



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

HEMERSON DANTAS DOS SANTOS

**ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DOS DADOS DE RMN DE
CAFÉS DA REGIÃO DA CHAPADA DIAMANTINA/BAHIA**

Salvador
2019

HEMERSON DANTAS DOS SANTOS

**ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DOS DADOS DE RMN DE
CAFÉS DA REGIÃO DA CHAPADA DIAMANTINA/BAHIA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química na Universidade Federal da Bahia – UFBA, para obtenção do grau de Mestre em Química. Subárea de concentração em Química Orgânica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Elisangela Fabiana Boffo

Salvador
2019

TERMO DE APROVAÇÃO

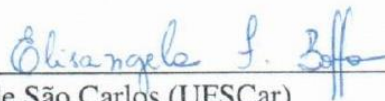
HEMERSON DANTAS DOS SANTOS

“ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DOS DADOS DE RMN DE CAFÉS DA REGIÃO DA
CHAPADA DIAMANTINA/BAHIA”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química,
Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof.^a. Dr.^a. Elisângela Fabiana Boffo

Doutorado em Ciências, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
Universidade Federal da Bahia



Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Jesus

Doutorado em Bioquímica Vegetal e Biologia Molecular, Wageningen University
Universidade Federal da Bahia



Prof.^a. Dr.^a. Rosilene Aparecida de Oliveira

Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
Universidade Estadual de Santa Cruz




Salvador, 03 de maio de 2019.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dantas dos Santos, Hemerson
ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DOS DADOS DE RMN DE CAFÉS DA
REGIÃO DA CHAPADA DIAMANTINA/BAHIA / Hemerson Dantas
dos Santos. -- Salvador, 2019.
97 f. : il

Orientadora: Elisangela Fabiana Boffo.
Dissertação (Mestrado - Pós Graduação em Química) --
Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química,
2019.

1. Café. 2. Chapada Diamantina/Bahia. 3. RMN. 4.
Quimiometria. I. Fabiana Boffo, Elisangela. II.
Título.



Dedico esse trabalho...

...À minha família pelo incentivo, apoio e por sempre acreditar no sucesso de minhas escolhas. E ao meu povo Pataxó Hãhãhã por lutar e (re)existir para que possamos escrever “histórias” como esta.

AGRADECIMENTOS

A Tupã por permitir todas as realizações.

A professora Dra. Elisangela F. Boffo, pelos conhecimentos compartilhados e pela orientação deste trabalho.

Aos amigos: Benivaldo, Tâmara, Yasmin, Vinícius, Milena e Raiana, pela convivência e companheirismo durante este período no grupo de pesquisa o qual fiz parte.

Aos professores do grupo de pesquisa GESNAT, e aos demais professores do Instituto de Química da UFBA pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear (LABAREMN) da UFBA pela possibilidade de realização dos experimentos de RMN.

A todos do grupo de pesquisa, à Heiter, ao Instituto Baiano de Metrologia e Qualidade (Ibmetro) e a Cooperativa de Cafés Especiais e Agropecuária de Piatã (COOPIATÃ) que contribuíram para a aquisição das amostras de cafés que permitiram a obtenção de dados para este trabalho.

A M^a. Brígida Salgado da Cooperativa de Produtores de cafés Orgânicos e Biodinâmicos da Chapada Diamantina (COOPERBIO) pela prestatividade e fornecimento de amostras.

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram com o meu desenvolvimento durante esse trabalho. Em especial aos meus amigos: Jurema Machado, Franklin P. Carvalho, Aninha Cláudia (Aninha), Daniela Alarcon e M^a. Rosário.

A toda a minha família que sempre me incentivou e me deu apoio nessa caminhada, em especial a minha mãe Maria da Pena, meu pai Edinei Dantas e minha irmã Émile Dantas. E aos meus parentes indígenas do Núcleo de Estudantes Indígenas da UFBA (NEI) pelo acolhimento.

A Andreza Nataly por todo o carinho e companheirismo dedicado a mim.

E a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo auxílio financeiro por meio da concessão da bolsa de pesquisa.

SANTOS, Hemerson Dantas. Análise Quimiométrica dos dados de RMN de Cafés da região da Chapada Diamantina/Bahia. 97 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

RESUMO

Os cafés provenientes da região da Chapada Diamantina/Bahia apresentam alto grau de qualidade e excelência. O uso adequado dos critérios de produção e processamento dos frutos até o produto final tem proporcionado a este alimento esses padrões de qualidade e que está ligado diretamente a sua complexidade química final. Nesse contexto, os estudos voltados para a compreensão do seu perfil químico evidenciam importantes relações entre a sua composição química e padrões de qualidade, bem como informações da procedência geográfica, assim, contribuindo com metodologias antifraudes. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a composição química dos cafés produzidos na Chapada Diamantina/BA por meio da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e discriminá-los de cafés de outras procedências geográficas. Foram analisadas 37 amostras comerciais com três classes de qualidade (tradicional, superior e *gourmet*). Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos no espectrômetro Varian Inova 500 do Laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear (LABAREMN) da UFBA. Na análise dos dados de RMN foram identificados sinais característicos de ácidos clorogênicos (ACGs), a exemplo dos ácidos cafeoilquínicos [6,74 – 6,80 m], alcaloides e xantinas, tais como a trigonelina [4,43 s] e a cafeína [3,24 s, 3,41 s e 3,84 s]. Foram observados sinais característicos de furanos (5-HMF [9,44 s]), amidas e aminoácidos, como a acrilamida [5,83 e 5,99 m] e a L-alanina [1,39 d (6 Hz)]. Por fim foram identificados também sinais de ácidos orgânicos, tais como o ácido láctico [1,35 d (7 Hz)] e o ácido acético [1,96 s], além de carboidratos e lactonas, a exemplo do mio-inositol [3,27 – 3,35 m] e da γ -butirolactona [2,15 - 2,18 (m)]. O pré-tratamento dos espectros de RMN de ^1H foi feito usando alinhamento, autoescalamento e normalização (norma um). Em seguida, foi feita a análise de componentes principais (PCA). No gráfico de escores foram observados quatro grupos, os quais foram denominados Chapada Diamantina, Bahia, Brasil e *gourmet*/superiores. Os cafés da Chapada Diamantina apresentaram um perfil químico característico, que os distinguiu dos demais, principalmente por conter maiores teores de lipídios. Por outro lado, os cafés dessa região que apresentam maior valor comercial e classificação de qualidade *gourmet* foram agrupados aos colombianos e alguns nacionais com padrão de qualidade semelhante. Este grupo se caracterizou por conter maiores teores de ácidos clorogênicos e trigonelina, substâncias as quais contribuem com o aroma e sabor agradável desta bebida. Os cafés de outras regiões da Bahia mostraram baixíssimas intensidades nos sinais dos ácidos clorogênicos, enquanto os dos demais estados brasileiros diferenciaram-se por apresentarem maiores teores de quinidas em relação aos da Bahia, e menores teores de clorogênicos em relação aos da Chapada Diamantina. Os resultados mostram que a RMN de ^1H aliada à quimiometria é uma ferramenta muito eficiente para discriminar os cafés, extraíndo o máximo de informações do conjunto de dados e evidenciando as que são mais importantes. Dessa forma, essa metodologia tem se mostrado eficaz nos mais diversos estudos para a compreensão de misturas complexas.

Palavras-chave: Café. Chapada Diamantina/Bahia. RMN. Quimiometria.

SANTOS, Hemerson Dantas. Chemometric analysis of NMR data of coffee from the Chapada Diamantina region (state of Bahia, Brazil). 97 pp. Master Thesis – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

ABSTRACT

The coffee from the Chapada Diamantina region, in the state of Bahia, Brazil, are considered high quality, due to the use of adequate production and processing criteria throughout the entire process, has provided this food with a high degree of quality and excellence, which is directly linked to its final chemical complexity. Studies about the chemical profile of coffee have correlated chemical composition, quality standards and data about geographical origin, thus contributing to antifraud methodologies. This research used Nuclear Magnetic Resonance (NMR) to study the chemical composition of coffee from Chapada Diamantina, in order to contrast them to coffee from other regions. We analyzed 37 commercial samples, which are classified, accordingly to their quality, as *traditional*, *superior* and *gourmet*. ^1H NMR spectra were acquired on the Varian Inova 500 spectrometer of the *Laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear* (LABAREMN/UFBA). Analyzing the NMR data, we identified characteristic signals of chlorogenic acids (CGA), such as caffeoylquinic acids [6.74 - 6.80 m], alkaloids and xanthines as trigonelline [4.43 s] and caffeine [3.24 s, 3.41 and 3.84 s]. We also observed characteristic signals of furans (5-HMF [9.44 s]), amides and amino acids such as acrylamide [5.83 and 5.99 m] and L-alanine [1.39 d (6 Hz)]. Finally, we identified signals of organic acids, such as lactic acid [1.35 d (7 Hz)] and acetic acid [1.96 s], as well as carbohydrates and lactones, such as myo-inositol [3.27 - 3.35 m] and γ -butyrolactone [2.15 - 2.18 (m)]. The pretreatment of the ^1H NMR spectra was made using alignment, autoscaling, and normalization (norm one). Then, the principal components analysis was performed. In the PCA scores plot, we observed four groups, which were denominated *Chapada Diamantina*, *Bahia*, *Brazil* and *gourmet/superior*. The coffee from Chapada Diamantina presented a characteristic chemical profile, which distinguished them from the others, mainly because they contain higher levels of lipids. The coffee from that region which present highest commercial value and which are classified as gourmet were grouped with Colombian coffee and some national ones with similar quality standards. This group presented higher levels of chlorogenic acids and trigonelline, substances which contribute to the pleasant aroma and taste of the beverage. The chlorogenic acid signals of coffee from other regions of the state of Bahia showed very low intensities. Coffee from other Brazilian states presented higher quinine levels in comparison than those from Bahia, and lower levels of chlorogenic acids than those from Chapada Diamantina. The results show that ^1H NMR, coupled with chemometrics, is a very effective tool to discriminate coffee, allowing us to obtain from the data set as much information as possible, and to highlight its most important pieces. This methodology, whose efficiency has been proved by various studies, can help us understand complex mixtures.

Keywords: Coffee. Chapada Diamantina (State of Bahia, Brazil). NMR. Chemometrics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1	Gráfico de escores de uma análise de componentes principais (PCA)	13
Figura 1-2	Representação do gráfico de loadings em análise de PCA	14
Figura 2-1	Fórmulas estruturais de constituintes majoritários do café solúvel ²⁵	22
Figura 2-2	Aminoácidos majoritários em cafés verdes ²⁸	23
Figura 2-3	Constituintes químicos atribuídos ao sabor amargo dos cafés torrados ^{33,34}	24
Figura 2-4	Constituintes químicos responsáveis pelo amargor intenso em cafés torrados ³⁴	25
Figura 5-1	(A) Espectro de RMN de ¹ H do café (500 MHz, D ₂ O) obtido com supressão do sinal da água com atribuição dos constituintes. (B) Ampliação na região de 0,8 – 4,4 ppm. (C) Ampliação na região de 5,0 – 9,5 ppm	58
Figura 5-2	Representação estrutural dos ácidos cafeoilquínicos e catecol	64
Figura 5-3	Representação estrutural dos alcaloides e xantinas	65
Figura 5-4	Representação estrutural dos furanos	66
Figura 5-5	Representação estrutural dos compostos nitrogenados	67
Figura 5-6	Representação estrutural dos ácidos orgânicos	68
Figura 5-7	Representação estrutural dos carboidratos e lactonas	69
Figura 5-8	Correlações ¹ H- ¹ H observadas no experimento de gCOSY do café torrado da Chapada Diamantina. Ampliação na região de 0,6 – 5,7 ppm	71
Figura 5-9	Representação dos ésteres graxos identificados no café	72
Figura 5-10	Correlações ¹ H- ¹ H observadas no experimento de gCOSY destacando as principais correlações do conteúdo lipídico em cafés torrados da Chapada Diamantina. Ampliação na região de 0,6 – 5,7 ppm	73
Figura 5-11	Ampliações nas regiões em 5,29 - 5,44 ppm e 1,26 – 1,44 ppm do espectro de RMN de ¹ H, evidenciando os sinais de ácidos clorogênicos e lipídios presentes no café torrado da região da Chapada Diamantina	75
Figura 5-12	Ampliações das regiões 6,10 - 7,60 e 8,35 - 8,90 dos espectros de RMN de ¹ H mostrando o alinhamento dos sinais pelo algoritmo <i>icoshift</i>	77

Figura 5-13	Gráfico de linhas dos espectros de RMN de ^1H do extrato aquosos de cafés comerciais mostrando as regiões excluídas em cinza 80
Figura 5-14	Gráfico de escores dos dados de RMN de ^1H 81
Figura 5-15	Gráfico de <i>loadings</i> representando a influência das variáveis em PC1 e PC2. A: principais variáveis que descrevem o grupo <i>gourmet</i> /superiores; B: principais variáveis de descrevem amostras da Chapada Diamantina/BA; C: variáveis que caracterizaram as amostras de regiões da Bahia..... 83
Figura 5-16	Principais variáveis responsáveis pela discriminação dos cafés da Chapada Diamantina (B-1) e do grupo <i>gourmet</i> /superiores (A-1, A-2, A-3 e A-4), evidenciadas pelo gráfico de <i>loadings</i> 84
Figura 5-17	Descritores do grau de torra influentes na discriminação em PC1 85
Figura 5-18	Comparação entre o sinal da trigonelina em 8,83 ppm e cátion <i>N</i> -metilpiridínio em 8,77 ppm dos dados de RMN ^1H das amostras dos grupos <i>gourmet</i> /superiores e Bahia 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 2-1	Produção mundial de cafés arábica e robusta ⁵	19
Tabela 2-2	Levantamento de safra para os principais estados produtores de cafés no Brasil ⁶	19
Tabela 2-3	Dados de exportação dos três maiores produtores de café ¹¹	20
Tabela 2-4	Faixa de notas de QG usada para classificar os tipos de cafés ¹⁵	21
Tabela 2-5	Padrão oficial de classificação do café obtido por infusão, percolação, decantação ou outro processo a partir do grão torrado e moído ¹⁶	21
Tabela 2-6	Limites de detecção simultânea de metabólitos no café solúvel por RMN de ¹ H ²⁵	32
Tabela 2-7	Trabalhos publicados que abordam a investigação química do café....	40
Tabela 4-1	Descrição das amostras analisadas	54
Tabela 5-1	Atribuições da composição química identificada nos extratos aquoso dos cafés torrados comerciais por meio dos experimentos de RMN de ¹ H, ¹³ C, <i>g</i> COSY e <i>g</i> HSQC.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico (em ppm)
ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café
AQ	Tempo de aquisição (<i>Acquisition Time</i>)
D1	Tempo de espera antes das aquisições
<i>d</i>	<i>Dubleto</i>
<i>dd</i>	<i>Duplo dubleto</i>
<i>dl</i>	<i>Dubleto largo</i>
F1	Eixo vertical no experimento bidimensional
F2	Eixo horizontal no experimento bidimensional
gCOSY	<i>gradient - COrrelation SpectroscopY</i>
gHMBC	<i>gradient - Heteronuclear Multiple Bonds Correlations</i>
gHSQC	<i>gradient - Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LB	Função matemática empregada no aumento da relação sinal/ruído (<i>Line Broadening</i>)
<i>m</i>	<i>Multiplete</i>
NS	Número de aquisições (<i>Number of Scans</i>)
P1	Pulso de 90° com alta potência aplicado no canal f1
PCA	<i>Principal Components Analysis</i>
PL	<i>Power Level</i>
PQC	Programa de Qualidade do Café
RG	Ganho do receptor (<i>Receiver Gain</i>)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio-1
<i>s</i>	<i>Singleto</i>
<i>sl</i>	<i>Singleto largo</i>
SW	Janela espectral utilizada nos espectros (<i>Spectral Width</i>)
<i>t</i>	<i>Triplete</i>
TD	<i>Time Domain Data Size</i>
TMSP-d4	Trimetilsilil-2,2,3,3-d4-propionato de sódio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
	O CAFÉ.....	18
	Produção de café	18
	Classificação do café	20
	Composição química do café	22
	Atividade Biológica dos Principais Constituintes do Café	27
	TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE CAFÉ	28
	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	30
	Espectroscopia de RMN na análise de cafés	32
	QUIMIOMETRIA.....	35
	Quimiometria na análise de cafés	36
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
	REFERÊNCIAS	48
3	OBJETIVOS	52
3.1	OBJETIVO GERAL.....	52
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
4	METODOLOGIA	53
4.1	OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS.....	53
4.2	ANÁLISES DE RMN.....	54
4.3	ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA	55
4.3.1	Alinhamento	56
4.3.2	Pré-tratamento	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS CAFÉS DA CHAPADA DIAMANTINA/BAHIA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	57
5.2	TRATAMENTO DOS DADOS DE ¹ H PARA ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA.....	75
5.3	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.....	78
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
	REFERÊNCIAS	88
	APÊNDICE - A	93
	APÊNDICE - B	94
	APÊNDICE - C	95
	APÊNDICE - D	96
	ANEXO - A	97

1 INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, sendo produzido e exportado por mais de 47 países. Entre os países produtores, o Brasil ocupa a primeira posição e o Estado da Bahia é o quarto maior produtor nacional. Além disso, nos últimos anos observou-se a crescente qualidade dos cafés especiais provenientes da região da Chapada Diamantina/BA.

Os cafés dessa região têm recebido diversos prêmios, devido sua alta qualidade, que é favorecida por 85.201 hectares em produção de café da espécie *Coffea arabica* no planalto baiano, sendo que esse cultivo proporciona ao produto final alta qualidade no que discrimina o sabor, aroma e textura deste alimento. Isto se deve principalmente aos padrões de complexidade química, intrínseca a esta espécie, fatores bióticos e abióticos da região e melhorias das técnicas de produção, cultivo e torra dos grãos.

Tradicionalmente, a classificação de qualidade da bebida de café é realizada pelo teste da xícara, que é realizada por classificadores (provadores) habilitados para analisar o produto. Desta forma são avaliadas características como aroma, sabor e textura. Em 2004, com o objetivo de garantir a qualidade da bebida a Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC) lançou o Programa de Qualidade do Café (PQC), no qual classifica o produto em quatro diferentes categorias: Tradicional, Extraforte, Superior e *Gourmet*, dando mais confiabilidade ao produto nacional e aumentando o consumo interno.

Outro aspecto importante que deve ser abordado refere-se à composição química deste produto, visto que as diferentes técnicas analíticas (tais como a cromatografia a gás e as espectroscopias na região do infravermelho e de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)) aliadas aos métodos quimiométricos mostram que os constituintes ou classes de substâncias presentes nos cafés atuam como marcadores de espécies economicamente importantes (como a *Coffea arabica*) e/ou de origem geográfica. Essas informações podem levar ao desenvolvimento de metodologias a serem aplicadas no controle de fraudes. Além disso, o uso dessas técnicas juntamente com a classificação feita pela prova da xícara está se mostrando muito eficiente, isto porque, enquanto que o paladar humano (teste da xícara) apresenta-se capaz de avaliar as características sensoriais da qualidade global da bebida, as ferramentas analíticas podem de identificar, além

do padrão metabólicos das mesmas, também são capazes de correlacionar descritores (constituítes individuais ou classes de constituítes) visíveis e invisíveis ao paladar humano, com características da qualidade, procedência geográfica e autenticidade do produto.

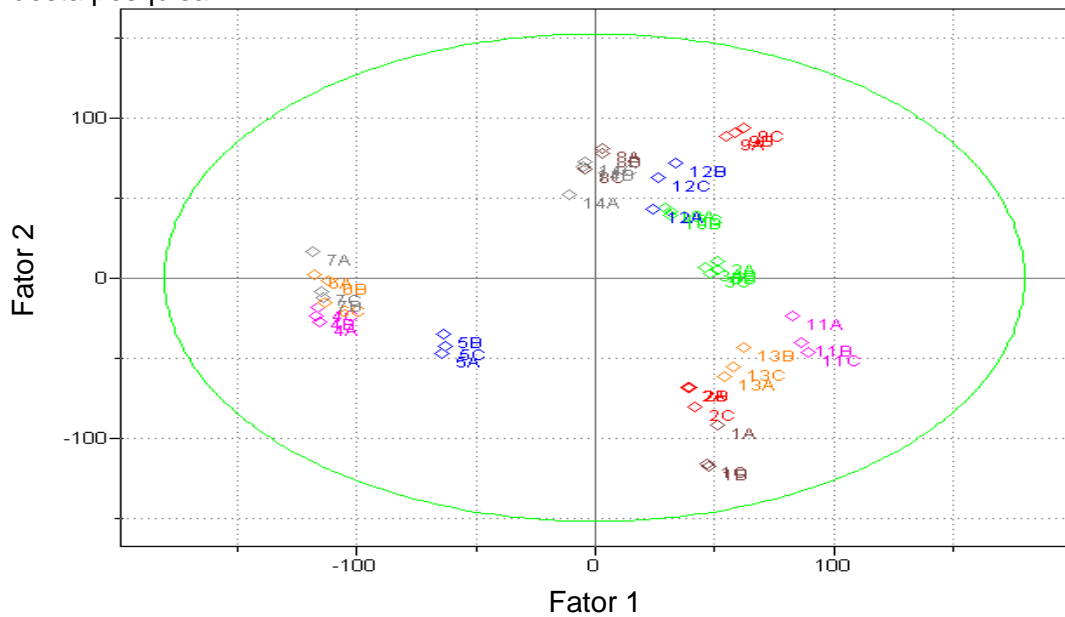
A RMN é capaz de fornecer várias informações referentes à uma determinada amostra em um único experimento, a exemplo da quantidade de hidrogênios por meio da integração da área do sinal no espectro, mapeamento da vizinhança do hidrogênio por meio da observação da multiplicidade apresentada pelo sinal e quantificação de constituintes individuais em mistura complexa sem a necessidade de separação do mesmo. Além disso, se trata de uma técnica não destrutiva e que fornece análises rápidas por requisitar o mínimo preparo da amostra. Dessa forma, a técnica de RMN de ^1H tem se mostrado eficaz na análise de matrizes complexas a exemplo dos alimentos.

A evolução das técnicas analíticas no campo da ciência possibilitou observações mais detalhadas a respeito do objeto investigado, entretanto, quando uma grande quantidade de amostra é analisada e um elevado número de informações é adquirido, a sua interpretação manual torna-se impraticável. Neste contexto, métodos estatísticos suficientemente capazes de observar cada variável vêm sendo desenvolvidos e na química essa metodologia é denominada de quimiometria.

A quimiometria é uma área multidisciplinar que une conhecimentos da química, matemática e estatística, dispondo de diversas metodologias, sendo as mais comuns: Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) para análise exploratória dos dados; Regressão pelo Método dos Quadrados Mínimos Parciais (PLS, do inglês *Partial Least Square*) para calibração multivariada e para a classificação de amostras desconhecidas é usado o método SIMCA (do inglês *Soft Independent Modeling of Class Analogy*). Estas análises multivariadas são aplicadas conforme objetivo de cada tipo de estudo.

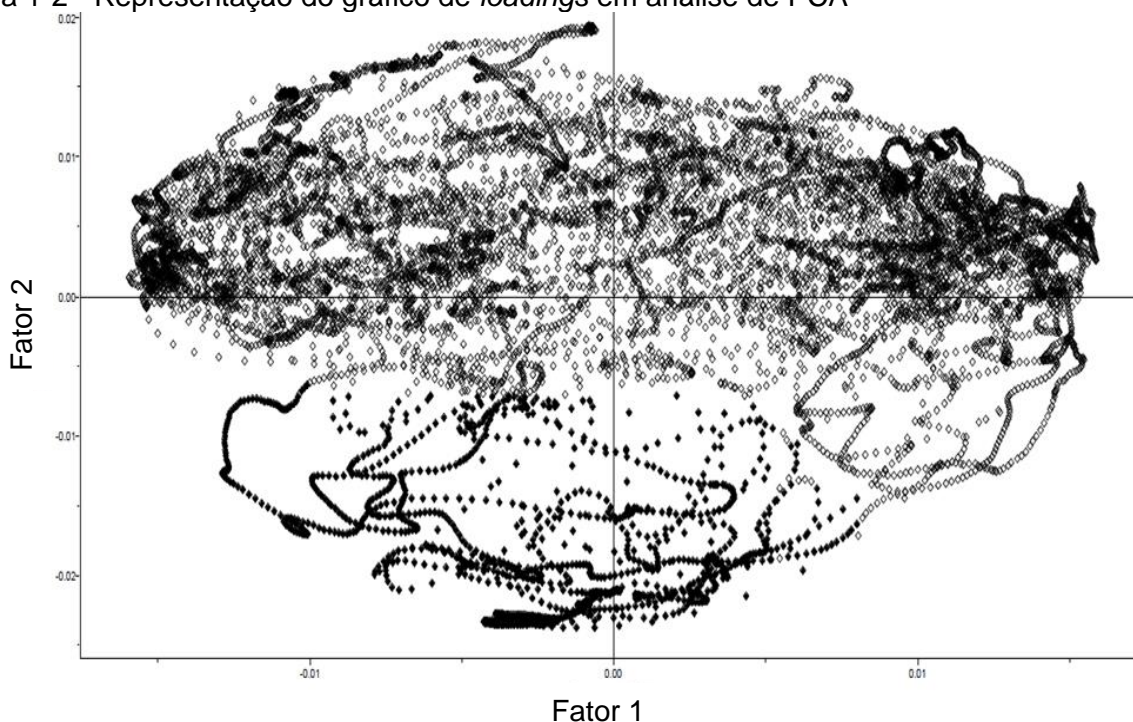
Um resultado preliminar da análise de componentes principais (PCA) deste trabalho pode ser observado na Figura 1-1.

Figura 1-1 - Gráfico de escores de uma análise de componentes principais (PCA) dos dados parciais desta pesquisa



Este resultado é denominado gráfico de escores e representa a distribuição das amostras (1 a 14) com base na informação química de variáveis pré-selecionadas em um conjunto de dados de RMN disposto em uma matriz. Por isso, a observação de pontos próximos corresponde às características químicas comuns entre as amostras envolvidas, a exemplo das amostras de 4 a 7 e das replicatas (A, B e C) de cada amostra. Os pontos distantes correspondem às características químicas distintas entre as amostras, como é o exemplo das amostras 9 e 2.

Com isso, afim de compreender o resultado observado, o espectroscopista pode analisar no gráfico de *loadings* (Figura 1-2) quais são as variáveis responsáveis pelo resultado observado.

Figura 1-2 - Representação do gráfico de *loadings* em análise de PCA

No gráfico de *loadings* cada ponto refere-se ao valor de uma variável (deslocamento químico) na matriz de dados. Ao selecionar esses pontos, o *software* evidencia na matriz a localização das variáveis selecionadas. Com isso, é possível identificar as informações que influenciaram o resultado obtido no gráfico de escores.

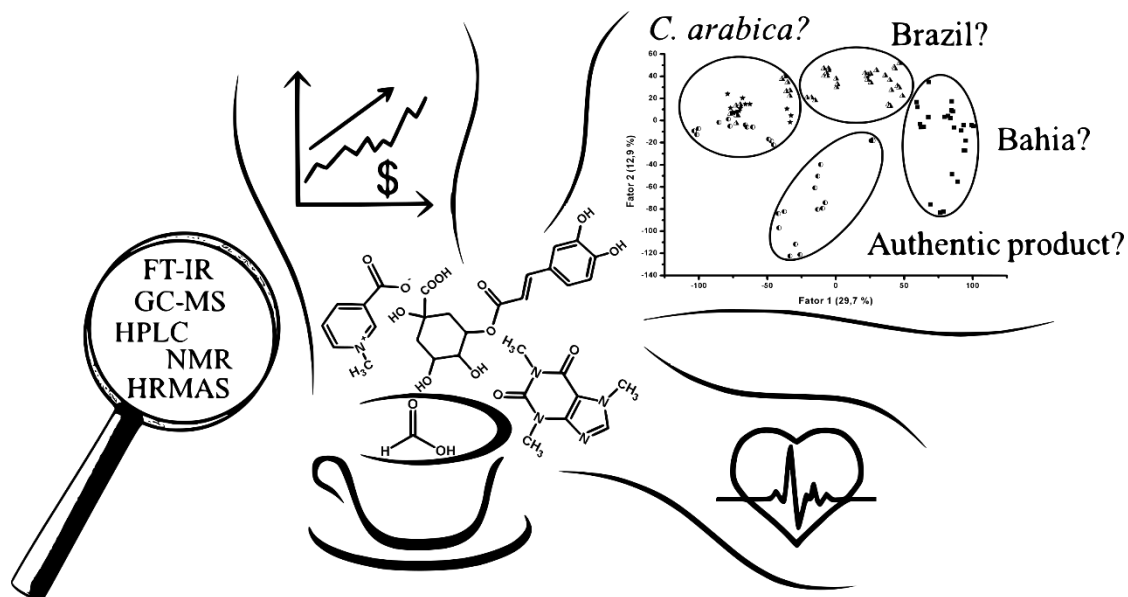
A quimiometria alinhada aos dados de RMN de ^1H possibilita a extração de informações importantes em um grande conjunto de dados, o que permite o desenvolvimento de metodologias capazes de identificar a origem geográfica, qualidade e autenticidade de amostras diversas por meio da identificação de seus descritores. Dessa forma, a RMN de ^1H e os métodos quimiométricos permite o desenvolvimento de uma análise química e estatística eficiente nos mais diversos estudos para a compreensão de misturas complexas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Este referencial teórico compreende um artigo de revisão que está submetido para publicação na revista Química Nova^a.

^a Referências no final do manuscrito, página 48

Graphical Abstract



The diverse analytical and statistical techniques that are used in the analysis of chemical composition of coffee relate its chemical profile with quality and geographical origin parameters, adding value to the product and identifying potential bioactive constituents.

O CAFÉ PARA ALÉM DA XÍCARA: TÉCNICAS ANALÍTICAS USADAS NA INVESTIGAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA. UMA REVISÃO

Hemerson Dantas dos Santos, Elisangela Fabiana Boffo*

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, 40170-115 Salvador – BA, Brasil

() Manuscrito com material suplementar

(X) Manuscrito sem material suplementar

*e-mail: eboffo@ufba.br

COFFEE BEYOND THE CUP: ANALYTICAL TECHNIQUES USED IN THE RESEARCH OF CHEMICAL COMPOSITION. A REVIEW

This review contemplates the last 18 years of work that have coffee as the main objective. Diverse aspects were addressed, from Brazilian and global production, classification norms, biological activity of its constituents and, mostly, the analytical techniques that were used to identify its chemical composition. Coffee is one of the most consumed beverages in the world, being exported from more than 47 countries and having Brazil as its main producer. Traditionally, the classification of beverage quality is performed by a sensory test, where characteristics such as aroma, taste and texture are evaluated. The studies show the richness of information that the chemical constituents bring to the final product, seen as the different analytical techniques allied to the chemometric methods show that the constituents or classes of substances in the coffee act like markers of economically important species and/or geographic origin. This has led to the development of quality control methodologies that can be used along with the sensory test. That being, this work looks forward to contribute with the diffusion of the analytical techniques used in the investigation of the chemical constituents of the coffee, but mostly, highlighting the advantages of the NMR spectroscopy and the Chemometrics.

Keywords: coffee, chemical composition, analytical techniques, chemometrics, authenticity

O CAFÉ

Uma grande variedade de cafés é cultivada no mundo todo, contudo as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (comumente conhecidas como arábica e robusta, respectivamente) são as mais economicamente importantes.^{1,2}

A história mais difundida e aceita pelos historiadores com relação à descoberta do café foi registrada por volta do ano 575, sendo considerada como o seu primeiro registro.^{3,4} Tal história relata que a descoberta foi feita por um pastor de ovelhas na Etiópia (nação que se encontra no Chifre da África) que ao observar estes animais se alimentarem de um arbusto (que futuramente viria a ser classificado por Lineu como *Coffea arabica*) notou que eles ficavam cheios de energia.

A partir do conhecimento de seus efeitos, o café tornou-se produto comercial, saindo do Sudão e passando pela Etiópia rumo ao Iêmen e a Arábia. Isso aconteceu por volta do ano 1000, época na qual algumas formas de preparo foram desenvolvidas, como infusão e fermentação dos frutos. Após a sua popularização na Arábia, os holandeses passaram a cultivá-lo e a difundi-lo para o mundo.⁴

No Brasil, a indústria cafeeira teve uma grande contribuição para a história do país. No período denominado República Velha (1894 - 1930), o café era o principal motor econômico da nação.⁴ Deste período foram alcançadas três grandes conquistas: a imigração, que trouxe mão de obra mais qualificada, a urbanização e a industrialização do país. Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial deste alimento.²

Produção de café

A produção mundial de café aumentou 4,5 % na safra de 2018 em relação ao ano anterior, com cerca de 168 milhões de sacas de 60 quilogramas (Kg).⁵ O Brasil contribuiu significativamente para isso, injetando neste mesmo período cerca de 62 milhões de sacas (36,7 % da produção mundial), sendo o maior produtor, seguido por Vietnã e Colômbia, mas apresentando uma produção quatro vezes maior do que a da Colômbia (Tabela 2-1).⁵ Para o Brasil alcançar esses números, calcula-se que foi dedicada uma área com cerca de 2,2 milhões de hectares do território nacional ao seu plantio,⁶ que ainda segundo o portal de informações da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), corresponde à 3,0 % da área total das

culturas cultivadas no país que compreende a cultura de grãos (85,3 %) a exemplo da soja e do milho, e a produção de cana de açúcar (11,7 %).

