

**MAYARA SILVA DUTRA**

**INFLUÊNCIA DA MATURAÇÃO, DA GRANULOMETRIA E DA TORRA NA  
COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DO CAFÉ CONILON**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz

Coorientador: André Fernando de Oliveira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS**

**2019**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

D978i  
2019  
Dutra, Mayara Silva, 1990-  
Influência da maturação, da granulometria e da torra na  
composição volátil do café conilon / Mayara Silva Dutra. –  
Viçosa, MG, 2019.

1 dissertação eletrônica (79 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Química, 2019.

Referências bibliográficas: f. 65-75.

Disponível em: <https://www.locus.ufv.br>

1. *Coffea canephora*. 2. Cromatografia a gás.  
3. Espectrometria de massa. 4. Análise de componentes  
principais . I. Queiroz, Maria Eliana Lopes Ribeiro de, 1958-.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química.  
Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. III. Título.

CDD 22. ed. 633.73

**MAYARA SILVA DUTRA**

**INFLUÊNCIA DA MATURAÇÃO, DA GRANULOMETRIA E DA TORRA NA  
COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DO CAFÉ CONILON**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 outubro de 2019.

Assentimento:

  
\_\_\_\_\_  
Mayara Silva Dutra  
Autora

  
\_\_\_\_\_  
Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz  
Orientadora

*Dedico este trabalho a Deus, à Nossa Senhora e à São Judas Tadeu;  
aos meus pais Walter e Luciana, ao meu irmão Vinícius e ao meu namorado  
Marcelo.*

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, por sua orientação e amizade e aos professores André Fernando de Oliveira, Vanessa Moreira Osório e Lucas Louzada Pereira pela contribuição em meu projeto e disponibilidade.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Química, pela realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Espírito Santo, em particular ao Departamento de Química e Física, por proporcionar a conclusão do mestrado.

Ao Instituto Federal do Espírito Santo – Campus de Venda Nova, pelo tratamento das amostras e auxílio no decorrer do projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## **AGRADECIMENTOS PESSOAIS**

A Deus e à nossa senhora, por estarem sempre comigo me dando força nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Walter e Luciana, pelo amor incondicional e apoio em toda minha vida.

Ao meu irmão Vinícius, pelo companheirismo e amizade sempre que preciso.

Ao meu namorado Marcelo, pelo carinho e presença em todos os momentos.

Aos meus amigos, pela amizade e auxílio na minha caminhada.

À família LAQUA por ser um excelente lugar de trabalho, com ótimas pessoas e profissionais, em especial aos amigos Thaís, Jessika, Mariane, Aline e Vitor.

## BIOGRAFIA

MAYARA SILVA DUTRA, filha de Walter Louzada Dutra e Luciana Rodrigues Silva Dutra, nasceu em Cachoeiro de Itapemirim, em 02 de setembro de 1990.

Iniciou o curso de Bacharel em Química em março de 2010 pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa – MG. Começou seu primeiro estágio no Laboratório de Química Analítica (LAQUAM) com o professor Dr. Carlos Roberto Bellato, na área de Química Ambiental, no projeto de remoção de corantes catiônicos por adsorção. Depois estagiou no Laboratório de Química Analítica (LAQUA) com a professora Dra. Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, na área de Química Ambiental, no projeto voltado para a sorção e dessorção de fungicidas no solo, o qual foi utilizado para a sua conclusão de curso.

Participou da 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, no minicurso a Evolução das Técnicas e Processos Sintéticos Aplicados ao Desenvolvimento de Fármacos e ainda apresentou o trabalho de Avaliação do efeito de matriz nos estudos de adsorção da azoxistrobina e difenoconazol em solo.

Em julho de 2015, formou-se e em agosto de 2017, iniciou o curso de pós-graduação em Agroquímica, em nível de mestrado na mesma instituição que concluiu a graduação, submetendo-se à defesa da dissertação em outubro de 2019 com o trabalho intitulado “Influência da maturação, da granulometria e da torra na composição volátil do café conilon”.

É técnica de laboratório na Universidade Federal do Espírito Santo (Campus Alegre) desde julho de 2018, sendo suas funções a responsabilidade pelo laboratório Central Analítica, trabalhando com os cromatógrafos gasosos e líquidos, além de estabelecer o controle dos produtos controlados da Polícia Federal e Exército no campus.

## RESUMO

DUTRA, Mayara Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2019. **Influência da maturação, da granulometria e da torra na composição volátil do café conilon.** Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Coorientador: André Fernando de Oliveira.

Os parâmetros, aroma e sabor, característicos do café auxiliam na avaliação da qualidade do mesmo. O sabor é um atributo sensorial mais fácil de avaliar, uma vez que normalmente o café é classificado qualitativamente como doce, salgado, amargo e azedo. Já a avaliação do atributo aroma é mais complexa, uma vez que o café pode apresentar inúmeros compostos voláteis que podem variar em função do tipo, do estágio de maturação e da torrefação do café. Para estudar o efeito da torrefação sobre o aroma do café, neste trabalho foram avaliados os compostos voláteis presentes em um café tipo conilon (*Coffea canephora PIERRE ex Froehner*), em relação a diferentes perfis de torra, granulometria e maturação. Para avaliar o perfil volátil do café o método envolvendo a microextração em fase sólida, no modo *headspace* (HS), e, análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (HS/SPME-GC-MS) foi otimizado e validado. Na otimização um planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central ( $n=3$ ) em triplicata, foi empregado para determinar os parâmetros temperatura e tempo de extração. No método otimizado, 1,0 g de café torrado e moído são aquecidos, em um frasco hermeticamente fechado, a 70 °C por 30 min para a extração dos voláteis empregando uma fibra DVB/CAR/PDMS. Na validação os fatores considerados foram a seletividade, linearidade, precisão e exatidão. Com exceções da concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> para o 4-etilguaiacol e de 7,0 mg L<sup>-1</sup> para o furfuralpirrol e 4-etilguaiacol, a repetitividade apresentou valores adequados (coeficiente de variação < 10%), enquanto a precisão intermediária não foi satisfatória devido ao fato da utilização de uma outra fibra no procedimento. Os valores de recuperação variaram de 62,2 à 124,7%. O método otimizado e validado foi empregado para avaliar a composição química do café conilon em diferentes perfis de torra (clara, média e escura), granulometria (peneira de 13 e 16 polegadas) e tempos de maturação em amostras comerciais. Foi observado que dentre os parâmetros avaliados, o método apresenta-se viável, além de ser simples e não utilizar solventes. Em amostras comerciais de torra clara, foi possível identificar esses compostos, ao contrário de amostras comerciais com torra escura, possivelmente devido a degradação dos mesmos. Para a análise de componentes principais, verificou-se a

influência dos compostos voláteis sobre os perfis de torra, granulometria e tempo de maturação, além de mostrar dentre eles, quais são odorantes potentes de impacto no aroma. Com o presente trabalho, um café com voláteis de melhor qualidade pode ser adquirido através dos parâmetros de torra escura, peneira de 16 polegadas e tempo de maturação média.

Palavras-chave: HS-SPME-GC-MS. Análise de Componentes Principais. *Coffea canephora* PIERRE ex Froehner. Odorantes potentes de impacto.

## ABSTRACT

DUTRA, Mayara Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2019. **Influence of maturation, granulometry and tower on the volatile composition of conilon coffee.** Advisor: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-advisor: André Fernando de Oliveira.

The parameters, aroma and taste, characteristic of coffee assist in the evaluation of its quality. Taste is an easier sensory attribute to evaluate, as coffee is usually classified qualitatively as sweet, salty, bitter and sour. The evaluation of the aroma attribute is more complex, since coffee may have numerous volatile compounds that may vary depending on the type, maturity stage and coffee roasting. To study the effect of roasting on coffee aroma, this work evaluated the volatile compounds present in a conilon coffee (*Coffea canephora PIERRE ex Froehner*), in relation to different roasting, grain size and maturation profiles. To evaluate the volatile profile of coffee, the method involving solid phase microextraction in headspace mode (HS) and mass spectrometry coupled gas chromatographic analysis (HS/SPME-GC-MS) was optimized and validated. In the optimization, a factorial design 2<sup>2</sup> with central point (n = 3) in triplicate was employed to determine the temperature and extraction time parameters. In the optimized method, 1.0 g of roasted and ground coffee are heated in a hermetically sealed bottle at 70° C for 30 min for the extraction of volatiles using a DVB/CAR/PDMS fiber. In the validation, the factors considered were selectivity, linearity, precision and accuracy. With the exception of the concentration of 10 mg L<sup>-1</sup> for 4-ethylguaiacol and 7.0 mg L<sup>-1</sup> for Furfurilpirrol and 4-ethylguaiacol, repeatability was adequate (coefficient of variation <10%), while intermediate precision was not satisfactory due to the use of another fiber in the procedure. Recovery values ranged from 62.2% to 124.7. The optimized and validated method was applied to evaluate the chemical composition of conilon coffee in different roasting profiles (light, medium and dark), grain size (13 and 16 inch sieve) and maturation times in commercial samples. It was observed that among the evaluated parameters, the method is viable, besides being simple and not using solvents. In commercial samples of light roasting, it was possible to identify these compounds, as opposed to commercial samples with dark roasting, due to their degradation. For the principal component analysis, it was verified the influence of volatile compounds on the roasting profiles, granulometry and maturation time, and showed among them, which are potent impact odorants. With the

present work, a better quality volatile coffee can be purchased through dark roasting parameters, 16 inch sieve and average maturation time.

Keywords: HS-SPME-GC-MS. Principal component analysis. *Coffea canephora* *PIERRE ex Froehner*. Powerful impact odorants.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Amostras de café com três perfis de torra: claro, médio e escuro.....	33
<b>Figura 2:</b> Esquema do sistema empregado para extração dos compostos dos voláteis de café.....	34
<b>Figura 3:</b> Padrão de hidrocarbonetos (C <sub>8</sub> – C <sub>23</sub> ) com seus respectivos tempos de retenção.....	37
<b>Figura 4:</b> Cromatograma da amostra de café sem adições dos padrões. Tempos de Retenção (T <sub>R</sub> ) para (1) 2-metilpirazina (T <sub>R</sub> = 5,50 min), (2) furfural (T <sub>R</sub> = 5,90 min), (3) 2,5-dimetilpirazina (T <sub>R</sub> = 9,40 min), (4) 5-metilfurfural (T <sub>R</sub> = 12,2 min), (5) furfurilpirrol (T <sub>R</sub> = 23,7 min), (6) 4-etilguaiacol (T <sub>R</sub> = 28,3 min).....	41
<b>Figura 5:</b> Cromatogramas das amostras de café com 1 g (A) e 3 g (B).....	42
<b>Figura 6.</b> Efeitos dos fatores de tempo e temperatura, oriundos dos gráficos de paretos, sobre a extração de compostos voláteis de café por HS/SPME-GC-MS. Ácido piridinapropanóico; 2-metilpirazina; 2-etil-6-metilpirazina; 2-etil-3-metilpirazina; 5-metilfurfural; 2,3,5-trimetilpirazina; Álcool furfuril; Tetrametilpirazina; 3-etil-2,5-dimetilpirazina; Trietilfosfato; Furfurilpirrol; 4-etenilguaiacol; 2,3-dimetilpirazina; 1-acetiloxi-2-propanona; Furfural; 2-etilpirazina; 2,6-dimetilpirazina; 2,5-dimetilpirazina.....	44
<b>Figura 7:</b> Cromatograma da mistura de 12 amostras com diferentes perfis de torra, granulometria e tempos de maturação com adição de padrões.....	46
<b>Figura 8.</b> Gráficos de Resíduos para as curvas analíticas feitas em amostras de café com adição de padrão nas concentrações de 4,0; 5,5; 7,0; 8,5 e 10,0 mg L <sup>-1</sup> para 2-metilpirazina (A), Furfurilpirrol (B) e 4-etilguaiacol (C) e nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L <sup>-1</sup> para furfural (D), 5-metilfurfural (E) e 2,5-dimetilpirazina (F).....	49
<b>Figura 9.</b> Análise dos Compostos Principais de amostras de café com diferentes perfis de torra. TE: Torra Escura, TM: Torra Média e TC: Torra Clara.....	57
<b>Figura 10.</b> Análise dos Compostos Principais de amostras de café em diferentes classificações por peneiras. P13: Peneira 13 polegadas e P16: Peneira 16 polegadas.....	58
<b>Figura 11.</b> Análise dos Compostos Principais de amostras de café em diferentes tempos de maturação. M: Médio e P16: Tardio.....	59
<b>Figura 12.</b> Análise dos Compostos Principais de amostras de café em diferentes tempos de maturação.....	60

**Figura 13.** Valores de Loading para cada composto obtido com os diferentes perfis de torra, granulometria e tempos de maturação.....61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Padrões e suas características físico-químicas.....	30
<b>Tabela 2:</b> Planejamento fatorial $2^2$ com ponto central ( $n=1$ ) em triplica (ensaios 5,6 e 7) aplicado na otimização da SPME de amostras de café com duas variáveis e os códigos.....	34
<b>Tabela 3:</b> Índice de Kovats para os compostos voláteis encontrados nas amostras de café com diferentes perfis de torra, granulometria e tempo de maturação.....	40
<b>Tabela 4:</b> Compostos voláteis selecionados para avaliar a otimização dos parâmetros tempo e temperatura de extração.....	43
<b>Tabela 5:</b> Áreas dos compostos de uma mistura das 12 amostras sem e com adição dos padrões em amostras de café 2-metilpirazina, furfural, 2,5-dimetilpirazina, 5-metilfurfural, furfuralpirrol e 4-etilguaiacol.....	47
<b>Tabela 6:</b> Equações lineares e Coeficientes de Correlação para os padrões 2-metilpirazina, furfural, 2,5-dimetilpirazina, 5-metilfurfural, furfuralpirrol e 4-etilguaiacol.....	47
<b>Tabela 7:</b> Concentrações para os compostos 2-metilpirazina, furfural, 2,5-dimetilpirazina, 5-metilfurfural, furfuralpirrol e 4-etilguaiacol na mistura de 12 amostras com diferentes perfis de torra, granulometria e tempos de maturação.....	50
<b>Tabela 8:</b> Coeficientes de Variação obtidos pela análise de uma mistura de 12 amostras de café conilon com diferentes perfis de torra, granulometria e tempos de maturação, fortificadas em três concentrações em ensaios intra-dia.....	51
<b>Tabela 9:</b> Coeficientes de Variação obtidos pela análise de uma mistura de 12 amostras de café conilon com diferentes perfis de torra, granulometria e tempos de maturação, fortificadas em três concentrações em ensaios inter-dia.....	53
<b>Tabela 10:</b> Porcentagens de Recuperação obtidos pela análise da matriz café em três distintas concentrações por adição de padrão em ensaios intra-dia.....	54
<b>Tabela 11:</b> Áreas dos compostos presentes na amostra de café tradicional com e sem adição de padrões na concentração de $7,0 \text{ mg L}^{-1}$ para 2-metilpirazina, furfuralpirrol e 4-etilguaiacol e $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ para furfural, 5-metilfurfural e 2,5-dimetilpirazina.....	55
<b>Tabela 12:</b> Áreas dos compostos presentes na amostra de café extraforte com e sem adição de padrões na concentração de $7,0 \text{ mg L}^{-1}$ para 2-metilpirazina, furfuralpirrol e 4-etilguaiacol e $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ para furfural, 5-metilfurfural e 2,5-dimetilpirazina.....	55
<b>Tabela 13:</b> Tabela de Contingência $2 \times 2$ para avaliar a diferença de peneiras aplicadas as amostras de café.....	58

<b>Tabela 14:</b> Tabela de Contingência 2 x 2 para avaliar a diferença de tempo de maturação das amostras de café.....	59
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ABIC – Associação Brasileira da Indústria de Café

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

DVB/CAR/PDMS - *Divenylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane*

INCAPER – Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

HS – *Headspace*

SCAA – Associação Americana de Cafés Especiais

LAPC – Laboratório de Análise e Pesquisa em Café

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

SPME – Microextração em Fase Sólida

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. O CAFÉ NA ECONOMIA DO BRASIL E DO ESPÍRITO SANTO .....	19
2.2. CAFÉ CONILON: ORIGEM, DESENVOLVIMENTO E MERCADO.....	19
2.3. PROCESSOS DE TORRA DO CAFÉ.....	21
2.4. COMPOSTOS VOLÁTEIS .....	22
2.4.1. Fenóis .....	23
2.4.2. Furanos.....	23
2.4.3. Pirazinas .....	24
2.4.4. Pirróis.....	24
2.5. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO EMPREGADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS .....	24
2.6. CROMATOGRAFIA GASOSA .....	26
3. OBJETIVO.....	28
3.1. OBJETIVO GERAL.....	28
3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO .....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1. REAGENTES .....	29
4.2. INSTRUMENTAÇÃO .....	31
4.3. AMOSTRAS.....	32
4.4. EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO CAFÉ EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA POR HEADSPACE (HS/SPME) .....	33
4.4.1. Otimização do método de HS/SPME .....	33
4.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	35
4.5.1. Seletividade .....	35
4.5.2. Linearidade .....	35
4.5.3. Limites de Detecção e Quantificação.....	35
4.5.4. Precisão .....	36
4.5.5. Exatidão .....	36
4.6. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS POR ÍNDICE DE KOVATS .....	37
4.7. ANÁLISE DE AMOSTRAS DE CAFÉS COMERCIAIS .....	38
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA DE AMOSTRAS COM DIFERENTES PERFIS DE TORRA, GRANULOMETRIA E TEMPOS DE MATURAÇÃO.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	38
5.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA .....	38
5.2. OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE HS-SPME.....	41
5.2.1. Determinação da Massa de Café para a análise de compostos voláteis pela Técnica de HS-SPME .....	41
5.2.2. Otimização dos Parâmetros Tempo e Temperatura para Extração dos Voláteis pela Técnica de HS-SPME.....	43
5.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	45
5.3.1. Seletividade .....	46

5.3.2. Linearidade .....	47
5.3.3. Limites de Detecção e Quantificação .....	50
5.3.4. Precisão .....	51
5.3.5. Exatidão .....	54
5.3.6. Aplicação do Método.....	55
5.4. CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DO CAFÉ CONILON EM DIFERENTES PERFIS DE TORRA, GRANULOMETRIA E TEMPOS DE MATURAÇÃO POR CROMATOGRAFIA GASOSA .....	56
5.4.1. Análise de Componentes Principais em amostras de Café com Diferentes Perfis de Torra, Granulometria e Tempos de Maturação .....	56
6. CONCLUSÕES.....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65
8. ANEXOS.....	76

# 1. INTRODUÇÃO

No século XVIII, o café surgiu no Brasil ao ter suas primeiras mudas vindas da Guiana Francesa. Depois começou a ser cultivado no Rio de Janeiro e um novo ciclo econômico iniciava-se na história do país. Penetrando pelo vale do rio Paraíba, se disseminou e atingiu o estado de São Paulo, que passou a ser o maior produtor nacional a partir da década de 1880. No término do século XIX, o Brasil controlava o mercado cafeeiro mundial (ABIC, 2018).

