

**ANA PAULA CRAIG CARNEIREIRO**

**DISCRIMINAÇÃO DE CAFÉS CRUS SADIOS E  
DEFEITUOSOS POR MEIO DE  
ESPECTROSCOPIA NO  
INFRAVERMELHO MÉDIO**

**Faculdade de Farmácia da UFMG**

**Belo Horizonte, MG**

**2010**

**ANA PAULA CRAIG CARNEIREIRO**

**DISCRIMINAÇÃO DE CAFÉS CRUS SADIOS E  
DEFEITUOSOS POR MEIO DE  
ESPECTROSCOPIA NO  
INFRAVERMELHO MÉDIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Adriana Silva França, Ph.D

**Faculdade de Farmácia da UFMG**

**Belo Horizonte, MG**

**2010**

*Folha de Aprovação*

## AGRADECIMENTOS

À professora Adriana Silva França pela oportunidade, credibilidade e por estar sempre presente, me orientando e contribuindo positivamente com a minha formação.

Ao professor Leandro Soares de Oliveira pelos ensinamentos e pelas idéias que foram fundamentais ao meu trabalho.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG, em especial ao professor Roberto Junqueira, pelo apoio nas análises estatísticas, e ao professor David Lee Nelson, pelos ensinamentos e contribuições em espectroscopia.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições positivas para este trabalho.

À professora Lúcia Peret de Almeida, do Centro Universitário de Belo Horizonte (Uni-BH), onde me graduei, pelo incentivo e amizade.

Ao Bruno Tavares, do Café Fino Grão, por permitir a minha visita à indústria e ceder amostras de café, e ao pessoal do Controle de Qualidade pelas instruções.

À equipe do Sindicafé pelos ensinamentos valiosos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À toda minha família pelo estímulo e imenso carinho. Em especial, agradeço à minha mãe pela minha formação como pessoa e por estar sempre presente, me apoiando e acreditando em mim. Ao meu pai pelo incentivo e pelos momentos agradáveis, que eu gostaria de ter durante o ano todo. Aos meus queridos irmãos, Marcelo e Zequinha, que apesar da distância estão sempre em meus pensamentos, pelas risadas e pela cumplicidade.

Ao Daniel pelo carinho e companheirismo. Às amiga pela torcida, em especial, Cris, Gli e Vê, pela presença constante, e Marcela e Miri, pelas conversas e encontros sempre prazerosos.

Aos meus colegas de laboratório, Adriana, Carla, Cibele, Dalila, Diego, Hélia, Felipe, Luis, Nádia, Rafael e Rodrigo, pela boa companhia e troca de idéias.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Finalmente, agradeço à Deus por estar sempre iluminando o meu caminho.

# SUMÁRIO

	Página
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	7
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	11
<b>RESUMO</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
<b>2.1 O CAFÉ</b> .....	17
<b>2.1.1 Beneficiamento do café</b> .....	17
2.1.1.1 Recepção e separação .....	17
2.1.1.2 Processamento .....	19
2.1.1.3 Rebeneficiamento .....	20
2.1.1.4 Torração e Moagem .....	21
<b>2.1.2 Qualidade do café</b> .....	23
<b>2.1.3 Grãos defeituosos</b> .....	25
2.1.4.1 Atributos físicos .....	26
2.1.4.2 Atributos químicos .....	27
2.1.4.3 Atributos sensoriais .....	30
<b>2.2 COLORIMETRIA</b> .....	31
<b>2.3 ESPECTROSCOPIA</b> .....	32
<b>2.3.1 Técnicas de medição</b> .....	33
2.3.1.1 Medidas de Transmitância .....	34

2.3.1.2 Medidas de Reflectância.....	35
<b>2.3.2 Espectroscopia no infravermelho.....</b>	<b>36</b>
2.3.2.1 Espectroscopia no infravermelho médio .....	37
2.3.2.2 Espectroscopia no infravermelho próximo .....	38
<b>2.3.3 Espectroscopia por Transformada de Fourier .....</b>	<b>41</b>
<b>2.4 QUIMIOMETRIA.....</b>	<b>42</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1 MATÉRIA-PRIMA .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2 SEPARAÇÃO DOS GRÃOS DEFEITUOSOS.....</b>	<b>45</b>
<b>3.3 MOAGEM.....</b>	<b>46</b>
<b>3.4 ANÁLISE COLORIMÉTRICA .....</b>	<b>46</b>
<b>3.5 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO .....</b>	<b>47</b>
<b>3.5.1 Análise qualitativa dos espectros .....</b>	<b>47</b>
<b>3.5.2 Análise por transmitância.....</b>	<b>47</b>
3.5.2.1 Padronização da metodologia de análise .....	47
3.5.2.2 Análise discriminante .....	48
<b>3.5.3 Análise por ATR.....</b>	<b>48</b>
3.5.3.1 Padronização da metodologia de análise .....	48
3.5.3.2 Análise discriminante .....	49
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1 ANÁLISE COLORIMÉTRICA .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2.1 Análise qualitativa dos espectros.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2.2 Análise por transmitância.....</b>	<b>62</b>
4.2.2.1 Padronização da metodologia de análise .....	62
4.2.2.2 Análise discriminante .....	70

<b>4.2.3 Análise por ATR</b> .....	75
4.2.3.1 Padronização da metodologia de análise .....	75
4.2.3.2 Análise discriminante .....	79
<b>5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES</b> .....	89
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	91
<b>7 APÊNDICE – PROPOSTA DE MANUSCRITO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	101

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Perda aproximada de água e compostos voláteis para diferentes graus de torração (%) .....	21
Tabela 2 - Composição (% em base seca) de grãos de café arábica e robusta, crus e torrados .....	22
Tabela 3 - Classificação oficial do café brasileiro .....	24
Tabela 4 - Descrição do tipo de sistema de classificação de cafés da Bolsa de Café e Açúcar de Nova York.....	25
Tabela 5 - Equivalência de defeitos de acordo com o sistema de classificação de cafés da Bolsa de Café e Açúcar de Nova York.....	25
Tabela 6 - Regiões do espectro de interesse em análises químicas .....	33
Tabela 7 - Técnicas de medição da luz.....	34
Tabela 8 - Materiais utilizados como cristais de ATR .....	36
Tabela 9 - Bandas características de alguns componentes do café no MIR.....	38
Tabela 10 - Parâmetros médios de cor para grãos inteiros e moídos .....	52



## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Balanço de energia da luz incidente ao interagir com uma amostra.....	34
Figura 2 - Representação de um FT-IR com interferômetro Michelson .....	42
Figura 3 – Classificação de grãos de café sadios e defeituosos .....	45
Figura 4 - Diferença de cor entre grãos sadios e defeituosos.....	52
Figura 5 - PCA dos valores $L^*a^*b^*$ de grãos inteiros.....	53
Figura 6 - PCA dos valores $L^*a^*b^*$ de grãos moídos.....	54
Figura 7 - PCA dos valores $L^*h^*c^*$ de grãos inteiros.....	55
Figura 8 - PCA dos valores $L^*h^*abc^*$ de grãos moídos .....	56
Figura 9 - Espectro médio de café sadio cru obtido por transmitância .....	58
Figura 10 - Espectro médio de café sadio cru obtido por ATR .....	59
Figura 11 - Cafeína .....	60
Figura 12 - Trigonelina .....	61
Figura 13 - Ácidos Clorogênicos.....	62
Figura 14 - Espectros médios de café sadio obtidos por transmitância, com e sem pastilha de KBr como branco.....	63
Figura 15 - Espectros médios de café sadio obtidos por transmitância, com pastilhas prensadas por 5 e 10 minutos.....	64
Figura 16 - PCA de espectros de café sadio obtidos por transmitância, com pastilhas prensadas por 5 e 10 minutos.....	64
Figura 17 - Espectros de café sadio obtidos a partir de pastilhas contendo 0,7% de amostra .....	65
Figura 18 - PCA de espectros obtidos a partir de pastilhas contendo 0,7% de amostra.....	66
Figura 19 - Espectros de café sadio obtidos a partir de pastilhas contendo 2% de amostra.....	66
Figura 20 - PCA de espectros obtidos a partir de pastilhas contendo 2% de amostra.....	67
Figura 21 - Espectros de café preto obtidos a partir de pastilhas contendo 3,85% de amostra .....	68

Figura 22 - PCA de espectros obtidos a partir de pastilhas contendo 3,85% de amostra.....	68
Figura 23 - Espectros de café verde obtidos a partir de pastilhas contendo 9% de amostra.....	69
Figura 24 - PCA de espectros obtidos a partir de pastilhas contendo 9% de amostra.....	69
Figura 25 - Espectros médios de cafés sadio e ardido obtidos por transmitância	70
Figura 26 - Espectros médios de cafés sadio e preto obtidos por transmitância	71
Figura 27 - Espectros médios de cafés sadio e verde obtidos por transmitância.	71
Figura 28 - PCA de espectros normalizados e submetidos a derivada 1ª obtidos a partir de pastilhas contendo 2% de amostra .....	73
Figura 29 - PCA de espectros normalizados e submetidos a derivada 2ª obtidos a partir de pastilhas contendo 2% de amostra .....	73
Figura 30 - Dendograma de espectros obtidos por transmitância (S = Sadio; A = Ardido; V = Verde e P = Preto).....	74
Figura 31 - Principais classes do dendograma de espectros obtidos por transmitância .....	74
Figura 32 - Espectros de café torrado obtidos por ATR sem suporte, sob as mesmas condições de análise .....	76
Figura 33 - Espectros de café torrado seco e sem secagem, sem correção atmosférica .....	77
Figura 34 - Espectros de café torrado seco e sem secagem, com correção atmosférica .....	77
Figura 35 - PCA de espectros obtidos a partir de amostras com e sem secagem prévia.....	78
Figura 36 - Espectros de café torrado com partículas com $0,5 \text{ mm} < D < 0,85 \text{ mm}$	79
Figura 37 - Espectros de café torrado com partículas com $D < 0,39 \text{ mm}$ .....	79
Figura 38 - Espectros médios de cafés sadio e ardido claro obtidos por ATR.....	80
Figura 39 - Espectros médios de cafés sadio e ardido escuro obtidos por ATR ..	80
Figura 40 - Espectros médios de cafés sadio e preto obtidos por ATR .....	81
Figura 41 - Espectros médios de cafés sadio e verde obtidos por ATR.....	81
Figura 42 - PCA de espectros normalizados obtidos por ATR.....	82
Figura 43 - PCA de espectros normalizados e submetidos à derivada 1ª obtidos por ATR .....	83

<b>Figura 44 - PCA de espectros normalizados e submetidos à derivada 2ª obtidos por ATR .....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 45 - Cargas fatoriais de regiões selecionadas da PCA de espectros normalizados .....</b>	<b>84</b>
<b>Figura 46 - Dendograma de espectros normalizados obtidos por ATR (S = Sadio; AC = Ardido Claro; AE = Ardidos Escuro; V = Verde e P = Preto) .....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 47 - Principais classes do dendograma de espectros normalizados obtidos por ATR .....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 48 - PCA de espectros de cafés sadio e verde normalizados obtidos por ATR .....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 49 - PCA de espectros de cafés sadio e verde normalizados obtidos por ATR .....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 50 - Cargas fatoriais de regiões selecionadas da PCA de espectros de cafés sadio e verde normalizados obtidos por ATR .....</b>	<b>88</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABIC:</b>	Associação Brasileira da Indústria de Café
<b>ATR:</b>	Reflectância Total Atenuada
<b>CGA:</b>	Ácido Clorogênico
<b>D:</b>	Diâmetro
<b>DEMEC:</b>	Departamento de Engenharia Mecânica
<b>DRIFT:</b>	Reflectância Difusa
<b>FAME:</b>	Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos
<b>FIR:</b>	Infravermelho Distante
<b>FTIR:</b>	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
<b>HCA:</b>	Análise de Agrupamento Hierárquico
<b>IUPAC:</b>	União Internacional de Química Pura e Aplicada
<b>MIR:</b>	Infravermelho Médio
<b>NIR:</b>	Infravermelho Próximo
<b>PC:</b>	Componente Principal
<b>PCA:</b>	Análise de Componentes Principais
<b>PLS:</b>	Regressão dos Mínimos Quadrados Parciais
<b>UFMG:</b>	Universidade Federal de Minas Gerais

## RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial da espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para a caracterização e discriminação de cafés sadios e defeituosos. Grãos de café Arábica, sadios e defeituosos (pretos, verdes e ardidos) foram manualmente separados. As amostras de cafés inteiros e moídos foram analisadas colorimetricamente e por FTIR. Foram feitas análises de transmitância, empregando discos de KBr, e de reflectância total atenuada (ATR), empregando acessório próprio (8200H/8200HA). Os espectros foram analisados por estatística multivariada (análise de componentes principais - PCA e análise de agrupamento hierárquico - HCA) para verificar a possibilidade de discriminação entre amostras de cafés sadios e defeituosos. Os resultados indicam que a separação por cor é eficiente apenas para os defeitos ardidos e pretos, e não para os grãos verdes. Uma clara separação entre cafés defeituosos e não defeituosos foi observada nas análises de PCA e HCA de espectros normalizados (ATR) e submetidos à derivada 1ª (transmitância). Espectros de cafés sadios e verdes foram analisados isoladamente por PCA, e as classes amostrais puderam ser totalmente discriminadas, demonstrando que a metodologia de FTIR-ATR pode ser utilizada de forma complementar ao processo de separação por cor. Estes resultados demonstram que análises por FTIR apresentam potencial para o desenvolvimento de uma metodologia de análise rápida e funcional para a discriminação de grãos de café sadios e defeituosos.

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the potential of Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR) for the characterization and discrimination of defective and non-defective coffee beans. Defective (black, immature and sour) and non-defective Arabica coffee beans were manually separated. Whole and ground coffee samples were then submitted to colorimetric analysis and FTIR analysis by transmittance readings, employing a KBr disk, and reflectance readings, employing an attenuated total reflectance (ATR) accessory (8200H/8200HA). Multivariate statistical analysis (principal component analysis - PCA and hierarchical cluster analysis - HCA) was performed in order to verify the possibility of discrimination between defective and non-defective coffee samples. The results indicated that the monochromatic color separation between defective and non defective coffee beans will only be effective in the case of black and sour defects, but not in the case of immature beans. A clear separation between defective and non-defective coffee beans was observed based on PCA and HCA analysis of the normalized spectra (ATR) and of the first derivatives of the spectra (transmittance). Spectra of non defective and green coffee were separately evaluated by PCA and were fully discriminated, demonstrating that FTIR-ATR can be employed complementary to color separation. Such results indicated that FTIR analysis presents potential for the development of a fast and reliable analytical methodology for discrimination between defective and non-defective coffee beans.

# 1 INTRODUÇÃO

O café é um dos produtos de maior comercialização no mercado internacional, sendo reconhecido pela grande receptividade que tem a sua bebida. Este produto nobre do agronegócio possui importância particular para o Brasil, ocupando lugar de destaque na história do desenvolvimento do país, onde seu cultivo e industrialização geram um grande número de empregos e divisas (ENCARNAÇÃO & LIMA, 2003).

Em 2009, o Brasil permaneceu sendo o maior produtor de café, com produção de aproximadamente 39 milhões de sacas, o maior exportador do mundo, com 26,4 milhões de sacas exportadas, e o segundo maior mercado consumidor, com 18,39 milhões de sacas consumidas. O consumo *per capita* brasileiro subiu para 4,65 kg de café torrado nos últimos anos, se aproximando do consumo histórico de 1965, que foi de 4,72 kg/hab.ano. A importância disso está no fato de que a Associação Brasileira da Indústria de Café, ao lançar o Programa do Selo de Pureza, em 1989, anunciou que pretendia reverter a queda do consumo de café que houve na época, por meio da oferta de melhor qualidade ao consumidor, com o objetivo de retomar a grande demanda interna registrada em 1965, pelo extinto IBC - Instituto Brasileiro do Café (ABIC, 2009; CONAB, 2010).

Apesar de ser o maior exportador mundial de café cru, apenas 132 mil sacas de café torrado foram exportadas em 2008. A exportação de café processado com marca brasileira é uma iniciativa muito recente, que assumiu uma característica de negócio consistente a partir de 2002. Em sete anos as vendas aumentaram em quase 800%, considerando que em 2002 os embarques foram de US\$ 4 milhões. A baixa participação brasileira no mercado internacional de café torrado e moído é devida, principalmente, a falta de padrão de qualidade do produto. Esta situação acarreta em grandes perdas econômicas, pois a exportação do café processado e embalado nas torrefadoras brasileiras agrega valor ao produto e gera mais empregos e renda para a população (ABIC, 2009).

A falta de padrão de qualidade do café ocorre devido à dificuldade de se identificar impurezas e misturas no café torrado e moído, impedindo a autenticação do produto. De acordo com a legislação vigente, a quantidade máxima permitida de impurezas, sedimentos e matérias estranhas no café torrado é de 1% (BRASIL, 2010). A mistura de grãos defeituosos com sadios não é fraudulenta, uma vez que esses

grãos não são considerados como impurezas, porém, essa mistura irá produzir uma bebida de qualidade inferior.

Independente das condições de cultivo, colheita e processamento dos grãos de café, alguns defeitos intrínsecos sempre irão ocorrer. Entre estes defeitos, os que mais afetam a qualidade da bebida são os grãos pretos, verdes e ardidos, conhecidos como PVA (OLIVEIRA et al., 2008). Avaliando a influência dos grãos verdes na qualidade sensorial do café, PUERTA-QUINTERO (2000) demonstrou que a presença desses grãos em concentração de 2,5% em mistura com grãos maduros foi suficiente para desclassificar 30% das amostras em decorrência de sabores desagradáveis. Atualmente, 20% da produção nacional correspondem a grãos defeituosos, o que representa um alto valor de investimento em cultivo, colheita e manuseio na cadeia de produção do café. Porém, os grãos sadios são separados eletronicamente dos defeituosos para a comercialização internacional ou para a produção de cafés especiais, devido ao impacto negativo que os grãos defeituosos causam na qualidade da bebida (FRANCA et al., 2005a; FRANCA et al., 2005b, OLIVEIRA et al, 2008).

No Brasil, a separação manual é normalmente empregada na classificação dos cafés de diferentes qualidades, e a separação eletrônica é empregada em fazendas e cooperativas de produtores para a remoção dos grãos defeituosos. A separação eletrônica é realizada por meio da cor dos grãos, que passam um a um por uma seletora óptica que irá ejetá-los ou não de acordo com um padrão estabelecido (BORÉM, 2008; FRANCA & OLIVEIRA, 2008). Entretanto, este procedimento não é eficiente na separação de grãos ardidos e verdes. Atualmente, para garantir que os grãos defeituosos foram efetivamente removidos de um determinado lote, a seletora óptica é configurada para permitir ejetar grãos sadios que apresentem coloração similar á de grãos ardidos ou verdes. Como consequência, lotes de café que são rejeitados como defeituosos podem apresentar grande quantidade de grãos sadios, como apontado em estudos empregando misturas de cafés Arábica de diferentes origens e safras que foram classificadas eletronicamente como sendo de baixa qualidade (FRANCA et al., 2005b; FARAH et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007). O mesmo problema ocorre na separação de cafés por peneiração (FRANCA et al., 2005b; MENDONÇA et al., 2009a).

Existem diferenças químicas relevantes entre grãos sadios e defeituosos que poderiam ser utilizadas como parâmetro de diferenciação entre as duas qualidades de café (MAZZAFERA, 1999; CASAL et al., 2000; FRANCA et al., 2005a; FRANCA et al.,



2005b; FARAH et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006; RAMALAKSHMI et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2007; FRANCA & OLIVEIRA, 2008; MENDONÇA et al., 2009a; MENDONÇA et al., 2009b), mas é importante considerar que as metodologias analíticas utilizadas para analisar componentes químicos são, em sua maioria, caras, elaboradas e/ou demoradas. Como alternativa, métodos baseados em FTIR em combinação com quimiometria podem ser aplicados com sucesso no controle de qualidade de indústrias alimentícias (SHIROMA & RODRIGUEZ-SAONA, 2009; RODRIGUEZ-SAONA & ALLENDORF, 2011). Esses métodos são rápidos, simples, reprodutíveis e não requerem pré-tratamento amostral.

Em particular, muitos trabalhos demonstraram a eficiência do uso da espectroscopia na região do infravermelho em combinação com métodos quimiométricos na discriminação de espécies e quantificação de misturas de café Arábica e Robusta (KEMSLEY et al., 1995; BRIANDET et al., 1996; DOWNEY & BOUSSION, 1996; DOWNEY et al., 1997; PIZARRO et al., 2007; ESTEBAN-DÍEZ et al., 2007), na diferenciação de cafés por origem geográfica (WANG et al., 2009) e no controle de qualidade de cafés (RIBEIRO et al., 2010). Diante dos fatos apresentados, propõe-se no presente estudo avaliar a viabilidade de discriminar grãos crus de café defeituosos de sadios por meio da técnica de espectroscopia no infravermelho associada à métodos quimiométricos.

Os objetivos específicos do trabalho que caracterizam as principais etapas do seu desenvolvimento são:

- 1) Classificar e discriminar cafés crus, sadios e defeituosos por colorimetria.
- 2) Desenvolver e otimizar a metodologia de análise por FTIR.
- 3) Discriminar cafés crus, sadios e defeituosos por meio de FTIR.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O CAFÉ

A planta café é um gênero da família *Rubiaceae* com várias espécies, sendo as mais importantes comercialmente a *Coffea arabica*, uma espécie originária da Etiópia e com inúmeras variedades, e a *Coffea canephora*, geralmente chamada de robusta, que é a sua variedade mais produtiva. A planta ocorre em regiões tropicais do planeta, entre os trópicos de Câncer e Capricórnio, podendo variar muito em aparência de acordo com a região (SIVETZ & DESROSIER, 1979; BANKS et al., 1999). Os grãos de café são as sementes encontradas dentro da fruta, cada semente é coberta com uma fina película denominada película prateada. Normalmente existem duas sementes em cada fruta, dispostas uma de frente para a outra, que ficam soltas dentro de uma casca amarelada denominada pergaminho, que por sua vez, é coberta por uma polpa mucilaginoso que forma o mesocarpo da cereja (SMITH, 1989).

O café arábica é a espécie mais antiga que se conhece e é cultivada em regiões montanhosas, com altitude ótima entre 1000-2000 m e temperatura entre 15-24 °C. É uma espécie difícil de ser cultivada, sendo mais sensível à doenças, pestes e geadas. Seus grãos, que geralmente são maiores que de robusta, produzem uma bebida mais delicada e com aroma acidífero. Esta espécie representa aproximadamente 70% do café produzido no mundo. A espécie *C. canephora* é mais resistente que a *C. arabica*, pode ser cultivada em regiões com altitude acima de 700 m e temperatura entre 24-30 °C, porém, sua bebida não é tão apreciada, o que a torna uma espécie mais barata e que responde por menos de 30% da produção mundial. Geralmente é processada por via seca e utilizada para a produção de misturas, café solúvel ou café instantâneo (BANKS et al., 1999). A espécie e a variedade do café influenciam fortemente na sua composição química, mas outros fatores, como as condições de cultivo, o grau de maturação e as condições de armazenamento, também devem ser considerados (SMITH, 1989).

#### 2.1.1 Beneficiamento do café

##### 2.1.1.1 Recepção e separação

O café proveniente da lavoura constitui-se de frutos verdes, maduros ou “cereja”, super-maduros ou “passa”, frutos secos, folhas, ramos, terra, paus e pedras,

sendo que a presença e a proporção de cada um desses componentes dependem do sistema e dos cuidados adotados na colheita. Dessa forma, a colheita seletiva, desejável para a produção de cafés com qualidade superior, resultará na sua totalidade em frutos maduros. A colheita por derrixa completa, quando realizada precocemente, produzirá cafés com grande quantidade de frutos verdes, enquanto colheitas tardias, grande quantidade de frutos secos. Nesses dois últimos casos poderão ser produzidos, com maior frequência, cafés com qualidade inferior. A colheita sobre o pano evita o contato dos frutos com o solo e a mistura de frutos recém-colhidos com os frutos de varrição, na sua maioria já em fase de deterioração (BORÉM, 2008).

Os frutos colhidos são recepcionados em moegas que facilitam as operações de descarga e movimentação dos frutos provenientes da lavoura, e seguem para a etapa de abanação que tem como objetivo separar as impurezas leves (folhas, gravetos e outras impurezas). A abanação manual ainda é utilizada em pequenos produtores, tradicionalmente com peneiras. A abanação mecânica é realizada por abanadores móveis ou estacionários, tanto por sucção como por insuflação de uma corrente de ar gerada por um ventilador. Em seguida, o café segue para a etapa de separação hidráulica, que ocorre no lavador e é basicamente uma separação por diferença de densidade. Nessa etapa, o café é separado em dois lotes: um formado pelos frutos cereja e verde, mais densos, e outro formado pelos frutos menos densos, conhecidos como bóias, constituídos pelos frutos secos, super-maduros, chochos e mal granados e frutos maduros com apenas uma semente desenvolvida. Nessa etapa ainda são retiradas impurezas leves que não foram separadas na etapa de abanação, e materiais mais densos como terra e pedras, que ficaram depositados no fundo do lavador (BORÉM, 2008).

Os frutos bóias podem ainda passar por uma etapa de separação por tamanho, realizada por meio de uma peneira cilíndrica com perfurações circulares, onde os frutos mais secos e menores passam através das perfurações, e os frutos maiores e mais úmidos ficam retidos. Essa operação é especialmente recomendada no início da colheita em razão da elevada quantidade de frutos maduros e verdes que flutuam por estarem brocados ou chochos. Os frutos verdes podem ainda ser separados dos frutos maduros por separação eletrônica, num processo onde os frutos passam um a um por uma seletora óptica, que irá ejetá-los ou não de acordo com um padrão estabelecido (BORÉM, 2008).

### 2.1.1.2 Processamento

O processamento dos frutos consiste na retirada da sua polpa, que pode ser feita de forma natural (via seca) ou por lavagem (via úmida). O café processado por via úmida é mais comumente tido como um café de qualidade superior, com aroma mais agradável e livre de elementos indesejáveis. Porém, quando o café natural é processado em condições ideais, ele pode apresentar atributos sensoriais tão positivos quanto o café processado por via úmida, o problema, é que essas condições ideais (o que inclui temperatura, umidade, condições de colheita e processamento) não são facilmente atingidas (SIVETZ & DESROSIER, 1979). Mas deve-se lembrar que no Brasil e na Etiópia o processamento por via seca é predominante, e são produzidos muitos dos cafés mais apreciados em todo o mundo (BANKS et al., 1999).

O processamento por via seca consiste na secagem dos frutos inteiros imediatamente após a colheita (VINCENT, 1987; BORÉM, 2008). É comumente empregado onde há pouca infra-estrutura ou em regiões tropicais onde há uma estação seca característica durante o período de colheita (SIVETZ & DESROSIER, 1979; BANKS et al., 1999; BORÉM, 2008). A secagem pode ser natural ou artificial. A secagem natural é feita expondo os frutos ao sol, requerendo uma grande área de secagem com ventilação adequada. Os frutos devem ser espalhados na superfície em uma camada fina e devem ser sempre mexidos, especialmente no período inicial da secagem, evitando que ocorra fermentação ou proliferação de fungos. A secagem artificial pode ser utilizada em substituição ou como complemento à secagem natural. Vários tipos de equipamentos são empregados, incluindo secadores estáticos, rotativos, horizontais, verticais, em processos contínuos ou em batelada (SIVETZ & DESROSIER, 1979; VINCENT, 1987).

O processamento por via úmida desenvolveu-se principalmente nas regiões equatoriais onde há contínua precipitação durante o período de colheita, e conseqüentemente, a produção de cafés naturais resultaria quase sempre em cafés de qualidade inferior. No Brasil, a produção de cafés por via úmida ainda é pequena comparada ao volume total produzido. Atualmente a via úmida pode ser conduzida de três formas: removendo-se a casca mecanicamente e a mucilagem por meio de fermentação biológica, resultando no café despulpado, sendo este o método mais usado em todo o mundo; removendo-se mecanicamente a casca e parte da mucilagem, resultando no café cereja descascado, comumente usado no Brasil; ou removendo-se mecanicamente a casca e a mucilagem, produzindo o café desmucilado. Em seguida

os grãos são submetidos à secagem no terreiro, em secadores mecânicos ou à secagem mista (SANTOS, 2005; BORÉM, 2008). Avaliando as formas de processamento por via úmida e tipos de secagem na qualidade do café, SANTOS (2005) concluiu que o café descascado seco em terreiro apresentou mais indicadores positivos de qualidade, reduzindo o número de defeitos e a contagem microbiana dos grãos.

Após o processamento por via seca ou úmida, os grãos com pergaminho contendo até 12% de umidade podem ser estocados por um mês, ou alguns meses quando em atmosfera controlada (BANKS et al., 1999). Para um armazenamento mais longo e seguro os grãos podem passar por outra secagem visando um conteúdo de umidade final de 11%, o que facilita a remoção da película e do pergaminho, além de aumentar a estabilidade durante o armazenamento (VINCENT, 1987).

#### 2.1.1.3 Rebeneficiamento

O rebeneficiamento tem como objetivos classificar o café por granulometria e cor, o que confere a padronização dentro da regulamentação específica (BORÉM, 2008).

A limpeza dos grãos para a remoção de impurezas pode ser feita por separador magnético, peneiração ou separação pneumática. Os grãos são, então, submetidos a um descascador que irá remover toda a polpa, pergaminho e película restantes. A classificação dos grãos por tamanho é feita por peneiração e confere vantagens como: preços mais altos cobrados pelos grãos maiores; facilitação na subsequente separação pneumática; e uniformidade na torração. Neste estágio o café ainda contém impurezas e grãos de menor densidade que podem ser separados por separação pneumática ou gravimétrica. Em seguida, os grãos podem ser separados por cor por meio de separador eletrônico, que pode ser ajustado de forma a separar determinado(s) tipo(s) de defeito(s) (VINCENT, 1987).

Finalmente, os grãos são armazenados, tradicionalmente em sacas. Como já mencionado, a umidade dos grãos não deve ultrapassar 11% para um armazenamento adequado. Portanto, a umidade do ambiente de armazenamento deve ser controlada. Quando os grãos são armazenados em ambiente com umidade relativa em torno de 74%, o café entrará em equilíbrio com o ambiente, adquirindo 13% (b.u.) de umidade, dependendo da temperatura, o que o torna susceptível a contaminação por fungos (VINCENT, 1987).

#### 2.1.1.4 Torração e Moagem

Diferentes tipos de torrefadoras, operando em sistemas contínuos ou descontínuos, são utilizados no processo de torração, que consiste na aplicação de calor aos grãos de café, mantidos em movimento para assegurar a uniformidade da torra e subsequente resfriamento (SMITH, 1989). Dependendo das condições dos grãos e do grau de torração desejado, o processo ocorre entre 200-240 °C durante 8-14 minutos. Os termos mais utilizados para definir o grau de torração são “claro”, “médio” e “escuro”, de acordo com a coloração, que acompanham uma exsudação progressiva de óleo na superfície dos grãos e perda progressiva de massa (Tab. 1), correspondente a perda de água e compostos voláteis (CLARKE, 1987; BANKS et al., 1999).

**Tabela 1 - Perda aproximada de água e compostos voláteis para diferentes graus de torração (%)**

Grau de torração	Porcentagem de perda de massa
Claro	1-5
Médio	5-8
Escuro	8-12
Muito escuro	>12

FONTE: CLARKE, 1987

Durante a torra ocorrem mudanças consideráveis nos grãos, como a degradação dos compostos termolábeis e a interação dos compostos mais reativos formando complexos. Todas essas mudanças químicas acarretam em mudanças sensoriais, como o desenvolvimento do aroma característico (SMITH, 1989). FRANCA et al. (2009) e RIBEIRO et al. (2010) demonstraram que é possível discriminar cafés com diferentes graus de torração pelos seus perfis de compostos voláteis, avaliados por SPME CG-MS, e por FTIR, respectivamente.

Entre as mudanças químicas ocorridas, a sacarose é desidratada e hidrolisada a açúcares redutores até que a temperatura atinja o ponto de pirólise. Os açúcares redutores são então polimerizados, degradados em compostos voláteis, água e gás carbônico, ou reagem com proteínas por meio da reação de Maillard. A celulose é hidrolisada tornando os grãos mais quebradiços, e através da conversão dos

polissacarídeos presentes, altamente insolúveis, pode-se esperar a formação de anidridos e polímeros, como os ácidos húmicos (SIVETZ & DESROSIER, 1979; TRUGO, 1989; LYMAN et al., 2003).

