

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**“PREVISÃO DE DIFERENTES ATRIBUTOS SENSORIAIS
LIGADOS À QUALIDADE DO CAFÉ ARÁBICA
BRASILEIRO UTILIZANDO-SE MÉTODOS ANALÍTICOS
DISTINTOS E FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS”**

Tese de Doutorado

Aluno: Juliano Souza Ribeiro

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Miguel Castro Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Augusto

Dezembro / 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

R354p Ribeiro, Juliano Souza.
Previsão de diferentes atributos sensoriais ligados à
qualidade do café arábica brasileiro utilizando-se
métodos analíticos distintos e ferramentas
quimiométricas / Juliano Souza Ribeiro. -- Campinas,
SP: [s.n], 2009.

Orientadora: Márcia Miguel Castro Ferreira.

Co-orientador: Fabio Augusto

Tese - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Quimiometria. 2. Café - Qualidade. 3. SPME.
I. Ferreira, Márcia Miguel Castro. II. Augusto, Fabio.
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. IV. Título.

Título em inglês: Prediction of different sensory attributes related to Brazilian arabica coffee quality using distinct instrumental methods and chemometrics tools

Palavras-chaves em inglês: Chemometrics, Coffee - Quality, SPME

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Profa. Dra. Marcia Miguel Castro Ferreira (orientadora), Prof. Dr. Roy Edward Bruns (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho (DQ-UFSCar), Dra. Eliete Vaz de Faria (ITAL)

Data de defesa: 09/12/2009

À Deus

Aos meus pais José Alberto e Márcia Ribeiro

Ao meu irmão Guilherme, à sua esposa Débora e à minha sobrinha Flora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus.

Aos meus pais, José Alberto e Márcia por tudo o que eles fizeram à minha formação e a tudo o que eles representam em minha vida.

Ao meu irmão Guilherme e sua esposa Débora, por toda ajuda, amor, compreensão, orgulho e principalmente pelo maior presente da minha vida: minha sobrinha Flora.

A minha sobrinha Flora, que desde o seu nascimento me faz uma pessoa mais feliz e orgulhosa.

A minha namorada Nathália por todo amor, companheirismo, dedicação e força em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Fábio Augusto, meu co-orientador, pelas oportunidades, ensinamentos, pelo senso profissional, apoio e atenção.

A Pesquisadora Terezinha Salva, por ter acreditado em meu potencial desde o início, por toda a amizade e aprendizado adquiridos em 5 anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Francisco Teófilo, por todo aprendizado, amizade, conselhos e profissionalismo.

A Profa. Dra. Márcia Miguel Castro Ferreira, minha orientadora.

A todos os professores do Instituto de Química e de outras universidades que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A todos os provadores de café que analisaram as amostras analisadas nesta tese. Sem eles este trabalho não seria possível.

A todos os funcionários do IQ, da biblioteca, do xerox, das oficinas, da limpeza, da segurança, que auxiliaram e muito para o bom andamento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Cromatografia Gasosa, Gago, Márcio, Ernesto, Eduardo, Adriano, Luiz e Raquel pelo apoio durante esses anos.

A todos os pesquisadores e colegas do Centro de Café – IAC pelo apoio durante esses anos.

Aos companheiros de grupo do Laboratório de Quimiometria Teórica e Aplicada, João Paulo, Clécio, Samuel, Yuri, Márcia, Flávia, Euzébio, André, Rudolf e Kerly pelos ensinamentos durante esses anos.

A todos os amigos que tenho no Instituto de Química e resto da UNICAMP que aqui não foram citados, mas que fazem e sempre farão parte da minha vida.

Aos meus amigos de Agudos, Tiago e Mourinha por vários anos de muita amizade.

Por fim, a Capes pelo apoio financeiro.

“O café é o ouro do homem comum, e, como o ouro, traz a todo homem o sentimento de luxúria e nobreza. Onde é servido, há graça e esplendor, amizade e alegria. Todas as preocupações desaparecem quando uma xícara de café é levada aos lábios”

Xeique Abda-al-Kadir, palavras escritas em 1587

CURRICULUM VITAE

Juliano Souza Ribeiro

e-mail: jsouzaribeiro@yahoo.com

1. Formação acadêmica

- **11/2004 – 12/2009** - Doutor em Química - Área de concentração: Química Analítica. Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, São Paulo, Brasil. Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
- **08/2002 – 07/2004** - Mestre em Química - Área de concentração: Físico-Química. Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, São Paulo, Brasil. Bolsista da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).
- **03/1998 – 06/2002** - Bacharel em Química - Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, São Paulo, Brasil.

2. Atividades científicas e acadêmicas

- **04/1999 – 06/2001** - Aluno de iniciação científica - Laboratório de Química Biológica - Prof. Dr. Néelson Duran - Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, São Paulo, Brasil.
- **07/2001 – 12/2001** - Aluno de iniciação científica - Laboratório de Fitoquímica – Profa. Dra. Mariângela Burgos - Instituto Agrônomo de Campinas, IAC, São Paulo, Brasil.
- **01/2002 – 07/2002** - Aluno bolsista de iniciação científica - Laboratório de Química Biológica - Prof. Dr. Néelson Duran - Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, São Paulo, Brasil. Bolsista do Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

- **07/2004 – 11/2004** - Estágio remunerado - Laboratório de Análises do Solo - Instituto Agronômico de Campinas, IAC, São Paulo, Brasil.
- **03/2007 – 07/2007** - Programa de estágio docente - Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, São Paulo, Brasil. Disciplina: Bioquímica II. Supervisores: Prof. Dr. Carlos Roque e Prof. Dr. Carlos Ramos. Carga horária: 16 h mensais.

3. Produção científica e tecnológica

3.1. Resumos e trabalhos em congressos científicos

- 6 resumos publicados em anais de eventos internacionais;
- 9 resumos publicados em anais de eventos nacionais;
- 4 resumos expandidos publicados em anais de eventos nacionais;
- 3 trabalhos completos publicados em anais de eventos internacionais;
- 2 apresentações orais em anais de eventos nacionais;
- 1 apresentação oral em anais de eventos internacionais.

3.2. Artigos publicados em revistas científicas

- Ribeiro, J. S., Augusto, F., Salva, T. J., 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, *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 634, 172-179.
- Ribeiro, J. S., Salva, T. J., Ferreira, M. M. C., Chemometric studies for quality control of processed brazilian coffees using DRIFTS, *J. Food Qual.*, Aceito.
- Ribeiro, J. S., Teófilo, R. F., Salva, T. J., Augusto, F., Ferreira, M. M. C., Exploratory and discriminant studies for quality control of processed Brazilian coffees using

headspace solid phase microextraction - gas chromatography, *submetido para Food Chemistry*.

- Ribeiro, J. S., Teófilo, R. F., Augusto, F., Ferreira, M. M. C., Simultaneous optimization of coffee volatiles microextraction using response surface methodology and principal component analysis, *submetido para Chemometric and Intelligent Laboratory Systems*.
- Ribeiro, J. S., Augusto, F., Ferreira, M. M. C., Salva, T. J. G., Análise exploratória de perfis cromatográficos de voláteis para a diferenciação da qualidade sensorial de bebidas de café arábica, *submetido Química Nova*.
- Ribeiro, J. S., Ferreira, M. M. C., Salva, T. J. G., Prediction models for beverage quality evaluation of Arabica coffee using near infrared spectra analyses, *submetido para Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Ribeiro, J. S., Augusto, F., Salva, T. J. G., Ferreira, M. M. C., Electronic Arabica coffee cupper: a gas chromatography quality control method, *em construção*.
- Lira, T. O., Colombo, R., Ribeiro J. S., Ferreira, M. M. C., Yariwake, J. H., Chemometric treatment of two varieties of transgenic sugarcane leaves by HPLC fingerprinting, *em construção*.

RESUMO

PREVISÃO DE DIFERENTES ATRIBUTOS SENSORIAIS LIGADOS À QUALIDADE DO CAFÉ ARÁBICA BRASILEIRO UTILIZANDO-SE MÉTODOS ANALÍTICOS DISTINTOS E FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS:

Atualmente, o café é considerado a segunda bebida mais consumida em todo o mundo, sendo superado somente pela água. Esse consumo representa hoje, cerca de 60 bilhões de dólares anuais, contemplando desde a escolha do grão a ser plantado até o produto final comercializado. No mundo todo, especialistas e pesquisadores buscam meios para reconhecer, valorizar e promover padrões de qualidade para os melhores cafés. Porém, a qualidade da bebida tem se mostrado dependente de vários componentes simultaneamente, e sua avaliação é determinada pela prova “de xícara”, realizada por profissionais experientes na arte de degustar café (provadores). Deste modo, este trabalho visou a construção de modelos quimiométricos de previsão de diversos atributos sensoriais do café arábica brasileiro, a partir da correlação entre o aroma e análises sensoriais. Para isso, a técnica analítica de microextração em fase sólida acoplada a cromatografia gasosa foi utilizada (SPME-GC). Um planejamento experimental realizado com as variáveis experimentais do sistema de SPME indicou as melhores condições para a extração simultânea da maioria dos picos cromatográficos. Com todo o sistema de extração otimizado, foram construídos modelos PLS de previsão para seis atributos sensoriais (acidez, amargor, aroma, bebida, corpo e qualidade global) descritos por provadores, a partir do perfil aromático de amostras de café torrado. Modelos com base em dados espectroscópicos (infravermelho próximo) também foram construídos. Os modelos de regressão PLS gerados a partir dos perfis cromatográficos dos voláteis de cafés arábica torrados e dos dados espectroscópicos previram adequadamente as notas dos seis atributos sensoriais estudados. Os erros de previsão desses modelos foram baixos e compatíveis com os erros médios das notas fornecidas pelos provadores.

ABSTRACT

PREDICTION OF DIFFERENT SENSORY ATTRIBUTES RELATED TO BRAZILIAN ARABICA COFFEE QUALITY USING DISTINCT ANALYTICAL METHODS AND CHEMOMETRIC TOOLS:

Nowadays, coffee is considered the second most consumed beverage in the whole world, only being surpassed by water. This consumption represents about 60 billion dollars annually, from the choice of the seed to be planted until the final commercialized product. In the entire world, specialists and scientists search for ways to recognize, to promote and to valorize standards of quality for the best coffee beverages. However, the quality of the beverage depends on various compounds simultaneously, and its evaluation is determined by the cup profile carried out by experts in the art of sampling fresh coffee (cuppers). Thus, this work aimed at the construction of chemometric models for the prediction of diverse sensory attributes of Brazilian Arabica coffees from the correlation between their aromas and their sensory analyses. For this, the analytical technique used was solid phase microextraction followed by gas chromatography (SPME-GC). An experimental design carried out with the several variables of the SPME system indicated the best conditions for the simultaneous extraction of the majority of the chromatographic peaks. With the extraction system optimized, PLS prediction models for six sensory attributes (acidity, bitterness, flavour, cleanliness, body and overall quality) described by the cuppers were constructed from the flavour profile of roasted coffee samples. Spectroscopic models based on spectroscopic data (near infrared) were also constructed. The PLS regression models generated from the chromatographic profiles and of the spectroscopic data of roasted Arabica coffee adequately predicted notes of the six sensorial attributes studied. The prediction errors of these models were low and compatible with the average errors of notes supplied by the cuppers.

ÍNDICE GERAL

| | |
|--|----------|
| <i>Lista de Figuras</i> | xxvii |
| <i>Lista de Tabelas</i> | xxxv |
| <i>Lista de abreviaturas</i> | xxxviii |
| <u>Capítulo 1 - Justificativa e objetivos da tese</u> | 1 |
| 1.1. Justificativa | 1 |
| 1.2. Objetivos | 7 |
| 1.1.1. Objetivo geral | 7 |
| 1.1.2. Objetivos secundários | 7 |

REVISÕES BIBLIOGRÁFICAS

| | |
|--|-----------|
| <u>Capítulo 2 - Voláteis de café torrado - do fim do século XIX aos dias atuais</u> | 9 |
| 2.1. Breve histórico | 9 |
| 2.2. Compostos voláteis do café | 10 |
| 2.3. Compostos de impacto para o aroma do café torrado | 12 |
| <u>Capítulo 3 - Tipos de classificação e análises sensoriais</u> | 15 |
| 3.1. Classificação dos grãos | 15 |
| 3.1.1. Classificação por peneira | 16 |
| 3.1.2. Classificação por tipo ou defeito | 17 |
| 3.1.3. Classificação por qualidade ou bebida | 19 |
| 3.2. Consumo e mercado interno | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3. Prova da xícara | 24 |
| 3.3.1. Conceitos e evolução | 24 |
| 3.3.2. A prova da xícara | 26 |
| 3.3.3. Provedores <i>versus</i> painel de degustação | 28 |
| | |
| Capítulo 4 - Técnicas analíticas utilizadas | 30 |
| 4.1. Microextração em fase sólida | 30 |
| 4.1.1. Princípios de operação de SPME | 32 |
| 4.1.2. Mecanismos de extração em SPME | 35 |
| 4.1.3. Aspectos que influenciam a eficiência de extração | 36 |
| 4.1.4. Vantagens e aplicações | 38 |
| 4.2. Infravermelho | 40 |
| 4.2.1. Espectroscopia na região do infravermelho | 40 |
| 4.2.2. Regiões do infravermelho | 41 |
| 4.2.2.1. <i>Infravermelho próximo (NIR)</i> | 42 |
| 4.2.2.2. <i>Infravermelho médio (MIR)</i> | 42 |
| 4.2.2.3. <i>Diferenças e vantagens entre NIR e MIR</i> | 43 |
| 4.2.3. Reflectância no infravermelho | 44 |
| | |
| Capítulo 5 - Métodos quimiométricos | 47 |
| 5.1. Notações e convenções utilizadas nesta tese | 47 |
| 5.1.1. Organização dos dados | 47 |
| 5.2. Análise multivariada de dados | 48 |
| 5.2.1. Análise de componentes principais (PCA) | 49 |
| 5.3. Métodos multivariados de regressão | 52 |
| 5.3.1. Regressão por quadrados mínimos parciais (PLS) | 54 |

| | |
|--|-----------|
| 5.3.1.1. Validação do modelo | 55 |
| 5.3.1.2. Detecção de amostras anômalas | 60 |
| 5.3.2. Análise discriminante a partir da regressão por quadrados mínimos parciais (PLS-DA) | 62 |
| 5.3.3. Figuras de mérito | 69 |
| 5.4. Pré-tratamento dos dados | 71 |
| 5.4.1. Transformações | 71 |
| 5.4.1.1. Correção de linha de base | 72 |
| 5.4.1.2. Primeira e segunda derivadas | 73 |
| 5.4.1.3. Correção multiplicativa de sinal | 75 |
| 5.4.1.4. Normalização | 76 |
| 5.4.1.5. Alisamento dos dados | 77 |
| 5.4.1.6. Alinhamento dos dados - Correlation Optimized Warping (COW) | 79 |
| 5.4.2. Pré-processamentos | 84 |
| 5.4.2.1. Centrar os dados na média | 84 |
| 5.4.2.2. Autoescalamento dos dados | 85 |
| 5.5. Seleção de Variáveis | 85 |
| 5.6. Planejamento de experimentos | 87 |
| 5.6.1. Planejamento Composto Central | 89 |
| 5.6.2. Identificação dos efeitos e coeficientes significativos | 91 |
| 5.7. Ferramentas estatísticas usuais aplicadas | 94 |
| 5.7.1. Cálculo de médias e desvios-padrão | 94 |
| 5.7.2. Teste <i>t</i> -pareado | 94 |

RESULTADOS INICIAIS

| | |
|--|------------|
| Capítulo 6 – Cafés comerciais – Resultados iniciais | 96 |
| <i>Resumo</i> | 96 |
| 6.1. Introdução | 97 |
| 6.1.1. Processamentos de cafés | 98 |
| 6.1.1.1. Descafeinação | 98 |
| 6.1.1.2. Torrefação | 99 |
| 6.2. Material e métodos | 99 |
| 6.2.1. Amostras de cafés comerciais | 99 |
| 6.2.2. Microextração em fase sólida e cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (SPME-GC-FID) | 100 |
| 6.2.3. Cromatografia gasosa com detector de massas (GC-MS) | 101 |
| 6.2.4. Condições experimentais para extração dos voláteis por SPME | 101 |
| 6.2.5. Infravermelho médio por reflectância difusa (DRIFT) | 101 |
| 6.2.6. Análises quimiométricas | 102 |
| 6.3. Resultados e discussão | 102 |
| 6.3.1. Dados cromatográficos | 102 |
| 6.3.1.1. Escolha das fibras de SPME | 102 |
| 6.3.1.2. Compostos identificados por espectrometria de massas | 104 |
| 6.3.1.3. Análise de componentes principais (PCA) | 105 |
| 6.3.1.4. Análise discriminante através da regressão por quadrados mínimos parciais (PLS-DA) | 110 |
| 6.3.2. Dados espectroscópicos | 113 |
| 6.3.2.1. Análise de componentes principais (PCA) | 113 |
| 6.3.2.2. Análise discriminante através da regressão por quadrados mínimos parciais (PLS-DA) | 119 |

| | |
|-------------------------------|------------|
| 6.4. Conclusões | 122 |
| 6.4.1. Dados cromatográficos | 122 |
| 6.4.2. Dados espectroscópicos | 122 |

RESULTADOS FINAIS

Capítulo 7 – Planejamento e análise de experimentos – Resultados finais

| | |
|--|------------|
| <u>Resumo</u> | 124 |
| 7.1. Introdução | 125 |
| 7.2. Material e métodos | 128 |
| 7.2.1. Amostra de café | 128 |
| 7.2.2. Microextração em fase sólida e cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (SPME-GC-FID) | 128 |
| 7.2.3. Condições experimentais para extração dos voláteis por SPME | 129 |
| 7.2.4. Planejamento experimental | 129 |
| 7.2.4.1. Planejamento composto central e variáveis investigadas | 129 |
| 7.2.4.2. Variáveis não investigadas nos experimentos | 131 |
| 7.3. Resultados e discussão | 132 |
| 7.4. Conclusões | 141 |

Capítulo 8 – Previsão de atributos sensoriais do café arábica utilizando SPME-GC-FID - Safra 2008/2009 – Resultados finais

| | |
|--------------------------------|------------|
| <u>Resumo</u> | 142 |
| 8.1. Introdução | 144 |
| 8.2. Material e métodos | 145 |

| | |
|---|------------|
| 8.2.1. Amostras de café da espécie arábica safra 2008/2009 | 145 |
| 8.2.2. Processo de torra | 145 |
| 8.2.3. Análise sensorial | 146 |
| 8.2.4. Microextração em fase sólida e cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (SPME-GC-FID) | 147 |
| 8.2.5. Cromatografia gasosa com detector de massas (SPME-GC-MS) | 147 |
| 8.2.6. Condições experimentais para extração dos voláteis por SPME | 148 |
| 8.2.7. Análises quimiométricas | 148 |
| 8.3. Resultados e discussão | 148 |
| 8.3.1. Identificação dos compostos por espectrometria de massas | 148 |
| 8.3.2. Modelos de regressão de 6 atributos sensoriais do café arábica Brasileiro | 152 |
| 8.4. Conclusões | 163 |

Capítulo 9 – Análise exploratória de dados cromatográficos dos cafés arábica da safra 2008/2009 – Resultados finais

| | |
|---|------------|
| <i>Resumo</i> | 164 |
| 9.1. Introdução | 165 |
| 9.2. Material e métodos | 165 |
| 9.2.1. Amostras de café utilizadas | 165 |
| 9.2.2. Processo de torra | 166 |
| 9.2.3. Microextração em fase sólida e cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (SPME-GC-FID) | 166 |
| 9.2.4. Cromatografia gasosa com detector de massas (SPME-GC-MS) | 166 |
| 9.2.5. Condições experimentais para extração dos voláteis por SPME | 166 |
| 9.2.6. Análises quimiométricas | 166 |

| | |
|--|------------|
| 9.3. Resultados e discussão | 167 |
| 9.3.1. Compostos voláteis identificados por espectrometria de massas | 167 |
| 9.3.2. Análise exploratória dos dados cromatográficos | 169 |
| 9.3.2.1. <i>Aroma</i> | 169 |
| 9.3.2.2. <i>Bebida</i> | 170 |
| 9.3.2.3. <i>Qualidade global</i> | 172 |
| 9.3.3. Sensitividade e especificidade | 175 |
| 9.4. Conclusões | 176 |
| Anexo 1 | 178 |
| Anexo 2 | 179 |
| Anexo 3 | 180 |

Capítulo 10 – Previsão dos atributos sensoriais dos cafés arábica utilizando infravermelho próximo – safra 2008/2009 - Resultados finais

| | |
|---|------------|
| <i>Resumo</i> | 181 |
| 10.1. Introdução | 182 |
| 10.2. Material e métodos | 182 |
| 10.2.1. Padrões dos compostos | 182 |
| 10.2.2. Amostras de café da espécie arábica safra 2008/2009 | 183 |
| 10.2.3. Processo de torra | 183 |
| 10.2.4. Análise sensorial | 183 |
| 10.2.5. Condições experimentais para as análises espectroscópicas | 183 |
| 10.2.6. Análises quimiométricas | 184 |
| 10.3. Resultados e discussão | 184 |
| 10.3.1. Modelos de regressão de 6 atributos sensoriais do café arábica brasileiro | 184 |

| | |
|---|------------|
| 10.3.1.1. <i>Acidez</i> | 196 |
| 10.3.1.2. <i>Amargor</i> | 197 |
| 10.3.1.3. <i>Corpo</i> | 197 |
| 10.3.1.4. <i>Aroma, bebida e qualidade global</i> | 198 |
| 10.4. Conclusões | 199 |
| | |
| <u>Capítulo 11</u> – Conclusões finais e perspectivas futuras | 200 |
| 11.1. Considerações iniciais | 200 |
| 11.1.1. Sobre a idéia inicial da tese | 200 |
| 11.1.2. Idéias emergentes durante o período | 202 |
| 11.1.3. Seleção e interpretação das variáveis | 202 |
| 11.2. Conclusões finais | 203 |
| 11.3. Perspectivas futuras | 204 |
| | |
| <u>Capítulo 12</u> – Referências bibliográficas | 206 |
| | |
| <u>Apêndice</u> – Composição química do café verde, torra e voláteis do café | 225 |

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.1.** Logotipos de órgãos nacionais e internacionais de qualidade _____ 3
- Figura 1.2.** Fases da produção do café e fatores que podem influenciar na qualidade final da bebida _____ 4
- Figura 1.3.** Representação das provas de xícara realizadas por provadores _____ 6
- Figura 1.4.** Representação esquemática para o alcance do objetivo principal e dos objetivos secundários da tese de doutorado. **PCA** – análise de componentes principais; **PLS** – regressão por quadrados mínimos parciais; **PLS-DA** – análise discriminante a partir da regressão por mínimos quadrados parciais; **CCD** – planejamento composto central; **RSM** – metodologia de superfície de resposta_ 8

Capítulo 3

- Figura 3.1.** Grãos de café beneficiados da espécie arábica (A) e robusta (B) _____ 15
- Figura 3.2.** Imagem dos defeitos mais frequentes nos grãos de café. Grãos pretos (A), verdes (B) e ardidos (C) _____ 18
- Figura 3.3.** Representação da coloração dos discos do Sistema *Agtron* para determinação do grau de torra dos cafés (A) e grãos de moagem (B) _____ 26
- Figura 3.4.** Fotos de um provador classificando amostras de café pela prova da xícara _____ 28

Capítulo 4

- Figura 4.1.** Representação da fibra recolhida dentro da agulha (A), do recobrimento polimérico sobre a fibra de sílica (B) e extração dos analitos pela fibra (C) _____ 31

| | |
|--|----|
| Figura 4.2. Representação de um <i>holder</i> (aplicador) para SPME, com a fibra retraída (A) e exposta (B) | 31 |
| Figura 4.3. Modos de operação de SPME: extração direta (A) e extração pelo <i>headspace</i> (B) | 32 |
| Figura 4.4. Representação esquemática das regiões espectrais do visível ao infravermelho distante | 40 |

Capítulo 5

| | |
|---|----|
| Figura 5.1. Gráfico simulado das respostas estimadas (\hat{y}) <i>versus</i> medidas (y) junto com as elipses que representam <i>DE</i> (A) e <i>DM</i> (B) equivalentes em torno aos pontos médios em $\mathbf{M}(\bar{y}, \hat{\bar{y}})$ | 59 |
| Figura 5.2. Representação esquemática da matriz \mathbf{X} de dados cromatográficos e da matriz \mathbf{Y} contendo duas classes utilizadas no PLS-DA | 63 |
| Figura 5.3. Representação esquemática de um PLS-DA possuindo duas classes (A) e três classes (B). LC – Limites de confiança (linhas em cinza). Classe A (■), B (●) e classe C (*) | 65 |
| Figura 5.4. Representação esquemática de modelos PLS-DA para 4 classes distintas. Classe A (■), classe B (●), classe C (*) e classe D (□). LC – Limites de confiança entre as classes (linhas tracejadas) | 68 |
| Figura 5.5. Gráfico de <i>Coomans</i> para duas classes de amostras (A, B). Amostras representadas por círculo são da classe A e as representadas por quadrados pertencem à classe B. Amostras no 1º quadrante foram classificadas como não pertencentes a nenhuma das classes e as do 3º quadrante foram classificadas como pertencentes a ambas as classes | 70 |

| | |
|---|----|
| Figura 5.6. Partes de um cromatograma de voláteis de café torrado. Cromatogramas originais extraídos do <i>Software</i> (A) e cromatogramas com linha de base corrigida (B) | 73 |
| Figura 5.7. Espectros de cafés torrados medidos na região do infravermelho próximo por refletância difusa. Espectros originais (A), Espectros tratados com a 1ª derivada aplicada (B) e com a 2ª derivada aplicada (C) | 74 |
| Figura 5.8. Espectros de cafés torrados por reflectância difusa medidos na região do infravermelho próximo. Espectros originais (A) e espectros corrigidos pela MSC (B) | 76 |
| Figura 5.9. Região expandida dos espectros de infravermelho médio com refletância difusa de cafés torrados. Espectros originais sem alisamento (A) e espectros alisados (B) | 78 |
| Figura 5.10. Representação esquemática do processo de alisamento segundo Savitsky-Golay | 79 |
| Figura 5.11. Representação esquemática do alinhamento de sessões de dois vetores simulados contendo 2 picos cada um, utilizando-se o método COW. As duas sessões têm o mesmo número de variáveis M e M' são iguais | 83 |
| Figura 5.12 Representação esquemática do funcionamento do algoritmo COW alinhando sinais de comprimentos diferentes ($M \neq M'$) | 84 |
| Figura 5.13. Representação esquemática das etapas realizadas pelo método OPS | 87 |
| Figura 5.14. Planejamento composto central: $n = 3$ e $\alpha = 1,682$. (●) planejamento fatorial, (●) pontos axiais e (○) ponto central | 90 |

Capítulo 6

- Figura 6.1.** Concentrações médias dos principais compostos presentes nos cafés verdes das espécies arábica e robusta descafeinados ou não (g/100g de matéria seca)_____ 99
- Figura 6.2.** Cromatogramas de voláteis de café torrado obtidos nas mesmas condições com diferentes fibras de SPME_____ 103
- Figura 6.3.** Cromatogramas originais sobrepostos obtidos pela fibra de PDMS/DVB (A) e CX/PDMS (B). Cromatogramas pré-tratados das fibras de PDMS/DVB (C) e CX/PDMS (D)_____ 106
- Figura 6.4.** Picos selecionados nos cromatogramas médios obtidos com as fibras de PDMS/DVB (A) e CX/PDMS (B) para cafés descafeinados (—) e convencionais (—)_____ 107
- Figura 6.5.** Gráficos dos escores obtidos nos PCAs realizados com as fibras de PDMS/DVB (A) e CX/PDMS (B) - Cafés descafeinados (▼), tradicionais (●) e extra-fortes (□)_____ 108
- Figura 6.6.** Pesos em PC1 dos compostos responsáveis pela discriminação dos cafés descafeinados - PDMS/DVB (A) e CX/PDMS (B)_____ 109
- Figura 6.7.** Picos selecionados nos cromatogramas médios obtidos com as fibras de PDMS/DVB (B) e CX/PDMS (D) para cafés tradicionais (—) e extra-fortes (—)_____ 110
- Figura 6.8.** Gráficos dos escores obtidos a partir dos PLS-DAs realizados com a fibra de PDMS/DVB (A) e CX/PDMS (B) – Cafés tradicionais (●) e extra-fortes (□)_____ 111
- Figura 6.9.** Pesos em VL1 dos compostos responsáveis pela discriminação dos cafés por grau de torra - PDMS/DVB (A) e CX/PDMS (B)_____ 112

| | |
|---|-----|
| Figura 6.10. Gráficos dos escores de PC1xPC2 utilizando todos os comprimentos de onda dos espectros. Cafés descafeinados (▼), tradicionais (●) e extra-fortes (□) | 114 |
| Figura 6.11. Regiões selecionadas no espectro de IV (A) e região expandida (B). Espectros médios de cafés descafeinados em preto (—) e convencionais em cinza (—) | 115 |
| Figura 6.12. Gráficos dos escores de PC1xPC2. Cafés descafeinados (▼), tradicionais (●) e extra-fortes (□) | 116 |
| Figura 6.13. Gráfico de pesos de PC1 das variáveis selecionadas | 116 |
| Figura 6.14. Regiões selecionadas pelo algoritmo OPS para separação e classificação dos cafés com diferentes graus de torra. Espectros médios dos cafés tradicionais (—) e extra-fortes (—) | 119 |
| Figura 6.15. Gráfico das 2 primeiras variáveis latentes do PLS-DA. Amostras de validação dos cafés tradicionais (●) e extra-fortes (□). Amostras de previsão dos cafés tradicionais (*) e extra-fortes (*) | 120 |
| Figura 6.16. Pesos em VL1 das 10 regiões selecionadas pelo método OPS | 121 |

Capítulo 7

| | |
|--|-----|
| Figura 7.1. Representação esquemática da construção da superfície de resposta utilizando como variáveis do planejamento os escores de um PCA dos dados originais | 127 |
| Figura 7.2. Exemplo de cromatograma obtido nas análises dos voláteis de café. A região expandida apresenta picos sobrepostos | 133 |
| Figura 7.3. Correlograma entre as áreas (regiões) dos picos | 134 |
| Figura 7.4. Correlação entre a soma das áreas dos picos dos subgrupos e os escores em PC1. Áreas dos picos do <i>subgrupo A</i> e os escores de PC1 do <i>subgrupo A</i> (A); | |

áreas dos picos do *subgrupo B* e os escores de PC1 do *subgrupo B* (B); áreas dos picos do *subgrupo A* e os escores de PC1 do *subgrupo B* (C) e áreas dos picos do *subgrupo B* e os escores de PC1 do *subgrupo A* (D)_____135

Figura 7.5. Superfícies de resposta obtidas com os escores do *subgrupo A* (A) e *subgrupo B* (B)_____138

Figura 7.6. Cromatogramas obtidos em diferentes condições experimentais. Condições indicadas pela superfície A (—), condições indicadas pela superfície B(---) e condições escolhidas para os experimentos de extração dos capítulos 8 e 9 (---)_____140

Capítulo 8

Figura 8.1. Cromatogramas originais (A), alinhados (B) e totalmente pré-tratados (C). As regiões selecionadas e ampliadas mostram o alinhamento dos picos antes e depois do algoritmo de alinhamento COW (B) e depois de alisados e derivados (C) _____153

Figura 8.2. Variáveis selecionadas pelo OPS para construção de cada modelo de regressão. (A) acidez, (B) amargor, (C) aroma, (D) bebida, (E) corpo e (F) qualidade global _____154 - 156

Figura 8.3. Gráficos de *Leverage* x Resíduo de *Student* dos 6 modelos de regressão. (A) acidez, (B) amargor, (C) aroma, (D) bebida, (E) corpo e (F) qualidade global _____157

Figura 8.4. Representação gráfica das notas dos provadores para as amostras de validação cruzada (○) e validação externa (□) *versus* as notas previstas pelos modelos. Acidez (A), amargor (B), aroma (C), bebida (D), corpo (E) e qualidade global (F)_____159

Figura 8.5. Distribuição dos compostos voláteis indicados na Tabela 8.2 de acordo com o(s) modelo(s) PLS que participam _____162

Capítulo 9

- Figura 9.1.** Picos selecionados para a PCA de aroma (A). O cromatograma em verde (—) é um cromatograma típico de amostras com aroma baixo ou ruim e o em azul é um cromatograma típico de amostras com ótimo aroma (—)_____169
- Figura 9.2.** Gráfico 3D de escores de PC1 x PC2 x PC3 (A) e gráfico de escores e pesos de PC1 *versus* PC2 (B) - Amostras com aroma fraco e/ou muito fraco (●) e amostras com excelente aroma (□) – Os números em verde e em azul representam o peso de cada pico entre as amostras_____170
- Figura 9.3.** Picos selecionados para a análise PCA. O cromatograma em verde (—) é uma média dos cromatogramas de bebida rio/riada e o em azul é uma média dos cromatogramas de bebidas moles (—)_____171
- Figura 9.4.** Gráfico 3D de escores de PC1 x PC2 x PC3 (A) e gráfico de escores e pesos de PC1 *versus* PC2 (B) - Amostras com bebida rio/riada (●) e amostras com bebida mole (□) – Os números em verde e em azul representam o peso de cada pico entre as amostras_____171
- Figura 9.5.** Picos selecionados para a PCA. O cromatograma em verde (—) é uma média dos cromatogramas com baixa qualidade global ou e o azul é uma média dos cromatogramas com excelente qualidade global (—)_____172
- Figura 9.6.** Gráfico 3D de escores de PC1 x PC2 x PC3 (A) e gráfico de escores e pesos de PC1 *versus* PC2 (B) - Amostras com baixa qualidade global (●) e amostras com alta qualidade global (□) – Os números em verde e em azul representam o peso de cada pico entre as amostras_____173
- Figura 9.7.** Gráficos de *Coomans* para as distâncias quadráticas dos modelos para aroma (A), bebida (B) e qualidade global (C). Nos Gráficos as amostras das classes 1 para os 3 modelos estão indicadas por quadrados (□) enquanto as amostras das classes 2 por bolinhas (○)_____175
- Anexo 1**_____178

| | |
|----------------|-----|
| Anexo 2 | 179 |
| Anexo 3 | 180 |

Capítulo 10

| | |
|--|-----------|
| Figura 10.1. Dados espectroscópicos originais (A) e pré-tratados (B) | 185 |
| Figura 10.2. Variáveis selecionadas pelo OPS para construção de cada modelo de regressão. (A) acidez, (B) amargor, (C) aroma, (D) bebida, (E) corpo e (F) qualidade global | 186 - 187 |
| Figura 10.3. Gráficos de <i>Leverage</i> x Resíduo de <i>Student</i> dos 6 modelos de regressão. (A) acidez, (B) amargor, (C) aroma, (D) bebida, (E) corpo e (F) qualidade global | 190 |
| Figura 10.4. Representação gráfica das notas dos provadores para as amostras da validação cruzada (○) e validação externa (□) <i>versus</i> as notas previstas pelos modelos. Acidez (A), amargor (B), aroma (C), bebida (D), corpo (E) e qualidade global (F) | 192 |
| Figura 10.5. Espectros de infravermelho próximo por refletância difusa dos padrões dos principais compostos constituintes do café sobrepostos aos espectros do café arábica cru | 195 |
| Figura 10.6. Representação esquemática das regiões de absorção dos principais compostos do café arábica cru na região do infravermelho próximo. A diferença vertical das barras de cores diferentes indica a concentração aproximada em % dos compostos presentes no café, segundo Toci et al. (2006) | 196 |

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

| | |
|--|----|
| Tabela 2.1. Compostos descritos na literatura como os principais responsáveis pelo aroma do café torrado e suas respectivas descrições sensoriais | 14 |
|--|----|

Capítulo 3

| | |
|---|----|
| Tabela 3.1. Classificação de café cru por peneira | 17 |
| Tabela 3.2. Características e causas dos principais defeitos encontrados no café beneficiado | 19 |
| Tabela 3.3. Atributos sensoriais descritos na classificação por bebida e suas características | 20 |
| Tabela 3.4. Classificação dos cafés arábica por qualidade da bebida ou simplesmente bebida | 21 |
| Tabela 3.5. Classificação dos cafés pela qualidade global | 22 |
| Tabela 3.6. Características sensoriais e qualidade global recomendada pela ABIC em 2005 | 23 |
| Tabela 3.7. Características sensoriais e qualidade global recomendada pela ABIC atualmente em 2007 | 24 |

Capítulo 4

| | |
|---|----|
| Tabela 4.1. Recobrimentos comercialmente disponíveis para SPME | 38 |
|---|----|

Capítulo 5

| | |
|---|----|
| Tabela 5.1. Análise de variância para regressão múltipla | 93 |
|---|----|

Capítulo 6

| | |
|--|-----|
| Tabela 6.1. Principais compostos identificados por espectrometria de massas nas análises cromatográficas dos cafés comerciais_____ | 104 |
| Tabela 6.2. Freqüências características de absorção de infravermelho médio atribuições para cada região selecionada visualmente para o PCA e pelo método OPS para o PLS-DA_____ | 117 |

Capítulo 7

| | |
|--|-----|
| Tabela 7.1. Variáveis, notação das variáveis e seus níveis no planejamento composto central_____ | 129 |
| Tabela 7.2. Experimentos realizados para o planejamento composto central 2 ³ . Os níveis decodificados estão entre parênteses e os níveis codificados fora. A letra C indica experimentos no ponto central _____ | 130 |
| Tabela 7.3. Porcentagem e variância capturada pelo PCA para os diferentes subgrupos_____ | 135 |
| Tabela 7.4. Ensaio realizados e seus escores de PC1 de cada <i>subgrupo</i> usado como resposta nos planejamentos_____ | 136 |
| Tabela 7.5. Análise estatística dos modelos e coeficientes codificados para os <i>subgrupos A e B</i> _____ | 136 |
| Tabela 7.6. ANOVA para os dois modelos lineares construídos_____ | 137 |

Capítulo 8

| | |
|---|-----|
| Tabela 8.1. Tabela de atributos fornecidos aos provadores para a realização das análises sensoriais_____ | 146 |
| Tabela 8.2. Compostos identificados através das análises de massa por comparação dos seus MS espectros com os do NIST MS data base e literatura_____ | 149 |

Tabela 8.3. Parâmetros estatísticos calculados para os modelos de regressão na validação cruzada_____158

Tabela 8.4. Valores médios e desvios padrão dos seis atributos sensoriais atribuídos pelos provadores e previstos pelos modelos de regressão_____160

Capítulo 9

Tabela 9.1. Principais compostos identificados através das análises de massa por comparação dos seus MS espectros com os do NIST MS data base e literatura_167

Tabela 9.2. Sensitividade e especificidade para os modelos de aroma, bebida e qualidade global_____175

Capítulo 10

Tabela 10.1. Regiões espectrais selecionadas pelo OPS para os modelos de previsão dos seis atributos sensoriais estudados_____187

Tabela 10.2. Parâmetros estatísticos calculados para os modelos de regressão na validação cruzada_____191

Tabela 10.3. Valores médios e desvios padrão dos seis atributos sensoriais atribuídos pelos provadores e previstos pelos modelos de regressão_____193

LISTA DE ABREVIATURAS

| Abreviaturas | Termos em português | Termos em inglês |
|--------------|---|--|
| AEDA | Análise de extrato de aroma diluído | <i>Aroma extract dilution analysis</i> |
| AMDIS | Sistema automático de identificação de deconvolução se espectros de massa | <i>Automated mass spectral deconvolution and identification system</i> |
| ANOVA | Análise de variância | <i>Variance analysis</i> |
| ASIC | Associação para Ciência e Informação sobre Café | <i>Association for Science and Information on Coffee</i> |
| CCD | Planejamento composto central | <i>Central composite design</i> |
| COW | Alinhamento otimizado por correlação | <i>Correlation optimized warping</i> |
| DRIFT | Infravermelho com transformada de Fourier por reflectância difusa | <i>Diffuse reflectance infrared with Fourier transformation</i> |
| <i>Ext</i> | Tempo de extração | <i>Extraction time</i> |
| FID | Detector por ionização em chama | <i>Flame ionization detector</i> |
| GC | Cromatografia gasosa | <i>Gas chromatography</i> |
| GC-O | Cromatografia gasosa com detector olfatométrico | <i>Gas chromatography with olfatometric detector</i> |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência | <i>High performance liquid chromatography</i> |
| HS | Espaço (vaporoso) confinados | <i>Headspace</i> |
| ISO | Organização Internacional para Padronização | <i>International Organization for Standardization</i> |
| MID | Infravermelho médio | <i>Middle infrared</i> |
| MLR | Regressão linear múltipla | <i>Multiple linear regression</i> |
| MQ | Média quadrática | <i>Mean square</i> |
| MS | Detector de massas | <i>Mass detector</i> |
| MSC | Correção multiplicativa de sinal | <i>Multiple scattering correction</i> |
| nDF | Número de Graus de Liberdade | <i>Number of degrees of freedom</i> |
| NIR | Infravermelho próximo | <i>Near infrared</i> |

| | | |
|----------|--|--|
| NIST | | <i>Mass spectral search program from the national institute for science and technology</i> |
| OPS | Seleção das variáveis ordenadas | <i>Ordered predictors selection</i> |
| p | Valor p estatístico | <i>Statistical significance (p Level)</i> |
| PCA | Análise de componentes principais | <i>Principal component analysis</i> |
| PCR | Regressão por componentes principais | <i>Principal component regression</i> |
| PLS | Quadrados mínimos parciais | <i>Partial least squares</i> |
| PLS-DA | Análise discriminante por quadrados mínimos parciais | <i>Partial least squares – discriminant analysis</i> |
| PVA | Preto, verde e ardido | <i>Black, green, bitter</i> |
| r | Coeficiente de correlação | <i>Correlation coefficient</i> |
| RMSECV | Erro quadrático médio de validação cruzada | <i>Root mean square error of cross validation</i> |
| RMSEP | Erro quadrático médio de previsão | <i>Root mean square error of prediction</i> |
| RSM | Metodologia de superfície de resposta | <i>Response surface methodology</i> |
| SPME | Microextração em fase sólida | <i>Solid phase microextraction</i> |
| SQ | Soma quadrática | <i>Sums of squares</i> |
| T | Temperatura do banho | <i>Bath temperature</i> |
| TPE | Tempo de pré-equilíbrio | <i>Pre equilibrium time</i> |
| VOA | Valor de odor ativo | <i>Aroma threshold value</i> |
| VOC | Compostos orgânicos voláteis | <i>Volatile organic compounds</i> |
| α | Nível de significância estatística | <i>Significance statistical level (alpha level)</i> |

Capítulo 1

Justificativa e objetivos da tese

1.1. Justificativa

Pode-se buscar argumentos ou teorias de toda ordem, mas nenhuma bebida é tão autenticamente brasileira quanto o café. Isso é praticamente irrefutável e se baseia em séculos de caminhada. Em cada gole sorve-se muito mais do que o néctar produzido a partir do grão colhido em fazendas espalhadas por vários estados: sente-se o sabor de uma história. Quase seria viável identificar ali, em meio às características intrínsecas de cada tipo de pó ou de solúvel, um quê de passado, lembrasse a própria formação social e cultural do País.

E o Brasil mantém relação de muito afeto com os cafezais. Primeiro, por ser o maior produtor mundial de café, com quase o dobro de volume colhido em relação ao segundo colocado. Depois, por ser o principal fornecedor mundial desse grão, liderando o *ranking* dos exportadores (Beling et al., 2008).

No agronegócio do café, apenas duas das centenas de espécies existentes (pertencentes a família das *Rubiaceae*, do gênero *Coffea*) arcam com o imenso prestígio desta bebida: *C. arabica*, responsável por 63 % da produção mundial exportável e *C. canephora*, responsável pelos 37 % restantes.

Atualmente, o café é considerado a segunda bebida mais consumida em todo o mundo, sendo superado somente pela água. Esse consumo representa hoje, cerca de 60 bilhões de dólares anuais, contemplando desde a escolha do grão a ser plantado até o produto final comercializado (Brando, 2007).

A consolidação da posição brasileira como o maior produtor e exportador deste produto requer um controle cada vez mais rigoroso de sua qualidade, preferencialmente por meio de parâmetros objetivos e mensuráveis. Esta garantia

objetiva deve ser encarada como um elemento essencial do esforço para melhorar o valor agregado da produção agroindustrial brasileira. Nesse contexto, a preocupação em garantir a autenticidade do café comercializado internacionalmente é grande e, reflete-se, por exemplo, na necessidade da emissão de certificados de qualidade que assegurem que o produto comercializado atende ao padrão apropriado para a exportação e mesmo para o consumo interno.

O estabelecimento de mecanismos que permitam avaliar, assegurar e certificar a qualidade do café é uma estratégia indispensável para a manutenção da competitividade comercial. O grande número de normas e certificações criadas por organismos nacionais e internacionais, tais como o ISO (*International Organization for Standardization*), UTZ Kapeh Foundation, Cafés do Brasil, *Fair Trade Federation* entre outras (Figura 1.1) indica a importância da garantia da qualidade, freqüentemente exigida em transações comerciais (Keegan e Green, 2000). A certificação é o procedimento pelo qual uma terceira parte, independente (organização certificadora), assegura, por escrito, que um produto, processo ou serviço obedece a determinados requisitos, através da emissão de um certificado. No caso do café, esses certificados vão desde a origem e tipo do grão (rastreabilidade comprovada) passando por critérios econômicos e culturais, chegando a fatores de responsabilidade social e ambiental (sustentabilidade) tão ostensivamente debatidos atualmente.

Só para se ter uma idéia, o primeiro código de conduta que abordou as condições de saúde e trabalho dos funcionários, conformidade com a legislação e preocupação com a sustentabilidade social, ambiental e cultural, dentro de fazendas de café da Guatemala foi criado em 2000 pela organização não-governamental UTZ Kapeh (UTZ Kapeh).



Figura 1.1. Logotipos de órgãos nacionais e internacionais de qualidade.

O consumidor com algum conhecimento sobre esse mercado pode distinguir, pelas características da bebida, um café de qualidade superior. Contudo, a grande maioria dos consumidores não está apta a distinguir certos atributos de qualidade. Nesses casos, o fortalecimento da confiança no organismo certificador estimula a comprovação dos atributos contidos no selo impresso na embalagem (Souza e Saes, 2001).

No mundo todo, especialistas e pesquisadores buscam meios para reconhecer, valorizar e promover esses padrões de qualidade para os melhores cafés. Uma prova disto é o fato de, em 2008, na 22ª Conferência Internacional sobre a Ciência do Café (ASIC-2008), realizada em Campinas-SP, o comitê organizador do evento ter contabilizado um volume de trabalhos científicos 40,4 % superior ao da última edição, realizada no ano de 2006 em Montpellier, na França. Nesta conferência o tema qualidade foi intensivamente abordado nas áreas de agronomia, química, biotecnologia e melhoramento de cafeeiros.

Segundo os resultados dessas pesquisas, muitos são os fatores que influenciam a qualidade da bebida, incluindo fatores genéticos, agronômicos, ambientais, passando pelos processos de preparo e armazenagem, até a maneira como é torrado e preparado (Leite e De Carvalho, 1994; De Carvalho et al., 2003; Andrueza et al., 2003; Alves et al., 2009; Selmar et al., 2008) (Figura 1.2). Assim, tanto na fase de pré quanto na de pós-colheita, a qualidade da bebida depende da interação entre fatores

que garantem a expressão final das características de aroma e sabor (Feria - Morales, 1990).



Figura 1.2. Fases da produção do café e fatores que podem influenciar na qualidade final da bebida.

Na procura por parâmetros mensuráveis, inúmeras tentativas têm sido realizadas para tornar a avaliação da bebida de café objetiva. Uma metodologia bastante estudada é a que procura correlacionar a qualidade da bebida com as características físicas e químicas do grão cru (verde) ou torrado. Com esse intuito, pesquisas vêm sendo realizadas ao longo dos anos empregando-se, por exemplo, o pH (Sivetz, 1972), a acidez total titulável (De Carvalho et al., 1994), teor de polifenóis (De Carvalho et al., 1989; Pimenta, 2000; Coelho, 2000) o teor de sólidos solúveis

(Vree e Yeransia, 1973; Lopes, 2000), de ácidos clorogênicos (De Maria, 2004; Bicchi et al., 1995; Perrone et al., 2008a), de açúcares, de cafeína e de trigonelina (De Maria et al., 1994; Beckers, 2004; Alves et al., 2006; Morgano et al., 2007; Perrone et al., 2008b), metais (Fernandes et al., 2005) e outros (Esteban-Díez et al., 2004a; Franca et al., 2005; Farah et al., 2006; Nebesny e Budryn, 2006; Ross et al., 2006; Andrueza et al., 2007). Técnicas promissoras tais como língua e nariz eletrônicos, GC-O, AEDA (análises de aroma de extratos diluídos) e CharmAnalysis[®] (Reid et al., 2006; Poliak et al., 2006; Zellner et al., 2008; Van Ruth, 2001; Schmid e Grosch, 1986; Acree et al., 1984) também vem sendo testadas. Porém, a qualidade da bebida tem se mostrado dependente de vários componentes simultaneamente, e sua avaliação requer uma cuidadosa análise conjunta dos resultados.

Nesse contexto, o tratamento quimiométrico de informações analíticas relacionadas ao café já vêm sendo explorado na identificação de sua origem botânica (Martín et al., 1998; Downey et al., 1997; Carrera et al., 1998; Martín et al., 1999), caracterização por metais (Fernandes et al., 2005), voláteis (Huang et al., 2007), torra (Martín et al., 1996; Ribeiro et al., *submetido para Food Chemistry*), entre outros. Os resultados obtidos nesses trabalhos indicam que a composição química do grão aliada a este tratamento estatístico de dados analíticos pode ser utilizada, por exemplo, para garantir de maneira objetiva e mensurável a origem botânica do café comercializado.

Apesar das alternativas em estudo, até os dias de hoje, nenhum processo químico ou físico tem sido efetivamente empregado para avaliar objetivamente a qualidade deste produto. E, apesar dos esforços realizados, a qualidade da bebida de café ainda é determinada pela “prova de xícara” (*cup profile*), realizada com competência pelos “provadores” (*cuppers*), que são profissionais experientes na arte de degustar café (Figura 1.3).



Figura 1.3. Representação das provas de xícara realizadas por provadores.

Embora mundialmente empregada, são muitas as críticas aos protocolos usados para a “prova de xícara”. Essas críticas incluem a falta de padronização da metodologia e questionam especialmente o fato das avaliações conduzidas pelos provadores serem realizadas em condições de torra e preparo de bebida muito diferentes daqueles comumente usados pelos consumidores (Feria - Morales, 2002).

O emprego de análises estatísticas multivariadas na avaliação da qualidade de certos produtos, correlacionando o seu aroma com análises sensoriais descritivas, vem se tornado uma excelente ferramenta no controle de qualidade de alimentos e produtos agrícolas, sendo aplicada com sucesso em análises de nozes, vinagre, sucos e vinhos (Alasalvar et al., 2003; Durante et al., 2006; Moshonas e Shaw, 1997; Rapp, 1998; Aznar et al., 2003).

Contudo, mesmo sabendo que o aroma do café torrado possui um papel fundamental na qualidade da bebida, ainda são raros os trabalhos que visam estabelecer essa relação (Rocha et al., 2004; Agresti et al., 2008; Toci et al., 2008). Há, por outro lado, várias pesquisas identificando compostos-chave do aroma real do café (Simmelroch e Grosch, 1995; Semmelroch e Grosch, 1996; Czerny et al., 1999; Czerny e Grosch, 2000; Grosch e Mayer, 1999; Mayers et al., 2000; Mayers e Grosch, 2001; Buffo e Cardelli-Freire, 2004).

Entretanto, até o momento nenhum estudo quimiométrico foi proposto para tratar conjuntamente os resultados analíticos relativos aos constituintes do aroma, não se tendo por isso viabilizado o desenvolvimento de um procedimento de autenticação da qualidade sensorial do café tendo por base o aroma do grão torrado.

Assim, nesta tese se propõe o estabelecimento de modelos quimiométricos para a previsão de notas dos atributos sensoriais, tais como bebida, corpo, qualidade global entre outros, considerados essenciais na caracterização da bebida, a partir da correlação entre seus compostos voláteis e notas atribuídas na prova de xícara.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

O objetivo principal deste projeto é a construção de modelos quimiométricos de previsão que possam ser utilizados para a certificação da qualidade dos cafés arábica brasileiros a partir da correlação entre os compostos voláteis que compõem o seu aroma e análises sensoriais descritivas de diversas amostras com características distintas.

A utilização apenas de cafés da espécie arábica ocorreu devido à sua maior importância no cenário mundial e nas exportações brasileiras.

1.2.2. Objetivos secundários

1. Construir modelos quimiométricos capazes de prever notas de diferentes atributos sensoriais de amostras desconhecidas de cafés arábica torrados utilizando infravermelho próximo por reflectância difusa.
2. Determinar os componentes voláteis de maior relevância (marcadores) para cada atributo sensorial importante para a qualidade.

Para encerrar, a representação esquemática indicada pela Figura 1.4 apresenta os caminhos principais e secundários necessários para o cumprimento dos objetivos desta tese. Nela, as linhas pretas contínuas (—) indicam os caminhos diretos levados ao objetivo central da tese e seus resultados; as linhas cinza tracejadas (---) indicam resultados secundários obtidos durante o período (não menos importantes) e as linhas pretas pontilhadas (•••) indicam os caminhos não utilizados ou que não apresentaram bons resultados.

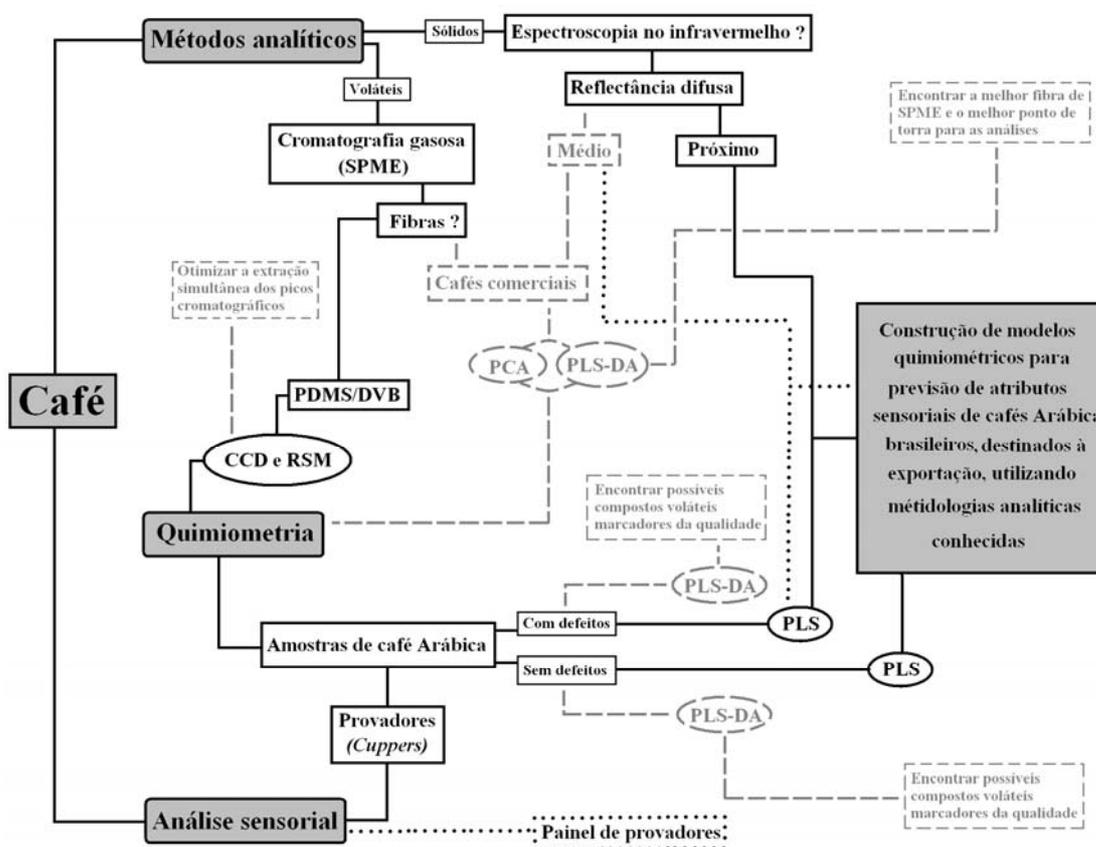


Figura 1.4. Representação esquemática para o alcance do objetivo principal e dos objetivos secundários da tese de doutorado. **PCA** – análise de componentes principais; **PLS** – regressão por quadrados mínimos parciais; **PLS-DA** – análise discriminante a partir da regressão por mínimos quadrados parciais; **CCD** – planejamento composto central; **RSM** – metodologia de superfície de resposta.

Capítulo 2

Voláteis de café torrado

Do fim do século XIX aos dias atuais

2.1. Breve histórico

As evidências botânicas sugerem que a planta do café originou-se na Etiópia Central. Entretanto, ninguém parece saber exatamente quando o primeiro café foi tomado lá (ou em qualquer parte), mas os registros apontam para meados do século XV.

À medida que o café tornou-se cada vez mais popular, salas especiais nas casas dos mais abastados foram reservadas para se tomar café, e casas de café começaram a surgir nas cidades. A primeira foi aberta em Meca, no final do século XV e início do XVI, seguida por Cairo, Constantinopla e outras partes do Oriente Médio. Enquanto isso, comerciantes europeus da Holanda, Alemanha e Itália certamente já estavam exportando grãos e, também, tentando introduzir a lavoura em suas colônias, tais como Sri Lanka e Java.

Em 1727 os portugueses vislumbraram que a terra do Brasil tinha todas as possibilidades que convinham à cafeicultura. Mas infelizmente eles não possuíam nem plantas nem grãos. Então, através de uma estratégia supostamente política, o governo do Pará conseguiu as primeiras sementes, a partir das quais haveria de se crescer o poderoso império brasileiro do café.

Favorecida por fatores políticos, a importância do café no Brasil refletiu-se na sua rápida expansão geográfica (aproximadamente 50 anos), sendo por várias décadas sua mais importante atividade econômica (Fonte: Grande Enciclopédia Larousse Cultural).

Atualmente, o Brasil, não tem o café como o principal produto de sua balança comercial, configurando assim uma perda significativa originada de outras produções mundiais que cresceram rapidamente, levando a concorrência dos preços e da qualidade (Pimentel, 2001).

Uma característica interessante da bebida do café é o fato de não possuir valor nutricional relevante, sendo consumida basicamente devido aos efeitos fisiológicos e psicológicos relacionados à presença de certas substâncias, isso sem contar o prazer e a satisfação que esta bebida é capaz de proporcionar.

As palavras do Xeique Abda-al-Kadir escritas em 1587, exprimem exatamente esses sentimentos de milhões de apreciadores dessa bebida em todo mundo, “O café é o ouro do homem comum, e, como o ouro, traz a todo homem o sentimento de luxúria e nobreza. Onde é servido, há graça e esplendor, amizade e alegria. Todas as preocupações desaparecem quando uma xícara de café é levada aos lábios” (Pettigrew, 1998).

A qualidade do café como bebida é altamente dependente de suas características de aroma e sabor que determinam o seu valor comercial. Essa combinação de características é altamente complexa, resultante da presença combinada de vários constituintes químicos voláteis e não voláteis. Porém, dessas duas características sensoriais, o aroma é sem nenhuma dúvida o mais interessante e complexo (De Maria et al., 1999).

2.2 Compostos voláteis do café

Devido à grande importância que o aroma representa na qualidade da bebida café, os esforços científicos que elucidam a origem de seu sabor rico e distinto foram iniciados em meados de 1880 quando Bernheimer identificou o primeiro volátil orgânico do café (VOC) dando-lhe o nome de cafeol ($C_8H_{10}O_2$) (Bernheimer, 1880). Contudo, foi a partir de 1926 que os pesquisadores Reichenstein e Staudinger (1926)

identificaram e patentearam diversos compostos importante do aroma do café, dentre eles o 2-hidroximetil-furano, considerado inicialmente como um dos possíveis componentes de impacto no aroma do café torrado (Reichenstein et al., 1928).

A partir de então, devido ao progresso em técnicas analíticas, principalmente da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas na década de 60, e devido ao aumento do interesse econômico em dominar o sabor do café, o número de publicações envolvendo aromas do mesmo e, conseqüentemente o número de compostos encontrados no café (VOCs) aumentaram rapidamente (Yeretzian et al., 2003).

Hoje, aproximadamente, 900 compostos orgânicos voláteis já foram relatados e identificados no café (Nijssen et al., 1996). Estes compreendem compostos encontrados tanto no grão verde quanto no café torrado (todos os níveis de torra) das diferentes origens botânicas. Contudo, a maioria dos compostos voláteis encontrados é produzida durante a torra do café verde (De Maria et al., 1999).

Por muitos anos, os cientistas concentraram-se em identificar um número crescente de VOCs do café. Porém, o avanço nas pesquisas na década de 70 demonstrou que somente uma pequena fração destes voláteis era odorífera (5 % aproximadamente). A partir de então, o foco destas pesquisas se deslocou para estes poucos compostos orgânicos relevantemente mais importantes para a o aroma (Yeretzian et al., 2003). Nos dias atuais, segundo Reineccius (1995), a identificação de novos voláteis em café torrado pode se tornar um exercício de futilidade, visto que, a questão central tenha se tornado a identificação dos compostos de impacto do aroma do café. Uma revisão bibliográfica detalhada dos principais compostos voláteis encontrados no café verde ou torrado encontra-se no *Apêndice* desta tese.

2.3. Compostos de impacto do aroma do café torrado

Com o objetivo de avaliar o impacto destes poucos compostos odoríferos no aroma do café, diversas técnicas analíticas foram desenvolvidas para a identificação e quantificação dos VOCs. Técnicas como cromatografia gasosa com detector olfatométrico (CG-O) (Holscher e Steinhart, 1992), análises de aroma de extratos diluídos (AEDA) (Schimid e Grosch, 1986) e CharmAnalysis[®] (Acree et al., 1984) estão entre elas. As técnicas de AEDA e CharmAnalysis[®] permitem determinar o potencial odorífero de um determinado componente baseando-se em diluições sucessivas de um extrato obtido de um alimento. Cada diluição é então injetada em um CG-olfatométrico. A diferença entre as técnicas é que na primeira delas apenas as substâncias com aroma são anotadas, enquanto que na segunda, as que não possuem aroma também são anotadas.

Segundo Semmelroch e Grosch (1996), utilizando-se a técnica de AEDA, 14 compostos voláteis foram selecionados para reproduzir o aroma do café baseados em seus elevados valores de odor ativo (VOA), partindo de uma lista inicial proposta por Holscher e Steinhart (1994) contendo 80 compostos voláteis. Já com a técnica CharmAnalysis[®] foram selecionados 18 (Contis et al., 1998).

Em pesquisa realizada posteriormente com cafés arábica torrados, modelos de análises sensoriais de 27 compostos odoríferos foram realizados em mistura água/óleo. Neste estudo um painel sensorial demonstrava as mudanças no aroma total após a omissão de um ou mais compostos. Esses experimentos de omissão indicaram que 2-furfuriltiol, 4-vinilguaicol, várias alquilpirazinas, furanonas, acetaldeído, propanal, metilpropanal e 2- e 3-metilbutanal possuíam os maiores impactos no aroma do café. Em contrapartida, a ausência do 2,3-butanediona, 2,3-pentanediona, β -damascenona e vanilina em seus respectivos modelos de aroma não foram notadas diferenças (Czerny et al., 1999).

Procurando diferenças entre o aroma do pó e da bebida, pesquisadores quantificaram estes compostos com odorantes potentes em cafés arábica e robusta torrados, detectando diferenças nos respectivos aromas e concentrações provenientes do pó e da bebida. Os odorantes polares (ex. solotona) eram preferencialmente extraídos, enquanto que as concentrações dos apolares (ex. 2-furfuriltiol e β -damascenona) eram baixas. Aplicando como base esses resultados, os autores formularam misturas sintéticas (modelos de aroma) para bebidas de cafés arábica e robusta. Os modelos apresentaram aromas muito próximos ao da bebida café, demonstrando claramente as diferenças no aroma entre as duas espécies estudadas (Semmelroch e Grosch, 1996).

Finalmente, pesquisadores do mesmo grupo, a partir de um modelo aromático criado utilizando diferentes concentrações dos compostos odoríferos, quantificaram os mais potentes no *headspace* do café arábica. De acordo com seus resultados, utilizando-se uma escala de similaridade de 0 a 3 eles obtiveram um valor e 2.6 (Mayers e Grosch, 2001). A Tabela 2.12, retirada de uma revisão mais recente (Buffo e Cardelli-Freire, 2004), indica os 25 compostos identificados nesses trabalhos como os responsáveis pelo aroma do café torrado e a descrição sensorial obtida de cada um deles.

Tabela 2.1. Compostos descritos na literatura como os principais responsáveis pelo aroma do café torrado e suas respectivas descrições sensoriais.

| Compostos | Descrição sensorial |
|---|----------------------------|
| Acetaldeído | Frutal |
| Metilpropanal | Adocicado, caramelado |
| 2-metilbutanal | Adocicado, caramelado |
| 3-metilbutanal | Adocicado, caramelado |
| 2,3-butadiona | Adocicado, caramelado |
| 2,3-pentadiona | Adocicado, caramelado |
| β -Damascenona | Frutal |
| 2-furfuriltiol | Matéria queimada |
| Formato de 3-mercapto-3-metilbutil | Matéria torrada |
| Furaneol | Caramelo |
| 2-metilfuranotiol | Nozes |
| Guaiacol | Plástico |
| 4-vinilguaiacol | Cravo |
| Metional | Batata |
| 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona (Solotona) | Queimado |
| Vanilina | Baunilha |
| 4-etilguaiacol | Picante |
| 5-etil-3-hidroxi-4-metil-2(5H)-furanona (Abhexona) | Açúcar queimado |
| 5-metil-6,7-dihidrociclopentapirazina | Algodão doce |
| 2-etil-3,5-dimetilpirazina | Matéria queimada |
| 2-isopropil-3-metoxipirazina | Pimenta vermelha |
| 2,3,5-trimetilpirazina | Matéria torrada |
| 2,3-dietil-5-metilpirazina | Terra |
| 2,4,5-trimetiltiazol | Plástico |
| (E)-2-nonenal | Matéria torrada |

Fonte: Buffo e Cardelli-Freire, 2004

Capítulo 3

Tipos de classificação e análises sensoriais

3.1. Classificação dos grãos

Após o beneficiamento, o café está pronto para ser comercializado, porém, como a qualidade dos grãos é bastante diversificada, em função das diferentes condições de produção, é conveniente proceder a uma classificação do produto. É através desta classificação que os valores comerciais deste produto são definidos, tanto no mercado interno quanto no externo. Cada país exportador costuma ter sua própria classificação, sendo comum levar em conta a aparência, a presença de defeitos e algumas características sensoriais da bebida. A *International Standardization Organization* (ISO) citada por Feria-Morales (2002) apresenta algumas normas para a padronização de definição, designação, composição, defeitos tipo e formato de grãos, cor, características após torra e perfil sensorial de “prova de xícara” (*cup profile*).

O que vigora comercialmente no mercado internacional é a classificação por espécies. Segundo Illy e Viani (2005), a espécie *C. arabica* (café arábica) (Figura 3.1 A), de melhor bebida e mais comercializada, apresenta aroma e sabor mais intensos, amargor e acidez balanceados enquanto, o café da espécie *C. canephora* (café robusta) (Figura 3.1 B) é considerado de bebida neutra, com sabor sensivelmente mais amargo.



Figura 3.1. Grãos de café beneficiados da espécie arábica (A) e robusta (B).

Parte considerável da diferença sensorial entre as bebidas das duas espécies é atribuída à diferença na composição química desses cafés ainda crus (verdes), atuando de forma diversa como precursores para a formação dos compostos que conferirão o aroma e sabor característicos do café torrado. Além das características inerentes a cada espécie, o clima, o tipo de solo, a altitude em que se encontra o talhão e os tratamentos agrícolas aplicados também influenciam na composição química e, por conseguinte, na qualidade da bebida.

No Brasil, são vários os critérios utilizados na classificação dos grãos de café cru, contemplando aspectos físicos, como o tamanho, a cor e o número de defeitos e as características sensoriais da bebida. As classificações mais importantes comercialmente são as classificações por peneira, por tipo ou defeito e por bebida (qualidade).

3.1.1. Classificação por peneira

A classificação oficial por peneira discrimina os grãos beneficiados por suas dimensões. As favas chatas e moca são separadas e quantificadas por peneira de crivos circulares e alongados, respectivamente. As peneiras oficiais são designadas por números, que divididos por 64 são iguais ao tamanho dos furos, expresso em polegadas. As peneiras de grão chato vão de nº 12 a 20 e as de grão moca de 8 a 13 (Segges, 2001) (Tabela 3.1). As peneiras para separar os grãos moca geralmente são intercaladas entre as demais, para que a separação se dê por tamanho e forma.

A separação do café por peneiras é bastante importante para se garantir uma torra uniforme, pois, numa torra de grãos de diversos tamanhos (“bica corrida”), os grãos menores torram mais rapidamente, havendo o risco de carbonização e posterior percepção de sabor e aroma queimado na bebida (Matiello, 1991).

Tabela 3.1. Classificação de café cru por peneira.

| Classificação | Peneiras |
|------------------------|-------------------------------------|
| Chato grosso | 17 a 20 (café grande) |
| Chato médio | 15 a 16 (café médio) |
| Chato miúdo (chatinho) | 12 a 14 (café miúdo ou chatinho) |
| Moca graúdo | 11 a 13 (café moca grande) |
| Moca Médio | 10 (café moca médio) |
| Moca miúdo (moquinha) | 8 a 9 (café moca miúdo ou moquinha) |

3.1.2. Classificação por tipo ou defeito

Essa classificação, que leva em conta aspectos físicos de uma amostra de café, é baseada na "Tabela Oficial Brasileira de Classificação" (Resolução nº 535 do extinto Instituto Brasileiro do Café - IBC), e compreende sete tipos, variando de 2 a 8. A análise do lote de café é feita através de uma amostra de 300 gramas, e a classificação é feita de acordo com o número de defeitos (IBC, 1977).

Os defeitos podem ser resultantes de modificações fisiológicas e genéticas ou de processos agrícolas mal conduzidos. Dessas falhas, surgem os defeitos de natureza intrínseca, que são os cafés pretos, ardidos, verdes, chochos, mal granados, quebrados e brocados. Os defeitos também podem ser de natureza extrínseca, representados por elementos estranhos misturados aos grãos, incluindo cascas, paus, pedras e outras impurezas (<http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=5&ID=33>).

Segundo Silva (1999), quanto maior for o tempo de permanência do café na lavoura após a maturação, quer seja na árvore quer seja no chão, maior será a incidência de grãos ardidos e pretos, considerados, juntamente com os verdes, os piores defeitos do café. Grãos com esses defeitos são conhecidos como PVA, sigla para preto, verde e ardido (Figura 3.2). Dessa forma, recomenda-se que a colheita seja iniciada quando cerca de 90 % dos frutos estiver madura e antes que se inicie a sua

queda no chão. Esse período de colheita acontece, em média, sete meses após a floração, a qual, por sua vez, ocorre por ocasião das primeiras chuvas.

Para a classificação do café por tipo segundo a tabela oficial de classificação, emprega-se a tabela de equivalência de grãos imperfeitos. Para a composição da tabela de equivalência de defeitos, tomou-se como padrão o grão “preto”, que é considerado o pior dos defeitos, ou seja, 1 grão preto equivale a 1 defeito. Os demais defeitos, tais como os ardidos, as conchas, os brocados, os paus, etc., são considerados secundários. De acordo com essa tabela, dois grãos de café ardido equivalem a 1 defeito, por exemplo.

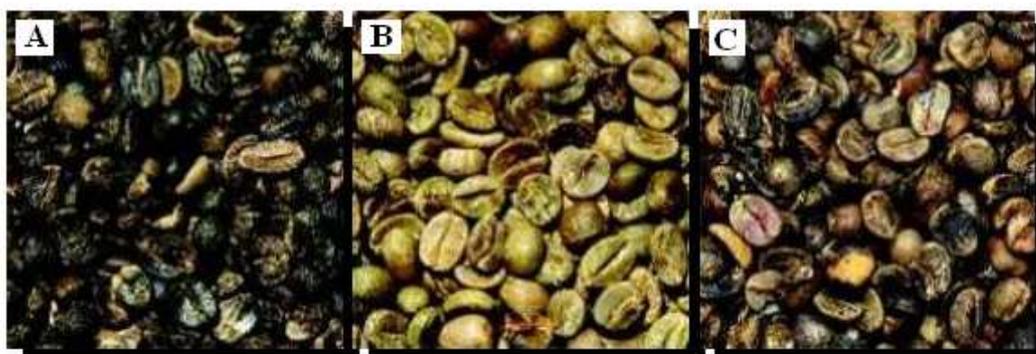


Figura 3.2. Imagem dos defeitos mais frequentes nos grãos de café. Grãos pretos (A), verdes (B) e ardidos (C). Fonte: ABIC.

Segundo a portaria N° 49 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 25/03/2008 (<http://www.agricultura.gov.br>) esses defeitos são descritos de acordo com a tabela 3.2 abaixo.

Pela classificação por tipo é possível inferir sobre as condições da colheita, e sobre os cuidados durante o processamento pós-colheita e beneficiamento. Dessa forma, grãos com cor de terra indicam o contato do fruto com o solo enquanto grãos manchados sugerem secagem drástica ou desuniforme e grãos quebrados, cocos e marinheiros indicam pouco cuidado no beneficiamento.

Tabela 3.2. Características e causas dos principais defeitos encontrados no café beneficiado.

| Defeitos | Características | Causas |
|--------------------|--|--|
| Ardido | Grão ou pedaço de grão que apresenta a coloração marrom, em diversos tons, devido à ação de processos fermentativos; | Bolores em frutos colhidos verdes ou devido à permanência prolongada dos frutos em contato com o solo* |
| Preto | Grão ou pedaço de grão de coloração preta opaca | Ataque de fungos devido à colheita atrasada dos frutos e permanência prolongada no solo* |
| Preto-verde | Grão preto que se apresenta brilhante devido à aderência da película prateada | |
| Verde | Grão imaturo, com película prateada aderida, com sulco ventral fechado e de coloração verde em tons diversos | Colheita de frutos verdes* |
| Brocados | Grão que apresenta furos com coloração azulada* | É o grão danificado pela broca do café (<i>Hypotenemus hampei</i>)* |
| Impurezas | Casca, pau e outros detritos provenientes da própria planta | Colheita por derriça no chão e abanação mal feita* |

* Fonte: Bartholo e Guimarães, 1997; Martiello, 1991; Illy e Viani, 2005

Para alguns pesquisadores, cafés verdes, ardidos e pretos são os que mais influenciam no resultado final da bebida, com tendência para os cafés isentos de defeitos serem os de melhor qualidade (Camargo e Queiros Telles, 1958; Myia et al., 1973/1974; Teixeira et al., 1971; Agresti et al., 2008). Entretanto, até hoje, não existe uma correlação entre a quantidade de defeitos e a classificação da prova de xícara. No entanto, é de se esperar que cafés com defeitos graves, como grãos pretos e ardidos, promovam uma bebida de baixa qualidade sensorial.

3.1.3. Classificação por qualidade ou bebida

De acordo com a portaria N° 49 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 25/03/2008, essa classificação baseia-se nos resultados da análise sensorial descritiva quantitativa, mediante a “prova de xícara”. Essa análise consiste fundamentalmente em atribuir notas para algumas características sensoriais da bebida

como: aroma, fragrância, amargor, corpo, sabor (tradicionalmente conhecido como bebida), sabor residual, acidez, adstringência e qualidade global, cujos significados encontram-se na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Atributos sensoriais descritos na classificação por bebida e suas características.

| Atributos | Características |
|--|---|
| Acidez | A percepção causada por substâncias como ácido clorogênico, cítrico, málico e tartárico que produzem gosto ácido; Pode ser associado ainda ao ácido fosfórico Os cafés arábica são mais ácidos que os robusta. Sendo que os cafés processados por via úmida são mais ácidos que os processados por via seca (Clifford, 1985; Clarke, 1986) |
| Adstringência | A sensação de secura na boca deixada após a sua ingestão da bebida de café É particularmente associada à presença de ácidos dicafeoilquínicos, que são compostos adstringentes cuja característica é precipitar as proteínas salivares; O café robusta é mais adstringente que o arábica, e grãos de café provenientes de cerejas imaturas também são adstringentes, uma vez que possuem maior quantidade de ácidos dicafeoilquínicos (Clifford, 1985; Clarke, 1986) |
| Aroma | A percepção olfativa causada pelos gases liberados do café torrado e moído, após preparação da infusão, conforme os compostos aromáticos são inalados pelo nariz |
| Fragrância | A percepção olfativa causada pelos gases liberados do café torrado e moído, conforme os compostos aromáticos são inalados pelo nariz |
| Amargor | A percepção de gosto amargo causada por substâncias como cafeína, trigonelina, ácidos cafêico e quínico e outros compostos fenólicos (degradação dos ácidos clorogênicos) e caramelização de açúcares (Clifford, 1985; Clarke, 1986) |
| Corpo | A percepção tátil de oleosidade e viscosidade na boca da bebida de café |
| Sabor | A sensação causada pelos compostos químicos da bebida de café quando introduzida na boca |
| Sabor residual | A persistência da sensação de sabor após a ingestão da bebida de café |
| Qualidade da bebida¹ | É a combinação de sensações causada pelos compostos químicos da bebida do café quando introduzida na boca [*] ; Apresenta uma escala de classificação (Tabela 3.4) |
| Qualidade global² | A percepção conjunta das características sensoriais do café Apresenta uma escala de classificação (Tabela 3.5) |

* Fonte – ABIC; ¹. Tabela 3.4; ². Tabela 3.5

Alternativamente à análise sensorial descritiva, a classificação da bebida pode ser baseada apenas no atributo “bebida” ou sabor. A avaliação da bebida do café arábica através desse atributo é realizada desde 1917, quando foi instalada a Bolsa

Oficial de Café e Mercadorias de Santos e é feita pela “prova de xícara” por profissionais treinados e experientes na atividade de degustar café (*cuppers*) (Figura 3.3).

