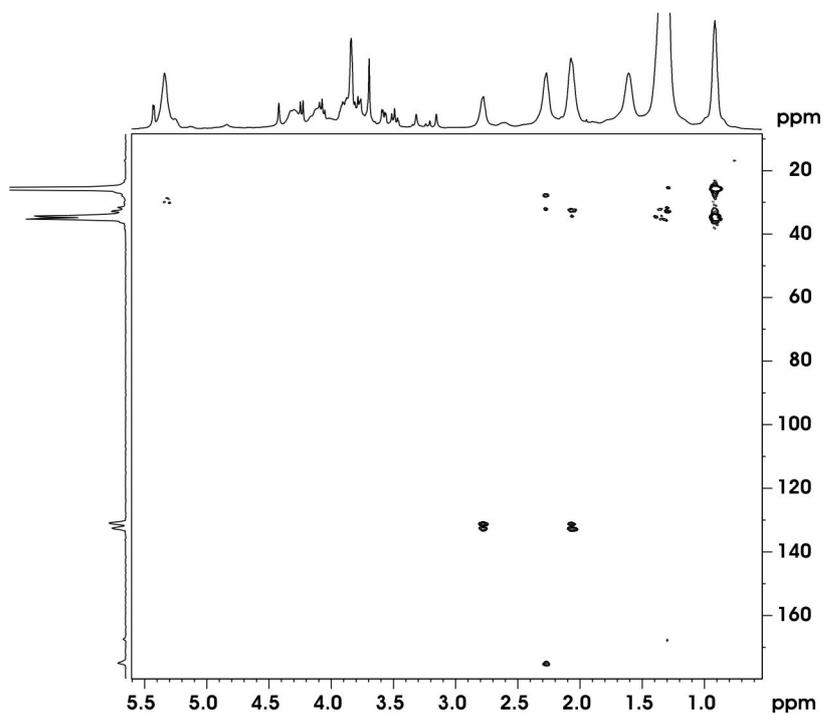


FIGURA 7.3.3.1.5 - Espectro de RMN de *g*HMBC HR-MAS de grãos de café cru

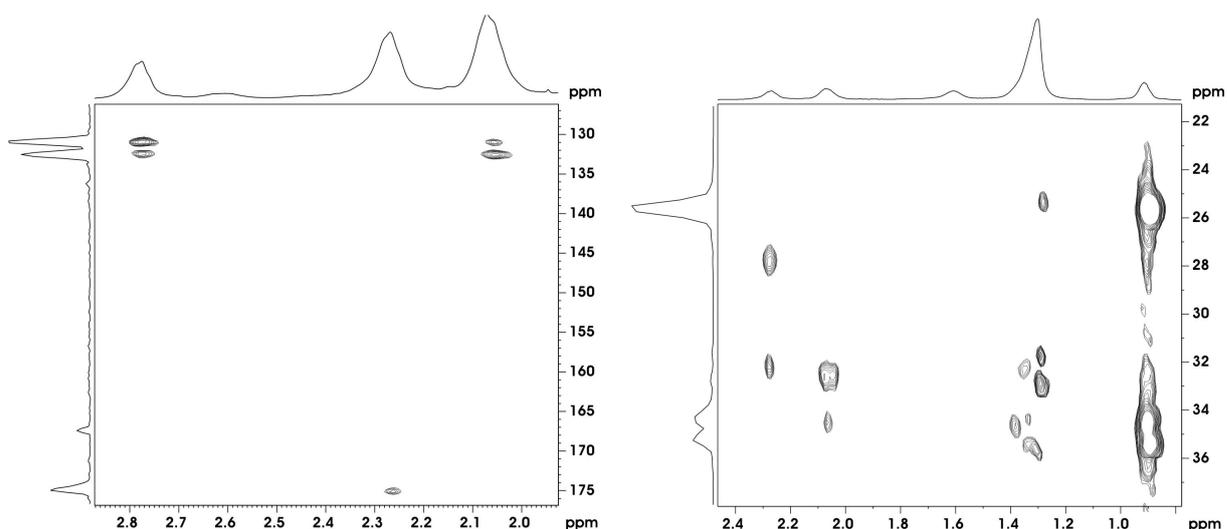


FIGURA 7.3.3.1.6 - Expansão da região de 0,8 – 2,9 ppm do espectro de RMN de *g*HMBC HR-MAS de grãos de café cru

TABELA 7.3.3.1.2 – Atribuição dos sinais de RMN para os ésteres de ácidos graxos de grãos de café cru

Posição	$\delta^1_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta^{13}_{\text{C}}$ (ppm)	HMBC
$\text{CH}_3\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---}$	0,91	16,7	25,6; 34,5 e 35,2
$\text{CH}_3\text{---CH}_2\text{---CH=CH---}$	0,92	n.d	---
$\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---}$	1,30	25,6 a 35,2	25,6; 31,5; 32,0; 32,5; 34,7 e 35,2
$\text{---CH=CH---CH}_2\text{---CH=CH---}$	2,78	28,4	130,9 e 132,4
$\text{---CH}_2\text{---CH=CH---CH}_2\text{---}$	2,07	30,1	32,5; 34,7; 130,9 e 132,4
$\text{---CH=CH---CH}_2\text{---CH=CH---}$	5,34	130,8	28,4 e 30,1
$\text{---CH=CH---CH}_2\text{---CH=CH---}$	5,34	132,4	28,4 e 30,1
$\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---COOR}$	1,61	27,7	---
$\text{---CH}_2\text{---COOR}$	2,27	36,6	27,7; 32,5 e 174,9
$\text{---R---COOR}$	---	174,9	---
$\text{---CH}_2\text{---O---}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C---R}$	4,10 e 4,30	64,8	---
$\text{>CH---O---}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C---R}$	5,30	71,9	---

Além dos compostos lipídicos, os experimentos 1D, de hidrogênio, e 2D, *g*COSY e *g*HSQC, permitiram a observação de alguns sinais característicos de açúcares nos grãos de café. Como por exemplo, a correlação do duplete em 5,42

ppm com o sinal em 3,57 ppm e  $^1J_{CH}$  em 95,1 ppm, a correlação do sinal em 3,57 ppm, que apresentou  $^1J_{CH}$  em 74,1 ppm, com aquele em 3,78 ppm, dentre outras correlações. Entretanto, uma atribuição completa dos sinais de  $^1H$  e  $^{13}C$  dos açúcares não foi possível, pois seria necessário um maior tempo de aquisição para os experimentos bidimensionais já que esses sinais apresentam baixa intensidade. Porém, optou-se por não despendar mais tempo nesses experimentos, uma vez que os açúcares são mais facilmente caracterizados na fração aquosa extraída dos grãos moídos.

## **7.4 – CONCLUSÕES**

A aplicação dos métodos quimiométricos PCA e HCA em espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de cafés crus, obtidos diretamente do grão moído ou de sua extração aquosa, mostrou ser uma ferramenta útil na discriminação dos cafés com diferentes qualidades na prova de xícara. A partir do método KNN, foi possível propor modelos capazes de auxiliar o atual processo de avaliação da qualidade do café, os quais mostraram grande eficiência atribuindo a classe corretamente para todas as amostras teste. Além disso, foi possível determinar a importância do teor de açúcares e ácidos graxos para essa classificação, eliminando assim a subjetividade do atual método.