Entre os principais compostos nitrogenados, a cafeína é estável a torração, a trigonelina é degradada em aproximadamente 50%, formando ácido nicotínico e outros compostos, os aminoácidos livres são pirolisados ou interagem com outros componentes, e as proteínas são desnaturadas (SIVETZ & DESROSIER, 1979; MACRAE, 1989). A perda de lipídios durante a torração quase não ocorre (FOLSTAR, 1989). Os minerais catalisam as reações de pirólise (SIVETZ & DESROSIER, 1979). Os ácidos clorogênicos são perdidos em grande parte, formando pigmentos, ácidos quínicos livres, fenóis de baixo peso molecular ou compostos voláteis (CLIFFORD, 1989). Grande parte dos ácidos carboxílicos é formada nas primeiras etapas da torração, devido à decomposição dos carboidratos, porém, em cafés de torra escura, os ácidos são decompostos, de forma que cafés mais claros possuem maior acidez que os escuros (SIVETZ & DESROSIER, 1979; WOODMAN, 1989).

Na Tab. 2 é descrito um resumo de dados referentes à composição química dos grãos de café arábica e robusta, crus e torrados (SMITH, 1989).

**Tabela 2 - Composição (% em base seca) de grãos de café arábica e robusta, crus e torrados**

Componente	Arábica		Robusta	
	Cru	Torrado	Cru	Torrado
Minerais	3-4,2	3,5-4,5	4-4,5	4,6-5
Cafeína	0,9-1,2	~1	1,6-2,4	~2
Trigonelina	1-1,2	0,5-1	0,6-0,75	0,3-0,6
Lipídios	12-18	14,5-20	9-13	11-16
Ácidos clorogênicos	5,5-8	1,2-2,3	7-10	3,9-4,6
Ácidos alifáticos	1,5-2	1-1,5	1,5-2	1-1,5
Oligossacarídeos	6-8	0-3,5	5-7	0-3,5
Polissacarídeos totais	50-55	24-39	37-47	-
Aminoácidos	2	0	2	0
Proteínas	11-13	13-15	11-13	13-15
Ácidos húmicos	-	16-17	-	16-17

FONTE: SMITH, 1989

A moagem do café é realizada em moinho de disco, quando feita em pequena escala, e em moinho de rolos, quando em escala maior (CLARKE, 1987). O grau de torração dos grãos exerce influência na moagem, uma vez que o café escuro se torna mais quebradiço e mais propenso a quebrar em pedaços mais finos, devido á maior perda de água que sofre. O café comercial é classificado de acordo com a sua granulometria em turco, espresso, fino e médio (BANKS et al., 1999). Quanto mais fino o pó obtido, mais rápida será a extração aquosa dos compostos solúveis e dos compostos voláteis (CLARKE, 1987).

### **2.1.2 Qualidade do café**

A qualidade do café consumido está fortemente relacionada com a composição química dos grãos torrados, que é afetada pela composição dos grãos crus e pelas condições do seu processamento (BANKS et al., 1999). Quando o consumidor toma uma xícara de café ele espera certo padrão de qualidade, e a indústria torrefadora precisa garantir que a qualidade do seu produto é controlada. Assim, a negociação do café cru como matéria-prima é baseada na análise de amostras do produtor (SMITH, 1989).

Entre os critérios de avaliação da qualidade do café, a análise sensorial ou “prova de xícara” é a mais importante, que consiste na avaliação da aparência, cor, sabor, aroma, sabor residual e textura da bebida em um painel sensorial com provadores treinados. A percepção conjunta de todas as características sensoriais do café é denominada Qualidade Global, esta, quando inferior a 4 pontos em uma escala de 0 a 10, enquadra o café em Fora de Tipo, o que proíbe a sua comercialização. A bebida deve ser processada por percolação, pesando-se 100 g de pó da amostra, com tolerância de 2 g para mais ou para menos, disposto em filtro de papel no suporte de filtro, e utilizando 1,0 L de água mineral natural ou purificada em béquer, aquecida entre 92 °C e 96 °C. Embora este critério não seja o único responsável pela especificação dos cafés, ele exerce grande influência no sistema de cotação internacional. O café brasileiro é oficialmente categorizado com base em uma escala de aromas, conforme descrito na Tab. 3 (CLARKE, 1987; COELHO, 2000, BRASIL, 2010).



**Tabela 3 - Classificação oficial do café brasileiro**

Classificação	Característica
Estritamente mole	Aroma e sabor "mole" mais acentuado;
Mole	aroma e sabor "mole" mais acentuado;
Apenas mole	sabor levemente doce e suave, mas sem adstringência ou aspereza de paladar;
Duro	sabor acre, adstringente e áspero, porém não apresenta paladares estranhos;
Riado	leve sabor típico de iodofórmio;
Rio	sabor típico e acentuado de iodofórmio;
Rio Zona	aroma e sabor muito acentuado, semelhante ao iodofórmio ou ao ácido fênico.

FONTE: BRASIL, 2010

Entre os outros fatores considerados na avaliação da qualidade do café cru, um deles é a umidade, que quando atinge 14 a 15% pode levar a formação de *off-flavours*. A umidade em concentração baixa também é indesejável, pois indica que o grão é frágil, tendendo a quebrar durante o manejo e a torrar com muita rapidez, afetando assim o aroma do produto. Já o café torrado e moído, pode ter umidade máxima de 5% para ser comercializado. O tamanho dos grãos exerce influência na qualidade do café da mesma forma que os grãos quebrados, que irão torrar com mais rapidez tendendo a produzir uma torra desigual. A cor e a aparência dos grãos podem indicar a espécie botânica e o quanto o grão é velho ou novo (geralmente, quanto mais pálido mais velho) (SMITH, 1989).

O termo “defeito” é utilizado comercialmente como parâmetro de qualidade do café, para descrever a presença de grãos defeituosos (preto, ardido, verde, brocado ou danificado por insetos, e quebrado) e materiais estranhos ou impurezas (galhos, cascas, películas ou pedras) (CLARKE, 1987). Quando o café torrado supera o limite máximo de 1% de impurezas, sua comercialização é proibida (BRASIL, 2010). A Bolsa de Café e Açúcar de Nova York instituiu um sistema de classificação do café cru baseado na quantidade de defeitos em 300 g de amostra, como pode ser observado nas Tab. 4 e 5 (FRANCA et al., 2005b). Desta forma, a presença de grãos defeituosos influi, não somente na qualidade da bebida, mas na sua cotação, e conseqüentemente na economia do setor cafeeiro.

**Tabela 4 - Descrição do tipo de sistema de classificação de cafés da Bolsa de Café e Açúcar de Nova York**

Tipo	Máximo permitido de defeitos por 300 g de amostra
NY2	6
NY3	13
NY4	30
NY5	60
NY6	120
NY7	240
NY8	450

FONTE: FRANCA et al., 2005b

**Tabela 5 - Equivalência de defeitos de acordo com o sistema de classificação de cafés da Bolsa de Café e Açúcar de Nova York**

Tipo de defeito e quantidade	Equivalência (defeitos)
1 grão preto	1
2 grãos ardidos	1
5 grãos imaturos	1
2/5 grãos brocados	1
1 pedra pequena	1
1 pedra grande	5
1 galho pequeno	1
1 galho grande	5

FONTE: FRANCA et al., 2005b

### 2.1.3 Grãos defeituosos

O tipo e o número de defeitos no café apresentam influência significativa na qualidade da bebida. Os defeitos podem ser de natureza intrínseca e extrínseca. Os defeitos intrínsecos são caracterizados pela presença de grãos alterados devido à aplicação de processos agrícolas e industriais inadequados ou por modificações de origem fisiológica ou genética (pretos, ardidos, imaturos, chochos, quebrados e brocados). Os defeitos de natureza extrínseca correspondem aos elementos estranhos ao café beneficiado (coco, marinheiro, cascas, paus e pedras), decorrentes de

imperfeições no processo de beneficiamento (MYIA et al., 1973/1974). Entre estes defeitos, os que mais afetam a qualidade da bebida são os grãos pretos, verdes e ardidos, ou PVA (OLIVEIRA et al., 2008). Os grãos pretos são derivados de grãos mortos dentro do fruto do café, ainda na árvore, ou são associados à fermentação de grãos verdes que caíram naturalmente no chão, neste último caso, são chamados de “café-verde-preto” (CLARKE, 1987; MANCHA AGRESTI et al., 2008). Os grãos verdes são provenientes de frutos imaturos e os grãos ardidos são associados a uma fermentação excessiva durante o processamento por via úmida, a um processo de secagem inadequado ou ao aproveitamento de cerejas muito maduras (SIVETZ & DESROSIER, 1979; CLARKE, 1987; COELHO, 2000).

Poucos trabalhos foram feitos na intenção de discriminar grãos sadios de defeituosos. Antes de serem torrados, os grãos podem ser diferenciados por parâmetros físicos e químicos, porém, a única metodologia analítica que permitiu esta distinção após a torração foi a SPME-CG-MS associada à análise de componentes principais (FRANCA & OLIVEIRA, 2008; MANCHA AGRESTI et al., 2008).

#### 2.1.4.1 Atributos físicos

O tamanho e o formato dos grãos de café se diferem em espécie e qualidade, sendo que o arábica é maior que o robusta, e os grãos defeituosos são menores que os sadios em ambas as espécies. Assim, para propósitos de comercialização, o tamanho e o formato dos grãos são comumente avaliados por peneiração (FRANCA & OLIVEIRA, 2008; MENDONÇA et al., 2009a). Após a torração, a separação dos grãos por peneiração se torna eficiente somente nos grãos de café arábica. No caso do robusta, somente os grãos com defeitos provenientes de fermentação (preto e ardido) podem ser separados por tamanho (MENDONÇA et al., 2009a).

Uma comparação entre as densidades de grãos crus sadios e defeituosos mostra que não há diferença significativa entre eles, com exceção dos grãos pretos robusta, que apresentam densidade menor que os demais. Durante a torração, ocorre aumento de volume e perda de massa, o que acarreta em uma queda na densidade dos grãos. Por serem menores, os grãos pretos arábica apresentam aumento de volume menor que os demais, e conseqüentemente, maior densidade (FRANCA et al., 2005a, FRANCA et al., 2005b; MENDONÇA et al., 2009a). No caso dos grãos pretos robusta não é observada nenhuma diferença significativa (MENDONÇA et al., 2009a).

Os grãos crus de café contém 10 a 13% de umidade, entretanto, nenhuma diferença significativa é notada entre os teores de umidade de grãos sadios e defeituosos (SMITH, 1989; RAMALAKSHMI et al, 2007). Durante a torração, os grãos defeituosos apresentam perda de umidade menor que os sadios, o que indica que eles torram a um grau menor, sob as mesmas condições de processamento (VASCONCELOS et al., 2007).

A cor é um importante atributo dos grãos de café crus, uma vez que ela varia com a espécie, origem, condições de processamento e a idade do grão, podendo ser um indicativo da sua qualidade. Durante o armazenamento prolongado o café brasileiro processado por via seca tende a se tornar esbranquiçado (CLARKE, 1987; FRANCA & OLIVEIRA, 2008). O café arábica processado por via úmida é geralmente verde-azulado ou verde acinzentado, com cor uniforme. Já o robusta processado por via seca, tende a ser amarronzado e com coloração não uniforme (CLARKE, 1987). A triagem por cor é o procedimento mais utilizado na separação de grãos sadios e defeituosos antes da torração. Os grãos verdes podem ser identificados por apresentarem a película prateada aderida à semente, com sulco ventral fechado e coloração verde em diversos tons. Os ardidos apresentam o endosperma de coloração marrom, e os grãos pretos possuem o endosperma totalmente preto (COELHO, 2000; SILVA, 2005; FRANCA & OLIVEIRA, 2008). No Brasil, a separação manual é empregada na classificação dos cafés quanto à qualidade, e a separação eletrônica é empregada em fazendas e cooperativas de produtoras e indústrias (FRANCA & OLIVEIRA, 2008). Porém, estudos indicam que esta separação não é eficiente (FRANCA et al., 2005b; FARAH et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

#### 2.1.4.2 Atributos químicos

A sacarose é o açúcar livre presente em maior quantidade no café cru, com o seu conteúdo variando de acordo com a espécie, diferenças no cultivo, estágio de maturação e condições de processamento e armazenamento (TRUGO, 1989). A presença de grãos fermentados e imaturos no café terá um impacto direto na redução do conteúdo de sacarose, o que pode ser utilizado como um indicador da presença de grãos defeituosos no café cru (FRANCA & OLIVEIRA, 2008). MAZZAFERA et al. (1999) e VASCONCELOS et al. (2007) encontraram valores mais altos de sacarose em grãos sadios em relação a defeituosos, por meio de extração metanólica e subsequente análise colorimétrica, e por diferença centesimal, respectivamente. Após a

torração, apenas traços de sacarose foram encontrados. MENDONÇA et al. (2009b) diferenciaram amostras de grãos defeituosos de não defeituosos antes da torração por espectroscopia de massas com ionização por *electrospray* associada a análise de componentes principais, devido a maior presença de sacarose nos grãos sadios em comparação aos defeituosos.

A fração lipídica do café é composta pelo óleo, presente substancialmente no endosperma, e uma pequena quantidade de cera encontrada nas camadas externas dos grãos. O óleo contém triglicerídeos e uma porção considerável de outros lipídios que conferem as suas principais características. A perda de lipídios durante a torração é mínima (FOLSTAR, 1989). O café arábica se difere do robusta por conter maior conteúdo de óleo, tanto no grão cru quanto no torrado, assim como grãos sadios se diferem de grãos defeituosos por sua maior quantidade de óleo (MAZZAFERA et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007). OLIVEIRA et al. (2006) avaliaram a influência de grãos defeituosos na composição de ácidos graxos. Foi utilizado o procedimento recomendado pela Associação dos Químicos Analíticos Oficiais (método 996.06). Os FAMES foram analisados por cromatografia gasosa e detectados por ionização de chama. Nenhuma diferença significativa foi observada entre grãos sadios e defeituosos, crus ou torrados.

Não há evidências de que o conteúdo de proteínas no café de diferentes qualidades ou diferentes espécies possa apresentar alguma diferença significativa (MACRAE, 1989). Utilizando os procedimentos padrões de análise, VASCONCELOS et al. (2005) e OLIVEIRA et al. (2006) não encontraram diferenças significativas nos teores de proteínas de grãos sadios e defeituosos, crus ou torrados. É necessário mencionar que este teor é determinado com base no nitrogênio cru, e posterior subtração dos níveis de trigonelina e cafeína.

A cafeína foi a primeira substância química identificada no café, em 1820, na Alemanha, e devido as suas atividades estimulantes nenhuma substância foi mais estudada desde então em toda a história da medicina (ENCARNAÇÃO & LIMA, 2003). A cafeína é um alcalóide, com estrutura de dioxipurina metilada, que sublima em temperatura abaixo de 178°C. Apesar da torração do café ocorrer em temperatura mais elevada que essa, pouca cafeína se perde neste processo, provavelmente devido a um acúmulo de pressão no grão (MACRAE, 1989). Utilizando a técnica de espectroscopia no ultravioleta, FARAH et al. (2006) demonstraram que as concentrações de cafeína e trigonelina estão relacionadas com a qualidade do café, de forma que quanto maior a

concentração de cafeína e trigonelina, melhor a qualidade do café. FRANCA et al. (2005a) e RAMALAKSHMI et al. (2007) concluíram que grãos sadios apresentam teor maior de cafeína em relação a defeituosos, enquanto que, FRANCA et al. (2005b) concluíram que o teor é menor. Já MAZZAFERA et al. (1999), não encontraram diferença significativa nos teores de cafeína de grãos sadios e defeituosos.

Aminas são bases orgânicas encontradas em vários alimentos, que tem sido utilizadas na avaliação da qualidade dos alimentos. Elas podem ser classificadas em (a) naturais, formadas durante a biosíntese de novas poliaminas, ou (b) bioativas, formadas pela ação de microrganismos descarboxilase-positivos. VASCONCELOS et al. (2007), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, compararam os níveis e a composição de aminas em grãos sadios e defeituosos de café arábica. No café cru, os grãos pretos foram os que apresentaram menor teor de aminas totais, enquanto que os grãos imaturos e ardidos não apresentaram diferença significativa entre os seus teores. A putrecina foi encontrada em todas as amostras, sendo a amina predominante entre os grãos sadios. A histamina foi a única amina encontrada exclusivamente em grãos defeituosos, sugerindo que a sua presença em grãos crus pode ser utilizada como potencial indicador de qualidade. Após a torração, os níveis de aminas caíram drasticamente. No café de torração clara, foram encontrados apenas traços de serotonina, enquanto que nos cafés de torração média e escura não foram encontradas aminas.

Os ácidos clorogênicos (CGA) são formados por uma estrutura de ácido quínico esterificada a um resíduo de acilação. A partir da torração, os CGA's formam inúmeros isômeros derivados do ácido quínico, entre eles os ácidos cafeoilquínico (CQA), dicafeoilquínico (diCQA), feruloilquínico (FQA), e coumaroilquínico (CoQA), que exercem diversos efeitos biológicos benéficos à saúde. Porém, a excessiva torração leva a destruição destes compostos (CLIFFORD, 1989; ENCARNAÇÃO & LIMA, 2003). De acordo com WHITE (1995), o conteúdo de CQA no grão de café verde pode ser utilizado como um indicador de qualidade e maturidade, de forma que nos grãos imaturos a relação diCQA/CQA é maior do que em grãos sadios. FARAH et al. (2006) observaram que o café cru de pior qualidade, grãos verdes e preto-verdes apresentam maior concentração de CGA, onde o 5-CQA e 5-FQA estão mais fortemente relacionados à pior qualidade. Grãos de torração clara de pior qualidade foram relacionados com níveis altos de 3-CQA, 4-CQA e 5-CQA, enquanto, grãos de torração média de pior qualidade foram relacionados com níveis altos de 5-CQA, 4-FQA e 5-

FQA. A perda de CGA no café de torração escura foi de 93% e não houve nenhuma relação significativa entre os níveis de CQA e a qualidade deste café. Foi observada uma relação positiva entre o conteúdo total de CGA e, principalmente, de 5-CQA com a intensidade da cor dos grãos, o que permite concluir que grãos de pior qualidade tem coloração mais intensa.

OLIVEIRA et al. (2006) e VASCONCELOS et al. (2007) observaram que grãos defeituosos apresentam maior conteúdo de minerais do que sadios. Entre eles, o grão preto apresenta os maiores teores.

A qualidade do café está relacionada diretamente com o seu aroma e sabor, os compostos voláteis do café são inúmeros e estão presentes em diferentes concentrações. A composição dos compostos voláteis depende de diversos fatores, como espécie, condições climáticas e do solo, armazenamento dos grãos, temperatura e tempo de torração, assim como o tipo de torradora utilizada. Em todas as formas de adulteração ou misturas a constituição dos compostos voláteis é alterada. Esta característica comum já se mostrou eficiente na discriminação de cafés por espécie, região geográfica, qualidade e na identificação de adulterantes (NUROK et al., 1987; DART & NURSTEN, 1989; FREITAS et al., 2001; ZAMBONIN et al., 2005; RISTICEVIC et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009).

MANCHA AGRESTI et al. (2008) extraíram os compostos voláteis de grãos de café sadios e defeituosos após torração clara, média e escura utilizando micro-extração em fase sólida. Os compostos foram analisados em cromatógrafo gasoso e foram determinados aproximadamente 250 compostos voláteis, considerando todas as amostras. Somente cinco compostos foram detectados em todos os grãos defeituosos e não foram detectados nos grãos sadios. Os grãos ardidos foram os que apresentaram maior número de compostos não detectados em grãos sadios, seguido dos pretos e imaturos. Pela PCA os compostos voláteis puderam ser separados em dois grupos, um representado pelos grãos verdes e pretos, e outro pelos grãos sadios e ardidos. Estes resultados indicam que os grãos pretos e ardidos podem estar associados com a fermentação de grãos verdes e sadios, respectivamente.

#### 2.1.4.3 Atributos sensoriais

O grão preto é caracterizado por apresentar aroma forte, com perfil de compostos voláteis distinto do sadio ou dos outros grãos defeituosos, sendo considerado o pior tipo de defeito intrínseco (CLARKE, 1987; COELHO, 2000;

MANCHA AGRESTI et al., 2008). O grão ardido contribui para um sabor azedo, ardido ou que lembre cebola, e o verde, devido a presença de taninos, contribui para a adstringência da bebida, e em baixas concentrações produz uma sensação aceitável na língua, denominada “*mouthfeel*”, mas quando presente em altas concentrações produz sensações desagradáveis (CLARKE, 1987; COELHO, 2000).

COELHO (2000) avaliou os atributos sensoriais do café previamente classificado como “estritamente mole” após a inclusão de diferentes quantidades de defeitos verde, ardido e preto. Foi constatado que o café sem adição de defeitos apresentou valores mais altos para os atributos considerados mais agradáveis, tais como amendoim torrado, amêndoas/nozes, cereal e caramelo, e que a intensidade desses atributos diminuiu à medida que a quantidade de grãos defeituosos aumentou. Após a inclusão de 5 e 10% de grãos verdes, o atributo doce ainda era notado, mas os atributos verde e adstringente foram perceptíveis. Com a inclusão de 30% de grãos verdes notou-se a ocorrência mais acentuada dos atributos químico, óleo e fermentado. Já a adição de grãos ardidos proporcionou o aparecimento dos atributos ardido e amargo. O defeito preto foi o mais prejudicial à qualidade do café, contribuindo fortemente com as características amargo e azedo. A mudança da classificação da bebida de “estritamente mole” para “dura” ocorreu com a inclusão de 19,49% de grãos verdes, 16,36% de grãos ardidos, e de apenas 14,26% de grãos pretos.

PUERTA-QUINTERO (2000) avaliou a influência dos grãos verdes na qualidade sensorial do café e demonstrou que a presença destes grãos em concentração de 2,5% em mistura com grãos maduros foi suficiente para desclassificar 30% das amostras em decorrência de sabores desagradáveis.

SILVA (2005) analisou o impacto sensorial da presença de grãos defeitos na qualidade da bebida produzida por café orgânico, e concluiu que os defeitos intrínsecos ocasionam grande impacto negativo nos atributos doçura, acidez, gosto remanescente e corpo.

## **2.2 COLORIMETRIA**

A colorimetria lida com a descrição objetiva de correlações físicas da percepção das cores. Somente na década de 1920, quando uma medida objetiva da luz colorida foi alcançada, que os físicos desenvolveram métodos para comparações diretas entre a luz colorida com uma luz de referência. Em 1931, a Comissão Internacional de Iluminação (CIE) definiu um observador padrão para a colorimetria e o sistema CIE de



colorimetria. O básico deste sistema ainda é válido, mas desde então diversas evoluções foram feitas (SCHANDA, 2007).

O espaço de cor tridimensional CIE  $L^*a^*b^*$  representa as cores visíveis ao olho humano. Ele separa a iluminação ambiente, ou luminosidade ( $L^*$ ) em um eixo vertical que vai de 0 (preto) ao 100 (branco), e a cromaticidade em um plano xy horizontal (REDDICK et al., 2009). A cromaticidade é representada por dois parâmetros:  $a^*$ , ou o componente verde-vermelho; e  $b^*$ , ou componente azul-amarelo. Entretanto, a cromaticidade é representada e discutida de melhor forma em termos de coordenadas polares, raio e ângulo, que representam a saturação ( $c^*$ ) e a tonalidade ( $h_{ab}$ ) das cores, respectivamente (MENDONÇA et al., 2009a).

## 2.3 ESPECTROSCOPIA

A espectroscopia é o estudo da interação da luz com a matéria. A luz é composta pelas ondas elétrica e magnética que estão em planos perpendiculares entre si. É a parte elétrica da luz, chamada de vetor elétrico, que interage com as moléculas da matéria (SMITH, 1996). O número de onda  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) é diretamente proporcional à energia (Eq. 1), e está relacionada com o comprimento de onda  $\lambda$  ( $\mu\text{m}$ ), com a frequência  $\tilde{\nu}$  ( $\text{s}^{-1}$ ) e com a frequência angular  $\omega$  ( $\text{s}^{-1}$ ) da seguinte forma (Eq. 2):

$$E = h\nu \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\nu = \frac{1}{\lambda} = \frac{\tilde{\nu}}{c} = \frac{\omega}{2\pi c} \quad (\text{Eq. 2})$$

em que,  $E$  = energia da luz,  $h$  = constante de Planck ( $6,626068 \times 10^{-34} \text{ m}^2\text{kg/s}$ ) e  $c = 2,99793 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$ , que é a velocidade da radiação eletromagnética no vácuo (SMITH, 1996; TOLSTOY et al., 2003).

A espectroscopia começou a ser utilizada em experimentos na região do visível do espectro eletromagnético em 1965, quando Newton realizou experimentos sobre a dispersão da luz branca em várias cores utilizando um prisma de vidro triangular. Mas foi apenas em 1860, aproximadamente, que Bunsen e Kirchhoff desenvolveram o espectroscópio de prisma com uma unidade integrada para uso como um instrumento analítico. Posteriormente, foram observados espectros de emissão de várias amostras em chama, o que foi o início das análises de espectroscopia de absorção atômica de

chama (HOLLAS, 2004). Devido a sua extraordinária sensibilidade e velocidade, as técnicas de espectroscopia se tornaram importantes ferramentas para lidar com uma ampla gama de questões da bioquímica e biofísica. Propriedades espectroscópicas, como absorvância, fluorescência e dispersão podem fornecer informações sobre a identidade, concentração, energia, conformação ou dinâmica das moléculas, e serem sensíveis a mudanças na estrutura molecular e no ambiente (PARSON, 2007).

A radiação eletromagnética abrange uma ampla faixa de comprimento de onda, a partir das ondas do rádio até as ondas de raio-  $\gamma$ . Quando expostos a ondas eletromagnéticas os átomos e moléculas se excitam de forma a sofrerem rotação, vibração, ionização, entre outros processos. A Tab. 6 apresenta as regiões do espectro de interesse em análises químicas (SMITH, 2002; HOLLAS, 2004).

**Tabela 6 - Regiões do espectro de interesse em análises químicas**

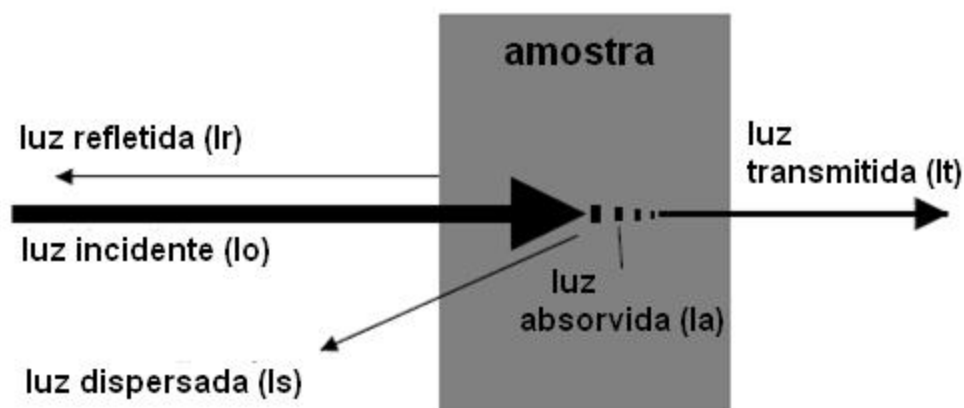
Região	Número de onda/ comprimento de onda	Medida característica
Ultravioleta	52.632-27.778 $\text{cm}^{-1}$ / 190-360 nm	Transições eletrônicas: deslocamentos de elétrons Pi
Visível	27.778-12.821 $\text{cm}^{-1}$ / 360-780 nm	Transições eletrônicas: medidas de cor
Infravermelho próximo (NIR)	12.821-4.000 $\text{cm}^{-1}$ / 780-2500 nm	Sobreposições e combinações de bandas de vibrações moleculares fundamentais
Infravermelho médio (MIR)	4.000-400 $\text{cm}^{-1}$ / 2.500-25.000 nm	Vibrações moleculares fundamentais
Infravermelho distante (FIR)	400-10 $\text{cm}^{-1}$ / 2,5 x 10 <sup>4</sup> a 10 <sup>6</sup> nm	Rotação molecular

FONTE: WORKMAN & WEIER, 2007

### 2.3.1 Técnicas de medição

Ao interagir com a amostra, a luz incidente, de intensidade  $I_0$ , pode ser absorvida  $I_A$ , refletida  $I_R$ , dispersada  $I_S$  ou transmitida  $I_T$ . O balanço de energia para a luz incidente pode ser demonstrado pela Equação (3) ou pela Fig. 1:

$$I_0 = I_A + I_R + I_D + I_T \quad (\text{Eq. 3})$$



**Figura 1 - Balanço de energia da luz incidente ao interagir com uma amostra**

FONTE: STEINER, 2003

Todas as informações químicas da amostra se encontram na  $I_A$ , porém ela só pode ser quantificada pelas medidas de  $I_R$ ,  $I_S$  ou  $I_T$  e do valor de  $I_0$  conhecido (STEINER, 2003). Desta forma, as técnicas de medição utilizadas em espectroscopia são resumidas conforme a Tab. 7.

**Tabela 7 - Técnicas de medição da luz**

Técnica	Medidas	Objetivo da preparação amostral	Avaliação
Transmissão	$I_0, I_T$	$I_R = I_S = 0$	$I_A = I_0 - I_T$
Reflexão	$I_0, I_R$	$I_S = I_T = 0$	$I_A = I_0 - I_R$
Reflexão Difusa	$I_0, I_S$	$I_R = I_T = 0$	$I_A = I_0 - I_S$

FONTE: STEINER, 2003

### 2.3.1.1 Medidas de Transmitância

A espectroscopia por transmitância é a técnica de medição mais utilizada, pela sua simplicidade e versatilidade, podendo ser utilizada na análise de gases, sólidos e líquidos. Nesta técnica, o feixe de energia é forçado a atravessar a amostra, perdendo energia e, através do monocromador ou do interferograma, alcança o detector. O espectro de gases e líquidos de baixo ponto de ebulição pode ser obtido pela expansão da amostra no interior de uma célula previamente evacuada. Existe uma grande variedade de materiais utilizados na confecção dessas células, mas na região do MIR e NIR as células de cloreto de sódio e brometo de potássio são as mais utilizadas

(SABLINSKAS et al., 2003; HOLLAS, 2004; SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000). Os sólidos são analisados, geralmente, com o uso de pastilhas. A amostra é moída em grão juntamente com o brometo de potássio (KBr) até a obtenção de partículas com diâmetro inferior a 2  $\mu\text{m}$ . O material é prensado a vácuo produzindo a pastilha de KBr, transparente e com aplicação ao longo de toda a região do IV, que é analisada diretamente no equipamento (HOLLAS, 2004; SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

#### 2.3.1.2 Medidas de Reflectância

Nas análises de IV por transmitância o feixe de energia é forçado a atravessar a amostra, porém, como as fontes de energia IV fornecem uma pequena quantidade de energia, severas limitações técnicas são impostas, já que uma amostra mais espessa ou mais concentrada, que absorva fortemente em determinada faixa do espectro irá absorver toda a energia fornecida e nenhum sinal chegará ao detector. Desta forma, para se obter um bom espectro por transmitância é necessário fazer um pré-tratamento da amostra, como a produção de pastilhas ou a diluição em solventes, que muitas vezes são trabalhosos e requerem experiência. No caso das análises por reflexão, estas limitações são eliminadas, já que o feixe de energia não precisa atravessar a amostra (SEDMAN et al., 1999). A técnica pode ser dividida em duas categorias: reflexão externa e interna.

A reflexão externa mede a radiação refletida por superfícies, e se divide em reflexão especular e difusa. A reflexão especular ocorre quando o ângulo da radiação refletida se iguala ao ângulo da radiação incidente. A quantidade de luz refletida varia com o ângulo da radiação incidente, o índice de refração, a rugosidade da superfície e as propriedades de absorção da amostra. Na reflexão difusa, ou DRIFT, a energia penetra na amostra, o que não ocorre na reflexão especular, e é refletida em todas as direções. Esta penetração pode se tornar um problema em determinadas regiões do espectro onde há uma alta absorção de energia pela amostra, e os efeitos de superfície causam bandas Reststrahlen. O fenômeno Reststrahlen pode levar a distorção e inversão de bandas de absorção, tornando as análises quantitativas difíceis ou impossíveis. Para solucionar este problema, as amostras em pó analisadas por DRIFT são misturadas com KBr e moídas até a obtenção de partículas pequenas (CULLER, 1993; STUART, 2004).

A técnica conhecida como reflectância total atenuada (ATR), ou espectroscopia de reflexão interna ocorre quando um feixe de ondas eletromagnéticas entra em um

crystal que irá refleti-lo internamente, fazendo com que ele penetre um pouco além da superfície refletora, alcançando a amostra, e perdendo energia na região onde a amostra absorve. A profundidade da penetração depende do comprimento de onda, número de onda, índice de refração do cristal e do ângulo da radiação incidente. Os cristais usados nas células de ATR devem ser materiais com baixa solubilidade em água e alto índice de refração. Na Tab. 8 são listados os materiais mais utilizados. Os diferentes designs dos cristais permitem a análise de amostras sólidas ou líquidas (STAURT, 2004).