Com base no atributo sabor (ou bebida), a bebida do café arábica pode ser classificada como estritamente mole, mole, apenas mole, dura, riada, rio e rio zona, que correspondem a bebidas com as características apresentadas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Classificação dos cafés arábica por qualidade da bebida ou simplesmente bebida.

| Classificação por bebida | Características |
|---------------------------------|---|
| Estritamente mole | Aquela que apresenta, em conjunto, todos os requisitos de aroma e sabor mole, porém mais acentuado |
| Mole | Aquela que apresenta aroma e sabor agradável, brando e adocicado |
| Apenas mole | Aquela que apresenta sabor levemente doce e suave, mas sem adstringência ou aspereza de paladar |
| Dura | Aquela que apresenta sabor acre, adstringente e áspero, porém não apresenta paladares estranhos |
| Riada | Aquela que apresenta leve sabor, típico de iodofórmio |
| Rio | Aquela que apresenta sabor típico e acentuado de iodofórmio |
| Rio Zona | Aquela que apresenta aroma e sabor muito acentuado, assemelhado ao iodofórmio ou ao ácido fênico, sendo repugnante ao paladar |

Fonte: Portaria Nº 49 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 25/03/2008

Por outro lado, com base no atributo qualidade global os cafés podem também ser classificados em gourmet, superior e tradicional, que guardam as características apresentadas na Tabela 3.5.

Um fato interessante para se ressaltar neste tipo de classificação é que não existe uma correlação entre a qualidade física do grão e o resultado da prova de xícara, ou seja, é possível encontrar um café com aparência não tão boa, mas cuja bebida seja de excelente qualidade, sendo que a situação inversa também é verdadeira.

Tabela 3.5. Classificação dos cafés pela qualidade global.

| Qualidade global | Características |
|--------------------|--|
| Gourmet | Aquela constituída de café de lote único, liga ou de <i>blend</i> , desde que isentos de matérias estranhas e que proporcionam uma bebida variando de apenas mole a melhor, atendendo a qualidade global da bebida |
| Superior | Aquela constituída de café de lote único, liga ou de <i>blend</i> , desde que isentos de matérias estranhas e que proporcionam uma bebida variando de dura a melhor |
| Tradicional | Aquela constituída de café de lote único, liga ou de <i>blend</i> , desde que isentos de matérias estranhas e que proporcionam uma bebida rio a melhor, excluindo-se o gosto rio zona |

Fonte: Portaria Nº 49 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 25/03/2008

3.2. Consumo e mercado interno

Enquanto que até a década de 80 o controle de qualidade dos cafés se restringia a uma necessidade imposta pelo comércio externo, hoje existem normas também para a comercialização interna do café, que visam proteger e orientar o consumidor cada vez mais exigente.

O selo de pureza da Associação Brasileira da Indústria do Café (ABIC) criado, no final da década 80 garante, por exemplo, que a amostra seja composta apenas por grãos de café.

Anos mais tarde, o selo de qualidade da ABIC foi introduzido com o intuito de melhorar ainda mais certos parâmetros, agregando assim mais valor a classificação do café comercializado no Brasil. Segundo a ABIC esse selo de qualidade atesta tanto o sabor do café do dia a dia do brasileiro quanto os chamados especiais. A Tabela 3.6 mostra alguns parâmetros recomendados e considerados importantes pela ABIC em 2005 quando foi lançado o Programa de Qualidade do Café (PQC), um novo programa de certificação e segurança alimentar para o café torrado e moído ou torrado em grão (GPCQC – www.abic.com.br, 2005).

Tabela 3.6. Características sensoriais e qualidade global recomendada pela ABIC em 2005. Fonte: ABIC.

| | Não recomendável | Recomendável |
|-------------------------|------------------|---------------------------------|
| Aroma | Fraco | Suave a característico, intenso |
| Acidez | Indesejável | Alta a baixa |
| Amargor | Excessivo | Típico a fraco |
| Sabor | Inexistente | Suave e intenso |
| Sabor estranho | Moderado | Livre de sabor estranho |
| Adstringência | Forte | Moderada a nenhuma |
| Corpo | Fraco | Leve a encorpado |
| Qualidade Global | Ruim | Regular, bom e excelente |

Já em 2007 o PQC se segmenta com o lançamento das categorias de qualidade: tradicional, superior e gourmet.

Segundo esse programa, o perfil do sabor identifica sete características do produto: bebida, torra, moagem, sabor, corpo, aroma e tipo de café.

A escala sensorial para a qualidade global, segundo esse programa, é uma escada de 10 pontos, onde cada café analisado recebe uma nota. Quanto maior essa nota, melhor o café. O nível mínimo corresponde a 4,5 pontos (qualidade recomendável). A qualidade da bebida é avaliada sensorialmente por provadores experientes e treinados.

De acordo com essa escala, o PQC certifica as três diferentes categorias de qualidade, sendo tradicional de 4,5 a 6, superior de 6 a 7,3 e gourmet de 7,3 a 10. Na classificação por tipo de café, o tradicional pode ser formado por *blends* (combinação de diferentes cafés) de cafés arábica e robusta e as outras duas classes formadas apenas por cafés da espécie arábica.

Tabela 3.7. Características sensoriais e qualidade global recomendada pela ABIC em 2007. Fonte: ABIC.

| | Não recomendável | Recomendável |
|-------------------------|------------------|----------------------|
| Qualidade global | Menor que 4,5 | Maior ou igual a 4,5 |
| Aroma | Fraco | Suave a intenso |
| Sabor | Inexistente | Suave a intenso |
| Corpo | Inexistente | Leve a encorpado |
| Torra | Muito escura | Clara e escura |
| Moagem | Muito fina | Fina a grossa |

Segundo o PQC, cafés de qualidade recomendável, torrados em grão ou torrados moídos, são aqueles constituídos de cafés arábica ou blendados com robusta (mistura de arábica e robusta) que atendam aos requisitos de qualidade global (Tabela 3.7). Mais especificamente, são aqueles constituídos por grãos de café tipo 8 COB (Classificação Oficial Brasileira) ou melhores, com um máximo de 20 % em peso de grãos com defeitos pretos, verdes e ardidos, admitindo-se a utilização de grãos passados e de cafés verdes claros com qualquer bebida (PQC– www.abic.com.br, 2007).

3.3. Prova da xícara

3.3.1. Conceitos e evolução

Apesar da modernização dos equipamentos analíticos e das atuais metodologias de análise de resultados disponíveis, os compostos responsáveis pelo aroma e pelo sabor do café encontram-se apenas parcialmente identificados. Não bastasse a complexidade da sua identificação e de suas propriedades como composto puro, há ainda que se compreender os efeitos das misturas deles, como ocorre no grão. Por esta razão, a determinação da qualidade do café conduzida por análises químicas ainda é

limitada, e a palavra final sobre a classificação e qualidade da bebida ainda é a dada pelos resultados da “prova de xícara”.

A primeira abordagem técnica sobre o sistema de prova de xícara foi introduzida em 1961. Nela foi estabelecida uma escala de valores para as bebidas (Estritamente Mole = 24 pontos; Dura = 11 pontos; Rio = 1 ponto). Esta escala foi importante para determinar a origem da bebida riada (mínimo de 10 % de grãos rio misturados com padrões de bebida Mole) e, finalmente, para quantificar a influência dos defeitos na bebida do café.

Em 1989 foi proposta por Feria-Morales uma nova classificação da bebida do café arábica, estabelecendo a separação dos atributos sensoriais em classes daqueles responsáveis pelo gosto da bebida (ácido, azedo, amargo, doce e salgado); pelo sabor/aroma (químico/medicinal, caramelo, nozes, queimado/fumaça, etc) e pelas sensações bucais (adstringência e corpo). Assim, as descrições da bebida obtida de cafés corresponderiam à da bebida “estritamente mole” como sendo uma bebida de sabor e aroma suave e adocicada, encorpada, etc.; a “bebida mole”, com estas características menos acentuadas; a bebida dura, com a predominância de um sabor/aroma metálico ou uma característica sensorial de adstringência e aspereza mais acentuadas, e as bebidas “riada” e “rio” seriam aquelas com leve sabor de iodo e maior ou menor intensidade do gosto/sabor químico ou medicinal; e por último a bebida “rio zona” com características ainda mais acentuadas do que as da bebida “rio” (Feria-Morales, 1989). Para os cafés robusta a classificação por bebida ainda é extra-oficial.

Atualmente, de acordo com a portaria N° 49 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 25/03/2008, no Brasil, a prova de xícara deve ser realizada por classificadores (provadores) habilitados para analisar o produto e devidamente registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Esses profissionais avaliam o conjunto dos atributos sensoriais e físicos da amostra de café indicados nas tabelas 3.3, 3.4 e 3.5, e atribuem o seu conceito sobre cada um deles. Para isso usam uma escala linear que varia de equipe para equipe, mas geralmente vão de 1 a 5, 1 a 10 ou 1 a 100, em que 1 se refere a um café muito ruim e 5, 10 ou 100 representam cafés excelentes.

3.3.2. A prova de xícara

Antes de ser provado, o café deve ser torrado e moído. O ponto de torra deve ser determinado por meio do Sistema Agtron / *Roast Classification Color Disk* (Figura 3.3 A) ou por instrumento similar de detecção eletrônica de cores, colorímetro, que dê resultado equivalente. Já o grau de moagem deve ser determinado com base na porcentagem de retenção em peneiras granulométricas de diferentes números (Figura 3.3 B).

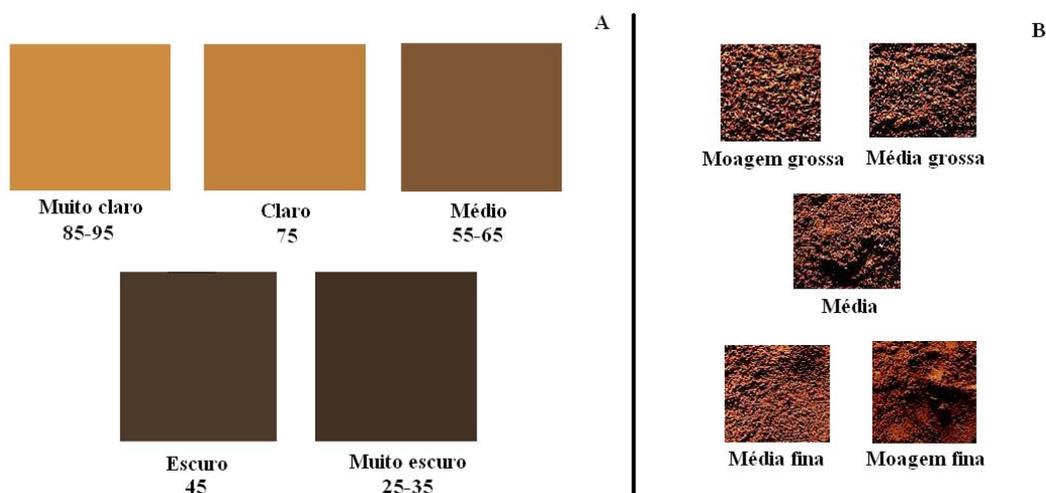


Figura 3.3. Representação da coloração dos discos do Sistema *Agtron* para determinação do grau de torra dos cafés (A) e grãos de moagem (B). Fonte: ABIC.

Em uma xícara ou tigela pequena as amostras são preparadas por infusão de 10 gramas de pó em 100 mL de água mineral quente ao ponto da primeira fervura. A fragrância do item 3.1.3 é sentida com café seco. Após misturar com uma pequena

concha, o provador avalia o aroma da infusão. Depois disso, a espuma é retirada e o café é deixado a decantar. O processo de degustação é iniciado quando o pó estiver depositado no fundo da vasilha e a mistura estiver morna (aproximadamente 60 °C) (Della Modesta et al., 2000).

Com o auxílio da concha, o degustador sorve uma quantidade de líquido, que mantém na boca o tempo suficiente para sentir o sabor e memorizar todos os seus detalhes (Figura 3.4). Em seguida, esse líquido é expelido em um recipiente, chamado "cuspideira".

As provas de xícara são feitas com teste cego, por esse motivo, o grupo de 2 ou mais provadores deve apresentar um paladar apurado e calibrado, para poder distinguir com a mesma intensidade as diferenças entre as bebidas (Della Modesta et al., 2000). Entre cada prova, os provadores devem enxaguar a boca com quantidade suficiente de água para não prejudicar a percepção sensorial quando da análise da próxima amostra.

Na análise dos resultados, para cada uma das características sensoriais avaliadas, deve-se calcular a média aritmética e o desvio padrão entre os valores atribuídos por todos os classificadores. A distinção das categorias gourmet, superior ou tradicional é determinada em função do resultado obtido pela nota da qualidade global, a qual refletirá o resultado da maioria das características sensoriais avaliadas, podendo algumas das características desviar-se da categoria final atingida (portaria Nº 49 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 25/03/2008 - <http://www.agricultura.gov.br>).



Figura 3.4. Fotos de um provador classificando amostras de café pela prova da xícara.

3.3.3. Provadores *versus* painel de degustação

Gatchalian (1981) definiu os “provadores” como os grandes conhecedores de um produto e deste modo responsáveis pelo julgamento e decisões quanto ao seu destino. Os “provadores” são muito empregados em indústrias de alimentos de um modo geral, no mercado do café e nas fábricas de perfume, chá, fumo e vinho. Hall (1958) explica que estes profissionais desenvolvem uma sensibilidade aguçada para muitas características de um determinado produto após um longo tempo de treinamento e experiência. Desta maneira eles se tornam aptos a realizar julgamentos rápidos sobre o processo e o produto final (Feria-Morales, 2002).

Nas indústrias de café, nas exportadoras e nas cooperativas, cabe normalmente a um ou alguns poucos provadores classificar a matéria prima e definir a composição do *blend*, e o grau de torra ideal para o mercado comprador.

Apesar de amplamente utilizada, são muitas as críticas feitas a esse método usado em todo o mundo para classificar o café segundo suas características sensoriais. A principal crítica se refere à falta de padronização da metodologia, em particular ao fato de nas avaliações feitas por provadores serem empregadas condições de torra e de

preparo de bebida muito diferentes daquelas comumente utilizadas pelos consumidores (Feria-Morales, 2002).

Segundo os críticos desse método, a dependência constante dos provadores pode significar alguns riscos para a continuidade e reprodutibilidade de resultados. De acordo com eles a análise de amostras preparadas dentro dos padrões de consumo, do perfil de sabor e perfil livre por painéis treinados (análise sensorial), com resultados tratados por metodologia estatística adequada pode ser uma excelente ferramenta nas indústrias cafeeiras assim como é nos demais segmentos da indústria de alimentos e bebidas (Meilgaard, 1991; Stone e Sidel, 1985).

Atualmente, existem vários métodos de análise sensorial descritiva (Murray et al., 2001), incluindo o método de perfil do sabor (*Flavour Profile Method*) (Cairncross e Sjöstrom, 1950), o método de perfil da textura (*Texture Profile Method*) (Brandt et al., 1963), a análise quantitativa descritiva (*Quantitative Descriptive Analysis*) (Stone et al., 1974), o método espectro (*Spectrum method*) (Meilgaard et al., 1991), o perfil quantitativo do sabor (*Quantitative Flavour Profiling*) (Stampanoni, 1993a,b), o perfil de escolha livre (*Free-choice Profiling*) (Langron, 1983; Thompson e MacFie, 1983) e análises descritivas genéricas.

Contudo, existem divergências entre os profissionais que trabalham na área de avaliação sensorial de café. Assim, tanto a “prova de xícara” feita por provadores quanto os métodos sensoriais que empregam painéis treinados têm sido utilizados pela indústria cafeeira. A prova de xícara, por exemplo, tem sido considerada mais adequada para o estabelecimento de *blends* e para o mercado exportador, enquanto o painel tem sido empregado principalmente para avaliações de qualidade para o comércio interno brasileiro.

Para finalizar, gostaríamos de deixar claro que devido a essa divergência de métodos, as amostras de café estudadas nesta tese foram analisadas sensorialmente pela prova de xícara.

Capítulo 4

Técnicas analíticas utilizadas

4.1. Microextração em fase sólida

A microextração em fase sólida (SPME - *solid phase microextraction*) foi desenvolvida por Arthur e Pawliszyn (1990) como uma alternativa às técnicas convencionais de extração. Desde a primeira descrição desta técnica (Belardi e Pawliszyn, 1989), ela vem sendo intensamente adotada para análises em ar, água, óleos, alimentos, etc (Akiyama et al., 2003; Vas e Vékey, 2004; Cuevas-Glory et al., 2007; Risticovic et al., 2008). Ao contrário da extração líquido-líquido, a SPME não necessita de grandes quantidades de solventes orgânicos normalmente tóxicos e, em comparação à extração em fase sólida, a SPME tem as vantagens de minimizar a perda de analitos voláteis e de exigir amostras pouco volumosas. Essa técnica facilita em muito o preparo de amostras, podendo ser utilizada tanto no laboratório quanto no local de coleta das mesmas. Ela resume em um só passo extração, limpeza (*clean-up*) e concentração, possibilitando grande economia de tempo. Seu princípio operacional baseia-se na sorção das espécies de interesse por um filme de material sorvente depositado sobre uma fibra de sílica fundida.

No processo, a fibra recoberta com a fase extratora é exposta à amostra (ou ao seu *headspace*), extraíndo os compostos que serão determinados (Figura 4.1). Decorrido o tempo de extração, a fibra é retirada do frasco que contém a amostra e inserida no injetor quente de um cromatógrafo a gás, onde os analitos são termicamente desorvidos da fibra e carregados para a coluna cromatográfica.

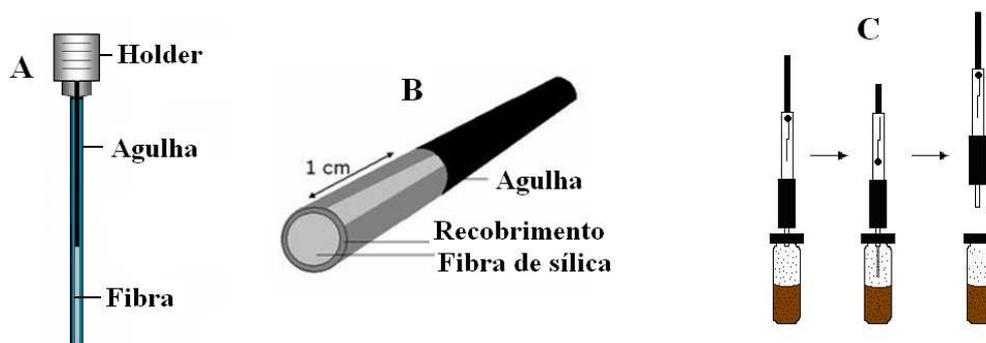


Figura 4.1. Representação da fibra recolhida dentro da agulha (A), do recobrimento polimérico sobre a fibra de sílica (B) e extração dos analitos pela fibra do *headspace* (C).

O dispositivo de SPME inicialmente montado por Pawliszyn (Arthur e Pawliszyn, 1990) consistia de uma fibra de sílica fundida recoberta com uma camada de PDMS (polidimetilsiloxano). Esta fibra era então conectada à haste de uma microseringa de vidro convencional, com a agulha da mesma atuando como proteção da fibra. Posteriormente, um aplicador (*holder*) foi desenvolvido, sendo desde então universalmente utilizado (Figura 4.2):



Figura 4.2. Representação de um aplicador (*holder*) para SPME, com a fibra retraída (A) e exposta (B).

A Figura 4.2 A mostra a fibra recolhida no tubo hipodérmico (2). Para que se exponha a fibra, perfura-se, com este tubo, o septo de silicone do frasco contendo a amostra. Após isso, pressiona-se o êmbolo (1), de modo a se expor a fibra (3) para a extração (Figura 4.2 B).

Há dois modos de se fazer uma extração via SPME: um deles é o modo de extração direta, onde a fibra extratora é mergulhada diretamente em uma amostra líquida. Este modo é indicado quando os analitos de interesse são pouco voláteis; a desvantagem deste modo é a possibilidade de sorção também de interferentes e de compostos de alta massa molar que possam causar efeito de memória e/ou encurtar a vida útil da fibra. Amostras muito ácidas ou básicas também podem prejudicar a fibra. O outro modo, conhecido como extração pelo *headspace*, consiste em expor a fibra somente ao ar confinado no frasco que contém a amostra. Neste modo, os analitos passam para a fase de vapor e são ali extraídos pela fibra. A extração por *headspace* é indicada para a análise de compostos de média a alta volatilidade, tendo a vantagem de poupar a fibra de exposição a possíveis interferentes e compostos prejudiciais à integridade da fase extratora.

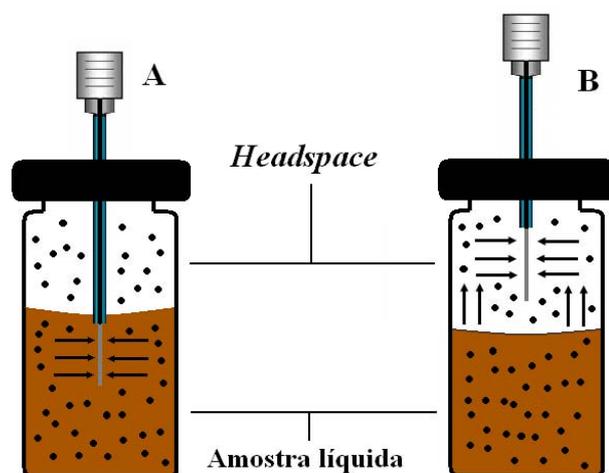


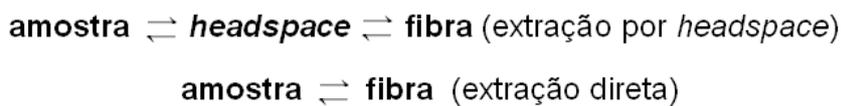
Figura 4.3. Modos de operação de SPME: extração direta (A) e extração pelo *headspace* (B).

4.1.1. Princípios de operação de SPME

A extração dos analitos por SPME dá-se pela afinidade dos mesmos pelo material sorvente e a quantidade extraída das espécies de interesse é função da constante de equilíbrio entre o recobrimento e o analito. Assim, a SPME é uma

técnica de equilíbrio multifásico, ou seja, em condições ideais de extração, haverá um equilíbrio entre a amostra e o filme sorvente; a partir daí, a massa de analitos extraída pela fibra não mais aumentará (Pawliszyn, 1998).

Freqüentemente esse sistema de extração é complexo, deste modo para simplificá-lo, somente três fases são geralmente consideradas: (i) material de recobrimento da fibra, (ii) a fase gasosa ou o *headspace* (quando for utilizado esse método), e (iii) uma matriz homogeneia tal como água pura. O princípio de operação da SPME é a distribuição do (s) analito (s) entre essas fases e a amostra. Assim, uma extração por SPME é governada pelas constantes de equilíbrio abaixo:



A massa do analito extraído pelo material de recobrimento é relativo ao equilíbrio total do analito no sistema trifásico. Se, no início de uma extração por *headspace*, tem-se um volume V_a de amostra contendo um analito em uma concentração inicial C_0 , a massa de analito extraída (m), uma vez estabelecido o equilíbrio, será dada pela expressão:

$$m = \frac{(K_{fh} K_{ha} V_f C_0 V_a)}{K_{fh} K_{ha} V_f + K_{ha} V_h + V_a} \quad \text{(extração por } \textit{headspace}) \quad (4.1)$$

onde K_{fh} representa a constante de distribuição entre o *headspace* e a fibra e K_{ha} a constante de distribuição entre a amostra e o *headspace*; V_h é o volume do *headspace* e V_f o volume do recobrimento da fibra.

Já para extrações no modo direto, assumindo-se que não há *headspace*, então a equação 4.2 fica com a forma:

$$m = \frac{K_{fa} V_f C_0 V_a}{K_{fa} V_f + V_a} \quad (\text{extração direta}) \quad (4.2)$$

onde K_{fa} representa a constante de distribuição entre a amostra e a fibra.

O volume de amostra (da ordem de mililitros) é muito maior que o volume de um recobrimento de SPME, que, tipicamente, é da ordem de microlitros ($V_a \gg K_{fa} V_f$). A equação 4.2 reduz-se, desta forma, para

$$m = K_{fa} V_f C_0 \quad (4.3)$$

Um aspecto interessante da equação 4.3 é o fato de, em extrações diretas, a quantidade extraída do analito não depender do volume da amostra processada, possibilitando o uso de amostras de pequeno volume. As equações 4.1, 4.2 e 4.3 também indicam que, em última instância, a eficiência da extração é função da constante de distribuição K_{fa} . Este parâmetro é característico de uma fase extratora e indica as seletividades dos recobrimentos e suas propriedades. A sensibilidade do método é determinada pelo volume do recobrimento, que também determina o tempo de equilíbrio:

$$t_e = \frac{L_f^2}{2D_f} \quad (4.4)$$

onde t_e é o tempo de equilíbrio, L_f a espessura do filme e D_f o coeficiente de difusão do analito na camada polimérica. Assim, vê-se que, quanto mais espesso o filme sorvente, mais tempo será necessário para se chegar ao equilíbrio. Por outro lado, quanto maior o coeficiente de difusão do(s) analito(s) na fase extratora, mais rápido este equilíbrio será atingido. Segundo a definição, sensibilidade é a variação no sinal de respostas pela variação da unidade de concentração do analito, ou seja, a inclinação da curva analítica (Skoog et al., 2002).

Outro aspecto importante da SPME é o fato de, uma vez estabelecido o equilíbrio do sistema, a massa extraída encontra-se maximizada e constante. Nessa etapa, compostos mais voláteis extraídos pelo *headspace* entram em equilíbrio com o recobrimento da fibra mais rapidamente, por passarem à fase de vapor com maior rapidez, enquanto compostos mais pesados requerem mais tempo de exposição à fibra para que o equilíbrio seja atingido, uma vez que suas pressões de vapor são menores.

4.1.2 Mecanismos de extração em SPME

Uma extração por SPME pode ocorrer por três mecanismos distintos: (i) quando a fase extratora é constituída de um líquido, ou de um polímero sólido com temperatura de transição vítrea abaixo da temperatura ambiente, tem-se um processo de absorção, onde os analitos são solubilizados pelo recobrimento da fibra, sofrendo uma partição entre esta e a amostra; este processo ocorre com recobrimentos de PDMS e PA, por exemplo.

O processo de partição é baseado na distribuição do analito entre duas fases imiscíveis, que é determinado pela fugacidade de um composto em cada fase e, em equilíbrio pode ser descrito através de uma constante dimensional (coeficiente de partição - K):

$$K = \frac{C_0^\infty}{C_s^\infty} \quad (4.5)$$

onde C_0^∞ é a concentração de equilíbrio de um composto da fase orgânica (ex-recobrimento da fibra) e C_s^∞ é a concentração de equilíbrio na amostra.

A habilidade de a fibra absorvente reter determinadas quantidades de analitos depende principalmente da espessura da camada líquida (recobrimento) e do tamanho

do analito. Assim, quanto maior a espessura do filme maior será a difusão do analito dentro deste filme.

A polaridade da fibra pode aumentar a atração de determinado analito, porém é a espessura do filme líquido na fibra que retém o analito.

Por outro lado, quando se tem apenas um sólido poroso, a extração se dá por processos de adsorção (*ii*), como em fibras que contêm carboxen como sorvente.

Uma diferença marcante entre os processos de absorção e adsorção é a possibilidade de, neste último, ocorrer competição entre os analitos presentes em uma amostra. Sendo a adsorção um fenômeno meramente superficial, o número de sítios adsorptivos é relativamente baixo, fazendo com que os analitos disputem entre si estes sítios. Geralmente, com tempos mais longos de extração, a adsorção de compostos mais pesados torna-se favorável em detrimento da extração de compostos mais leves.

Fibras adsorventes extraem os analitos por interações físicas. A coleta ocorre por retenção dos analitos dentro dos poros internos. Os micro e mesoporos são ideais para analitos pequenos e intermediários e, normalmente os analitos ficarão retidos até que seja feita a dessorção térmica ou por solventes (Parreira e Cardeal, 2005). Macroporos podem adsorver grandes analitos através de interações de van der Waals ou pontes de hidrogênio (Pawliszyn, 1998).

No terceiro mecanismo (*iii*) ocorrem os dois processos simultaneamente, pois a fibra é composta por uma mistura de líquido e sólido. A fibra de PDMS/DVB, introduzida em 1996, é um exemplo de fibra mistura onde se encontra polímeros sólidos porosos de DVB com líquido polimérico PDMS.

4.1.3. Aspectos que influenciam a eficiência de extração

- *Força iônica.* Quanto à força iônica, tem-se que a adição de eletrólitos fortes à amostra minimiza a solubilidade de compostos pouco polares, forçando-os a passar à fase de vapor e/ou à fibra. Entretanto, a adição de eletrólitos pode ser desfavorável

para compostos muito polares e/ou ionizados, uma vez que sua atividade na solução aumenta com a força iônica (Pawliszyn, 1998);

- *pH da amostra.* A influência do pH na extração de analitos básicos ou ácidos é bastante pronunciada: amostras ácidas fazem com que analitos básicos permaneçam em suas formas ionizadas, diminuindo sua volatilidade e sua afinidade pelos recobrimentos poliméricos; da mesma maneira, amostras básicas promovem a ionização de analitos ácidos, produzindo efeitos similares;
- *Agitação da amostra.* A agitação da amostra influencia decisivamente o tempo de uma extração: ela facilita a difusão dos analitos, acelerando a transferência de massa e, conseqüentemente, tornando a extração mais rápida. A agitação magnética é a mais comumente utilizada. Sem agitação, vê-se que o equilíbrio seria atingido em tempos de extração muito longos. Deve-se notar, entretanto, que a agitação não aumenta a capacidade de extração da fibra; ela somente minimiza o tempo para que seja atingido o equilíbrio;
- *Temperatura de extração.* Em extrações pelo *headspace*, o aquecimento da amostra pode ser vantajoso, uma vez que a pressão de vapor dos analitos torna-se maior, aumentando o valor de K_{na} (equação 4.1). Entretanto, temperaturas mais altas diminuem a constante de distribuição dos analitos entre o *headspace* e o recobrimento (K_{fh} , equação 4.1), favorecendo a passagem dos analitos de volta a fase de vapor. Portanto, o aumento da temperatura de uma extração pode melhorar a sensibilidade em relação a compostos mais pesados ao mesmo tempo em que prejudica a extração de compostos mais leves. Com isso, geralmente busca-se o melhor compromisso entre o aumento da extração de compostos pesados e a perda de sensibilidade na análise de compostos mais leves (Pawliszyn, 1998);
- *Tipo de recobrimento.* Como já dito anteriormente, a eficiência de uma extração depende fortemente das constantes de distribuição dos analitos entre a amostra, o *headspace* (para extrações neste modo) e o recobrimento da fibra utilizada.

Desta forma, a escolha apropriada da fibra é um parâmetro essencial. As fases sorventes de fibras de SPME comerciais (recobrimentos) consistem em materiais poliméricos puros tais como polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA) ou blends poliméricas imobilizadas no substrato de sílica fundida como PDMS/divinilbenzeno (PDMS/DVB), Carboxen/PDMS e outros (Kataoka et al., 2000). Alguns deles encontrados comercialmente estão listados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Recobrimentos comercialmente disponíveis para SPME.

| Sorvente | $d_f / \mu\text{m}$ | Aplicações típicas |
|---|---------------------|--------------------------|
| <i>Recobrimentos poliméricos puros: partição</i> | | |
| PDMS | 70, 30, 100 | Apolares |
| Poliacrilato | 85 | Semivoláteis, polares |
| <i>Dispersões de sólidos porosos em matrizes poliméricas: adsorção/absorção</i> | | |
| DVB/PDMS | 60, 65 | Voláteis, nitro / aminas |
| Carbowax / DVB | 65, 70 | Polares, alcoóis |
| Carbowax / TPR ^a | 50 | Surfactantes |
| Carboxen / PDMS | 75, 85 | Gases, compostos leves |
| Carbowax / PEG ^b | 60 | Polares |
| Carbopack-Z | 15 | Gases, compostos leves |
| Carboxen /DVB/PDMS | 50, 30 | Compostos leves, polares |

a. resina suportada SUPELCOGEL TPR-100 (constituída por polidivinilbenzeno/metacrilato); b. poli(etilenoglicol)

Como mostra a Tabela 4.1, cada tipo de recobrimento tem características específicas, sendo indicado para uma determinada classe de analitos. Uma fibra de PDMS puro, por exemplo, pode mostrar pouca afinidade por compostos de média/alta polaridade de certa amostra analisada. Entretanto, a incorporação de sólidos adsortivos aumenta sensivelmente a gama de compostos extraídos.

4.1.4. Vantagens e aplicações

As vantagens da SPME em relação aos métodos tradicionais de amostragem de *headspace* são: o baixo custo de análise, reutilização da fibra, sistema portátil,

facilidade de operação, facilidade para automação, perda e contaminação mínima da amostra durante o transporte e armazenamento e, finalmente, extração de diferentes classes de compostos (Pawliszyn, 1998).

A SPME é uma técnica bem estabelecida, encontrando-se inúmeros trabalhos na literatura. Por isso, nos restringimos a citar trabalhos específicos em análise de voláteis de alimentos (Kataoka et al., 2000), tais como, mel (Cuevas-Glory et al., 2007), pimenta (Sousa et al., 2006), vinho (Martínez-Urunuela et al., 2004), vinagre (Durante et al., 2006) frutas tropicais (Pini et al., 2004; Reid et al., 2004; Carasek e Pawliszyn, 2006), fragrâncias (Kim e Lee, 2004), chás (Van Nederkassel et al., 2005) e café torrado (Rocha et al., 2004; Zambonin et al., 2005; Risticovic et al., 2008; Ribeiro et al., 2009), etc.

4.2. Infravermelho

4.2.1. Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia é o processo instrumental de medição baseado nas propriedades de absorção e emissão de energia eletromagnética em alguma região do espectro eletromagnético.

A porção do espectro percebida pelo olho humano (região do visível) está compreendida entre comprimentos de onda (λ) de 400 e 700 nanômetros (nm) enquanto que, acima desse limite, até cerca de 1×10^6 nm, a radiação é conhecida como infravermelha (IV) (Figura 4.4).

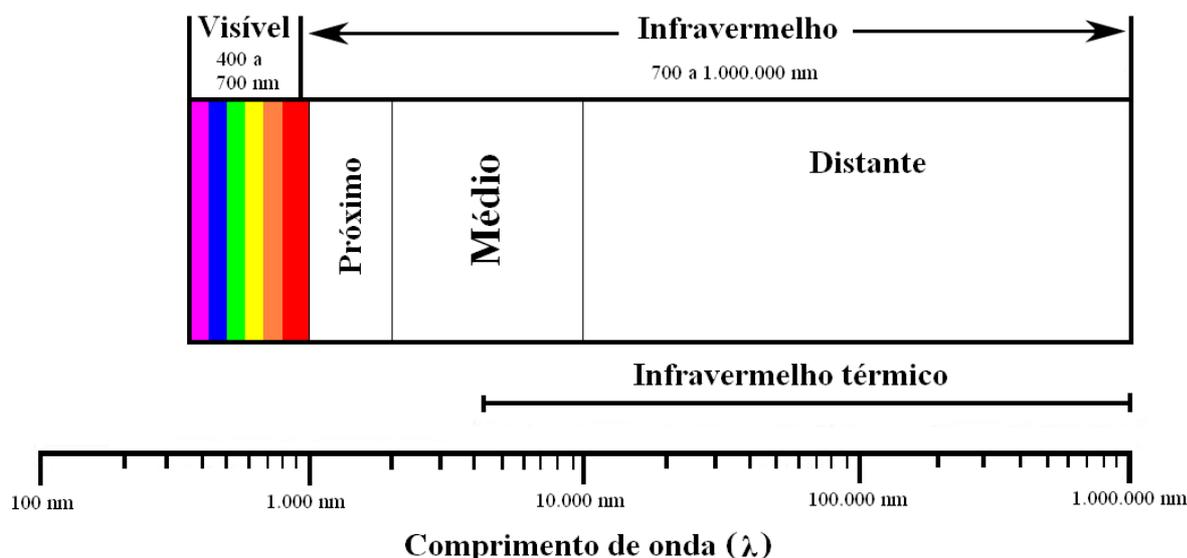


Figura 4.4. Representação esquemática das regiões espectrais do visível ao infravermelho distante.

A faixa espectral do infravermelho pode ser dividida em três regiões distintas, sendo elas: infravermelho próximo (NIR – *near infrared*), médio (MIR – *middle infrared*) e distante (FIR – *far infrared*) (Skoog et al., 2002). Deste modo, esta técnica espectroscópica pode ser aplicada em diferentes regiões, ou seja, diferentes intervalos de comprimento de onda (λ) ou número de onda (cm^{-1}). A região correspondente ao infravermelho próximo é fixada entre 700 a 2500 nm ou 12800 a 4000 cm^{-1} , enquanto

a região do infravermelho médio encontra-se entre 2500 a 10000 nm ou 4000 a 400 cm^{-1} e a do distante fica entre 10000 a 1×10^6 nm ou 400 a 10 cm^{-1} . Destas regiões, o infravermelho médio é descrito como sendo de maior interesse para os químicos orgânicos, enquanto as regiões do infravermelho próximo e distante, juntamente com técnicas multivariadas de análise, apresentam diversas aplicações em análises quantitativas e qualitativas de diversos produtos (Pasquini, 2003; Reich, 2005; Cen e He, 2007; Roggo et al., 2007).

Quando se fala na utilização da espectroscopia na região do infravermelho, as principais vantagens descritas são: o estudo de amostras pode ser realizado na fase sólida, líquida ou gasosa; na grande maioria das vezes, não requer grande preparo de amostra, é rápida e, dependendo da técnica utilizada para a análise, esta pode ser não destrutiva.

O principal objetivo da espectroscopia na região do infravermelho é a determinação dos grupos funcionais de um dado material. Isso é possível porque cada grupo funcional absorve em frequência característica de radiação desta região (Silverstein e Webster, 1998).

4.2.2. Regiões do infravermelho

A técnica de espectroscopia no infravermelho, principalmente nas regiões do NIR e MIR, tem tido, recentemente, grandes avanços em diversas aplicações principalmente na área de ciência de alimentos e produtos agrícolas (Esteban-Díez et al., 2007; Chen et al., 2006; Small, 2006; Cen e He, 2007) e quando acoplada a ferramentas quimiométricas, pode ser considerada uma alternativa rápida e confiável de controle de processos (Pedro e Ferreira 2005; Li et al., 2006; Xie et al., 2007).

Embora o FIR tenha várias aplicações atualmente, nesta tese não nos preocuparemos em descrevê-lo melhor, pois esta técnica não foi utilizada em nenhum experimento.

4.2.2.1. Infravermelho próximo (NIR)

Essencialmente, os sinais observados na região do infravermelho próximo (NIR) ocorrem devido a bandas vibracionais de absorção de compostos orgânicos determinadas por sobretoms (12800 e 5000 cm^{-1}) e bandas de combinação (5500 a 4000 cm^{-1}) envolvendo estiramentos e deformações angulares de ligações X-H (Olinger e Griffiths, 1993a) onde X pode assumir a forma de diversos elementos químicos ou grupos funcionais, como por exemplo: átomos de oxigênio, nitrogênio, carbono, C-H em anéis aromáticos, etc. Outros grupos funcionais importantes incluem estiramentos carbono-oxigênio e grupos carbonila, estiramentos e deformações de ligações carbono-nitrogênio, ligações carbono-carbono, etc.

Na região do NIR, as principais aplicações encontram-se na análise quantitativa e qualitativas de produtos químicos de diversas áreas como: materiais industriais (Li et al., 2006), alimentícias (Cozzolino et al., 2006; Pizarro et al., 2007), farmacêuticos (Reich, 2005), etc (Wang et al., 1999; Siebielec et al., 2004).

As análises com NIR são realizadas tanto em amostras líquidas como azeite de oliva, sucos e vinhos (Downey et al., 2003; Shao e He, 2007; Cozzolino et al., 2003) quanto sólidas utilizando as técnicas de reflectância (Andrés e Bona, 2005; Alessandrini et al., 2008; Karoui et al., 2006; Esteban-Díez, et al., 2004b).

4.2.2.2. Infravermelho médio (MIR)

A região do MIR, com certeza, é onde se encontra o maior número de pesquisas e aplicações. Esta região começou a ser utilizada no início da década de 50 para análise qualitativa de compostos orgânicos, tendo em vista que esta região espectral apresenta uma grande quantidade de informações que podem ser utilizadas para a caracterização funcional de compostos orgânicos (Skoog et al., 2002).

A identificação de compostos orgânicos, amplamente realizada pelo MIR, ocorre essencialmente por transições fundamentais, por isso essa faixa do espectro é conhecida como região de impressão digital (*fingerprint*) (4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1}). Nessa região, pequenas alterações na estrutura molecular resultam em mudanças significativas na distribuição dos picos de absorção do espectro que são relacionados com a estrutura da molécula. Com base nessa informação, a identificação de compostos pode ser realizada pela comparação do seu espectro MID com banco de dados existentes.

A maioria das aplicações em qualidade de alimentos encontradas na literatura utilizando-se o MIR são para líquidos, viscosos ou não, como mel, sucos de frutas, azeite de oliva e cerveja (Bertelli et al., 2007; He et al., 2007; Sinelli et al., 2007; Iñón et al., 2006). Entretanto, isso não quer dizer que o MIR não possa ser usado em sólidos (Reeves e Zapf, 1998; Ribeiro et al., 2008).

4.2.2.3. Diferenças e vantagens entre NIR e MIR

Devido ao baixo sinal das bandas na região do NIR, amostras sólidas não necessitam ser diluídas. Entretanto, uma atribuição (interpretação) precisa de bandas (análise estrutural) na região do NIR é difícil, isto porque, suas regiões espectrais são formadas por sobretoms e combinações de bandas fundamentais relativamente fracas das regiões do MIR, todas severamente sobrepostas (Workman, 1996). Por causa disso, antes da introdução e utilização das ferramentas quimiométricas, o uso das informações do NIR era muito limitado devido à dificuldade de interpretações de seus sinais.

Já a região do MIR potencialmente apresenta algumas vantagens sobre a região do infravermelho próximo quando falamos em classificação e discriminação de alimentos e outros produtos, pois as absorbâncias na região do MIR são mais ricas qualitativamente falando e as informações fornecidas por ela (estruturas moleculares)

podem ser mais facilmente distinguíveis e interpretáveis (Olinger e Griffiths, 1993a; Olinger e Griffiths, 1993b).

4.2.3. Reflectância no infravermelho

No caso de amostras sólidas ou em forma de pó, o uso de acessórios para reflexão da luz tem facilitado às análises qualitativas e quantitativas de diferentes tipos de alimentos e produtos, sendo a uniformidade das partículas sólidas e a compactação das mesmas, na cela, parâmetros importantes para obtenção de espectros reprodutíveis.

Os espectros de reflexão, embora não idênticos aos espectros de absorção correspondentes, são semelhantes na aparência geral e fornecem a mesma informação. A reflexão da radiação pode se dar de quatro maneiras distintas: (SR - *Especcular Reflectance*), difusa (DR - *Diffuse Reflectance*), interna (IR - *Internal Reflectance*) e total atenuada (ATR - *Attenuated Total Reflectance*) (Skoog et al., 2002). Dentre os tipos citados, o que apresenta o maior número de aplicações, principalmente na região do NIR e MIR, é a técnica reflectância difusa com transformada de Fourier, também conhecida como DRIFTS (*Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectrometry*) muito embora a sigla DRIFTS seja mais utilizada em análises de infravermelho médio (Reeves e Zapf, 1998; Bertelli et al., 2007; Ribeiro et al., 2008).

A DRIFTS pode ser um modo efetivo de se obter espectros de infravermelho diretamente de amostras sólidas pulverizadas com o mínimo de preparação de amostra (Fuller e Griffiths, 1978). Além de poupar tempo na preparação da amostra, permite a aquisição de dados convencionais de infravermelho em amostras que não foram alteradas significativamente em relação à sua forma original.

A reflectância difusa é um processo complexo que ocorre quando um feixe de radiação atinge uma superfície rugosa que pode se apresentar na forma de um filme ou de um pó. Estritamente, não se trata de um fenômeno de superfície, pois, ele requer

a ocorrência de absorção pela interação entre a amostra e a radiação infravermelho incidente. Com esse tipo de superfície rugosa, ocorre reflexão especular em cada pequena parte de superfície plana. No entanto, como há muitas destas superfícies e elas estão orientadas aleatoriamente, a radiação é refletida em todas as direções. Tipicamente, a intensidade da radiação refletida é, em grosso modo, independente do ângulo de observação. A radiação infravermelha penetra a superfície, interage com a amostra e pode ser refletida de forma especular e difusa.

Como descrito, a técnica de reflectância difusa envolve a penetração de radiação infravermelha dentro da amostra. Contudo, o caminho ótico não é definido, e varia em função da absortividade da amostra. Como resultado o espectro de reflectância de um composto não apresenta uma relação linear com a concentração (Coates, 1998). Desta forma, diversos modelos foram desenvolvidos para descrever em termos quantitativos a intensidade da radiação refletida difusamente, sendo o mais usado o modelo desenvolvido por Kubelka e Munk (Kubelka, 1948). Neste modelo a intensidade relativa de reflectância de um pó $f(R_{ef\infty})$ é dada por (Fuller e Griffiths, 1978):

$$f(R_{ef\infty}) = \frac{(1 - R_{ef\infty})^2}{2R_{ef\infty}} = K/s \quad (4.6)$$

onde $R_{ef\infty}$ é a razão entre a intensidade refletida pela amostra e a de um padrão não-absorvente, como cloreto de potássio finamente moído, por exemplo. A constante K é o coeficiente de absorção molar do analito e s é o coeficiente de espalhamento. Para uma amostra diluída, K está relacionado à absortividade molar ϵ e a concentração do analito C pela relação:

$$K = 2,303 \epsilon C \quad (4.7)$$

Assim, os espectros de reflectância consistem de um registro de $f(R_{ef\infty})$ em função do número de onda, muito parecidos com espectros de absorção.

Nesta tese a maioria dos experimentos foram realizados utilizando-se a microextração em fase sólida dos voláteis do café torrado e a espectroscopia no infravermelho próximo por reflectância difusa. Contudo, testes e até resultados foram obtidos na faixa do infravermelho médio.

Na cromatografia gasosa as análises rotineiras foram realizadas em um GC-FID, enquanto o GC-MS era utilizado apenas para identificação dos compostos voláteis detectados.

5.1. Notações e convenções utilizadas nesta tese

5.1.1. Organização dos dados

Todos os dados experimentais (cromatogramas e espectros) utilizados nesta tese foram organizados em forma de matriz de dados ($I \times J$), contendo I linhas e J colunas. As matrizes geralmente são indicadas por letras maiúsculas em negrito (\mathbf{X} , \mathbf{Y} , \mathbf{Z}). Em uma matriz de dados cromatográficos $\mathbf{X}(I \times J)$, por exemplo, cada linha (vetor) representa o cromatograma de uma amostra com J variáveis (tempos de retenção). Os vetores são representados por letras minúsculas em negrito (\mathbf{x} , \mathbf{y} , \mathbf{z}).

$$\mathbf{X} = \begin{matrix} & \mathbf{x}^1 & \mathbf{x}^2 & \cdots & \cdots & \mathbf{x}^J \\ \begin{bmatrix} \mathbf{x}_1^T \\ \mathbf{x}_2^T \\ \vdots \\ \vdots \\ \mathbf{x}_I^T \end{bmatrix} & = & \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & \cdots & x_{1J} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & \cdots & x_{2J} \\ \vdots & \vdots & \ddots & & \vdots \\ \vdots & \vdots & & \ddots & \vdots \\ x_{I1} & x_{I2} & \cdots & \cdots & x_{IJ} \end{bmatrix} \end{matrix}$$

Os elementos internos (escalares) que formam os vetores e as matrizes serão representados pelas correspondentes letras minúsculas, em itálico com os subscritos definindo a linha e a coluna, respectivamente (x_{ij} , y_{ij} , z_{ij}), e correspondem à intensidade medida para a i -ésima no j -ésimo tempo de retenção.

Deste modo, cada amostra \mathbf{x}_i corresponde a uma linha e cada coluna \mathbf{x}^j se refere a uma variável (um tempo de retenção), ou seja, uma medida j realizada para todas as amostras.

O símbolo \mathbf{X} representa a matriz original dos dados obtidos experimentalmente, \mathbf{X}_p representa essa matriz de dados pré-tratada, \mathbf{y} representa o vetor de respostas ou

variáveis dependentes e \mathbf{Y} a matriz de respostas binárias (1 e 0). Os sobrescritos T e -1 indicam transposição e inversa, respectivamente. Os símbolos $(\hat{})$ e $(\bar{})$ indicam a matriz, vetor ou escalar estimado e médio, respectivamente.

Em algumas equações descritas neste capítulo, para indicarmos uma matriz de dados, utilizamos a denominação \mathbf{X} tanto para uma matriz original (\mathbf{X}) quanto para uma pré-tratada (\mathbf{X}_p) apenas para simplificar a representação.

5.2. Análise multivariada de dados

Num passado recente, era comum falarmos sobre o crescente desenvolvimento das técnicas instrumentais analíticas e das vantagens que elas passariam a oferecer para os pesquisadores, tais como melhorias consideráveis na precisão e maior rapidez na aquisição dos dados gerados, entre outras. Desta forma, eles se viram obrigados, primeiramente a se adaptar a essa nova realidade e por fim a entender e estudar esses resultados até então imperceptíveis ou até descartáveis.

A análise multivariada de dados químicos, conhecida como quimiometria, surgiu então dessa necessidade de desenvolver técnicas de tratamento, do ponto de vista matemático e estatístico, para esses novos dados considerados mais complexos (Geladi e Kowalski, 1986; Wold et al., 1987; Thomas, 1994; Beebe et al., 1998; Ferreira et al., 1999; Brereton, 2000; Gemperline, 2006). Assim, a quimiometria permite que a avaliação da influência das variáveis existentes na informação que se deseja extrair dos dados seja feita de forma global, sendo possível observar as correlações entre elas (Brereton, 2000).

Atualmente, a descrição da utilização da quimiometria é bem trivial. Deste modo, me arrisco a afirmar, juntamente com outros pesquisadores da área, que a quimiometria, antes conhecida como ferramenta alternativa para o tratamento de

dados químicos, passa a ser hoje parte essencial e indispensável do conhecimento de qualquer estudante ou pesquisador da área química e outras áreas da ciência.

Essa afirmação pode ser melhor compreendida quando observamos o crescente emprego e as inúmeras aplicações da quimiometria em diversas áreas da química (Singh et al., 2005; Daszykowski e Walczak, 2006; Berrueta et al., 2007; Ribeiro et al., 2009; Teófilo et al., 2009) e muitos outros trabalhos até mesmo em áreas como a economia (Weldscholte et al., 1998) e psicologia (Barratt et al., 1999).

5.2.1. Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA – *principal component analysis*) é provavelmente o método quimiométrico mais amplamente difundido, sendo considerada por muitos como a base para a maioria dos tratamentos utilizados na análise multivariada dos dados (Wold, 1966; Wold et al., 1987; Beebe et al., 1998; Ferreira et al., 1999; Brereton, 2003).

A PCA é um método de projeção de dados multivariados, cujo objetivo é reduzir a dimensão dos mesmos permitindo a visualização das informações mais significativas em um número menor de novas variáveis, as então chamadas componentes principais (PCs – *principal components*). Em outras palavras, ele consiste numa manipulação da matriz de dados \mathbf{X} com o objetivo de representar as informações apresentadas em muitas variáveis, através de um número menor de novas variáveis. Assim, as amostras são projetadas num novo sistema de eixos (PCs) de dimensão menor e com isto, as informações mais significativas ou predominantes se tornam mais óbvias.

Essa diminuição na dimensionalidade dos dados ocorre quando as variáveis (colunas J da matriz \mathbf{X}) são altamente correlacionadas (colineares) apresentando assim informações redundantes.

Então as PCs são geradas, a partir da combinação linear das j variáveis originais correlacionadas. Como as PCs são definidas ortogonalmente, a informação que está em uma não aparece na outra. Elas são construídas em ordem decrescente da quantidade de variância que descrevem (indicada por porcentagem), o que significa que a PC1 descreve a direção da maior variação dos dados, a PC2 é ortogonal à primeira e descreve o máximo de variância restante, e assim sucessivamente para as PCs seguintes.

Do ponto de vista matemático, na PCA, a matriz original dos dados \mathbf{X} ($I \times J$) é decomposta em duas matrizes descritas pela equação 5.1, onde \mathbf{S} ($I \times J$) é chamada matriz dos escores e \mathbf{P}^T ($J \times J$) é a matriz transposta dos pesos.

$$\mathbf{X} = \mathbf{S}\mathbf{P}^T \quad (5.1)$$

Os escores representam as novas coordenadas das amostras no sistema de eixos das PCs e os pesos são os coeficientes da combinação linear que medem a importância de cada variável original em cada PC, ou seja, o peso que cada variável tem naquela combinação. Estes pesos são o cosseno do ângulo entre o eixo da PC e o eixo da variável original e, portanto, seu valor estará sempre entre 1 e -1 . Quanto mais próximo de ± 1 , maior a influência que uma determinada variável tem na descrição desta PC. É através da análise dos pesos que se pode saber, por exemplo, quais as variáveis do conjunto original que mais contribuem para a descrição do seu conjunto de amostras.

Contudo, como as informações contidas nos dados originais são descritas em ordem decrescente na PCA, um número reduzido de PCs passa a conter praticamente toda a informação do conjunto original de dados, deixando principalmente variações aleatórias, tais como erros experimentais e ruídos para as últimas PCs (Ferreira et al., 1999; Beebe et al., 1998). Por isso, a utilização de gráficos (geralmente em duas ou

três dimensões) para a visualização dos escores (novas coordenadas das amostras) e pesos (importância das variáveis originais) entre as primeiras PCs poderá revelar agrupamentos, tendências das amostras analisadas, e a ocorrência de amostras atípicas (*outliers*), que poderiam ser de difícil visualização no caso das variáveis originais (Wold et al., 1987; Ferreira et al., 1999; Beebe et al., 1998; Geladi e Kowalski, 1986).

A escolha do número (k) apropriado de PCs necessárias para explicar as informações relevantes de um determinado conjunto de dados, é um passo importante em uma PCA e pode ser realizada pela análise dos seus resíduos. Esses resíduos (descritos também em forma de matriz, \mathbf{E}) são constituídos por pequenas quantidades de variância não totalmente explicadas ou não descritas pelas PCs geradas a partir dos dados originais. Assim, a decomposição indicada na equação 5.1 pode ser reescrita como:

$$\mathbf{X} = \mathbf{S}_k \mathbf{P}_k^T + \mathbf{E} \quad (5.2)$$

onde k é o número apropriado de componentes principais utilizadas para descrever o conjunto de dados e \mathbf{S}_k ($I \times k$) e \mathbf{P}_k ($J \times k$) são as matrizes de escores e pesos truncadas em k , respectivamente e \mathbf{E} ($I \times J$) é a matriz de resíduos.

Vários algoritmos são descritos na literatura para calcular as matrizes \mathbf{S} e \mathbf{P} a partir da matrix \mathbf{X} . Dentre os principais estão à decomposição por valores singulares (SVD – *Singular Values Deconvolution*) (Golup e Van Loan, 1989), diagonalização da matriz de correlação (ou covariância) e o algoritmo NIPALS (*Non Linear Iterative Partial Least-Squares*) (Wold, 1966).

5.3. Métodos multivariados de regressão

A regressão multivariada pode ser definida como uma série de operações que estabelecem uma relação (modelo estatístico) entre dois grupos de dados (\mathbf{X} e \mathbf{y}) (eq. 5.3), em que \mathbf{X} é o bloco dos dados experimentais contendo as variáveis instrumentais (cromatogramas e espectros) e \mathbf{y} formado pela(s) variável(s) dependente(s), que representam as respostas analíticas, tais como concentrações e notas de análises sensoriais (Martens e Naes, 1989).

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\mathbf{b} + \mathbf{e} \quad (5.3)$$

onde \mathbf{e} representa os resíduos e \mathbf{b} o vetor que correlaciona os dois grupos de dados (vetor de regressão).

Os métodos multivariados de análise quantitativa empregados com maior frequência são os de regressão, sendo os mais conhecidos, a regressão linear múltipla (MLR - *Multiple Linear Regression*), regressão por componentes principais (PCR – *Principal Components Regression*) e regressão por quadrados mínimos parciais (PLS – *Partial Least Squares*) (Beebe et al., 1998; Geladi e Kowalski, 1986). Todos estes métodos são lineares porque os seus modelos resultantes descrevem uma relação linear entre variáveis obtidas em um instrumento analítico, por exemplo, e certas respostas ou concentrações dos componentes das amostras estudadas (Martens e Naes, 1989; Thomas e Haaland, 1990; Thomas, 1994).

Para a MLR, o vetor de regressão \mathbf{b} é determinado por quadrados mínimos (Myers e Montgomery, 2002; Box e Draper, 1987) produzindo,

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{y} \quad (5.4)$$

Contudo, como sabemos, essas relações são lineares apenas dentro de uma faixa de respostas, apresentando desvios não lineares em outras. Exemplos de não linearidades podem ocorrer devido a: (i) não homogeneidade na amostra; (ii) não linearidades de detectores; (iii) não linearidades em medidas de transmitância/reflectância difusa em espectroscopia NIR, entre outras.

A colinearidade também é outra questão a ser discutida, pois a grande maioria dos dados analíticos gerados atualmente, tais como espectros e cromatogramas possuem variáveis altamente correlacionadas. Nesses casos, e também quando o número de variáveis é maior do que o de amostras ($I < J$), a matriz $\mathbf{X}^T\mathbf{X}$, pode não ser inversível.

Assim, a compressão de dados a partir da combinação linear destas variáveis originais gerando novas variáveis não correlacionadas em números menores, tornou-se uma alternativa. Por isso, os métodos de regressão PCR e PLS são mais utilizados e considerados mais eficientes que a MLR, pois são métodos conhecidos de compressão de dados possuindo a vantagem de utilizar todas as informações obtidas no cromatograma e/ou espectros que estão sendo estudados (Martens e Naes, 1989; Geladi e Kowalski, 1986).

A grande diferença entre os métodos PCR e PLS é que no primeiro, o modelo é construído a partir das PCs utilizando unicamente as variáveis instrumentais (\mathbf{X}) sem levar em consideração informações provenientes das respostas \mathbf{y} , enquanto o segundo utiliza ambas as informações em sua construção. Provavelmente seja por isso, que o método PLS tenha se tornado a ferramenta de preferência em muitos campos da química e ainda no controle de inúmeros processos industriais (Ferreira et al., 1999).

5.3.1. Regressão por quadrados mínimos parciais (PLS)

O método de regressão multivariada utilizado no tratamento dos dados desta tese foi o de regressão por quadrados mínimos parciais (PLS).

A principal idéia deste método é encontrar as componentes principais (aqui denominadas de variáveis latentes - VL) da matriz \mathbf{X} que maximizem a covariância entre os escores de \mathbf{X} e \mathbf{y} . Deste modo, PLS modela \mathbf{X} e \mathbf{y} simultaneamente para encontrar as variáveis latentes em \mathbf{X} .

No método PLS, o vetor de respostas \mathbf{y} é utilizado inicialmente como vetor de escores, na decomposição de \mathbf{X} , para gerar um vetor de pesos (\mathbf{w}). O resultado matemático disso encontra-se indicado na equação 5.5, que mostra o cálculo da primeira variável latente:

$$\mathbf{X} = \mathbf{y}\mathbf{w}^T \quad (5.5)$$

onde \mathbf{X} ($I \times J$) é a matriz de dados originais, \mathbf{y} ($I \times 1$) é o vetor de respostas sendo usado como vetor de escores e \mathbf{w}^T ($1 \times J$) é o vetor transposto de pesos.

Da equação 5.5 pode-se estimar \mathbf{w} ($\hat{\mathbf{w}} = \mathbf{X}^T(\mathbf{y}^T\mathbf{y})^{-1}\mathbf{y}$), por quadrados mínimos, que depois de normalizado ($\hat{\mathbf{w}} = \hat{\mathbf{w}}/\sqrt{\hat{\mathbf{w}}^T\hat{\mathbf{w}}}$) é utilizado para estimar o novo vetor de escores ($\hat{\mathbf{s}} = \mathbf{X}\hat{\mathbf{w}}$), que por sua vez gera o vetor de variável latente de \mathbf{X} ($\hat{\mathbf{p}} = \mathbf{X}^T\hat{\mathbf{s}}(\hat{\mathbf{s}}^T\hat{\mathbf{s}})^{-1}$). Esta variável latente é semelhante, mas não igual ao vetor de pesos em PCR. Então uma correlação entre os vetores $\hat{\mathbf{s}}$ e \mathbf{y} é construída ($q = (\hat{\mathbf{s}}^T\hat{\mathbf{s}})^{-1}\hat{\mathbf{s}}^T\mathbf{y}$).

Calculados os escores e pesos da primeira variável latente, o cálculo da matriz de resíduos, \mathbf{E} , pode ser feito (eq. 5.6). O processo é repetido usando a matriz \mathbf{E} obtida da eq. 5.6 como a matriz \mathbf{X} , na eq. 5.4, para o cálculo da 2ª, 3ª,... k variáveis latentes desejadas.

$$\mathbf{E} = \mathbf{X} - \hat{\mathbf{s}}\hat{\mathbf{p}}^T \quad (5.6)$$

Por fim, o vetor de regressão é estimado utilizando-se k VLs segundo a equação 5.7:

$$\hat{\mathbf{b}}_k = \mathbf{W}_k (\mathbf{P}_k^T \mathbf{S}_k)^{-1} \mathbf{q}_k^T \quad (5.7)$$

É por causa dessa “relação” construída entre \mathbf{X} e \mathbf{y} (eq. 5.5), que as PCs (\mathbf{p}) passam a ser chamadas de variáveis latentes, pois ocorrem pequenas distorções nas direções dos pesos, de modo que, rigorosamente, eles perdem a ortogonalidade que a PCA fornece levando a pequenas redundâncias de informação que otimizam a relação linear entre os escores de \mathbf{X} e \mathbf{y} (Beebe et al., 1998; Otto, 2007; Burns e Ciurczak, 2008).

Assim, de maneira a prever uma resposta analítica y_i para um novo cromatograma ou espectro \mathbf{x}_i ($J \times 1$) pré-processado de acordo com a necessidade, a equação 5.8 pode ser usada.

$$\hat{y}_i = \mathbf{x}_i^T \mathbf{b} \quad (5.8)$$

Na equação, \hat{y}_i é o valor estimado para a i -ésima nova amostra e \mathbf{b} é vetor de regressão obtido da equação 5.7.

5.3.1.1. Validação do modelo

Antes da aplicação do modelo construído, o mesmo deve ser validado com o objetivo de testar a sua capacidade preditiva. Esta validação consiste em testar o modelo prevendo valores de \mathbf{y} de novas amostras. Isto é feito para estabelecer se elas

de fato irão refletir o comportamento da resposta de interesse. Essa validação é realizada de duas maneiras: validação cruzada e validação externa (Lorber, 1988).

Durante a aplicação da validação cruzada, uma (*leave one out*) ou algumas amostras do conjunto de calibração (blocos de amostras) são separadas, um modelo é construído com as amostras restantes e a previsão é feita para a(s) amostra(s) separada(s) inicialmente, ou seja, a(s) amostra(s) predita(s) são as mesmas usadas no conjunto de calibração, porém, não participaram da construção do modelo quando foram preditas. O processo é repetido até que todas as amostras tenham sido previstas uma vez e a raiz quadrada da soma dos quadrados dos erros de validação cruzada (RMSECV – *root mean square error of cross validation*) (eq. 5.9) tenha sido computada para o modelo PLS com diferentes números de variáveis latentes (Naes et al., 2002). É através do RMSECV e do coeficiente de correlação da validação cruzada (r_{vc}) (eq. 5.10), medido entre os valores estimados e experimentais do método de referência, que o melhor modelo PLS pode ser determinado.

$$RMSECV_k = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (y_i - \hat{y}_i)^2}{I}} \quad (5.9)$$

$$r_{vc} = \frac{\sum_{i=1}^I (\hat{y}_i - \bar{\hat{y}})(y_i - \bar{y})}{\left[\sum_{i=1}^I (\hat{y}_i - \bar{\hat{y}}) \right]^{1/2} \left[\sum_{i=1}^I (y_i - \bar{y}) \right]^{1/2}} \quad (5.10)$$

onde y_i é a resposta medida para a i -ésima amostra retirada do modelo de calibração, \hat{y}_i é a resposta estimada para essa amostra retirada durante a validação cruzada, $\bar{\hat{y}}$ é a

resposta média estimada, I é o número de amostras do conjunto de calibração e k é o número de variáveis latentes utilizadas no modelo.

Assim, o melhor modelo PLS corresponde ao número de variáveis latentes resultante do menor valor de RMSECV.

O RMSECV de um modelo de regressão pode ser corrigido ainda pelo seu número grau de liberdade (nDF), neste caso, a equação 5.9 teria em seu denominador $I-k-1$. Isso geralmente é feito para se obter uma estimativa razoável e mais próxima do erro de previsão (RMSEP) (Petersen et al., 2005). Essa correção pelo nDF é importante em modelos de regressão multivariados construídos com poucas amostras e muitas VL, pois o RMSECV será elevado, indicando problemas de calibração. Contudo, quando possuímos um número elevado de amostras, além de um número pequeno de VL, o valor de RMSECV se mantém próximo, independente se dividido por I ou $I-k-1$. Por isso, atualmente, as descrições para o cálculo do RMSECV são feitas sem a correção pelo nDF.

Adicionalmente, o modelo PLS é validado (validação externa) com um conjunto independente de amostras (amostras de previsão) e neste caso para comparar o poder de previsão externa do mesmo, pode ser computada a raiz quadrada da soma dos quadrados dos erros de previsão (RMSEP – *root mean square error of prediction*):

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (y_i^p - \hat{y}_i^p)^2}{I_p}} \quad (5.11)$$

Na equação 5.11, I_p é o número de amostras do conjunto de validação externa, \hat{y}_i^p e y_i^p são os valores preditos e medidos das respostas utilizadas nesse conjunto, respectivamente (Vandeginste et al., 1998).

Um dos critérios mais utilizados para sabermos se um modelo prevê ou não certos valores de y é através dos erros relativos percentuais (ER (%)) entre o valor experimental ou valor do método de referência y_i e o valor estimado pelo modelo \hat{y}_i (eq. 5.12):

$$ER(\%) = \left(\frac{y_i - \hat{y}_i}{y_i} \right) \cdot 100 \quad (5.12)$$

Porém, devido às diferenças na natureza das respostas y , tais como a concentração de um analito (mol.L^{-1}) e notas de análise sensorial (u.a), que se deseja prever em modelos quimiométricos de regressão, os erros utilizados para a avaliação da capacidade preditiva desses modelos podem ser outros além do erro relativo percentual.

Assim, outra maneira de se calcular erros quando técnicas quimiométricas multivariadas são aplicadas é através das distâncias medidas entre 2 objetos. As medidas de distância mais comuns usadas são: a distância euclidiana (DE) (equação 5.13) e a distância de Mahalanobis (DM) (De Maesschalck et al., 2000; Daszykowski et al., 2007). Ambas, podem ser calculadas no espaço de variáveis originais e no espaço de componentes principais.

Assim, num caso onde se deseja saber se um dado modelo PLS prevê uma resposta y_i , a DE pode ser calculada de acordo com a eq. 5.13:

$$DE_i = \sqrt{(\hat{y}_i - \hat{y})^2 + (y_i - \bar{y})^2} \quad (5.13)$$

onde \hat{y}_i e y_i são os valores estimado e medido da i -ésima resposta de y (i.e., concentração de um determinado compostos ou nota da análise sensorial), e \hat{y} e \bar{y}

são os valores médios das I respostas do conjunto de treinamento para os valores preditos e medidos, respectivamente.

Já a DM leva em consideração a covariância entre as variáveis no cálculo das distâncias. Utilizando essa medida, os problemas de escala e correlação encontradas nas medidas de DE são eliminados. Para entender melhor esta diferença, imagine que utilizando a DE o conjunto de pontos equidistantes de um determinado local fica em torno de um círculo, enquanto que a DM de um conjunto de pontos equidistante é descrita por uma elipse (Figura 5.1).

No espaço das variáveis originais a distância de Mahalanobis (equação 5.14) utiliza a correlação entre as variáveis, pois ela é calculada utilizando a matriz inversa de *variância-covariância* (\mathbf{C}) dos dados de interesse (respostas analíticas estimadas e medidas). A matriz de variância-covariância é calculada de acordo com a equação 5.15.

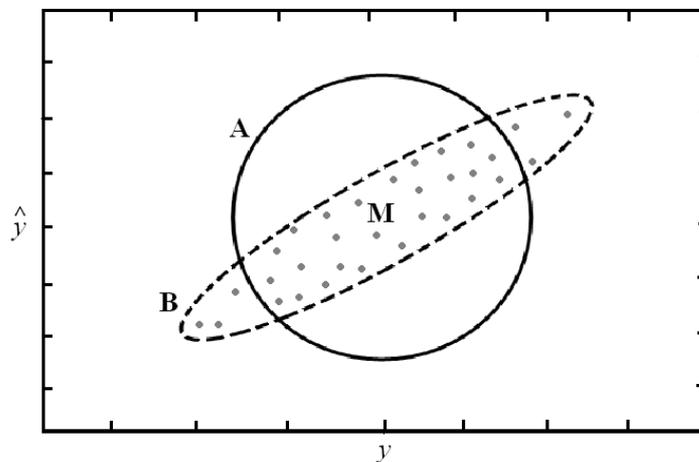


Figura 5.1. Gráfico simulado das respostas estimadas (\hat{y}) versus medidas (y) junto com as elipses que representam DE (A) e DM (B) equivalentes em torno aos pontos médios em $\mathbf{M} (\bar{y}, \hat{\bar{y}})$.

$$DM_i = \sqrt{(\hat{y}_i - \hat{\bar{y}}) \mathbf{C}^{-1} (y_i - \bar{y})^T} \quad (5.14)$$

$$\mathbf{C} = \mathbf{Y}^T \mathbf{Y} \quad (5.15)$$

onde, \mathbf{Y} ($I \times Z$) é a matriz de respostas contendo I respostas medidas nas linhas para Z vetores de diferentes repostas, ou seja, respostas obtidas experimentalmente por um ou mais métodos analíticos e respostas estimadas por modelos de regressão.

5.3.1.2. Detecção de amostras anômalas

O resultado de qualquer teste estatístico é afetado pela qualidade dos resultados experimentais utilizados. É, portanto, importante, inicialmente, avaliar a qualidade destes resultados experimentais, para garantir que eles estejam livres de anomalias.

Um dos problemas mais comuns encontrados quando construímos um modelo de regressão multivariada com o método PLS, é a presença de amostras anômalas (*outliers*). Naes et al. (2002) definiram *outliers* como sendo observações diferentes do resto do conjunto de dados, *i.e.*, atípicas. Essas amostras podem ser irrelevantes, fortemente errôneas ou anormais em alguma forma, comparadas à maioria dos dados. Felizmente, a detecção e posterior eliminação delas é possível, podendo melhorar, de forma significativa, os modelos de calibração.

Dentre outras, há duas situações principais em que amostras são *outliers*. A primeira está relacionada com as amostras utilizadas para obtenção dos sinais analíticos (cromatogramas e espectros), que podem ter sofrido algum tipo de contaminação ou dano, por exemplo. A segunda refere-se aos erros nos valores de referência (respostas analíticas de interesse) que se encontram fora do intervalo esperado para os dados em questão.

Para detectarmos essas amostras anômalas, o gráfico de *leverage versus* resíduo de *Student* nos auxilia fornecendo informações importantes.

A *leverage* é uma medida de afastamento da amostra em relação ao centro ou média dos dados e indica a influência que cada amostra exerce no modelo de regressão. Ela pode ser calculada de acordo com a equação 5.16. O grau de *leverage* fornece condições para identificar possíveis *outliers*. Um ponto com *leverage* elevado possui uma influência alta sob os parâmetros estimados pela regressão, tais como resposta, coeficiente de regressão e erros padrões, porém, se a amostra possui *leverage* baixo, está pode ser considerada (descrita) como a combinação linear de outras amostras, ou seja, apresenta baixa influência sob os parâmetros estimados.

$$h_{ii} = \frac{1}{I} + (\mathbf{x}_i - \bar{\mathbf{x}})^T (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} (\mathbf{x}_i - \bar{\mathbf{x}}) \quad (5.16)$$

Na equação 5.16, h_{ii} é a *leverage*, I é o número de amostras no conjunto de calibração, \mathbf{x}_i é o espectro ou cromatograma da i -ésima amostra e $\bar{\mathbf{x}}$ é o espectro ou cromatograma médio.

Amostras mal modeladas têm resíduos altos, por isso, para obtê-las utilizamos o resíduo de *Student* (equação 5.17). Como os resíduos de *Student* são definidos em unidades de desvio padrão do valor médio, os valores além de $\pm 2,5$ são considerados altos sob as condições usuais da estatística ($\alpha > 0,05$).

$$\text{resíduo_de_Student} = \frac{(\hat{y}_i - y_i)}{L_{resc} \sqrt{1 - h_i}} \quad (5.17)$$

onde \hat{y}_i e y_i são respectivamente, os valores estimado e medido da resposta analítica de interesse da i -ésima amostra e h_i é o valor de *leverage* para a i -ésima amostra. L_{resc_i} é o resíduo do valor previsto para a amostra i corrigida pela *leverage* de acordo com a equação 5.18.

$$L_{resc} = \sqrt{\frac{(\hat{y}_i - y_i)^2}{(I-1)(1-h_i)}} \quad (5.18)$$

Assim, amostras com resíduo de *Student* e *leverage* elevados devem sempre ser excluídas (*outliers*) e o modelo de calibração reconstruído. Para os casos de amostras que apresentem alto resíduo e pequeno valor de *leverage*, ou o contrário, uma avaliação cautelosa deve ser feita construindo-se inicialmente um modelo com a amostra e outro após a sua exclusão. Os resultados obtidos são comparados e a decisão de exclusão ou não da amostra é tomada.

5.3.2. Análise discriminante a partir da regressão por quadrados mínimos parciais (PLS-DA)

Embora o método de regressão PLS não tenha sido inicialmente desenvolvido para resolver problemas de classificação e discriminação de classes, ele passou a ser rotineiramente utilizado para esse propósito (Barker e Rayens, 2003; Gurden et al., 2004; Whelehan et al., 2006; Xing et al., 2007; Indahl et al., 2007; Westerhuis et al., 2008). Se numa regressão com o método PLS a separação entre grupos de amostras no conjunto de dados é pronunciada, então, uma nova amostra pode ser classificada projetando-a e atribuindo-a à classe cujo centro é o mais próximo. Assim, esse método de regressão bem conhecido dos pesquisadores e quimiometristas, quando utilizado para classificação e discriminação, passou a ser chamado de análise discriminante a partir da regressão por quadrados mínimos parciais (PLS-DA – *Partial Least Squares – Discriminant Analysis*).

O método PLS-DA é apenas uma variante dos padrões da regressão por PLS na qual o bloco **Y** (variáveis dependentes) consiste em um conjunto de variáveis binárias (uma para cada classe) denotando diferentes classes (Figura 5.2). Então, num bloco **Y**

($I \times Z$), onde I representa as amostras do conjunto total e Z o número de classes deste conjunto, valores iguais a um (1) são atribuídos às amostras de uma determinada classe (A), enquanto as outras amostras pertencentes a outras classes (B, C, \dots, Z) recebem o valor zero (0) em uma dada coluna. Já na próxima coluna, as amostras da classe seguinte (B) recebem o valor 1, enquanto as amostras da classe A , que anteriormente haviam recebido valor 1, juntamente com as amostras das classes restantes (C, D, \dots, Z) recebem valor 0, e assim por diante até que cada uma das classes (A, B, \dots, Z) sejam representadas por valores 1 em uma das colunas. Assim, o objetivo do método PLS-DA é encontrar diferenças no espaço das variáveis \mathbf{X} que discriminam as classes, baseado em um conjunto de treinamento com membros de classes conhecidas. É importante lembrar que as matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} são relacionadas utilizando-se os mesmos princípios matemáticos do método PLS (Dixon et al., 2007) indicados nas equações 5.5 a 5.9.

Da mesma forma como o método PLS seleciona as direções que apresentam maior aproximação com as respostas em \mathbf{y} , o método PLS-DA seleciona as direções que apresentam a máxima separação entre as classes indicadas nos dados (Massart et al., 1997).

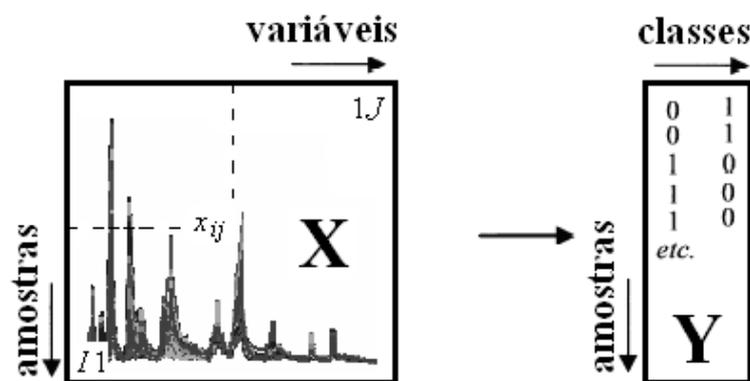


Figura 5.2. Representação esquemática da matriz \mathbf{X} de dados cromatográficos e da matriz \mathbf{Y} contendo duas classes utilizadas no PLS-DA.

Um atributo interessante quando utilizamos o método PLS-DA, é que ele realça as diferenças entre as classes de amostras e pode ser usado quando a informação sobre as diferenças entre elas não aparece nos primeiros eixos de maior variância dos dados, por exemplo, comparado com uma PCA. Assim, as primeiras variáveis latentes de um modelo PLS-DA podem não descrever sempre, da mesma maneira, as primeiras componentes principais de uma PCA. Por isso, já são encontrados na literatura trabalhos onde o PLS-DA é utilizado no lugar do PCA a fim de aumentar a diferenciação entre classes distintas, utiliza-se gráficos de escores entre as primeiras VLs do PLS-DA no lugar de gráficos de escores entre as primeiras PCs de um PCA (Ribeiro et al., 2009).