Os grãos de café são as sementes de um arbusto perene pertencente à família *Rubiaceae* e ao gênero *Coffea*. As duas espécies de importância comercial são a *Coffea arabica* Linn. e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, conhecidas como café arábica e conilon, respectivamente (CLARKE *et al.*, 1985; CONAB, 2014). Porém, como acontece com a produção mundial, o café arábica corresponde a mais de 70% da produção brasileira (CONAB, 2014).

O sabor e aroma presentes em uma xícara de café conduziu essa bebida a uma popularidade e apreciação em escala mundial. As duas características são imprescindíveis e ligadas diretamente à sua qualidade, sendo o aroma mais complexo e formado por um conjunto de vários compostos voláteis, os quais são gerados basicamente durante a torra do café (MARIA *et al.*, 1999; MOREIRA *et al.*, 2000; RODARTE, 2008). Essa etapa influencia no perfil dos voláteis, os quais são gerados por várias reações químicas, além da dependência dos parâmetros de temperatura e tempo de torra (GETACHEW *et al.*, 2019).

Há uma constante busca pela melhoria da qualidade do café e pela compreensão de como o processo de torra pode influenciar nos compostos voláteis produzidos. Neste sentido, este trabalho tem como objetivo avaliar os compostos voláteis produzidos por amostras de café conilon com diferentes perfis de torra, granulometria e tempos de maturação, empregando a microextração em fase sólida no modo *headspace* e análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O café na economia do Brasil e do Espírito Santo

O café é um produto de grande riqueza em nível mundial que garante a geração de muitos empregos e possui importância na economia. Em relação a sua produção e exportação, o Brasil se destaca por ser o primeiro nessa categoria, com uma área de 2 milhões de hectares, distribuída em 12 estados, os quais possuem grande variedade de climas, relevos, altitudes e latitudes. Deste modo, o país produz uma diversidade de grãos, possibilitando atender um público variado (MAPA, 2018).

Toda essa potência pode ser vista em números: 35,230 milhões de sacas de café foram exportadas em 2018, para 123 países, correspondendo a US\$ 5,09 bilhões de receita cambial com preço médio de US\$ 144,53 por saca, conforme ABIC (2019).

Em relação ao estado do Espírito Santo, o cultivo iniciou-se no século XIX, no entanto, só na metade mesmo século que obteve produções significativas (FONSECA *et al.*, 2015). Com o decorrer dos anos, a cafeicultura se consolidou no estado e hoje é a principal atividade agrícola do estado, desenvolvida em todos os municípios, exceto na capital. Sendo assim, o Espírito Santo é o 2º maior produtor brasileiro de café com 131 mil famílias produtoras, responsável por 22% da produção nacional. Cerca de 400 mil empregos são gerados devido este produto no estado (INCAPER, 2019).

### 2.2. Café Conilon: Origem, Desenvolvimento e Mercado

O café é originário da África, sendo o *Coffea canephora* vindo do Congo e introduzido no Brasil pelo estado do Espírito Santo. É conhecido como Robusta e Conilon e possui uma ampla variedade, além de ser uma espécie de fecundação cruzada, rústica, tolerante a várias doenças e adapta a condições de clima tropical (temperaturas mais elevadas) e solo de baixa altitude (FERRÃO *et al.*, 2017). Entre outras características, pode-se destacar a perenidade dessa espécie, longos ciclos produtivos e reprodutivos e efeito da bienalidade de produção (que é caracterizado pela variação dos anos com alta e baixa produção) (CARIAS *et al.*, 2014).

No cafeeiro, o desenvolvimento reprodutivo começa com a florada, depois há a formação dos chumbinhos (estágio inicial de desenvolvimento do café), pela

expansão dos grãos, até seu tamanho normal e, em seguida, ocorre a granação (formação) dos frutos e a fase de maturação. Esta última, ocorre entre o período de floração e o amadurecimento dos frutos, ela pode variar de acordo com o genótipo e com as condições climáticas e ainda ser dividida conforme os números de dias. Para o *Coffea canephora* as plantas podem apresentar ciclos de maturação: precoce (240 dias), intermediárias (270 dias), tardias (300 dias) e extremamente tardias (330 dias) (PEZZOPANE *et al.*, 2003; DE SOUZA, 2017).

O processo de maturação dos frutos é complexo, envolvendo diversas vias metabólicas que resultam não somente da alteração de pigmentação e da consistência dos frutos, mas também da modificação do metabolismo de açúcares, ácidos orgânicos, proteínas e de compostos oriundos do metabolismo secundário que influenciam diretamente nas características organolépticas do café (ROGERS *et al.*, 1999; DE CASTRO *et al.*, 2006).

Para obter um café conilon de qualidade, uma maneira de melhoramento genético desenvolvido pelo Incaper são as variedades clonais, as quais são formadas pelo agrupamento de um conjunto de clones superiores e compatíveis entre si. Entre esses cultivares têm-se Jequitibá ES8122 e Centenária ES8132, obtidas por diferentes estratégias de melhoramento e um conjunto de dados de experimentos conduzidos nas Fazendas Experimentais do Incaper de Marilândia, Sooretama e Bananal do Norte, que representam macroambientes representativos de cultivo do café conilon das regiões do Espírito Santo (INCAPER, 2013; FERRÃO *et al.*, 2017).

Cada um desses dois cultivares, lançados em 2013, foram obtidos pelo agrupamento de nove clones compatíveis entre si, sendo o Jequitibá ES8122 de maturação intermediária e com colheita no mês de junho, enquanto Centenária ES8132 de maturação tardia tendo colheita em julho (FERRÃO *et al.*, 2017).

De acordo com FAGAN e colaboradores (2011), o tempo de maturação é um fator que influencia intimamente a qualidade do café, visto que para grãos com menor tempo de formação, mais baixa é a concentração de ácido quínico, que por sua vez, é precursor do ácido clorogênico. Este último ácido, gera compostos voláteis, dentre os quais o 4-etilguaicol, que é fundamental para a qualidade do café (RIBEIRO *et al.*, 2009; CAPORASO *et al.*, 2018).

Com relação a sua granulometria, o café pode ser subdividido em subcategorias, de acordo com o formato dos grãos (“chatos” ou “moca”), que por sua vez, são separados em função de seu tamanho, de acordo com as peneiras em que

ficam retidos. O objetivo da separação por peneira é garantir uma uniformidade dos grãos, pois ao apresentar distintos tamanhos, o processo de torra acontece de maneira desigual, comprometendo, deste modo, a qualidade do café (FERRÃO *et al.*, 2017).

As etapas de produção do café estendem-se da colheita até a bebida, e podem ser descritas da seguinte forma: a colheita (manual ou mecanizada) seguida do processamento (via seca ou úmida), onde ocorre a limpeza e separação dos grãos cerejas dos demais (verdes, secos entre outros). Logo após, tem a secagem e, em seguida o beneficiamento, que é a eliminação do endocarpo do grão. Posteriormente, o grão passa pelo processo de torra e moagem, estando pronto para o consumo (SILVA *et al.*, 1999).

Com relação ao mercado, o café conilon apresenta menor preço que o café arábica, sendo empregado em misturas e na indústria de café solúvel, o que permite uma boa visibilidade no mercado internacional. Sua produção no Brasil vem principalmente do estado do Espírito Santo, com cerca de 75% da produção nacional (RIBEIRO *et al.*, 2014; INCAPER, 2019).

As exportações de café conilon no período de janeiro a maio de 2019 atingiram 1,15 milhão de sacas, as quais representam aumento bem significativo em relação ao mesmo período de 2018, cujo volume exportado foi de 221,96 mil sacas (EMBRAPA, 2019).

### **2.3. Processos de Torra do Café**

O processo de torra consiste em aplicar calor considerável aos grãos, mantendo-os em movimento para assegurar processamento uniforme, até que sua cor atinja o tom desejado de marrom, sendo rapidamente resfriado por uma corrente de ar com ou sem a ajuda de um spray de água. Essa etapa é precursora das características sensoriais típicas do café, as quais são influenciadas pelo tipo de torrador, temperatura, tempo e método de torração (CLARKE *et al.*, 1985; GABRIEL-GUZMÁN *et al.*, 2017).

Durante a torra, a mudança da coloração do grão ocorre devido reações químicas e uma classificação é designada pelos termos clara, média e escura, sendo a cor obtida no final do processo um parâmetro de monitoramento (MENDES *et al.*, 2001; FRANCA *et al.*, 2009).

A torra é complexa e inicia-se com perda de água livre do grão a uma temperatura em torno de 100 °C, através da transferência de calor por ar aquecido. Em seguida, a composição química dos grãos é modificada, devido à várias reações pirolíticas complexas, resultando na formação de substâncias referentes ao aroma e sabor, além de perda de matéria seca (dióxido de carbono). Na fase final, há um resfriamento rápido, usando ar ou água (VILAS BOAS *et al.*, 2001; BUFFO *et al.*, 2004). As reações químicas que ocorrem durante a pirólise são: degradação de polissacarídeos, açúcares, aminoácidos e ácidos clorogênicos, a reação de *Maillard* e *Strecker* (Figura 1). É importante ressaltar que as concentrações de cafeína e lipídeos suportam esse tratamento térmico sem sofrer alterações (GOMES, 1997).

No café conilon, foi relatado por NASCIMENTO e colaboradores (2007), que diferentes perfis de torra também apresentam distintos compostos de impacto no aroma. Uma vez que, a soma das atividades odoríficas dos compostos encontrados no café conilon na torra clara é superior comparado aos outros graus de torra. A presença do composto  $\beta$ -damascenona (aroma de frutas, flores e de chá) em maior concentração é responsável por essa característica.

#### **2.4. Compostos voláteis**

O aroma tem um papel fundamental na qualidade do café, sendo considerado por muitos como sua impressão digital. Ele é formado por uma mistura extremamente complexa de vários compostos voláteis que apresentam qualidade e concentrações diferentes. São oriundos, em grande parte, de compostos não voláteis encontrados no grão cru, incluindo açúcar, aminoácidos, lipídios, trigonelina, ácido clorogênico e carotenoides (CLARKE *et al.*, 1985).

Mais de 1000 compostos voláteis foram identificados no café torrado, os quais estão compreendidos entre várias classes: aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres, pirazinas, furanos, ácidos, compostos contendo nitrogênio e compostos fenólicos voláteis. Alguns desses compostos são citados a seguir (PEREIRA *et al.*, 2019).

A qualidade do café é dependente dos compostos voláteis oriundos deste grão. Isso ocorre, devido ao fato de alguns desses odores estarem intensamente ligados ao sabor do café e ampliarem o número de compostos chave responsáveis por esse sabor (BLANK *et al.*, 1992).

Para descrever melhor a formação de alguns compostos voláteis, certas reações devem ser descritas, como a reação de *Maillard* que é representada por numerosas reações, que ocorrem principalmente durante o aquecimento e armazenamento prolongado de alimentos, resultando em modificações na sua qualidade (FRANCISQUINI *et al.*, 2017).

Outra reação de destaque seria a degradação de *Strecker*, a qual ocorre durante a reação de *Maillard* e é uma fonte frequentemente citada de importantes constituintes voláteis dos sabores dos alimentos (RIZZI, 2008).

#### **2.4.1. Fenóis**

As quantidades de fenóis dependem do grau de torra e a espécie de café. Para o café conilon e torras mais intensa os compostos fenólicos apresentam-se em maiores quantidades. Os compostos que se destacam por suas maiores quantidades são o 4-vinil-guaiacol, o guaiacol e o fenol (CLARKE *et al.*, 1985; MOREIRA *et al.*, 2000).

Tratando-se de suas características sensoriais, há uma variedade considerada, sendo responsáveis pelo odor de matéria queimada, especiarias, cravo, fumo e, também, pela sensação de amargor e adstringência encontrada no café (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

#### **2.4.2. Furanos**

No café torrado, os furanos são derivados de açúcares e terpenos sendo encontrados em quantidades abundantes nesse tipo de matéria prima. Cerca de 100 compostos furânicos já foram identificados em café, com grupos funcionais como: aldeídos, cetonas, ésteres, álcoois, éteres, ácidos e tióis (CLARKE *et al.*, 1985; DE MARIA *et al.*, 1999).

Estes constituintes contribuem bastante para o aroma da bebida e apresentam odores de grama, éter, material queimado, caramelo, açúcar queimado, e outros (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

### 2.4.3. Pirazinas

As pirazinas são compostos característicos de alimentos submetidos a tratamento térmico, os quais existem em grande quantidade no aroma, porém em torras prolongadas ocorre sua degradação, sendo características de torras claras e médias (CLARKE *et al.*, 1985; FLAMENT, 2002).

As pirazinas apresentam características sensoriais em que predominam o aroma de grama ou matéria queimada. Normalmente são oriundas da reação *Maillard*, da degradação de *Strecker* ou da pirólise de hidroxiaminoácidos. Os compostos presentes em maior concentração no café torrado são metilpirazina, 2,6-dimetilpirazina, 2,5-dimetilpirazina, 2-etilpirazina, trimetilpirazina, 2-etil-5-metilpirazina, pirazinas e 2,3-dimetilpirazina. As alquilpirazinas de maior massa molecular também estão presentes, mas em concentrações mais baixas (CLARKE *et al.*, 1985; DE MARIA *et al.*, 1999; NASCIMENTO *et al.*, 2007).

### 2.4.4. Pirróis

Os pirróis são compostos encontrados em alimentos que sofreram tratamento térmico e à medida que a torra prossegue, a quantidade de pirróis aumenta, sendo, em função disto encontrado em maior proporção em café com torra escura. Além da temperatura, o tipo de pirrol depende de fatores como pH e tempo e seus aromas transmitem cheiros doces, amargos e torrados (CLARKE *et al.*, 1985; FLAMENT, 2002).

Os pirróis são provenientes da reação de *Maillard*, degradação de *Strecker*, pirólise de aminoácidos ou pela degradação da trigonelina (NASCIMENTO *et al.*, 2007). Os compostos encontrados em maior quantidade são o N-furil-2-formilpirrol e o N-metil-2-acetilpirrol (DE MARIA *et al.*, 1999).

Outras classes de compostos podem ser encontradas no café torrado, no entanto, os compostos citados apresentam-se em maior quantidade e com destaque para o estudo realizado.