Tabela 2-1. Produção mundial de cafés arábica e robusta⁵

País	Produção (milhões de sacas de 60 Kg)			
	2016	2017	2018	% (2017-2018)
Brasil	56,787	52,735	61,700	17,0
Vietnã	25,540	30,540	29,500	3,4
Colômbia	14,634	13,824	14,200	2,7
Indonésia	11,541	10,802	10,200	-5,6
Honduras	7,457	7,560	7,450	-1,5
Etiópia	7,297	7,454	7,500	0,6
Uganda	4,962	4,797	4,900	2,2
Peru	4,223	4,279	4,300	0,5
México	3,781	4,392	4,500	2,5
<i>Mundial</i>	<i>160,040</i>	<i>160,780</i>	<i>168,093</i>	<i>4,5</i>

A cafeicultura no Brasil obteve esse ótimo desempenho devido principalmente às condições de clima tropical, boa frequência pluviométrica e temperaturas médias entre 18 e 26 °C.⁷ O estado maior produtor é Minas Gerais (Tabela 2-2), com 54,1 % da produção nacional em 2018. A Bahia é o quarto maior produtor e produziu 4,55 milhões de sacas para a mesma safra em uma área de 130.000 hectares.⁶ Não obstante, a competência, experiência e investimento aliados a condições naturais de cada região brasileira, proporcionaram aos produtores a oportunidade de oferecer um produto de alta aceitação tanto no mercado interno, quanto no exterior.

Tabela 2-2. Levantamento de safra para os principais estados produtores de cafés no Brasil⁶

Estado	Produção (mil sacas de 60 Kg)		
	2018 ^a	2017 ^b	2016 ^c
Minas Gerais	33 360,4	24 445,3	30 724,1
Espírito Santo	13 739,0	8 865,0	8 967,4
São Paulo	6 302,3	4 411,8	6 031,0
Bahia	4 550,2	3 358,0	2 093,3
Rondônia	1 978,3	1 938,2	1 626,9
Paraná	1 000,0	1 210,0	1 047,0
Rio de Janeiro	346,0	349,0	347,4
Goiás	195,4	190,2	226,8
Mato Grosso	104,2	91,5	125,4
<i>Nacional</i>	<i>61 657,5</i>	<i>44 970,0</i>	<i>51 369,2</i>

a: 1º Levantamento - Safra 2019; b: 1º Levantamento - Safra 2018; c: 2º Levantamento - Safra 2017.

Em se tratando dos cafés produzidos na Bahia, uma região que está ganhando destaque é a Chapada Diamantina, sendo que o solo e o clima dessa área juntamente com a melhoria das técnicas de cultivo e torra têm favorecido a produção de cafés *gourmet*, sendo de elevada qualidade e excelência. Fato que levou esses produtos a serem contemplados com os primeiros lugares em duas categorias (Ouro e Especial) no 14º Concurso Nacional ABIC de Qualidade do Café (realizado em 2017).⁸ Além disso, em 2018 o maior número de fazendas premiadas na categoria “Poupas Naturais” no mais influente campeonato internacional do setor (*Cup of Excellence*) foram dessa região.⁹

Em meio a tanto poder de produção, é plausível que o Brasil também lidere as exportações de cafés (Tabela 2-3). Os principais destinos são os Estados Unidos [6,2 milhões de sacas (60 Kg), ou seja, 17,5 % do total embarcado], Alemanha [5,6 milhões de sacas, 16,0 %] e Itália [3,1 milhões de sacas, 8,9 %].¹⁰

Tabela 2-3. Dados de exportação dos três maiores produtores de café¹¹

País	Exportação (milhões de sacas de 60 Kg)		
	2018	2017	2016
Brasil	35,330	30,450	33,081
Vietnã	28,200	27,900	27,550
Colômbia	13,300	12,715	13,755

A crescente produção é também reflexo do seu consumo, tornando-o uma das bebidas mais requisitadas no mundo. Neste sentido, os brasileiros também passaram a apreciar mais o “cafezinho”, no período entre novembro de 2017 e outubro de 2018 o consumo desta bebida cresceu 4,8 % em relação ao período entre novembro de 2016 e outubro de 2017 chegando ao consumo *per capita* de 4,82 kg de café torrado e moído ao ano.¹² Diante às diversas marcas e tipos disponíveis nas prateleiras nacionais, faz-se necessário garantir que o produto chegue à xícara com a qualidade, cuja qual fora prometida pelo fabricante.¹²⁻¹⁴ Portanto, sabendo-se que a qualidade final do produto comercial sofre influência direta da sua composição química é importante conhecer o seu perfil químico, tanto do grão verde quanto torrado.

Classificação do café

No Brasil, a certificação de pureza do produto é feita pela Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC), que em 2004 lançou o Programa de Qualidade do Café (PQC) com o objetivo de proporcionar ao consumidor produtos de qualidade em diferentes categorias: Tradicional, Extraforte, Superior e *Gourmet*. O PQC analisa o café de acordo com sua

Qualidade Global (QG), fazendo uma avaliação de vários fatores, como o aroma e seu grau de intensidade, acidez, amargor, adstringência, presença ou ausência do gosto de grãos defeituosos como os verdes, ardidos, pretos, preto-verde, brocado, quebrado, entre outros.

A nota da QG é dada em uma escala sensorial que varia de 0 a 10 (Tabela 2-4) sendo que o nível mínimo de qualidade aceito é de 5, ponto no qual a bebida começa a ser recomendada ao consumo.

Tabela 2-4. Faixa de notas de QG usada para classificar os tipos de cafés¹⁵

Valores de QG	Conceito	Categoria
$0 \leq QG < 1$	Péssimo	Não recomendável
$1 \leq QG < 3$	Muito ruim	
$3 \leq QG < 4$	Ruim	
$4 \leq QG < 5$	Regular	
$5 \leq QG < 6$	Bom	Tradicional e/ou extraforte
$6 \leq QG < 7$	Bom	Superior
$7 \leq QG < 9$	Muito bom	Gourmet
$9 \leq QG < 10$	Excelente	

Esta nota provém de testes de análise sensorial, nos quais os provadores verificam as características da bebida. Além disso, com o auxílio da microscopia ótica é investigada também a pureza além de outros parâmetros diretamente ligados à qualidade do produto.¹⁵ Quanto à análise sensorial, ainda não há uma metodologia instrumental capaz de compreender o efeito da mistura dos compostos responsáveis pelo sabor e aroma do café. Sendo assim, a análise sensorial é determinada pelo “teste da xícara”, assistido pela Instrução Normativa 08/03 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), de 11 de junho de 2003, disponível no portal da Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC).¹⁶ O teste consiste em classificar a bebida de acordo a pontuação atribuída na prova, segundo as classes descritas na Tabela 2-5.¹⁶

Tabela 2-5. Padrão oficial de classificação do café obtido por infusão, percolação, decantação ou outro processo a partir do grão torrado e moído¹⁶

Classe	Definição
Mole	Apresenta aroma e sabor agradável, brando e adocicado
Apenas mole	Apresenta sabor levemente doce e suave, mas sem adstringência ou aspereza de paladar
Estritamente mole	Apresenta, em conjunto, todos os requisitos de aroma e sabor mole, porém mais acentuado
Duro	Apresenta sabor acre, adstringente e áspero, porém não apresenta paladares estranhos
Riada	Apresenta leve sabor, típico de iodofórmio
Rio	Apresenta sabor típico e acentuado de iodofórmio
Rio zona	Apresenta aroma e sabor muito acentuado, assemelhado ao iodofórmio ou ao ácido fênico, sendo repugnante ao paladar

Composição química do café

O café tem sido analisado em muitas pesquisas, devido a sua importância econômica nacional e mundial, mas também pela sua complexidade química. Com isso, observou-se que muitos de seus constituintes são bioativos e apresentam diversas funções preventivas, tais como propriedades antioxidantes e anticancerígenas.^{17,18} Além disso, o interesse em proporcionar ao consumidor um produto autêntico e de alta qualidade, fez com que pesquisadores de várias partes do mundo realizassem importantes estudos voltados para a investigação da sua composição química e medida dos teores dos seus constituintes. Neste sentido, pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de detectar, quantificar e classificar as substâncias químicas presentes nos grãos,^{19,20} mas também para desenvolver metodologias capazes de classificar o produto com relação à qualidade, origem geográfica e autenticidade.²¹⁻²³

A cafeína é a substância mais conhecida do café, devido a sua ação estimulante no sistema nervoso central.²⁴ Ela também está presente em outras bebidas, como energéticos e chás, além de fazer parte da composição de medicamentos, tornando-se o psicoativo mais consumido no mundo.²⁵ Outras substâncias bastante conhecidas são a trigonelina e ácido fórmico (Figura 2-1) e a determinação dos seus teores faz-se necessária na indústria cafeeira devido a influência destas sobre as propriedades organolépticas do produto final.^{26,27} Segundo Campo e colaboradores (2010), essas substâncias são as majoritárias em cafés solúveis, apresentando valores médios iguais a 4,2% para a cafeína; 2,4% para a trigonelina e 2,6% para o ácido fórmico.²⁵

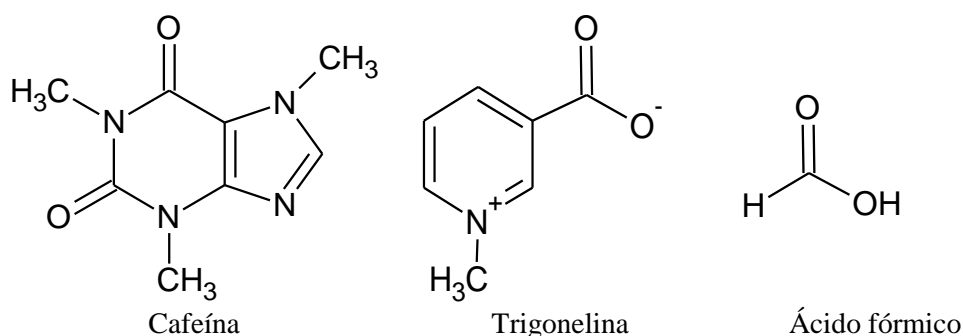


Figura 2-1. Fórmulas estruturais de constituintes majoritários do café solúvel²⁵

A composição de aminoácidos em grãos verdes é representada majoritariamente pelos ácidos glutâmico, γ -amino-n-butírico e aspártico, alanina, triptofano, fenilalanina, prolina, tirosina, valina e lisina (Figura 2-2), sendo o ácido glutâmico observado em maior concentração na

espécie *C. arabica* em relação a *C. canephora*.²⁸ Durante a torra, os aminoácidos e as proteínas, como também os ácidos clorogênicos proporcionam a formação de melanoidinas, conjunto de substâncias complexas de difícil separação e com alta massa molecular, cuja natureza estrutural ainda não foi totalmente elucidada. A sua formação é proveniente de uma reação denominada de reação de Maillard, que ocorre entre aminoácidos ou proteínas e um carboidrato redutor. As melanoidinas são reportadas na literatura como contribuintes para a cor (predominantemente marrom) e o sabor do café (que depende de fatores como o pH, a matéria-prima e combinações de tempo e temperatura),²⁹ além de candidatas a componentes fisiologicamente ativas.^{30,31}

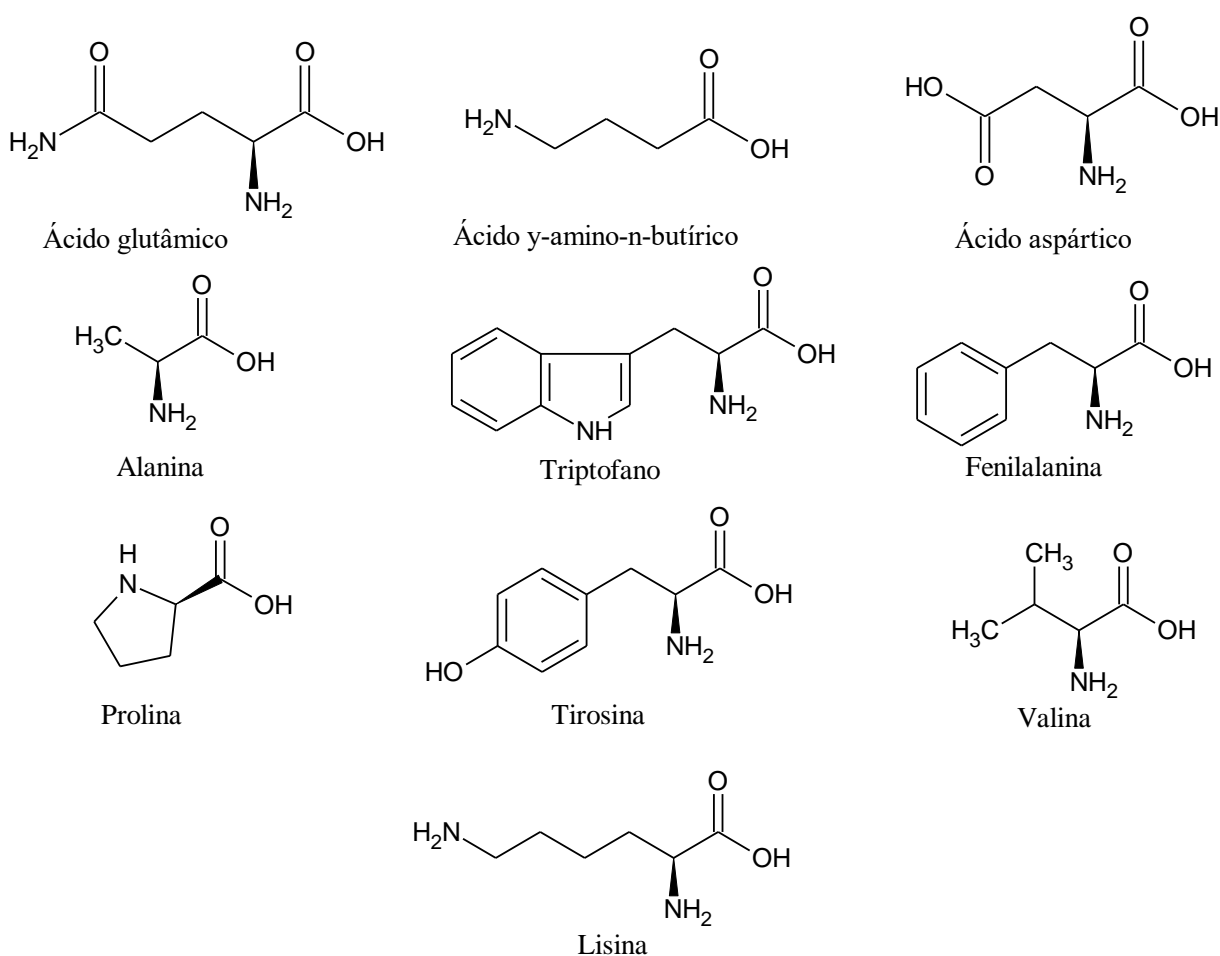


Figura 2-2. Aminoácidos majoritários em cafés verdes²⁸

Os constituintes químicos presentes no café torrado influenciam diretamente nas propriedades organolépticas da bebida. Substâncias como metilxantinas (cafeína e teobromina), trigonelina e os ácidos clorogênicos têm sido relacionadas ao sabor da bebida, embora essa influência não tenha sido confirmada.³² Entretanto, Frank, Zehentbauer e Hofmann identificaram, isolaram e caracterizaram 14 constituintes químicos presentes no café torrado e que são importantes

contribuintes para o sabor amargo, sendo que os que apresentaram maiores contribuições estão apresentados na Figura 2-3 [3-*O*-cafeoil- γ -quinida (3a), 4-*O*-cafeoil- γ -quinida (3b), 5-*O*-cafeoil-*epi*- δ -quinida (3c), 4-*O*-cafeoil-*muco*- γ -quinida (3d), 5-*O*-cafeoil-*muco*- γ -quinida (3e), 3-*O*-feruloil- γ -quinida (3f), 4-*O*-feruloil- γ -quinida (3g)]. Os autores relataram que com o auxílio de reações de síntese foi possível identificar a composição de frações complexas, a exemplo da fração obtida pela extração em acetato de etila, sendo que nesta etapa foram identificados derivados dos ácidos *p*-cumárico, cafeico, felúrico, hidroxicinâmico e quínico.³³

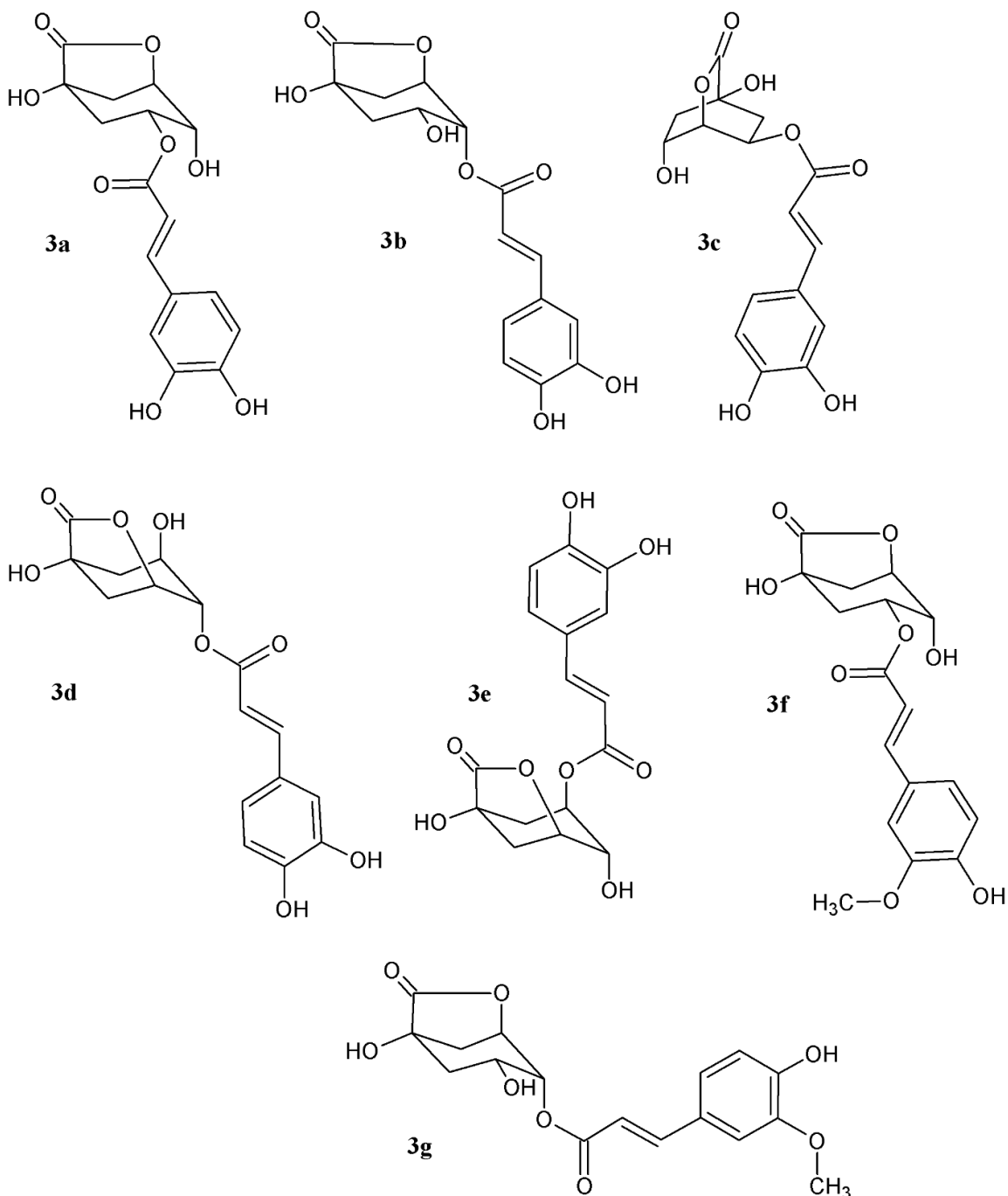


Figura 2-3. Constituintes químicos atribuídos ao sabor amargo dos cafés torrados^{33,34}

Frank, Zehentbauer e Hofmann ainda constataram que atribuições diretas dos constituintes químicos majoritários, como os alcaloides (cafeína e trigonelina), compostos heterocíclicos e produtos de termólise da trigonelina, como os principais responsáveis pelo sabor amargo do café podem levar a resultados errôneos, pois os constituintes que mais proporcionaram sabor amargo à bebida se encontravam em baixas concentrações e foram identificados com o acompanhamento sensorial no processo de isolamento. Reações de sínteses partindo de padrões dos precursores destes componentes foram necessárias para as caracterizações, devido principalmente a impossibilidade do isolamento direto dos mesmos, por se encontrarem em baixas concentrações. Os compostos apresentados na Figura 2-4 [3,4-*O*-dicafeoil- γ -quinida (4a), 3,5-*O*-dicafeoil-*epi*- δ -quinida (4b) e 4,5-*O*-dicafeoil-muco- γ -quinida (4c)] foram identificados como sendo responsáveis pelo sabor fortemente amargo em cafés torrados, podendo ser detectados pelo paladar humano em concentrações de até 4,8 mg L⁻¹.³³

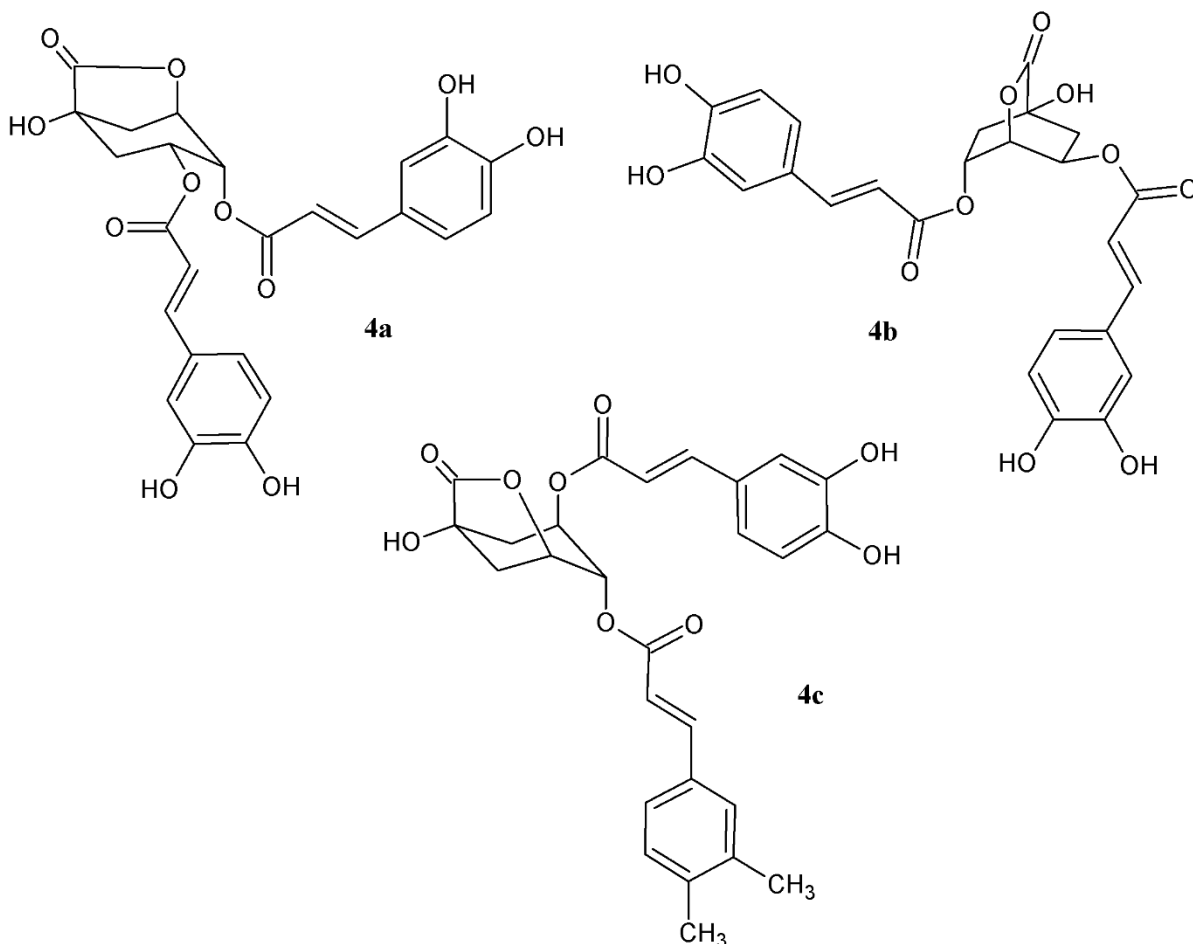


Figura 2-4. Constituintes químicos responsáveis pelo amargor intenso em cafés torrados³⁴

Com relação a sua composição volátil, compostos como acetaldeído, 3-metilbutanal, 2,3-butanodiona, 2,3-pentanodiona, guaiacol, 4-etilguaiacol, 4-vinilguaiacol, furaneol, 2,3,5-trimetilpirazina e vanilina se destacam.³⁵ Além disso, os cafés torrados também apresentam

em sua composição pequenas quantidades de 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF), que é formado no processo da torra como produto de decomposição térmica de carboidratos, tornando-se um indicador da deterioração da qualidade, devido a torra excessiva ou longos períodos de armazenagem do produto.²⁵ O 5-HMF passou a ser levado em consideração devido a seu potencial carcinogênico. No entanto, a quantidade presente nos alimentos é muito pequena e, além disso, parte dele é secretado pela urina, eliminando assim uma parcela do que estava presente no organismo humano.³⁶

No Brasil, perfis metabólicos dos extratos metanólicos de cafés torrados da espécie *Coffea arabica* L. foram investigados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas com analisador de quadrupolo (GC-Q/MS, do inglês *Gas Chromatography coupled with Quadrupole Mass Spectrometry*) com o objetivo de identificar possíveis descritores microrregionais. No estudo foram identificados 44 metabólitos, dos quais 10 contribuíram com maior precisão para a diferenciação dos produtos de três microrregiões brasileiras (Lavras/MG, Santo Antônio do Amparo/MG, e São Sebastião da Gramma/SP). Os autores enfatizaram que as investigações de descritores que correspondem a origens dos grãos estão comumente voltadas apenas para diferenciação por países ou continentes, no entanto, mostraram que os seus perfis químicos podem trazer padrões distintos mesmo em regiões próximas.³⁷

Outro trabalho desenvolvido no Brasil identificou e quantificou os teores de café robusta adicionados ao arábica fazendo-se uso de duas ferramentas analíticas, a espectrometria de massas por ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR MS, do inglês *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*) e a espectroscopia de refletância total atenuada com transformada de Fourier na região do infravermelho (ATR-FTIR, do inglês *Attenuated Total Reflectance Fourier Transform InfraRed spectroscopy*). Os autores detectaram 46 substâncias, as quais contribuíram para a discriminação das amostras estudadas.³⁸ Anteriormente, Garrett e colaboradores já haviam aplicado a técnica de FT-ICR MS para a identificação de 20 metabólitos presentes no café arábica e usaram a análise discriminante nos dados obtidos revelando a correlação entre os metabólitos, cultivares de *C. arabica* e as diferentes regiões de cultivo das amostras analisadas.³⁹

Atividade Biológica dos Principais Constituintes do Café

O café possui muitas substâncias bioativas.^{40,41} Constituintes como cafeína, trigonelina, ácidos clorogênicos e diterpenos (cafestol e kahweol) possuem diversas funções biológicas, por isso receberam uma atenção especial em uma revisão elaborada por Nuhu em 2014, na qual foram abordadas 16 metodologias analíticas para caracterização e quantificação dos mesmos.⁴² Além disso, a literatura apresenta importantes contribuições dos metabólitos do café para a saúde humana. A cafeína está relacionada a atividade contra a doença de Parkinson,⁴³ apresenta potencial terapêutico contra a doença de Alzheimer⁴⁴ e capacidade antioxidante.^{40,42,45-47} Os ácidos clorogênicos causam redução nos efeitos da amnésia e são capazes de auxiliar na apoptose das células de câncer de pâncreas,⁴⁸⁻⁵¹ os ácidos cafeoilquínicos apresentam atividade anti-HIV⁵² e os diterpenos mostraram efeito anti-proliferativo contra leucemia.^{42,53}

De acordo com as pesquisas desenvolvidas por Boettler e colaboradores⁵⁴ e Johnson e colaboradores⁵⁵, o consumo de três ou mais xícaras de café por dia, bem como a ação dos seus constituintes, tais como os ácidos clorogênicos e o cátion *N*-metilpiridínio, possuem correlações benéficas com a redução de riscos de hepatocarcinoma celular e outros tipos de câncer.

Uma importante revisão escrita por Cano-Marquina, Tarín e Cano em 2013 e intitulada “O impacto do café na saúde (*The impact of coffee on health*)” sugere que ele traz mais benefícios do que malefícios a saúde. Os pesquisadores reuniram trabalhos de 22 anos, nos quais observaram a ação do metabolismo de carboidratos e lipídios e acompanharam os efeitos da cafeína para a pressão arterial, arritmia ou insuficiência cardíaca. Neste sentido, constataram que a sua ingestão traz um equilíbrio ao colesterol total e que os antioxidantes presentes nesta bebida reduzem a oxidação lipídica, bem como o café descafeinado reduz o teor de glicose em humanos. O estudo também mostrou trabalhos que evidenciam a associação do seu consumo com a redução na incidência de diabetes, doenças hepáticas e redução da mortalidade.¹⁸

Neste contexto, os trabalhos desenvolvidos por Cai e colaboradores⁵⁶ e Kempf e colaboradores⁵⁷ indicaram que o café favorece o aumento do colesterol total, embora tende a estabelecer um equilíbrio entre as lipoproteínas de baixa densidade (LDL - *Low Density Lipoproteins*) e as lipoproteínas de alta densidade (HDL - *High Density Lipoproteins*). Quanto ao sistema cardiovascular, a cafeína é responsável pelo aumento da pressão arterial, embora

não influencie na frequência cardíaca.⁵⁸ Em se tratando de prevenção à diabetes, alguns estudos mostram relações do seu consumo com a redução dos riscos de diabetes tipo 2, além disso, o consumo moderado durante todo um ciclo de vida reduz os danos hepáticos independente dos agentes agressores, como também os riscos de desenvolver a doença de Alzheimer.⁵⁹⁻⁶²

TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE CAFÉ

Com o avanço das técnicas de análises química, dos processamentos computacionais e algoritmos de ferramentas estatísticas, desenvolveu-se uma diversidade de metodologias capazes de oferecer informações precisas, consistentes e confiáveis para a investigação de materiais em matrizes complexas.