**Tabela 8 - Materiais utilizados como cristais de ATR**

Material	Faixa de uso (cm <sup>-1</sup> )	Índice de refração	Propriedades
KRS-5 (iodeto de tálio)	17.000-250	2,4	Solúvel em bases, ligeiramente solúvel em água, insolúvel em ácidos, tóxico
ZnSe	20.000-500	2,4	Insolúvel em água e solventes orgânicos, solúvel em ácidos e bases
Ge	5.000-550	4,0	Insolúvel em água, muito frágil

FONTE: STUART & ANDO, 1996

### 2.3.2 Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho (IR) é o método espectroscópico mais comumente utilizado e disseminado por várias razões: rapidez, sensibilidade, facilidade de manipulação e possibilidade de análise de amostras sólidas, líquidas ou gasosas. Abrange uma extensa região do espectro que é dividida em infravermelho próximo (NIR), infravermelho médio (MIR), e infravermelho distante (FIR), sendo que as duas primeiras regiões são as mais utilizadas. O formato padrão de um espectro de IR, de acordo com a IUPAC, é transmitância (% T) versus número de onda  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) (HOF, 2003).

A região do IR compreende vibrações fundamentais de átomos ligados. Sempre que esses átomos ligados absorvem energia e vibram, eles exibem bandas no espectro. Os movimentos vibracionais se dividem em estiramentos e deformações angulares. Os estiramentos alteram o comprimento das ligações e podem ser simétricos ( $\nu_s$ ), quando duas ligações entre três átomos sempre apresentam o mesmo tamanho, e assimétricos ( $\nu_{as}$ ), quando uma ligação se torna mais curta enquanto a outra se alonga. As deformações angulares ( $\delta$ ) resultam da variação no ângulo das

ligações, e podem ocorrer no plano (tesoura, balanço) ou fora do plano (sacudida, torção), alterando apenas sua referência em relação aos eixos cartesianos (BARSOBA, 2008).

As características de um espectro de IR (número das bandas de absorção, suas intensidades e suas formas) estão diretamente relacionadas com a estrutura molecular de um composto individual, é uma propriedade física exclusiva desse composto, como a sua impressão digital molecular ou *fingerprint* (HOF, 2003). A intensidade das bandas é proporcional à concentração de determinado componente, como descreve a Lei de Beer-Lambert (Eq. 4), deste modo, é possível realizar análises quantitativas utilizando métodos baseados na altura das bandas ou, preferencialmente, nas intensidades integradas (HOF, 2003; SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

$$A = \alpha cl \quad (\text{Eq. 4})$$

em que,  $A$  é a absorvância,  $\alpha$  é a absorvividade molar,  $c$  é a concentração das moléculas absorventes e  $l$  a distância percorrida pela luz ao atravessar o material (WORKMAN & WEIER, 2007).

#### 2.3.2.1 Espectroscopia no infravermelho médio

O infravermelho médio compreende a região de  $4000 \text{ cm}^{-1}$  ( $2,5 \mu\text{m}$ ) a  $400 \text{ cm}^{-1}$  ( $25 \mu\text{m}$ ) do espectro, que pode ser dividido em três regiões. A primeira, de  $4000$  a  $1400 \text{ cm}^{-1}$ , abrange vibrações de alongamento entre átomos de baixo peso molecular (menor que  $20 \text{ g.mol}^{-1}$ ), como O–H, N–H, C≡C, C≡N, N≡N e C=O. A segunda região, de  $1400$  a  $900 \text{ cm}^{-1}$ , é comumente chamada de região de *fingerprint* pela grande quantidade de bandas características de ligações simples ou grupamentos químicos muito específicos. Entre as ligações encontram-se: C–H, C–O, C–N e P–O (SABLINSKAS et al., 2003, WANG et al., 2009). A terceira região, de  $900$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$ , é caracterizada por vibrações de dobramento entre os átomos de C–H de compostos aromáticos. A ausência de vibrações entre  $900$  a  $650 \text{ cm}^{-1}$  é um indicativo de que o composto analisado não apresenta anéis aromáticos. Moléculas contendo átomos da família dos halogênios também contribuem nesta região (SABLINSKAS et al., 2003).

Quanto à instrumentação, existem dois tipos de espectrômetros utilizados no MIR: dispersivo e por Transformada de Fourier (FT), sendo o último mais utilizado (SABLINSKAS, 2003).

Um grande número de compostos presentes no café apresentam bandas marcantes nesta região, como pode ser observado na Tab. 9.

**Tabela 9 - Bandas características de alguns componentes do café no MIR**

Componente ou grupamento	Região (cm <sup>-1</sup> )
Lipídios	~1744
Carboidratos	1400-900
Ácidos Clorogênicos	1300-1150
Cafeína	1650-1600
Ácidos Aromáticos	1700-1680
Ácidos Alifáticos	1714-1705
Lactonas	1780-1762
Cetonas	1725-1705
Aldeídos	1739-1724
Ésteres alifáticos	1755-1740

FONTE: KEMSLEY ET AL., 1995; BRIANDET et al., 1996; LYMAN et al., 2003

### 2.3.2.2 Espectroscopia no infravermelho próximo

O infravermelho próximo abrange a região de 12500 cm<sup>-1</sup> (800 nm) a 4000 cm<sup>-1</sup> (2,5 µm) do espectro. A absorção de energia eletromagnética no NIR é causada por sobreposições e combinações de vibrações de O–H, N–H, C–H e C=O, que geram bandas com intensidades muito fracas, característica que pode tornar a análise do espectro mais complicada (SMITH, 1996; HOF, 2003; SABLINSKAS et al., 2003). Esta característica pode mascarar informações importantes do espectro, principalmente em regiões que são mais afetadas por ruídos e interferências. Os progressos ocorridos nos últimos anos na computação e no desenvolvimento de novos métodos matemáticos para o processamento de dados tornaram as análises de espectroscopia no NIR mais atrativas (PIZARRO et al., 2007; ROGGO et al., 2007).

NIR tem uma enorme variedade de aplicações, e entre os métodos de espectroscopia, apresenta a maior variedade de princípios de instrumentação. Os espectrômetros comerciais variam notavelmente em relação ao custo, portabilidade, tempo de análise e condições ambientais requeridas (SABLINSKAS, 2003).

### 2.3.2.3 Pré-tratamentos utilizados para minimizar variações espectrais

A técnica de espectroscopia no infravermelho vem sendo cada vez mais utilizada na identificação e classificação de amostras por métodos quimiométricos como a PCA. Porém, mesmo os equipamentos mais modernos de infravermelho estão sujeitos a instabilidades, o que irá afetar as posteriores análises quimiométricas. Enquanto estas instabilidades não influenciam análises envolvendo amostras com diferenças evidentes, elas ameaçam o sucesso das análises de conjuntos de dados com pequena variância intrínseca. Em outras palavras, quando existem diferenças espectrais evidentes entre as classes amostrais, fatores relacionados ao equipamento são insignificantes. Entretanto, quando as diferenças espectrais são sutis os efeitos instrumentais se tornam muito importantes (DEFERDEZ & WILSON, 1997).

BRIANDET et al. (1996) identificaram a adulteração de cafés instantâneos com diferentes tipos de açúcares por meio da análise da extração aquosa do café por ATR. Para tornar os espectros repetíveis foi aplicada a correção de linha de base com um ponto, seguida da normalização de área integrada. Estes mesmos tratamentos foram utilizados por KEMSLEY et al. (1995) na diferenciação de cafés torrados por espécie, mas neste caso, os espectros foram obtidos por DRIFT.

No estudo de diferenciação de purês de morango e framboesa, por meio de MIR por ATR, utilizando dois equipamentos de FTIR diferentes, HOLLAND et al. (1997) verificaram a necessidade de efetuar algum pré-tratamento nos espectros a fim de eliminar as variações ocorrentes entre os dois equipamentos empregados. As variações ocorreram na posição da linha de base e nos níveis globais de intensidade do espectro. Antes de efetuar o pré-tratamento, a PCA indicou que o PC1 separou as amostras de acordo com o equipamento empregado na análise e o PC2 separou fracamente as amostras por tipo de fruta. Os autores optaram por efetuar a correção de linha de base com um ponto e a normalização de área dos espectros. A correção de linha de base foi feita utilizando o ponto com maior número de onda na seção do espectro, em uma região sem picos relevantes. A normalização de área compensou os diferentes comprimentos de onda entre o porta-amostra. Isso foi alcançado somando a área total sob a seção do espectro e dividindo a intensidade de cada ponto por esse valor. Após estes tratamentos a PCA indicou que as amostras foram separadas primeiramente pela classe de fruta (PC1), e que o tipo de equipamento utilizado nas análises não causou variação entre os espectros.



DEFERDEZ & WILSON (1997) avaliaram as influências instrumentais e experimentais que afetavam a validade de análises espectroscópicas no MIR de morango, framboesa e maçã, utilizando ATR e DRIFT. Primeiramente, analisando somente um tipo de fruta, as PCA's obtidas permitiram observar que amostras de uma mesma classe se distinguiam pela variação do dia de análise e condições de armazenamento (amostras frescas ou que haviam sido congeladas). Esta variação ocorreu devido à perda de intensidade nos espectros, o que, de acordo com os autores, pode ser devido à perda de intensidade da energia produzida pela fonte, pela perda de sensibilidade do detector ou por uma degradação progressiva da superfície do cristal. Este efeito pode ser reduzido efetuando a normalização de área antes da PCA. Em uma segunda etapa os autores objetivaram verificar se inserindo os outros dois tipos de amostras nas análises estas variações instrumentais ainda seriam evidentes, ou se a variação entre as amostras seria maior a ponto de tornar as variações instrumentais insignificantes. Foi observado que o dia de análise separava os espectros pelo PC1, enquanto que as classes amostrais separavam os espectros fracamente pelo PC2. Após efetuar a normalização de área, os espectros não puderam mais ser discriminados por dia de análise pelo PC1. Os autores atentaram ainda para a importância de se operar o equipamento sob temperatura constante e de efetuar o branco (*background*) antes de cada amostra.

Na tentativa de diferenciar tipos de carne, misturas destas e de identificar a presença de carne que havia sido congelada e descongelada por MIR e PCA, AL-JOWDER et al. (1997) também relataram variações na intensidade de espectros de amostras em duplicata. A variação seria devido à eficiência de contato entre o cristal de ATR e a amostra. Os autores optaram por utilizar dois pré-tratamentos espectrais: correção de linha de base e normalização da área espectral integrada, permitindo que os espectros pudessem ser diferenciados apenas pelo PC1. AL-JOWDER et al. (1999), também analisando tipos de carnes, relataram que a intensidade absoluta de espectros obtidos por ATR deve ser interpretada com cuidado devido ao contato irreproduzível entre a amostra e o cristal, o que é uma fonte de variabilidade espectral indesejada. Neste estudo foi utilizado somente correção de linha de base com um ponto para reduzir esta variabilidade.

Nos estudos de classificação de óleos de oliva e de vinhos australianos, por ATR e transmissão, respectivamente, foi utilizado apenas o pré-tratamento "correção

atmosférica” na manipulação dos espectros antes da análise estatística (SINELLI et al., 2007; BEVIN et al., 2008).

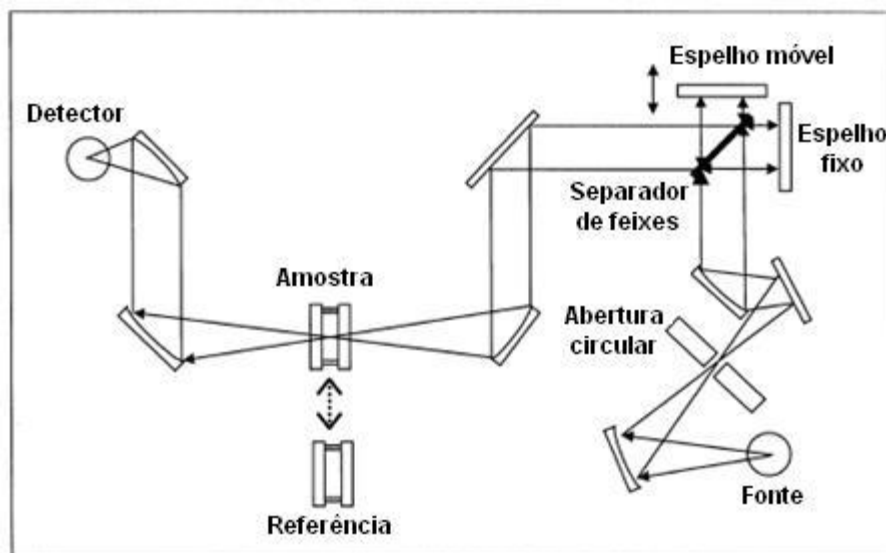
WANG et al. (2009) diferenciaram espectros obtidos por ATR de cafés cultivados em Kona, Hawaii, e cafés cultivados na ilha de Oahu por PLS-CVA. No desenvolvimento do modelo de calibração com o mínimo de erros para a predição da porcentagem do café de Kona em misturas, vários pré-tratamentos foram utilizados, como derivada 1ª e 2ª, centralização da média e escala de variância. Os dois últimos são utilizados para remover informações redundantes e realçar as diferenças entre as amostras. A centralização da média envolve o cálculo dos valores médios de todos os espectros e a subtração desse valor de cada espectro. A escala de variância é usada para enfatizar pequenas variações nos dados e é calculada dividindo-se a resposta em cada ponto espectral pelo desvio padrão das respostas de todos os espectros de treinamento neste ponto. As derivadas são utilizadas para compensar deslocamentos de linha de base entre os espectros e reduzir os efeitos instrumentais de DRIFT.

### **2.3.3 Espectroscopia por Transformada de Fourier**

A espectroscopia por FTIR pode ser utilizada na região do visível, ultravioleta e infravermelho, com especial importância no último. O seu diferencial é que, como não se usam monocromadores, todos os comprimentos de onda são medidos simultaneamente, enquanto que nos espectrômetros dispersivos, são medidos consecutivamente. Isso faz com que as análises por FTIR sejam muito rápidas e apresentem alta resolução ( $\leq 0,001 \text{ cm}^{-1}$ ). O centro do FTIR é o interferômetro, sendo o de Michelson o fundamental. Ele é constituído, basicamente, por um refletor e dois espelhos planos, sendo um fixo e outro móvel. Os refletores mais comuns são feitos de KBr e devem ter uma refletividade de 50% e nenhuma absorção ao longo da faixa de uso (SABLINSKAS, 2003; HOLLAS, 2004).

O funcionamento de um interferômetro é baseado em um feixe de ondas colimado que é dirigido ao separador de feixe, onde é dividido em duas partes de intensidades iguais. Os feixes divididos são refletidos pelos espelhos fixo e móvel de volta ao separador de feixes, onde se recombina e se interfere. O deslocamento do espelho móvel provoca mudanças na extensão do caminho óptico entre os dois feixes, ou entre as distâncias percorridas pelas ondas, de modo que são obtidas interferências construtivas e destrutivas e, conseqüentemente, variações na intensidade de radiação recebida pelo detector. A diferença entre as distâncias percorridas pelas ondas é

denominada diferença do caminho óptico (ou retardação óptica), representada pela letra  $\delta$ . O feixe recombinado passa pela amostra (ou referência) e atinge o detector, como é mostrado na Fig. 2 (SMITH, 1996; SABLINSKAS, 2003; SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).



**Figura 2 - Representação de um FT-IR com interferômetro Michelson**

FONTA: SABLINSKAS, 2003

O procedimento matemático que é utilizado para converter o interferograma (intensidade versus tempo, também chamado de domínio do tempo) para um espectro (intensidade versus frequência, também chamado domínio da frequência), é chamado de Transformação de Fourier. Os interferogramas da amostra e da referência são transformados, a razão entre os dois é automaticamente calculada, e os espectros são apresentados de forma independente (SABLINSKAS, 2003).

## 2.4 QUIMIOMETRIA

A quimiometria é a disciplina que utiliza métodos estatísticos e matemáticos para a seleção do melhor procedimento experimental e do melhor tratamento de dados de análises químicas, envolvendo vários tópicos como delineamento de experimentos, métodos de extração de informações (modelagem, classificação, testes de hipótese) e técnicas que permitam a compreensão de mecanismos químicos (ROGGO et al., 2007).

Devido ao grande número de informações que fornecem, as análises quantitativas e qualitativas de infravermelho requerem a aplicação de métodos

quimiométricos para a sua interpretação (WORKMAN & WEYER, 2007). Os métodos quimiométricos mais comumente utilizados em análises espectroscópicas podem ser divididos em: (a) Pré-tratamentos matemáticos para melhorar as informações que são buscadas no estudo e reduzir a influência de informações irrelevantes no espectro. Os pré-tratamentos mais utilizados são normalizações, derivadas e *smoothing* ou suavização de linha (b) Métodos de classificação para agrupar amostras pelo seu espectro. (c) Métodos de regressão para vincular o espectro com propriedades quantitativas da amostra (ROGGO et al., 2007). Aqui serão abordados apenas os métodos propostos para este trabalho.

A Análise de Componentes Principais (PCA) é um método quimiométrico qualitativo de classificação não supervisionado, ou seja, as amostras podem ser classificadas sem nenhum conhecimento prévio a seu respeito, exceto seu espectro. (ROGGO et al., 2007). A técnica foi proposta em 1901 por Pearson, mas não era amplamente utilizada antes do desenvolvimento da computação moderna, hoje é um dos métodos mais amplamente utilizados. O principal objetivo da PCA é reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados em que há um grande número de variáveis relacionadas entre si, mantendo o máximo possível das informações presentes nos dados originais (KEMSLEY et al., 1996).

A PCA pode ser considerada um método de projeção, que projeta as observações de um espaço  $p$ -dimensional com  $p$  variáveis para um espaço  $k$ -dimensional (onde  $p < k$ ), de modo a conservar o máximo de informações que são medidas pela variação total dos dados originais. Esta redução é obtida por uma transformação linear para um novo conjunto de variáveis, os componentes principais (PC's), que não se correlacionam entre si e são ordenados de tal forma que os primeiros retenham a maior parte da variação de todas as variáveis originais. Geralmente, grande parte da variância dos dados é explicada por um número reduzido de componentes, sendo possível descartar o restante sem grande perda de informações. Se as informações associadas com os dois ou três primeiros componentes principais representam uma porcentagem suficiente da variabilidade total dos dados originais, as observações poderão ser representadas em um gráfico de 2 ou 3 dimensões, tornando muito mais fácil a sua interpretação. (KEMSLEY et al., 1996; MARQUES, 2005; ADDINSOFT, 2011).

A Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) ou Análise de *Clusters* é um método de classificação iterativa, também não supervisionada. O processo começa

com o cálculo da similaridade ou dissimilaridade entre os N objetos ou elementos da população. Em seguida, dois objetos que, quando agrupadas minimizam um critério de aglomeração estabelecida, são agrupados, criando assim uma classe. As similaridades ou dissimilaridades entre a classe e os N-2 outros objetos é calculada utilizando o mesmo critério de aglomeração e os dois objetos ou classes de objetos cujo agrupamento minimiza o critério de aglomeração são então agrupadas. Esse processo continua até que todos os objetos tenham sido agrupados. Essa operação sucessiva de agrupamentos produz um dendograma que representa uma hierarquia de partições, cuja raiz são as classes que contém todas as observações (ADDINSOFT, 2011).

Uma vez que as amostras foram classificadas, pode ser útil determinar em qual extensão elas se diferenciam, fazendo-se necessário o uso de métodos quantitativos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no departamento de Engenharia Mecânica da UFMG (DEMEC/UFMG), no laboratório de Biocombustíveis, vinculado ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Café. A seguir são apresentados os materiais e a metodologia empregados neste trabalho.

#### 3.1 MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima utilizada foi fornecida pelo Café Fino Grão (Contagem, MG, Brasil) e consistiu de uma mistura de grãos sadios e defeituosos de café arábica, provenientes da região de Manhuaçu, safra 2009/2010.

#### 3.2 SEPARAÇÃO DOS GRÃOS DEFEITUOSOS

Os grãos foram separados manualmente conforme apresentado na Fig. 3.



Figura 3 – Classificação de grãos de café sadios e defeituosos

### 3.3 MOAGEM E PENEIRAMENTO

Os grãos crus foram moídos em moedor de café da marca Arbel (Brasil). Para as análises colorimétricas de grãos moídos, as amostras não foram submetidas á peneiramento. Para as análises no infravermelho por transmitância, as amostras foram peneiradas, sendo utilizada a fração com  $D < 0,5$  mm. Nos testes preliminares por ATR, foram utilizadas amostras com diferentes granulometrias ( $0,39 \text{ mm} < D < 0,5 \text{ mm}$ ;  $0,25 \text{ mm} < D < 0,39 \text{ mm}$ ;  $0,15 \text{ mm} < D < 0,25 \text{ mm}$  e  $D < 0,15 \text{ mm}$ ). Na padronização da metodologia de análise por ATR, foram utilizadas amostras com  $0,5 \text{ mm} < D < 0,85 \text{ mm}$  e  $D < 0,39 \text{ mm}$ , e na análise discriminante, amostras com  $D < 0,39 \text{ mm}$ .

### 3.4 ANÁLISE COLORIMÉTRICA

As análises colorimétricas foram realizadas em colorímetro tristímulo (HunterLab Colorflex 45/0 Spectrophotometer, Hunter Laboratories, VA, USA) utilizando ângulo de observação de  $10^\circ$  e iluminante padrão D65 (luz diurna). Amostras de grãos de café crus inteiros e moídos foram colocadas em recipiente de vidro próprio para a análise (04720900G) e sobre a amostra foi colocado um disco de cerâmica. O recipiente foi posicionado no colorímetro e coberto com um recipiente de cor preta. As leituras foram realizadas em triplicata, em três dias diferentes, com amostras separadas em dias diferentes, totalizando 69 leituras para grãos inteiros e 69 leituras para grãos moídos. Os dados fornecidos pelo colorímetro ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) foram utilizados para o cálculo da saturação ( $c^*$ ) e tonalidade ( $h_{ab}$ ), conforme as seguintes equações (BORGES et al., 2002):

$$c^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Eq. 6})$$

$$h_{ab} = \tan^{-1} \left( \frac{b^*}{a^*} \right) \quad (\text{Eq. 7})$$

A diferença de cor entre os grãos sadios e defeituosos foi calculada pela distância Euclidiana entre dois pontos no espaço de cor CIE  $L^*a^*b^*$ , conforme Equação 8 (BORGES et al., 2002):

$$\Delta E_{12} = [(L_1^* - L_2^*)^2 + (a_1^* - a_2^*)^2 + (b_1^* - b_2^*)^2]^{1/2} \quad (\text{Eq. 8})$$

em que,  $\Delta E_{12}$  é a diferença de cor entre duas amostras,  $L^*$  é a luminosidade (define a escala padrão cinza entre o preto e o branco),  $a^*$  é o posicionamento da cor no eixo vermelho-verde e  $b^*$  é o posicionamento da cor no eixo amarelo-azul.

A fim de avaliar se os grãos se distinguem entre si pelos seus atributos colorimétricos, foram utilizados os parâmetros  $L^*a^*b^*$  e  $L^*h_{ab}c^*$  na análise de componentes principais (PCA), utilizando o software XLStat (Addinsoft, 2010).

### 3.5 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

As análises por FTIR foram realizadas no equipamento IRAffinity-1 (Shimadzu, Japão), com um detector DLATGS (Deuterated Triglycine Sulfate Doped with L-Alanine), que abrange a faixa de  $7800-370\text{ cm}^{-1}$  do espectro. As leituras foram efetuadas na faixa de  $4000-700\text{ cm}^{-1}$ , com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , 20 scans e apodização Happ-Genzel utilizada antes da transformação de Fourier. As análises foram realizadas em atmosfera seca e à temperatura de  $20 \pm 0,5\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 3.5.1 Análise qualitativa dos espectros

Os espectros médios obtidos por transmitância e ATR foram analisados de forma qualitativa, relacionando picos e bandas com possíveis constituintes do café cru.

#### 3.5.2 Análise por transmitância

##### 3.5.2.1 Padronização da metodologia de análise

Foram utilizadas amostras de café sadio, ardido, preto e verde, moídos e peneirados. As amostras foram maceradas com KBr e secas em estufa à  $85\text{ }^\circ\text{C}$  de um dia para o outro. No dia seguinte, 0,1g de cada mistura foi pesado e armazenado em *ependorfs*. Todo o conteúdo dos *ependorfs* foi disposto em um acessório próprio e prensado a  $80\text{ kgf/cm}^2$ .

Os seguintes parâmetros de análise foram avaliados: (a) branco (*background*) com ar ambiente ou com uma pastilha de KBr puro, (b) tempo de prensagem das pastilhas (5 e 10 minutos) e (c) concentração de amostra em mistura com KBr (0,7; 2; 3,85 e 9%). O teste referente ao branco foi feito em sextuplicata obtida em dois dias de análise. Para o teste de tempo de prensagem foram produzidas 8 pastilhas prensadas por 5 minutos e 6 por 10 minutos, obtidas em 2 dias de análise. Nesses dois testes foram utilizadas somente amostras de café sadio. O teste de concentração de amostra



foi feito em sextuplicata com leituras obtidas em dois dias de análise, porém, foram utilizadas amostras de café sadio e defeituoso.

### 3.5.2.2 Análise discriminante

De acordo com os resultados do item 3.5.2.1, para a análise discriminante, foi efetuado o branco com uma pastilha de KBr antes de cada leitura, as pastilhas foram prensadas por 5 minutos, e foram utilizadas pastilhas com 2% de amostra em mistura com KBr. Seis espectros de cada classe amostral foram obtidos em dois dias de análise, totalizando 24 espectros.

As leituras foram efetuadas na faixa de 4000-700  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , 20 scans e apodização Happ-Genzel.

Foram utilizados pré-tratamentos matemáticos, tais como correção atmosférica, corte, correção de linha de base, normalização e derivadas 1ª e 2ª para melhorar as informações que são buscadas no estudo e reduzir a influência de informações irrelevantes. Estes pré-tratamentos foram realizados pelo software IRSolution (Shimadzu, Japão) e pelo Excel (Microsoft Corporation, Estados Unidos).

A análise estatística dos dados foi feita pelo software XLStat (Addinsoft, França). Foi aplicada a PCA e a HCA, com o objetivo de avaliar se as classes amostrais podem ser discriminadas entre si pelas suas características espectrais. O tipo de PCA utilizado foi o de Pearson. Para a HCA, foram calculadas as dissimilaridades entre as amostras pela Distância da Corda, e o método de aglomeração utilizado foi o Método de Ward.

### 3.5.3 Análise por ATR

#### 3.5.3.1 Padronização da metodologia de análise

Para a padronização da metodologia de análise por ATR foram utilizadas amostras de café comercial torrado e moído, que foram peneirados em jogo de peneiras. O branco (*background*) foi feito com o ar ambiente antes de cada leitura, e a limpeza do prisma foi feita com acetona.

Foram feitos testes preliminares utilizando os acessórios fornecidos pela Shimadzu para análise por ATR (8200H/8200HA), que consistem em um acessório horizontal equipado com um prisma de ZnSe e um dispositivo para prensagem da amostra sobre o prisma. Diversas variáveis foram alteradas no intuito de melhorar a

qualidade dos espectros, como, (a) massa da amostra (0,15; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4 e 0,45 g), (b) granulometria (frações: 0,39 mm < D < 0,5 mm; 0,25 mm < D < 0,39 mm; 0,15 mm < D < 0,25 mm e D < 0,15 mm), (c) prensagem (sem prensagem, com leve prensagem e com prensagem total) e (d) secagem da amostra (sem secagem e seca em estufa a 85 °C por 16 horas).

Diante dos resultados encontrados nos testes preliminares, foi construído um suporte metálico com as mesmas dimensões do acessório do ATR para manter a distribuição e espalhamento da amostra sobre o prisma constantes. O suporte foi posicionado sobre o acessório e o espaço delimitado por ele foi preenchido com 2 g de amostra que foi compactado com a ajuda de uma espátula, obtendo o melhor contato possível com o cristal. Primeiramente, o efeito da secagem foi avaliado em amostras sem uma granulometria estabelecida. Foram analisadas amostras de café sem secagem prévia e com secagem prévia em estufa a 85 °C por 16 horas, ambas em quintuplicata obtidas em dois dias de análise. Foi avaliado, em quadruplicata, o efeito de diferentes granulometrias, descritas no item 3.3, na qualidade dos espectros.

#### 3.5.3.2 Análise discriminante

Foram utilizadas amostras de café sadio, verde, ardido claro, ardido escuro e preto, moídos e peneirados. As amostras não foram submetidas a uma secagem prévia e o branco (*background*) foi feito com o ar ambiente. O suporte metálico desenvolvido foi posicionado sobre o acessório para análise por ATR, e o espaço delimitado por ele foi preenchido com 2 g de amostra que foi compactada com a ajuda de uma espátula, obtendo o melhor contato possível com o cristal.

As leituras foram efetuadas na faixa de 4000-700  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , 20 scans e apodização Happ-Genzel. Ao final, foram obtidos 75 espectros, ao longo de três meses de análises.

Foram utilizados pré-tratamentos matemáticos, tais como correção atmosférica, corte, correção de linha de base, normalização e derivadas para melhorar as informações que são buscadas no estudo e reduzir a influência de informações irrelevantes. Estes pré-tratamentos foram realizados pelo software IRSolution (Shimadzu, Japão) e pelo Excel (Microsoft Corporation, Estados Unidos).

A análise estatística dos dados foi feita pelo software XLStat (Addinsoft, França). Foi aplicada a PCA e a HCA, com o objetivo de avaliar se as classes amostrais podem ser discriminadas entre si pelas suas características espectrais. O

tipo de PCA utilizado foi o de Pearson. Para a HCA, foram calculadas as dissimilaridades entre as amostras pela Distância da Corda, e o método de aglomeração utilizado foi o Método de Ward.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISE COLORIMÉTRICA

Na Tab. 10, um resumo dos resultados colorimétricos é apresentado. Observaram-se maiores valores de luminosidade em grãos verdes e sadios, e menores em grãos pretos, os menores. Esta tendência foi observada tanto para cafés inteiros quanto para cafés moídos. Em todos os casos a luminosidade foi maior nos grãos moídos em relação aos inteiros, o que sugere que a superfície dos grãos é mais escura que o seu interior. Estes resultados corroboram os obtidos por BORGES et al. (2002), MENDONÇA et al. (2009a); FRANCA et al. (2005b); VASCONCELOS et al. (2007).

Em relação à tonalidade dos grãos inteiros, os sadios e pretos não diferiram entre si, assim como os ardidos. Em relação aos grãos moídos, todas as classes diferiram entre si, e apresentaram tonalidade ligeiramente superior aos inteiros, o que não foi observado por FRANCA et al. (2005b).

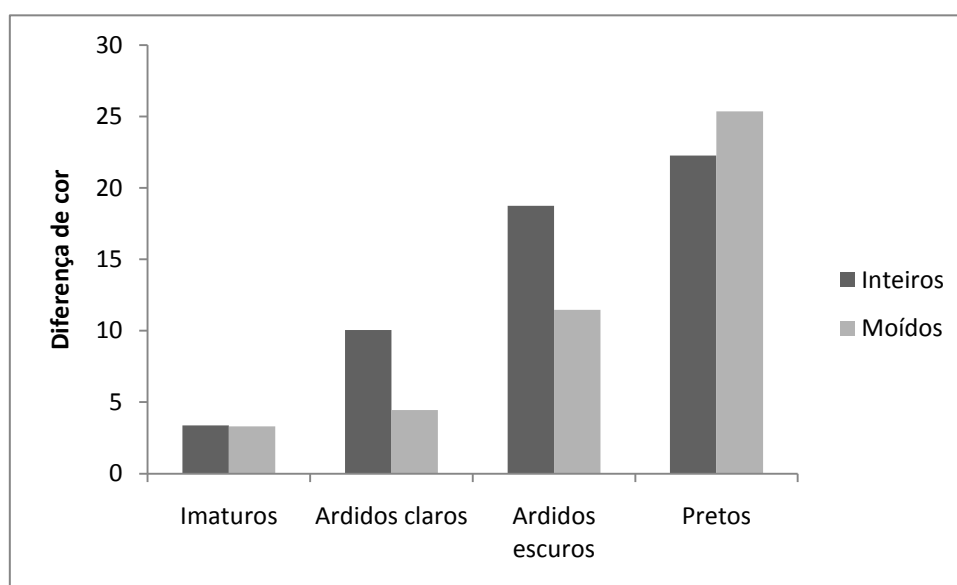
Quanto à saturação, os grãos sadios, verdes e ardidos claros exibiram valores visualmente semelhantes, tanto para grãos inteiros como moídos. Quando o teste de Tukey foi aplicado para os grãos inteiros (Tab. 10), foi constatado que todas as classes amostrais diferem entre si, enquanto que para os grãos moídos, os ardidos não se discriminaram. O baixo valor de saturação encontrado para os grãos pretos também foi observado por FRANCA et al. (2005b) e MENDONÇA et al. (2009a).