Quem estuda um pouco mais a fundo o princípio do método PLS-DA percebe que ele é muito similar a outra técnica discriminante descrita por Fisher (1936) e conhecida como análise linear discriminante (LDA – *Linear Discriminant Analysis*). Contudo, o grande problema em se usar a LDA na discriminação de grupos é que esse método não pode ser aplicado a conjuntos de dados que apresentam um grande número de variáveis, ou seja, mais variáveis que amostras ou observações (porque a LDA usa MLR). Deste modo seu uso vem se tornando restrito, perdendo espaço para métodos de compressão de dados, tais como PLS-DA (Massart et al., 1997; Berrueta et al., 2007).

Quando utilizamos esse método, algumas questões importantes devem ser entendidas previamente. Para um conjunto de dados com apenas duas classes, classificadas por PLS-DA, por exemplo, é mais fácil enxergar como podemos determinar um valor de uma amostra do conjunto de treinamento, pois apenas dois valores possíveis são esperados (1 ou 0). Entretanto, obviamente o modelo não irá prever perfeitamente 1 ou 0, então um limite de confiança (LC) deve ser calculado para cada classe, ao qual abaixo de um dos valores a amostra é prevista como sendo da classe zero e acima dele da classe um (Figura 5.3 A). Neste caso, o cálculo do

limite de confiança assume que os valores do conjunto de treinamento de Y seguem uma distribuição similar a que será observada para as amostras de previsão futuras. Cálculos similares podem ser feitos na etapa de validação cruzada para verificar o desempenho futuro do limite de confiança selecionado.

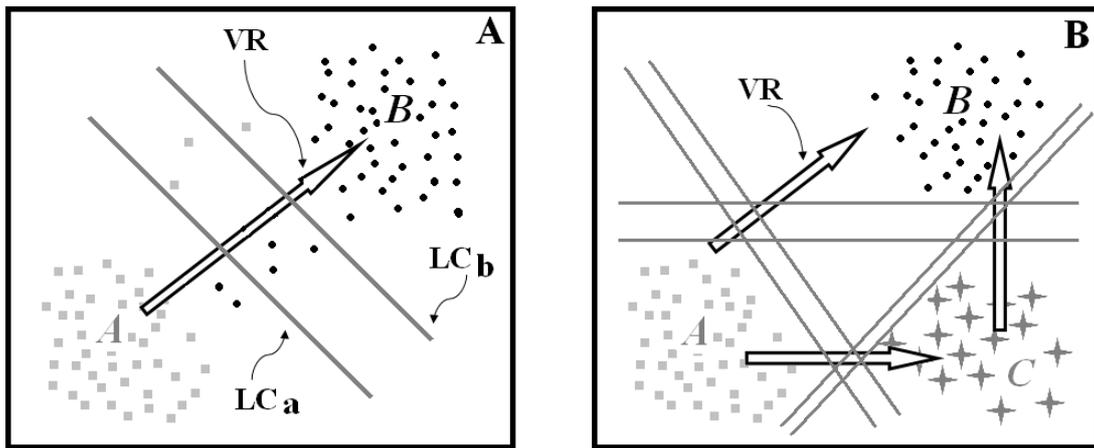


Figura 5.3. Representação esquemática de um PLS-DA possuindo duas classes (A) e três classes (B). LC – Limites de confiança (linhas em cinza). Classe A (■), B (●) e classe C (*).

Basicamente esse limite de confiança é calculado utilizando-se os valores preditos de Y a partir do modelo PLS-DA, ajustando uma distribuição normal para eles e então usando essa distribuição para calcular a probabilidade de um dado valor de Y ser indicado em uma das classes (eq. 5.19):

$$Probabilidade(e.g.classe_A) = \frac{P(Y,1)}{P(Y,1) + P(Y,0)} \quad (5.19)$$

onde Y é o valor predito a partir de um modelo PLS-DA para a amostra em questão, $P(Y,1)$ é a probabilidade da amostra pertencer à classe A (valor 1) e $P(Y, 0)$ é a probabilidade da mesma amostra pertencer à classe B (valor 0). As duas

probabilidades usadas acima são estimadas a partir dos valores medidos de Y no conjunto de treinamento. Assim uma determinada amostra de previsão pode ser classificada em uma das classes se o seu valor calculado (próximo de 1 ou 0) pelo modelo PLS-DA estiver abaixo do LC calculado para classe de A ou acima do LC calculado para B . Contudo, um pequeno número de amostras em qualquer uma das classes pode ultrapassar o limite de confiança calculado. Assim, se observarmos a região entre os LCs indicados na Figura 5.3 A, uma amostra contida nela não seria classificada em nenhuma das classes. Neste caso se a amostra é realmente da classe A e está entre os LCs de A e B ela é chamada de “verdadeiro negativo”, ou seja, amostra classificada como não pertencente a classe B . Porém, se essa mesma amostra for classificada na classe B ela é chamada de “falso positivo”. Quando uma amostra da classe A está abaixo do LC de A (classificada corretamente) ela é conhecida como “verdadeira positivo” e quando uma amostra da classe A é incorretamente prevista como não sendo da classe A ela é chamada de “falso negativo”.

Contudo, a análise pode conter mais de 2 classes e, neste caso, outras considerações devem ser levadas (Figura 5.3 B).

Assim, instintivamente, seria possível enumerar as classes de Y como 1, 2, 3, etc, por exemplo. Entretanto, isto implicaria que a classe 2 estaria de algum modo entre as classes 1 e 3, o que não é geralmente o caso.

A solução para isso então foi a criação do bloco Y com uma variável para cada classe. Pois, o valor 1 indica que uma amostra pertence àquela classe, e 0 indica que ela não pertence, deste modo a PLS-DA pode ser calculado para mais classes.

Ordinariamente, o objetivo da PLS-DA é a construção de um modelo que discrimine cada classe individualmente. Assim, com quatro classes, o modelo PLS-DA discriminado as quatro ao mesmo tempo fornecerá quatro vetores de regressão distintos (e valores previstos correspondentes de Y), um para cada um das quatro classes.

Deste modo, para encontrar resultados que discriminem bem as classes existentes, algumas medidas podem ser tomadas. Em alguns casos, por exemplo, é melhor combinar múltiplas classes em uma só. Isso é feito com a finalidade de melhorar a modelagem de acordo com 2 situações:

1. Quando se observa que duas classes são essencialmente indistinguíveis entre si (muito parecidas), mas elas podem ser distintas das outras classes do conjunto de dados. Neste caso, combinando as duas classes semelhantes junto em um único "grupo" e modelá-las junto de encontro às outras classes geralmente melhorará o desempenho do modelo de PLS-DA. Numa etapa como essa a visualização das variáveis importantes para discriminar esse único grupo se torna mais evidente.

Por exemplo, dadas quatro classes, onde as classes *A* e *B* são muito parecidas, mas as classes *C* e *D* são diferentes entre si (e das classes *A* e *B*), a seguinte divisão de grupos seria útil: [*A B*] vs [*C*] vs [*D*], onde as classes *A* e *B* são agrupadas, mas a *C* e *D* estão sozinhos em seus grupos.

2. Outra situação ocorre quando todas as classes são distintas entre si. Normalmente, ao se tentar a distinção entre mais de duas classes, um modelo único de PLS-DA construído para todas entre si, de uma só vez, resultará e um modelo mais pobre que um modelo onde apenas uma classe é separada das outras todas, pois a seleção de variáveis fica mais complexa.

Por este motivo, construir modelos de PLS-DA distintos (cada qual sendo responsável pela separação de uma classe de todas as outras) se torna muito vantajoso. Isso porque permite que se faça um grupo com apenas uma classe e outro com todas as outras classes, e assim a seleção de variáveis para discriminar o grupo com a classe única fica mais simples. Utilizando quatro classes iniciais dispostas em dois grupos, por exemplo, grupo-classe *A* e grupo-classes *BCD* (*[A]* vs *[BCD]*) o resultados deste modelo seria bem melhor comparado com um modelo único separando todas (Figura 5.4).

A única dificuldade em se aplicar o PLS-DA desta forma é que geralmente, deve-se construir um modelo para cada classe sozinha, ($[B]$ vs $[ACD]$; $[C]$ vs $[ABD]$, e $[D]$ vs $[ABC]$). Contudo, estes quatro modelos individuais de PLS-DA terão um desempenho, muitas vezes, melhor do que um único modelo de PLS-DA separando todas as quatro classes de uma só vez (PLS-DA Class Groups Interface).

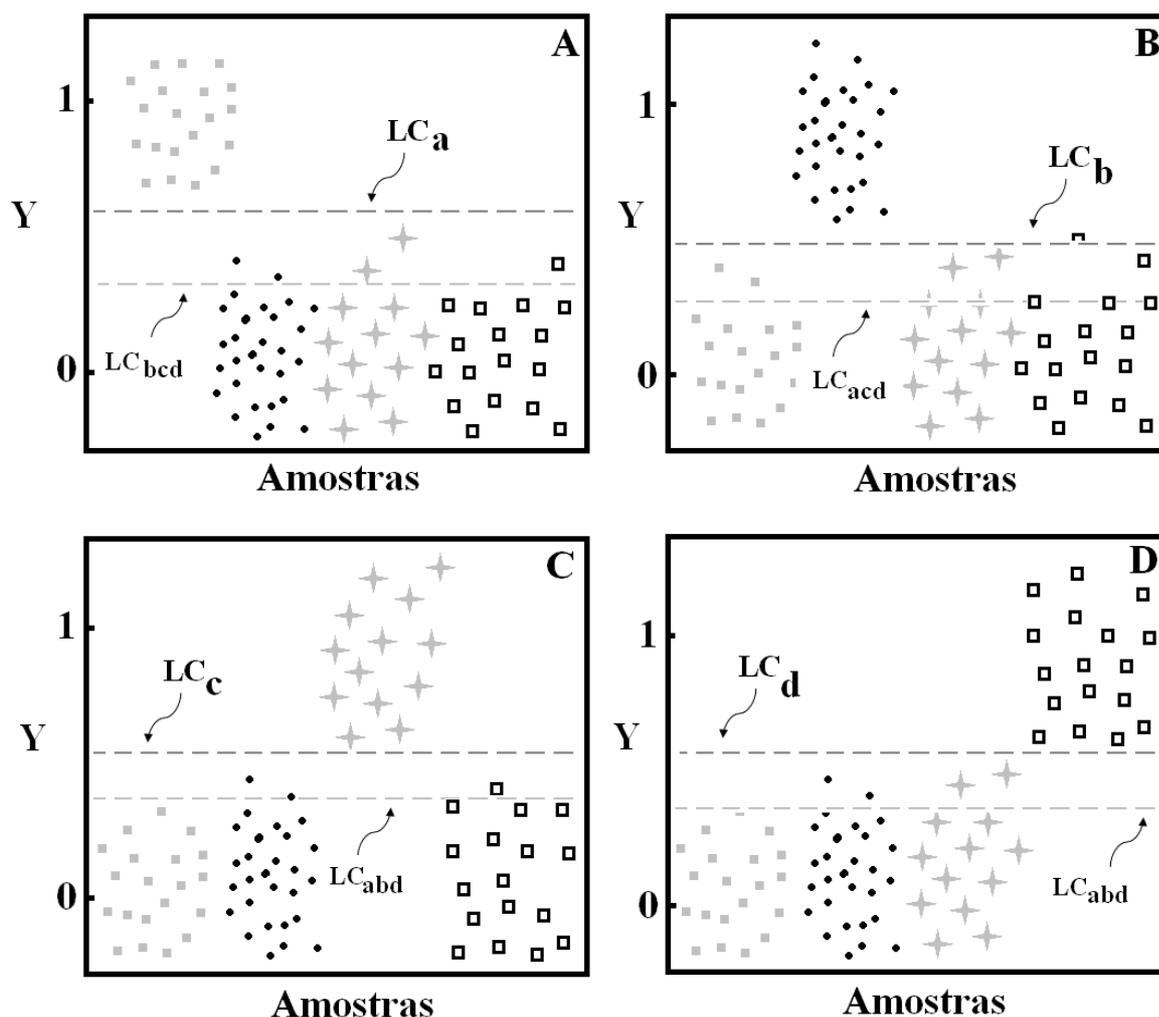


Figura 5.4. Representação esquemática de modelos PLS-DA para 4 classes distintas. Classe A (■), classe B (●), classe C (*) e classe D (□). LC – Limites de confiança entre as classes (linhas tracejadas).

5.3.3. Figuras de mérito

Nesta tese duas figuras de mérito, sensibilidade e especificidade (seletividade) foram calculadas na análise dos dados descritos no capítulo 8 (Meléndez et al., 1999).

Na obtenção destas figuras de mérito, uma análise de componentes principais (PCA) é realizada para cada classe (A , B) e os erros são calculados de acordo com a equação 5.2 ($\mathbf{E} = \mathbf{X} - \mathbf{S}_k \mathbf{P}_k^T$). Assim, podemos obter uma matriz de resíduos para a classe A e o desvio padrão residual de cada objeto da classe A , S_i^A , de acordo com a equação 5.20. O mesmo procedimento é aplicado à classe B .

$$S_i^A = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^J (e_{ij}^A)^2}{(J-k_A)}}, \text{ onde } J \text{ é o número de variáveis} \quad (5.20)$$

Para visualizarmos a classificação dos objetos em uma das classes A e B , podemos usar um gráfico de *Coomans* (Coomans e Broeckaert, 1986) cujos eixos correspondem aos desvios padrão S_i^A e S_i^B . Isto é viável porque estes dois parâmetros representam a distância dos diversos objetos (amostras) ao hiperplano definido pelas k componentes principais das classes A e B .

Observando o exemplo indicado na Figura 5.5, temos 27 amostras pertencentes à classe A (\bullet, \circ, \odot) e 22 a classe B ($\blacksquare, \square, \blacksquare$). As amostras localizadas no 2º quadrante pertencem à classe A (\bullet) e foram reconhecidas pelo modelo (hiperplano) construído para a classe A . O mesmo acontece com as amostras no 4º quadrante, porém, pertencentes à classe B (\blacksquare) e são reconhecidas por ela. Já as amostras localizadas no 3º quadrante (\square, \circ) são pertencentes a uma das classes, mas reconhecidas por ambas. Por fim, as amostras localizadas no 1º quadrante (\blacksquare, \bullet) pertencer a uma das classes, porém, não foram reconhecidas por nenhum dos modelos construídos para elas. Em alguns casos, as amostras encontradas no 1º quadrante podem ser *outliers* ou amostras

de outras classes (C , D) que não foram modeladas. Assumindo que as distâncias seguem uma distribuição normal, pode-se usar um teste t para determinar uma linha de corte para cada classe, com um determinado nível de confiança. A linha tracejada vertical é a linha (de corte) com 95% de probabilidade para classe A e a linha tracejada horizontal idem para a classe B . Através da localização destas amostras no gráfico das distâncias pode-se calcular a sensibilidade e a especificidade.

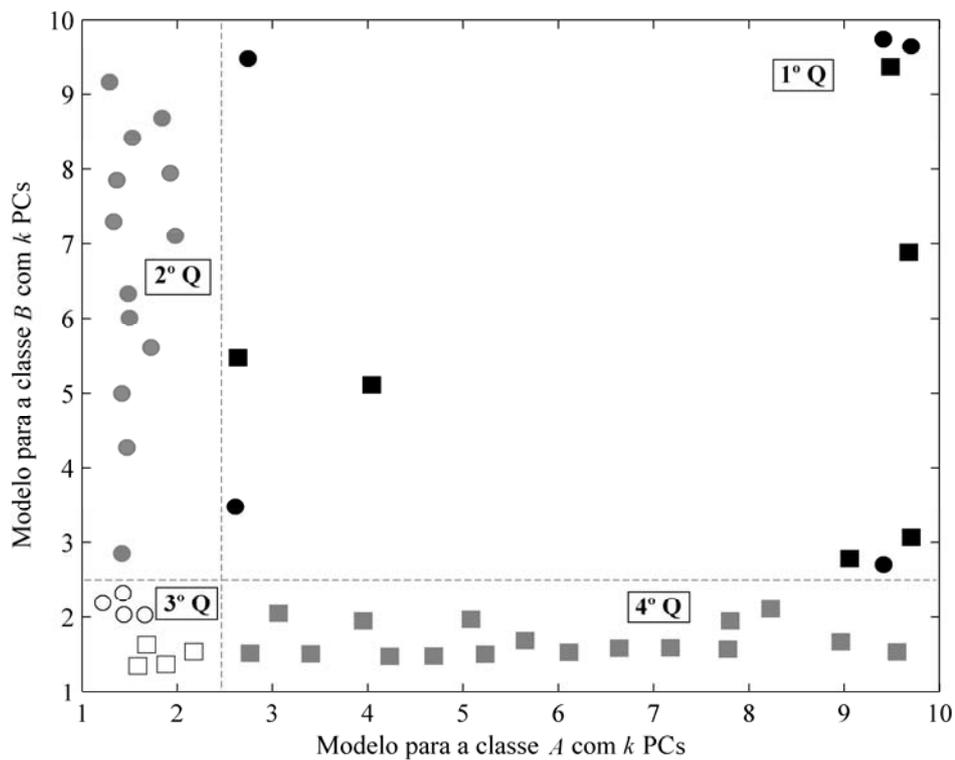


Figura 5.5. Gráfico de *Coomans* para duas classes de amostras (A , B). Amostras representadas por círculo são da classe A e as representadas por quadrados pertencem à classe B . Amostras no 1º quadrante foram classificadas como não pertencentes a nenhuma das classes e as do 3º quadrante foram classificadas como pertencentes a ambas as classes.

Assim, a sensibilidade para o modelo da classe A , por exemplo, é calculada como a porcentagem de amostras pertencentes a esta classe e que foram corretamente classificadas. Neste caso é a razão entre o nº de amostras reconhecidas pelo modelo

(●,○) e o n° total de amostras da classe A (●,○,●). Já a especificidade do modelo da classe A é a porcentagem de amostras pertencentes a alguma outra classe e que foram realmente consideradas como sendo de outra classe. Neste caso, é a razão entre as amostras reconhecidas e pertencentes à classe B (■) e todas as amostras da classe B (■,□,■).

Para cada modelo construído, um valor crítico é calculado a partir de um teste T com 95 % de probabilidade. Assim, a linha tracejada vertical é o limite calculado para a classe A e a linha horizontal tracejada para classe B.

5.4. Pré-tratamento dos dados

Os dados experimentais originais obtidos em uma determinada análise instrumental, muitas vezes, podem não ter uma distribuição adequada para a análise multivariada, dificultando assim a extração de informações úteis e interpretações dos mesmos. Isso ocorre porque, durante uma análise, além das variações estocásticas podem ocorrer variações sistemáticas. Dentre essas variações sistemáticas encontram-se: medidas em diferentes unidades, variáveis com diferentes variâncias, diferenças no volume injetado em análises cromatográficas, dispersão de luz em amostras sólidas e dispersões espectrais causadas pelo *Hardware* do equipamento (ruídos no detector) em análises espectroscópicas. Nestes casos, um pré-tratamento desses dados originais pode ser de fundamental importância.

Podemos distribuir os pré-tratamentos em transformações (aplicadas nas linhas da matriz \mathbf{X} – amostras) e pré-processamentos (aplicados às colunas da matriz \mathbf{X} – variáveis).

5.4.1. Transformações

Durante a obtenção de dados cromatográficos e espectroscópicos dentre outros, variações sistemáticas podem ocorrer e influenciar o sinal, o que pode comprometer a

qualidade dos resultados. Deste modo, se os dados apresentarem esses tipos de desvios, uma PCA, por exemplo, pode apresentar um efeito negativo profundo nos resultados das análises. Assim, essas variações devem ser removidas ou corrigidas antes da análise dos dados.

5.4.1.1. Correção de linha de base

Na cromatografia gasosa, por exemplo, em um detector por ionização em chama (FID), largamente utilizado nos experimentos desta tese, o gás de arraste (He) chega ao detector que contém uma chama produzida pela combustão de ar e H₂ queima e ioniza algumas moléculas presentes nessa corrente gasosa (impurezas), gerando íons que produzem uma pequena corrente da ordem de 10⁻¹⁴ A, registrada como linha de base do detector (Collins et al., 2006). Deste modo, essas impurezas podem alterar a corrente elétrica e causar variações na linha de base.

Já em espectroscopia por refletância difusa o deslocamento de linha de base geralmente é causado pelo espalhamento de luz em amostras sólidas, gerados por diferenças no tamanho e na forma das partículas (Gemperline, 2006).

Uma maneira prática e eficiente de resolver estes tipos de problemas é aplicando a correção de linha de base para cada amostra usando um dado de referência (cromatograma de referência). Durante a aplicação deste método a diferença de linha de base entre os cromatogramas que serão corrigidas e o de referência é subtraída no início e no fim da corrida cromatográfica (Figura 5.6), restando assim apenas pequenas variações na linha de base entre picos mal resolvidos.

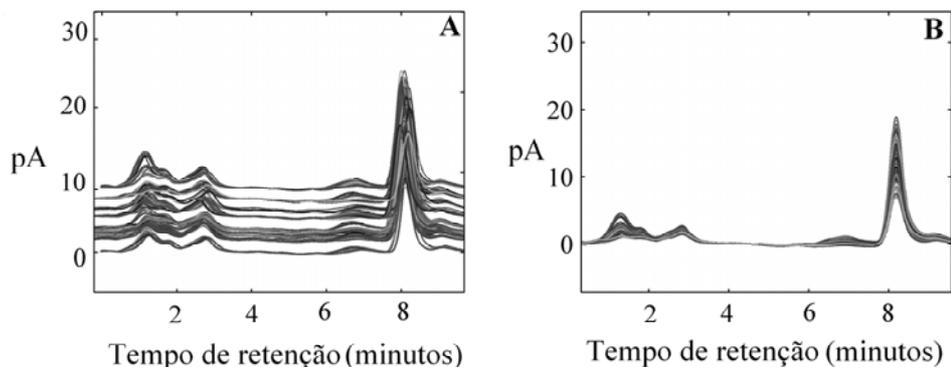


Figura 5.6. Partes de um cromatograma de voláteis de café torrado. Cromatogramas originais extraídos do *Software* (A) e cromatogramas com linha de base corrigida (B).

5.4.1.2. Primeira e segunda derivadas

Outra maneira muitas vezes mais eficiente de eliminar deslocamentos da linha de base de dados cromatográficos e espectroscópicos é a aplicação da primeira derivada. A derivada também é amplamente aplicada para aumentar resoluções espectrais e para eliminar absorções de segundo plano (Savitzky e Golay, 1964; Barak, 1995; Gorry, 1990). Segundo Martens e Naes (1989), a derivada de dados espectroscópicos melhora a definição de bandas que se encontram sobrepostas em uma mesma região espectral. Assim as informações contidas nos diferentes comprimentos de onda são, geralmente, acentuadas.

A Figura 5.7 A apresenta os espectros originais de amostras de café torrado analisadas por reflectância difusa no infravermelho próximo. A primeira derivada (Figura 5.7 B) permite que a constante adicional dos efeitos de segundo plano seja removida, ou seja, a derivada do termo constante de uma função contínua é zero (Brown et al., 2000). Já a segunda derivada remove as variações na inclinação da linha de base e efeitos adicionais. Porém, espectros de segunda derivada são mais ruidosos (Figura 5.7 C).

O algoritmo mais freqüentemente utilizado para obter as funções derivadas é chamado de Savitzky e Golay (SG) (Savitzky e Golay, 1964) onde os dados que se encontram dentro de uma janela móvel são ajustados por um polinômio de um grau fixado gerando uma diferenciação de grau desejada (Gorry, 1990; Zeiter et al., 2005).

Além da remoção dos deslocamentos de linha de base, a derivada também funciona como um filtro. Os pontos de cruzamento no zero podem ser usados para identificar a posição dos picos nos espectros originais. A transformação causada pela derivada é linear, e as curvas produzidas pela derivada mantêm os aspectos quantitativos dos sinais originais.

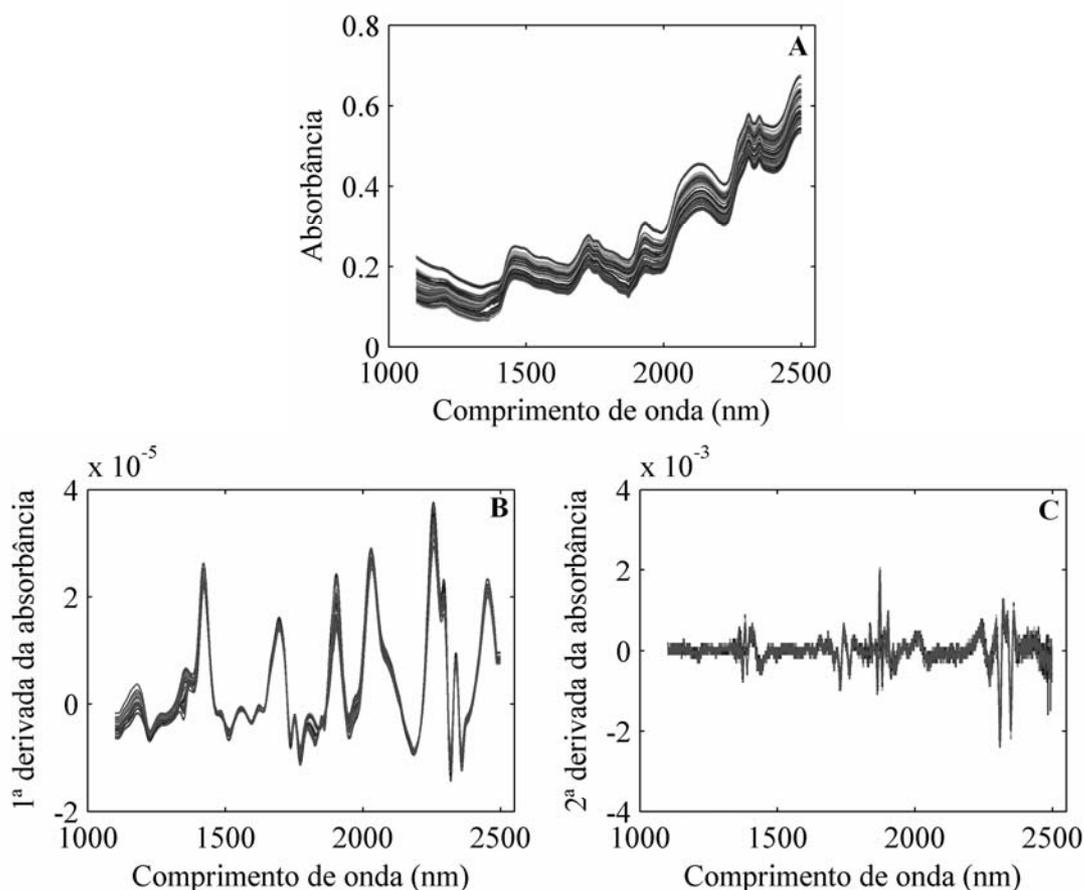


Figura 5.7. Espectros de cafés torrados medidos na região do infravermelho próximo por refletância difusa. Espectros originais (A), Espectros tratados com a 1ª derivada aplicada (B) e com a 2ª derivada aplicada (C).

5.4.1.3. Correção multiplicativa de sinal

A correção multiplicativa de sinal (MSC - *Multiplicative Scatter Correction*) foi descrita pela primeira vez em 1985 (Geladi et al., 1985) como um método de correção de efeitos aditivos e multiplicativos causados por espalhamentos de luz e as diferenças nas dimensões das partículas em medidas de NIRS por reflectância de amostras. Assim, este método corrige tanto a reflectância especular da luz (refletida pelas partículas sem ser absorvida por elas) quanto a reflectância difusa (refletida pela amostra após penetrar as partículas da mesma onde parte da luz é absorvida pelas moléculas presentes nas partículas). Isso é feito a partir de uma regressão linear simples de um espectro de uma amostra \mathbf{x}_i sobre um espectro de referência (\mathbf{x}_r) (eq. 5.21). Geralmente o espectro de referência é o espectro médio dos espectros do conjunto de calibração (Isaksson e Naes, 1988; Zeiter et al., 2005).

$$\mathbf{x}_i \approx \hat{\beta}_{0i} + \hat{\beta}_{1i} \mathbf{x}_r \quad (5.21)$$

onde os coeficientes $\hat{\beta}_{0i}$ e $\hat{\beta}_{1i}$ são estimados por quadrados mínimos e então utilizados para calcular o espectro corrigido (\mathbf{x}_i^*) (eq. 5.22).

$$\mathbf{x}_i^* = (\mathbf{x}_i - \hat{\beta}_{0i}) / \hat{\beta}_{1i} \quad (5.22)$$

A principal vantagem da MSC é que o espectro corrigido se assemelha ao espectro original, o que ajuda muito na sua interpretação. A Figura 5.8 mostra os espectros originais (A) e depois de sofrerem a correção multiplicativa de sinal (B).

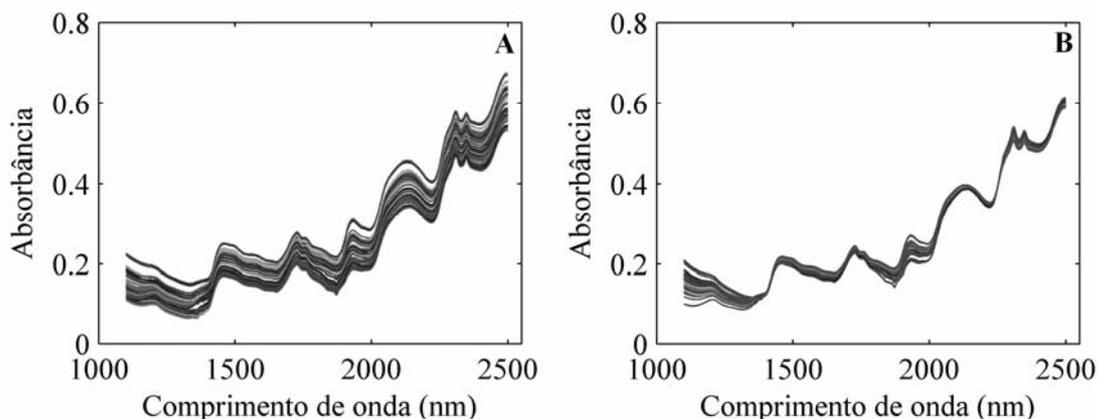


Figura 5.8. Espectros de cafés torrados por reflectância difusa medidos na região do infravermelho próximo. Espectros originais (A) e espectros corrigidos pela MSC (B).

Foi demonstrado em diversos estudos que a MSC funciona muito bem como pré-tratamento (Geladi et al., 1985; Barnes et al., 1989; Xie et al., 2007; Ribeiro et al., 2008), e que os resultados mostraram uma melhoria significativa no desempenho de calibrações multivariadas causando uma redução no número de componentes principais utilizadas.

5.4.1.4. Normalização

Em algumas situações torna-se necessária a normalização de uma série de sinais, tais como cromatogramas e espectros antes da análise desses dados (Gemperline, 2006). Ela é usada principalmente para remover variações sistemáticas, em geral associadas com o tamanho da amostra. Corrige-se, por exemplo, o efeito causado no sinal do detector de diferentes dias de análise e diferentes volumes injetados em cromatografia, normalizando cada cromatograma pela sua unidade de comprimento.

Neste pré-tratamento, divide-se cada uma das variáveis de uma dada amostra i por um fator de normalização: pela norma da amostra i , representada por $\|\mathbf{x}_i\|$.

A normalização por unidade de área (l_1), é geralmente utilizada em dados espectroscópicos. Nela a área sobre cada um dos espectros é unitária (eq. 5.23). É calculada a partir da soma das absorbâncias.

$$\|\mathbf{x}_i\|_1 = \sum_{j=1}^J |x_{ij}| \quad (5.23)$$

Já a normalização por unidade de comprimento ou Euclidiana (l_2), foi utilizada nos dados cromatográficos desta tese. Nela cada espectro ou cromatograma terá comprimento igual a 1. Essa normalização é calculada dividindo-se os valores indicados pelo detector em cada tempo de retenção pela raiz quadrada da soma das mesmas ao quadrado (eq. 5.24).

$$\|\mathbf{x}_i\|_2 = \sqrt{\sum_{j=1}^J x_{ij}^2} \quad (5.24)$$

5.4.1.5. Alisamento dos dados

Alisamento é o método de pré-tratamento utilizado para reduzir ruído, *i.e.*, as variações estocásticas na amplitude aumentando assim a razão sinal-ruído (S/R). O método mais simples de alisamento consiste em usar uma janela móvel de pontos. O espectro alisado é gerado usando o valor médio dessa janela. Contudo, a distorção produzida pelo processo é bem visível, principalmente nos valores-finais (limites) de curvas presentes no sinal original. Por isso, para reduzir esta distorção enquanto diminui o ruído, diversos métodos utilizando-se polinômios simples ajustados aos dados foram descritos (Savitzky e Golay, 1964; Steiner et al., 1972; Enke e Nieman, 1976).

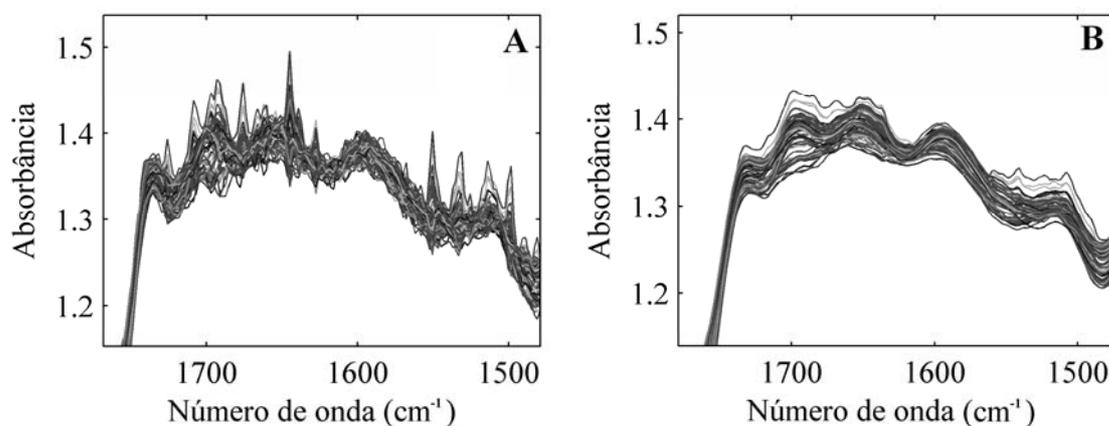


Figura 5.9. Região expandida dos espectros de infravermelho médio com refletância difusa de cafés torrados. Espectros originais sem alisamento (A) e espectros alisados (B).

O tipo mais comum e geral de alisamento polinomial é conhecido como alisamento segundo Savitzky-Golay (Savitzky e Golay, 1964) (Figura 5.9). Esse alisamento funciona através do ajuste, por quadrados mínimos, de uma função polinomial aos dados ruidosos presentes em uma janela móvel de largura w , onde w é geralmente um número ímpar. Depois, o polinômio é usado para determinar um ponto alisado (centro da janela), a janela é movida para a direita deixando de fora o ponto mais a esquerda e adicionando o ponto seguinte à janela. Um novo polinômio é ajustado à nova janela, e seu ponto médio é estimado (Figura 5.10). Este processo é continuado, ponto a ponto, até que a curva inteira esteja alisada. O grau do alisamento é controlado variando-se a largura da janela, w , e mudando o grau de ajuste da função polinomial. Com polinômios de baixa ordem, por exemplo, mais ruído é filtrado, porém ocorre um aumento na distorção do sinal. Aumentar a janela usada no alisamento também diminui o ruído, mas a custo da distorção significativa do sinal (Wilson e Edwards, 1976). Já polinômios de ordem superior permitem que curvas mais complexas sejam ajustadas aos dados, ou seja, permitem o ajuste dos dados que mudam rapidamente dentro da janela. Nestes casos, quando o alisamento é feito com

w pequenos, menos ruído é removido e menor a distorção, pois esses polinômios descrevem melhor os sinais originais (Gemperline, 2006).

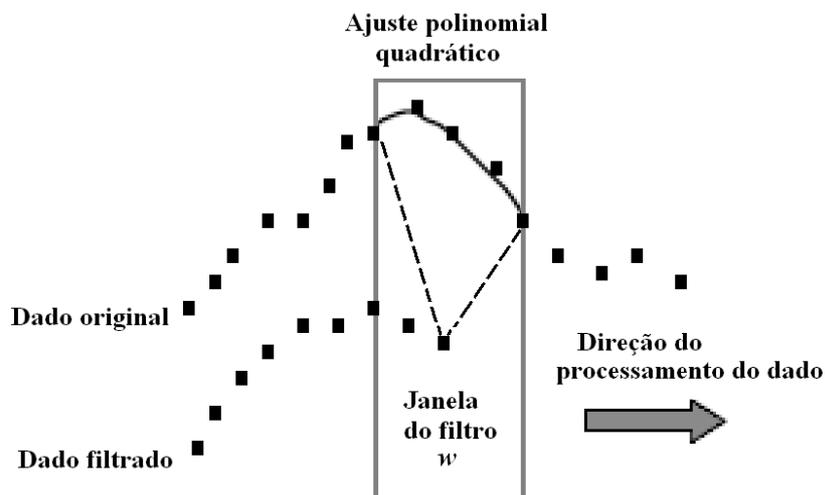


Figura 5.10. Representação esquemática do processo de alisamento segundo Savitsky-Golay.

Quando um aumento na razão sinal/ruído dos dados é desejado, em tempo real, aconselha-se alisar o espectro durante a aquisição dos dados. Esse alisamento dos dados durante a análise é conhecida como “filtro digital”.

5.4.1.6. Alinhamento dos dados - Correlation Optimized Warping (COW)

Na cromatografia, em geral, existe uma crescente tendência no uso de cromatogramas de matrizes complexas (envolvendo centenas de compostos) da mesma forma como outros sinais instrumentais, especialmente se os dados forem tratados por métodos quimiométricos. A vantagem em se usar os cromatogramas diretamente é a possibilidade da extração de informações adicionais que não são computadas quando apenas as áreas relativas dos picos obtidos para os compostos são utilizadas como resposta analítica. Entretanto, para a aplicação das técnicas quimiométricas, os cromatogramas, devem ser adequadamente pré-tratados.

Um aspecto importante a ser considerado neste caso, é o deslocamento de picos que ocorrem com frequência, em decorrência de variações na temperatura, idade da coluna, pequenas variações na composição da fase móvel e diferentes maneiras de injeção da amostra (Van Niderkassel, et al., 2005). O pré-tratamento aplicado a fim de corrigir esses deslocamentos é o alinhamento dos picos do cromatograma. Várias técnicas de alinhamento foram propostas na literatura. Dentre elas encontram-se *correlation optimized warping* (COW) (Nielsen et al., 1998; Pravdova et al., 2002; Tomasi et al., 2004), *dynamic time warping* (DTW) (Kassidas et al., 1998), *parametric time warping* (PTW) (Eilers, 2004), alinhamento de picos por algoritmos genéticos (PAGA) (Forshed et al., 2003), *fuzzy warping* (FW) (Walczak e Wu, 2005) e *semi-parametric time warping* (STW).

O método COW introduzido por Nielsen et al. (1998), é o algoritmo mais popular e eficiente no processo de alinhamento de picos cromatográficos, espectroscópicos e de ressonância magnética nuclear (Daszykowski e Walczak 2006).

O algoritmo COW alinha um cromatograma desalinhado e representado por \mathbf{x}_d , a um cromatograma de referência designado por \mathbf{x}_r . Neste caso, \mathbf{x}_r pode ser o cromatograma médio, calculado entre todos os cromatogramas que serão alinhados, ou aquele que apresentar o melhor sinal (visualmente), como por exemplo, o cromatograma com os picos mais resolvidos. Considerando \mathbf{x}_d e \mathbf{x}_r como vetores contendo J e J' coordenadas, respectivamente (J e J' variáveis ou leituras do detector para os tempos de retenção), \mathbf{x}_d será alinhado a \mathbf{x}_r por meio de compressões e estiramentos (deformações) em seções previamente definidas do cromatograma. A solução geral para o alinhamento corresponderá a uma combinação das diversas deformações para cada seção, que fornecerá a máxima correlação entre \mathbf{x}_d e \mathbf{x}_r , aproximando o máximo possível o vetor desalinhado do vetor de referência. Em outras palavras, um conjunto formado pelos graus de deformação para cada seção é determinado pelo critério de máxima correlação entre os vetores já citados.

O algoritmo funciona da seguinte forma:

1. Tanto o vetor a ser alinhado, \mathbf{x}_d , quanto o vetor de referência, \mathbf{x}_r , são divididos em um número N de seções, especificadas pelo analista (equação 5.25). Cada seção tem comprimento M e M' para \mathbf{x}_d e \mathbf{x}_r , respectivamente, que neste contexto significa o número de coordenadas (variáveis) das seções, aqui denominadas, \mathbf{g} e \mathbf{g}' . Além disso, são definidos para cada seção os “nós” que efetivamente sofrerão deslocamentos e proporcionarão as deformações.

$$N = J/M \quad (5.25)$$

2. Cada seção $\mathbf{g}_n (n = 1, 2, \dots, N)$, de comprimento M , é distorcida, tendo seu comprimento alongado ou encurtado por um número pré-definido de pontos, *i. e.*, variando o número de coordenadas do vetor \mathbf{x}_d , que por sua vez são obtidos através de interpolação linear entre apropriados pontos adjacentes entre \mathbf{x}_d e \mathbf{x}_r . A variação corresponde ao deslocamento dos “nós” mediante uma amplitude máxima pré-definida. No caso de \mathbf{x}_d e \mathbf{x}_r possuírem o mesmo número de coordenadas, J será igual a J' e M será igual a M' , havendo então apenas um deslocamento da seção. Vale ressaltar que no alinhamento, os pontos iniciais e finais (primeiro e último nós) do vetor desalinhado \mathbf{x}_d e do vetor de referência \mathbf{x}_r são sempre igualados e permanecem fixos durante o procedimento.

Diante do exposto acima fica clara a necessidade de dois parâmetros que são responsáveis pela qualidade do alinhamento. O primeiro deles é o número, N ($\mathbf{g}_n n = 1, 2, \dots, N$) de seções (ou o comprimento das seções) no qual o cromatograma é dividido, definindo a posição dos nós. O segundo parâmetro, s , mais conhecido como parâmetro de distorção (em inglês, *slack*), define todas as possíveis deformações (encurtamento ou alongamento), ou seja, as posições finais dos nós de uma seção de comprimento M . A qualidade do alinhamento está diretamente ligada à razão entre

esses parâmetros que pode ser entendida como a flexibilidade (*slack/comprimento* das seções). Desse modo o que importa é esta razão e não o valor numérico dos parâmetros em si.

A posição dos pontos de extremidade (nós) de cada seção \mathbf{g}_n é definida pelo parâmetro s . Então, cada seção pode ser alongada ou encurtada de acordo com a amplitude definida pelo parâmetro de distorção, de $-s$ a $+s$ pontos, com exceção dos pontos inicial ($x_{d(i,1)}$) e final ($x_{d(i,J)}$) dos vetores que são fixados. Por exemplo, se s for igual a dois, existem cinco possíveis pontos finais de uma seção: -2 , -1 , 0 , 1 e 2 . Logo, estes cinco finais possíveis, obtidos para cada \mathbf{g}_n são linearmente interpolados à respectiva seção \mathbf{g}_n' . Desta forma, coeficientes de correlação (r) entre os 5 possíveis \mathbf{g}_n e \mathbf{g}_n' são calculados, e o alinhamento que apresentar a melhor correlação, ou seja, o melhor alinhamento da seção é escolhido. O processo é repetido para as seções \mathbf{g}_{n+1} e \mathbf{g}_{n+1}' e o melhor alinhamento é armazenado, e assim sucessivamente para todas as N seções.

Assim, a melhor solução de distorção (o melhor alinhamento) do vetor \mathbf{x}_d é construída a partir da união das N seções, cada uma com seu respectivo maior valor de r . Ou seja, à posição do ponto final da primeira seção (\mathbf{g}_n) em \mathbf{x}_d (por exemplo, para um dado valor de s) une-se o ponto inicial da segunda seção de \mathbf{x}_d (\mathbf{g}_{n+1}) e assim por diante.

O tempo computacional do método COW aumenta exponencialmente com os valores de s . A seleção deste parâmetro é guiada geralmente por deslocamentos observados entre os picos dos vetores (\mathbf{x}_r e \mathbf{x}_d) e pelo próprio comprimento da seção. O parâmetro s deve ser grande o suficiente para assegurar a flexibilidade satisfatória de distorção, sendo que o número de pontos dos dados em uma seção subtraído de s deve ser maior que 1. Entretanto, para diminuir este tempo computacional e aumentar

flexibilidade no alinhamento, uma alternativa é o aumento no número de seções mantendo baixos valores de s (Daszykowski e Walczak, 2006).

A Figura 5.11 apresenta um exemplo de como é calculado o alinhamento de um vetor desalinhado \mathbf{x}_d em função de um vetor de referência \mathbf{x}_r , de mesmo comprimento, utilizando $N=1$ e $s=2$. Assim, observa-se os possíveis deslocamentos indicados em linhas pontilhadas, e o melhor alinhamento $M-s$ (linha cinza clara pontilhada sobreposta a linha preta contínua) no quadro B da figura 5.11.

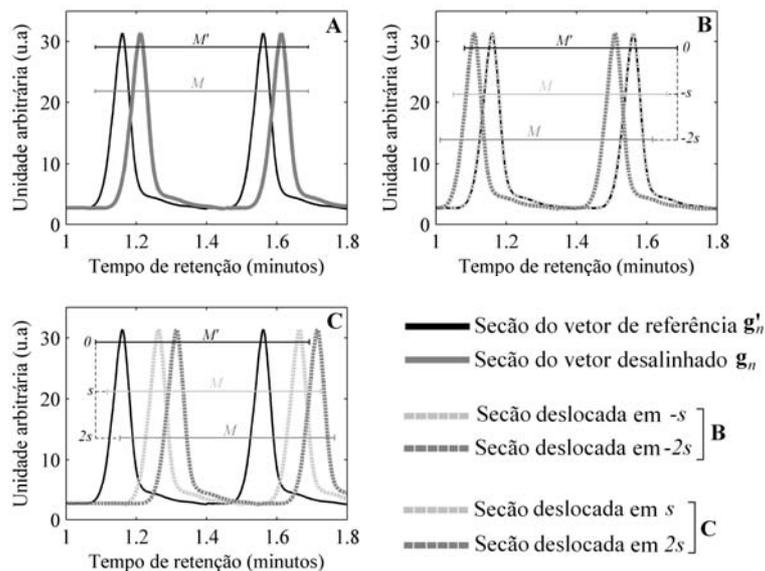


Figura 5.11. Representação esquemática do alinhamento de seções de 2 vetores simulados contendo dois picos cada um, utilizando-se o método COW. As duas seções têm o mesmo número de variáveis e M e M' são iguais.

Conforme já foi mostrado, uma restrição do algoritmo COW é que os pontos nas extremidades do vetor desalinhado e do vetor referência são igualados e fixos, o que possibilita também igualar sinais processados de diferentes comprimentos ($\mathbf{x}_r \neq \mathbf{x}_d$). Se cada seção (\mathbf{g}_n) de \mathbf{x}_d for interpolada linearmente ao comprimento de uma seção (\mathbf{g}_n^r) em \mathbf{x}_r , têm-se após o alinhamento sinais de mesmo comprimento. A Figura

5.12 apresenta esquematicamente o alinhamento de um vetor desalinhado menor do que o vetor de referência.

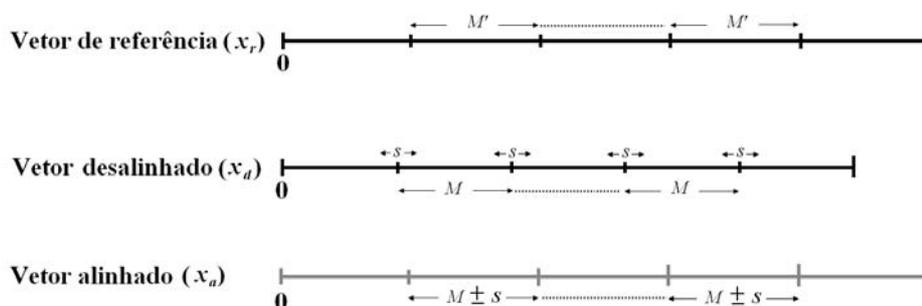


Figura 5.12 Representação esquemática do funcionamento do algoritmo COW alinhando sinais de comprimentos diferentes (M é diferente de M').

Como os pontos inicial e final de um vetor (cromatograma) são fixos, a flexibilidade de distorção para seções localizadas mais ao centro deste vetor é maior, uma vez que há uma maior distância das restrições. Como consequência, é mais difícil alinhar picos que estão no começo ou na extremidade de um vetor (Van Nederkassel et al., 2006).

5.4.2. Pré-processamentos

5.4.2.1. Centrar os dados na média

Centrar os dados na média equivale geometricamente, a fazer uma translação do sistema de eixos ao longo do vetor das médias, para o centro do conjunto de dados. Neste caso, se x_{ij} representa o ij -ésimo elemento da matriz \mathbf{X} , então a centragem dos dados na média é realizada subtraindo-se de x_{ij} o valor dado pela média aritmética dos elementos da j -ésima coluna, \bar{x}_j , onde $i=1, 2, \dots, I$.

Neste pré-processamento, a distância entre as amostras é conservada. Todos os dados espectroscópicos foram centrados na média nesta tese.

5.4.2.2. Autoescalamamento dos dados

Escalar os dados significa colocar todas as variáveis de um conjunto de dados em uma mesma escala, quando tais variáveis apresentam diferentes unidades entre si ou quando a faixa de variação das mesmas for muito variada. Deste modo para autoescalarmos o ij -ésimo elemento de uma dada matriz $\mathbf{X}(I \times J)$ basta centrá-lo na média e dividi-lo pelo desvio padrão da j -ésima coluna.

Em separações cromatográficas diversas, compostos voláteis e não voláteis são analisados por diferentes detectores (FID, MS, etc). Muitos destes detectores, apesar de serem considerados universais, não apresentam a mesma relação sinal/concentração entre diferentes compostos químicos (sensibilidade de cada um deles). Além disso, a baixa concentração de certos compostos, em relação a outros, presentes em quantidades elevadas, não os torna menos importantes em resultados analíticos qualitativos e quantitativos. Assim, para evitarmos que durante as análises quimiométricas alguns compostos sejam considerados mais importantes que outros, apenas por estarem com sinal elevado, os dados cromatográficos foram autoescalados.

É importante saber que quando autoescalamos um determinado conjunto de dados devemos tomar cuidado com amostras anômalas, pois todos os métodos de escalamento são sensíveis à presença delas.

5.5. Seleção de Variáveis

A seleção de variáveis é uma etapa preliminar muito importante na análise multivariada de dados, particularmente porque muitas dessas variáveis contêm informações redundantes ou ruídos experimentais. Em outras palavras, essa operação consiste na escolha de determinadas regiões do espectro (comprimentos de onda) ou do cromatograma (picos), que melhor se correlacionam com a resposta analítica

estudada (Xu e Schechter, 1996; Nadler e Coifman, 2005; Ferreira, 2002; Jouanrimbaud et al., 1995; Teófilo et al., 2009).

A grande vantagem de uma seleção adequada de variáveis é que ela permite minimizar os erros de calibração, melhorando significativamente sua eficiência, resultando assim em um modelo mais robusto, simples de interpretar e com melhor exatidão nas previsões.

Um grande número de procedimentos para seleção de variáveis está disponível na literatura (Osborne et al., 1997; Forina et al., 2004; Chong e Jun, 2005; Hoskuldsson, 2001; Teófilo et al., 2009), a maioria focada na seleção de comprimentos de onda de dados espectroscópicos. Estes procedimentos podem ser distinguidos um do outro pelo método de busca que localiza um subconjunto ótimo e pelo método objetivo para encontrar as variáveis ótimas.

Nesta tese, a seleção das variáveis para os modelos de regressão (PLS) e classificação (PLS-DA) foi realizada utilizando-se o algoritmo OPS (*Ordered Predictors Selection*), desenvolvido em nosso do grupo de pesquisa (Teófilo et al., 2009). Esse algoritmo consiste em quatro etapas:

1. Na primeira delas ocorre a obtenção de um vetor informativo (VI) que contém informações sobre a localização das melhores variáveis independentes para previsão; Esse VI pode ser o vetor de regressão para o modelo PLS, o vetor de correlação de cada coluna em \mathbf{X} com \mathbf{y} , além de outros indicados em Teófilo et al. (2009). A possibilidade de se usar o produto entre dois ou mais destes vetores também existe.
2. A diferenciação das variáveis originais de acordo com os valores correspondentes ao vetor informativo obtido na primeira etapa, acontece na segunda etapa;
3. Já na terceira etapa ocorre a organização das variáveis originais em ordem decrescente de magnitude;
4. Por fim, os modelos de regressão multivariados são construídos e avaliados utilizando a estratégia de validação cruzada (Figura 5.13).

A seleção das variáveis para as análises exploratórias (PCA) foi realizada visualmente sobrepondo todos os cromatogramas e espectros e observando as diferenças sistemáticas entre as amostras.

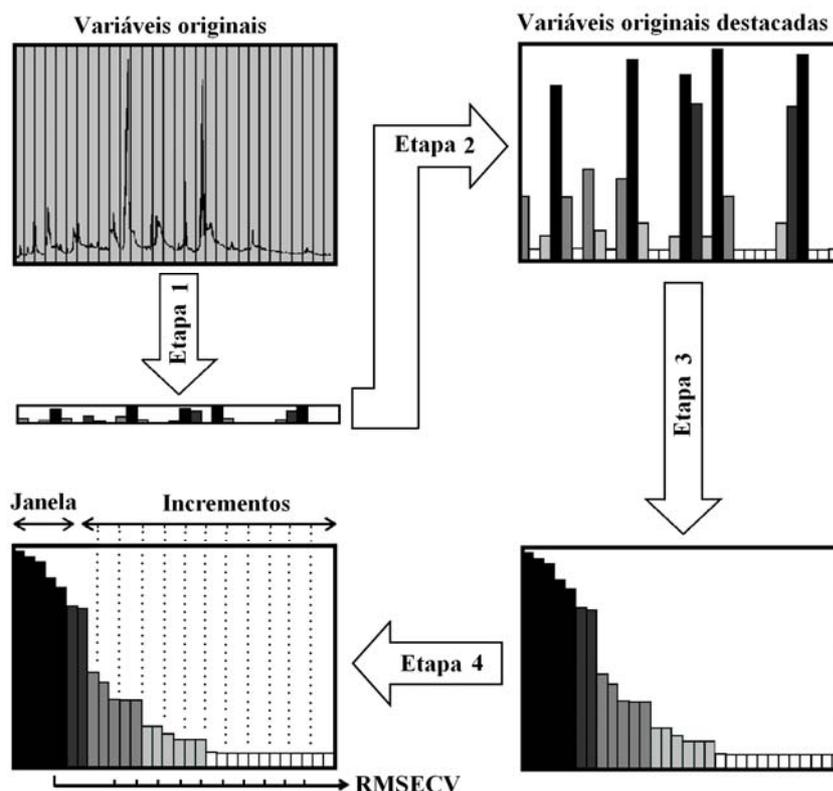


Figura 5.13. Representação esquemática das etapas realizadas pelo método OPS.

5.6. Planejamento de experimentos

Muitas vezes em experimentos e processos químicos, condições ou variáveis experimentais podem influenciar a resposta desejada. Deste modo os planejamentos fatoriais, baseados em princípios estatísticos, aparecem como uma importante ferramenta de entendimento das variáveis de interesse e os efeitos de interação entre elas (Barros Neto et al., 2002; Teófilo e Ferreira, 2006). Através deles, pesquisadores podem determinar as variáveis que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, realizando um número mínimo de experimentos (Barros Neto et al., 2002). Dentre os planejamentos experimentais mais utilizados encontram-se os

fatoriais completos, fracionados (Box et al., 1978; Barros Neto et al., 2002), composto central (CCD – *Central Composite Design*) (Box e Wilson, 1951) e *Doehlert* (Doehlert, 1970).

Segundo a literatura, a primeira medida a ser tomada num planejamento fatorial é um experimento de triagem das variáveis (Barros Neto et al., 2002; Teófilo e Ferreira, 2006). Esse experimento é executado com o intuito em se determinar as variáveis experimentais que têm influência significativa sobre as diferentes respostas de interesse (Lundstedt et al., 1998).

Em uma etapa seguinte, deve-se escolher qual planejamento usar para estimar a influência (o efeito) das diferentes variáveis experimentais sobre a resposta de interesse.

Em um planejamento fatorial a combinação de n fatores ou variáveis em v níveis é realizada com k^n experimentos (I), onde normalmente os fatores (n) são as concentrações de uma substância, valores de pH, temperatura, etc. Já os níveis (k) mais baixos são nomeados pelo sinal (-) enquanto os mais altos pelo sinal (+). No caso de efeitos de interação de 2ª ordem e de ordem superior entre todas as variáveis do planejamento, os sinais são obtidos pelo produto dos sinais originais das variáveis envolvidas. Desta forma é possível construir colunas de sinais para todas as interações e elaborar uma matriz de coeficiente de contraste (\mathbf{X}_c).

Assim, num planejamento fatorial com I ensaios e y_i respostas individuais, os efeitos (ef) para cada coluna de \mathbf{X}_c são dados pelas seguintes equações:

$$ef = \frac{\sum_{i=1}^I y_i}{I} \quad (5.26)$$

$$ef = \frac{\sum_{i=1}^{I/2} y_{i(+)} - \sum_{i=1}^{I/2} y_{i(-)}}{I/2} \quad (5.27)$$

onde \bar{ef} (eq. 5.26) descreve a média de todas as observações, enquanto ef (eq. 5.27) descreve o cálculo do efeito para as variáveis e interações usando a diferença entre as médias das observações no nível mais ($y_{i(+)}$) e as médias das observações no nível menos ($y_{i(-)}$).

Utilizando-se a matriz \mathbf{X}_c , construída a partir de um planejamento fatorial completo, juntamente com o vetor de respostas \mathbf{y} , o cálculo dos efeitos pode ser realizado ainda através do método dos quadrados mínimos.

5.6.1. Planejamento Composto Central

Nesta tese apenas o planejamento composto central (CCD) foi utilizado, deste modo será melhor descrito.

Na construção de um CCD é necessário definir o número de variáveis a serem estudadas (n), qual planejamento fatorial será empregado (completo ou fracionário) e quantos experimentos serão realizados no ponto central (I_c).

Em geral, um CCD para n fatores e 2 níveis ($k=2$), devidamente codificados como (x_1, \dots, x_n) , é formado de três partes:

1. Um planejamento fatorial completo ou fracionário de dois níveis, contendo um total 2^n pontos de coordenadas.
2. Uma parte axial (ou em estrela), formada por $2n$ pontos em que $x_i = \pm \alpha$ com $x_n \neq x_i$ e $\alpha = \sqrt[4]{2^n}$. Estes pontos são situados nos eixos do sistema de coordenadas com distância $\pm \alpha$ da origem.
3. Um total de I_c ensaios realizados no ponto central, onde, $x_1 = \dots = x_n = 0$;

Neste caso, o número de experimentos a ser realizado no CCD é dado por $2^n + 2n + I_c$.

Portanto, em um planejamento central com 3 variáveis ($n = 3$), a parte cúbica é formada por 8 experimentos, a parte axial de 6 (com $\alpha = 1,68$), e I_c experimentos no ponto central (Figura 5.14).

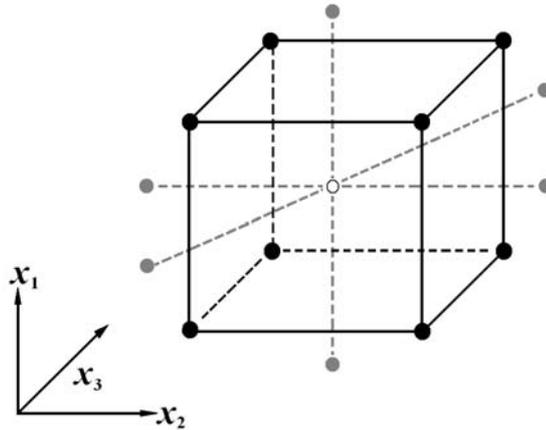


Figura 5.14. Planejamento composto central: $n = 3$ e $\alpha = 1,682$. (●) planejamento fatorial, (●) pontos axiais e (○) ponto central.

Neste tipo de planejamento os níveis α (o mesmo vale para qualquer valor codificado x_i) necessitam ser decodificados para os valores experimentais dos níveis das variáveis a serem estudadas. Vale ressaltar também, que é aceitável o ajuste de α a um valor experimentalmente viável para o nível, desde que não ocorram grandes distorções no valor original.

A partir das repetições realizadas no ponto central é possível obter a estimativa dos erros para os coeficientes, ou seja, média e a variância das replicatas de acordo com as equações 5.28 e 5.29.

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^r y_i}{r} \quad (5.28)$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^r (y_i - \bar{y})^2}{(r-1)} \quad (5.29)$$

onde r é o número de replicatas, isto é, o número de experimentos realizados no ponto central, y_i são os valores de cada observação individual, \bar{y} é o valor médio e s^2 é a variância dos dados.

Já os valores correspondentes aos erros padrão (s_{bi}) dos coeficientes calculados podem ser determinados pela raiz quadrada dos elementos da diagonal principal da matriz $\mathbf{C}(b)$ (eq. 5.30). Isto acontece porque a matriz $(\mathbf{X}^T\mathbf{X})^{-1}$ apresenta grande influência na variância dos parâmetros de regressão, ou seja, sobre os coeficientes.

$$s_{bi} = \pm\sqrt{c(b)_{ii}}, i=1, 2, \dots, I \quad (5.30)$$

Essa matriz $\mathbf{C}(b)$, conhecida como matriz de *variância covariância*, é obtida através do produto entre $(\mathbf{X}^T\mathbf{X})^{-1}$ e o valor da variância (s^2) obtida entre as repetições no ponto central (r).

5.6.2. Identificação dos efeitos e coeficientes significativos

A maneira mais confiável de se avaliar a qualidade do ajuste de um dado planejamento é empregando-se a análise de variância (ANOVA), onde são avaliados os coeficientes e os resíduos do modelo calculado (Christensen, 2000).

Na ANOVA (Tabela 5.1) a variação total da resposta, ou seja, a soma quadrática da variação total (SQ_T), é definida como a soma quadrática da regressão (SQ_R) mais a soma quadrada dos resíduos (SQ_r) (equação 5.31).

$$SQ_T = SQ_R + SQ_r \quad \text{ou} \quad \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{r_i} (y_{ij} - \bar{y})^2 = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{r_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{r_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2 \quad (5.31)$$

onde, na SQ_R , k é o número total de níveis do planejamento, isto é, pontos experimentais do planejamento; \hat{y}_i é o valor estimado pelo modelo para o nível i e \bar{y} é o valor médio das replicatas (r). No entanto, como há somente replicatas no ponto central (PC), a média das replicatas nos níveis (+) e (-) é o próprio valor observado do ensaio naquele nível. Já o segundo somatório indica que se deve fazer o quadrado das diferenças inclusive com cada repetição.

Uma parte da variação total das observações y_i em torno da média \bar{y} das replicatas realizadas no PC é descrita pela equação de regressão, e o restante fica por conta dos resíduos.

O termo referente à soma quadrática residual (SQ_r) indica que o quadrado da diferença entre o valor de cada observação (y_i) e o valor estimado (\hat{y}_i) e, inclusive das replicatas (y_j) em cada nível (v), fornece a soma quadrática residual de todos os níveis (equação 5.32).

$$SQ_r = SQ_{ep} + SQ_f \quad (5.32)$$

onde o primeiro termo (SQ_{ep}) é chamado de soma quadrática do erro puro (relacionado exclusivamente com os erros aleatórios das replicatas) e o segundo termo (SQ_f) é chamado de soma quadrática da falta de ajuste (medida da discrepância entre a resposta estimada pelo modelo de regressão (\hat{y}_i) e a média das replicatas (\bar{y}_i) realizadas no conjunto de condições experimentais (Teófilo e Ferreira, 2006).

Sabe-se que cada fonte de variação está associada um número de graus de liberdade (nDF) (valores indicados na Tabela 5.1). Neste caso, a divisão da SQ de cada fonte de variação pelo seu respectivo número de graus de liberdade fornece a média quadrática (MQ). Assim, a razão entre a média quadrática de regressão (MQ_R) e a média quadrática dos resíduos (MQ_r), pode ser usada para comparar tais fontes de

variação através do teste F (*distribuição de Fisher*), levando em consideração seus respectivos nDF. Da mesma forma, pode ser feito para a razão entre a média quadrática da falta de ajuste (MQ_f) e a média quadrática do erro puro (MQ_{ep}).

Neste caso, como foi realizada a avaliação dos efeitos (ef) e coeficientes empregando o teste t (*distribuição de Student*), através do valor p (testes de hipótese e significância), o mesmo será feito para comparar as duas fontes de variação entre si, empregando-se neste caso o teste F , ou seja, $MQ_1/MQ_2 \approx F_{g1,g2}$, em que MQ_1 e MQ_2 são as médias quadráticas das fontes de variação 1 e 2, respectivamente, e $g1$, $g2$ são seus respectivos nDF (Teófilo e Ferreira, 2006).

O valor p representa a probabilidade de validade do erro envolvido no resultado observado, isto é, como representativo da população. Deste modo o resultado será significativo dentro de um intervalo de confiança ($p \leq \alpha$, sendo α o grau de significância, geralmente 0,05) para o número de graus de liberdade em questão.

Tabela 5.1. Análise de variância para regressão múltipla.

| Fonte de variação | Soma quadrática | Nº de graus de liberdade* | Média quadrática | F (<i>distribuição de Fisher</i>) |
|-------------------|-----------------|---------------------------|------------------|-------------------------------------|
| Total | SQ_T | $I - 1$ | | |
| Regressão | SQ_R | $n - 1$ | MQ_R | MQ_R/MQ_r |
| Resíduos | SQ_r | $I - n$ | MQ_r | |
| Falta de ajuste | SQ_f | $k - n$ | MQ_f | MQ_f/MQ_{ep} |
| Erro puro | SQ_{ep} | $I - k$ | MQ_{ep} | |

* n é o número de parâmetros (coeficientes) do modelo; I é o número total de observações (ensaios); k é o número de níveis do planejamento.

Por fim, quando se quer otimizar um sistema em estudo (planejamentos fatoriais) pode-se utilizar a metodologia de superfície de resposta (RSM – *Response surface methodology*) (Box e Wilson, 1951). Isso porque, ela se baseia na construção de modelos matemáticos empíricos, geralmente empregando funções polinomiais lineares ou quadráticas, que descrevam o sistema estudado e, conseqüentemente, dão

condições de explorá-lo (modelar e deslocar) até sua otimização. Essa exploração ou deslocamento se dá ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada (Barros Neto et al., 2002).

5.7. Ferramentas estatísticas usuais aplicadas

5.7.1. Cálculo de médias e desvios-padrão

Para cálculo dos modelos de regressão entre os dados experimentais e análises sensoriais (capítulos 8 e 10) o vetor de resposta y utilizado foi construído a partir da média das notas indicadas pelos diferentes provadores aos 6 atributos sensoriais estudados nesta tese. A equação 5.28 descreve como é feito o cálculo das médias.

Cada amostra de café utilizada na tese foi analisada em triplicata pelas técnicas analíticas descritas no capítulo 4. Deste modo, os modelos de regressão previram sempre 3 notas para cada amostra, por isso o desvio padrão (s) existente entre essas notas previstas para uma mesma amostra foram calculados de acordo com a equação 5.33. Os desvios padrão entre as notas fornecidas pelos provadores também foram calculados.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^r (y_i - \bar{y})^2}{(r-1)}} \quad (5.33)$$

5.7.2. Teste t -pareado

Às vezes, quando comparamos métodos em química analítica, torna-se impossível de se obter replicatas de cada amostra ou alíquota em cada método, devido à quantidade limitada do material de teste ou tipo de medida analítico. Nestes casos, cada material de teste ou amostra pode ser analisada uma vez, separadamente por dois

métodos. Assim, não é possível calcular uma média ou desvio padrão para as análises se cada amostra analisada é diferente. Neste caso, o tipo de teste usado para tratar esse tipo de dado é conhecido como teste t pareado (Box e Wilson, 1951).

Cada amostra é analisada duas vezes (dois provadores), uma por cada método (cada provador). Antes de se calcular a média dos métodos um e dois, é necessário calcular a diferença entre eles para cada amostra, e utilizar o valor resultante para calcular a média das diferenças e o desvio padrão destas diferenças.

$$t = \frac{\bar{y}_d \sqrt{I}}{s} \quad (5.34)$$

onde \bar{y}_d é a média das diferenças mantendo os valores de sinal, s é o desvio padrão e I é o número de amostras.

Se o valor de t calculado for menor que o valor crítico de t tabelado com limite de confiança de 90 %, fica aceita a hipótese nula que não existe diferenças significativas entre os dois métodos ou provadores.

O Teste t pareado foi utilizado para calcular as diferenças entre as notas fornecidas por dois provadores a 58 amostras de café utilizadas na publicação Ribeiro et al. (2009).

Capítulo 6
Cafés comerciais
Resultados iniciais

Resumo

Neste capítulo, almejando um entendimento prévio sobre o potencial de duas técnicas analíticas distintas, e diferentes ferramentas quimiométricas que poderiam ser aplicadas posteriormente nos *Capítulos 7, 8, 9 e 10*, vinte e uma amostras de uma marca de café comercial brasileiro foram utilizadas. Essas amostras eram divididas em: (i) descafeinados com torra clara, (ii) torra média ou tradicional e (iii) torra extra-forte. As técnicas analíticas utilizadas foram a microextração em fase sólida acoplada a cromatografia gasosa (SPME-GC) e a espectroscopia por reflectância difusa no infravermelho médio com transformada de Fourier (DRIFTS). Assim, dois estudos quimiométricos foram gerados e em ambos, a PCA foi utilizada na separação dos cafés descafeinados das outras duas classes de amostras, além de análises discriminantes pelo método PLS-DA que classificaram estas outras amostras de acordo com o seu grau de torra (médio ou extra-forte). No caso dos dados espectroscópicos oito amostras externas foram previstas pelo modelo PLS-DA.

Os resultados espectroscópicos deste capítulo encontram-se publicados no *Journal of Food Quality*, 2009.

6.1. Introdução

Atualmente, a demanda por processos analíticos rápidos e baratos vem crescendo e com o alto nível de automação e capacidade de processamento de dados disponíveis a um analista hoje, o preparo de amostra tornou-se a etapa de maior demanda de tempo em um processo analítico, sendo, não raro, uma das maiores fontes de erros de uma determinação quantitativa.

Deste modo o preparo de amostras tornou-se uma das etapas mais importantes, fazendo-se necessário para a eliminação de interferentes, ou seja, limpeza (*clean-up*) da amostra e concentração de analitos, tornando a amostra compatível com o sistema analítico a ser empregado, e possibilitando a obtenção de menores limites de detecção. A microextração em fase sólida (SPME) (Pawliszyn, 1998), por exemplo, aparece como uma destas técnicas de preparo, e vem apresentando ótimos resultados em diversas áreas como análise de alimentos (Kataoka, 2000), tais como frutas (Carasek e Pawliszyn, 2006; Kim e Lee, 2004), café (Ribeiro et al., 2009; Risticovic et al., 2008), vinhos (Martinez-Uruñuela et al., 2004), vinagres (Durante et al., 2006), entre outros.

Por outro lado, devido ao crescimento da utilização de técnicas multivariadas de tratamento de dados, técnicas espectroscópicas, como por exemplo, o infravermelho e o raio-X, passaram a ser utilizadas na detecção e quantificação de inúmeros compostos em matrizes complexas, e assim foram ganhando espaços onde apenas técnicas da chamada química de via úmida eram empregadas (Yan-de et al., 2007; Siebielec et al., 2004; Pedro e Ferreira, 2005; Morgano et al., 2007; Liu et al., 2006). As medidas feitas na região do infravermelho, por exemplo, possibilitam o estudo de amostras que podem se encontrar na fase sólida, líquida ou gasosa. Na grande maioria das vezes, não requer grande preparo de amostra e dependendo da técnica utilizada para a análise, esta pode ser não destrutiva e relativamente rápida.

As informações relevantes sobre as duas técnicas analíticas utilizadas neste estudo encontram-se descritas nos itens 4.1 e 4.2 do capítulo 4 de metodologias analíticas.

6.1.1. Processamentos de cafés

6.1.1.1. Descafeinação

A cafeína é uma das substâncias psicoativas mais conhecidas no mundo. Durante as últimas cinco décadas, seu consumo mundial *per capita* dobrou, através do consumo de bebidas energéticas, principalmente do café. Por esse motivo, muitos trabalhos têm sido realizados sobre os efeitos fisiológicos desta substância, resultando até os dias de hoje na impossibilidade de se chegar a um consenso sobre seus efeitos positivos e negativos (Montella et al., 2007; Barker et al., 2007). Tal informação controversa acaba por acarretar num aumento do consumo de café descafeinado, muitas vezes por aconselhamento médico.

O processo de descafeinação é realizado nos grãos crus inteiros, antes do processo de torrefação. A maioria dos métodos de descafeinação existentes utiliza solventes orgânicos para extração da cafeína, tais como diclorometano, clorofórmio, álcool, acetato de etila, acetona e outros, sendo diclorometano e acetato de etila os mais utilizados no Brasil. Outros dois métodos também são conhecidos na extração deste alcalóide; a descafeinação com água e a descafeinação utilizando fluido super crítico (CO₂) (Clarke e Vitzthum, 2001).

Durante a extração da cafeína, a perda de outros componentes é muito provável. No entanto, embora existam vários estudos sobre a composição química do café integral, pouco se sabe sobre a composição do café descafeinado.

Em um trabalho encontrado na literatura, o processo de descafeinação com diclorometano ocasionou a modificação da composição química dos grãos. Nos resultados foi possível constatar a perda de sacarose e a diminuição nos teores de

ácidos clorogênicos, ficando pouco afetados os teores de lipídios e glicídios totais (Figura 6.1). Segundo esse trabalho ainda, o processo de extração da cafeína mostrou particularidades no que se refere às propriedades físico-químicas dos grãos. Tais modificações podem acarretar não somente em modificações nas características sensoriais da bebida, como também em termos fisiológicos (Toci et al., 2006).

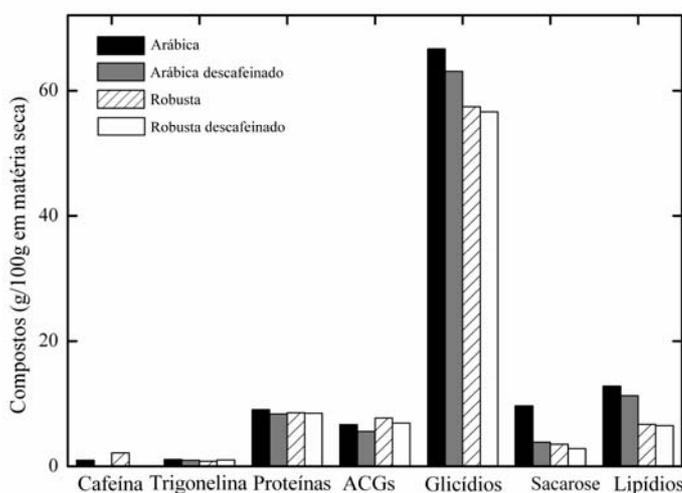


Figura 6.1. Concentrações médias dos principais compostos presentes nos cafés verdes das espécies arábica e robusta descafeinados ou não (g/100g de matéria seca).

6.1.1.2. Torrefação

A torrefação, seus processos e reações encontram-se descritos no *Apêndice A* desta tese.

6.2. Material e métodos

6.2.1. Amostras de cafés comerciais

Vinte e uma amostras de cafés comerciais torrados de uma mesma marca e de diferentes lotes foram adquiridas em estabelecimentos comerciais e analisadas por microextração em fase sólida acoplada a cromatografia gasosa (SPME-GC) e infravermelho médio por reflectância difusa (DRIFT). Essas amostras foram divididas

em descafeinadas e torra clara (**DC**), torra média ou tradicional (**TR**) e torra escura ou extra-forte (**EF**). Cada classe era composta por sete amostras. Oito novas amostras (cinco tradicionais e três extra-fortes) foram adquiridas para previsão externa do modelo PLS-DA feito com os dados espectroscópicos.

6.2.2. Microextração em fase sólida e cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (SPME-GC-FID)

As fibras de SPME comerciais e o *holder* manual, utilizadas para os experimentos, foram adquiridos da Supelco (Bellefonte, PA, EUA). Cada fibra era recoberta por: (i) poliacrilato (PA) com 85 μm de espessura ($V_f = 0,521 \text{ mm}^3$), (ii) polidimetilsiloxano /divinilbenzeno (PDMS/DBV) com 65 μm de espessura ($V_f = 0,357 \text{ mm}^3$), (iii) Carboxen/polidimetilsiloxano (CX/PDMS) 75 μm ($V_f = 0,436 \text{ mm}^3$) e (iv) Carbowax/divinilbenzeno 65 μm ($V_f = 0,357 \text{ mm}^3$). Antes do uso das mesmas, elas foram condicionadas em um cromatógrafo a gás por 12 horas a temperaturas que variavam entre 220 a 250° C de acordo com o tipo de recobrimento indicado no manual das fibras (T7941231, Supelco Co., Bellefonte, PA, EUA).

O modelo de cromatógrafo a gás utilizado para as análises dos voláteis das amostras de café foi um G-6850 series GC system (Agilent, Wilmington, DE), com detecção por ionização em chama (FID) e injetor *split/splitless*. A coluna cromatográfica utilizada foi uma HP-5 (5% difenilsiloxano e 95% dimetilsiloxano; 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 1 mL min⁻¹. O injetor foi equipado com um *liner* de diâmetro interno de 0,75 e mantido a 220° C no modo *splitless*. A temperatura do forno foi programada da seguinte maneira: 40 °C \rightarrow 7 °C / min \rightarrow 150 °C \rightarrow 30 °C / min \rightarrow 260°C. Sob essas condições, não foi observado efeito de memória nas corridas em branco entre as extrações.