Os cafés torrados mostraram grande variação na composição química devido à torrefação e não puderam ser discriminados com eficiência, pelos métodos PCA e HCA, quanto à qualidade que apresentam na prova de xícara.

A partir da análise espectral feita diretamente no grão de café cru moído, via HR-MAS, foi possível verificar, além da discriminação das amostras quanto à sua qualidade, uma maior eficiência do método com a utilização da seqüência de pulsos zgcprr, ao invés da CPMG e ainda, fazer uma completa caracterização dos ésteres de ácidos graxos presentes.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Esse trabalho mostra a relevância e o potencial da técnica de RMN na obtenção das informações necessárias para a análise quimiométrica no controle de qualidade do café. A rapidez com que os resultados podem ser obtidos e a não exigência por um pré-tratamento da amostra, evitando alterações na composição da mesma, torna essa ferramenta (RMN + quimiometria) muito atrativa, podendo ser estendida no estudo da autenticidade e controle de qualidade de muitos outros alimentos. Nesse trabalho, essas técnicas permitiram a discriminação de cada tipo de café analisado além de apontar as principais diferenças em suas composições.

Entretanto, acredita-se que esse estudo não deva ser tomado como um resultado definitivo e sim como um indicativo das diferenças e semelhanças químicas entre as amostras e sua relação com a qualidade da bebida. Para se obter um método que possa ser aplicado em sistemas reais de avaliação com fins comerciais é sugerido incluir um número maior de amostras, e obter modelos mais representativos onde sejam consideradas variações tais como o ano de colheita, forma de colheita, tipo de processamento, etc.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AIRIAU, C.Y.; SHEN, H & BRERETON, R. G. "Principal Component analysis in liquid chromatography proton nuclear magnetic resonance: differentiation of three regio-isomers". *Anal. Chim. Acta*, **447**(1-2): 199-210, 2001.
- ALAM, T. M & ALAM, M. K. "Chemometric Analysis of NMR spectroscopy data: a review". *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, **54**: 41-80, 2005.
- ANDRADE, P. B.; LEITÃO, R.; SEABRA, R. M.; OLIVEIRA, M. B. & FERREIRA, M. A. "3,4-Dimethoxycinnamic acid levels as a tool for differentiation of *Coffea canephora* var. robusta and *Coffea arabica*". *Food Chem.*, **61**: 511-514, 1998.
- BAX, A. D. "A spatially selective composite 90° radiofrequency pulse". *J. Magn. Reson.*, **65**: 142-145, 1985.
- BEEBE, K.; PEL, R & SEASHOLTZ, M. B. *Chemometrics - A Practical Guide*. New York, John Wiley & Sons, 1998.
- BELTON, P. S.; COLQUHON, I. J.; KEMSLEY, E. K.; DELGADILLO, I.; ROMA, P.; DENNIS, M. J.; SHARMAN, M.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. & SPRAUL, M. "Application of chemometrics to the <sup>1</sup>H NMR spectra of apple juices: discrimination between apple varieties". *Food Chem.*, **61**(1-2): 207-213, 1998.
- BICCHI, C. P.; PANERO, O. M.; PELLEGRINO, G. M. & VANNI, A. C. "Characterization of Roasted Coffee and Coffee Beverages by Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography and Principal Component Analysis". *J. Agric. Food. Chem.* **45**: 4680-4686, 1997.
- BOSCO, M.; TOFFANIN, R.; de PALO, D; ZATTI, L. & SEGRE, A. "High-resolution NMR investigation of coffee". *J. Sci. Food Agric.* **79**: 869-878, 1999.
- BOUHSAIN, Z.; GARRIGUES, J. M.; GARRIGUES, S. & GUARDIA, M. "Flow injection fourier transform infrared determination of caffeine in coffee". *Vib. Spectrosc.*, **21**(1-2): 143-150, 1999.
- BOURN, D. & PRESCOTT, J. "A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **42**(1):1-34, 2002.

- BRESCIA, M. A.; SGARAMELLA, A.; GHLLI, S & SACCO, A. “ $^1\text{H}$  HR-MAS NMR and isotopic investigation of bread and flour samples produced in southern Italy” *J. Sci. Food Agric.*, **83**: 1463-1468, 2003.
- BRESCIA, M. A.; MONFREDA, M.; BUCCOLIERI, A & CARRINO, C. “Characterisation of the geographical origin of buffalo milk and mozzarella cheese by means of analytical and spectroscopic determinations”. *Food Chem.*, **89**: 139-147, 2005.
- BRETERON, R. G. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. Chichester, Wiley, 2002.
- BRIANDET, R.; KEMSLEY, E. K & WILSON, R. H. “Discrimination of Arabica and Robusta in instant coffee by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics”. *J. Agric. Food Chem.* **44**(1): 170-174, 1996.
- BROWN, R. J. S.; CAPOZZI, F.; CAVANI, C.; CREMONINI, M. A.; PETRACCI, M & PACUCCI, G. “Relationships between  $^1\text{H}$  NMR relaxation data and some technological parameters of meat: a chemometric approach”. *J. Magn. Reson.*, **147**: 89-94, 2000.
- CAMPA, V.; BALLESTER, J. F.; DOULBEAU, S.; DUSSERT, S. HAMON, S & NOIROT, M “Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species”. *Food Chem.*, **88**: 39-43, 2004.
- CARRERA, F.; LEÓN-CAMACHO, M.; PABLOS, F & GONZÁLEZ, A. G. “Authentication of green coffee varieties according to their sterolic profile”. *Anal. Chim. Acta*, **370**: 131-139, 1998.
- CARVALHO, V. D & CHALFOUN, S. M. “Aspectos qualitativos do café” *Informe Agropecuário*. Belo Horizonte, **11**(126): 79-92, 1985.
- CARVALHO, V. D.; CHAGAS, S. J. R & CHALFOUN, S. M. “Qualidade do café” *Informe Agropecuário*. Belo Horizonte, **18**(187): 5-20, 1997.
- CASAL, S.; OLIVEIRA, B. P. P.; ALVES, M. R & FERREIRA, M. A “Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine content”. *J. Agric. Food. Chem.*, **48**: 3420-3424, 2000.

- CHAGAS, S. J. R. *Caracterização química e qualitativa de cafés de alguns municípios de três regiões produtoras de Minas Gerais*. Lavras, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – ESAL, 1994. Dissertação de Mestrado, 85 p.
- CHARLTON, A. J.; FARRINGTON, W. H. H & BRERETON, P. “Application of  $^1\text{H}$  NMR and multivariate statistics for screening complex mixtures: Quality control and authenticity of instant coffee”. *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 3098-3103, 2002.
- CLARKE, R. J. & MACRAE, R. *Coffee: Chemistry*, Elsevier Applied Science Publishers LTD: London, 1985.
- CLARIDGE, T. D. W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Oxford, Pergamon, 1999.
- COELHO, K. F & PEREIRA, R. G. F. A. “Influência de grãos defeituosos em algumas características químicas do café cru e torrado”. *Ciênc. Agrotec.*, **26**: 375-384, 2002.
- D’AGOSTINA, A.; BOSCHIN, G.; BACCHINI, F & ARNOLDI, A. “Investigations on the high molecular weight foaming fractions of espresso coffee”. *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 7118-7125, 2004.
- DANHO, D.; NAULET, N & MARTIN, G. J. “Deuterium, carbon and nitrogen isotopic analysis of natural and synthetic caffeine. Authentication of coffees and coffee extracts”. *Analisis*, **20**: 179-184, 1992
- DEL CASTILLO, M. L. R.; HERRAIZ, M. & BLANCH, G. “Rapid analysis of cholesterol-elevating compounds in coffee brews by off-line high-performance liquid chromatography/high-resolution gas chromatography”. *J. Agric. Food Chem.*, **47**: 1525-1529, 1999.
- DEL CASTILLO, M. D.; AMES, J. M & GORDON, M. H. “Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews”. *J. Agric. Food Chem*, **50**: 3698-3703, 2002.
- DE MARIA, C. A. B.; TRUGO, L. C.; AQUINO NETO, F. R.; MOREIRA, R. F. A. & ALVIANO, C. S. “Composition of green coffee water-soluble fractions and identification of volatiles formed during roasting”. *Food Chem.*, **33**: 203-207, 1998.
- DOWNEY, G & BOUSSION, J. “Authentication of coffee bean variety by near-infrared reflectance spectroscopy of dried extract”. *J. Sci. Food Agric.*, **71**(1): 41-49, 1996.