**Tabela 10 - Parâmetros médios de cor para grãos inteiros e moídos**

Amostra	L*	a*	b*	h <sub>ab</sub>	c*
Grãos Inteiros					
Sadios	46,1±1,1 <sup>a</sup>	2,7±0,3 <sup>c</sup>	19,0±0,8 <sup>b</sup>	81,8±1,0 <sup>b</sup>	19,2±0,8 <sup>b</sup>
Verdes	43,1±1,1 <sup>b</sup>	1,8±0,3 <sup>d</sup>	20,3±0,8 <sup>a</sup>	84,9±0,6 <sup>a</sup>	20,4±0,8 <sup>a</sup>
Ardidos claros	37,1±2,1 <sup>c</sup>	6,5±1,0 <sup>a</sup>	16,8±0,9 <sup>c</sup>	68,8±3,4 <sup>c</sup>	18,1±0,8 <sup>c</sup>
Ardidos escuros	29,6±2,0 <sup>d</sup>	3,7±0,4 <sup>b</sup>	10,2±1,4 <sup>d</sup>	70,0±1,8 <sup>c</sup>	10,9±1,4 <sup>d</sup>
Pretos	27,6±1,3 <sup>d</sup>	0,9±0,2 <sup>e</sup>	6,7±0,8 <sup>e</sup>	82,4±1,4 <sup>b</sup>	6,8±0,8 <sup>e</sup>
Grãos Moídos					
Sadios	59,6±1,3 <sup>b</sup>	2,3±0,6 <sup>c</sup>	19,4±0,6 <sup>b</sup>	83,3±1,5 <sup>c</sup>	19,6±0,6 <sup>b</sup>
Verdes	61,2±1,1 <sup>a</sup>	0,5±0,2 <sup>d</sup>	21,7±0,9 <sup>a</sup>	88,7±0,4 <sup>b</sup>	21,7±0,9 <sup>a</sup>
Ardidos claros	55,7±0,6 <sup>c</sup>	4,1±0,3 <sup>a</sup>	18,1±0,5 <sup>c</sup>	77,3±0,7 <sup>e</sup>	18,6±0,6 <sup>c</sup>
Ardidos escuros	48,2±0,5 <sup>d</sup>	3,5±0,1 <sup>b</sup>	18,0±0,2 <sup>c</sup>	78,9±0,4 <sup>d</sup>	18,4±0,2 <sup>c</sup>
Pretos	36,0±0,9 <sup>e</sup>	-1,3±0,4 <sup>e</sup>	10,9±0,9 <sup>d</sup>	97,0±2,1 <sup>a</sup>	11,0±0,9 <sup>d</sup>

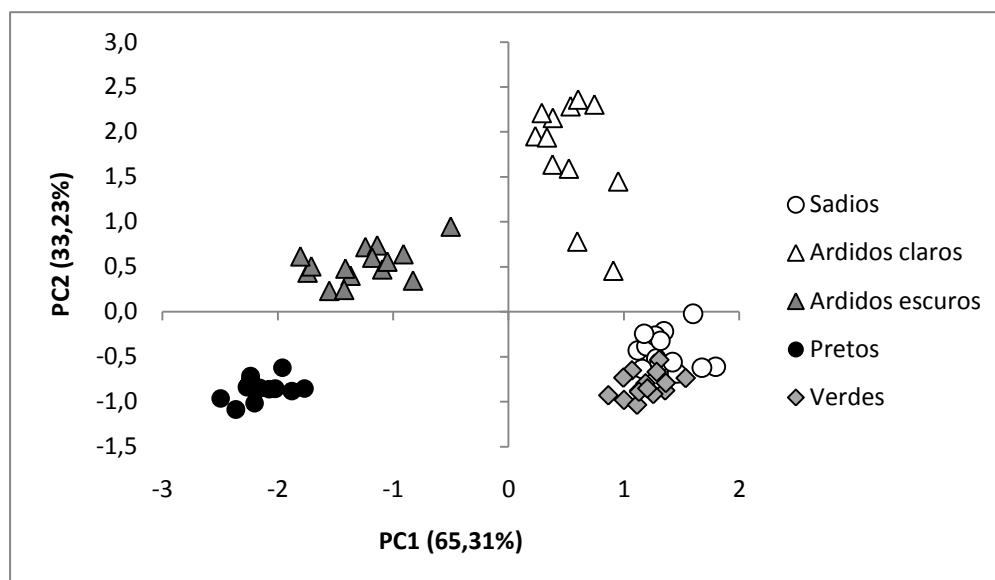
Valor médio ± desvio padrão. Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

O gráfico de diferença de cor calculada entre os grãos de café sadios e cada tipo de café defeituoso mostra que os grãos pretos são os que mais diferem dos sadios, seguidos dos ardidos escuros (Fig. 4).

**Figura 4 - Diferença de cor entre grãos sadios e defeituosos**

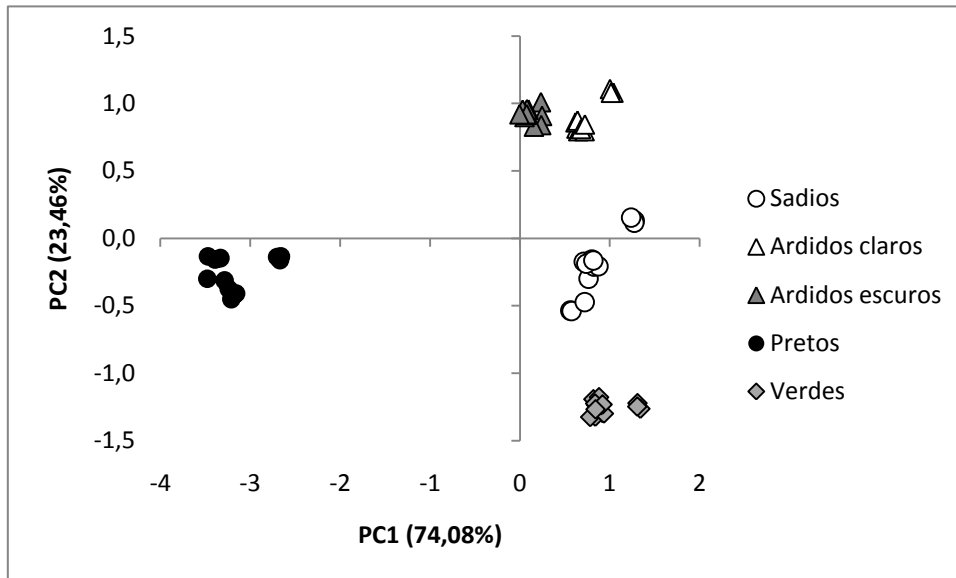
A análise de componentes principais (PCA) foi feita utilizando as variáveis L\*a\*b\* (Fig. 5). Quando os grãos estão inteiros, não é possível discriminar sadios de

verdes, confirmando a ineficiência da separação por cor para estas duas classes específicas. As variáveis  $b^*$  e  $L^*$  contribuíram com 49,92% e 47,87%, respectivamente, com o PC1, que separou as amostras em dois grupos: (1) sadios, ardidos claros e verdes (PC1 positivo) e (2) ardidos escuros e pretos (PC1 negativo). O grupo 1 é caracterizado por apresentar maiores valores de luminosidade e de  $b^*$ , o que indica que eles tendem a ser mais claros e a apresentar maior contribuição do amarelo no eixo azul-amarelo em relação ao grupo 2. O componente PC2 separou os grãos ardidos (PC2 positivo) dos demais (PC2 negativo), e a variável  $a^*$  foi a principal contribuinte da separação (95,87%). De acordo com os dados colorimétricos obtidos, os grãos ardidos apresentam valores de  $a^*$  superiores aos demais, o que indica uma maior contribuição do vermelho no eixo verde-vermelho em relação aos grãos sadios, pretos e verdes.



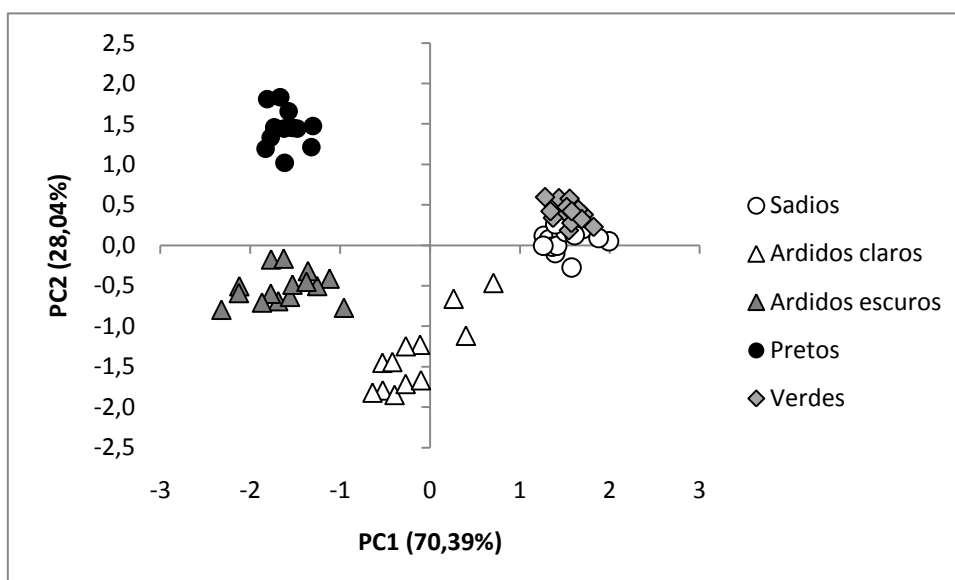
**Figura 5 - PCA dos valores  $L^*a^*b^*$  de grãos inteiros**

Na análise dos grãos moídos (Fig. 6), os pretos (PC1 negativo) se discriminaram totalmente dos demais (PC1 positivo) pelo PC1, com contribuições das variáveis  $b^*$  (40,99%) e  $L^*$  (39,36%), novamente. Os grãos pretos são caracterizados por apresentar menores valores de  $b^*$  e  $L^*$ , o que indica que o amarelo exerce menor influência no eixo azul-amarelo e que eles são mais escuros que os demais. Os grãos ardidos claros e escuros não puderam ser discriminados. Os grãos verdes e sadios puderam ser discriminados, mas se apresentaram em um mesmo quadrante do gráfico.



**Figura 6 - PCA dos valores L\*a\*b\* de grãos moídos**

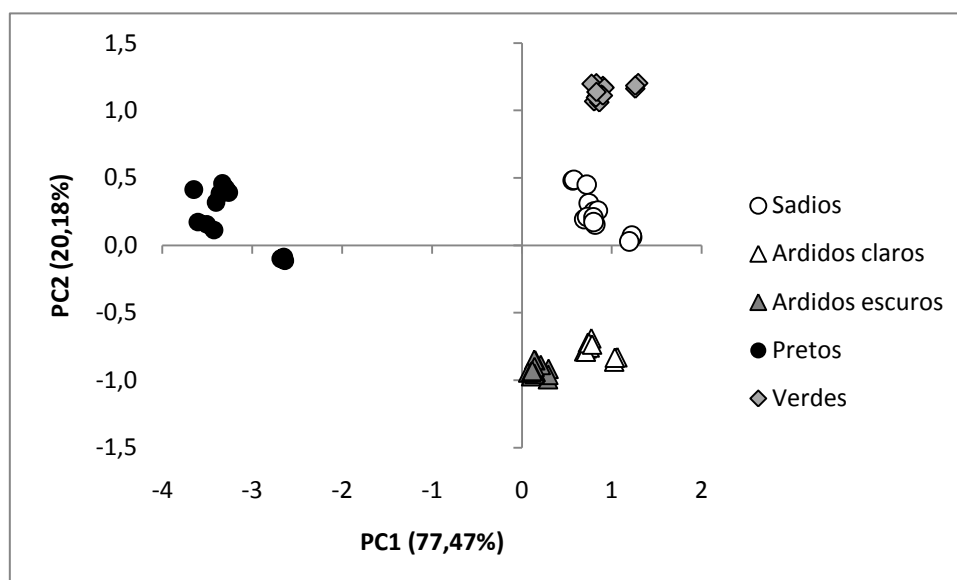
A PCA foi feita utilizando os parâmetros  $L^*$ ,  $h_{ab}$  e  $c^*$  dos grãos inteiros (Fig. 7). Novamente, os grãos sadios não se discriminaram dos verdes. Os grãos sadios e verdes (PC1 positivo) se discriminaram dos ardidos escuros e pretos (PC1 negativo), e dos ardidos claros (PC1 predominantemente negativo). As variáveis que contribuíram mais com o PC1 foram a  $L^*$  (47,64%) e a  $c^*$  (41,65%), e os grãos sadios e verdes apresentaram valores mais altos de  $L^*$  e  $c^*$ , o que indica que eles são mais claros e apresentam maior saturação que os demais. Pelo PC2, os grãos pretos, verdes (PC2 positivo) e sadios (PC2 predominantemente positivo) se discriminaram dos ardidos (PC2 negativo), sendo que a variável  $h_{ab}$  contribuiu significativamente para essa discriminação (84,96%). De acordo com os dados de  $h_{ab}$  apresentados na Tab. 10, a tonalidade de todas as classes amostrais é marrom, porém, os grãos pretos, verdes e sadios tendem a ser mais amarelados, determinando a discriminação no eixo PC2.



**Figura 7 - PCA dos valores L\*a\*b\* de grãos inteiros**

Os grãos moídos se separaram de forma semelhante à observada na PCA com variáveis L\*a\*b\*, como é apresentado na Fig. 8. O PC1 discriminou os grãos pretos (PC1 negativo) dos demais (PC1 positivo) e recebeu contribuição das três variáveis empregadas, sendo que a saturação exerceu maior influência na discriminação (38,65%). Os grãos pretos apresentaram valor de saturação inferior aos demais, o que determinou em grande parte a discriminação no PC1. Já o PC2, discriminou grãos sadios, verdes (PC2 positivo) e pretos (PC2 predominantemente positivo) de grãos ardidos (PC2 negativo) e recebeu contribuição, principalmente da variável  $h_{ab}$ . Com base nos dados de  $h_{ab}$  apresentados na Tab. 10, os grãos moídos tem a tonalidade marrom, porém, os ardidos tendem a ser avermelhados, os sadios e verdes, amarelados, e os pretos, esverdeados, o que determina a diferenciação desses grãos ao longo do eixo PC2.





**Figura 8 - PCA dos valores  $L^*h_{ab}c^*$  de grãos moídos**

MENDONÇA et al. (2009a) utilizando colorímetro tristimulus concluíram que somente grãos ardidos escuros e pretos podem ser discriminados por colorimetria. Porém, os resultados encontrados neste trabalho indicam que os grãos ardidos claros também podem ser discriminados dos sadios pelos seus parâmetros colorimétricos, e que somente os verdes não podem ser discriminados de sadios. Isto indica que a separação eletrônica de grãos verdes que ocorre na indústria por meio de seletora óptica também não é eficiente.

Atualmente, para garantir que os grãos defeituosos foram efetivamente removidos de um determinado lote, a seletora óptica é configurada para permitir ejetar grãos sadios que apresentem coloração similar a de grãos ardidos ou verdes. Como consequência, lotes de café que são rejeitados como defeituosos podem apresentar grande quantidade de grãos sadios, como apontado em estudos empregando misturas de cafés arábica de diferentes origens e safras que foram classificadas eletronicamente como sendo de baixa qualidade (FRANCA et al., 2005b; FARAH et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007). Diante disso, torna-se importante buscar novas técnicas que permitam a discriminação, principalmente de grãos sadios e verdes.

## 4.2 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

### 4.2.1 Análise qualitativa dos espectros

Os espectros médios de café sadio cru, obtidos por transmitância e ATR, submetidos à correção atmosférica, corte na região de 3100-800  $\text{cm}^{-1}$  e correção de linha de base, são apresentados nas Fig. 9 e 10, respectivamente. Em geral, espectros obtidos por transmitância absorvem mais intensamente que os obtidos por ATR. Este efeito ocorre, pois, na análise por transmitância, o feixe de luz é forçado a atravessar a pastilha contendo amostra e perde mais energia do que o feixe que é apenas refletido pela amostra, como acontece na análise por ATR. Porém, a concentração de amostra na pastilha, e a granulometria da amostra na análise por ATR exercem influência nesta absorção. Apesar da diferença no aspecto geral dos espectros, os mesmos picos e bandas de absorção foram observados em ambos e foram enumerados para melhor compreensão.

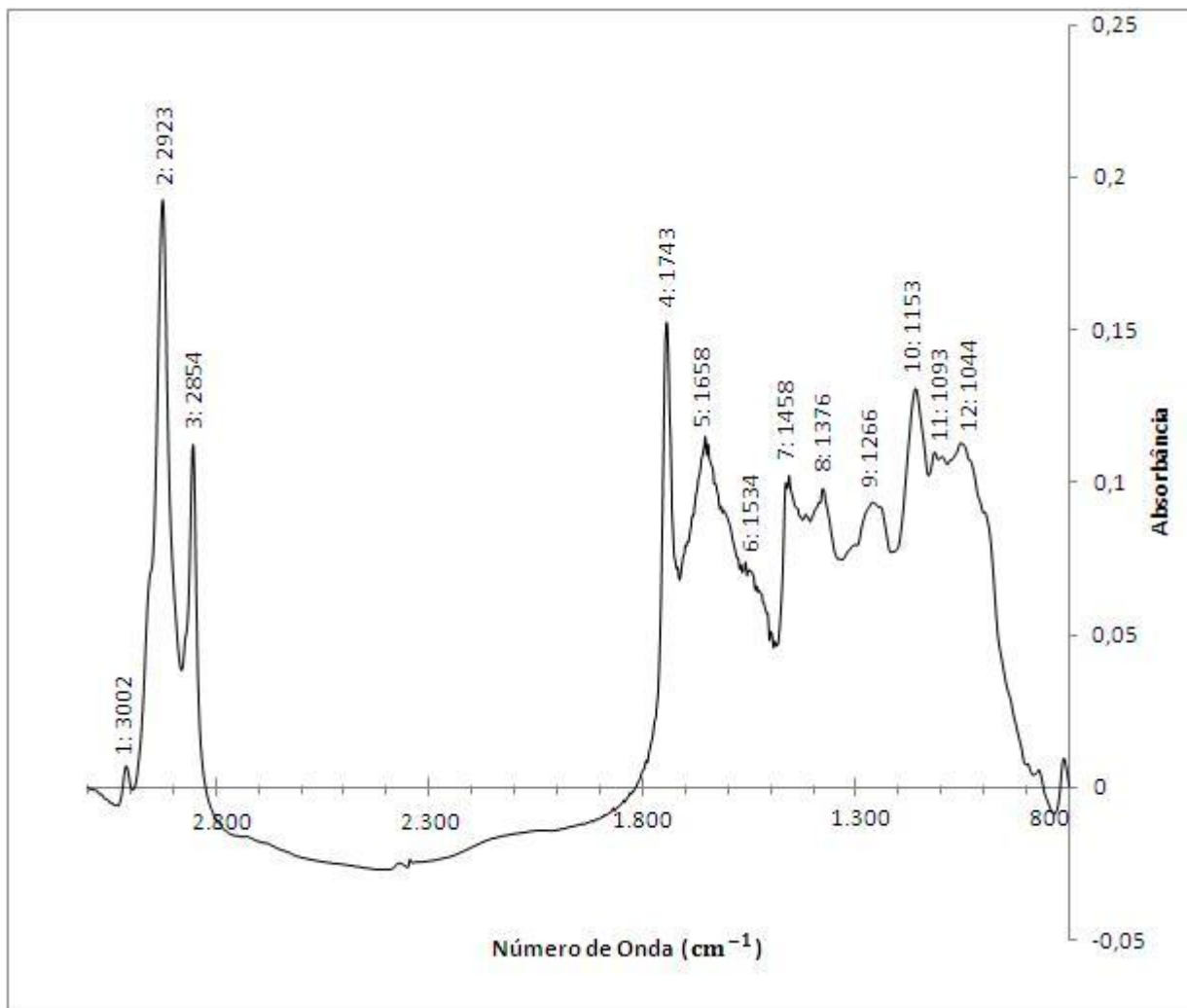
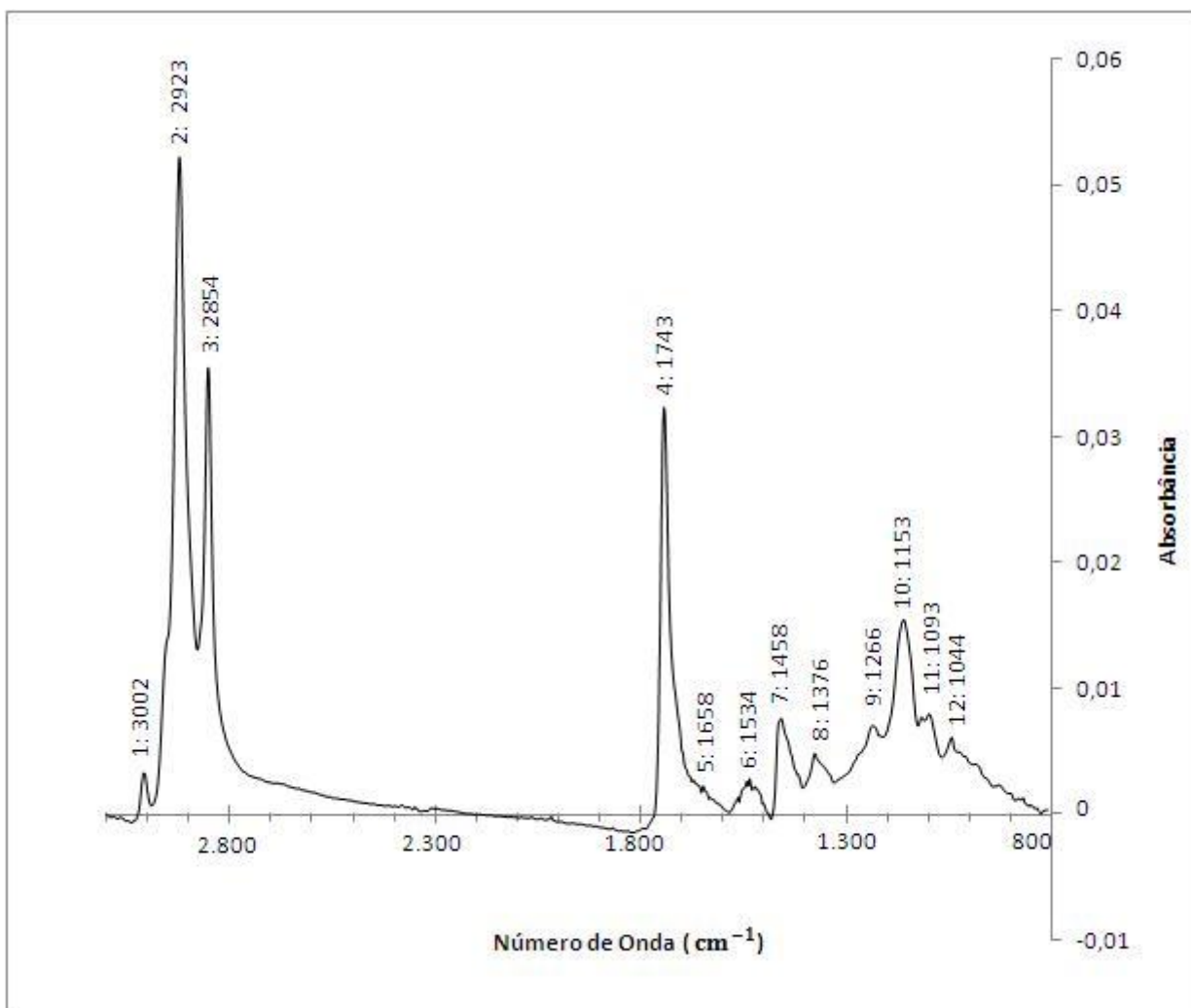


Figura 9 - Espectro médio de café sadio cru obtido por transmitância



**Figura 10 - Espectro médio de café sadio cru obtido por ATR**

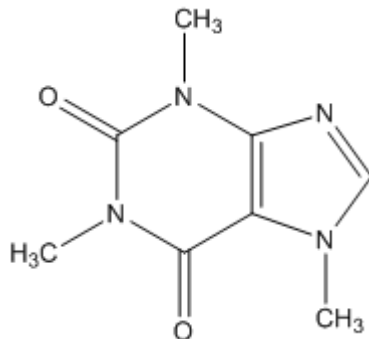
PARADKAR & IRUDAYARAJ (2002) analisando cafeína em refrigerantes por meio de FTIR, atribuíram dois picos fortes em 2882 e 2829  $\text{cm}^{-1}$ , sendo que o primeiro foi relacionado à vibração de estiramento assimétrico de ligações C–H do grupamento metil na molécula de cafeína. Desta forma, a cafeína poderia contribuir com os picos 2 e 3. Porém, esses picos podem, também, ser atribuídos a deformação axial de C–H de uma série de outras funções como alcanos, alquenos, alquinos e anéis aromáticos (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000; BARBOSA, 2008).

De acordo com BARBOSA (2008) e SILVERSTEIN & WEBSTER (2000) os ésteres exibem um pico forte entre 1750-1725  $\text{cm}^{-1}$  (C=O) e outro entre 1300-1000  $\text{cm}^{-1}$  (C–O–C). KEMSLEY et al. (1995) analisaram amostras de café por transmissão utilizando pastilhas de KBr e relataram que os lipídios em geral exibem uma banda característica em  $\sim 1744 \text{ cm}^{-1}$ , devido a vibração na ligação carbonila (C=O) que ocorre

na função éster dos triglicerídeos ou na função ácido carboxílico dos ácidos graxos livres. Este pico foi claramente identificado neste trabalho (4).

O café também apresenta quantidade significativa de ácidos carboxílicos alifáticos, responsáveis pela acidez da bebida (SMITH, 1989). Os ácidos carboxílicos absorvem em  $1750-1725\text{ cm}^{-1}$  (C=O) e em  $3400-2500\text{ cm}^{-1}$  (O–H), podendo contribuir com o pico 4 (BARBOSA, 2008; SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000). Porém, de acordo com LYMAN et al. (2003) os ácidos alifáticos absorvem em  $1714-1705\text{ cm}^{-1}$ .

A cafeína (Fig. 11) foi caracterizada por absorver em  $1750-1550\text{ cm}^{-1}$  (KEMSLEY et al., 1995; BRIANDET et al., 1996; BARBOSA, 2008) e LYMAN et al. (2003) atribuíram o pico em  $1658\text{ cm}^{-1}$  à absorção desse composto. A cafeína apresenta duas lactamas que parecem ser determinantes na sua identificação no espectro. SILVERSTEIN & WEBSTER (2000) atribuíram a ligação C = O de lactamas em anéis de seis ou mais átomos a um pico em  $1650\text{ cm}^{-1}$ . No caso de fusão do anel de lactama com outro anel, geralmente a frequência é aumentada em  $20-50\text{ cm}^{-1}$ . Este pico é claramente identificado nos espectros obtidos por transmissão, enquanto que nos espectros por ATR aparece apenas como um ombro (5).

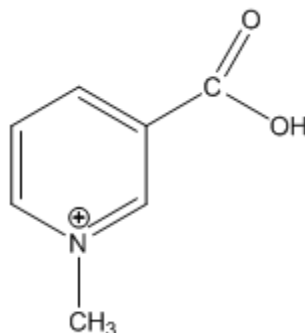


**Figura 11 - Cafeína**

As proteínas são formadas por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas. Esta ligação ocorre entre grupos carboxílicos e amínicos, formando amidas secundárias (BOBBIO & BOBBIO, 1992). As amidas secundárias absorvem entre  $3330-3060\text{ cm}^{-1}$  e entre  $1570-1515\text{ cm}^{-1}$  devido a vibrações de deformação axial e angular de N – H, respectivamente, e em  $1640\text{ cm}^{-1}$ , devido a deformação axial de C=O (BARBOSA, 2008). Portanto, pode contribuir, principalmente com o pico 6.

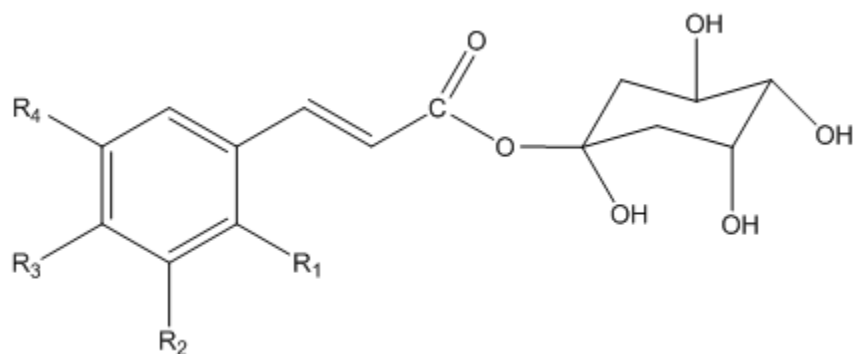
A trigonelina (Fig. 12) é formada por uma piridina. Este composto foi caracterizado por SILVERSTEIN & WEBSTER (2000) por apresentar quatro bandas

entre 1600-1300  $\text{cm}^{-1}$ . BARBOSA (2008) atribuiu um pico médio a forte entre 3100-3010  $\text{cm}^{-1}$  às ligações =C-H do anel, enquanto as ligações C=C e C=N causariam picos fortes em 1615-1575  $\text{cm}^{-1}$ , 1575-1570  $\text{cm}^{-1}$  e 1520-1460  $\text{cm}^{-1}$ . Possivelmente, esse composto contribui com os picos 6 a 8.



**Figura 12 - Trigonelina**

De acordo com KEMSLEY et al. (1995), BRIANDET et al. (1996) e LYMAN et al. (2003) os ácidos clorogênicos absorvem fortemente entre 1300-1150  $\text{cm}^{-1}$ . FABIAN et al. (1992) relacionaram a região de 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$  aos ácidos clorogênicos e à cafeína. Analisando a estrutura desse composto (Fig. 13) pode-se identificar um resíduo de acilação formado por um anel benzênico com possíveis radicais, que irão determinar a sua nomenclatura, esterificado a um ácido quínico. As regiões de absorção do resíduo de acilação podem variar, considerando a variedade de radicais que podem estar presentes. A deformação axial de C – O do ácido quínico ocorre entre 1085-1050  $\text{cm}^{-1}$  (álcool secundário em anel alicíclico de seis átomos), enquanto a vibração de deformação angular de O – H ocorre entre 1420-1330  $\text{cm}^{-1}$ . A ligação C – O – C do éster pode ainda absorver em 1300-1000  $\text{cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000). Dessa forma, os ácidos clorogênicos podem contribuir, principalmente, com os picos 8 a 10.



R1	R2	R3	R4	
H	H	H	H	Ácido cinâmico
OH	H	H	H	Ácido <i>o</i> -hidroxicinâmico
H	H	OH	H	Ácido <i>p</i> -hidroxicinâmico
H	OH	OH	H	Ácido cafeico
H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Ácido ferúlico
H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	Ácido isoferúlico
H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Ácido sinápico

**Figura 13 - Ácidos Clorogênicos**

A região de *finger print* ( $1400-900\text{ cm}^{-1}$ ) é caracterizada por exibir vibrações de uma grande quantidade de ligações simples de grupamentos químicos muito específicos. Entre elas estão: C–H, C–O, C–N e P–O (SABLINSKAS et al., 2003, WANG et al., 2009). A sacarose já foi caracterizada anteriormente por absorver em toda a região de *finger print* (KEMSLEY et al., 1995; BRIANDET et al., 1996), contribuindo, possivelmente, com os picos 8 a 12.

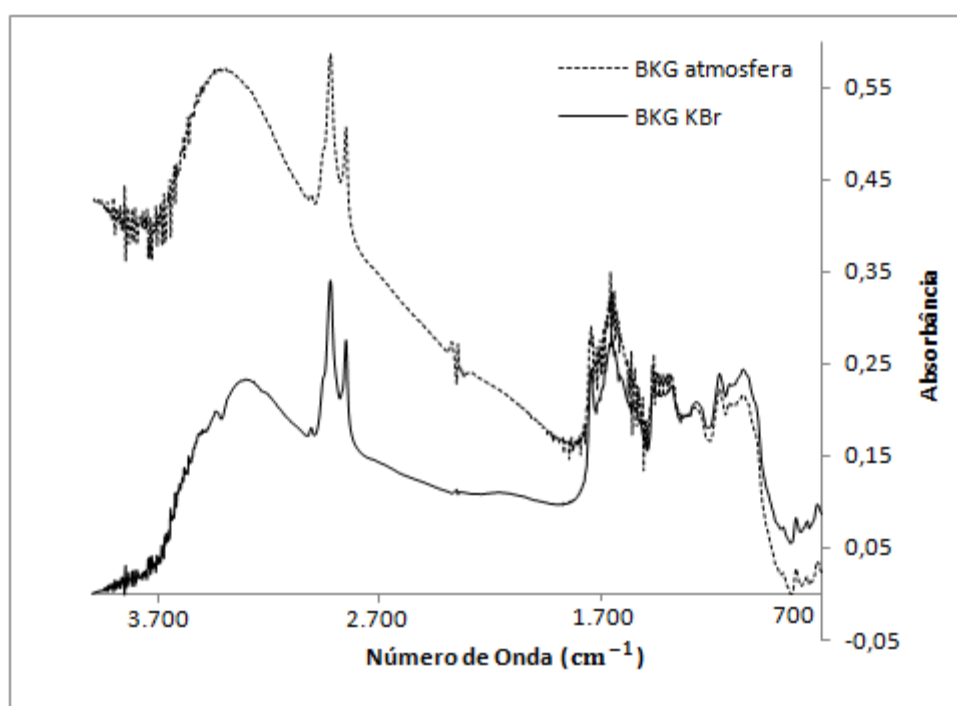
## 4.2.2 Análise por transmitância

### 4.2.2.1 Padronização da metodologia de análise

O branco (*background*) é o procedimento utilizado para reduzir e corrigir o efeito do ambiente ou de algum diluente no momento da leitura das amostras, já que essas informações são irrelevantes e prejudicam a qualidade dos espectros. Uma vez que o brometo de potássio (KBr) utilizado na produção das pastilhas como diluente não absorve na região do infravermelho médio, é possível fazer o branco antes das leituras utilizando apenas o ar ambiente. Porém, como o KBr é altamente higroscópico e a produção das pastilhas demanda tempo, muitas vezes o branco com o ar ambiente não é suficiente para minimizar as influências ambientais. Uma alternativa é fazer uma

pastilha somente com KBr e utilizá-la como branco, dessa forma, o branco terá sido submetido às mesmas condições que a pastilha contendo a amostra.