## 2.5. Técnicas de extração empregadas para a determinação de compostos voláteis

Algumas técnicas são utilizadas para extração de voláteis como a extração-destilação simultânea (SDE), a extração sortiva em barra de agitação (SBSE) e a microextração em fase sólida (SPME). A extração-destilação simultânea combina a destilação a vapor com a extração simultânea dos voláteis em uma quantidade de solvente orgânico imiscível em água (WEI *et al.*, 2009). Em condições adequadas obtêm um enriquecimento mais alto e a análise direta do extrato pode ser realizada sem concentração adicional, além de não ser necessário a limpeza da amostra (TEIXEIRA *et al.*, 2007). Análises de voláteis para o café arábica foram feitas por essa técnica (FIGUEROA *et al.*, 2012). A extração sortiva em barra de agitação é uma técnica pouco custosa e de fácil manipulação, além de combinar simultaneamente a microextração e a concentração dos analitos em um passo único, podendo ser utilizada no modo de imersão ou por *headspace*. Também tem como vantagem, robustez e boa sensibilidade (BORGES *et al.*, 2015). BICCHI e colaboradores (2002) utilizou esta técnica para análises de voláteis em café arábica.

A microextração em fase sólida é uma das técnicas mais utilizadas para análise de voláteis em alimentos (JELEN *et al.*, 2012), sendo, portanto, escolhida para a realização deste trabalho. A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica de preparo de amostras que captura os analitos através de uma fibra de sílica fundida, revestida externamente com uma fase estacionária que varia de acordo com a análise. A fibra é introduzida no septo do recipiente contendo a amostra e exposta ao meio onde ocorrerá a extração com posterior dessorção térmica no injetor de um cromatógrafo a gás ou por solventes líquidos na cromatografia líquida (KATAOKA *et al.*, 2000; LAMBROPOULOU *et al.*, 2007). Essa técnica elimina possíveis efeitos de matriz, permite a extração simultânea e a pré-concentração de analitos (ZAMBONIN *et al.*, 2005). Além disso, analisa compostos relativamente voláteis para uma grande variedade de matrizes: plantas (FUNG *et al.*, 2019), vinho (TUFARIELLO *et al.*, 2019), sangue (SAITO *et al.*, 2019), queijo (BEZERRA *et al.*, 2016), água (VALENTE *et al.*, 1998), café (PETISCA *et al.*, 2013) entre outras.

Os principais modos de aplicação da SPME são a extração no modo direto, em que a fibra é introduzida diretamente na amostra e extração no modo *headspace* (HS). A análise do HS envolve a amostragem da fase vapor em equilíbrio com a matriz de interesse. As vantagens dessa técnica são rapidez, simplicidade, dispensa o uso de solventes extratores e manipulação excessiva de amostra, além de conferir maior

durabilidade à fibra por não entrar em contato com a amostra (HELENO *et al.*, 2010; PRATES *et al.*, 2011; CLARKE *et al.*, 1985).

A escolha da fibra para SPME é fundamental para o bom desempenho experimental, por isso, o tipo de fibra é o primeiro parâmetro a ser avaliado (PETISCA *et al.*, 2013; BICCHI *et al.*, 2002). Por exemplo, TUFARIELLO e colaboradores (2019) avaliaram 4 tipos de fibra para análise de voláteis em vinho: 100 µm PDMS, 65 µm PDMS/DVB, 75 µm CAR/PDMS, 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, sendo esta última escolhida para realizar a análise, devido a apresentar melhores parâmetros como reprodutibilidade, valores de equilíbrio e tempo de extração.

Para esta pesquisa, a fibra *Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane* (DVB/CAR/PDMS), também foi escolhida, por ter sido empregada com sucesso para análise de voláteis de café em outros trabalhos (BICCHI *et al.*, 2002; LÓPEZ-GALILEA *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2017; PINHEIRO, 2018). Além disso, esta fibra possui uma composição trifásica, a qual fornece altas recuperações para analitos com diferentes estruturas e polaridades.

## 2.6. Cromatografia Gasosa

Essa é uma das mais importantes técnicas analíticas disponível na atualidade e é a principal para separação e determinação de compostos voláteis e/ou volatilizáveis graças as suas características. Dentre suas vantagens estão o seu alto poder de resolução, baixos limites de detecção, além de ser uma excelente técnica quantitativa (COLLINS *et al.*, 2006; PENTEADO *et al.*, 2008).

Para identificar e quantificar compostos voláteis, utiliza-se, cada vez mais, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, com destaque na área de alimentos: vinho (FERNADES *et al.*, 2018), queijo (BEZERRA *et al.*, 2016), cerveja (KLEJDUS, *et al.*, 2014), banana (CAPOBIANGO *et al.*, 2016), café (BICCHI *et al.*, 2002), entre outros. Muitos estudos têm empregado a SPME junto à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para a análise de compostos voláteis em café (BICCHI *et al.*, 2002; ZAMBONIN *et al.*, 2005; BASSOLI, 2006; LÓPEZ-GALILEA *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2017; CAPORASO *et al.*, 2018; VELÁSQUEZ, 2019), oferecendo resultados satisfatórios para a pesquisa, como o trabalho de IAMANAKA e colaboradores (2014), onde seu o objetivo foi a investigação da influência dos compostos voláteis, produzidos por fungos, na qualidade do

sensorial do café. Eles obtiveram resultados satisfatórios devido aos fungos utilizados impactarem positivamente as características sensoriais e isso pôde ser confirmado com a presença de certos compostos voláteis, como octan-3-ona (odor a ervas) e pentadecan-2-ona (aroma floral), 2-octenal e decanal, que são caracterizados por sabores cítricos, frescos e cetonas, como nonan-2-ona, non-3-en-2-ona, undecan-2-ona, que são caracterizados por aroma frutado.

## **3. OBJETIVO**

### **3.1. Objetivo Geral**

Determinar os compostos voláteis nas amostras de café com diferentes perfis de torra, granulometria e tempo de maturação por HS-SPME-GC-MS otimizado e validado.

### **3.2. Objetivo Específico**

- Otimizar e validar o método de HS-SPME-GC-MS para os compostos voláteis do café;
- Aplicar o método desenvolvido em amostras comerciais;
- Efetuar análises estatísticas de amostras de café com diferentes perfis de torra, maturação e granulometria.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

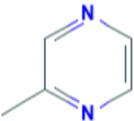
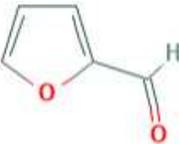
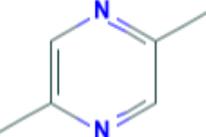
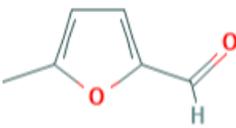
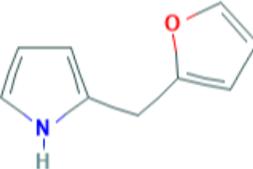
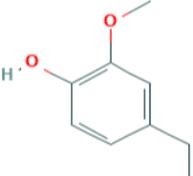
### 4.1. Reagentes

Os padrões utilizados para a validação foram:

- 2,5-dimetilpirazina,  $\geq 98,5\%$  – Sigma-Aldrich (EUA);
- 5-metilfurfural,  $\geq 98,5\%$  – Sigma-Aldrich (China);
- 2-metilpirazina,  $\geq 99\%$  – Sigma-Aldrich (China);
- furfural,  $\geq 98,5\%$  – Sigma-Aldrich (EUA);
- furfuralpirrol,  $\geq 98\%$  – Sigma-Aldrich (China);
- 4-etilguaiacol,  $\geq 98\%$  – Sigma-Aldrich (China);

As soluções foram preparadas em água destilada nas concentrações 100 mg L<sup>-1</sup> para todos os padrões, com sucessivas diluições e condicionadas em geladeira (Eletrolux) à temperatura entre 4 °C. A tabela 1, apresenta as características físico-química dos padrões.

Os padrões de hidrocarbonetos pertencem à Sigma-Aldrich (Brasil), referência do produto: 49452-U

PADRÕES	FÓRMULA ESTRUTURAL	Massa Molar/ (g mol <sup>-1</sup> )	Densidade/ (g cm <sup>-3</sup> )	Temperatura de Ebulição/°C
2-METILPIRAZINA		94,11	1,030	135
FURFURAL		96,08	1,159	162
2,5-DIMETILPIRAZINA		108,14	0,990	152
5-METILFURFURAL		110,11	1,107	187
FURFURILPIRROL		147,18	1,081	76
4-ETILGUAIACOL		152,19	1,063	234

**Tabela 1:** Padrões e suas características físico-químicas.

**Fonte:** Sigma-Aldrich

## 4.2. Instrumentação

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás da marca Shimadzu QP Plus 2010, acoplado a um detector de espectrometria de massas Shimadzu QP Plus 2010.

As condições cromatográficas foram:

- Coluna capilar, modelo Rtx-5MS (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano) da Restek (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme);
- Temperatura do injetor: 250 °C;
- Temperatura do detector: 300 °C;
- Temperatura de Interface: 240 °C;
- *Split*: 1/10.

O programa de aquecimento da coluna foi:

40°C  $\xrightarrow{3^\circ\text{C}/\text{min}}$  125°C (1min)  $\xrightarrow{10^\circ\text{C}/\text{min}}$  245 °C (3min)

- Tempo de análise: 49,33 min;
- Gás de arraste: Hélio (White Martins,  $\geq 99\%$ );
- Vazão do gás de arraste: 1,67 mL min<sup>-1</sup>;
- Monitoramento: modo *SCAN*;
- Fonte de Ionização: impacto de elétrons 70 eV;
- Analisador: Quadrupolo.

A biblioteca utilizada foi a WILEY7 (2002) e os outros equipamentos foram utilizados, como a balança analítica (Marte), modelo AY220, um termômetro, um banho termostaticado (Marconi), um torrador da (IKAWA, modelo PRO V3) e moinho Bunn G3.

### 4.3. Amostras

As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas dos cultivares clonais da espécie *Coffea canephora* PIERRE ex Froehner na localidade de Lagoa Seca, município de Alegre - ES, região do Caparaó Capixaba, as quais encontravam-se a uma altitude de 647 m. Os experimentos foram conduzidos com genótipos melhorados de café conilon componentes das cultivares “Jequitibá ES8122” e “Centenária ES8132”, sendo o primeiro com ciclo de maturação intermediária e o segundo com ciclo de maturação tardia.

A colheita foi realizada entre julho e setembro de 2018 no período de maturação estabelecido para cada genótipo (85 a 90% frutos cerejas), sendo colhidos 6 litros de café por amostra, que foram transportados para a unidade de processamento via seca. Nela, os frutos foram secos em terreiro onde os grãos ficaram expostos ao sol, os quais foram revolvidos durante o dia para uma melhor uniformidade na secagem, atingindo um teor de umidade próxima dos 35%. Esse procedimento durou 3 dias. Em seguida, os genótipos foram conduzidos à estufa de circulação forçada até atingir uma umidade próxima a 11%.

As amostras de café com dois tipos de maturação (média e tardia) foram beneficiadas, peneiradas (peneiras de 13 e 16 polegadas, com seus crivos com tamanho de 13/64 e 16/64 polegadas, respectivamente) e realizou-se a catação dos defeitos de acordo com o protocolo da Associação Americana de Cafés Especiais – SCAA. Depois foi feita a torra das amostras no torrador IKAWA modelo PRO V3 que atua por indução, por um período de 6 min para a torra escura, 8 min para a torra média e 14 min para a torra clara, este procedimento também foi estabelecido no Laboratório de Análise e Pesquisa em Café – LAPC do Instituto Federal do Espírito Santo, campus Venda Nova do Imigrante. As amostras estão apresentadas na Figura 1.

Os compostos voláteis dessas amostras foram identificados e os seus resultados foram submetidos a uma análise estatística (Análise de Componentes Principais) para avaliar os compostos voláteis que podem influenciar na qualidade do café nas condições apresentadas.

**Figura 1:** Amostras de café com três perfis de torra: claro, médio e escuro



**FONTE:** DUTRA, 2019

#### **4.4. Extração dos Compostos Voláteis do Café Empregando Microextração em Fase Sólida por *Headspace* (HS/SPME)**

Para a análise dos compostos voláteis, a microextração em fase sólida por *headspace* foi otimizada e os seguintes parâmetros foram estabelecidos: 1 g de café torrado e moído foi adicionado em um frasco de 20 mL com tampa que possui septo de silicone faceado com teflon. Este frasco, foi posteriormente aquecido em um banho maria a uma temperatura de 70 °C juntamente com a exposição da fibra (DVB/CAR/PDMS), de 30/50 µm de espessura, por um período de 30 min. Em seguida, a fibra foi exposta no injetor do cromatógrafo a gás por 5 min para dessorção nas condições previamente já descritas (item 4.2). Os parâmetros otimizados foram tempo e temperatura de extração. A otimização do método é descrita a seguir.

##### **4.4.1. Otimização do método de HS/SPME**

Antes de definir as condições de extração dos compostos voláteis pela técnica de HS/SPME, um estudo da quantidade de massa de café a ser utilizado foi feito. As massas de 1,0 g e 3,0 g de amostras foram estudadas em triplicata, nas condições de 30 min de exposição da fibra a 70 °C. Com este parâmetro definido, um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com triplicatas do ponto central foi aplicado, variando os parâmetros tempo e temperatura de extração, totalizando 7 ensaios, com o objetivo de promover maior

extração dos compostos voláteis. O planejamento está apresentado na Tabela 2 e na Figura 2 é apresentado um esquema do sistema de extração utilizado.

Ensaio	Temperatura/°C		Tempo/min	
	Código	Valor	Código	Valor
1	+	70	+	30
2	+	70	-	10
3	-	30	+	30
4	-	30	-	10
5	0	50	0	20
6	0	50	0	20
7	0	50	0	20

**Tabela 2:** Planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central ( $n=3$ ) em triplica (ensaio 5,6 e 7) aplicado na otimização da SPME de amostras de café com duas variáveis e os códigos.

**Figura 2:** Esquema do sistema empregado para extração dos compostos dos voláteis de café



Fonte: DUTRA, 2019

## **4.5. Validação do método**

O método de microextração em fase sólida por *headspace* seguido da análise de cromatografia gasosa acoplado com espectrometria de massas otimizado para caracterização da composição volátil do café conilon foi validado para as seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade, exatidão e precisão. Foi empregado para realizar a validação o guia do órgão ANVISA, 2017.

### **4.5.1. Seletividade**

A seletividade foi avaliada por uma mistura das 12 amostras de café com distintos perfis de torra, granulometria e tempos de maturação, foi analisada por HS/SPME com e sem adição de padrões, nas quais as concentrações adicionadas foram 10,0 mg L<sup>-1</sup> para 2-metilpirazina, furfurilpirrol e 4-etilguaiacol e 5,0 mg L<sup>-1</sup> para furfural, 5-metilfurfural e 2,5-dimetilpirazina. Os picos e as áreas dos dois cromatogramas foram comparadas, para garantir que o método foi seletivo (ANVISA, 2017).

### **4.5.2. Linearidade**

A linearidade foi determinada por curvas analíticas feitas por adição de padrão, ou seja, a matriz foi fortificada com uma mistura de padrões com 5 pontos em triplicata nas concentrações de 4,0; 5,5; 7,0; 8,5 e 10,0 mg L<sup>-1</sup> para 2-metilpirazina, furfurilpirrol e 4-etilguaiacol e nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> para furfural, 5-metilfurfural e 2,5-dimetilpirazina. Depois a amostra foi submetida ao processo de extração por HS/SPME e, em seguida, analisada em cromatógrafo a gás. Avaliou-se a linearidade do método pelos coeficientes de correlação (R) e gráficos de resíduos (ANVISA, 2017).

### **4.5.3. Limites de Detecção e Quantificação**

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados pelos parâmetros da curva analítica, os quais são apresentados pelas Equações 1 e 2, respectivamente (ANVISA, 2017):

$$LD = 3,3 \frac{\sigma}{IC} \quad (\text{Equação 1})$$

$$LQ = 10 \frac{\sigma}{IC} \quad (\text{Equação 2})$$

em que,  $\sigma$  é a estimativa do desvio padrão do branco obtida pela curva analítica através da função proj.lin do Microsoft Excel e IC é a inclinação da curva analítica.

#### 4.5.4. Precisão

A precisão foi avaliada com relação à repetitividade e à precisão intermediária utilizando os valores de coeficiente de variação (%CV), Equação 3 (ANVISA, 2017):

$$\%CV = \frac{dp}{cmd} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

em que, cmd é a média das concentrações determinadas, dp é o desvio padrão

Para avaliar a repetitividade o método foi aplicado em amostras de café fortificadas, em triplicata, em 3 concentrações: 4,0; 7,0; e 10,0 mg L<sup>-1</sup> para 2-metilpirazina, furfuralpirrol e 4-etilguaiacol e 1,0; 3,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> para furfural, 5-metilfurfural e 2,5-dimetilpirazina. Os ensaios foram no mesmo dia, pelo mesmo analista, no mesmo laboratório. Já a avaliação da precisão intermediária foi feita nas mesmas condições, mas em 3 dias diferentes.