- DUARTE, I.; BARROS, A.; BELTON, P. S.; RIGHELATO, R.; SPRAUL, M. HUMPFER, E & GIL, A. M. "High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis for the characterization of beer". *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 2475-2481, 2002.
- ESTEBAN-DÍEZ, I.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M & PIZARRO, C. "An evaluation of orthogonal signal correction methods for the characterisation of *arabica* and *robusta* coffee varieties by NIRS". *Anal. Chim. Acta*, **514**: 57-67, 2004.
- FELDMAN, J. R.; RYDER, W. S & KUNG, J. T. "Importance of nonvolatile compounds to the flavor of coffee". *J. Agric. Food Chem.*, **17**: 733-739, 1965.
- FERNANDES, A. P. *Emprego de estratégias quimiométricas para a diferenciação de alimentos de acordo com as formas de produção*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2006. Tese de Doutorado, 189 p.
- FERNANDES, E. A .D. N.; TAGLIAFERRO, F. S.; AZEVEDO-FILHO, A. & BODE, P. "Organic coffee discrimination with INAA and data mining/KDD techniques: new perspectives for coffee trade". *Accred. Qual. Assur.*, **7**: 378-387, 2002.
- FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; & VOLPE, P. L. O. "Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial" *Quim. Nova*, **22**(5): 724-731, 1999.
- FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; MENDONÇA, J. C. F & SILVA, X. A "Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans". *Food Chem.*, **90**: 89-94, 2005.
- GIL, A. M.; DUARTE, I. F.; DELGADILLO, I.; COLQUHON, I. J.; CASUSCELLI, F.; HUMPFER, E & SPRAUL, M. "Study of the composition changes of mango during ripening by use of nuclear magnetic resonance spectroscopy". *J. Agric. Food Chem.*, **48**: 1524-1536, 2000.
- GRAF, A. B. *Exotica International: Pictorial Cyclopedia of Exotic Plants from Tropical and Near-Tropica Regions*. Roehrs Company Publishers, v: 2, 1982.
- KEMSLEY, E. K.; RUAULT, S & WILSON, R. H. "Discrimination between *Coffea arabica* and *Coffea canephora* variant robusta beans using infrared spectroscopy" *Food Chem.*, **54**: 321-326, 1995.

- MAGKOS, F.; ARVANITI, F. & ZAMPELAS, A. "Organic food: buying more safety or just peace of mind? a critical review of the literature". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **46**: 23–56, 2006.
- MAEZTU, L.; SANZ, C.; ANDUEZA, S.; DE PEÑA, M. P.; BELLO, J & CID, C. "Characterization of espresso coffees aroma by static headspace GC-MS and sensory flavor profile". *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 5437-5444, 2001.
- MANNINA, L.; LUCHINAT, C.; EMANUELE, M. C. & SEGRE, A. "Acyl positional distribution of glycerol tri-esters in vegetable oils: a <sup>13</sup>C NMR study". *Chem. Phys. Lipids*, **103**: 47–55, 1999.
- MANNINA, L.; SOBOLEV, A. P & SEGRE, A. "Olive oil as seen by NMR and chemometrics". *Spectroscopy Europe*, **15**: 6-14, 2003.
- Manual do PIROUETTE, para análise quimiométrica, versão 3.11 (demonstrativa). Infometrix, Woodinville, 1985-2003.
- MARTIN, M. J.; PABLOS, F & GONZÁLEZ, A .G "Characterization of green coffee varieties according to their metal content". *Anal. Chim. Acta*, **358**: 177-183, 1998.
- MARTIN, M. J.; PABLOS, F & GONZÁLEZ, A .G "Discrimination between arabica and robusta green coffee varieties according to their chemical composition". *Talanta*, **46**: 1259-1264, 1998.
- MARTIN, M. J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A .G.; VALDENEBRO, M. S & LÉON-CAMACHO, M. "Fatty acid profiles as discriminant parameters for coffee varieties differentiation". *Talanta*, **54**: 291-297, 2001.
- MATTILA, P & KUMPULAINEN, J. "Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection". *J. Agric. Food Chem*, **50**: 3660-3667, 2002.
- MAZZAFERA, P.; SOARES, D.; ZULLO, M. A. T & GUERREIRO FILHO, O. "Oil content of green beans from some coffee species". *Bragantia*, 57(1): 45-48, 1999.
- MAZZAFERA, P. "Chemical composition of defective coffee beans". *Food Chem.*, **64**: 547-554, 1999.

MAZZAFERA, P & ROBINSON, S. P. "Characterization of polyphenol oxidase in coffee". *Phytochemistry*, **55**: 285-296, 2000.

MENEZES, H. C. "The relationship between the state of maturity of raw coffee beans and the isomers of caffeoylquinic acid". *Food Chem.*, **50**: 293-296, 1994.

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C. & DE MARIA, C. A. B "Componentes voláteis do café torrado. Parte II: componentes alifáticos, alicíclicos e aromáticos". *Quim. Nova*, **23**(2): 195-203, 2000.

MOREIRA, A. B.; DIAS, I. L. T.; NETO, G. O.; ZAGATTO, E. A. G.; FERREIRA, M. M. C. KUBOTA, L. T. "Solid-phase spectrofluorimetric determination of acetylsalicylic acid and caffeine in pharmaceutical preparations using partial least-squares multivariate calibration", *Talanta*, **67**: 65-69, 2005.

NAVARINI, L.; GILLI, R.; GOMBAC, V.; ABATANGELO, A.; BOSCO, M & TOFFANIN, R. "Polysaccharides from hot water extracts of roasted *Coffea arabica* beans: isolation and characterization" *Carbohydr. Polym.*, **40**: 71-81, 1999.

OLIVEIRA, J. C.; SILVA, D. M.; TEIXEIRA, A. A & AMORIM, H. V. "Atividade enzimática da polifenoloxidase, peroxidase e catalase em grãos de *Coffea arabica*, L. e relação com a qualidade da bebida". *Turrialba*, **27**: 76-82, 1997.

OLIVEIRA, S. L.; FRANCA, A. S.; MENDONÇA, J. C. F & BARROS-JÚNIOR, M. C. "Proximate composition and fatty acids profile of green and roasted defective coffee beans" *LWT- Food Sci. Technol.*, **39**: 235-239, 2006.

