

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Perfil químico do Café Capixaba Conilon & Arábica por  
ESI(-)FT-ICR MS e ATR-FTIR: uma abordagem quantitativa**

**Radigya Meyrelles Correia**

**Dissertação de Mestrado em Química**

**Vitória  
2016**

**Radigya Meyrelles Correia**

**Perfil Químico do Café Capixaba Conilon & Arábica por ESI(-)FT-ICR  
MS E ATR-FTIR: uma abordagem quantitativa**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Lacerda Jr.

Co-orientador: Prof. Dr. Wanderson Romão

**VITÓRIA**

**2016**

# **Perfil Químico do Café Capixaba Conilon & Arábica por ESI(-)FT-ICR MS E ATR-FTIR: uma Abordagem Quantitativa**

**Radigya Meyrelles Correia**

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do  
grau de Mestre em Química.**

**Aprovado(a) em 04/03/2016 por:**

---

**Prof. Dr. Valdemar Lacerda Jr.  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientador**

---

**Prof. Dr. Wanderson Romão  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Co-orientador**

---

**Prof. Dr. Rafael Garrett da Costa  
Universidade Federal do Rio de Janeiro**

---

**Prof. Dr. Paulo Roberto Filgueiras  
Universidade Federal do Espírito Santo**

**Universidade Federal do Espírito Santo  
Vitória, março de 2016**

Aos meus pais, Marcos André Correia e Andrea Meyrelles M. Correia e a meu esposo e filho, Maicon Coutinho Rocha e Arthur Meyrelles Coutinho.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela Sua presença em minha vida.

A minha mãe Andrea e meu pai Marcos por me proporcionar tudo que foi preciso para que eu estivesse aqui. A toda minha família pela compreensão e apoio. Dedico a vocês a minha felicidade.

Ao meu esposo Maicon, pela paciência e apoio em todo o percurso trilhado, e principalmente por acreditar no meu potencial.

Ao meu filho Arthur por ser a razão de todo meu esforço e por, todos os dias, me dar a certeza de que valeu a pena.

Ao prof. Dr. Valdemar Lacerda Jr. pela paciência, zelo, amizade e confiança nesses anos de convivência.

Ao prof. Dr. Wanderson Romão pela paciência, transmissão de conhecimento e por me dar a oportunidade de aprender com sua experiência, para me tornar uma profissional melhor.

Aos prof. Dr. Paulo Roberto Filgueiras e Rafael Garrett da Costa por aceitarem participar da banca, colaborando para o crescimento do trabalho.

A Cooperativa dos cafeicultores de Iúna - CACIL e ao presidente da CACIL José Roberto Silveira Barros, por me introduzirem nesse mundo do café e pelo fornecimento das amostras.

A todos os colegas de pesquisa do Laboratório de Petroleômica e Forense: Heloá, Elizangela, Flávia, Heloísa, Letícia, Izabela, Daniel, Eliane, Larissa, Fabiano, Gabriela, Fernanda, Silvana Lindamara, Natwrie, Vitor, Eloilson, Jade, Bruno, Helber, Nayara, e em especial Lilian, por me transmitir seu conhecimento todas as vezes que necessitei.

A Laiza Bruzadelle do Laboratório de Instrumentação.

Ao LabPetro pelo espaço cedido.

A CAPES, CNPq E FAPES pelo auxílio nesse período.

A PPGQUI-UFES, em especial aos professores que colaboraram no meu crescimento.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”

Arthur Schopenhauer

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estados produtores de Café no Brasil .....	17
<b>Figura 2.</b> Compostos fenólicos encontrados em amostras de cafés .....	22
<b>Figura 3.</b> Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas .....	27
<b>Figura 4.</b> Esquema da fonte de ionização por ESI .....	28
<b>Figura 5.</b> Diagrama esquemático de uma cela de ICR .....	30
<b>Figura 6.</b> Diagrama esquemático de um interferômetro de Michelson .....	32
<b>Figura 7.</b> Espectros de ESI(-)FT-ICR MS do (a) café Conilon (b) café Arábica.....	43
<b>Figura 8.</b> Espectros de <i>MS/MS</i> dos íons de <i>m/z</i> (a) 335 ácido cafeoilchiquímico, (b) 353 ácido cafeoilquínico (c) 365 dímero do ácido quínico, (d) 367 ácido feruloilquínico e (e) 457 íon do ácido esteárico e ácido quínico .....	46
<b>Figura 9.</b> Propostas de mecanismos de fragmentações para os íons de <i>m/z</i> (a) 335 ácido cafeoilchiquímico, (b) 353 ácido cafeoilquínico (c) 365 dímero do ácido quínico, (d) 367 ácido feruloilquínico e (e) 457 íon do ácido esteárico e ácido quínico .....	48
<b>Figura 10.</b> Espectros de ESI(-)FT-ICR MS das blendas de café em diferentes níveis de adulteração. Em destaque a relação entre os íons de <i>m/z</i> 283 e 353; e <i>m/z</i> 365 e 367 .....	50
<b>Figura 11.</b> Curva de calibração da intensidade relativa em função do teor de café Conilon (wt%) nas blendas com café Arábica. Em destaque, barra de erros .....	52
<b>Figura 12.</b> Espectros de ATR-FTIR (a) café Arábica (b) café Conilon .....	54
<b>Figura 13.</b> Espectros de ATR-FTIR das blendas de café Arábica/Conilon em função da concentração de Conilon .....	56
<b>Figura 14.</b> Gráfico do erro quadrático médio de validação cruzada pelo número de variáveis latentes utilizados na construção do modelo PLS .....	57
<b>Figura 15.</b> (a) Espectros das blendas de cafés (após tratamento dos dados) (b) Gráfico dos coeficientes de regressão do modelo .....	58
<b>Figura 16.</b> Relação do teor de café Conilon nas amostras e previstos em blendas utilizando o modelo PLS .....	59





## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros como valores de $m/z$ medido, erro de massa (ppm), DBE, fórmula mínima e estrutura proposta para os sinais detectados no café Conilon e Arábica .....	<b>44</b>
<b>Tabela 2.</b> Dados das análises de ESI(-)-FT-ICR MS para construção do modelo de calibração univariada .....	<b>51</b>
<b>Tabela 3.</b> Valores das razões das somas das intensidades relativas dos sinais de $m/z$ 365 e 367 por $m/z$ 353 para o cálculo de repetibilidade para ESI(-)-FT-ICR MS .....	<b>52</b>
<b>Tabela 4.</b> Valores das razões das somas das intensidades relativas dos sinais de $m/z$ 365 e 367 por $m/z$ 353 para o cálculo de precisão intermediária para ESI(-)-FT-ICR MS .....	<b>53</b>
<b>Tabela 5.</b> Espectros de ATR-FTIR das amostras de (a) café Arábica (b) café Conilon puras .....	<b>55</b>

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ACC – Ácido cafeoilchiquímico

ACQ – Ácido cafeoilquínico

AFQ – Ácido feruloilquínico

ATR-FTIR – Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier

AQ – Ácido quínico

ASTM - *American Society for Testing and Materials*

CACIL – Cooperativa Agrária dos Cafeicultores de Iúna

CID – Dissociação Induzida por Colisão

DBE - Equivalente dupla ligação

ESI – Ionização por eletrospray (do inglês *electrospray ionization*)

FT-ICR MS - Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier.

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ICR – Ressonância ciclotrônica de íons (do inglês *ion cyclotron resonance*)

IR – Infravermelho, (do inglês *Infrared*)

LABPETRO – Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Metodologias para Análises de Petróleo

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MS – Espectrometria de Massas (do inglês *Mass Spectrometry*)

MS/MS - Espectrometria de Massas Tandem

$m/z$  – Razão massa-sobre-carga

NaTFA – Trifluoracetato de sódio

pH - Potencial hidrogeniônico.

PPM – Partes por milhão.

PCA – Análise dos componentes principais

PLS – Regressão por mínimos quadrados parciais

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMSEP - Raiz quadrada dos somatórios dos quadrados dos resíduos do conjunto de previsão

RMSECV – Raiz quadrada dos somatórios dos quadrados dos resíduos do conjunto de validação cruzada

PPGQUI / UFES – Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

16-OMC - 16-O-metilcafestol

## LISTA DE SÍMBOLOS

atm – atmosfera

B - Campo magnético

cm – centímetros

Da – Dalton

F – Força eletromagnética

g – grama

% - porcentagem

mg - miligramas

mL – mililitros

q – carga

R<sup>2</sup> - coeficiente de determinação

r - raio

V- Volts

wt % - porcentagem em massa

$\omega$  – velocidade angular

$\omega_c$  – frequência ciclotrônica

## RESUMO

O Brasil é o maior produtor e segundo consumidor mundial de café, sendo o Espírito Santo um dos maiores pólos de produção nacional deste produto. O café é uma fruta de grande importância para o PIB do país e a presença de adulterantes infringe o direito do consumidor, causando-lhe prejuízos e possíveis danos à saúde. Desta maneira, desenvolver um método analítico para determinar possíveis adulterações, agregaria valor de *commodity*, fortalecendo o crescimento econômico do país. Amostras de café torrados Conilon e Arábica foram analisadas através da técnica de Espectrometria de Massas por Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (ESI(-)FT-ICR MS) e Espectroscopia na região do infravermelho médio com refletância total atenuada (ATR-FTIR) com o objetivo de desenvolver um método de quantificação de café Conilon em blendas de café Arábica, utilizando modelos de análise de dados uni e multivariados. Para construção do modelo de calibração univariada por ESI(-)FT-ICR MS, foram usadas 10 amostras de café Arábica (*Coffea Arábica*) adulteradas com diferentes proporções de café Conilon (*Coffea Canephora*), e 2 amostras puras (0% e 100 wt% de café Conilon) dopadas com um padrão interno de ácido esteárico de concentração  $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  (m/z 283 e 567). Para a análise de ATR-FTIR foram usadas uma maior variabilidade de adulterações, totalizando 21 amostras de blendas e 2 amostras puras (0% e 100 wt% de café Conilon), a partir dos resultados foi proposto um modelo de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). A partir dos resultados de ESI(-)FT-ICR foi possível identificar as principais espécies químicas presentes nas amostras de cafés, tais como: ácido quínico (m/z 191), ácido cafeoilquínico (m/z 353) e ácido feruloilquínico (m/z 367). O modelo de calibração univariada desenvolvido apresentou boa linearidade ( $R^2$  de 0,976) e limites de detecção e de quantificação de 0.2 e 0.3 wt%, respectivamente. O modelo PLS construído com dados ATR-FTIR resultou em um RMSECV de 5.7 wt% e RMSEP de 9.2 wt%, com coeficientes de determinação para validação cruzada e previsão de 0.9635 e 0.9295, respectivamente. Foram encontrados valores de repetibilidade e precisão intermediária de 4 wt% e 5 wt% para ESI(-)FT-ICR MS respectivamente, e 1,7 wt% para ambas as figuras de mérito nas análises de ATR-FTIR.

**Palavras-chaves:** *Coffea Arábica* L. *Coffea canephora*. Adulteração. ESI-FT-ICR MS. ATR-FTIR. Calibração multivariada.

## ABSTRACT

Brazil is the largest coffee producer and world's second major consumer of coffee. The Espírito Santo State has one of the largest national production centers of this product. Coffee is a very important fruit for the country's GNP and the presence of adulterants infringe consumer rights, causing losses to the consumer and possible damage to health. Therefore, developing an analytical method to determine possible tampering would add value to the commodity and strengthening the country's economic growth. Robusta and Arabica roasted coffee samples were analyzed by negative-ion mode electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (ESI(-)FT-ICR MS) and attenuated total reflection Fourier transform in the mid infrared region spectroscopy (ATR-FTIR) aiming to develop a quantification method of Robusta coffee in Arabica coffee blends using uni- and multivariate data analysis models. To build the univariate calibration model with ESI(-)FT-ICR MS data, 10 samples of Arabica coffee (*Coffea Arabica*) adulterated with different proportions of Robusta coffee (*Coffea Canephora*) and two pure samples (0% and 100 wt % of Robusta coffee), doped with an internal standard of  $5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> stearic acid ( $m/z$  283 and 567) were used. For the ATR-FTIR analysis a higher variability of adulterations were used, totaling 21 blend samples and two pure amostras (0% e 100 wt% Robusta coffee), and a partial least squares (PLS) regression model was proposed. ESI(-)FT-ICR results identified the main chemical species present in the coffee blends such as: quinic acid ( $m/z$  191), caffeoylquinic acid ( $m/z$  353) and feruloylquinic acid ( $m/z$  367). The univariate calibration model obtained had a good linearity ( $R^2$  of 0.9757) and limits of detection and quantification of 0.2 and 0.3 wt %, respectively. The PLS model built with ATR-FTIR data resulted in a RMSECV of 5.7 wt % and a RMSEP of 9.2 wt %, with coefficient of determination for cross-validation and prediction of 0.9635 and 0.9295, respectively. Repeatability and intermediate precision values of 4 wt% and 5 wt% were found for ESI(-)FT-ICR MS respectively, and 1.7 wt% for both figures of merit in the ATR-FTIR analysis.

**Keywords:** *Coffea Arabica* L. *Coffea canephora* Pierre. Adulteration. ESI-FT-ICR MS. ATR-FTIR. Multivariate calibration.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>1.1 Café</b> .....	17
1.1.1. Processamento do café .....	18
1.1.1.1. Colheita .....	19
1.1.1.2. Secagem .....	19
1.1.1.3. Beneficiamento.....	20
1.1.1.4. Torrefação .....	20
1.1.1.5. Moagem .....	21
1.1.1.6. Armazenamento .....	21
1.1.2. Composição química .....	21
1.1.2.1. Compostos fenólicos .....	22
1.1.2.2. Alcaloides .....	23
1.1.2.3. Minerais.....	24
1.1.2.4. Carboidratos.....	24
<b>1.2. Adultrações</b> .....	24
<b>1.3. Caracterização do café</b> .....	26
1.3.1. Espectrometria de Massas .....	26
1.3.2. Ionização por <i>electrospray</i> (ESI).....	27
1.3.3. Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT-ICR MS).....	28
1.3.4. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier com acessório de refletância atenuada total (ATR-FTIR).....	30
<b>1.4. Análises quantitativas</b> .....	32
<b>1.5. Quimiometria</b> .....	33
1.5.1. Regressão por mínimos quadrados parciais .....	34
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	35
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	35
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	35
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	35
<b>3.1. Amostras e reagentes</b> .....	35
<b>3.2. Extração dos componentes polares e majoritários do café Conilon e Arábica para ESI(-)FT-ICR MS</b> .....	36
<b>3.3. Preparação das blendas</b> .....	36
<b>4. CARACTERIZAÇÃO</b> .....	36
<b>4.1. Análise físico-química</b> .....	36

<b>4.2. ESI(-)-FT-ICR MS</b> .....	36
4.2.1. ESI(-)-FT-ICR MS/MS.....	37
<b>4.3. FTIR</b> .....	37
<b>4.4. Análises quantitativas</b> .....	38
4.4.1. Calibração univariada .....	38
4.4.2. Análises quimiométricas .....	39
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>5.2. ESI(-)MS/MS</b> .....	46
<b>5.3. Quantificação de café Conilon em blendas de café Arábica</b> .....	49
<b>5.4. Espectroscopia no Infravermelho médio – ATR-FTIR</b> .....	53
<b>5.5. Análises quimiométricas</b> .....	56
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	60

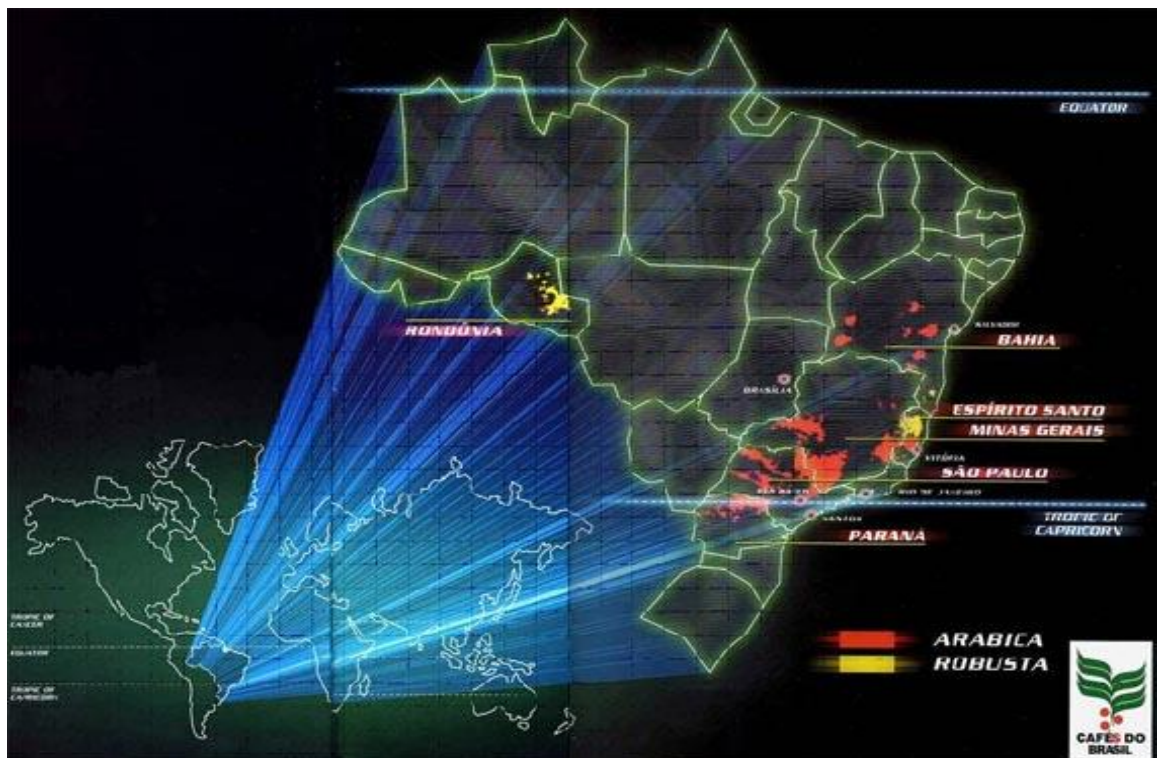


# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Café

Atualmente, o café se tornou um dos seis principais produtos de exportação mundial junto ao minério de ferro, petróleo bruto, complexo de soja, carne e açúcar. O café tornou-se fundamental para a economia e política de muitos países em desenvolvimento, contribuindo com até 70% do crescimento econômico. Isso demonstra a importância da atividade cafeeira no processo de estruturação das economias dos países produtores (UNICAFÉ). O mercado brasileiro cafeeiro vem crescendo, e devido a sua importância no cenário econômico mundial, a busca por cafés de alta qualidade vem se tornando primordial.