Para cada técnica foram desenvolvidas muitas metodologias voltadas às análises de alimentos. Um exemplo interessante está relacionado à análise de sabor e refere-se ao uso da cromatografia gasosa-olfatometria quantitativa (GC-O, do inglês *Gas Chromatography-Olfactometry*) e experimentos de reconstituição de aroma, os quais denominam-se de análises de diluição de sabor.^{29,63} Esta metodologia se configura em usar técnicas cromatográficas para separar os constituintes químicos presentes em diversos tipos de alimentos (cenoura, chá verde, chá preto, café, etc.). Em seguida, as frações geradas (puras ou ainda contendo mistura de substâncias) são diluídas em água potável e submetidas a um painel sensorial composto por provadores treinados, os quais aplicam um teste do triângulo descrito por Wieser e Belitz.⁶⁴ Ao fim, as frações recebem notas de 0 (zero) a 3 (três), sendo que zero corresponde a ausência de sabor amargo e três significa forte amargor.⁶⁵

A crescente demanda por cafés de boa qualidade e o alto valor agregado a tipos específicos pode levar ao surgimento de produtos adulterados. Somado a isto tem-se a necessidade de quantificar os componentes químicos capazes de exercer funções biológicas, por isto muitos autores acreditam que se deve buscar por técnicas cada vez mais eficientes, rápidas e robustas com relação a autenticação e investigação da qualidade do produto.^{19,25,66-69}

O sabor, a textura e o aroma do café estão intrinsecamente relacionados à sua complexa composição química, sendo que a maioria dos compostos está presente em concentrações traços, muitos deles estão originalmente presentes no grão e outros aparecem como resultado de uma série de reações que acontecem durante o processo da torra.⁷⁰⁻⁷³ Esta complexidade química influencia a qualidade do café e depende de diversos fatores intrínsecos e extrínsecos

que vão do grão até à xícara. Sendo assim, a espécie, o clima, o solo e todo o manuseio do grão definem a classificação no que diz respeito à qualidade do produto final.⁷⁴⁻⁷⁶

As investigações da composição química dos grãos possibilitam a compreensão dos seus constituintes fixos e voláteis, assim, nos familiarizam com o seu perfil químico e possibilitam o desenvolvimento de metodologias rápidas e confiáveis para confirmação da autenticidade deste produto. Técnicas como a Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) proporcionaram bons resultados em estudos sobre constituintes em baixas concentrações ou voláteis, devido principalmente a alta sensibilidade dos instrumentos, o que permite detectar componentes em pequenas quantidades, a exemplo da metodologia de detecção e quantificação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em café torrado na faixa de 0,85 a 39,32 ng mL⁻¹.⁷⁷

As técnicas analíticas utilizadas na investigação de componentes voláteis dos cafés são diversas. A análise direta por microsonda em linha de fotoionização e espectrometria de massas (SPI-TOFMS, do inglês *Single-Photon Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) foi usada para verificar a formação de componentes voláteis dentro e fora de grãos das espécies *C. arabica* e *C. canephora* durante o processo de torra.⁷⁸ A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-Q-MS) foi aplicada como método para autenticação de cafés Kopi Luwak.⁷⁹ A microextração em fase sólida em múltiplos estágios combinada com a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (smSPME-ss-GC-MS, do inglês, *simultaneous multiple Solid-Phase MicroExtraction-single shot-Gas Chromatography Mass Spectrometry*) foi usada na análise do perfil do aroma.⁸⁰ A técnica de dessorção térmica acoplada a cromatografia gasosa e espectrometria de massas ((TD)-GC-MS, do inglês, *Thermal Desorption-Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) foi importante para desenvolver uma metodologia para análise multi-elementar de constituintes voláteis em amostras aquosas desta bebida.³⁰ Em outra análise cromatográfica, os autores relacionaram componentes voláteis com defeitos intrínsecos presentes nos grãos.⁸¹

Com relação as técnicas usadas na observação dos componentes fixos do café, destaca-se o uso da espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIRS, do inglês *Near InfraRed Spectroscopy*) na análise da mistura de arábica e robusta.⁸² A espectrometria de massas de alta resolução com plasma indutivamente acoplado (HR-ICP-MS, do inglês *High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) foi aplicada na análise de isótopos de boro, carbono, nitrogênio, oxigênio e estrôncio em amostras de cafés arábica provenientes de 14 países dos continentes da Ásia, África e América para distinguir as procedências geográficas. Os autores consideraram os elementos observados como potenciais indicadores geográficos.⁸³

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução (LC-UV-ESI-MS, do inglês *Liquid Chromatography UltraViolet detection coupled ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry*) foi aplicada na análise dos polifenóis na película prateada (epiderme) do grão, a qual se apresentou como uma matéria-prima de baixo custo para o preparo de suplementos alimentares à base de ácidos clorogênicos e sem cafeína.⁸⁴ A condutividade elétrica (ECM, do inglês *Electrical Conductivity Method*) foi usada na investigação de produtos especiais e tradicionais de *C. canephora*.⁸⁵ Um método baseado na análise de DNA e técnicas de FT-ICR MS e ATR-FTIR possibilitaram a detecção e quantificação de adulteração de cafés arábica com robusta.^{38,86} A micro espectroscopia na região do infravermelho próximo (microNIR, do inglês *micro Near InfraRed spectroscopy*) trata-se de uma técnica analítica compacta, na qual um espectrômetro portátil possibilita adquirir dados em tempo real e detectar e/ou quantificar não conformidade, adulteração do café arábica com robusta ou com impurezas como milho e cascas.⁸⁷

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tem sido bastante utilizada na análise da composição química dos cafés.⁸⁸⁻⁹⁷ Esta técnica dispensa o preparo laborioso de amostra e oferece, de forma rápida, uma grande quantidade de informações quanto à composição química do material em análise, fazendo dela uma poderosa ferramenta analítica para aplicação em estudos que buscam obter informações químicas em matrizes complexas.^{25,98}

ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A técnica de RMN baseia-se na aplicação de uma sequência de pulsos de radiofrequência em uma faixa específica de núcleos atômicos (geralmente hidrogênio-1 ou carbono-13) submetidos a um campo magnético estável, a fim de promover spins nucleares a níveis de maior energia, e posteriormente captar a resposta proveniente do núcleo observado em função do seu tempo de relaxação, processo que pode acontecer de duas formas, por T_1 (que corresponde a relaxação longitudinal do spin com magnetização paralela ao campo magnético externo) e por T_2 (que corresponde ao tempo de relaxação transversal da magnetização). Neste processo é gerado o FID (Decaimento Livre de Indução, do inglês *Free-Induction Decay*) que ao passar por uma transformada de Fourier (TF) gera um espectro no domínio da frequência, mostrando os sinais característicos de cada ambiente nuclear.^{68,96,99}

Em uma única análise, a RMN de ^1H é capaz de fornecer várias informações referentes à amostra, como a quantidade de hidrogênios em cada sinal do espectro,¹⁰⁰ mapeamento da vizinhança de cada hidrogênio analisado¹⁰¹ e quantificação de componentes em mistura complexa.¹⁰²

A RMN possibilita ainda a obtenção de experimentos bidimensionais, tais como COSY (*homonuclear Correlation Spectroscopy*), HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*), além de experimentos n-dimensionais, que são muito utilizados na identificação de substâncias com elevado peso molecular, desta forma oferecem mais clareza e confiança a trabalhos de elucidação estrutural.^{102,103}

Existem metodologias em RMN nas quais a amostra é analisada na própria embalagem, como é o caso da RMN no domínio do tempo (RMN-DT), que é aplicada principalmente na ciência de alimentos para análise de água e teores de gorduras. Em um estudo recente, Santos, Pereira-Filho e Colnago aplicaram esta técnica como método rápido para avaliação de adulteração em leites industrializados com soro, leite sintético, urina sintética, ureia e peróxido de hidrogênio.¹⁰⁴ Adicionalmente, uma metodologia baseada no descritor 16-O-metilcafestol (16-OMC, um composto marcador reconhecido para grãos robusta) usou a RMN de ^1H (60 MHz) possibilitando a detecção e determinação de teores de misturas de cafés arábica e robusta em 81 amostras, por meio de uma simples extração com clorofórmio.¹⁰⁵ Além disso, essas técnicas são não destrutivas, repetitivas e apresentam alta economia no uso de solventes orgânicos e menores custos de capital e manutenção quando comparadas aos magnetos supercondutores.^{89,90,106}

Estruturas moleculares grandes como as de proteínas podem ser elucidadas por técnicas n-dimensionais, graças aos desenvolvimentos de estudos voltados para a elaboração de *scripts* de processamentos de FIDs com velocidades superiores à atual TF, que melhoram a resolução de correlações entre dimensões nos experimentos multidimensionais em RMN.^{107–109}

A evolução da RMN tem contribuído para a determinação estrutural de substâncias complexas, como as estruturas supramoleculares, as quais se configuram conjuntos virais, proteínas de membranas, etc. A compreensão estrutural de moléculas complexas e de alto peso molecular se faz necessária e importante, principalmente por suas atividades biológicas, atuação como máquinas moleculares, localizadores de células, transporte molecular, etc. Estudos voltados para estes assuntos têm alcançado resultados com a aplicação da técnica de RMN no estado sólido.¹¹⁰

Espectroscopia de RMN na análise de cafés

Muitos métodos foram utilizados em análises de cafés verdes e torrados, sendo que os resultados mais completos com relação a quantificação, autenticidade e origem geográfica foram alcançados principalmente com o uso da espectroscopia de RMN de ^1H ,⁶⁸ embora estudos usando a espectroscopia nas regiões do infravermelho próximo (NIR) e médio (ATR-mIR) também alcançaram resultados semelhantes.¹¹¹

Um trabalho de revisão publicado em 2013 abordou os resultados da aplicação de várias técnicas da RMN em três matrizes complexas: cigarro, chá e café. Neste trabalho foram discutidas as vantagens da RMN com relação a outros métodos, como CG-EM, CLAE e FT-IR. Os autores constataram que uma das mais importantes aplicações da RMN está relacionada aos estudos da composição de misturas complexas, principalmente no que se refere a obtenção do perfil químico, enquanto que as outras técnicas são mais eficientes na detecção e quantificação de componentes químicos devido à maior sensibilidade.⁶⁸

O estudo desenvolvido por Campo e colaboradores mostrou a quantificação de constituintes multi-elementos majoritários do café solúvel. Os dados de limites de detecção obtidos pela técnica de RMN de ^1H de quatro importantes substâncias estão apresentados na Tabela 2-6. Segundo os autores, a espectroscopia de RMN vem sendo aplicada há quase quatro décadas no estudo desta composição complexa, contudo os novos estudos aliados à evolução da técnica proporcionam novos resultados e novas possibilidades.²⁵

Tabela 2-6. Limites de detecção simultânea de metabólitos no café solúvel por RMN de ^1H ²⁵

Analito	Limite de Detecção (mg g^{-1})
Cafeína	1,33
Ácido Fórmico	0,45
Trigonelina	0,58
5-HMF	0,30

Um estudo desenvolvido por Arana e colaboradores comparou o desempenho da RMN de ^1H com o da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas de razão isotópica (GC-IRMS, do inglês *Gas Chromatography Isotope Ratio Mass Spectrometry*) para discriminar cafés colombianos em relação aos produzidos em outros países. Os resultados revelaram que a RMN de ^1H foi mais vantajosa na discriminação dos colombianos, brasileiros e peruanos, devido ao seu poder de extrair mais informações das amostras.¹¹² Não obstante, Medina e colaboradores mostraram que a técnica de ATR-mIR proporcionou resultados semelhantes

aos obtidos com a RMN de ^1H para a discriminação de cafés de diferentes origens geográficas quando analisados por métodos quimiométricos.¹¹²

A RMN de ^1H e o experimento de RMN bidimensional TOCSY ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ -*Total Correlation Spectroscopy*) auxiliaram na identificação da substância responsável pela discriminação entre cafés instantâneos de diferentes fabricantes e também do mesmo fabricante. Os autores atribuíram ao 5-HMF a capacidade de discriminar essas amostras.¹¹³

Apesar da existência de diversos experimentos em RMN, alguns deles ainda são pouco explorados em trabalhos voltados à análise de alimentos, como por exemplo, a técnica de RMN de alta resolução com giro no ângulo mágico (HR-MAS, do inglês *High Resolution Magic Angle Spinning*), que permite a análise de material heterogêneo e proporciona espectros de alta resolução a partir da análise direta deste, proporcionando, desta forma, um experimento com o mínimo de pré-tratamento da amostra.¹¹⁴ Um estudo usando a RMN HR-MAS permitiu observar as mudanças no conteúdo de açúcares, aminoácidos, ácidos clorogênicos, cafeína, trigonelina e outros componentes dos cafés arábica e robusta em 12 temperaturas de torra (entre 30 e 215 °C).¹¹⁵ O resultado possibilitou um maior entendimento a respeito da reação de Maillard, permitindo dividi-la em três etapas: na primeira delas, a elevação da temperatura faz com que a glicosilamina sofra um rearranjo das ligações duplas formando um produto de Amadori.¹¹⁶⁻¹¹⁸ No passo seguinte, os produtos formados decompõem-se e dão origem às diversas espécies heterocíclicas. O terceiro estágio é caracterizado pela formação das melanoidinas, compostos com estruturas complexas de alto peso molecular e que proporcionam a tonalidade marrom ao café torrado.¹¹⁵

Os pesquisadores Kreppenhof, Frank e Hofmann investigaram a influência de produtos provenientes de reações binárias entre di e tri-hidroxibenzenos e derivados reativos de furano (furfurilálcool, furan-2-aldeído e 5-HMF) identificados no café torrado e responsáveis pelo sabor amargo, segundo os autores. Os produtos destas reações foram identificados por RMN uni e bidimensionais e quantificados por CLAE-EM/EM. O estudo constatou ainda que as concentrações capazes de serem detectadas pelo paladar humano dependem das estruturas químicas, com variação entre 16 e 900 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a adstringência e entre 100 a 1800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o sabor amargo.¹¹⁹

Wei e colaboradores realizaram três trabalhos utilizando a técnica de RMN como ferramenta para análise de cafés. Em 2010, identificaram 16 metabólitos presentes nos grãos verdes por RMN de ^1H , ^{13}C , COSY e HSQC, e quantificaram os mesmos por RMN de ^{13}C , sem qualquer processo de separação, preservando assim as informações quantitativas dos constituintes na mistura original.¹⁰² Em 2012, usaram dados da RMN de ^{13}C para distinguir amostras de cafés

verdes por espécie e origem geográfica com auxílio de análise multivariada. Com isso, observaram dezenas de metabólitos descritores, entre eles a sacarose, cafeína, ácidos clorogênicos, colina, aminoácidos, ácidos orgânicos e trigonelina. Segundo os autores, o espectro de ^{13}C possui menor número de sinais complexos (sobrepostos) com relação aos espectros de ^1H , além disso, o complexo formado entre a cafeína-clorogenato influencia no deslocamento químico dos hidrogênios destes metabólitos. Os resultados demonstraram que a RMN de ^{13}C é uma ferramenta útil na discriminação de espécies e origens de extratos de cafés verdes.¹²⁰ Em 2014, os autores exploraram ainda mais a técnica de RMN enfatizando que a grande capacidade de análise multi-elementar e o mínimo de tratamento da amostra proporcionam investigações químicas que vão além da discriminação de grãos verdes, torrados e moídos, de distintas espécies ou procedências geográficas. O estudo mostrou que é possível aplicar a espectroscopia de RMN como uma "língua magnética" na caracterização e previsão do sabor dos alimentos. O objetivo dos pesquisadores foi desenvolver um novo método para prever o sabor da bebida pelo estudo metabolômico dos dados de RMN. O modelo estatístico estabelecido correlacionou a composição metabólica com as características sensoriais de quatro extratos de café, prevendo com sucesso os sabores de cada um.¹²¹

O poder de obtenção de dados químicos da RMN de ^1H também permitiu avaliar o teor de café arábica torrado e moído em mistura com robusta em um trabalho desenvolvido por Cagliani e colaboradores.⁸⁸

Outro importante estudo que mostra o poder de análise de substâncias complexas por RMN foi desenvolvido por Ciaramelli e colaboradores. A junção das técnicas uni e bidimensionais com a microscopia de força atômica e ensaios bioquímicos e celulares *in vitro* possibilitou verificar atividade significativa contra danos neurais, que foi atribuída aos ácidos cafeoilquínicos e as melanoidinas. Os resultados apontaram ainda que as atividades dos extratos de cafés verdes e torrados foram maiores com relação aos componentes isolados, o que indica ação de outros metabólitos minoritários.¹²²

No Brasil, um importante estudo foi desenvolvido por Tavares e Ferreira. Os pesquisadores identificaram os constituintes majoritários dos cafés comerciais (cafeína, trigonelina, *N*-metilpiridina, catecol, ácido fórmico e os ácidos quínico, cafeico, ferúlico e clorogênicos) fazendo uso das técnicas de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC. Os teores de cafeína em cafés de estabelecimentos comerciais foram medidos e variaram de 0,49 a 1,33 mg mL⁻¹. Os resultados expressaram de forma clara a praticidade das análises por RMN.⁹⁷

Outro estudo brasileiro com a aplicação de técnicas de RMN em matrizes de cafés torrados usou a RMN de ^1H para a autenticá-los por "impressão digital" de procedência geográfica. O

estudo visou fornecer um método simples e eficaz para distinguir os produtos de acordo as regiões de origem, ao passo que contribui com a proteção do mercado e agrega valor aos produtos. Os resultados se mostraram promissores e possibilitaram a distinção de cafés de regiões geográficas próximas, como os provenientes dos estados de São Paulo e sul de Minas Gerais.²³

Um estudo realizado com as cascas dos cafés sugeriu que elas possam ser potenciais fontes de lignina. A pesquisa desenvolvida por De Carvalho Oliveira e colaboradores caracterizou estas cascas por RMN e revelou que o seu conteúdo é composto por 92% de lignina, tornando possível o uso deste resíduo como matéria prima para biorrefinarias.¹²³

QUIMIOMETRIA

Os instrumentos analíticos modernos oferecem diversas informações químicas em uma análise, tornando as investigações científicas muito mais completas em relação aos métodos instrumentais clássicos. Entretanto, a manipulação de uma grande quantidade de dados torna-se inviável, e em RMN, por exemplo, ao obter espectros de um grande número de amostras, o espectroscopista se depara com milhares de variáveis a serem interpretadas, a fim de extrair as informações mais importantes do conjunto de dados. A análise manual torna-se impraticável e o usuário deve recorrer aos métodos estatísticos suficientemente capazes de observar cada variável e fazer a comparação entre todas elas. Neste sentido, estudos vêm sendo desenvolvidos desde a década de 1970, época na qual o químico orgânico Svante Wold usou pela primeira vez o termo Quimiometria.¹²⁴

A quimiometria é uma área multidisciplinar que une conhecimentos da química, matemática e estatística, dispondo de diversas metodologias para análise dos dados, sendo que as mais comuns são: Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) para análise exploratória dos dados; Regressão pelo Método dos Quadrados Mínimos Parciais (PLS, do inglês *Partial Least Square*) para calibração multivariada e o método SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*) para a classificação de amostras desconhecidas. Estas análises multivariadas são aplicadas conforme o objetivo de cada estudo.¹²⁴

Os métodos quimiométricos são aplicados em matrizes de dados provenientes de diversas análises instrumentais. A combinação com a RMN tem gerado muitos trabalhos científicos, como a utilização da RMN no domínio do tempo na determinação de parâmetros de qualidade

para molhos de mostarda¹²⁵ e para carne bovina¹⁰⁶, identificação de ácido isetiônico e pequenos metabólitos de *Fragilariopsis cylindrus* por RMN de ^1H ¹²⁶ e o perfil de biofluidos revelando desregulação metabólica em pessoas infectadas pelo vírus do HIV e aqueles em terapia antirretroviral.¹²⁷

Outros trabalhos mostraram a quimiometria sendo aplicada aos dados de RMN para a discriminação de plantas geneticamente idênticas,^{128,129} na previsão de corrosividade de óleos brutos nas unidades de destilação das refinarias de petróleo¹³⁰, na discriminação de vinhos provenientes de cultivares geneticamente semelhantes,¹²⁸ na classificação de origem botânica de méis^{98,131} e na classificação das cultivares de *Humulus lupulus L. (hop)* comerciais com dados de RMN bidimensionais.¹³²

Quimiometria na análise de cafés

Em observação a importância comercial dos cafés, quanto as diferentes espécies, modo de cultivo e terra, categorias de classificação (tradicional, superior ou *gourmet*), controle de qualidade, denominação de origem geográfica, entre outros, a aplicação de técnicas quimiométricas para fins de diferenciá-los com base em seu perfil químico tem gerado resultados satisfatórios por pesquisadores de várias partes do mundo.

Na análise química de cafés, os métodos quimiométricos são aplicados em dados de metodologias analíticas, tais como a FT-ICR MS,³⁸ CLAE-UV,¹³³ micro-espectroscopia Raman,¹³⁴ GC-IRMS e CG-MS,¹¹² espectroscopia fotoacústica por infravermelho¹³⁵ e RMN.^{112,122,136,137} Estes trabalhos mostram a eficácia destas técnicas e suas capacidades em discriminar cafés, tanto pela região de produção, quanto pelas espécies cultivadas. Sendo assim, os métodos espectroscópicos aliados à quimiometria são indispensáveis em estudos que buscam diferenciá-los com base nos seus perfis químicos.

O tratamento quimiométrico de dados espectrais de infravermelho foi relatado em três trabalhos. Ribeiro e colaboradores verificaram que o método PLS apresentou relevantes correlações entre a composição e atributos da qualidade da bebida como corpo, amargor, acidez, limpeza e sabor.⁷³ Craig, Franca e Oliveira mostraram a capacidade dessas técnicas em discriminar grãos defeituosos de cafés arábica verdes e moídos. Apesar do sucesso na discriminação de dados sobre defeitos dos grãos, a técnica não foi capaz de ser aplicada aos grãos inteiros.¹³⁸ No entanto, em 2018 Caporaso e colaboradores publicaram um artigo mostrando o desenvolvimento de uma metodologia capaz de analisar grãos inteiros de cafés

por infravermelho. Os autores apresentaram pela primeira vez uma análise da umidade do grão verde e teor de lipídios baseada em imagem hiperespectral. A técnica combina a natureza não destrutiva da espectroscopia na região do infravermelho próximo com a análise de imagens, possibilitando a análise simultânea dos grãos inteiros, obtendo medidas de suas características físicas e composição química. O estudo demonstrou a distribuição da umidade e lipídios dentro dos grãos individuais, o que pode permitir a detecção de sementes defeituosas na população amostral.¹³⁹

Desde o ano de 1999, a RMN de ^1H já era usada na análise de cafés expresso. Bosco e colaboradores testaram a potencialidade da técnica como uma ferramenta de análise para a investigação da bebida, e os resultados sugeriram a possibilidade do desenvolvimento de pesquisas voltadas para a aplicação da análise multivariada aos dados de RMN de ^1H de alta resolução na discriminação entre espécies, variados processos de torra dos grãos e origem geográfica.¹⁴⁰

Em 2002, Charlton e colaboradores aplicaram os métodos quimiométricos aos dados de RMN de 98 cafés instantâneos e conseguiram atribuir corretamente 99% das amostras aos seus fabricantes. Além do perfil químico global, os autores identificaram o 5-HMF como sendo o marcador primário da discriminação das amostras.¹¹³ Essa substância é reconhecida como um indicador de deterioração da qualidade por aquecimento excessivo ou longo tempo de armazenamento, e pode ser facilmente quantificada por RMN de ^1H pela metodologia desenvolvida por Campo e colaboradores.²⁵

A quimiometria aplicada aos dados de RMN de ^1H possibilitou a discriminação entre cafés arábica e robusta. O trabalho desenvolvido por Monakhova e colaboradores mostrou que a RMN aliada a quimiometria pode garantir a autenticidade de cafés 100% arábica e fornecer, além do seu perfil químico, informações quantitativas e estruturais dos constituintes fixos a partir de dados espectrais obtidos de forma rápida e reprodutível. Na pesquisa realizada por eles, o conteúdo químico das amostras foi extraído com clorofórmio deuterado. Após a obtenção dos espectros, a observação visual já permitia a distinção imediata entre um café 100% arábica e uma amostra que apresentava uma mistura com robusta, devido principalmente a visualização do sinal do grupo éter do 16-*O*-metilcafestol esterificado. Uma observação importante deste trabalho revela que, apesar da possibilidade de distinção de ambas as espécies por meio da observação univariada dos espectros de extratos lipofílicos, a análise multivariada revela sinais descritores em outras regiões no espectro de ^1H , desta forma a abordagem quimiométrica acrescenta mais segurança às análises de maneira a evitar decisões errôneas com relação a autenticidade do produto.¹³⁷

No Brasil, trabalhos usando RMN e quimiometria possibilitaram o desenvolvimento de uma metodologia rápida e eficaz para determinação e quantificação de adulterantes diversos como milho, casca de café, cevada e soja em produtos comerciais. O tratamento quimiométrico dos dados de RMN de ^1H permitiu discriminar todos os produtos adulterados em uma população de 31 amostras, se mostrando uma eficiente metodologia antifraude de produtos alimentícios.¹⁴¹

Villalón-López e colaboradores aplicaram os métodos quimiométricos aos dados de RMN de ^1H para diferenciar cafés torrados e moídos dos solúveis (instantâneos) e verificaram que os solúveis apresentaram maiores quantidades de 5-HMF e carboidratos e menores teores de trigonelina, cátion *N*-metilpiridínio, cafeína, ácidos cafeoilquínicos e 2-furilmetanol, características que permitiram diferenciar os dois tipos de café.¹⁴²

De forma geral, é possível observar que os trabalhos apresentados nesta revisão mostram a aplicabilidade de várias técnicas que são empregadas na análise química dos cafés, mas também tornam evidente que a RMN aliada à quimiometria tem gerado resultados surpreendentes nestes estudos, podendo discriminá-los por vários parâmetros como origem, espécies, torra, etc.

A Tabela 2-7 mostra um resumo dos principais artigos apresentados neste trabalho, sendo possível observar inúmeros componentes químicos do café, os quais proporcionam a este produto propriedades organolépticas específicas, de marcador geográfico e de espécies, além de diversos benefícios à saúde humana.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por metodologias de análise química dos cafés é cada vez maior, principalmente pelo fato do seu consumo estar aumentando a cada ano e investimentos estarem sendo aplicados para fornecer produtos de altíssima qualidade.

Os inúmeros estudos voltados para a identificação dos constituintes principais do café e a compreensão das melanoidinas têm gerado resultados de impactos positivos à saúde humana. Pode-se destacar os efeitos neuroprotetores e a prevenção de morte celular por estresse oxidativo dos ácidos cafeoilquínicos, melanoidinas e da bebida do café (tanto dos grãos verdes como torrados).

A aplicação das técnicas analíticas juntamente com os métodos quimiométricos tem se mostrado indispensáveis na descoberta de descritores, tanto com relação a qualidade quanto a

origem do produto. Quanto aos descritores de origem, estes são capazes de discriminar cafés tanto de procedências muito distintas quanto de procedências relativamente próximas. Além disso, a espectroscopia de RMN tem se mostrado muito eficiente nas mais diversas análises que tiveram o café como objeto de pesquisa, por isso essa técnica é atualmente considerada uma das mais eficazes para a compreensão de misturas complexas.

Tabela 2-7. Trabalhos publicados que abordam a investigação química do café

Técnicas utilizadas	Composição química relatada/identificada no café	Métodos estatísticos	Descrição	Referência
RMN de ¹ H NOESY 1D COSY TOCSY	trigonelina ácido láctico ácido cítrico ácido quínico ácido acético ácido fórmico ácido cafeico ácido felúrico ácidos clorogênicos cafeína ésteres de β-sitosterol cátion <i>N</i> -metilpiridínio	--	O trabalho descreveu o estudo de propriedades organolépticas de três variedades de café em dois sistemas de extração, aquoso e em clorofórmio	BOSCO et al., 1999
Fracionamento sensorial guiado por LC-MS/MS RMN 1D e 2D RP-HPLC	4- <i>O</i> -cafeoil-muco-γ-quinida 5- <i>O</i> -cafeoil-muco-γ-quinida 3- <i>O</i> -cafeoil-γ-quinida 5- <i>O</i> -cafeoil-epi-δ-quinida 4- <i>O</i> -cafeoil-γ-quinida 5- <i>O</i> -feruloil-muco-γ-quinida 4- <i>O</i> -feruloil-muco-γ-quinida 5- <i>O</i> -feruloil-epi-δ-quinida 4- <i>O</i> -feruloil-γ-quinida 3,4- <i>O</i> -dicafeoil-quinida 3,5- <i>O</i> -dicafeoil-quinida 4,5- <i>O</i> -dicafeoil-quinida 3,5- <i>O</i> -dicafeoil-epi-δ-quinida 4,5- <i>O</i> -dicafeoil-muco-quinida 3,4- <i>O</i> -dicafeoil-γ-quinida 5- <i>O</i> -cafeoil-epi-δ-quinida 3,5- <i>O</i> -di-cafeoil-epi-δ-quinida	--	Uma bebida de café torrado foi selecionada para investigar seus principais compostos de sabor	FRANK ZEHEENTBAUER HOFMANN, 2006
Cromatografia em Colunas Sephadex	arabinose galactose	--	Os autores caracterizaram frações de melanoidinas afim de fornecer	GNIECHWITZ et al., 2008

LH-20 e Octilsefaroze; GC-FID; HPLC com detecção de fluorescência; RMN 2D (HSQC)	ácido glutâmico glicina fragmentos das melanoidinas (fenólicos condensados, anéis aromáticos, olefinas)		informações adicionais sobre a natureza dos elementos estruturais ainda não identificados dos seus complexos	
RMN HR-MAS de ¹ H e 2D	ácidos clorogênicos acrilamida açúcares aminoácidos cafeína melanoidinas cátion <i>N</i> -metilpiridínio pirazinas trigonelina	--	A abordagem de RMN HR-MAS foi usada para avaliar a evolução da concentração de moléculas significativas durante o processo de torrefação, especialmente referente ao seu papel na reação de Maillard, em cafés arábica e robusta	CIAMPA et al., 2010
RMN de ¹ H RMN de ¹³ C DQF-COSY HSQC HMBC	3-ACQ 4-ACQ 5-ACQ ácido acético ácido cítrico ácido L-glutâmico ácido málico ácido quínico cafeína colina AGAB L-alanina L-asparagina mio-inositol sacarose trigonelina	--	Os autores relataram pela primeira vez a identificação e quantificação de compostos orgânicos em extrato de grãos de café verde sem qualquer separação, com auxílio da RMN uni e bidimensional	WEI et al., 2010
RP-HPLC/DAD LC-MS/MS RMN 1D e 2D	2-(bis-(2,3,4-trihidroxifenil)metil)-5-(2,3,4-trihidroxibenzil)-furano 2-(bis-(2,4-dihidroxifenil)metil)-5-(2,4-dihidroxibenzil)-furano	--	Os autores trataram termicamente misturas binárias de di/tri-hidroxibenzenos e derivados reativos de furano identificados no café, sendo eles	KREPPENHOFER FRANK HOFMANN, 2011

	<p>3-((2-furilmetil)-sufanil)-benzeno-1,2,4-triol 3-(furan-2-ilmetil)-6-metilbenzeno-1,2-diol 3-metilbenzeno-1,2-diol (3-metilcatecol) 4-(furan-2-ilmetil)-5-metilbenzeno-1,2-diol 4-(furan-2-ilmetil)benzeno-1,2,3-triol 4-(furan-2-ilmetil)benzeno-1,2-diol 3-((2-furilmetil)sufanil)benzeno-1,2-diol 4-(furan-2-ilmetil)benzeno-1,3-diol 4,4'-(furan-2-ilmetanodiil)dibenzeno-1,3-diol 4,4'-(furan-2-ilmethanediil)dibenzeno-1,2,3-triol 4-metilbenzeno-1,2-diol (4-metilcatecol) 5-(furan-2-ilmetil)-benzeno-1,2,4-triol pirogalol hidroxi-hidroquinona catecol resorcinol</p>		furfurilálcool, o furan-2-aldeído e o 5-HMF	
<p>RMN de ¹H RMN de ¹³C DQF-COSY HSQC CT-HMBC</p>	<p>3-ACQ 4-ACQ 5-ACQ ácido acético ácido L-glutâmico cafeína citrato colina AGAB L-alanina L-asparagina malato sacarose trigonelina</p>	<p>PCA OPLS-DA</p>	<p>O estudo objetivou aplicar a RMN de ¹³C com informações detalhadas de atribuição, juntamente com modelos PCA e OPLS-DA, para distinguir as espécies e origens de grãos de café verde e identificar metabólitos significativamente diferentes entre espécies e procedência geográfica</p>	WEI et al., 2012
<p>RMN de ¹H</p>	<p>2-furilmetanol ácido acético ácidos clorogênicos ácido quínico cafeína</p>	<p>OPLS</p>	<p>Os autores avaliaram o teor e a composição de cafés arábica torrados e moídos e teor destes em misturas com robusta</p>	CAGLIANI et al., 2013

	formiato cátion <i>N</i> -metilpiridínio trigonelina			
GC-Q/MS	4-ACQ 5-ACQ ácido cafeico ácido cítrico ácido glucurônico ácido glutarínico ácido L-aspártico ácido L-glutâmico ácido maleico ácido mucico ácido nicotínico ácido oxálico ácido quínico ácido trionônico benzotiazol cafeína D-glicose D-sorbitol frutose galactinol L-asparagina L-lisina L-prolina serina mio-inositol putrescina serotonina trans-aconitato trigonelina	PCA PLS-DA	O trabalho demonstrou o potencial do uso de perfis de metabólitos de sementes de café com auxílio da análise multivariada e identificou amostras de café de acordo com suas origens botânicas e geográficas no Brasil	TAVEIRA et al., 2014
RMN ¹ H	2-furilmetanol 5-HMF ácido acético	PCA OPLS	Os autores desenvolveram um método para prever os sabores de quatro tipos de grãos de café torrado usando	WEI et al., 2014

	3-ACQ		metabolômica baseada em RMN
	4-ACQ		
	5-ACQ		
	ácido nicotínico		
	ácido quínico		
	ácido <i>cis</i> -quínico		
	cafeína		
	citrato		
	colina		
	formiato		
	lactato		
	lípidos		
	malato		
	mio-inositol		
	cátion <i>N</i> -metilpiridínio		
	trigonelina		
	α -(1-3)-L-arabinofuranose		
	α -(1-5)-L-arabinofuranose		
	β -(1-3)-D-galactopiranosose		
	β -(1-4)-D-manopiranosose		
	β -(1-6)-D-galactopiranosose		
	γ -butirolactona		
	γ -quinida		

RP-HPLC	1-AFQ			
HPLC	1-feruloilquinida			
UV-Vis	3,4-diACQ			
GC-EI/MS	3,5-diACQ			
	3-AcoQ			
	3-ACQ	ANOVA	Os autores avaliaram as diferentes formas de compostos fenólicos presentes nas melanoidinas, para observar a sua abundância nesta classe de substância. Eles estudaram também a influência dos níveis de ácido clorogênico do café verde com relação à quantidade de compostos fenólicos incorporados nas melanoidinas ¹⁴³	COELHO et al., 2014
	3-ACQ			
	3-AFQ			
	3-feruloilquinida			
	4-AcoQ			
	4-ACQ			
	4-cafeoilquinida			

	4-AFQ 4-feruloilquinida 5-AcoQ 5-ACQ 5-AFQ arabinose cafeína frutose galactose dimetilamino-desoxi-aldoexose proteína sacarose		
RMN de ¹ H RMN de ¹³ C TOCSY HMQC HMBC NOESY	éster do 16-O-metilcafestol éster do cafestol éster do kahweol	--	O trabalho relatou um método analítico baseado na espectroscopia de RMN que pode ser usado como uma alternativa as normas do padrão alemão <i>Do Institut für Normung</i> (DIN) e que pode garantir a autenticidade de cafés 100% arábica, detectando possíveis fraudes comerciais de uma maneira rápida e confiável SCHIEVANO et al., 2014
RMN de ¹ H NOESY CPMG HMBC HSQC TOCSY STOCSY	ácido acético ácido clorogênico ácido quiníco ácidos graxos alanina asparagina cafeína citrato colina fosfocolina AGAB malato sacarose trigonelina	PCA OPLS-DA	Os autores relataram a caracterização metabólica de grãos de café verde de alta qualidade ou especialidade de <i>C. arabica</i> de diferentes áreas de produção. Eles também identificaram e quantificaram os metabólitos, utilizando dados de RMN de ¹ H aliada à análise estatística multivariada KWON et al., 2015
RMN de ¹ H	ácidos clorogênicos	PCA	O trabalho descreveu pela primeira vez a DE MOURA RIBEIRO et

	<p>ácido fórmico ácidos graxos aminoácidos cafeína lipídios cátion <i>N</i>-metilpiridínio trigonelina</p>		<p>utilização da RMN de ¹H para identificação e quantificação dos principais adulterantes em cafés torrados e moídos</p>	<p>al., 2017</p>
RMN de ¹ H	16- <i>O</i> -metilcafestol	--	<p>O estudo distinguiu misturas de cafés arábica e robusta pela espectroscopia de RMN de baixo campo e caracterizou quantitativamente as misturas</p>	<p>DEFERNEZ et al., 2017</p>
RMN ¹ H IV-Médio IV-Próximo	<p>ácidos clorogênicos ácidos alifáticos aldeídos cafeína cetonas compostos aromáticos ésteres vinílicos lactonas lipídios</p>	<p>PCA PLS OPLS-DA</p>	<p>Os autores avaliaram o desempenho das espectroscopias de RMN de ¹H, de infravermelho próximo e de infravermelho médio aplicadas à detecção de fraudes em café colombiano</p>	<p>MEDINA et al., 2017</p>
RMN de ¹ H RMN de ¹³ C TOCSY	<p>ácido acético alanina cafeína ACGs citrato colina formiato lactato malato melanoidinas sacarose trigonelina</p>	--	<p>Os autores analisaram cafés verdes e torrados de seis variedades com diferentes origens geográficas. Eles também avaliaram as interações dos principais componente polifenólico, ácido 5-<i>O</i>-cafeoilquínico (5-ACQ), com oligômeros Aβ1-42 e testaram a eficácia de extratos de café verde e torrado, 5-ACQ e melanoidinas em neutralizar a citotoxicidade induzida por agentes pró-oxidantes (peróxido de hidrogênio e rotenona)</p>	<p>CIARAMELLI et al., 2018</p>
RMN de ¹ H	<p>ácido acético ácido fórmico ácido láctico</p>	PCA	<p>O trabalho desenvolveu uma impressão digital para cafés torrados brasileiros, de acordo com procedências regionais,</p>	<p>TOCI et al., 2018</p>

	ácido quínico cafeína ACQs cátion <i>N</i> -metilpiridínio trigonelina		utilizando a técnica de RMN de ¹ H, aliada à estatística multivariada	
UV-vis FT-IR RMN de ¹ H RMN de ¹³ C HSQC HPLC	ácido acético ácido fórmico ácido levulínico furfural 5-HMF lignina p-hidroxibenzaldeído siringaldeído vanilina	ANOVA	Os autores caracterizaram a lignina obtida a partir de casca de café, oferecendo recurso significativo para o seu uso como matéria-prima para biorrefinarias	DE CARVALHO OLIVEIRA et al., 2018

ACQ - ácido cafeoilquínico; *AFQ* – ácido feruloilquínico; *ACoQ* - ácido *p*-coumaroilquínico; *ACG* - ácido clorogênico; *5-HMF* – 5-hidroximetilfurfural; *AGAB* - ácido gama-aminobutírico.