Apresentam-se na Fig. 14 espectros de café obtidos por transmitância. Em um deles o branco (BKG) foi efetuado somente com o ar ambiente e no outro, com uma pastilha de KBr. Mesmo utilizando o pré-tratamento correção atmosférica, o primeiro sofre interferência ambiental, principalmente nas regiões de absorção da água e do gás carbônico, que, de acordo com BARBOSA (2008), são de 2000-1280  $\text{cm}^{-1}$  e de 2350-2330  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. O procedimento de utilizar uma pastilha com KBr como branco antes das leituras forneceu espectros limpos e com menos ruídos, sendo, portanto, utilizado nas análises subsequentes.

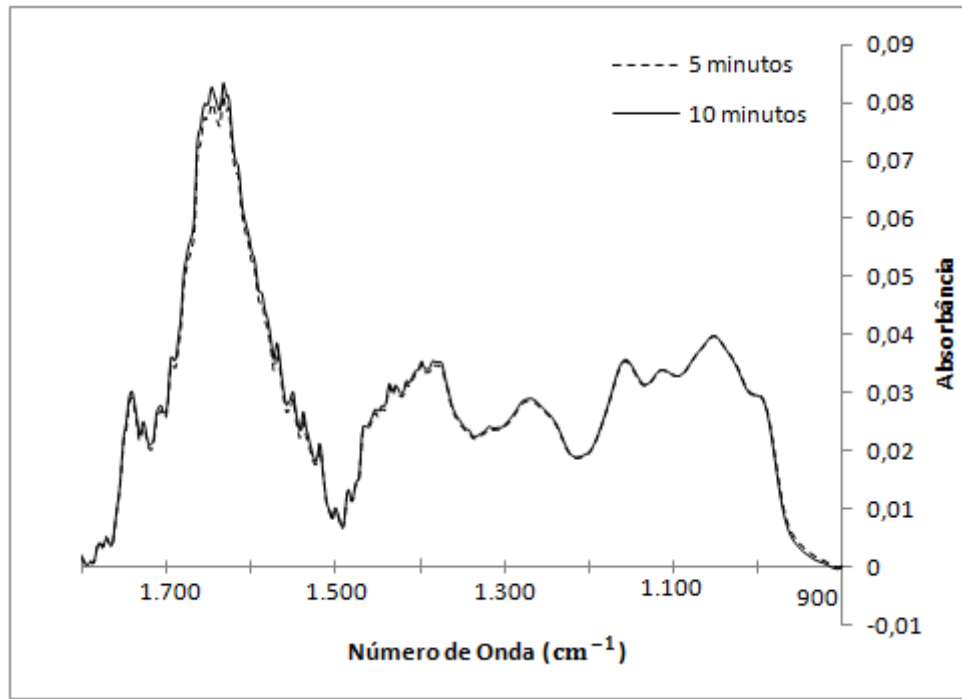


**Figura 14 - Espectros médios de café sadio obtidos por transmitância, com e sem pastilha de KBr como branco**

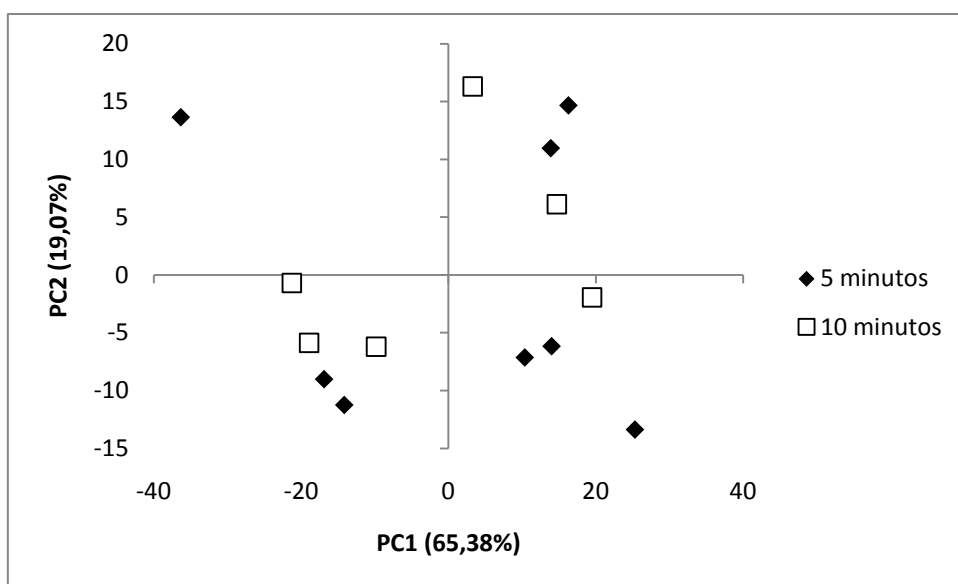
De acordo com o fabricante do FTIR e seus acessórios, quanto maior o tempo de prensagem das pastilhas, maior sua transparência, porém, acima de 10 minutos esse efeito não é mais observado. A fim de avaliar se este fator exerce influência na qualidade dos espectros, foram analisadas 8 pastilhas prensadas por 5 minutos e 6 prensadas por 10 minutos, em dois dias de análise. Na Fig. 15, os espectros médios obtidos foram cortados na região do *fingerprint* para melhor visualização, e foi observado que o tempo de prensagem não exerce influência sobre os espectros,



aparentemente. Os espectros foram cortados na região de 3100-800  $\text{cm}^{-1}$  e submetidos a correção de linha de base. A PCA foi aplicada (Fig. 16) confirmando a observação, visto que não foi observado qualquer tipo de agrupamento em associação ao tempo de prensagem. Dessa forma, as demais pastilhas produzidas foram prensadas por 5 minutos.



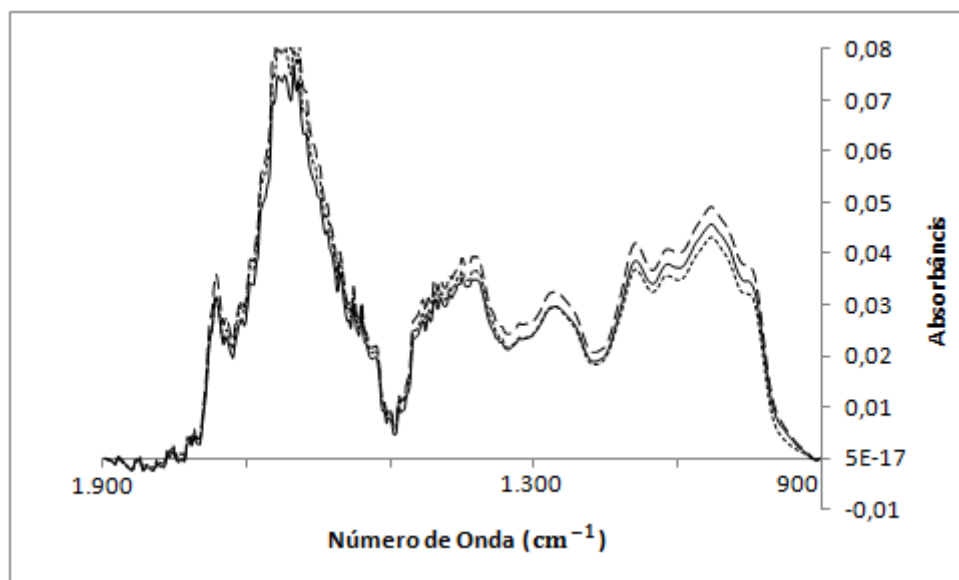
**Figura 15 - Espectros médios de café sadio obtidos por transmitância, com pastilhas prensadas por 5 e 10 minutos**



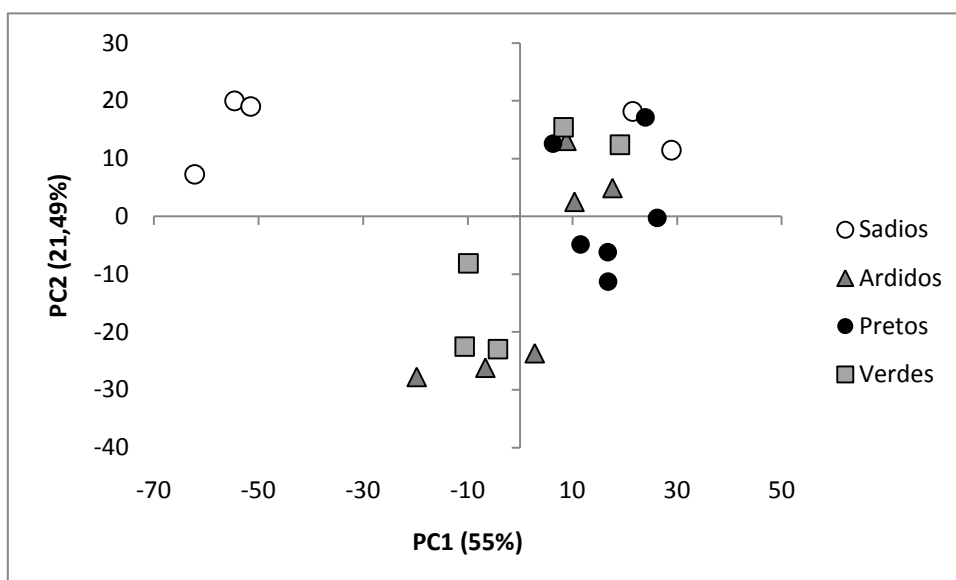
**Figura 16 - PCA de espectros de café sadio obtidos por transmitância, com pastilhas prensadas por 5 e 10 minutos**

Uma das etapas mais importantes da padronização da metodologia de FTIR é a escolha da concentração de amostra em mistura com KBr para a produção das pastilhas. Se a quantidade de amostra for baixa, a luz absorvida poderá ser insuficiente para ser detectada; se for excessiva, a amostra poderá absorver toda a luz incidente e o detector não irá receber nenhum sinal. Foram testadas as concentrações de 0,7; 2; 3,85 e 9% em massa de café, em um total de 0,1 g de mistura café/KBr utilizado para a prensagem das pastilhas.

São apresentados na Fig. 17 três espectros de pastilhas contendo 0,7% de café sadio, submetidos à correção atmosférica, *smoothing* e correção de linha de base. Visualmente, as replicatas apresentaram aparência e intensidade de absorbância semelhantes entre si. A PCA foi aplicada para avaliar se a concentração de amostra estudada permite a discriminação entre as amostras (Fig. 18). Foi observado que não houve uma tendência a discriminação amostral, e que parte dos espectros de café sadio se agruparam com defeituosos, de forma que essa concentração de amostra não favoreceu a análise. Para a PCA foram utilizados os espectros na faixa de 3100-800  $\text{cm}^{-1}$ , com correção atmosférica, *smoothing* e correção de linha de base.

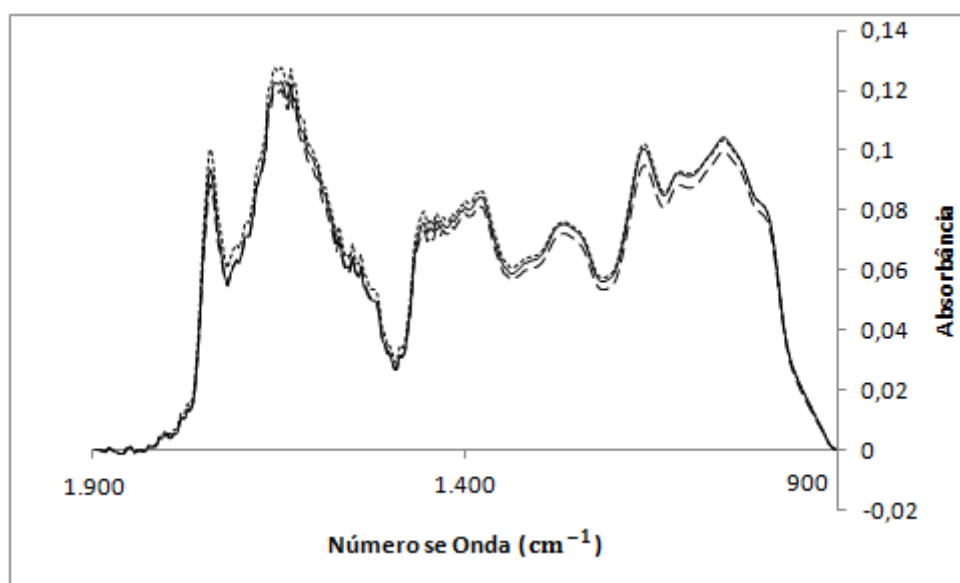


**Figura 17 - Espectros de café sadio obtidos a partir de pastilhas contendo 0,7% de amostra**

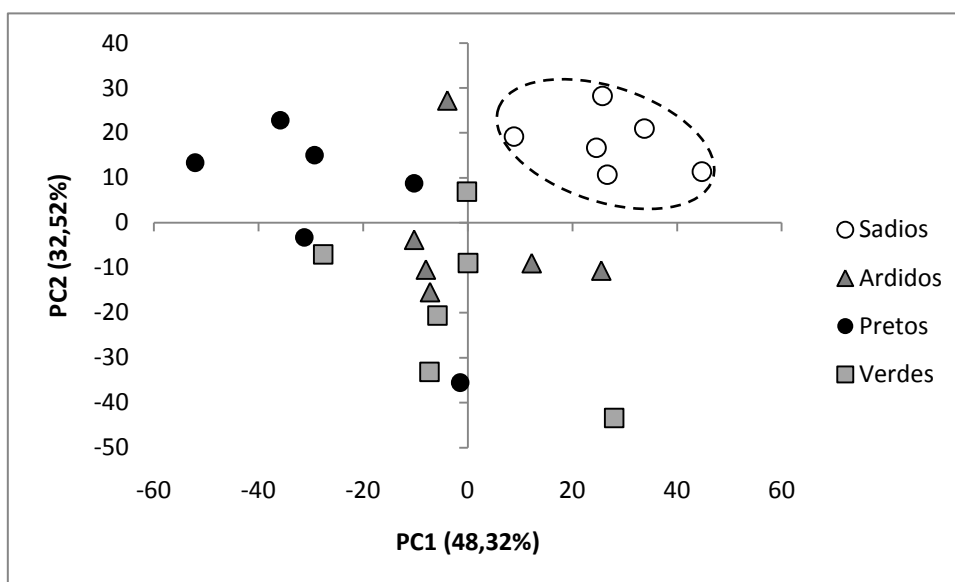


**Figura 18 - PCA de espectros obtidos a partir de pastilhas contendo 0,7% de amostra**

As replicatas dos espectros obtidos com pastilhas contendo 2% de amostra também apresentaram aparência e intensidade de absorbância semelhantes entre si, como é mostrado na Fig. 19, com três espectros de café sadio. A PCA foi aplicada a todos os espectros, na faixa de  $3100-800\text{ cm}^{-1}$ , com correção atmosférica, *smoothing* e correção de linha de base, e os espectros de café sadio se separaram dos defeituosos (Fig. 20). Os dois componentes principais representaram 80,23% da variância total. Esta concentração de amostra em mistura com KBr proporcionou bons resultados.



**Figura 19 - Espectros de café sadio obtidos a partir de pastilhas contendo 2% de amostra**



**Figura 20 - PCA de espectros obtidos a partir de pastilhas contendo 2% de amostra**

As pastilhas contendo 3,85% de amostra em mistura com KBr não se apresentaram resistentes, de forma que houve quebra de cinco delas. Também foi observado que as intensidades de absorvância entre espectros de uma mesma classe amostral variaram entre si, como demonstrado na Fig. 21. Para verificar o potencial da concentração de amostra em estudo, a PCA foi aplicada aos espectros cortados na faixa de  $3100-800\text{ cm}^{-1}$ , com correção atmosférica, *smoothing* e correção de linha de base (Fig. 22). Apesar do eixo PC1 tender a discriminar grãos sadios e ardidos (PC1 positivo) de pretos e verdes (PC1 negativo), a discriminação não foi satisfatória.

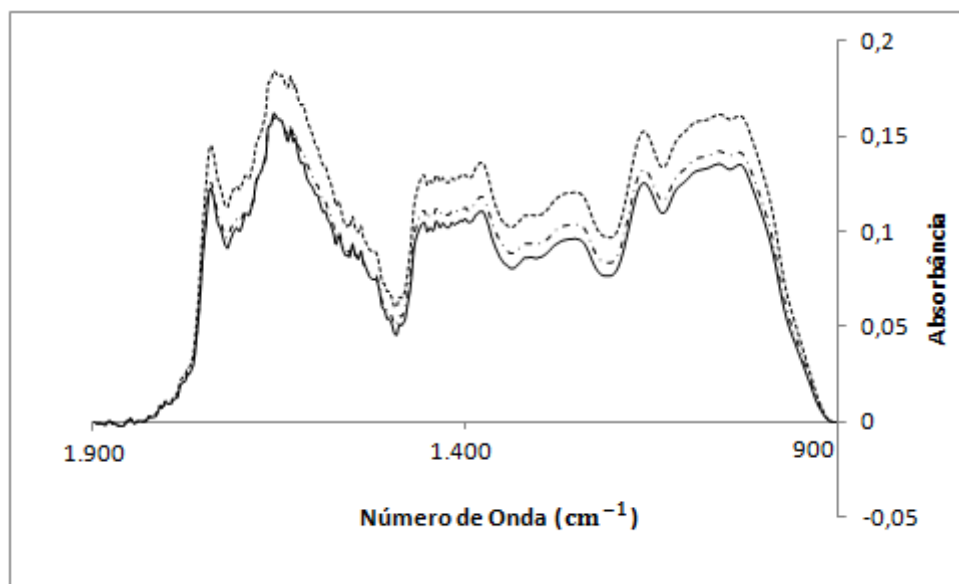


Figura 21 - Espectros de café preto obtidos a partir de pastilhas contendo 3,85% de amostra

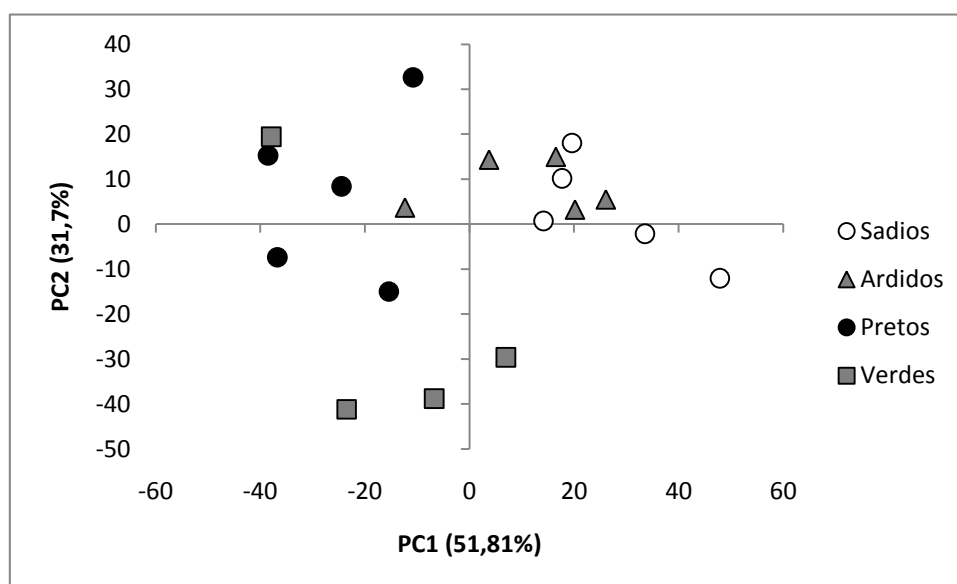
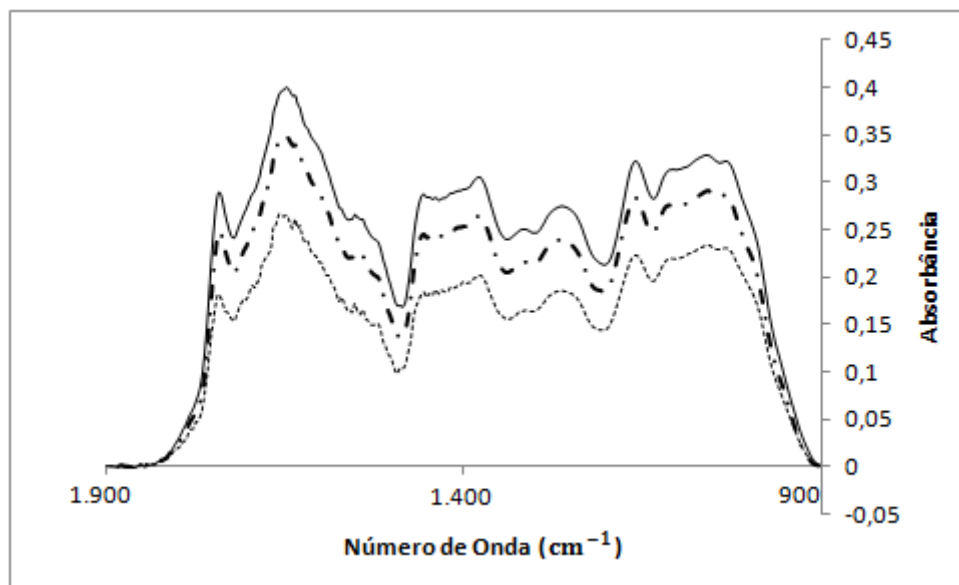
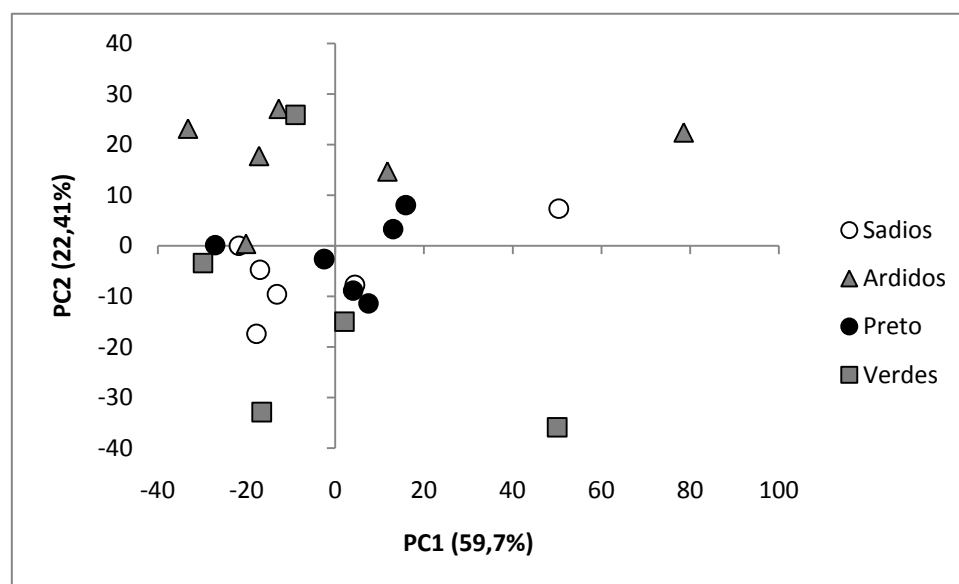


Figura 22 - PCA de espectros obtidos a partir de pastilhas contendo 3,85% de amostra

As pastilhas contendo 9% de amostra em mistura com KBr se apresentaram muito quebradiças e as intensidades de absorvância entre espectros de uma mesma classe amostral exibiram fortes discrepâncias entre si, como é apresentado na Fig. 23. Na PCA aplicada aos espectros na faixa de  $3100-800\text{ cm}^{-1}$ , com correção atmosférica, *smoothing* e correção de linha de base (Fig. 24), não foi observada nenhuma tendência à discriminação amostral, evidenciando que esta concentração de amostra é desfavorável à análise.



**Figura 23 - Espectros de café verde obtidos a partir de pastilhas contendo 9% de amostra**



**Figura 24 - PCA de espectros obtidos a partir de pastilhas contendo 9% de amostra**

Dentre os parâmetros analisados na padronização da metodologia, a utilização de uma pastilha de KBr como branco proporcionou melhora na qualidade dos espectros, reduzindo ou eliminando ruídos provenientes de interferências ambientais. O tempo de prensagem das pastilhas não causou nenhum efeito nos espectros.

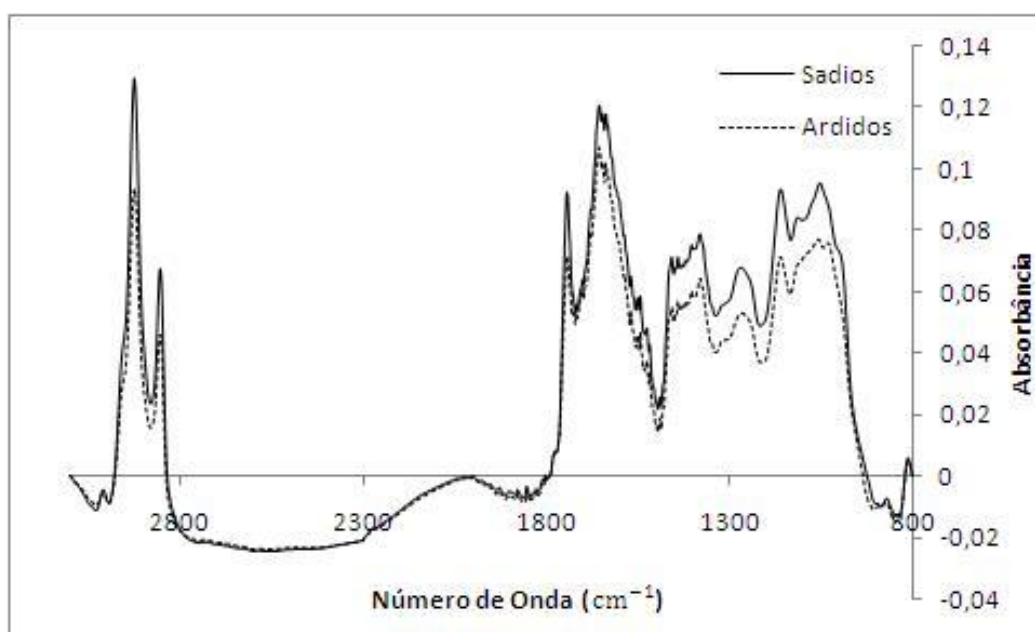
Diferentes concentrações de amostra em mistura com KBr para a produção das pastilhas foram avaliadas. Conforme a concentração de amostra nas pastilhas foi

aumentada, a intensidade de absorbância dos espectros também aumentou, como esperado (Fig. 17, 19, 21 e 23). A concentração de 2% de amostra em mistura com KBr possibilitou a discriminação dos espectros de grãos sadios por PCA, enquanto que, pastilhas contendo concentrações maiores de amostra se apresentaram quebradiças e não favoreceram a discriminação amostral.

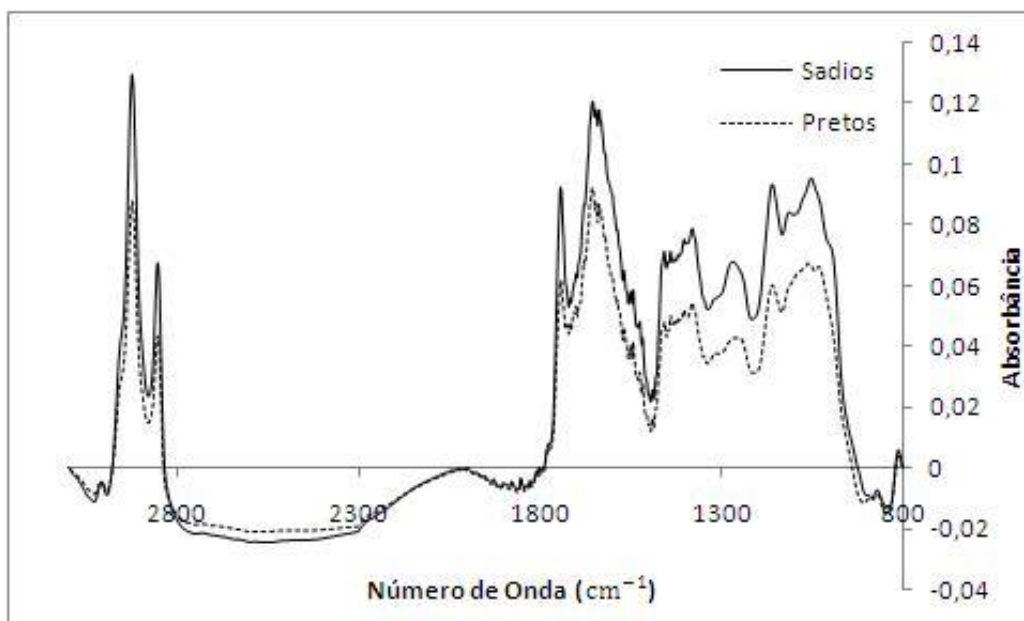
#### 4.2.2.2 Análise discriminante

De acordo com os resultados do item 4.2.2.1, espectros obtidos a partir de pastilhas com 2% de amostra em mistura com KBr foram utilizadas para a análise discriminante de grãos sadios e defeituosos.

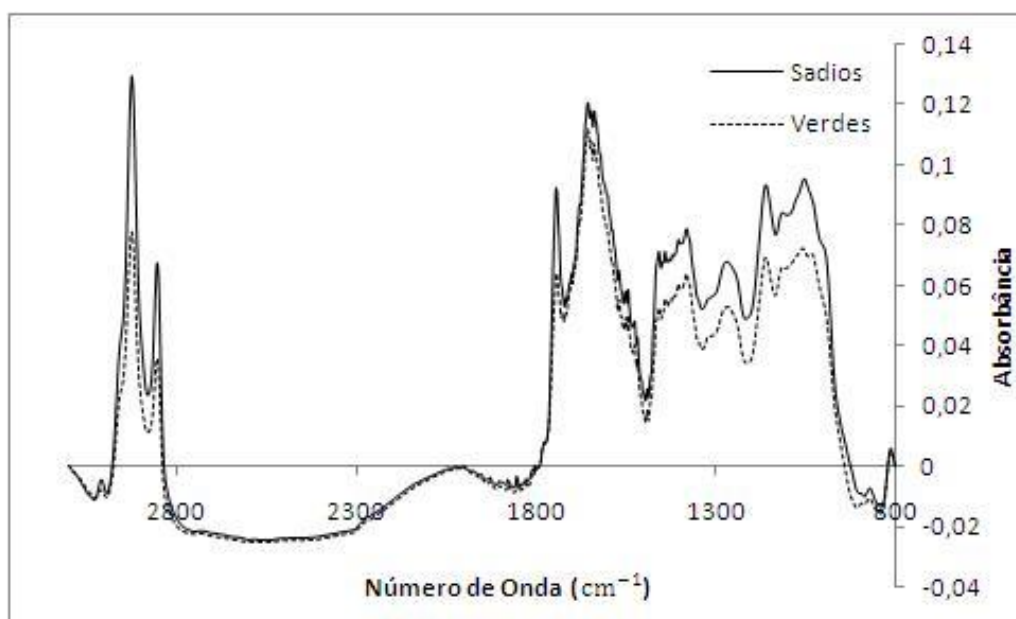
O espectro médio das sextuplicatas de cada café defeituoso foi calculado e comparado com o espectro médio da sextuplicata de café sadio (Fig. 25 a 27). Foi observado que os espectros de café sadio absorveram mais intensamente que os ardidos, pretos e verdes ao longo de toda a faixa estudada, principalmente na região de *fingerprint* ( $1400-900\text{ cm}^{-1}$ ), no pico em  $1743\text{ cm}^{-1}$ , e nos dois picos que ocorrem entre  $3000-2850\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 25 - Espectros médios de cafés sadio e ardido obtidos por transmitância**



**Figura 26 - Espectros médios de cafés sadio e preto obtidos por transmitância**



**Figura 27 - Espectros médios de cafés sadio e verde obtidos por transmitância**

Grãos sadios apresentam valores mais altos de sacarose em comparação com defeituosos (MAZZAFERA et al., 1999; RAMALAKSHMI et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2007). Como este é o açúcar livre majoritário no café cru, já era esperado que os grãos pretos, verdes e ardidos apresentassem menor absorção na região de 1400-900  $\text{cm}^{-1}$  em relação a grãos de café sadios.