Destaca-se o Brasil, como sendo o maior produtor e segundo consumidor mundial de café, com o Espírito Santo sendo um dos maiores pólos de produção nacional deste produto (BRASIL, 2015), **Figura 1**.



**Figura 1.** Estados produtores de Café no Brasil.

O café pertence ao gênero *Coffea* da família das Rubiáceas, e dentre todas as espécies, as mais importantes são a *Coffea Arábica* L., conhecida como café Arábica, que corresponde a 75% da produção mundial e a *Coffea canephora* Pierre, o café

Conilon (ou Robusta), que compõe os 25% restantes da produção (MENDES, DE MENEZES, APARECIDA *et al.*, 2001). O café Arábica permite ao consumidor degustar um produto de melhor qualidade. Originalmente produzido no oriente, este tipo de café é normalmente cultivado em altitudes acima de 800 m. No Brasil, o café Arábica predomina nas lavouras de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Bahia, Rio de Janeiro e em parte do Espírito Santo. Já o café Conilon é usado para a fabricação de cafés solúveis e apresenta menor acidez e maior teor de cafeína. Ele predomina nas lavouras do Espírito Santo, em Rondônia e em parte da Bahia e de Minas Gerais (BRASIL, 2015).

#### *Café Conilon*

O café Conilon se destaca como sendo mais produtivo e resistente. Ele é cultivado em terrenos baixos e possui plantas de maior envergadura (menores) e grãos menos perfumados. A quantidade de cafeína é maior (entre 2 e 4,5 wt% do total), o que o torna mais amargo do que o Arábica. As sementes são ovais na forma, e menores do que aquelas da Arábica e demoram até 11 meses para amadurecer. O café Conilon é encontrado na África Ocidental e Central, no Sudeste Asiático e a algumas extensões no Brasil (CNCAFÉ).

#### *Café Arábica*

O café Arábica foi descrito pela primeira vez por Linnaeus, em 1753. Possui teor de cafeína menor do que o Conilon (entre 0,9 e 1,5 wt%). Os frutos são redondos, suaves, levemente amargos, de cor achocolatada, com crosta lisa e perfume intenso. A planta é um arbusto grande com as folhas ovais verde escuros. As frutas ficam maduras em 7 a 9 meses; contêm geralmente duas sementes lisas (os feijões de café). O café Arábica é muito encontrado na América Latina, na África Central e do Leste, na Índia e em alguma extensão em Indonésia (CNCAFÉ). Todas essas características fazem com que o café Arábica tenha um valor de *commodity* superior ao café Conilon.

##### 1.1.1. Processamento do café

Há um longo e criterioso processo na produção da bebida de café. Este processo inicia-se a partir da colheita, secagem, beneficiamento e estende-se até moagem e o armazenamento.

#### 1.1.1.1. Colheita

O fruto do cafeeiro atinge o auge da maturação no estado “cereja”, quando apresenta o máximo desenvolvimento de todos os seus componentes (casca, mucilagem, pergaminho e sementes), onde a composição química dos grãos oferece condições para que no processo de torra ocorram todas as reações físico-químicas necessárias para obtenção de todas as características sensoriais desejáveis como sabor, amargor, acidez, corpo e doçura, satisfazendo as exigências para produção de cafés de alta qualidade de bebida. Por isso, o estágio cereja é o momento em que o fruto expressa seu potencial máximo de qualidade, representando o ponto ideal para colheita (GIOMO, 2012).

A colheita deve ser iniciada quando a maior parte dos frutos estiver maduro e antes que se inicie a sua queda. O período de colheita do café é variável de região para região, em função, principalmente, da altitude, da latitude e das condições climáticas. Quanto mais tempo o café permanecer na árvore ou no chão, maior será a incidência de grãos ardidos e grãos pretos, considerados, juntamente com os verdes, os piores defeitos do café (UNICAFÉ; MAZZAFERA, 1999; FRANCA, OLIVEIRA e MENDONÇA, 2005; FRANÇA, MENDONÇA e OLIVEIRA, 2005).

#### 1.1.1.2. Secagem

O café por ser um produto colhido com elevado teor de umidade no estágio cereja requer cuidados especiais, principalmente no processo de secagem. A secagem inicial deve ser processada de forma rápida, para evitar a ocorrência de fermentações. Entretanto, o grão não deve ser demasiadamente aquecido, para evitar o risco do aparecimento de grãos ardidos, da ocorrência de secagem desuniforme e do branqueamento dos grãos, características indesejáveis no café (FREIRE, 1998). Este processo é um dos pontos críticos na pós-colheita, devido ao alto custo operacional e se for mal conduzida afeta a qualidade da bebida.

Na secagem em terreiro, os grãos ficam por um determinado tempo exposto ao sol, porém há produtores que utilizam secadores mecânicos, que possuem a vantagem de gastar menos tempo neste processo (GIOMO, 2012).

#### 1.1.1.3. Beneficiamento

O beneficiamento do café é uma operação pós-colheita usada para transformar, pela eliminação da casca e separação, o beneficiamento dos grãos, que são frutos secos (natural ou pergaminho) (HALAL, 2008).

Este processo inicia-se na separação das impurezas maiores e menores, através de catadores de pedras e peneiras. Logo após, os grãos são descascados através de máquinas de beneficiamento próprias a esta etapa. E por último, os grãos são separados por tamanho, através de peneiras fixas na máquina de beneficiamento.

Para que as características originais sejam mantidas é necessário que o beneficiamento seja realizado o mais próximo possível do período de comercialização (SIQUEIRA e ABREU, 2006).

#### 1.1.1.4. Torrefação

O café, para seu consumo, necessita obrigatoriamente ser torrado. O processo de torra consiste em submeter o grão cru à elevação progressiva e rápida da temperatura, fazendo com que sua umidade interna chegue a 3%. Durante o processo, os grãos são mexidos continuamente para que a torra seja uniforme. Esta fase é determinante na característica final da bebida, pois o grau de torra evidencia e/ou esconde muitas propriedades do grão (ABIC).

A temperatura e o tempo deste processo dependem da qualidade final do produto desejado, sendo caracterizados em três tipos: clara, média e escura.

As características essenciais de cada tipo de café dependem principalmente do grau da torra, sendo que a preferencial nas cidades brasileiras são as torrefações escuras, que acentuam o sabor e o aroma do produto. Já os americanos se identificam com o grau de torra clara, o que torna o café mais suave, devido ao menor amargor proporcionado pela formação de produtos durante a torra. A preferência por tais características depende tanto da localidade como da população, porém a torrefação média seria a mais indicada, por haver um equilíbrio na formação e degradação dos produtos essenciais a cafés de qualidade.

A torrefação é considerada uma das etapas mais importantes para o desenvolvimento do sabor e aroma do café, que são conferidos por compostos voláteis, presentes nos grãos antes e/ou, após a torração, por exemplo os furanos, pirróis e pirazinas (DE MARIA, MOREIRA E TRUGO, 1999). Nesta fase, os grãos sofrem algumas reações químicas importantes, necessárias à formação da qualidade

sensorial, assim como ocorrem mudanças físicas que podem variar de uma espécie a outra e também entre cultivares (SIQUEIRA e ABREU, 2006).

#### 1.1.1.5. Moagem

A moagem é o processo em que os grãos torrados são triturados até a transformação em pó fino. Ela pode ser classificada em função do grau de moagem: pulverizado, fina, média e grossa.

O tempo de preparação final da bebida é influenciado pela moagem, pois numa moagem muito fina, a água levará mais tempo para passar pelo pó, resultando numa extração superior (ABIC).

#### 1.1.1.6. Armazenamento

A respiração celular é um fenômeno que consiste basicamente na liberação de energia química acumulada nas moléculas de diversas substâncias, onde ocorre oxidação de compostos orgânicos de alto teor energético e a consequente formação de substâncias de menor conteúdo energético como gás carbônico e água. Assim diversos fatores podem influenciar a taxa respiratória dos grãos durante o armazenamento, como o teor de água durante a colheita, a danificação mecânica, o teor inicial de água para o armazenamento, a temperatura dos grãos e as condições climáticas (NOGUEIRA, 2009)

A atividade da água do grão e/ou semente, juntamente com a temperatura são os principais fatores que afetam a taxa de produção de CO<sub>2</sub>. E com o alto teor de água, a respiração é aumentada rapidamente, ocorrendo deterioração e perda de matéria seca do produto. Em grãos armazenados, o processo respiratório deve ser mantido em nível tão baixo quanto possível para que haja melhor conservação quantitativa e qualitativa (NOGUEIRA, 2009).

Devido a estes fatores, os grãos devem ser armazenados em sacos de juta novos, longe da umidade e do sol, em locais com temperatura aproximada de 11°C.

#### 1.1.2. Composição química

A qualidade do café se encontra estritamente relacionada aos constituintes dos grãos crus, que após torrados e moídos conferem sabor e aroma à bebida. Portanto o teor e a composição química dos grãos crus definem a qualidade final da bebida. Destes constituintes, podemos citar como os mais importantes ou os que estão em

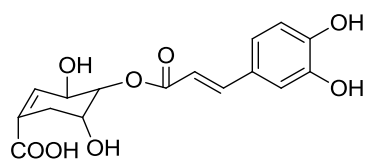
maior quantidade: os alcaloides, ácidos carboxílicos, aldeídos, cetonas, compostos fenólicos, aminoácidos, proteínas, dentre outros (TAVARES e FERREIRA, 2006).

A sacarose, cafeína, trigonelina e os ácidos clorogênicos são os principais componentes presentes nos cafés Arábica e Conilon responsáveis por diferenciar as duas espécies, portanto as análises físico-químicas (determinação do teor de sólidos solúveis totais, cafeína, pH, dentre outros) são os métodos comumente utilizados para definir o teor destes compostos com objetivo de diferenciação dos cafés. E normalmente para verificar a qualidade da bebida final usa-se a análise sensorial, tornando o resultado subjetivo. A identificação da composição química dos cafés torna-se primordial para distinção das variedades de cafés produzidos.

#### 1.1.2.1. Compostos fenólicos

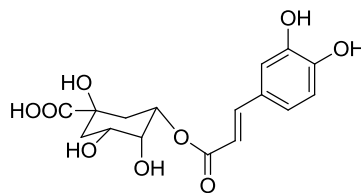
Os compostos fenólicos são metabólitos secundários presentes em todo o reino vegetal, portanto alguns deles podem ser considerados marcadores químicos de diferentes espécies de frutos. A denominação geral de ácidos fenólicos engloba os ácidos benzoicos, com sete átomos de carbono e os ácidos cinâmicos, com nove átomos de carbono. Os compostos fenólicos, além de serem descritos como contribuintes para o sabor e aroma característicos das bebidas de café são conhecidos em razão das propriedades fisiológicas e farmacológicas que conferem à saúde humana, como a atividade antioxidante (DA SILVA, 1999; DEL CASTILLO, AMES e GORDON, 2002).

Os ácidos fenólicos encontram-se na natureza sob a forma de combinações do tipo éster ou sob a forma de glicosídeos. O ácido cafeoilquínico (**Figura 2**), conhecido como ácido clorogênico, é um éster do ácido caféico e do ácido quínico e constitui a combinação mais frequente na natureza (DEL CASTILLO, AMES e GORDON, 2002).



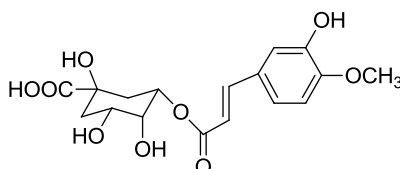
Ácido cafeoilchiquímico

$C_{16}H_{15}O_8$   $M_W$  336



Ácido cafeoilquínico

$C_{16}H_{18}O_9$   $M_W$  354



Ácido feruloilquínico

$C_{17}H_{19}O_9$   $M_W$  368

**Figura 2.** Compostos fenólicos encontrados em amostras de cafés.

Os compostos fenólicos são utilizados como marcadores de autenticidade por possuírem três características: ubiquidade - todos os frutos e respectivos derivados que já foram estudados contêm um grande número de compostos fenólicos, em quantidades facilmente mensuráveis; especificidade - a distribuição dos fenóis depende do controle genético, o que permite que estes sejam usados como marcadores taxonômicos para a classificação de cultivares; multiplicidade - uma determinada espécie contém um conjunto de compostos fenólicos, o que, geralmente, torna possível associar um perfil químico ao derivado desse fruto. Este "*fingerprint*" deve ser considerado tanto qualitativamente como quantitativamente, estabelecendo, por exemplo, relações entre diferentes constituintes fenólicos (DA SILVA, 1999).

#### 1.1.2.2. Alcaloides

A trigonelina e os produtos provenientes de sua degradação térmica têm recebido considerável atenção devido a sua importância do ponto de vista sensorial e nutricional (HALAL, 2008). No processo de degradação da trigonelina são formados diversos compostos voláteis, como as piridinas e pirróis que vão contribuir para o aroma do café.

Quimicamente, a cafeína pertence ao grupo das trimetilxantinas, as quais costumam ser designadas derivadas das xantinas. A cafeína é o alcaloide mais abundante nos grãos de café, e seu teor apresenta uma variação que depende, dentre

outros fatores, da espécie da planta utilizada, assim o café Arábica contém em média 1 wt% deste alcaloide e o café Conilon em torno de 2 wt% (TAVARES e FERREIRA, 2006).

#### 1.1.2.3. Minerais

O café possui mais de trinta tipos de minerais, dentre eles: potássio, magnésio, cálcio, sódio, ferro, manganês, rubídio, zinco, cobre, estanho, cromo, vanádio, bário, níquel, cobalto, chumbo, molibdênio, titânio e cádmio (HALAL, 2008). Atualmente, as técnicas analíticas empregadas para identificação e quantificação de minerais são: a espectrometria de absorção atômica (AAS) e a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) (MORGANO, PAULUCI, MANTOVANI *et al.*, 2002; POHL, STELMACH, WELNA *et al.*, 2013; CARVALHO, PICHELI, LUCCAS *et al.*, 2014).

#### 1.1.2.4. Carboidratos

Os carboidratos estão presentes no grão na forma de polissacarídeos e como açúcares de baixa massa molar, que incluem tri, di e monossacarídeos redutores e não redutores. O conteúdo e a natureza dos açúcares nos grãos do café beneficiado e pré-processado têm sua importância no desenvolvimento do aroma e pigmentação durante a torrefação (HALAL, 2008).

### 1.2. Adulterações

A descoberta de adulteração de produtos alimentícios aconteceu no século XVIII na Inglaterra, desencadeando a demanda por estudos para o desenvolvimento de ferramentas analíticas para a identificação e a quantificação dessas adulterações.

PIZARRO, ESTEBAN-DÍEZ e GONZÁLEZ-SÁIZ (2007) afirmam que a autenticação de alimentos tem se tornado um desafio cada vez mais importante nos últimos anos, devido à campanha para garantir a verdadeira origem dos produtos e para a determinação de adulteração com contaminantes ou preenchimento com ingredientes de baixo custo. De acordo com a Lei 9.677/98 de 2 de julho de 1998 do código penal brasileiro "... falsificação, corrupção, adulteração ou alteração de substância ou produtos alimentícios são configurados como crime contra a saúde pública".



O café é um produto comercial de alto valor no mercado nacional e internacional. O aumento no consumo desta bebida nos últimos anos, solicitou uma melhoria nos produtos de café de qualidade. No entanto, as características físicas do café podem favorecer adulterações com ingredientes fisicamente semelhantes após a torrefação e moagem. Práticas fraudulentas na indústria do café inclui a adulteração com matérias-primas de qualidade inferior como milho, cascas e paus, produzindo um produto de má qualidade que, no geral, é consumido por grande parte da população (TAVARES, PEREIRA, NUNES *et al.*, 2012).

O alto valor de mercado do café Arábica, quando comparado ao café Conilon, tem motivado a prática de adulteração de café Arábica com Conilon (sem afetar a qualidade sensorial da bebida), produzindo as blendas (DE MOURA, GERMER, ANJOS *et al.*, 2007). A utilização de métodos rápidos e precisos para a detecção e quantificação de adulterantes em amostras de café contribuem para minimizar e eliminar este tipo de prática fraudulenta.

Recentemente, a espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) tem sido amplamente utilizada para monitorar vários adulterantes (cascas de café, milho, dentre outros) em café torrado e moído (REIS, FRANCA e OLIVEIRA, 2013; TAVARES, PEREIRA, NUNES *et al.*, 2012), para discriminar entre cafés torrados defeituosos e não-defeituosos (CRAIG, FRANCA e OLIVEIRA, 2012; CRAIG, FRANCA, OLIVEIRA *et al.*, 2014), e para quantificar o teor da variedade Conilon em amostras de cafés torrados, como um meio para controlar e evitar a adulteração do café (PIZARRO, ESTEBAN-DIEZ e GONZÁLEZ-SÁIZ, 2007).

Outra técnica analítica de sucesso que tem sido empregado para o controle da qualidade do café é a espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS) (SÁ, FERREIRA, QUEIROZ *et al.*, 2014; KUHNERT, YASSIN, JAISWAL, *et al.*, 2015; GARRETT, SCHMIDT, PEREIRA *et al.*, 2013b; AQUINO, AUGUSTI e ALVES *et al.*, 2014; GARRETT, VAZ, HOVELL *et al.*, 2012); e, recentemente, espectrometria de massas com ionização ambiente, tais como ionização por spray em papel (GARRETT, REZENDE e IFA, 2013a) e ionização por dessorção *electrospray* (GARRETT, SCHWAB, CABRAL *et al.*, 2014). Entre estes trabalhos reportados anteriormente, AQUINO, AUGUSTI, ALVES *et al.* (2014), utilizaram a infusão direta ESI-MS para detectar adulterações no café torrado a partir das suas cascas. As impressões digitais ESI-MS (em ambos os modos negativos e positivos) revelaram a presença de marcadores de identificação, tais como hidratos de carbono (por

exemplo, sacarose), ácidos clorogênicos, cafeína e outros componentes relacionados com o sabor e aroma do café, que caracterizam cada tipo de amostra (café e casca). GARRETT, VAZ e HOVELL *et al.* (2012) combinaram dados de ESI-MS, em ambos os modos de ionização: positivos e negativos, com a técnica de calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS), e definiram uma maneira rápida de detectar e quantificar adulterações de café Arábica por café Conilon.