#### 4.5.5. Exatidão

Para avaliar a exatidão foi utilizado os ensaios de recuperação, em que amostras de café foram fortificadas, em triplicata, nas concentrações de 4,0; 7,0; e 10,0 mg L<sup>-1</sup> para 2-metilpirazina, furfuralpirrol e 4-etilguaiacol e 1,0; 3,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> para furfural, 5-metilfurfural e 2,5-dimetilpirazina e submetidas ao método otimizado. A porcentagem de recuperação foi calculada de acordo com a Equação 4 (ANVISA, 2017):

$$\%R = \left(\frac{C_M}{C_R}\right) \times 100\% \quad (\text{Equação 4})$$

em que,  $C_M$  é a médias das concentrações experimentais;  $C_R$  é a concentração real.

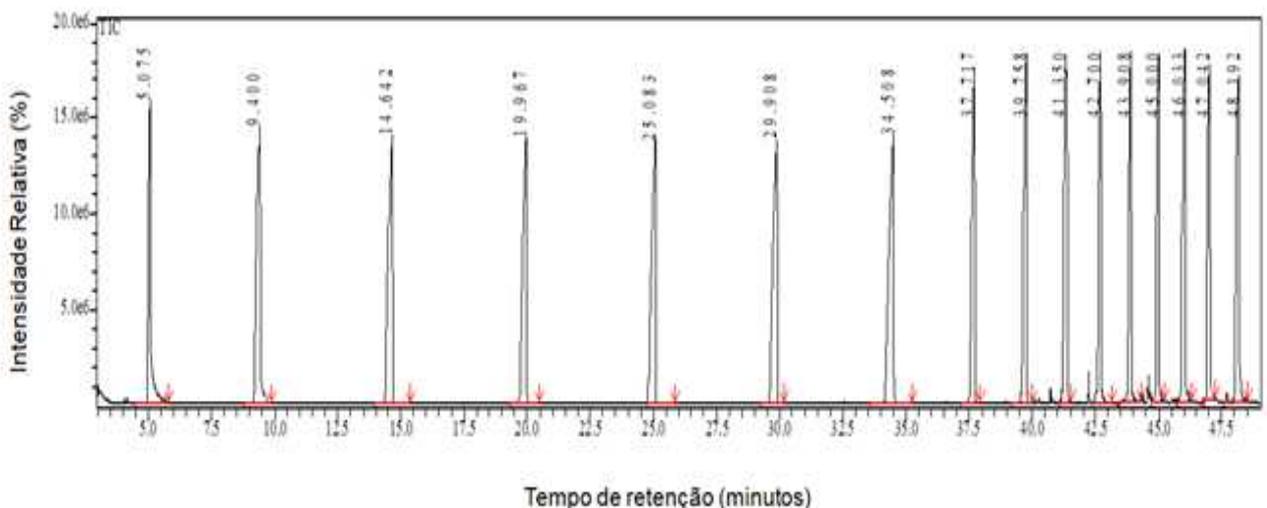
#### 4.6. Identificação dos Compostos por Índice de Kovats

O índice de Kovats representa o comportamento de retenção dos compostos de interesse de acordo com uma escala uniforme determinada por uma série e substâncias padrão estreitamente relacionadas (ZELLNER *et al.*, 2008). A escala utilizada foi uma mistura de hidrocarbonetos ( $C_8 - C_{23}$ ), a qual é representada com seus respectivos tempos de retenção na Figura 3. O cálculo do Índice de Kovats é obtido pela Equação 5:

$$IK = 100 \left[ z + \frac{(\log X_s - \log X_z)}{(\log X_{z+1} - \log X_z)} \right] \quad (\text{Equação 5})$$

em que,  $z = n^\circ$  de carbonos do alcano;  $X_s =$  tempo de retenção do analito de interesse;  $X_z =$  tempo de retenção do alcano antecessor;  $X_{z+1} =$  tempo de retenção do alcano sucessor.

**Figura 3:** Padrão de hidrocarbonetos ( $C_8 - C_{23}$ ) com seus respectivos tempos de retenção.



Os Índices de Kovats calculado e tabelado foram comparados e, para uma pequena variação (20 unidades), considerou-se a identificação do composto, a qual foi confirmada com o respectivo espectro de massa do analito.

#### **4.7. Análise de Amostras de Cafés Comerciais**

O método otimizado e validado foi aplicado em duas amostras de café de uma mesma marca com níveis de torra diferentes (tradicional e extraforte), adquiridas em estabelecimento comercial (padaria), Alegre-ES. As análises foram feitas em triplicata. Todas as análises foram feitas no laboratório Central Analítica do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo no Campus de Alegre.

#### **4.8. Análise Estatística de Amostras com Diferentes Perfis de Torra, Granulometria e Tempos de Maturação**

Amostras de café com diferentes perfis de torra, granulometria e tempos de maturação foram analisadas estatisticamente por Análise de Compostos Principais (PCA). Todos os ensaios foram feitos em triplicata, permitindo avaliar os voláteis que influenciam na qualidade do café.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **5.1. Análise Cromatográfica**

Através das condições cromatográficas descritas no item 4.2, foi possível a separação de diferentes compostos em uma corrida de 49,33 min, possuindo uma boa resolução. A amostra analisada por HS-SPME-GC-MS é uma mistura de todas as 12 amostras com diferentes perfis de torra, granulometria e tempos de maturação. Os tempos de retenção e os Índice de Kovats estão na Tabela 3.

Com a comparação dos Índice de Kovats tabelado e calculado e com as análises dos seus respectivos espectros de massas em uma faixa de 30 m/z a 700 m/z, obtidos pela biblioteca do GC-MS, foi possível a identificação de 37 compostos

voláteis na mistura das amostras de café, com concentração variada entre os mesmos. NASCIMENTO e colaboradores (2007) também encontraram alguns desses compostos pertencentes as classes pirazinas, pirróis, furanos e fenóis em café conilon.

Dentre os compostos identificados, seis foram selecionados para a validação do método (2-metilpirazina; furfural; 2,5-dimetilpirazina; 5-metilfurfural; furfurilpirrol; 4-etilguaicol), os quais são apresentados na Figura 4. Os mesmos foram selecionados para as análises devido a uns serem compostos odorantes de impacto e outros por obterem boa resposta.

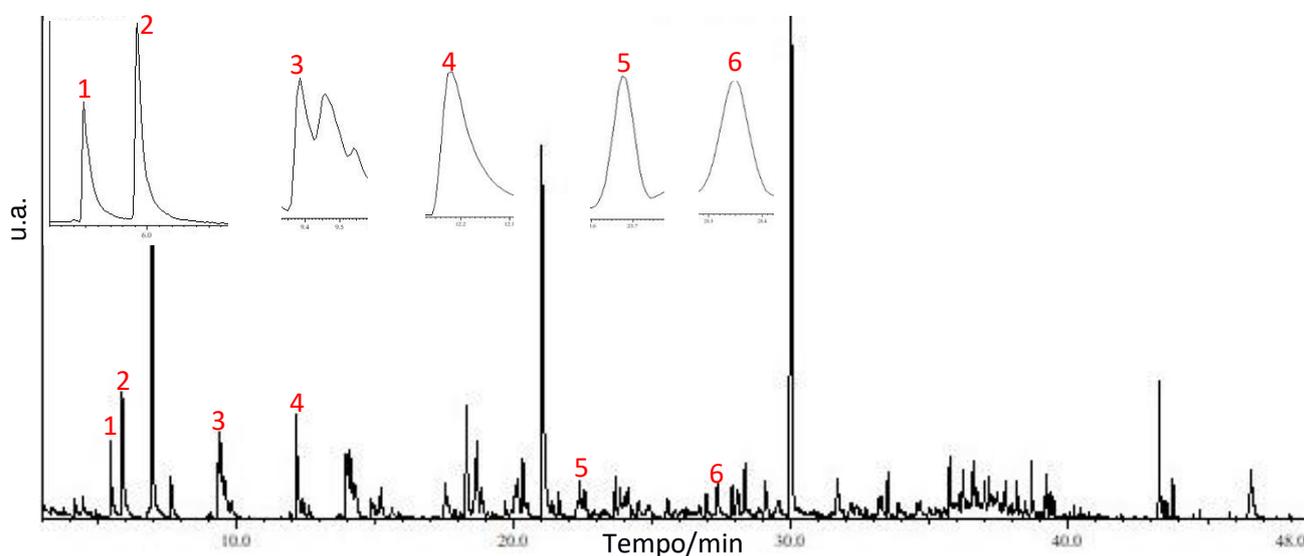
<b>Compostos</b>	<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Índice de Kovats Tabelado*</b>	<b>Índice de Kovats Calculado</b>
2-metilpirazina	5,48	819	800-815
Furfural	5,92	828	827-828
álcool furfurílico	7,00	866	854-856
1-acetiloxi-2-propanona	7,67	870	869-871
2-heptanol	9,10	894	895
2,5-dimetilpirazina	9,38	908	899-900
2,6-dimetilpirazina	9,46	909	901-902
2-etilpirazina	9,62	912	905-906
2,3-dimetilpirazina	9,84	915	910-912
Benzaldeído	12,0	952	955
5-metilfurfural	12,2	957	959-960
1-acetiloxi-2-butanone	12,6	969	967-968
acetato de furfurilo	14,0	991	991
2-etil-6-metilpirazina	14,1	1003	990-991
2-etil-5-metilpirazina	13,9	994	992-991
2,5,6-trimetilpirazina	14,2	1000	989-994
2-etil-3-metilpirazina	14,3	1002	992-995
2-formilpirrol	14,9	1008	1005-1007
2-acetilpirrol	17,5	1054	1059
3-etil-2,5-dimetilpirazina	18,3	1071	1072-1073
2-etil-3,5-dimetilpirazina	18,7	1081	1080
Guaiacol	18,9	1087	1076-1082
Tetrapirazina	18,7	1083	1078-1079
Nonanal	19,7	1100	1095-1096
2-acetil-3-metilpirazina	20,3	1095	1107-1108
Trietilfosfato	21,0	1127	1121-1123
2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-one	21,6	1134	1133
2,3-dietil-5-metilpirazina	22,3	1158	1146

3,5-dietil-2-metilpirazina	22,4	1160	1147-1148
Furfurilpirrol	23,7	1172	1170
Dodecano	24,5	1199	1184
2-Isoamil-6-metilpirazina	27,0	1242	1235-1236
salicilato de etilo	27,9	1267	1256-1257
4-etilguaiacol	28,3	1285	1267
1H-indole	29,1	1288	1282
4-vinilguaiacol	30,0	1309	1302-1303
Cafeína	43,3	1848	1847-1848

\* Fonte: Os Índices de Kovats foram obtidos por Adams, Pherobase e Pubchem.

**Tabela 3:** Índice de Kovats para os compostos voláteis encontrados nas amostras de café com diferentes perfis de torra, granulometria e tempo de maturação.

**Figura 4:** Cromatograma da amostra de café sem adições dos padrões. Tempos de Retenção ( $T_R$ ) para (1) 2-metilpirazina ( $T_R = 5,50$  min), (2) furfural ( $T_R = 5,90$  min), (3) 2,5-dimetilpirazina ( $T_R = 9,40$  min), (4) 5-metilfurfural ( $T_R = 12,2$  min), (5) furfurilpirrol ( $T_R = 23,7$  min), (6) 4-etilguaiacol ( $T_R = 28,3$  min).

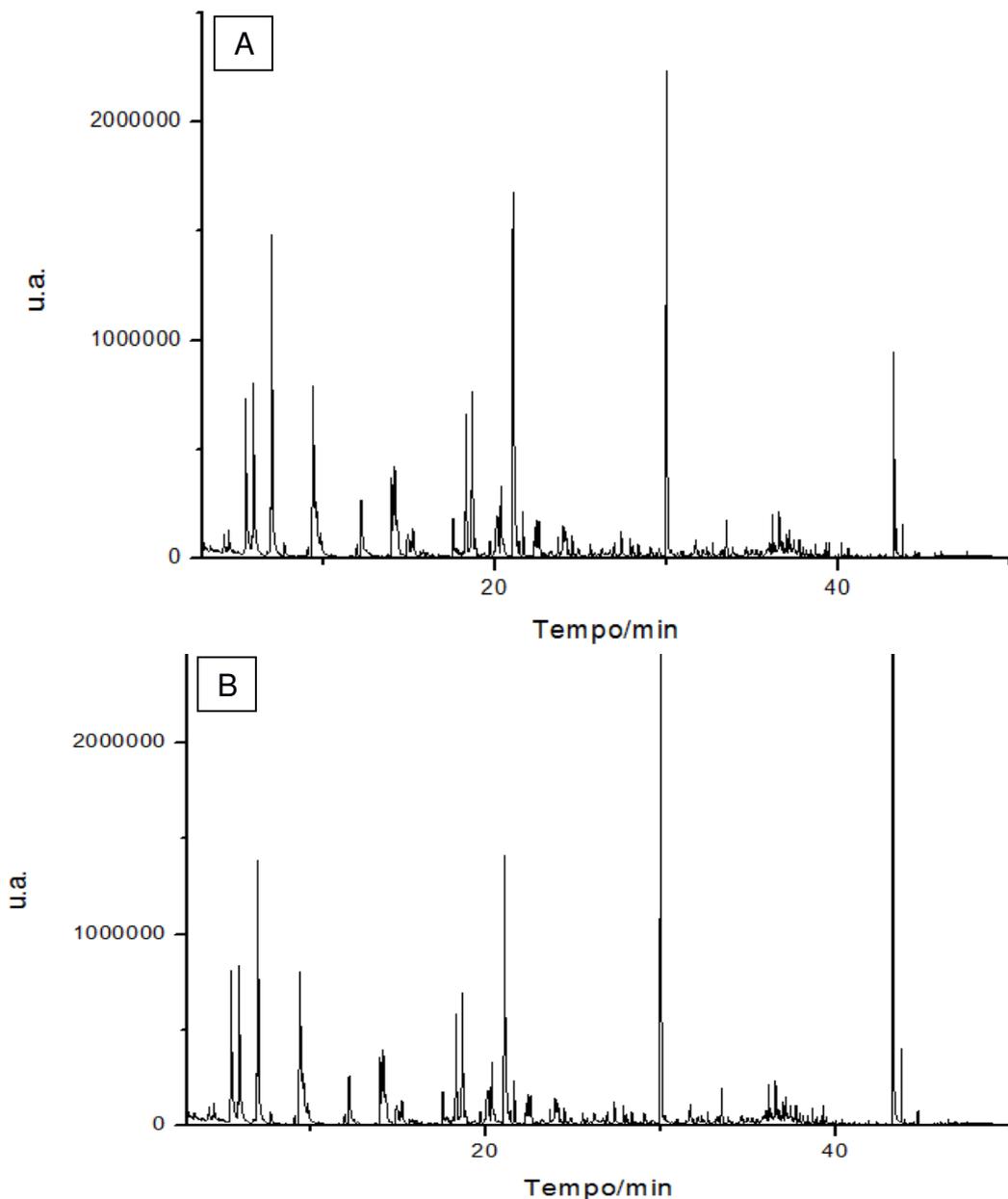


## 5.2. Otimização da Técnica de HS-SPME

### 5.2.1. Determinação da Massa de Café para a análise de compostos voláteis pela Técnica de HS-SPME

Neste estudo foi empregada uma amostra de café de maturação tardia, com torra média e granulometria obtida em peneira de 16 polegadas. A primeira etapa consistiu em determinar a massa de amostra que seria empregada para determinação de compostos voláteis, desta forma, foi feita uma análise empregando massas de 1,0 g e 3,0 g em triplicata. Percebe-se que nos cromatogramas da Figura 5, os picos possuem a mesma intensidade para a maioria dos compostos. Em função disto, a massa de 1,0 g foi determinada para as próximas etapas do estudo devido possibilitar uma avaliação representativa dos voláteis com menos quantidade de amostra.