ONGRIC, N.; KOSIR, I. J.; KOCJANCIC, M & KIDRIC, J. "Determination of authenticity, regional origin, and vintage of Slovenian wines using a combination of IRMS and SNIF-NMR analyses". *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 1432-1440, 2001.

PEDRO, A. M. K & FERREIRA, M. M. C "Nondestructive determination of solids and carotenoids in tomato products by Near-Infrared spectroscopy and multivariate calibration". *Anal. Chem.*, **77**(8): 2505-2511, 2005.

PUPIN, A. M.; DENNIS, M. J.; PARKER, I.; KELLY, S.; BIGWOOD, T. & TOLEDO, M. C. F. "Use of isotopic analyses to determine the authenticity of Brazilian orange juice (*Citrus sinensis*)". *J. Agric. Food Chem.* **46**(4): 1369-1373, 1998.

- REMAUD, G. S.; MARTIN, Y.; MARTIN, G. G.; NAULET, N & MARTIN, G. J. "Authentication of mustard oils by combined stable isotope analysis (SNIF-NMR and IRMS)". *J. Agric. Food Chem.* **45**: 1844-1848, 1997.
- ROBINSON, W. E. JR.; CORDEIRO, M.; ABDEL-MALEK, S.; JIA, Q.; CHOW, S. A.; REINECKE M. G & MITCHELL W. M. "Dicaffeoylquinic acid inhibitors of human immunodeficiency virus integrase: inhibition of the core catalytic domain of human immunodeficiency virus integrase" *Mol. Pharmacol.*, **50**: 846-855, 1996.
- ROOS, B.; WEG, G. V. D.; URGERT, R.; BOVENKAMP, P. V.; CHARRIER, A & KATAN, M. B. "Levels of cafestol, kawheol, and related diterpenoids in wild species of coffee plant *Coffea*". *J. Agric. Food Chem.*, **45**: 3065-3069, 1997.
- RUBAYIZA, A. B & MEURENS, M "Chemical discrimination of arabica and robusta coffees by Fourier transform Raman spectroscopy". *J. Agric. Food. Chem*, **53**: 4654-4659, 2005.
- SACCO, A.; BOLSI, I. N.; MASSINI, R.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E & GHELLI, S. "Preliminary investigation on the characterization of durum wheat flours coming from some areas of South Italy by means of  $^1\text{H}$  High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance". *J. Agric. Food. Chem*, **46**: 4242-4249, 1998.
- SALDAÑA, M. D. A.; MAZZAFERA, P & MOHAMED, R. "Extração dos alcalóides: cafeína e trigonelina dos grãos de café com  $\text{CO}_2$  supercrítico". *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **17**(4): 371-376, 1997.
- SANDERS, J. K. M & HUNTER, B., *Modern NMR Spectroscopy, a guide for chemists*, Oxford University Press, 1<sup>st</sup> edition, 1987.
- SHINTU, L.; ZIARELLI, F & CALDARELLI, S. "Is High-Resolution Magic Angle Spinning NMR a practical speciation tool for cheese samples? Parmigiano Reggiano as a case study" *Magn. Reson. Chem.*, **42**: 396-401, 2004.
- SIVAKESAVA, S & IRUDAYARAJ, J. "A rapid spectroscopic technique for determining honey adulteration with corn syrup" *J. Food Sci.* **66**: 787-792, 2001.
- SCHENKER, S. HEINEMANN, C. HUBER, M. POMPIZZI, R. PERREN, R. & ESCHER, F. "Impact of roasting conditions on the formation of aroma compounds in coffee beans" *J. Food Sci.* **67**: 60-66, 2002.

- SUCHÁNEK, M.; FILIPOVÁ, H.; VOLKA, K.; DELGADILLO, I & DAVIES A. N. "Qualitative analysis of green coffee by infrared spectrometry". *Fresenius J Anal Chem.* **354**: 327–332, 1996.
- STADLER, R. H.; VARGA, N.; HAU, J.; VERA, F. A & WEITI, D. H. "Alkylpyridiniums 1. Formation in model systems via thermal degradation of trigonelline". *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 1192-1199, 2002.
- STADLER, R. H.; VARGA, N.; MILO, C.; SCHILTER, B.; VERA, F. A & WELTI, D. H. "Alkylpyridiniums. 2. Isolation and quantification in roasted and ground coffees". *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 1200-1206, 2002.
- TAVARES, L. A. *Determinação do teor de cafeína e identificação dos constituintes majoritários de cafés comerciais via RM*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2002. Dissertação de Mestrado, 75 p.
- TAVARES, L. A & FERREIRA, A. G. "Análises quali e quantitativa de cafés comerciais via ressonância magnética nuclear". *Quim. Nova*, **29**(5): 911-915, 2006.
- TOCI, A.; FARAH, A. & TRUGO, L. C. "Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após a torração". *Quim. Nova*, **29**(5): 965-971, 2006.
- TRUGO, L. C. & MACRAE, R. "A Study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC" *Food Chem.*, **15**: 219-227, 1984.
- VLAHOV, G. "Application of NMR to the study of olive oils" *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **35**: 341-357, 1999.
- VOGELS, J. T. W. E.; TERWEL, L.; TAS, A .C.; VAN DER BERG, F.; DUKEL, F & VAN DER GREEF. "Detection of adulteration in Orange juices by a new screening method using proton NMR Spectroscopy in combination with Pattern Recognition Techniques". *J. Agric. Food Chem.*, **44**: 175-180, 1996.
- WECKERLE, B.; GÁTI, T.; TÓTH, G & SCHREIER, P. "3-Methylbutanoyl and 3-methylbut-2-enoyl disaccharides from green coffee beans (*Coffea arabica*)". *Phytochemistry*, **60**: 409-414. 2002.

WOESE, K.; LANGE, D.; BOESS, C. & BOGL, K. W. "A comparison of organically and conventionally grown foods: results of a review of the relevant literature" *J Sci. Food Agric.*, **74**: 281-293, 1997.

<http://www.conab.gov.br/download/safra/1ºLevantamento-Safra2006-07.pdf>,  
acessado em 14/01/2006.

[http://www.epamig.br/produtos/publicacoes/Outras/mercado\\_cafe.htm](http://www.epamig.br/produtos/publicacoes/Outras/mercado_cafe.htm), acessado em  
12/01/2006.

[http://www.sindicafesp.com.br/nota\\_cmkt\\_ago06.atml](http://www.sindicafesp.com.br/nota_cmkt_ago06.atml), acessado em 30/10/2006.

## ANÁLISES QUALI- E QUANTITATIVA DE CAFÉS COMERCIAIS VIA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Leila Aley Tavares e Antonio Gilberto Ferreira\*

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13560-970 São Carlos - SP, Brasil

Recebido em 18/3/05; aceito em 4/11/05; publicado na web em 18/5/06

QUALI- AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF COMMERCIAL COFFEE BY NMR. Coffee is one of the beverages most widely consumed in the world and the "cafezinho" is normally prepared from a blend of roasted powder of two species, *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. Each one exhibits differences in their taste and in the chemical composition, especially in the caffeine percentage. There are several procedures proposed in the literature for caffeine determination in different samples like soft drinks, coffee, medicines, etc but most of them need a sample workup which involves at least one step of purification. This work describes the quantitative analysis of caffeine using  $^1\text{H}$  NMR and the identification of the major components in commercial coffee samples using 1D and 2D NMR techniques without any sample pre-treatment.