Com base nas duas principais técnicas analíticas empregadas para análise de café (ESI-MS e FTIR), métodos de calibração univariada e multivariada foram aplicados para identificar e quantificar o percentual de café Conilon em blends de café Arábica. As figuras de mérito (limite de detecção, LD, limite de quantificação, LQ, repetibilidade, precisão intermediária e linearidade) foram obtidas e comparadas.

### 1.3. Caracterização do café

As características morfológicas dos grãos verdes de diferentes espécies são muitas vezes suficientes para discriminar as mesmas. Contudo, a inspeção visual é inadequada no caso de grãos torrados, e um método para determinar a presença de compostos característicos de cada um é necessário. Para este fim, as propriedades visuais e sensoriais podem ser insuficientes e subjetivas, de modo, que as diferenças na composição química devem ser exploradas.

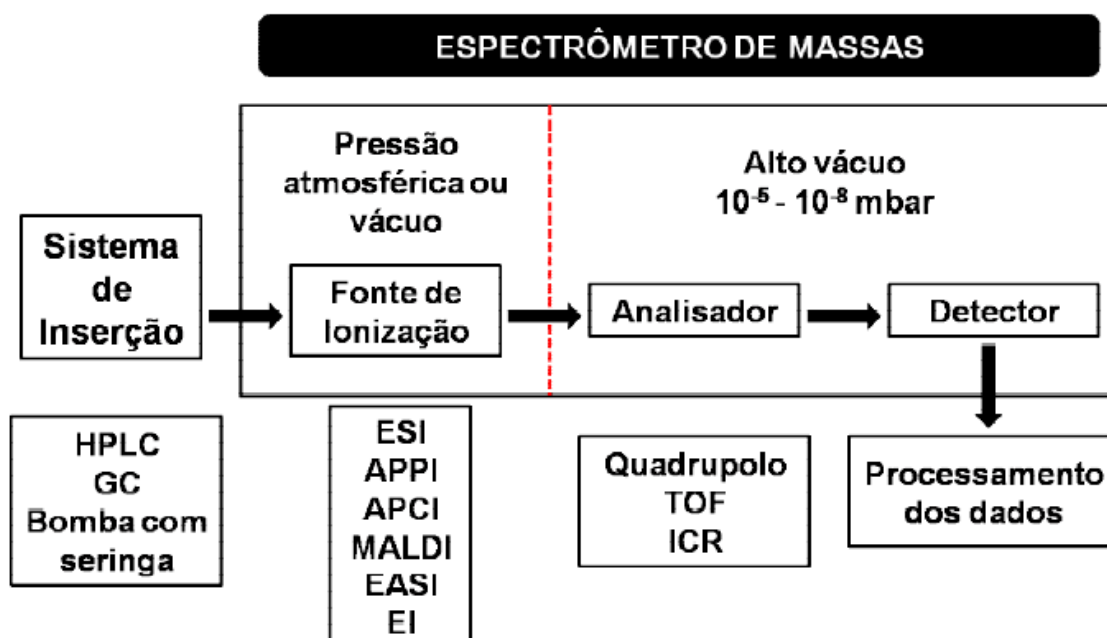
SCHIEVANO, FINOTELLO, ANGELIS *et al.* (2014) afirmam que, até a presente data, o método oficial de caracterização de espécies de cafés Arábica e Conilon, segue usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Método DIN 10779 alemão), onde quantifica-se o composto 16-O-metilcafestol (16-OMC) em grãos torrados e verdes. A metodologia é eficaz, porém consome solvente e tempo em excesso, devido as várias etapas envolvidas. Por estes e outros motivos que novas metodologias vem sendo investigadas com a finalidade de caracterização de vários tipos de cafés

#### 1.3.1. Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica que consiste na ionização das moléculas de interesse e separação dos íons com base em suas diferentes razões massa/carga  $m/z$  (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1991). É importante ressaltar que a MS não analisa átomos neutros ou moléculas neutras e sim, espécies ionizadas. Antes de discriminar os íons é necessário, primeiramente, gerá-los utilizando um

sistema de ionização ou fonte de íons. Os diferentes tipos de fonte de ionização e analisadores de massas são os que determinam a aplicabilidade da MS (HAM, 2008).

Os espectrômetros de massas constituem-se basicamente de: um sistema de introdução de amostra; uma fonte de ionização; um analisador de massas; e um detector, que realiza a “contagem” dos íons e transforma o sinal em corrente elétrica, que posteriormente, de acordo com a magnitude do mesmo, será convertido em função da razão  $m/z$ , proporcionando um espectro de massas correspondente. (ROMÃO, 2010). Um diagrama esquemático do funcionamento de um espectrômetro de massas é mostrado na **Figura 3**:

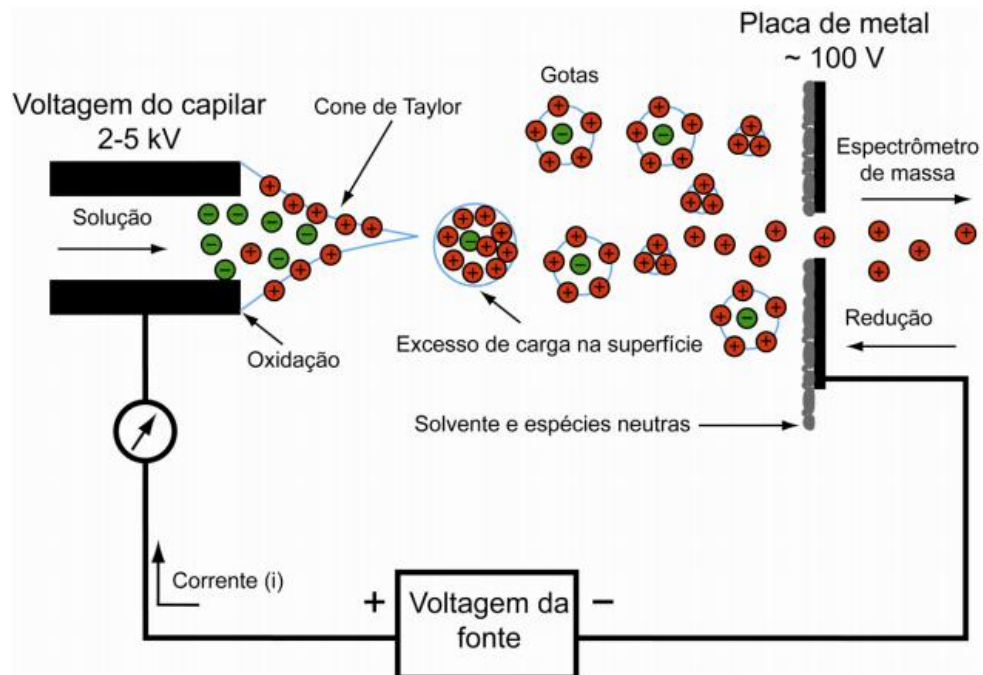


**Figura 3.** Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas (ROMÃO, 2010).

### 1.3.2. Ionização por *electrospray* (ESI)

A fonte *electrospray* (ESI) é um método de ionização a pressão atmosférica (atm), que causa a protonação ou desprotonação de moléculas para amostras em solução, dissolvidas em solvente prótico (ex.:  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) ou base (ex.:  $\text{NH}_4\text{OH}$ ), para facilitar a ionização. A solução é conduzida por um capilar metálico submetido a um alto potencial elétrico (3-5 kV), resultando na formação de uma dupla camada elétrica na interface capilar/solução. Consequentemente, formam-se gotas carregadas que, com a secagem do solvente, vão aumentando a densidade de cargas até o ponto em que ocorre um fenômeno chamado de explosão coulômbica. Assim, são formadas microgotas que, com a secagem do solvente, liberam os íons  $[\text{M} + \text{H}]^+$  ou  $[\text{M} - \text{H}]^-$  para

serem analisados pelo analisador de massas, **Figura 4** (ROMÃO, 2010). A técnica ESI tem sido amplamente usada nos últimos anos, tanto para identificação e quantificação como também para estudos de determinação estrutural aplicada ao estudo metabólico de frutas tropicais (FRAIGE, 2012), dentre outras.



**Figura 4.** Esquema da fonte de ionização por ESI (ROMÃO, 2010).

### 1.3.3. Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT-ICR MS)

O desenvolvimento da espectrometria de massas por ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR MS) no início da década de 70 possibilitou a obtenção de espectros de altíssima resolução ( $m/\Delta m_{50\%} > 400\,000$ ) e exatidão de massas ( $>2$  ppm). A determinação de valores inequívocos de razão massa/carga,  $m/z$ , no analisador de ICR, **Figura 5**, com tamanha resolução é baseada no movimento ciclotrônico de íons (MARSHALL, HENDRICKSON, JACKSON, 1998).

O altíssimo poder de resolução e exatidão em massas torna a técnica analítica versátil, garantindo a determinação da fórmula química dos íons produzidos. Além disso, apresenta capacidade de análises do tipo  $(MS)^n$ , importante para determinação de estrutura molecular, e fácil adaptação com os mais diversos tipos de fontes de ionização externas (KLITZKE, 2012).

O princípio fundamental da FT-ICR MS explora o comportamento de íons com baixa velocidade submetido a um campo magnético forte, onde elas assumem um movimento circular através de uma frequência, movimento ciclotrônico de íons, que é proporcional a sua razão  $m/z$ .

No interior da célula de ICR há um campo magnético uniforme  $B$  que gera nos íons, com carga  $q$ , uma força  $F$ , dada pela **Equação 1**, fazendo com que estes tenham uma trajetória circular com raio  $r$  e velocidade  $v$ , ou seja, um movimento ciclotrônico, conforme **Equação 1** (HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

$$F = qv \times B \quad (1)$$

Substituindo as **Equações 2 e 3**, onde  $a_c$  é a aceleração centrípeta e  $m$  é a massa do íon, na **Equação 1**, tem-se a **Equação 4**.

$$F = m \cdot a_c \quad (2)$$

$$v = \frac{v^2}{r} \quad (3)$$

$$r = \frac{mv}{qB} \quad (4)$$

A partir da **Equação 4**, percebe-se uma relação inversamente proporcional entre o raio da trajetória do íon e o campo magnético, indicando que em campos magnéticos altos o raio de trajetória do íon é pequeno, fazendo com que os íons fiquem presos dentro da célula de ICR (HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

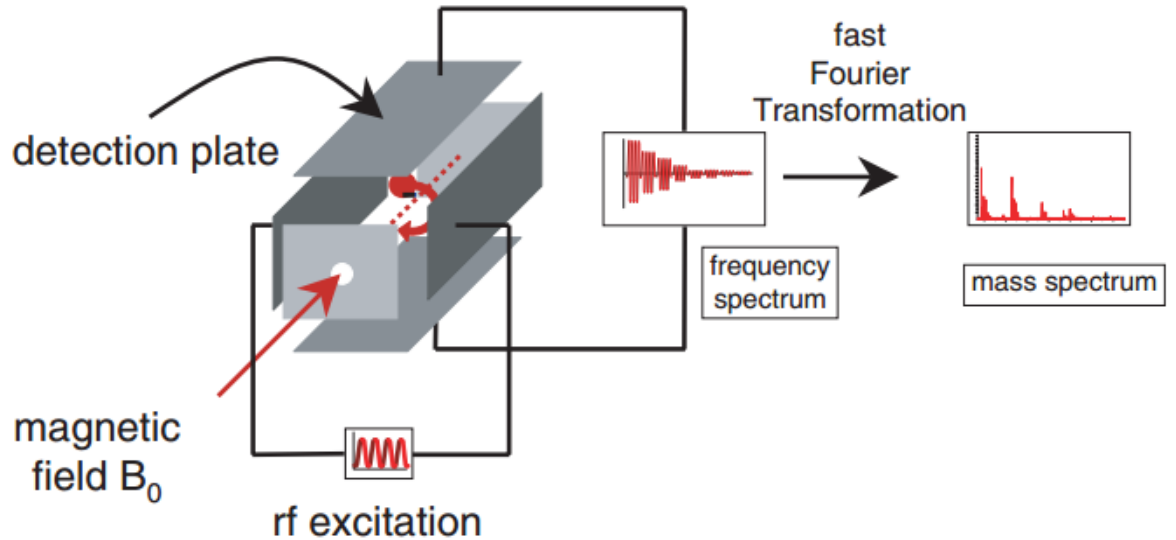
Substituindo a **Equação 5**, onde  $\omega$  é a frequência ciclotrônica, na **Equação 4**, temos **Equação 6**.

$$\omega = \frac{v}{r} \quad (5)$$

$$\omega_c = \frac{qB}{m} \quad (6)$$

A partir da **Equação 6**, percebe-se que íons de mesma razão massa carga terão a mesma frequência ciclotrônica para um determinado valor do campo magnético. Sendo assim, vários pacotes de íons de frequências ciclotrônicas

dependentes de suas razões massa carga entram em movimento circular dentro da célula de ICR (**Figura 5**).



**Figura 5.** Diagrama esquemático de uma cela de ICR (SCHRADER E KLEIN, 2004).

Para aproximar os íons das placas detectoras da célula de ICR são aplicados pulsos de rádio frequência aumentando o raio de trajetória dos íons, fazendo com que os íons induzam uma corrente nas placas detectoras. A frequência desta corrente é a mesma que a frequência ciclotrônica dos íons e a intensidade é proporcional ao número de íons. O sinal de ICR no domínio do tempo é convertido então, através da Transformada de Fourier, para o domínio da frequência que depois é convertido em um espectro de massas (HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

#### 1.3.4. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier com acessório de refletância atenuada total (ATR-FTIR)

A técnica de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier com acessório de refletância atenuada total (ATR-FTIR) analisa a interação da matéria com radiação eletromagnética na região do infravermelho, variando de 12 800-4000  $\text{cm}^{-1}$  (próximo) e 4000-640  $\text{cm}^{-1}$  (médio), para substâncias no estado sólido e líquido. Quase todos os compostos que fazem ligações covalentes absorvem em várias frequências na região do infravermelho (IR) (próximo, médio ou distante), entretanto, a mais empregada é a região do IR médio (4000 a 200  $\text{cm}^{-1}$ ) (SILVERSTEIN, BASSLER e MORRILL, 1991).

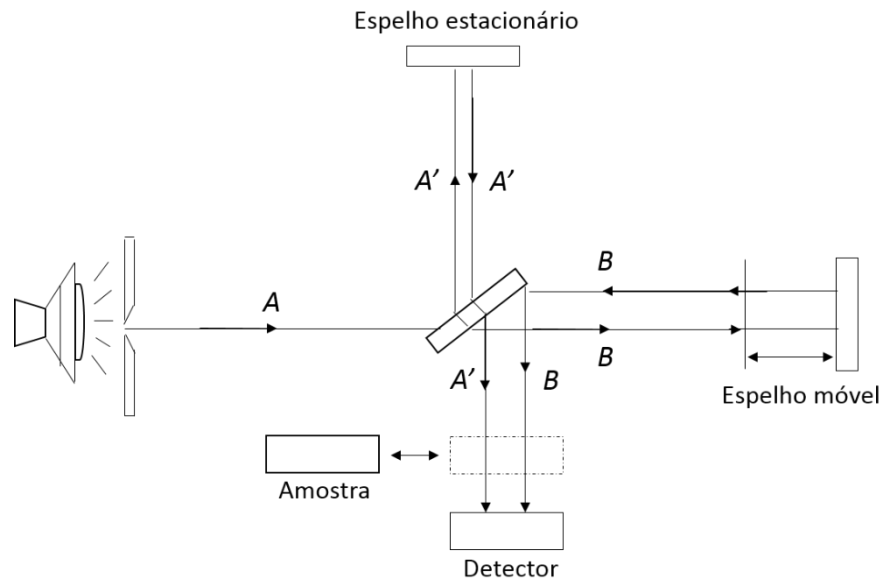
A técnica de ATR-FTIR baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas que correspondem a níveis de energia vibracionais bem definidos caracterizando ligações e, conseqüentemente, os grupos funcionais presentes nas moléculas. Em muitos casos, podem ser realizadas análises quantitativas por meio desta técnica, considerando-se que a resposta do sinal obtido pelo espectro de FTIR está associada à concentração do analito na amostra (SILVERSTEIN, BASSLER e MORRILL, 1991).

Em FTIR, o acessório de ATR é bastante empregado para análise de substâncias no estado sólido, onde um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal de seleneto de zinco, por exemplo) para um meio menos denso (amostra) ocorrendo o processo de reflexão. A fração do feixe de luz incidente é refletida e sua intensidade aumenta de acordo com o ângulo  $37^\circ$  de incidência. Este dispositivo é caracterizado pelas múltiplas reflexões da radiação do IR que ocorrem entre o cristal e a amostra.

Os instrumentos com transformada de Fourier são os espectrômetros de infravermelho que utilizam um dispositivo denominado interferômetro de Michelson. A transformada de Fourier trouxe avanços significativos resultantes do emprego de um interferômetro que manipula a energia enviada para a amostra e gera um padrão chamado interferograma, considerado um sinal complexo que ao ser manipulado pelo processo matemático de transformada de Fourier separando as frequências das absorções individuais contidas no interferograma resultando num espectro semelhante aquele obtido pelo espectrômetro dispersivo. A técnica de FTIR é um método mais rápido e de melhor qualidade, com diminuição da razão sinal-ruído (SKOOG, WEST, HOLLER, *et al.*, 2007).

A **Figura 6** mostra um esquema do interferômetro de Michelson. Um feixe da fonte de luz à esquerda é dividido em dois feixes pelo divisor de feixes. Os dois feixes percorrem caminhos separados e convergem sobre o detector. Os dois feixes, A' e B convergem-se na mesma região do espaço e formam um padrão de interferência. À medida que o espelho móvel à direita se desloca, o padrão de interferência se desloca sobre o detector e modula o sinal óptico. O interferograma de referência resultante é registrado e empregado como medida da potência do feixe incidente em todos os comprimentos de onda. Uma amostra absorvente é inserida então no feixe e o interferograma da amostra é registrado. Os dois interferogramas são empregados para computar o espectro de absorção da amostra.

As análises por ATR-FTIR apresentam como vantagens o baixo custo de manutenção, boa sensibilidade e resolução, rapidez na análise, é uma técnica não destrutiva e com o uso do cristal de ATR é necessário pouco ou nenhum preparo de amostra.



**Figura 6.** Diagrama esquemático de um interferômetro de Michelson (SKOOG, WEST, HOLLER, *et al.*, 2007).

#### 1.4. Análises quantitativas

A curva de calibração univariada de dados corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental e a concentração do analito, resultando na melhor linearidade da análise pela minimização dos erros quadrados. Segundo RIBANI, BOTOLI, COLLINS *et al.* (2004), o LD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O LQ representa a menor concentração da substância em análise que pode ser quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental.