**Figura 5:** Cromatogramas das amostras de café com 1 g (A) e 3 g (B).



### 5.2.2. Otimização dos Parâmetros Tempo e Temperatura para Extração dos Voláteis pela Técnica de HS-SPME

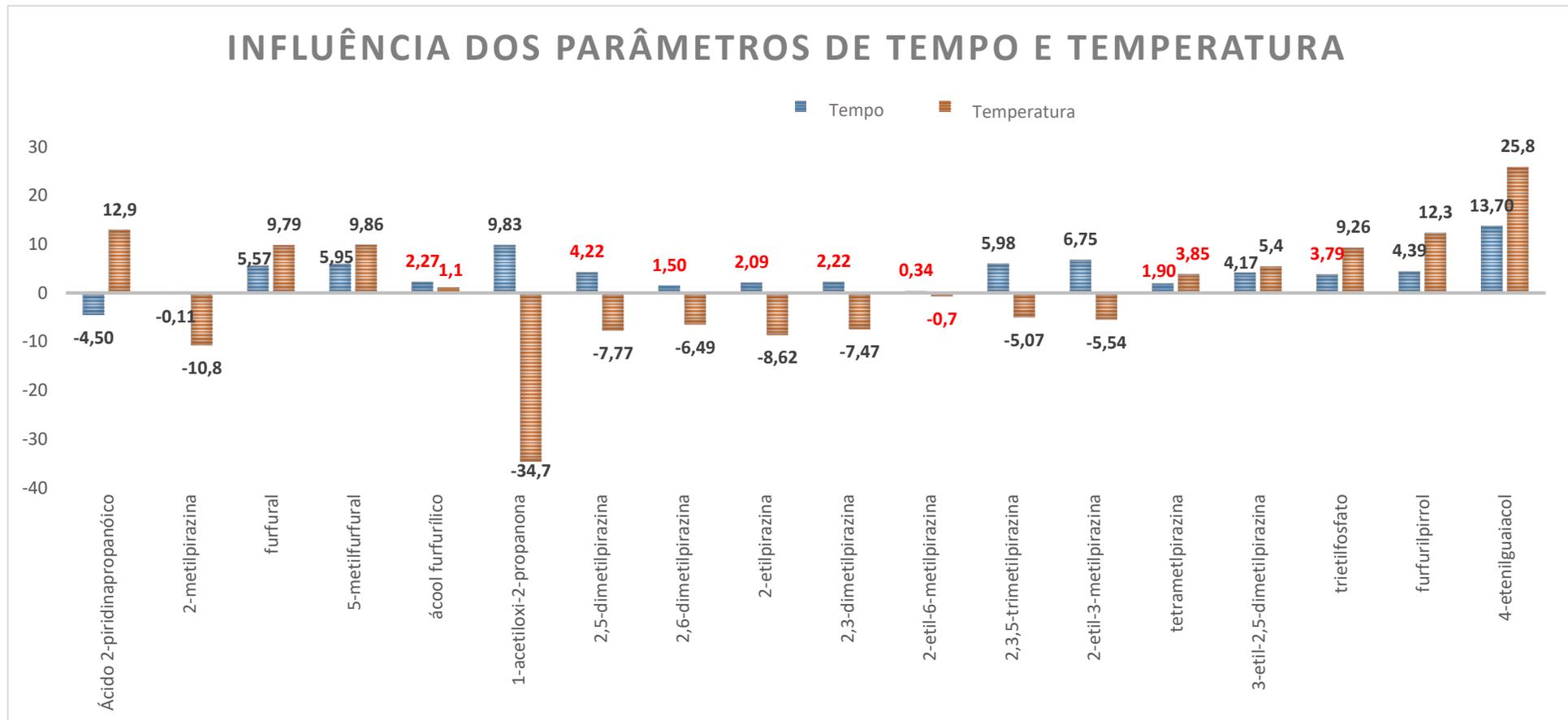
Com a massa da amostra determinada (1,0 g), os parâmetros tempo e temperatura de extração, que são fundamentais para a eficiência da técnica foram otimizados, empregando um planejamento fatorial  $2^2$  com triplicata do ponto central. Foi utilizado o programa Statistica 7 na função *Experimental Design* (DOE), para obter o planejamento e avaliar os resultados.

Os compostos voláteis comuns encontrados nos ensaios estão na Tabela 4 e foram utilizados para avaliar estes parâmetros. Os valores das áreas obtidas para os compostos foram usados para construir os gráficos de Pareto dos compostos (Figura 6), os quais permitiram avaliar a significância dos parâmetros analisados e de suas interações através comprimentos das barras.

COMPOSTOS
Ácido 2-piridinapropanóico
2-metilpirazina
Furfural
5-metilfurfural
Álcool furfurílico
1-acetiloxi-2-propanona
2,5-dimetilpirazina
2,6-dimetilpirazina
2-etilpirazina
2,3-dimetilpirazina
4-etenilguaiccol
2-etil-6-metilpirazina
2,3,5-trimetilpirazina
2-etil-3-metilpirazina
Tetrametilpirazina
3-etil-2,5-dimetilpirazina
Trietilfosfato
Furfurilpirrol

**Tabela 4:** Compostos voláteis selecionados para avaliar a otimização dos parâmetros tempo e temperatura de extração

**Figura 6.** Efeitos dos fatores de tempo e temperatura, oriundos dos gráficos de paretos, sobre a extração de compostos voláteis de café por HS/SPME-GC-MS. Ácido piridinapropanóico; 2-metilpirazina; 2-etil-6-metilpirazina; 2-etil-3-metilpirazina; 5-metilfurfural; 2,3,5-trimetilpirazina; Álcool furfuril; Tetrametilpirazina; 3-etil-2,5-dimetilpirazina; Trietilfosfato; Furfurilpirrol; 4-etenilguaiaicol; 2,3-dimetilpirazina; 1-acetiloxi-2-propanona; Furfural; 2-etilpirazina; 2,6-dimetilpirazina; 2,5-dimetilpirazina.



De acordo com os gráficos de Pareto, o tempo de extração foi um parâmetro significativo positivos para extração de 7 compostos (Furfural; 1-acetiloxi-2-propanona; 5-metilfurfural; 2,3,5-trimetilpirazina; 2-etil-3-metilpirazina; Furfurilpirrol; 4-etenilguaiacol), significativo negativo para um composto (Ácido piridinapropanóico) e não afetou significativamente a extração dos outros 10 compostos. Estes resultados indicam que o parâmetro tempo não afeta significativamente a extração da maioria dos compostos empregando a HS/SPME-GC-MS. Entretanto, um tempo de extração no nível mais alto poderia melhorar a extração de mais sete compostos. Portanto, optou-se pelo emprego do maior tempo de extração (30 min), o qual seria mais adequado, pois obteve o equilíbrio satisfatório entre o sistema para a extração dos compostos voláteis. Resultado semelhante foi obtido por RIBEIRO *et al.* (2010) para determinação de voláteis em café para um subconjunto de componentes principais, em que maior tempo de extração, favoreceu a extração dos compostos voláteis.

A variável temperatura de extração apresentou efeito significativo negativo para extração da maioria dos compostos (8 compostos), indicando que temperaturas mais baixas (~30 °C) favorecem a extração destes compostos. Por outro lado, os resultados também mostraram que a temperatura apresenta efeito significativo positivo para extração de 7 compostos, indicando maior eficiência da extração quando maiores temperaturas são empregadas. Portanto, levando em consideração que a temperatura não afeta a extração de 3 compostos e que se a menor temperatura for utilizada, compostos como a cafeína (importante para o café), não seriam adequadamente extraídos, a temperatura de 70 °C foi escolhida para a extração dos compostos no processo de otimização. Ainda referente à RIBEIRO *et al.* (2010), o mesmo também ocorreu em seus resultados, pois a quantidade de voláteis aumentou com a elevação da temperatura.

### **5.3. Validação do Método**

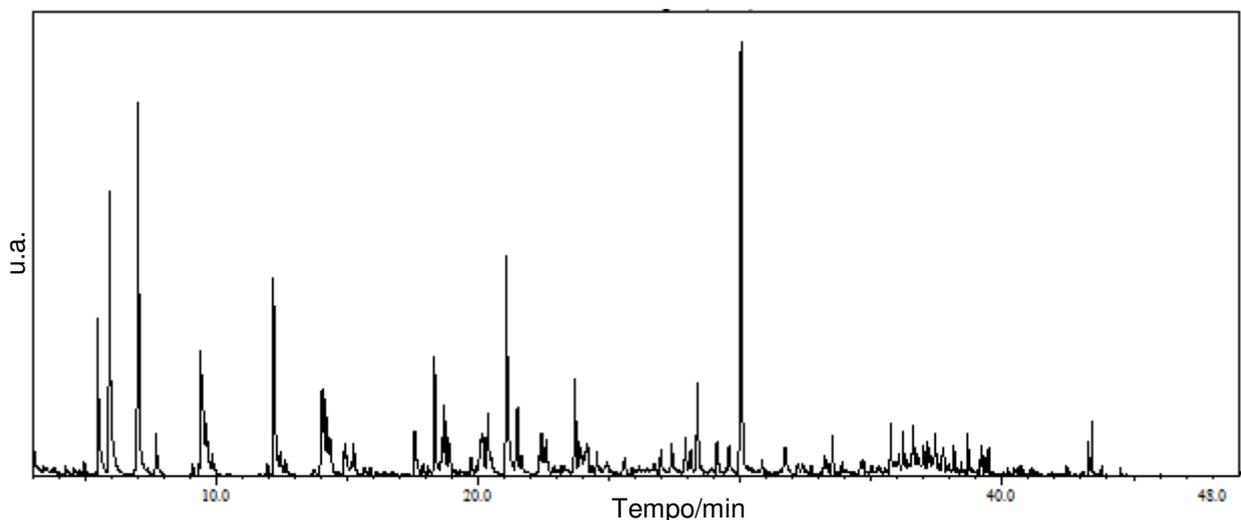
Os parâmetros de seletividade, linearidade, exatidão e precisão foram determinados para garantir que o método otimizado e validado seja adequado. Para isso, foi seguido o guia de validação ANVISA, 2017.

### 5.3.1. Seletividade

É capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse na presença de interferentes (ANVISA, 2017). A seletividade do método foi avaliada pela análise da matriz que já possui os analitos de interesse e da matriz com adição de padrões, em triplicata, na concentração de 10,0 mg L<sup>-1</sup> para 2-metilpirazina, furfurilpirrol e 4-etilguaiacol e na concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup> para furfural, 5-metilfurfural e 2,5-dimetilpirazina.

Através dos cromatogramas, não é possível observar que os picos se intensificam com adição de padrão para os compostos citados acima, porém, verifica-se que não há interferentes nos tempos de retenção dos analitos de interesse devido o espectro de massas e o índice de Kovats (Figura 7). Para visualizar esta diferença, na Tabela 5, encontram-se as áreas de cada um dos compostos analisados antes e após a adição de padrão.

**Figura 7:** Cromatograma da mistura de 12 amostras com diferentes perfis de torra, granulometria e tempos de maturação com adição de padrões



COMPOSTOS	Sem Padrão/x10 <sup>6</sup>			Com Padrão/x10 <sup>6</sup>		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
2-metilpirazina	3,00	4,22	2,82	6,50	6,69	7,04
Furfural	4,80	6,92	4,67	13,5	13,1	15,2
2,5-dimetilpirazina	1,99	2,56	1,90	3,40	3,23	3,62
5-metilfurfural	4,10	4,92	3,82	8,70	8,53	11,7
Furfurilpirrol	1,37	1,74	1,33	4,11	4,16	4,94
4-etilguaiacol	2,14	2,22	2,09	4,61	4,41	6,17

**Tabela 5:** Áreas dos compostos de uma mistura das 12 amostras sem e com adição dos padrões em amostras de café 2-metilpirazina, furfural, 2,5-dimetilpirazina, 5-metilfurfural, furfurilpirrol e 4-etilguaiacol

### 5.3.2. Linearidade

Determinou-se a linearidade do método otimizado aplicando o mesmo na matriz sem e com adição de seis padrões em 5 pontos, em triplicata. Curvas analíticas foram construídas para cada composto. A linearidade foi avaliada parâmetro pelo coeficiente de correlação que deve apresentar valor superior a 0,990 (ANVISA, 2017) e pelos gráficos de resíduos que devem ter um comportamento aleatório.

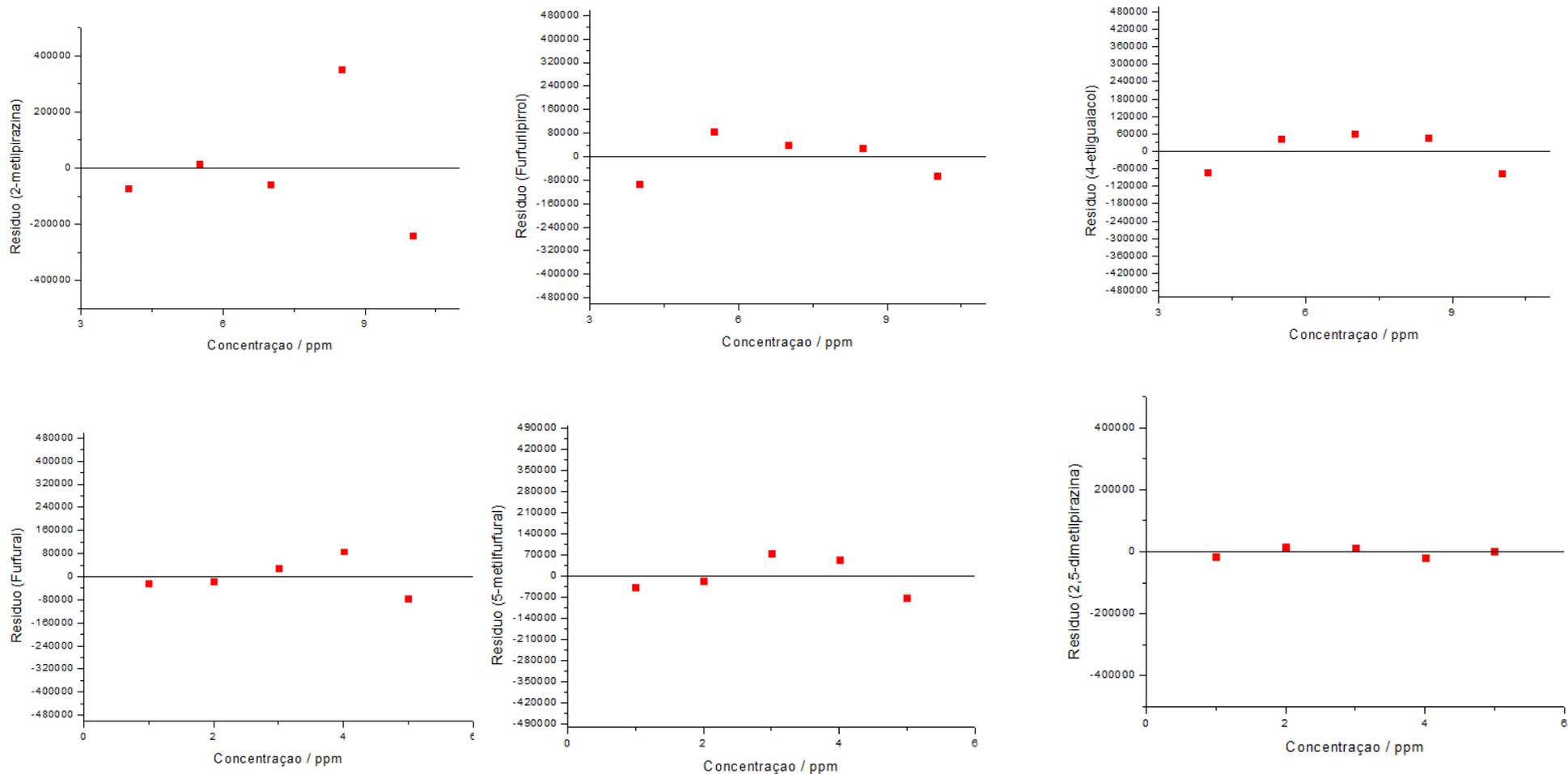
PADRÕES	EQUAÇÃO LINEAR	COEF. CORRELAÇÃO
2-metilpirazina	$y = 187424x + 5489654$	0,898
Furfural	$y = 322194x + 12263439$	0,993
2,5-dimetilpirazina	$y = 108138x + 3080444$	0,996
5-metilfurfural	$y = 99466x + 8403944$	0,930
Furfurilpirrol	$y = 102425x + 3113447$	0,956
4-etilguaiacol	$y = 250163x + 3104612$	0,993

**Tabela 6:** Equações lineares e Coeficientes de Correlação para os padrões 2-metilpirazina, furfural, 2,5-dimetilpirazina, 5-metilfurfural, furfurilpirrol e 4-etilguaiacol.

Devido os coeficientes de correlação apresentarem valores superiores à 0,990 para três compostos e os gráficos de resíduos possuírem distribuição aleatórias para

todos compostos, confirmou-se que o modelo de regressão escolhido foi adequado. A SPME é uma técnica de extração, com alta capacidade de pré-concentração, sendo também muito sensível à pequenas variações de temperatura e tempo de extração que devem ser rigorosamente controlados. Pequenas variações nestes parâmetros podem ter gerado variações nas áreas que levaram a valores de R menores que 0,990. Além disso, as concentrações dos analitos nas amostras são muito altas e geram áreas superiores a 1.000.000. Ao fazer a adição de padrão, as áreas tornaram-se ainda maiores, este fato causa uma saturação do detector, dificultando a identificação desses compostos, o que ocasionou valores de coeficientes de correlação inferiores a 0,990.