6.2.3. Cromatografia gasosa com detector de massas (GC-MS)

A identificação dos analitos extraídos foi realizada em um cromatógrafo a gás modelo Saturn 2000 Ion Trap GC-MS (Varian, Walnut Creek – CA, USA) equipado com a mesma coluna e utilizando as mesmas condições do GC-FID. O tratamento dos dados obtidos pelo GC-MS foi realizado utilizando-se o software *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System* (AMDIS) v. 2.61 e o *Mass Spectral Search Program* v. 1.6d (NIST, Washington, DC, USA). Comparações também foram feitas com trabalhos encontrados na literatura sobre voláteis de café torrado identificados por espectrometria de massas (Zambonin et al., 2005; Ryan et al., 2004).

6.2.4. Condições experimentais para extração dos voláteis por SPME

Para os procedimentos de extração dos voláteis, 250 mg de café torrado e 2 mL de solução saturada de cloreto de sódio foram colocados em frascos de vidro de 5 mL com tampas perfuradas para adaptação de septos de silicone e, posteriormente, fechados e agitados com barras magnéticas a 900 rotações por minuto (rpm).

As condições experimentais utilizadas inicialmente para as extrações foram: 40 °C de temperatura do banho (*T*), 10 minutos de tempo de pré-equilíbrio (*TPE*) e 10 minutos de tempo de extração (*TE*).

6.2.5. Infravermelho médio por reflectância difusa (DRIFT)

Todos os espectros foram coletados em um espectrômetro modelo Nicolet 520 FT-IR equipado com um acessório de reflectância difusa modelo Jasco DR81, usando 256 varreduras na faixa de 4000 - 400 cm^{-1} , com 4 cm^{-1} de resolução e 64 interferogramas co-adicionados antes da transformada de Fourier. KBr anidro foi utilizado como branco. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para o procedimento de medida dos espectros, uma pequena quantidade de cada amostra de café comercial era triturada com a ajuda de um almofariz e então colocada

na cela de análise com quatro cavidades de volume interno de aproximadamente 0,20 cm³. Na primeira cavidade era colocado o KBr e nas outras três eram colocadas diferentes porções de cada amostra de café. Deste modo, era obtido um espectro para cada uma das três diferentes porções (análise em triplicata).

6.2.6. Análises quimiométricas

Os dados cromatográficos foram alinhados utilizando o algoritmo COW (Nielsen et al., 1998). Após o alinhamento os dados foram normalizados por unidade de comprimento e auto-escalados (Savitzky e Golay, 1964).

Três pré-tratamentos foram aplicados aos dados espectroscópicos. Para reduzir as variações aleatórias (ruído experimental) foi realizado um alisamento, segundo Savitzky-Golay, com janela tamanho 10 (Savitzky e Golay, 1964). As variações sistemáticas foram reduzidas utilizando a correção multiplicativa de sinal (MSC) (Isaksson e Naes, 1988) e por último os dados foram centrados na média.

A PCA foi aplicada como método exploratório dos dados e a PLS-DA como método de classificação.

A seleção das variáveis para as análises exploratórias foi visual e para a construção dos modelos de classificação foi realizada utilizando-se o algoritmo OPS (Teófilo et al., 2009).

6.3. Resultados e discussão

6.3.1. Dados cromatográficos

6.3.1.1. Escolha das fibras de SPME

Inicialmente, para conduzirmos o processo de extração dos voláteis das amostras de café utilizadas neste estudo, tornou-se necessário testarmos diferentes fibras existentes no mercado a fim de sabermos qual delas se comportaria melhor no

processo de extração, nos fornecendo assim respostas mais pertinentes. Deste modo a fibra de poliacrilato (PA) e as fibras mistas de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (DMS/DVB), carboxen/polidimetilsiloxano (CX/PDMS) e carbowax/divinilbenzeno (CW/DVB) foram testadas (Figura 6.2).

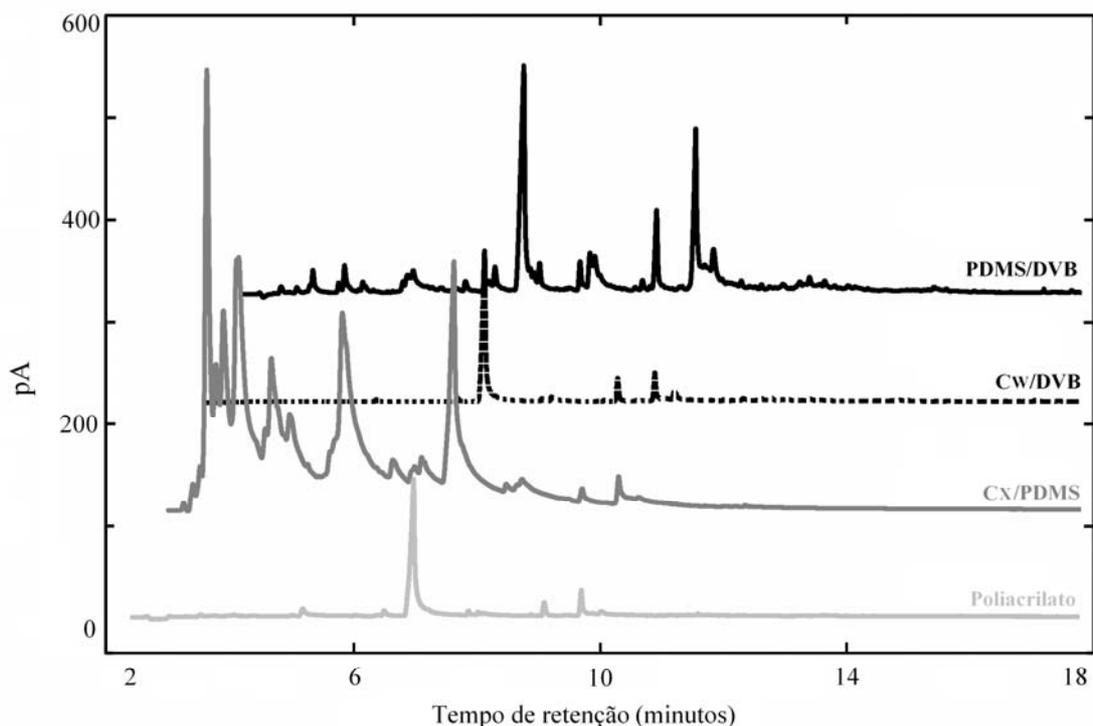


Figura 6.2. Cromatogramas de voláteis de café torrado obtidos nas mesmas condições com diferentes fibras de SPME.

A Figura 6.2 demonstra claramente que a fibra recoberta com CX/PDMS apresenta a maior adsorção dos compostos voláteis de baixo peso molecular (pouco retidos), porém, a fibra de PDMS/DVB adsorve uma maior variedade compostos voláteis. Trabalhos anteriores utilizando SPME já indicavam essa duas fibras como as mais apropriadas para extração de compostos voláteis de café (Bicchi et al., 1997; Bicchi et al., 2002; Zambonin et al., 2005). Atualmente, já se encontra disponível no mercado uma fibra mista de PDMS/DVB/CX.

Deste modo, estas duas fibras mistas foram utilizadas nos experimentos de extração das amostras comerciais e posteriormente, através das análises quimiométricas poderíamos saber qual delas apresentaria uma melhor reprodutibilidade e separação entre as classes de café estudadas.

6.3.1.2. Compostos identificados por espectrometria de massas

Os principais compostos voláteis extraídos do *headspace* das amostras de café utilizando as duas fibras de SPME foram detectados por análises de GC-MS e identificados por comparação de suas fragmentações com os bancos de dados do NIST e algumas publicações recentes referenciais desta área (Zambonin et al., 2005; Ryan et al., 2004; Yeretizian et al., 2003). Este procedimento foi capaz de extrair e detectar um grande número de compostos, e mais de 50 deles foram identificados. Pirazinas, furanos, pirróis e seus derivados foram alguns dos compostos encontrados no *headspace*. A Tabela 6.1 apresenta os principais compostos detectados e identificados pela análise de GC-MS.

Tabela 6.1. Principais compostos identificados por espectrometria de massas nas análises cromatográficas dos cafés comerciais.

| Picos | Tempo de retenção (minutos) | Compostos identificados ^a | Principais <i>m/z</i> íons observados nos espectros MS ^b |
|-------|--------------------------------|--------------------------------------|--|
| 1 | 2,90 | 2-Pentanona | 43(B) |
| 2 | 3,25 | Metilpropanal | 43(B), 72 |
| 3 | 3,45 | 3-Metil -1-butenol | 43(B), 72 |
| 4 | 3,50 | 2-Metilfurano | 82(B), 53 |
| 5 | 3,90 | 2-Metilbutanal | 41(B), 57, 29 |
| 6 | 4,00 | 2,3-pentadiona | 43(B), 57 |
| 7 | 4,45 | 2,6-Dimetilfurano | 96(B), 43, 45 |
| 8 | 4,50 | 2,4-Dimetilfurano | 96(B), 63, 53 |
| 9 | 4,95 | <i>N</i> -metilpirrol | 81(B), 53 |
| 10 | 5,10 | Pirazina | 80(B) |

Capítulo 6. Cafés comerciais

| | | | |
|----|-------|------------------------------|---------------|
| 11 | 5,90 | 1-Etilpirrol | 83(B), 98, 55 |
| 12 | 6,10 | 4-Metiltiazol | 71(B), 99, 45 |
| 13 | 6,30 | 2- Pirrol carboxaldeído | 95(B) |
| 14 | 6,45 | Furfural | 96(B) |
| 15 | 7,10 | 2-Furanmetanol | 81(B), 98 |
| 16 | 7,80 | Formato de furfurila | 81(B), 126 |
| 17 | 8,00 | Acetilfurano | 95(B), 110 |
| 18 | 8,10 | 2,5-Dimetilpirazina | 108(B), 42 |
| 19 | 8,15 | Etilpirazina | 107(B) |
| 20 | 9,05 | 5-Metil-2-furancarboxaldeído | 110(B), 53 |
| 21 | 9,55 | 3-Acetil-1-metilpirrol | 108(B), 123 |
| 22 | 9,70 | Acetato de 2-Furanmetanol | 81(B), 140 |
| 23 | 9,80 | 2-Etil-5-metilpirazina | 121(B) |
| 24 | 9,90 | 2-Furanmetanotiol | 81(B), 53 |
| 25 | 10,00 | Trimetilpirazina | 122(B), 42 |
| 26 | 11,50 | 3-Etil-2,5-dimetilpirazina | 135(B) |
| 27 | 11,60 | 2-Furfurilfurano | 148(B), 91 |

a. *Match* de todos os compostos acima de 800.

b. B indica o pico base observado nos bancos de espectros de massas.

6.3.1.3. Análise de componentes principais (PCA)

Uma vez selecionadas as fibras que seriam utilizadas na extração dos voláteis, as vinte e uma amostras de café foram analisadas por HS-SPME-GC-FID. Os resultados (cromatogramas) originais foram organizados em formato de matrizes \mathbf{X} ($I \times J$). Uma das matrizes foi gerada pela fibra de CX/PDMS (63x10200) e outra para a fibra de PDMS/DVB (63x15000). A Figura 6.3 (A) e (B) apresentam os cromatogramas originais sobrepostos de todas as análises realizadas (21 amostras em triplicata – 63 cromatogramas) com as fibras de PDMS/DVB e CX/PDMS, respectivamente. É visível através destas figuras a necessidade de pré-processamentos, tais como, ajuste de linha de base e alinhamento dos picos cromatográficos, pois nas análises quimiométricas não serão utilizadas as áreas relativas de cada pico e sim o perfil cromatográfico como um todo. Já as Figuras 6.3 (C) e (D) mostram os cromatogramas

alinhados com o algoritmo COW e pré-tratados. Para o alinhamento, os cromatogramas foram divididos em 5 regiões a fim de diminuir o tempo computacional do algoritmo. O comprimento do segmento (N) e o parâmetro de distorção (s) usados em cada região foram 10 e 1, respectivamente. O vetor de referência usado foi o cromatograma com a melhor resolução dos picos.

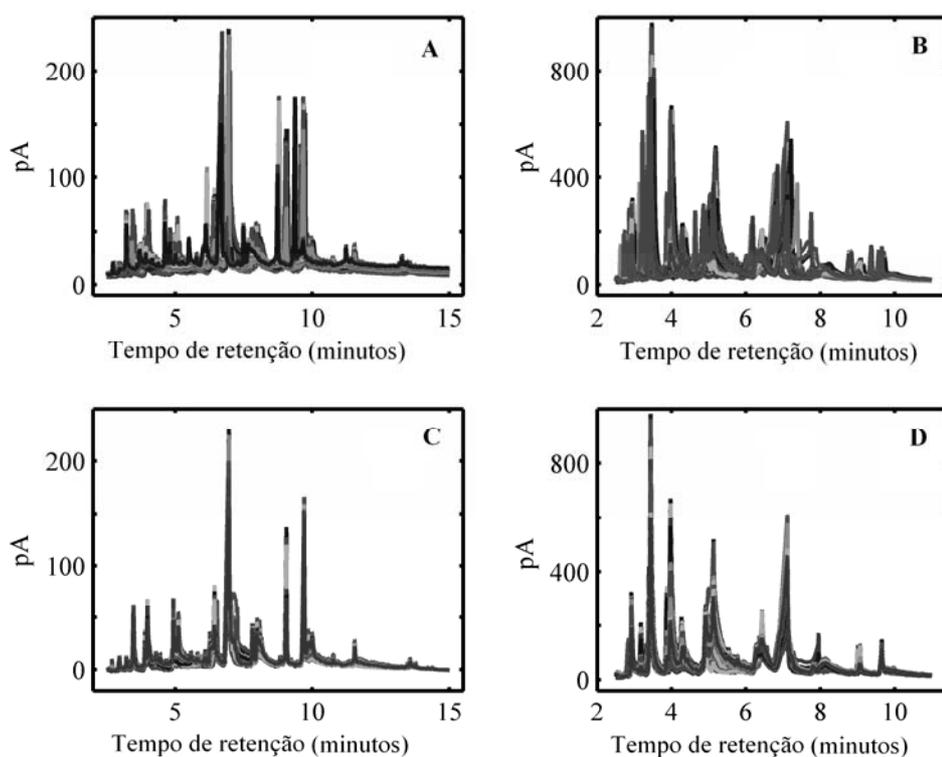


Figura 6.3. Cromatogramas originais sobrepostos obtidos pela fibra de PDMS/DVB (A) e CX/PDMS (B). Cromatogramas pré-tratados das fibras de PDMS/DVB (C) e CX/PDMS (D).

De maneira a encontrar quais picos cromatográficos poderiam ser responsáveis pela discriminação das amostras de café descafeinado dos cafés convencionais (tradicional e extra-forte) para cada fibra, análises visuais dos cromatogramas pré-tratados e sobrepostos (X_p) foram realizadas, separadamente. Nessas análises alguns picos apresentaram grandes diferenças de concentração entre as classes de cafés que foram selecionados e uma PCA foi aplicada sobre cada grupo de picos selecionados

por fibra. Os conjuntos de picos selecionados para cada fibra estão indicados na Figura 6.4, onde o cromatograma médio de cafés descafeinados foi sobreposto ao cromatograma médio dos cafés tradicionais e extra-fortes. Os números sobre os picos estão de acordo com a Tabela 6.1.

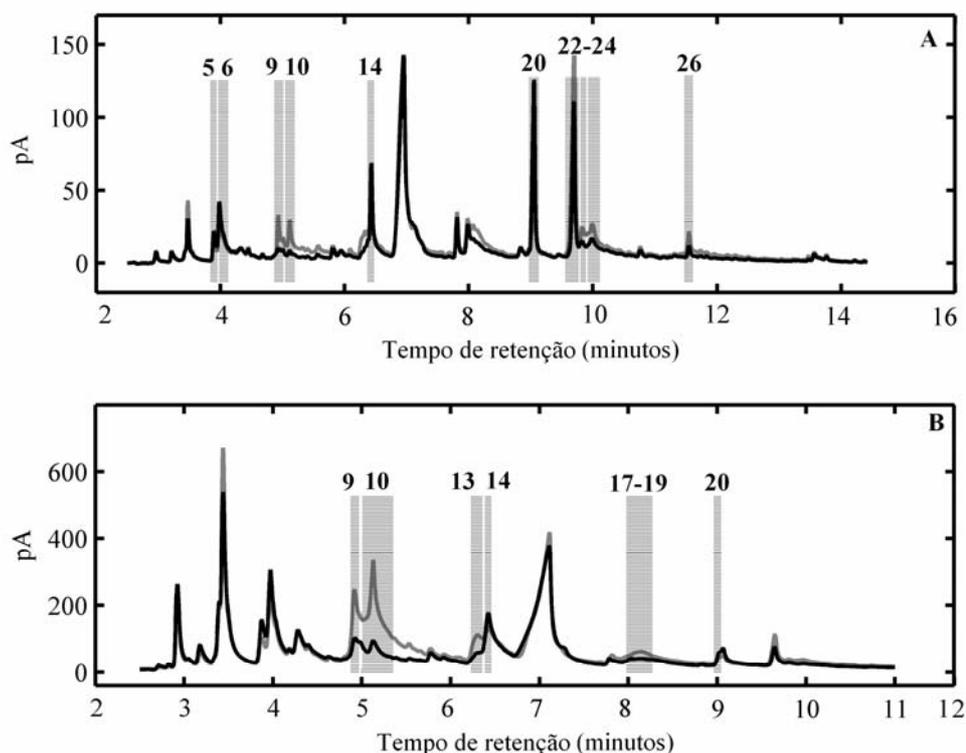


Figura 6.4. Picos selecionados nos cromatogramas médios obtidos com as fibras de PDMS/DVB (A) e CX/PDMS (B) para cafés descafeinados (—) e convencionais (—).

Os gráficos de escores representados na Figura 6.5 demonstram uma separação visual entre os cafés descafeinados e as outras duas classes para cada fibra utilizada. Em ambos os gráficos, os cafés descafeinados estão localizados a esquerda de PC1, apresentando escores negativos, bem separados das outras duas classes localizadas a direita de PC1 com escores positivos. As primeiras componentes de ambas as análises descreveram 57,56 % e 77,94 % da informação original para as análises cromatográficas com as fibras de PDMS/DVB e CX/PDMS, respectivamente.

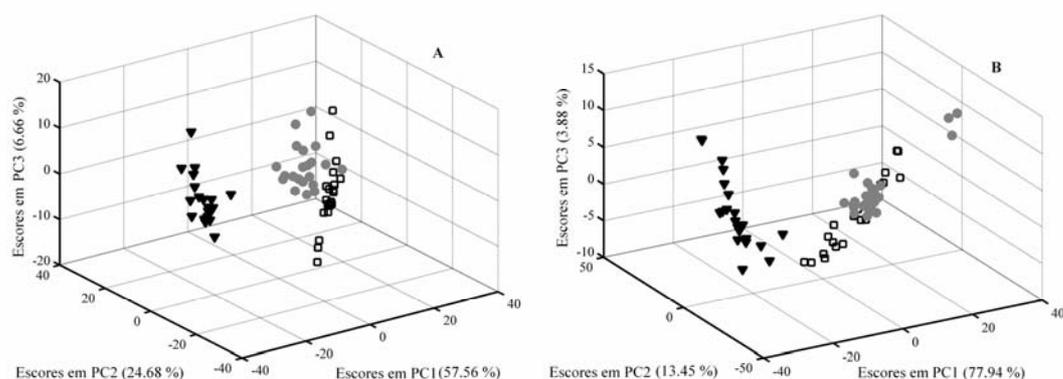


Figura 6.5. Gráficos dos escores obtidos nos PCAs realizados com as fibras de PDMS/DVB (A) e CX/PDMS (B) - Cafés descafeinados (▼), tradicionais (●) e extra-fortes (□).

Utilizando os dados referentes à fibra de PDMS/DVB, segundo os pesos em PC1 indicados na Figura 6.6 A, os compostos identificados como os responsáveis pela separação das classes foram: 2-metilbutanal (5), 2,3-pentanodiona (6), *N*-metilpirrol (9), pirazina (10), furfural (14), 5-metil-2-furancarboxaldeído (20), acetato de 2-furanmetanol (22), 2-metil-5-metilpirazina (23), 2-furanmetanetiolo (24) e 3-etil-2,5-dimetilpirazina (26). Os compostos 5, 6, 14 e 20 aparecem em maior concentração nos cafés descafeinados (pesos negativos). Os outros compostos aparecem em maior quantidade nos cafés de torra média e escura (pesos positivos).

Já para a fibra de CX/PDMS, os compostos voláteis identificados pelos pesos de PC1 (Figura 6.6 B) e considerados importantes para a separação das amostras de cafés foram: *N*-metilpirrol (9), pirazina (10), pirrol-2-carboxaldeído (13), furfural (14), acetilfurano (17), 2,5-dimetilpirazina (18), etilpirazina (19) and 5-metil-2-furancarboxaldeído (20). O furfural (14) e o 5-metil-2-furancarboxaldeído (20) são mais abundantes em cafés descafeinados (pesos negativos). Os outros compostos são mais abundantes nos cafés convencionais.

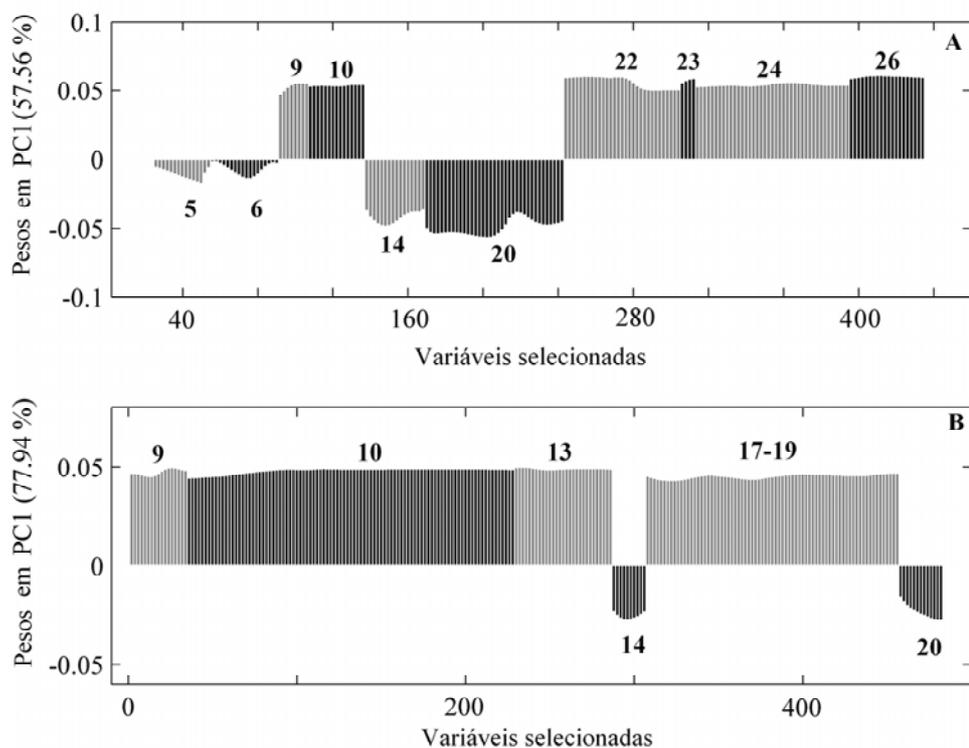


Figura 6.6. Pesos em PC1 dos compostos responsáveis pela discriminação dos cafés descafeinados - PDMS/DVB (A) e CX/PDMS (B).

Segundo Toci et al. (2006) o processo de descafeinação causa uma perda significativa de sacarose (Figura 6.1) e os principais produtos da pirólise desse produto são os furanos, pirróis, pirazinas e seus derivados. Os resultados cromatográficos, com ambas as fibras, confirmam que a concentração da maioria destes compostos formados é reduzida em amostras de café descafeinados. As Figuras 6.4 A e B apresentam a diferença de concentração destes compostos entre um cromatograma médio de cafés descafeinados e um cromatograma médio de cafés convencionais obtidos pelas fibras de PDMS/DVB e CX/PDMS, respectivamente.

6.3.1.4. Análise discriminante através da regressão por quadrados mínimos parciais (PLS-DA)

Para classificar as amostras de acordo com o grau de torra, uma PLS-DA foi realizada com os picos cromatográficos selecionados pelo método OPS para cada fibra de SPME (Figura 6.7). Para isso, os cafés descafeinados foram retirados da matriz de dados. O conjunto de dados restante foi separado em um conjunto de treinamento (10 amostras – 30 replicatas) e um conjunto de validação externa (4 amostras – 12 replicatas) (Kennard e Stone, 1969).

Os valores indicados para a matriz de variáveis dependentes (Y) foram 1 e 0, sendo, na primeira coluna, ($y = 1$) correspondente à classe dos cafés tradicionais e $y = 0$ à classe dos extra-fortes e na segunda coluna esses valores foram invertidos.

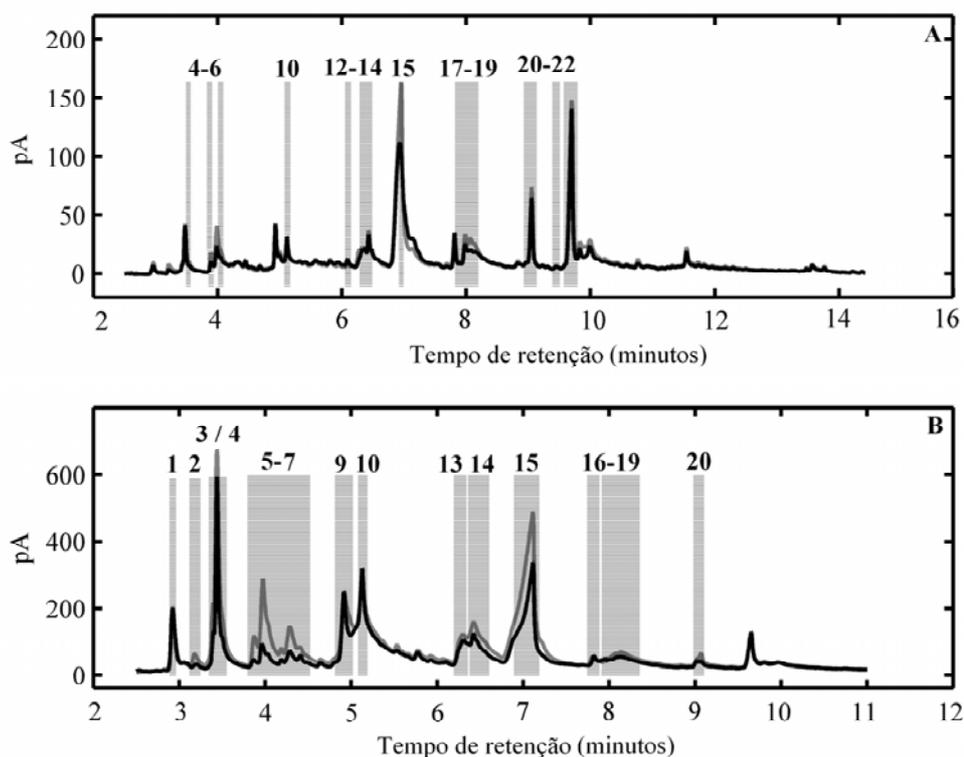


Figura 6.7. Picos selecionados nos cromatogramas médios obtidos com as fibras de PDMS/DVB (B) e CX/PDMS (D) para cafés tradicionais (—) e extra-fortes (—).

Usando três variáveis latentes em ambos os modelos, os parâmetros estatísticos indicaram baixos valores na raiz do erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV = 0,15 e 0,22) e coeficientes de correlação de validação cruzada elevados ($r_{cv} = 0,97$ e $0,97$) para os dados das fibras de PDMS/DVB e CX/PDMS, respectivamente. Todas as amostras do conjunto de treinamento e validação externa foram classificadas corretamente para a fibra de PDMS/DVB. Entretanto, uma amostra da validação externa com o uso da fibra de CX/PDMS foi classificada erroneamente. A Figura 6.8 A e B mostram os gráficos de escores entre as três primeiras variáveis latentes (VL) para ambos os modelos.

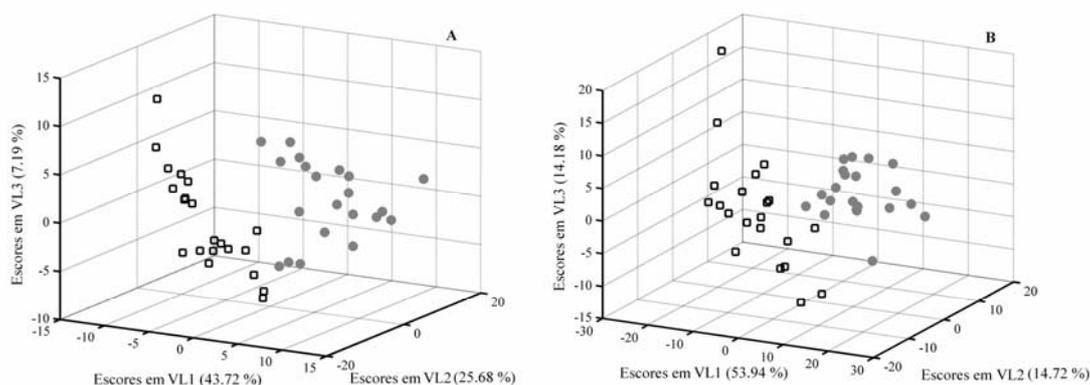


Figura 6.8. Gráficos dos escores obtidos a partir dos PLS-DAs realizados com a fibra de PDMS/DVB (A) e CX/PDMS (B) – Cafés tradicionais (●) e extra-fortes (□).

Para a fibra de PDMS/DVB, segundo os pesos em VL1 (Figura 6.9 A), os picos importantes na discriminação foram identificados como: 2-metilfurano (4), 2-metilbutanal (5), 2,3-pentadiona (6), pirazina (10), 4-metiltiazol (12), pirrol-2-carboxaldeido (13), furfural (14), 2-furanmetanol (15), acetilfurano (17), 2,5-dimetilpirazina (18), etilpirazina (19), 5-metil-2-furancarboxaldeido (20), 3-acetil-1-metilpirrol (21) e acetato de 2-furanmetanol (22). Apenas o 4-metiltiazol (12) aparece em maior quantidade nos cafés extra-forte (peso negativo).

Já os pesos em VL1 para a fibra de CX/PDMS (Figura 6.9 B) indicaram a 2-pentanona (1), metilpropanal (2), 3-metil-1-butenol (3), 2-metilfurano (4), 2-metilbutanal (5), 2,3-pentanona (6), 2,6-dimetilfurano (7), *N*-metilpirrol (9), pirazina (10), pirrol-2-carboxaldeído (13), furfural (14), 2-furanmetanol (15), Formato de furfurila (16), acetilfurano (17), 2,5-dimetilpirazina (18), etilpirazina (19) e 5-metil-2-furancarboxaldeído (20) como responsáveis pela discriminação do grau de torra. Nesse caso, apenas o 2-pentanona (1) aparece em maior quantidade nos cafés extra-fortes (peso negativo).

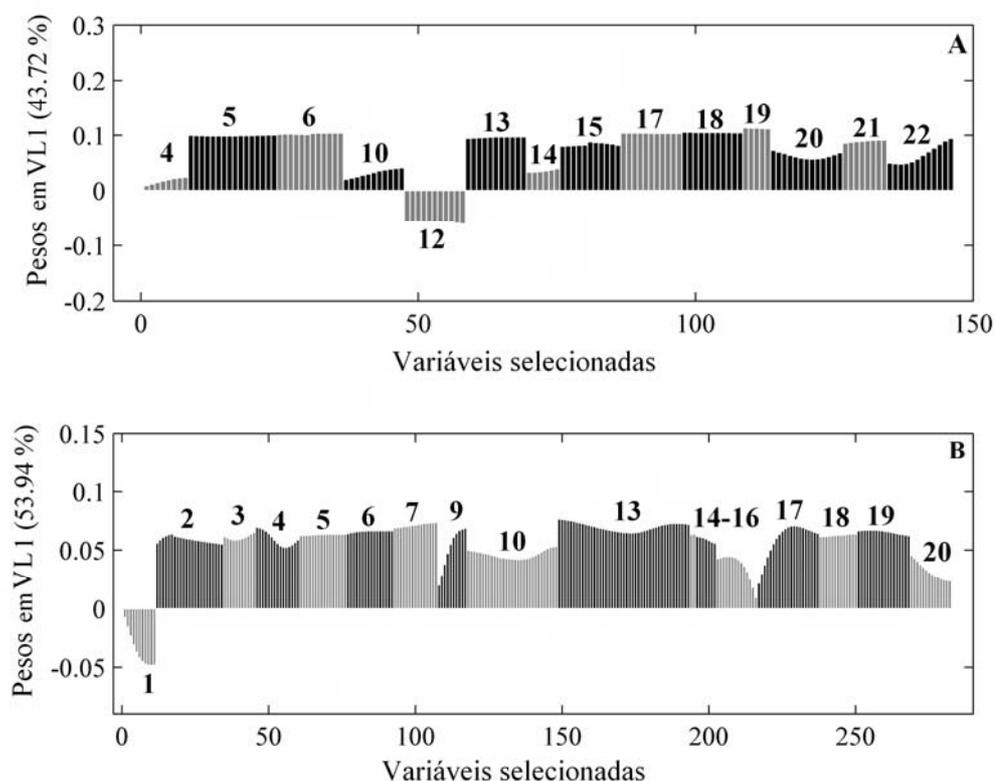


Figura 6.9. Pesos em VL1 dos compostos responsáveis pela discriminação dos cafés por grau de torra - PDMS/DVB (A) e CX/PDMS (B).

As Figuras 6.7 A e B apresentam a diferença de concentração dos compostos selecionados entre o cromatograma médio de cafés tradicionais e o cromatograma médio de cafés extra-forte obtidos pelas fibras de PDMS/DVB e CX/PDMS,

respectivamente. A concentração elevada da maioria dos compostos extraídos do café tradicional em relação às amostras de cafés extra-fortes pode ser explicada pela parede dos grãos. Todas as reações pirolíticas ocorrem dentro dos grãos e suas paredes funcionam como autoclaves sob alta pressão. Quando o processo de torra continua até a torra escura as paredes não suportam a pressão e “explodem” perdendo uma grande quantidade de voláteis para o ar.

Os resultados obtidos com as fibras de SPME foram muito similares, demonstrando que ambas as fibras poderiam ser usadas em análises de voláteis de café. Entretanto, a fibra de PDMS/DVB apresentou maior reprodutibilidade e tempo de vida comparada à fibra de CX/PDMS. Uma outra característica interessante da fibra de PDMS/DVB foi a maior capacidade de extração de diferentes compostos do aroma. Atualmente, uma fibra trifásica composta por CX/PDMS/DVB encontra-se disponível no mercado, porém, como o interesse desse trabalho não é extrair uma concentração elevada de certos compostos e sim uma variedade maior dos mesmos a fibra de PDMS/DVB foi escolhida para os estudos posteriores.

6.3.2. Dados espectroscópicos

6.3.2.1. Análise de componentes principais (PCA)

As mesmas amostras de cafés comerciais utilizadas nos estudos cromatográficos acima foram também analisadas por espectroscopia na região do infravermelho médio por reflectância difusa (DRIFTS).

Os espectros originais do conjunto de treinamento (21 amostras) foram organizados em uma matriz \mathbf{X} (63x1856). A fim de obter uma análise estatística correta e confiável esses espectros foram pré-tratados antes das análises quimiométricas (item 6.2.6). Porém, mesmo depois dos pré-tratamentos os espectros apresentavam regiões com alta variação dos sinais de origem instrumental (2380-2280

e $500-400\text{ cm}^{-1}$), então essas regiões foram excluídas dos dados originais, resultando em uma matriz \mathbf{X}_p (63×1772).

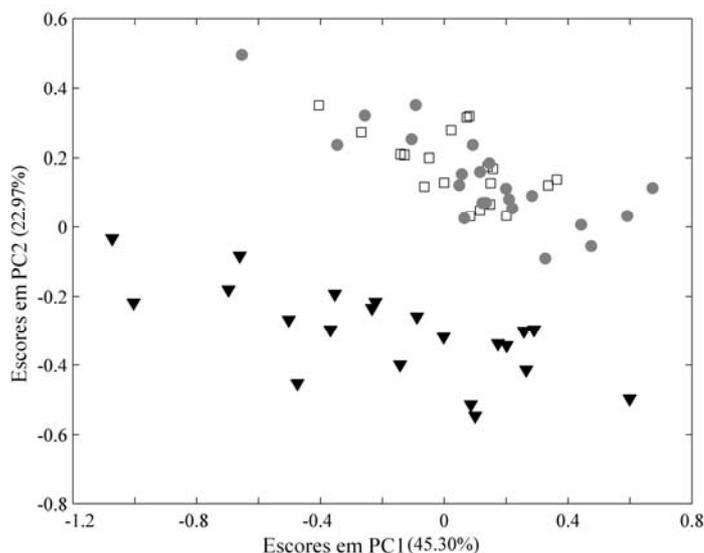


Figura 6.10. Gráficos dos escores de PC1xPC2 utilizando todos os comprimentos de onda dos espectros. Cafés descafeinados (\blacktriangledown), tradicionais (\bullet) e extra-fortes (\square).

Inicialmente, para uma visualização prévia dos dados no espaço multivariado, foi calculado um PCA com todas as 1772 variáveis dos espectros pré-tratados. Já nesta análise foi possível discriminar em PC2 o grupo dos descafeinados e o grupo dos tradicionais e extra-fortes (Figura 6.10). Assim, de maneira a descobrir quais bandas espectrais poderiam ser as principais responsáveis pela discriminação dos cafés descafeinados, uma seleção visual de variáveis foi utilizada. Então, de um conjunto inicial de 1772 variáveis 269 foram selecionadas e organizadas em 9 regiões espectrais, tornando assim mais fácil a visualização dos dados (Figura 6.11). As regiões indicadas na Figura 6.11 estão detalhadas na Tabela 6.2. Nessa tabela encontram-se ainda regiões importantes para a análise discriminante descrita no item 6.3.2.2 deste capítulo. Para tornar mais fácil o entendimento dos resultados, os números indicados na Figura 6.11 estão ordenados de acordo com a Tabela 6.2.

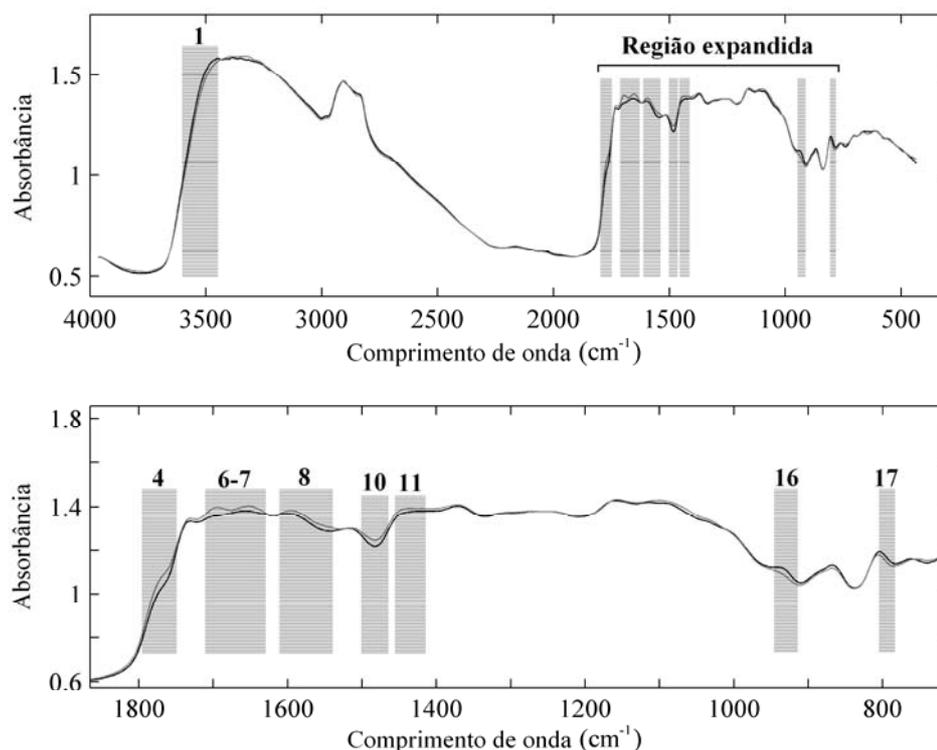


Figura 6.11. Regiões selecionadas no espectro de IV (A) e região expandida (B). Espectros médios de cafés descafeinados em preto (—) e convencionais em cinza (---).

Uma PCA foi aplicada às regiões selecionadas e o gráfico de PC1xPC2 (Figura 6.12) revelou os mesmos dois agrupamentos vistos anteriormente na Figura 6.10, porém, agora separados em PC1. O primeiro grupo era formado de cafés descafeinados localizados a direita de PC1 (escores positivos), enquanto o outro grupo correspondia aos cafés com torra média e escura, a esquerda de PC1 (escores negativos). PC1 explicou 66,57 % do total de variância dos dados selecionados.

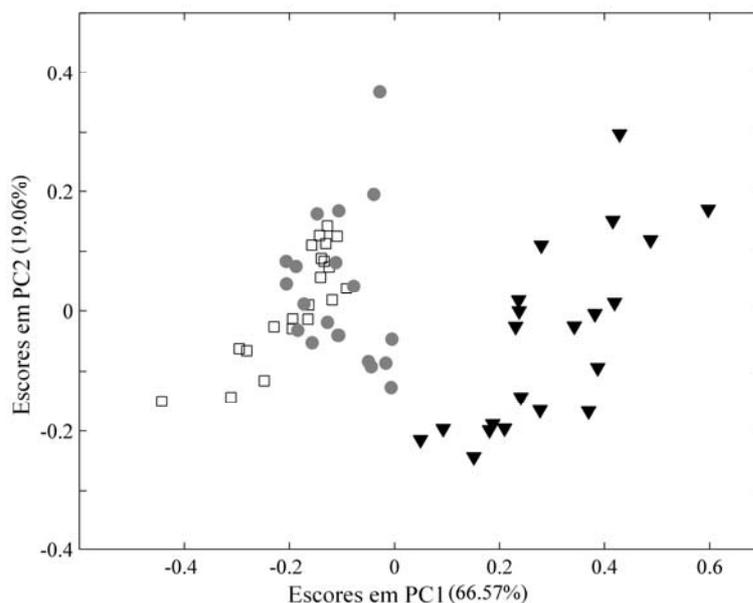


Figura 6.12. Gráficos dos escores de PC1xPC2. Cafés descafeinados (▼), tradicionais (●) e extra-fortes (□).

É visível através do gráfico de pesos de PC1 (Figura 6.13) que as regiões **1**, **16** e **17** possuem valores positivos e contribuem significativamente para a separação dos cafés descafeinados. Por outro lado, as amostras de café com torra média e escura são caracterizadas por maiores absorbâncias nas outras regiões (**4**, **6**, **7**, **8**, **10** e **11**) que possuem pesos negativos.

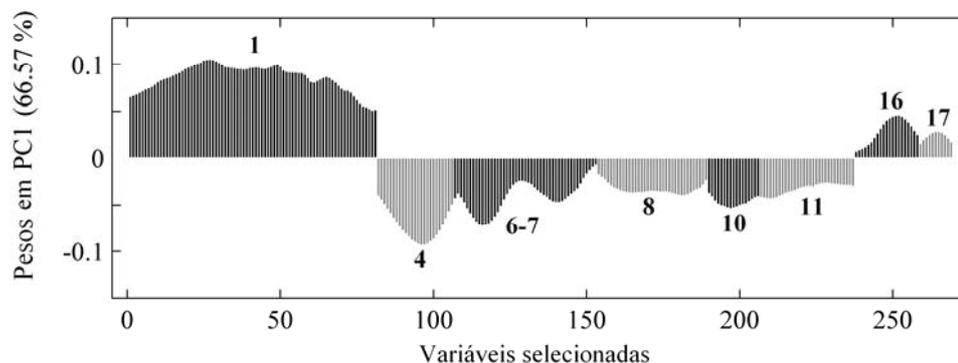


Figura 6.13. Gráfico de pesos de PC1 das variáveis selecionadas.

Tabela 6.2. Freqüências características de absorção de infravermelho médio atribuições para cada região selecionada visualmente para o PCA e pelo método OPS para o PLS-DA.

| Regiões selecionadas visualmente e pelo OPS | Faixas de comprimento de onda ^c (cm ⁻¹) | Modos vibracionais ^{d,e,f} |
|---|--|---|
| 1 ^{a,b} | 3600-3450 | O-H str. |
| 2 ^b | 3370-3350 | N-H str., NH ₃ ⁺ str., NH ₂ str. |
| 3 ^b | 3000-2820 | C-H str. |
| 4 ^{a,b} | 1795-1750 | C=O str. |
| 5 ^b | 1750-1720 | C=O str. |
| 6 ^{a,b} | 1710-1680 | C=O str. |
| 7 ^{a,b} | 1665-1630 | C=C str., C=N str., C=O str. |
| 8 ^a | 1610-1540 | NO ₂ str., NH ₃ ⁺ def., N=N str., C=O str. |
| 9 ^b | 1570-1500 | NH ₃ ⁺ def., N=O str., C=C str., N-H def. |
| 10 ^a | 1500-1465 | C=C str., N=O str., NH def. |
| 11 ^{a,b} | 1455-1415 | C-H def., S=O str. |
| 12 ^b | 1400-1380 | O-H str., C-H def., CH ₃ def. |
| 13 ^b | 1325-1295 | S=O str., C-H def., NO ₂ str. |
| 14 ^b | 1275-1260 | O-NO ₂ vib., ROR str. |
| 15 ^b | 1240-1170 | S=O str., C-N vib. |
| 16 ^a | 945-915 | C-H def. |
| 17 ^a | 804-784 | C-H def. |

a. Variáveis selecionadas visualmente; b. Variáveis selecionadas pelo método OPS; c. Valores de comprimento de onda retirados de Silverstein e Webster, 1998; Parikh, 1974; d. str.=Estiramento; e. def.= Deformação; f. vib = vibração.

A composição do café torrado é muito complexa. Presentes em grande quantidade carboidratos e polissacarídeos complexos são os maiores constituintes do café torrado. Por outro lado, simples açúcares encontrados em grãos verdes são em sua maioria destruídos durante a torra, e apenas pequenas quantidades de glicose e frutose são encontradas em cafés torrados. Os carboidratos exibem geralmente sinais característicos na chamada região da “impressão digital” (*fingerprint*) (900-1500cm⁻¹), e são provavelmente responsáveis pela maioria das bandas em espectros de café torrado. Outros compostos que se apresentam em grande quantidade são proteínas e lipídios. Cafés verdes, da espécie arábica, contêm de 14-18 % (w/w) de lipídios e

valores entre 1-2 % podem ocorrer depois da torra dos grãos. Lipídios em geral, exibem bandas características na região do grupo carbonila (C=O) com vibrações próximas de 1744 cm^{-1} , que podem ser identificadas em qualquer espectro (Kemsley et al., 1995).

A região espectral **1** é bem conhecida por estiramentos de ligações O-H (Silverstein e Webster, 1998). Nos espectros dos cafés esse estiramento pode ser caracterizado por umidade, carboidratos e açúcares livres. Maiores absorbâncias nesta região indicam elevados valores de umidade nas amostras descafeinadas. Isso pode ser explicado pela torra mais clara destas amostras.

As regiões **4, 6 e 7** exibem estiramentos característicos de grupos carbonila (C=O) (Silverstein e Webster, 1998). Proteínas, aminoácidos livres, lipídios, ácidos clorogênicos e alcalóides (cafeína e trigonelina) podem ser responsáveis pela absorvância nestas regiões. Sabendo que a maior modificação causada no grão pelo processo de descafeinação é a redução drástica de cafeína, as menores absorvâncias nesta região são altamente relacionadas com a concentração de alcalóides. Embora, de acordo com a literatura o processo de descafeinação extrai quantidades consideráveis de ácidos (Toci et al., 2006). Assim, a perda destes compostos também é o suficiente para diminuir o sinal nessas regiões.

De acordo com Kemsley et al. (1995), carboidratos são responsáveis pela absorvância nas regiões **10 e 11**. O peso positivo destas regiões indica que as concentrações de carboidratos nos cafés descafeinados, mesmo menos torrados, é menor que nos cafés não descafeinados. Isso confirma que o processo de extração de cafeína reduz a concentração de carboidratos e açúcares nos grãos (Toci et al., 2006).

6.3.2.2. Análise discriminante através de regressão por quadrados mínimos parciais (PLS-DA)

Uma análise discriminante usando o método PLS-DA foi também realizada com os dados espectroscópicos a fim de classificar as amostras a partir de seu grau de torrefação. Devido a isso, o modelo de calibração foi construído usando apenas as amostras de torra média e torra escura e 8 novas amostras (cinco tradicionais e três extra-fortes) foram utilizadas como conjunto de previsão externa.

Nesse caso, a mesma estratégia usada para a seleção de variáveis dos dados cromatográficos foi adotada (método OPS). Dessa combinação as variáveis com menor RMSECV e maior r_{vc} foram escolhidas. Assim, de 1856 variáveis iniciais, foram selecionadas 208, organizadas também em 13 regiões espectrais (Figura 6.14).

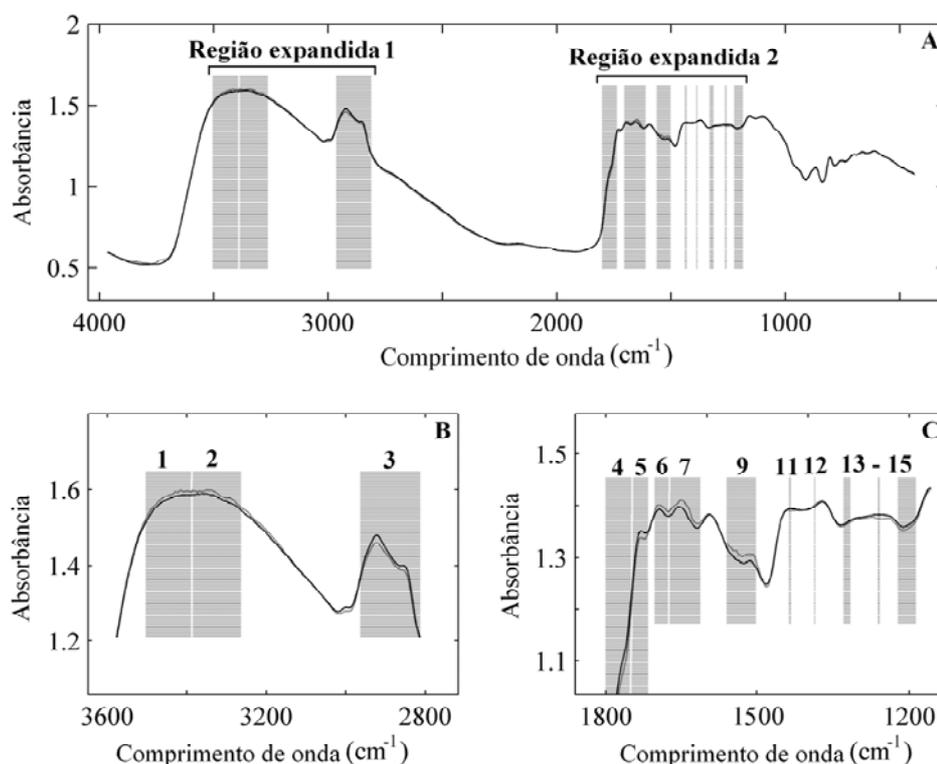


Figura 6.14. Regiões selecionadas pelo algoritmo OPS para separação e classificação dos cafés com diferentes graus de torra. Espectros médios dos cafés tradicionais (—) e extra-fortes (—).

A validação cruzada resultante do PLS-DA usando uma variável latente demonstrou $RMSECV = 0,17$ e $r_{vc} = 0,94$. O valor calculado para as faixas limites de cada classe foram 0,58 e 0,42 para tradicional e extra-forte, respectivamente. Nesse caso todas as amostras da validação cruzada e previsão foram classificadas corretamente. A Figura 6.15 mostra as amostras de previsão distribuídas entre os conjuntos de validação interna e externa através do gráfico de escores entre as 2 primeiras variáveis latentes. A primeira variável latente contém 43,81 % da variância dos dados selecionados e demonstra ótima separação entre os cafés de torra média e escura.

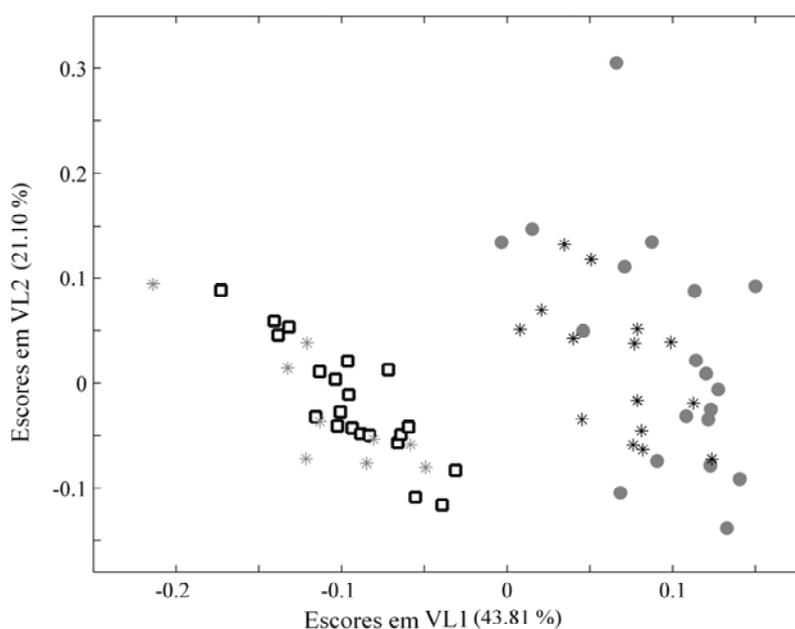


Figura 6.15. Gráfico das 2 primeiras variáveis latentes do PLS-DA. Amostras de validação dos cafés tradicionais (●) e extra-fortes (□). Amostras de previsão dos cafés tradicionais (*) e extra-fortes (*).

O gráfico de pesos em VL1 (Figura 6.16) indica que as regiões **1, 2, 6, 7, 9 e 12** possuem valores positivos e contribuem significativamente para a discriminação dos cafés de torra média. As outras regiões (**3, 4, 5, 11, 13, 14 e 15**) possuem pesos negativos e são importantes para os cafés extra-fortes.

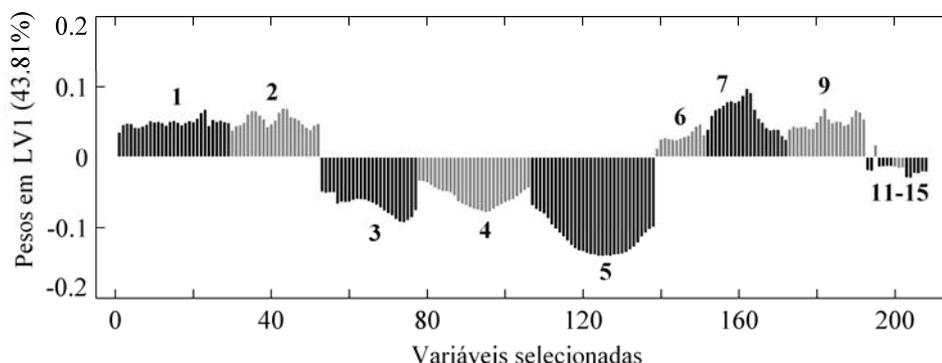


Figura 6.16. Pesos em VL1 das 10 regiões selecionadas pelo método OPS.

Como indicado anteriormente, a umidade é uma das principais razões para os sinais espectrais na região **1** entre $3600-3350\text{ cm}^{-1}$. Essa observação confirma que os cafés submetidos a torra escura contém teores menores de umidade.

De acordo com Toci et al. (2006) a degradação de lipídios, durante a torra, é muito baixa e sua porcentagem em relação a massa total do grão (M/M) aumenta com o aumento do grau de torra. A região **3** com pesos negativos e maior absorvância pode ser explicada por esse aumento relativo de lipídios.

A degradação de ácidos clorogênicos, em fenóis voláteis e não voláteis, a degradação das proteínas em aminoácidos, a degradação dos carboidratos em sacarose e outro açúcares e as reações pirolíticas, que ocorrem entre essas substâncias, são responsáveis pelas diferenças nas outras regiões espectrais. Entretanto, devido à complexidade da composição do café torrado não é possível concluir sobre as outras regiões selecionadas pelo algoritmo.

As regiões do espectro de infravermelho médio importantes para discriminação dos cafés por grau de torra estão também indicadas na Tabela 6.2.

6.4. Conclusões

6.4.1. Dados cromatográficos

Os resultados obtidos a partir das análises de PCA demonstraram que ambas as fibras se apresentaram muito bem para a discriminação das amostras de café descafeinados. No geral, os pesos de PC1 indicaram que a maioria dos picos cromatográficos que contribuíram para essa separação foram os mesmos em ambas as fibras. As pequenas diferenças ocorreram principalmente devido a natureza do material de recobrimento de cada uma delas.

Com os modelos de classificação (PLS-DA) para grau de torra, utilizando-se três variáveis latentes a fibra de PDMS/DVB classificou corretamente todas as amostras de validação interna e externa, enquanto que com a fibra de CX/PDMS um erro foi detectado na validação externa. Assim, devido à maior absorção de diferentes compostos e melhor reprodutibilidade, a fibra de PDMS/DVB foi escolhida para ser utilizada nos outros estudos desta tese.

6.4.2. Dados espectroscópicos

As regiões selecionadas para o PCA discriminaram muito bem as amostras descafeinadas e o modelo de classificação, construído com as variáveis selecionadas pelo OPS, acertou 100 % das amostras de validação externa e previsão.

Os resultados obtidos a partir dos dados espectroscópicos apresentaram resultados similares aos resultados cromatográficos. Deste modo, cabe ao analista químico decidir qual das duas metodologias instrumentais se apresenta melhor para os seus propósitos. Por exemplo, a reprodutibilidade do aparelho de infravermelho utilizado nestes experimentos não foi tão boa quanto à do cromatógrafo a gás. Embora os aparelhos mais modernos de IV já não apresentem mais este problema. Por outro lado, a rapidez da análise da técnica de IV frente à cromatografia é muito superior,

além da falta de necessidade de tratamentos prévios nas amostras antes das análises. Porém, as informações químicas, de matrizes complexas como o café, obtidas na cromatografia são mais diretas do que as obtidas por IV, pois a interpretação dos resultados espectroscópicos é mais complexa frente a identificação dos compostos analisados por cromatografia.

Capítulo 7

Planejamento e análise de experimentos

Resultados finais

Resumo

Neste capítulo a análise de componentes principais (PCA) foi utilizada na compactação das informações correlacionadas entre picos cromatográficos de voláteis de café arábica torrado. Posteriormente, a primeira componente principal foi empregada como resposta de um planejamento composto central (CCD) para otimizar as condições experimentais a fim de melhorar a extração simultânea de todos esses picos. A técnica de extração dos voláteis utilizada foi a microextração em fase sólida do *headspace* (HS-SPME) e a separação e detecção dos compostos foram feitas em um cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama (GC-FID).

Os resultados indicados neste capítulo encontram-se publicados em forma de resumo expandido na 22^o Conferência Internacional da Ciência do Café (ASIC).

Ribeiro, J. S.; Teófilo, R. F.; Augusto, F.; Ferreira, M. M. C. Simultaneous multiple response optimization of microextraction conditions using principal component analysis and response surface methodology to coffee volatile extraction, *Resumo expandido*. CD-ROM da 22^a ASIC – Campinas-SP, 2008.

7.1. Introdução

O perfil aromático pode ser descrito como um dos mais típicos medidores das qualidades organolépticas e autenticidade dos produtos alimentícios (Careri et al., 1994). Devido ao grande número de compostos voláteis presentes em um determinado produto, seu perfil aromático pode ser considerado como sua impressão digital (*fingerprint*) (Cuevas-Glory, et al., 2007).

Compostos voláteis estão presentes em elevadas quantidades em café torrado como misturas complexas de diferentes grupos funcionais. Provavelmente por isso, a utilização de voláteis de café torrado é altamente descrita na literatura em diferentes estudos de métodos analíticos e novos materiais extratores (Ishikawa et al., 2004; Bicchi et al., 2002; Mondello et al., 2004; Huang et al., 2007; Poliak et al., 2006).

A SPME vem se apresentando como uma excelente técnica de amostragem, que permite a extração e concentração simultâneas dos analitos de diferentes tipos de amostras. A otimização das condições experimentais utilizadas na SPME é uma das etapas mais importantes neste tipo de extração, isto porque os processos cinéticos e termodinâmicos presentes são governados por essas condições, tais como material de recobrimento da fibra, concentração do(s) analito(s), temperatura, tempo, força iônica do meio entre outras (Pawliszyn, 1998).

Do ponto de vista univariado, diversos esforços foram realizados a fim de estudar as condições experimentais para a extração de voláteis em alimentos por microextração em fase sólida (HS-SPME) (Roberts et al., 2000; Kataoka et al., 2000; Ho et al., 2006). Entretanto, na análise de voláteis de café torrado, em específico, certas variáveis experimentais variam de trabalho para trabalho (Zambonin et al., 2005; Akiyama et al., 2007; Agresti et al., 2008; Rocha et al., 2004; Akiyama et al., 2003).

Contudo, sabe-se hoje que otimizações de variáveis experimentais se tornam mais eficientes e precisas quando técnicas estatísticas multivariadas são empregadas

(Barros Neto et al., 2002; Teófilo e Ferreira, 2006; Box e Draper, 1987; Brereton, 2000). Para realizar esse procedimento, planejamentos experimentais e a metodologia de superfície de resposta (RSM), são os procedimentos empregados na maioria dos estudos de otimização (Mousavi et al., 2007; Moon e Li-Chan, 2004; Arambarri et al., 2004; Polo et al., 2007). Esses planejamentos são úteis na determinação simultânea dos efeitos de cada variável ou fatores e das interações entre as variáveis a fim de encontrar as melhores condições de trabalho com economia de experimentos (Teófilo e Ferreira, 2006; Brereton, 2000; Barros Neto et al., 2002; Polo et al., 2007).

Apesar de serem encontrados vários trabalhos na literatura, utilizando-se HS-SPME (Mousavi et al., 2007; Moon e Li-Chan, 2004; Polo et al., 2007; Martínez-Urunuela et al., 2004; Da Silva et al., 2007), as otimizações de condições experimentais de extração de voláteis de café são escassas e não utilizam planejamentos experimentais (Sanz et al., 2001; Roberts et al., 2000).

Um problema encontrado ao se aplicar os métodos de otimização em sistemas cromatográficos é o tipo de resposta obtida. Normalmente, existe o interesse em otimizar as condições de extração para mais de um pico cromatográfico. Entretanto, quando existe mais de duas variáveis dependentes (respostas) a análise dos resultados de uma RSM, por exemplo, são mais complicadas.

No caso do café torrado, alguns compostos voláteis aparecem em grandes ou pequenas quantidades no *headspace*, dependendo do grau de torra e da qualidade do grão. Assim, uma extração otimizada para cada composto seria difícil e complexa. Além disso, essa otimização não seria representativa, devido ao elevado número de compostos voláteis que o café torrado possui (mais de 900 compostos voláteis).

Assim, neste trabalho uma metodologia recente baseada na análise de componentes principais foi aplicada como estratégia no tratamento e otimização de múltiplas respostas (Figura 6.1).

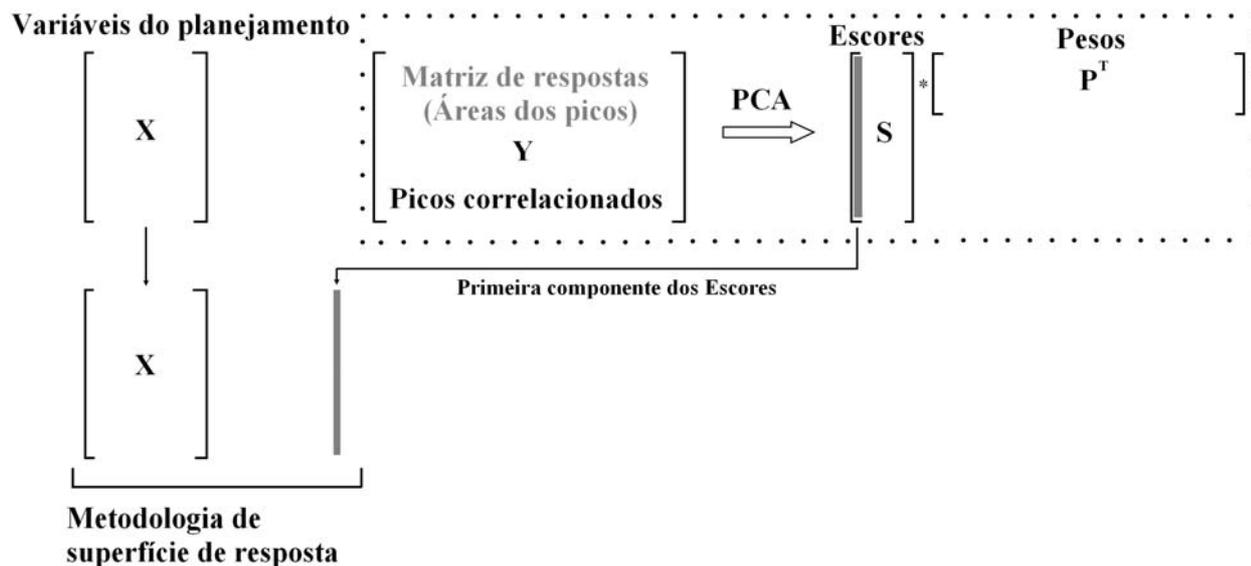


Figura 7.1. Representação esquemática da construção da superfície de resposta utilizando como variáveis do planejamento os escores de um PCA dos dados originais.

Esse procedimento foi apresentado pela primeira vez por Bratchell (1989) e posteriormente demonstrado em cinco diferentes exemplos por Carlson et al. (1992). As publicações de Sandstrom et al. (2001) e Ellekjaer et al. (1996) também descrevem este procedimento. Atualmente, a utilização de PCA é realizada em parâmetros de planejamentos Taguchi (Taguchi et al., 1989; Su e Tong, 1997; Antony, 2000; Fung et al., 2005; Liao, 2006). Segundo Fung et al. (2005) a metodologia que utiliza ambos o planejamento experimental e PCA é muito prática e eficiente para resolver problemas de múltiplas respostas. Entretanto, a aplicação desta estratégia ainda não é usada em otimizações de condições experimentais de análises cromatográficas e este trabalho irá explorar esta possibilidade.

Então, o objetivo deste capítulo foi aplicar a estratégia baseada na PCA e CCD para encontrar as melhores condições experimentais do sistema HS-SPME-GC-FID, a fim de otimizar a extração simultânea da maioria dos compostos voláteis de café arábica torrado pela fibra de PDMS/DVB.

7.2. Material e métodos

7.2.1. Amostra de café

Nesse estudo, uma amostra de café arábica foi utilizada. O processo de torra foi realizado em um torrador a gás (Pinhalense S/A Máquinas Agrícolas) até o grau médio de torra. O café torrado foi analisado imediatamente.

7.2.2. Microextração em fase sólida e cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (SMPE-GC-FID)

A extração dos voláteis foi realizada utilizando-se a técnica analítica de microextração em fase sólida. A fibra de SPME comercial recoberta com polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) com 65 μm de espessura ($V_f = 0,357 \text{ mm}^3$) e o *holder* manual foram adquiridos da Supelco (Bellefonte, PA, EUA). Antes do seu uso ela foi condicionada em um cromatógrafo a gás por 12 horas a temperatura de 240° C de acordo com o manual da fibra (T7941231, Supelco Co., Bellefonte, PA, EUA). Esta fibra mista foi escolhida devido aos ótimos resultados iniciais descritos no capítulo 6 desta tese.

No processo de separação dos voláteis foi utilizado um cromatógrafo a gás modelo G-6850 series GC system (Agilent, Wilmington, DE), com detecção por ionização em chama (FID) e injetor *split/splitless*. A coluna cromatográfica utilizada foi uma HP-5 (5 % difenilsiloxano e 95 % dimetilsiloxano; 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 1 mL min⁻¹. O injetor foi equipado com um *liner* de diâmetro interno de 0,75 e mantido a 220° C no modo *splitless*. A temperatura do forno foi programada da seguinte maneira: 40 °C → 5 °C / min → 150 °C → 30 °C / min → 260°C. Sob essas condições, não foi observado efeito de memória nas corridas em branco entre as extrações.

7.2.3. Condições experimentais para extração dos voláteis por SPME

Para os procedimentos de extração dos voláteis, 250 mg de café torrado e 2 mL de solução saturada de cloreto de sódio foram colocados em frascos de vidro de 5 mL com tampas perfuradas para adaptação de septos de silicone e, posteriormente, fechados e agitados com barras magnéticas a 900 rotações por minuto (rpm).

As condições experimentais utilizadas na extração foram determinadas pelo planejamento experimental aplicado neste estudo, ou seja, temperatura do banho (T) 42,5 °C, 10 minutos de tempo de pré-equilíbrio (TPE) e 22,5 minutos de tempo de extração (TE).

7.2.4. Planejamento experimental

7.2.4.1. Planejamento composto central e variáveis investigadas

Para otimizar a extração simultânea dos vários picos cromatográficos, foi utilizado um planejamento composto central (Barros Neto et al., 2002) com três variáveis escolhidas para executar a metodologia de superfície de resposta. O planejamento consistiu num total de 18 experimentos: 8 nos pontos fatoriais, 6 nos pontos axiais e 4 no ponto central. As variáveis independentes investigadas foram: o tempo de pré-equilíbrio (TPE), o tempo de extração (TE) e a temperatura do banho (T). Essas variáveis codificadas nos níveis -1 e +1 apresentam seus valores na Tabela 7.1.

Tabela 7.1. Variáveis, notação das variáveis e seus níveis no planejamento composto central.

| Variáveis | Notação das variáveis | Níveis | |
|-------------------------------|-----------------------|--------|----|
| | | -1 | +1 |
| Temperatura (°C) | T | 30 | 50 |
| Tempo de extração (min) | TE | 10 | 20 |
| Tempo de pré-equilíbrio (min) | TPE | 5 | 15 |

Esses limites foram selecionados com base em conhecimentos prévios do sistema em estudo. Todos os experimentos foram realizados em ordem aleatória a fim de minimizar os efeitos de fatores não controlados que poderiam introduzir medidas tendenciosas. A ordem dos experimentos e os valores das variáveis estão indicados na tabela 7.2.

Tabela 7.2. Experimentos realizados para o planejamento composto central 2^3 . Os níveis decodificados estão entre parênteses e os níveis codificados fora. A letra C indica experimentos no ponto central.

| Nº de ensaios | Ordem dos ensaios | T. pré-equilíbrio | | |
|---------------|-------------------|-------------------|--------------|-------------------|
| | | Temperatura (°C) | (min) | T. extração (min) |
| 1 | 5 | 50 (+1) | 5 (-1) | 10 (-1) |
| 2 | 9 | 23 (-1,682) | 10 (0) | 15 (0) |
| 3 | 16 (C) | 40 (0) | 10 (0) | 15 (0) |
| 4 | 6 | 50 (+1) | 5 (-1) | 20 (+1) |
| 5 | 4 | 30 (-1) | 15 (+1) | 20 (+1) |
| 6 | 10 | 57 (+1,682) | 10 (0) | 15 (0) |
| 7 | 15 (C) | 40 (0) | 10 (0) | 15 (0) |
| 8 | 13 | 40 (0) | 10 (0) | 6.5 (-1,682) |
| 9 | 3 | 30 (-1) | 15 (+1) | 10 (-1) |
| 10 | 12 | 40 (0) | 18 (+1,682) | 15 (0) |
| 11 | 17 (C) | 40 (0) | 10 (0) | 15 (0) |
| 12 | 14 | 40 (0) | 10 (0) | 23 (+1,682) |
| 13 | 7 | 50 (+1) | 15 (+1) | 10 (-1) |
| 14 | 11 | 40 (0) | 1.5 (-1,682) | 15 (0) |
| 15 | 18 (C) | 40 (0) | 10 (0) | 15 (0) |
| 16 | 2 | 30 (-1) | 5 (-1) | 20 (+1) |
| 17 | 8 | 50 (+1) | 15 (+1) | 20 (+1) |
| 18 | 1 | 30 (-1) | 5 (-1) | 10 (-1) |

O autoescalamento dos dados foi realizado utilizando o software Matlab 6.5 (The MathWorks, Co., Natick, MA, USA) e o pacote computacional PLS_Toolbox (Eigenvector Research, Inc. – PLS_Toolbox version 3.02.) (Wise et al., 2004).

A análise dos resultados foi feita através da metodologia de superfície de resposta, usando-se planilhas eletrônicas apresentadas por Teófilo e Ferreira (2006) e disponíveis no site <http://lqta.iqm.unicamp.br>. Os coeficientes dos modelos foram calculados por regressão linear múltipla e validados pela análise de variância (ANOVA).

7.2.4.2. Variáveis não investigadas nos experimentos

A técnica de HS-SPME é conhecida pela sua dependência por diferentes parâmetros (condições) experimentais que devem ser considerados num dado processo de extração. A adição de sal, o pH, a temperatura de extração, analitos em solução ou sólidos, a razão volume do *headspace*/volume do líquido e o tempo de equilíbrio são alguns desses parâmetros importantes para obter melhor eficiência na extração (Arthur e Pawliszyn, 1990; Pawliszyn, 1998).

Contudo, no planejamento aplicado neste capítulo, alguns desses parâmetros não foram incluídos. Assim, de acordo com estratégias de otimização realizadas por Da Silva et al. (2007), a utilização de solução aquosa saturada com sal é mais eficiente para extrações de compostos do *headspace*. Isso porque a água, neste caso, aparece como um aditivo muito eficiente para facilitar a liberação dos analitos da matriz para o *headspace* e juntamente com temperaturas elevadas de extração diminuem em muito a constante dielétrica dos compostos, melhorando a dissolução de analitos apolares. Por fim, a adição de eletrólitos fortes à amostra minimiza a solubilidade de compostos pouco polares, forçando-os a passar à fase de vapor e/ou à fibra (efeito *sauting-out*).

Já em relação ao volume da amostra e do *headspace*, por exemplo, segundo Pawliszyn (1998) quanto menor o volume do *headspace* melhor é a extração, porém, o tamanho da fibra se torna um impedimento. Deste modo, a melhor condição neste

caso, é manter o volume necessário para que a fibra fique fora da solução. O pH também foi outro parâmetro não incluído no planejamento.

7.3. Resultados e discussão

Em trabalhos recentes sobre compostos voláteis de impacto odorífero no café (Mayers e Grosch, 2001; Buffo e Cardelli-Freire, 2004), cerca de 25 compostos foram selecionados para reproduzir fielmente seu aroma. Já em um trabalho sobre qualidade (Ribeiro et al., 2009), 13 compostos voláteis foram descritos como possíveis indicadores de qualidade do café arábica. Esses compostos encontrados em ambas as pesquisas possuem diferente grupos funcionais, tamanho e polaridade. Isso mostra que, em análises cromatográficas de voláteis de café torrado, geralmente os compostos importantes encontram-se distribuídos por todo o cromatograma (em diferentes tempos de retenção) indicando que todas as regiões (de compostos leves e pesados) possuem a mesma importância.

Deste modo, as respostas iniciais obtidas nos 18 experimentos do planejamento foram as 57 maiores áreas de picos espalhados por todo o cromatograma de voláteis de cafés, extraídos por SPME (fibra de PDMS/DVB) e obtidas através de um sistema de cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG-FID). Esses 57 picos foram organizados em 42 regiões. Neste caso, cada região pode representar um único pico ou um grupo de picos. Esta organização foi necessária porque a separação cromatográfica de picos muito próximos não foi eficiente (coeluição), em algumas regiões do cromatograma (Figura 7.2). Por essa razão, a área de picos individuais ou de um grupo de picos (regiões) será chamada de área de pico nesse capítulo.

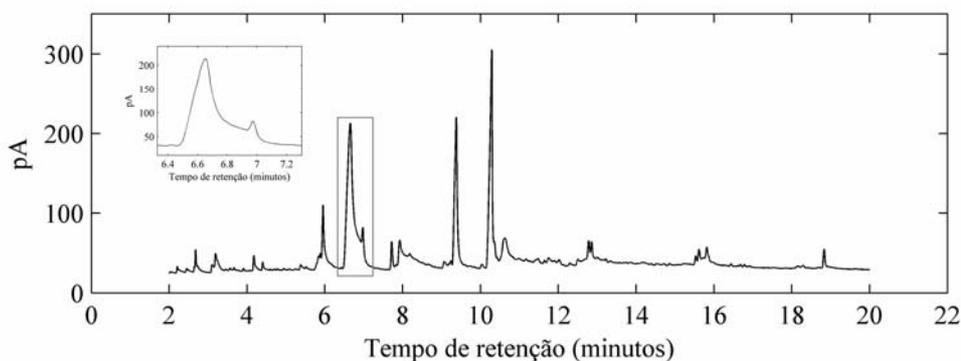


Figura 7.2. Exemplo de cromatograma obtido nas análises dos voláteis de café. A região expandida apresenta picos sobrepostos.

A base para esta otimização de múltiplas respostas, consiste em compactar a informação de maior variância entre os picos cromatográficos analisados, através de uma PCA, e usar a primeira componente principal como a resposta de um CCD.

Como o método PCA agrupa variáveis correlacionadas, é de se esperar que picos que apresentem respostas similares, independente das variações nas condições experimentais do sistema, sejam altamente correlacionados. Desse modo, quando calculamos a matriz de correlação das áreas dos picos, e a representamos graficamente na forma de um correlograma (Figura 7.3), foram observadas correlações diretas entre picos em 2 subgrupos (regiões em tons de vermelho da Figura 7.3). O primeiro subgrupo (*Subgrupo A*) era formado por 24 compostos (22 regiões), distribuídos do início da corrida cromatográfica, até 8 minutos de corrida, e o segundo subgrupo (*Subgrupo B*) formado por 33 compostos (20 regiões), entre 8 e 19 minutos de corrida cromatográfica.