Há três formas de se estimar os limites de detecção e de quantificação, e a escolha de uma delas deve levar em consideração a técnica analítica utilizada e o grau de confiabilidade estatística necessária: método visual, método da relação sinal-ruído, e método baseado em parâmetros da curva analítica. O método visual e da relação sinal-ruído são comumente utilizados pela sua rapidez, no entanto o primeiro apresenta a desvantagem de ser baseado em parâmetro subjetivo e o segundo da necessidade de uma matriz onde seja possível estimar o branco. O método baseado



em parâmetros da curva analítica apresenta-se como melhor opção quando não é possível obter um branco da amostra em estudo (RIBEIRO, FERREIRA, MORANO *et al.*, 2008).

A precisão de um método determina as circunstâncias específicas da análise e sua variabilidade, onde avalia-se a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra (PEREIRA, SCHEHOWITSCH, CRUZ *et al.*, 2007).

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE no 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003.

De acordo com a ANVISA "...a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados".

As condições de repetitividade podem ser caracterizadas utilizando o mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local, e repetições no menor espaço de tempo possível. A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados (INMETRO).

A precisão intermediária, de acordo com a ISO 5725-3, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como diferentes analistas, diferentes equipamentos e/ou diferentes tempos (INMETRO).

## **1.5. Quimiometria**

A quimiometria utiliza ferramentas matemáticas e estatísticas para extrair maior informação de dados químicos. Uma das principais aplicações desta área, é a calibração multivariada de dados que normalmente envolve o uso de um tipo de medida instrumental para prever o valor de um parâmetro de base ou propriedade (FILGUEIRAS, 2011).

De acordo com NUNES (2008), a calibração multivariada é realizada de forma geral, por intermédio das etapas:

- Preparação do conjunto de calibração: Obtenção de um conjunto de amostras das quais se conheça a propriedade de interesse e que seja representativo para realizar futuras previsões. Este conjunto deve ser representativo em todas as fontes de variação;
- Registro do sinal analítico: A informação pode ser obtida de várias fontes. No caso dos métodos espectrométricos, o registro é o espectro. A partir destes sinais são obtidas as informações químicas e/ou físicas desejadas;
- Pré-tratamento dos dados: Nesta etapa, são minimizadas as possíveis contribuições não desejadas dos sinais, que diminuem a capacidade de previsão dos modelos.
- Construção do modelo: seleção de parâmetros do modelo que melhor estabelece a relação entre o sinal instrumental e a propriedade desejada;
- Validação do modelo: Para assegurar a capacidade preditiva de um modelo faz-se necessário realizar um processo de validação do mesmo, que consiste no estudo quantitativo dos resultados da aplicação do modelo em novas amostras (que não fizeram parte da etapa de calibração). Esta validação pode ser um processo externo ou de validação cruzada (cross-validation); a primeira consiste na utilização de um conjunto de amostras independentes das utilizadas na calibração, mas que sejam representativas das mesmas e das futuras amostras a analisar, denominado conjunto de validação. A validação cruzada divide o conjunto de calibração em vários segmentos. Um dos seguimentos é utilizado para validação e o restante para construir o modelo de calibração. São construídos modelos de acordo com o número de segmentos utilizados, de maneira que cada segmento seja excluído do modelo de calibração e utilizado na validação. O modelo final será aquele que apresentar o menor resíduo de resposta.

#### 1.5.1. Regressão por mínimos quadrados parciais

O método de calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS), utiliza a técnica de análise de componentes principais para a redução da dimensionalidade do conjunto de dados ao mesmo tempo que estabelece correlação entre os espectros (matriz X) e as propriedades de interesse (matriz Y) (WOLD,

SJÖSTRÖM e ERIKSSON, 2001; HÖSKULDSSON, 1988; ANDERSSON, 2009). A propriedade de interesse muitas vezes é a concentração de um analito, porém não limitada a esta, podendo até mesmo ser propriedades físico-químicas, tais como densidade e viscosidade, as quais são relacionadas a composição da amostra (DE SOUZA, BREITKREITZ, FILGUEIRAS *et al.*, 2013).

Este trabalho foi realizado com o intuito de determinar possíveis adições de café Conilon ao café Arábica em diferentes níveis de adulterações, através das técnicas de ESI(-)FT-ICR MS e FTIR aliadas a calibração univariada e multivariada PLS.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar o desempenho das técnicas de ESI(-)FT-ICR MS e ATR-FTIR como ferramentas analíticas na caracterização e quantificação de forma rápida, simples e eficaz do perfil químico de blendas de café Arábica e Conilon.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Identificar a composição química a nível molecular do café capixaba Arábica e Conilon
- Realizar experimentos de fragmentação (MS/MS) nos principais marcadores químicos vegetais presentes em diferentes cultivares (Arábica *versus* Conilon);
- Classificar e quantificar o café capixaba Arábica e Conilon em blendas.

## **3. METODOLOGIA**

### **3.1. Amostras e reagentes**

Os grãos de cafés selecionados para análise são da espécie de café Arábica e café Conilon fornecidas em função do grau de maturação cereja, safra 2013/14, provenientes do estado do Espírito Santo e fornecidas pela Cooperativa Agrária dos Cafeicultores de Lúna – CACIL.

Os grãos foram torrados a nível de torra escura (180 °C/ 14min) e posteriormente moídos.

### **3.2. Extração dos componentes polares e majoritários do café Conilon e Arábica para ESI(-)FT-ICR MS**

Para a preparação do extrato do café, as amostras foram maceradas em gral de ágata para homogeneização e posteriormente dissolvidas em água fervente em concentração de  $0,1 \text{ g mL}^{-1}$  e submetidas ao procedimento de filtração com papel de filtro comum, sendo 1 mL centrifugado durante 5 min.

### **3.3. Preparação das blendas**

A formulação das blendas de cafés para a análise de ESI(-)FT-ICR MS, foram realizadas em duplicatas usando 10 concentrações diferentes (0,5; 1; 2; 5; 10; 15; 20; 25; 50 e 75 wt %) de café Conilon no café Arábica e 2 puras (0 e 100 wt% de café Arábica e Conilon, respectivamente). Para as análises de FTIR, foram preparadas 21 concentrações de blendas (0,5; 1; 2; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75; 80; 85; 90 e 95 wt % de café Conilon) e duas puras (0 e 100 wt%) de café Conilon e café Arábica, respectivamente, em triplicata de 200mg cada, posteriormente maceradas em gral de ágata para homogeneização.

## **4. CARACTERIZAÇÃO**

### **4.1. Análise físico-química**

A análise físico-química de pH foi realizada por um potenciômetro modelo PH 500, marca IonLab. Foram realizadas análises em triplicata das amostras de cafés puros a  $0,02 \text{ g mL}^{-1}$ . O procedimento foi executado de acordo com a metodologia descrita pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (ZENEON, PASCUET e TIGLEA, 2008)

### **4.2. ESI(-)FT-ICR MS**

As análises de FT-ICR MS (modelo Solarix 9,4T, Bruker Daltonics, Bremen-Alemanha), foram realizadas em duplicata utilizando 100  $\mu\text{L}$  do extrato aquoso de amostras do café, diluído até completar um volume total de 900  $\mu\text{L}$  em uma solução de metanol dopado com 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido esteárico a  $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ , totalizando 1mL (ou 1000  $\mu\text{L}$ ) da solução para aquisição no modo ESI(-).

A solução foi injetada na fonte de ESI a um fluxo de  $5-10 \mu\text{L min}^{-1}$ . A faixa dinâmica de aquisição de íons na cela de ICR foi de  $m/z$  150-1200. Os demais parâmetros da fonte de ESI foram: **i)** voltagem no capilar: 3000-3800 V; **ii)** *End Plate*

Offset = -500 V; **iii**) temperatura e fluxo do gás de secagem: 200 °C e 4 L min<sup>-1</sup>; **iv**) pressão do gás nebulizador: 1 bar; **v**) *skimmer* = 10 V e **vi**) *collision voltage* = (±) 2 V. Na transmissão de íons, o tempo de acumulação de íons no hexapolo (*ion accumulation time*) e o TOF foram de 0.05 s e 0.70 ms, respectivamente. Cada espectro foi adquirido a partir da acumulação de 32 scans com um domínio de tempo de 4M (*mega-point*) (DIAS, DIXINI, ALMEIDA *et al*, 2015a; DIAS, GONÇALVES, FREITA *et al*, 2015b; NASCIMENTO, COSTA, SOUZA *et al*, 2015). Antes da aquisição, o equipamento foi externamente calibrado a partir de uma solução de NaTFA. O poder de resolução,  $m/\Delta m_{50\%}$  = 420-480,000 (em que  $m/\Delta m_{50\%}$  é a largura do pico na metade de sua altura de  $m/z \approx 400$ ) e exatidão < 1 ppm, permitiram a determinação da fórmula molecular de íons moleculares com carga unitária.

O grau de insaturação de cada molécula pode ser deduzida diretamente do seu número de insaturações e anéis (DBE) de acordo a **Equação 7**:

$$\text{DBE} = c - \frac{h}{2} + \frac{n}{2} + 1 \quad (7)$$

onde c, h e n são equivalentes ao número de átomos de carbono, hidrogénio, e nitrogênio, respectivamente, na fórmula molecular.

#### 4.2.1. ESI(-)-FT-ICR MS/MS

Para os experimentos de MS/MS, a janela do quadrupolo foi fechada em um intervalo de 2 Da, ou seja,  $m/z_{\text{selecionado}} \pm 2$ , proporcionando o isolamento do íon de interesse. Posteriormente, o íon foi conduzido para o interior de uma cela de colisão (hexapolo) com energia de colisão variando entre 3-20 V, sendo Argônio o gás de colisão utilizado. A fim de aumentar a quantidade de íons na cela ICR (analisador do FTMS), o tempo de acumulação de íons no hexapolo (*ion accumulation time*) foi aumentado de 0.05 para 1s.

### 4.3. FTIR

As análises de FTIR foram realizadas em triplicata por um instrumento modelo *Spectrum 400 MID/NIR FTIR* da Perkin Helmer com acessório ATR (cristal de Seleneto de Zinco) para aquisição dos dados. Os espectros de ATR-FTIR foram adquiridos no modo *single*, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, na região de 4000 a 600 cm<sup>-1</sup> e registrados com uma média de 16 varreduras.

#### 4.4. Análises quantitativas

##### 4.4.1. Calibração univariada

A curva de calibração univariada foi construída através da relação entre a razão das somas das intensidades relativas dos sinais  $m/z$  365 e 367 pelo  $m/z$  353 (caracterizado como  $y$  real, ou seja, o sinal analítico), obtidos nas análises de ESI(-)-FT-ICR MS, em função da concentração de Conilon (wt%). Esta relação foi determinada a partir da maior abundância e da variabilidade das intensidades relativas destes íons entre os cafés Arábica e Conilon.

Os valores de LD e LQ foram obtidos através dos cálculos descritos pelo método baseado em parâmetros da curva de analítica (RIBEIRO, FERREIRA, MORANO, 2008). Inicialmente, o desvio padrão foi obtido de acordo com a **Equação 8**:

$$s_y = \sqrt{\sum \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}} \quad (8)$$

na qual,  $s_y$  é o desvio padrão calculado para o ajuste linear,  $y_i$  e  $\hat{y}_i$  os valores do eixo  $y$  real e estimado, respectivamente, e  $N$  o número total de amostras.

Para o cálculo de LD (**Equação 9**), usa-se o valor do intercepto do limite superior do intervalo de confiança, conhecido por  $y_c$  crítico ( $y_c$ ), conforme **Equação 10**, onde sua projeção no limite inferior é uma estimativa da concentração mínima que pode ser medida com um grau de confiança comprovado estatisticamente, ou seja, o limite de detecção do método:

$$LD = 2 x \frac{s_y \cdot t}{a_1} \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (9)$$

$$y_c = a_0 + s_y \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (10)$$

onde  $a_0$  e  $a_1$ , é o coeficiente linear e angular da reta, respectivamente. Os valores do eixo  $x$  na reta são representados por  $x_i$  (wt% de café Conilon) e,  $\bar{x}$  é a média dos valores de  $x_i$ .

O LQ também foi calculado a partir do intervalo de confiança da curva analítica, em que  $x_c$  é o valor da concentração ( $x$ ) no ponto em que o valor de  $a_0$  intercepta a reta de regressão, e  $y_h$  é o valor de  $y$  para a projeção de  $x_c$  no limite de controle

superior (RIBEIRO, FERREIRA, MORANO, 2008). As estimativas de LQ,  $x_c$  e  $y_h$  podem ser realizadas respectivamente, pela utilização das **Equações 11, 12 e 13**:

$$LQ = \left( \frac{y_h - a_0}{a_1} \right) + \left( \frac{s_y \cdot t}{a_1} \right) \cdot \sqrt{\left( \frac{1}{N} \right) + 1 + \frac{(y_h - \bar{y}_i)^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (11)$$

$$x_c = \left( \frac{s_y \cdot t}{a_1} \right) \cdot \sqrt{\left( \frac{1}{N} \right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (12)$$

$$y_h = a_0 + 2 + s_y \cdot t \cdot \sqrt{\left( \frac{1}{N} \right) + 1 + \frac{(x_c - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (13)$$

A precisão de um método pode ser expressa pela repetibilidade e pela precisão intermediária, sendo usualmente caracterizados pelo desvio padrão e desvio padrão relativo (ou coeficiente de variação) (RIBANI *et al*, 2004; PEREIRA *et al*, 2007; ANVISA). O desvio padrão relativo (DPR), normalmente em % é calculado por (**Equação 14**):

$$DPR = \frac{DP}{\bar{X}} \times 100 \quad (14)$$

Onde DP = desvio padrão e  $\bar{X}$  = média total das determinações.

Para tal, foram realizadas cinco análises em triplicata no mesmo dia (repetibilidade) e nove análises durante cinco dias no mesmo laboratório e nas mesmas condições (precisão intermediária) para um nível de concentração (20 wt%).

#### 4.4.2. Análises quimiométricas

##### *Calibração multivariada*

Nesta análise foram utilizadas 21 amostras de blendas binárias de café Arábica com café Conilon e 2 amostras puras de cada café. As amostras foram separadas aleatoriamente em dois conjuntos: calibração e previsão, contendo 17 e 6 amostras, respectivamente. Dessa forma foi realizada a construção do modelo de PLS (SNEE, 1977).

### *Validação do modelo*

O número ótimo de variáveis latentes do modelo PLS foi determinado pelo método de validação cruzada *Venetian Bend K-fold*, onde o conjunto de amostras de calibração é dividido em k subconjuntos disjuntos, um destes subconjuntos é retirado para validação enquanto os k-1 subconjuntos restantes são utilizados para construção do modelo, em seguida as amostras do subconjunto retirado para validação têm seus valores previstos. Todos os cálculos foram realizados no software Matlab 7.

### *Seleção de variáveis*

Cada espectro de infravermelho contém originalmente 3351 variáveis (números de onda espectrais). O número ideal de variáveis latentes utilizados para a construção do modelo PLS foi determinada pelo procedimento de k vezes de validação cruzada, com k igual 5. Neste método, as amostras no conjunto de calibração são divididos em k subconjuntos disjuntos. Um destes subconjuntos é retirado para validação enquanto os k-1 subconjuntos restantes são usados para a construção do modelo. Em seguida, o subconjunto previsto é retirado. Este procedimento é feito até que todas as amostras sejam previstas. O número ideal de variáveis latentes é dado pelo raiz quadrada dos somatórios dos quadrados dos resíduos do conjunto de validação cruzada (RMSECV), calculado de acordo com a **Equação 15**:

$$RMSECV = \sqrt{\frac{1}{n_{cal}} \sum_{i=1}^{n_{cal}} (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (15)$$

onde  $n_{cal}$  é o número de amostras de calibração e  $y_i$  e  $\hat{y}_i$  são referência e previsão do teor café Conilon, respectivamente.

Após a construção do modelo PLS, foram determinados os valores de RMSECV e da raiz quadrada dos somatórios dos quadrados dos resíduos do conjunto de previsão (RMSEP), coeficientes de determinação ( $R^2_{cv}$  e  $R^2_p$ ), LD e LQ nos conjuntos de calibração e de previsão. Todos os cálculos foram feitos através do software Matlab 8.1.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. ESI(-)FT-ICR MS

Os cafés Arábica e Conilon em maturação cereja em nível de torra escura foram caracterizados por ESI(-)FT-ICR MS, **Figura 7**. A abordagem em ESI(-) é mais adequada do que em ESI(+) para verificar o perfil químico, pois não há supressão de sinais, relacionadas a altas concentrações de sais minerais ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , dentre outros) presentes em amostras de produtos naturais. Além disso, esse modo de ionização apresenta melhor eficiência de ionização para os componentes ácidos e fenólicos, tornando a interpretação do espectro mais simples (COSTA, SOUZA, SOPRANI *et al.*, 2015).

O espectro de ESI(-)FT-ICR MS para o café Conilon apresenta uma maior quantidade de sinais do que o café Arábica (43 e 31 sinais, respectivamente). Todas as espécies químicas detectadas apresentaram intensidade relativa superior a 1%, e suas informações como valor  $m/z$  medido, erro de massa (ppm), fórmula mínima e estrutura proposta são descritas na **Tabela 1**. Entre as espécies mais abundantes detectadas foram propostas possíveis estruturas, e destacam-se o ácido quínico (AQ),  $m/z$  191, ácido cafeoilchiquímico (ACC),  $m/z$  335, ácido cafeoilquínico (ACQ),  $m/z$  353, ácido feruloilquínico (AFQ),  $m/z$  367, íon do ácido esteárico e ácido quínico  $m/z$  457 e o ácido esteárico,  $m/z$  283. O sinal de  $m/z$  567 refere-se ao íon  $[2M - H]^-$ , onde M corresponde ao  $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$  que é a molécula neutra do ácido esteárico. O íon de  $m/z$  365 corresponde ao dímero de AQ sem uma molécula de água ( $[\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_{12} - \text{H}_2\text{O}]$ ). Todas essas estruturas apresentam valores de DBE que variam de 1 a 9, **Tabela 1**.