REFERÊNCIAS

1. Illy, A.; Viani, R.; *Espresso Coffee: The Science of Quality*, 2 ed., San Diego: California, 2005.
2. <http://www.ico.org/documents/icc-102-10p-rules-statistical-reports-final.pdf>, acessada em fevereiro de 2019.
3. <http://www.muslimheritage.com/uploads/Main - Coffee.pdf>, acessada em outubro de 2018.
4. Martins, A. L.; *História do Café*, São Paulo: São Paulo, 2012.
5. <http://www.ico.org/prices/po-production.pdf>, acessada em fevereiro de 2019.
6. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafes/boletim-da-safra-de-caffe>, acessada em fevereiro de 2019.
7. Frederico, S.; *GEOUSP Espaço e Tempo* **2017**, 21, 73.
8. <http://abic.com.br/eventos/concurso-qualidade-do-caffe/14concursoabic/>, acessada em dezembro de 2018.
9. <https://allianceforcoffeeexcellence.org/brazil-pulped-naturals-2018/>, acessada em fevereiro de 2019.
10. http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/informe_estatistico/CECAFE_Relatorio_Mensal_Dezembro_2018.pdf, acessada em março de 2019.
11. <https://usda.library.cornell.edu/concern/publications/m900nt40f?locale=en>, acessada em fevereiro de 2019.
12. <http://abic.com.br/consumo-de-caffe-cresceu-quase-5-no-pais-no-ano-passado-diz-abic/>, acessada em fevereiro de 2019.
13. Ribeiro, J. S.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2009.
14. SALVA, T. de J. G.; GUERREIRO FILHO, O.; FAZUOLI, L. C.; *Cafés de qualidade: aspectos tecnológicos, científicos e comerciais*, 1 ed., Porto Velho: Rondônia, 2007.
15. <http://abic.com.br/recomendacoes-tecnicas/recomendacoes-tecnicas-da-abic/categorias-de-qualidade-do-caffe/>, acessada em fevereiro de 2018.
16. http://abic.com.br/src/uploads/2017/07/CONS_leg_instnormativa08-03.pdf, acessada em março de 2019.
17. Lee, K.-A.; Chae, J.-I.; Shim, J.-H.; *J. Biomed. Sci.* **2012**, 19, 60.
18. Cano-Marquina, A.; Tarín, J. J.; Cano, A.; *Maturitas* **2013**, 75, 7.
19. Souza, R. M. N. de; Canuto, G. A. B.; Dias, R. C. E.; Benassi, M. de T.; *Quim. Nova* **2010**, 33, 885.
20. Marcucci, C. T.; Benassi, M. de T.; Almeida, M. B.; Nixdorf, S. L.; *Quim. Nova* **2013**, 36, 544.
21. Kwon, D.-J.; Jeong, H.-J.; Moon, H.; Kim, H.-N.; Cho, J.-H.; Lee, J.-E.; Hong, K. S.; Hong, Y.-S.; *Food Res. Int.* **2015**, 67, 175.
22. Arana, V. A.; Medina, J.; Alarcon, R.; Moreno, E.; Heintz, L.; Schäfer, H.; Wist, J.; *Food Chem.* **2015**, 175, 500.
23. Toci, A. T.; de Moura Ribeiro, M. V.; de Toledo, P. R. A. B.; Boralle, N.; Pezza, H. R.; Pezza, L.; *Food Sci. Biotechnol.* **2018**, 27, 19.
24. Howell, L. L.; Coffin, V. L.; Spealman, R. D.; *Psychopharmacology* **1997**, 129, 1.
25. Del Campo, G.; Berregi, I.; Caracena, R.; Zuriarrain, J.; *Talanta* **2010**, 81, 367.
26. Perrone, D.; Donangelo, C. M.; Farah, A.; *Food Chem.* **2008**, 110, 1030.
27. Ky, C.-L.; Louarn, J.; Dussert, S.; Guyot, B.; Hamon, S.; Noirot, M.; *Food Chem.* **2001**, 75, 223.
28. Casal, S.; Alves, M. R.; Mendes, E.; Oliveira, M. B. P. P.; Ferreira, M. A.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 6495.
29. Ames, J. M.; *Food Chem.* **1998**, 62, 431.
30. Gniechwitz, D.; Reichardt, N.; Ralph, J.; Blaut, M.; Steinhart, H.; Bunzel, M.; *J. Sci. Food Agric.* **2008**, 88, 2153.
31. Saath, R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual Paulista, Brasil, 2010.
32. Nogueira, M.; Trugo, L. C.; *Cienc. Tecnol. Aliment.* **2003**, 23, 296.
33. Frank, O.; Zehentbauer, G.; Hofmann, T.; *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, 222, 492.
34. Zehentbauer, G.; Bunke, P.; Ekanayake, A.; Young, J.; Frank, O.; Hofmann, T.; Blumberg, S.; *US20070003678A1* **2007**.
35. Ochiai, N.; Tsunokawa, J.; Sasamoto, K.; Hoffmann, A.; *J. Chromatogr. A* **2014**, 1371, 65.

36. Murkovic, M.; Pichler, N.; *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 842.
37. Da Silva Taveira, J. H.; Borém, F. M.; Figueiredo, L. P.; Reis, N.; Franca, A. S.; Harding, S. A.; Tsai, C.-J.; *Food Res. Int.* **2014**, *61*, 75.
38. Correia, R. M.; Loureiro, L. B.; Rodrigues, R. R. T.; Costa, H. B.; Oliveira, B. G.; Filgueiras, P. R.; Thompson, C. J.; Lacerda, V.; Romão, W.; *Anal. Methods* **2016**, *8*, 7678.
39. Garrett, R.; Schmidt, E. M.; Pereira, L. F. P.; Kitzberger, C. S. G.; Scholz, M. B. S.; Eberlin, M. N.; Rezende, C. M.; *LWT - Food Sci. Technol.* **2013**, *50*, 496.
40. Chu, Y.-F.; Brown, P. H.; Lyle, B. J.; Chen, Y.; Black, R. M.; Williams, C. E.; Lin, Y.-C.; Hsu, C.-W.; Cheng, I. H.; *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 9801.
41. Alves, R. C.; Casal, S.; Oliveira, B.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 2169.
42. Nuhu, A. A.; *ISRN Nutr.* **2014**, *2014*, 13.
43. Prediger, R. D. S.; *J. Alzheimer's Dis.* **2010**, *20*, S205.
44. Arendash, G. W.; Cao, C.; *J. Alzheimer's Dis.* **2010**, *20*, S117.
45. Tai, J.; Cheung, S.; Chan, E.; Hasman, D.; *Nutr. Cancer* **2010**, *62*, 1044.
46. Santos, M. H. dos; Batista, B. L.; Duarte, S. M. da S.; Abreu, C. M. P. de; Gouvêa, C. M. C. P.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 604.
47. Lima, A. R.; Pereira, R. G. F. A.; Abrahão, S. A.; Duarte, S. M. da S.; Paula, F. B. de A.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 20.
48. Kwon, S.-H.; Lee, H.-K.; Kim, J.-A.; Hong, S.-I.; Kim, H.-C.; Jo, T.-H.; Park, Y.-I.; Lee, C.-K.; Kim, Y.-B.; Lee, S.-Y.; Jang, C.-G.; *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, *649*, 210.
49. Chu, Y.-F.; Chang, W.-H.; Black, R. M.; Liu, J.-R.; Sompol, P.; Chen, Y.; Wei, H.; Zhao, Q.; Cheng, I. H.; *Food Chem.* **2012**, *135*, 2095.
50. Clifford, M.; *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1138.
51. Schnermann, M. J.; Beaudry, C. M.; Genung, N. E.; Canham, S. M.; Untiedt, N. L.; Karanikolas, B. D. W.; Sütterlin, C.; Overman, L. E.; *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17494.
52. Ma, C.-M.; Kawahata, T.; Hattori, M.; Otake, T.; Wang, L.; Daneshmand, M.; *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 863.
53. Fan, T. W.-M.; Lane, A. N.; *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2008**, *52*, 69.
54. Boettler, U.; Sommerfeld, K.; Volz, N.; Pahlke, G.; Teller, N.; Somoza, V.; Lang, R.; Hofmann, T.; Marko, D.; *J. Nutr. Biochem.* **2011**, *22*, 426.
55. Johnson, S.; Koh, W.-P.; Wang, R.; Govindarajan, S.; Yu, M. C.; Yuan, J.-M.; *Cancer Causes Control* **2011**, *22*, 503.
56. Cai, L.; Ma, D.; Zhang, Y.; Liu, Z.; Wang, P.; *Eur. J. Clin. Nutr.* **2012**, *66*, 872.
57. Kempf, K.; Herder, C.; Erlund, I.; Kolb, H.; Martin, S.; Carstensen, M.; Koenig, W.; Sundvall, J.; Bidel, S.; Kuha, S.; Jaakko, T.; *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *91*, 950.
58. Umemura, T.; Ueda, K.; Nishioka, K.; Hidaka, T.; Takemoto, H.; Nakamura, S.; Jitsuiki, D.; Soga, J.; Goto, C.; Chayama, K.; Yoshizumi, M.; Higashi, Y.; *Am. J. Cardiol.* **2006**, *98*, 1538.
59. Huxley, R.; *Arch. Intern. Med.* **2009**, *169*, 2053.
60. Masterton, G. S.; Hayes, P. C.; *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2010**, *22*, 1277.
61. Lai, G. Y.; Weinstein, S. J.; Albanes, D.; Taylor, P. R.; McGlynn, K. A.; Virtamo, J.; Sinha, R.; Freedman, N. D.; *Br. J. Cancer* **2013**, *109*, 1344.
62. Lang, R.; Dieminger, N.; Beusch, A.; Lee, Y. M.; Dunkel, A.; Suess, B.; Skurk, T.; Wahl, A.; Hauner, H.; Hofmann, T.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 8487.
63. Mayer, F.; Czerny, M.; Grosch, W.; *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, *211*, 272.
64. Wieser, H.; Belitz, H.-D.; *Z. Lebensm. -Unters. Forsch.* **1976**, *160*, 383.
65. Czepa, A.; Hofmann, T.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3865.
66. Weldegebreal, B.; Redi-Abshiro, M.; Chandravanshi, B. S.; *Chem. Cent. J.* **2017**, *11*, 126.
67. Jeszka-Skowron, M.; Zgoła-Grześkowiak, A.; Grześkowiak, T.; *Eur. Food Res. Technol.* **2015**, *240*, 19.
68. Uryupin, A. B.; Peregudov, A. S.; *J. Anal. Chem.* **2013**, *68*, 1021.
69. Barbin, D. F.; Felicio, A. L. de S. M.; Sun, D.-W.; Nixdorf, S. L.; Hirooka, E. Y.; *Food Res. Int.* **2014**, *61*, 23.
70. Quintero, G. I. P.; *Composición química de una taza de café*, Manizales: Colômbia, 2011.
71. Flament, I.; *Coffee Flavor Chemistry*, 1 ed., Nova Jersey: USA, 2001.
72. Clarke, R. J.; Vitzthum, O. G.; *Coffee : recent developments*, Malden: Massachusetts, 2001.

73. Ribeiro, J. S.; Ferreira, M. M. C.; Salva, T. J. G.; *Talanta* **2011**, *83*, 1352.
74. Bertrand, B.; Boulanger, R.; Dussert, S.; Ribeyre, F.; Berthiot, L.; Descroix, F.; Joët, T.; *Food Chem.* **2012**, *135*, 2575.
75. Silva, S. D. A.; Lima, J. S. de S.; *Rev. Ceres* **2012**, *59*, 271.
76. Santi, A. L.; Amado, T. J. C.; Cherubin, M. R.; Martin, T. N.; Pires, J. L.; Flora, L. P. Della; Basso, C. J.; *Pesqui. Agropecu. Bras.* **2012**, *47*, 1346.
77. Guatemala-Morales, G. M.; Beltrán-Medina, E. A.; Murillo-Tovar, M. A.; Ruiz-Palomino, P.; Corona-González, R. I.; Arriola-Guevara, E.; *Food Chem.* **2016**, *197*, 747.
78. Hertz-Schünemann, R.; Streibel, T.; Ehlert, S.; Zimmermann, R.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 7083.
79. Jumhawan, U.; Putri, S. P.; Yusianto; Marwani, E.; Bamba, T.; Fukusaki, E.; *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 7994.
80. Lee, C.; Lee, Y.; Lee, J.-G.; Buglass, A. J.; *J. Chromatogr. A* **2013**, *1295*, 24.
81. Bandeira, R. D. C. C.; Toci, A. T.; Trugo, L. C.; Farah, A.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 309.
82. Pizarro, C.; Esteban-Díez, I.; González-Sáiz, J. M.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, *585*, 266.
83. Liu, H.-C.; You, C.-F.; Chen, C.-Y.; Liu, Y.-C.; Chung, M.-T.; *Food Chem.* **2014**, *142*, 439.
84. Regazzoni, L.; Saligari, F.; Marinello, C.; Rossoni, G.; Aldini, G.; Carini, M.; Orioli, M.; *J. Funct. Foods* **2016**, *20*, 472.
85. Noia, L. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil, 2017.
86. Combes, M.-C.; Joët, T.; Lashermes, P.; *Food Control* **2018**, *88*, 198.
87. Correia, R. M.; Tosato, F.; Domingos, E.; Rodrigues, R. R. T.; Aquino, L. F. M.; Filgueiras, P. R.; Lacerda, V.; Romão, W.; *Talanta* **2018**, *176*, 59.
88. Cagliani, L. R.; Pellegrino, G.; Giugno, G.; Consonni, R.; *Talanta* **2013**, *106*, 169.
89. Mateus, M.-L.; Champion, D.; Liardon, R.; Voilley, A.; *J. Food Eng.* **2007**, *81*, 572.
90. Williamson, K.; Hatzakis, E.; *Food Res. Int.* **2018**, *119*, 683.
91. Atabani, A. E.; Shobana, S.; Mohammed, M. N.; Uğuz, G.; Kumar, G.; Arvindnarayan, S.; Aslam, M.; Al-Muhtaseb, A. H.; *Fuel* **2019**, *244*, 419.
92. Schripsema, J.; Vianna, M.; Lemos, M.; Dagnino, D.; *Planta Med.* **2011**, *21*, 14.
93. Matulová, M.; Capek, P.; Kaneko, S.; Navarini, L.; Liverani, F. S.; *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 1029.
94. D'Amelio, N.; De Angelis, E.; Navarini, L.; Schievano, E.; Mammi, S.; *Talanta* **2013**, *110*, 118.
95. Heinzmann, S. S.; Holmes, E.; Kochhar, S.; Nicholson, J. K.; Schmitt-Kopplin, P.; *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 8615.
96. Tavares, L. A.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2007.
97. Tavares, L. A.; Ferreira, A. G.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 911.
98. Boffo, E. F.; Tavares, L. A.; Tobias, A. C. T.; Ferreira, M. M. C.; Ferreira, A. G.; *LWT - Food Sci. Technol.* **2012**, *49*, 55.
99. Boffo, E. F.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2009.
100. Smith, W. B.; *J. Chem. Educ.* **1964**, *41*, 97.
101. Selvaratnam, R.; Chowdhury, S.; VanSchouwen, B.; Melacini, G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 6133.
102. Wei, F.; Furihata, K.; Hu, F.; Miyakawa, T.; Tanokura, M.; *Magn. Reson. Chem.* **2010**, *48*, 857.
103. Zhang, Z.; Huang, Y.; Smith, P. E. S.; Wang, K.; Cai, S.; Chen, Z.; *J. Magn. Reson.* **2014**, *242*, 49.
104. Santos, P. M.; Pereira-Filho, E. R.; Colnago, L. A.; *Microchem. J.* **2016**, *124*, 15.
105. Defernez, M.; Wren, E.; Watson, A. D.; Gunning, Y.; Colquhoun, I. J.; Le Gall, G.; Williamson, D.; Kemsley, E. K.; *Food Chem.* **2017**, *216*, 106.
106. Pereira, F. M. V.; Bertelli Pflanzler, S.; Gomig, T.; Lugnani Gomes, C.; de Felício, P. E.; Alberto Colnago, L.; *Talanta* **2013**, *108*, 88.
107. Hassanieh, H.; Mayzel, M.; Shi, L.; Katabi, D.; Orekhov, V. Y.; *J. Biomol. NMR* **2015**, *63*, 9.
108. Liu, Y.; Prestegard, J. H.; *J. Magn. Reson.* **2011**, *212*, 289.
109. Evangelidis, T.; Nerli, S.; Nováček, J.; Brereton, A. E.; Karplus, P. A.; Dotas, R. R.; Venditti, V.; Sgourakis, N. G.; Tripsianes, K.; *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 384.
110. Demers, J.-P.; Fricke, P.; Shi, C.; Chevelkov, V.; Lange, A.; *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2018**, *109*, 51.

111. Medina, J.; Caro Rodríguez, D.; Arana, V. A.; Bernal, A.; Esseiva, P.; Wist, J.; *Int. J. Anal. Chem.* **2017**, *2017*, 1.
112. Arana, V. A.; Medina, J.; Esseiva, P.; Pazos, D.; Wist, J.; *J. Anal. Methods Chem.* **2016**, *2016*, 11.
113. Charlton, A. J.; Farrington, W. H. H.; Brereton, P.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3098.
114. Santos, A. D. C.; Fonseca, F. A.; Lião, L. M.; Alcantara, G. B.; Barison, A.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2015**, *73*, 10.
115. CIAMPA, A.; RENZI, G.; TAGLIANTI, A.; SEQUI, P.; VALENTINI, M.; *J. Food Qual.* **2010**, *33*, 199.
116. Farmer, E. H.; Bennett, G. M.; Baker, J. W.; Plant, S. G. P.; *Annu. Rep. Prog. Chem.* **1931**, *28*, 66.
117. Hodge, J. E.; Rist, C. E.; *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 316.
118. Molero-Vilchez, M. D.; Wedzicha, B. L.; *Food Chem.* **1997**, *58*, 249.
119. Kreppenhof, S.; Frank, O.; Hofmann, T.; *Food Chem.* **2011**, *126*, 441.
120. Wei, F.; Furihata, K.; Koda, M.; Hu, F.; Kato, R.; Miyakawa, T.; Tanokura, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 10118.
121. Wei, F.; Furihata, K.; Miyakawa, T.; Tanokura, M.; *Food Chem.* **2014**, *152*, 363.
122. Ciaramelli, C.; Palmioli, A.; De Luigi, A.; Colombo, L.; Sala, G.; Riva, C.; Zoia, C. P.; Salmona, M.; Airoidi, C.; *Food Chem.* **2018**, *252*, 171.
123. De Carvalho Oliveira, F.; Srinivas, K.; Helms, G. L.; Isern, N. G.; Cort, J. R.; Gonçalves, A. R.; Ahring, B. K.; *Bioresour. Technol.* **2018**, *257*, 172.
124. Ferreira, M. M. C.; *Quimiometria - conceitos, métodos e aplicações*, São Paulo: São Paulo, 2015.
125. Pereira, F. M. V.; Hashimoto, J. C.; Pallone, J. A. L.; Colnago, L. A.; *Food Analytical Methods* **2015**, *8*, 122.
126. Boroujerdi, A. F. B.; Lee, P. A.; DiTullio, G. R.; Janech, M. G.; Vied, S. B.; Bearden, D. W.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *404*, 777.
127. Munshi, S. U.; Rewari, B. B.; Bhavesh, N. S.; Jameel, S.; *PLoS One* **2013**, *8*, 1.
128. Hu, B.; Yue, Y.; Zhu, Y.; Wen, W.; Zhang, F.; Hardie, J. W.; *PLoS One* **2015**, *10*, 1.
129. Um, J. A.; Choi, Y.-G.; Lee, D.-K.; Lee, Y. S.; Lim, C. J.; Youn, Y. A.; Lee, H. D.; Cho, H. J.; Park, J. H.; Seo, Y. B.; Kuo, H.; Lim, J.; Yang, T.-J.; Kwon, S. W.; Lee, J.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 7523.
130. Mejia-Miranda, C.; Laverde, D.; Molina V., D.; *Energy Fuels* **2015**, *29*, 7595.
131. Zheng, X.; Zhao, Y.; Wu, H.; Dong, J.; Feng, J.; *Food Analytical Methods* **2016**, *9*, 1470.
132. Farag, M. A.; Mahrous, E. A.; Lübken, T.; Porzel, A.; Wessjohann, L.; *Metabolomics* **2014**, *10*, 21.
133. Alonso-Salces, R. M.; Serra, F.; Reniero, F.; Héberger, K.; *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4224.
134. El-Abassy, R. M.; Donfack, P.; Materny, A.; *Food Chem.* **2011**, *126*, 1443.
135. Dias, R. C. E.; Valderrama, P.; Março, P. H.; dos Santos Scholz, M. B.; Edelman, M.; Yeretzyan, C.; *Food Chem.* **2018**, *255*, 132.
136. Consonni, R.; Cagliani, L. R.; Cogliati, C.; *Talanta* **2012**, *88*, 420.
137. Monakhova, Y. B.; Ruge, W.; Kuballa, T.; Ilse, M.; Winkelmann, O.; Diehl, B.; Thomas, F.; Lachenmeier, D. W.; *Food Chem.* **2015**, *182*, 178.
138. Craig, A. P.; Franca, A. S.; Oliveira, L. S.; *Food Chem.* **2012**, *132*, 1368.
139. Caporaso, N.; Whitworth, M. B.; Grebby, S.; Fisk, I. D.; *J. Food Eng.* **2018**, *227*, 18.
140. Bosco, M.; Toffanin, R.; Palo, D. de; Zatti, L.; Segre, A.; *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 869.
136. Schievano, E.; Finotello, C.; De Angelis, E.; Mammi, S.; Navarini, L.; *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 12309.
141. De Moura Ribeiro, M. V.; Boralle, N.; Redigolo Pezza, H.; Pezza, L.; Toci, A. T.; *J. Food Compos. Anal.* **2017**, *57*, 24.
142. Villalón-López, N.; Serrano-Contreras, J. I.; Téllez-Medina, D. I.; Gerardo Zepeda, L. An ¹H NMR-based metabolomic approach to compare the chemical profiling of retail samples of ground roasted and instant coffees. *Food Res. Int.* **2018**, *106*, 263.
143. Coelho, C.; Ribeiro, M.; Cruz, A. C. S.; Domingues, M. R. M.; Coimbra, M. A.; Bunzel, M.; Nunes, F. M.; *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 7843.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi analisar a composição química de cafés produzidos na região da Chapada Diamantina/BA e fazer a sua correlação com os demais cafés comerciais, utilizando-se as técnicas de RMN e quimiometria como ferramentas analíticas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Identificar os compostos presentes no café por RMN;
- Discriminar o café da região da Chapada Diamantina/Bahia dos demais cafés comerciais aplicando os métodos quimiométricos aos espectros de RMN de ^1H ;
- Identificar os compostos responsáveis por esta discriminação.

4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras foram obtidas no período compreendido entre junho de 2017 a novembro de 2018. As diferentes marcas de café foram adquiridas (de forma aleatória) no comércio de Salvador/BA durante 75% do período de execução do projeto. Além disto, o Instituto Baiano de Metrologia e Qualidade (Ibmetro), a Cooperativa de Produtores Orgânicos e Biodinâmicos da Chapada Diamantina (Cooperbio) e a Cooperativa de Cafés Especiais e Agropecuária de Piatã (Coopiatã) disponibilizaram amostras. As amostras de cafés provenientes da cidade de Bogotá, Colômbia, foram adquiridas comercialmente. Com isso, foi adquirido um total de 37 amostras de cafés comerciais torrados e moídos de três diferentes classes de qualidade, Tradicional, Superior e *Gourmet* descritas nas embalagens (Tabela 4-1).

Para o preparo das amostras foram pesadas 10,000 g de cada café torrado. O preparo da bebida foi realizado em uma cafeteira para café expresso (modelo *PrimaLatte* da *Oster*), com pressão constante (15 bar). Foi usado o padrão da cafeteira de uma xícara (35,0 mL) para a extração do conteúdo de café solúvel em água destilada. Após esse preparo, uma alíquota de 600 µL foi transferida para um tubo de RMN de 500 MHz, e para manter o campo magnético uniforme e estável foram adicionados 50 µL de água deuterada com o padrão interno para referência de deslocamento químico TMS⁺-d₄ (2,2,3,3-d₄-3-trimetilsililpropionato de sódio).

Tabela 4-1 - Descrição das amostras de cafés analisadas

Estado/região	Espécie	Marca ^a	Classe de qualidade ^b
Bogotá, Colômbia	Arábica	A	<i>Gourmet</i>
Bogotá, Colômbia	Arábica	A	<i>Gourmet</i>
Bogotá, Colômbia	Arábica	A	<i>Gourmet</i>
Bogotá, Colômbia	Arábica	A	<i>Gourmet</i>
Sudeste (Cerrado, Minas Gerais)	Arábica	B	Superior
Sudeste (Sul, Minas Gerais)	Arábica	B	Superior
Sudeste (Mogiana, São Paulo)	Arábica	B	Superior
Sudeste (Mogiana, São Paulo)	Arábica	C	Superior
Sudeste (Sul, Minas Gerais)	Arábica	C	Superior
Sudeste	Robusta	D	Tradicional
Sudeste	Robusta	C	Tradicional
Nordeste	Robusta	E	Tradicional
Nordeste	Robusta	F	Tradicional
Nordeste	Robusta	B	Tradicional
Sudeste	Robusta	G	Tradicional
Nordeste	Robusta	H	Tradicional
Sudeste	Robusta	I	Tradicional
Nordeste	Robusta	J	Tradicional
Bahia	Arábica	K	Tradicional
Bahia	Robusta	L	Tradicional
Bahia	Robusta	M	Tradicional
Bahia	Robusta	N	Tradicional
Bahia	Arábica e Robusta	O	Tradicional
Bahia	Arábica	P	Artesanal
Bahia	Robusta	Q	Tradicional
Bahia	Robusta	R	Tradicional
Bahia	Arábica	S	Artesanal
Bahia	Arábica	T	Artesanal
Chapada Diamantina, Bahia	Arábica	U	Orgânico
Chapada Diamantina, Bahia	Arábica	V	<i>Gourmet</i>
Chapada Diamantina, Bahia	Arábica	X	<i>Gourmet</i>
Chapada Diamantina, Bahia	Arábica	X	<i>Gourmet</i>
Chapada Diamantina, Bahia	Arábica	X	Clássico
Chapada Diamantina, Bahia	Arábica	X	Orgânico
Chapada Diamantina, Bahia	Arábica	Y	<i>Gourmet</i>
Chapada Diamantina, Bahia	Arábica	Z	<i>Gourmet</i>
Chapada Diamantina, Bahia	Arábica	W	<i>Gourmet</i>

a: Letras diferentes indicam marcas/fabricantes diferentes; b: Informação obtida nos rótulos dos produtos.

4.2 ANÁLISES DE RMN

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , $g\text{COSY}$ e $g\text{HSQC}$ foram adquiridos no equipamento Varian Inova 500 de 11,7 Tesla (500 MHz para a frequência do hidrogênio e 125 MHz para a do carbono), equipado com sonda indireta de 5 mm, gradiente de campo no eixo z e a temperatura ajustada para 300 K. Na aquisição em triplicata dos espectros de ^1H a janela espectral (*Spectral Width* – SW) foi ajustada para o intervalo de -1 a 11 ppm, com 32768 pontos. Foram adquiridos 64 aquisições

(*Number of Scans* – NS) com pulso de 7,0 μ s (P1), tempo de aquisição de 5,5 s (*Acquisition* – AQ), tempo de espera entre cada aquisição de 2,0 s (D1) e fator de ganho do receptor de 34 (RG). Para supressão do sinal de água (em 4,90 ppm) foi usado a sequência de pulso *Presat* com atenuação da potência para supressão ajustada para 3 dB.

O experimento *g*COSY foi obtido usando os seguintes valores, 4096 pontos ao longo de TD(F2) (*Time Domain Data Size* - TD) e 128 experimentos ao longo de TD(F1), a janela espectral (SW) foi de 5997,9 Hz ao longo de F1 e F2, o tempo de aquisição (AQ) foi de 0,683 segundos e o tempo de espera entre as aquisições foi de 1,0 segundos. O número de aquisições (NS) foi de 64 e a atenuação do pulso de pré-saturação (*Power Level* – PL) foi 3 dB.

Na aquisição do experimento *g*HSQC os valores foram 4096 pontos ao longo de TD(F2) e 128 experimentos ao longo de TD(F1), a janela espectral (SW) foi de 5997,9 Hz ao longo de F2 e 21367,5 Hz ao longo de F1, o tempo de aquisição (AQ) foi de 0,683 segundos e o tempo de espera entre as aquisições foi de 1,0 segundos. O número de aquisições (NS) foi de 64 scans e a atenuação do pulso de pré-saturação (PL) foi 3 dB.

Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos para todas as amostras, com o objetivo de identificar os principais compostos presentes, e posterior discriminação com o uso dos métodos quimiométricos.

Os experimentos de RMN de ^{13}C e bidimensionais (*g*COSY e *g*HSQC) foram realizados nas amostras pertinentes e usados para identificação dos compostos presentes nos cafés.

Após aquisição dos espectros de RMN, os mesmos foram processados no *software ACD/Labs Release versão 12.01*. Para isso foi aplicada uma transformada de *Fourier* e uma multiplicação exponencial com fator de alargamento de linha (*Line Broadening* ou LB) de 0,3 Hz para ^1H e 3,0 Hz para ^{13}C afim de aumentar a relação sinal/ruído do espectro. Na sequência, foi realizado o ajuste manual da fase e a correção da linha de base, sendo o sinal do TMS-*d*4 referenciado para 0,00 ppm.

4.3 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA

Todos os espectros processados de RMN de ^1H foram convertidos para uma matriz que foi construída com auxílio do *software Origin* versão 8.0.

4.3.1 Alinhamento

Os sinais no espectro de RMN de ^1H foram alinhados com o algoritmo *icoshift* no *Software MatLab* versão *R2017a*. Para isso, foram avaliados três parâmetros de entrada, *xt* (vetor de destino), *xp* (matriz) e *inter* (modo de alinhamento). Para *xt* foi usada a média 2, definida como 3 vezes o valor da média para obter melhor alinhamento de sinais com baixa intensidade. Em *xp* foi adicionada a matriz de dados.

Para *inter* foi aplicado inicialmente o modo global “*whole*”, em seguida uma sequência de 25 intervalos cuidadosamente definidos para alcançar o melhor resultado de alinhamento.

4.3.2 Pré-tratamento

O tratamento quimiométrico foi realizado com auxílio do programa *Pirouette*® versão 4.5 (*InfoMetrix Inc., Bothell, Washington, USA*).

Os parâmetros e a seleção de variáveis foram otimizados a partir das análises exploratórias de dados dos espectros de RMN de ^1H , a fim de obter melhores resultados da técnica de PCA. Com relação aos parâmetros, foram usadas a normalização (norma um) e o autoescalamento, sendo excluídos os ruídos espectrais e regiões de solventes como a da água residual da supressão e do TMSP-d4.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

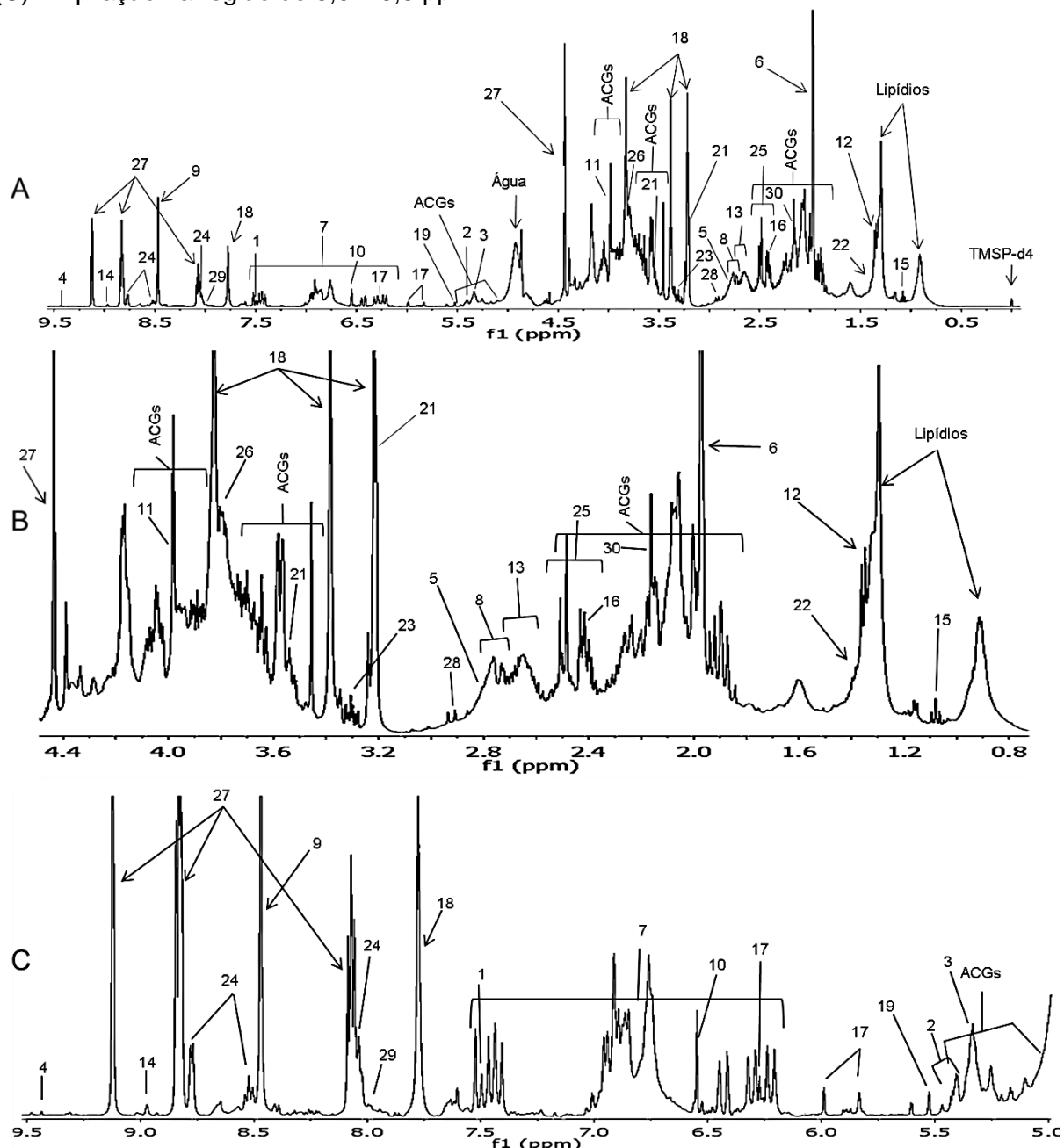
5.1 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS CAFÉS DA CHAPADA DIAMANTINA/BAHIA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A região da Chapada Diamantina faz parte do planalto baiano e possui condições climáticas favoráveis ao cultivo de frutos de cafés arábica¹ (elevadas altitudes de até 1 268 metros acima do nível do mar² e temperatura média anual de 20,5 °C³), que quando bem manejados são capazes de oferecer um produto com elevada qualidade no que diz respeito às suas propriedades organolépticas.⁴ Nesse contexto, é importante salientar que são inúmeras as variáveis capazes de influenciar os parâmetros da qualidade global desta bebida, desde as características do clima e microclima local, os métodos de cultivo, colheita, secagem, armazenamento,⁵ tempo⁶ e temperatura da torra,⁷ *blends*, etc.^{1,8}

No que se refere aos impactos à saúde humana do consumo desta bebida, constatam-se benefícios que vão além das referidas propriedades organolépticas.⁹ Tendo em vista este aspecto, uma observação importante está na forma de cultivo, tanto deste como de qualquer produto alimentício, pois se tratando de qualidades perceptíveis aos sentidos humanos os produtos podem apresentar-se como semelhantes, mas no ponto de vista do impacto à saúde podem ser bem distintos, devido principalmente aos constituintes químicos que os compõe.¹⁰ Dessa maneira, estudos capazes de investigar a composição química dos alimentos são importantes tanto para o aperfeiçoamento da sua produção, quanto para a compreensão de sua ação no organismo biológico.

Diante disto, o estudo espectroscópico dos cafés torrados provenientes da região da Chapada Diamantina/BA permite conhecer alguns de seus constituintes metabólicos. Além disso, é importante salientar que a composição química do extrato aquoso do café torrado possui dependência da espécie, condições de produção, torra e armazenamento do produto final.^{8,11} Um espectro de RMN de ¹H que melhor representou essas amostras foi escolhido para demonstrar a identificação dos constituintes químicos (Figura 5-1), que foi realizada de acordo com dado da literatura.^{8,12-21}

Figura 5-1 - (A) Espectro de RMN de ^1H do café (500 MHz, D_2O) obtido com supressão do sinal da água com atribuição dos constituintes. (B) Ampliação na região de 0,8 – 4,4 ppm. (C) Ampliação na região de 5,0 – 9,5 ppm



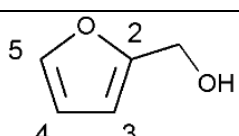
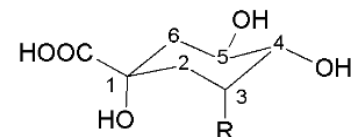
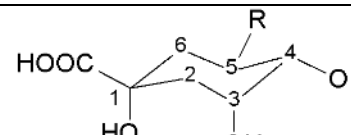
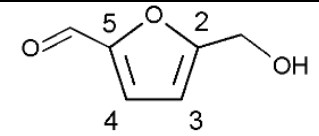
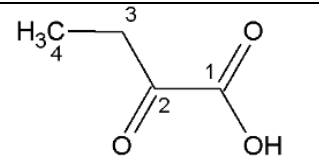
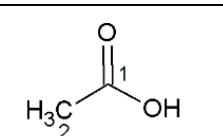
ACGs: ácidos clorogênicos; **1**: 2-furilmetanol; **2**: ácido 3-cafeoilquínico (3-ACQ); **3**: ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ); **4**: 5-hidróximetilfural (5-HMF); **5**: ácido 2-oxobutílico; **6**: ácido acético; **7**: cafeoil; **8**: ácido cítrico; **9**: ácido fórmico; **10**: ácido fumárico; **11**: ácido glicólico; **12**: ácido láctico; **13**: ácido málico; **14**: ácido nicotínico; **15**: ácido propanóico; **16**: ácido succínico; **17**: acrilamida; **18**: cafeína; **19**: catecol; **20**: cátion *N*-metilpiridínio; **21**: colina; **22**: L-alanina; **23**: mio-inositol; **24**: nicotinato de metila; **25**: quinida; **26**: sacarose; **27**: trigonelina; **28**: trimetilamina; **29**: xantina; **30**: γ -butirolactona.

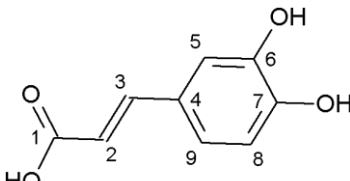
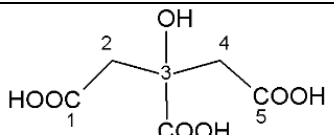
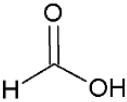
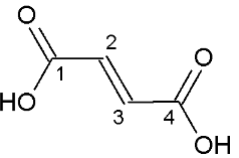
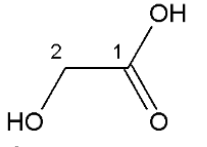
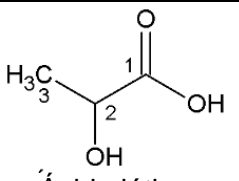
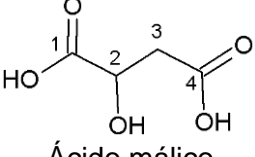
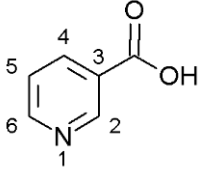
Os sinais observados nos espectros de ^1H apresentaram boa relação sinal/ruído e a supressão do sinal dos hidrogênios da água (4,90 ppm) se mostrou

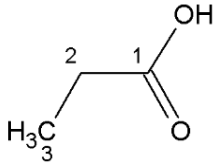
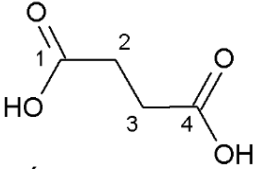
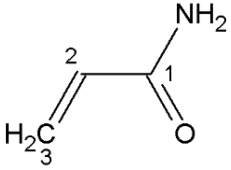
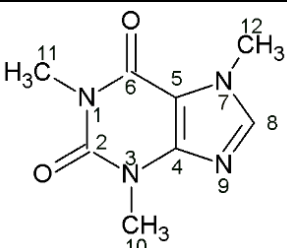
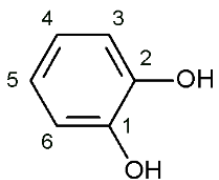
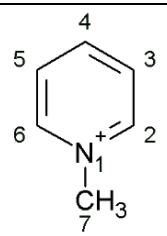
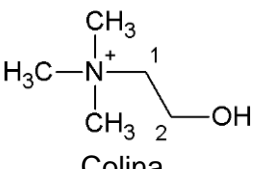
eficiente, possibilitando a análise das informações químicas das amostras sem a necessidade de liofilização.

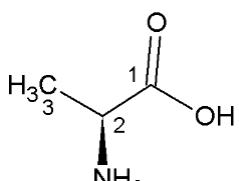
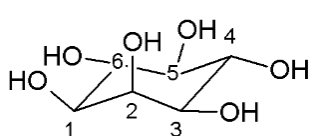
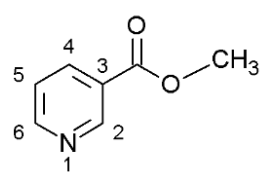
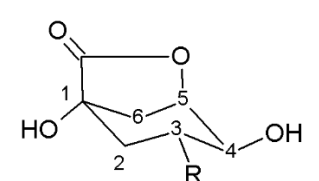
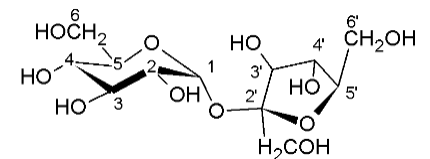
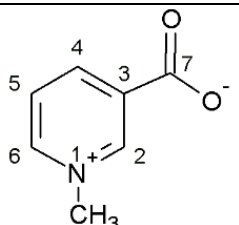
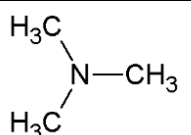
Os sinais identificados nos experimentos de ^{13}C e de correlações ^1H - ^{13}C ($^1J_{\text{CH}}$) $g\text{HSQC}$ contribuíram para a caracterização dos constituintes identificados nos espectros de ^1H , sendo que estas atribuições podem ser observadas na Tabela 5-1.

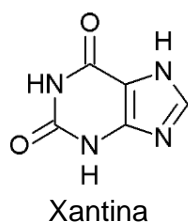
Tabela 5-1 – Atribuições da composição química identificada nos extratos aquoso dos cafés torrados comerciais por meio dos experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , $g\text{COSY}$ e $g\text{HSQC}$

Representação estrutural	Posição	Deslocamento químico (δ ppm)		*
		^1H (multiplicidade, J em Hz)	^{13}C ($g\text{HSQC}$)	
 2-furilmetanol	3	6,42 (d, 3,0 Hz)	-	13
	4	6,45 (sl)	-	
	5	7,52 - 7,55 (m)	-	
 3-ACQ	3	5,38 - 5,43 (m)	-	16
	6	2,09 – 2,13 (m)	-	
 5-ACQ	5	5,28-5,38 (m)	-	16
	6	2,09 – 2,13 (m)	-	
 5-HMF	5	9,44 (s)	-	13
 Ácido 2-oxobutílico	3	2,76-2,83 (m)	-	13
 Ácido acético	2	1,96 (s)	23,6	13,15

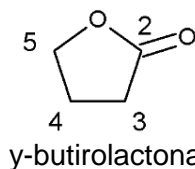
 <p>Ácido cafeico</p>	2	6,31 (d, 16,0 Hz)	-	
	3	7,42 (d, 16,0 Hz)	145,7	
	5	6,89 - 6,95 (m)	122,3	12,15,16
	8	6,74 - 6,80 (m)	115,6	
	9	6,86 (d, 8,0 Hz)	116,0	
 <p>Ácido cítrico</p>	2 e 4	2,61 – 2,84 (m)	44,2	13,15
 <p>Ácido fórmico</p>	1	8,46 (s)	-	13
 <p>Ácido fumárico</p>	2 e 3	6,55 (s)	135,2	13
 <p>Ácido glicólico</p>	2	3,98 (s)	61,2	13,15
 <p>Ácido láctico</p>	2	4,13 – 4,19 (m)	69,3	
	3	1,35 (d, 6,9 HZ)	20,7	14,15
 <p>Ácido málico</p>	2	4,32 – 4,38 (m)	70,7	
	3	2,62-2,81 (m)	42,3	13,15
 <p>Ácido nicotínico</p>	2	8,97 (s)	-	13

	2	2,24 – 2,31 (m)	27,1	13
	3	1,08 (t, 7,7 Hz)	9,3	
Ácido propanoico				
	2 e 3	2,39 (s)	29,4	13
	Ácido succínico			
	2	6,27 – 6,30 (m)	130,5	13,21
	3	5,83 - 5,99 (m)	129,7	
Acrilamida				
	8	7,77 (s)	143,8	13,16
	10	3,41 (s)	30,4	
	11	3,24 (s)	28,4	
	12	3,84 (s)	34,0	
Cafeína				
	1 e 2	5,49 - 5,58 (sl)	-	17,18
	Catecol			
	6 e 2	8,77 (d, 5,8 Hz)	145,0	8,15
	3 e 5	8,01 – 8,06 (m)	127,7	
	4	8,52 (t, 7,9 Hz)	145,8	
	7	4,39 (s)	48,1	
Cátion <i>N</i> -metilpiridínio				
	-(CH ₃) ₃	3,21 (s)	54,4	13,15
	1	3,54 (t, 2,6 Hz)	68,3	
	2	4,01 - 4,10 (m)	56,4	
Colina				

 <p>L-alanina</p>	2	4,25 - 4,31 (m)	-	12
	3	1,39 (d, 7,2 Hz)	-	
 <p>mio-inositol</p>	1	3,26 - 3,33 (m)	75,1	13,15
	2 e 6	3,66 - 3,76 (m)	73,1	
	3 e 5	3,51 - 3,56 (m)	71,8	
	4	3,84 - 3,87 (m)	72,3	
 <p>Nicotinato de metila</p>	4	8,08 (d, 7,4 Hz)	135,1	13
	6	8,63 (d, 5,1 Hz)	150,3	
 <p>Quinida</p>	2	(2,40 - 2,46) _a (m) /(2,48 - 2,55) _e (m)	36,7	15,19
	3	3,87 - 3,93 (m)	66,2	
	4	4,19 - 4,22 (m)	66,3	
	5	4,91 - 4,94 (m)	77,8	
	6	(2,08 - 2,13) _a (m) /(2,18 - 2,14) _e (m)	38,4	
 <p>Sacarose</p>	1	5,60 (d, 2,5 Hz)	92,7	8,16
	3	3,77 - 3,83 (m)	-	
	6'	3,77 - 3,83 (m)	62,3	
	6	3,77 - 3,83 (m)	62,9	
 <p>Trigonelina</p>	2	9,12 (s)	-	8,13,15
	4	8,83 (d, 7,3 Hz)	146,8	
	5	8,08 (t, 7,3 Hz)	127,6	
	6	8,84 (dl, 7,4 Hz)	145,0	
	8	4,43 (s)	48,8	
 <p>Trimetilamina</p>	(-CH ₃) ₃	2,91 (s)	48,8	13



8	8,00 (sl)	-	13
---	-----------	---	----



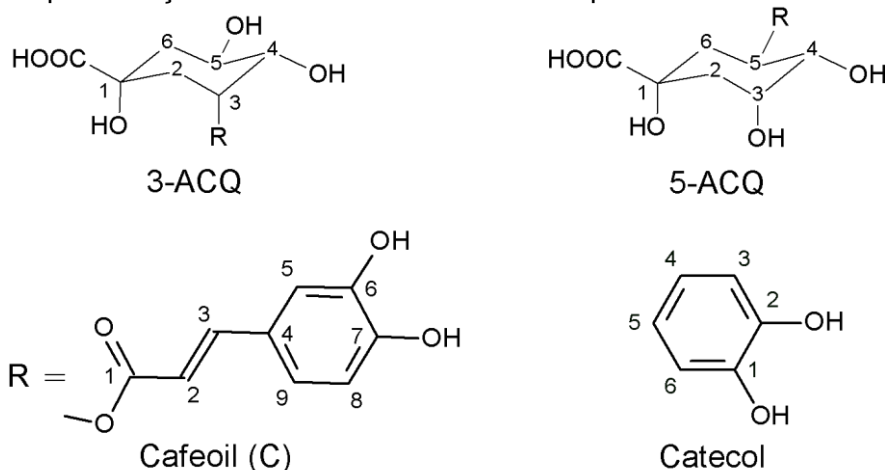
3	4,35 - 4,38 (m)	71,0	
4	2,22 - 2,30 (m)	-	13,15
5	2,15 - 2,18 (m)	-	

*Referência; R = cafeoil; s: singlete; sl: singlete largo; d: dublete; dl: dublete largo; dd: dublete de dublete; t: tripinete; m: multipinete; *J*: constante de acoplamento.

Com auxílio de um interessante estudo desenvolvido por Villalón-López e colaboradores em 2018, o qual tratou de uma abordagem de impressão digital baseada em RMN de ^1H de cafés torrados comerciais (Anexo – A, na página 95),¹³ bem como de outros trabalhos científicos relacionados e pela análise dos dados experimentais de RMN bidimensional (*g*COSY e *g*HSQC) foi possível realizar a atribuição dos sinais dos constituintes do extrato de café analisado. Os constituintes identificados são apresentados de acordo as suas classes químicas e semelhança em suas fórmulas estruturais.

A análise dos dados de RMN de ^1H possibilitou identificar alguns sinais dos ácidos clorogênicos (ACGs), que são formas esterificadas do ácido quínico com derivados do ácido cinâmico. Os ácidos cafeoilquínicos (ACQs) são exemplos desses ésteres e são formados entre o ácido quínico e o ácido cafeico. O sinal do H3 do ácido 3-cafeoilquínico (3-ACQ) foi observado entre 5,38 - 5,43 ppm (m) enquanto que o ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) apresentou o sinal do H5 entre 5,28 e 5,38 ppm (m). Além disso, para o substituinte cafeoil foram observados os sinais característicos dos hidrogênios olefínicos (H2 e H3) em 6,31 (d, *J* = 16,0 Hz) e 7,42 ppm (d, *J* = 16,0 Hz), respectivamente, e os sinais dos hidrogênios aromáticos (H5, H8 e H9) nos respectivos deslocamentos químicos 6,89 - 6,95 (m), entre 6,74 e 6,80 (m) e em 6,86 ppm (d, *J* = 8,0 Hz). O sinal dos hidrogênios de hidroxilas do catecol foi verificado em 5,53 ppm (singlete largo). A representação estrutural desses constituintes pode ser observada na Figura 5-2.

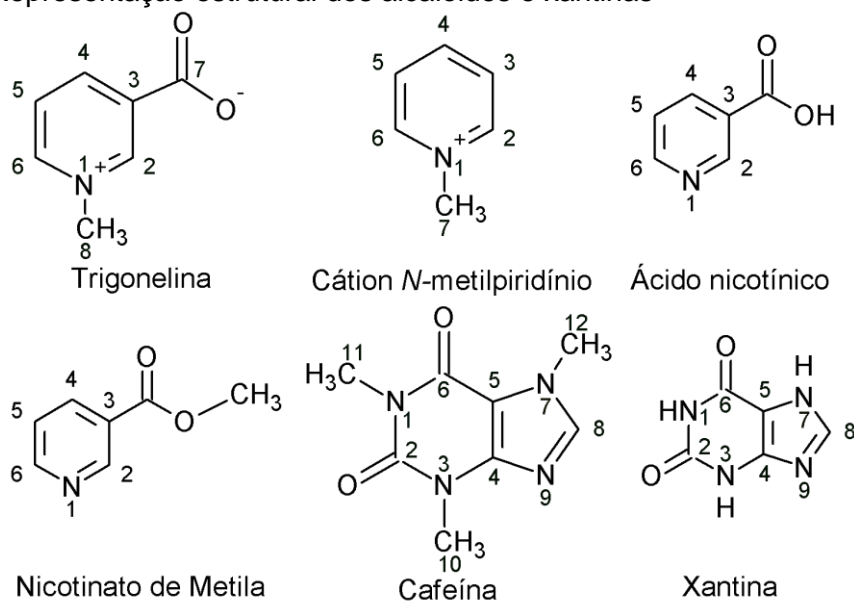
Figura 5-2 – Representação estrutural dos ácidos cafeoilquínicos e catecol



Os ácidos clorogênicos estão correlacionados com a qualidade do sabor do café, sendo que ao ácido 3,4-dicafeoilquínico é associada a elevada qualidade da bebida, entretanto o 5-ACQ é associado a uma qualidade ruim,²² apesar de ser o mais observado na literatura deste alimento.²³ Outro aspecto importante é a ação benéfica que os ácidos clorogênicos podem trazer à saúde, a exemplo da sua atividade antioxidante revisada em 2012.²⁴

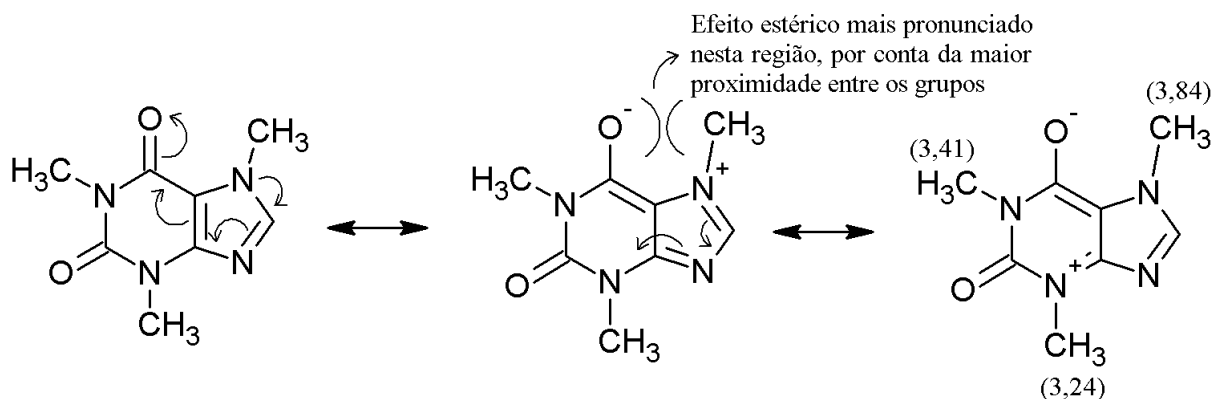
Para a trigonelina foram observados os sinais do H2 em 9,12 ppm (s), H4 em 8,83 ppm (d, $J = 7,3$ Hz), H5 em 8,08 ppm (t, $J = 7,3$ Hz) e os hidrogênios metílicos H8 em 4,43 ppm (s). O cátion *N*-metilpiridínio apresentou sinais dos hidrogênios H2 e H6 em 8,77 ppm (d, $J = 5,8$ Hz), H3 e H5 entre 8,01 e 8,06 ppm (m), H4 em 8,52 ppm (d, $J = 7,9$ Hz) e os hidrogênios metílicos H7 em 4,39 ppm (s). O sinal do H2 do ácido nicotínico foi identificado em 8,97 ppm (s) enquanto que a observação do nicotinato de metila ocorreu pelos sinais dos hidrogênios H4 e H6 em 8,08 ppm (d, $J = 7,4$ Hz) e 8,63 ppm (d, $J = 5,1$ Hz), respectivamente. Além disso, os sinais dos hidrogênios metílicos H10, H11 e H12 da cafeína foram observados em 3,41 (s), 3,24 (s) e 3,84 ppm (s), respectivamente, e o H8 em 7,77 ppm (s). Com relação a xantina, o sinal do H8 foi identificado em 8,00 ppm (singleto largo). As fórmulas estruturais desses constituintes podem ser observadas na Figura 5-3.

Figura 5-3 - Representação estrutural dos alcaloides e xantinas



A cafeína e a trigonelina apresentam alto deslocamento químico dos grupos metílicos, isto devido principalmente aos efeitos eletrônicos em suas respectivas estruturas. O grupo metílico na trigonelina está ligado a um átomo de nitrogênio com uma carga residual positiva o que eleva o deslocamento químico deste grupo. Quanto a cafeína a metila com menor deslocamento químico (3,24 ppm) sofre efeitos indutivo pois está ligada a um heteroátomo e estérico de repulsão elétron-elétron da densidade eletrônica dos grupos carbonílicos próximos as metilas. As duas metilas mais deslocadas (nas posições 7 e 3) possuem um efeito adicional, que se refere a carga residual presente nos nitrogênios os quais estes grupos estão ligados, como podemos observar nas estruturas de ressonância²⁵ (Figura 5-4) o que contribui para a observação destes deslocamentos químicos.

Figura 5-4 - Representações de ressonâncias para a fórmula estrutural da cafeína

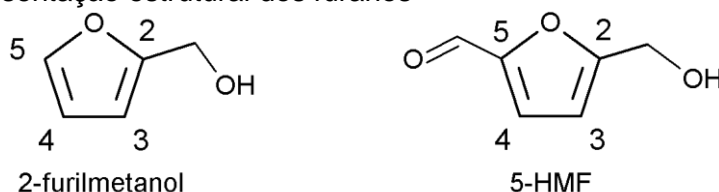


O cátion *N*-metilpiridínio, o ácido nicotínico e o nicotinato de metila são formados em decorrência da degradação da trigonelina, sendo que os dois últimos são formados em menor proporção²⁶. A trigonelina e esses derivados oferecem benefícios à bebida por apresentar atividade biológica, a exemplo da desintoxicação de xenobióticos e indução de mecanismos de defesa celular.²⁷ Além disso, os teores deste alcaloide e do cátion *N*-metilpiridínio no café torrado proporcionam uma relação que contribui para a verificação do grau de torra.⁸

A cafeína é o constituinte mais conhecido do café, devido a sua ação estimulante no sistema nervoso central.²⁸ Além disso, este metabólito possui correlação contra a doença de Parkinson,²⁹ apresenta potencial terapêutico contra a doença de Alzheimer³⁰ e capacidade antioxidante.³¹

Os sinais dos hidrogênios H3, H4 e H5 do 2-furilmetanol foram identificados nos respectivos deslocamentos químicos 6,42 (d, $J = 3,0$ Hz), 6,45 (singleto largo) e entre 7,52 e 7,55 ppm (m). O sinal do hidrogênio aldeídico no 5-hidróximetilfurfural (5-HMF) foi observado em 9,44 ppm (s). Entre os furanos (Figura 5-5) que podem ser encontrados em cafés torrados, o 2-furilmetanol é o que possui maior abundância,³² entretanto este está correlacionado com defeitos de grãos pretos-verdes que podem ocorrer pela antecipação da colheita dos grãos.³³ Quanto ao 5-HMF, este é formado no processo da torra como produto de decomposição térmica de carboidratos.³⁴ Em cafés, é um indicador da deterioração da qualidade, devido a torra excessiva ou longos períodos de armazenamento do produto.^{21,34}

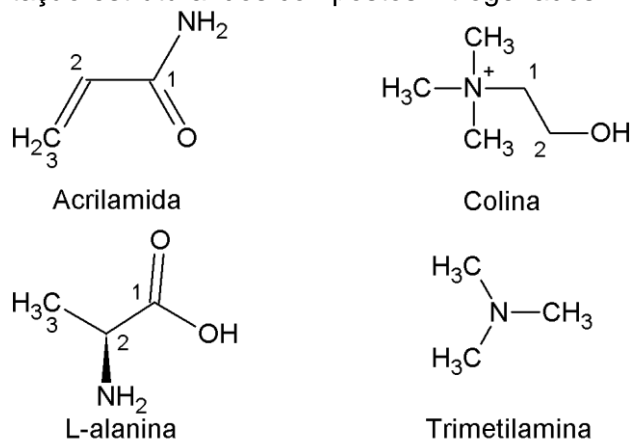
Figura 5-5 - Representação estrutural dos furanos



A acrilamida teve os respectivos sinais do H2 e H3 observados entre 6,27 e 6,30 ppm (m) e na faixa entre 5,83 e 5,99 ppm (m), respectivamente. A colina foi identificada pelos sinais dos hidrogênios dos grupos metílicos em 3,21 ppm (s), de H1 em 3,54 ppm (t, $J = 2,6$ Hz) e H2 na faixa entre 4,01 e 4,10 ppm (m). A L-alanina apresentou o sinal de H2 entre 4,25 e 4,31 ppm (m) e H3 em 1,39 ppm (d, $J = 7,2$ Hz) enquanto que a trimetilamina foi identificada pela observação do sinal dos

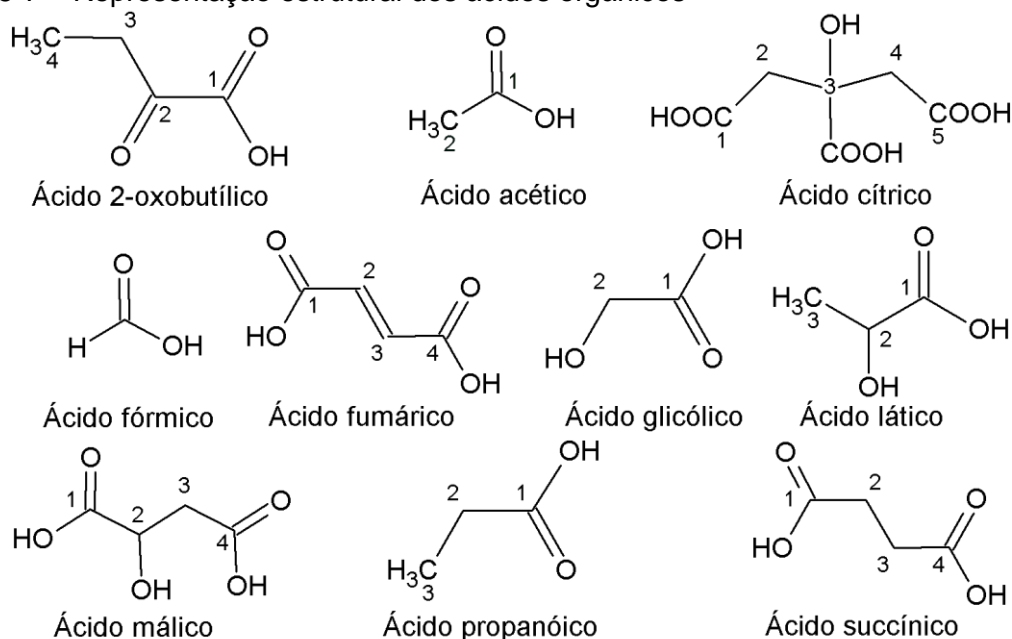
hidrogênios metílicos em 2,91 ppm (s). As respectivas fórmulas estruturais são apresentadas na Figura 5-6.