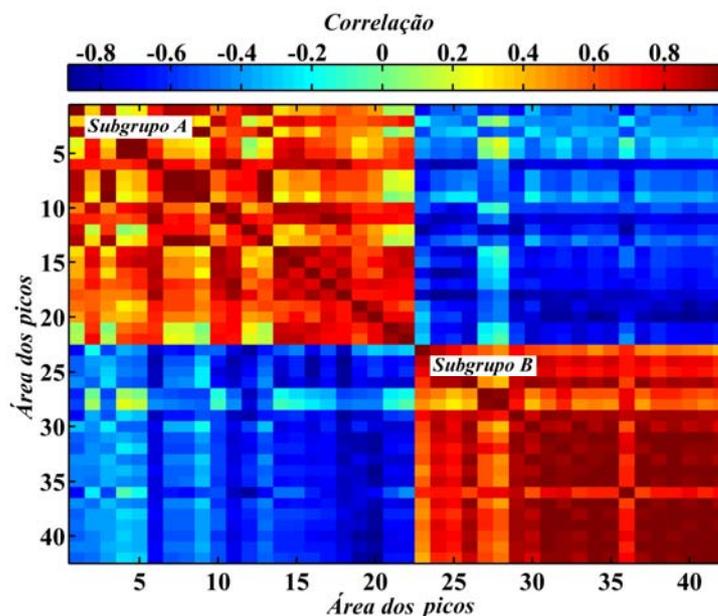


Figura 7.3. Correlograma entre as áreas (regiões) dos picos.

Entre as áreas dos *subgrupos A e B* foram observadas correlações negativas (regiões em tons de azul na Figura 7.3). Isso nos indica que as respostas fornecidas pelo *subgrupo A* trazem informações químicas diferentes ou opostas das respostas observada no outro subgrupo. Desse modo, a análise de múltiplas respostas, usando PCA, foi realizada separadamente para cada subgrupo de maneira a obter a maior variância explicada na primeira componente em ambos.

As primeiras componentes das PCAs calculadas para cada *subgrupo A e B*, com os dados autoescalados, explicaram 64,51 e 81,98 % da variância, respectivamente. A Tabela 7.3 apresenta a variância obtida nas 5 primeiras componentes de cada PCA.

Tabela 7.3. Porcentagem e variância capturada pelo PCA para os diferentes subgrupos.

| PC | Subgrupo A | | Subgrupo B | |
|----|-----------------------|-------|-----------------------|-------|
| | % Variância capturada | | % Variância capturada | |
| | Individual | Total | Individual | Total |
| 1 | 64,51 | 64,51 | 81,98 | 81,98 |
| 2 | 19,67 | 84,18 | 8,15 | 90,13 |
| 3 | 6,82 | 91,00 | 6,59 | 96,72 |
| 4 | 3,80 | 94,80 | 1,90 | 98,62 |
| 5 | 1,63 | 96,43 | 0,51 | 99,12 |

A correlação média entre as áreas dos picos e os escores de PC1 dos *subgrupos A e B* foram 0,80 ($\pm 0,10$) e 0,90 ($\pm 0,06$), respectivamente. Já a Figura 7.4 apresenta a correlação entre a soma das áreas dos picos dos subgrupos e os escores em PC1. Esses resultados justificam o uso dos escores da primeira componente como respostas representativas (Tabela 7.4).

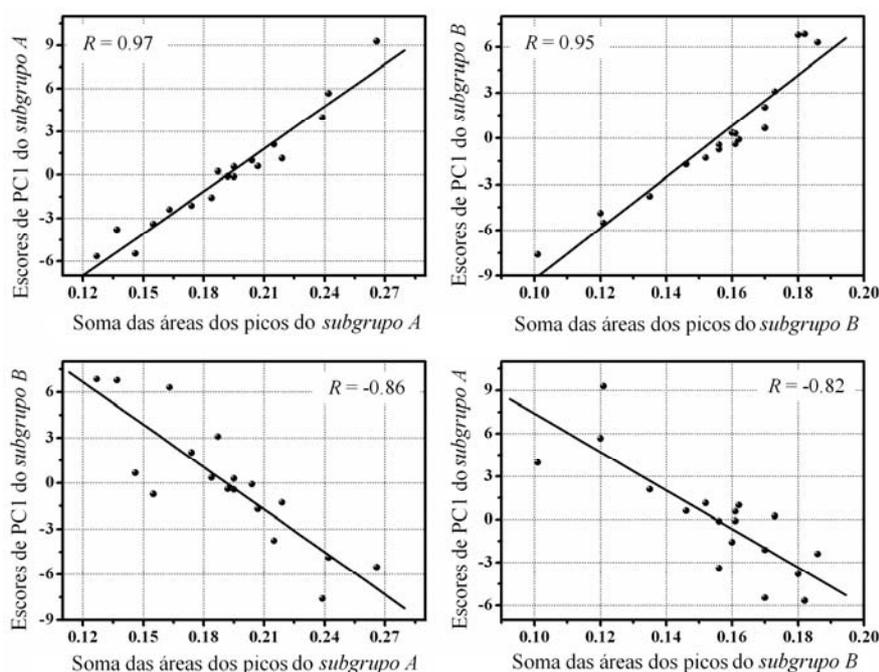


Figura 7.4. Correlação entre a soma das áreas dos picos dos subgrupos e os escores em PC1. Áreas dos picos do *subgrupo A* e os escores de PC1 do *subgrupo A* (A); áreas dos picos do *subgrupo B* e os escores de PC1 do *subgrupo B* (B); áreas dos picos do *subgrupo A* e os escores de PC1 do *subgrupo B* (C) e áreas dos picos do *subgrupo B* e os escores de PC1 do *subgrupo A* (D).

Tabela 7.4. Ensaios realizados e seus escores de PC1 de cada *subgrupo* usado como resposta nos planejamentos.

| Ensaio | Escore como respostas | |
|--------|-----------------------|------------|
| | Subgrupo A | Subgrupo B |
| 1 | 5,66 | -4,888 |
| 2 | 0,61 | -1,693 |
| 3 | 9,28 | -5,525 |
| 4 | 1,14 | -1,278 |
| 5 | -5,46 | 0,668 |
| 6 | -2,40 | 6,293 |
| 7 | -2,12 | 2,026 |
| 8 | -3,78 | 6,795 |
| 9 | 3,97 | -7,605 |
| 10 | -5,64 | 6,837 |
| 11 | -0,13 | -0,419 |
| 12 | -0,09 | -0,387 |
| 13 | 2,10 | -3,785 |
| 14 | 0,24 | 3,082 |
| 15 | 0,99 | -0,076 |
| 16 | -3,37 | -0,720 |
| 17 | -1,57 | 0,372 |
| 18 | 0,57 | 0,305 |

Tabela 7.5. Análise estatística dos modelos e coeficientes codificados para os *subgrupos A e B*.

| | Subgrupo A | | | | Subgrupo B | | | |
|-------------------|---------------|-------|---------------------|-------|-----------------------|-------|---------------------|----------------------|
| | Coefficientes | Erros | t (3) | P | Coefficientes | Erros | t (3) | p |
| Intercepto | 0 | 0,48 | 1×10^{-15} | 1 | $1,1 \times 10^{-15}$ | 0,12 | 9×10^{-15} | 1 |
| T | *-3,41 | 0,55 | 6,24 | 0,008 | * 3,91 | 0,14 | 28,88 | $9,1 \times 10^{-5}$ |
| TPE | 0,45 | 0,55 | 0,83 | 0,468 | 0,12 | 0,14 | 0,91 | 0,4285 |
| TE | -1,09 | 0,55 | 2,00 | 0,139 | * 2,15 | 0,14 | 15,88 | 0,0005 |
| T×TPE | -0,27 | 0,71 | 0,38 | 0,728 | 0,26 | 0,18 | 1,47 | 0,2381 |
| T×TE | 1,82 | 0,71 | 2,55 | 0,084 | 0,37 | 0,18 | 2,08 | 0,1287 |
| TPE×TE | -0,98 | 0,71 | 1,37 | 0,265 | 0,02 | 0,18 | 0,14 | 0,8982 |

*Coeficientes significativos usando 0,05 de nível de significância e 3 graus de liberdade para o teste *t* usando erro puro.

Para as análises estatísticas, dois modelos lineares independentes foram construídos. A Tabela 7.5 apresenta os coeficientes das variáveis para cada análise. Os coeficientes dos modelos foram calculados por regressão linear múltipla e validados pela análise de variância (ANOVA).

A ANOVA (Tabela 7.6) indicou que ambos os modelos de regressão foram significativos ($p < 0,05$) e a falta de ajuste não foi significativa ($p > 0,05$).

Tabela 7.6. ANOVA para os dois modelos lineares construídos.

| F. variação | Subgrupo A | | | | | Subgrupo B | | | | |
|---------------------|------------|----|-------|-------|--------|------------|----|-------|--------|--------------------|
| | SQ | GL | MQ | F | P | SQ | GL | MQ | F | p |
| Regressão | 212,94 | 9 | 35,49 | 13,78 | 0,0002 | 274,30 | 9 | 45,72 | 113,48 | 3×10^{-9} |
| Resíduos | 28,33 | 11 | 2,58 | | | 4,43 | 11 | 0,40 | | |
| F. de ajuste | 13,23 | 8 | 1,65 | 0,33 | 0,9074 | 3,84 | 8 | 0,48 | 1,49 | 0,41 |
| Erro puro | 15,08 | 3 | 5,03 | | | 0,96 | 3 | 0,32 | | |
| SQ total | 241,27 | 17 | | | | 278,73 | 17 | | | |
| R | 0,99 | | | | | 0,99 | | | | |

F. Variação. Fonte de variação; SQ. soma dos quadrados; GL. Graus de liberdade; MQ. média quadrática.

Segundo a Tabela 7.5 de coeficientes, o *subgrupo A* apresentou efeito linear, significativo e negativo, indicando que em baixas temperaturas uma grande quantidade de voláteis leves pode ser extraída. Por outro lado, o *subgrupo B* apresentou um efeito linear e positivo para a temperatura (T), sugerindo que a extração dos voláteis que representam este subgrupo é mais eficiente com o aumento da temperatura. Um outro efeito significativo do *subgrupo B* foi o efeito linear e positivo do tempo de extração (TE), indicando que o aumento do tempo de extração aumenta a extração de voláteis mais pesados.

Os resultados obtidos através das superfícies de resposta (Figura 7.5) indicaram para duas condições extremas e demonstraram como é possível deslocar o equilíbrio de sorção do sistema de SPME para melhor extração de compostos desejados.

Na primeira superfície de resposta (Figura 7.5 A), a melhor extração pode ser obtida em baixas temperaturas. Nesse caso, baixas temperaturas fazem com que os compostos pesados apareçam em menor concentração no *headspace* comparado com os compostos mais leves, assim, a extração de compostos mais leves é mais eficiente (rápida adsorção).

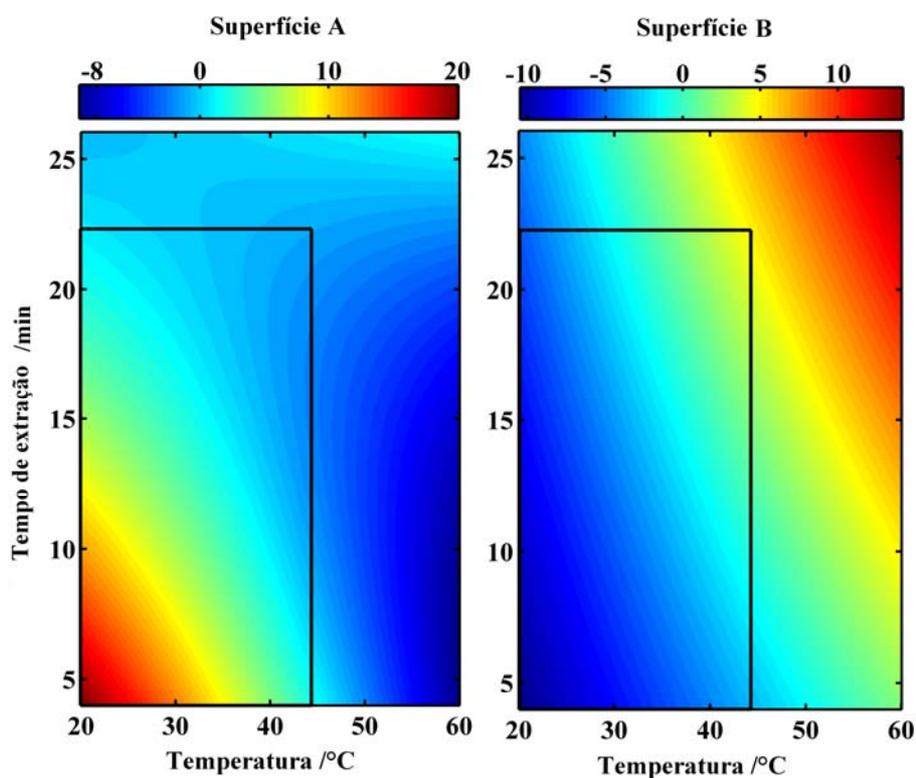


Figura 7.5. Superfícies de resposta obtidas com os escores do *subgrupo A* (A) e *subgrupo B* (B).

Já a superfície B (Figura 7.5 B) indica exatamente o contrário, ou seja, as respostas otimizadas para compostos pesados são obtidas em temperaturas e tempo de extração elevados. Essa superfície, formada basicamente por informações de compostos pesados, indica que em temperaturas elevadas os analitos podem se dissociar facilmente da matriz, deslocar o equilíbrio de sorção e se mover para o *headspace* para uma rápida extração pelo material de recobrimento da fibra. Entretanto, o coeficiente de distribuição recobrimento/amostra decresce com o

aumento da temperatura, resultando em uma diminuição na adsorção dos analitos pela fibra. Por essa razão, essa técnica de extração, geralmente, não utiliza temperaturas muito elevadas. Segundo Arthur e Pawliszyn (1990) e Kataoka (2000) uma melhor eficiência na extração de compostos pesados, sem um aumento significativo na temperatura, poderia ser compensado pela adição de uma solução saturada de sal e/ou um tempo maior de equilíbrio/extração.

Condizendo com as informações indicadas pelos autores citados no parágrafo anterior, o tempo de extração também apresentou efeito significativo na superfície B. De acordo com os resultados, tempos de extração elevados aumentam a sorção de compostos pesados à fibra. A extração dos compostos, em equilíbrio, através da fibra de PDMS/DVB pode ser descrita pela isoterma de adsorção de Langmuir. De acordo com essa isoterma a fibra de PDMS/DVB possui um número limitado de sítios ativos (poros) na superfície e conseqüentemente, o número de moléculas de analitos adsorvidos é diretamente proporcional ao número de sítios. Portanto, exceto para altas concentrações, a relação entre a quantidade de analitos adsorvido e a sua concentração a amostra é praticamente linear.

Devido ao fato da sorção ser um processo competitivo ao qual as moléculas com baixa afinidade pela fibra de SPME podem ser substituídas por outras de alta afinidade, um tempo de extração elevado faz com que as moléculas mais leves, rapidamente aderidas à fibra, possam ser gradualmente substituídas por moléculas mais pesadas com maior afinidade.

A Figura 7.6 mostra a diferença entre os cromatogramas obtidos utilizando-se as duas condições experimentais indicadas pelas duas superfícies. O cromatograma em linha contínua preta demonstra que baixas temperaturas são mais eficientes na extração de maiores concentrações de compostos leves (condição indicada pela superfície A). Já o cromatograma indicado em linha azul tracejada demonstra as

melhores condições indicadas pela superfície B, onde a extração de compostos mais pesados é aumentada.

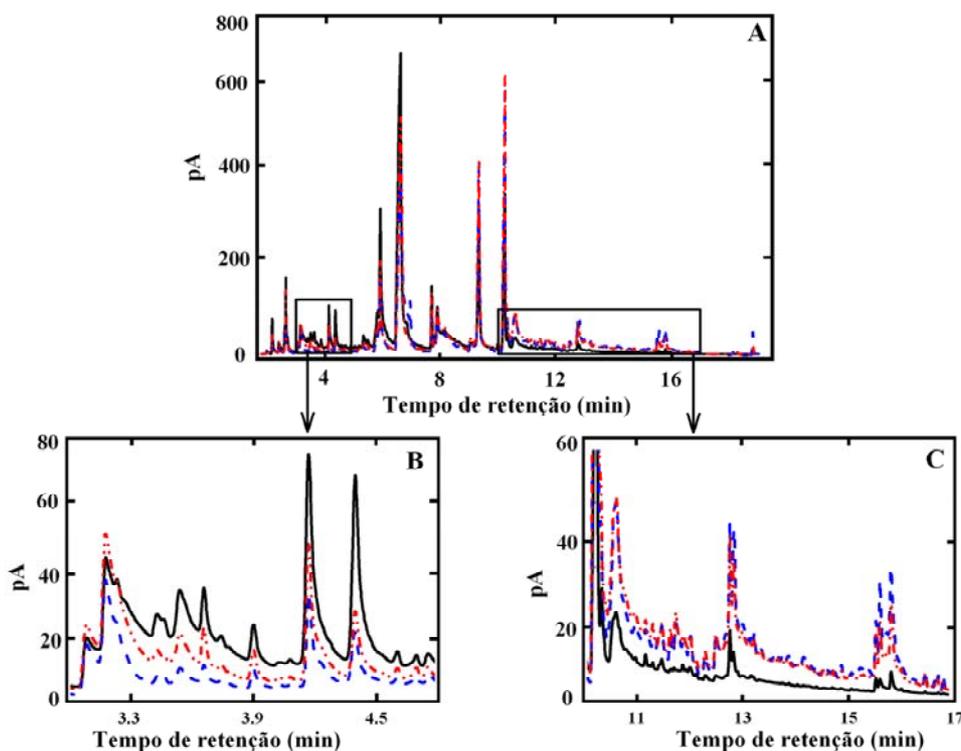


Figura 7.6. Cromatogramas obtidos em diferentes condições experimentais. Condições indicadas pela superfície A (—), condições indicadas pela superfície B(---) e condições escolhidas para os experimentos de extração dos capítulos 8 e 11 (-.-).

Porém, observando esses dois cromatogramas podemos ver que, em geral, a concentração de compostos leves extraídos pela fibra é maior comparada com a concentração dos compostos pesados que aparecem no final do cromatograma. Desse modo, pensando na importância de todos os compostos voláteis (leves e pesados), temperaturas e tempos de extração tendendo a valores mais elevados poderiam fazer com que a extração da maioria dos picos cromatográficos, leves e pesados, fosse satisfatória para o processo de extração dos voláteis de café. A concentração dos mais leves poderia diminuir um pouco, contudo, aumentar a extração dos picos mais

pesados seria vantajoso. Deste modo, a linha preta indicada nas superfícies (Figura 7.5) mostra a condição escolhida para a extração dos voláteis de café para os experimentos posteriores ($T = 42,5 \text{ }^\circ\text{C}$, $TE = 22,5 \text{ min}$). O cromatograma obtido na condição escolhida aparece como linha vermelha tracejada na Figura 6.6.

7.4. Conclusões

O uso do PCA na compressão de dados para construir superfícies de resposta foi de grande importância na otimização simultânea da extração de compostos voláteis de cafés arábica torrados. Utilizando essa estratégia de múltiplas respostas não houve a necessidade do uso de metodologias mais complexas. A alta correlação entre os picos cromatográficos fez com que as informações obtidas na primeira componente dos PCAs pudesse ser usada como resposta analítica.

A análise dos planejamentos CCDs indicou a importância da temperatura para a extração de diversos tipos de compostos. Devido ao equilíbrio de sorção do sistema, o tempo de extração se apresentou como outro importante parâmetro, principalmente para compostos mais pesados. A condição experimental escolhida, de acordo com as RSMs, para a extração dos voláteis de café para os experimentos posteriores realizados nos capítulos 8 e 9 foi $T = 42,5 \text{ }^\circ\text{C}$, $TE = 22,5 \text{ minutos}$ e $TPE = 10 \text{ minutos}$.

Os cromatogramas descritos no capítulo 6 foram obtidos antes da realização deste planejamento. Contudo, foram as observações sobre estes resultados iniciais que nos levaram a realização desta otimização.

Capítulo 8

Previsão de atributos sensoriais do café arábica utilizando SPME-GC-FID

Safra 2008/2009

Resultados finais

Resumo

Em um trabalho prévio realizado por Ribeiro et al. (2009) encontra-se descrita a construção de modelos de regressão para a previsão de quatro características sensoriais ligadas à qualidade do café (aroma, bebida, corpo e qualidade global) utilizando-se a metodologia analítica de HS-SPME-GC-FID e o método de regressão multivariada PLS. Os resultados deste trabalho demonstraram-se promissores, por isso tornou-se necessária a confirmação dos mesmos, levando em consideração algumas questões sugeridas no exame de qualificação realizado pelo aluno no dia 04/06/2008.

Dentre as questões sugeridas estão:

- Confirmação dos resultados dos modelos iniciais com novas amostras de outras safras;
- Utilização de um número maior de provadores;
- Previsão de outros atributos sensoriais, além dos 4 previstos inicialmente.

Assim, o objetivo deste capítulo foi estabelecer novos modelos de regressão para previsão de notas de 6 atributos sensoriais com base no perfil cromatográfico dos voláteis de café arábica torrado da safra 2007/2008. Cinquenta e três amostras de

cafés foram analisadas sensorialmente por diversos provadores usando uma escala de 1 a 5. A extração dos voláteis foi realizada novamente pela técnica de microextração em fase sólida (SPME) e os voláteis extraídos foram analisados por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (SPME-GC-FID). A regressão por quadrados mínimos parciais (PLS), o algoritmo de alinhamento COW e o método OPS, para a seleção de variáveis, foram as ferramentas empregadas na análise dos dados. As notas previstas pelos modelos gerados para acidez, amargor, aroma, bebida (sabor), corpo e qualidade global foram bastante concordantes com as das análises sensoriais e os parâmetros estatísticos calculados aqui foram melhores que os apresentados no trabalho publicado anteriormente (Ribeiro et al., 2009).

8.1. Introdução

A busca pela qualidade na indústria de alimentos está mostrando um crescimento constante nas últimas décadas, fruto de mudanças principalmente nas preferências dos consumidores. Assim, muitos deles estão dispostos a pagar mais por produtos que possuam alguns atributos desejados, que podem incluir características tangíveis ou intangíveis, invariavelmente com valor agregado. Paralelamente a essa necessidade, cresce o número de normas criadas por organismos internacionais para normatizar critérios de avaliação e padrões de identidade e qualidade de produtos em lançamento ou mesmo há tempos disponíveis no mercado.

Almejando a obtenção destes parâmetros tangíveis inúmeras tentativas têm sido realizadas para tornar a avaliação da bebida café objetiva tentando correlacionar a sua qualidade com características físico-químicas e composição química do grão verde ou torrado. Algumas destas pesquisas estão indicadas no capítulo 1. Entretanto, até os dias de hoje, nenhum processo químico ou físico-químico demonstrou resultados confiáveis para se medir objetivamente a qualidade deste produto. Talvez seja por isso que, no Brasil, a legislação vigente em 2009 determina que a avaliação da qualidade da bebida de café ainda seja realizada pela “prova de xícara”, descrita no capítulo 3 (portaria Nº 49 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 25/03/2008 - <http://www.agricultura.gov.br>).

Em se tratando do aroma do café, os esforços no sentido da determinação da qualidade deste produto começaram a aparecer recentemente (Sanz et al., 2002; Agresti et al., 2008; Toci e Farah, 2008), porém, ainda são raros os que tentam correlacionar o aroma com a qualidade final da bebida utilizando quimiometria (Bicchi et al., 1997; Ribeiro et al., 2009).

Assim, o objetivo central deste capítulo é a construção de modelos de regressão (PLS) para a previsão de diferentes atributos, ligados à qualidade dos cafés arábica brasileiros, a partir da correlação entre os compostos voláteis que compõem o aroma e análises sensoriais descritivas de diversas amostras de café com características distintas.

8.2. Material e métodos

8.2.1. Amostras de café da espécie arábica safra 2008/2009

Cinquenta e três amostras de café arábica cru de diferentes variedades foram fornecidas pelo Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Café "Alcides Carvalho" situado no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e por cooperativas associadas dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Devido à classificação brasileira dos grãos por tipo, os defeitos encontrados nas amostras foram mantidos.

8.2.2. Processo de torra

Para o processo de torrefação, 300 g de cada amostra de café arábica foram submetidos a torra média em um torrador a gás (Pinhalense S/A Máquinas Agrícolas). Os grãos torrados foram moídos em moinho elétrico, e para evitar a perda de constituintes voláteis, as amostras foram imediatamente armazenadas em embalagens metalizadas (alumínio) recobertas por camadas plásticas (polietileno e poliestireno), seladas (para evitar perda de compostos voláteis e contaminantes externos) e mantidas a baixas temperaturas (-5 °C) até sua análise cromatográfica. Todas as amostras torradas em um determinado dia eram analisadas nesse mesmo dia.

8.2.3. Análise sensorial

Das 53 amostras estudadas, dois diferentes lotes (30 e 10 amostras) contendo 300 g de café verde foram enviados para às empresas Café Toledo LTDA (Assessoria Técnica em Classificação e Degustação de Café) e Terra Forte Exportação e Importação de Café LTDA para a realização das análises sensoriais, respectivamente. As 13 amostras restantes já vieram provadas e analisadas pelos próprios provedores das cooperativas fornecedoras de café. Deste modo, os laudos de classificação foram fornecidos por diversos provedores treinados e experientes na atividade de degustar café (*cuppers*).

O preparo das amostras (torra e infusão) foi realizado utilizando-se a portaria Nº 49 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 25/03/2008 (<http://www.agricultura.gov.br>). A determinação do ponto de torra clara foi realizada por meio do Sistema *Agtron* (disco nº 75) e as infusões foram preparadas em xícara ou tigela pequena contendo 10 gramas de pó em 100 mL de água mineral quente ao ponto da primeira fervura.

Tabela 8.1. Tabela de atributos fornecidos aos provedores para a realização das análises sensoriais.

| Notas | Acidez | Amargor | Aroma | Corpo | Bebida | Q. global |
|-------|-----------------------------|-------------|----------------------------|----------------|-------------------|--------------|
| 1 | Baixa ou alta e indesejável | Forte | Muito Fraco ou indesejável | Fraco | Rio | Muito ruim |
| 1,5 | - | - | M. fraco/fraco | M. fraco/fraco | Rio/Riada | M. ruim/ruim |
| 2 | Alta/Baixa | Forte/reg. | Fraco | Fraco | Riada | Ruim |
| 2,5 | - | - | Fraco/reg. | Regular | Dura - | Ruim/reg. |
| 3 | Média | Regular | Regular | Regular | Dura | Regular |
| 3,5 | - | - | Reg./bom | Reg./bom | Dura + | Reg./bom |
| 4 | Méd./Alta | Reg./normal | Bom | Bom | Apenas mole | Bom |
| 4,5 | - | - | Bom/excel. | Bom/excel. | Mole | Bom/excel. |
| 5 | Alta | Normal | Excelente | Excelente | Estritamente mole | Excelente |

Os parâmetros analisados foram: acidez, amargor, aroma, bebida, corpo e qualidade global. Todas as notas atribuídas à cada parâmetro foram computadas, em escala de 1 a 5 de acordo com a magnitude da característica sensorial percebida, a partir da Tabela 8.1 fornecida como modelo para cada grupo de provadores. Estes parâmetros sensoriais estão descritos no capítulo 3 desta tese.

De acordo com a Tabela 8.1, a nota do atributo bebida, por exemplo, veio acompanhado de uma classificação convencional brasileira. Esta classificação vai de café estritamente mole (nota 5 – excelente bebida) até café rio/riada (nota 1-bebida ruim).

8.2.4. Microextração em fase sólida e cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (SPME-GC-FID)

Descrita no item 7.2.2 do capítulo 7.

8.2.5. Cromatografia gasosa com detector de massas (SPME-GC-MS)

A identificação dos analitos extraídos foi realizada em um cromatógrafo a gás modelo HP-5890 (Hewlett-Packard, Wilmington, DE, USA) equipado com detector de massas modelo HP-5973 e com a mesma coluna utilizada no GC-FID. Também foram utilizadas as mesmas condições empregadas no GC-FID. O tratamento dos dados obtidos pelo GC-MS foi realizado utilizando-se o software “*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*” (AMDIS) v. 2.61 e o “*Mass Spectral Search Program v. 1.6d*” (NIST, Washington, DC, USA). Comparações também foram feitas com trabalhos encontrados na literatura sobre voláteis de café torrado identificados por espectrometria de massas (Zambonin et al., 2005; Ryan et al., 2004; Ribeiro et al., 2009).

8.2.6. Condições experimentais para extração dos voláteis por SPME

As condições experimentais para extração dos voláteis por SPME estão descritas no item 7.2.3 do capítulo 7. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

8.2.7. Análises quimiométricas

Todos os dados obtidos através das análises cromatográficas foram transformados em matrizes \mathbf{X} (159x24701) na qual cada replicata foi utilizada como uma amostra. O processamento dos dados foi realizado utilizando o software Matlab 6.5 (The MathWorks, Co., Natick, MA, USA) e o pacote computacional PLS_Toolbox (Eigenvector Research, Inc. – PLS_Toolbox version 3.02.) (Wise et al., 2004).

Os dados cromatográficos foram alinhados utilizando o algoritmo COW (Nielsen et al., 1998). Após o alinhamento, os dados foram normalizados por unidade de comprimento, a 1ª derivada foi aplicada e os dados foram auto-escalados (Savitzky e Golay, 1964). A seleção inicial das variáveis para os modelos de regressão foi realizada utilizando-se o algoritmo OPS desenvolvido por membros do grupo de pesquisa (Teófilo et al., 2009), e posteriormente essas variáveis passaram por um processo visual final de seleção. O PLS foi utilizado como método de regressão (Ferreira et al., 1999).

8.3. Resultados e discussão

8.3.1. Identificação dos compostos por espectrometria de massas

Quatro amostras distintas dentre as 53 utilizadas para a construção dos modelos foram analisadas por espectrometria de massas para a identificação dos voláteis de importância para o estudo.

Nessas análises, foram detectados mais de 250 compostos, aos quais 115 deles foram importantes para a construção de um ou mais modelos de regressão. A Tabela 8.2 mostra estes compostos com seus respectivos tempos de retenção, nomes, fragmentação e *math*.

Tabela 8.2. Compostos identificados através das análises de massa por comparação dos seus MS espectros com os do NIST MS data base e literatura.

| Nº | T.R. | Compostos | Fragmentação | Math |
|----|------|-------------------------------|------------------------|------|
| 1 | 2,01 | Acetaldeído | 44 (B), 43, 42 | 932 |
| 2 | 2,05 | *Metanotiol | 47 (B), 45, 60 | 986 |
| 3 | 2,20 | *Acetona e furano - coeluição | 43 (B), 58 | 870 |
| 4 | 2,30 | *Acetato de metila | 43 (B), 74 | 944 |
| 5 | 2,42 | 2-Metilpropanal | 43 (B), 39, 72 | 911 |
| 6 | 2,57 | 2,3-Butanodiona | 43 (B), 86 | 961 |
| 7 | 2,62 | *2-butanona | 43 (B), 73 | 959 |
| 8 | 3,06 | *3-Metil butanal | 41 (B), 39, 58, 71 | 962 |
| 9 | 3,16 | 2-Metil butanal | 41 (B), 57, 39 | 962 |
| 10 | 3,41 | 3-Metil 2-butanona | 43 (B), 86 | 893 |
| 11 | 3,48 | *2,3-Pentanodiona | 43 (B), 57 | 945 |
| 12 | 3,52 | Ácido acético | 45 (B), 60 | 952 |
| 13 | 3,88 | 2,5-Dimetil furano | 43 (B), 53, 96 | 922 |
| 14 | 4,00 | 3-Metil piridazina | 39 (B), 65, 94 | 891 |
| 15 | 4,05 | Pirazina | 80 (B), 53, 96 | 910 |
| 16 | 4,14 | *1-Metil pirrol | 81 (B), 39, 42, 53 | 954 |
| 17 | 4,21 | Piridina | 79 (B), 52 | 936 |
| 18 | 4,36 | *Pirrol | 67 (B), 39 | 942 |
| 19 | 4,86 | *2,3-Hexanediona | 43 (B), 71, 114 | 911 |
| 20 | 5,03 | 3,4-Hexanediona | 57 (B), 114 | 924 |
| 21 | 5,16 | 3,3-Dimetil 2-butanona | 57 (B), 43, 100 | 800 |
| 22 | 5,32 | *Diidro-2-metil 3-furanona | 43 (B), 72, 100 | 928 |
| 23 | 5,48 | *1-Etil 1H-pirrol | 80 (B), 95, 67, 53, 78 | 806 |
| 24 | 5,55 | 4-Metil tiazol | 71 (B), 99, 45 | 863 |
| 25 | 5,68 | Metil pirazina | 94 (B), 67, 39 | 965 |

Capítulo 8. Previsão de atributos sensoriais do café arábica utilizando SPME-GC-FID

| | | | | |
|----|-------|-------------------------------------|-----------------------------|-----|
| 26 | 5,79 | Furfuril metil éter | 81 (B), 53, 112 | 876 |
| 27 | 5,85 | *3-Metil fenol | 108 (B), 43, 65, 79 | 768 |
| 28 | 5,92 | *Furfural | 39 (B), 95 | 953 |
| 29 | 5,98 | *2, <i>N</i> -dimetil 1H-pirrol | 94 (B), 42 | 800 |
| 30 | 6,25 | *Trimetil oxazol | 111 (B), 42, 55, 68 | 882 |
| 31 | 6,66 | 2-Furanmetanol | 98 (B), 41, 53, 81, 69 | 951 |
| 32 | 6,74 | Ácido 3-metil butanóico | 60 (B), 45, 87, 99 | 822 |
| 33 | 7,67 | Formiato de furfurila | 81 (B), 53, 39, 126 | 882 |
| 34 | 7,74 | 2-Furanmetanetiol | 81 (B), 53, 114 | 864 |
| 35 | 7,86 | 2,5-Dimetil pirazina | 42 (B), 108, 39 | 902 |
| 36 | 7,95 | Etil pirazina | 107 (B) | 848 |
| 37 | 8,06 | 2,3-Dimetil pirazina | 67 (B), 40, 108 | 886 |
| 38 | 8,33 | Butirolactona | 42 (B), 39, 56, 86 | 885 |
| 39 | 8,58 | *Etenilpirazina | 106(B), 52, 79 | 820 |
| 40 | 8,78 | N/I | - | - |
| 41 | 8,83 | 2- <i>N</i> -butilfurano | 81 (B), 124 | 755 |
| 42 | 9,00 | *3-Etilpiridina | 92 (B), 107, 65, 39 | 918 |
| 43 | 9,19 | Benzaldeído | 77 (B), 105, 51 | 850 |
| 44 | 9,34 | *5-Metil 2-furancarboxaldeído | 53 (B), 110, 81 | 938 |
| 45 | 9,54 | 1-Acetiloxi 2-butanona | 43 (B), 57, 130 | 902 |
| 46 | 9,64 | N/I | - | - |
| 47 | 9,95 | Fenol | 94 (B), 66, 39 | 898 |
| 48 | 10,23 | Acetato de 2-furanmetanol | 81 (B), 43, 52, 98, 39, 140 | 949 |
| 49 | 10,29 | *2-Etil-6-metil pirazina | 121 (B), 94, 128 | 830 |
| 50 | 10,37 | *2-Etil-5-metil pirazina | 121 (B), 39, 58 | 793 |
| 51 | 10,42 | Trimetil pirazina | 42 (B), 122, 39 | 832 |
| 52 | 10,50 | *1-Metil-1-H-pirrol 2-carboxaldeído | 109 (B), 53, 39, 80 | 892 |
| 53 | 10,57 | 2-Propionil furano | 95 (B), 39, 124 | 889 |
| 54 | 10,77 | *2-Etenil- <i>n</i> -metil pirazina | 52 (B), 120, 39 | 778 |
| 55 | 10,88 | 2-Pirrolcarboxaldeído | 95 (B), 66, 39 | 886 |
| 56 | 10,97 | N/I | - | - |
| 57 | 11,15 | Limoneno | 68 (B), 93, 136 | 784 |
| 58 | 11,25 | *2-Acetilpiridina | 79 (B), 43, 121 | 847 |
| 59 | 11,37 | N/I | - | - |
| 60 | 11,44 | 2,2'-Bifuryl | 134 (B), 78, 105 | 805 |
| 61 | 11,57 | *Benzenoacetaldeído | 91 (B), 120, 65, 39 | 893 |

Capítulo 8. Previsão de atributos sensoriais do café arábica utilizando SPME-GC-FID

| | | | | |
|----|-------|----------------------------------|--------------------------|-----|
| 62 | 11,67 | *4-Piridazinamida | 95 (B), 43 | 748 |
| 63 | 11,76 | *1-(2'-fúril)-2-butanona | 57 (B), 81, 138 | 840 |
| 64 | 11,90 | <i>N</i> -Metil fenol | 108 (B), 79, 91 | 800 |
| 65 | 11,96 | *N/I | - | - |
| 66 | 12,14 | 3-Acetoxipiridina | 95 (B), 43, 137 | 785 |
| 67 | 12,41 | *2-Acetilpirrol | 94 (B), 109, 66 | 800 |
| 68 | 12,42 | N/I | - | - |
| 69 | 12,43 | 2-Acetil- <i>n</i> -metil pirrol | 108 (B), 123 | 909 |
| 70 | 12,47 | *3-Etil-2,5-dimetilpirazina | 42 (B), 39, 135 | 905 |
| 71 | 12,91 | <i>p</i> -Guaiacol | 81 (B), 109, 124, 53, 39 | 901 |
| 72 | 13,00 | N/I | - | - |
| 73 | 13,17 | N/I | - | - |
| 74 | 13,26 | *N/I | - | - |
| 75 | 13,37 | *N/I | - | - |
| 76 | 13,60 | Maltol | 43 (B), 71, 126, 55, 97 | 882 |
| 77 | 13,83 | N/I | - | - |
| 78 | 14,05 | *5-Metil 2-propionil furano | 109 (B), 53, 138 | 876 |
| 79 | 14,85 | N/I | - | - |
| 80 | 14,92 | N/I | - | - |
| 81 | 15,01 | *N/I | - | - |
| 82 | 15,10 | N/I | - | - |
| 83 | 15,20 | *N/I | - | - |
| 84 | 15,32 | N/I | - | - |
| 85 | 15,54 | <i>N</i> -furfurilpirrol | 81 (B), 53, 147 | 894 |
| 86 | 15,61 | *Coeluição – N/I | - | - |
| 87 | 15,76 | *Coeluição – N/I | - | - |
| 88 | 15,90 | N/I | - | - |
| 89 | 16,01 | N/I | - | - |
| 90 | 16,14 | *N/I | - | - |
| 91 | 16,24 | N/I | - | - |
| 92 | 16,38 | *Furfuril metil disulfeto | 81 (B), 53, 160 | 891 |
| 93 | 16,49 | N/I | - | - |
| 94 | 16,56 | N/I | - | - |
| 95 | 16,63 | *Pentanoato de furfurila | 81 (B), 98, 182 | 784 |
| 96 | 16,84 | *N/I | - | - |
| 97 | 17,41 | *N/I | - | - |

Capítulo 8. Previsão de atributos sensoriais do café arábica utilizando SPME-GC-FID

| | | | | | |
|-----|-------|---------------------|------|---------------------------|-----|
| 98 | 17,56 | | *N/I | - | - |
| 99 | 17,72 | | N/I | - | - |
| 100 | 17,81 | | *N/I | - | - |
| 101 | 17,96 | | N/I | - | - |
| 102 | 18,05 | *Furfuril disulfeto | | 81 (B), 53, 161 | 793 |
| 103 | 18,18 | 4-Etil guaiacol | | 137 (B), 152 | 906 |
| 104 | 18,31 | | N/I | - | - |
| 105 | 18,52 | | *N/I | - | - |
| 106 | 18,59 | | N/I | - | - |
| 107 | 18,77 | Difurfuril eter | | 81 (B), 53, 39, 95, 69 | 901 |
| 108 | 18,87 | | N/I | - | - |
| 109 | 19,11 | *4-Vinilguaiacol | | 77 (B), 135, 150, 107, 51 | 907 |
| 110 | 19,19 | | N/I | - | - |
| 111 | 19,39 | | N/I | - | - |
| 112 | 20,57 | | *N/I | - | - |
| 113 | 20,96 | | *N/I | - | - |
| 114 | 21,22 | | N/I | - | - |
| 115 | 21,70 | | *N/I | - | - |

N/I. Não identificado. B. Pico base. * Compostos importantes para o capítulo 9.

8.3.2. Modelos de regressão de 6 atributos sensoriais do café arábica brasileiro

Inicialmente, os cromatogramas originais das amostras de cafés arábica foram obtidos em triplicata e sobrepostos (Figura 8.1 A). Através da Figura 8.1 A e sua região expandida podemos perceber a necessidade de pré-tratamentos dos dados originais, tais como, alinhamento dos picos (B) e correção de linha de base (C) antes da construção dos modelos. Assim, os cálculos subseqüentes foram realizados com a matriz de dados pré-tratada (\mathbf{X}_p) como indicado em material e métodos deste capítulo (Figura 8.1 C).

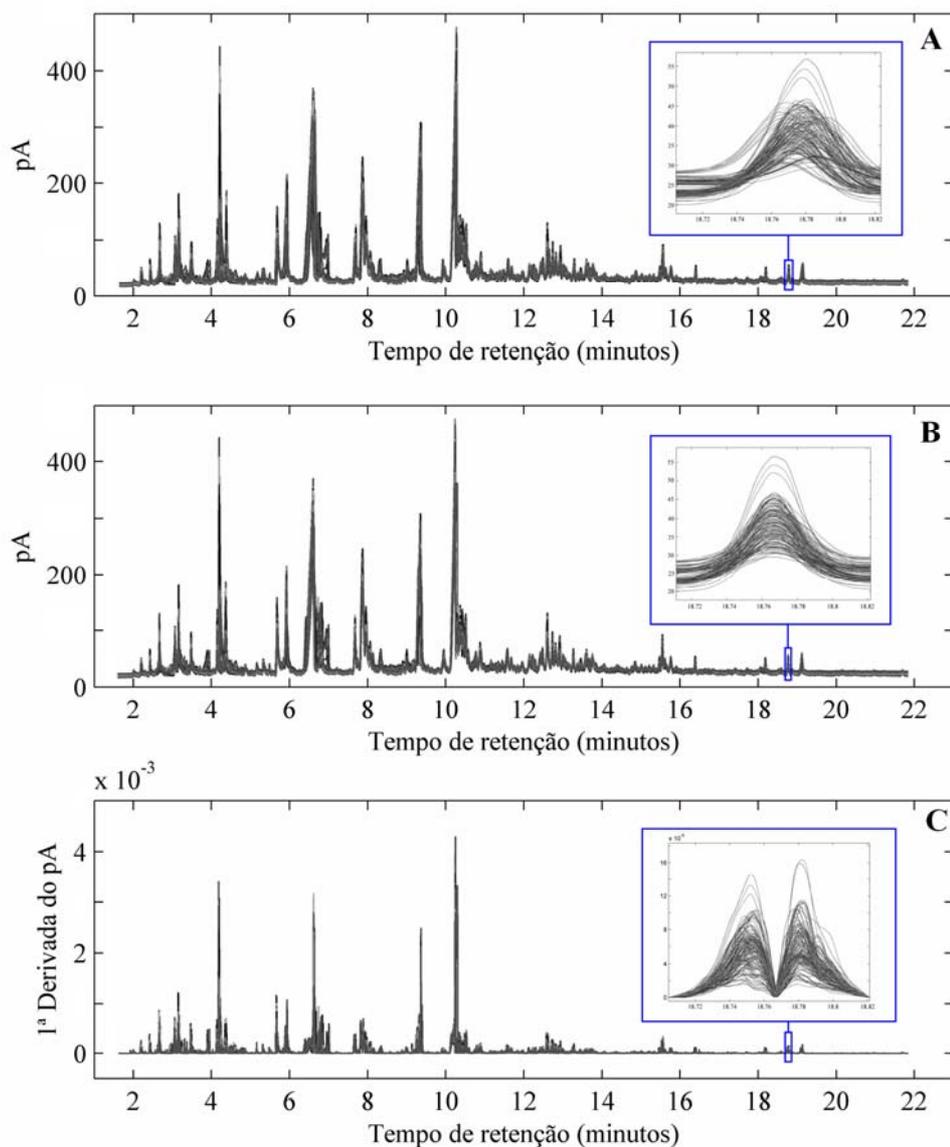


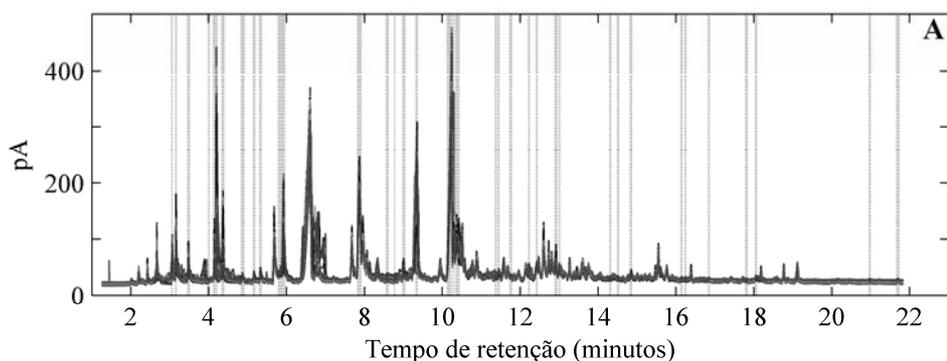
Figura 8.1. Cromatogramas originais (A), alinhados (B) e totalmente pré-tratados (C). As regiões selecionadas e ampliadas mostram o alinhamento dos picos antes e depois do algoritmo de alinhamento COW (B) e depois de alisados e derivados (valores absolutos) (C).

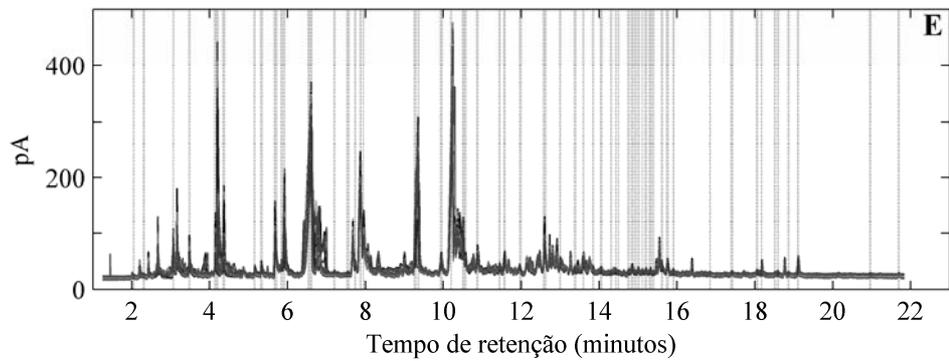
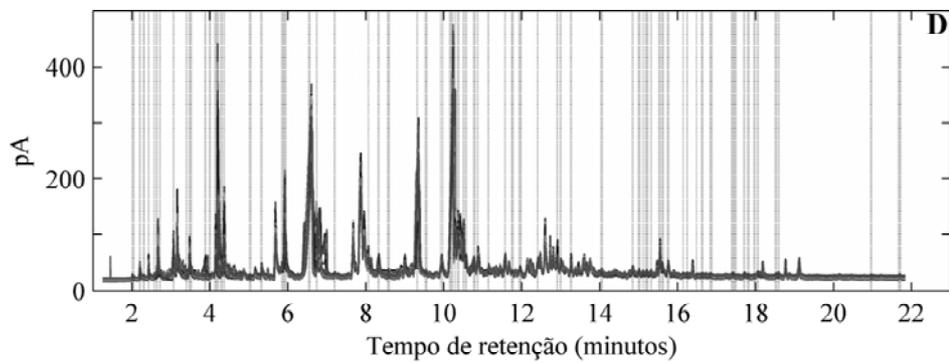
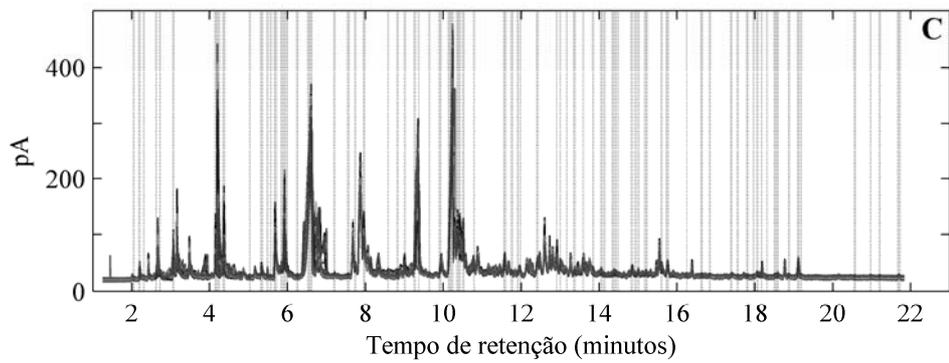
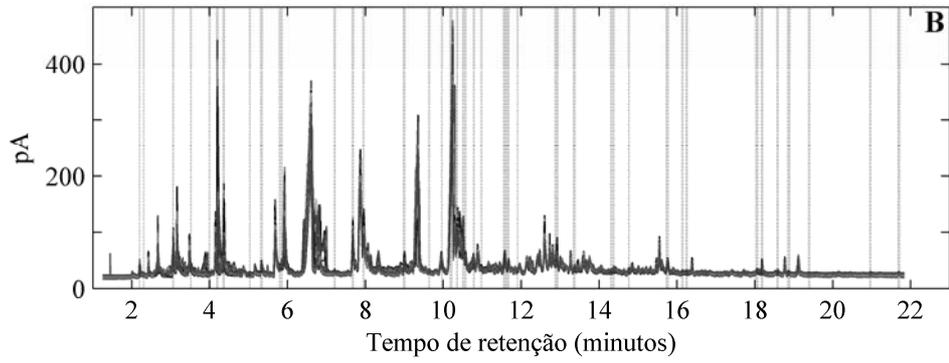
Para a construção dos modelos de regressão foram utilizados os valores médios das notas atribuídas à acidez, ao amargor, ao aroma, à bebida, ao corpo e à qualidade global pelos diferentes grupos de provadores, e os 159 cromatogramas pré-tratados

referentes às 53 amostras de café torrado. Dentro da escala inicial proposta para as análises sensoriais (1-5 pontos), as notas médias obtidas para todos os atributos estudados ficaram entre 1,13 e 4,5.

Na formação dos conjuntos de calibração de cada modelo foram selecionados aleatoriamente 129 cromatogramas, correspondentes a 43 amostras, de forma a cobrir toda a faixa de resposta das análises sensoriais. Os 30 cromatogramas restantes para cada modelo, correspondentes a 10 amostras, foram utilizados para formar os conjuntos validação externa. A validação cruzada (interna) realizada com cada conjunto de calibração (129 replicatas) foi realizada retirando-se aleatoriamente 5 amostras por vez (15 replicatas) até que cada amostra (3 replicatas) tenha sido retirada uma vez.

Na seleção de variáveis para cada modelo, o método OPS foi utilizado sobre a matriz de dados pré-tratada X_p (159x24701). Desse modo, de um conjunto inicial de 24701 variáveis foram selecionadas 1732 (36 picos) para a construção do modelo de acidez (A), 1515 (41 picos) para amargor (B), 2783 (71 picos) para aroma (C), no caso da bebida foram 1902 (63 picos) (D), já com o corpo foram 2223 (55 picos) (E) e por fim 2179 (65 picos) para qualidade global (F). Estas variáveis estão indicadas em linhas verticais nas Figuras 8.2.





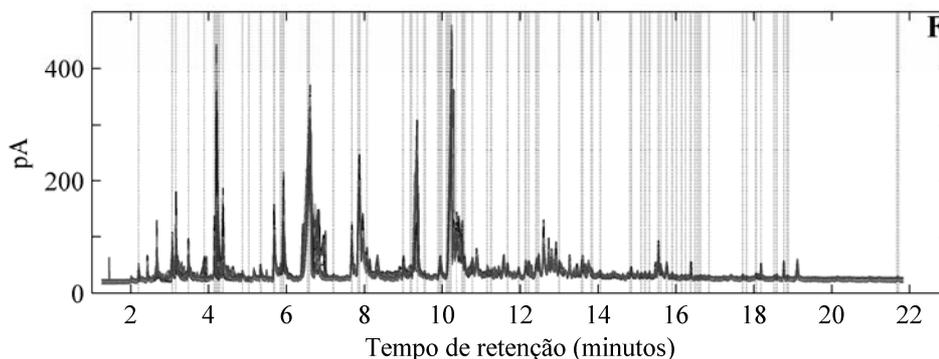


Figura 8.2. Variáveis selecionadas pelo OPS para construção de cada modelo de regressão. (A) acidez, (B) amargor, (C) aroma, (D) bebida, (E) corpo e (F) qualidade global.

Quando construímos um modelo de regressão PLS, o gráfico de *leverage versus* resíduo de *Student* nos fornece informações importantes sobre a presença ou não de amostras anômalas. De acordo com ele, amostras que apresentam simultaneamente resíduo de *Student* e *leverage* elevados devem sempre ser excluídas e o modelo de calibração reconstruído.

No caso deste conjunto de dados, os modelos de regressão construídos para o todos os atributos apresentam algumas replicatas com valores elevados de *leverage* e outras com valores elevados de resíduo (Figura 8.3). Porém, nos seis modelos nenhuma replicata apresentou valores elevados para *leverage* e resíduo, ou seja, nenhuma amostra foi considerada atípica. O limite de confiança utilizado para o valor limite do *leverage* foi de 95 % em todos os casos.

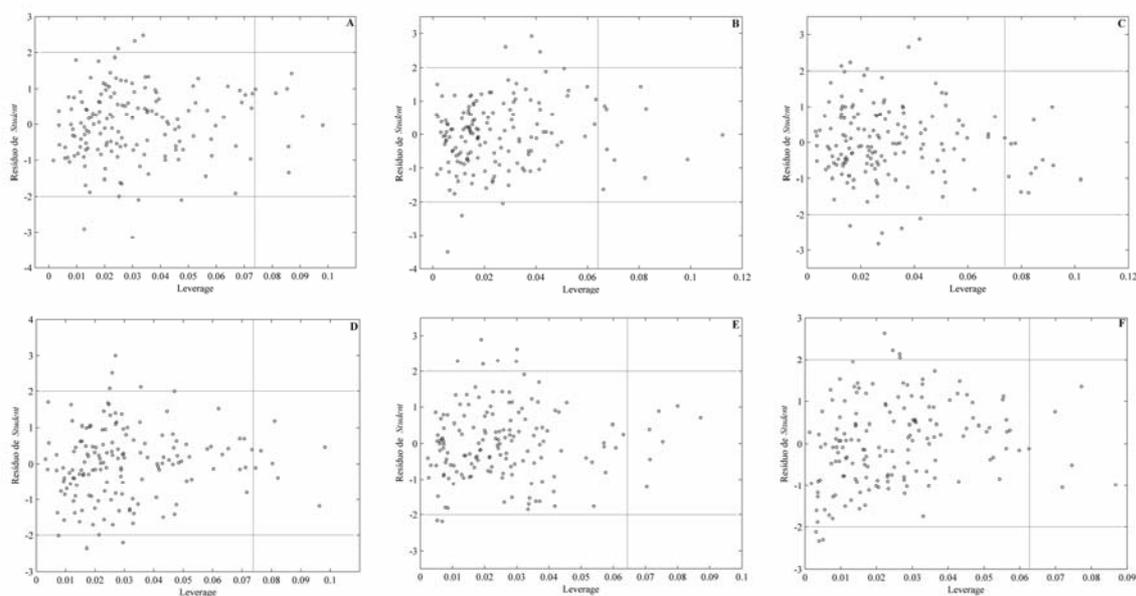


Figura 8.8. Gráficos de *Leverage* x Resíduo de *Student* dos 6 modelos de regressão. (A) acidez, (B) amargor, (C) aroma, (D) bebida, (E) corpo e (F) qualidade global.

O número de variáveis latentes (VL), utilizado nos modelos PLS, foi determinado a partir dos menores valores de RMSECV exibidos nos conjuntos de validação cruzada (Tabela 8.3). A Tabela 8.3 indica ainda os coeficientes de correlação da validação cruzada entre valores experimentais *versus* os valores preditos pelos modelos PLS com seus respectivos números de variáveis latentes.

Em média, 95 % e 45 % da variância dos blocos **Y** e **X** foram usados para descrever cada modelo de regressão, respectivamente.

Os modelos construídos foram validados utilizando o conjunto externo de 10 amostras (30 replicatas). A Figura 8.4 representa os valores de referência dos provadores *versus* os valores preditos pelos modelos para as amostras de validação externa distribuídas entre os valores dos conjuntos de validação cruzada. A Tabela 8.4 apresenta os valores de referência dos provadores e os valores previstos pelos modelos de regressão das amostras do conjunto de validação externa para melhor

comparação dos resultados. Os valores de RMSEP dos modelos foram 0,28 para acidez, 0,33 para o amargor, 0,33 para o aroma, 0,34 para corpo, 0,41 para bebida e 0,35 para qualidade global.

Tabela 8.3. Parâmetros estatísticos calculados para os modelos de regressão na validação cruzada.

| Modelos | Nº VL | RMSECV | r_{vc} |
|------------------|-------|-------------|-------------|
| Acidez | 5 | 0,27 ± 0,01 | 0,83 ± 0,01 |
| Amargor | 4 | 0,33 ± 0,02 | 0,89 ± 0,02 |
| Aroma | 5 | 0,26 ± 0,01 | 0,95 ± 0,00 |
| Bebida | 5 | 0,36 ± 0,01 | 0,92 ± 0,01 |
| Corpo | 4 | 0,26 ± 0,01 | 0,89 ± 0,01 |
| Qualidade global | 5 | 0,38 ± 0,01 | 0,92 ± 0,00 |

O aroma do café é composto por uma mistura extremamente complexa de compostos voláteis aos quais apresentam diferentes intensidades, concentrações e poder odorífero. De acordo com De Maria et al. (1999) um mesmo composto pode apresentar uma sensação odorífica agradável ou não, dependendo de sua concentração no meio ou devido a efeitos sinérgicos quando combinado com outros compostos.

A literatura descreve cerca de 900 compostos voláteis encontrados no café (Nijssen et al., 1996), essas descrições vêm desde 1880 quando Bernheimer identificou o primeiro composto volátil do café torrado (Bernheimer, 1880).

Contudo, em uma determinada análise cromatográfica dos voláteis de uma amostra qualquer de café torrado, essa quantidade de compostos provavelmente será menor. Isso acontece devido a diversos fatores, tais como espécies de café, região de plantio, processamento, grau de torra, tempo de extração e principalmente método de extração.

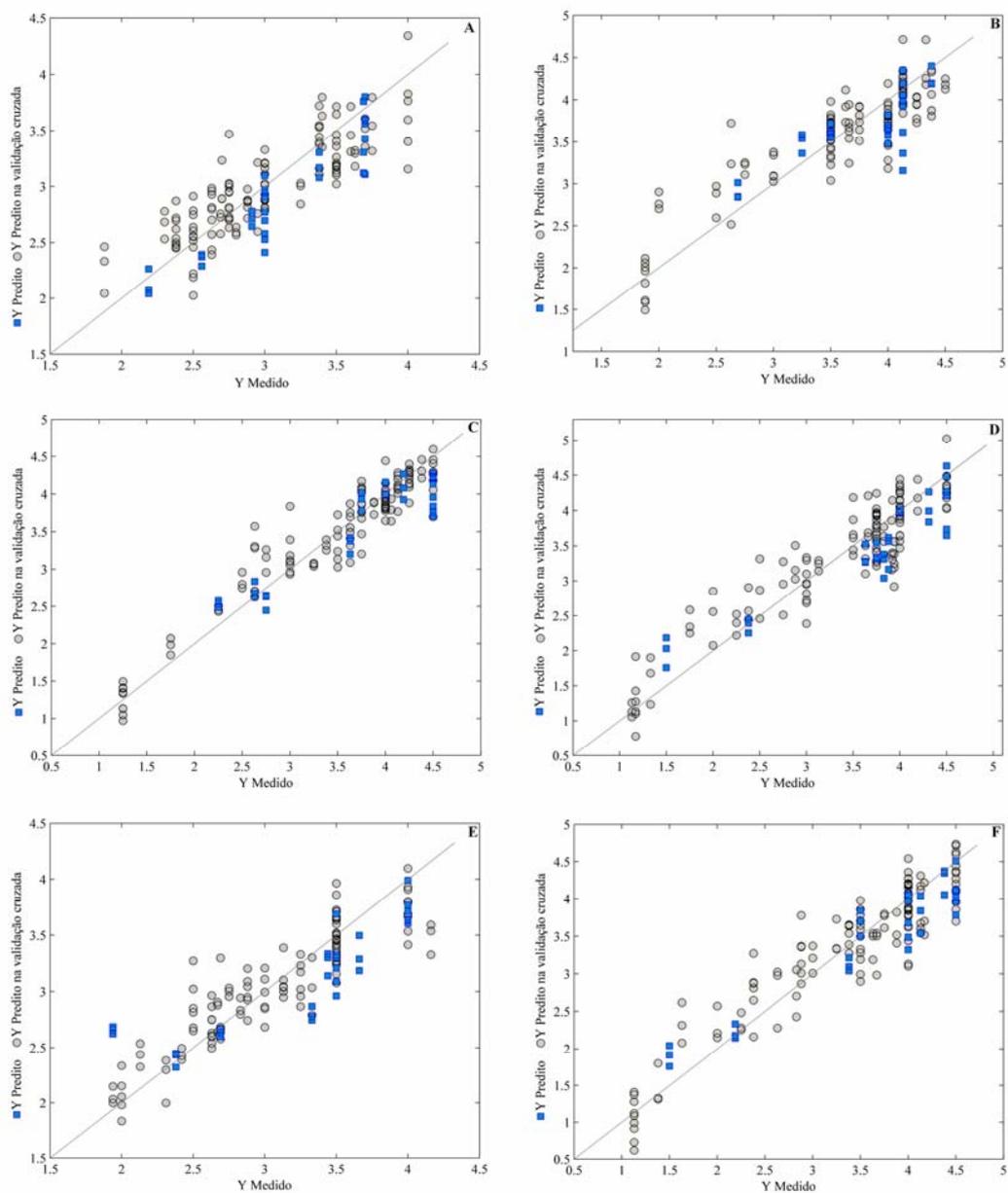


Figura 8.4. Representação gráfica das notas dos provadores para as amostras de validação cruzada (○) e validação externa (□) versus as notas previstas pelos modelos. Acidez (A), amargor (B), aroma (C), bebida (D), corpo (E) e qualidade global (F).

Tabela 8.4. Valores médios e desvios padrão dos seis atributos sensoriais atribuídos pelos provadores e previstos pelos modelos de regressão.

| Amostras | Acidez | | Amargor | | Aroma | |
|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Medido | Previsto | Medido | Previsto | Medido | Previsto |
| 1 | 3,00 ± 0,43 | 2,75 ± 0,16 | 4,13 ± 0,63 | 3,38 ± 0,23 | 2,75 ± 0,29 | 2,58 ± 0,11 |
| 2 | 3,70 ± 0,39 | 3,65 ± 0,13 | 4,38 ± 0,75 | 4,26 ± 0,12 | 4,19 ± 0,52 | 4,09 ± 0,17 |
| 3 | 3,69 ± 0,39 | 3,40 ± 0,32 | 4,13 ± 0,63 | 3,99 ± 0,06 | 3,63 ± 0,48 | 3,33 ± 0,11 |
| 4 | 3,38 ± 0,50 | 3,18 ± 0,11 | 4,13 ± 0,63 | 4,30 ± 0,09 | 3,75 ± 0,29 | 3,91 ± 0,12 |
| 5 | 2,56 ± 0,43 | 2,35 ± 0,05 | 2,69 ± 0,63 | 2,90 ± 0,10 | 2,25 ± 0,00 | 2,53 ± 0,05 |
| 6 | 2,19 ± 0,50 | 2,13 ± 0,11 | 3,25 ± 0,50 | 3,50 ± 0,12 | 2,63 ± 0,48 | 2,71 ± 0,11 |
| 7 | 2,91 ± 0,39 | 2,71 ± 0,06 | 3,50 ± 0,50 | 3,57 ± 0,02 | 4,50 ± 0,48 | 3,89 ± 0,28 |
| 8 | 3,00 ± 0,25 | 2,54 ± 0,14 | 3,50 ± 0,63 | 3,65 ± 0,06 | 4,00 ± 0,21 | 4,05 ± 0,09 |
| 9 | 3,70 ± 0,30 | 3,38 ± 0,25 | 4,00 ± 0,75 | 3,68 ± 0,13 | 4,50 ± 0,52 | 4,11 ± 0,14 |
| 10 | 3,00 ± 0,25 | 3,00 ± 0,08 | 4,00 ± 0,63 | 3,61 ± 0,12 | 4,50 ± 0,65 | 4,12 ± 0,24 |

| | Bebida | | Corpo | | Qualidade | |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Medido | Previsto | Medido | Previsto | Medido | Previsto |
| 1 | 3,83 ± 0,29 | 3,24 ± 0,18 | 3,33 ± 0,58 | 2,79 ± 0,08 | 3,38 ± 0,48 | 3,12 ± 0,09 |
| 2 | 4,31 ± 0,38 | 4,03 ± 0,22 | 3,44 ± 0,38 | 3,33 ± 0,08 | 4,38 ± 0,25 | 4,26 ± 0,18 |
| 3 | 3,63 ± 0,48 | 3,36 ± 0,15 | 3,66 ± 0,58 | 3,32 ± 0,16 | 4,13 ± 0,25 | 3,81 ± 0,25 |
| 4 | 3,88 ± 0,14 | 3,45 ± 0,25 | 2,69 ± 0,31 | 2,71 ± 0,03 | 4,00 ± 0,00 | 3,49 ± 0,18 |
| 5 | 1,50 ± 0,20 | 1,99 ± 0,22 | 1,94 ± 0,24 | 2,61 ± 0,05 | 1,50 ± 0,20 | 1,91 ± 0,14 |
| 6 | 2,38 ± 0,43 | 2,37 ± 0,10 | 2,38 ± 0,43 | 2,36 ± 0,05 | 2,19 ± 0,13 | 2,22 ± 0,10 |
| 7 | 3,75 ± 0,29 | 3,40 ± 0,13 | 3,50 ± 0,48 | 3,12 ± 0,12 | 3,50 ± 0,41 | 3,68 ± 0,17 |
| 8 | 4,00 ± 0,31 | 3,99 ± 0,02 | 3,50 ± 0,25 | 3,45 ± 0,23 | 4,00 ± 0,25 | 4,03 ± 0,05 |
| 9 | 4,50 ± 0,24 | 3,88 ± 0,34 | 4,00 ± 0,50 | 3,53 ± 0,03 | 4,50 ± 0,25 | 3,92 ± 0,12 |
| 10 | 4,50 ± 0,41 | 4,44 ± 0,22 | 4,00 ± 0,41 | 3,85 ± 0,09 | 4,50 ± 0,50 | 4,25 ± 0,23 |

Neste trabalho a SPME foi utilizada na extração dos voláteis e como esta técnica apresenta fibras com diferentes materiais sorventes (polares e apolares), espera-se que os compostos extraídos por uma determinada fibra sejam os que apresentam maior afinidade por ela.

Segundo a literatura (Kataoka et al., 2000), a fibra de PDMS/DVB utilizada nestes experimentos extrai com melhor eficiência compostos voláteis (na faixa de C₂-

C₁₂) com polaridade intermediária, tais como, nitro / aminas, alguns aldeídos, cetonas, entre outros. Assim, hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos e álcoois, são menos extraídos por esse tipo de recobrimento.

Deste modo, as discussões sobre os compostos importantes para a construção dos modelos de regressão se restringem aos compostos extraídos por SPME e identificados por espectrometria de massas.

Sabendo-se que a qualidade global é dependente de diversos atributos sensoriais, tais como aroma, acidez, corpo, entre outros. Sendo assim, é de se esperar que alguns compostos indicados na Tabela 8.2 sejam importantes para a maioria dos atributos sensoriais estudados.

A Figura 8.5 foi construída a fim de tornar mais fácil a visualização dos compostos distribuídos entre os modelos de regressão. Deste, sete (6,08 %) são importantes na construção de todos os modelos (**8, 17, 18, 22, 48, 102, 115**) (Ver Tabela 8.2). Outros quatorze (12,17 %) foram usados em cinco modelos (**16, 27, 28, 44, 47, 50, 52, 72, 78, 79, 87, 91, 96, 113**) e mais 18 compostos (15,65 %) foram importantes na construção de 4 modelos de regressão (**3, 4, 11, 20, 31, 42, 53, 54, 61, 65, 71, 83, 86, 90, 100, 103, 106, 108**). Portanto, 34 % dos picos foram selecionados em pelo menos 4 modelos de regressão mostrando que a maioria desses compostos em conjunto são importantes para prever esses atributos.

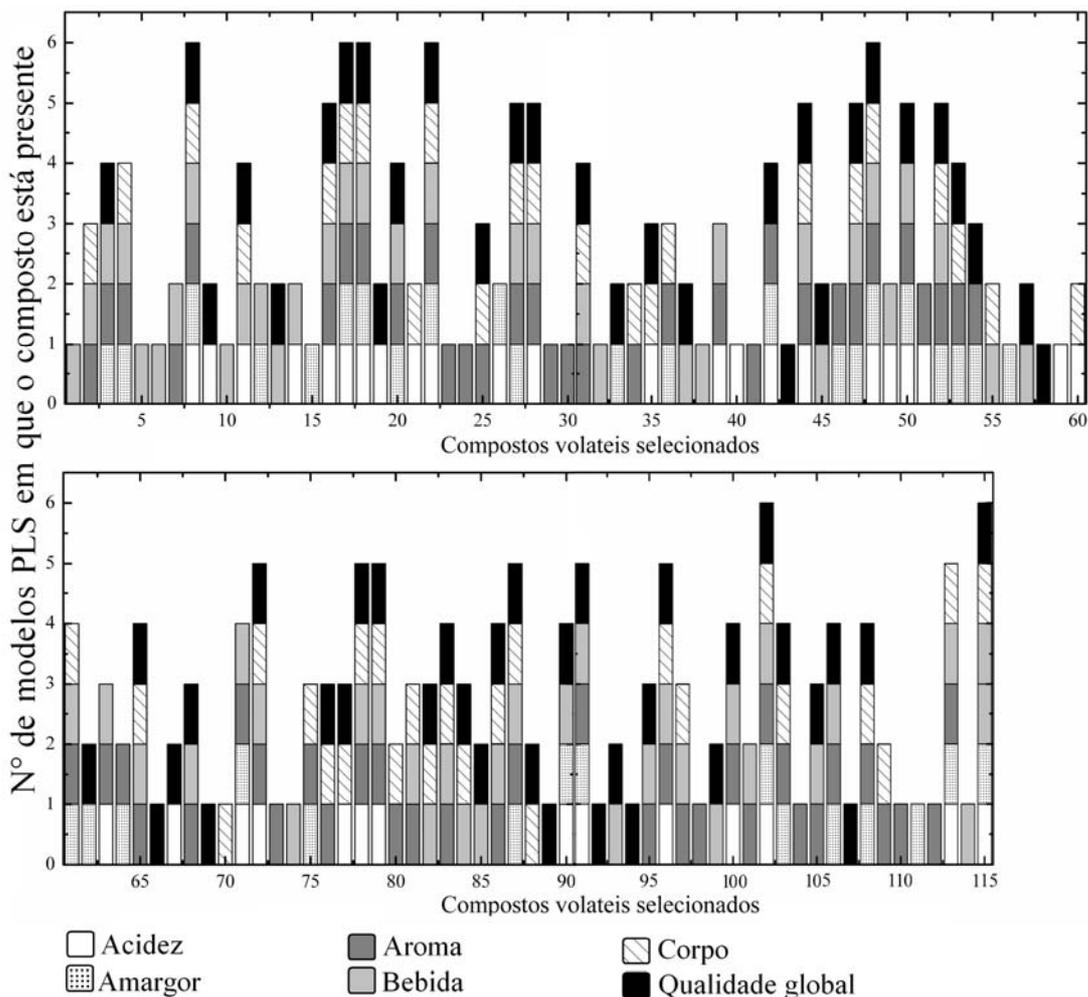


Figura 8.5. Distribuição dos compostos voláteis indicados na Tabela 8.2 de acordo com o(s) modelo(s) PLS que participam.

Contudo, as análises sensoriais, segundo os provadores, descrevem uma relação muito mais próxima entre os atributos aroma, bebida e qualidade global. Desta forma é de se esperar que um café bem avaliado em termos da qualidade global apresente também uma alta avaliação nesses outros dois atributos. Isso pode ser visualizado na Figura 8.5 onde 33 compostos selecionados fazem parte dos modelos de regressão dos três atributos.

8.4. Conclusões

Os novos modelos de regressão PLS gerados a partir do perfil cromatográfico dos voláteis de cafés arábica torrado, previram adequadamente as notas de acidez, aroma, qualidade global, amargor, corpo e sabor da bebida. Esse trabalho de confirmação de resultados anteriores, já publicados, demonstra a elevada relação linear entre as notas atribuídas aos atributos sensoriais por provadores e determinados compostos voláteis encontrados no perfil aromático dos cafés arábica torrados. Esses resultados juntamente com os anteriores mostram a confiabilidade em se utilizar cromatografia gasosa no monitoramento de vários atributos sensoriais importantes ligados a qualidade dos cafés brasileiros e de outros países produtores.

Os erros de previsão desses modelos, empregando 4 ou 5 variáveis latentes, foram iguais a 0,28, 0,33, 0,35, 0,33, 0,34 e 0,41, para cada um dos atributos, respectivamente, e são melhores que os publicados e, compatíveis com os erros médios das notas dos provadores.

Capítulo 9

Análise exploratória de dados cromatográficos dos cafés arábica da safra 2008/2009

Resultados finais

Resumo

Neste capítulo utilizou-se a análise de componentes principais (PCA) como ferramenta para a diferenciação de bebidas de cafés arábicas com base nos atributos aroma, bebida e qualidade global. Assim, os dados utilizados como variáveis foram os 115 compostos selecionados no capítulo anterior para os modelos de aroma, bebida e qualidade global, juntamente com amostras que apresentaram notas nas extremidades destes atributos. Assim, os resultados deste capítulo apresentam 54 compostos voláteis altamente relacionados com a qualidade global, com o aroma e com o sabor da bebida. Os voláteis 1-metil pirrol, pirrol, ciclopentanona, diidro-2-metil 3-furanona, furfural, 2-etil-5-metil pirazina, 2-etenil-n-metil pirazina, 5-metil 2-propionil furano e mais 5 compostos não identificados se mostraram importantes para a diferenciação das amostras segundo os três atributos. Os resultados obtidos para as amostras dos três atributos sensoriais estudados foram ainda interpretados em termos das figuras de mérito sensibilidade e especificidade.

De acordo com esses resultados e os preliminares descritos em Ribeiro et al. (2009) a partir de uma análise discriminante (PLS-DA) da qualidade global de 20 amostras, poderemos discutir sobre os compostos encontrados em ambos os trabalhos, tais como o furfural e 5-metil 2-furancarboxaldeído, por exemplo.

9.1. Introdução

A identificação de certos compostos presentes no café (marcadores químicos), possivelmente ligados a certos atributos sensoriais da qualidade, apresenta-se como uma das alternativas viáveis na busca de um processo analítico objetivo e quantitativo que possa auxiliar os métodos sensoriais convencionais já existentes. Na literatura, são vários os trabalhos com voláteis de café torrado que indicam possíveis compostos marcadores da qualidade (Flament, 2002; López-Galilea et al., 2006; Toci e Farah, 2008 ; Agresti et al., 2008; Ribeiro et al., 2009).

Assim, o objetivo principal deste capítulo é a determinação de compostos voláteis (marcadores) correlacionados aos atributos sensoriais aroma, bebida e qualidade global a partir da PCA de cromatogramas de amostras de cafés arábica que possuem essas três características bem distintas. Esses atributos foram escolhidos, pois apresentam uma alta correlação entre eles nas análises sensoriais. As figuras de mérito sensibilidade e especificidade também foram calculadas para cada um dos atributos sensoriais.

9.2. Material e métodos

9.2.1. Amostras de café utilizadas

As amostras de café arábica analisadas neste capítulo foram as mesmas do capítulo 8, porém, nem todas foram utilizadas. Assim, onze delas foram classificadas como de aroma fraco, as bebidas de dez foram classificadas como riada ou rio e de 12 foram classificadas como de qualidade global baixa. Vinte e duas amostras proporcionaram bebidas de aroma considerado pelos provadores como excelentes, 17 foram classificadas como bebida mole e 24 foram consideradas com excelente qualidade global.

9.2.2. Processo de torra

Já descrito no item 8.2.2 do capítulo 8.

9.2.3. Microextração em fase sólida e cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (SPME-GC-FID)

Condições e equipamentos descritos no item 7.2.2 do capítulo 7.

9.2.4. Cromatografia gasosa com detector de massas (SPME-GC-MS)

As condições, os equipamentos e os softwares utilizados para as análises de massas encontram-se descritos no item 8.2.5 do capítulo 8.

9.2.5. Condições experimentais para extração dos voláteis por SPME

As condições experimentais para a extração dos voláteis estão descritas no item 7.2.3 do capítulo 7.

9.2.6. Análises quimiométricas

Os pré-tratamentos utilizados nos dados deste capítulo são os mesmos indicados no capítulo anterior (item 8.2.7).

A PCA foi utilizada como método exploratório dos dados. A seleção das variáveis para essas análises foi realizada visualmente sobrepondo todos os picos selecionados para os modelos de regressão descritos no capítulo anterior (aroma, bebida e qualidade global) e observando os compostos que apresentavam as maiores diferenças sistemáticas. Deste modo, tornou-se possível uma seleção mais apurada dos compostos que possam diferenciar as amostras.

9.3. Resultados e discussão

9.3.1. Compostos voláteis identificados por espectrometria de massas

Nas análises de massas descritas no capítulo 8 foram selecionados 115 compostos importantes para a construção dos modelos de regressão dos 6 atributos sensoriais estudados. Neste capítulo, para a construção das PCAs para diferenciação de amostras segundo os atributos aroma, bebida e qualidade global, partindo dos 115 já descritos, foram selecionados 54 compostos. A Tabela 9.1 abaixo mostra estes compostos com seus respectivos tempos de retenção, nomes, fragmentação, *math* e PCA onde foram utilizados.