Os íons com  $m/z$  335, 337, 353, 367 e 395 são compostos fenólicos presentes em amostras de cafés, e são degradados durante o processo de torrefação, chegando à perda superior a 50 wt% em cafés Arábica e Conilon (MOREIRA, NUNES, DOMINGUES *et al.* 2012). Os íons de  $m/z$  335, 353 367 são classificados como ácidos clorogênicos (ACG). Os ACG são precursores importantes dos ácidos fenólicos livres e, por conseguinte, dos compostos fenólicos voláteis. Estes são essenciais na formação do aroma do café processado (MOREIRA, TRUGO e DE MARIA, 2000).

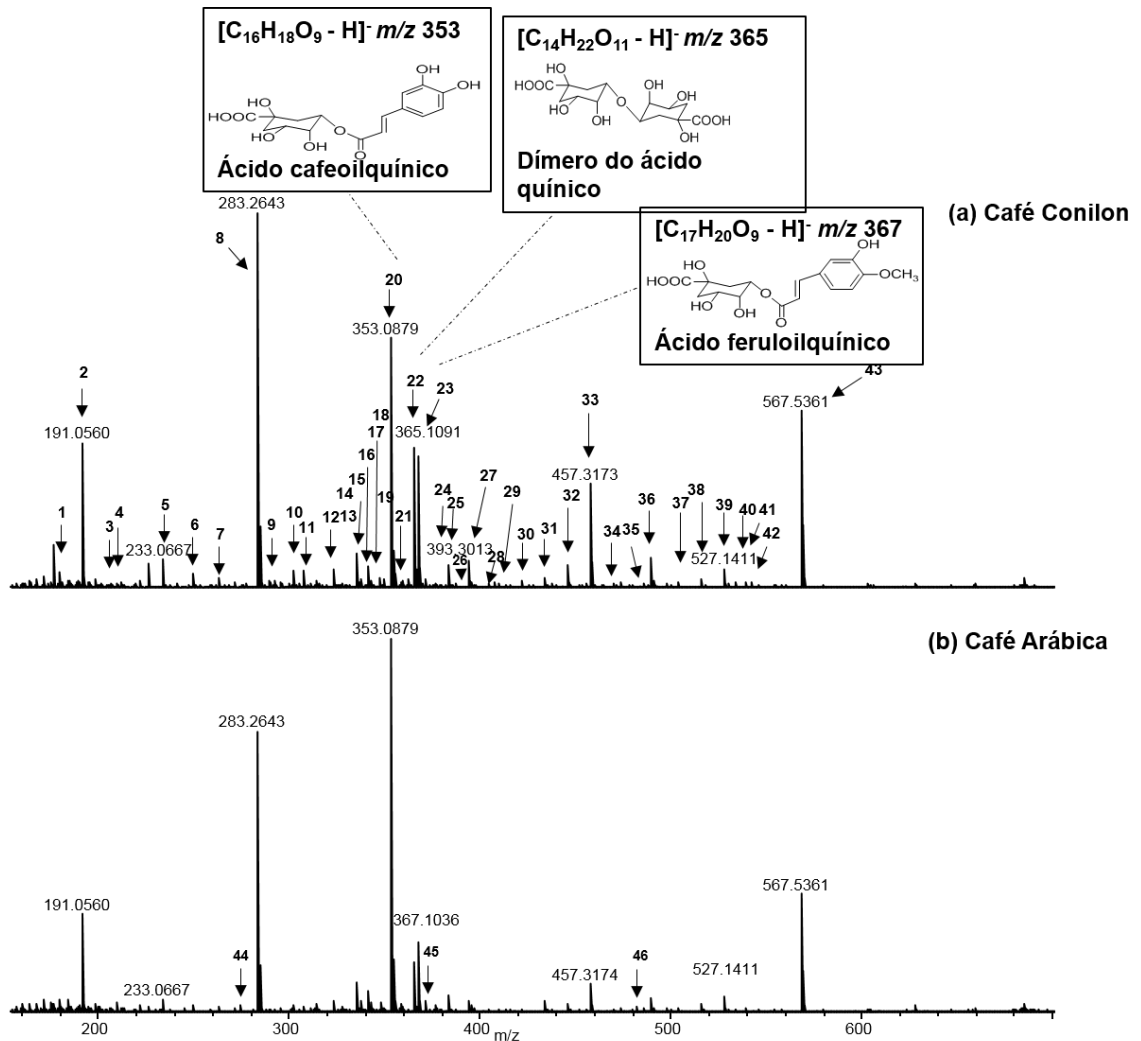
A literatura relata a existência de três isômeros para cada molécula ACG em 3, 4 e 5 posições da região do ácido quínico das espécies ACQ, AFQ e ACC. A identificação inequívoca dos compostos ACG e de seus isômeros pode ser realizada utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) e

experimentos de dissociação induzida por colisão (CID) ou análise de ressonância magnética nuclear (RMN) (CLIFFORD, JOHNSTON, KNIGHT *et al.* 2003; DESHPANDE, EL-ABASSY, JAISWAL *et al.* 2014), no entanto o objetivo foi verificar a capacidade do FT-ICR MS como uma técnica preditiva para possíveis adulterações entre cafés torrados Arábica e Conilon utilizando a calibração univariada.

O íon  $m/z$  353 é majoritário no café Arábica, **Figura 7b** enquanto os íons  $m/z$  191, 365, 367, 457 e 567 possuem maior abundância no café Conilon (**Figura 7a**). O íon de  $m/z$  395, espécie minoritária em ambos os cafés, corresponde a acetil-cafeoilquínico ácido, sendo um produto de transesterificação de ACQ com ácido acético ( $C_2H_3O$ ) (JAISWAL, MATEI, GOLON *et al.*, 2012). TRUGO e MACRAE (1984) relataram níveis mais elevados de ACQ em café Arábica com a torra escura em relação ao café Conilon com torrefação leve. Este resultado corrobora com a **Figura 7**. Em geral, o nível mais elevado de torrefação, como a torra escura, leva à maior degradação dos ACG (a um nível de 50% wt) em comparação a torra clara e média. (MOREIRA, NUNES, DOMINGUES *et al.*, 2012; DEL CASTILLO, AMES E GORDON, 2002). Por outro lado, observa-se maior abundância do AQ ( $m/z$  191) no café Conilon, **Figura 7**, devido a degradação de ACGs durante a torrefação, e como consequência, a produção de AQ e outros compostos fenólicos de baixo peso molecular, conforme **Figura 8**. (MONTEIRO E TRUGO, 2005). Deste modo, o conteúdo total de ACGs depende da espécie e variedade do café e, principalmente conforme o nível de aquecimento.

GARRETT, VAZ, HOVELL *et al.* (2012) observou que os íons  $m/z$  191, 353 e 367 foram as espécies mais abundantes presentes no extrato aquoso de cafés Arábica e Conilon em ESI(-)FT-ICR MS, corroborando com a **Figura 7**.

Os valores altos de DBEs (8 a 9) observados para os íons  $m/z$  335, 353 e 367 correspondem a natureza fenólica (DBE = 4) dessas espécies além da presença de outros grupos orgânicos como ácido carboxílico (DBE = 1), éster (DBE = 1), anel glicídico (DBE = 1), ciclos alcenos (DBE = 2) e/ou alqueno (DBE = 1). Já o composto AQ,  $m/z$  191, apresenta menor valor de DBE (DBE = 2), contendo apenas um grupo carboxílico e um anel glicídico. A identidade das espécies químicas propostas na **Tabela 1** estão de acordo com as relatadas na literatura (GARRETT, VAZ, HOVELL *et al.*, 2012; AMORIM, HOVELL, PINTO *et al.*, 2009; AQUINO, AUGUSTI e ALVES *et al.*, 2014).



**Figura 7.** Espectros de ESI(-)FT-ICR MS do café Conilon (**7a**) e Arábica (**7b**). As espécies químicas abundantes ( $m/z$  353, 365 e 367) possuem suas estruturas químicas ilustradas na **Figura 7a**.

Outros compostos também foram identificados apenas em café Conilon em baixa abundância, tal como íons de  $m/z$  397 e 342 que correspondem ao ácido sinapoilquinico e cafeoiltilrosina, respectivamente (**Tabela 1**) (KUHNER, JAISWAL, ERAVUCHIRA *et al.*, 2011; GARRETT, VAZ, HOVELL *et al.*, 2012; MORISHITA, TAKAI, YAMADA *et al.*, 1987). O íon de  $m/z$  481 que corresponde ao diterpeno glicosilado atractilosídeo II foi identificado somente no café Arábica (GARRETT, VAZ, HOVELL *et al.*, 2012). Estes compostos podem ser utilizados como marcadores de presença de café Conilon e de café Arábica em blends.

**Tabela 1.** Parâmetros como valores de  $m/z$  medido, erro de massa (ppm), DBE, fórmula mínima e estrutura proposta para os sinais detectados no café Conilon e Arábica.

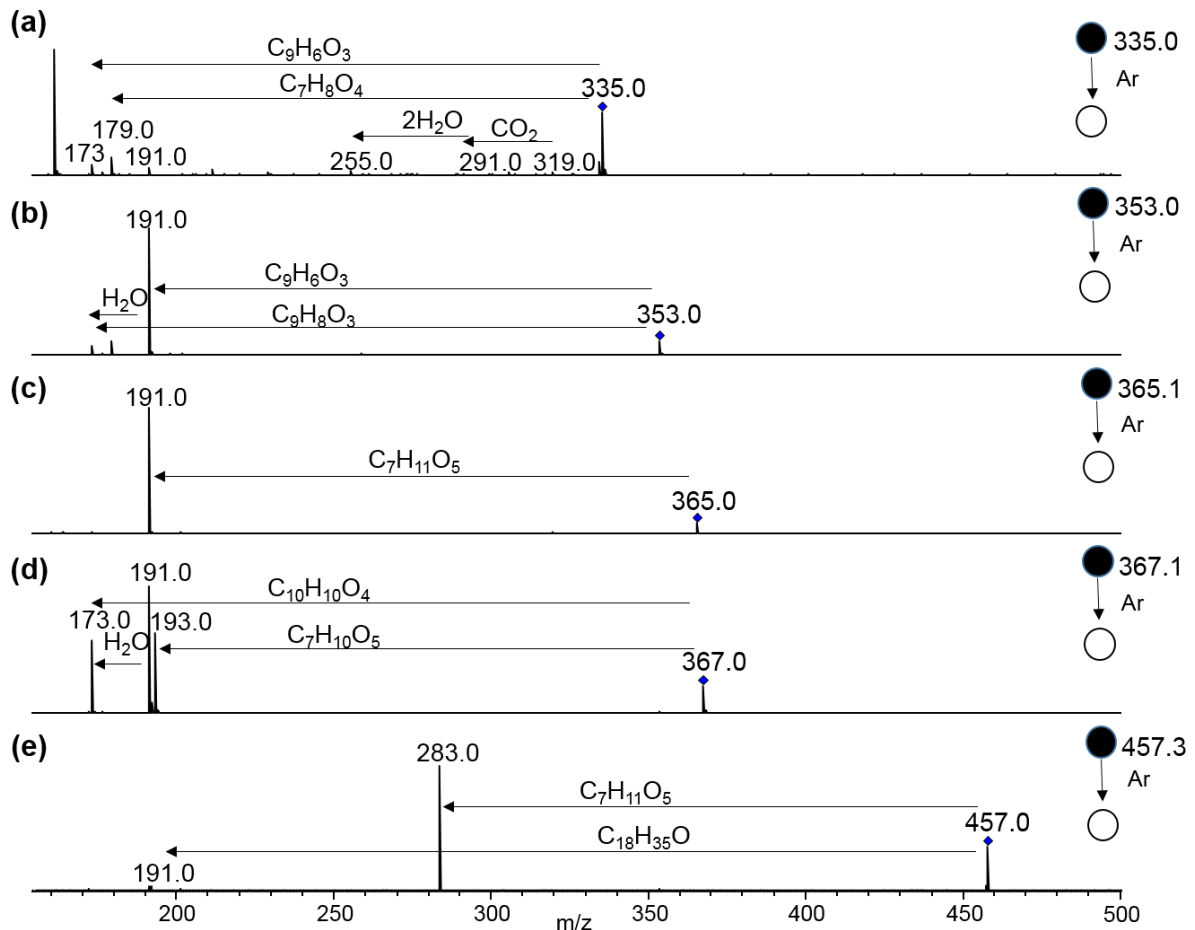
Número	$m/z$ experimental	Erro	DBE	Formula mínima [M - H] <sup>-</sup>	Estrutura proposta	Café Conilon	Café Arábica
1	179,05586	0,56	1	[C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> - H] <sup>-</sup>	Glicose	X	X
2	191,05586	0,43	2	[C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> - H] <sup>-</sup>	Ácido quínico	X	X
3	219,05086	0,65	3	[C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub> - H] <sup>-</sup>		X	
4	221,06672	-0,22	2	[C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub> - H] <sup>-</sup>		X	X
5	233,06673	-0,22	3	[C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub> - H] <sup>-</sup>		X	X
6	249,06164	-0,20	3	[C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub> - H] <sup>-</sup>		X	X
7	263,07731	-0,25	3	[C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> - H] <sup>-</sup>		X	X
8	283,26431	-0,19	1	[C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> O <sub>2</sub> - H] <sup>-</sup>	Ácido esteárico	X	X
9	289,09301	-0,42	4	[C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub> - H] <sup>-</sup>		X	
10	302,08829	-0,48	5	[C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>8</sub> - H] <sup>-</sup>		X	
11	307,10347	-0,49	3	[C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub> - H] <sup>-</sup>		X	X
12	323,09838	-0,33	3	[C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> - H] <sup>-</sup>		X	X
13	326,10361	-0,64	11	[C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub> - H] <sup>-</sup>	p-cumaroiltirosina (ou cafeoilfenilalanina)	X	
14	335,07736	0,06	9	[C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> - H] <sup>-</sup>	Ácido cafeoilchiquímico	X	X
15	337,09308	-0,57	8	[C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub> - H] <sup>-</sup>	Ácido p-cumaroilquínico	X	X
16	341,10907	-0,11	2	[C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> - H] <sup>-</sup>	Sacarose	X	X
17	342,09853	-0,65	11	[C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>6</sub> - H] <sup>-</sup>	Cafeoiltirosina	X	
18	347,09845	-0,62	5	[C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> - H] <sup>-</sup>		X	
19	349,09309	-0,57	9	[C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub> - H] <sup>-</sup>	Feruloil-quinide	X	X
20	353,08776	0,06	8	[C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub> - H] <sup>-</sup>	Ácido cafeoilquínico	X	X
21	355,10369	-0,65	7	[C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub> - H] <sup>-</sup>	Ácido ferúlico-hexose	X	X
22	365,10916	-0,62	4	[C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> - H] <sup>-</sup>	Dímero ácido quínico	X	X
23	367,10357	-0,38	8	[C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub> - H] <sup>-</sup>	Ácido feruloilquínico	X	X
24	383,11986	-0,62	3	[C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub> - H] <sup>-</sup>		X	X
25	393,30128	-0,63	4	[C <sub>24</sub> H <sub>41</sub> O <sub>4</sub> - H] <sup>-</sup>		X	X
26	395,09869	-0,20	9	[C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> - H] <sup>-</sup>	Acetil-ACQ	X	X

27	397,11435	-0,88	8	[C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> - H] <sup>-</sup>	Ácido sinapoilquinico	X	
28	407,11967	-0,43	5	[C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub> - H] <sup>-</sup>		X	
29	409,11431	-0,28	9	[C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> - H] <sup>-</sup>		X	
30	433,11432	-0,68	11	[C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> - H] <sup>-</sup>		X	X
31	421,33266	-0,78	14	[C <sub>26</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub> - H] <sup>-</sup>		X	
32	445,31743	-0,79	2	[C <sub>24</sub> H <sub>46</sub> O <sub>7</sub> - H] <sup>-</sup>		X	
33	457,31740	-0,71	3	[C <sub>25</sub> H <sub>46</sub> O <sub>7</sub> - H] <sup>-</sup>	Íon do ácido esteárico com ácido quínico	X	X
34	463,12484	-0,35	11	[C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub> - H] <sup>-</sup>		X	
35	485,13022	-0,70	9	[C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub> - H] <sup>-</sup>		X	X
36	489,14037	-0,69	12	[C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub> - H] <sup>-</sup>		X	X
37	503,15615	-0,53	12	[C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>11</sub> - H] <sup>-</sup>		X	
38	515,11963	0,19	14	[C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub> - H] <sup>-</sup>	Ácido dicafeoilquínico	X	X
39	527,14077	-0,27	10	[C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub> - H] <sup>-</sup>	Ácido cafeoilquínico e ácido quínico	X	X
40	529,13571	-1,06	14	[C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub> - H] <sup>-</sup>	Ácido feruloil- cafeoilquínico	X	X
41	533,13052	-0,85	13	[C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub> - H] <sup>-</sup>		X	
42	541,15650	-0,40	10	[C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub> - H] <sup>-</sup>		X	
43	567,53617	-0,67	1	[C <sub>36</sub> H <sub>72</sub> O <sub>4</sub> - H] <sup>-</sup>	[2M - H] <sup>-</sup> onde M = molécula neutral do ácido esteárico	X	X
44	271,08242	-0,34	5	[C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub> - H] <sup>-</sup>			X
45	371,11978	-0,52	2	[C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub> - H] <sup>-</sup>			X
46	481,24445	-0,82	7	[C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> O <sub>9</sub> - H] <sup>-</sup>	Atractilosídeo II		X

Os valores de pH das amostras de cafés Arábica e Conilon foram de  $5,7 \pm 0,2$  e  $6,2 \pm 0,4$ , respectivamente. Isso pode estar correlacionado a uma maior quantidade de sacarose no café Arábica que provoca, durante o processo de torrefação, a formação de compostos ácidos com menor massa molar (tais como: ácido fórmico, acético, lácticos, glicólicos) (CONTI, 2013), não detectados pela técnica de ESI(-)FT-ICR MS.

## 5.2. ESI(-)MS/MS

Para comprovar a estrutura das espécies mais abundantes em ambos os cafés, foram realizados experimentos de *collision-induced dissociation* (CID) nos íons  $m/z$  335 (ACC), 353 (ACQ), 365 (dímero do ácido quínico), 367 (AFQ) e 457 (íon do ácido esteárico e ácido quínico), e os espectros de ESI(-)MS/MS são mostrados na **Figura 8a-e**.