Em relação ao teor de cafeína, os resultados da literatura são contraditórios. FRANCA et al. (2005a), FARAH et al. (2006) e RAMALAKSHMI et al. (2007)

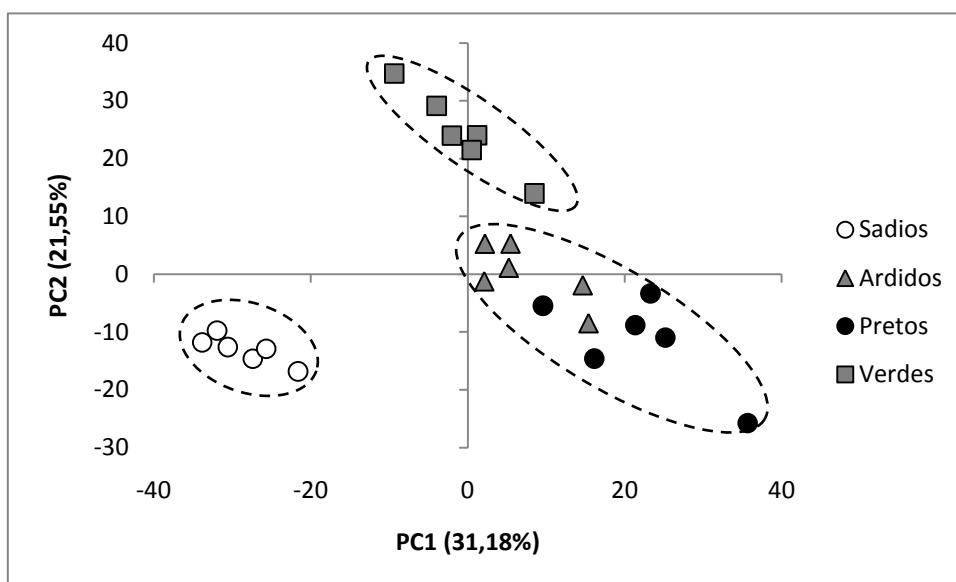


encontraram níveis mais altos de cafeína em cafés de melhor qualidade, enquanto que, FRANCA et al. (2005b) encontraram níveis menores. MAZZAFERA (1999) não encontrou diferença significativa nos teores de cafeína de grãos sadios e defeituosos, e estudos anteriores indicaram que durante o desenvolvimento do café, poucas mudanças ocorrem nos níveis de cafeína (CLIFFORD & KAZI, 1987). Os resultados encontrados nesse trabalho indicam que, na região típica de absorção da cafeína, cafés sadios apresentaram intensidade de absorção superior a de pretos, ligeiramente superior a de ardidos, e semelhante a de verdes.

Uma melhor associação entre os níveis de trigonelina e proteínas de cafés sadios e defeituosos é feita no item 4.2.3.2, pelos espectros obtidos por ATR, nos quais o pico característico desses compostos está mais evidente.

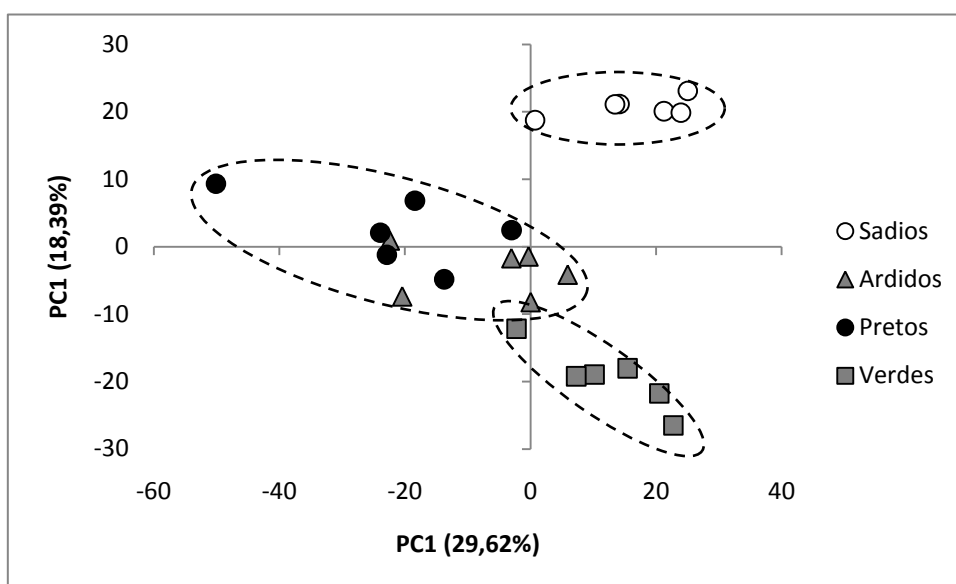
Grãos sadios crus foram caracterizados anteriormente por apresentarem um teor mais alto de lipídios em relação aos defeituosos (MAZZAFERA, 1999; OLIVEIRA et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007), e analisando visualmente os espectros obtidos neste trabalho, pode-se observar que os grãos sadios absorveram mais que os defeituosos em  $1743\text{ cm}^{-1}$ , corroborando os trabalhos anteriores.

Devido à complexidade dos espectros, foi utilizada a PCA para verificar se as classes amostrais estudadas diferenciam entre si por suas características espectrais. A partir dos espectros obtidos na faixa de  $3100\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ , com correção atmosférica, *smoothing* e correção de linha de base, outras manipulações foram testadas. Uma boa discriminação foi observada quando os espectros foram submetidos à correção atmosférica, *smoothing*, correção de linha de base, normalização e derivada 1ª (Fig. 28). Os espectros foram divididos em três grupos: (a) sadios, (b) verdes e (c) fermentados (ardidos/pretos). Neste caso, o primeiro e segundo componentes principais representaram 31,18% e 21,55% da variância total dos espectros, respectivamente.



**Figura 28 - PCA de espectros normalizados e submetidos a derivada 1ª obtidos a partir de pastilhas contendo 2% de amostra**

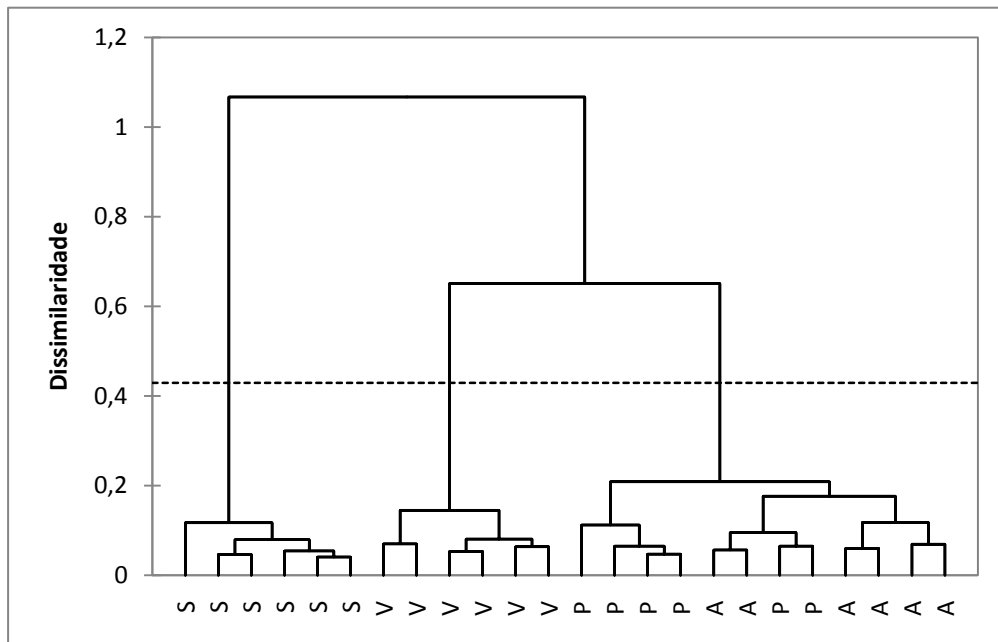
Quando a derivada 2ª foi aplicada, a separação não foi melhorada (Fig. 29).



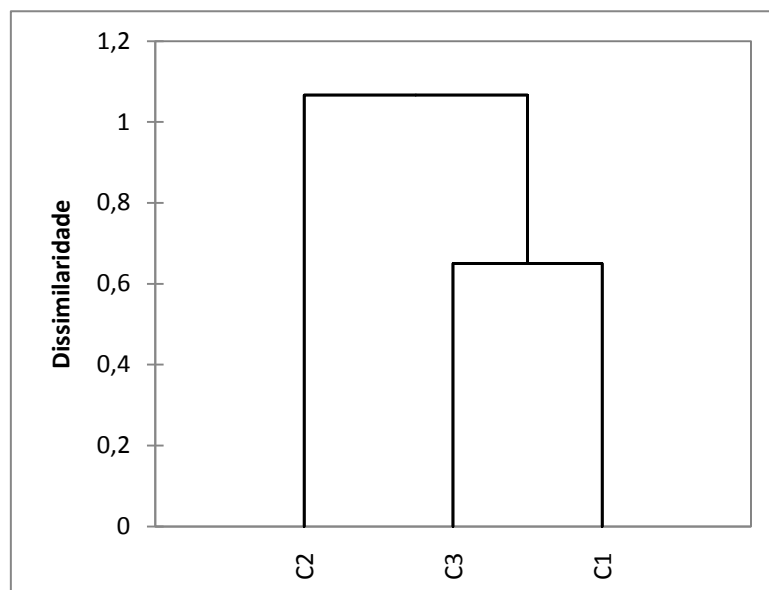
**Figura 29 - PCA de espectros normalizados e submetidos a derivada 2ª obtidos a partir de pastilhas contendo 2% de amostra**

A Análise de Agrupamentos Hierárquicos foi aplicada aos espectros normalizados e submetidos à derivada 1ª, e evidenciou a discriminação dos cafés de diferentes qualidades, corroborando os resultados observados na PCA (Fig. 30 e 31). Nos dendogramas, os espectros de café sadio se agruparam formando uma grande classe (C2) que se discriminou claramente das classes C3, formada por espectros de

café verde, e C1, formada por espectros de café ardido e preto. É possível observar que a dissimilaridade entre a classe C2, formada por espectros de café sadio, e as demais classes é superior a dissimilaridade entre as classes representadas por grãos defeituosos, nas quais os espectros foram agrupados em função do processo fermentativo, de forma que grãos verdes se discriminaram de ardidos e pretos.



**Figura 30 - Dendrograma de espectros obtidos por transmitância (S = Sadio; A = Ardido; V = Verde e P = Preto)**



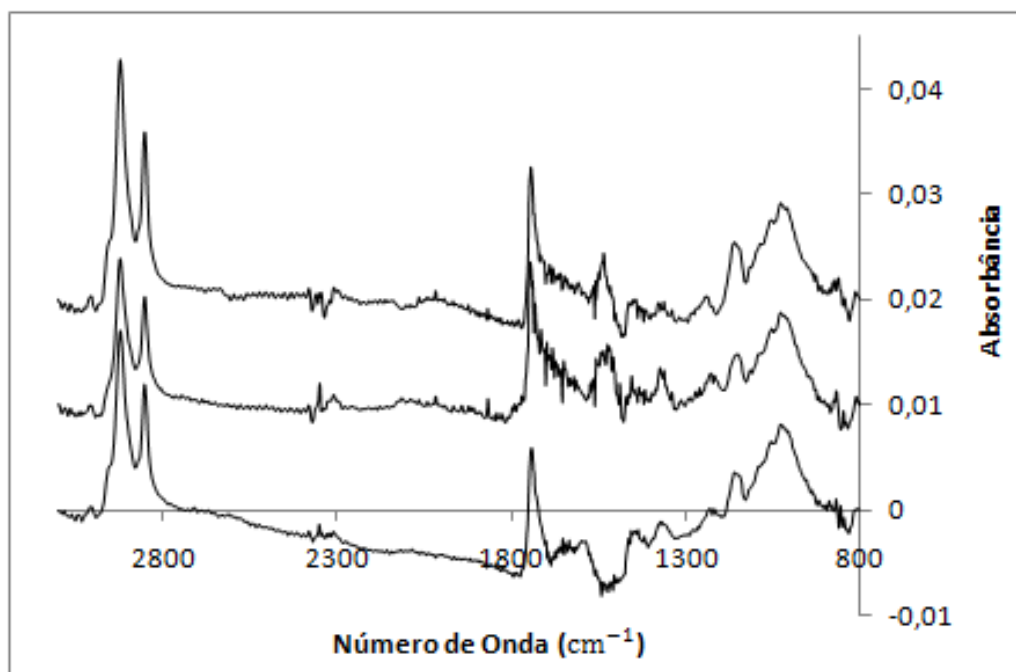
**Figura 31 - Principais classes do dendrograma de espectros obtidos por transmitância**

Pode-se concluir que a técnica de espectroscopia no infravermelho por transmitância utilizando pastilhas de KBr apresenta potencial para discriminar cafés de diferentes qualidades. Apesar dos resultados positivos, deve-se atentar para as limitações de se implementar esta técnica em análises de rotina, pois ela é demorada, exige a etapa de preparação das pastilhas e emprega uma quantidade mínima de amostra, o que é desfavorável às análises quantitativas ou representativas de um lote.

### **4.2.3 Análise por ATR**

#### **4.2.3.1 Padronização da metodologia de análise**

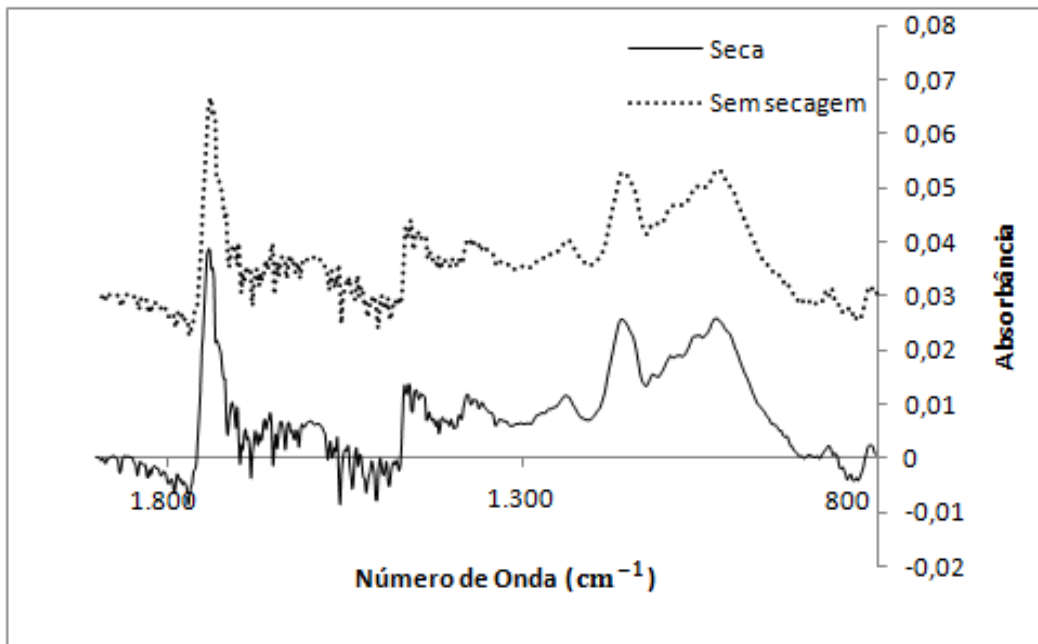
Como mencionado no item 3.5.3.1, foram feitos testes preliminares com café torrado utilizando apenas os acessórios fornecidos pela Shimadzu para análise por ATR. Diversas variáveis foram alteradas no intuito de melhorar a qualidade dos espectros, como, (a) massa da amostra, (b) granulometria, (c) prensagem e (d) secagem da amostra, e nenhuma dessas variáveis, nem a combinação de algumas delas, proporcionou espectros repetíveis e sem ruídos, de forma que os testes não foram conclusivos. Para ilustrar isso, são mostrados na Fig. 32 três espectros de uma mesma amostra obtidos sob as seguintes condições de análise: (a) massa: 0,4 g, (b) granulometria ( $0,15 \text{ mm} < D < 0,25 \text{ mm}$ ), (c) prensagem total e (d) sem secagem. A linha de base foi deslocada para facilitar a visualização dos espectros. Como pode ser observado, os três espectros se diferem em aparência, apresentam picos com intensidade de absorção diferentes e grande quantidade de ruídos.



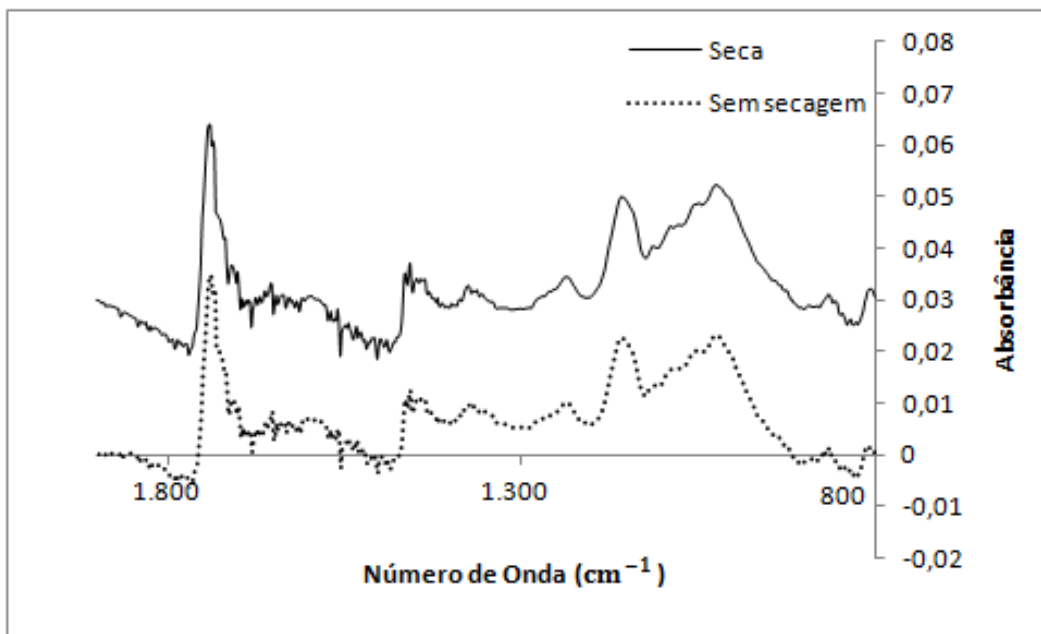
**Figura 32 - Espectros de café torrado obtidos por ATR sem suporte, sob as mesmas condições de análise**

Somente quando o suporte metálico desenvolvido foi utilizado, os espectros passaram a ser repetíveis e a se apresentar sem ruídos. Isso indica que o espalhamento e a superfície de contato entre o prisma e a amostra exercem muita influência na qualidade dos espectros e devem ser mantidos constantes.

O efeito da secagem em estufa antes das análises foi avaliado com amostras sem uma granulometria estabelecida. Espectros de amostras com e sem secagem prévia, sem serem submetidos ao pré-tratamento correção atmosférica são mostrados na Fig. 33. Os mesmos espectros após aplicação da correção atmosférica são mostrados na Fig. 34. A linha de base foi deslocada para melhor visualização. Observa-se que, as amostras com e sem secagem prévia apresentaram espectros muito semelhantes, e o pré-tratamento correção atmosférica foi suficiente para minimizar ruídos provenientes da umidade ambiente.



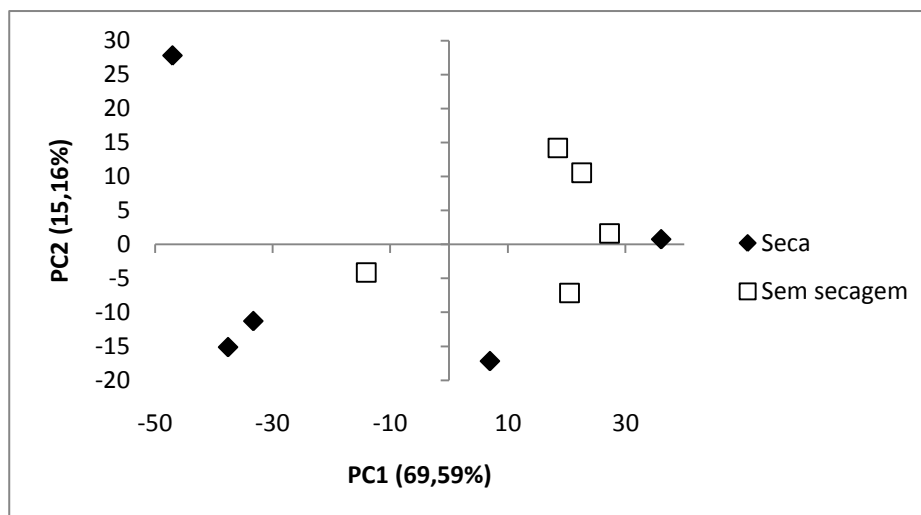
**Figura 33 - Espectros de café torrado seco e sem secagem, sem correção atmosférica**



**Figura 34 - Espectros de café torrado seco e sem secagem, com correção atmosférica**

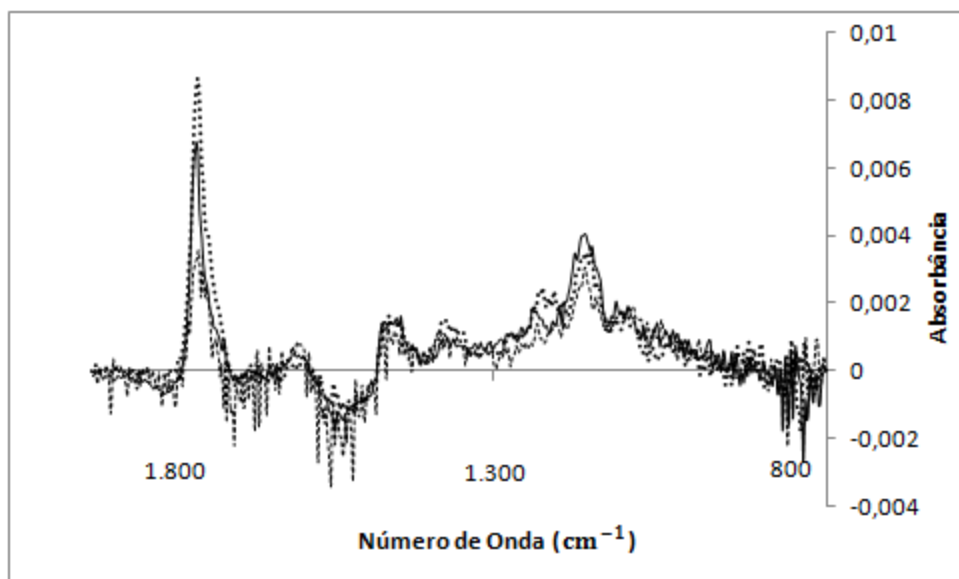
A fim de confirmar se o procedimento de secar as amostras antes das análises não causa nenhum efeito na qualidade dos espectros após a aplicação do pré-tratamento correção atmosférica, foram analisados por PCA 5 espectros de amostras com secagem prévia em estufa e 5 sem secagem prévia (Fig. 35). Os espectros foram submetidos aos pré-tratamentos: correção atmosférica, corte na região de 3100-800

$\text{cm}^{-1}$  e correção de linha de base. Nenhum tipo de agrupamento entre os espectros foi observado, demonstrando que o procedimento de secar as amostras antes da análise não exerceu influência suficiente nos espectros a fim de discriminá-los, ou seja, que o procedimento é desnecessário. Dessa forma, para as análises subsequentes não foi efetuada a secagem das amostras.

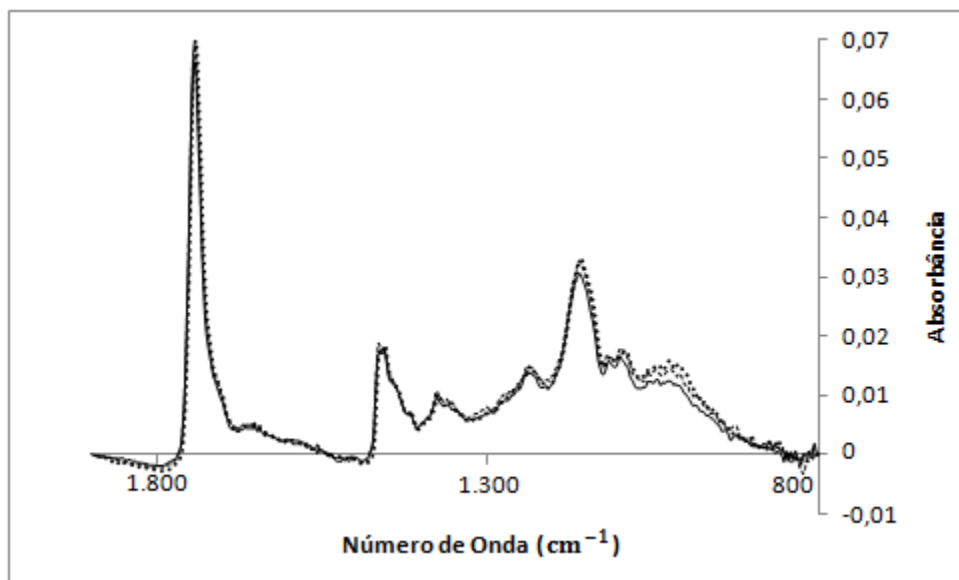


**Figura 35 - PCA de espectros obtidos a partir de amostras com e sem secagem prévia**

A fim de avaliar o efeito da granulometria na qualidade dos espectros, foram analisadas amostras de café com duas granulometrias diferentes:  $0,5 \text{ mm} < D < 0,85 \text{ mm}$  (Fig. 36) e  $D < 0,39 \text{ mm}$  (Fig. 37). A primeira forneceu espectros com muitos ruídos e com discrepâncias nas intensidades de absorção das replicatas, enquanto que a segunda granulometria avaliada forneceu espectros limpos e repetíveis. DOWNEY et al. (1997) afirmam que o tamanho das partículas da amostra afeta a qualidade dos espectros, e que alguns tratamentos, como normalização, podem ser utilizados para aumentar a repetitividade dos espectros. Nas Fig. 36 e 37, pode ser observado que amostras com grânulos menores absorvem mais intensamente devido a maior superfície de contato entre a amostra e o prisma.



**Figura 36 - Espectros de café torrado com partículas com  $0,5 \text{ mm} < D < 0,85 \text{ mm}$**



**Figura 37 - Espectros de café torrado com partículas com  $D < 0,39 \text{ mm}$**

Com os resultados obtidos, foi definido que amostras sem secagem prévia em estufa e com partículas com  $D < 0,39 \text{ mm}$  seriam utilizadas na análise discriminante.

#### 4.2.3.2 Análise discriminante

Nas Fig. 38 a 41, são mostrados os espectros médios de café cru sadio juntamente dos espectros médios de cada tipo de café defeituoso, submetidos à correção atmosférica, corte na região de  $3100\text{-}800 \text{ cm}^{-1}$  e correção de linha de base. Apesar da semelhança no aspecto geral dos espectros, algumas diferenças podem ser



notadas. Os espectros de grãos de café sadios absorveram mais intensamente que os ardidos escuros, pretos e verdes ao longo de toda a faixa estudada, e apresentaram intensidades de absorção muito semelhantes às de ardidos claros.

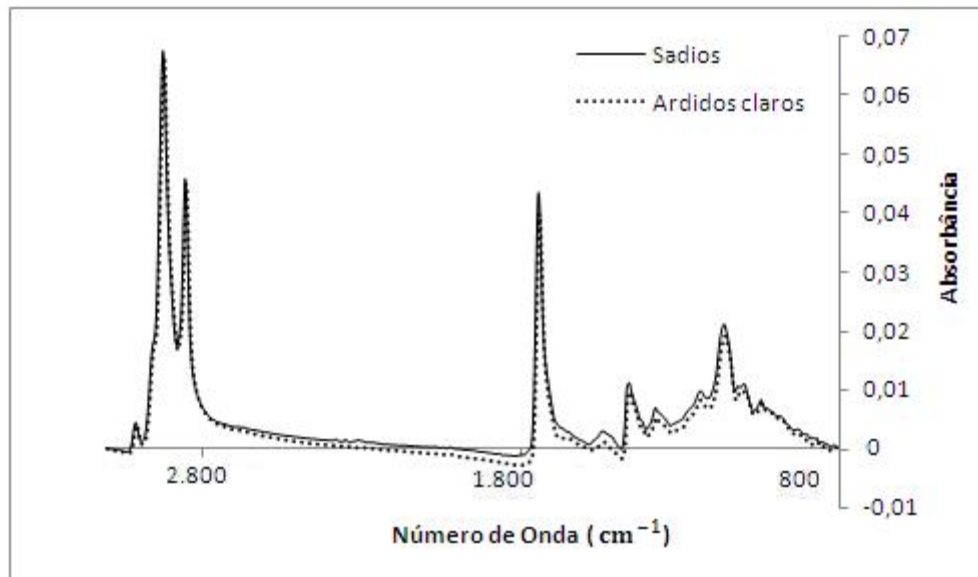


Figura 38 - Espectros médios de cafés sadio e ardido claro obtidos por ATR

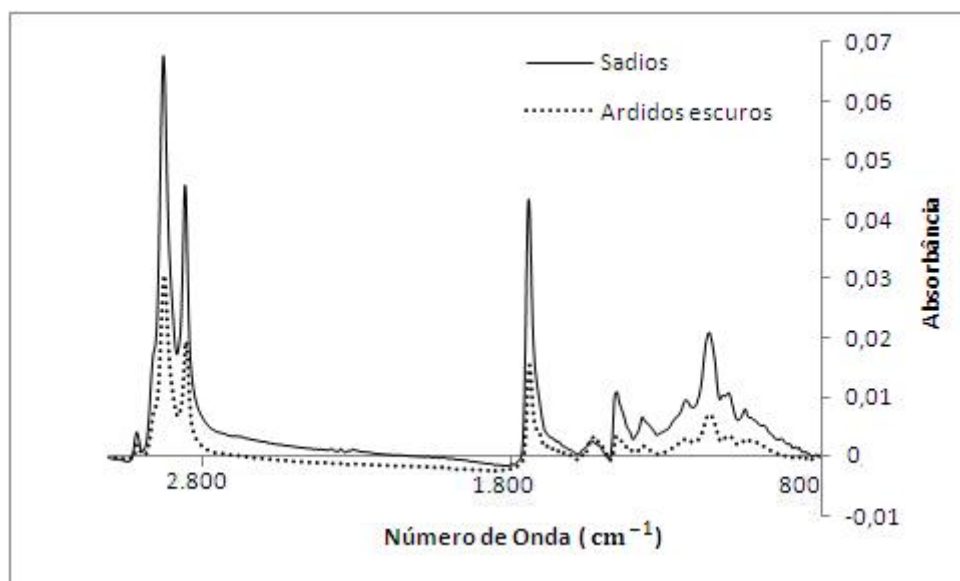
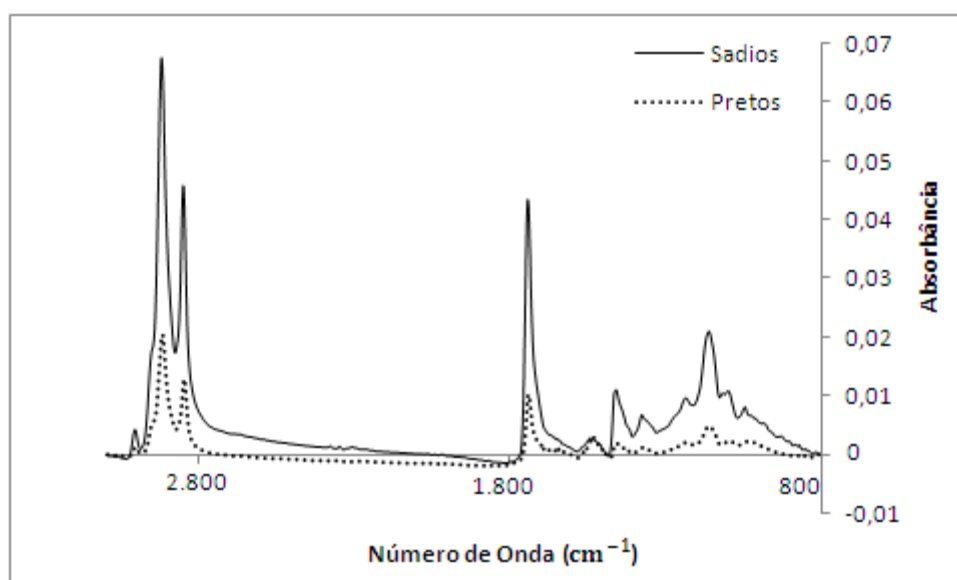
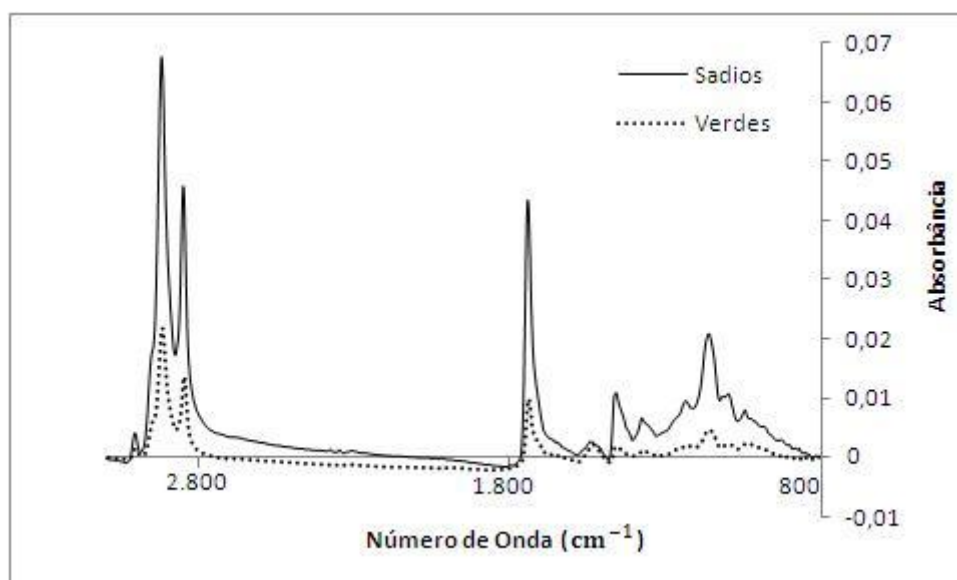


Figura 39 - Espectros médios de cafés sadio e ardido escuro obtidos por ATR



**Figura 40 - Espectros médios de cafés sadio e preto obtidos por ATR**



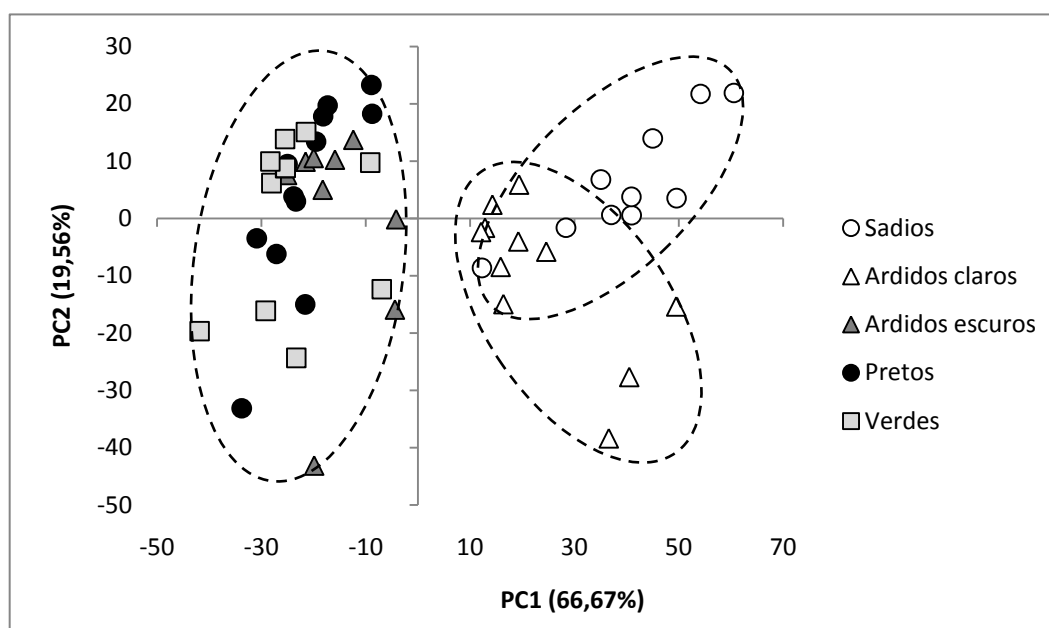
**Figura 41 - Espectros médios de cafés sadio e verde obtidos por ATR**

Assim como nos espectros obtidos por transmitância (Fig. 25 a 27), os espectros de grãos defeituosos obtidos por ATR, com exceção dos ardidos claros, também apresentaram absorções menos intensas nas regiões de  $1743\text{ cm}^{-1}$  e  $1400\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ , sugerindo que o teor de lipídeos e carboidratos desses grãos é inferior ao de sadios.