**Figura 8.** Gráficos de Resíduos para as curvas analíticas feitas em amostras de café com adição de padrão nas concentrações de 4,0; 5,5; 7,0; 8,5 e 10,0 mg L<sup>-1</sup> para 2-metilpirazina (A), Furfurilpirrol (B) e 4-etilguaicol (C) e nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> para furfural (D), 5-metilfurfural (E) e 2,5-dimetilpirazina (F).



### 5.3.3. Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação são obtidos para amostras que possuem uma matriz isenta dos analitos (branco) e, através dela, utiliza-se os ruídos para seus cálculos. Como a amostra em questão não possui um branco, não é possível estabelecer o cálculo desses limites, pois caso o valor seja obtido, ele não será real, devido a matriz em estudo (café), já contém os compostos voláteis analisados.

Essa afirmativa pode ser confirmada com a quantificação dos compostos presentes na mistura de 12 amostras com diferentes perfis de torra, granulometria e tempos de maturação. A quantificação foi feita por uma curva analítica por adição de padrões nas concentrações de 0; 4,0; 5,5; 7,0; 8,5 e 10,0 mg L<sup>-1</sup> para 2-metilpirazina, furfural e 4-etilguaiacol e nas concentrações de 0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> para furfural, 5-metilfurfural e 2,5-dimetilpirazina e, por extrapolação, obteve-se a concentração dos compostos na amostra sem a adição de padrão. Essas concentrações estão em valores consideráveis e mostram que dentre os padrões selecionados, todos já encontram-se na amostra de café. Seus respectivos valores estão na Tabela 7.

PADRÕES	CONCENTRAÇÕES /(mg L <sup>-1</sup> )
2-metilpirazina	10,4
Furfural	9,00
2,5-dimetilpirazina	12,5
5-metilfurfural	8,72
Furfuralpirrol	7,92
4-etilguaiacol	5,92

**Tabela 7:** Concentrações para os compostos 2-metilpirazina, furfural, 2,5-dimetilpirazina, 5-metilfurfural, furfuralpirrol e 4-etilguaiacol na mistura de 12 amostras com diferentes perfis de torra, granulometria e tempos de maturação.

### 5.3.4. Precisão

A precisão foi avaliada pela repetitividade e precisão intermediária em função dos coeficientes de variação, obtidos pelos ensaios feitos com 3 diferentes concentrações em triplicata ANVISA (2017).

#### 5.3.4.1. Repetitividade

Para a verificação da repetitividade, as análises foram realizadas e, assim, obtidos os coeficientes de variação que estão apresentados na Tabela 8:

COMPOSTOS	CONCENTRAÇÃO (mg L <sup>-1</sup> )	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
2-metilpirazina	10,0	6,3
	7,0	4,0
	4,0	2,4
Furfural	5,0	9,1
	3,0	6,6
	1,0	0,7
2,5-dimetilpirazina	5,0	4,1
	3,0	5,7
	1,0	4,5
5-metilfurufural	5,0	4,6
	3,0	7,9
	1,0	0,7
Furfurilpirrol	10,0	10,0
	7,0	11,2
	4,0	5,7
4-etilguaiacol	10,0	43,7
	7,0	14,5
	4,0	4,5

**Tabela 8:** Coeficientes de Variação obtidos pela análise de uma mistura de 12 amostras de café conilon com diferentes perfis de torra, granulometria e tempos de maturação, fortificadas em três concentrações em ensaios intra-dia

Foram obtidos coeficientes de variação entre 0,7 a 14,5% para a maioria dos compostos, em todos os níveis de fortificação, com exceção da concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> para o 4-etilguaiacol, indicando boa repetitividade do método. Isto é, o método apresenta repetitividade adequada, com valores dos coeficientes de variação menor que 20%, conforme estabelecido pela ANVISA (2017), para amostras complexas.

#### **5.3.4.2. Precisão Intermediária**

Com o objetivo de verificar se no mesmo laboratório e em dias diferentes o método fornecerá resultados com coeficientes de variação aceitáveis, os testes de precisão intermediária foram realizados. Os coeficientes de variação obtidos nestes ensaios se encontram-se na Tabela 9.

COMPOSTOS	CONCENTRAÇÃO COEFICIENTE DE	
	(mg L <sup>-1</sup> )	VARIAÇÃO (%)
2-metilpirazina	10,0	21,0
	7,0	23,6
	4,0	8,2
Furfural	5,0	25,7
	3,0	24,8
	1,0	22,9
2,5-dimetilpirazina	5,0	21,5
	3,0	17,7
	1,0	14,8
5-metilfurfural	5,0	24,2
	3,0	23,3
	1,0	17,8
Furfurilpirrol	10,0	16,9
	7,0	15,2
	4,0	12,8
4-etilguaiacol	10,0	26,2
	7,0	15,3
	4,0	9,28

**Tabela 9:** Coeficientes de Variação obtidos pela análise de uma mistura de 12 amostras de café conilon com diferentes perfis de torra, granulometria e tempos de maturação, fortificadas em três concentrações em ensaios inter-dia.

Os coeficientes de variação variaram de 8 a 26%, estando acima dos valores aceitáveis, 20% (ANVISA, 2017), amostras complexas, para a maioria dos compostos. Observa-se que os maiores valores foram obtidos principalmente para as maiores concentrações. Ressalta-se que, durante o desenvolvimento desta etapa de validação, foi necessário utilizar no terceiro dia de ensaio outra fibra similar à utilizada nos ensaios anteriores (Ver Anexo A), sendo observada uma variação referente aos outros dois dias, o que poderia justificar os resultados obtidos. A fibra, mesmo sendo condicionada, pode ter apresentado um efeito de matriz que interferiu na sorção dos voláteis na análise, afetando, desta maneira, a precisão intermediária do método.

### 5.3.5. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por ensaios de recuperação com 3 concentrações diferentes em triplicata nas concentrações 4,0; 7,0; e 10,0 mg L<sup>-1</sup> para 2-metilpirazina, furfuralpirrol e 4-etilguaiacol e 1,0; 3,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> para furfural, 5-metilfurfural e 2,5-dimetilpirazina em triplicata. Os valores encontram-se na Tabela 10.

COMPOSTOS	CONCENTRAÇÃO /(mg L <sup>-1</sup> )	DESVIO PADRÃO	PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO (%R)
2-metilpirazina	10,0	2,41	87,3
	7,0	1,44	95,7
	4,0	0,78	90,6
Furfural	5,0	2,02	95,3
	3,0	2,73	102,9
	1,0	0,29	92,4
2,5-dimetilpirazina	5,0	1,38	100,5
	3,0	1,82	104,2
	1,0	1,33	86,5
5-metilfurfural	5,0	4,10	85,3
	3,0	6,95	124,7
	1,0	0,57	62,2
Furfuralpirrol	10,0	3,97	93,7
	7,0	4,23	105,7
	4,0	1,90	77,5
4-etilguaiacol	10,0	9,66	97,0
	7,0	2,85	103,5
	4,0	0,73	92,7

**Tabela 10:** Porcentagens de Recuperação obtidos pela análise da matriz café em três distintas concentrações por adição de padrão em ensaios intra-dia.

A maioria das porcentagens de recuperação está entre a faixa 77,5% a 105,7% (exceto para as concentrações de 3,0 mg L<sup>-1</sup> e 1,0 mg L<sup>-1</sup> para 5-metilfurfural e 1,0 mg L<sup>-1</sup> para Furfuralpirrol) para os compostos estudados, com valores de desvio

padrão relativamente baixos (menores que 9,66%) para as concentrações. Esses resultados sugerem uma boa exatidão para o método, devido à grande parte dos valores estarem dentro dos valores estabelecidos pela legislação 80-120% (ANVISA, 2017).

### 5.3.6. Aplicação do Método

O método HS/SPME-GC-MS otimizado e validado foi aplicado em amostras comerciais com perfis de torras diferentes (tradicional e extraforte). As áreas dos brancos das amostras e das amostras com adição de padrão, encontram-se na Tabela 11 e na Tabela 12.

COMPOSTOS	Sem Padrão/x10 <sup>6</sup>			Com Padrão/x10 <sup>6</sup>		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
2-metilpirazina	5,75	5,73	6,11	7,30	6,70	7,12
Furfural	4,20	4,14	4,40	6,27	5,55	5,70
2,5-dimetilpirazina	2,38	2,45	2,59	2,43	2,65	2,63
5-metilfurfural	5,62	5,52	5,87	7,68	7,35	7,23
Furfurilpirrol	3,96	3,71	3,87	4,59	4,67	4,47
4-etilguaiacol	5,54	5,08	5,31	8,89	8,85	7,08

**Tabela 11:** Áreas dos compostos presentes na amostra de café tradicional com e sem adição de padrões na concentração de 7,0 mg L<sup>-1</sup> para 2-metilpirazina, furfurilpirrol e 4-etilguaiacol e 3,0 mg L<sup>-1</sup> para furfural, 5-metilfurfural e 2,5-dimetilpirazina

COMPOSTOS	Sem Padrão/x10 <sup>6</sup>			Com Padrão/x10 <sup>6</sup>		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
2-metilpirazina	7,58	6,51	6,71	8,44	7,35	6,70
Furfural	4,20	3,88	3,79	5,71	5,33	4,69
2,5-dimetilpirazina	3,18	2,89	2,77	3,11	2,89	2,56
5-metilfurfural	6,05	5,36	5,63	7,65	7,12	6,34
Furfurilpirrol	4,62	4,05	4,29	5,65	5,69	4,30
4-etilguaiacol	6,58	7,07	6,30	8,45	7,85	7,86

**Tabela 12:** Áreas dos compostos presentes na amostra de café extraforte com e sem adição de padrões na concentração de 7,0 mg L<sup>-1</sup> para 2-metilpirazina, furfuralpirrol e 4-etilguaiacol e 3,0 mg L<sup>-1</sup> para furfural, 5-metilfurfural e 2,5-dimetilpirazina.

Devido aos espectros de massas confirmarem os compostos e as áreas com adição de padrão apresentarem maior valor que as amostras sem adição de padrão, pode-se concluir que o método aplicado mostrou eficiência para a amostra comercial tradicional. Entretanto, os mesmos resultados não foram obtidos na amostra comercial extraforte, a razão disto, possivelmente está relacionada a degradação de alguns compostos voláteis em perfis de torra escura, semelhante ao trabalho de NASCIMENTO e colaboradores (2007), que retrata a degradação de álcoois, aldeídos, furanos e pirazinas para torras mais intensas.

#### **5.4. Caracterização da Composição Volátil do Café Conilon em Diferentes Perfis de Torra, Granulometria e Tempos de Maturação por Cromatografia Gasosa**

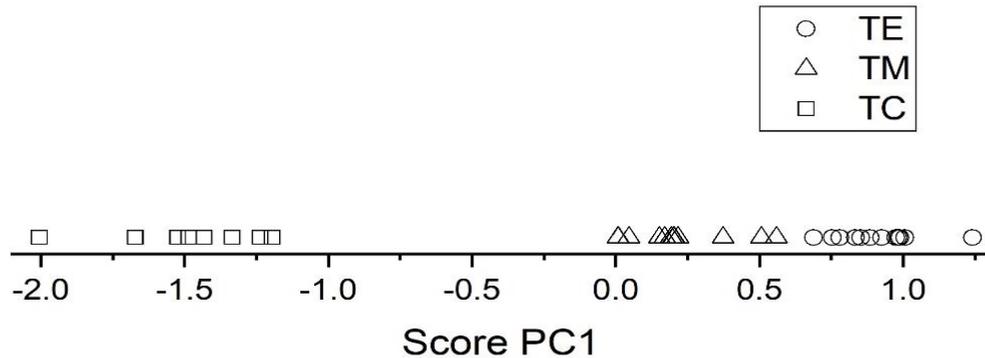
Dois cultivares de diferentes tempos de maturações (intermediária e tardia) foram submetidas a duas peneiras diferentes (13 e 16 polegadas) e passaram pelo processo de torra em três perfis distintos (clara, média e escura), resultando em 12 amostras com composição volátil característica de cada amostra. A tabela do Anexo B apresenta a fração volátil correspondente as amostras, os quais serão discutidos após a Análise de Componentes Principais.

##### **5.4.1. Análise de Componentes Principais em amostras de Café com Diferentes Perfis de Torra, Granulometria e Tempos de Maturação**

Neste estudo, a análise de Componentes Principais (PCA) tem como objetivo propor uma avaliação da qualidade do café utilizando como parâmetro os compostos voláteis. Através da estatística foi possível avaliar os voláteis nas amostras com diferentes perfis de torra, granulometria e tempos de maturação de um café tipo conilon.

Como pode ser visto na Figura 9, ao comparar os escores pelos diferentes tipos de torra, pode-se observar sua separação a partir do componente principal PC1, em um gráfico unidimensional.

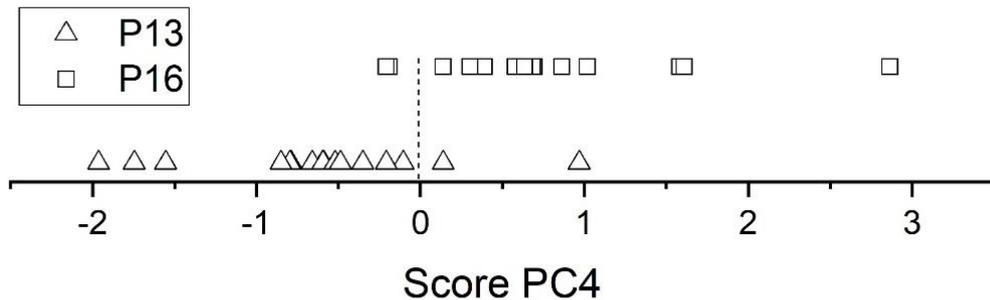
**Figura 9:** Análise dos Componentes Principais de amostras de café com diferentes perfis de torra. TE: Torra Escura, TM: Torra Média e TC: Torra Clara



Observa-se uma boa separação entre os três tipos de torra, não havendo sobreposição entre seus escores. A Torra Clara apresentou escores negativos (menores que -1,0), sendo muito distintos dos escores obtidos para Torra Média (escores entre zero e +0,6) e Torra Escura (escores maiores que 0,7).

Os escores do componente principal PC4 também permitiu a distinção entre grão peneirados com a Peneira P13 e a P16, porém com alguma sobreposição (Figura 10).

**Figura 10:** Análise dos Compostos Principais de amostras de café em diferentes classificações por peneiras. P13: Peneira 13 polegadas e P16: Peneira 16 polegadas.



Na Figura 10 é apresentado o *cut-off* no valor de escore igual a zero, ou seja, para valores negativos de escores do PC4 são associados ao tratamento utilizando a peneira P13 e para valores positivos, a peneira P16. Os erros associados à essa escolha do *cut-off* podem ser obtidos a partir de uma tabela de contingência 2x2, conforme apresentado na Tabela 13.

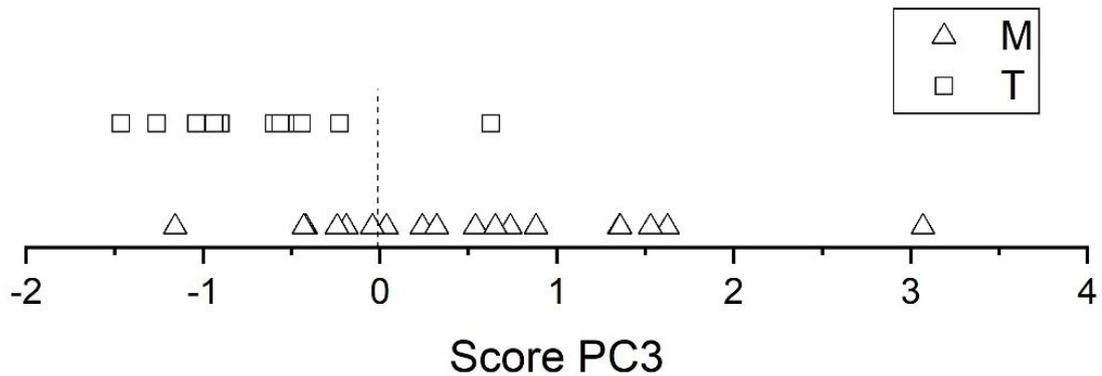
PC4 score	P13	P16	Total
< zero	16	2	18
> zero	2	13	15
<b>Total</b>	18	15	33

**Tabela 13:** Tabela de Contingência 2 x 2 para avaliar a diferença de peneiras aplicadas as amostras de café.

A probabilidade de errar qual tipo de peneira foi usada ao considerar que todas peneiras de P13 têm escore PC4 negativo é igual a cerca de 13%. É interessante lembrar que essa probabilidade é chamada de erro beta ou erro tipo II ou falso negativo e a imposição que P13 têm escore negativo é a hipótese nula ( $H_0$ ). Por outro lado, a probabilidade de errar a escolha ao considerar que todas peneiras P16 têm escores positivos é igual a cerca 11%. Nesse caso, o erro envolvido é o erro alfa (ou tipo I ou falso positivo) e afirmação, a hipótese alternativa.