Tabela 9.1. Principais compostos identificados através das análises de massa por comparação dos seus MS espectros com os do NIST MS data base e literatura.

| Nº comp. | T.R. (min) | Nome do composto | Fragmentação ^{a,b} | Math | Picos (PCA) |
|----------|------------|------------------------------|-----------------------------|------|-------------|
| 1 | 2,05 | Metanotiol | 47 (B), 45, 60 | 986 | A, B |
| 2 | 2,20 | Acetona e furano - coeluição | 43 (B), 58 | 870 | A, C |
| 3 | 2,30 | Acetato de metila | 43 (B), 74 | 944 | A, B |
| 4 | 2,62 | 2-Butanona | 43 (B), 73 | 959 | A, B |
| 5 | 3,06 | 3-Metil butanal | 41 (B), 39, 58, 71 | 962 | A |
| 6 | 3,48 | 2,3-Pentanodiona | 43 (B), 57 | 945 | B, C |
| 7 | 4,14 | 1-metil pirrol | 81 (B), 39, 42, 53 | 954 | A, B, C |
| 8 | 4,18 | N/I ^c | - | - | A |
| 9 | 4,21 | Piridina | 79 (B), 52 | 936 | B, C |
| 10 | 4,25 | N/I | - | - | A |
| 11 | 4,36 | Pirrol | 67 (B), 39 | 942 | A, B, C |
| 12 | 4,86 | 2,3-Hexanediona | 43 (B), 71, 114 | 911 | C |
| 13 | 5,03 | Ciclopentanona | 55 (B), 84 | 824 | A, B, C |
| 14 | 5,32 | Diidro-2-metil 3-furanona | 43 (B), 72, 100 | 928 | A, B, C |
| 15 | 5,48 | 1-Etil 1H-pirrol | 80 (B), 95, 67, 53, 78 | 806 | A |
| 16 | 5,85 | 3-Metil fenol | 108 (B), 43, 65, 79 | 768 | A, B |
| 17 | 5,92 | Furfural | 39 (B), 95 | 953 | A, B, C |
| 18 | 5,98 | 2,N-dimetil 1H-pirrol | 94 (B), 42 | 800 | A |
| 19 | 6,25 | Trimetil oxazol | 111 (B), 42, 55, 68 | 882 | A |
| 20 | 8,58 | Etenilpirazina | 106 (B), 52, 79 | 820 | A, B |

Capítulo 9. Análise exploratória de dados cromatográficos dos cafés arábica da safra 2008/2009

| | | | | | |
|----|-------|------------------------------------|------------------------------|-----|---------|
| 21 | 9,00 | 3-Etil piridina | 92 (B), 107, 65, 39 | 918 | A, C |
| 22 | 9,34 | 5-Metil 2-furancarboxaldeído | 53 (B), 110, 81 | 938 | B, C |
| 23 | 10,29 | 2-Etil-6-metil pirazina | 121 (B), 94, 128 | 830 | A, C |
| 24 | 10,37 | 2-Etil-5-metil pirazina | 121 (B), 39, 58 | 793 | A, B, C |
| 25 | 10,50 | 1-Metil-1-H-pirrol 2-carboxaldeído | 109 (B), 53, 39, 80 | 859 | A |
| 26 | 10,77 | 2-Etenil-n-metil pirazina | 52 (B), 120, 39 | 778 | A, B, C |
| 27 | 11,25 | 2-Acetilpiridina | 79 (B), 43, 121 | 847 | C |
| 28 | 11,57 | Benzenoacetaldeído | 91 (B), 120, 65, 39 | 893 | A, B |
| 29 | 11,67 | 4-Piridazinamida | 95 (B), 43 | 748 | C |
| 30 | 11,76 | 1-(2'-fúril)-2-butanona | 57 (B), 81, 138 | 840 | A, B |
| 31 | 11,96 | N/I | - | - | A, B, C |
| 32 | 12,41 | 2-Acetilpirrol | 94 (B), 66, 109, 43 | 890 | A |
| 33 | 12,47 | 3-Etil-2,5-dimetilpirazina | 42 (B), 39, 135 | 905 | C |
| 34 | 13,26 | N/I | - | - | B |
| 35 | 13,37 | N/I | - | - | A |
| 36 | 14,05 | 5-Metil 2-propionil furano | 109 (B), 53, 138 | 876 | A, B, C |
| 37 | 15,01 | N/I | - | - | A, B |
| 38 | 15,02 | N/I | - | - | B |
| 39 | 15,20 | N/I | - | - | A, C |
| 40 | 15,61 | Coeluição - N/I | - | - | B, C |
| 41 | 15,76 | Coeluição - N/I | - | - | A, B, C |
| 42 | 16,14 | N/I | - | - | C |
| 43 | 16,38 | Furfuril metil disulfeto | 81 (B), 53, 160 | 891 | A, C |
| 44 | 16,63 | Pentanoato de furfurila | 81 (B), 98, 182 | 784 | B, C |
| 45 | 16,84 | N/I | - | - | A, B, C |
| 46 | 17,41 | N/I | - | - | B |
| 47 | 17,56 | N/I | - | - | A |
| 48 | 17,81 | N/I | - | - | A, B, C |
| 49 | 18,05 | Furfuril disulfeto | 81 (B), 53, 161 | 793 | C |
| 50 | 18,52 | N/I | - | - | B, C |
| 51 | 19,11 | 4-Vinilguaiaicol | 77 (B), 135, 150, 107, 51 | 907 | A |
| 52 | 20,57 | N/I | - | - | A |
| 53 | 20,96 | N/I | - | - | A |
| 54 | 21,70 | N/I | - | - | A, B, C |

A. Aroma; B. Bebida; C. Qualidade global; a. M/z de cada composto a partir do banco de dados do NIST, B. Pico base, c. N/I – Não identificados. Tabela construída a partir de alguns compostos da Tabela 8.2 do capítulo anterior.

9.3.2. Análise exploratória dos dados cromatográficos

9.3.2.1. Aroma

Para a classificação segundo o aroma, foram selecionadas 11 amostras com notas baixas, ou seja, com característica de aroma fraco ou atípico (classe 1), e 22 amostras apresentando notas elevadas nesse atributo (classe 2). Dos 115 compostos iniciais observados foram selecionados visualmente 39 (2393 variáveis). Esses picos estão indicados pelas linhas verticais na Figura 9.1, que apresenta dois cromatogramas característicos, um de uma amostra de baixo aroma e outro de aroma excelente. Os números indicados sobre cada pico na Figura 9.1 correspondem aos compostos descritos previamente na Tabela 9.1.

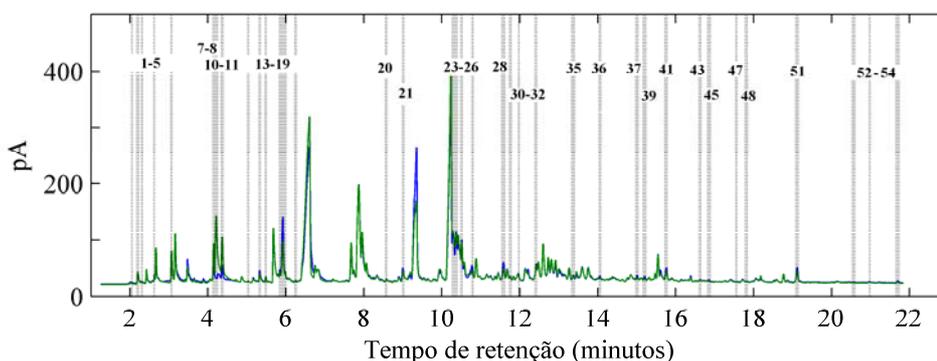


Figura 9.1. Picos selecionados para a PCA de aroma. O cromatograma em verde (—) é um cromatograma típico de amostras com aroma baixo ou ruim e o em azul é um cromatograma típico de amostras com ótimo aroma (—) (**Anexo 1**).

Utilizando os 39 picos selecionados, a PCA permitiu descrever 46,96% da variância total dos dados selecionados com apenas 2 componentes principais. A porcentagem de variância que cada componente descreve está detalhada no gráfico de escores (Figura 9.2 A). Esta análise revelou que a separação entre as duas classes está relacionada à primeira componente principal (PC1), em que as amostras da classe 1 (aroma baixo) (●) encontram-se à esquerda desta componente, distantes das amostras

da classe 2 (aroma excelente) (\square) dispostas à direita de PC1. Os números em verde e em azul indicados na Figura 9.2 B (gráfico de escores e pesos) representam os compostos selecionados e a influência (o peso) de cada um deles na separação das amostras.

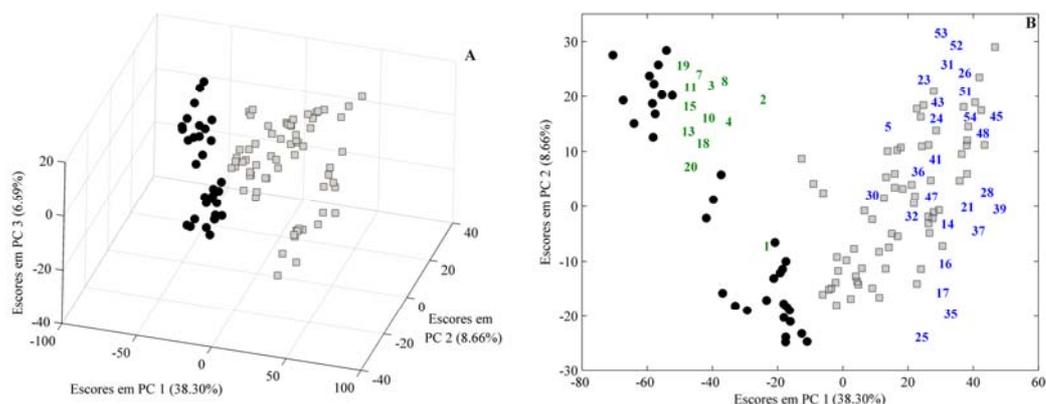


Figura 9.2. Gráfico 3D de escores de PC1 x PC2 x PC3 (A) e gráfico de escores e pesos de PC1 versus PC2 (B) - Amostras com aroma fraco e/ou muito fraco (\bullet) e amostras com excelente aroma (\square) – Os números em verde e em azul representam o peso de cada pico entre as amostras.

9.3.2.2. Bebida

O atributo sabor (bebida) também foi estudado pela análise de componentes principais. Para esta análise, foram utilizadas 10 amostras de café com bebida de características rio ou riada (ruins) e 17 de bebidas classificadas sensorialmente como bebida mole (boas). Trinta picos, correspondentes a 2415 variáveis, foram escolhidos na seleção visual de variáveis para este atributo. Esses picos (ou variáveis) estão indicados em linhas verticais na Figura 9.3 e enumerados de acordo com a Tabela 9.1.

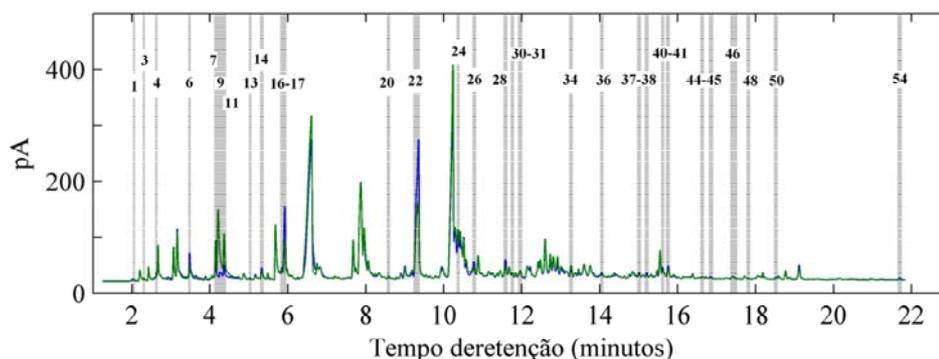


Figura 9.3. Picos selecionados para a análise PCA. O cromatograma em verde (—) é uma média dos cromatogramas de bebida rio/riada e o em azul é uma média dos cromatogramas de bebidas moles (—) (Anexo 2).

No gráfico dos escores (Figura 9.4 A), verifica-se uma tendência de agrupamento das amostras ao longo de PC1. Essa PC explicou 45,45 % da variância dos picos selecionados. As amostras à esquerda de PC1 (rio ou riadas) formam um agrupamento (●) enquanto as amostras a direita (moles) (□) formam outro. Os números em verde e em azul indicados no gráfico de escores e pesos de PC1 x PC2 (Figura 9.4 B) representam os compostos voláteis selecionados e a influência de cada um na diferenciação das amostras.

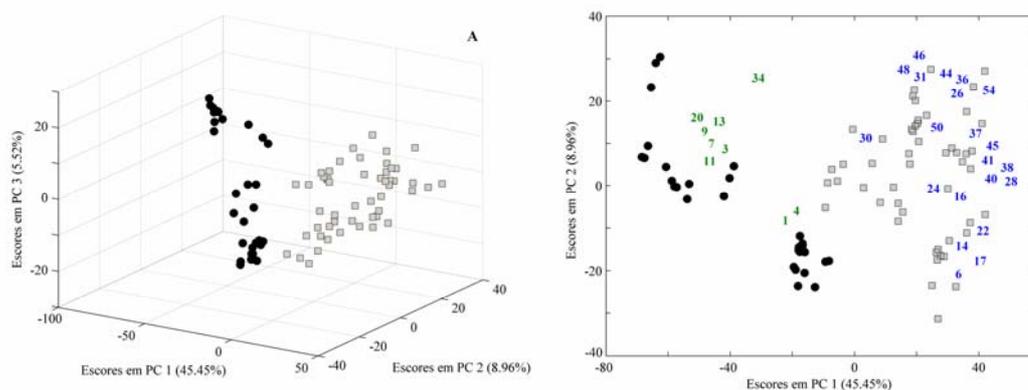


Figura 9.4. Gráfico 3D de escores de PC1 x PC2 x PC3 (A) e gráfico de escores e pesos de PC1 versus PC2 (B) - Amostras com bebida rio/riada (●) e amostras com bebida mole (□) – Os números em verde e em azul representam o peso de cada pico entre as amostras.

9.3.2.3. Qualidade global

Já para a PCA que investiga o atributo qualidade global foram utilizadas 24 amostras com notas elevadas de qualidade global e 12 com notas baixas. Após a seleção visual de variáveis, similar a realizada nos itens anteriores, 30 picos cromatográficos referentes a 2032 variáveis foram considerados para análise de PCA. A Figura 9.5 mostra os cromatogramas típicos de amostra de bebida de qualidade global baixa (verde) e alta (azul), bem como os picos selecionados, enumerados de acordo com a Tabela 9.1 e indicados em linhas verticais.

De acordo com o gráfico de escores de PC1 x PC2 x PC3 (Figura 9.6 A), as amostras com bebidas de baixa qualidade global (●) estão localizadas na parte negativa de PC1, enquanto as amostras de alta qualidade (□) tendem a ficar na parte positiva desta componente principal. A PC1 explicou 37,07 % da variância dos 30 picos selecionados.

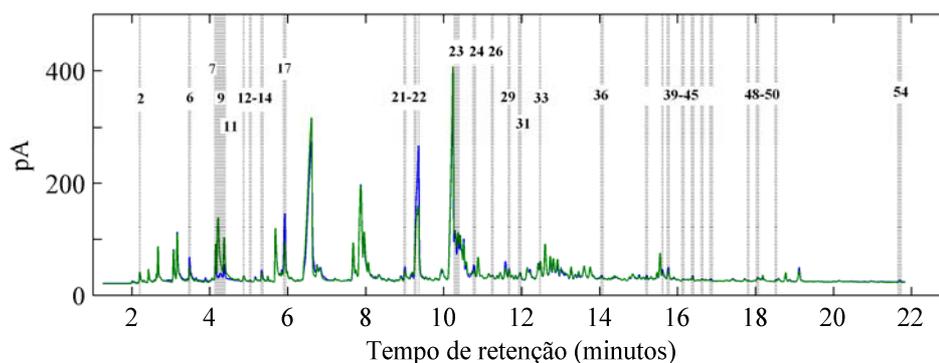


Figura 9.5. Picos selecionados para a PCA. O cromatograma em verde (—) é uma média dos cromatogramas com baixa qualidade global ou e o azul é uma média dos cromatogramas com excelente qualidade global (—) (Anexo 3).

A Figura 9.6 B apresenta ainda um gráfico de escores e pesos entre as 2 primeiras componentes principais. Os números representam os picos cromatográficos

(compostos voláteis) selecionados e a influência de cada um na separação das amostras.

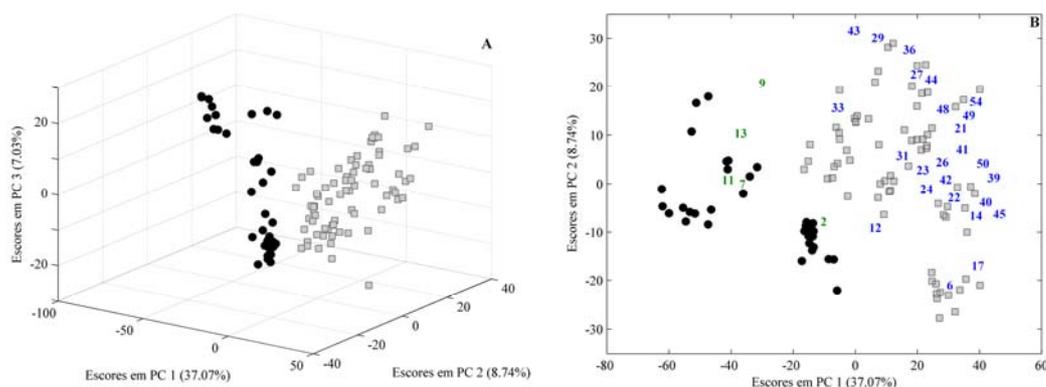


Figura 9.6. Gráfico 3D de escores de PC1 x PC2 x PC3 (A) e gráfico de escores e pesos de PC1 versus PC2 (B) - Amostras com baixa qualidade global (●) e amostras com alta qualidade global (□) – Os números em verde e em azul representam o peso de cada pico entre as amostras.

Segundo a ABIC, o aroma é a percepção olfativa causada pelos gases liberados do café torrado e moído, após preparação da infusão. A bebida é descrita como a combinação de sensações causada pelos compostos químicos da bebida do café quando introduzida na boca. Já a qualidade global, é a percepção conjunta dos aromas da bebida e de seu grau de intensidade, sendo que quanto mais aromático, melhor a qualidade do café; dos sabores característicos do café; de um amargor típico mas não o resultante da excessiva torra do grão (ou carbonização); da presença não preponderante do gosto dos grãos defeituosos (verdes escuros, pretos, ardidos) ou de sua inexistência, para o caso dos cafés *gourmet*; da inexistência do gosto característico de grãos fermentados, podres ou preto-verdes; do equilíbrio e da harmonia da bebida, tudo se traduzindo numa sensação agradável durante e após a degustação (Guia prático do programa de qualidade do café – www.abic.com.br).

Por isso, é de se esperar que um café bem avaliado em termos da qualidade global terá também uma alta avaliação nos outros atributos (aroma e bebida).

De acordo com as análises de componentes principais realizadas para diferenciar bebidas de cafés segundo seus voláteis, os compostos 1-metil pirrol (**7**), pirrol (**11**), ciclopentanona (**13**), diidro-2-metil 3-furanona (**14**), furfural (**17**), 2-etil-5-metil pirazina (**24**), 2-etenil-n-metil pirazina (**26**), 5-metil 2-propionil furano (**36**) e mais 5 compostos não identificados (**31, 41, 45, 48, 54**) (ver tabela 9.1) seriam possíveis marcadores tanto do aroma quanto do sabor e da qualidade global, simultaneamente. Destes, os compostos **7, 11 e 13** quando aparecem em maior concentração tendem a diminuir a qualidade das bebidas. Contrariamente, os outros compostos identificados aumentam a qualidade dos cafés quando em maior concentração.

A análise efetuada para o atributo “qualidade global” confirma alguns dos resultados apresentados em Ribeiro et al. (2009), em que os compostos furfural (**17**) e 5-metil 2-furancarboxaldeído (**22**) aparecem como possíveis marcadores desse atributo da bebida. O composto 1-metil pirrol (**7**) foi identificado como marcador negativo de qualidade, confirmando o apresentado na literatura (Flament, 2002; López-Galilea et al., 2006). Como em Toci e Farah (2008), a piridina (**9**) e o 2-etenilpirazina (**20**) também indicam baixa qualidade de bebida. As análises de componentes principais revelam que esses compostos interferem no aroma e na bebida (**20**), bem como na bebida e na qualidade global (**9**) da bebida de café. Entretanto, o composto 2-Etil-5-metil pirazina (**24**) neste trabalho foi identificado como marcador positivo para os 3 atributos sensoriais, mas apresentou caráter negativo no trabalho de Agresti et al. (2008).

Os outros compostos trazidos na Tabela 9.1 são igualmente possíveis marcadores de um ou mais dos três atributos estudados, com efeitos negativos ou positivos, conforme suas posições nos gráficos de escores e pesos.

9.3.3. Sensitividade e especificidade

Para o cálculo de duas figuras de mérito (sensitividade e especificidade), análises de componentes principais com os dados utilizados nos itens anteriores 9.3.2.1 - 9.3.2.3 foram feitas. Assim, as amostras descritas no item 9.2.1 foram organizadas em classes (Tabela 9.2).

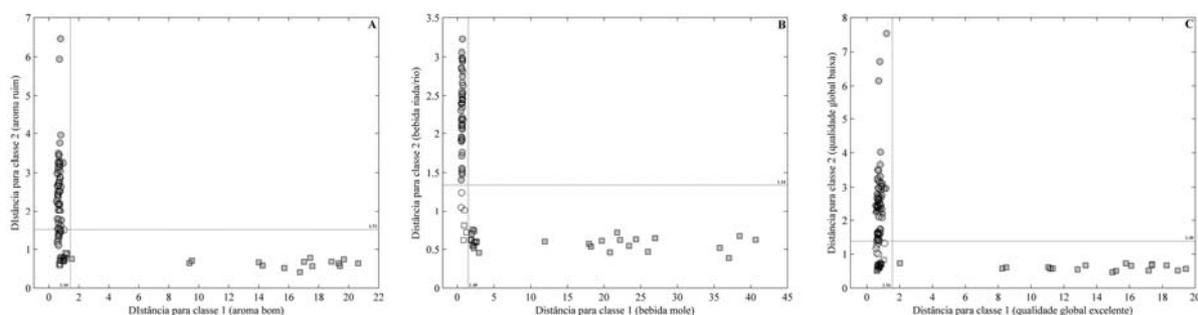


Figura 9.7. Gráficos de *Coomans* para as distâncias quadráticas dos modelos para aroma (A), bebida (B) e qualidade global (C). Nos gráficos as amostras das classes 1 para os 3 modelos estão indicadas por quadrados (□) enquanto as amostras das classes 2 por bolinhas (○).

Tabela 9.2. Sensitividade e especificidade para os modelos de aroma, bebida e qualidade global.

| Modelos | Classes | PCs | Distância crítica | Sensitividade (%) | Especificidade (%) |
|-----------------|-----------------------|-----|-------------------|-------------------|--------------------|
| Modelo A | Aroma excelente (1) | 5 | 1,44 | 100 | 45 |
| Aroma | Aroma fraco (2) | 2 | 1,51 | 100 | 78 |
| Modelo B | Bebida mole (1) | 4 | 1,48 | 100 | 90 |
| Bebida | Bebida riada /rio (2) | 3 | 1,34 | 100 | 94 |
| Modelo C | Q.G alta (1) | 3 | 1,56 | 100 | 50 |
| Q. G. | Q. G. Baixa (2) | 3 | 1,38 | 100 | 90 |

Nos gráficos de *Coomans* para o atributo aroma (Figura 9.7 A), a sensibilidade foi de 100% para as duas categorias de café: de aroma bom e ruim, indicando que estas duas classes são capazes de identificar as amostras pertencentes a elas. Quanto á especificidade, a classe de cafés de aroma bom rejeitou apenas 45% das amostras de cafés de aroma ruim. Em outras palavras, esta classe aceitou 55% das amostras de

aroma ruim. Por outro lado, a classe de cafés ruins é satisfatoriamente seletiva. Ela reconheceu todas as amostras de sua classe e 22% das amostras de aroma bom.

No caso do atributo bebida, segundo a distribuição das amostras no gráfico de *Coomans* (Figura 9.7 B), a sensibilidade foi de 100% para as duas categorias de café (rio/riada e mole), indicando que ambas são capazes de identificar as amostras pertencentes a elas. Quanto á especificidade, a classe de cafés moles rejeitou 90% das amostras de cafés rio/riados, enquanto que a classe de cafés rio/riados rejeitou 94% dos cafés moles, demonstrando alta seletividade em ambas.

Por fim, para o atributo qualidade global (Figura 9.7 C) a sensibilidade também foi de 100% para as duas categorias de café (alta e baixa qualidade global). Contudo, na especificidade a classe de cafés com alta qualidade global aceitou 50% das amostras de baixa qualidade global, enquanto a classe de cafés de baixa qualidade global apresentou especificidade seletiva reconhecendo todas as amostras de sua classe e apenas 10% das amostras de alta qualidade global.

9.4. Conclusões

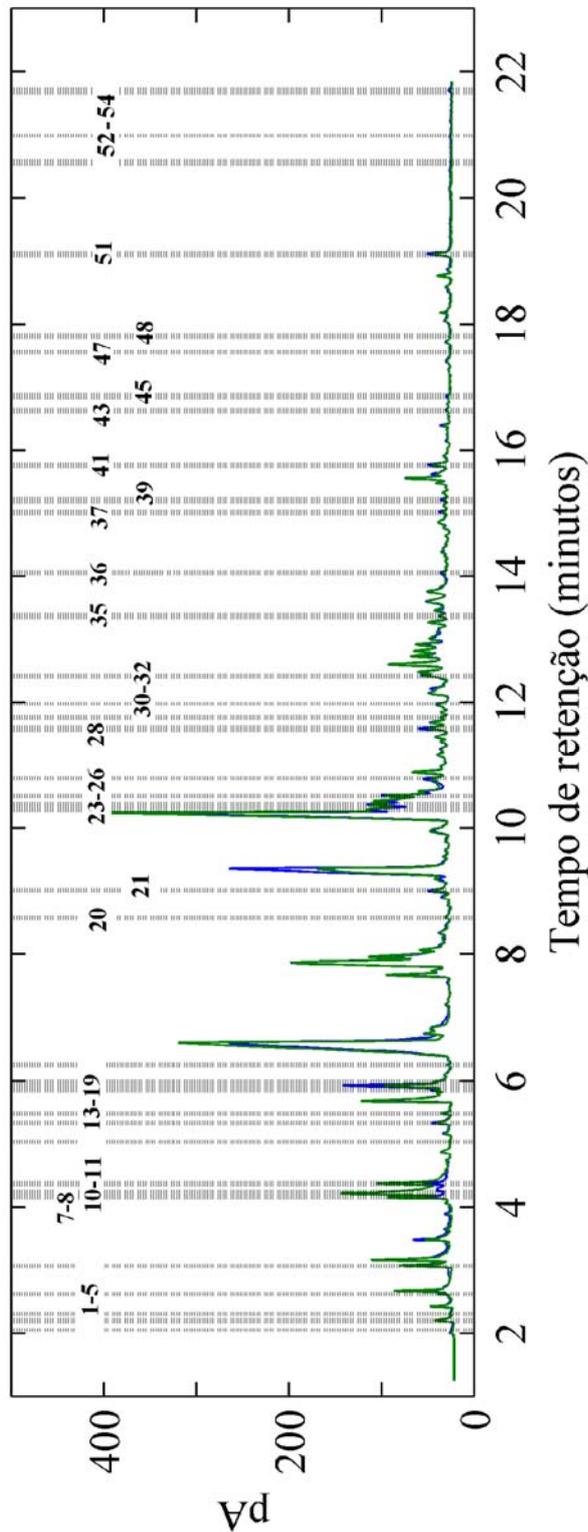
A PCA realizada com os dados cromatográficos dos grãos torrados indicou que os compostos: 1-metil pirrol, pirrol, ciclopentanona, diidro-2-metil 3-furanona, furfural, 2-etil-5-metil pirazina, 2-etenil-n-metil pirazina, 5-metil 2-propionil furano e mais 5 compostos não identificados podem ser colocados na lista de possíveis marcadores para a diferenciação da qualidade dos grãos de café arábica, pois apareceram como compostos importantes na diferenciação das amostras segundo os 3 atributos estudados.

Os compostos 1-metil pirrol, pirrol e o ciclopentanona apresentaram efeito negativo para qualidade enquanto os demais têm efeito positivo. Outros 41 compostos

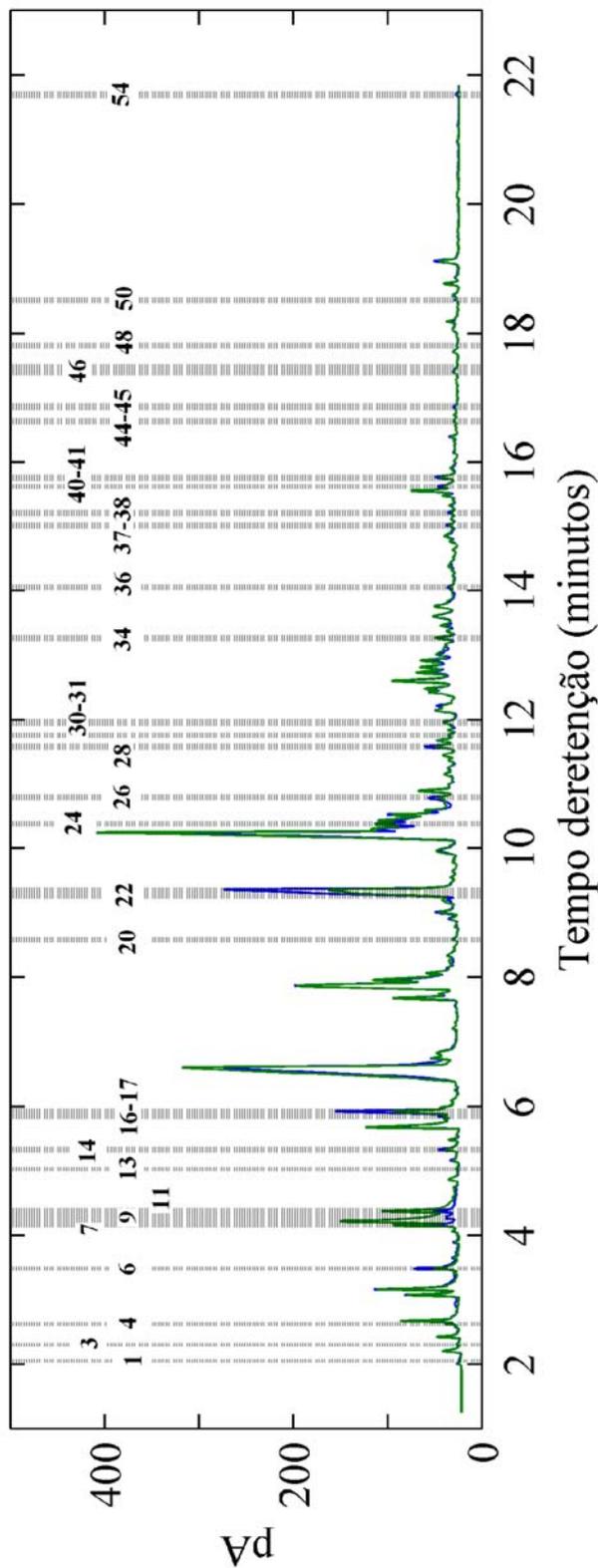
foram identificados como possíveis marcadores de um ou mais dos atributos estudados.

Contudo, devemos desprender uma maior atenção aos compostos furfural, 5-metil 2-furancarboxaldeído, 1-metil pirrol, piridina e 2-etenilpirazina, pois eles já apareceram em alguns trabalhos anteriores.

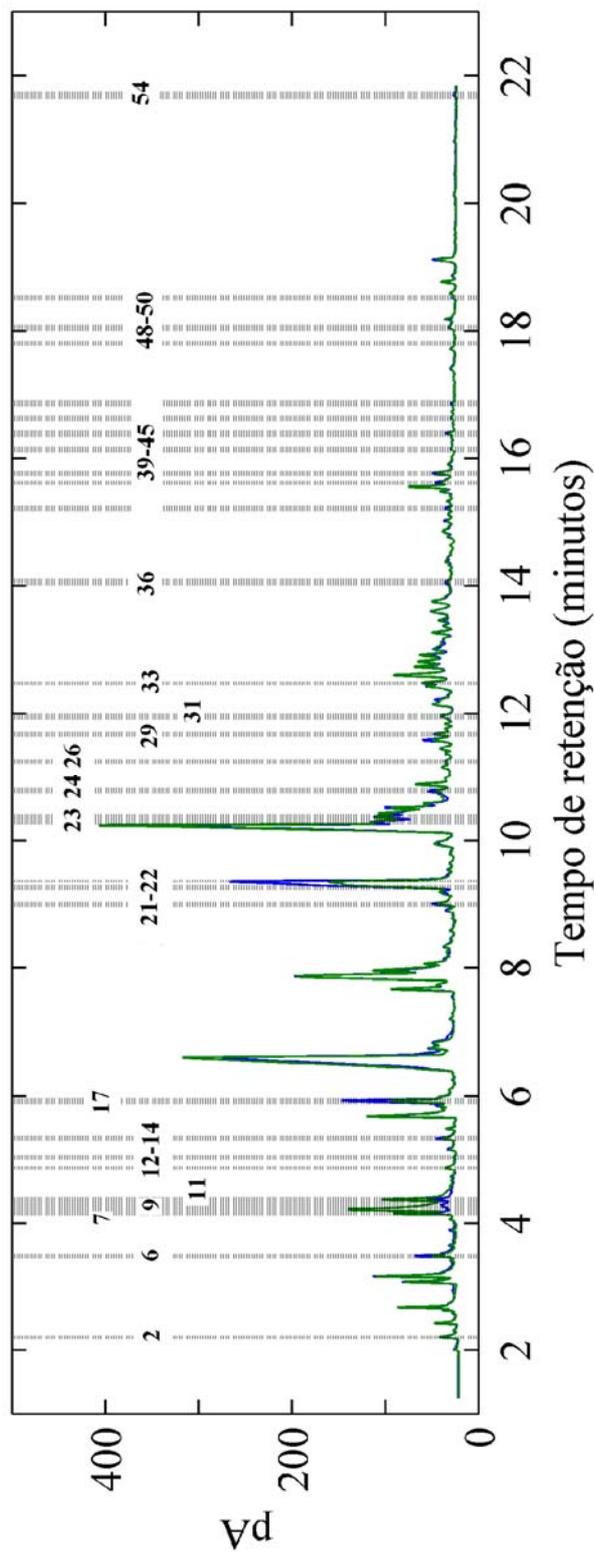
Anexo 1



Anexo 2



Anexo 3



Capítulo 10

Previsão de atributos sensoriais dos cafés arábica utilizando espectroscopia no infravermelho próximo - Safra 2008/2009

Resultados finais

Resumo

A análise de espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR) de amostras de café cru e torrado tem se mostrado bastante promissora para a identificação de espécies, na definição do ponto de torra e para a quantificação de alguns compostos químicos da semente, por exemplo. Por isso, neste capítulo são apresentados modelos quimiométricos de previsão de seis atributos sensoriais, ligados à qualidade da bebida de café arábica, construídos a partir da correlação entre espectros de NIR e análises sensoriais de cafés arábica. Para isso, 51 amostras de cafés arábica cru foram enviadas para avaliação sensorial para os atributos acidez, amargor, aroma, bebida, corpo e qualidade global e, depois de torradas e moídas, analisadas em infravermelho próximo por reflectância difusa. A regressão PLS foi utilizada na construção dos modelos. Através da seleção de variáveis realizada pelo método OPS foram identificadas diversas regiões espectrais relacionadas a cada atributo estudado. Todos os modelos foram validados internamente por validação cruzada e a validação externa de cada um foi realizada com 10 amostras.

Os espectros de infravermelho próximo por reflectância difusa de padrões identificados de compostos existentes na matriz de café, tais como cafeína, trigonelina, sacarose, ácidos clorogênicos, lipídios, proteína e carboidratos foram utilizados para uma melhor compreensão dos resultados.

A realização dos estudos deste capítulo foi uma sugestão dos membros da banca do exame de qualificação do aluno realizado em 04/06/2008.

10.1. Introdução

A técnica espectroscópica utilizando infravermelho próximo (NIRS) vem se tornando uma metodologia muito empregada em análises qualitativas e quantitativas em áreas química, farmacêutica, alimentícia entre outras (Li et al., 2006; Wang et al., 1999; Siebielec et al., 2004; Chen et al., 2006; Cozzolino et al., 2006; Karoui et al., 2006; Cen e He, 2007; Pizarro et al., 2007a). Especificamente com café, vários estudos realizados com NIRS podem ser encontrados na literatura. Dentre eles, foram investigados a discriminação de espécies (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) em variedades puras e na composição de *blends* (Kemsley et al., 1995; Pizarro et al., 2007b; Esteban-Diez et al. 2007), a quantificação de cafeína (Pizarro et al., 2007a), trigonelina, ácidos clorogênicos (Morgano et al., 2001; Bertrand et al 2005), açúcares totais (Morgano et al., 2007), minerais (Morgano et al., 2002), grau de torra, umidade (Alessandrini et al., 2008) e qualidade de cafés expressos (Esteban-Díez et al., 2004a).

No intuito de se obter um método científico, rápido e confiável para a determinação da qualidade da bebida do café, o objetivo deste capítulo é o desenvolvimento de modelos matemáticos de previsão baseado em espectros de infravermelho próximo e análises sensoriais de cafés arábica torrados.

10.2. Material e métodos

10.2.1. Padrões dos compostos

Cafeína (99 % de pureza), trigonelina (99 %), sacarose (99,5 %), 5-CGA (5-ácido cafeoilquínico - 95 %) e caseína (90 %) foram obtidos a partir da Sigma–Aldrich (Munich, Alemanha). A fração lipídica dos grãos verdes foi extraída mecanicamente por prensagem dos mesmos.

10.2.2. Amostras de café da espécie arábica safra 2008/2009

Neste capítulo foram utilizadas 51 amostras de café arábica. A descrição completa delas encontra-se no item 8.2.1 do capítulo 8. Contudo, não foi possível utilizar todas indicadas no item 8.2.1, pois duas delas não foram analisadas por infravermelho próximo.

10.2.3. Processo de torra

Descrito no item 8.2.2 do capítulo 8.

10.2.4. Análise sensorial

A análise sensorial encontra-se descrita no item 8.2.3 do capítulo 8.

10.2.5. Condições experimentais para as análises espectroscópicas

Todos os espectros foram coletados em um espectrômetro Nirsystem 6500 (Foss NIRSystems, Raamsdonksveer, Holanda) equipado com um acessório de reflectância difusa, e um módulo de transporte de amostra. O instrumento é controlado por um computador portátil utilizando o *software* Vision 2.22 (Foss NIRSystems, Raamsdonksveer, Holanda).

Os espectros foram obtidos diretamente sobre as amostras de café torrado e moído usando 256 varreduras na faixa de 1100 - 2500 nm, com 4 cm^{-1} de resolução. Um padrão de poliestireno (4 picos) existente no próprio aparelho foi utilizado como branco. Três diferentes porções de cada amostra eram analisadas de cada vez (triplicatas) sendo colocado aproximadamente 4 g de café torrado e moído na cela de amostragem de quartzo.

10.2.6. Análises quimiométricas

No pré-tratamento dos dados, para reduzir as variações aleatórias (ruído experimental) foi realizado um alisamento segundo Savitzky-Golay com janela tamanho 5 (Savitzky e Golay, 1964). As variações sistemáticas foram reduzidas aplicando-se a 1ª derivada e por último os dados foram centrados na média. A Figura 10.1 A apresenta os dados originais obtidos e a Figura 9.1 B os dados pré-tratados.

Neste capítulo, novamente a seleção inicial das variáveis para os modelos de regressão (PLS) foi realizada utilizando-se o algoritmo OPS. Posteriormente, um estudo destas variáveis pré-selecionadas, juntamente com espectros puros dos compostos presentes no café foi realizado, para que, finalmente as variáveis importantes para cada modelo fossem selecionadas. A regressão por quadrados mínimos parciais (PLS) foi utilizada como método de regressão.

10.3. Resultados e discussão

10.3.1. Modelos de regressão de 6 atributos sensoriais do café arábica brasileiro

Na construção dos modelos de regressão foram utilizados os valores médios das notas de acidez, amargor, aroma, bebida, corpo e qualidade global obtidas através das análises sensoriais realizadas pelos provadores (\mathbf{y}) e os espectros pré-tratados referentes às amostras de café arábica torrado analisados (\mathbf{X}_p).

Para formar os conjuntos de calibração de cada modelo foram selecionados aleatoriamente 123 espectros, correspondentes a 41 amostras, de forma a cobrir toda a faixa de resposta das análises sensoriais. A validação cruzada (interna) realizada com cada conjunto de calibração (123 replicatas) foi realizada retirando-se aleatoriamente 5 amostras por vez (15 replicatas) até que cada amostra (3 replicatas) tenha sido retirada do modelo uma vez. Os 30 espectros restantes para cada modelo,

correspondentes a 10 amostras, foram utilizados para formar os conjuntos de validação externa.

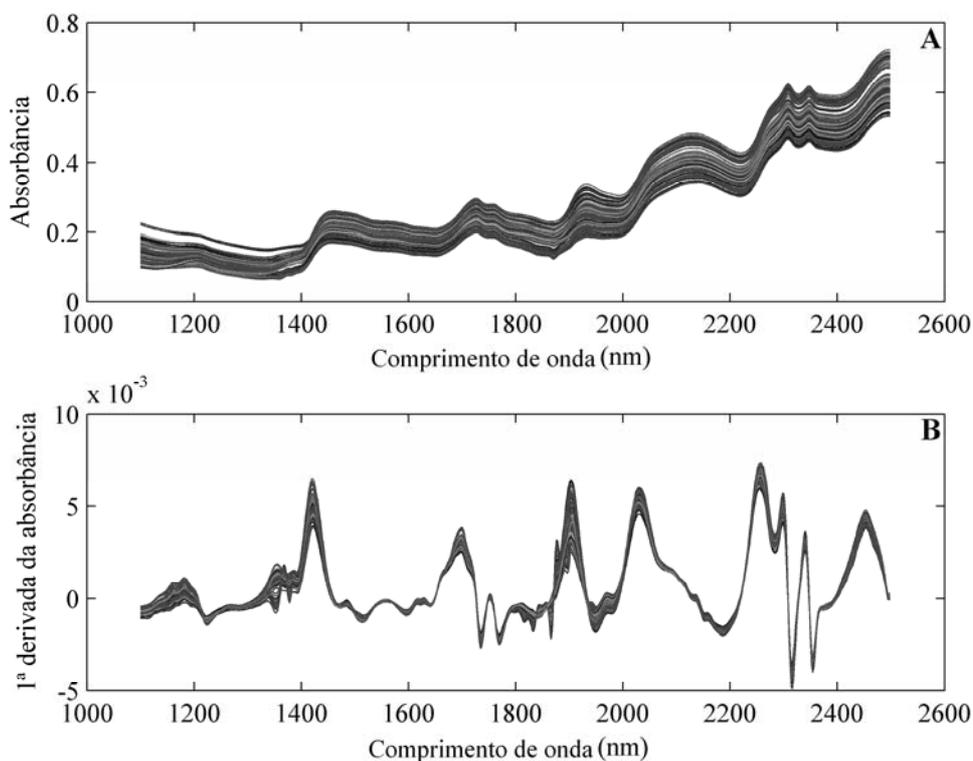
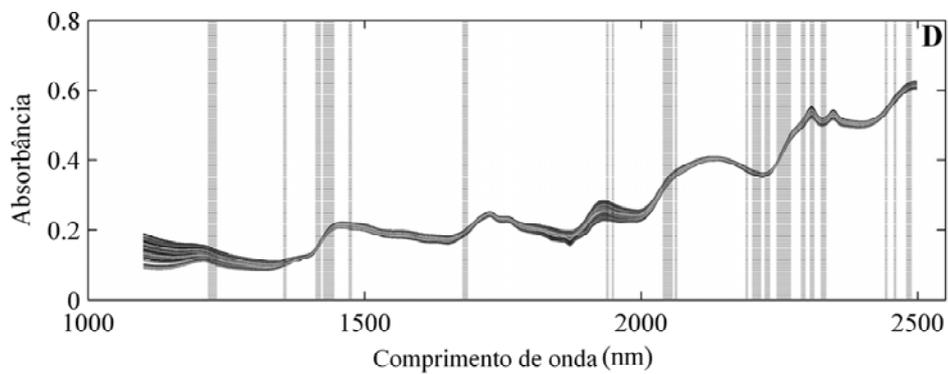
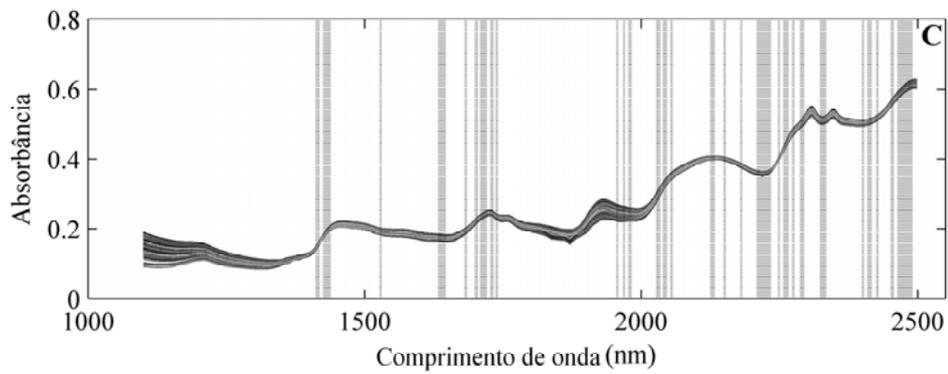
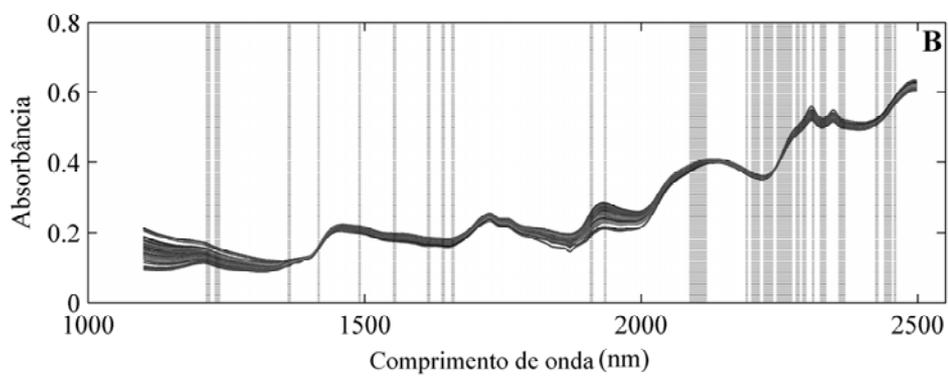
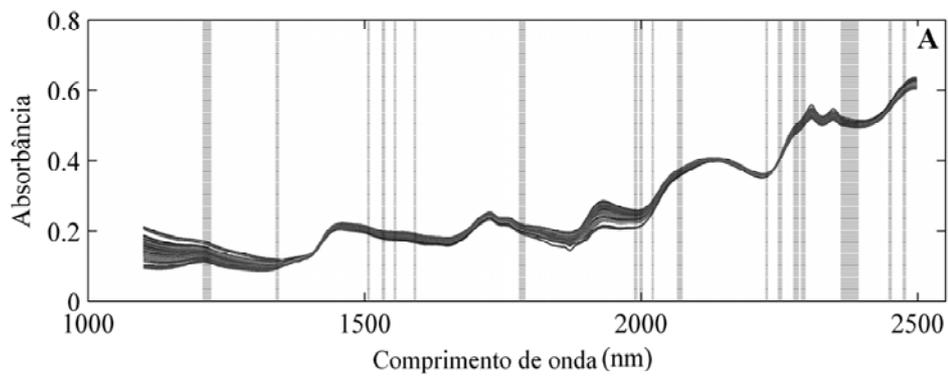


Figura 10.1. Dados espectroscópicos originais (A) e pré-tratados (B).

A etapa de seleção de variáveis para cada modelo de regressão foi realizada sobre a matriz de dados pré-tratada \mathbf{X}_p (153x700), deste modo, foram selecionadas 76 variáveis (18 regiões) para a construção do modelo de acidez (A), 116 (23 regiões) para amargor (B), 118 (29 regiões) para aroma (C), 99 (20 regiões) para bebida (D), 143 (29 regiões) para corpo (E) e 131 (21 regiões) para qualidade global (F). Estas variáveis estão indicadas em linhas verticais nas Figuras 10.2.



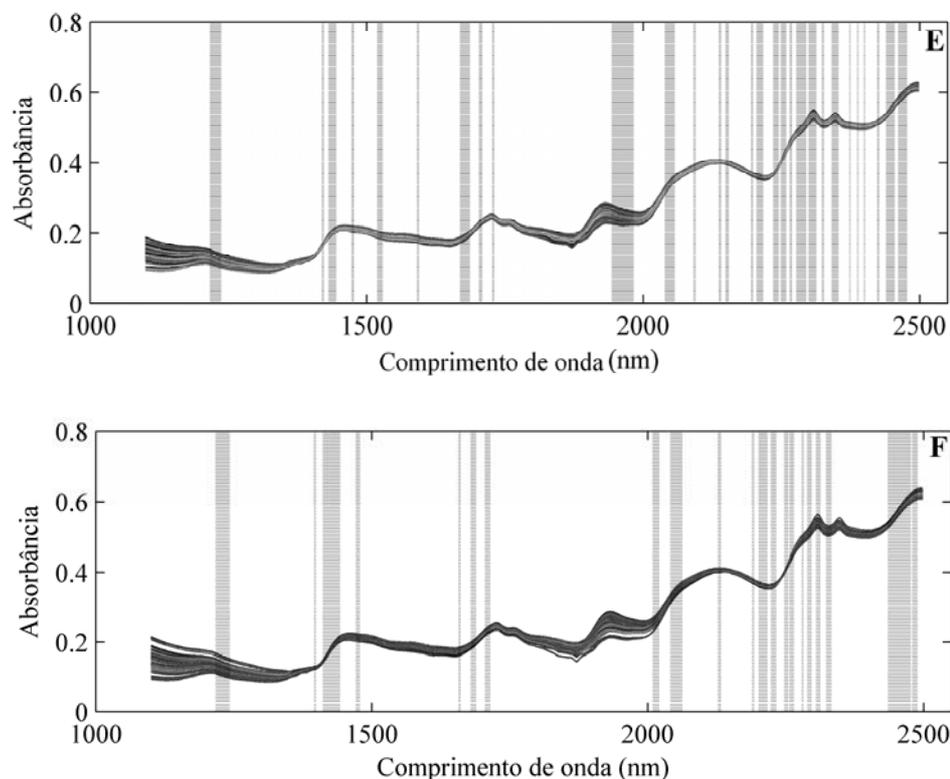


Figura 10.2. Variáveis selecionadas pelo método OPS para construção de cada modelo de regressão. (A) acidez, (B) amargor, (C) aroma, (D) bebida, (E) corpo e (F) qualidade global.

Tabela 10.1. Regiões espectrais selecionadas pelo OPS para os modelos de previsão dos seis atributos sensoriais estudados.

| Regiões selecionadas | Faixa (nm) | Faixas para cada modelo | Vibrações | Grupos |
|----------------------|------------------------------------|--|------------------------------------|--|
| 1 | 1214-1236 ^{A, B, D, E, F} | 1208-1222 ^A , 1214-1220 ^B , 1218-1232 ^D , 1218-1236 ^E , 1218-1242 ^F | 2° overtone de C-H | CH CH ₂ |
| 2 | 1230-1238 ^B | - | 2° overtone de C-H | CH |
| 3 | 1340-1344 ^A | - | 1° overtone de bandas de comb. C-H | CH ₃ |
| 4 | 1352-1358 ^D | - | 1° overtone de bandas de comb. C-H | CH ₃ |
| 5 | 1362-1366 ^B | - | 1° overtone de bandas de comb. C-H | CH ₃ |
| 6 | 1396-1398 ^F | - | 1° overtone de O-H | ArOH CH ₂ CH ₃ |
| 7 | 1412-1444 ^{B-F} | 1416-1418 ^B , 1412-1418 ^C , 1426-1438 ^C , 1412-1444 ^D , 1420-1422 ^E , 1432-1444 ^E , 1412-1442 ^F , | 1° overtone de O-H e N-H | ArOH CH CH ₂ H ₂ O ROH CONH ₂ |

Capítulo 10. Previsão de atributos sensoriais dos cafés arábica utilizando infravermelho próximo

| | | | | |
|----|------------------------------|--|--|---|
| 8 | 1472-1478 ^{D, E, F} | 1472-1476 ^D , 1474-1476 ^E , 1472-1478 ^F | 1º overtone de N-H | ROH CONHR CONH ₂ |
| 9 | 1506-1508 ^A | - | 1º overtone de N-H | RNH ₂ |
| 10 | 1520-1528 ^E | - | 1º overtone de N-H | RNH ₂ |
| 11 | 1528-1530 ^C | - | 1º overtone de N-H | RNH ₂ |
| 12 | 1532-1536 ^A | - | 1º overtone de N-H | RNH ₂ |
| 13 | 1552-1556 ^{A, B} | 1554-1556 ^A , 1552-1556 ^B | Região de 1º overtone | - |
| 14 | 1590-1594 ^{A, E} | 1590-1592 ^A , 1592-1594 ^E | Região de 1º overtone | - |
| 15 | 1614-1618 ^B | - | 1º overtone de C-H | ArCH |
| 16 | 1634-1646 ^{B, C} | 1640-1644 ^B , 1634-1646 ^C | 1º overtone de C-H | ArCH CH ₃ |
| 17 | 1658-1662 ^{B, F} | 1658-1662 ^B , 1658-1660 ^F | 1º overtone de C-H | CH ₃ |
| 18 | 1678-1688 ^{C- F} | 1682-1684 ^C , 1678-1686 ^D , 1670-1686 ^E , 1680-1688 ^F | 1º overtone de C-H | CH ₂ CH ₃ |
| 19 | 1700-1704 ^C | - | 1º overtone de C-H | CH CH ₂ CH ₃ |
| 20 | 1704-1720 ^{C, E, F} | 1710-1720 ^C , 1704-1708 ^E , 1706-1714 ^F | 1º overtone de C-H | CH CH ₂ CH ₃ |
| 21 | 1728-1732 ^{C, E} | 1728-1732 ^C , 1728-1730 ^E | 1º overtone de C-H | CH CH ₂ |
| 22 | 1738-1740 ^C | - | 1º overtone de C-H e S-H | CH CH ₂ SH |
| 23 | 1780-1790 ^A | - | 1º overtone de C-H | CH |
| 24 | 1908-1912 ^B | - | 2º overtone de estiramento C=O | H ₂ O POH RCO ₂ H |
| 25 | 1934-1636 ^B | - | 2º overtone de estiramento C=O | H ₂ O POH CONH ₂ RCO ₂ R' |
| 26 | 1938-1940 ^D | - | 2º overtone de estiramento C=O | H ₂ O RCO ₂ R' CONH ₂ |
| 27 | 1944-1982 ^{C, D, E} | 1956-1958 ^C , 1968-1970 ^C , 1978-1982 ^C , 1948-1950 ^D , 1944-1982 ^E | 2º overtone de estiramento C=O | H ₂ O RCO ₂ R' CONH ₂ |
| 28 | 1988-1992 ^A | - | 1º overtone de C=O e bandas de comb. O-H | - |
| 29 | 1998-2002 ^A | - | 1º overtone de C=O e bandas de comb. O-H | - |
| 30 | 2010-2022 ^{A, F} | 2020-2022 ^A , 2010-2020 ^F | 1º overtone de C=O e bandas de comb. O-H | - |
| 31 | 2028-2034 ^C | - | 1º overtone de C=O e bandas de comb. O-H | - |
| 32 | 2040-2074 ^{A, C- F} | 2066-2074 ^A , 2040-2046 ^C , 2054-2056 ^C , 2040- | 1º overtone de C=O e bandas de | CO |

Capítulo 10. Previsão de atributos sensoriais dos cafés arábica utilizando infravermelho próximo

| | | | | |
|----|------------------------------|---|--|--|
| | | 2056 ^D , 2062-2064 ^D , 2040-2056 ^E , 2042-2062 ^F | comb. O-H | |
| 33 | 2088-2118 ^{B, E} | 2088-2118 ^B , 2092-2094 ^E | 1 ^o overtone de C=O e bandas de comb. O-H | ROH CONH ₂ (R) CO |
| 34 | 2126-2132 ^{C, F} | 2126-2132 ^C , 2128-2132 ^F | Bandas de combinação N-H | CONH ₂ (R) |
| 35 | 2138-2140 ^E | - | Bandas de combinação N-H | CONH ₂ (R) |
| 36 | 2150-2154 ^{C, E} | 2150-2152 ^C , 2150-2154 ^E | Bandas de combinação N-H | RNH ₂ |
| 37 | 2180-2182 ^C | - | Bandas de combinação N-H | RNH ₂ CC |
| 38 | 2190-2192 ^{B, D, F} | - | 1 ^o overtone de O-H | RNH ₂ CC CHO |
| 39 | 2196-2198 ^E | - | Bandas de combinação N-H e O-H | ArOH CH ₂ CH ₃ |
| 40 | 2200-2238 ^{A- F} | 2226-2228 ^A , 2200-2214 ^B , 2222-2238 ^B , 2210-2234 ^C , 2202-2216 ^D , 2224-2232 ^D , 2206-2216 ^E , 2202-2216 ^F , 2224-2232 ^F | Bandas de combinação N-H e O-H | RNH ₂ CC CHO |
| 41 | 2238-2244 ^E | - | Bandas de combinação N-H e O-H | RNH ₂ CHO CH ₃ |
| 42 | 2246-2270 ^{A- F} | 2248-2254 ^A , 2248-2272 ^B , 2248-2250 ^C , 2258-2266 ^C , 2246-2270 ^D , 2250-2258 ^E , 2266-2268 ^E , 2248-2254 ^F , 2258-2264 ^F | Bandas de combinação N-H e O-H | H ₂ O CH ₃ |
| 43 | 2274-2298 ^{A- F} | 2276-2284 ^A , 2290-2296 ^A , 2280-2286 ^B , 2292-2298 ^B , 2274-2276 ^C , 2288-2294 ^C , 2290-2296 ^D , 2278-2294 ^E , 2280-2282 ^F , 2290-2296 ^F | Bandas de combinação C-H + C-H | H ₂ O CH ₂ CH ₃ |
| 44 | 2300-2316 ^{B, D- F} | 2310-2312 ^B , 2306-2312 ^D , 2300-2312 ^E , 2306-2312 ^F | Bandas de combinação CH + CC | CH CH ₂ CH ₃ |
| 45 | 2324-2334 ^{B- F} | 2324-2334 ^B , 2324-2334 ^C , 2326-2334 ^D , 2324-2326 ^E , 2324-2332 ^F | Bandas de combinação C-H + C-H | CH CH ₂ CH ₃ |
| 46 | 2342-2352 ^E | - | Bandas de combinação CH + CC | CH CH ₂ CH ₃ |
| 47 | 2358-2394 ^{A, E} | 2362-2394 ^A , 2358-2368 ^B , 2374 ^E , 2388 ^E | Bandas de combinação C-H + C-H | CH CH ₂ CH ₃ |
| 48 | 2400-2402 ^{C, E} | 2400-2402 ^C , 2400 ^E | Bandas de combinação C-H + C-H | CH CH ₂ CH ₃ |
| 49 | 2410-2416 ^C | - | Bandas de combinação C-H + C-H | CH CH ₂ |
| 50 | 2424-2428 ^{B, C, E} | 2424-2428 ^B , 2426-2428 ^C , 2424-2426 ^E | Bandas de combinação C-H + C-H | CH CH ₂ |
| 51 | 2436-2475 ^{A- F} | 2448-2452 ^A , 2440-2452 ^B , 2458-2460 ^B , 2452-2456 ^C , 2442-2444 ^D , 2458-2460 ^D , 2440-2454 ^E , 2436-2475 ^F | Bandas de combinação C-H + C-H | CH |
| 52 | 2464-2490 ^{A, C- F} | 2474-2478 ^A , 2460-2490 ^C , 2480-2488 ^D , 2464-2476 ^E , 2480-2488 ^F | Bandas de combinação CH + CC | - |

A. Acidez; B. Amargor; C. Aroma; D. Bebida; E. Corpo; F. Qualidade global. Fonte: Foss

Como mencionado no item 8.3.2 do capítulo 8, os gráficos de *leverage* versus resíduo de *Student* nos fornecem informações importantes sobre a presença ou não de amostras anômalas. Felizmente, no caso do conjunto de dados espectroscópicos estudados neste capítulo, os modelos de regressão construídos para o todos os atributos também apresentaram algumas replicatas com valores elevados de *leverage* e outras com valores elevados de resíduo. Porém, nos seis modelos nenhuma replicata apresentou valores elevados para *leverage* e resíduo, ou seja, nenhuma amostra foi considerada atípica (Figura 10.3). O limite de confiança utilizado para o valor limite do *leverage* foi de 95 % em todos os casos.

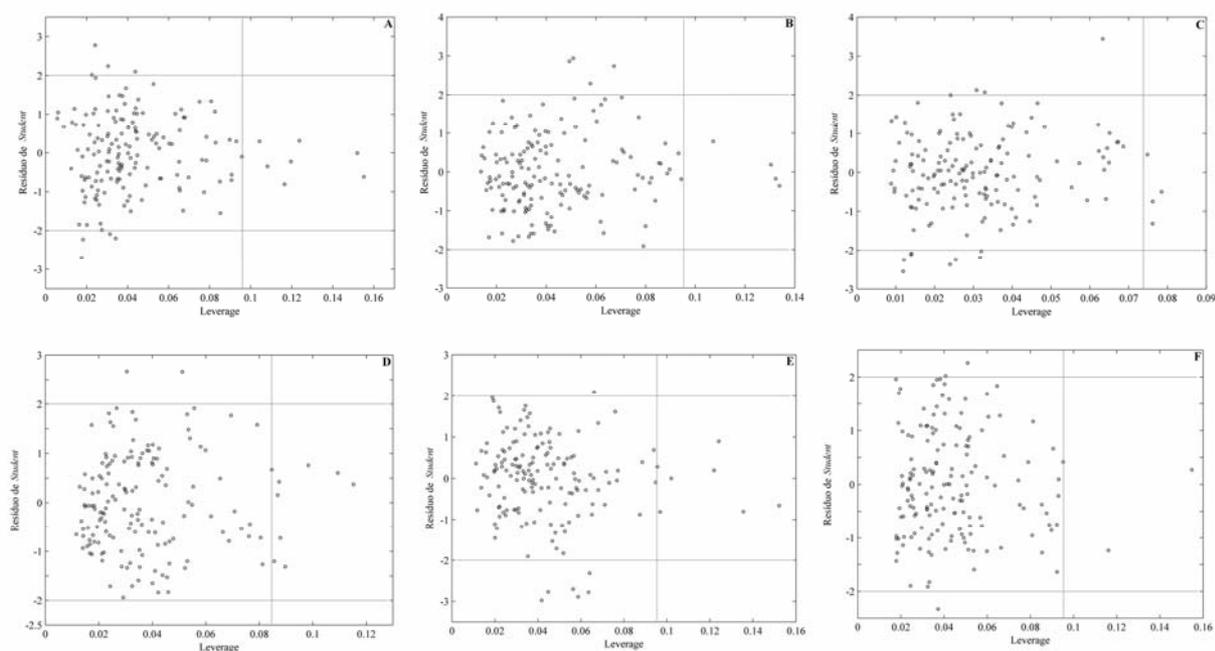


Figura 10.3. Gráficos de *Leverage* x Resíduo de *Student* dos 6 modelos de regressão. (A) acidez, (B) amargor, (C) aroma, (D) bebida, (E) corpo e (F) qualidade global.

O número de variáveis latentes, utilizado nos modelos PLS, foi determinado a partir dos menores valores de RMSECV exibidos nos conjuntos de validação cruzada.

Esses valores estão indicados, para cada modelo, na Tabela 10.2. Essa tabela indica ainda os parâmetros de erros de validação cruzada (RMSECV) e coeficiente de correlação da validação cruzada (r_{vc}) entre valores experimentais *versus* os valores preditos pelos modelos PLS com seus respectivos números de variáveis latentes utilizadas.

Tabela 10.2. Parâmetros estatísticos calculados para os modelos de regressão na validação cruzada.

| Modelos | N° VL | RMSECV | r_{vc} |
|------------------|-------|-------------|-------------|
| Acidez | 8 | 0,28 ± 0,01 | 0,84 ± 0,02 |
| Amargor | 8 | 0,35 ± 0,01 | 0,87 ± 0,01 |
| Aroma | 7 | 0,31 ± 0,01 | 0,93 ± 0,00 |
| Bebida | 8 | 0,38 ± 0,01 | 0,91 ± 0,01 |
| Corpo | 9 | 0,27 ± 0,01 | 0,88 ± 0,01 |
| Qualidade global | 8 | 0,39 ± 0,01 | 0,91 ± 0,00 |

Os desvios-padrão indicados para cada valor de RMSECV e r_{vc} na Tabela 10.2 foram calculados, pois devido a retirada de 5 amostras por vez na etapa de validação cruzada (10 % do conjunto de dados), pequenas desvios nos valores finais destes dois parâmetros podem ocorrer cada vez que os modelos forem recalculados. Neste caso, os baixos valores de desvio-padrão demonstram a estabilidade dos modelos.

Em média, 99 % e 86 % da variância dos blocos **Y** e **X** (respectivamente) utilizados nas calibrações foram necessários para descrever cada modelo de regressão.

Os modelos construídos para a predição das notas foram validados utilizando o conjunto externo de validação de 10 amostras, relativos a 30 replicatas. A Figura 10.4 representa os valores de referência dos provadores *versus* os valores preditos pelos modelos para as amostras de validação distribuídas entre os valores dos conjuntos de validação cruzada. A Tabela 10.3 apresenta os valores numéricos obtidos para as amostras de validação para cada modelo de regressão calculado. Os valores de

RMSEP dos modelos foram 0,30 para acidez, 0,37 para o amargor, 0,25 para o aroma, 0,30 para corpo, 0,37 para bebida e 0,37 para qualidade global.

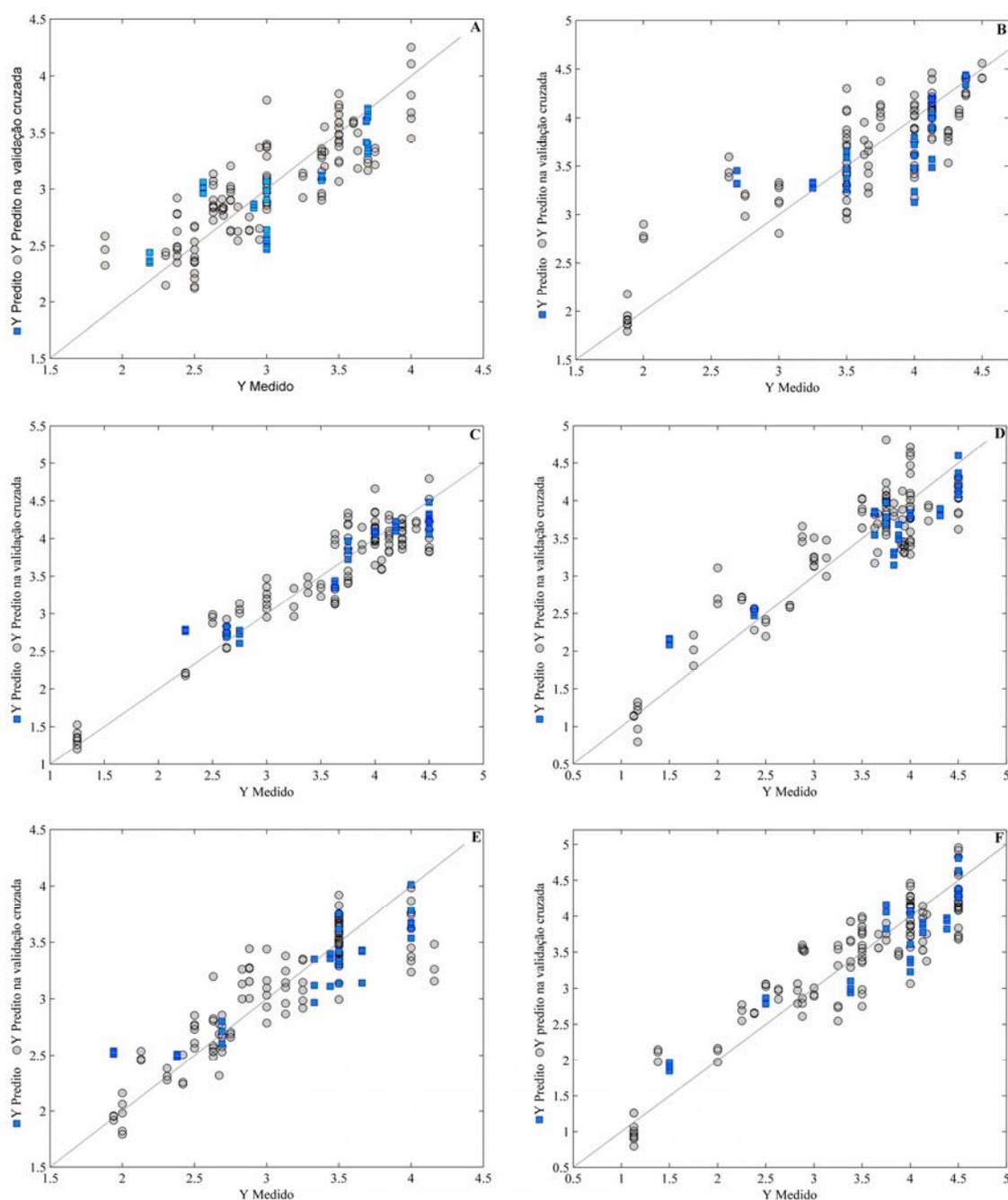


Figura 10.4. Representação gráfica das notas dos provadores para as amostras da validação cruzada (○) e validação externa (□) versus as notas previstas pelos modelos. Acidez (A), amargor (B), aroma (C), bebida (D), corpo (E) e qualidade global (F).

Tabela 10.3. Valores médios e desvios padrão dos seis atributos sensoriais atribuídos pelos provadores e previstos pelos modelos de regressão.

| Amostras | Acidez | | Amargor | | Aroma | |
|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Medido | Previsto | Medido | Previsto | Medido | Previsto |
| 1 | 3,00 ± 0,06 | 2,56 ± 0,08 | 4,13 ± 0,63 | 3,65 ± 0,22 | 2,75 ± 0,29 | 2,70 ± 0,09 |
| 2 | 3,70 ± 0,02 | 3,35 ± 0,05 | 4,38 ± 0,75 | 4,40 ± 0,06 | 4,19 ± 0,52 | 4,16 ± 0,06 |
| 3 | 3,69 ± 0,06 | 3,54 ± 0,11 | 4,13 ± 0,63 | 4,12 ± 0,11 | 3,63 ± 0,48 | 3,39 ± 0,05 |
| 4 | 3,38 ± 0,03 | 3,10 ± 0,02 | 4,13 ± 0,63 | 4,15 ± 0,08 | 3,75 ± 0,29 | 3,84 ± 0,12 |
| 5 | 2,56 ± 0,05 | 3,01 ± 0,05 | 2,69 ± 0,63 | 3,36 ± 0,08 | 2,25 ± 0,00 | 2,78 ± 0,01 |
| 6 | 2,19 ± 0,03 | 2,38 ± 0,05 | 3,25 ± 0,50 | 3,31 ± 0,03 | 2,63 ± 0,48 | 2,75 ± 0,07 |
| 7 | 2,91 ± 0,06 | 2,85 ± 0,02 | 3,50 ± 0,50 | 3,46 ± 0,20 | 4,50 ± 0,48 | 4,24 ± 0,10 |
| 8 | 3,00 ± 0,04 | 2,53 ± 0,05 | 3,50 ± 0,63 | 3,42 ± 0,15 | 4,00 ± 0,21 | 4,08 ± 0,02 |
| 9 | 3,7 ± 0,02 | 3,68 ± 0,04 | 4,00 ± 0,75 | 3,71 ± 0,10 | 4,50 ± 0,52 | 4,17 ± 0,10 |
| 10 | 3,00 ± 0,04 | 2,99 ± 0,08 | 4,00 ± 0,63 | 3,28 ± 0,18 | 4,50 ± 0,65 | 4,34 ± 0,13 |

| | Bebida | | Corpo | | Qualidade global | |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------|-------------|
| | Medido | Previsto | Medido | Previsto | Medido | Previsto |
| 1 | 3,83 ± 0,29 | 3,51 ± 0,07 | 3,33 ± 0,58 | 3,15 ± 0,19 | 3,38 ± 0,48 | 3,01 ± 0,08 |
| 2 | 4,31 ± 0,38 | 3,82 ± 0,07 | 3,44 ± 0,38 | 3,29 ± 0,15 | 4,38 ± 0,25 | 3,91 ± 0,08 |
| 3 | 3,63 ± 0,48 | 3,52 ± 0,07 | 3,66 ± 0,58 | 3,33 ± 0,16 | 4,13 ± 0,25 | 3,85 ± 0,07 |
| 4 | 3,88 ± 0,14 | 3,47 ± 0,05 | 2,69 ± 0,31 | 2,71 ± 0,10 | 4,00 ± 0,00 | 3,33 ± 0,09 |
| 5 | 1,50 ± 0,20 | 1,83 ± 0,06 | 1,94 ± 0,24 | 2,52 ± 0,01 | 1,50 ± 0,20 | 1,91 ± 0,06 |
| 6 | 2,38 ± 0,43 | 2,54 ± 0,02 | 2,38 ± 0,43 | 2,50 ± 0,02 | 2,50 ± 0,13 | 2,81 ± 0,05 |
| 7 | 3,75 ± 0,29 | 3,88 ± 0,21 | 3,50 ± 0,48 | 3,50 ± 0,33 | 3,75 ± 0,41 | 4,01 ± 0,17 |
| 8 | 4,00 ± 0,31 | 3,77 ± 0,05 | 3,50 ± 0,25 | 3,35 ± 0,06 | 4,00 ± 0,25 | 3,90 ± 0,25 |
| 9 | 4,50 ± 0,24 | 4,25 ± 0,12 | 4,00 ± 0,50 | 3,61 ± 0,07 | 4,50 ± 0,25 | 4,28 ± 0,02 |
| 10 | 4,50 ± 0,41 | 4,35 ± 0,07 | 4,00 ± 0,41 | 3,82 ± 0,18 | 4,50 ± 0,50 | 4,61 ± 0,22 |

Mesmo sabendo da importância dos inúmeros compostos presentes no café torrado (Borém et al., 2008), quando se trata da qualidade da bebida café, uma atenção especial é dada aos ácidos clorogênicos, trigonelina, cafeína, proteínas, lipídios, açúcares e polissacarídeos. Os ácidos clorogênicos, por exemplo, são relacionados a intensidade da adstringência, amargor (Clifford e Ohiokpehai, 1983; Illy e Viani, 2005; Clifford, 1985; Clarke, 1986) e acidez (Verardo et al., 2002). A trigonelina e a sacarose estão envolvidas na formação de compostos do aroma, tais

como piridinas, pirróis e furanos (De Maria et al., 1999; Ribeiro et al., 2009), sendo ainda a sacarose responsável pela doçura da bebida e um precursor do amargor (Clifford, 1985; Clarke, 1986). Os polissacarídeos são responsáveis em parte pela formação do creme (espuma) do café (Nunes e Coimbra, 1998), as proteínas podem ser responsáveis pelo corpo e o aroma (Esteban-Diez et al., 2004b; De Maria et al., 1999), lipídios são altamente correlacionados com o corpo do café (Illy e Viani, 2005) e cafeína com o amargor (Keast e Roper, 2007).

De modo a identificar os compostos presentes no café que poderiam explicar, pelo menos em parte, as regiões selecionadas e indicadas na Tabela 10.1 para os atributos sensoriais modelados, os espectros puros dos principais compostos presentes foram adquiridos e aparecem indicados na Figura 10.5.

Já a Figura 10.6 foi construída utilizando as regiões de alta absorbância dos espectros puros da figura anterior, a fim de tornar mais fácil a visualização das informações relevantes.