Uma melhor associação entre os níveis de cafeína de cafés sadios e defeituosos é feita no item 4.2.2.2 pelos espectros obtidos por transmitância, já que nos espectros obtidos por ATR esse composto aparece apenas como um ombro.

O pico 6 (Fig. 9 e 10) parece estar relacionado à presença de trigonelina e proteínas no café, e foi o único pico em que a absorvância de sadios e defeituosos foi muito próxima, indicando que estes compostos ocorrem em níveis semelhantes em cafés sadios e defeituosos. FRANCA et al. (2005a) encontraram níveis de trigonelina de 1% em café sadio, verde e ardido e ~0,8% em café preto. Em relação às proteínas, não há evidências de que os teores em cafés sadios e defeituosos apresentem diferenças significativas (MACRAE, 1989; VASCONCELOS et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2006).

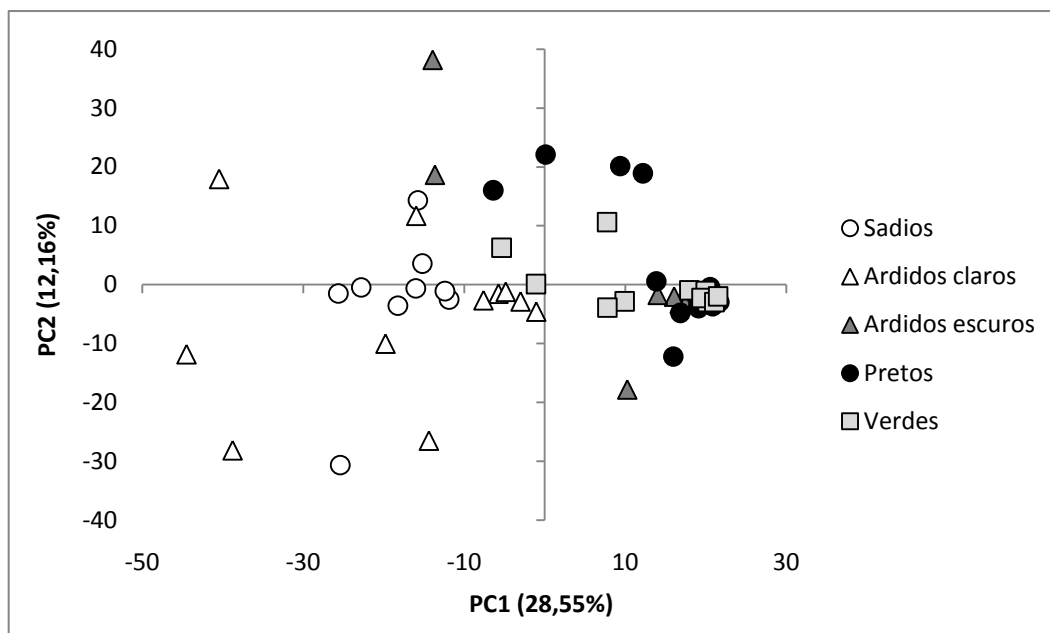
Devido à complexidade dos espectros, foi utilizada a PCA para verificar se as classes amostrais estudadas se diferenciam entre si por suas características espectrais (Fig. 42). Os espectros foram submetidos aos pré-tratamentos: correção atmosférica, corte na região de 3100-800  $\text{cm}^{-1}$ , correção de linha de base e normalização. Os dois primeiros componentes principais explicaram 86,23% da variância total entre os espectros. Através do PC1, os espectros de sadios e ardidos claros (PC1 positivo) foram totalmente discriminados dos espectros de ardidos escuros, pretos e verdes (PC1 negativo).



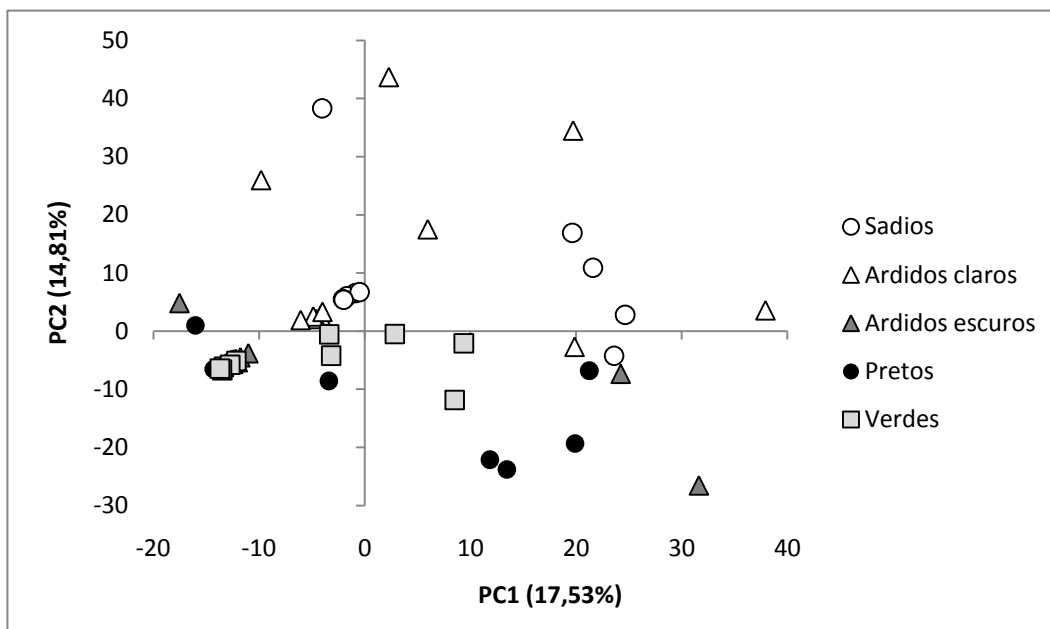
**Figura 42 - PCA de espectros normalizados obtidos por ATR**

As derivadas 1ª e 2ª foram aplicadas aos espectros (Fig. 43 e 44). No trabalho de WANG et al. (2009), bem como nos espectros obtidos por transmissão neste trabalho (Fig. 28 e 29), este procedimento melhorou a discriminação amostral. Porém,

neste caso, nenhum efeito positivo foi observado, e quando foi aplicada a derivada 2ª, a discriminação tendeu a ser pelo PC2.



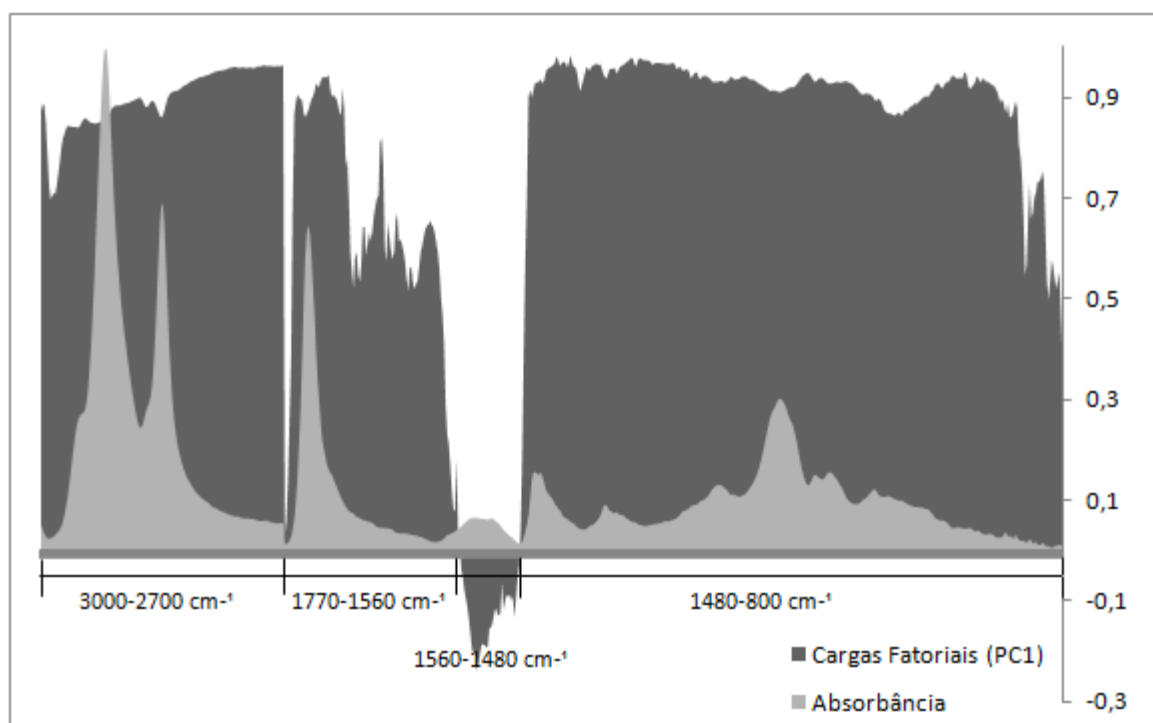
**Figura 43 - PCA de espectros normalizados e submetidos à derivada 1ª obtidos por ATR**



**Figura 44 - PCA de espectros normalizados e submetidos à derivada 2ª obtidos por ATR**

Observando as Fig. 38 a 41, é possível selecionar duas regiões do espectro por apresentarem maior diferença na intensidade de absorção entre sadios e

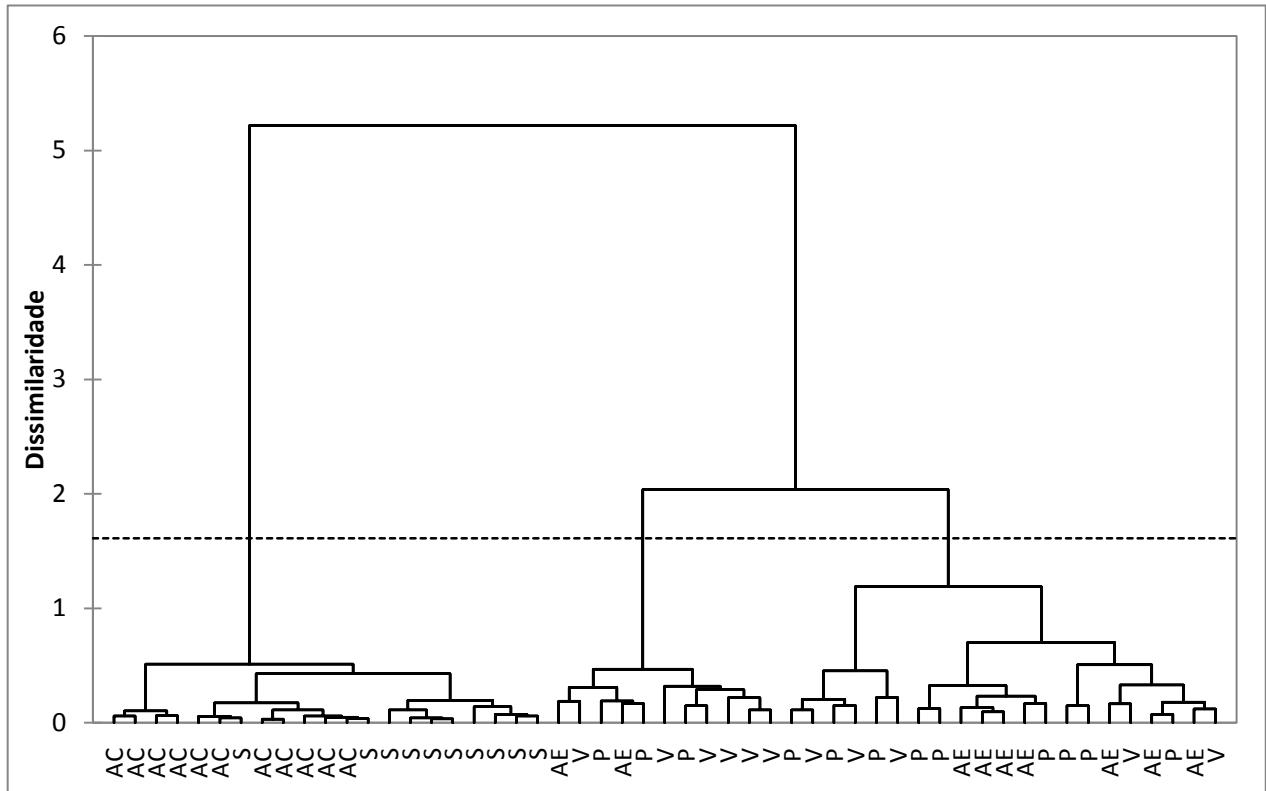
defeituosos: a região de 1770-800  $\text{cm}^{-1}$  e de 3000-2700  $\text{cm}^{-1}$ . As cargas fatoriais (*loadings*) dessas regiões foram plotadas para facilitar a visualização da contribuição dessas regiões no PC1 (Fig. 45). Como pode ser observado, as regiões de 1480-800  $\text{cm}^{-1}$ , 1770-1560  $\text{cm}^{-1}$  e 3000-2700  $\text{cm}^{-1}$  apresentam valores de cargas fatoriais altamente positivos, contribuindo com o PC1 positivo, e correspondem às regiões do espectro em que sadios absorveram mais que defeituosos. A região de 1560-1480  $\text{cm}^{-1}$ , na qual possivelmente a trigonelina e as proteínas absorvem, foi a única com valores de cargas fatoriais negativas, contribuindo com o PC1 negativo, e corresponde à única região do espectro em que sadios e defeituosos apresentaram valores de absorbância muito próximos.



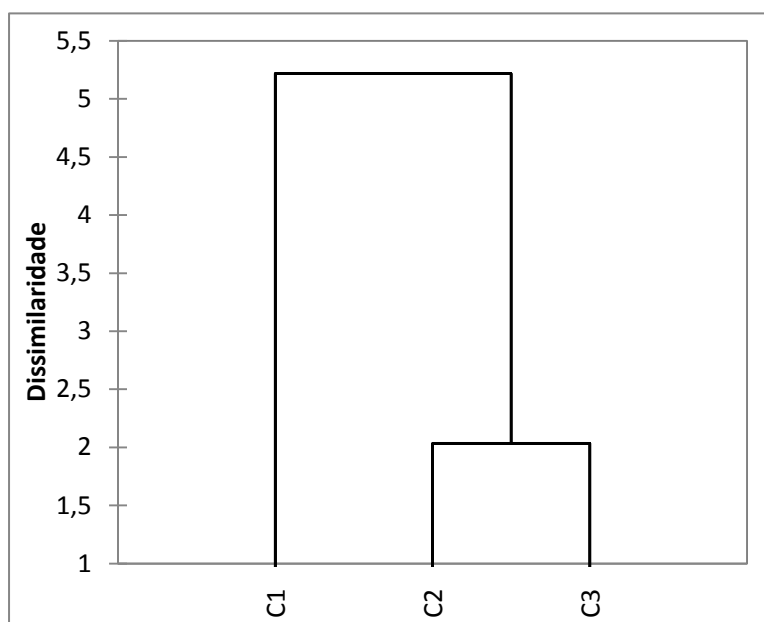
**Figura 45 - Cargas fatoriais de regiões selecionadas da PCA de espectros normalizados**

A Análise de Agrupamentos Hierárquicos foi aplicada aos espectros normalizados e é apresentada nas Fig. 46 e 47. A primeira classe (C1), formada por espectros de cafés sadio e ardido claro, que tenderam a se agrupar em diferentes subclasses, exibiu grande dissimilaridade das demais, corroborando os resultados da PCA. A segunda classe (C2) é formada, em maior quantidade, por espectros de café verde, e a terceira classe (C3), é formada, principalmente por espectros de cafés ardido escuro e preto. Apesar da semelhança no aspecto geral dos dendogramas de

espectros obtidos por transmitância e ATR (Fig. 30 e 31), no segundo, a dissimilaridade entre a classe representada por grãos sadios e as classes representadas por grãos verdes, ardidos escuros e pretos é maior, evidenciando a discriminação de cafés sadios e defeituosos.

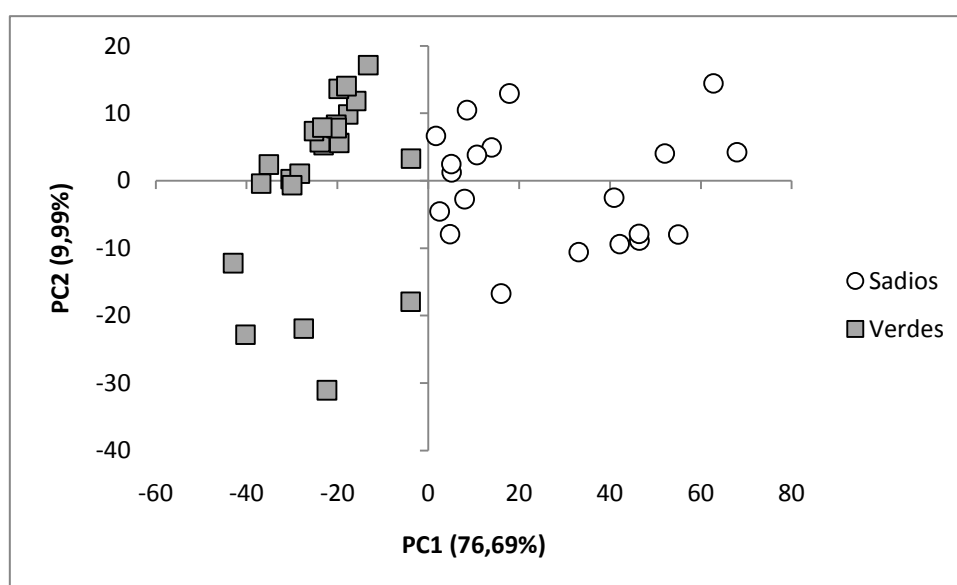


**Figura 46 - Dendrograma de espectros normalizados obtidos por ATR (S = Sadio; AC = Ardido Claro; AE = Ardidos Escuro; V = Verde e P = Preto)**

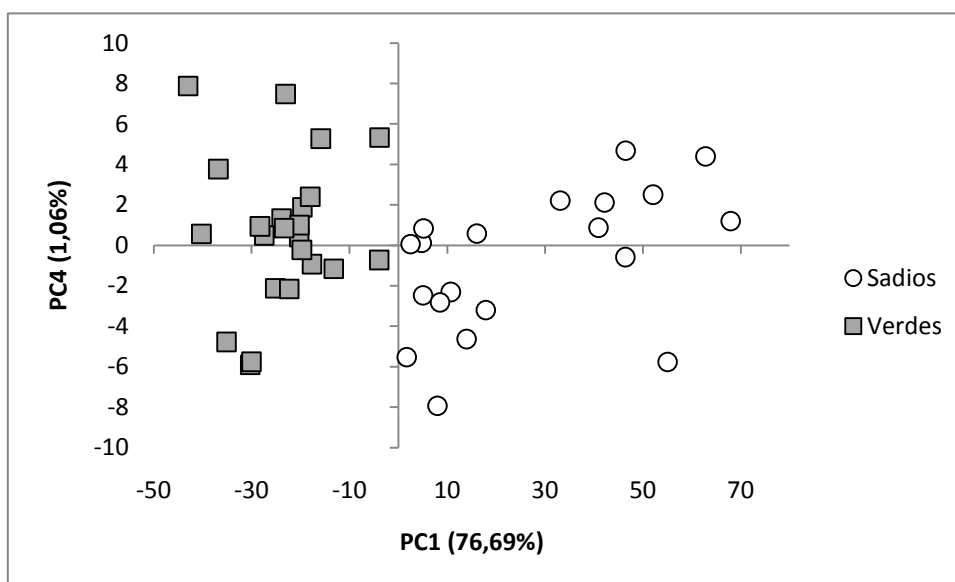


**Figura 47 - Principais classes do dendrograma de espectros normalizados obtidos por ATR**

A discriminação de grãos sadios e verdes tem maior relevância, já que essas classes amostrais não podem ser discriminadas por colorimetria. A fim de confirmar a discriminação desses grãos por espectroscopia, mais amostras de café sadio e verde foram analisadas, e novamente os espectros de café sadio puderam ser discriminados de café verde através do PC1 (Fig. 48). Os dois primeiros componentes principais representaram 86,68% da variância total entre os espectros. Plotando os valores de PC1 e PC4 foi observada uma melhor distribuição e uma diminuição no espalhamento dos espectros na PCA (Fig. 49).



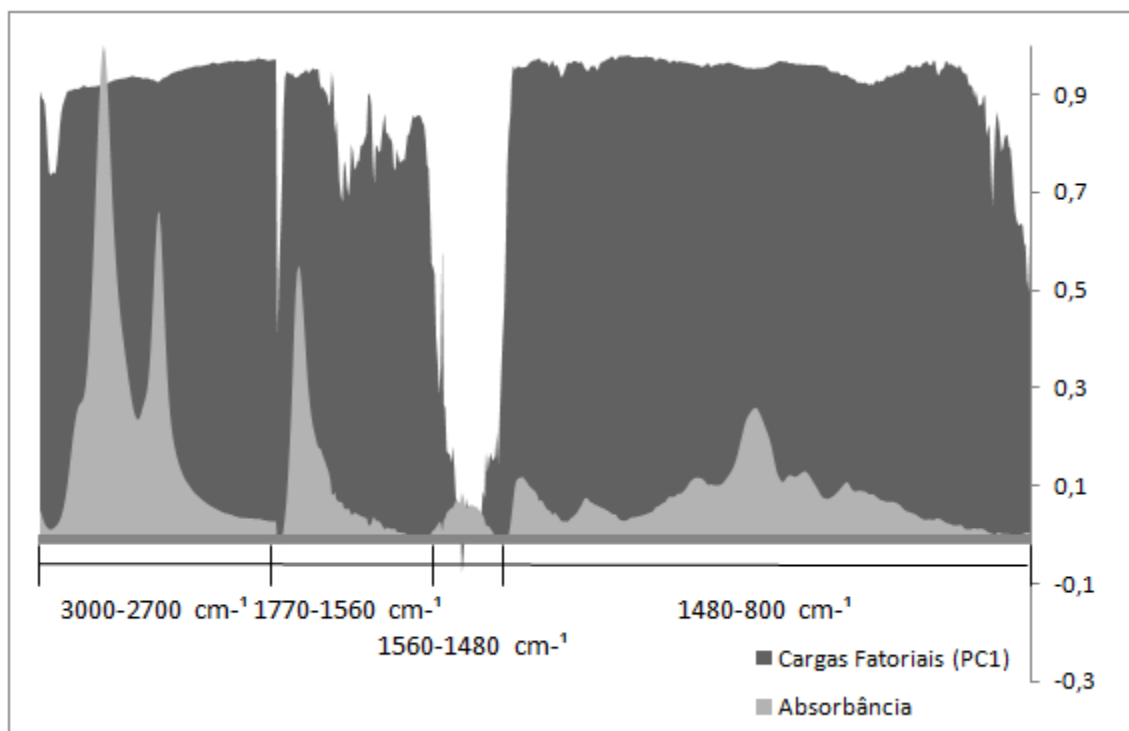
**Figura 48 - PCA de espectros de cafés sadio e verde normalizados obtidos por ATR**



**Figura 49 - PCA de espectros de cafés sadio e verde normalizados obtidos por ATR**

Observado a Fig. 41, é possível selecionar duas regiões do espectro por apresentarem maior diferença na intensidade de absorção entre cafés sadios e verdes: a região de  $1770-800\text{ cm}^{-1}$  e a de  $3000-2700\text{ cm}^{-1}$ . As cargas fatoriais (*loadings*) dessas regiões foram plotadas juntamente do espectro médio da PCA para facilitar a visualização da contribuição dessas regiões no PC1 (Fig. 50). Na Fig., mostra-se que as regiões de  $1480-800\text{ cm}^{-1}$ ,  $1770-1560\text{ cm}^{-1}$  e  $3000-2700\text{ cm}^{-1}$  apresentam valores de cargas fatoriais altamente positivos, contribuindo com o PC1 positivo. Estas regiões correspondem às regiões do espectro em que sadios absorveram mais intensamente que verdes, portanto, a discriminação observada no PC1 pode ser associada, principalmente, a níveis superiores de carboidratos, lipídeos e cafeína em cafés sadios. A região de  $1560-1480\text{ cm}^{-1}$ , na qual possivelmente a trigonelina e as proteínas absorvem, contribuiu, embora fracamente, com o PC1 negativo, e corresponde à única região do espectro em que sadios e verdes apresentaram valores de absorbância muito próximos.





**Figura 50 - Cargas fatoriais de regiões selecionadas da PCA de espectros de cafés sadio e verde normalizados obtidos por ATR**

Além dos resultados positivos obtidos na discriminação de cafés de diferentes qualidades por ATR, vale ressaltar que esta técnica é simples, rápida, elimina a etapa de preparação da amostra, sendo, portanto, apropriada para a implementação em análises de rotina.

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Com base nos resultados encontrados no presente trabalho de estudo da viabilidade de se diferenciar grãos crus de café sadio e defeituoso por espectroscopia na região do infravermelho médio aliada a métodos quimiométricos, pode-se concluir que a metodologia utilizada foi satisfatória para os objetivos propostos. Com base nos espectros obtidos, foi possível atribuir picos e bandas a compostos encontrados no café cru.

Grãos de café inteiros e moídos foram analisados por colorimetria e os dados obtidos foram analisados por PCA. Antes da moagem, não foi possível discriminar grãos sadios de verdes, enquanto que grãos ardidos e pretos foram discriminados com clareza. Após a moagem, todas as classes amostrais foram discriminadas. Estes resultados indicam que a separação eletrônica de grãos sadios e verdes que ocorre na indústria por meio de seletora óptica também não é eficiente.

Foram padronizadas com sucesso as metodologias de análise de FTIR por transmitância, utilizando pastilhas de KBr em mistura com amostra, e reflectância total atenuada, utilizando um acessório equipado com um prisma de ZnSe.

Os espectros obtidos por transmitância foram analisados por PCA e foram claramente discriminados em três grupos: (a) sadios, (b) verdes e (c) fermentados (ardidos e pretos). Esta mesma discriminação foi observada quando foi efetuada a HCA. Apesar dos resultados positivos que foram obtidos, deve-se atentar para as limitações de se implementar esta técnica em análises de rotina, pois ela demanda tempo, exige a etapa de preparação das pastilhas, emprega uma quantidade mínima de amostra, o que é desfavorável a análises quantitativas, e sofre interferências ambientais.

Já os espectros obtidos por ATR foram discriminados, com a aplicação da PCA, em dois grandes grupos: (a) sadios e ardidos claros, e (b) ardidos escuros, pretos e imaturos. A semelhança entre os espectros de grãos sadios e ardidos claros indica que a composição química desses grãos é similar. Sugere-se que os grãos ardidos claros ocorram em função de uma fermentação superficial de grãos sadios, o que justificaria também, o fato da diferença de cor entre esses grãos ser mais pronunciada somente quando estão inteiros. A HCA separou os espectros em três grandes classes. A primeira classe (C1) formou-se por espectros de cafés sadio e ardido claro que tenderam a se agrupar em diferentes subclasses. A segunda classe (C2) formou-se,

em maior quantidade, por espectros de café verde, e a terceira (C3), formou-se, principalmente por espectros de cafés ardido escuro e preto. A classe C1 apresentou grande dissimilaridade das demais, corroborando os resultados da Análise de Componentes Principais.

Uma vez que grãos de café sadios e verdes não podem ser discriminados por colorimetria, foram obtidos mais espectros dessas classes amostrais, por ATR, a fim de confirmar a discriminação por espectroscopia no infravermelho. Os espectros foram analisados por PCA e puderam ser totalmente discriminados, confirmando o potencial da técnica em estudo.

Outros estudos serão realizados utilizando um conjunto maior de amostras para desenvolver modelos preditivos. A metodologia também será testada para a discriminação de cafés sadios e defeituosos após a torração.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC (Associação Brasileira da Indústria de café). *Indicadores da indústria de café no Brasil – 2009*. Rio de Janeiro: ABIC, 2010.

ADDINSOFT. *XLSTAT Tutorials: Statistical and Multivariate analysis explanation*. Disponível em: <http://www.xlstat.com/en/support/tutorials/>. Acesso em: 12 fev. 2011

AL-JOWDER, O.; KEMSLEY, E.E.K.; WILSON, R.H. Mid-infrared spectroscopy and authenticity problems in selected meats: a feasibility study. *Journal of Food Chemistry*, v. 59, n. 2, p. 195-201, 1997.

AL-JOWDER, O.; DEFERDEZ, M.; KEMSLEY, E.K.; WILSON, R.H. Mid-Infrared Spectroscopy and Chemometrics for the Authentication of Meat Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 3210-3218, 1999.