Figura 5-6 – Representação estrutural dos compostos nitrogenados



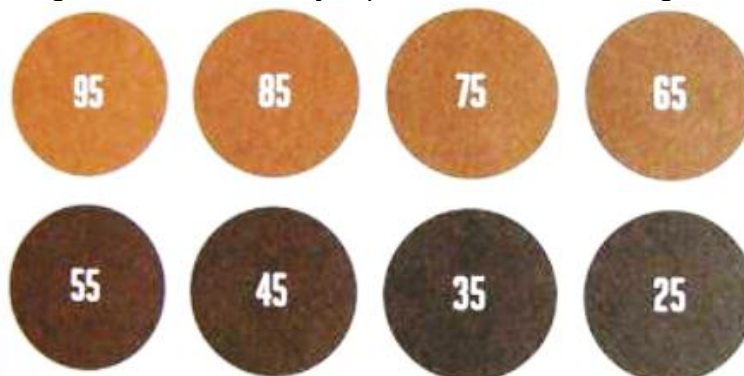
O ácido 2-oxobutílico foi identificado pelo sinal dos hidrogênios H3 entre 2,76 e 2,83 ppm (m). O sinal dos hidrogênios metílicos do ácido acético foi verificado como um singleto intenso em 1,96 ppm enquanto que o ácido cítrico teve os sinais do H2 e H4 observados entre 2,61 e 2,84 ppm (m). O sinal do H1 do ácido fórmico foi observado em 8,46 ppm (s), já o ácido fumárico apresentou o sinal dos H2 e H3 em 6,55 ppm (s) e o sinal do H2 do ácido glicólico foi observado em 3,98 (s). O ácido láctico foi caracterizado pelo sinal do H2 entre 4,13 e 4,19 ppm (m) e dos três hidrogênios metílico H3 em 1,35 ppm (d, $J = 6,9$ Hz). O ácido málico teve o sinal do H2 identificado entre 4,32 e 4,38 ppm (m) e H3 entre 2,62 e 2,81 ppm (m). Foram verificados também os respectivos sinais do H2 e H3 do ácido propanoico entre 2,24 e 2,31 ppm (m) e em 1,08 ppm (t, $J = 7,7$ Hz). Além disso, o ácido succínico apresentou os sinais dos hidrogênios H2 e H3 em 2,39 ppm (s). As fórmulas estruturais destes ácidos orgânicos são apresentadas na Figura 5-7.

Figura 5-7 – Representação estrutural dos ácidos orgânicos



Sabe-se que a quantidade de acidez livre proporciona sabor à bebida e é um dos atributos na avaliação da qualidade realizada pela *Specialty Coffee Association* (SCA).³⁵ A hidrólise de ésteres e ocorrência da reação de Maillard durante a produção do café são as causas prováveis de aumento da acidez.^{8,36} O ácido acético, assim como os ácidos cítrico e málico, são os que mais afetam a acidez. Tanto o ácido acético quanto o málico aumentam com a torra clara e tendem a diminuir da torra média para a escura, tais graus de torras são verificados por meio da tonalidade da cor dos grãos (Figura 5-8). Contudo, o ácido fórmico tende a aumentar com a elevação da intensidade da torra, assim como os ácidos láctico, quínico e os de cadeia carbônica pequena também tendem a aumentar em torras mais prolongadas.³⁷

Figura 5-8 - Classificação por meio do sistema Agtron

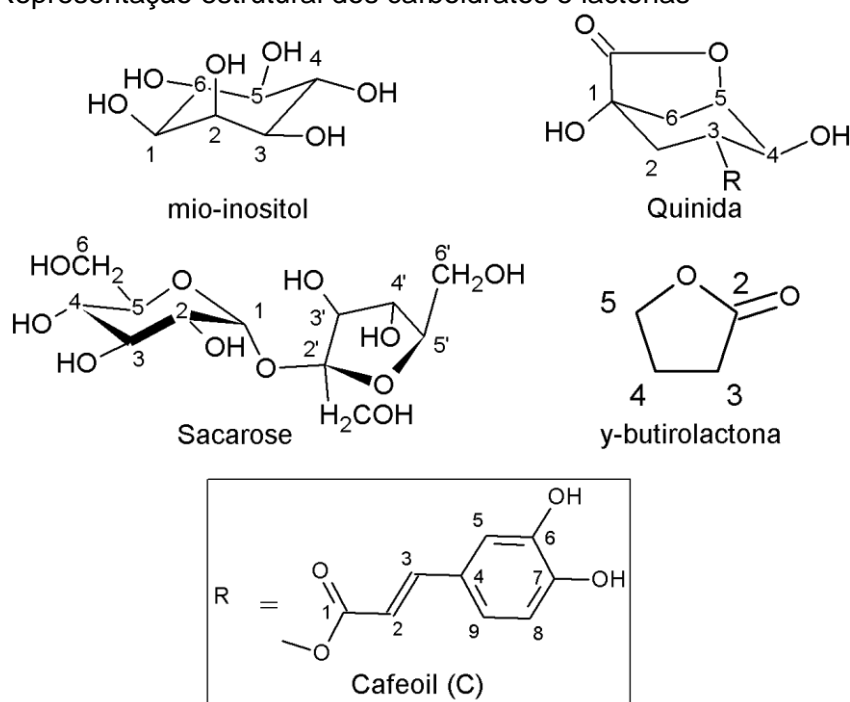


Disco de Agtron.³⁸ Torra clara: 75 a 95; Torra média: 55 a 65; Torra escura: 25 A 45.

O ácido glicólico também é formado no processo da torra pela degradação dos carboidratos,³⁹ e é utilizado no tratamento contra acne.⁴⁰ O ácido fumárico é relacionado como um metabólico de proteção em espécies de cafés resistentes à infestações de parasitas.⁴¹ Os ésteres do ácido málico podem exercer efeitos neuroprotetores no organismo biológico,⁴² ao passo que contribuem com as propriedades organolépticas proporcionando um sabor de maçã.⁴³ Além disso, o ácido cítrico caracteriza-se pelo sabor de limão e o ácido láctico por proporcionar um sabor amanteigado.⁴³ Como exposto, cada ácido contribui de forma diferente para a qualidade final da bebida.

O mio-inositol apresentou o sinal do H1 entre 3,26 e 3,33 ppm (m), H2 e H6 entre 3,66 e 3,76 ppm (m), H3 e H5 entre 3,51 e 3,56 ppm (m) e H4 entre 3,84 e 3,87 ppm (m). Os respectivos sinais dos hidrogênios axial e equatorial H2 da quinida foram observados entre 2,40 e 2,46 (m) e 2,48 e 2,55 ppm (m) e os hidrogênios axial e equatorial H6 foram observados entre 2,08 e 2,13 (m) e entre 2,18 e 2,14 ppm (m), respectivamente. A sacarose foi identificada pelo sinal do H1 em 5,60 ppm (d, $J = 2,5$ Hz) e H3 entre 3,77 e 3,83 ppm (m) enquanto que a γ -butirolactona foi identificada pelos sinais do H3 entre 4,31 e 4,38 ppm (m) e H4 entre 2,22 e 2,30 ppm (m). Na Figura 5-9 são representadas as respectivas fórmulas estruturais.

Figura 5-9 – Representação estrutural dos carboidratos e lactonas

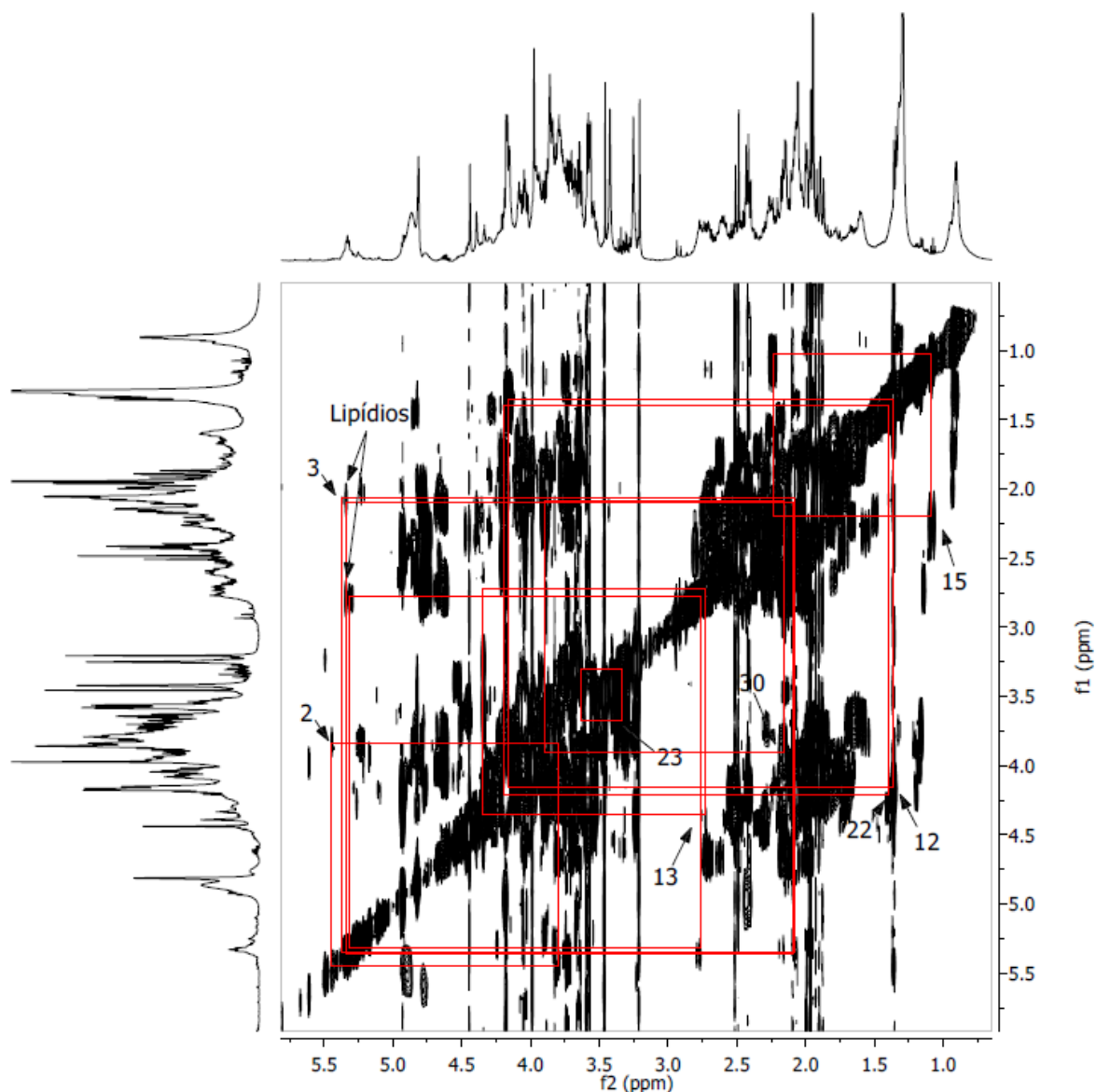


A γ -butirolactona também pode possuir correlação com a torra,⁴⁴ além disso, as lactonas podem conferir grande variedade de odores,^{44,45} e embora a γ -butirolactona seja um composto volátil,^{6,44,46,47} a mesma pode ser detectada¹³⁻¹⁵ e quantificada em cafés torrados.¹⁵ O mio-inositol é observado em maiores quantidades no café robusta do que no arábica.⁴⁸

Algumas correlações ^1H - ^1H , que corroboram com a atribuição dos sinais realizada analisando-se o espectro de ^1H (Figura 5-1), foram verificadas no experimento de RMN bidimensional gCOSY (Figura 5-10 e Figura 5-12).

Na ampliação mostrada na Figura 5-10 foram correlacionados os sinais do H5 [5,30 - 5,37 ppm (m)] e do H6 [2,04 e 2,11 ppm (m)] no 5-ACQ. O 3-ACQ apresentou correlação do sinal do H3 [5,41, dd] com H4 [3,77 - 3,83 ppm (m)]. Foi observada uma correlação do sinal do H3 [2,62 - 2,81 ppm (m)] com o H2 [4,33 - 4,39 ppm (m)] do ácido málico. Também foi possível observar uma fraca correlação entre H3 [1,39 ppm (d)] e H2 [4,29 - 4,31 ppm (m)] da L-alanina. O mio-inositol apresentou correlação de H1 [3,27 - 3,33 ppm (m)] com H2 e H6 [3,66 - 3,76 ppm (m)]. Foi observada a correlação do H3 [1,35 ppm (d)] com o H2 [4,13 - 4,19 ppm (m)] do ácido láctico. O ácido propanoico mostrou correlação dos hidrogênios metílicos H3 [1,08 ppm (t)] com os hidrogênios metilênicos H2 [2,24 - 2,31 ppm (m)] e a γ -butirolactona mostrou uma correlação do H4 [2,22 - 2,30 ppm (m)] com H3 [4,31 - 4,38 ppm (m)]. Estas correlações concordam com dados da literatura.^{15,16}

Figura 5-10 – Correlações ^1H - ^1H observadas no experimento de gCOSY do café torrado da Chapada Diamantina. Ampliação na região de 0,6 – 5,7 ppm



2: ácido 3-cafeoilquínico (3-ACQ); **3:** ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ); **12:** ácido láctico; **13:** ácido málico; **15:** ácido propanoico; **22:** L-alanina; **23:** mio-inositol; **30:** γ -butirolactona.

O conteúdo de lipídios (Figura 5-11) apresentou boa visualização das correlações ^1H - ^1H no experimento de gCOSY (Figura 5-12). Foi possível observar as correlações dos hidrogênios metílicos ($-\text{CH}_3$) [0,88 - 0,97 ppm (m)] com os hidrogênios metilênicos ($-\text{CH}_2-$) [1,28 - 1,35 ppm (m)], estes sinais representam os ácidos graxos totais, tanto insaturados como o ácido linoleico e o oleico, quanto os saturados a exemplo do ácido palmítico. Além disso, foi observada também correlação do ($-\text{CH}_2-$) com o sinal dos hidrogênios metilênicos α aos grupos olefínicos dos ésteres graxos insaturados ($=\text{CHCH}_2-$) [2,05 - 2,08 ppm (m)]. O sinal atribuído ao hidrogênio olefínico ($=\text{CH}-$) [5,30 - 5,37 ppm (m)] apresentou correlação

com os hidrogênios metilênicos entre os grupos olefínicos ($=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{}$) [2,76 – 2,80 ppm (m)], característicos de ácidos linoleico e linolênico presentes em cafés⁵ além da correlação com o grupo metilênico na posição α aos grupos olefínicos [2,05 ppm] desses ésteres graxos (Figura 5-11).

Por fim, foi observado também correlação do sinal dos hidrogênios metilênicos β em relação à carbonila dos ácidos graxos ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$) [1,56 - 1,65 ppm (m)] com o sinal dos hidrogênios metilênicos α à carbonila ($-\text{CH}_2\text{CO}$) [2,25 – 2,29 ppm (m)]. Estas atribuições estão de acordo com o observado por Tavares em sua tese intitulada “Utilização de Métodos Quimiométricos Aliados a RMN na Caracterização dos Diferentes Tipos de Cafés Comerciais”.⁸

Figura 5-11 - Representação dos ésteres graxos identificados no café

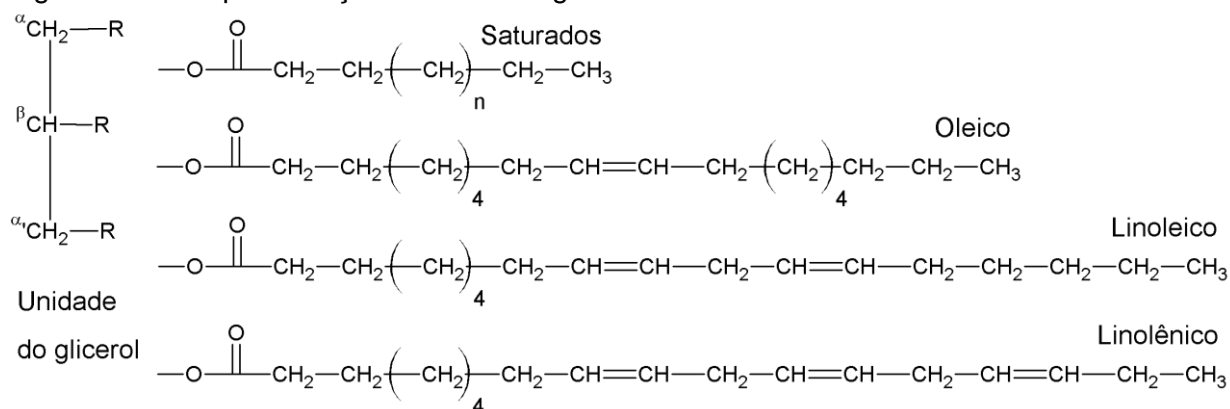
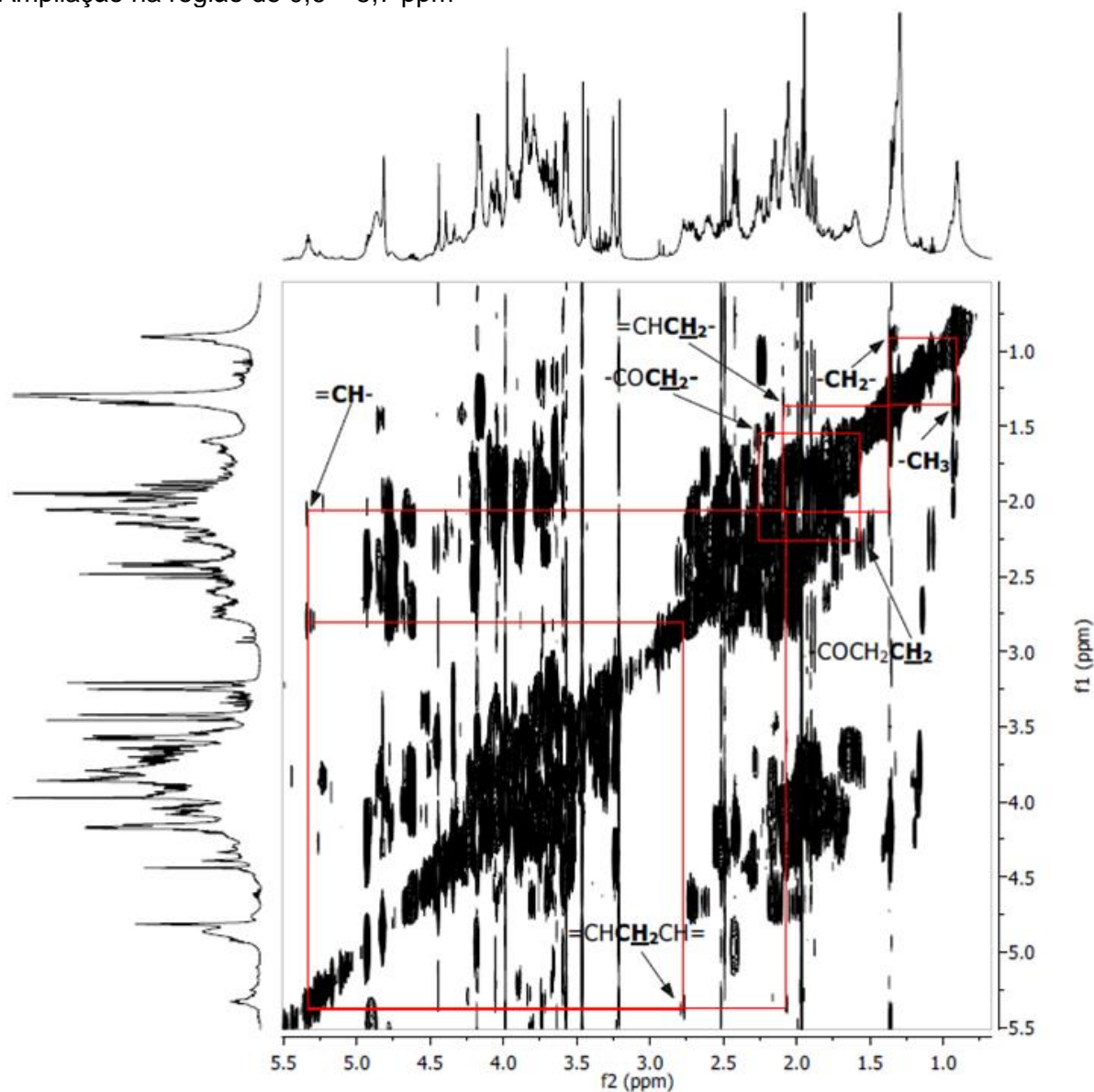


Figura 5-12 - Correlações ^1H - ^1H observadas no experimento de gCOSY destacando as principais correlações do conteúdo lipídico em cafés torrados da Chapada Diamantina. Ampliação na região de 0,6 – 5,7 ppm



Os cafés torrados podem apresentar de 11,0 à 20,0 % de lipídios em sua composição⁴⁹ e os ácidos linoleico e palmítico são reportados como sendo os principais no café verde.^{50,51} Os lipídios deste alimento compõem o que na literatura é conhecido como “óleos de café”, isto porque diferente de muitos óleos de origem vegetal ou animal, o “óleo de café” possui uma fração insaponificável característica.^{50–52} Estes óleos possuem função protetora de compostos aromáticos,⁸ entretanto, apesar de possuírem certa resistência à torra,⁵³ sofrem degradação oxidativa gerando compostos voláteis como álcoois alifáticos e compostos carbonilados que contribuem para a reação de Maillard.⁵⁴

O “óleo de café” é responsável por dissolver a maior parte dos compostos que proporcionam qualidades sensoriais da bebida,^{52,55} os extratos do óleo revelam a maior pontuação dos descritores sensoriais, a exemplo do doce, da vanilina e do mel.⁵⁶ Devido as propriedades organolépticas proporcionadas por essa classe de substâncias, estudos foram desenvolvidos para a compreensão de suas propriedades físico-químicas, para sua aplicação como ingrediente básico para melhorar as características sensoriais de outros produtos alimentícios, bem como para aumentar os efeitos benéficos à saúde.^{52,57}

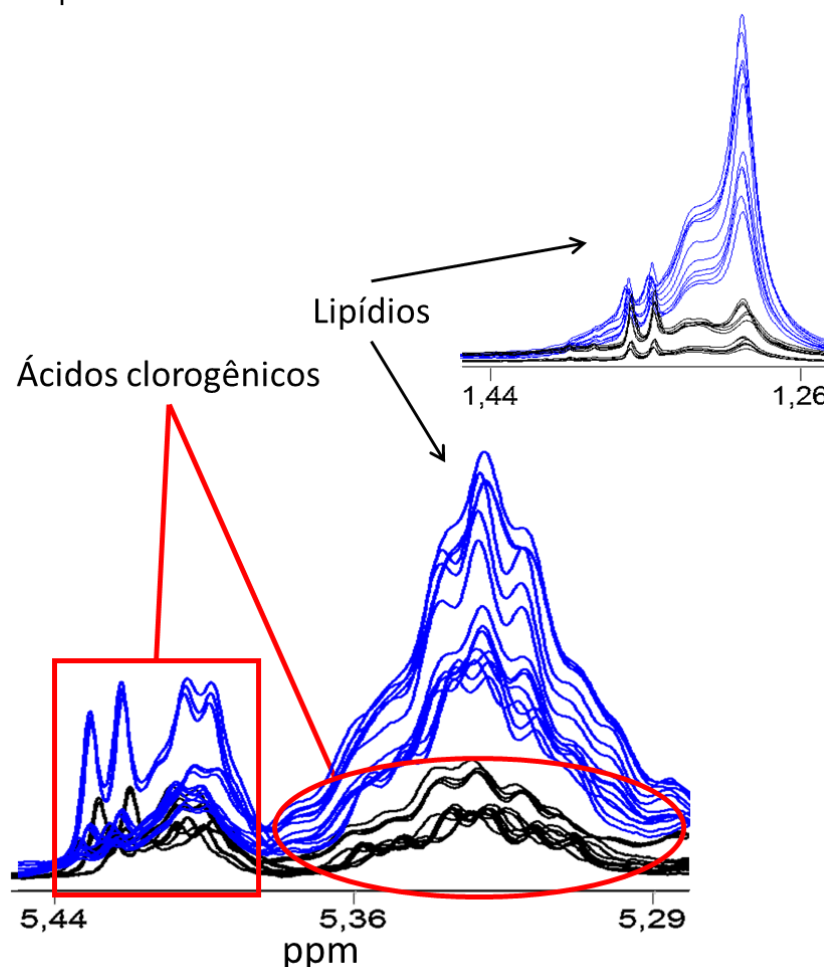
Quanto aos dados de RMN de ^{13}C , estes também são bons parâmetros para comparação com os dados de deslocamentos químicos (δ) disponíveis na literatura, isto porque os sinais são menos sobrepostos e os δ de ^{13}C não sofrem influências perceptíveis das interações intermoleculares na complexa mistura dos constituintes químicos em amostras de cafés como ocorre na RMN de ^1H ,⁵⁸ sendo assim, os valores de δ tornam-se mais reprodutíveis. Contudo, a principal desvantagem nos experimentos de RMN de ^{13}C está relacionado com o longo período na aquisição dos dados. Isso é resultado da sua baixa sensibilidade, uma vez que a constante magnetogírica (específica de cada núcleo) do ^{13}C (Y_C) é aproximadamente um quarto em relação a do ^1H ($Y_C/Y_H = 1/4$), o que leva a uma sensibilidade de $1/64$ (Y^3), isto somado a sua abundância natural na terra de apenas 1,1 % (praticamente todo o restante é ^{12}C , entretanto, o núcleo de ^{12}C não possui propriedades magnéticas). Assim, a receptividade do ^{13}C é cerca de $(1/64) \times (0,011) = 1,72 \cdot 10^{-4}$ em relação ao ^1H , que é cerca de quatro ordens de magnitude superior.⁵⁹

A bebida do café é uma das matrizes alimentícias mais complexas,⁴⁹ devido ao grande número de constituintes químicos, tanto os naturais (observados no fruto verde) quanto os que são formados no processamento do grão até o produto final, sendo que na torra acontece a maioria das alterações da composição química deste produto.⁶⁰

Parte dessa complexidade foi verificada nos sinais entre 5,29 - 5,44 ppm (Figura 5-13), que comumente são atribuídos aos ácidos clorogênicos, 3-ACQ e 5-ACQ, os quais mostraram distinção entre os cafés analisados da região da Chapada Diamantina. O sinal do H3 do 3-ACQ está destacado no retângulo, sendo que nessa região é observado somente este sinal. Por outro lado, o sinal do H5 do 5-ACQ (em destaque na elipse) coincide com o deslocamento químico dos hidrogênios olefínicos dos ésteres graxos insaturados. Além disso, é possível verificar nessa

Figura que as amostras que estão representadas pelas linhas espectrais em azul, as quais apresentam os sinais com maior intensidade entre 5,29 e 5,36 ppm (com relação as demais em linhas espectrais na cor preta), são relativamente ricas em lipídios, como pode ser observado na ampliação entre 1,26 e 1,44 ppm.

Figura 5-13 - Ampliações nas regiões em 5,29 - 5,44 ppm e 1,26 – 1,44 ppm do espectro de RMN de ^1H , evidenciando os sinais de ácidos clorogênicos e lipídios presentes no café torrado da região da Chapada Diamantina



5.2 TRATAMENTO DOS DADOS DE ^1H PARA ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA

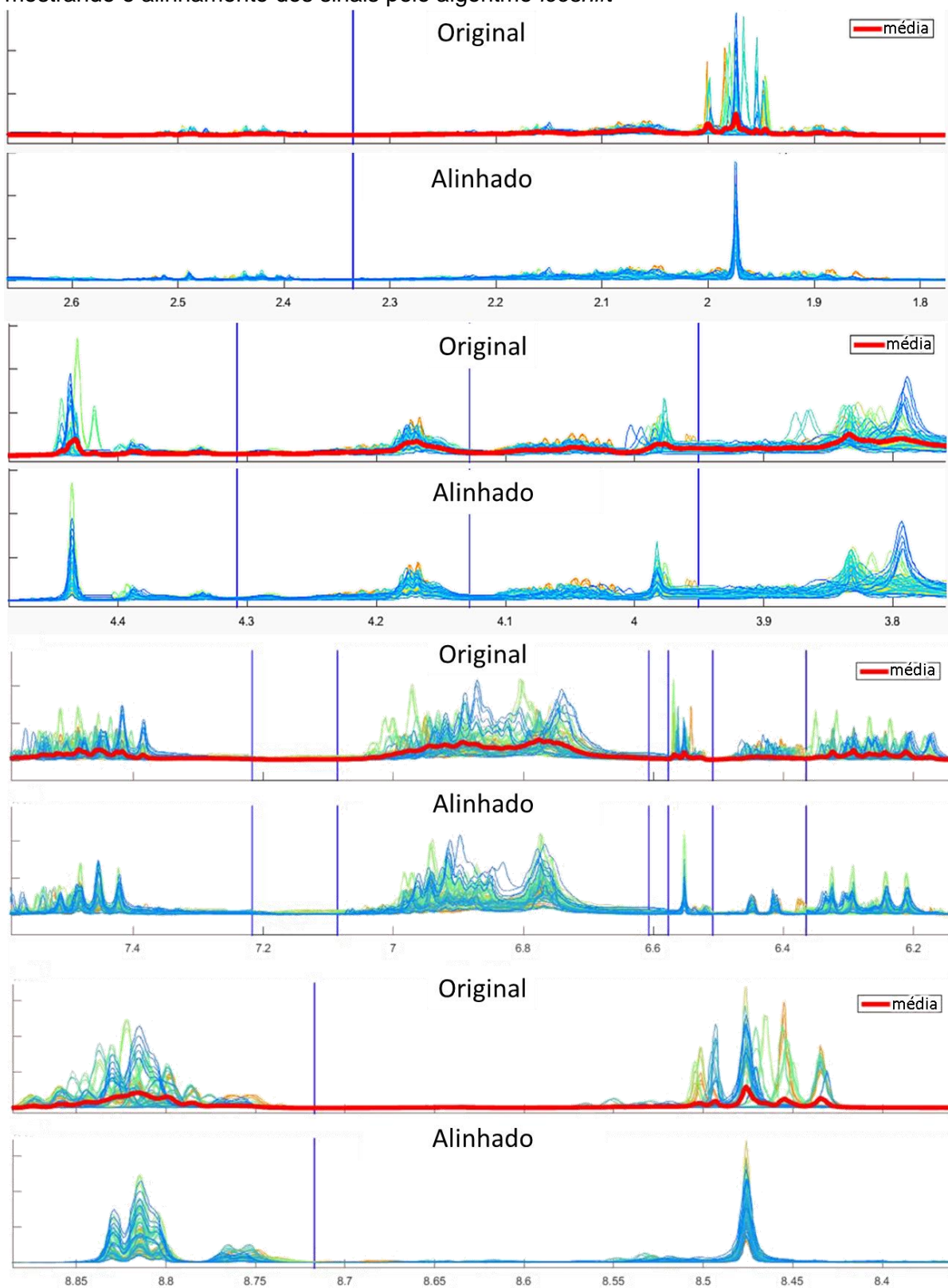
Após a obtenção dos espectros de RMN de ^1H das amostras de cafés comerciais provenientes da região da Chapada Diamantina, de outras regiões da Bahia, dos demais estados brasileiros e colombianos, iniciou-se o processamento dos espectros de maneira a garantir homogeneidade na manipulação dos dados.