Keywords: caffeine; quantitative  $^1\text{H}$  NMR; coffee composition.

### INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais consumidas mundialmente e a sua importância econômica tem incentivado vários estudos, principalmente no que se refere à composição química do grão e da bebida<sup>1-7</sup>. O teor de cafeína no café apresenta uma variação que depende, dentre outros fatores, da espécie da planta utilizada, sendo que a *Coffea arabica* (arábica) contém em média 1% do alcalóide e a *Coffea canephora* (robusta) em torno de 2%<sup>8-10</sup>. Entre os compostos mais estudados a cafeína é sem dúvida alguma o alcalóide, extraído do café, mais conhecido e também o que se encontra em maior quantidade, embora muitos outros compostos estejam presentes.

Outra substância presente no café e que tem despertado interesse é a trigonelina, importante não pela sua presença em si, mas principalmente, pelos produtos da sua degradação que podem ser gerados no processo de torra. Por isso, o grau de torra do café, tempo de torra *versus* temperatura, pode ser estimado fazendo-se a relação do teor de trigonelina com o do ácido nicotínico resultante da sua degradação térmica<sup>8</sup>. O ácido nicotínico ou niacina é uma importante vitamina para o metabolismo humano, podendo ser encontrado em quantidades que chegam próximo a 20 mg para cada 100 g de café torrado dependendo, evidentemente, do grau de torra do café<sup>11</sup> e, portanto, a sua quantificação é de suma importância.

A temperatura de torra tem sido fortemente associada ao aroma do café. Durante a torrefação, reações de Maillard, degradação de Stecker, pirólise e outras reações químicas produzem um grande número de diferentes compostos voláteis, sendo que mais de 800 compostos de várias classes já foram identificados. Além disso, o grau de torra tem impacto na concentração de vários compostos importantes, como por ex., guaiacol e 2-furfuriltiol, que aumentam com o grau de torra, enquanto que a 2,3-butanodiona e 2,3-pentanodiona apresentam um máximo de concentração para um grau de torra médio e exibem concentração mínima em cafés com alto grau de torra<sup>4</sup>.

Durante o processo de torrefação também se produzem outros compostos derivados de piridinas, pirróis e alguns compostos bicíclicos, os quais têm grande contribuição para o sabor final da bebida<sup>8,12,13</sup>.

Além desses, outros compostos de grande interesse são os ácidos clorogênicos, que têm chamado atenção devido à sua atividade anticancerígena comprovada para alguns tipos de câncer<sup>14</sup>, e a sua ação benéfica no combate a doenças cardiovasculares devido às suas propriedades antioxidantes<sup>15</sup>. Eles são formados principalmente pela esterificação do ácido quínico com os ácidos cafeico, ferúlico ou p-cumárico. A esterificação também pode ocorrer entre o ácido quínico e dois ácidos cafeicos, ou ainda, entre o ácido quínico com um ácido cafeico e um ferúlico. O teor total desses ácidos nos grãos verdes de café é de aproximadamente 6,0 e 9,5% (m m<sup>-1</sup>) para as espécies arábica e robusta, respectivamente<sup>16</sup>, muito embora se encontrem somente traços dos ácidos livres nos grãos de café verdes<sup>8</sup>. Os principais isômeros dos ácidos clorogênicos foram identificados e quantificados, recentemente, em amostras de cafés comerciais, onde se observou para todas as amostras uma predominância dos ácidos cafeoilquínicos com cerca de 77 a 81% do total de ácidos clorogênicos<sup>11</sup>.

Na identificação dos compostos presentes no café, várias técnicas espectroscópicas são utilizadas, tanto em separado, como em associação, tais como cromatografia líquida de alta resolução<sup>7,17</sup>, espectroscopia nas regiões do infravermelho<sup>18,19</sup> e infravermelho próximo<sup>20</sup>, cromatografia gasosa<sup>21,22</sup>, cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas<sup>12,23</sup> e ressonância magnética nuclear<sup>24,25</sup>. A RMN tem a vantagem de não requerer nenhum pré-tratamento da amostra quando comparada às outras técnicas e, além disso, uma análise espectral detalhada de um único espectro de hidrogênio poderá fornecer informações sobre a estrutura e a composição química dos principais constituintes químicos majoritários presentes na amostra.

A RMN tem sido, em geral, utilizada na análise de cafés para identificação de substâncias isoladas ou que constituem um pequeno grupo de substâncias em uma fração extraída do café, como por ex., a investigação dos compostos poliméricos da fração espumante de cafés expressos recém-preparados<sup>26</sup>, o estudo dos produtos de degradação térmica da trigonelina em sistemas modelos<sup>27</sup> e as suas quantificações em amostras de cafés torrados<sup>28</sup> e, também, na identificação de polissacarídeos da fração aquosa de cafés torrados<sup>3</sup> e dissacarídeos isolados de cafés verdes<sup>29</sup>, dentre outros. No entanto, a aplicação dessa técnica na análise de amostras de cafés sem nenhum pré-tratamento<sup>24</sup>, assim como ocorre neste trabalho, ainda é muito pouco explorada.

\*e-mail: giba\_04@yahoo.com.br

Neste trabalho a técnica de RMN foi aplicada utilizando-se amostras de “cafezinho”, sem nenhum processo de tratamento e com dois propósitos. O primeiro foi identificar os compostos majoritários encontrados na bebida preparada a partir de pós de cafés comerciais, e o segundo, quantificar os teores de cafeína tanto nos cafés preparados em laboratório como nos encontrados em estabelecimentos comerciais da cidade de São Carlos-SP.

## PARTE EXPERIMENTAL

Todos os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento de 9,4 T (400,13 MHz para frequência do hidrogênio), marca Bruker, modelo DRX400, a uma temperatura de 303 K e equipado com uma sonda de detecção inversa de 5 mm.

### Preparação das amostras

As amostras de pós de cafés torrados utilizadas na identificação dos constituintes majoritários foram preparadas de modo a se obter uma infusão concentrada utilizando-se cerca de 40 g de pó e 250 mL de água fervente, aproximadamente 95 °C, que foi adicionada sobre os pós e filtrados em uma cafeteira manual, usando-se papel de filtro comum.

### Espectroscopia de RMN de $^1\text{H}$

Em uma alíquota de 0,6 mL dessa solução foram adicionadas 2 gotas de DMSO- $d_6$ . Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos utilizando-se a seqüência de pulsos zgcppr (pré-saturação do sinal de HDO utilizando-se pulsos compostos), a qual se mostrou a mais eficiente dentre aquelas testadas: zgpr, noesypr1d (ambas com pré-saturação por ondas contínuas de baixa potência) e WATERGATE<sup>30</sup>. Além dos espectros de hidrogênio, também foram realizados os experimentos de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ , gCOSY, gHSQC e gHMBC, com o intuito de identificar o maior número de compostos. No entanto, para facilitar a confirmação de alguns sinais encontrados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foram adicionadas algumas substâncias puras, como cafeína, catecol, trigonelina, ácidos cafeico, ferúlico, quínico e 5-cafeoilquínico.