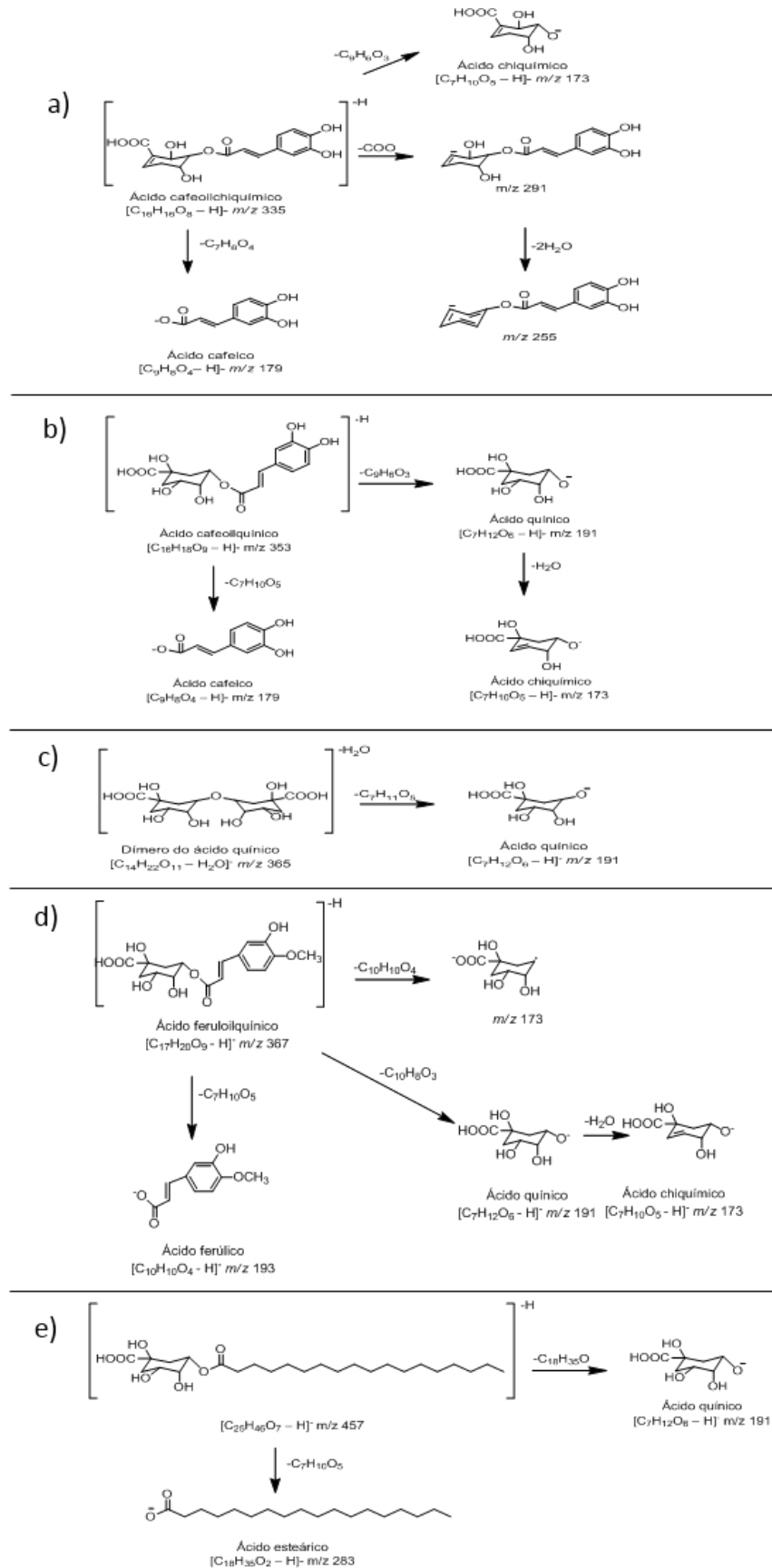
**Figura 8.** Espectros de MS/MS dos íons  $m/z$  (a) 335 ácido cafeoilchiquímico, (b) 353 ácido cafeoilquínico (c) 365 dímero do ácido quínico, (d) 367 ácido feruloilquínico e (e) 457 íon do ácido esteárico e ácido quínico.

Inicialmente, o experimento de CID para o íon  $m/z$  335 produz fragmentos com  $m/z$  291 e 255, que correspondem as perdas neutras de  $\text{CO}_2$  e, posteriormente, de duas moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ , **Figura 8a**. Alguns autores atribuem o íon  $m/z$  335, a lactona do ACQ (FARAH, DE PAULIS, MOREIRA *et al.*, 2006; FARAH, DE PAULIS, TRUGO *et al.*, 2005). No entanto, o experimento de CID e seu padrão de fragmentação confirmaram a presença do ACC, **Figura 8a e 9a**. Para a lactona ACQ a perda neutra de 44D, não foi observada (JAISWAL, SOVDAT, VIVAN *et al.* 2010a)

O fragmento que corresponde ao ácido caféico (AC), apresenta-se comum aos espectros de ESI(-)MS/MS para os compostos ACC e ACQ (**Figura 8a-b**) enquanto que o fragmento de  $m/z$  191 correspondente ao AQ é comum a todos os cinco compostos, **Figura 8a-e**. Para o composto AFQ, a intensidade relativa do íon de  $m/z$  191 pode ser usado para distinguir o 5-AFQ a partir dos seus isômeros utilizando análises de LC-MS / MS (CLIFFORD, JOHNSTON, KNIGHT *et al.*, 2003). Além disso, o sinal  $m/z$  193, que representa o ácido ferúlico, é observado apenas no espectro de ESI(-)MS/MS do AFQ,  $m/z$  367, **Figura 8d**. Finalmente, o fragmento a  $m/z$  173, ácido chiquímico, é produzido por meio de eliminação de H<sub>2</sub>O a partir de AQ (JAISWAL, PATRAS, ERAVUCHIRA *et al.* 2010b), **Figura 8b-d**.

Foram demonstradas também as estruturas químicas do dímero ( $m/z$  365) do AQ e do íon  $m/z$  457 do ácido esteárico e AQ, a partir de produção de fragmentos de  $m/z$  191 e 283, respectivamente, as **Figuras 8c e 8e**.

Os ACGs são formados pela esterificação do AQ, íon [C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> - H]<sup>-</sup> de  $m/z$  191 com um dos três ácidos *trans*-cinâmicos: **i**) AC (3,4-di-hidroxicinâmico) [C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> - H]<sup>-</sup>  $m/z$  179; **ii**) ácido ferúlico (3-metoxi, 4-hidróxi) [C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> - H]<sup>-</sup>  $m/z$  193; ou **iii**) o ácido *p*-cumárico (4-hidróxi), íon [C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> - H]<sup>-</sup> de  $m/z$  163 (MOREIRA, NUNES, DOMINGUES *et al.*, 2012). Propostas de fragmentações para compostos de  $m/z$  335, 353, 365, 367 e 457 são apresentadas na **Figura 9**.



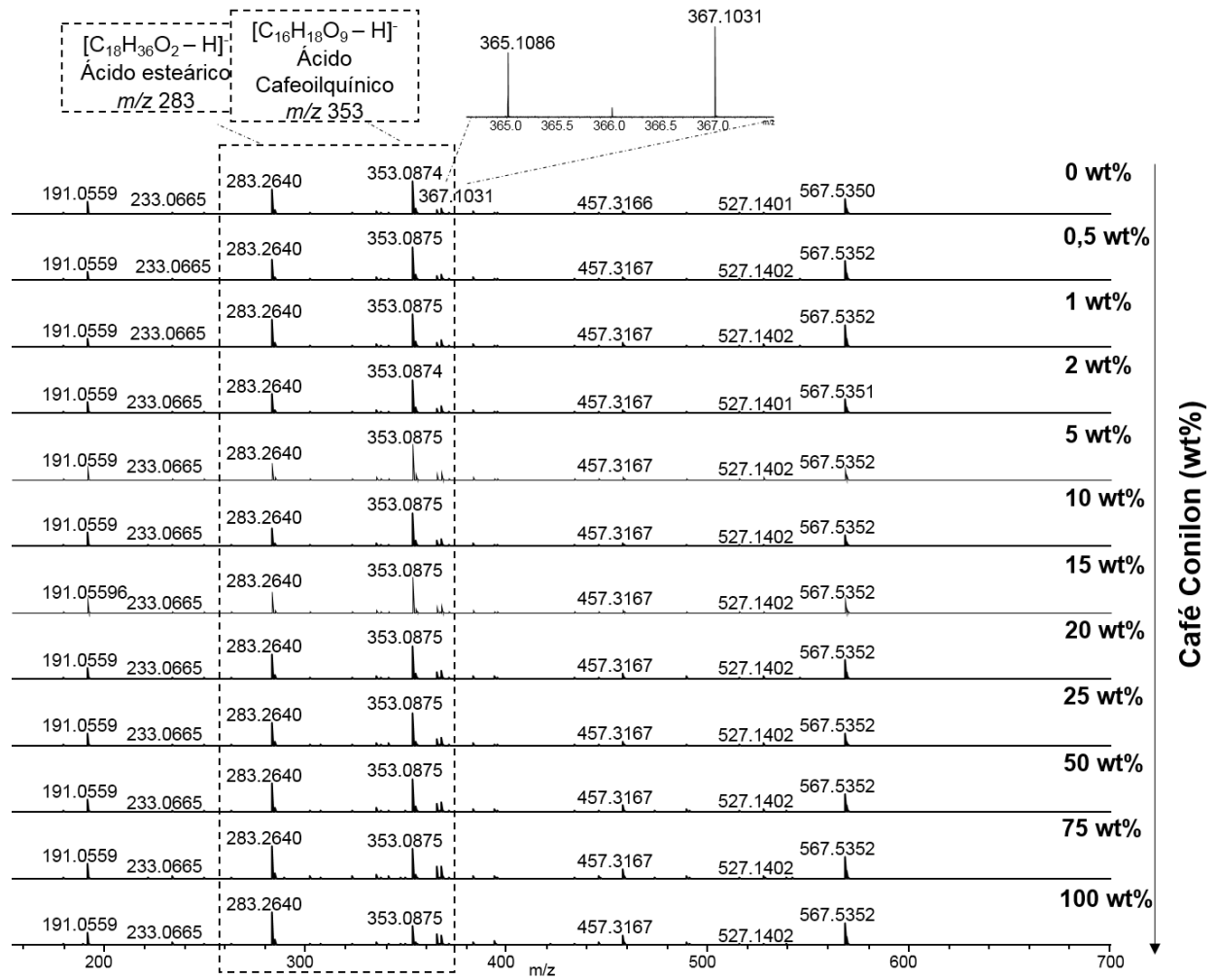
**Figura 9.** Propostas de mecanismos de fragmentações para os íons de m/z (a) 335 ácido cafeoilchiquímico, (b) 353 ácido cafeoilquínico (c) 365 dímero do ácido quínico, (d) 367 ácido feruloilquínico e (e) 457 íon do ácido esteárico e ácido quínico.



### 5.3. Quantificação de café Conilon em blendas de café Arábica

A utilização de um padrão interno ou agente dopante em experimentos de quantificação é comumente usada em análises de Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) e por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (KARUNAA, ECKARDSTEINA E RENTSCHA, 2009; TAVARES E FERREIRA, 2006). Neste trabalho foi utilizado como dopante o ácido esteárico, garantindo uma linearidade e reprodutibilidade da metodologia, eliminando assim, interferência instrumental. As condições de ionização na fonte de ESI(-) também foram mantidas constantes.

Blendas de café Arábica acrescidas com diferentes proporções de café Conilon foram analisadas e os espectros de ESI(-)FT-ICR MS são mostrados na **Figura 10**. O ACQ ( $m/z$  353) é majoritário, seguido dos íons de  $m/z$  191, 283, 567, 365 e 367, respectivamente. Essa relação é alterada, quando o café Conilon é adicionado na blenda. Em amostras de blendas com alta porcentagem de café Conilon (> 50 wt %), a intensidade relativa do íon  $m/z$  283 ácido esteárico (dopante com concentração conhecida) é majoritário seguido do ACQ ( $m/z$  353). Adicionalmente, a abundância das espécies AFQ ( $m/z$  367) e do dímero do AQ de  $m/z$  365 aumentam em relação ao íon de  $m/z$  353 (ACQ). Existe também uma inversão na abundância relativa entre os sinais de  $m/z$  365 e 367 com aumento da concentração de Conilon na blenda, **Figura 10**.



**Figura 10.** Espectros de ESI(-)FT-ICR MS das blendas de café em diferentes níveis de adulteração. Em destaque a relação entre os íons de  $m/z$  283 e 353; e  $m/z$  365 e 367.

Uma curva de calibração foi construída usando a razão entre a soma das intensidades relativas dos sinais  $m/z$  365 e 367 pelo sinal do  $m/z$  353 **Tabela 2** em função do teor de café Conilon na blenda (**Equação 16**).

**Tabela 2.** Dados das análises de ESI(-)-FT-ICR MS para construção do modelo de calibração univariada.

$x_i$ café Conilon (wt %)	$y$ real <i>Intensidade</i> $\frac{365 + 367}{353}$
0	0,309
0,5	0,307
1	0,320
2	0,320
5	0,345
10	0,392
15	0,396
20	0,433
25	0,430
50	0,559
75	0,828
100	1,061

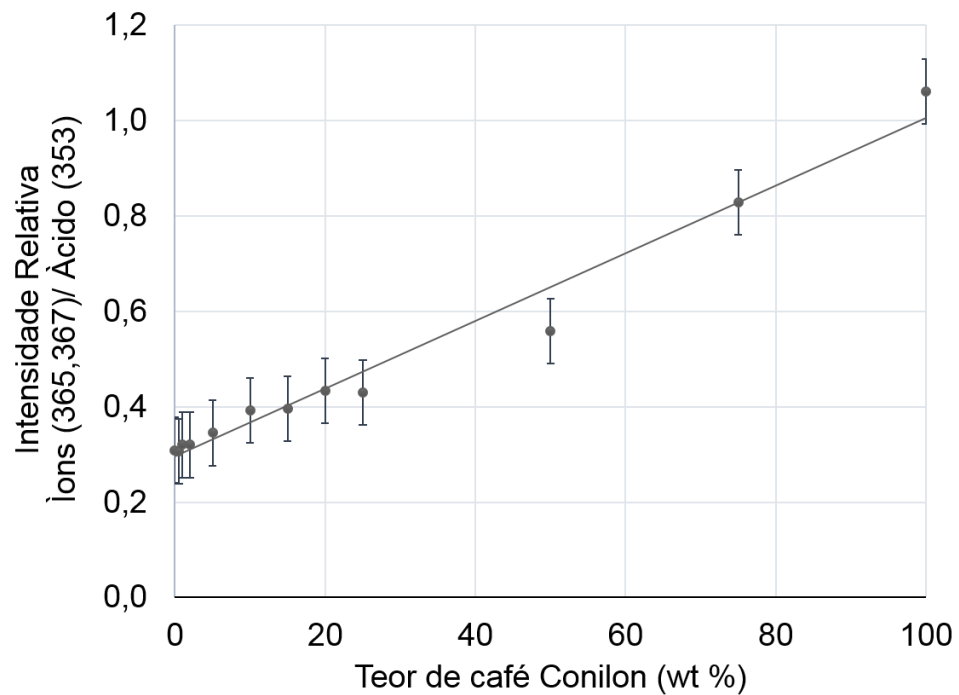
A **equação 16** pode ser usada para prever a concentração de café Conilon em amostras comerciais, onde  $y$  corresponde a razão dos sinais e  $x$  a concentração de café Conilon (wt %).

$$y = 0.0071x + 0.30 \quad (16)$$

$(\pm 0.0004)$      $(\pm 0.01)$

A curva analítica apresentou boa linearidade com coeficiente de determinação,  $R^2 = 0.976$  (**Figura 11**). Os coeficientes linear e angular são significativos ao nível de confiança de 95% (RIBEIRO, FERREIRA, MORANO *et al.*, 2008; VANINI, SOUZA, CARNEIRO *et al.*, 2015).

Os valores de LD e LQ foram determinados a partir de parâmetros da curva, sendo 0.2 e 0.3 wt %, respectivamente, para um nível de 95% de confiança (RIBEIRO, FERREIRA, MORANO *et al.*, 2008).



**Figura 11.** Curva de calibração da intensidade relativa (íon 365 + íon 367)/(íon 353) em função do teor de café Conilon (wt %) nas blendas com café Arábica. Em destaque, barra de erros.

Os dados obtidos por ESI(-)FT-ICR MS foram utilizados para os cálculos de repetibilidade e precisão intermediária a fim de monitorar e comprovar a confiabilidade dos métodos. A **Tabela 3** demonstra os valores da razão das somas das intensidades dos sinais  $m/z$  365 e 367 por  $m/z$  353 para o cálculo de repetibilidade.

**Tabela 3.** Valores das razões das somas das intensidades relativas dos sinais de  $m/z$  365 e 367 por  $m/z$  353 para o cálculo de repetibilidade para ESI(-)FT-ICR MS

Análises	Triplícatas			Médias
1º	0,330	0,339	0,338	0,3357
2º	0,361	0,355	0,360	0,3587
3º	0,370	0,372	0,372	0,3713
4º	0,360	0,360	0,360	0,3600
5º	0,376	0,374	0,378	0,3760

O resultado do ensaio de repetibilidade foi expresso como desvio padrão relativo (DPR), conforme estipulado pela ANVISA. O DPR calculado foi de 4 wt%, demonstrando que o método não sofre influências do período em que é realizado, uma vez que o DPR máximo permitido pela legislação é de 5 % (RDC nº 899 de 29

de maio de 2003) (ANVISA). A **tabela 4** mostra os valores da razão das somas das intensidades relativas dos sinais  $m/z$  365 e 367 por  $m/z$  353 no período de 5 dias para o cálculo de precisão intermediária.