A avaliação de transformação dos dados, o que designa-se a aplicação de recursos matemáticos às variáveis de maneira a proporcionar uma melhor análise

exploratória dos dados, possibilita reduzir variações aleatórias e informações sistemáticas indesejáveis, contribuindo dessa forma, para a identificação das informações relevantes a serem avaliadas. A escolha de cada pré-tratamento deve ser criteriosa⁶¹, além disso, deve-se ter um bom entendimento da função de cada método. Tendo em vista estes aspectos, foram considerados neste trabalho os recursos de pré-tratamento de alinhamento de sinais, normalização (norma um) e autoescalamento, por proporcionarem os melhores resultados de processamento destes dados.

As pequenas variações no deslocamento químico dos sinais, que podem ser causadas por variáveis como temperatura e pH, podem se tornar inconvenientes quando um conjunto de espectros de RMN é submetido a análise multivariada. Neste sentido, o alinhamento deve ser realizado para que essas variações possam ser corrigidas. Com o objetivo de alcançar um alinhamento ideal para esses dados, foi aplicado o algoritmo *icoshift*, um modelo matemático para alinhamento de espectros que oferece bons resultados para dados de RMN como pode ser observado na Figura 5-14.⁶²

Figura 5-14 – Ampliações das regiões 6,10 - 7,60 e 8,35 - 8,90 dos espectros de RMN de ^1H mostrando o alinhamento dos sinais pelo algoritmo *icoshift*



Com relação à normalização, este pré-tratamento se faz essencial neste tipo de trabalho principalmente por se tratar de cafés comerciais de distintos fabricantes,

sendo assim, no momento do preparo cada amostra pode apresentar uma pequena variação na extração dos constituintes solúveis em água, conseqüentemente concentrações finais com pequenas diferenças podem ser obtidas. A normalização (norma um) considera a área de cada espectro igual a um, assim, ela normaliza a magnitude de cada amostra, mas preserva a sua direção.⁶¹

Por fim, o autoescalamento se faz necessário, pois considera que todos os sinais dos espectros têm a mesma importância, mesmo tendo diferentes intensidades, não distinguindo se o constituinte é majoritário ou se é encontrado em pequenas proporções. Por isso, deve-se excluir todos os ruídos do espectro, de forma a evitar que estes sejam considerados importantes para a análise.

Após definidos os principais parâmetros para a análise multivariada, o resultado do PCA revelou características importantes dos dados espectrais de RMN de ¹H da composição química dos cafés.

5.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

Análises prévias de PCA foram realizadas apenas excluindo o sinal residual da água e as regiões de ruídos (Figura 5-15), com o objetivo de compreender o sistema de dados estudado. Com essa verificação preliminar foi possível observar a discriminação de quatro grupos distintos (Figura 5-16), embora as amostras se apresentem espaçadas entre si e a observação do conjunto de variáveis para a discriminação de 36,0 %. Contudo regiões mais restritas dos espectros foram observadas para que se alcançasse um conjunto de dados mais precisos quanto à discriminação das amostras e conseqüentemente dos respectivos grupos.

Figura 5-15 - Gráfico de linhas dos espectros de RMN de ^1H do extrato aquoso de cafés comerciais mostrando as regiões de exclusões preliminares em cinza

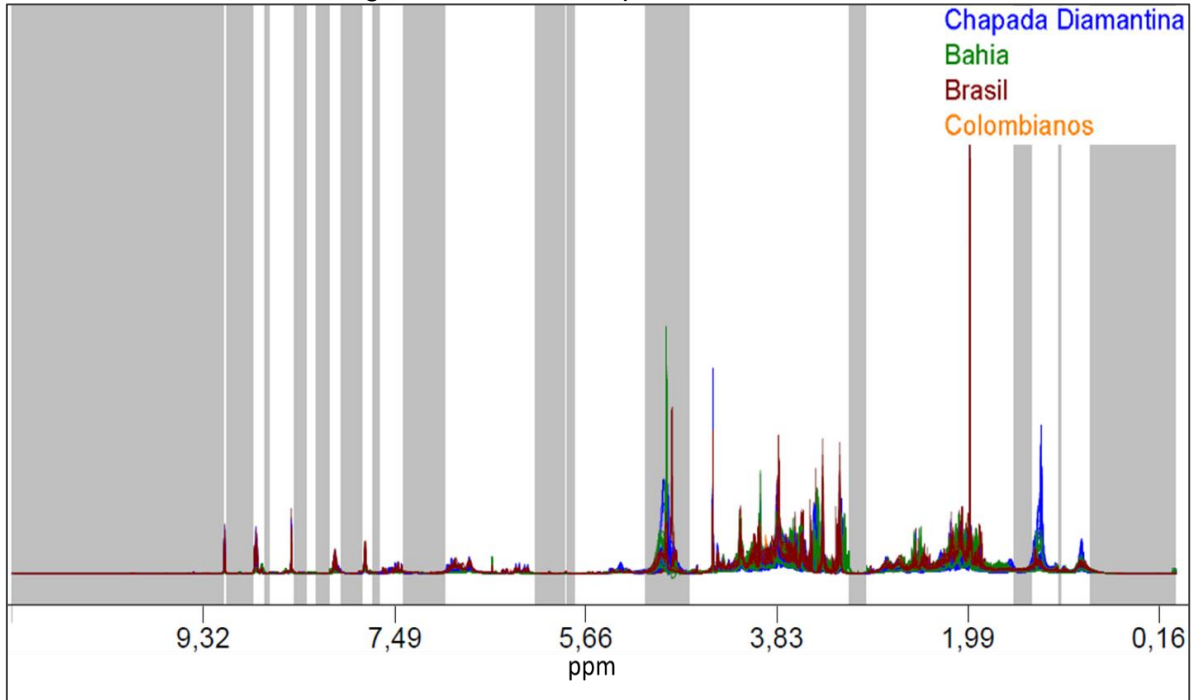
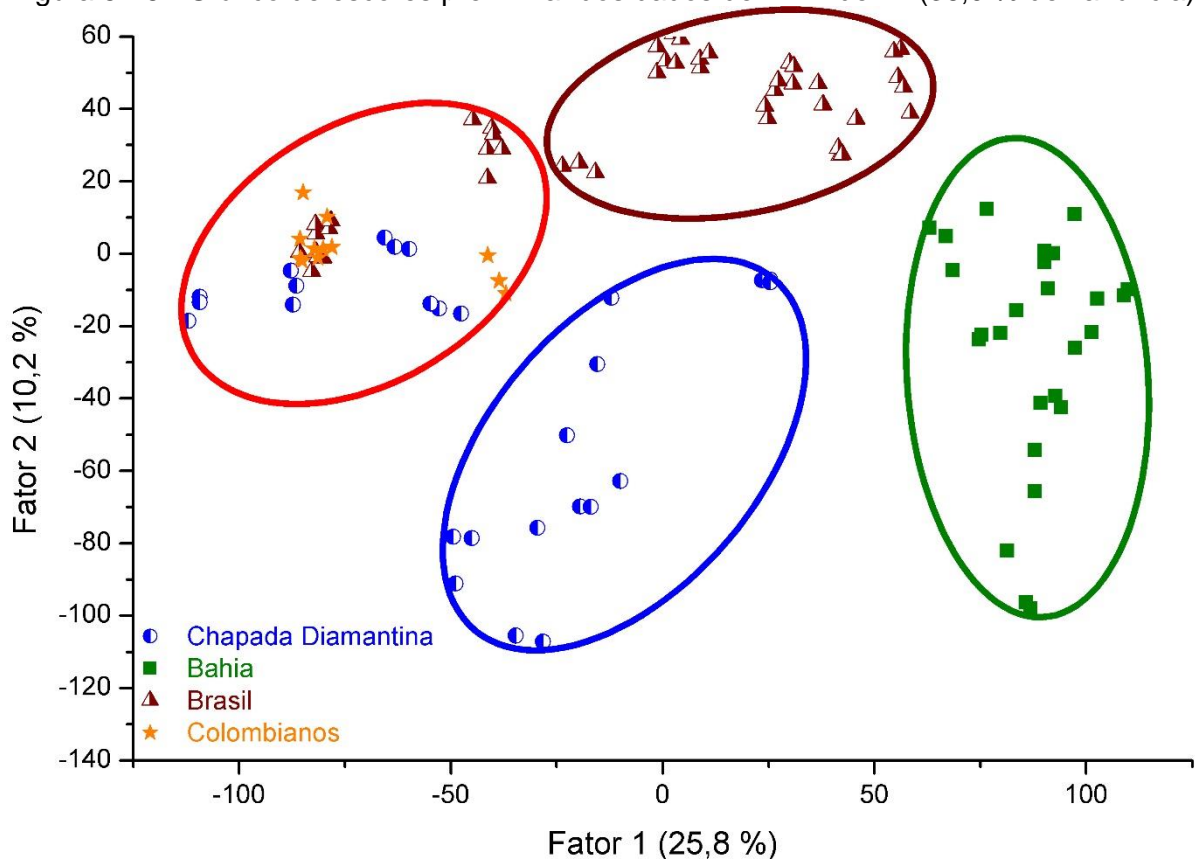
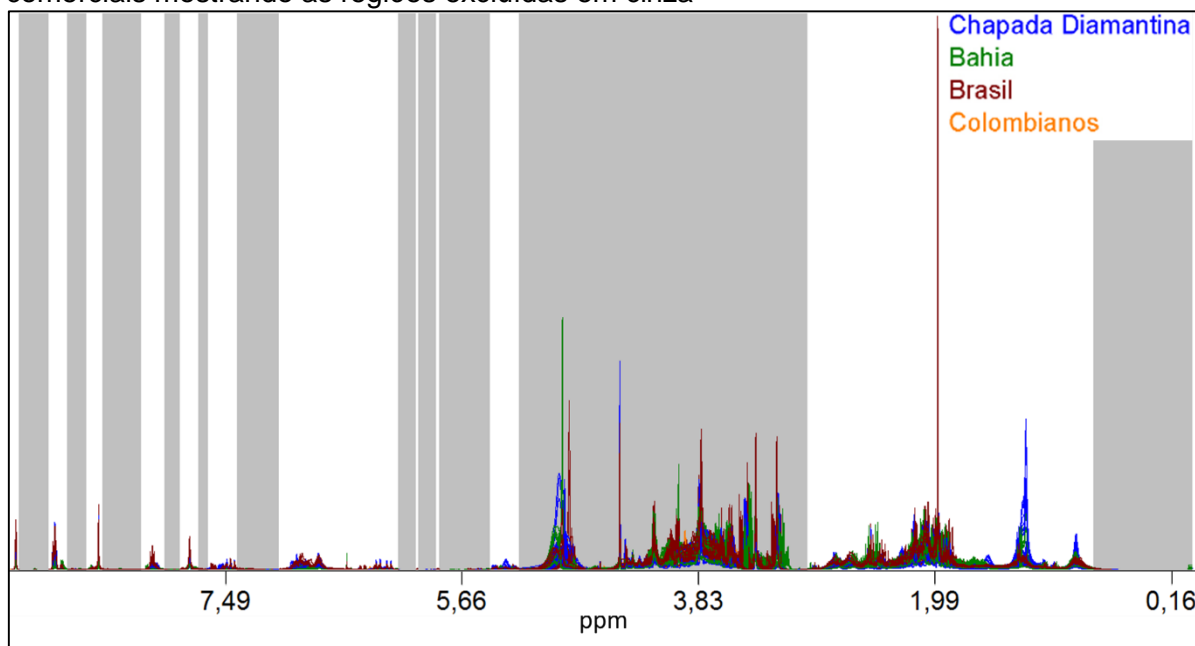


Figura 5-16 - Gráfico de escores preliminar dos dados de RMN de ^1H (36,0 % de variância)



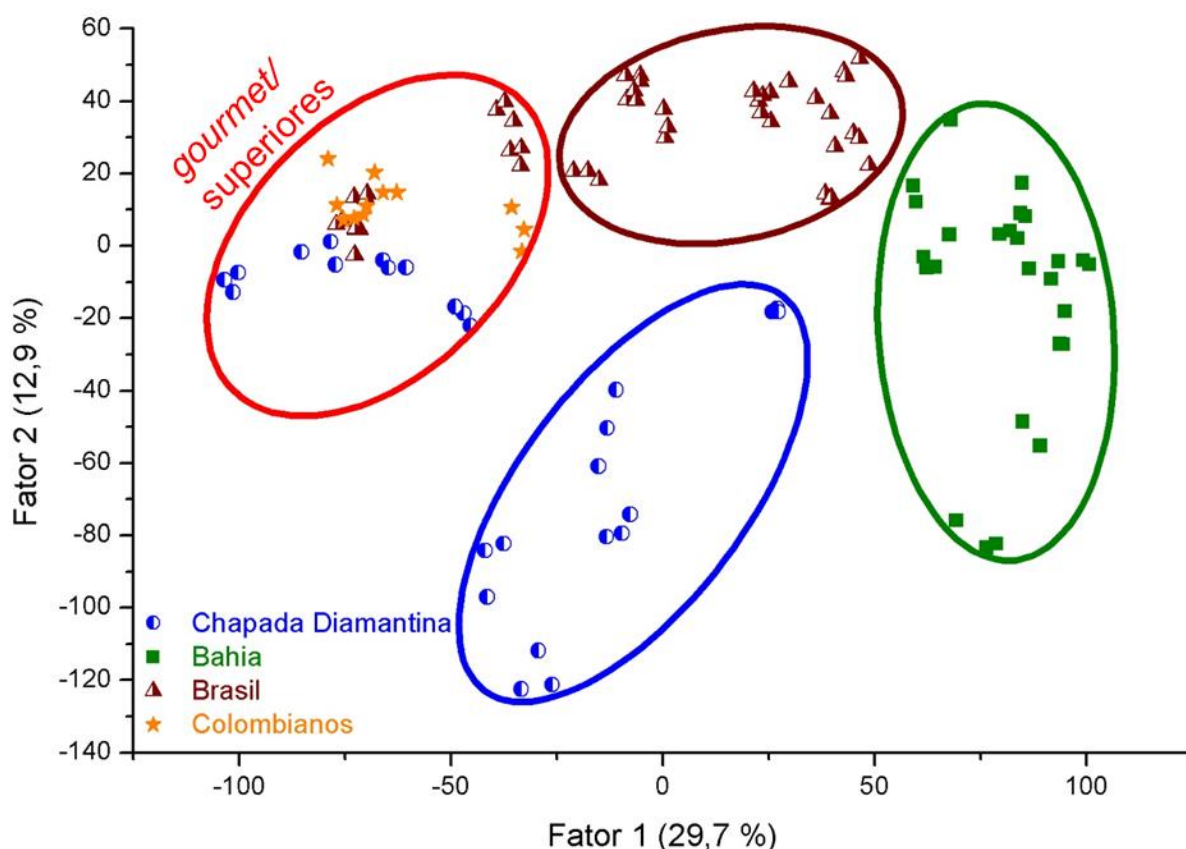
Para a obtenção do melhor resultado na análise por PCA (*Principal Component Analysis*) foram excluídas as regiões dos espectros que não contribuíram para o resultado de discriminação, além disso, estas regiões de exclusão foram verificadas de forma que proporcionassem a melhor discriminação das amostras, o resultado alcançado está apresentado na Figura 5-17.

Figura 5-17 - Gráfico de linhas dos espectros de RMN de ^1H do extrato aquosos de cafés comerciais mostrando as regiões excluídas em cinza



A variância dos dados explicada pelas componentes principais PC1 e PC2 é de 42,6% e as informações disponíveis nos espectros de RMN permitiram obter uma análise satisfatória com relação ao comportamento das amostras. Na Figura 5-18 está mostrado o gráfico de escores obtido para a análise quimiométrica dos dados de RMN dos cafés estudados, sendo que cada ponto representa replicata amostral. Dessa forma, entende-se que para os pontos que se encontram próximos a composição química (entre as amostras) é semelhante, e que os pontos que se encontram relativamente distantes equivalem a uma distinção na composição química das amostras.

Figura 5-18 - Gráfico de escores dos dados de RMN de ^1H (42,6 % de variância)



O gráfico de escores mostrou uma distinção entre as amostras de forma a discriminá-las com facilidade com relação a procedência geográfica, como é o caso dos cafés da Chapada Diamantina, os das demais regiões da Bahia e os provenientes de outros estados brasileiros. Além disso, os resultados permitiram discriminar as amostras quanto a classificação de qualidade no que diz respeito aos cafés *gourmets* e/ou superiores em relação aos tradicionais (cafés da Bahia e Brasil). Os da Chapada Diamantina não são classificados como tradicionais, uma vez que todas as amostras pertencentes a esse grupo foram de qualidade *gourmet*, orgânico e clássico.

Em uma primeira análise, sabe-se que a composição química é resultado de distintos processos que vão desde a pré-colheita até o armazenamento do produto final, neste contexto, a composição química de origem, ou seja, a informação química de registro geográfico pode passar por diversas transformações. Embora isto aconteça, o perfil químico final da bebida pode trazer partes desse registro metabólico original do fruto, fato que ao observar as informações químicas evidenciadas pela quimiometria leva principalmente a discriminação entre as amostras da Chapada Diamantina e de outros estados brasileiros.

A semelhança na composição química solúvel no extrato aquoso das amostras do grupo *gourmet*/superiores dispensou a variável origem geográfica, isto é, em um único grupo foram agrupados cafés provenientes da Chapada Diamantina, de alguns estados brasileiros e da Colômbia. Este resultado, evidenciou a influência dos recursos de produção adotados pelos produtores na composição química destas amostras para alcançar tal classificação de qualidade, além disso, a espécie pode ser o principal fator de influência para a observação deste grupo, pois estas amostras são exclusivamente da *Coffea arabica*, cuja a qual é conhecida por proporcionar uma composição metabólica inicial favorável aos agradáveis sabores deste alimento.

Para compreender melhor o resultado observado no gráfico de escores, as componentes PC1 e PC2 foram analisadas separadamente. A componente principal PC1 foi responsável por 29,7 % dos dados que discriminam as amostras. Analisando-se a discriminação das amostras com relação a essa componente, foi observado que os cafés *gourmet* e superiores foram agrupados em valores negativos de PC1 enquanto que as amostras de outras regiões da Bahia se concentraram em valores positivos desta componente. Foi constatado também que as amostras da Chapada Diamantina apresentaram uma maior tendência a se concentrarem em valores negativos de PC1, ao passo que os cafés dos demais estados brasileiros apresentaram em uma região central do gráfico (-25 a 50 em valores de PC1). Dessa forma, é possível verificar que a discriminação principal observada em PC1 está entre os cafés *gourmet* e superiores e aqueles produzidos nas várias regiões do estado da Bahia.

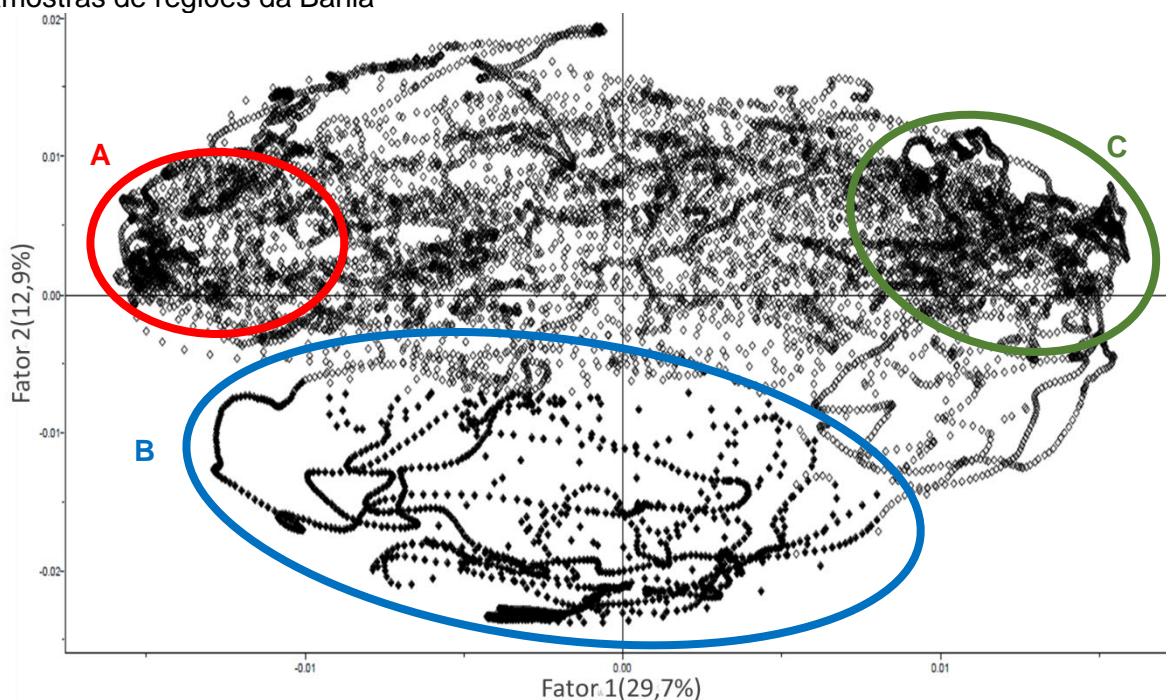
Analisando a discriminação observada ao longo do eixo PC2, que descreveu somente 12,9 % dos dados, é possível observar que todas as amostras da Chapada Diamantina concentraram-se em valores negativo de PC2, enquanto que praticamente todas as amostras de outros estados brasileiros se concentraram em valores positivo de PC2, mesmos aquelas classificadas para o grupo *gourmet*/superiores. As amostras provenientes de outras regiões da Bahia e as que se agruparam em *gourmet*/superiores não apresentaram uma discriminação com relação a PC2.

Após analisar a distribuição das amostras ao longo das PCs, pode-se buscar no gráfico de *loadings* as correlações capazes de identificar as variáveis responsáveis por esse resultado. Os espectros representativos de cada grupo

discriminado na PCA podem ser observados nos Apêndices (A, B, C e D) deste trabalho (páginas 91 a 94).

O gráfico de *loadings* (Figura 5-19) mostrou que grande parte das variáveis que descrevem PC1 encontram-se predominantemente na região positiva de PC2 com concentração evidente na região circulada em verde (“C”) e outra pequena tendência de concentração na região circulada em vermelho (“A”). O gráfico de escores sugere que estas regiões (“A” e “C”) são de predominância das amostras *gourmet*/superiores e de regiões da Bahia, respectivamente. Outro fato interessante a ser destacado neste gráfico são as variáveis que discriminam as amostras da Chapada Diamantina, pois trata-se da porção facilmente identificada e destacada em azul (“B”). A seleção destes pontos evidenciou no espectro de ^1H (Figura 5-20 e Figura 5-21) os sinais dos constituintes que permitiram a distinção dessas amostras.

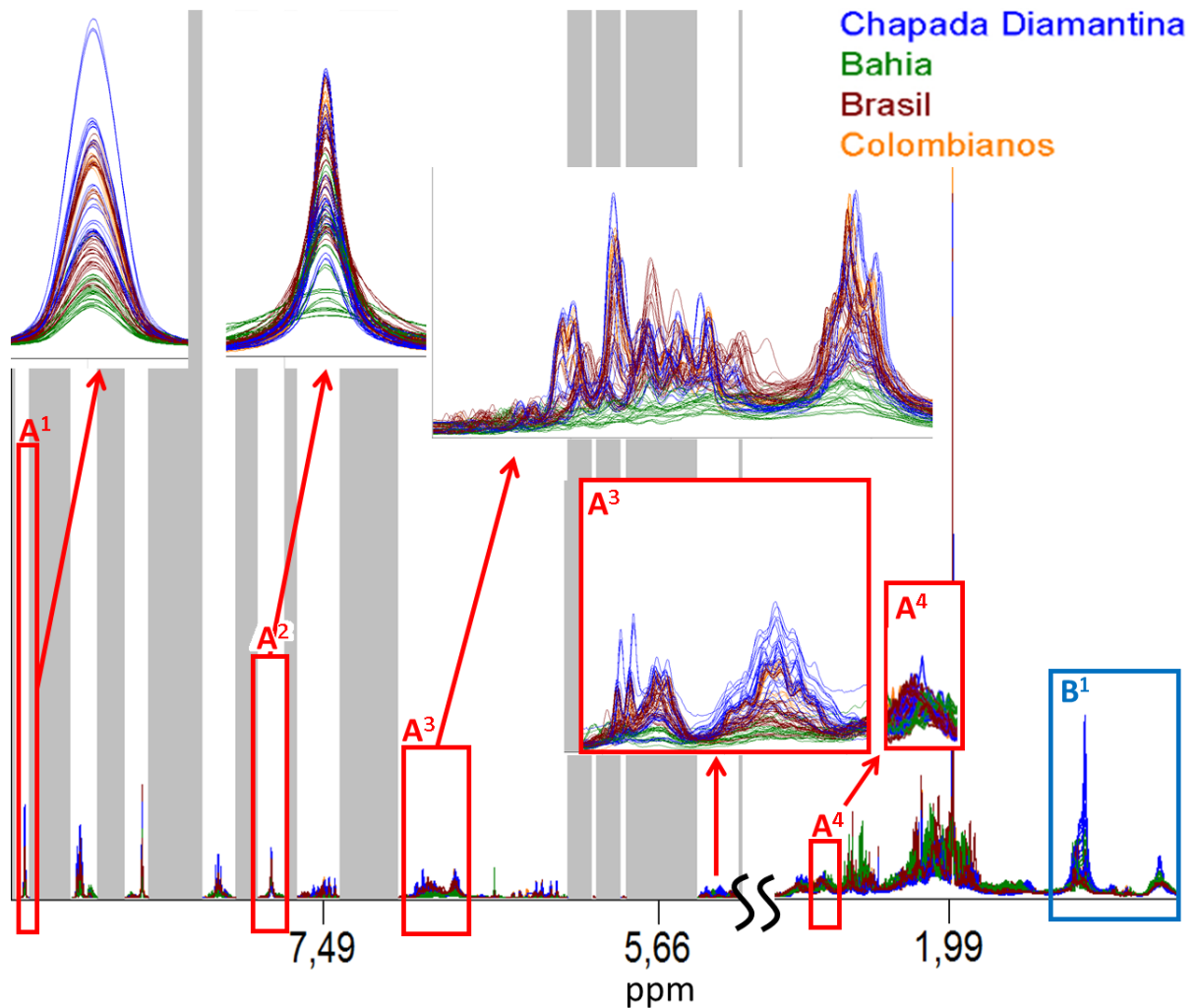
Figura 5-19 - Gráfico de *loadings* representando a influência das variáveis em PC1 e PC2. A: principais variáveis que descrevem o grupo *gourmet*/superiores; B: principais variáveis de descrevem amostras da Chapada Diamantina/BA; C: variáveis que caracterizaram as amostras de regiões da Bahia



Observando-se a Figura 5-19 é possível verificar no espectro de RMN de ^1H as informações que foram destacadas na Figura 5-20 e que são responsáveis pela discriminação dos cafés da Chapada Diamantina e do grupo *gourmet*/superiores. A composição química “B-1” que caracterizou as amostras da Chapada Diamantina

correspondem ao considerável conteúdo de lipídios (sinais em 0,98, entre 1,22 e 1,71 e na região compreendida entre 5,20 e 5,38 ppm). É possível observar o sinal da trigonelina “A-1” (9,12 ppm), cafeína “A-2” (7,77 ppm), ácidos clorogênicos “A-3” (6,75 – 7,05 ppm) e sinais de ácidos orgânicos “A-4” (2,62 – 2,71 ppm), os quais correspondem aos constituintes descritores do grupo *gourmet*/superiores.

Figura 5-20 - Principais variáveis responsáveis pela discriminação dos cafés da Chapada Diamantina (B-1) e do grupo *gourmet*/superiores (A-1, A-2, A-3 e A-4), evidenciadas pelo gráfico de *loadings*

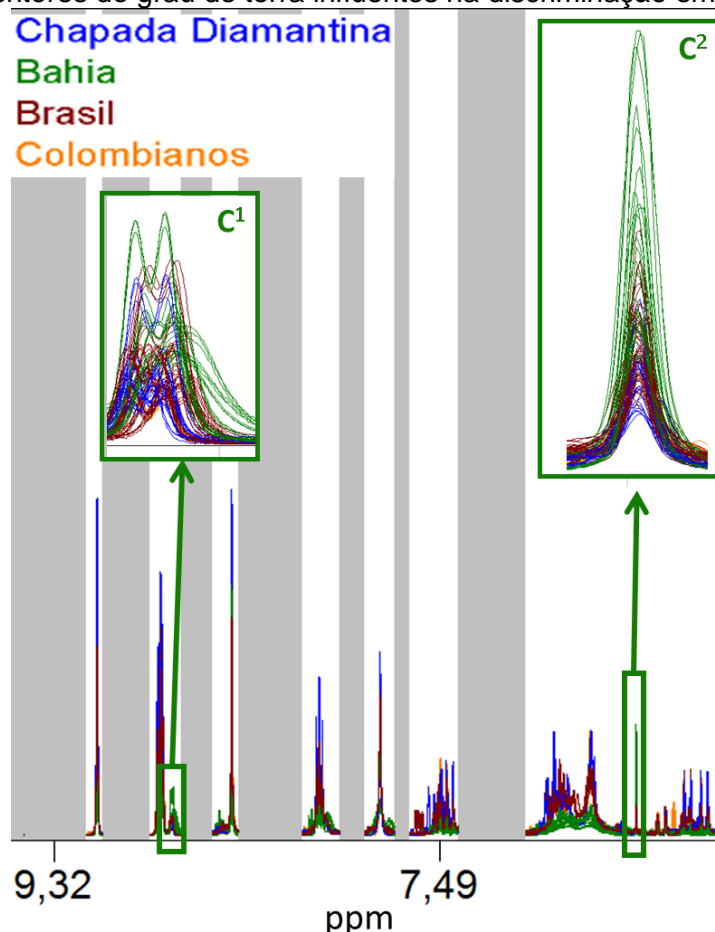


A-1: trigonelina; A-2: cafeína; A-3: ácidos clorogênicos; A-4: ácidos orgânicos; B-1: lipídios.

Ainda analisando o resultado do gráfico de *loadings*, foi possível observar que as variáveis as quais tratam-se de produtos de degradação térmica intensificam seu sinal (da esquerda para a direita) ao longo de PC1, a exemplo do cátion *N*-metilpiridínio “C-1” (8,77 ppm), que melhor discriminou as amostras pelo grau de torra, enquanto que o ácido fumárico “C-2” (8,46 ppm), reportado como metabólito

característico de espécies resistente a parasitas⁴¹, caracterizou principalmente os cafés de regiões da Bahia (Figura 5-21).

Figura 5-21 - Descritores do grau de torra influentes na discriminação em PC1



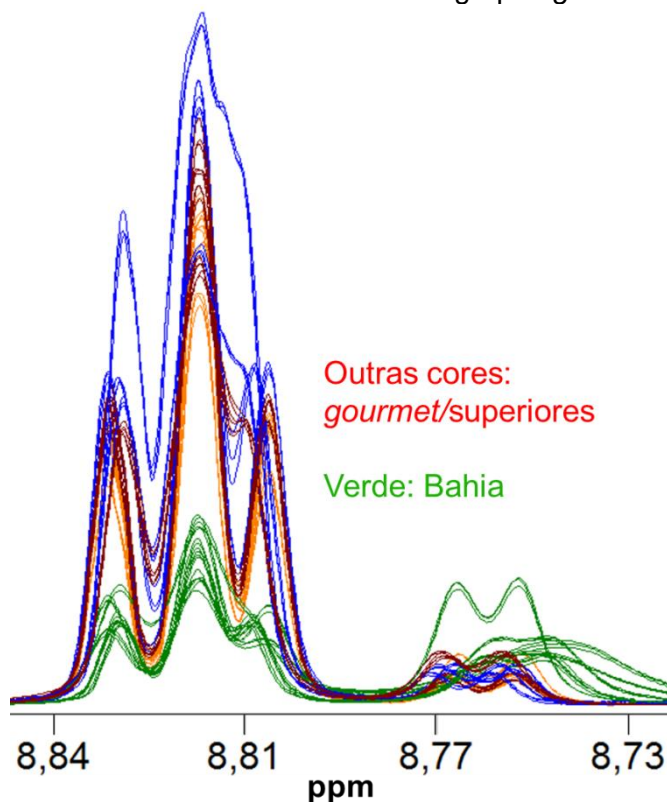
C-1: cátion *N*-metilpiridínio; C-2: ácido fumárico.

As amostras provenientes de regiões da Bahia apresentaram maiores relações com o que caracteriza composição química e alto grau de torra,²¹ esta informação é melhor observada na Figura 5-22. Pode-se notar que o sinal da trigonelina é menor para as amostras mais torradas, enquanto que o sinal do cátion *N*-metilpiridínio é mais intenso para essas amostras.

A razão da área do sinal do cátion *N*-metilpiridínio (8,77 ppm) com relação a área do sinal da trigonelina (9,12 ppm) para as amostras do grupo *gourmet*/superior foi de $0,139 \pm 0,03$ enquanto que este valor para as amostras do grupo Bahia foi de $1,260 \pm 0,38$, expressando um aumento no teor do produto de degradação térmica de nove vezes para as amostras mais torradas. Com isso, foi possível verificar que os cafés classificados como *gourmet*/superiores apresentam os menores graus de torras, enquanto que os cafés do grupo Bahia possuem uma torra nove vezes mais

elevada. Estas observações referentes à torra concordam com os rótulos das amostras comerciais. Em consequência disto, ambos os grupos (Bahia e *gourmet/superiores*) apresentaram-se nas extremidades do eixo PC1 do gráfico de escores apresentado na Figura 5-18.