### Quantificação do teor de cafeína

Para as análises quantitativas as amostras foram preparadas de três formas distintas:

**Amostras A1 – A13** - Foram preparadas em uma cafeteira do tipo expresso, utilizando-se 10,0 g de pó de café e 72,0 mL de água a uma temperatura de 95 °C. Para as medidas de RMN utilizou-se uma mistura de 5,0 mL do cafezinho, obtido imediatamente após o preparo, e 2,0 mL do padrão interno (*N,N*-dimetilformamida 947 mg/L) e, em uma alíquota de 0,6 mL dessa mistura, adicionaram-se duas gotas de DMSO- $d_6$  para ajuste da homogeneidade do campo magnético.

**Amostra A14** - Café solúvel e descafeinado, foi preparada a partir de 3,0 g de café solúvel comercial e adição de 60,0 mL de água fervente. Para a execução das medidas de RMN, e posterior quantificação do teor da cafeína, o cafezinho assim obtido foi misturado com uma solução do padrão interno, conforme descrito para as amostras de A1-A13.

**Amostras B1 - B20** - Foram coletadas no comércio local, São Carlos-SP, e, após aproximadamente 4 h, as amostras foram submetidas às análises via RMN conforme descrito para as amostras de A1-A13. Estas receberam duas classificações de acordo com a forma de preparo: de B1 a B9 como café caseiro e de B10 a B20, café expresso.

Após a aquisição e o processamento dos espectros de hidrogênio, a área do pico em 7,9 ppm, referente ao hidrogênio pirrólico da cafeína, foi relacionado com a área do pico do padrão interno em 8,1 ppm, hidrogênio carbonílico. Este procedimento, juntamente com a construção de uma curva de calibração, possibilitou a determinação do teor de cafeína.

### Validação do método

A repetibilidade do método foi avaliada através dos valores do desvio padrão, sendo que para os cafés preparados no laboratório foram realizadas 15 medidas e para as bebidas coletadas no comércio e do café descafeinado, efetuaram-se 5 medidas para cada uma.

O teste de reprodutibilidade foi obtido através da execução das mesmas medidas, inclusive o preparo da amostra, por um analista diferente. Foi analisada em quintuplicata uma das amostras após ter decorrido aproximadamente 4 meses da primeira medida.

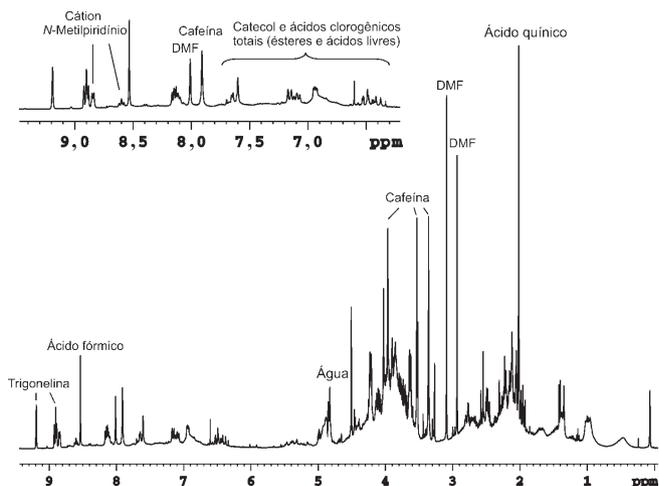
O limite de quantificação foi calculado a partir do teor de cafeína encontrado em amostras de cafés descafeinados.

O limite de detecção foi estimado adquirindo-se espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de soluções aquosas de cafeína com diluições decrescentes.

A exatidão foi calculada através da diferença entre duas medidas da concentração de cafeína na bebida. A primeira medida foi feita utilizando-se o café descafeinado sem adição de cafeína, e a segunda, adicionando-se uma quantidade conhecida à mesma amostra. Desta forma obtivemos o valor experimental, extraído da integração do sinal, que foi comparado com valor da quantidade de cafeína adicionada.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eficiência da seqüência de pulsos compostos, zgcppr<sup>30,31</sup>, utilizada na aquisição dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , que pode ser verificada na Figura 1, mostra os sinais de interesse com uma boa relação sinal/ruído e sem causar perda dos sinais próximos à irradiação. A eficiência na supressão do sinal da água foi importante tanto para as análises quantitativas, no que se refere a afetar ao mínimo a intensidade dos sinais e, conseqüentemente, os valores das suas integrais, como também na identificação dos compostos, garantindo que nenhum sinal fosse suprimido.



**Figura 1.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido diretamente da bebida de café usando-se a seqüência de pulsos compostos (zgcppr) para a supressão do sinal da água

### Identificação dos constituintes majoritários

As estruturas dos compostos identificados neste trabalho são mostradas na Figura 2, e os valores dos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

O experimento de 2D homonuclear, gCOSY, foi executado com supressão do sinal dos hidrogênios da água para garantir uma melhor relação sinal/ruído. A partir dele foi possível observarmos as seguintes correlações: trigonelina - H5 com H4 e H6, e H2 com H4 e H6; *N*-metilpiridina - H2 e H6 com H3 e H5 e também de H3 e H5 com H4; ácidos cafeico/ferúlico/clorogênicos (todos na mesma região) - H7 com H8 e ácido quínico - H3 com H4, H5 com H6 (equatorial e axial) e também H3 com H2 (equatorial e axial).

Os espectros de gHSQC e gHMBC foram usados para a determinação dos deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$ . Utilizando o experimento de gHSQC, foi possível atribuir os valores dos deslocamen-

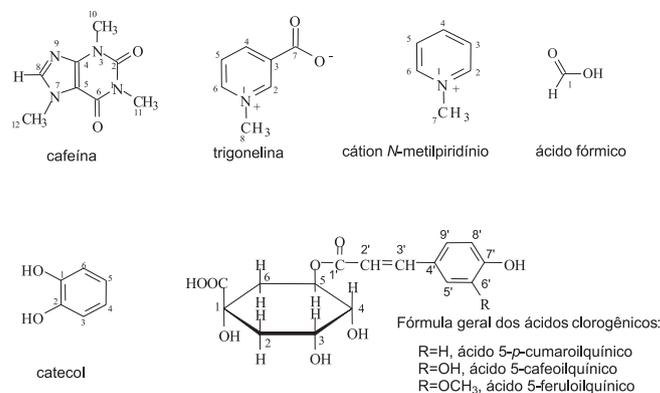


Figura 2. Estruturas dos compostos identificados na bebida de café

Tabela 1. Deslocamentos químicos  $\delta$ (ppm) de RMN de  $^1\text{H}$ , constante de acoplamento J(Hz) e correlações via gHMBC para os compostos identificados na bebida de café