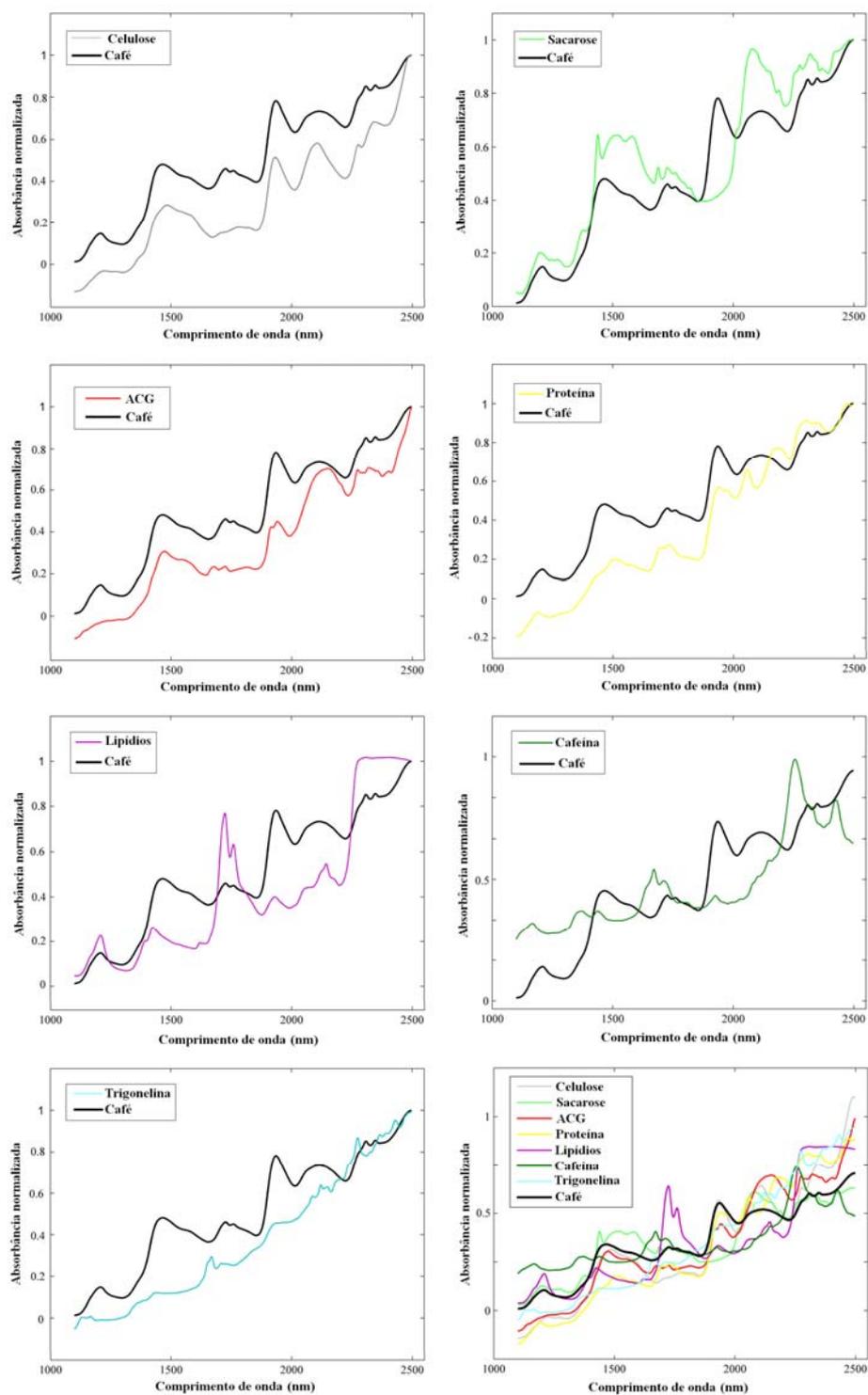


Figura 10.5. Espectros de infravermelho próximo por refletância difusa dos padrões dos principais compostos constituintes do café sobrepostos aos espectros do café arábica cru.

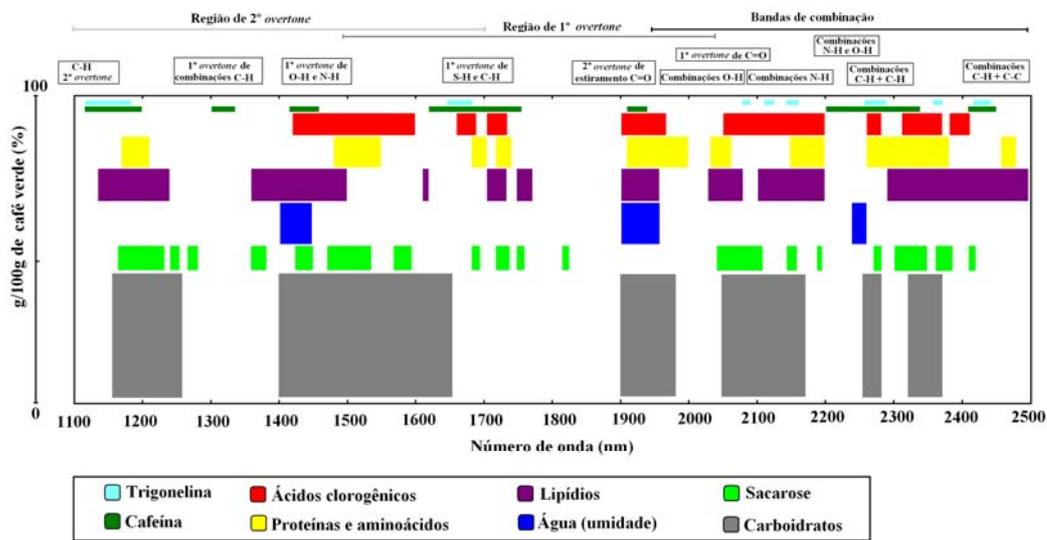


Figura 10.6. Representação esquemática das regiões de absorção dos principais compostos do café arábica cru na região do infravermelho próximo. A diferença vertical das barras de cores diferentes indica a concentração aproximada em % dos compostos presentes no café, segundo Toci et al. (2006).

10.3.1.1. Acidez

Algumas pesquisas indicam que a acidez da bebida café ocorre devido ao ácido fosfórico, ácidos clorogênicos, ácido quínico e ácidos orgânicos alifáticos presentes em no café torrado (Clifford, 1985; Clarke, 1986). Observando o comprimento de onda das 18 regiões selecionadas pelo método OPS para o modelo de acidez (Tabela 10.1), pode-se notar 8 delas relevantes as absorções das estruturas de ácidos alifáticos e clorogênicos. As regiões **28**, **29**, **30** e **32** (1º overtone de bandas de combinação C=O e O-H) e **13** (1º overtone de C-H) podem ser de ácidos orgânicos. Devido ao fato de não termos analisado ácidos alifáticos puros, somente a região **32** apresenta correlação entre a acidez e os ácidos clorogênicos, como mostrado na Figura 10.6. Esta correlação é reafirmada nas regiões **42**, **43** e **47**, onde as absorbâncias são relacionadas a bandas de combinação O-H e CH + CH, de acordo com as análises dos compostos puros (Figura 10.6).

Segundo Esteban-Diez et al. (2004b) a influência dos ácidos clorogênicos pode ser justificada levando em consideração a decomposição dos mesmos durante a torra em uma infinidade de grupos de compostos diretamente ligados a acidez. Neste trabalho, um comprimento de onda selecionado pelos autores para acidez também foi utilizado em nosso modelo de regressão para esse mesmo atributo (1212 nm). No caso do atributo amargor também foi utilizado um comprimento de onda (2069 nm) e para corpo, de nove comprimentos selecionados pelos autores, quatro foram selecionados pelo método OPS na construção do modelo de corpo (1968, 1972, 1978 e 2142 nm).

10.3.1.2. Amargor

O amargor é atribuído, em parte, à cafeína e alguns compostos heterocíclicos, peptídicos, vários produtos da degradação dos ácidos clorogênicos e caramelização de açúcares durante a torra (Clifford, 1985; Clarke, 1986). Assim, o amargor é altamente correlacionado ao grau de torra dos grãos.

Para o modelo de amargor, quinze das 23 regiões selecionadas pelo método OPS podem ser relacionadas aos ácidos clorogênicos e à cafeína segundo a Figura 10.6: região **7** (1° overtone de O-H e N-H), regiões **13**, **15-17** (1° overtone de C-H), **24**, **25** (1° overtone do estiramento C=O), **33** (1° overtone do estiramento C=O e bandas de combinação O-H), **38** (1° overtone de O-H), **42** (bandas de combinação N-H e O-H), **43-45**, **50** e **51** (bandas de combinação C-H + C-H).

10.3.1.3. Corpo

O atributo corpo é intimamente correlacionado a lipídios emulsionados, o que significa que a contribuição de certas bandas (comprimentos de onda) ligadas a esta classe de compostos pode ser consistentemente justificada (Illy e Viani, 2005).

Assim, no caso do atributo corpo, a partir das 29 regiões selecionadas pelo método OPS (Tabela 10.1), 15 delas (**7, 20, 21, 32, 35, 36, 39, 44-48, 50, 51 e 52**) encontram-se nas regiões de absorção de lipídios (Figura 10.6.) Muito embora, 10 deles coincidem também com a absorção de ácidos clorogênicos e 8 com regiões características de proteínas. Mesmo assim, esse resultado é um forte indicativo sobre a relação entre lipídios e o atributo corpo, confirmando informações da literatura (Illy e Viani, 2005). Os resultados sugerem ainda a relação do corpo com proteínas e ácidos clorogênicos. A influência na quantidade de proteínas na bebida pode ser explicada pela viscosidade da mesma (a viscosidade é uma sensação fundamental que contribui muito para a percepção do corpo) representa uma medida direta deste parâmetro (Esteban-Diez et al., 2004b).

10.3.1.4. Aroma, bebida e qualidade global

De acordo com as definições dos atributos aroma, bebida e qualidade global descritas no item 9.3.2.3 do capítulo 9, conclui-se que a qualidade global é dependente do conjunto de vários atributos sensoriais estudados acima, sendo especialmente ligada ao aroma e à bebida. Então, é de se esperar que cafés com ótimo aroma e bebida tenham uma qualidade global elevada.

Um total de 9 regiões espectrais (**7, 18, 32, 40, 42, 43, 45, 51 e 52**) selecionadas são importantes para esses 3 atributos (aroma, bebida e qualidade global) e mais 6 regiões são importantes para um deles (aroma e bebida) juntamente com a qualidade global (**1, 8, 20, 34, 38 e 44**).

As regiões **7** (1412-1444 nm), **32** (2040-2082 nm), **42** (2246-2270 nm), **43** (2274-2298 nm) e **45** (2324-2334 nm), por exemplo, apresentam absorbâncias importantes para a maioria dos compostos indicados na Figura 10.6. Outras regiões apresentam absorbâncias mais específicas tais como, as regiões **1** (1218-1242 nm), **7** (1412-1444 nm), **44** (2306-2312 nm) e **45** (2324-2332 nm) podem ser correlacionadas

com sacarose e carboidratos ou produtos de suas degradações; a região **8** (1472-1478 nm) com ácidos clorogênicos, fenóis e produtos de degradação; os comprimentos de onda indicados na região **40** (2202-2216 / 2224-2232 nm) com a cafeína; **34** (2128-2132 nm) e **38** (2190-2192 nm) podem ser correlacionados com proteínas e/ou ácidos clorogênicos e seus produtos de degradação. Por fim, as regiões **20** (1706-1714 nm), **51** (2436-2475 nm) e **52** (2480-2488 nm) apresentam alta correlação com lipídios. Isso demonstra a importância de todos os compostos existentes na matriz do café para a determinação da qualidade global, do aroma e da bebida.

10.4. Conclusões

Os modelos de regressão PLS, utilizando dados espectroscópicos de cafés arábica torrados, previram satisfatoriamente todos os atributos sensoriais propostos pelo trabalho (acidez, amargor, aroma, bebida, corpo e qualidade global). A seleção de variáveis foi uma etapa primordial para que pudéssemos encontrar as regiões espectrais que descreveriam melhor cada atributo sensorial estudado, uma vez que a sobreposição de informações no infravermelho próximo dificulta a seleção visual.

Além do investimento inicial relativamente baixo na aquisição de um aparelho de infravermelho próximo, comparado com outras técnicas analíticas, essa metodologia aparece como uma ótima alternativa no monitoramento desses e de vários outros atributos sensoriais e químicos importantes para a qualidade dos cafés brasileiros.

Capítulo 11

Conclusões finais e perspectivas futuras

11.1. Considerações iniciais

11.1.1. Sobre a idéia inicial da tese

Atualmente, a elevada demanda industrial fez com que a procura por métodos analíticos específicos para a análise de seus produtos fosse intensificada. Um exemplo claro dessa necessidade de novos métodos ocorre nos casos em que provadores são utilizados na determinação da qualidade final de um dado produto, pois esses profissionais passaram a ficar sobrecarregados e o treinamento de novos, muitas vezes, ainda não é tão rápido quanto o esperado.

A quimiometria, de uma forma geral, passou a ser utilizada em vários processos industriais, contribuindo desde a execução de planejamento de experimentos para a otimização das condições experimentais com diminuição de gastos e tempo de análise, até na manutenção do controle de certos processos. No caso específico da bebida do café, a construção de modelos quimiométricos de previsão dos atributos fornecidos por provadores, utilizando-se diferentes metodologias analíticas tornou-se um caminho promissor a ser explorado.

Contudo, o intuito da construção desses modelos de previsão não é acabar ou restringir o uso de provadores nas indústrias e empresas de exportação. Ao contrário, é criar uma metodologia instrumental para auxiliá-los nas numerosas análises diárias. Mesmo porque, esses modelos quimiométricos são calibrados por esses provadores de acordo com a necessidade do mercado consumidor a quem eles atendem.

Segundo Márcio da Cruz, provador de café da empresa norte americana *Starbucks*, uma metodologia de avaliação instrumental de qualidade de bebida,

complementando as análises realizadas por provadores, traria, certamente, um acréscimo significativo no valor agregado do produto que sua empresa produz.

No caso dos cafés estudados nesta tese, a utilização apenas de diferentes variedades de uma única espécie, *C. arabica*, aconteceu devido a dois motivos: (1) devido à maior importância econômica desta espécie para as exportações brasileiras e mundiais, frente às outras; (2) ao fato de não existir até hoje uma classificação sensorial oficial de outras espécies. Isso não quer dizer que a espécie *C. canephora* (segunda mais comercializada) também não desempenhe um papel de destaque, pois sua comercialização é de grande valor na elaboração de *blends* e produção de cafés solúveis, tendo em vista que os cafés robustas apresentam maior teor de sólidos solúveis.

Para a escolha da metodologia instrumental, o “preparo de amostra” foi considerado como uma das etapas mais importantes exigidas nas universidades, entidades de pesquisas e principalmente nas indústrias. Ou seja, o processo que o analista deve desenvolver para que os compostos de interesse presentes na matriz estudada possam ser analisados pelos instrumentos sem alterá-los e com a presença mínima de interferentes.

Desse modo, como os voláteis de café torrado são conhecidamente importantes para análises sensoriais (elevada relação com a qualidade) e passam, geralmente, por apenas um tipo de preparo de amostra, extração direta do *headspace*, eles foram inicialmente escolhidos como os analitos de interesse para a correlação com as análises sensoriais.

Por fim, a técnica de SPME foi selecionada e utilizada com êxito na extração dos voláteis, comprovando todas as suas vantagens descritas na literatura, como por exemplo, a extração e concentração de diversos analitos simultaneamente e a ótima reprodutibilidade.

11.1.2. Idéias emergentes durante o período

Com o decorrer dos experimentos de SPME, nos deparamos com a possibilidade da aplicação de novos métodos analíticos, tais como a espectroscopia no infravermelho e a ressonância magnética nuclear, por exemplo. Isso ocorreu, pois após a torra dos grãos e a extração de seus voláteis o restante das amostras de café analisadas por SPME eram descartadas ou consumidas e deste modo, estávamos deixando de explorar todo o potencial de informações contidas nas amostras torradas.

Então, de acordo com as possibilidades encontradas na época, a espectroscopia no infravermelho próximo por refletância difusa foi introduzida em nossas análises.

11.1.3. Seleção e interpretação das variáveis

Um questionamento importante ocorrido durante o desenvolvimento da tese foi a investigação dos resultados quimiométricos obtidos, principalmente a interpretação das variáveis selecionadas por algoritmos de seleção de variáveis.

Essa investigação é importante, pois a experiência nos mostra que algumas variáveis encontradas e utilizadas em alguns trabalhos da literatura são decorrentes do emprego de todos os dados obtidos nas análises instrumentais, ou seja, ruídos, linha de base, entre outras. Assim as variáveis utilizadas para construção dos modelos poderiam não estar corretamente relacionadas às informações químicas desejadas, mas sim a variações aleatórias presentes nos dados. Nestes casos, a confiabilidade dos modelos construídos ficaria comprometida e, não poderiam ser aplicáveis a outros estudos com o mesmo propósito.

Assim, durante a análise dos resultados obtidos nesta tese, foi dedicada uma atenção especial à escolha e interpretação das variáveis selecionadas pelo algoritmo utilizado em cada modelo e para cada conjunto de dados analíticos estudado (cromatogramas ou espectros). Desse modo, as discussões encontradas nos capítulos

de resultados da tese (7, 8, 9 e 10) apresentam informações confiáveis, e sempre que possível foram explicadas com fundamentos químicos conhecidos, utilizando para isso informações e dados químicos de padrões dos compostos mais relevantes encontrados na matriz do café verde.

11.2. Conclusões finais

Os objetivos principais e secundários desta tese, descritos no capítulo 1, foram atingidos com sucesso. No entanto, durante todo o período de execução das análises, modificações no projeto inicial foram realizadas quando necessárias.

A análise dos perfis cromatográficos de forma semelhante à dos dados espectroscópicos, ao invés de utilizar as tradicionais áreas integradas dos picos detectados, deu uma nova visão ao tratamento de dados cromatográficos de café, pois informações adicionais relevantes puderam ser adquiridas. Os algoritmos de alinhamento e de pré-tratamentos de dados cromatográficos abriram novas portas para a cromatografia em geral e vêm ganhando muitos adeptos por todo mundo.

O emprego da PCA na compressão de dados para construir as superfícies de resposta foi de grande importância na determinação das condições experimentais para a otimização da extração simultânea de compostos voláteis de cafés torrados. Utilizando essa estratégia de otimização de múltiplas respostas foi possível compreender como funciona o equilíbrio de extração do sistema SPME, maximizando a extração dos compostos de interesse. A utilização da 1ª PC como resposta analítica só foi possível, devido à elevada correlação existente entre as áreas relativas dos picos cromatográficos.

Os modelos de regressão PLS gerados a partir do perfil cromatográfico dos voláteis e dos dados espectroscópicos da matriz café se mostraram capazes de prever adequadamente as notas de acidez, amargor, aroma, bebida, corpo e qualidade. Os erros de previsão desses modelos foram compatíveis e geralmente menores que os

erros médios e desvios padrão entre as notas dos provadores. Esses resultados, juntamente com os descritos no anexo, mostram a confiabilidade em se utilizar a cromatografia gasosa e/ou a espectroscopia no infravermelho próximo para o monitoramento de vários atributos sensoriais importantes ligados à qualidade dos cafés arábica.

A busca por marcadores voláteis da qualidade revelou a heterogeneidade dos compostos formados durante a torra e como alguns destes compostos, dependendo de sua concentração no meio, influenciam de maneira negativa ou positiva esse atributo. No capítulo 8, juntamente com os resultados indicados no anexo foi possível descrever alguns compostos marcadores, entretanto, outros ainda poderão ser encontrados, dependendo da técnica analítica utilizada.

11.3. Perspectivas futuras

Há ainda um longo caminho a ser percorrido em relação à procura por novos marcadores voláteis da qualidade do café arábica. Contudo, nossa sugestão é que seria mais representativo se esses marcadores pudessem ser analisados no grão ainda cru, na forma de seus precursores.

Um problema importante, que também gera discussão e pode ser estudado mais a fundo, é a falta de padronização encontrada entre as análises sensoriais existentes, tanto nos métodos de painéis de prova quanto dos provadores. Isso ficou ainda mais visível nas diversas discussões realizadas sobre esse assunto durante a Conferência Internacional sobre a Ciência do Café (ASIC-2008), realizada em Campinas-SP.

A evolução das técnicas analíticas também propicia a construção de novos modelos ou até a melhoria dos já propostos nesta tese. Na cromatografia gasosa, por exemplo, o estabelecimento da cromatografia bidimensional já demonstrou, de maneira geral, que o número de compostos antes detectados na cromatografia unidimensional, é maior, pois nessa nova técnica, compostos coeluídos podem ser

separados. Essa técnica gera, também, a possibilidade de aplicação de técnicas quimiométricas mais elaboradas, pois os cromatogramas gerados na cromatografia bidimensional podem ser analisados de maneira semelhante ao tratamento de imagens.

Em relação à espectroscopia na região do infravermelho próximo, a análise do grão cru torna-se uma perspectiva imediata, pois, como os resultados com cafés torrados foram muito promissores, uma etapa a menos seria necessária no preparo de amostra (neste caso a torra).

No caso do uso de mais de uma técnica fica a critério do analista sua escolha, visto que essas técnicas são complementares. A cromatografia, por exemplo, nos fornece informações mais diretas sobre a constituição de uma determinada amostra a partir da separação dos seus compostos. Já a espectroscopia apresenta a vantagem de realizar análises mais rápidas em relação à cromatografia. Por fim, o preparo de amostra é mais elaborado na cromatografia, enquanto que na espectroscopia é quase que inexistente.

Referências bibliográficas

- Acree, T. E.; Barnald, J.; Cunningham, D. G. A procedure for sensory analysis of gas chromatographic effluents. *Food Chem.* **1984**, 14, 273-286.
- Agresti, P. D. C.; Franca, A. S.; Oliveira, L. S.; Augusti, R. Discrimination between defective and non-defective Brazilian coffee beans by their volatile profile. *Food Chem.* **2008**, 106, 787-796.
- Akiyama, M.; Murakami, K.; Ikeda, M. Analysis of the headspace volatiles of freshly brewed arabica coffee using solid-phase microextraction. *J. Food Sci.* **2007**, 72, C388-C396.
- Akiyama, M.; Murakami, K.; Ohtani, N.; Iwatsuki, K.; Sotoyama, K.; Wada, A.; Tokuno, K.; Iwabuchi, H.; Tanaka, K. Analysis of volatile compounds released during the grinding of roasted coffee beans using solid-phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 1961-1969.
- Alasalvar, C.; Shahidi, F.; Cadwallader, K. R. Comparison of natural and roasted Turkish tumbul hazelnut (*Corylus avellana L.*) volatiles and flavor by DHA/GC/MS and descriptive sensory analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 5067-5072.
- Alessandrini, L.; Romani, S.; Pinnavaia, G.; Rosa, M. D.; Near infrared spectroscopy: an analytical tool to predict coffee roasting degree. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 625, 95-102.
- Alves, R. C.; Casal, S.; Alves, M. R.; Oliveira, M. B. Analytical methods discrimination between arabica and robusta coffee species on the basis of their tocopherol profiles. *Food Chem.* **2009**, 114, 295-299.
- Alves, T. S.; Dias, R. C. E.; Benassi, M. T. Metodologia para análise simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em café torrado por cromatografia líquida de alta eficiência. *Quím. Nova* **2006**, 29, 1164-1168.
- Andrés, J. M.; Bona, M. T. Analysis of coal by diffuse reflectance near-infrared spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 53, 123-132.
- Andrueza, S.; Paz De Peña; Cid, C.; Chemical and sensorial characteristics of espresso coffee as affected by grinding and torrefacto roast. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 7034-7039.
- Andrueza, S.; Vila, M. A.; De Pena, M. P. Influence of coffee/water ratio on the final quality of espresso coffee. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, 4, 586-592.
- Antony, J. Multi-response optimization in industrial experiments using Taguchi's quality loss function and principal component analysis. *Qual. Reliab. Eng. Int.* **2000**, 16, 3-8.
- Arambarri, I.; Lasa, M.; Garcia, R.; Millán, E. Determination of fuel dialkyl ethers and BTEX in water using headspace solid-phase microextraction and gas

- chromatography-flame ionization detection. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1033, 193-203.
- Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2145-2148.
- Aznar, M.; Pez, R. L.; Cacho, J.; Ferreira, V. Prediction of aged red wine aroma properties from aroma chemical composition. Partial least squares regression models. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 2700-2707.
- Baker, J. A.; Boakye, K.; McCann, S. E. Consumption of black tea or coffee and risk of ovarian cancer. *Inter. J. Gynecol. Cancer* **2007**, 17, 50-54.
- Barak P. Smoothing and differentiation by an adaptive-degree polynomial filter. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2758-2762.
- Barker M.; Rayens W. Partial least squares for discrimination. *J. Chemom.* **2003**, 17, 166-173.
- Barnes, R. J.; Dhanoa, M. S.; Lister, S. J. Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Appl. Spectrosc.* **1989**, 43, 772-777.
- Barratt, E. S.; Stanford, M. S.; Dowdy, L.; Liebman, M. J.; Kent, T. A.; Impulsive and premeditated aggression: a factory analysis of self-reported acts. *Psychiatry Res.* **1999**, 86, 163-173.
- Barros Neto, B., Scarminio, I. S., Bruns, R. E., Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2a ed., Ed. Unicamp, Campinas, **2002**.
- Bartholo, G. F.; Guimarães, P. T. G. Cuidados na colheita e preparo do café. *Informe Agropecuário*. EPAMIG, Belo Horizonte, **1997**, 18, 32-34.
- Beckers, J. L. The determination of caffeine in coffee: Sense or nonsense? *J. Chem. Educ.* **2004**, 81, 90-93.
- Beebe, K. R.; Pell, R. J.; Seasholtz, M. B. Chemometrics: A practical guide, John Wiley & Sons, New York, **1998**, p.348.
- Belardi, R. G.; Pawliszyn, J. The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. *Water Pollut. Res. J. Can.* **1989**, 24, 179- 191.
- Beling, R. R. Anuário brasileiro de café. Ed. Gazeta, Porto Alegre, **2008**, 6.
- Bernheimer, O. Zur Kenntniss der Rostproducte des Caffees. *Monatsh. Chem.* **1880**, 1, 456-467.
- Berrueta, L. A.; Alonso-Salces, R. M.; Héberger, K. Supervised pattern recognition in food analysis *J. Chromatogr. A* **2007**, 1158, 196-214.
- Bertelli, D.; Plessi, M.; Sabatini, A. G.; Lolli, M.; Grillenzoni, F. Classification of Italian honeys by mid-infrared diffuse reflectance spectroscopy (DRIFTS). *Food Chem.* **2007**, 101, 1565-1570.

- Bertrand, B.; Etienne, H.; Lashermes, P. ; Guyot, B. ; Davrieux F. Can near-infrared reflectance of green coffee be used to detect introgression in *Coffea arabica* cultivars ? *J. Sci. Food Agric.* **2005**, 85, 955-962.
- Bicchi, C. P.; Binello, A. E.; Pellegrino, G. M. Characterization of green and roasted coffees through the chlorogenic acid fraction by HPLC-UV and principal component analysis. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 1549-1555.
- Bicchi, C. P.; Ombretta, M. P.; Pellegrino, G. M.; Vanni, A. C. Characterization of roasted coffee and coffee beverages by solid phase microextraction – gas chromatography and principal component analysis. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 4680-4686.
- Bicchi, C.; Iori, C.; Rubiolo, P.; Sandra, P. Headspace sorptive extraction (HSSE), stir sorptive extraction (SBSE), and solid phase microextraction (SPME) applied to the analysis of roasted arabica coffee and coffee brew. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 449-459.
- Borém, F. M.; Salva, T. J. G.; Silva, E. A. A. Anatomia e Composição Química do Fruto e da Semente do Cafeeiro. In: Borém, F. M. Pós-Colheita do Café. Editora UFPA, Lavras, **2008**, 1, 19-40.
- Box, G. E. P.; Draper, N. R. Empirical Model-Building and Response Surfaces. John Wiley & Sons, New York, **1987**.
- Box, G. E. P.; Wilson, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B* **1951**, 13, 1-38.
- Brando, C. H. J. Tendências futuras de mercado e demanda de pesquisa: um ponto de vista. In: Salva, T. J. G.; Filho, O. G.; Thomaziello, R. A.; Fazuoli, L. C. Cafés de Qualidade: Aspectos tecnológicos, científicos e comerciais. Instituto Agrônomo, Campinas, **2007**, 352-355.
- Brandt, M. A.; Skinner, E. Z.; Coleman, J. A. Texture profile method. *J. Food Sci.* **1963**, 28, 404–409.
- Bratchell, N. Multivariate response surface modelling by principal components analysis. *J. Chemom.* 1989, 3, 579-588.
- Brereton, R. G. Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. John Wiley & Sons, Chichester, **2003**, p. 407.
- Brereton, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry, *Analyst.* **2000**, 125, 2125-2154.
- Brown, C. D.; Vega-Montoto, L.; Wentzell, P. D. Derivative preprocessing and optimal corrections for baseline drift in multivariate calibration. *Appl. Spectrosc.* **2000**, 54, 1055-1068.
- Buffo, R; Cardelli-Freire, C. Coffee flavour: an overview. *Flavour Frag. J.* **2004**, 19, 99-104.
- Burns, D. A.; Ciurczak, E. W. Handbook of Near-infrared Analysis. 3^a ed. CRC Press, New York, **2008**.

- Cairncross, S. E.; Sjöstrom, L. B. Flavour profiles: a new approach to flavour problems. *Food Technol.* **1950**, 4, 308–311.
- Camargo, R.; Queiros Telles, A. O café no Brasil: Sua aclimação e industrialização, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, **1958**, 720.
- Carasek, E.; Pawliszyn, J. Screening of tropical fruit volatile compounds using solid-phase microextraction (SPME) fibers and internally cooled SPME fiber. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 8668-8696.
- Careri, M.; Mangia, A.; Barbieri, G.; Bolzoni, L.; Virgili, R.; Parolari, G. Sensory property relationship to chemical data italian-type dry-cured ham. *J. Food Sci.* **1994**, 27, 491–495.
- Carlson, R.; Nordahl, Å.; Barth, T.; Myklebust, R. An approach to evaluating screening experiments when several responses are measured. *Chemom. Intel. Lab. Syst.* **1992**, 12, 237-255.
- Carrera, F.; León-Camacho, M. ; Pablos, F. ; González, A. G. Authentication of green coffee varieties according to their sterolic profile. *Anal. Chim. Acta* **1998**, 370, 131-139.
- Cen, H.; He, Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends Food Sci. Technol.* **2007**, 18, 72-83.
- Chen, Q.; Zhao, J.; Zhang, H.; Wang, X. Feasibility study on qualitative and quantitative analysis in tea by near infrared spectroscopy with multivariate calibration. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 572, 77-84.
- Chong, I. G.; Jun, C. H. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2005**, 78, 103-112.
- Christensen, R., Analysis of Variance, Design and Regression – Applied Statistical Methods. CRC, New York, **2000**.
- Clarke, R. J. The flavor of coffee. In: Morton, I. D.; Macleod, A. J. Food Flavour: Part B. The flavours of beverages. Elsevier Science Publ., Amsterdam, **1986**.
- Clarke, R. J.; Vitzthum, O. G. Coffee: Recent Developments. World Agriculture Series: Blackwell Science, Ames, **2001**.
- Clifford, M. N. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In: Clifford, M. N., Willson, K., Coffee: Botany, Biochemistry and Production and Beans and Beverage. Croom Helm, London, **1985**.
- Clifford, M. N., Ohiokpehai, O., Coffee Astringency, *Food Anal.* **1983**, 20, 83-86.
- Coates, J. Vibrational spectroscopy: instrumentation for infrared and Raman spectroscopy. *Appl. Spectros. Rev.* **1998**, 33, 267-425.
- Coelho, K. F. Avaliação química e sensorial da qualidade do café de bebida estritamente mole após a inclusão de grãos defeituosos. UFLA, Lavras, **2000**, 96.
- Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. Fundamentos de Cromatografia. Editora da Unicamp, Campinas, **2006**.

- Contis, E. T.; Ho, C. T.; Mussinan C. J. Food Flavors: Formation, Analysis and Packaging Influences. Elsevier, Amsterdam, **1998**, 69-78.
- Coomans, D.; Broeckart, I. Potential pattern recognition in chemical and medical decision making. John Wiley, Letchworth, **1986**, 215.
- Cozzolino, D.; Smyth, H. E.; Gishen, M. Feasibility study on the use of visible and near-infrared spectroscopy together with chemometrics to discriminate between commercial white wines of different varietal origins. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 7703-7708.
- Cozzolino, D.; Smyth, H. E.; Lattey, K. A.; Cynkar, W.; Janik, L.; Damberg, R. G.; Francis, I. L.; Gishen, M. Combining mass spectrometry based electronic nose, visible-near infrared spectroscopy and chemometrics to assess the sensory properties of Australian Riesling wines. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 563, 319-324.
- Cuevas-Glory, L F.; Pino, J. A.; Santiago, L. S.; Sauri-Duch, E. A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chem.* **2007**, 103, 1032-1043.
- Czerny, M.; Grosch, W. Potent odorants of raw Arabica coffee. Their changes during roasting. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 868-872.
- Czerny, M.; Mayer, F.; Grosch, W. Sensory study on the character impact odorants of roasted Arabica coffee. *J. Agric. Food. Chem.* **1999**, 47, 695-699.
- Da Silva, G. A.; Augusto, F.; Poppi, R. J. Simultaneous optimization by neuro-genetic approach of multiresidue method for determination of pesticides in Passiflora alata infuses using headspace solid phase microextraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1138, 251- 261.
- Daszykowski, M.; Kaczmarek, K.; Vander Heyden, Y.; Walczak, B. Robust statistics in data analysis – A review - Basic concepts. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2007**, 85, 203-219.
- Daszykowski, M.; Walczak, B. Use and abuse of chemometrics in chromatography. *Trends Anal. Chem.* **2006**, 25, 1081-1096.
- De Carvalho, C.; Borém, F. M.; Pereira, R. G. F. A.; Silva, F. M. Influência de diferentes sistemas de colheita na qualidade do café (*Coffea arabica* L.) *Ciênc. Agrotec. Lavras* **2003**, 27, 1089-1096.
- De Carvalho, V. D.; Chagas, S. J. D.; Chalfoun, S. M. Relação entre a composição físico química e química do grão beneficiado e a qualidade da bebida do café. I. Atividades de polifenoloxidase e peroxidase, índice de coloração e acidez. *Pesq. Agropec. Bras.* **1994**, 29, 449-454.
- De Carvalho, V. D.; Chalfoun, S. M.; Chagas, S. J. R. Relação entre classificação do café pela bebida e composição físico-química, química e microflora do grão beneficiado. In: *Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*. Maringá-PR, Abril, **1989**, 15, 25-26.

- De Maesschalck, R.; Jouan-Rimbaud, D.; Massart, D.L. Tutorial: The Mahalanobis distance. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2000**, 50, 1–18.
- De Maria, C. A. B.; Moreira, R. F. A. Analytical methods for chlorogenic acid. *Quím. Nova* **2004**, 27, 586-592.
- De Maria, C. A. B.; Moreira, R. F. A.; Trugo, L. C. Volatile components in roasted coffee, Part I: Heterocyclic compounds. *Quím. Nova* **1999**, 22, 209-217.
- De Maria, C. A. B.; Trugo, L. C.; Moreira, R. F. A. Composition of green coffee fractions and their contribution to the volatile profile formed during roasting. *Food Chem.* **1994**, 50, 141-145.
- Della Modesta, R.C.; Gonçalves, E. B.; De Mattos, P. B.; Ferreira, J. C. S. Validação do perfil sensorial para bebida de café brasileiro, In: *I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*. Vitória-ES, Setembro, **2000**.
- Dixon, S. J.; Xu, Y.; Brereton, R. G.; Soini, H. A.; Novotny, M. V.; Oberzaucher, E.; Grammer, K.; Penn, D. J. Pattern recognition of gas chromatography-mass spectrometry of human volatiles in sweat to distinguish the sex of subjects and determine potential discriminatory marker peaks. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2007**, 87, 161–172.
- Doehlert, D. H. Uniform shell design. *Appl. Statist.* **1970**, 19, 231-239.
- Downey, G.; Briandet, R.; Wilson, R. H.; Kemsley, E. K. Near- and mid-infrared spectroscopies in food authentication: coffee varietal identification. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 4357-4361.
- Downey, G.; McIntyre, P.; Davies, A. N. Geographic classification of extra virgin olive oils from the eastern Mediterranean by chemometric analysis of visible and near-infrared spectroscopy data. *Appl. Spectros.* **2003**, 57, 158-163.
- Durante, C.; Cocchi, M.; Grande, M. Application of N-PLS to gas chromatographic and sensory data of traditional balsamic vinegars of Modena. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2006**, 83, 54-65.
- Eilers, P. H. C. Parametric time warping. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 404-411.
- Ellekjaer, M. R.; Ilseng, M. A.; Naes, T. A case study of the use of experimental design and multivariate analysis in product improvement. *Food Qual. Prefer.* **1996**, 7, 29-36.
- Enke, C. G. Nieman, T, A. Signal-to-noise enhancement by least-squares polynomial smoothing, *Anal. Chem.* **1976**, 48, 705A-712A.
- Esteban-Díez, I.; Gonzalez-Saiz, J. M.; Pizarro, C. Prediction of roasting colour and other quality parameters of roasted coffee samples by near infrared spectroscopy. A feasibility study. *J. Near Infrared Spectrosc.* **2004a**, 12, 287-297.
- Esteban-Díez, I.; González-Sáiz, J. M.; Pizarro, C. Prediction of sensory properties of espresso from roasted coffee samples by near-infrared spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **2004b**, 525, 171- 182.

- Esteban-Díez, I.; González-Sáiz, J. M.; Sáenz-González, C.; Pizarro, C. Coffee varietal differentiation based on near infrared spectroscopy. *Talanta* **2007**, 71, 221–229.
- Farah, A.; Monteiro, M. C.; Calado V.; Franca, A. S.; Trugo, L. C. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chem.* **2006**, 98, 373-380.
- Feria-Morales, A. M. Changes in cup quality when using innovative field practices. *International Coffee Organization*, Documento interno restrito. London, **1990**, 2-8.
- Feria-Morales, A. M. Examining the case of green coffee to illustrate the limitations of grinding systems/experts tasters in sensory evaluation for quality control. *Food Qual. Prefer.* **2002**, 13, 355-367.
- Feria-Morales, A. M. The research and test unit of the International Coffee Organization scientific activities focusing on the quality of coffee. In: *13th Int. Coll. Chem. Coffee (ASIC)*, Paipa, Agosto, **1989**, 159-180.
- Fernandes, A. P.; Santos, M. C.; Lemos, S. G.; Ferreira, M. M. C.; Nogueira, A. R. A.; Nóbrega, J. A. Pattern recognition applied to mineral characterization of Brazilian coffees and sugar-cane spirits. *Spectrochim. Acta Part B* **2005**, 60, 717-724.
- Ferreira, M. M. C. Multivariate QSAR. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, 13, 742-753.
- Ferreira, M. M. C.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S., Volpe, P. L O. Chemometrics I – Multivariate calibration, a tutorial. *Quim. Nova* **1999**, 22, 724-731.
- Fisher, R .A. The use of multiple measurement in taxonomic problems. *Ann. Eugen.* **1936**, 7, 179-188.
- Flament, I. Coffee Flavor Chemistry. British Library Cataloguing, London, **2002**.
- Forina, M.; Lanteri, S.; Oliveros, M.; Millan, C. P. Selection of useful predictors in multivariate calibration. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 380, 397-418.
- Forshed, J.; Schuppe-Koistinen, I.; Jacobsson, S. P. Peak alignment of NMR signals by means of a genetic algorithm. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 487, 189-199.
- Franca, A. S.; Mendonça, J. C. F.; Oliveira, S. D. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT* **2005**, 38, 709-715.
- Fuller, M. P.; Griffiths, P. R. Diffuse reflectance measurements by infrared Fourier transform spectrometry. *Anal. Chem.* **1978**, 50, 1906- 1910.
- Fung, C. P.; Kang, P. C. Multi-response optimization in friction properties of PBT composites using Taguchi method and principal component analysis. *J. Mater. Process. Technol.* **2005**, 170, 602-610.
- Gatchalian, M. M. Sensory evaluation methods with statistical analysis. Diliman, Quezon City, Philippines: College of Home Economics, University of the Philippines. **1981**.

- Geladi, P.; Kowalski, B. R. Partial least-squares regression- a tutorial. *Anal. Chim. Acta* **1986**, 185, 1-17.
- Geladi, P.; MacDougall, D.; Martens, H. Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat. *Appl. Spectrosc.* **1985**, 39, 491-500.
- Gemperline, P. Practical Guide to Chemometrics. 2nd ed. CRC Press, New York, **2006**.
- Golub, G. H.; Van Loan, C. F. Matrix computation. 2nd ed., Johns Hopkins University Press, Baltimore, **1989**.
- Gorry, P. General least-squares smoothing and differentiation by the convolution (Savitzky-Golay) method. *Anal. Chem.* **1990**, 62, 570-573.
- Grosch, W.; Mayer, F. Release of odorants from roasted coffee. *Abstr. Papers Am. Chem. Soc.* **1999**, 218, U53-U53.
- Guia prático do controle de qualidade do café – www.abic.com.br, acessado em 2005 e 2007.
- Gurden, S. P.; Monteiro, V. F.; Longo, E.; Ferreira, M. M. C. Quantitative analysis and classification of AFM images of human hair. *J. Microsc.* **2004**, 215, 13-23.
- Hall, R. L. Flavour study approaches at McCormick & Company, In: Little, A. D. Flavour research and food acceptance, New York, **1958**, 224–249.
- He, J.; Rodriguez-Saona, L. E.; Giusti, M. M. Mid-infrared spectroscopy for juice authentication – rapid differentiation of commercial juices. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 4443-4452.
- Ho, C. W.; Wan Aida, W. M.; Maskat, M. Y.; Osman, H. Optimization of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) for gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of aroma compound in palm sugar (*Arenga pinnata*). *J. Food Comp. Anal.* **2006**, 19, 822-830.
- Holscher, W.; Steinhart, H. Investigation of roasted coffee freshness with an improved headspace technique. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, 195, 33-38.
- Holscher, W.; Steinhart, H. Formation pathways for primary roasted coffee aromas. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **1994**, 543, 206-217.
- Hoskuldsson, A. Variable and subset selection in PLS regression. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2001**, 55, 23-38.
- Huang, L. F.; Wu, M. J.; Zhong, K. J.; Sun, X. J.; Liang, Y. Z.; Dai, Y. H.; Huang, K. L.; Guo, F. Q. Fingerprint developing of coffee flavor by gas chromatography-mass spectrometry and combined chemometrics methods. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 588, 216-223.
- Illy, A., Viani, R. Espresso coffee—the chemistry of quality. Academic Press, London **2005**.
- Indahl, U. G.; Martens, H.; Naes, T. From dummy regression to prior probabilities in PLS-DA. *J. Chemom.* **2007**, 21, 529–536.

- Iñón, F. A.; Garrigues, S.; Guardia, M. Combination of mid- and near-infrared spectroscopy for the determination of the quality properties of beers. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 571, 167-174.
- Instituto Brasileiro do Café (IBC). Cultura do café no Brasil: manual do IBC. 2 ed. Rio de Janeiro, **1977**, 235.
- Isaksson, T.; Naes, T. The effect of multiplicative scatter correction (MSC) and linearity improvement in NIR spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **1988**, 42, 1273-1284.
- Ishikawa, M.; Ito, O.; Ishizaki, S.; Kurobayashi, Y.; Fujita, A. Solid-phase aroma concentrate extraction (SPACETM): a new headspace technique for more sensitive analysis of volatiles. *Flavour Frag. J.* **2004**, 19, 183-187.
- Jouan-rimbaud, D.; Walczak, B.; Massart, D. L.; Last, I. R.; Prebble, K. A. Comparison of multivariate methods based on latent vectors and methods based on wavelength selection for the analysis of near-infrared spectroscopic data. *Anal. Chim. Acta* **1995**, 304, 285-295.
- Karoui, R.; Pillonel, L.; Schaller, E.; Bosset, J. O.; De Baerdemaeker, J. Prediction of sensory attributes of European Emmental cheese using near-infrared spectroscopy: A feasibility study. *Food Chem.* **2006**, 101, 1121-1129.
- Kassidas, A.; MacGregor, J. F.; Taylor, P. A. Synchronization of batch trajectories using dynamic time warping. *AIChE J.* **1998**, 44, 864-875.
- Kataoka, H.; Lord, H. L.; Pawliszyn, J. Application of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A* **2000**, 880, 35-62.
- Keast, R.; Roper, J. A complex relationship among chemical concentration, detection threshold, and suprathreshold intensity of bitter compounds. *Chem. Senses*, **2007**, 32, 245-253.
- Keegan, W. J.; Green, M. C. Princípios de marketing global. Ed. Saraiva, São Paulo, **2000**.
- Kemsley, E. K.; Ruault, S.; Wilson, R. H.; Discrimination between *Coffea arabica* and *Coffea canephora* variant *robusta* beans using infrared spectroscopy. *Anal. Nutr. Clin. Meth. Sec.* **1995**, 54, 321-326.
- Kennard, R. W.; Stone, L. A. Computer aided design of experiments. *Technometrics* **1969**, 11, 137-&.
- Kim, N. S.; Lee, D. S. Headspace solid-phase microextraction for characterization of fragrances of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2004**, 27, 96-100.
- Kubelka, P. New contributions to the optics of intensely light-scattering materials: I. *J. Opt. Soc. Am.* **1948**, 38, 448-457.
- Langron, S. P. The application of Procrustes statistics to sensory profiling. In: Williams, A. A.; Atkin, R. K. Sensory quality in food and beverages: definition, measurement and control. Ellis Horwood, Chichester, **1983**.

- Leite, I. P.; De Carvalho, V. D. Influência do local de cultivo e do tipo de colheita nas características físicas, composição química do grão e qualidade do café. *Pesq. Agropec. Bras.* **1994**, 29, 299-308.
- Li, W.; Huang, D.; Liu, L. The application of near infrared spectroscopy in the quality control analysis of glass/phenolic resin prepreg. *J. Mater. Sci.* **2006**, 41, 7183-7189.
- Liao, H. C. Multi-response optimization using weighted principal component. *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* **2006**, 27, 720-725.
- Liu, Y.; Ying, Y.; Yu, H.; Fu, X. Comparison of the HPLC method and FT-NIR analysis for quantification of glucose, fructose, and sucrose in intact apple fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 2810-2815.
- Lopes, L. M. V. Avaliação da qualidade de grãos de café crus e torrados de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: *Dissertação de Mestrado em Ciências dos Alimentos*, UFLA. **2000**, 95.
- López-Galilea, I.; Andrueza, S.; Leonaedo, I.; Paz de Peña, M.; Cid, C. Influence of torrefacto roast on antioxidant and pro-oxidant activity of coffee. *Food Chem.* **2006**, 94, 75-80.
- Lorber, A.; Kowalski, B.R. Estimation of prediction error for multivariate calibration. *J. Chemom.* **1988**, 2, 93-109.
- Lundstedt, T.; Seifert, E.; Abramo, L.; Theilin, B.; Nyström, A.; Pettersen, J.; Bergman, R. Experimental design and optimization. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1998**, 42, 3-40.
- Martens, H.; Naes, T. Multivariate calibration. John Wiley & Sons: New York, **1989**, p.419.
- Martín, M. J.; Pablos, F.; González, A. G. Application of pattern recognition to the discrimination of roasted coffees, *Anal. Chim. Acta* **1996**, 320, 191-197.
- Martín, M. J.; Pablos, F.; González, A. G. Characterization of arabica and robusta roasted coffee varieties and mixture resolution according to their metal content. *Food Chem.* **1999**, 66, 365-370.
- Martín, M. J.; Pablos, F.; González, A. G. Discrimination between arabica and robusta green coffee varieties according to their chemical composition. *Talanta* **1998**, 46, 1259-1264.
- Martinez-Uruñuela, A.; Gonzalez-Sáiz, J. M.; Pizarro, C. Optimisation of headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1056, 49-56.
- Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Buydens, L. M. C.; De Jong, S.; Lewi, P. J.; Smeyers-Verbeke, J. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A, Elsevier, Amsterdam, **1997**, p. 207.

- Matiello, J. B. O café: do cultivo ao consume. Coleção do Agricultor (grãos). Globo, São Paulo, **1991**.
- Mayer, F; Czerny, M; Grosch, W. Sensory study of the character impact aroma compounds of a coffee beverage. *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, 211, 272-276.
- Mayers, F.; Grosch, W. Aroma simulation on the basis of the odorant composition of roasted coffee headspace. *Flavour Frag. J.* **2001**, 16, 180-190.
- Meilgaard, M. C.; Civille, G. V.; Carr, B. T. Sensory evaluation techniques (2nd ed.). Boca Raton, FL: CRC Press. **1991**.
- Meléndez, M.; Ortíz, M. C.; Sánchez, M.; Sarabia, L.; Iñiguez, M. Chemometric characterization of the clarets and rose wines of the certified denomination of origin Rioja using Cielab parameters. *Quím. Anal.*, **1999**, 18, 119–126.
- Mondello, L.; Casilli, A.; Tranchida, P. Q.; Dugo, P.; Costa, R.; Festa, S.; Dugo, G. Comprehensive multidimensional GC for the characterization of roasted coffee beans. *J. Sep. Sci.* **2004**, 27, 442-450.
- Montella, M.; Polesel, J.; La Vecchia, C. Coffee and tea consumption and risk of hepatocellular carcinoma in Italy. *Int. J. Cancer* **2007**, 120, 1555-1559.
- Moon, S. Y.; Li-Chan, C. Y. Development of solid-phase microextraction methodology for analysis of headspace volatile compounds in simulated beef flavour. *Food Chem.* **2004**, 88, 141-149.
- Morgano, M.; Camargo, C.; Pagel, A. P.; Ferrao, M. F.; Ferreira, M. M. C. Determinação simultânea dos teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico em amostras de café cru por análise multivariada (PLS) em dados de espectroscopia por reflexão difusa no infravermelho próximo. In: *II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, Vitória, ES, **2001**, 1502-1510.
- Morgano, M. A.; Pauluci, L. F.; Mantovani, B. M. V.; Mory, E. E. M. Determinação de minerais em café cru. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2002**, 22, 19-23.
- Morgano, M. A.; Faria, C. G.; Ferrão, M. F.; Ferreira, M. C. Determinação de açúcares total em café cru por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais. *Quím. Nova* **2007**, 30, 346-350.
- Moshonas, M. G.; Shaw, P. E. Quantification of volatile constituents in mandarin juices and its use for comparison with orange juices by multivariate analysis. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 3968-3972.
- Mousavi, M.; Noroozian, E.; Jalali-Heravi, M.; Mollahosseini, A. Optimization of solid-phase-microextraction of volatile phenols in water by a polyaniline-coated PT-fiber using experimental design. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 581, 71-77.
- Murray, J. M.; Delahunty, C. M.; Baxter, I. A. Descriptive sensory analysis: past, present and future. *Food Res. Inter.*, **2001**, 34, 461–471.
- Myers, R. H.; Montgomery, D. C. Response surface methodology, Wiley, New York, **2002**.

- Myia, E. E.; Garruti, R. S.; Chaib, M. A.; Angelucci, R. S.; Figueiredo, I.; Shirone, I. Defeito do café e a qualidade da bebida. In: *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, Campinas, **1973/1974**, 5, 417-432.
- Nadler, B.; Coifman, R. R. The prediction error in CLS and PLS: the importance of feature selection prior to multivariate calibration. *J. Chemometr.* **2005**, 19, 107-118.
- Naes, T.; Isaksson, T.; Fearn, T.; Davies, T. Multivariate calibration and classification. Nir Publications, Chichester, **2002**, p.344.
- Nebesny, E.; Budryn, G. Evaluation of sensory attributes of coffee brews from robusta coffee roasted under different conditions. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, 224, 159-165.
- Nielsen, N. P. V.; Carstensen, J. M.; Smedsgaard, J. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis correlation optimized warping. *J. Chromatogr. A* **1998**, 805, 17-35.
- Nijssen, L. M.; Visscher, C. A.; Maarse, H.; Willemsens, L. C.; Boelens, M. M. Volatile Compounds in Food. Qualitative and Quantitative Data. 7th ed. Nutrition and Food Research Institute. TNO, Zeist, **1996**.
- Nunes, F. M.; Coimbra, M. A., Influence of polysaccharide composition in foam stability of espresso coffee, *Carbohydr. Polym.*, **1998**, 37, 283-285.
- Olinger, J. M.; Griffiths, P. R. Effects of sample dilution and particle size/morphology on diffuse reflectance spectra of carbohydrate systems in the near- and mid-infrared. Part I: Single Analytes. *Appl. Spectros.* **1993a**, 47, 687-694.
- Olinger, J. M.; Griffiths, P. R. Effects of sample dilution and particle size/morphology on diffuse reflectance spectra of carbohydrate systems in the near- and mid-infrared. Part II: Durum Wheat, *Appl. Spectros.* **1993b**, 47, 695-701.
- Osborne, S. D.; Jordan, R. D.; Kunnemeyer, R. Method of wavelength selection for partial least squares. *Analyst* **1997**, 122, 1531-1537.
- Otto, M. Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry, 2^a ed. Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- Parikh, V. M. Absorption Spectroscopy of Organic Molecules. Addison-Wesley, London, **1974**.
- Parreira, F. V.; Cardeal, Z. L. Amostragem de compostos orgânicos voláteis no ar utilizando a técnica de microextração em fase sólida. *Quím. Nova* **2005**, 28, 646-654.
- Pasquini, C. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, 14, 198-219.
- Pawliszyn, J. J. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice. Wiley-VCH, New York **1998**.

- Pedro, A. M. K.; Ferreira, M. M. C. Nondestructive determination of solids and carotenoids in tomato products by near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2505-2511.
- Perrone, D.; Farah, A.; Donangelo, C. M.; Paulis, T.; Martin, P. R. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. *Food Chem.* **2008a**, *106*, 859-867.
- Perrone, D.; Donangelo, C. M.; Farah, A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography–mass spectrometry. *Food Chem.* **2008b**, *110*, 1030–1035.
- Petersen, M.; Dyrby, M.; Toubro, S.; Engelsen, S. B.; Nørgaard, L.; Pedersen, H. T.; Dyerberg, J. Quantification of lipoprotein subclasses by proton nuclear magnetic resonance–based partial least-squares regression models. *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 1457–1461.
- Pettigrew, J. Coffee, PRC Publishing, London, **1998**.
- Pimenta, C. J.; Costa, L.; Chagas, S. J. de R., Peso, acidez, sólidos solúveis, açúcares e compostos fenólicos em café (*Coffea arábica L.*), colhidos em diferentes estádios de maturação. *Rev. Bras. Armazenam.* **2000**, *1*, 23-30.
- Pimentel, In: Fernandes, S. M.; Pinto, N. A. V. D.; Thé, P. M. P.; Pereira, R.G. F. A.; Carvalho, V. D. *Rev. Bras. Agro.* **2001**, *7*, 197-199.
- Pini, G. F.; Brito, E. S.; Garcia, N. H. P.; Valente, A. L. P.; Augusto, F. A headspace solid phase microextraction (HS-SPME) method for the chromatographic determination of alkylpyrazines in cocoa samples. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 267-271.
- Pizarro, C.; Esteban-Díez, I.; González-Sáiz, J. M.; Forina, M. Use of near-infrared spectroscopy and feature selection techniques for predicting the caffeine content and roasting color in roasted coffees. *J. Agric. Food Chem.* **2007a**, *55*, 7477-7488.
- Pizarro, C.; Esteban-Díez, I.; González-Sáiz, J. M. Mixture resolution according to the percentage of robusta variety in order to detect adulteration in roasted coffee by near infrared spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **2007b**, *585*, 266-276.
- PLSDA Class Groups Interface – acessado em março de 2009.
http://wiki.eigenvector.com/index.php?title=PLSDA_Class_Groups_Interface
- Poliak, M.; Kochman, M.; Gordin, A.; Amirav, A. A comparison of SnifProbe and SPME for aroma sampling. *Chromatographia* **2006**, *64*, 487–493.
- Polo, M.; Garcia-Jares, C.; Llompert, M.; Cela, R. Optimization of a sensitive method for the determination of nitro musk fragrances in waters by solid-phase microextraction and gas chromatography with micro electron capture detection using factorial experimental design. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *388*, 1789–1798.

- Portaria N° 49 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento de 25/03/2008 - <<http://www.agricultura.gov.br/>> link: legislação – SISLEGIS – Sistema de consulta à legislação, acessado em 12/03/2009.
- Pravdova, V.; Walczak, B.; Massart, D. L. A comparison of two algorithms for warping of analytical signals. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 456, 77-92.
- Programa de qualidade do café – www.abic.com.br, acessado em 2008.
- Rapp, A. Volatile flavour of wine: Correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung* **1998**, 42, 351-363.
- Reeves, J. B.; Zapf, C. M. Mid-infrared diffuse reflectance spectroscopy for discriminant analysis of food ingredients. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 3614-3622.
- Reich, G., Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. *Adva. Drug Deliv. Rev.* **2005**, 57, 1109-1143.
- Reichenstein, T.; Staudinger, H. *Patent application* **1928** UK 260,960.
- Reid, L. M.; O'Donnell, C. P. O.; Downey, G. Potential of SPME-GC and chemometrics to detect adulteration of soft fruit purées. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 421-427.
- Reid, L. M.; O'Donnell, C. P.; Downey, G. Recent technological advances for the determination of food authenticity. *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, 17, 344–353.
- Reineccius, G. A. The Maillard reaction of coffee flavor. In: Proceedings of the *16th Int. Colloq. Chem. Coffee (ASIC)*, Kyoto, Abril, **1995**, 249-257.
- Ribeiro, J. S.; Salva, T. J. G.; Ferreira, M. M. C. Chemometric studies for quality control of processed Brazilian coffees using DRIFTS. *J. Food Qual.* **2008** – *aceito*.
- Ribeiro, J. S.; Augusto, F.; 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. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 634, 172-179.
- Ribeiro, J. S.; Teófilo, R. F.; Augusto, F.; Salva, T. J. G.; Ferreira, M. M. C. Exploratory and discriminant studies for quality control of processed Brazilian coffees using headspace solid phase microextraction - gas chromatography, *submetido para Food Chemistry*.
- Risticvic, S.; Carasek, E.; Pawliszyn, J. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic-time-of-flight mass spectrometric methodology for geographical origin verification of coffee. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 617, 72-84.
- Roberts, D. D.; Pollien, P.; Milo, C. Solid-phase microextraction method development for headspace analysis of volatile flavor compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 2430-2437.

- Rocha, S.; Maetzu, L.; Barros, A.; Cid, C. Screening and distinction of coffee brews based on headspace solid phase microextraction/gas chromatography / principal component analysis. *J. Sci. Food Agric.* **2004**, 84, 43-51.
- Roggo, Y.; Chalus, P.; Maurer, L.; Lema-Martinez, C.; Edmond, A.; Jent, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J. Pharm. Med. Anal.* **2007**, 44, 683-700.
- Ross, C. F.; Pecka, K.; Weller, K. Effect of storage conditions on the sensory quality of ground Arabica coffee. *J. Food Qual.* **2006**, 29, 596-606.
- Ryan, D.; Shellie, R.; Tranchida, P. Analysis of roasted coffee bean volatiles by using comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1054, 57-65.
- Sandström, K. J. M.; Carlson, R.; Sunesson, A. L. Levin, J. O.; Turner, A. P. F. Multivariate evaluation of factors influencing the performance of a formic acid biosensor for use in air monitoring. *Analyst*, **2001**, 126, 2008-2014.
- Sanz, C.; Ansorena, D.; Bello, J.; Cid, C. Optimizing headspace temperature and time sampling for identification of volatile compounds in ground roasted arabica coffee. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 1364-1369.
- Sanz, C.; Maeztu, L.; Zapelena, M. J.; Bello, J.; Cid, C. Profiles of volatile compounds and sensory analysis of three blend of coffee: influence of different proportions of Arabica and Robusta and influence of roasting coffee with sugar. *J. Sci. Food Agric.* **2002**, 82, 840-847.
- Savitzky, A.; Golay, M. J. E. Smoothing + differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.* **1964**, 36, 1627-1679.
- Schimid, W.; Grosch, W. Identifizierung fluchtiger Aromastoffe mit hohen Aromawerten in Sauerkirschen (*Prunus cerasus L.*). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1986**, 182, 407-412.
- Segges, J. H., Focalizando o café e a qualidade. Seropédica, RJ: Editora Universidade Rural, **2001**, 124.
- Selmar, D.; Bytof, G.; Knopp, S. The storage of green coffee (*Coffea arabica*): Decrease of viability and changes of potential aroma precursors. *Ann. Bot.*, **2008**, 101, 31-38.
- Semmelroch, P.; Grosch, W. Analysis of roasted coffee powders and brews by gas chromatography-olfactometry of headspace samples. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1995**, 28, 310-313.
- Semmelroch, P.; Grosch, W. Studies on character impact odorants of coffee brews. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 537-543.
- Shao, Y.; He, Y.; Nondestructive measurement of the internal quality of bayberry juice Vis/NIR spectroscopy. *J. Food Eng.* **2007**, 79, 1015-1019.

- Siebielec, G.; McCarty, G. W.; Stuczynski, T. I.; Reeves, J. B. Near- and mid-infrared diffuse reflectance spectroscopy for measuring soil metal content. *J. Environ. Qual.* **2004**, 33, 2056-2069.
- Silva, J. S. Colheita, secagem e armazenamento do café. In: *I Encontro Sobre Produção de café com qualidade*. Viçosa, **1999**, 1, 39-80.
- Silverstein, R. M.; Webster, F. X. Spectrometric Identification of Organic Compounds, 6^a ed, Wiley, New York, **1998**.
- Sinelli, N.; Cosio, M. S.; Gigliotti, C.; Casiraghi, E. Preliminary study on application of mid infrared spectroscopy for the evaluation of the virgin olive oil “freshness”. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 598, 128–134.
- Singh, K. P.; Malik, A.; Mohan, D.; Sinha, S.; Singh, V. K. Chemometric data analysis of pollutants in water – a case study. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 532, 15-25.
- Site *coffebreak* <<http://www.coffebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=5&ID=33>> – acessado em 12/03/2009.
- <<http://www.coffebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=8&ID=89>>, acesso em: 01/03/2009.
- Sivetz, M. How acidity affects coffee flavor. *Food Technol.* **1972**, 26, 708-713.
- Skoog, D. A.; Roller, F. J.; Nieman, T. A. Princípios de Análise Instrumental. 5^a ed. Bookman, São Paulo, **2002**.
- Small, G. W. Chemometrics and near-infrared spectroscopy: Avoiding the pitfalls. *Trends Anal. Chem.* **2006**, 25, 1057-1066.
- Sousa, E. T.; Rodrigues, F. M.; Martins, C. C.; Oliveira, F. S.; Pereira, P. A. P.; Andrade, J. B. Multivariate optimization and HS-SPME/GC-MS analysis of VOCs in red, yellow and purple varieties of *Capsicum chinenses* sp. peppers. *Microchem. J.* **2006**, 82, 142-149.
- Sousa, M. C. M.; Saes, M. S. M. A qualidade no segmento de cafés especiais. Fonte: Informativo Garcafé, agosto, **2001**.
- Stampanoni, C. R. Quantitative flavour profiling: an effective tool in flavour perception. *Food Marketing Technol.*, **1993a**, 4–8.
- Stampanoni, C. R. The Quantitative profiling technique. *Perfumer Flavourist.* **1993b**, 18, 19-24.
- Steiner, J.; Termonia, Y.; Deltour, J. Comments on smoothing and differentiation of data by simplified least square procedure. *Anal. Chem.* **1972**, 44, 1906-1909.
- Stone, H.; Sidel, J. L. Sensory evaluation practices. Academic Press, Inc. London. P311. **1985**.
- Stone, H.; Sidel, J. L.; Oliver, S.; Woolsey, A.; Singleton, R. C. Sensory evaluation by Quantitative Descriptive Analysis. *Food Technol.* **1974**, 28, 24–33.
- Su, C. T.; Tong, L. I. Multi-response robust design by principal component analysis. *Total Qual. Manage.* **1997**, 8, 409-416.

- Taguchi, G.; El Sayed, M.; Hsaing, C. Quality engineering and production systems. McGraw-Hill College, New York, Setembro, **1989**.
- Teixeira, A. A.; Pereira, L. S. P.; Pimentel Gomes, F.; Cruz, V. F.; Castilho, A. A influência de grãos ardidos em ligas com cafés de bebida mole, *Ciência e Cultura*, São Paulo, **1971**, 23, 683-687.
- Teófilo, R. F.; Ferreira, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Quím. Nova* **2006**, 29, 338-350.
- Teófilo, R. F.; Martins, J. P. A.; Ferreira, M. M. C. Sorting variables by using informative vectors as a strategy for featuring selection in multivariate regression. *J. Chemom.* **2009**, 23, 32-41.
- Thomas, E. V. A primer on multivariate calibration. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 795A-804A.
- Thomas, E. V.; Haaland, D. M. Comparison of multivariate calibration methods for quantitative spectral analysis. *Anal. Chem.* **1990**, 62, 1091-1099.
- Thompson, D. M. H.; MacFie, H. J. H. Is there an alternative to descriptive sensory assessment. In: Williams, A. A.; Atkin, R. K. Sensory quality in food and beverages: Definition, measurement and control. Ellis Horwood, Chichester, **1983**, 96-107.
- Toci, A.; Farah, A.; Trugo, L. C. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés Arábica e Robusta antes e após a torração. *Quim. Nova* **2006**, 29, 965-971.
- Toci, A.; Farah, A. Volatile compounds as potential defective coffee beans markers. *Food Chem.* **2008**, 108, 1133-1141.
- Tomasi, G.; Van den Berg, F.; Andersson, C. Correlation optimized warping and dynamic time warping as preprocessing methods for chromatographic data. *J. Chemom.* **2004**, 18, 231-241.
- UTZ KAPEH Foundation. Apresenta informações sobre o Código de Conduta da empresa. Disponível em: <www.utzkapeh.org>. Acesso em: 01 março de 2009.
- Van Nederkassel, A. M.; Daszykowski, M.; Massart, D. L.; Vander Heyden, Y. Prediction of total green tea antioxidant capacity from chromatograms by multivariate modeling. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1096, 177-186.
- Van Nederkassel, A. M.; Xu, C. J.; Lancelin, P.; Sarraf, M.; MacKenzie, D. A.; Walton, N. J.; Bensaid, F.; Lees, M.; Martin, G. J.; Desmurs, J. R.; Massart, D. L.; Smeyers Verbeke, J.; Vander Heyden, Y. Chemometric treatment of vanillin fingerprint chromatograms. Effect of different signal alignments on principal component analysis plots. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1120, 291-298.
- Van Ruth, S. M. Methods for gas chromatography-olfatometry: a review. *Biomol. Eng.* **2001**, 17, 121-128.

- Vandeginste, B.G.M.; Massart, D.L.; Buydens, L.M.C.; De Jong, S.; Lewi, P.J.; Smeyers-Verbeke, J. Data Handling in Science and Technology 20 B, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B, Elsevier, Amsterdam, **1998**, p. 331.
- Vas, G.; Vékey, K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J. Mass Spectrom.* **2004**, 39, 233-254.
- Verardo, G.; Cecconi, F.; Geatti, P.; Giumanini, A. G. New procedures for determination of acids in coffee extracts, and observations on the development of acidity upon ageing, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 374, 879-885.
- Vree, P. H.; Yeransia, J. A Determination of soluble solids in roasted coffee. *J. Assoc. Anal. Chem.* **1973**, 56, 1126-1129.
- Walczak, B.; Wu, W. Fuzzy warping of chromatograms. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2005**, 77, 173-180.
- Wang, D.; Dowell, F.E.; Lacey, R.E. Single wheat kernel color classification by using near-infrared reflectance spectra. *Cereal Chem.* **1999**, 76, 30-33.
- Weldscholte, C. M.; Kroonenberg, P. M.; Antonides, G. Three-mode analysis of perceptions of economic activities in Eastern and Western Europe. *J. Econ. Psychol.* **1998**, 19, 321-351.
- Westerhuis, J. A.; Hoefsloot, H. C. J.; Smit, S.; Vis, D. J.; Smilde, A. G.; van Velzen, E. J. J.; van Duijnhoven, J. P. M.; van Dorsten, F. A. Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics* **2008**, 4, 81-89.
- Whelehan, O. P.; Earll, M. E.; Johansson, E.; Toft, M.; Eriksson, L. Detection of ovarian cancer using chemometric analysis of proteomic profiles. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2006**, 84, 82-87.
- Wilson, P. D.; Edwards, T. H. Sampling and smoothing of spectra. *Appl. Spectrosc. Rev.* **1976**, 12, 1-81.
- Wise, B. M.; Gallagher, N. B.; Bro, R.; Shaver, J. M.; Windig, W.; Koch, R. S. PLS_Toolbox for Use with MatlabTM, Versão 3,5. Software, Eigenvector Research, Inc., Novembro, **2004**.
- Wold, H. Estimation of principal components and related models by iterative least squares. In: Multivariate Analysis. Academic Press, New York, **1966**, 391-420.
- Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P. Principal component analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **1987**, 2, 37-52.
- Workman, J. J. Interpretive spectroscopy for near infrared. *Appl. Spectrosc. Rev.* **1996**, 31, 251-320.
- Xie, L.; Ying, Y.; Ying, T.; Yu, H.; Fu, X. Discrimination of transgenic tomatoes based on visible/near-infrared spectra. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 584, 379-384.
- Xing, J.; Saeys, W.; De Baerdemaeker, J. Combination of chemometric tools and image processing for bruise detection on apples. *Comp. Electr. Agric.* **2007**, 56, 1-13.

Capítulo 12. Referências bibliográficas

- Xu, L.; Schechter, I. Wavelength selection for simultaneous spectroscopic analysis. Experimental and theoretical study. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2392-2400.
- Yan-de, L.; Yi-bin, Y.; Xianping, F.; Guisan, L. Experiments on predicting sugar content in apples by FT-NIR technique. *J. Food Eng.* **2007**, 80, 986-989.
- Yeretzian, C.; Jordan, A.; Lindinger, W. Analyzing the headspace of coffee by proton-reaction mass-spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, 223-224, 115-139.
- 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* **2005**, 66, 261-265.
- Zeiter, M.; Roger, J. M.; Bellon-Maurel, V. Robustness of models developed by multivariate calibration. Part II: The influence of pre-processing methods. *Trends Anal. Chem.* **2005**, 24, 437-445.
- Zellner, B. A.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. Gas chromatography-olfatometry in food flavour analysis. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1186, 123-143.

Apêndice

Composição química do café verde, torra e voláteis do café

1. Compostos precursores do aroma no café verde

A composição química do café verde (Figura 1) é influenciada por diversos fatores, tais como, a espécie ou variedade em questão, práticas agrícolas, grau de maturação do fruto, processamento, estocagem, torra e moagem.



Figura 1. Grãos beneficiados de cafés da espécie arábica.

Considerando a relevante importância que os compostos gerados durante a torra têm para o sabor e aroma da bebida, estudos envolvendo seus precursores no café verde nos ajudarão a compreender sua relação com a formação dos principais voláteis no café torrado. A Figura 2 indica valores médios relativos (g/100g de matéria seca) dos principais compostos encontrados nas duas espécies de maior importância (*C. arabica* e *C. canephora*). Esses valores foram retirados do trabalho realizado por Toci et al. (2006).

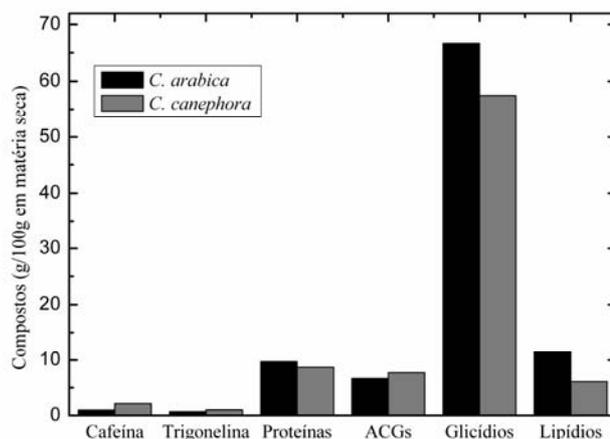


Figura 2. Concentrações médias dos principais compostos do café verde (g/100g de matéria seca).

1.1. Alcalóides

1.1.1. Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina), um dos componentes do café mais conhecidos e estudados, é um alcalóide farmacologicamente ativo pertencente ao grupo das xantinas. Ela é inodora e possui sabor amargo bastante característico, contribuindo com a nota de amargor importante para o sabor da bebida do café.

Este componente é o principal alcalóide presente no café, sendo seguido por quantidades menores de teofilina (1,3-dimetilxantina) e teobromina (3,7-dimetilxantina) (Clarke e Macrae, 1985). Os três alcalóides mencionados contêm um esqueleto de purina que é amplamente difundido pela natureza, sendo detectado em componentes metabólicos importantes, tais como a xantina, ácidos nucleicos e ácido úrico (Clarke e Macrae, 1985).

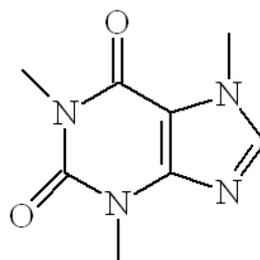


Figura 3. Estrutura química da cafeína.

O conteúdo de cafeína (Figura 3) no café verde varia amplamente de uma espécie para outra, sendo possível, também, encontrar variações dentro de uma mesma espécie. Valores médios deste alcalóide para o café arábica variam entre 0,9 e 1,3 %, e para robusta entre 1,2 e 2,4 % (Clarke e Macrae, 1985), sendo encontrada geralmente em maior quantidade na variedade robusta. Uma pesquisa realizada recentemente, apresentou uma variedade de café arábica com baixíssima concentração de cafeína (Silvarolla et al., 2004).

1.1.2. *Trigonelina*

A trigonelina (*N*-metil betaína) é um outro alcalóide de grande importância para o aroma do café torrado. No café verde, ela se apresenta em sua maioria na forma do sal 3-carboxi-1-metilpiridina (Clarke e Macrae, 1985). Ela contribui efetivamente para o aroma por meio da formação de produtos de degradação durante a torra. A maioria dos voláteis formados pela trigonelina (Figura 4), dependendo do grau de torra e temperatura, são derivados de piridinas e *N*-metil pirróis.

A niacina, uma vitamina importante para o metabolismo humano, é produzida durante o processo de torra dessa substância. Isso faz do café um dos únicos produtos que, mesmo depois de um processo térmico tão drástico, produz compostos importantes que aumentam seu valor nutricional.

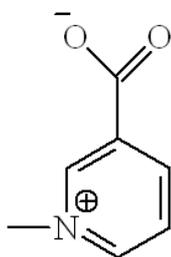


Figura 4. Estrutura química da trigonelina.

1.2. Proteínas e aminoácidos

Os aminoácidos são encontrados na forma livre ou ligados entre si formando as proteínas. A composição total de proteínas no café verde gira em torno de 9-12 % e varia muito pouco em relação ao café torrado, porém, suas propriedades físicas e químicas são drasticamente alteradas, reduzindo sensivelmente sua solubilidade em água (Underwood e Deatherage, 1952).

A torra causa grandes modificações nos aminoácidos, sendo que alguns deles (arginina, lisina, serina e treonina) são mais susceptíveis à torra.

Embora os aminoácidos livres representem uma pequena proporção do café verde, eles são precursores de aromas extremamente importantes, tendo uma participação marcante na qualidade do produto final.

1.3. Ácidos Clorogênicos

Os ácidos clorogênicos (ACGs) são uma família de compostos fenólicos não-voláteis oriundos da esterificação do ácido quínico com derivados do ácido cinâmico como os ácidos caféico, ferúlico e *p*-cumárico (Figura 5). Os principais grupos de ácidos clorogênicos encontrados são os cafeoilquínicos, os feruloilquínicos e os dicafeoilquínicos, sendo cada um composto por três isômeros constitucionais. O conteúdo total de ácidos clorogênicos varia conforme a espécie e a variedade do café. Diversas técnicas analíticas foram usadas para a determinação da concentração destes ácidos em café verde e valores médios entre 5,5 e 11 % e 8 a 11,7 % foram encontrados para as espécies *C. arabica* e *C. canephora*, respectivamente. O ácido 5-cafeoilquínico foi o predominante entre os outros, representando 66 % do conteúdo total de ACGs no café arabica e 56 % no robusta (Trugo e Macrae, 1984).

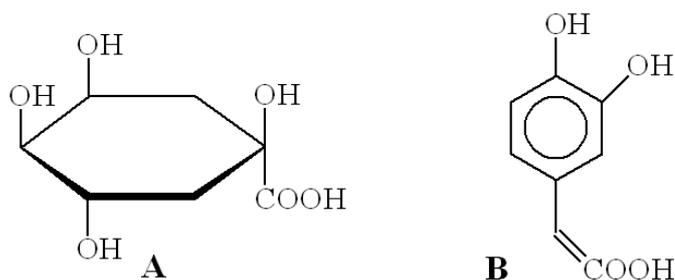


Figura 5. Estruturas químicas do ácido quínico (A) e ácido caféico (B) precursores dos ácidos clorogênicos.

Os ácidos clorogênicos geram durante a torra uma série de compostos fenólicos de baixo peso molecular, como por exemplo, o fenol, pirogallol, gauliacol, 4-vinilgauliacol.

1.4. Carboidratos

Esta é a classe essencial para a formação do aroma, principalmente pela caramelização de açúcares de baixo peso molecular. O total de carboidratos presente no café verde representa em média 50 % dos sólidos totais do grão verde seco. A composição desta classe de composto é complexa e gira em torno de diferentes poli-, oligo-, e monossacarídeos subdivididos em açúcares redutores e não redutores.

1.4.1. Glicídios ou açúcares e polissacarídeos

A sacarose (Figura 6), glicídio de baixa massa molecular é o mais abundante e o principal açúcar encontrado no café verde (5-8 % arábica e 3-5 % robusta). A natureza e o conteúdo deste açúcar são de primordial importância para o aroma do café, além da formação de pigmentos e outros compostos de alto peso molecular formados pela condensação e caramelização durante o processo de torra. Porém, não somente a sacarose como também outros glicídios e polissacarídeos são de importância para o aroma do café. Após uma degradação extensiva durante a torra, a principal família de compostos voláteis gerada por esses açúcares é a dos

furanos, que contribuem consideravelmente para as características sensoriais do café torrado.

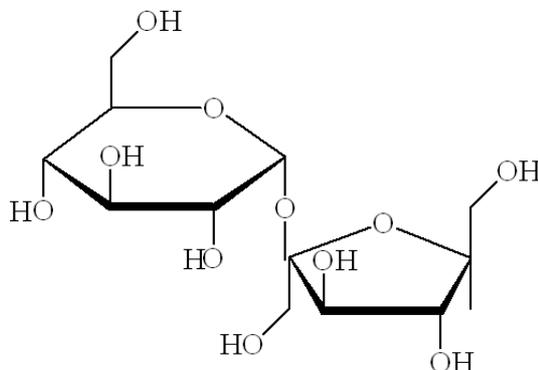


Figura 6. Estrutura química da sacarose.

1.5. Lipídios

Os lipídios representam aproximadamente 13 % em média da composição do café arábica verde, tendo no ácido linoléico (Figura 7) seu principal representante (Holscher et al., 1990). Com o processo de torra, os lipídios sofrem degradação oxidativa e auto-oxidação, gerando dentre os compostos voláteis do café, aldeídos, cetonas, álcoois alifáticos e aromáticos.



Figura 7. Estrutura química do ácido linoléico.

2. Processo de Torra

A torra é um ponto importante a ser considerado, pois com ela dá-se início a formação do sabor e aroma característicos, cujo desenvolvimento ocorre através de alterações físicas e químicas, ou seja, é o que vai propiciar um bom café (Illy e Viani, 2005). Os compostos voláteis responsáveis pelo aroma característico da bebida café são produzidos durante a torra do café verde. Devido as consideráveis

mudanças químicas esses compostos voláteis normalmente não estão presentes na matriz original, e sim, são produzidos durante o processo de torra. Isso faz do café um dos produtos mais modificados durante processamento. A Figura 8 tenta exprimir como é realizada a torra dos grãos e como é necessária a atenção com os mesmos durante todo o processo.