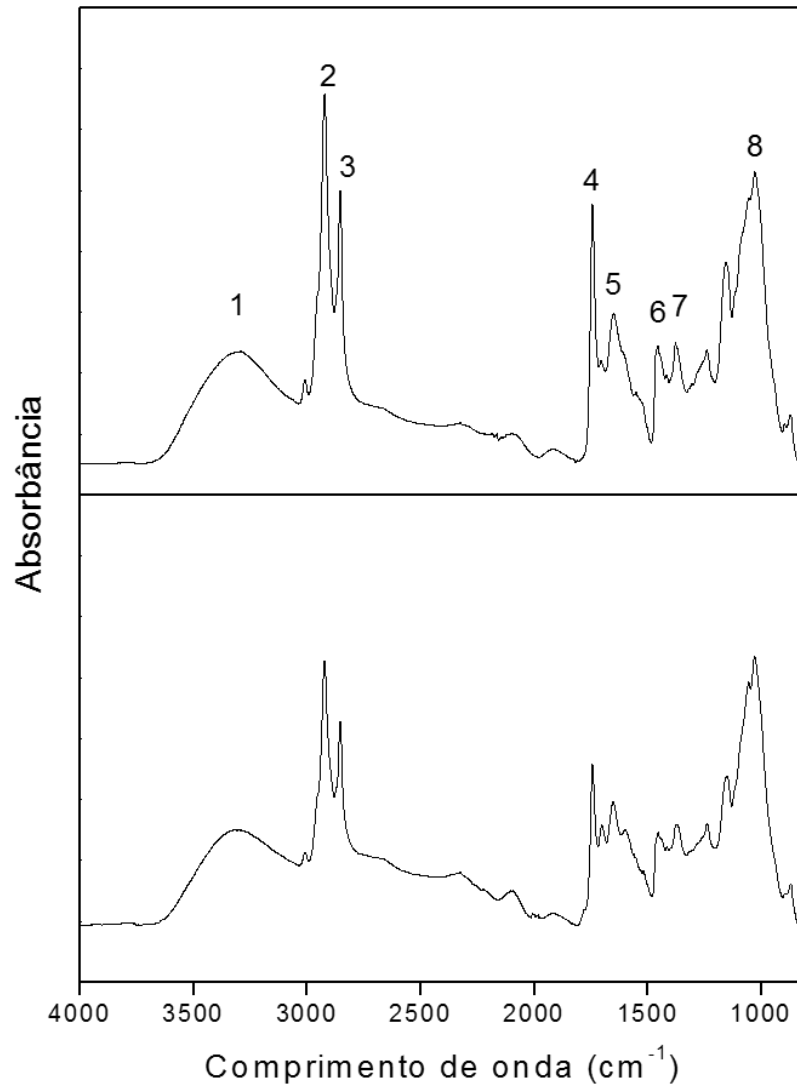
**Tabela 4.** Valores das razões das somas das intensidades relativas dos sinais de  $m/z$  365 e 367 por  $m/z$  353 para o cálculo de precisão intermediária para ESI(-)FT-ICR MS

Dias	Análises (9)									Médias
1º	0,360	0,360	0,360	0,376	0,374	0,378	0,370	0,372	0,372	0,3661
2º	0,368	0,367	0,370	0,364	0,367	0,377	0,453	0,365	0,351	0,3691
3º	0,276	0,341	0,342	0,345	0,341	0,356	0,302	0,294	0,487	0,3246
4º	0,335	0,336	0,346	0,350	0,346	0,353	0,342	0,356	0,342	0,3451
5º	0,333	0,350	0,349	0,353	0,351	0,352	0,356	0,350	0,354	0,3496

O resultado do ensaio de precisão intermediária também foi expresso como desvio padrão relativo (DPR). O DPR calculado foi de 5 wt%. Aplicou-se, também, a análise de variância (ANOVA) para verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os ensaios de precisão intermediária. O valor de F calculado ( $F=2.1382$ ;  $p=0,09$ ) ficou abaixo do F crítico (2,606) e  $p$  foi significativo de ao nível de 5% probabilidade, indicando não haver diferenças significativas entre as variâncias dos 5 dias observados. Através dos valores obtidos é possível garantir a precisão dos resultados independente do dia das análises.

#### 5.4. Espectroscopia no Infravermelho médio – ATR-FTIR

A **Figura 12a-b** mostra os espectros de ATR-FTIR para amostras puras de café Arábica e Conilon, respectivamente. A presença de uma banda larga em  $3308\text{ cm}^{-1}$  (1) corresponde ao estiramento OH pode estar relacionado a compostos hidroxilados como os açúcares, fenóis e ácidos carboxílicos (WELNA, SZYMCZYCHA-MADEJA e ZYRNICKI, 2013). Já presença de uma variedade extensa de compostos como hidratos de carbono, minerais, cafeína, ACG, proteínas, e lipídios, que em sua maioria absorvem na região de  $1500\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ , faz com que as bandas de absorção se sobreponham, dificultando a interpretação dos espectros (BRIANDET, KEMSLEY e WILSON, 1996).



**Figura 12.** Espectros de ATR-FTIR (a) Café Arábica (b) Café Conilon.

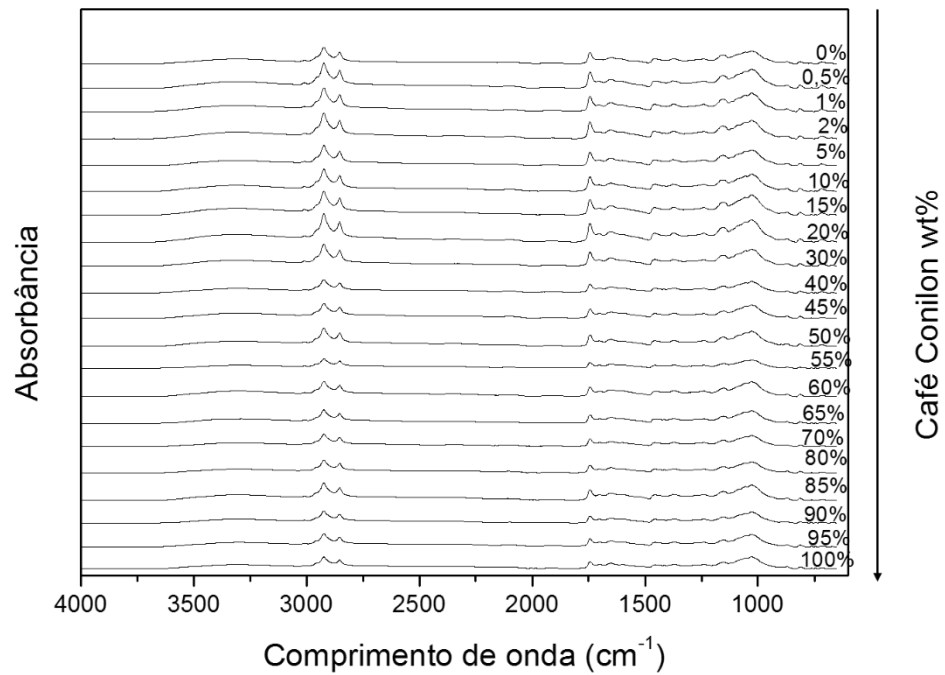
As atribuições das absorções (**Tabela 5**) podem estar associadas aos ácidos clorogênicos, compostos aromáticos, ácidos graxos, carboidratos, dentre outros componentes específicos de amostras de cafés.

**Tabela 5.** Espectros de ATR-FTIR das amostras de (a) café Arábica (b) café Conilon puras.

Numeração	Bandas (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições
1	3308	Estiramento da ligação O-H
2	2923	Estiramento assimétrico C-H alifático
3	2853	Estiramento simétrico C-H alifático
4	1743	Deformação axial da ligação C=O de ésteres
5	1652	Estiramento da ligação C=C de compostos aromáticos
6	1464	Deformação assimétrica de C-H alifáticas
7	1374	Estiramento da ligação C-O
8	1026	Deformação C-O

Após caracterização das amostras puras, blendas de cafés Arábica/Conilon foram analisados por ATR-FTIR, **Figura 13**. As bandas que, visualmente, apresentaram alterações em funções da concentração de Conilon nas blendas estão presentes nas regiões de 1500-2000 cm<sup>-1</sup> (4-5) e 3000-2750 cm<sup>-1</sup> (2-3).

É possível notar visualmente uma diminuição acentuada na absorbância da banda na região de 1743 cm<sup>-1</sup>, indicativa de carbonila de ésteres, que demonstra grande variação entre as duas amostras, com maior intensidade no café Arábica, e que pode ser característica também dos ACGs (CRAIG, FRANÇA e OLIVEIRA, 2012). DESHPANDE, EL-ABASSY, JAISWAL *et al.* 2014 relataram que é possível, através desta banda, diferenciar os cafés Arábica e Conilon. As absorções intensas nas regiões de 2900 e 2800 cm<sup>-1</sup> correspondem aos estiramentos simétricos e assimétricos da ligação C-H e são comuns em várias classes de compostos alifáticos, como ésteres graxos e álcoois de cadeia longa (WELNA, SZYMCZYCHA-MADEJA e ZYRNICKI, 2013).

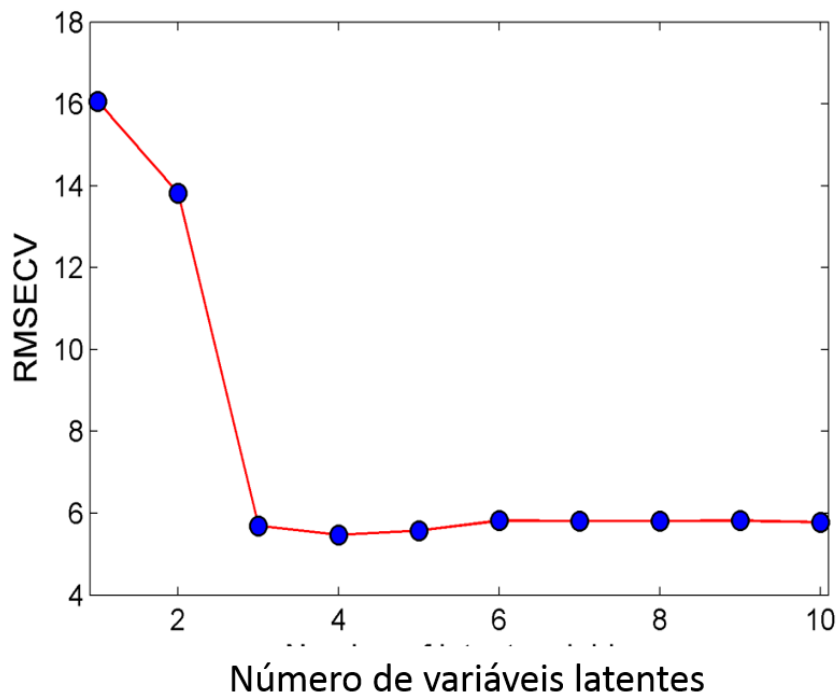


**Figura 13.** Espectros de ATR-FTIR das blendas de café Arábica/Conilon em função da concentração de Conilon.

### 5.5. Análises quimiométricas

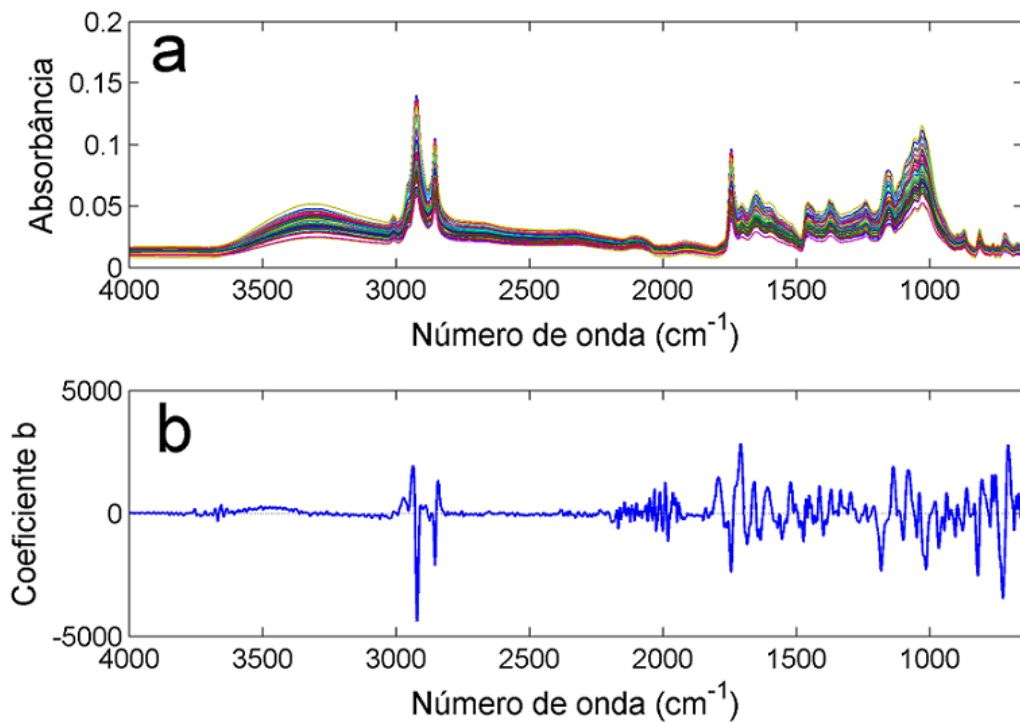
O modelo de calibração multivariada PLS foi construído buscando quantificar o teor de café Conilon nas blendas de café Conilon/Arábica. Espectros em triplicatas foram tomadas em cada amostra das blendas e estas foram utilizadas na construção do modelo PLS utilizando 3 variáveis latentes (**Figura 14**).





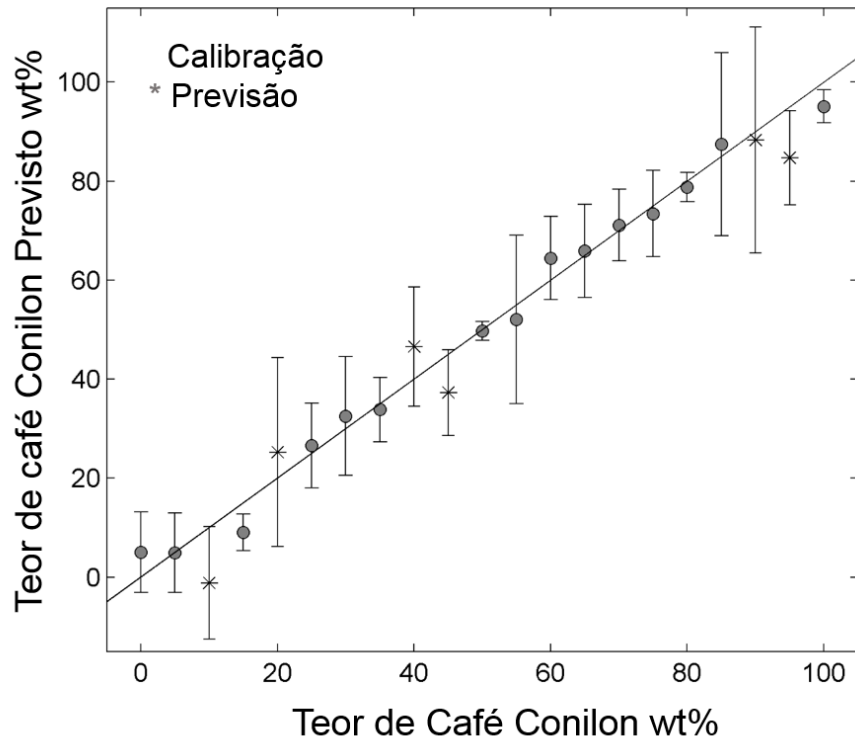
**Figura 14.** Gráfico do erro quadrático médio de validação cruzada pelo número de variáveis latentes utilizados na construção do modelo PLS.

A linha de base espectral foi corrigida utilizando a primeira derivada com janela de 9 pontos e polinômio de ajuste de segundo grau. O modelo PLS foi construído com 3 variáveis latentes. Os coeficientes de regressão do modelo PLS mostram relevância na região de aproximadamente  $2900\text{ cm}^{-1}$  relacionado à deformação axial da ligação C-H de compostos alifáticos; na região em torno de  $1750\text{ cm}^{-1}$  relacionado à deformação axial da carbonila de éster; e logo acima de  $1000\text{ cm}^{-1}$  relacionado à deformação axial da ligação C-O (**Figura 15b**). Vale ressaltar que a região de  $3100$  a  $3500\text{ cm}^{-1}$  relacionado à deformação axial da ligação O-H não foi significativo para construção do modelo, esta região pode estar associada ao teor de humidade das amostras.



**Figura 15.** (a) Espectros das blendas de cafés (após tratamento dos dados) (b) Gráfico dos coeficientes de regressão do modelo.

O modelo PLS apresentou erro médio de validação cruzada (RMSECV) de 5,7 wt % e de previsão (RMSEP) 9,2 wt%, com coeficientes de determinação para validação cruzada e previsão de 0,9635 e 0,9295, respectivamente. GARRETT, VAZ, HOVELL *et al.* (2012) reportam valores próximos à exatidão do modelo (RMSEP) para a técnica de ESI(-). PIZARRO, ESTEBAN-DÍEZ e GONZÁLEZ-SÁIZ (2007) utilizaram a calibração multivariada PLS associada a espectroscopia no infravermelho para prever possíveis adições de café conilon em café arábica e os resultados demonstraram valores menores de RMSECV e RMSEP, porém foram utilizadas uma maior quantidade de amostras (em média 190 amostras entre blendas e variedades puras) e o método de pré-processamento OWAVEC. A espectroscopia no infravermelho foi aplicada a calibração multivariada para prever outros adulterantes dentre eles cascas, milho e palha, com valores de RMSEP e RMSECV superiores ao encontrados neste estudo (TAVARES, 2012). Estes parâmetros mostram boa relação entre os valores previstos pelo modelo PLS e de referência (**Figura 16**). Os valores de LD e LQ foram de 1.29 wt % e 4.30 wt %, respectivamente, sendo maiores do que os obtidos pela técnica de ESI(-)FT-ICR MS.



**Figura 16.** Relação do teor de café Conilon nas amostras e previstos em blendas utilizando o modelo PLS. Em destaque, barra de erros.

A homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de Bartlett aplicado às amostras dos conjuntos de calibração e previsão a fim de verificar a homogeneidade da variância em cada nível de adulteração com café Conilon. Os resultados apresentaram  $p$ -valor de 0.347 e 0.757 respectivamente para calibração e previsão, indicando não haver diferenças significativas, ao nível de significância de 5%, entre as variâncias observadas dos níveis testados. A presença de erros sistemáticos nos resíduos foi avaliada pelo teste para bias, apresentando  $p$ -valor de 1.000 e 0.147 respectivamente para calibração e previsão, indicando a ausência de erros sistemáticos nos resíduos do modelo PLS construído, ao nível de significância de 5%.

A fim de comparação, foram realizados cálculos de repetibilidade e precisão intermediária para os dados obtidos pela técnica de ATR-FTIR. Foi possível através do modelo PLS construído (ASTM International, 2012), obter o valor estimado de DPR igual a 1,7 wt% para ambas as figuras de mérito, conforme estipulado pela legislação (ANVISA).