n°.	substâncias identificadas									
	Cafeína	Trigonelina	<i>N</i> -Metilpiridina	Catecol	Ácido quínico	Ácido cafeico	Ácido ferúlico	Ácido clorogênico	Ácido fórmico	
H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,52
H2	-	9,18 s *146,0; *49,2	8,83 dl (6,4 Hz) *128,5; *49,2	-	1,90-2,16 m *179,5	7,17– 7,21 m d (2,6 Hz)	7,17– 7,21 m d (2,6 Hz)	1,90- 2,16 m *179,5	-	-
H3	-	-	8,12 ddl (7,5; 6,4 Hz)	6,96 d (8,3 Hz) *145,8	4,09	-	-	4,09	-	-
H4	-	8,88 dl (6,2 Hz) *168,0; *146,8	8,60 tl (7,5; 7,5 Hz) *128,5	6,97 d (8,3 Hz) *145,8	3,62	-	-	3,62	-	-
H5	-	8,15 dd (7,6; 6,2 Hz)	8,12 ddl (7,5; 6,4 Hz)	6,97 d (8,3Hz) *145,8	4,20	6,96 d (8,3 Hz)	6,96 d (8,3 Hz)	-	-	-
H6	-	8,91 dl (7,6 Hz) *146,8	8,83 dl (6,4 Hz) *128,5; *49,2	6,96 d (8,3Hz) *145,8	1,90- 2,16 m *179,5	7,09 -7,16 m	7,09 -7,16 m	1,90 -2,16 m *179,5	-	-
H7	-	-	4,49 s	-	-	6,38-6,54 d (15,8 Hz) *128,0	6,38-6,54 d (15,8 Hz) *128,0	-	-	-
H8	7,89 *149,8; *108,0	4,49 s	-	-	-	7,59-7,73 d (15,8 Hz) *170,0	7,59-7,73 d (15,8 Hz) *170,0	-	-	-
H10	3,48 *153,8; *149,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H11	3,30 *153,8; *158,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H12	3,91 *108,0; *144,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H2'	-	-	-	-	-	-	-	7,59– 7,73 d (15,8 Hz)	-	-
H3'	-	-	-	-	-	-	-	6,38-6,54 d (15,8 Hz)	-	-
H5'	-	-	-	-	-	-	-	7,17-7,21 d (2,6 Hz)	-	-
H8'	-	-	-	-	-	-	-	6,96 d (8,3 Hz)	-	-
H9'	-	-	-	-	-	-	-	7,09 -7,16 m	-	-
OCH <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	3,84	-	-	-

\* deslocamentos químicos obtidos via gHMBC; s – singlete; d – dubleto; dl – dubleto largo; ddl – duplo dubleto largo; tl – triplete largo; m – multiplete.

**Tabela 2.** Deslocamentos químicos  $\delta$ (ppm) de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos compostos identificados na bebida de café

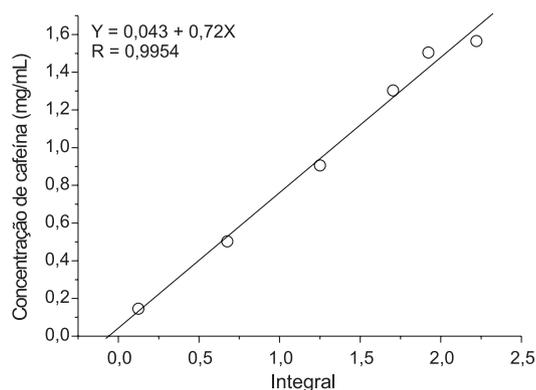
n <sup>o</sup> .	substâncias identificadas								
	Cafeína	Trigonelina	N-Metilpiridina	Catecol	Ácido quínico	Ácido cafeico	Ácido ferúlico	Ácido clorogênico	Ácido fórmico
C1	-	-	-	*145,8	76,0	*128,0	*128,0	76,0	171,9
C2	*153,8	146,8	145,9	*145,8	39,0	115,7	115,7	39,0	-
C3	-	*146,0	128,5	116,9	69,3	149,0	-	69,3	-
C4	*149,8	146,5	146,4	123,4	76,5	147,2	147,2	76,5	-
C5	*108,0	128,5	128,5	123,4	71,1	117,0	117,0	71,1	-
C6	*158,0	145,5	145,9	116,9	39,0	123,4	123,4	39,0	-
C7	-	168,0	49,2	-	*179,5	115,6	115,6	*179,5	-
C8	144,8	*49,2	-	-	-	146,8	146,8	-	-
C9	-	-	-	-	-	*170,0	*170,0	-	-
C10	30,9	-	-	-	-	-	-	-	-
C11	28,9	-	-	-	-	-	-	-	-
C12	34,5	-	-	-	-	-	-	-	-
C2'	-	-	-	-	-	-	-	146,8	-
C3'	-	-	-	-	-	-	-	115,6	-
C5'	-	-	-	-	-	-	-	115,7	-
C6'	-	-	-	-	-	-	-	149,0	-
C7'	-	-	-	-	-	-	-	147,2	-
C8'	-	-	-	-	-	-	-	117,0	-
C9'	-	-	-	-	-	-	-	123,4	-
OCH <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	65,5	-	-

\* correlações obtidas via gHMBC

tos químicos dos carbonos via  $^1\text{J}_{\text{IH-}^{13}\text{C}}$  e com o experimento gHMBC atribuiu-se todos os demais sinais através das correlações  $^n\text{J}_{\text{IH-}^{13}\text{C}}$ , que são mostrados na Tabela 2.

### Quantificação do teor de cafeína

Para cálculo do teor de cafeína, montou-se a curva de calibração mostrada na Figura 3, obtendo-se os valores encontrados para as amostras de cafés preparadas no laboratório sob condições controladas e para as amostras coletadas no comércio local, cujos resultados são apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Nelas podemos observar que existe uma grande variação tanto para as amostras de cafés produzidas no laboratório como, e principalmente, nas amostras encontradas no comércio local.



**Figura 3.** Curva de calibração para o teor de cafeína

Para as amostras de cafés preparadas em laboratório, os valores variaram de 49,8 a 69,6 mg/60 mL (volume aproximado de uma xícara de café utilizada no comércio em geral). Essa variação pode estar associada ao ano de colheita, à origem geográfica da planta, às espécies e/ou cultivares utilizadas, às diferentes composições das

**Tabela 3.** Teor de cafeína encontrado nos cafés preparados em laboratório

Amostras	Tipo de café	Concentração de cafeína mg/60 mL*
A1	Expresso	69,6 ± 1,8
A2	Extra-Forte	64,8 ± 6,6
A3	Extra-Forte	63,6 ± 5,4
A4	Forte	58,8 ± 4,8
A5	Tradicional	55,8 ± 4,2
A6	Orgânico	54,6 ± 4,2
A7	Tradicional	52,2 ± 3,0
A8	Suave	51,6 ± 4,2
A9	Extra-Forte	51,6 ± 2,4
A10	Forte	51,0 ± 1,2
A11	Forte	51,0 ± 4,2
A12	Forte	50,4 ± 1,2
A13	Exportação	49,8 ± 7,2
A14	Descafeinado	7,2 ± 1,2

\* corresponde a aproximadamente uma xícara de café

espécies na mistura, à granulometria dos pós e ao grau de torra<sup>8,32,33</sup>. Nas amostras de cafezinho coletadas no comércio, encontrou-se uma variação ainda maior, sua concentração variou de 29,4 a 79,8 mg/60 mL, já que nestas não houve controle algum tanto quanto aos produtos como no procedimento utilizado no preparo da bebida.