Outros valores de *cut-off* podem diminuir o erro tipo I, porém causarão um aumento no erro tipo II e o contrário também é verdade, certos valores diminuirão o erro tipo II, no entanto, o erro tipo I será aumentado.

**Figura 11:** Análise dos Compostos Principais de amostras de café em diferentes tempos de maturação. M: Médio e P16: Tardio



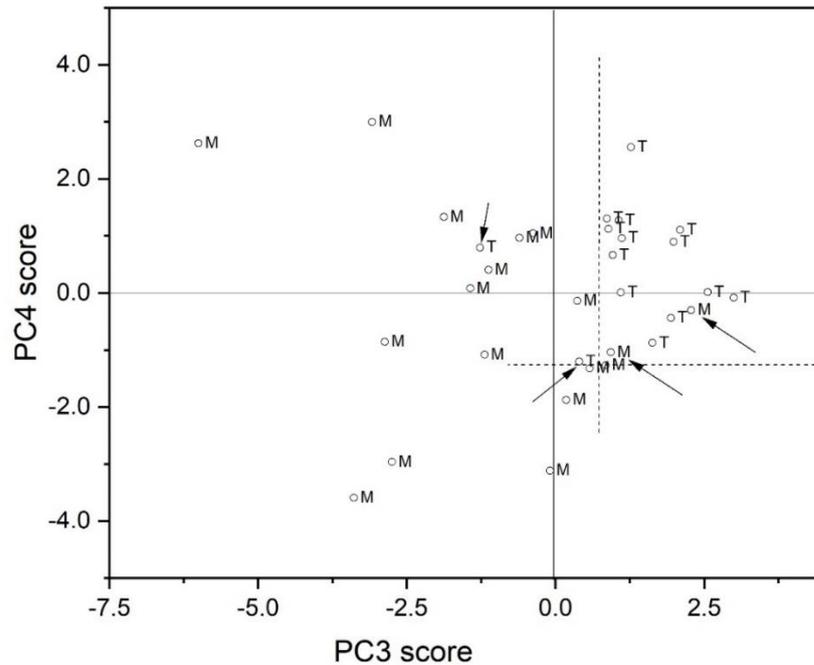
Os grãos obtidos do cultivar de maturação tardia apresentaram valores de scores PC3 principalmente menores que zero, embora para grão do cultivar de maturação tardia, os escores variaram desde valores negativos a positivos. O uso exclusivo de valores de scores do PC3 para distinguir os diferentes tempos de maturação dos grãos acarreta um erro tipo II próximo a 34,6%, embora de erro tipo I igual 14,3%, obtidos a partir da tabela de contingência 2x2 (Tabela 14), considerando um *cut-off* igual a -0,6.

PC4 score	P13	P16	Total
< -0,6	6	1	7
> -0,6	9	17	26
<b>Total</b>	15	18	33

**Tabela 14:** Tabela de Contingência 2 x 2 para avaliar a diferença de tempo de maturação das amostras de café.

A distinção entre os tempos de maturação foi melhorada utilizando-se tanto os scores do componente principal PC3 quanto PC4 (Figura 12). Nesse caso, os valores de *cut-off* iguais a +1,0 para PC3 e -1,5 para PC4 permitiram diminuir o erro tipo I para 13,3% e do erro II para 11,1%.

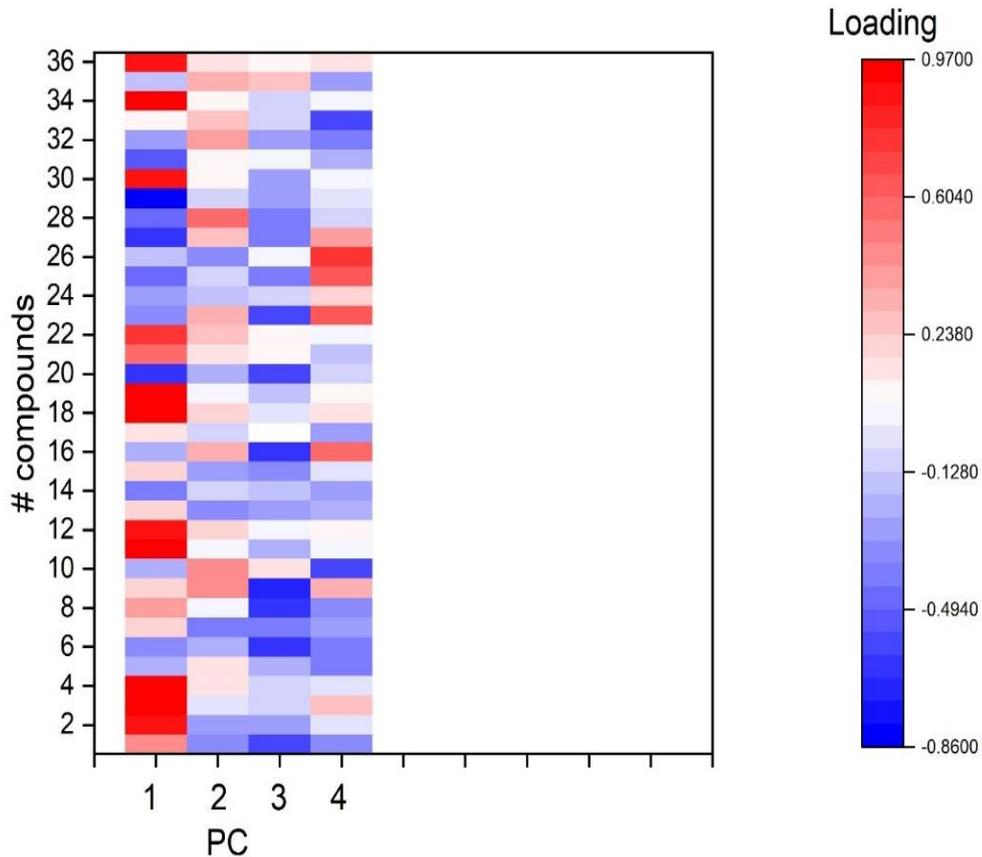
**Figura 12:** Análise dos Compostos Principais de amostras de café em diferentes tempos de maturação



Para cada composto obtido com os diferentes perfis de torra, granulometria e tempos de maturação foi avaliado a influência dos mesmos sobre PC1, PC2, PC3 e PC4. Para isso, foram obtidos os valores de *loading*, os quais estão apresentados no gráfico *heat map* (Figura 13). Foi observado que o PC2 não apresentou influência sobre os parâmetros analisados.

**Figura 13:** Valores de *Loading* para cada composto obtido com os diferentes perfis de torra, granulometria e tempos de maturação.

\* = compostos odorantes de impacto



Os valores de *loading* explicam a influência dos compostos sobre os valores de escores observados para o PC1, PC3 e PC4. Para PC1, as principais classes de compostos que influenciam a torra escura com loading positivos são fenóis, furanos e pirróis devido aos seus maiores valores de escores.

Em torras mais intensas, foram relatadas essas classes (MOREIRA *et al.*, 2000; CLARKE *et al.*, 1985; ARISSETO *et al.*, 2011; GUENTHER *et al.*, 2010; FLAMENT, 2002; CLARKE *et al.*, 1985). Dentre elas, os fenóis estão guaiacol, 4-etilguaiacol e 4-vinilguaiacol, os quais são compostos de impacto no aroma do café (SEMMELOCH *et al.*, 1996). Para confirmar a presença dos furanos, há os compostos 5-metilfurfural, álcool furfurílico e furfural nas amostras analisadas, tendo o álcool furfurílico como um volátil de importância para o café de torra escura, onde está presente em altas concentrações, conferindo aromas amargos e queimados

(CLARKE *et al.*, 1985). Com relações aos pirróis, estão presentes 2-formilpirrol, 2-acetilpirrole e furfuralpirrol.

Os compostos que predominam na TC, para as amostras analisadas, são as pirazinas, sendo voláteis característicos desse tipo de torra e para TM, devido ocorrer degradações desses compostos em torras mais intensas. Um composto de impacto determinado para essa classe foi o 3-etil-2,5-dimetilpirazina (FLAMENT, 2002; CLARKE *et al.*, 1985).

Os resultados de NASCIMENTO e colaboradores (2007) mostram que em TE os compostos 2-acetilpirrole, furfuralpirrol, 4-etilguaiacol e 4-vinilguaiacol apresentam-se em maiores quantidades, semelhante ao estudo em questão, enquanto para 5-metilfurfural, álcool furfurílico e furfural encontram-se em maior quantidade em TC, divergindo deste trabalho.

Através desses resultados, pode-se concluir que a TE apresenta maior número de compostos odorantes de impacto para o aroma do café, o qual está intimamente ligado com a qualidade. Portanto, de acordo com o estudo, café com TE apresentam melhor qualidade que os de TC e TM.

A separação entre os tempos de maturação média e tardia não ocorreu de forma total, mas significativa, isso foi possível devido à influência de alguns compostos para o cultivar com tempo de maturação média, Jequitibá ES8122, (2,5,6-trimetilpirazina, tetrapirazina e 6-metil-2-acetilpirazina) e para o cultivar com tempo de maturação tardia, Centenária ES8132, (benzaldeído e salicilato de etilo). Em que os primeiros apresentaram valores de loading positivos e, os outros, valores de loading negativos.

De acordo com os dados de outros autores, para um café de qualidade, o tempo de maturação média deve ser empregado, FAGAN e colaboradores afirmam que maturações mais lentas auxiliam no aumento da qualidade. Além disso, a 2,5,6-trimetilpirazina, mesmo não sendo um composto odorante de impacto, foi relatada como volátil importante para o café torrado (DE MARIA *et al.*, 1999), a qual se faz presente em tempo de maturação média.

Para a distinção de peneira, os loading positivos são responsáveis pela peneira de 16 polegadas e os loading negativos pertencem a peneira de 13 polegadas. Da mesma forma que os tempos de maturação, a diferenciação entre as peneiras não ocorreu totalmente, mas o suficiente para distingui-las. Na P16, as pirazinas encontram-se em maior número, sendo uma delas um odorante de impacto para o

café, 2,3-dietil-5-metilpirazina, (SEMMEYROCH *et al.*, 1996), além disso, há outro volátil importante para o aroma, o guaiacol.

Outro fator positivo para a P16, MARTINEZ e colaboradores descrevem que peneiras de maior diâmetro, junto com outros parâmetros, proporciona melhor qualidade do produto final.

## 6. CONCLUSÕES

O método de microextração em fase sólida por *headspace* com cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas (HS/SPME-GC-MS), foi otimizado e validado e apresentou ser simples e fácil para análise de compostos voláteis em café torrado e moído, apresentando ainda uma boa repetitividade e exatidão. No entanto, apresenta pontos negativos para certas variações na análise, como a utilização de uma outra fibra e oscilações de temperatura. Ao aplicar o método, o mesmo mostrou-se eficaz para amostras comerciais com perfil de Torra Clara (TC).

O estudo das 12 amostras com distintos perfis de torra, granulometria e tempos de maturação através da análise de componentes principais, possibilitou a caracterização do perfil volátil de cada uma delas, demonstrando ainda, os odorantes potentes de impacto no aroma, os quais são importantes na qualidade. Desde modo, para este trabalho, o café que apresentou melhor perfil volátil apresenta Torra Escura (TE), peneira de 16 polegadas (P16) e tempo de maturação média, devido à estes parâmetros conterem um maior número de voláteis significativos para o aroma. Por isso, foi importante a otimização e validação do método, pois através dessa etapa, foi possível dar confiabilidade aos resultados da estatística.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC (Associação Brasileira da Indústria de café). Disponível em: <<http://abic.com.br/o-cafe/historia/a-expansao-do-cafe-no-brasil/>>. Acesso 31 de outubro de 2018.

ABIC (Associação Brasileira da Indústria de café). Disponível em: <<http://abic.com.br/exportacoes-dos-cafes-do-brasil-atingem-352-milhoes-de-sacas-com-receita-cambial-de-us-51-bilhoes-em-2018/>>. Acesso 15 de junho de 2019.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oils by Ion trap Mass Spectroscopy**. Academic Press, INC., New York, 1989.

ALPENDURADA, M. de F. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v.889, p.3-14, 2000.

ARISSETO, A. P.; VICENTE, E.; UENO, M. S.; TFOUNI, S. A. V.; TOLEDO, M. C. F. Furan Levels in Coffee As Influenced by Species, Roast Degree, and Brewing Procedures. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 3118–3124, 2011.

BAGGENSTOSS, J.; POISSON, L.; KAEGI, R.; PERREN, R.; ESCHER F. Coffee roasting and aroma formation: Application of different time-temperature conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56 (2008), p. 5836-5846.

BASSOLI, D. G. **Impacto aromático dos componentes voláteis do café solúvel: uma abordagem analítica e sensorial**. 2006. 238 f. Tese de Doutorado – Universidade estadual de Londrina, Londrina, 2006.

BEZERRA, T. K. A.; ARAÚJO, A. R. R.; ARCANJO, N. M. O.; SILVA, F. L. H.; QUEIROGA, R. C. R. E.; MADRUGA, M. S. Optimization of the HS-SPME-GC/MS technique for the analysis of volatile compounds in caprine Coalho cheese using response surface methodology. **Food Sci. Technol**, v. 36, p. 103-110, 2016.

BICCHI, C.; IORI, C.; RUBIOLO, P.; SANDRA, P. Headspace sorptive extraction (hsse), stir bar sorptive extraction (sbse), and solid phase microextraction (spme) applied to the analysis of roasted arabica coffee and coffee brew. **J. Agric. Food Chem**, v. 50, p. 449-459, 2002.

BLANK, I.; SEN, A.; GROSCH, W. Potent odorants of the roasted powder and brew of Arabica coffee. **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 195, p. 239-245, 1992.

BORGES, K. B.; DE FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. GEN (Grupo Editorial Nacional): Rio de Janeiro, 2015

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

CAPOBIANGO, M.; DINIZ, I. M.; ANDRE, L. C.; OLIVEIRA, E. S.; CARDEAL, Z. L. Assessment of volatile organic compounds from banana Terra subjected to different alcoholic fermentation processes. **Food Sci. Technol**, v. 36, p. 510-519, 2016.

CAPORASO, N.; WHITWORTH, M. B.; CUI, C.; FISK, I. D. Variabilidade de compostos voláteis de café de grãos solúveis de cafés torrados arábica e robusta analisados por SPME-GC-MS. **Food Research International**, v.108, p. 628-640, 2018.

CARIAS, C. M. O. M.; TOMAZ, M. A.; FERRÃO, M. A. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G.; GONÇALVES, L. S. A. Produtividade de grãos de cafeeiro Conilon de diferentes grupos de maturação pelo procedimento REML/BLUP. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, n.2, p.707-718, 2014.

CHAVES, A. R.; QUEIROZ, M. E. C. Extração sortiva em barra de agitação para análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n° 7, p. 1814-1819, 2008.

CLARKE, R. J.; MACRAE, R. **Coffee, Volume I: Chemistry**. Editora: Elsevier Science Publishers LTD, 1985.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia UNICAMP**: Campinas, 2006.

CONAB. **Abastecimento da Safra Brasileira: café**. 2014. Brasília, v.1, 64 p.

CZERNY, M.; MAYER, F.; GROSCHE W. Sensory Study on the Character Impact Odorants of Roasted Arabica Coffee. **J. Agric. Food Chem**, v. 47, n. 2, p. 695-699, 1999.

DE CASTRO, R. D.; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.8, p. 175-199, 2006.

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

DE SOUZA, C. A. **Caracterização do ciclo de maturação dos frutos e da qualidade da bebida de clones superiores de coffea canephora das variedades botânicas “Conilon” e “Robusta”**. 2017. 79 f. Dissertação de Mestrado – Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2017.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/44050915/exportacao-dos-cafes-do-brasil-cresce-40-de-janeiro-a-maio-de-2019-se-comparada-com-o-periodo-anterior>>. Acesso em 16 de junho de 2019.

FAGAN, E. B.; DE SOUZA, C. H. E.; PEREIRA, N. M. B.; MACHADO, V. J. Efeito do tempo de formação do grão de café (coffea sp) na qualidade da bebida. **Biosci. J.**, v. 27, n. 5, p. 729-738, 2011.

FERNANDES, N. C. M.; GOMES, F. C. O.; GARCIA, C. F. VIEIRA, M. L. A.; MACHADO, A. M. R. Use of solid phase microextraction to identify volatile organic compounds in brazilian wines from different grape varieties. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 21, e2017058, 2018.