São empregadas diversas técnicas para análise de adulteração de cafés, embora sejam técnicas confiáveis, são necessários longos processos de preparação e as vezes é possível identificar somente um componente para distinguir os adulterantes. Outros autores (AQUINO, AUGUSTI, ALVES *et al.*, 2014; GARRETT, VAZ, HOVELL *et al.*, 2012) analisaram blendas de cafés, e obtiveram bons resultados através da aplicação de um modelo de calibração multivariada. No entanto, uma nova e simples metodologia (calibração univariada) foi desenvolvida para uma análise rápida e confiável a fim de caracterizar e controlar a qualidade de café Arábica adulterado com café Conilon por ESI(-)FT-ICR MS.

## 6. CONCLUSÕES

A técnica de ATR-FTIR possibilitou a construção de um modelo de calibração multivariada PLS. O modelo multivariado apresentou exatidão média de 9.2 wt%. Adicionalmente, técnica de ESI(-)FT-ICR MS possibilitou verificar o perfil químico dos cafés Arábica e Conilon, permitindo experimentos de MS/MS e a identificação dos principais compostos presentes nas amostras de cafés. Os resultados de ESI(-) possibilitaram a construção de um modelo quantitativo simples utilizando calibração univariada, gerando valores ótimos de LD (1,29 wt%) e LQ (4,3 wt%), além de valores aceitáveis de repetibilidade e precisão intermediária. Os valores encontrados para a ESI(-)FT-ICR MS foram excelentes, demonstrando a confiabilidade e reprodutibilidade da técnica como ferramenta analítica. Desta maneira, o modelo possibilitará quantificar blendas de cafés Arábica/Conilon em amostras comerciais.

## 7. REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ - ABIC. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>> Acesso em: 02 outubro 2015.

AMORIM, A. C. L., HOVELL, A. M. C., PINTO, A. C., EBERLIN, M. N., ARRUDA, N. P., PEREIRA, E. J., BIZZO, H. R., CATHARINO, R. R., MORAIS FILHO, Z. B., REZENDE, C. M. Green and Roasted Arabica Coffees Differentiated by Ripeness, Process and Cup Quality. *J. Braz. Chem. Soc.*, **20**(2), 313-321, 2009.

ANDERSSON, M. A comparison of nine PLS1 algorithms. *J. Chemom.*, **23**, 518-522. 2009.

AQUINO, F. J. T., AUGUSTI, R., ALVES, J. O., DINIZ, M. E. R., MORAIS, S. A. L., ALVES, B. H. P., NASCIMENTO, E. A., SABINO, A. A. Direct infusion electrospray ionization mass spectrometry applied to the detection of forgeries: Roasted coffees adulterated with their husks. *Microchem. J.*, **117**, 127–132, 2014.

ASTM International. ASTM Standard E1655-12: Standard practices for infrared multivariate quantitative analysis; ASTM International: West Conshohocken, PA, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura. URL <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe/saiba-mais>. Acesso em: 02 novembro 2015.

BRIANDET, R., KEMSLEY, K., WILSON, R. H. Discrimination of Arabica and Robusta in Instant Coffee by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 170–174, 1996.

CARVALHO, D. C., PICHELI, F. P., LUCCAS, P.O., MAGALHAES, C. S., AZEVEDO, L. Organic and Conventional Coffee (*Coffea arabica* L.): Differences in the Content of Minerals and Studies in Healthy and Induced Cancer Rats. *J. Nutr. Food Sci.*, 4-6, 2014.

CLIFFORD, M. N., JOHNSTON, K. L., KNIGHT, S., KUHNERT, N. Hierarchical Scheme for LC-MSn Identification of Chlorogenic Acids. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2900-2911, 2003.

CONSELHO NACIONAL DO CAFÉ - CNCAFE. Disponível em: <<http://www.cncafe.com.br/site/conteudo.asp?id=10>> Acesso em: 03 novembro 2015.

CONTI, J. A. **Influência de um tratamento com vapor e ácido nas características da bebida café conilon**. Tese de mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013, 77 p.

COSTA, H. C., SOUZA, L. M., SOPRANI, L. C., OLIVEIRA, B. G., OGAWA, E. M., KORRES, A. M. N., VENTURA, J. A., ROMÃO, W. Monitoring the physicochemical degradation of coconut water using ESI-FT-ICR MS. *Food Chem.*, **174**, 139–146, 2015.

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

CRAIG, A. P., FRANCA, A. S., OLIVEIRA, L. S., IRUDAYARAJ, J., ILELEJI, K. Application of elastic net and infrared spectroscopy in the discrimination between defective and non-defective roasted coffees. *Talanta*, **128**, 393-400, 2014.

DA SILVA, B. M. C. M. **Avaliação da autenticidade de derivados de marmelo através do perfil fenólico**. Tese de mestrado. Universidade do Porto, 1999. 99 p.

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., MOREIRA, R. F. A., TRUGO, L. C. Componentes voláteis do café torrado. Parte I: compostos heterocíclicos. *Quim. Nova*, **22**(2), 209-217, 1999.

DE MOURA, S. C. S. R., GERMER, S. P. M., ANJOS, V. D. A., MORI, E. E. M., MATTOSO, L. H. C., FIRMINO, A., NASCIMENTO, C. J. F. Evaluation of the Physical, Chemical and Sensory Characteristics of Arabica and Canephora (Robusta) Coffee Blends. *Braz. J. Food Technol.*, **10**(4), 271-277, 2007.

DESHPANDE, S., EL-ABASSY, R. M., JAISWAL, R., ERAVUCHIRA, P., KAMMER, B., MATERNY, A., KUHNERT, N. Which spectroscopic technique allows the best differentiation of coffee varieties: comparing principal component analysis using data derived from CD, NMR- and IR-spectroscopies and LC-MS in the analysis of the chlorogenic acid fraction in green coffee beans. *Anal. Methods*, **6**, 3268-3276, 2014.

DE SOUZA, A. M.; BREITKREITZ, M. C.; FILGUEIRAS, P. R.; ROHWEDDER, J. J. R.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada

na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. *Quim. Nova*, **36**(7), 1057-1065, 2013.

DIAS, H. P., DIXINI, P. V., ALMEIDA, L. C. P., VANINI, G., CASTRO, E V.R., AQUIJE, G. M. F. V., GOMES, A. O., MOURA, R. R., LACERDA, V., VAZ, B. G., ROMÃO, W. Evidencing the crude oil corrosion by Raman spectroscopy, atomic force microscopy and electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. *Fuel*, **139**, 328-336, 2015a.

DIAS, H. P., GONÇALVES, G. R., FREITAS, J. C. C., GOMES, A. O., DE CASTRO, E. V. R., VAZ, B. G., AQUIJE, G. M. F. V., ROMÃO, W. Catalytic decarboxylation of naphthenic acids in crude oils. *Fuel*, **158**, 113-121, 2015b.

FRAIGE, K. **Estudo comparativo do perfil metabolômico e proteômico de uvas (*Vitis vinifera*) durante o processo de maturação utilizando ferramentas bioanalíticas.** Tese de doutorado. Universidade de São Carlos, 2012. 227 p.

FREIRE, A.T. **Projeto e avaliação de um sistema para secagem combinada de café (*Coffea Arábica L.*) despulpado.** Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1998. 76 p.

FARAH, A., DE PAULIS, T., TRUGO, L. C., MARTIN, P. R. Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 1505–1513, 2005.

FARAH, A., DE PAULIS, T., MOREIRA, D. P., TRUGO, L. C., MARTIN, P. R. Chlorogenic Acids and Lactones in Regular and Water-Decaffeinated Arabica Coffees. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 374-381, 2006.

FILGUEIRAS, P. R. **Determinação da composição de blends de petróleos utilizando ATRi-FTIR e calibração multivariada.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória, 2011, 112p.

FRANCA, A. S., MENDONÇA, J. C. F., OLIVEIRA, S. D. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT*, **38**, 709-715, 2005.

FRANCA, A. S., L. S., OLIVEIRA, MENDONÇA, J. C. F., SILVA, X. A. Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans. *Food Chem*, **90**, 89-94, 2005.

GARRETT, R., REZENDE, C. M., IFA, D. R. Coffee origin discrimination by paper spray mass spectrometry and direct coffee spray analysis. *Anal. Methods*, **5**, 5944–5948, 2013a.

GARRETT, R., SCHMIDT, E. M., PEREIRA, L. F. P., KITZBERGER, C. S. G., SCHOLZ, M. B. S., EBERLIN, M. N., REZENDE, C. M. Discrimination of Arabica coffee cultivars by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and chemometrics. *Food Sci. Technol.*, **50**, 496-502, 2013b.

GARRETT, R., SCHWAB, N. V., CABRAL, E. C., HENRIQUE, B. V. M., IFA, D. R., EBERLIN, M. N., REZENDE, C. M. Ambient Mass Spectrometry Employed for Direct Analysis of Intact Arabica Coffee Beans. *J. Braz. Chem. Soc.*, **25**(7), 1172-1177, 2014.

GARRETT, R., VAZ, B. G., HOVELL, A. M. C., EBERLIN, M. N., & REZENDE, C. M. Arabica and Robusta Coffees: Identification of Major Polar Compounds and Quantification of *Blends* by Direct-Infusion Electrospray Ionization–Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 4253–4258, 2012.

GIOMO, G.S. Uma Boa Pós-Colheita é Segredo da Qualidade. A lavoura, Rio de Janeiro, nº 688, fev. 2012. Disponível em: <<http://www.youblisher.com/p/228033-A-LAVOURA-688-FEV-2012/>> Acesso em: 15 outubro 2015.

HALAL, S. L. M. **Composição, processamento e qualidade do café**. Monografia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008. 47 p.

HAM, B. M. **Even electron mass spectrometry with bimolecular applications**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2008. 422 p.



HOFFMANN E., STROOBANT V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. 3<sup>o</sup> Ed. London, John Wiley & Sons, 2007. 85-164p

HÖSKULDSSON, A. PLS regression methods. *J. Chemom.* 1988, **2**, 211-228.

JAISSWAL, R., MATEI, M. F., GOLON, A., WITT, M., KUHNERT, N. Understanding the fate of chlorogenic acids in coffee roasting using mass spectrometry based targeted and non-targeted analytical strategies. *Food Function*, **3**, 976-984, 2012.

JAISSWAL, R., PATRAS, M. A., ERAVUCHIRA, P. J., KUHNERT, N. Profile and Characterization of the Chlorogenic Acids in Green Robusta Coffee Beans by LC MS<sup>n</sup>: Identification of Seven New Classes of Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 8722–8737, 2010b.

JAISSWAL, N., SOVDAT, T., VIVAN, F., KUHNERT, N. Profiling and Characterization by LC-MS<sup>n</sup> of the Chlorogenic Acids and Hydroxycinnamoylshikimate Esters in Maté (*Ilex paraguariensis*) *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 5471–5484, 2010a.

KARUNAA, R., ECKARDSTEINA, A. V., RENTSCH, K. M. Dopant assisted-atmospheric pressure photoionization (DA-APPI) liquid chromatography–mass spectrometry for the quantification of 27-hydroxycholesterol in plasma. *Journal Chromatography B*, **877**, 261–268, 2009.

KLITZKE, C. F. **Aplicações da Espectrometria de Massas de Altíssima Resolução e da Mobilidade Iônica Aoplada a Espectrometria de Massas em Estudos de Geoquímica Orgânica**. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012, 173 p.

KUHNERT, N., JAISSWAL, R., ERAVUCHIRA, P., EL-ABASSY, R. M., KAMMER, B., MATERNY, A. Scope and limitations of principal component analysis of high resolution LC-TOF-MS data: the analysis of the chlorogenic acid fraction in green coffee beans as a case study. *Anal. Methods*, **3**, 144-155, 2011.

KUHNERT, N., YASSIN, G. H., JAISWAL, R., MATEI, M. F., GRÜN, C. H. Differentiation of prototropic ions in regioisomeric caffeoyl quinic acids by electrospray ion mobility mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **29**, 675-680, 2015.

MARSHALL, A. G., HENDRICKSON, C. L., JACKSON, G. S. Fourier Transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. *Mass Spectrom. Rev.* **17**, 1, 1-35, 1998.

MAZZAFERA, P. Chemical composition of defective coffee beans. *Food Chem*, **64**, 547-554, 1999.

MENDES, L. C., DE MENEZES, H. C., APARECIDA, M., DA SILVA, A. P. Optimization of the roasting of robusta coffee (*C. canephora conillon*) using acceptability tests and RSM. *Journal of Food Quality and Preference*, **12**, 153-162, 2001.

MONTEIRO, M. C., TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quím. Nova*, **28**(4), 637-641, 2005.

MOREIRA, A. S. P., NUNES, F. M., DOMINGUES, R., COIMBRA, M. A. Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts. *Food & Function*, **3**, 903–915, 2012.

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

MORGANO, M. A., PAULUCI, L. F., MANTOVANI, D. M. B. E MORY, E. E. M. Determinação de minerais em café cru. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **22**(1), 19-23, 2002.

MORISHITA, H., TAKAI, Y., YAMADA, H., FUKUDA, F., SAWADA, M., IWAHASHI, H., KIDO, R. Caffeoyltryptophan from green robusta coffee beans. *Phytochemistry*, **26**, 4, 1195-1996, 1987.

NASCIMENTO, I. R., COSTA, H. B., SOUZA, L. M., SOPRANI, L. C., MERLO, B. B., & ROMÃO, W. Chemical identification of cannabinoids in street marijuana samples using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. *Anal. Methods*, **7**, 1415-1424, 2015.

NOGUEIRA, B. L. **Características físicas, químicas e biológicas do café (Coffea Arábica L.) natural e despulpado**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2009. 71 p.

NUNES, P. G. A. **Uma nova técnica para seleção de variáveis em calibração multivariada aplicada às espectrometria UV-VIS e NIR**. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba. 2008. 106 p.

OLIVIERI, A. C., FABER, N. K. M., FERRÉ, J., BOQUÉ, R., KALIVAS, J. H., MARK, H. Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration. *IUPAC*, **78**, 633–661, 2006.

PEREIRA, A., SCESHOWITSCH, K., CRUZ, A. SILVA, M. A. S., STULZER, H. K. Validação de metodologia analítica para quantificação de piroxicam em cápsulas de gelatina por espectrofotometria ultravioleta (UV). *Visão Acadêmica*, Curitiba, **8**(2), 29-37, 2007.

POHL, P., STELMACH, E., WELNA, M., SZYMCZYCHA-MADEJA, A. Determination of the Elemental Composition of Coffee Using Instrumental Methods. *Food Anal. Methods*, **6**, 598–613, 2013.

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

REIS, N., FRANCA, A. S., & OLIVEIRA, L. S. Performance of diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy and chemometrics for detection of multiple adulterants in roasted and ground coffee. *Food Sci. Technol.*, **53**, 395-401, 2013.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Quím. Nova*, **27**, 5, 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L., FERREIRA, M. M. C., MORANO, S. C., DA SILVA, L. R., SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito. *Quím. Nova*, **31**(1), 164-171, 2008.

ROMÃO, W. **Novas Aplicações da Espectrometria de Massas em Química Forense**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010. 201 p.

SÁ, M., FERREIRA, J. P., QUEIROZ, V. T., VILAS-BOAS, L., SILVA, M. C., ALMEIDA, M. H., GUERRA-GUIMARÃES, L., BRONZE, M. R. A liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of salicylic, jasmonic and abscisic acids in *Coffea Arabica* leaves. *J. Sci. Food Agric.*, **94**, 529–536, 2014.

SCHIEVANO, E., FINOTELLO, C., DE ANGELIS, E., MAMMI, S. E NAVARINI, L. Rapid Authentication of Coffee Blends and Quantification of 16-O-Methylcafestol in Roasted Coffee Beans by Nuclear Magnetic Resonance. *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 12309–12314, 2014.

SCHRADER, W., KLEIN, H. W. Liquid chromatography/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (LC-FTICR MS): an early overview. *Anal. Bioanal. Chem.* **379**, 1013-1024, 2004.

SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRILL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds**. New York: John Wiley & Sons, 1991.

SIQUEIRA, H. H. DE., DE ABREU, C. M. P. Composição físico-química e qualidade do café submetido a dois tipos de torração e com diferentes formas de processamento. *Ciênc. agrotec.*, **30**(1), 112-117, 2006.

SKOOG, D. A. WEST, D. M. HOLLER, F. J. CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª Ed. São Paulo: Thomsom Learning, 2007.

SNEE, R. D. Validation of Regression Models: Methods and Examples. *Technometrics*, **19**, 415-428, 1977.

TAVARES, L. A., FERREIRA, A.G. Análises quali e quantitativa de cafés comerciais via Ressonância Magnética Nuclear. *Quím. Nova*, **29**(5), 901-915, 2006.

TAVARES, K. M. **Detecção de adulteração em café riado torrado e moído por espectroscopia no infravermelho e análise sensorial**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 2012. 109p.

TAVARES, K. M., PEREIRA, R. G. F. A., NUNES, C. A., PINHEIRO, A. C. M. Espectroscopia no infravermelho médio e análise sensorial aplicada à detecção de adulteração de café torrado por adição de cascas de café. *Quím. Nova*, **35**(6), 1164-1168, 2012.

TRUGO, C., MACRAE, R. A Study of the Effect of Roasting on the Chlorogenic Acid Composition of Coffee Using HPLC L. *Food Chem.*, **15**, 219-227, 1984.

União Exportadora de Café – UNICAFÉ Disponível em: <http://www.unicafe.com.br/asp/system/empty.asp?P=53&VID=default&SID=695027202288364&S=1&C=22260> Acesso em: 02 setembro 2015.

VANINI, G., SOUZA, M. O., CARNEIRO, M. T. W. D., FILGUEIRAS, P. R., BRUNS, R. E., ROMÃO, W. Multivariate optimisation of ICP OES instrumental parameters for Pb/Ba/Sb measurement in gunshot residues. *Microchem. J.*, **120**, 58-63, 2015.

VAZ, B. G. **Petroleômica por FT-ICR MS: desvendando a composição de polares do petróleo e derivados**. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2011, 191 p.

WELNA, M., SZYMCZYCHA-MADEJA, A., ZYRNICKI, W. Applicability of icp-oes, uv-vis, and ft-ir methods for the analysis of coffee products. *Anal. Letters*, **46**, 2927–2940, 2013.

WOLD, S., SJÖSTRÖM, M., & ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **58**, 109-130, 2001.

ZENEBON, O., PASCUET, N. S., TIGLEA, P. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: IV-Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 5° Ed. São Paulo – SP, Secretária de Estado da Saúde, Coordenadoria dos Serviços Especializados, XII, 492, 2008.