Considerando-se que o consumo de cafeína em doses moderadas, aproximadamente 300 mg/dia, não deve causar danos à saúde de um indivíduo normal, e que o consumo exagerado pode estar relacionado com o possível desenvolvimento de algumas doenças, como hipertensão, úlceras, taquicardia, etc<sup>34</sup>, os resultados obtidos demonstram que o controle diário baseado em xícaras de cafés não é uma medida recomendada. Dependendo dos vários fatores apontados acima, poder-se-ia estar consumindo mais ou menos cafeína

**Tabela 4.** Teor de cafeína encontrado nos cafés coletados no comércio local (São Carlos-SP)

Amostras	Tipo de café	Concentração de cafeína mg/60 mL*
B1	Caseiro	61,8 ± 4,2
B2	Caseiro	52,2 ± 1,2
B3	Caseiro	51,0 ± 1,2
B4	Caseiro	49,2 ± 1,2
B5	Caseiro	45,6 ± 0,6
B6	Caseiro	40,2 ± 1,8
B7	Caseiro	40,2 ± 1,2
B8	Caseiro	37,8 ± 1,2
B9	Caseiro	29,4 ± 0,6
B10	Expresso	79,8 ± 1,2
B11	Expresso	69,0 ± 1,8
B12	Expresso	64,8 ± 1,2
B13	Expresso	58,8 ± 0,6
B14	Expresso	55,8 ± 1,8
B15	Expresso	50,4 ± 1,2
B16	Expresso	49,8 ± 1,2
B17	Expresso	48,0 ± 1,2
B18	Expresso	46,2 ± 0,6
B19	Expresso	41,4 ± 0,6
B20	Expresso	40,2 ± 0,6

\* corresponde a aproximadamente uma xícara de café

diariamente em função do teor de cafeína encontrado em cada tipo de bebida e não, no número de xícaras consumidas.

Os teores de cafeína encontrados nas amostras estudadas estão em concordância com os dados da literatura<sup>33</sup> baseados na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Nos dois métodos foi observado um teor médio de cafeína, para os cafés do tipo expresso, um pouco superior aos do tipo caseiro. No entanto, algumas bebidas caseiras apresentaram valores superiores aos cafés expressos (Tabela 4). Isso é justificável uma vez que as amostras foram coletadas no comércio da cidade e não tiveram nenhum controle do seu preparo.

Com relação à amostra de café instantâneo e descafeinado, A14, observa-se um resíduo de cafeína da ordem de 0,2%. Esse valor está em concordância com a quantidade máxima de cafeína, em cafés descafeinados, estabelecida pelas normas de qualidade da Comunidade Européia<sup>8</sup>.

Para validação do método via RMN de <sup>1</sup>H encontrou-se boa reprodutibilidade e repetibilidade, que pode ser observada nos desvios padrões das Tabelas 3 e 4, exatidão de 95,5%, limite de quantificação de 0,12 mg/mL e limite de detecção de 0,027 mg/mL.

## CONCLUSÕES

Os experimentos de RMN 1D e 2D, auxiliados pela adição das substâncias padrões, permitiram a identificação dos constituintes majoritários no cafezinho como cafeína, trigonelina, *N*-metilpiridina, catecol, ácido fórmico e os ácidos quínico, cafeico, ferúlico e clorogênicos, sem o seu isolamento prévio. Quanto à determinação do teor de cafeína na bebida, a técnica de RMN mostrou ser uma ferramenta útil e confiável, com boa repetibilidade e reprodutibilidade entre as medidas, e uma exatidão de 95,5%.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e CAPES pelas bolsas de estudos e à FAPESP pelo apoio financeiro. Ao Prof. Dr. P. Mazzafesa, Departamento de Fisiologia Vegetal, IB-Unicamp, por ceder algumas substâncias puras utilizadas como padrões.

## REFERÊNCIAS

- Galli, V.; Barbas, C.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1032*, 299.
- Saldaña, M. D. A.; Mazzafera, P.; Mohamed, R.; *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **1997**, *17*, 371.
- Navarini, L.; Gilli, R.; Gombac, V.; Abatangelo, A.; Bosco, M.; Toffanin, R.; *Carbohydr. Polym.* **1999**, *40*, 71.
- Schenker, S.; Heinemann, C.; Huber, M.; Pompizzi, R.; Perren, R.; Escher, F.; *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 60.
- Roos, B.; Weg, G. V. D.; Urgert, R.; Bovenkamp, P. V.; Charrier, A.; Katan, M. B.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3065.
- Dutra, E. R.; Oliveira, L. S.; Franca, A. S.; Ferraz, V. P.; Afonso, R. J. C. F.; *J. Food Eng.* **2001**, *47*, 241.
- Martin, M. J.; Pablos, F.; González, A. G.; *Talanta* **1998**, *46*, 1259.
- Clarke, R.J.; Macrae, R.; *Coffee: Chemistry*, Elsevier Applied Science Publishers LTD: London, 1985.
- Carvalho, V. D.; Chalfoun, S. M.; *Informe Agropecuário* **1985**, *11*, 79.
- Carvalho, V. D.; Chagas, S. J. R.; Chalfoun, S. M.; *Informe Agropecuário* **1997**, *18*, 5.
- Monteiro, M. C.; Trugo, L. C.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 637.
- De Maria, C. A. B.; Trugo, L. C.; Aquino Neto, F. R.; Moreira, R. F. A.; Alviano, C. S.; *Food Chem.* **1998**, *33*, 203.
- De Maria, C. A. B.; Moreira, R. F. A.; Trugo, L. C.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 209.
- Mattila, P.; Kumpulainen, J.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3660.
- Del Castillo, M. D.; Ames, J. M.; Gordon, M. H.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3698.
- Moreira, R. F. A.; De Maria, C. A. B.; Trugo, L. C.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 195.
- Del Castillo, M. L. R.; Herraiz, M.; Blanch, G.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1525.
- Bouhsain, Z.; Garrigues, J. M.; Garrigues, S.; Guardia, M.; *Vib. Spectrosc.* **1999**, *21*, 143.
- Briand, R.; Kemsley, E. K.; Wilson, R. H.; *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 170.
- Esteban-Díez, I.; González-Sáiz, J. M.; Pizarro, C.; *Anal. Chim. Acta* **2004**, *514*, 57.
- Carrera, F.; León-Camacho, M.; Pablos, F.; González, A. G.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, *370*, 131.
- Bicchi, C. P.; Panero, O. M.; Pellegrino, G. M.; Vanni, A.C.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4680.
- Maetz, L.; Sanz, C.; Andueza, S.; De Peña, M. P.; Bello, J.; Cid, C.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5437.
- Bosco, M.; Toffanin, R.; De Palo, D.; Zatti, L.; Segre, A.; *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 869.
- Charlton, A. J.; Farrington, W. H. H.; Brereton, P.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3098.
- D'Agostina, A.; Boschini, G.; Bacchini, F.; Arnoldi, A.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7118.
- Stadler, R. H.; Varga, N.; Hau, J.; Vera, F. A.; Welti, D. H.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1192.
- Stadler, R. H.; Varga, N.; Milo, C.; Schilter, B.; Vera, F. A.; Welti, D. H.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1200.
- Weckerle, B.; Gáti, T.; Tóth, G.; Schreiber, P.; *Phytochemistry* **2002**, *60*, 409.
- Claridge, T. D. W.; *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamon: Oxford, 1999.
- Bax, A. D.; *J. Magn. Reson.* **1985**, *65*, 142.
- Andrade, P. B.; Leitão, R.; Seabra, R. M.; Oliveira, M. B.; Ferreira, M. A.; *Food Chem.* **1998**, *61*, 511.
- Camargo, M. C. R.; Toledo, M. C. F.; *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **1998**, *18*, 421.
- <http://www.ific.org/publications/reviews/caffeineir.cfm>, acessada em Outubro 2005.