Figura 5-22 - Comparação entre o sinal da trigonelina em 8,83 ppm e cátion *N*-metilpiridínio em 8,77 ppm dos dados de RMN ^1H das amostras dos grupos *gourmet/superiores* e Bahia



A relação dos dados químicos dos cafés *gourmet/superiores* com diferentes origens de produção (Chapada Diamantina, Minas Gerais, São Paulo e Colômbia) sugere que quando os critérios de produção e processamento do fruto até o produto final são bem aplicados, os produtos podem apresentar um perfil químico em comum, e como consequência disto, os produtos correspondem a um padrão de qualidade característico.

Além disso, a composição química inicial é importante para que se possa alcançar a qualidade desejada. Sendo assim, essas observações evidenciam que a produção desta bebida deve ser realizada de maneira criteriosa, a fim de fornecer as condições adequadas para que a composição química inicial possa alcançar as transformações necessárias, de forma a fornecer os produtos dos quais proporcionam as propriedades organolépticas desejáveis.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação da composição química na bebida do café pela análise dos espectros de RMN foi importante para a compreensão do comportamento desses dados no tratamento quimiométrico, o qual teve por objetivo identificar as variáveis cuja as quais influenciaram parâmetros de interesse, a exemplo dos marcadores de procedência geográfica ou de característica da qualidade sensorial da bebida.

Este trabalho mostrou que os extratos aquosos dos cafés comerciais provenientes da região da Chapada Diamantina possuem uma composição química rica em lipídios, ácidos orgânicos e ácidos clorogênicos, como consequência proporcionou a estes cafés características únicas de forma a discrimina-los das demais amostras.

Os resultados mostraram ainda, que o perfil químico o qual descreveu as amostras de qualidade *gourmet*/superiores também possuem uma composição rica em ácidos orgânicos, como os ácidos clorogênicos, málico e cítrico. Estas amostras apresentaram ainda baixas intensidades dos sinais do cátion *N*-metilpiridínio e de lipídios, o que pode ter mais relação com as técnicas de produção do que simplesmente a sua origem, entretanto a origem dos cafés é responsável por oferecer a composição química inicial a ser transformada nas etapas de produção.

De maneira geral, os resultados deste trabalho foram satisfatórios e permitiram desenvolver uma análise química e estatística bastante coerente com o que é observado na literatura de RMN e quimiometria no estudo desta matriz.

As sugestões sobre este tema para trabalhos futuros discorrem em: compreender melhor a natureza do conteúdo lipídico dos cafés provenientes da região da Chapada Diamantina, bem como conhecer a composição metabólica que compões estes óleos de café; compreender a influência na composição química, dos diferentes métodos de produção e cultivo deste alimento pelos produtores de cafés da Chapada Diamantina; buscar mais descritores metabólicos para denominação de origem destes cafés por meio de outras abordagens metodológicas.

REFERÊNCIAS

- 1 Martins-Neto, F. L. **Caracterização e avaliação da sustentabilidade da cafeicultura na Chapada Diamantina - BA**. 2009. 189 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, 2009.
- 2 SEI – Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia. **SEI**, p. 1,. Disponível em:
http://www.sei.ba.gov.br/site/geoambientais/mapas/pdf/municipal/mapa_descritivo_2924306_1.pdf. Acessado em 30 mar de 2019.
- 3 INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **INPE**. Disponível em:
<http://sinda.crn.inpe.br/PCD/SITE/novo/site/index.php>. Acessado em 18 de abr de 2019.
- 4 Cup of Excellence Brazil Pulped Naturals 2018. **Alliance for Coffee Excellence**. Disponível em: <https://allianceforcoffeexcellence.org/brazil-pulped-naturals-2018/>. Acessado em 26 de fev 2019.
- 5 Vidal, H. M. **Composição lipídica e a qualidade do café (*Coffea arabica L.*) durante armazenamento**. 2001. 92 f. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2001.
- 6 Hertz-Schünemann, R. et al. Looking into individual coffee beans during the roasting process: direct micro-probe sampling on-line photo-ionisation mass spectrometric analysis of coffee roasting gases. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 7083–7096, set. 2013.
- 7 Nascimento, E. A. Do et al. Composição química do café conillon em diferentes graus de torração. **Ciencia y Engenharia/ Science and Engineering Journal**, v. 16, p. 17–21, dez. 2007.
- 8 Tavares, L. A. **Utilização de Métodos Quimiométricos Aliados a RMN na Caracterização dos Diferentes Tipos de Cafés Comerciais**. 2007. 194 f. Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2007.
- 9 Alves, R. C.; Casal, S.; Oliveira, B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade?. **Química Nova**, v. 32, p. 2169–2180, nov. 2009.
- 10 Martins, M. **Caracterização de sistemas orgânicos de produção de café utilizados por agricultores familiares em Poço Fundo/MG**. 2003. 206 f. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2003.
- 11 Nogueira, M.; Trugo, L. C. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 296–299, ago. 2003.
- 12 Ciaramelli, C. et al. NMR-driven identification of anti-amyloidogenic compounds in green and roasted coffee extracts. **Food Chemistry**, v. 252, p. 171–180, jun. 2018.

- 13 Villalón-López, N. et al. An ^1H NMR-based metabolomic approach to compare the chemical profiling of retail samples of ground roasted and instant coffees. **Food Research International**, v. 106, p. 263–270, abr. 2018.
- 14 Wei, F. et al. A pilot study of NMR-based sensory prediction of roasted coffee bean extracts. **Food Chemistry**, v. 152, p. 363–369, jun. 2014.
- 15 Wei, F. et al. Two-Dimensional ^1H – ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-Based Comprehensive Analysis of Roasted Coffee Bean Extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 9065–9073, set. 2011.
- 16 Wei, F. et al. Complex mixture analysis of organic compounds in green coffee bean extract by two-dimensional NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 48, p. 857–865, nov. 2010.
- 17 Toci, A. T. et al. Fingerprint and authenticity roasted coffees by ^1H -NMR: the Brazilian coffee case. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, p. 19–26, fev. 2018.
- 18 Tavares, L. A.; Ferreira, A. G. Análises quali- e quantitativa de cafés comerciais via ressonância magnética nuclear. **Química Nova**, v. 29, p. 911–915, out. 2006.
- 19 Frank, O. et al. Structure Determination of 3- *O* -Caffeoyl- *epi* - γ -quinide, an Orphan Bitter Lactone in Roasted Coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 9581–9585, out. 2008.
- 20 D'Amelio, N. et al. NMR Studies of Hetero-Association of Caffeine with *di-O*-Caffeoylquinic Acid Isomers in Aqueous Solution. **Food Biophysics**, v. 10, p. 235–243, set. 2015.
- 21 Febvay, L. et al. Identification of markers of thermal processing (“roasting”) in aqueous extracts of *Coffea arabica* L. seeds through NMR fingerprinting and chemometrics. **Magnetic Resonance in Chemistry**, p. 1–14, fev. 2019.
- 22 Farah, A. et al. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, v. 98, p. 373–380, jan. 2006.
- 23 Trugo, L. C.; Macrae, R. Chlorogenic acid composition of instant coffees. **The Analyst**, v. 109, p. 263, 1984.
- 24 Zhao, Y. et al. Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids. **Hypertension Research**, v. 35, p. 370–374, abr. 2012.
- 25 Yanuka, Y.; Bergmann, F. Spectroscopic studies on caffeine and isocaffeine. **Tetrahedron**, v. 42, p. 5991–6002, jan. 1986.
- 26 VIANI, R.; HORMAN, I. Thermal behavior of trigonelline. **Journal of Food Science**, v. 39, p. 1216–1217, nov. 1974.

- 27 Jeszka-Skowron, M.; Zgoła-Grześkowiak, A.; Grześkowiak, T. Analytical methods applied for the characterization and the determination of bioactive compounds in coffee. **European Food Research and Technology**, v. 240, p. 19–31, jan. 2015.
- 28 Howell, L. L.; Coffin, V. L.; Spealman, R. D. Behavioral and physiological effects of xanthines in nonhuman primates. **Psychopharmacology**, v. 129, p. 1–14, jan. 1997.
- 29 Prediger, R. D. S. Effects of Caffeine in Parkinson's Disease: From Neuroprotection to the Management of Motor and Non-Motor Symptoms. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, p. S205–S220, abr. 2010.
- 30 Arendash, G. W.; Cao, C. Caffeine and Coffee as Therapeutics Against Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, p. S117–S126, abr. 2010.
- 31 Tai, J. et al. Antiproliferation Effect of Commercially Brewed Coffees on Human Ovarian Cancer Cells In Vitro. **Nutrition and Cancer**, v. 62, p. 1044–1057, nov. 2010.
- 32 Toci, A. T.; Farah, A. Volatile fingerprint of Brazilian defective coffee seeds: corroboration of potential marker compounds and identification of new low quality indicators. **Food Chemistry**, v. 153, p. 298–314, jun. 2014.
- 33 Bandeira, R. D. C. C. et al. Composição volátil dos defeitos intrínsecos do café por CG/EM-headspace. **Química Nova**, v. 32, p. 309–314, 2009.
- 34 Murkovic, M.; Pichler, N. Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in coffee, dried fruits and urine. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, p. 842–846, set. 2006.
- 35 SCA Cupping Protocols. **Specialty Coffee Association**. Disponível em: <https://sca.coffee/research/protocols-best-practices>. Acessado em 04 mar 2019.
- 36 Keyhani, A. **PY/GC/MS Investigation of the mechanism of Maillard reaction using isotopically enriched amino-acids and D-glucoses**. 1997. 182 f - Macdonald Campus, McGill University, 1997.
- 37 Verardo, G. et al. New procedures for determination of acids in coffee extracts, and observations on the development of acidity upon ageing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 374, p. 879–885, nov. 2002.
- 38 SCAA roast classification color disk. Speciality Coffee American Association. In: MORALES, E. V. **Influência do fator de extração do café torrado e granulado e injeção de gás na formação de espuma no café solúvel tipo spray drier**, 2014. 67 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil, 2014.
- 39 Ginz, M. et al. Formation of aliphatic acids by carbohydrate degradation during roasting of coffee. **European Food Research and Technology**, v. 211, p. 404–410, nov. 2000.

- 40 Atzori, L. et al. Glycolic acid peeling in the treatment of acne. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 12, p. 119–122, mar. 1999.
- 41 Machado, A. R. T. et al. Metabolic profiling in the roots of coffee plants exposed to the coffee root-knot nematode, *Meloidogyne exigua*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 134, p. 431–441, out. 2012.
- 42 Linker, R. A. et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. **Brain**, v. 134, p. 678–692, mar. 2011.
- 43 Lingle, R. **The Coffee Cupper's Handbook: A Systematic Guide to the Sensory Evaluation of Coffee's Flavor**. 4a. ed . California, 2011.
- 44 Bertrand, B. et al. Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2575–2583, dez. 2012.
- 45 S, A. **Perfume and flavor chemicals (Aroma chemical)** . USA: Carol Stream, 1969.
- 46 Lee, C. et al. Development of a simultaneous multiple solid-phase microextraction-single shot-gas chromatography/mass spectrometry method and application to aroma profile analysis of commercial coffee. **Journal of Chromatography A**, v. 1295, p. 24–41, jun. 2013.
- 47 Ribeiro, J. S. **Previsão de diferentes atributos sensoriais ligados à qualidade do café arábica brasileiro utilizando-se métodos analíticos distintos e ferramentas quimiométricas**. 2009. 302 f. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2009.
- 48 Rogers, W. J. et al. Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. **Plant Science**, v. 149, p. 115–123, dez. 1999.
- 49 Rosa, G. M. **Análise química e atividade antioxidante de quatro amostras de café (coffea arabica) comerciais**. 2010. 116 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.
- 50 Speer, K.; Kölling-Speer, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 201–216, mar. 2006.
- 51 Calligaris, S. et al. Insights into the physicochemical properties of coffee oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, p. 1270–1277, dez. 2009.

52 Williamson, K.; Hatzakis, E. NMR analysis of roasted coffee lipids and development of a spent ground coffee application for the production of bioplastic precursors. **Food Research International**, v. 119, p. 683–692, out. 2018.

53 Viani, R. **Caffeine, coffee, and health** . Raven Press: New York, 1993.

54 Kocadağlı, T. et al. In depth study of acrylamide formation in coffee during roasting: role of sucrose decomposition and lipid oxidation. **Food & Function**, v. 3, p. 970, 2012.

55 Oliveira, A. L. de et al. Brazilian roasted coffee oil obtained by mechanical expelling: compositional analysis by GC-MS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 677–682, dez. 2005.

56 Sarrazin, C. et al. Representativeness of coffee aroma extracts. **Food Chemistry**, v. 70, p. 99–106, jul. 2000.

57 Raba, D. N. et al. Investigation on Crude and High-Temperature Heated Coffee Oil by ATR-FTIR Spectroscopy along with Antioxidant and Antimicrobial Properties. **PLOS ONE**, v. 10, p. 1–20, set. 2015.

58 Wei, F. et al. ¹³C NMR-Based Metabolomics for the Classification of Green Coffee Beans According to Variety and Origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 10118–10125, out. 2012.

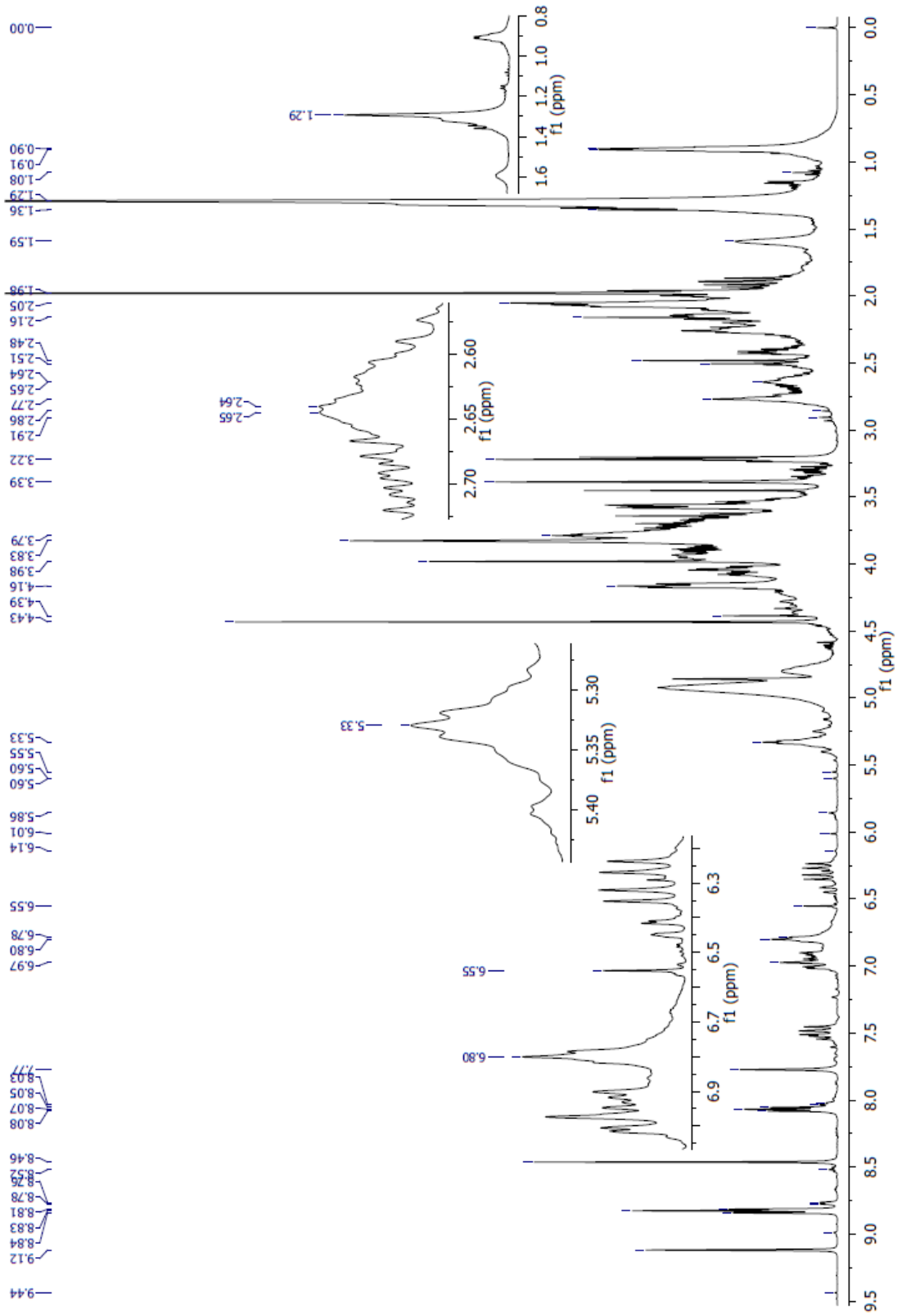
59 Jacobsen, N. E. Em Carbon-13 (¹³C) NMR Spectroscopy. In: Wiley, J.; Sons, I. **NMR Spectroscopy Explained**; New Jersey: EUA, H., orgs.; 2a. ed . 2007, cap. 4, p. 135.

60 Casal, S. et al. Discriminate Analysis of Roasted Coffee Varieties for Trigonelline, Nicotinic Acid, and Caffeine Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3420–3424, ago. 2000.

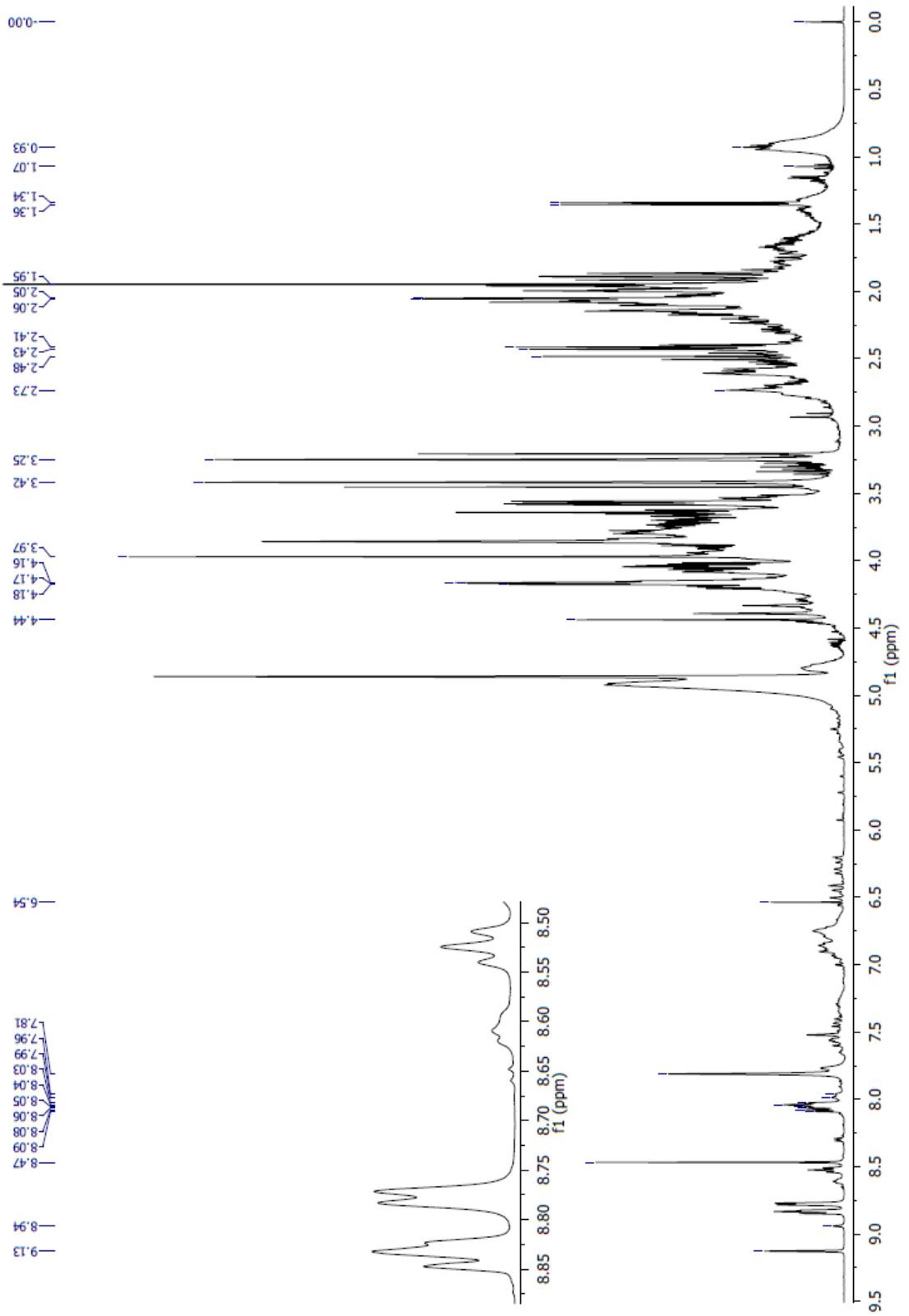
61 Ferreira, M. M. C. **Quimiometria - conceitos, métodos e aplicações** . São Paulo: São Paulo, 2015.

62 Savorani, F.; Tomasi, G.; Engelsen, S. B. icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 202, p. 190–202, fev. 2010.

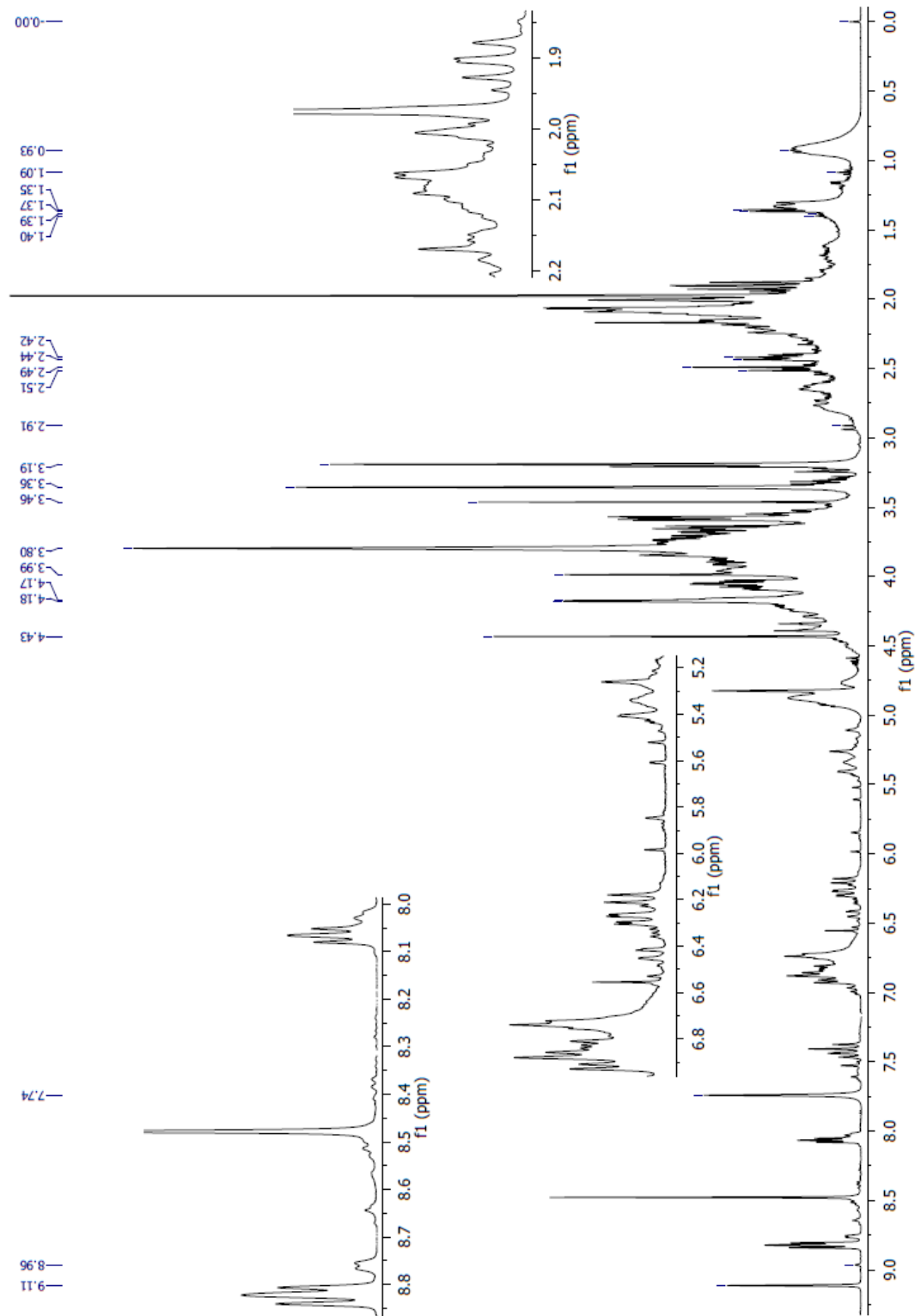
APÊNDICE A – Espectro de RMN de ^1H de uma amostra representativa do Grupo Chapada Diamantina/Bahia



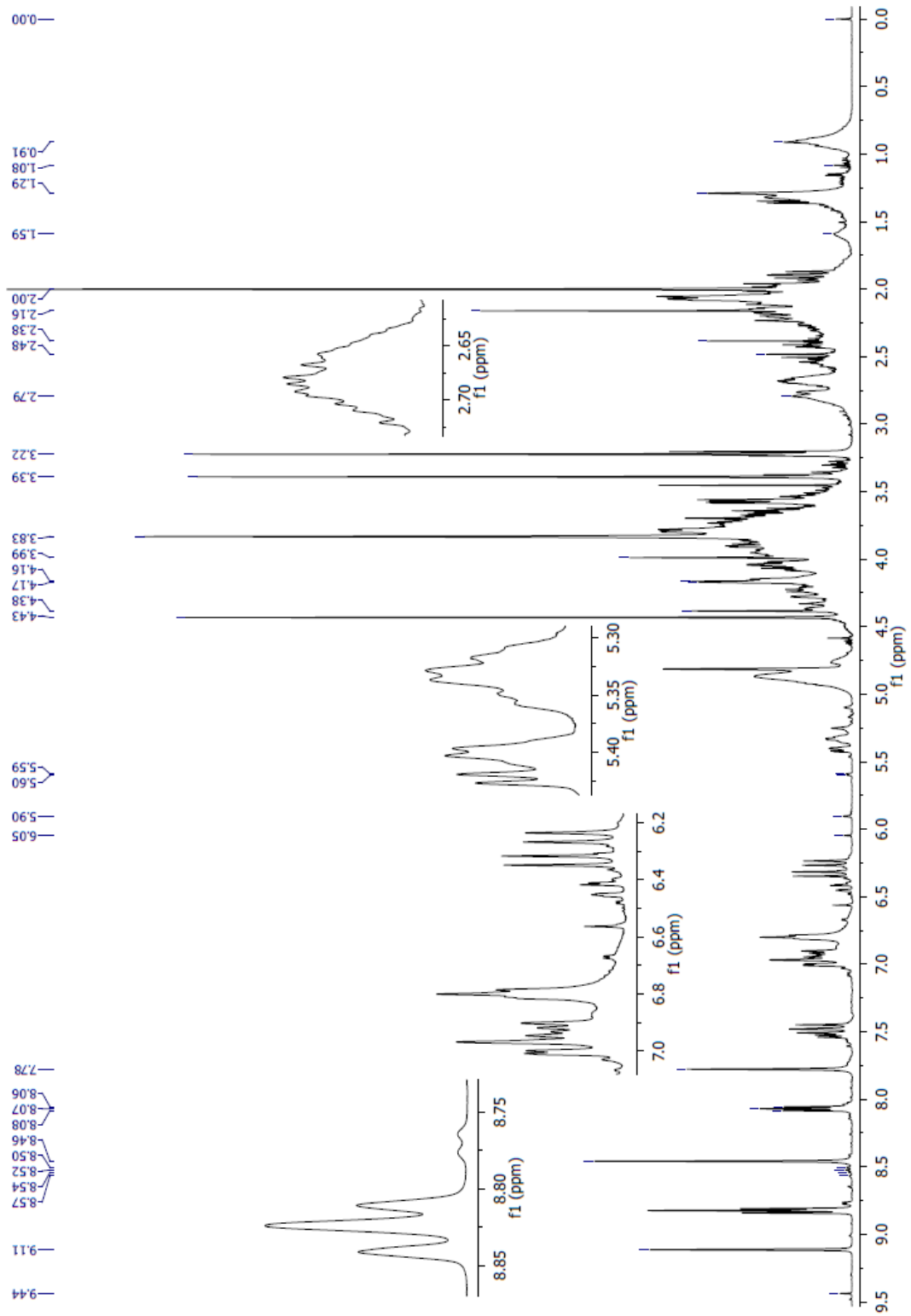
APÊNDICE B - Espectro de RMN de ¹H de uma amostra representativa do Grupo Bahia



APÊNDICE C - Espectro de RMN de ^1H de uma amostra representativa do Grupo Brasil



APÊNDICE D - Espectro de RMN de ^1H de uma amostra representativa do Grupo *gourmet*/superiores



ANEXO A

Espectro, com atribuições, retirado do artigo: Villalón-López, N. e colaboradores intitulado “An ^1H NMR-based metabolomic approach to compare the chemical profiling of retail samples of ground roasted and instant coffees” Publicado na revista Food Research International, v. 106, p. 263–270, abr. 2018.

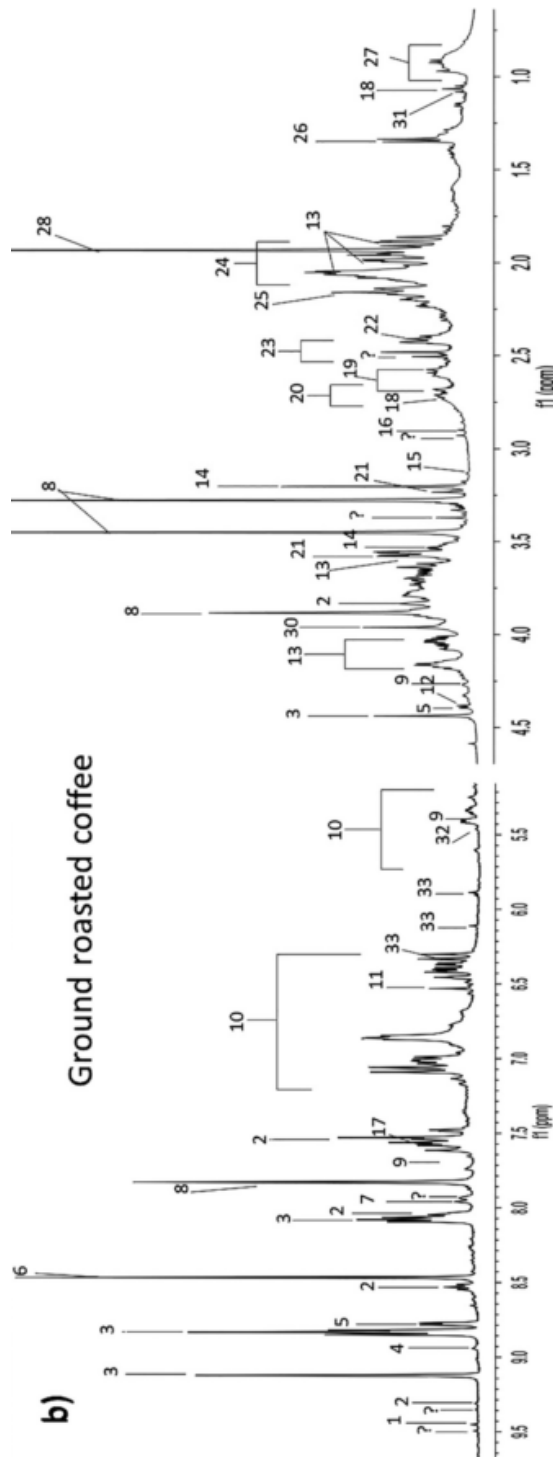


Fig. 1. ^1H NMR spectra (500 MHz, 25 °C) of the pooled extracts of (a) instant coffee and (b) ground roasted coffee. The metabolites identified are: 1, 5-HMF; 2, methylnicotinate; 3, trigonelline; 4, nicotinic acid; 5, *N*-methylpyridinium; 6, formic acid; 7, xanthine; 8, caffeine; 9, chlorogenic acid; 10, caffeoylquinic acid; 11, fumaric acid; 12, tartaric acid; 13, quinic acid; 14, choline; 15, malonic acid; 16, trimethylamine; 17, 2-furylmethanol; 18, 2-oxobutyric acid; 19, malic acid; 20, citric acid; 21, *myo*-inositol; 22, succinic acid; 23, γ -quinide; 24, *syllo*-quinic acid; 25, γ -butyrolactone; 26, lactic acid; 27, lipids; 28, acetic acid; 29, carbohydrates; 30, glycolic acid; 31, propionic acid; 32, sucrose; 33, acrylamide.