FERRÃO, R. G.; DA FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G.; DE MUNER, L. H. **Café Conilon**. Incaper: Vitória, 2017.

FERREIRA, W. L. **Análise de dados com medidas repetidas em experimento com ingestão de café**. 2012. 109 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

FIGUEROA, J. G.; VARGAS, L. F. evaluación de des, fsc y spme/cg-ms para la extracción y determinación de compuestos responsables del aroma de café tostado de vilcabamba – ecuador. **Química Nova**, v. 39, n° 6, p. 712-719, 2016.

FLAMENT, I. **Coffee Flavor Chemistry**. John Wiley & Sons, LTD: England, 2002.

FONSECA, A.; SAKIYMA, N.; BORÉM, A. **Café Conilon do plantio à colheita**. UFV, Viçosa, 2015.

FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, R. C. S.; AGRETI, P. C. M.; AUGUSTI, R. A preliminary evaluation of the effect of processing temperature on coffee roasting degree assessment. **Journal of Food Engineering**, v. 92, ed. 3, p. 345-352, 2009.

FRANCISQUINI, J. D.; MARTINS, E.; SILVA, P. H. F.; SCHUCK, P.; PERRONE, I. T.; CARVALHO, A. F. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 72, n. 1, p. 48-57, 2017.

FUNG, A. G.; YAMAGUCHI, M. S.; McCARTNEY, M. M.; AKSENOV, A. A.; PASAMONTES, A.; DAVIS, C. E. SPME-based mobile field device for active sampling of volatiles. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 407-413, 2019.

GABRIEL-GUZMÁN, M.; RIVERA, V. M.; COCOTLE-RONZÓN, Y.; GARCÍA-DÍAZ, S.; HERNANDEZ-MARTINEZ, E. Fractality in coffee bean surface for roasting process. **Caos, Solitons e Fractais**, v. 99, p. 79-84, 2017.

GETACHEW, A. T.; CHUN, B. S. Coffee Flavor. **Encyclopedia of Food Chemistry**, p. 48-53, 2019.

GUENTHER, H.; HOENICKE, K.; BIESTERVELD, S.; GERHARD-RIEBEN, E.; LANTZ, I. Furan in coffee: pilot studies on formation during roasting and losses during production steps and consumer handling. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n° 3, p. 283–290, 2010.

GOMES, P. C. A. C. **Doseamento simultâneo de aldeídos furânicos (5HMF e furfural), ácido 5Ocafeoilquínico e cafeína em café verde e torrado. Ensaio de termodegradação do 5HMF**. 1997. 96 f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Farmácia Universidade do Porto, 1997

HELENO, F. F.; LIMA, A. C.; AFONSO, R. J. C. F.; COUTRIM, M. X. Otimização e validação de métodos analíticos para a determinação de BTEX em água utilizando extração por headspace e microextração em fase sólida. **Química Nova**, v.33, n.2, 329-336, 2010.

INCAPER. **‘Centenária Incaper 8132’ – Nova Variedade Clonal de Conilon de Maturação Tardia para o Espírito Santo**, 2013.

INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural). Disponível em: <<https://incaper.es.gov.br/cafeicultura-conilon>> Acesso 06 de novembro de 2018.

JELLEN, H. H.; MAJCHER, M.; DZIADAS, M. Microextraction techniques in the analysis of food flavor compounds: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 738, p. 13-26, 2012.

KATAOKA, H.; LORD, H. L.; PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v.880, p.35-62, 2000.

KIM, J.; CHO, J.; SCHMITZ, M.; AL-SAIGH, Z. Y. Quantitative chemical analysis of volatile compounds via headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) coupled with inverse gas chromatography (IGC). **Forensic Chemistry**, v.11, p.7-14, 2018.

KLEJDUS, B.; KLEINOVÁ, J. Determination of volatiles in beer using solid-phase microextraction in combination with gas chromatography/mass spectrometry. **Czech J. Food Sci**, v. 32, n°. 3, p. 241–248, 2014.

LAMBROPOULOU, A. D.; KONSTANTINOOU I. K.; ALBANIS, T. A. Recent developments in headspace microextraction techniques for the analysis of environmental contaminants in different matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, ED. 1–2, p. 70-96, 2007.

LANÇAS, F. M.; MCNAIR, H. M. Cromatografia em fase gasosa. 1. Teoria elementar. **Química Nova**, v.6, n.1, p.6-13, 1983.

LEE, S. J.; KIM, M. K.; LEE, K. G. Effect of reversed coffee grinding and roasting process on physicochemical properties including volatile compound profiles. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 44, p. 97-102, 2017.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. **Journal of Chromatography A**. v. 885, ed. 1–2, p. 153-193, 2000.

LÓPEZ-GALILEA, I.; FOURNIER, N.; CID, C.; GUICHARD, E. Changes in Headspace Volatile Concentrations of Coffee Brews Caused by the Roasting Process and the Brewing Procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n. 22, p. 8560–8566, 2006.

MAPA (Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento) Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira>>. Acesso em 01 de novembro de 2018.

MAPA (Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento). INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 8, DE 11 DE JUNHO DE 2003.

MARRÉ, W. B. **Crescimento vegetativo e acúmulo de nutrientes em diferentes genótipos do café conilon**. 2012. 58 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2012.

MARTINEZ, H. E. P.; CLEMENTE, J. M.; LACERDA, J. S.; NEVES, Y. P.; PEDROSA, A. W. Nutrição mineral do cafeeiro e qualidade da bebida. **Rev. Ceres**, v. 61, Suplemento, p. 838-848, 2014.

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. **Food Quality and Preference**, v. 12, n. 2, p. 153-162, 2001.

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

NASCIMENTO, E. A.; DE AQUINO, F. J. T.; DO NASCIMENTO, P. M.; Roberto CHANG R.; DE MORAIS, S. A. L. Composição química do café conillon em diferentes graus de torração. **Ciência & Engenharia**, v. 16, n. 1/2, p. 17-21, 2007

NZEKOUE, F. K.; CAPRIOLI, G. C.; FIORINI, D.; TORREGIANI, E.; VITTORI, S.; SAGRATINI, G. HS-SPME-GC-MS technique for FFA and hexanal analysis in different cheese packaging in the course of long term storage. **Food Research International**, v. 121, p. 730-737, 2019.

PENTEADO, J. C. P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J. C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. **Química Nova**, v.31, n.8, p. 2190-2193, 2008.

PEREIRA, G. V. M.; NETO, D. P. C.; JÚNIOR, A. I. M.; VÁSQUEZ, Z. S.; MEDEIROS, A. B. P.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Exploring the impacts of postharvest processing on the aroma formation of coffee beans – A review. **Food Chemistry**, v. 272, p.441-452, 2019.

PETISCA, C.; PÉREZ-PALACIOS, T.; FARAH, A.; PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Furans and other volatile compounds in ground roasted and espresso coffee using headspace solid-phase microextraction: Effect of roasting speed. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, ed. 3, p. 233-241, 2013.

PEZZOPANE, J. R. M.; JÚNIOR, M. J. P.; THOMAZIELLO, R. A.; DE CAMARGO, M. B. P. Escala para avaliação de estádios fenológicos do cafeeiro arábica. **Bragantia**, v.62, n.3, p.499-505, 2003.

PHEROBASE. Disponível em: < <https://www.pherobase.com/> >. Acesso em junho de 2019.

PINHEIRO, C. A. **Análises físico-químicas e avaliação da qualidade de Coffea canephora Pierre & Froehner cultivados no Espírito Santo**. 2018. 89 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Espírito Santo, Alegre, 2018.

PRATES C. B.; GEBARA, S. S.; RÉ-POPPI, N. Análise de pesticidas organoclorados em água usando a microextração em fase sólida por headspace com cromatografia gasosa e espectrometria de massas. **Química Nova**, v.34, n.7, 1260-1264, 2011.

PUBCHEM. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> >. Acesso em junho de 2019.

RIBEIRO, J. S.; AUGUSTO, F.; FERREIRA, M. M. C.; SALVA, T. J. G; THOMAZIELLO, R. A.; FERREIRA, M. M. C. Prediction of sensory properties of

Brazilian Arabica roasted coffees by headspace solid phase microextraction-gas chromatography and partial least squares. **Analytica Chimica Acta**, v. 634, n. 2, p.172-179, 2009.

RIBEIRO, J. S.; TEÓFILO, R. F.; AUGUSTO F.; FERREIRA, M. M. C. Simultaneous optimization of the microextraction of coffee volatiles using response surface methodology and principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 102, n. 1, p. 45-52, 2010.

RIZZI, G. P. The Strecker Degradation of Amino Acids: Newer Avenues for Flavor Formation. **Food Reviews International**, v. 24, p. 416–435, 2008.

RIZZI, G. P. **The strecker degradation and its contribution to food flavor**. New York, edited by Teranishi et al. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.

RODARTE, M. P. **Análise sensorial, química e perfil de constituintes voláteis de cafés especiais**. 2008. 163 f. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

ROGERS, W. J.; MICHAUX, S.; BASTIN, M.; BUCHELI, P. Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C.arabica*) coffees. **Plant Science**, v.149, p. 115-123, 1999.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SAITO, K.; KANEKO, S.; FURUYA, Y.; ASADA, Y.; ITO, R.; SUGIE, K.; AKUTSU, M.; YANAGAWA, Y. Confirmation of synthetic cannabinoids in herb and blood by HS-SPME-GC/MS. **Química Forense**, v. 13 , p. 100156, 2019.

SEMMELOCH, P.; GROSCHE, W. Studies on Character Impact Odorants of Coffee Brews. **J. Agric. Food Chem.** v. 44, p. 537–543, 1996.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em: < <https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso julho de 2019.

TEIXEIRA, S.; MENDES, A.; ALVES, A.; SANTOS, L. Simultaneous distillation–extraction of high-value volatile compounds from *Cistus ladanifer* L. **Analytica Chimica Acta**, v. 584, n. 2, p. 439-446, 2007.

TUFARIELLO, M.; PATI, S.; D'AMICO, L.; BLEVE, G.; LOSITO, I.; GRIECO, F. Quantitative issues related to the headspace-SPME-GC/MS analysis of volatile compounds in wines: the case of Maresco sparkling wine. **LWT**, v. 108, p. 268-276, 2019.

VELÁSQUEZ, S.; PEÑA, N.; BOHÓRQUEZ, J. C.; Nelson GUTIERREZ, N.; SACKS, G. L. Volatile and sensory characterization of roast coffees – Effects of cherry maturity. **Food Chemistry**, v. 274, p.137-145, 2019.

VILAS BOAS, B. M.; LICCIARDI, R.; DE MORAIS, A. R.; DE CARVALHO, V. D. Seleção de extratores e tempo de extração para determinação de açúcares em café torrado. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 5, p. 1169-1173, 2001.

WEI, Y.; LI, B.; DUAN, H.; WU, X.; YAO, X. An integrated simultaneous distillation–extraction apparatus for the extraction of essential oils from herb materials and its application in Flos Magnoliae. **Biomed. Chromatogr**, v. 24, p. 289–293, 2010.

YANG, N.; LIU, C.; LIU, X.; DEGN, T. K.; MUNCHOW, M.; FISK, I. Determination of volatile markers of common roasted coffee defects. **Food Chemistry**, v. 211, p. 206-214, 2016.

ZAMBONIN, C. G.; BALEST, L.; DE BENEDETTO, G. E., PALMISANO, F. Solid-phase microextraction–gas chromatography mass spectrometry and multivariate analysis for the characterization of roasted coffees. **Talanta**, v. 66, n.1, p. 261-265, 2005.

ZELLNER, B. D.; BICCHI, C.; DUGO, P.; RUBIOLO, P.; DUGO, G.; MONDELLO, L. John Wiley & Sons, Ltd. Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 297–314, 2008.

## 8. ANEXOS

**Anexo A** – Áreas dos padrões no primeiro, terceiro e quinto dia de análise para as concentrações de 4,0; 7,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup> para 2-metilpirazina, furfuralpirrol e 4-etilguaiaicol e nas concentrações de 1,0; 3,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> para furfural, 5-metilfurfural e 2,5-dimetilpirazina

COMPOSTOS	PRIMEIRO DIA								
	1ª CONCENTRAÇÃO			3ª CONCENTRAÇÃO			5ª CONCENTRAÇÃO		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
2-metilpirazina	7614909	7036487	6724056	6504753	6692201	7037982	6216814	6285510	6004333
Furfural	14464114	13165045	13767198	12988152	12543973	14241722	12662952	12480423	12540039
2,5-dimetilpirazina	3735578	3682186	3453842	3403358	3230093	3621961	3326341	3039441	3156289
5-metilfurfural	9295801	8543612	8645196	8431114	8325322	9571806	8472598	8405595	8519164
Furfuralpirrol	4505858	3699533	4013732	3725449	3530697	4358420	3438005	3233062	3622433
4-etilguaiaicol	8322189	4136564	4133927	4608730	4408743	5731099	3944801	3909592	4241122

<b>TERCEIRO DIA</b>									
<b>COMPOSTOS</b>	<b>1ª CONCENTRAÇÃO</b>			<b>3ª CONCENTRAÇÃO</b>			<b>5ª CONCENTRAÇÃO</b>		
	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>
2-metilpirazina	6786058	6639271	7875129	8025271	6622426	6883712	7105914	7217481	7120296
Furfural	12493644	12128668	14742433	13787937	12414556	12539653	13151012	12218895	12924203
2,5-dimetilpirazina	3513050	3242744	4297933	3792344	3290235	3237456	3237495	3567396	3330918
5-metilfurfural	8367445	8320895	9920817	8839552	8437409	8674112	8873631	8305314	8731325
Furfurilpirrol	4204117	3705352	5498732	4406913	3514198	3656627	3222568	3149862	3006197
4-etilguaiaicol	5392788	4430097	6936083	5513425	4511152	5391207	4325957	4685745	4298211

<b>QUINTO DIA</b>									
<b>COMPOSTOS</b>	<b>1ª CONCENTRAÇÃO</b>			<b>3ª CONCENTRAÇÃO</b>			<b>5ª CONCENTRAÇÃO</b>		
	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>
2-metilpirazina	4429880	4720576	4680641	4105852	4166730	4990716	4291125	4446575	4179024
Furfural	6120281	8852131	8822778	7225247	7042181	8891879	7488528	7527762	7962689
2,5-dimetilpirazina	2116491	2661305	2456508	2293327	2334764	2614500	2519337	2313160	2501995
5-metilfurfural	4199787	5919374	6119426	5172963	5036272	5609521	5913101	5380849	6371950
Furfurilpirrol	2992013	4087033	4091376	2972888	2736952	3550437	2469194	2584165	3558655
4-etilguaiaicol	4787356	6425164	6990396	3982713	3603021	4446271	4483217	3383309	3965254

**Anexo B – Presença dos compostos voláteis nas amostras com diferentes perfis de torra, granulometria e tempos de maturação**

COMPOSTOS	TC-M-P13	TC-T-P13	TE-M-P13	TE-T-P13	TM-M-P13	TM-T-P13	TC-M-P16	TC-T-P16	TE-M-P16	TM-M-P16	TM-T-P16	TE-T-P13
2-metilpirazina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Furfural	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
álcool furfúrico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1-acetiloxi-2-propanona	-	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X
2,5-dimetilpirazina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2,6-dimetilpirazina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2-etilpirazina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2,3-dimetilpirazina	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	X	X
Benzaldeído	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-metilfurfural	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1-acetiloxi-2-butanona	-	-	X	X	-	-	-	-	X	-	-	X
2-etil-6-metilpirazina	X	X	X	-	X	X	X	X	-	X	-	X
2-etil-5-metilpirazina	-	-	-	X	X	X	-	X	X	-	X	-
2,5,6-trimetilpirazina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2-etil-3-metilpirazina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2-formilpirrol	X	X	X	X	X	X	-	-	X	X	X	X
2-acetilpirrol	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3-etil-2,5-dimetilpirazina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2-etil-3,5-dimetilpirazina	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
guaiacol	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	X
tetrapirazina	-	X	-	X	-	X	-	X	-	-	X	X
nonanal	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-

2-acetil-3-metilpirazina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
trietilfosfato	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-one	X	X	-	-	-	X	-	X	-	-	-	X	-
2,3-dietil-5-metilpirazina	X	X	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
3,5-dietil-2-metilpirazina	X	X	-	-	X	X	X	X	-	X	X	X	-
furfurilpirrol	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	X	X	X
dodecano	X	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
2-Isoamil-6-metilpirazina	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
salicilato de etilo	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-
4-etilguaiaicol	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	X	X	X
4-vinilguaiaicol	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
caféina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

TC = Torra Clara; TM = Torra Média; TE = Torra Escura; M = Maturação Média; T = Maturação Tardia; P13 = Peneira 13 polegadas; P16 = Peneira 16 polegadas  
X = presença; - = ausência