Figura 8. Modelo ROD-BEL de torrador de café e o processo de torra.

A torra pode ser aproximadamente dividida em três fases (Buffo e Cardelli-Freire, 2004):

1. Uma fase inicial de secagem, evidentemente endotérmica, onde a umidade é eliminada. O aroma dos grãos passa a ser parecido com o de massa crua de pão e a coloração se torna amarelada;
2. A fase real de torra, onde um grande número de reações pirolíticas complexas ocorrem. A composição química dos grãos é drasticamente modificada, com a liberação de uma grande quantidade de dióxido de carbono e a formação de centenas de compostos associados ao aroma e sabor do café. Nesta fase, os grãos se tornam escuros. Inicialmente o processo é exotérmico. As reações pirolíticas alcançam um máximo entre 190 e 210 °C, quando o processo se torna endotérmico com a perda de compostos voláteis. A reação total se torna exotérmica novamente à temperatura de 210 °C.
3. Uma fase final rápida de refrigeração para diminuir a parte exotérmica final do processo de torra, usando ar ou água como agente de refrigeração.

A quantidade de calor transferida aos grãos é um parâmetro muito importante no processo de torra. Ele pode ser controlado pela temperatura e tempo de torra. A cor dos grãos é diretamente correlacionada com a temperatura final de torra: quanto maior a temperatura, mais escuro fica o café e então a cor pode ser usada para definir o final do processo. Os graus de torra são usualmente descritos como clara, média e escura e têm impacto considerável na concentração de vários compostos importantes. Já o tempo de torra influencia nas reações dentro dos grãos. Quanto maiores os períodos de torra mais amargos e com aroma não muito satisfatório ficam os cafés, enquanto períodos muito pequenos de torra podem ser insuficientes para completar todas as reações pirolíticas, resultando em um café com baixas características organolépticas. Graus de torra mais escuros são também utilizados com o intuito de mascarar a presença de defeitos ou alterações comuns em cafés usados comercialmente.

A torra produz uma diminuição na quantidade de matéria seca, ou seja, ocorre vaporização de dióxido de carbono, água e produtos voláteis da pirólise. Há uma degradação considerável dos polissacarídeos, dos açúcares, dos ácidos clorogênicos e dos aminoácidos, e um aumento relativamente moderado de lipídios devido a perda de umidade pelo calor. O processo de torra também produz níveis elevados de produtos de caramelização e de condensação. As concentrações da cafeína e da trigonelina (ácido *N*-metil nicotínico) permanecem quase inalteradas (Clarke e Macrae, 1985). Segundo, Toci et al. (2006) durante a torra, os valores médios relativos dos compostos (g/100g matéria seca) apresentam a distribuição indicada na Figura 9.

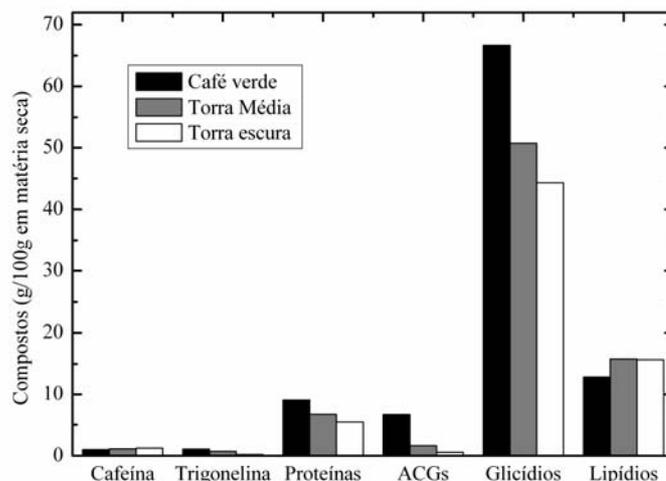


Figura 9. Concentrações médias dos principais compostos do café verde, com torra média e escura (g/100g de matéria seca).

As reações químicas que ocorrem durante a torra ainda não estão completamente elucidadas. Isto resulta da dificuldade extrema em reproduzir ou simular em laboratório todas as reações que ocorrem dentro de um grão. Essas dificuldades podem ser resumidas devido ao fato de:

- Nem todos os precursores ativos do aroma, da cor e do gosto do café verde terem sido totalmente identificados;
- O grande número de precursores causa reações complexas. Essas reações são difíceis de ser isoladas, devido ao fato desses intermediários reagirem entre si;
- A maioria das reações ocorre dentro dos grãos, que têm paredes muito grossas. Estas paredes são comparáveis às autoclaves, onde a pressão pode ser muito elevada.

Durante a torra, o efeito da temperatura provoca transformações físicas e químicas nos grãos, liberando gases que formam os princípios aromáticos responsáveis pelo aroma e pelo sabor do café torrado. É neste processo que os compostos voláteis e não voláteis são formados. Assim, certas características do

sabor, tradicionalmente associados com a origem e consideradas sinal de qualidade, podem ser perdidas por uma torra inadequada.

Mecanismos químicos complexos estão envolvidos na produção do aroma do café durante a torra além da clara existência de um grande número de interações entre todos estes mecanismos envolvidos. Dentre os mecanismos mais importantes estão:

1. A **reação do “Maillard”**: é uma reação de condensação entre substâncias que contém nitrogênio (proteínas, peptídeos, aminoácidos, serotonina e trigonelina) e carboidratos reduzidos, hidroxí-ácidos e fenóis para formar aminoaldolases e aminocetonas. O furaneol é um dos produtos de maior quantidade formado por essa reação;
2. A **degradação de “Strecker”**: reação entre um aminoácido e um alfa-dicarbonil com formação de aminocetonas que se condensam para formar compostos heterocíclicos nitrogenados e/ou reagir com o formaldeído;
3. A degradação de amino-ácidos sulfonados (cistina, cisteína e metionina) que são transformados em mercaptanas, tais como os tiofenos e os tiazóis, após reagir com os açúcares redutores ou produtos intermediários de reações de Maillard;
4. A degradação de hidroxí-aminoácidos (ex. serina e treonina) capazes de reagir com sacarose para formar a maioria dos alquilpirazinas;
5. A degradação da prolina e hidroxiprolina, que reagem com produtos intermediários das reações de Maillard. A prolina fornece piridinas, pirróis e pirrolidinas enquanto que a hidroxiprolinas formam alquil, acil- e furfúrilpirróis;
6. A degradação de trigonelina, formando alquilpiridinas e pirróis;
7. A degradação dos ácidos quínico, ferúlico e caféico formando fenóis;
8. A degradação de pigmentos tais como os carotenóides formando cetonas e aldeídos;
9. A degradação e auto-oxidação de lipídios formando álcoois, cetonas e aldeídos;
10. As interações entre produtos intermediários das degradações e outros mecanismos (a maioria ainda desconhecidos) (Buffo e Cardelli-Freire, 2004).

A Figura 10 ilustra os principais mecanismos de formação dos voláteis de café torrado de uma forma compacta e de fácil entendimento.

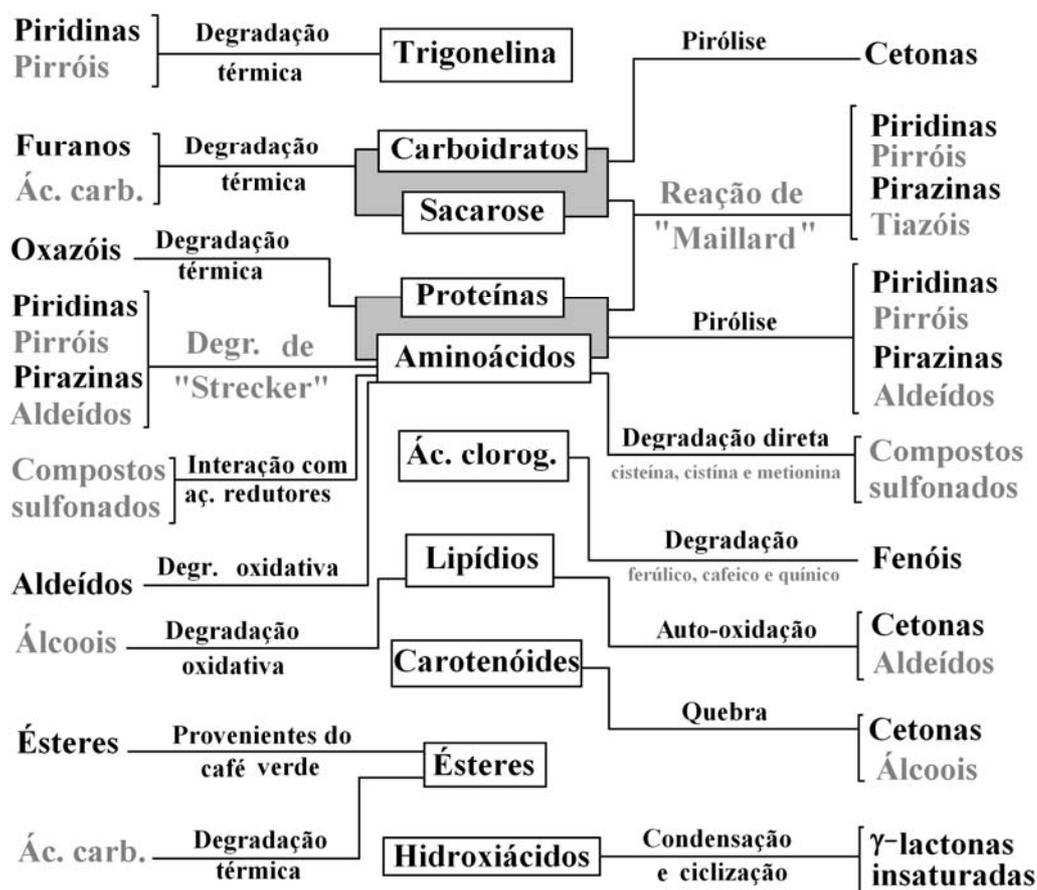


Figura 10. Principais mecanismos químicos de formação dos voláteis de café.

3. Voláteis do café torrado

O aroma do café é formado por uma mistura extremamente complexa de inúmeros compostos voláteis que apresentam qualidades de aroma, intensidades e concentrações diferentes. Esses compostos voláteis são gerados basicamente durante a torra do café verde. Dentre os compostos voláteis identificados no café torrado encontram-se: furanos, pirrois e pirazinas, hidrocarbonetos, fenóis, aldeídos, cetonas, álcoois, éteres, ácidos orgânicos, anidridos, ésteres, lactonas, aminas e compostos contendo átomos de enxôfre, além de uma série de compostos

voláteis que apresentam mais de uma função química. A Tabela 1 indica um número aproximado de compostos de cada classe já identificados e catalogados no café torrado.

Tabela 1. Classes de voláteis identificadas em café torrado e o n° de derivados estimados.

| Classe de compostos | Número de compostos identificados |
|--|-----------------------------------|
| Hidrocarbonetos | 80 |
| Álcoois | 24 |
| Aldeídos | 37 |
| Cetonas | 85 |
| Ácidos carboxílicos | 28 |
| Ésteres | 33 |
| Pirazinas | 86 |
| Pirróis | 66 |
| Piridinas | 20 |
| Outras bases (e. g. Quinoxalinas e indóis) | 52 |
| Compostos sulfonados | 100 |
| Furanos | 126 |
| Fenóis | 49 |
| Oxazóis | 35 |
| Outros | 20 |

Fonte: Nijssen et al., 1996

3.1. Furanos

Os furanos são éteres cíclicos encontrados em grande quantidade no café torrado. Devido ao fato do café verde possuir uma grande quantidade de carboidratos, sacarose e outros açúcares livres sabe-se que essa classe de compostos é normalmente produzida por degradação térmica destes constituintes durante a torra (Gianturco et al., 1964). Entretanto, evidências indicam que essa classe de compostos também seria formada em pequenas quantidades por oxidação térmica de lipídios e por degradação de terpenos com alto peso molecular (Vitzthum e Werkhoff, 1976). Porém, devido aos baixos teores destes no café,

devem então participar de forma inexpressiva como precursores de furanos durante a torra (Flament, 2001).

Mais de 120 furanos já foram identificados no café torrado. Alguns deles são encontrados em altas concentrações, sendo os mais abundantes o 2-acetilfurano, 2-furfural, 5-metil-2-furancarboxaldeído e o acetato de 2-furanmetanol (Figura 11) (Ribeiro et al., 2009).

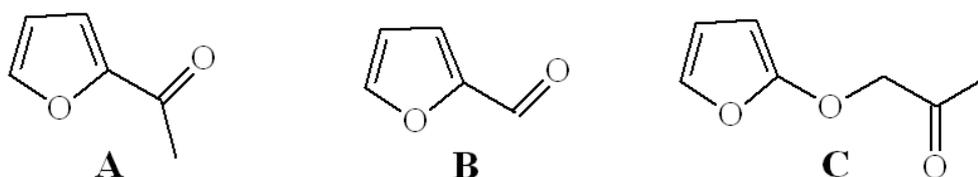


Figura 11. Estruturas químicas do 2-acetilfurano (A), 2-furfural (B) e acetato de 2-furanmetanol (C).

Dentre os furanos existentes no café torrado encontram-se classes com diferentes grupos funcionais, tais como, aldeídos, cetonas, ésteres, alcoóis, éteres, ácidos e tióis (Clarke, 1990). Furanos que apresentam outras funções orgânicas (maltol) e condensados com pirazinas e pirróis também são encontrados. A Tabela 2 indica os principais furanos encontrados no *headspace* do café torrado.

Tabela 2. Principais furanos e suas descrições sensoriais de acordo com a literatura.

| Principais furanos | Descrição sensorial |
|--------------------------|--|
| Furano | Odor de fumo e ligeiramente de canela (Arctander, 1969) |
| 2-Metilfurano | Odor de matéria queimada e odor doce parecido com o aroma do café torrado (Vernin, 1985) |
| 2-Etilfurano | O aroma é descrito como de alho, sujeira, ranço, fenólico e medicinal (Chemisis) |
| 2,5-Dimetilfurano | Odor de éter |
| 2-Furanmetanol | Possui um odor muito suave, ligeiramente de caramelo (Arctander, 1969); É bem correlacionado com a nota de queimado e amargo indesejáveis nos cafés com torra escura |
| Furfural | Seu aroma é parecido com o de pão e caramelo na concentração correta, possuindo ainda um caráter amargo (Fors, 1983) |

Apêndice – Compostos químicos do café verde, torra e voláteis do café

| | |
|--|--|
| 5-Metil-2-furancarboxaldeído | Odor descrito como picante, doce e ligeiramente caramelado (Arctander, 1969) |
| 2-Acetilfurano | Odor adocicado parecido com fumo, com sobreposições de aromas florais e medicinais (Arctander, 1969) |
| Furaneol® | Possui um odor intenso de frutas carameladas parecido com o de tortas de maçã (Arctander, 1969); Uma separação enantiomérica descobriu que o isômero (-) possui um nota intensa de caramelo e o odor do enantiômero (+) é doce e torrado |
| Formato de furfurila | Aroma de malte, frutas e cereais (Chemisis) |
| Acetato de 2-furanmetanol | Odor é suavemente floral as vezes lembrando acetoacetato de etila, acetato de benzila com sobreposição de odores herbais picantes (Arctander, 1969) |
| 2-Hidroximetil-furano | Aroma de matéria queimada (Clarke e Macrae, 1985) |
| Propionato de 2-furanmetanol | Aroma é descrito como de fruta, grama e pêra (Chemisis) |
| 2-Metilfuranotiol | Exibe um intenso aroma de carne como outros furanos substituídos na posição 3 por enxofre ele contribui irrefutantemente para o aroma do café torrado (Holscher e Steinhart, 1994); Descrito ainda como adocicado, bife frito e caldo de carne |
| 2-Furanmetanetiol ou 2-Furfuriltiol | É descrito como sendo um odor extremamente potente e penetrante; somente em diluições corretas ele se torna agradável com um aroma doce de caramelo, porém, em altas concentrações pode ser considerado um aroma desagradável (<i>off-flavour</i>) (Arctander, 1969) |
| 5-Metil-2-furanmetanetiol | Possui um aroma de matéria queimada e cebola (Chemisis); É um pouco menos potente que o 2-furanmetanetiol |

Fonte: Flament, 2001

Como regra, os furanos são considerados, do ponto de vista sensorial, constituintes importantes do aroma do café torrado. Vitzthum e Werkhoff (1976) mencionaram que furanos com substituintes insaturados possuíam forte odor que variava de desagradável à aroma de comida. Os alquilfuranos apresentam propriedades sensoriais que são importantes para a composição do aroma do café. De acordo com Ohloff e Flament (1978), furanos que não contêm enxofre são associados principalmente com odores adocicados, de frutas, castanhas e caramelo.

Por outro lado, sabe-se que compostos derivados de furanos com um ou mais átomos de enxofre apresentam um papel fundamental no aroma do café torrado. Uma revisão sobre constituintes voláteis sulfonados de café demonstrando a importância de furanos substituídos na posição 3 para o aroma do café foi publicada em 1988 (Flament e Chevallier, 1988).

De acordo com a Tabela 2, o 2-etilfurano é responsável pelo aroma de matéria queimada e pelo odor doce parecido com o aroma do café torrado. Já o furano fornece um aroma similar ao fumo e canela e o furfural um aroma parecido com o de pão. O 2-hidroxi-metilfurano está presente em grande quantidade no café submetido à torra muito forte e é considerado um dos responsáveis pelo aroma de matéria queimada característico desse café. Como os furanos são produzidos por pirólise de glicídios é comum a descrição do aroma de caramelo e açúcar queimado oriundo desses componentes.

3.2. Pirróis

Eles foram identificados nos alimentos em meados da década de 60 sendo compostos característicos de alimentos processados termicamente. Os acil-, alquil-acil-pirróis podem ser formados a partir da reação de "Maillard" (Maga, 1981b). Já o pirrol e os alquil-pirróis são formados via pirólise de hidroxil-aminoácido e degradação da trigonelina (Baltes e Bochmann, 1987). Foi relatado, também, que os pirróis poderiam ser formados pela interação entre um aminoácido e a 3-deoxi-hexosona através da degradação de "Strecker" seguida de desidratação e fechamento do anel (Kato et al., 1995). Em outro estudo foi evidenciado que o pirrol e os alquil-pirróis seriam formados pela pirólise de aminoácidos ligados a proteínas e não por aminoácidos livres (De Maria et al., 1996).

O tipo de pirrol formado depende de uma série de fatores, incluindo temperatura, tempo de torra e pH. A sua quantidade tende a aumentar com o aumento no processo de torra, sendo encontrado em maior quantidade em cafés com torra escura (Clarke e Macrae, 1985).

Tabela 3. Principais pirróis e suas respectivas descrições sensoriais de acordo com a literatura.

| Pirróis importantes | Descrição sensorial |
|---------------------|--|
| Pirrol | Levemente pungente, odor de feno (Arctander, 1969) |
| N-Metilpirrol | Identificado em café verde. Possui um aroma de mato verde e grãos (Chemisis) |
| 2-Etilpirrol | Aroma de matéria queimada (Winter et al., 1976a) |

Apêndice – Compostos químicos do café verde, torra e voláteis do café

| | |
|-------------------------------|---|
| 1-Isobutilpirrol | Aroma de madeira e química (Chemisis) |
| 1-(Sec-butil)pirrol | Possui um aroma desagradável de mato (Chemisis) |
| 1-Isopentilpirrol | aroma de ranço e gordura (Chemisis) |
| 1,2-Dimetilpirrol | Aroma fraco descrito como parecido com produtos químicos (Chemisis) |
| Indol | Identificado em café verde. Possui um odor poderoso e difusivo quase sempre repulsivo; Odor de fezes (Kato et al., 1971) |
| Pirrol-2-carboxaldeído | Odor pungente parecido com milho (Shibamoto e Russell, 1977) |
| 2-Acetilpirrol | Identificado em café verde. Esse composto adiciona um leve aroma de caramelo em carnes cozidas, porém, outros autores ligam o aroma desagradável deste composto a anti-sépticos e plásticos |
| N-Etil-2-formilpirrol | Aroma de matéria queimada e torrada (Winter et al., 1976a) |
| N-Furil-2-metilpirrol | Agradável aroma de mato verde e cogumelos; aroma de café torrado velho (Tressl et al., 1985) |

Fonte: Flament, 2001

Mais de 65 pirróis já foram identificados no café torrado (Nijssen et al., 1996). Destes, mais de trinta são alquil-pirróis. Foram identificados também, os acetil-pirróis, alquil-formil-pirróis e os furil-pirróis (Shimoda e Shibamoto, 1990). Dentre os pirróis encontrados em maior quantidade no café torrado estão o *N*-metilpirrol e o pirrol-2-carboxaldeído (Ribeiro et al., 2009) (Figura 12).

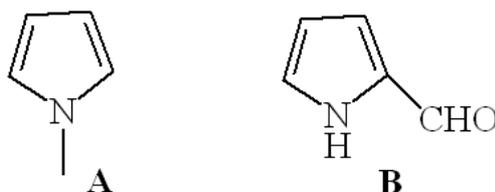


Figura 12. Estruturas químicas do *N*-metilpirrol (A) e pirrol-2-carboxaldeído (B).

Os pirróis apresentam propriedades sensoriais bem características. Foi constatado que os alquil-pirróis apresentaram um odor desagradável de petróleo, porém, em baixas concentrações, forneceram um aroma doce e levemente queimado. Os acil-pirróis possuem um odor adocicado e de fumaça. Em outro estudo, verificou-se que os acil-pirróis foram responsáveis por um odor semelhante ao de pão, enquanto os furil-pirróis foram relacionados a algumas notas observadas

no aroma de cogumelos. O *N*-fúril-2-metil-pirrol foi relacionado a uma nota observada no aroma de café torrado velho e foi considerado, no passado, como um dos possíveis componente de impacto para o aroma do café torrado. Já o 2-acetil-pirrol foi responsável pelo odor suave de caramelo identificado em carne bovina cozida. Outro componente considerado de grande importância para o café foi o *N*-etil-2-formil-pirrol, o qual foi responsável por uma nota observada no aroma de café torrado (Vernin, 1985). Descrições sensoriais destes compostos e de outros pirróis importantes são encontradas na Tabela 3.

3.3. Pirazinas

Um passo significativo na química de voláteis de café torrado foi tomado em 1920 quando pirazinas foram reportadas pela primeira vez neste produto (Reichstein e Staudinger, 1926). Elas são aromáticos que possuem dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 4 de um anel de seis membros abundantes no aroma do café torrado. Esses compostos voláteis são característicos de alimentos submetidos a tratamento térmico (De Maria et al., 1999). Como os pirróis, essa classe de compostos pode ser gerada diretamente por reação de "Maillard", por degradação de "Strecker" ou ainda por pirólise de hidroxí-aminoácidos (Baltes e Bochmann, 1987). Na reação de "Maillard" as maiores fontes de carbono para a formação das pirazinas são os produtos da degradação de carboidratos, enquanto que os aminoácidos funcionam basicamente como fontes de nitrogênio para esses compostos.

Atualmente, oitenta e seis compostos contendo um anel de pirazina já foram identificados como compostos da fração volátil do café torrado (Nijssen et al., 1996). Dentre as alquilpirazinas, destacam-se as metil- e dimetil- pirazinas, que segundo dados da literatura são as pirazinas majoritárias do café torrado (Silwar e Lullmann, 1988). Pirazinas com grupamentos alquenil, fúril e ciclo-pirazinas também foram encontradas (Holscher et al., 1990). Sabe-se que as concentrações de alquilpirazinas são proporcionais ao grau de torra (Clarke e Macrae, 1985). Essa

concentração aumenta, até certo limite, à medida que a temperatura de torra aumenta. Quando essa torra se prolongada começa a ocorrer degradação dessas pirazinas. Geralmente maiores quantidades de pirazinas devem ser encontradas em cafés submetidos a torrefações leve e moderada.

Sabe-se que a classe das pirazinas contribui apreciavelmente para as características sensoriais dos alimentos. Esses componentes apresentam propriedades sensoriais bem peculiares, sendo considerados flavorizantes importantes para a indústria de produtos alimentícios (Maga, 1982).

Tabela 4. Principais pirazinas e suas respectivas descrições sensoriais de acordo com a literatura.

| Pirazinas importantes | Descrições sensoriais |
|--|---|
| Pirazina | É pungente, e possui um odor adocicado e quando diluído floral (Arctander, 1969) |
| 2-Metilpirazina | Aroma de que lembra chocolate quando diluído (Calabretta, 1978) e amêndoas (Chemisis); Apresenta ainda um odor relacionado ao de matéria torrada e de grama (Boyko et al., 1982; Maga, 1982) |
| 2,3-Dimetilpirazina | Possui um aroma de mato verde, semente e matéria torrada (Pittet e Hruza, 1974); Aroma semelhante ao de óleo de linhaça (Sizer et al., 1975) |
| 2,5-Dimetilpirazina | O odor foi descrito como torrado, capim e milho e o que lembra batata frita, chocolate e castanhas torradas (Fors, 1983); Foi descrito ainda com aroma semelhante ao de grama e de nozes (Boyko et al., 1982) |
| 2,6-Dimetilpirazina | O odor é adocicado, e as vezes lembra batata frita (Arctander, 1969); O aroma foi descrito como de chocolate, terra, coco e matéria torrada (Chemisis) |
| 2-Etilpirazina | Odor semelhante à castanha e de matéria torrada (Pittet e Hruza, 1974), manteiga e rum (Sizer et al., 1975) |
| 2,3,5-Trimetil-pirazina | Aroma semelhante ao de nozes, de grama e de matéria torrada |
| 3-Etil-2,5-dimetilpirazina | Aroma descrito como de matéria torrada e terra (Wagner et al., 1999) |
| 2-Etil-3,5-dimetilpirazina | Aroma de matéria torrada e terra (Wagner et al., 1999) |
| 2,3-Dietil-5-metilpirazina | Odor de terra e aroma de castanha torrada (Pittet e Hruza, 1974) |
| 2-Etil-3-metilpirazina | Aroma semelhante ao de nozes e torrado (Pittet e Hruza, 1974) |
| 2-Etil-5-metilpirazina | Odor de grama (Pittet e Hruza, 1974) |
| 2-Etil-6-metilpirazina | Foi relacionada ao odor de matéria torrada e nozes (Winter et al., 1975b) |
| 2-Etenil-3-etil-5-metilpirazina | Odor parecido com terra e ranço (Grosch et al., 1996) |
| 2-Etenil-3,5-dimetilpirazina | Odor parecido com terra e ranço (Grosch et al., 1996) |
| 2-Metil-6,7-diidro-5H- | Possui uma descrição de odor e aroma parecidos com chocolate, terra e |

| | |
|---|--|
| ciclopentapirazina | batata (Coleman e Ho, 1980) |
| 5-Metil-6,7-diidro-5H-ciclopentapirazina | Aroma e odor de castanha e terra e batata (Coleman e Ho, 1980) |
| 2-Isopropil-3-metoxipirazina | Aroma de pimenta vermelha (Belitz e Grosch, 2004) |

Fonte: Flament, 2001

Segundo dados da literatura indicados na Tabela 4, as alquil-pirazinas apresentam propriedades sensoriais bastante variadas podendo ser relacionadas tanto a um aroma semelhante ao do milho, quanto a um odor adocicado extremamente forte. Uma característica interessante das dimetil- e etil-metilpirazinas é que suas descrições sensoriais variam bastante conforme a posição dos substituintes na molécula. A estrutura química de três pirazinas presentes na Tabela 4 estão indicados na Figura 13.

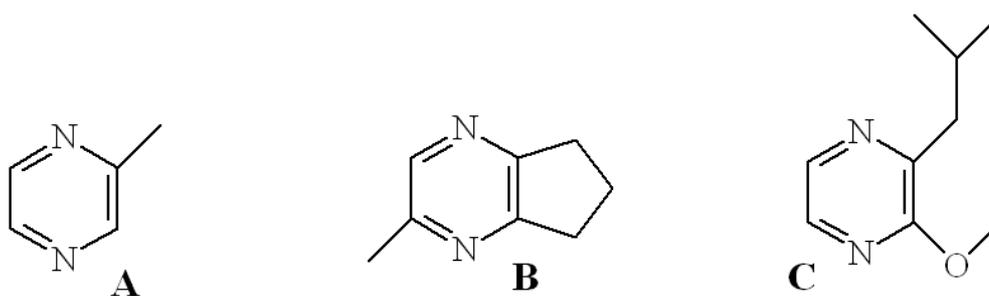


Figura 13. Estruturas químicas da 2-metilpirazina (A), 2-metil-6,7-diidro-5H-ciclopentapirazina (B) e 2-isopropil-3-metoxipirazina (C).

As metoxi-pirazinas são odorantes potentes e estão amplamente distribuídas pelo reino vegetal, sendo responsáveis dentre outros pelo odor de café verde. A 3-isopropil-2-metoxipirazina contribui para a impressão final do aroma logo após a torra e por isso apareceu como uma das possíveis substâncias consideradas de impacto para o aroma do café arábica torrado (Semmelroch e Grosch, 1996).

Estudos mais recentes através de análise de extrato de aroma diluído (AEDA) determinaram que apenas 6 alquil- e alquenil- pirazinas, todas presentes no aroma do café torrado, poderiam participar como aromas importantes de alimentos em geral (Gosch, 1993; Gosch, 1994; Gosch et al., 1996).

3.4. Piridinas

Piridinas vêm sendo encontradas em apenas uma quantidade relativamente pequena de alimentos, as quais foram submetidas a alguma atividade microbiana ou a tratamento térmico (Maga, 1981b). Segundo dados da literatura, as quantidades de piridinas no café torrado também dependem do grau de torra (Sivetz e Desrosier, 1979), sendo encontradas em maior concentração em cafés com torra escura. Elas são geradas por degradação térmica da trigonelina (Viani e Horman, 1974), por pirólise de aminoácidos, por degradação de "Strecker" (Lien e Nawar, 1974) ou ainda via reação de "Maillard" (Kato et al., 1973).

Um total de 20 piridinas já foram identificadas no café torrado incluindo derivados metílicos, etílicos, acetílicos e vinílicos (Clarke e Macrae, 1985). A metilpiridina e a 2,3-dimetilpiridina são representantes importantes desta classe de compostos (Figura 14).

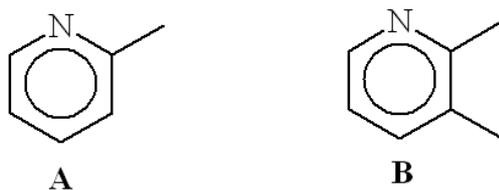


Figura 14. Estruturas químicas da 2-metil-piridina (A) e 2,3-dimetil-piridina (B).

As piridinas, apesar de possuírem estruturas similares aos pirróis, apresentam características sensoriais diferenciados. Dados da literatura mencionam que as piridinas geralmente possuem notas de adstringência, odor penetrante, aroma de mato verde e matéria queimada. A piridina é indicada como uma das responsáveis pelo odor desagradável do café torrado velho. Já a 2-metil-piridina foi responsável por uma sensação adstringente semelhante ao de avelã. Informações sobre as descrições sensoriais das piridinas importantes estão indicadas na Tabela 5.

Em um estudo comparativo, os autores consideraram as alquipiridinas como as principais responsáveis pelo aroma de mato verde (Pittet e Hruza, 1974).

Tabela 5. Principais piridinas e suas respectivas descrições sensoriais de acordo com a literatura.

| Principais piridinas | Descrição sensorial |
|---|--|
| Piridina | É caracterizada por um odor pungente e penetrante, geralmente descrito como nauseante, porém, extremamente diluída ela possui um aroma de fumaça e matéria queimada (Arctander, 1969); Responsável ainda pelo odor desagradável de café velho (Sivetz e Desrosier, 1979) |
| 2-Metilpiridina – α -picolina | Possui características adstringentes e aroma de avelã; Existe ainda uma descrição de aroma de pipoca torrada |
| 3-Metilpiridina – β -picolina | Possui a aroma de mato verde (Pittet e Hruza, 1974) |
| 2-Etilpiridina | Aroma de mato verde (Pitter e Hruza, 1974) |
| 3-Etilpiridina – β -lutidina | É caracterizada por um aroma de fumo (Fors, 1983), caramelo e matéria queimada (Chemisis) |
| 4-Etilpiridina – 4-homopicolino | Possui um potente aroma de mato verde adocicado. Em altas concentrações é nauseante, porém, depois de diluído se torna mais leve possuindo características de odor herbáceo. Existe ainda certa similaridade com odor de cogumelos e madeira (Arctander, 1969) |
| 2,3-Dimetilpiridina | Odor relacionado ao de borracha e de matéria queimada (Maga, 1981b) |
| 2-Etil-5-metilpiridina | Aroma de pipoca |
| Quinolina | O odor é fortemente penetrante e nauseante, porém, ainda doce (Arctander, 1969) |

Fonte: Flament, 2001

3.5. Oxazóis e Tiazóis

Os oxazóis são compostos heterocíclicos que apresentam um átomo de nitrogênio e um de oxigênio, enquanto os tiazóis contêm um átomo de nitrogênio e outro de enxofre (Maga, 1981a). Cerca de trinta e cinco oxazóis e vinte e sete tiazóis foram identificados no café torrado (Nijssen et al., 1996; Clarke, 1990). Não se sabe exatamente o mecanismo de formação dos oxazóis, porém, estudos indicam que essa classe de compostos pode ser formada principalmente por degradação térmica de proteínas e aminoácidos. Os tiazóis são formados via reação de Maillard entre aminoácidos sulfonados e açúcares redutores (Maga, 1975a).

As características sensoriais dos oxazóis variam de acordo com o tipo de substituintes no anel. Em geral, oxazóis possuem um aroma doce e semelhante ao de nozes (Clarke e Macrae, 1985). Alquinoxazóis são associados a odor doce, terra e vegetais (Ho et al., 1983). Já os tiazóis geralmente possuem um odor semelhante

ao de vegetais, carne, matéria torrada e nozes (Maga, 1975a). A presença de substituintes de cadeias laterais curtas na molécula do tiazol intensifica esses aromas. O 2,4,5–trimetiltiazol possui odor plástico (Buffo e Cardelli-Freire, 2004) sendo considerado um dos compostos de impacto do café. Até o momento, nenhum oxazol foi identificado como componente de impacto para o aroma do café.

Tabela 6. Principais oxazóis e tiazóis e suas respectivas descrições sensoriais de acordo com a literatura.

| Oxazóis e tiazóis importantes | Descrição sensorial |
|-------------------------------|--|
| 2,4-Dimetiloxazol | Aroma de mato verde, frutal e groselha (Chemisis) |
| 4,5-Dimetiloxazol | Aroma de gordura e matéria queimada (Chemisis) |
| 4-Etil-5-metiloxazol | Aroma parecido com o da piridina, caramelado e leite queimado (Chemisis) |
| Trimetiloxazol | Composto com odor piridínico; Aroma de madeira, rançoso (Mussinan et al., 1976); Aroma de terra e nozes (Coleman et al., 1981) |
| 5-Acetil-2-metiloxazol | Composto importante para o aroma de batata assada. Aroma de terra e nozes (Coleman et al., 1981) |
| Tiazol | Odor piridínico (Pittet e Hruza, 1974); Aroma rançoso, carne e de mato verde (Chemisis) |
| 4-Metiltiazol | Aroma de tomate, frutal, nozes, mato verde, carne (Chemisis) |
| 2,4-Dimetiltiazol | Aroma descrito como de acetona, frutal, fruta tropical (Chemisis) |
| 2-Acetil-4-metiltiazol | Aroma de matéria queimada (Winter et al., 1976c) |
| 2,4,5–Trimetiltiazol | Aroma de cacau, nozes (Pittet e Hruza, 1974) |

Fonte: Flament, 2001

A Figura 15 apresenta a estrutura química de um representante de cada classe destes compostos e a Tabela 6 indica a descrição sensorial de 10 compostos encontrados no café torrado.



Figura 15. Estruturas químicas do 5-acetil-2-metiloxazol (A) e 2-acetil-4-metiltiazol (B).

3.6. Compostos sulfonados e tiofenos

Os compostos contendo enxofre possuem a característica distinta de contribuir com notas agradáveis e desagradáveis no aroma de muitos alimentos. Eles são considerados de grande importância para o aroma do café torrado. Estes compostos estão presentes em baixíssimas quantidades, porém, apresentam aromas bem potentes e característicos, tendendo, assim, a dominar o aroma total do produto no qual estão presentes (Clarke e Macrae, 1985).

Sem contabilizar os compostos heterocíclicos, já foram detectados 65 compostos voláteis contendo enxofre no café torrado. O gás sulfídrico e o metanotiol apresentam um odor pútrido, conferindo uma nota de aroma desagradável ao café torrado (Holscher et al., 1992; Clarke e Macrae, 1985). Sendo o segundo deles um dos compostos de maior valor de odor ativo (VOA) em bebidas de café arábica e robusta (Semmelroch e Grosch, 1996).

A origem dos compostos contendo enxofre está geralmente relacionada à degradação direta de aminoácidos sulfurados (cistina, cisteína e metionina) ou, então, à interação desses compostos com açúcares redutores e intermediários da reação de "Maillard" (Clarke e Macrae, 1985).

Tabela 7. Principais compostos sulfonados e suas respectivas descrições sensoriais de acordo com a literatura.

| Compostos sulfonados | Descrição sensorial |
|-----------------------------------|---|
| Metanotiol | Odor muito difusivo de repolho podre (Arctander, 1969); Essa mercaptana fornece uma das mais intensas notas do café torrado |
| Dissulfeto de dimetila | Odor intenso de cebola (Arctander, 1969) |
| Metional | Odor poderoso e bem difusivo de cebola e carne. Quanto mais diluído mais agradável (Arctander, 1969); Odor de batata cozida e classificado como um dos mais poderosos odorantes em café verde e com torra média tendo características adocicadas, carameladas (Czerny and Grosch, 2000) |
| 3-Metil-2-buteno-1-tiol | A substância pura possui um cheiro pungente ou de alho-poró. Em baixas concentrações um odor penetrante de animais (Soeltoft, 1988) |
| 3-Mercapto-3-metil-butanol | Aroma de carne, enxofre e repolho (Chemisis), odor doce e semelhante à sopa |

| | |
|--|---|
| Formato de 3-mercaptop-3-metilbutil | Possui aroma de frutas tropicais, mato, e material queimada (Chemisis); Somente quando muito diluído esse composto justifica o termo “parecido com aroma de café torrado” (Vizthum, 1999) |
|--|---|

Fonte: Flament, 2001

Os compostos voláteis sulfurados contribuem de forma decisiva para o aroma final do café torrado. As descrições sensoriais de importantes compostos sulfonados encontrados no café torrado estão indicadas na Tabela 7. O dissulfeto de dimetila, por exemplo, é capaz de melhorar marcadamente o aroma desse produto (Clarke e Macrae, 1985). No café arábica torrado, o metional e o 2-furfuriltiol, formato de 3-mercaptop-3-metilbutil e 2-metilfuranotiol foram caracterizados compostos sulfurados de impacto para o aroma (indicados na Tabela 2 de furanos e Tabela 7) (Buffo e cardelli-Freire, 2004). As estruturas químicas destes compostos estão indicadas na Figura 16.



Figura 16. Estruturas químicas do metional (A) e 2-furfuriltiol (B).

Os tiofenos são compostos voláteis contendo um átomo de enxofre que aparentavam possuir grande relevância para o aroma do café torrado (Clarke e Macrae, 1985). De acordo com dados da literatura, trinta e um tiofenos já foram identificados como componentes da fração volátil do café torrado (Clarke, 1990). A formação dos tiofenos no café provavelmente está relacionada à presença de aminoácidos sulfurados. Esses aminoácidos sofrem degradação individual durante a torra e interagem com açúcares redutores e intermediários da reação de "Maillard", resultando na formação de uma ampla variedade de compostos voláteis sulfurados (Maga, 1975 b).

Tabela 8. Principais tiofenos e suas respectivas descrições sensoriais de acordo com a literatura.

| Importantes tiofenos | Descrição sensorial |
|--------------------------------|--|
| Tiofeno | Odor parecido com o do benzeno e responsável pelo odor desagradável de carne enlatada (Maga, 1975b) |
| 2-Metiltiofeno | A um odor desagradável levemente adocicado parecido com carne enlatada (Maga, 1975b); Odor sulfúrico e de cebola assada (Winter et al., 1975a) |
| Benzotiofeno | Tonalidades de cereal, fumaça e café (Chemisis) |
| 2-Acetiltiofeno | Odor parecido com o de mostarda (Maga, 1975b) |
| 3-Metil-2-acetiltiofeno | Odor de benzoato de metila (Maga, 1975b); Apresenta um aroma semelhante ao do café (Vernin, 1985) |
| 2-Metiltiofan-3-ona | Apresenta uma nota de café verde e torrado (Winter et al., 1975a) |

Fonte: Flament, 2001

Como exemplo desses componentes, podemos citar o 2-metiltiofeno, o benzotiofeno e o 2-acetiltiofeno, sendo o último encontrado em maior quantidade.

Segundo dados da literatura, indicados na Tabela 8, é sabido que o tiofeno apresenta um odor um tanto quanto semelhante ao do benzeno (Boelens et al., 1993) enquanto o 3-metil-2-acetil-tiofeno apresenta um aroma semelhante ao do café, sendo considerado em 1985 um dos possíveis compostos voláteis de impacto para o aroma desse produto (Vernin, 1985). Três representantes desta classe de compostos estão indicados na Figura 17.

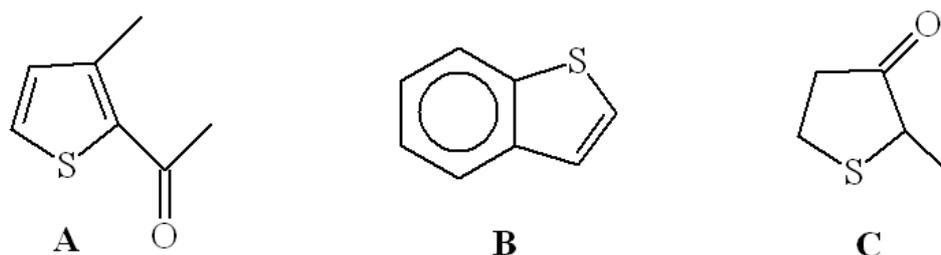


Figura 17. Estruturas químicas do 3-metil-2-acetil-tiofeno (A), benzotiofeno (B) e 2-metiltiofan-3-ona (C).

3.7. Fenóis

Fenóis são compostos essenciais para a qualidade típica do café. Eles são compostos aromáticos encontrados geralmente em baixas concentrações no café

torrado (Clarke e Macrae, 1985). A variedade e a concentração dos compostos fenólicos voláteis no café torrado variam de acordo com o grau de torra e maiores quantidades, tanto com relação à variedade quanto à concentração, são detectadas em cafés submetidos à torra forte. O café da espécie robusta normalmente apresenta um perfil de compostos fenólicos mais rico do que o da espécie arábica.

A principal via de formação dos compostos fenólicos voláteis parece ser a degradação dos ácidos fenólicos livres (ácido *p*-cumárico, ferúlico, caféico, quínico), durante a torra do café (Clarke e Macrae, 1985). Em segundo plano, experimentos demonstraram a degradação da sacarose como uma outra rota para a formação destes compostos (Baltes e Bochmann, 1987).

Além do próprio fenol, os metoxifenóis (guaiacol e 4-vinil-guaiacol) e os metilfenóis (cresóis) são os representantes desta classe encontrados em maior quantidade no café torrado (Silwar e Lullmannl, 1988). Isômeros do cresol (orto, meta e para) também fazem parte do grupo de fenóis majoritários do café torrado. A estrutura química do 4-vinilguaiacol, do guaiacol e do pirogalol estão indicados na Figura 18.

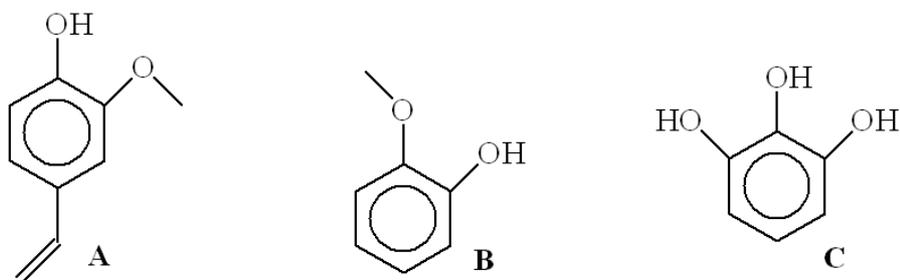


Figura 18. Estruturas químicas do 4-vinilguaiacol (A), guaiacol (B) e pirogalol (C).

Os compostos fenólicos voláteis, de maneira geral, apresentam características sensoriais bem variadas, sendo responsáveis pelo odor de matéria-queimada, de especiarias, de cravo, de fumo e também pela sensação de amargor e adstringência encontradas no café (Clarke e Macrae, 1985). Estudos recentes indicam que o guaiacol (material queimado), 4-vinil-guaiacol (semelhante a cravo), 4-etilguaiacol e a vanilina foram identificados dentre os 22 compostos de maior impacto

caracterizados a partir da bebida produzida com os cafés arábica e robusta torrados (Semmelroch e Grosh, 1996). A Tabela 9 indica os outros principais representantes desta classe.

Tabela 9. Principais e suas respectivas descrições sensoriais de acordo com a literatura.

| Fenóis importantes | Descrição sensorial |
|------------------------|---|
| Fenol | Aroma de fumaça (Maga, 1978 a) |
| Hidroquinona | Não possui odor (Arctander, 1969) |
| Pirogalol | Não possui odor |
| Catecol | Não possui nenhuma menção de odor |
| Guaiacol | Possui um poderoso odor de fumaça e levemente medicinal (Arctander, 1969); Descrito como fenólico, e matéria queimada; Descrito ainda como fumaça, madeira, fenólico e carne (Chemisis) |
| 4-Etilguaiacol | Aroma de fumaça e matéria queimada (Winter et al., 1976b) |
| 4-Vinilguaiacol | Possui um poderoso aroma de fumaça, adocicado e picante (Chemisis) |
| Vanilina | Odor intensamente doce e muito parecido com creme de baunilha (Arctander, 1969); Considerado um importante odorante do café torrado (Blank et al., 1992; Semmelroch e Grosh, 1996) |

Fonte: Flament, 2001

3.8. Aldeídos

Os aldeídos são encontrados em grande quantidade no café torrado fresco, sendo perdidos em quantidades elevadas durante a estocagem. Essa perda está relacionada a volatilização e a reações de oxidação. Segundo dados da literatura, os aldeídos são formados por degradação oxidativa de aminoácidos durante sua interação com açúcares em altas temperaturas e durante a interação de aminoácidos e polifenóis na presença da polifenol oxidase em temperatura ambiente (Motoda, 1979). A auto-oxidação de ácidos graxos insaturados através da quebra de intermediários de hidroperóxidos também é bem estabelecida na literatura (Ullrich e Grosh, 1988). Alguns bem conhecidos são o hexanal, (Z)-2-nonenal, (E)-2-nonenal, (E,Z)-2,6-nonadienal, (E,E)-2,4-nonadienal e os isômeros do 2,4-decadienal. Já o 2-metil-propanal, têm sua origem relacionada a pirólise de alanina,

valina e leucina (Merritt et al., 1969) enquanto o metional é resultante da degradação de Strecker da metionina (Flament, 2001).

Tabela 10. Principais aldeídos e suas respectivas descrições sensoriais de acordo com a literatura.

| Aldeídos importantes | Descrição sensorial |
|-------------------------------|---|
| Metanal ou formaldeído | Aroma acre e pungente, sendo indesejáveis em altas concentrações (Arctander, 1969) |
| Etanal ou Acetaldeído | Odor pungente e nauseante parecido com éter (Arctander, 1969); aroma frutal |
| Pirivaldeído | Aroma acre e pungente, sendo indesejáveis em altas concentrações (Arctander, 1969) |
| Propanal | Encontrado também em café verde. Odor bem difusivo e penetrante, sufocante. Bem diluído um odor de café torrado aparece (Arctander, 1969) |
| Metil-propanal | Possui um odor penetrante, pungente, desagradável e repulsivo quando puro. Extremamente diluído se torna prazerosa, adocicado, frutal como banana (Arctander, 1969); Possui odor de maçã e caramelo segundo Motoda (Motoda, 1979); Aroma descrito como fermentado, mato verde, chocolate, levemente cereal (Chemisis); Esse composto é considerado um odorante potente das bebidas de café (Pollien et al., 1997) |
| 3-Metil-butanal | Encontrado também em café verde. Possui um odor poderoso, acre e pungente. Quando bem diluído o odor se torna frutal, adocicado e aroma de pêra (Arctander, 1969); Para Motoda o odor é descrito como o de chocolate (Motoda, 1979); Descrito como mais potente que o isomero 2-metilbutanal em bebidas de café (Sammelroch e Grosch, 1996) |
| 2-Metilbutanal | Encontrado em café verde. Odor poderoso que se torna tolerante extremamente diluído. Geralmente agradável com caráter frutal e adocicado e fermentado que às vezes lembra café torrado (Arctander, 1969); Aroma de maçã e malte (Motoda, 1979) |
| Fenilacetaldéido | Possui um aroma floral, adocicado, mel (Chemisis) |
| (E)-2-Nonenal | Contribui para o aroma de diversos alimentos. Aroma de gordura se torna desagradável com o aumento da concentração à temperatura ambiente. Em altas temperaturas o aumento da concentração faz o aroma mudar de madeira para matéria queimada, gordura e ranço (Parliment et al., 1973); Esse composto apresenta efeitos sinérgicos e pode ajudar no balanço de outras notas de aroma |

O metional está indicado na tabela 7 de compostos sulfonados

Fonte: Flament, 2001

Os aldeídos possuem características sensoriais bem diversificadas (Tabela 10). O metanal, o etanal e o piruvaldeído apresentam aromas acres e pungentes, sendo indesejáveis em altas concentrações. Por outro lado, os aldeídos de cadeia longa normalmente apresentam um aroma agradável e suave de frutas e flores. Sabe-se, que o metional (indicado anteriormente), metilpropanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal e (E)-2-nonenal estão entre os odorantes mais potentes dessas bebidas, podendo ser considerados compostos relevantes para o aroma final das mesmas (Simmelroch e Grosch,1996). A Figura 19 apresenta a estrutura química do (E)-2-nonenal e o 2-metilbutanal.

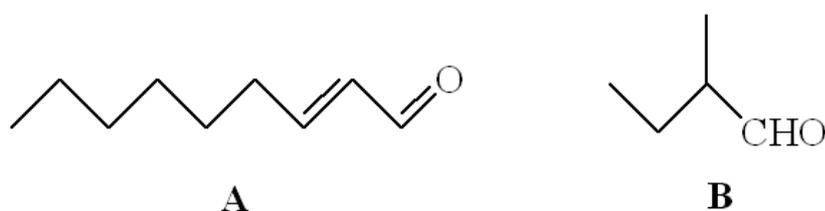


Figura 19. Estruturas químicas do (E)-2-nonenal (A) e 2-metilbutanal (B).

3.9. Cetonas

Cetonas constituem uma importante parte dos compostos voláteis do café torrado. Segundo Merritt et al. (1963) elas representam aproximadamente 10 % dos compostos do aroma do café. As cetonas de baixa massa molecular além de abundantes diminuem durante a estocagem do café torrado, como os aldeídos (Clarke e Macrae, 1985). Provavelmente, esta perda deve estar relacionada à volatilização desses compostos, uma vez que a oxidação dos mesmos é bem mais difícil que a dos aldeídos.

As cetonas alifáticas e as cíclicas vêm sendo identificadas desde a década de 60. Elas apresentam várias possíveis vias de formação. Pirólise da sacarose (Nishimura e Mihara, 1990), pirólise de carboidratos (Baltes e Bochmann, 1987), auto-oxidação de lipídios, reação de Maillard (Clarke e Macrae, 1985) e quebra de carotenóides (Holscher et al., 1990).

As cetonas apresentam propriedades sensoriais bem variadas (Tabela 11). De acordo com dados da literatura, a propanona possui um odor de fruta (Holscher et al., 1990), o maltol e o cicloteno, apresentam odores que podem ser associados a açúcar queimado. A 2,3-butanediona, 2,3-pentanediona e a β -damascenona, que apresenta um aroma de chá e fruta, são consideradas substâncias de impacto para o aroma final do café torrado (Semmelroch e Grosch, 1996; Buffo e Cardelli-Freire, 2004). As estruturas químicas destas três importantes cetonas estão indicadas na Figura 20.

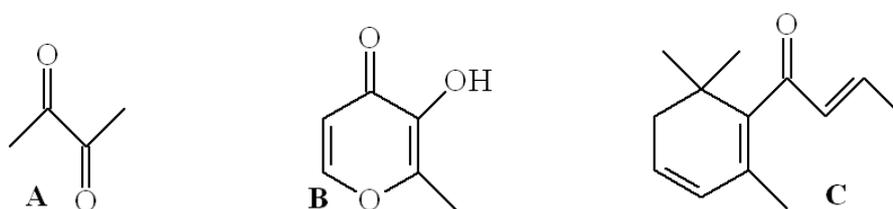


Figura 20. Estruturas químicas do 2,3-butanediona (A), maltol (B) e β -damascenona (C).

Tabela 11. Principais cetonas e suas respectivas descrições sensoriais de acordo com a literatura.

| Cetonas importantes | Descrição sensorial |
|---|---|
| 2-Butanona | Odor levemente nauseante parecido com éter (Arctander, 1969) |
| 2-Pentanona | Odor poderoso e bem difusivo, frutal e de éter (Arctander, 1969) |
| 2,3-Butanediona | Odor poderoso e difusivo, pungente de manteiga (Arctander, 1969); Adocicado, caramelado. Componente chave da bebida de café (Pollien et al., 1997) |
| 2,3-Pentanediona | Odor de manteiga e as vezes parecido com o da quinona menos agudo (Arctander, 1969); Adocicado, caramelado. Componente chave da bebida de café (Pollien et al., 1997) |
| Cicloteno | È um produto comercial freqüentemente utilizado como ingrediente flavorizante. Possui um odor poderoso, adocicado e de caramelo. Geralmente descrito como noz, licorice, aipo e fumo (Arctander, 1969) |
| Maltol | O odor é levemente de frutas, e doce com ênfase na nota de caramelo no estado seco, enquanto em soluções, o maltol demonstra um aroma de frutas pronunciado parecido com o de abacaxi e morango (Arctander, 1969) |
| (E)-β-Damascenona | Aroma descrito como o de suco de frutas, frutas vermelhas, madeira e adocicado (Chemisis); Através de um GC-olfatométrico teve odor descrito como o de chá e frutal (Holscher et al., 1990); Componente chave da bebida de café (Buffo e Cardelli-Freire, 2004) |

Fonte: Flament, 2001

3.10. Álcoois

Quando estudamos os diversos trabalhos realizados com aroma de cafés verdes e torrados, percebemos diferentes observações sobre a detecção de álcoois voláteis. Certamente essas observações adversas ocorrem devido aos diferentes métodos de extração e identificação utilizados e também a outros fatores, tais como graus de torra e origem do grão. Dentre os compostos voláteis do café torrado foram identificados quase 25 álcoois entre alifáticos e aromáticos (Nijssen et al., 1996).

Além do metanol e etanol, citado com bastante frequência em alguns estudos (Shimoda e Shibamoto, 1990), outros álcoois foram encontrados na fração volátil do café verde e torrado. Compostos, tais como o 3-metil-2-buten-1-ol, o 1-octen-3-ol, por exemplo, foram identificados por Cros et al. (1980). Ho et al. (1983) não identificou álcoois de cadeia longa, porém, identificou 3-metil-1-butanol, linalool e 2-furanmetanol. Os álcoois presentes no café torrado são um dos produtos secundários da degradação oxidativa de lipídios. A síntese desses compostos também pode ocorrer através da quebra de carotenóides (tetraterpenos) durante a torra do café, o que dá origem a monoterpenóides como, por exemplo, o linalool (Clarke e Macrae, 1985).

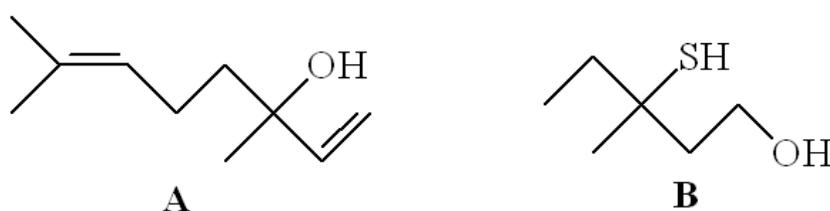


Figura 21. Estruturas químicas Linalool (A) e 3-mercapto-3-metilbutanol (B).

Devido ao fato dos álcoois de baixo peso molecular não serem odorantes potentes, eles não foram identificados em estudos de olfatométricos de voláteis de café torrado (Holscher et al., 1990; Semmelroch e Grosch, 1996). Segundo dados da literatura, somente o linalool, o feniletanol (Holscher et al., 1990) e o 3-

mercapto-3-metilbutanol foram listados como possíveis odorantes potentes do café torrado.

De acordo com as propriedades sensoriais dos álcoois, o feniletanol possui um odor de rosas e mel, o linalool é associado a um aroma floral e, contraditoriamente, ao odor de mofo enquanto o 3-mercapto-3-metil-butanol (indicado na Tabela 7) apresenta um odor doce e semelhante a sopa. A Figura 21 apresenta a estrutura química do linalool e da 3-mercapto-3-metilbutanol.

3.11. Ésteres e lactonas

Os ésteres alifáticos e aromáticos são pouco representados nos voláteis do café torrado, embora sejam abundantes e apresentem contribuição essencial para o aroma de frutas. Segundo dados da literatura 33 ésteres já foram identificados nessa fração (Nijssen et al., 1996). Os ésteres estão presentes em maior quantidade no café verde (Merritt et al., 1969), conseqüentemente, maioria deles é produzida no fruto do café antes da torra, não associados, portanto, com o processo de pirólise. Os ésteres furílicos são exceções, pois foram identificados apenas em café torrado. Eles são formados durante o processo de torra a partir da reação de esterificação entre um ácido e um álcool presentes no café.

Dentre os ésteres mais encontrados podemos destacar o formiato de metila, o acetato de metila e o acetato de etila. O éster aromático volátil encontrado em maior quantidade foi o salicilato de metila (Clarke e Macrae, 1985).

Os ésteres voláteis apresentam odores bem variados. O butanoato de etila e o isobutanoato de etila apresentaram odores semelhantes ao de pinho. Já o 2-metil-butanoato de etila apresenta odor de fruta do tipo damasco, enquanto que o acetato de n-hexila e o acetato de isoamila apresentaram odor de pêra. O acetato de furfurila foi caracterizado como tendo odor floral. Já o éster formato de 3-mercapto-3-metil-butila mostrou ser um componente volátil potente possuindo um odor penetrante de suor, geralmente relacionado aos gatos (Holscher et al., 1990). A Figura 22 demonstra a estrutura química do acetato de etila e da solotona.



Figura 22. Estruturas químicas do acetato de etila (A) e a solotona (B).

As lactonas são ésteres cíclicos largamente distribuídos nos alimentos e conferem a eles uma grande variedade de odores. As γ -lactonas saturadas, tais como a γ -butirolactona e a γ -valerolactona, são principalmente encontradas em café verde e apresentam odores que variam de frutal até manteiga e fumo (Arctander, 1969). Já as γ -lactonas insaturadas, tais como a γ -abhexona e a solotona possuem odores que variam de fumo e fumaça de madeira à cebola frita e pão e são encontrados em café torrado. Nove delas já foram identificadas como componentes desse produto tendo a solotona como o principal representante, pois figura entre os componentes considerados de impacto para o aroma do café torrado (Buffo e Cardelli-Freire, 2004).

3.12. Ácidos carboxílicos

Esses ácidos estão presentes em grande quantidade na fração volátil do café torrado, sendo que cerca de mais de vinte já foram identificados (Clarke, 1990). Desses, destacam-se os ácidos monocarboxílicos saturados da série de C_1 a C_{10} , isto é, do ácido fórmico ao ácido cáprico, juntamente com os isômeros constitucionais do ácido butírico e do valérico. Nenhum ácido aromático, entretanto, foi detectado nessa fração. Os principais ácidos carboxílicos voláteis encontrados no café torrado são o ácido acético, o ácido fórmico e o ácido propanóico (Clarke e Macrae, 1985).

Existem inúmeras vias possíveis de formação para os ácidos carboxílicos voláteis. A degradação de glicídios é uma dessas vias. Os ácidos mais voláteis

(com 3 a 10 átomos de carbono) também podem ter sua origem relacionada à presença de lipídios no café. A degradação térmica de ésteres e a auto-oxidação de aldeídos e cetonas também parecem estar relacionadas à formação de alguns ácidos (Clarke e Macrae, 1985). Devido a volatilização, os ácidos sofrem redução em seu conteúdo à medida que o tempo de torra aumenta. Alguns ácidos carboxílicos de cadeia curta estão indicados na Figura 23.

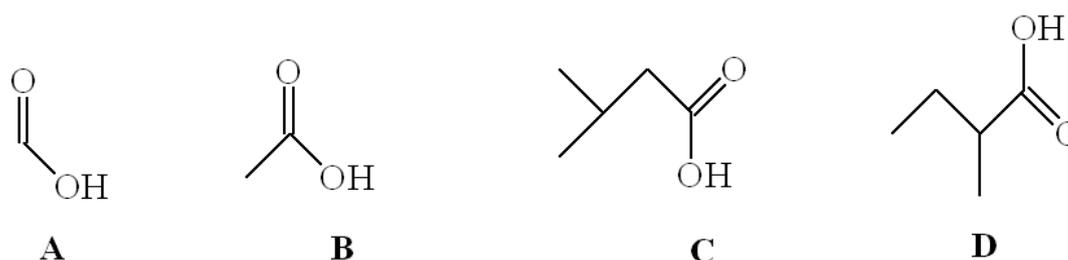


Figura 23. Estruturas químicas dos ácidos: fórmico (A), acético (B), valérico (C) e 2-metil butírico (D).

Os ácidos voláteis comumente presentes no café torrado apresentam odores bem característicos. O ácido 2-metil-butírico, por exemplo, é associado a um odor de queijo, manteiga, creme e chocolate, enquanto que o ácido acético e o ácido fórmico são relacionados a um odor penetrante e irritante, sendo que o primeiro é mais comumente associado ao odor de vinagre (Holscher et al., 1990). Já o ácido isovalérico apresenta um odor semelhante ao do chulé. Mesmo possuindo aromas bem marcantes e característicos os ácidos carboxílicos não vem sendo considerados substâncias de impacto para o aroma final do café torrado.

3.13. Outras classes de voláteis

Mais de 60 hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos foram detectados como componentes voláteis do café torrado, sendo que os mais abundantes são os alcanos e alquenos de cadeia curta. Dentre os aromáticos os destaques são o etil-benzeno e o estireno (Clarke e Macrae, 1985).

Os monoterpenos possuem particularmente notas de aroma desagradáveis. Três deles, β -mirceno, limoneno e *p*-cimeno são comuns em café torrado e contribuem com um aroma apimentado (Flament, 2001).

Já os éteres voláteis estão presentes em pequenas quantidades. Dentre eles estão, por exemplo, o metóxi-etano, 2-metóxi-2-metil-propano e o éter difurfurílico. A classe de éteres majoritária na fração volátil do café torrado é composta pelos tioéteres (Clarke, 1990).

Três anidridos foram identificados até o momento na fração volátil do café torrado, sendo eles o anidrido metil-maleico, o anidrido dimetil-maleico e o anidrido etil-metil-maleico.

Foram identificadas 17 aminas voláteis (alifáticas e aromáticas) no café torrado, sendo elas aminas primárias e secundárias. A dimetilamina é uma das aminas majoritárias presentes na fração volátil do café torrado (Clarke, 1990).

Aparentemente, apesar de estarem presentes na fração volátil do café torrado, nenhum dos compostos desses grupos é considerado de impacto para o aroma final desse produto.

4. Referências Bibliográficas

- Arctander. S. Perfume and flavor chemicals (Aroma chemical). Allured Publishing Corporation. Carol Stream, USA, **1969**.
- Baltes, W.; Bochmann, G. Model reactions on roast aroma formation .1 Reaction of serine and threonine with sucrose under the conditions of coffee roasting and identification of new coffee aroma compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, 35, 340-346.
- Belitz, H. D.; Grosch, W. Food Chemistry. 3rd revised ed. Springer, Berlin, **2004**.
- Blank, I.; Sen, A.; Grosch, W.; Lebensm, Z. Potent odorants of roasted powder and brew of arabica coffee. *Unters. Forsch.* **1992**, 195, 23-245.
- Boelens, M. H.; van Gemert, L. J. Volatile character-impact sulfur compounds and their sensory properties. *Perfum. Flavor* **1993**, 18, 29-39.
- Boyko, A. L.; Morgan, M. E.; Libbey, L. M. In Maga, J. Pyrazines in foods: an Update. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **1982**, 15, 1-48.
- Calabretta, P. J. Synthesis of some substituted pyrazines and their olfactive properties. *Perfum. Flavor*, **1978**, 3, 33-42.
- Chemisis. Data base on organoleptic proprieties of perfume and flavor chemicals, Firmenich SA, Geneva. In: Flament, I. Coffee Flavor Chemistry. John Wiley & Sons, Baffins Lane, **2001**.
- Clarke, R. J.; Macrae, R. *Coffee Chemistry (vol. 1)*. Elsevier Applied Science Publishers; London, **1985**.
- Clarke, R. J. The volatile compounds of roasted coffee. *J. Food Sci.* **1990**, 2, 79-88.
- Clarke, R. J.; Vitzthum, O. G. *World Agriculture Series. Coffee Recent Developments*. Blackwell Science, Oxford, **2001**.
- Coleman, E. C.; Ho, C. T. Chemistry of baked potato. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, 28, 66-68.
- Coleman, E. C.; Ho, C. T.; Chang, S. S. Isolation and identification of volatile compounds from baked potatoes. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, 29, 42-48.
- Cros, E.; Fourny, G.; Guyot, B. Changes in a roasted arabica coffee stored in 4 model packings - sensorial analysis, changes in the volatile fraction - comparison with a control - optimum utilization time limit. *Café Cacao Thé* **1980**, 24, 203-226.
- Czerny, M.; Grosch, W. Potent odorants of raw Arabica coffee. Their changes during roasting. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 868-872.
- De Maria, C. A. B.; Trugo, L. C.; Aquino Neto, F. R.; Moreira, R. F. A.; Alviano, C. S. Composition of green coffee water-soluble fractions and identification of volatiles formed during roasting. *Food Chem.* **1996**, 55, 203-207.
- De Maria, C. A. B.; Moreira, R. F. A.; Trugo, L. C. Volatile components in roasted coffee, Part I: Heterocyclic compounds. *Quim. Nova* **1999**, 22, 209-217.
- Enciclopédia Larousse Cultural
(http://pt.wikipedia.org/wiki/Larousse_Cultural)

- Flament, I.; Chevallier, C. Analysis of volatile constituents of coffee aroma. *Chem. Ind.* **1988**, 592-596.
- Flament, I. Coffee Flavor Chemistry. John Wiley & Sons, Baffins Lane, **2001**.
- Fors, S. Sensory proprieties of volatile Maillard reaction products and related compounds: a literature review. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **1983**, 215, 185-268.
- Gianturco, M. A.; Giammarino, A. S.; Friefel, P.; Flanagan, V. The volatile constituents of coffee. IV. Furanic and pyrrolic compounds. *Tetrahedron* **1964**, 20, 2951-2961.
- Grosch, W. Detection of potent odorants in food by aroma extract dilution analysis. *Trends Food Sci. Technol.* **1993**, 4, 68-73.
- Grosch, W. Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity values (OAVs). *Flavour Fragr. J.* **1994**, 9, 147-158.
- Grosch, W.; Czerny, M.; Wagner, R.; Mayer, F. Studies on the aroma of roasted coffee. *Royal Soc. Chem. Spec. Publ.* **1996**, 197, 200-205.
- Grosch, W.; Mayer, F. Release of odorants from roasted coffee. *Abstr. Papers Am. Chem. Soc.* **1999**, 218, U53-U53.
- Ho, C. T.; Jin, Q. Z.; Lee, M. H.; Chang, S. S. Positive identification of new alkyloxazoles, alkylthiazoles, and piperidine in roasted peanut flavor. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, 31, 1384-1386.
- Holscher, W.; Vitzthum, O. G.; Steinhart, H. Identification of sensorial evaluation of aroma-impact compounds in roasted Colombian coffee. *Café Cacao Thé* **1990**, 34, 205-212.
- Holscher, W.; Steinhart, H. Investigation of roasted coffee freshness with an improved headspace technique. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, 195, 33-38.
- Holscher, W.; Vitzthum, O. G.; Steinhart, H. Phenyl alcohol-Source for odorants in roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 655-658.
- Holscher, W.; Steinhart, H. Formation pathways for primary roasted coffee aromas. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **1994**, 543, 206-217.
- Illy, A., Viani, R. Espresso coffee—the chemistry of quality. Academic Press, London **2005**.
- Kato, H.; Fujimaki, M.; In Hwang, H-Ing.; Hartman, T.G.; Ho C-T. Relative reactivities of amino acids in formation of pyridines, pirroles and oxazoles. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 2917-2921.
- Kato, S.; Kurata, T.; Fujimaki, M. Thermal degradation of aromatic amino acids. *Agric. Biol. Chem.* **1971**, 35, 2106-2112.
- Kato, S.; Kurata, T.; Fujimaki, M. Volatile compounds produced by the reaction of L-cysteine or L-cystine with carbonyl compounds. *Agric. Biol. Chem.* **1973**, 37, 539-544.
- Lien, Y. C.; Nawar, W. W. Thermal-decomposition of some amino-acids - valine, leucine and isoleucine. *J. Food Sci.* **1974**, 39, 914.
- Maga, J. The role of sulfur compounds in food flavor, Part. I, Thiozoles. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1975a**, 6, 153-176.

- Maga, J. The role of sulfur compounds in food flavor, Part. II, Thiophenes. *CRC Crit. Rev. Food Technol.* **1975b**, 6, 241-270.
- Maga, J. A. Simple phenol and phenolic compounds in food flavor. *CRC Crit. Rev. Food Technol.* **1978a**, 10, 323-372.
- Maga, J. Pyrroles in food. *J. Agric. Food Chem.* **1981b**, 29, 691-694.
- Maga, J. The chemistry of oxazoles and oxazolines in food. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1981a**, 14, 295-307.
- Maga, J. Pyrazines in foods: an update. *CRC Crit. Rev. Food Technol.* **1982**, 15, 1-48.
- Mayer, F; Czerny, M; Grosch, W. Sensory study of the character impact aroma compounds of a coffee beverage. *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, 211, 272-276.
- Mayers, F.; Grosch, W. Aroma simulation on the basis of the odourant composition of roasted coffee headspace. *Flavour Frag. J.* **2001**, 16, 180-190.
- Merritt, C. Jr.; Bazinet, M. L.; Sullivan, J. H.; Robertson, D. H. Mass spectrometric determination of the volatile components from ground coffee. *J. Agric. Food Chem.* **1963**, 11, 152-155.
- Merritt, C. Jr.; Robertson, D. H.; McAdoo, D. J.; The relationship of volatile compounds in roasted coffee beans to their precursors. In: *4th Int. Colloq. Chem. Coffee (ASIC)*, Amsterdam, Junho, **1969**, 144-148.
- Motoda, S. Formation of Aldehydes from amino acids by polyphenol oxidase. *J. Ferment. Technol.* **1979**, 57, 395-399.
- Mussinan, C. J.; Wilson, R. A.; Katz, I.; Hruza, A.; Vock, M, H. Identification and flavor properties of some 3-oxazolines and 3-thiazolines isolated from cooked beef. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **1976**, 26, 133-145.
- Nijssen, L. M.; Visscher, C. A.; Maarse, H.; Willemsens, L. C.; Boelens, M. M. Volatile Compounds in Food. Qualitative and Quantitative Data. 7th ed. TNO Nutrition and Food Research Institute: Zeist, The Netherlands, **1996**.
- Nishimura, O.; Mihara, S.; Investigation of 2-hydroxy-2-cyclopenten-1-ones in roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.*, **1990**, 38, 1038-1041.
- Ohloff, G.; Flament, I. Heterocyclic constituents of meat aroma. *Heterocycles* **1978**, 11, 663-695.
- Parliment, T. H.; Clinton, W.; Scarpellino, R. trans-2-Nonenal, coffee compound with novel organoleptic properties. *J. Agric. Food Chem.* **1973**, 21, 485-487.
- Pettigrew, J. Coffee. PRC Publishing, London, **1998**.
- Pimentel, In: Fernandes, S. M.; Pinto, N. A. V. D.; Thé, P. M. P.; Pereira, R.G. F. A.; Carvalho, V. D. *Rev. Bras. Agro.* **2001**, 7, 197-199.
- Pittet, A. O.; Hruza, D. E. Comparative study of flavor properties of thiazole derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **1974**, 22, 264-269.
- Pollien, P.; Krebs, Y.; Chaintreau, A. Comparison of brew and instant coffee using a new GC-olfactometric method, In: *17th Int. Colloq. Chem. Coffee (ASIC)*, Nairobi, Julho, **1997**, 191-6.
- Reichstein, T.; Staudinger, H. (Int. Nahr. Genussm. Ag) A new or improved method of producing artificial coffee oil. Br. Patent 260960, **1926**.

- Reichenstein, T.; Staudinger, H. *Patent application* **1928** UK 260,960.
- Reineccius, G. A. The Maillard reaction of coffee flavor. In : *16th Int. Coll. Chem. Coffee (ASIC)*, Kyoto, Abril, **1995**, 249-257.
- Ribeiro, J. S.; Teófilo, R. F.; Augusto, F.; Salva, T, J. G.; Ferreira, M. M. C. Exploratory and discriminant studies for quality control of processed Brazilian coffees using headspace solid phase microextraction - gas chromatography, *submetido para Food Chemistry*.
- Schimid, W.; Grosch, W. Identifizierung fluchtiger Aromastoffe mit hohen Aromawerten in Sauerkirschen (*Prunus cerasus* L.). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1986**, 182, 407-412.
- Semmelroch, P.; Grosch, W. Studies on character impact odorants of coffee brews. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 537-543.
- Shibamoto, T.; Russel, G. F. A study of volatiles isolated from a D-glucose-H₂S-NH₃ model system. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, 25, 109-113.
- Shimoda, M.; Shibamoto, T. Isolation and identification of headspace volatiles from brewed coffee with on column GC/MS method. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 802-804.
- Silvarolla, M. B.; Mazzafera, P.; Fazuoli, L. C. Plant biochemistry - A naturally decaffeinated arabica coffee. *Nature* **2004**, 429(6994), 826.
- Silwar, R.; Lüllmann, C. The determination of mono-and disaccharides in green arabica and robusta coffees using high-performance liquid chromatography. *Café Cacao Thé* **1988**, 32, 319-322.
- Sivetz, M.; Desrosier, N. W. *Coffee Technology*. AVI Publishing Company, New York, **1979**, 256, 563.
- Sizer, C. E.; Maga, J.; Lorenz, K. The occurrence of pyrazines in white bread crust and crumb. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1975**, 8, 267-269.
- Soeltoft, M. Flavor active sulfur compounds in beer. *Brygmesteren*, **1988**, 45, 18-20 (Chem. Abstr. 109, 147858).
- Toci, A.; Farah, A.; Trugo, L. C. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após a torração. *Quím. Nova* **2006**, 29, 965-971.
- Tressl, R.; Grünwald, K. G.; Silwar, R. In *Coffee Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*. Clifford, M. N., Willson, K. C., Eds. Croom Helm, London, **1985**, 371.
- Trugo, L. C.; Macrae, R. Chlorogenic acid composition of instant coffees. *Analyst* **1984**, 109, 263-266.
- Ullrich, F.; Grosch, W. Flavor deterioration of soybean oil: identification of intense odor compounds formed during flavor reversion. *Fat Sci. Technol.* **1988**, 90, 332-336.
- Underwood, G. E.; Deatherage, F. E. A study of the amino acids of green and roasted coffee including a new method of protein hydrolysis. *Food Res.* **1952**, 17, 425-432.

- Vernin, G. In *Coffee Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*. Clifford, M.N. Willson, K. C. Eds. Croom Helm, London, **1985**, 347.
- Viani, R.; Horman, I. Thermal behavior of trigonelline. *J. Food Sci.* **1974**, 39, 1216-1217.
- Vitzthum, O. G.; Werkhoff, P. Steam-volatile aroma constituents of roasted coffee: neutral fraction. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1976**, 160, 277-291.
- Vitzthum, O. G. Thirty years of coffee chemistry research. In: *Flavor Chemistry, Thirty Years of Progress*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **1999**.
- Wagner, R.; Czerny, M.; Bielohradsky, J.; Grosch, W. Structure-odour-activity relationships of alkylpyrazines. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, 208, 308-316.
- Winter, M.; Gautschi, F.; Flament, I.; Stoll, M.; Goldman, I. M. (Firmenich & Cie) Use of heterocyclic compounds as flavoring ingredients: Thiophenes. US Patent 3900581, **1975a**.
- Winter, M.; Gautschi, F.; Flament, I.; Stoll, M.; Goldman, I. M. (Firmenich & Cie) Use of heterocyclic compounds as flavoring ingredients: pyridines and pyrazines. Swiss Patent 563725, **1975b**.
- Winter, M.; Gautschi, F.; Flament, I.; Stoll, M. (Firmenich & Cie) Flavoring agents: furanic sulfur compounds. US Patent 3931245, **1976a**.
- Winter, M.; Gautschi, F.; Flament, I.; Stoll, M.; Goldman, I. M. (Firmenich & Cie) Use of heterocyclic compounds as flavoring ingredients: Furfuryl ethers. US Patent 3940502, **1976b**.
- Winter, M.; Gautschi, F.; Flament, I.; Stoll, M. (Firmenich & Cie) Flavoring agents: Thiophane-3-ones and organoleptic properties of other coffee flavor constituents. US Patent 3943260, **1976c**.
- Yeretzian, C.; Jordan, A.; Lindinger, W. Analyzing the headspace of coffee by proton-reaction mass-spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, 223-224, 115-139.