BANKS, M.; McFADDEN, C.; ATKINSON, C. *The world encyclopedia of coffee*. London: Lorenz Books, 1999. 256 p.

BARBOSA, L. C. A. *Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos*. Viçosa: Editora UFV, 2008. 189 p.

BENOUDJIT, N.; COOLS, E.; MEURENS, M.; VERLEYSSEN, M. Chemometric calibration of infrared spectrometers: selection and validation of variables by non-linear models. *Journal of Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 70, p. 47-53, 2004.

BEVIN, C.J.; DAMBERGS, R.G.; FERGUSON, A.J.; COZZOLINO, D. Varietal discrimination of Australian wines by means of mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Analytica Chimica Acta*, v. 621, p. 19–23, 2008.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. *Introdução à Química de Alimentos*. 2 ed. São Paulo: Livraria Varela, 1992. 223 p.

BORÉM, F. M. Processamento do café. In: BORÉM, F. M. (Ed.) *Pós-colheita do café*. Lavras: Editora UFLA, 2008, p. 127-156.

BORGES, M. L. A.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; CORRÊA, P. C.; GLÓRIA, M. B. A. Estudo da variação da coloração de café arábica durante a torra em diferentes condições de aquecimento. *Revista Brasileira de Armazenamento*, v. 5, p. 3-8, 2002.

BRASIL. Instrução Normativa n. 16, de 24 de maio de 2010. Regulamento Técnico para o café torrado em grãos e para o café torrado e moído. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*, Brasília.

BRIANDET, R.; KEMSLEY, E. K.; WILSON, R. H. Approaches to adulteration detection in instant coffees using infrared spectroscopy and chemometrics. *Journal of Science Food and Agriculture*, v. 71, p. 359-366, 1996.

BRIANDET, R.; KEMSLEY, E. K.; WILSON, R. H. Discrimination of *Arabica* and *Robusta* in Instant Coffee by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, p.170-174, 1996.

CASAL, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; ALVES, M. R.; FERREIRA, M. A. Discriminate Analysis of Roasted Coffee Varieties for Trigonelline, Nicotinic Acid, and Caffeine Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 3420-3424, 2000.

CHEN, J.; WANG, X. Z. A New Approach to Near-Infrared Spectral Data Analysis Using Independent Component Analysis, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, v. 41, p. 992-1001, 2001.

CLARKE, R. J. Grading, Storage, Pre-treatments and Blending. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee: technology*. Barking: Elsevier Science Publishers Ltd, 1987. p. 35-57.

CLARKE, R. J. Water and Mineral Contents. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee: chemistry*. 2 ed. Barking: Elsevier Science Publishers Ltd, 1989. p. 42-81.

CLIFFORD, M. N.; KAZI, T. The influence of coffee bean maturity on the content of chlorogenic acids, caffeine and trigonelline, *Journal of Food Chemistry*, v. 26, p. 59-69, 1987.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic Acids. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee: chemistry*. 2 ed. Barking: Elsevier Science Publishers Ltd, 1989. p. 153-197.

COELHO, K. F. *Avaliação química e sensorial da qualidade do café de bebida estritamente mole após a inclusão de grãos defeituosos*. Viçosa: Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA. 2000. 96 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência dos Alimentos).

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). *Acompanhamento da Safra Brasileira Café Safra 2009, primeira estimativa, janeiro/2010*. Brasília: CONAB, 2010. 18 p.

CULLER, R. R. Diffuse reflectance infrared spectroscopy: sampling techniques for qualitative/quantitative analysis of solids. In: COLEMAN, P. B. (Ed.) *Practical sampling techniques for infrared analysis*. Boca Raton: CRC Press LLC, 1993. p. 93-105.

DART, S. K.; NURSTEN, H. E. Volatile Components. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee: chemistry*. 2 ed. Barking: Elsevier Science Publishers Ltd, 1989. p. 223-262.

DEFERDEZ, M.; WILSON, R.H. Infrared Spectroscopy: Instrumental Factors Affecting the Long-Term Validity of Chemometric Models. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 69, p. 1288-1294, 1997.

DOWNEY, G.; BOUSSION, J. Authentication of Coffee Bean Variety by Near-infrared Reflectance Spectroscopy of Dried Extract. *Journal of Science Food and Agriculture*, v. 71, p. 41-49, 1996.

DOWNEY, G.; BRIANDET R.; WILSON, R. H.; KEMSLEY, E. K. Near- and mid-Infrared spectroscopies in food authentication: coffee varietal identification. *Journal of Science Food and Agriculture*, v. 45, p. 4357-4361, 1997.

ENCARNAÇÃO, R. O.; LIMA, D. R. *O Café e a Saúde Humana*. Brasília: Embrapa Café, 2003. 63 p.

ESTEBAN-DIEZ, I.; GONZALEZ-SAIZ, J. M., SAENZ-GONZALEZ, C.; PIZARRO, C. Coffee varietal differentiation based on near infrared spectroscopy. *Talanta*, v. 71, p. 221-229, 2007.

FABIAN, Z.; SALGO, A; IZVEKOV, V. P. Determination of actual coffee content in instant coffee mixtures. In: HILDRUM, K. I.; ISAKSSON, T.; NAES, T.; TANDBERG, A. (Ed.) *Near infra-red Spectroscopy Bridging the Gap between Data Analysis and NIR Applications*. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1992. p. 357.

FARAH, A.; MONTEIRO, M. C.; CALADO, V.; FRANCA, A. S.; TRUGO, L. C. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Journal of Food Chemistry*, v. 98, p. 373- 380, 2006.

FOLSTAR, P. Lipids. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee: chemistry*. 2 ed. Barking: Elsevier Science Publishers Ltd, 1989. p. 203-220.

FRANCA, A. S.; MENDONCA, J. C. F; OLIVEIRA, S. D. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT - Food Science and Technology*, v. 38, p. 709-715, 2005a.

FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; MENDONCA, J. C. F; SILVIA, X. A. Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans. *Journal of Food Chemistry*., v. 90, p. 89-94, 2005b.

FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S. (2008). Chemistry of defective coffee beans. In: KOEFFER, E. N. (Ed.) *Food Chemistry Research Developments*. Hauppauge: Nova Science Publishers, p. 105-138, 2008.

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

FREITAS, A. M. C.; PARREIRA, C.; VILAS-BOAS, L. The use of an electronic aroma-sensing device to assess coffee differentiation – comparison with SPME gas chromatography mass spectrometry aroma patterns. *Journal of Food Compositional and Analysis*, v. 14, p. 513-522, 2001.

HOF, M. Basics of Optical Spectroscopy. In: GAUGLITZ G.; VO-DINH T. (Ed.) *Handbook of Spectroscopy*. Weinheim: WILEY-VCH, 2003. p. 39-47.

HOLLAND, J.K.; KEMSLEY, E.K.; WILSON, R.H. Transfer of Spectral Data between Fourier-Transform Infrared Spectrometers for use in Discriminant Analysis of Fruit Purees. *Journal of Science Food and Agriculture*, v. 75, p. 391-400, 1997.

HOLLAS, J. M. *Modern Spectroscopy*. 4. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2004. 452 p.

KEMSLEY, E. K.; RUAULT, S.; WILSON, R. H. Discrimination between *Coffea arabica* and *Coffea canephora* variant *robusta* beans using infrared spectroscopy. *Journal of Food Chemistry*, v. 54, p. 321-326, 1995.

KEMSLEY, E. K. Discriminant analysis of high-dimensional data: a comparison of principal components analysis and partial least squares data reduction methods. *Journal of Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 33, p. 47-61, 1996.

LYMAN, D. J.; BENCK, R.; DELL, S.; MERLE, S.; MURRAY-WIGELATH, J. FTIR-ATR analysis of brewed coffee: effect of roasting conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 11, p. 3268-3272, 2003.

MACRAE, R. Nitrogenous Componentes. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee: chemistry*. 2 ed. Barking: Elsevier Science Publishers Ltd, 1989. p. 115-149.



MANCHA AGRESTI, P.D.C.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; AUGUSTI, R. Discrimination between defective and non-defective Brazilian coffee beans by their volatile profile. *Journal of Food Chemistry*, v. 106, p. 787-796, 2008.

MARQUES, G. C. Análise em Componentes Principais. Processamento estatístico de sinais. 1º Semestre 2005/2006. Disponível em: <<http://www.deetc.isel.ipl.pt/comunicacoesep/disciplinas/pes/pca.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2010.

MAZZAFERA, P. Chemical composition of defective coffee beans. *Journal of Food Chemistry*, v. 64, p. 547–554, 1999.

MENDONÇA, J. C. F.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S. Physical characterization of non-defective and defective Arabica and Robusta coffees before and after roasting. *Journal of Food Engineering*, v. 92, p. 474-479, 2009a.

MENDONÇA, J. C. F.; FRANÇA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; AFONSO, R. J. C. F. Application of electrospray ionization-mass spectrometry to the discrimination of green and roasted coffees by species and quality. In: LANG J. K. (Org.) *Handbook on Mass Spectrometry: Instrumentation, Data and Analysis, and Applications*. New York: Nova Publishers, v. 17, 2009b.

MYIA, E. E.; GARRUTI, R. S.; CHAIB, M. A.; ANGELUCCI, R. S.; FIGUEIREDO, I.; SHIROSE, I. Defeito do café e a qualidade da bebida. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*. Campinas, v. 5, p. 417-432, 1973/1974.

NUROK, D.; ANDERSON, J. W.; ZLATKIS, A. Profiles of sulfur containing compounds obtained from Arabica and robusta coffees by capillary column gas chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 11, n. 4, p. 188-192, 1987.

OLIVEIRA, L. S.; FRANCA, A. S.; MENDONÇA, J. C. F.; BARROS-JÚNIOR, M.C. Proximate composition and fatty acids profile of green and roasted defective coffee beans. *LWT - Food Science and Technology*, v. 39, p. 235–239, 2006.

OLIVEIRA, L. S.; FRANCA, A. S.; CAMARGOS, R. R. S.; FERRAZ, V. P. Coffee oil as a potential feedstock for biodiesel production. *Journal of Bioresource Technology*, v. 99, p. 3244-3250, 2008.

OLIVEIRA, R. C. S.; OLIVEIRA, L. S.; FRANCA, A. S.; AUGUSTI, R. A. A preliminary evaluation of the potential of SPME-GC-MS and chemometrics to detect adulteration of ground roasted coffee with roasted barley. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 22, p. 257-261, 2009.

PARADKAR, M. M.; IRUDAYARAJ, J. Rapid determination of caffeine content in soft drinks using FTIR-ATR spectroscopy. *Journal of Food Chemistry*, v. 78, p. 261-266, 2002.

PARSON, W. W. *Modern Optical Spectroscopy*. Heidelberg: Springer, 2007. 512 p.

PIZARRO, C.; ESTEBAN-DIEZ, I.; GONZALEZ-SAIZ, J. M. Mixture resolution according to the percentage of robusta variety in order to detect adulteration in roasted coffee by near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, v. 585, p. 266-276, 2007.

PUERTA-QUINTERO, G. I. P. Influencia de los granos de café cosechados verdes, em la calidad física y organoléptica de la bebida. *Cenicafé*, v. 51, n. 2, p. 136-159, 2000.

RAMALAKSHMI, K.; KUBRA, I. R.; RAO L. J. M. Physicochemical characteristics of green coffee: comparison of graded and defective beans. *Journal of Food Science*, v. 72, n. 5, p. 333-337, 2007.

REDDICK, J. F.; HESKETH, A. H.; MORAR, S. H.; BRADSHAW, D. J. An evaluation of factors affecting the robustness of colour measurement and its potential to predict the grade of flotation concentrate. *Journal of Minerals Engineering*, v. 22, n.1, p. 64–69, 2009.

RIBEIRO, J. S.; SALVA, T. J.; FERREIRA, M. M. C. Chemometrics studies for quality control of processed brazilian coffees using DRIFTS. *Journal of Food Quality*, v. 33 p. 212-227, 2010.

RISTICEVIC, S.; CARASEK, E.; PAWLISZYN, J. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic-time-of-flight mass spectrometric methodology for geographical origin verification of coffee. *Analytica Chimica Acta*, v. 617, p. 72-84, 2008.

RODRIGUEZ-SAONA, L.; ALLENDORF, M. E. Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. *Annual Review of Food Science and Technology*. Em impressão, doi:10.1146/annurev-food-022510-133750. 2011.

ROGGO, Y.; CHAULUS, P.; MAURER, L.; LEMA-MARTINEZ, C.; EDMOND, A.; JENT, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical Technologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 44, p. 683–700, 2007.

SABLINSKAS, V. Instrumentation. In: GAUGLITZ G.; VO-DINH T. (Ed.) *Handbook of Spectroscopy*. Weinheim: WILEY-VCH, 2003. p. 48-69.

SABLINSKAS, V.; STEINER, G.; HOF, M. Applications. In: GAUGLITZ G.; VO-DINH T. (Ed.) *Handbook of Spectroscopy*. Weinheim: WILEY-VCH, 2003. p. 89-168.

SANTOS, M. A. *Influência do preparo por via úmida e tipos de secagem sobre a composição física, físico-química e química do café Coffea arábica L.* Viçosa: Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA. 2005. 60 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência dos Alimentos).

SCHANDA, J. *Colorimetry: Understanding the Cie System*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2007. 467 p.

SEDMAN, J.; VAN DE VOORT, F. R.; ISMAIL, A. A. Attenuated Total Reflectance Spectroscopy: principles and applications in Infrared analysis of food. In: MOSSOBA, M. M. (Ed.) *Spectral Methods in Food Analysis*. Basel: Marcel Dekker, 1999. p. 397-426.

SHIROMA, C.; RODRIGUEZ-SAONA, L. Application of NIR and MIR spectroscopy in quality control of potato chips. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 22, p. 596-605, 2009.

SILVA, V. A. *Influência dos grãos defeituosos na qualidade do café orgânico*. Viçosa: Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA. 2005. 120 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência dos Alimentos).

SILVERSTEIN, M. R.; WEBSTER, F. X. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora, 2000. 460 p.

SINELLI, N.; COSIO, M.S.; GIGLIOTTI, G.; CASIRAGHI, E. Preliminary study on application of mid infrared spectroscopy for the evaluation of the virgin olive oil “freshness”. *Analytica Chimica Acta*, v. 598, p. 128–134, 2007.

SIVETZ, A. W.; DESROSIER, N. W. *Coffee technology*. Westport: AVI Publishing Company, 1979. 716 p.

SMITH, A. W. Introduction. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee: chemistry*. 2. ed. Barking: Elsevier Science Publishers Ltd, 1989. p. 1-41.

SMITH, B. C. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. Boca Raton: CRC Press, 1996. 86 p.

SMITH, B. C. *Quantitative Spectroscopy: theory and practice*. San Diego: Elsevier Science, 2002. 213 p.

STEINER, G. Measurements Techniques. In: GAUGLITZ G.; VO-DINH T. (Ed.) *Handbook of Spectroscopy*. Weinheim: WILEY-VCH, 2003. p. 70-88.

STUART, B; ANDO, D. J. *Modern Infrared Spectroscopy*. 2. ed. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd., 1996. 180 p.

STUART, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd., 2004. 224 p.

TOLSTOY, V. P.; CHERNYSHOVA, I. V.; SKRYSHEVSKY, V. A. *Handbook of Infrared Spectroscopy of Ultrathin Films*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003. 739 p.

TRUGO, L. C. Carbohydrates. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee: chemistry*. 2 ed. Barking: Elsevier Science Publishers Ltd, 1989. p. 83-113.

VASCONCELOS, A. L. S.; FRANCA, A. S.; GLÓRIA, M. B. A.; MENDONÇA, J. C. F. A comparative study of chemical attributes and levels of amines in defective green and roasted coffee beans. *Journal of Food Chemistry*, v. 101, p. 26-32, 2007.

VINCENT, J. C. Green Coffee Processing. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee: technology*. Barking: Elsevier Science Publishers Ltd, 1987. p. 1-33.

WANG, J.; JU, S.; BITTENBERDEN, H. C.; GAUTZ, L.; LI, Q. X. Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Kona Coffee Authentication. *Journal of Food Science*, v. 74, n. 5, p. 385-391, 2009.

WHITE JR., D. R. Coffee adulteration and a multivariate approach to quality control. *Asic*, 16<sup>th</sup> Colloque, Kyoto, p. 259-266, 1995.

WOODMAN, J. S. Carboxylic Acids. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee: chemistry*. Barking: Elsevier Science Publishers Ltd, 1989. p. 266-291.

WORKMAN, Jr., J.; WEIER, L. *Practical guide to interpretive Near-Infrared spectroscopy*. Boca Raton: CRC Press LLC, 2007. 332 p.

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

## **7 APÊNDICE – PROPOSTA DE MANUSCRITO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO**

# EVALUATION OF THE POTENTIAL OF FTIR AND CHEMOMETRICS FOR SEPARATION BETWEEN DEFECTIVE AND NON-DEFECTIVE COFFEES

Ana Paula Craig<sup>1</sup>, Adriana S. Franca<sup>1,2</sup>, Leandro S. Oliveira<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos/UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia Mecânica/UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

**Running Title:** FTIR FOR DETECTION OF DEFECTIVE COFFEE

## **Abstract:**

The objective of this work was to evaluate the potential of Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR) in the characterization and separation of defective and non-defective coffee beans. Defective (black, immature and sour) and non-defective Arabica coffee beans were manually separated. Ground coffee samples were then submitted to FTIR analysis by transmittance readings employing a KBr disk and reflectance readings employing an attenuated total reflectance (ATR) accessory. Multivariate statistical analysis (PCA) was performed in order to verify the possibility of discrimination between defective and non-defective coffee samples. A clear separation between defective and non-defective coffee beans was observed based on PCA

---

<sup>1</sup> Corresponding author. Tel.: +55 31 34093512. Fax: +55 31 34433783. E-mail: adriana@demec.ufmg.br

analysis of the normalized spectra (ATR accessory) and of the first derivatives of the spectra (KBr disks). Such results indicate that FTIR analysis presents potential for the development of a fast and reliable analytical methodology for separation between defective and non-defective coffee beans.

## **1. Introduction**

The presence of defective coffee beans depreciates the quality of the coffee beverage consumed worldwide (Mancha Agresti et al., 2008). The intrinsic defects (sour, black and immature beans) are the ones that, when roasted, contribute the most to the depreciation of the coffee beverage quality. According to Clarke and Macrae (1987), the black bean is usually associated with a heavy flavor, sour beans contribute to sour and oniony tastes, while immature beans will impart astringency to the beverage. The negative effect that such beans impart on coffee quality can be associated with specific problems that occur during harvesting and post-harvest processing operations. Black beans result from dead beans within the coffee cherries or from beans that fall naturally on the ground by action of rain or over-ripening (Mazzafera, 1999). The presence of sour beans can be associated with 'overfermentation' during wet processing and with improper drying or picking of overripe cherries, whereas immature beans come from immature fruits (Clarke and Macrae, 1987; Mendonça et al., 2008). Defective beans represent about 20% of the total coffee produced in Brazil and, although they are separated from the non-defective beans prior to commercialization in external markets, the majority of these beans are dumped on the Brazilian internal market. Thus, the roasting industry in Brazil has been using these defective beans in blends with healthy ones, and, overall, a low-grade roasted coffee is consumed in the country (Oliveira et al., 2006).



Color sorting is the major procedure employed for separation of defective and non-defective coffee beans prior to roasting. In Brazil, manual sorting is usually employed for bean quality classification and electronic sorting is employed in farms and cooperatives of producers for the actual removal of defective beans. In the electronic sorters, coffee beans pass, one by one, by an electronic eye or camera system, and depending on wavelength measurements, the bean is either allowed to pass or it is shot with a puff of air into a reject pile (Franca and Oliveira, 2008). However, such procedure is not efficient for separation of sour and immature beans. Actually, in order to make sure that such defects are effectively removed from a specific coffee lot, color sorting machines are usually set up to allow some non-defective coffees to be also removed if their color is similar to that of sour or immature beans. As a consequence of this, the coffee lots that are rejected as defective may present a high percentage of good coffee, as pointed out in studies employing machine sorted mixtures or low quality Arabica coffees from different origins and crops (Franca et al., 2005ab; Farah et al., 2006; Vasconcelos et al., 2007). The same problem is present if separation by sieving is employed (Franca et al., 2005a; Mendonça et al., 2009).

Recent studies have shown that some chemical parameters could be employed for separation between defective and non-defective green coffee beans of a given variety (Arabica or Robusta). Examples include levels of histamine (Vasconcelos et al., 2007) and ESI-MS profiles (Mendonça et al., 2008). However, most of the employed instrumental techniques and analytical procedures are time demanding, expensive and involve a considerable amount of manual work. Recent studies have also shown that FTIR-based methods, in combination with chemometric techniques, can be successfully applied in the food industry, in association with food quality evaluation (Shiroma and Rodriguez-Saona, 2009; Rodriguez-Saona and Allendorf, 2011). FTIR-based methods are fast, reliable, simple to perform and do not require sample pre-treatment. Such technique provides simple and reproducible means of handling food products with nondestructive analyses, with the sampling/analysis procedure usually taking less than 5 min.

There are a few studies that have focused on FTIR applied to coffee analysis, employing either roasted coffee or aqueous extracts (e.g. coffee beverage). The specific applications were separation between Arabica and Robusta (Kemsley et al., 1995), adulteration of freeze-dried instant coffees by glucose, starch or chicory (Briandet et al., 1996), evaluation of roasting conditions (Lyman et al., 2003), geographical discrimination (Wang et al., 2009) and separation between decaffeinated and regular roasted coffees (Ribeiro et al., 2009). Thus, the objective of this work was to evaluate the potential of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy in the characterization and separation of defective and non-defective coffee beans prior to roasting.

## **2. Methodology**

Arabica green coffee samples, acquired from Café Fino Grão (Belo Horizonte, MG), were comprised of coffee beans obtained from different cooperatives located in Minas Gerais State, Brazil, that were rejected by color sorting machines. Black, sour (separated into light and dark colored), immature and non-defective beans were manually picked to constitute separate sampling lots and ground to a particle diameter of 0.42 mm. Color measurements were performed using a tristimulus colorimeter (HunterLab Colorflex 45/0 Spectrophotometer, Hunter Laboratories, VA, USA), with standard illumination  $D_{65}$ , and colorimetric normal observer angle of  $10^\circ$ , employing both whole and ground coffee samples. Color measurements were performed thrice for each sample.

A Shimadzu IRAffinity-1 FTIR Spectrophotometer (Shimadzu, Japan) with a DLATGS (Deuterated Triglycine Sulfate Doped with L-Alanine) detector was used in the measurements that were all performed in a dry atmosphere at room temperature ( $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ). The ground

coffee samples were mixed with potassium bromide at a 1/50 ratio (w/w). This powder was then compressed into a thin KBr disk under a pressure of 80 kgf/cm<sup>2</sup> for 5 min. The spectrum of a clean KBr disk (without coffee) was used for subtraction. A horizontal ATR sampling accessory (ATR-8200HA) equipped with ZnSe cell was also employed. Although the ATR-FTIR technique has been mostly applied for analysis of liquid samples, there are several recent studies that employ ATR for direct readings on solid food products (e.g. cheese, meats), given that it requires minimal sample preparation and variations in sample thickness have been shown not to affect the intensity of the bands (Koca et al., 2007; Argyri et al., 2010). In order to be able to obtain a constant sample mass, a small metal recipient 2.4 mm thick and presenting an aperture of the same size of the ATR accessory (79 mm long and 10 mm wide) was placed over the ZnSe ATR crystal. The ground coffee samples (2 g) were then placed inside the metal recipient and pressed with the machine's gripper in order to obtain the best possible contact with the crystal. Regardless of the sample preparation procedure, all spectra were recorded within a range of 4000–700 cm<sup>-1</sup> with a 4 cm<sup>-1</sup> resolution and 20 scans. Spectra treatment consisted of baseline correction and normalization.

## **Results and Discussion**

Average values of measured color parameters for non-defective and defective coffee samples are shown in Table 1. Measurements were based on the CIE  $L^*a^*b^*$  three dimensional cartesian (xyz) color space, represented by: Luminosity ( $L^*$ ), ranging from 0 (black) to 100 (white) – z axis; parameter  $a^*$ , representing the green–red color component – x axis; and parameter  $b^*$ , representing the blue–yellow component -y axis. However, chromaticity can be better represented and discussed in terms of polar coordinates, so  $a^*$  and  $b^*$  values were converted to

chroma ( $c^*$ ) and hue angle ( $h$ ), since these parameters can be directly associated to color intensity or saturation ( $c^*$ ) and to color tone ( $h$ ).

$$c^* = [a^{*2} + b^{*2}]^{1/2} \quad (1)$$

$$h = \tan^{-1}[b^*/a^*] \quad (2)$$

Results presented in Table 1 in terms measurements performed on whole coffee beans, i.e., evaluation of the bean surface color, show that black and dark sour beans presented lower luminosity values than non-defective, immature and light sour ones, indicating that this parameter can be successfully employed only to separate black and dark sour defects prior to roasting. Such results are in agreement with previous studies on physical attributes of defective coffee beans (Mendonça et al., 2009). It can also be observed that non-defective, immature and black beans presented higher values of hue angle in association with a greenish tone. Black and dark sour beans presented the lowest values of color saturation. Color measurements taken for ground samples represent an average color of the material, taking into account both the surface and interior. Luminosity values were higher for ground beans compared to whole ones, as a consequence of the fact that the bean surface is darker than its core. Values for color parameters for both whole and ground samples were similar to those reported on previous studies employing coffees from different crops and origins (Franca et al., 2005a; Mendonça et al., 2009).

The results presented in Table 1 for whole beans indicate that the monochromatic color separation procedure commonly employed in farms and cooperatives will only be effective in the case of black and dark sour defects. This can be corroborated by the score plots obtained for PCA analysis of color parameters of whole beans (see Figure 1). Data matrices for PCA analysis

were assembled so that each row corresponded to a sample and each column to a color parameter. The first two principal components (PCs) explained 66% and 32% of the data variance, respectively. Four distinct groups can be perceived, separated by quadrant: light sour (positive PC1, positive PC2); dark sour (negative PC1, positive PC2); black (negative PC1, negative PC2); non-defective and immature (positive PC1, negative PC2). The first component allowed for separation between darker and lighter samples, being mostly affected by luminosity values. Separation by the second component can be associated to black, immature and non-defective beans presenting a greenish tone as opposed to the yellowish hue of sour beans. Such results indicate that even sorting systems that employ bi-chromatic light measurements will not be able to completely separate immature and non-defective coffee beans.

Typical FTIR spectra obtained for green coffee samples are shown in Figure 2. A full assignment of the spectral bands is quite challenging problem and is not the objective of this work. Furthermore, FTIR literature data on coffee is only available for roasted samples, so a direct comparison cannot be done. Nonetheless, a few qualitative aspects of the spectra can be discussed. The spectra obtained by KBr transmission and ATR reflectance are similar from a qualitative point of view, in the sense that the most significant bands can be viewed in both types of spectrum. The two sharp bands that can be viewed in the 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  range (2852-2854 and 2922-2923  $\text{cm}^{-1}$ ) have also been reported for both Arabica and Robusta roasted coffee samples, but no identification was attempted (Kemsley et al., 1995). Nonetheless, studies of FTIR analysis of caffeine on soft drinks have also reported two sharp peaks at 2829 and 2882  $\text{cm}^{-1}$ , with the later one being correlated with the asymmetric stretching of C-H bonds of methyl ( $-\text{CH}_3$ ) group in the caffeine molecule and the peak region being successfully used to develop predictive models for quantitative analysis of caffeine (Paradkar and Irudayaraj, 2002). The sharp band at 1743  $\text{cm}^{-1}$  has been also observed on FTIR studies of roasted coffee (Kemsley et al., 1995; Lyman et al., 2003; Wang et al., 2009). Kemsley and co-workers (1995) reported that a

band at  $1744\text{ cm}^{-1}$  was larger in Arabica in comparison to Robusta sample and attributed this to carbonyl (C=O) vibration in lipids. The study by Lyman et al. (2003), on the other hand, associated the bands in that region to aliphatic esters ( $1755\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$ ). A band at  $1658\text{ cm}^{-1}$  appears in the spectra obtained by KBr transmission, as can be seen in Fig. 2(a), and it is also associated to caffeine absorption (Lyman et al., 2003). Ribeiro et al. (2010) reported that wavenumbers in the range of  $1600\text{ to }1700\text{ cm}^{-1}$  are highly related to chlorogenic acids and caffeine concentration in coffees. Other bands that appear in both spectra can be viewed at  $1458$ ,  $1376\text{-}1378$ ,  $1266$ , and  $1090\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$ , being probably associated to carbohydrates. The band at  $1153\text{ cm}^{-1}$  is evident in both spectra and falls within the absorption range reported for chlorogenic acids (Lyman et al., 2003).

PCA analysis of the KBr transmission spectra, employing (a) baseline correction and normalization and (b) first derivatives is displayed in Figure 3. Analysis was based on a  $24 \times 1192$  data matrix assembled so that each row corresponded to a sample and each column represented the spectra data at a given wavelength. In the case of PCA based on the spectra (Figure 3a), the two first components accounted for 80.23% of the total sample variance. A certain amount of sample separation can be observed, mainly for non-defective (negative PC1, positive PC2), immature (negative PC1, negative PC2), and fermented (sour/black positive PC1), but there is an extensive amount of sample scattering. In the case of PCA based on the first-derivative of the spectra (Figure 3b), the first and second principal components accounted for 31.18 and 21.55% of the total sample variance, respectively. In this case, sample scattering diminished considerably and there is a clear separation between non-defective and defective coffee beans. Three separate groups can be identified: (i) non-defective, (ii) immature and (iii) black/sour.

PCA analysis of the ATR reflectance spectra, employing baseline correction and normalization is displayed in Figure 4 (a). Analysis was based on a 54 x 1188 data matrix assembled so that each row corresponded to a sample and each column represented the spectra data at a given wavelength. The two first components accounted for 86% of the total sample variance. The first component provided separation of the evaluated samples into two major groups: non-defective/light sour (positive PC1) and black/dark sour/immature (negative PC1). Evaluation of the loadings plot (not shown) indicated that the spectral ranges that presented the highest influence on PC1 values in association with the black/dark sour/immature group were the following: 1482-1554, 1776-1797 and 3020-3100  $\text{cm}^{-1}$ . The only significant band that can be observed in the ATR spectra (Figure 2b) in those ranges is the one at 1534  $\text{cm}^{-1}$ . It was also present in the spectra obtained by Lyman et al. (2003) for aqueous extracts of roasted coffee, regardless of roasting conditions, although no identification was attempted. We herein infer that this band is most likely associated to C=C stretch in a nitrogen based ring, such as caffeine or trigonelline, both present in significant amounts in raw and roasted coffees. In the case of PCA based on the first-derivative of the spectra (not shown), the first and second principal components accounted for 28.6 and 12.6% of the total sample variance, respectively. No separation could be observed.

Given that the main problem with color sorting is the separation of immature and non-defective beans, separation of these specific classes was further investigated by ATR-FTIR analysis. Average normalized ATR-FTIR spectra are shown in Figure 5(a). Although the spectra are qualitatively similar, the major difference that can be observed is associated with absorbance intensity, which was much higher for non-defective beans in comparison to immature ones. The bands in the 900-1500  $\text{cm}^{-1}$  region can be associated to carbohydrates (Kemsley et al., 1995) and other studies on chemistry of defective coffee beans have reported lower sugar levels of defective coffees in comparison to non-defective ones (Mazzafera et al., 1999; Ramalakshmi et

al., 2007; Vasconcelos et al., 2007). Mazzafera (1999) compared the amount of reducing sugars and sucrose of immature, black and immature-black coffees, and encountered lower sugar and sucrose contents for immature beans, indicating that the amount of sugar could be associated with the developmental stage. Ramalakshmi et al. (2007) also reported lower sucrose levels for a mixture of defective beans in comparison to non-defective ones. Lower absorption intensity was also observed for immature beans in comparison to non-defective ones, in the wavenumber regions associated in the literature with caffeine and chlorogenic acids. Literature results on caffeine levels of defective coffees in comparison to non-defective ones are contradictory, with reports of defective or low quality coffees presenting either higher (Franca et al., 2005b; Farah et al., 2006; Ramalakshmi et al., 2007) or lower (Franca et al., 2005a) caffeine levels in comparison to non-defective or high quality coffees. Earlier studies have reported very small changes in caffeine levels during the development of the coffee fruit (Clifford and Kazi, 1987). Regarding chlorogenic acids, the reported levels for immature beans are either slightly higher or similar to non-defective coffees (Franca et al., 2005a; Farah et al., 2006).

PCA analysis of the ATR reflectance spectra, employing baseline correction and normalization is displayed in Figure 5 (b). Analysis was based on a 42 x 1188 data matrix assembled so that each row corresponded to a sample and each column represented the spectra data at a given wavelength. The two first components accounted for 87% of the total sample variance. A clear separation between non-defective and immature beans can be observed, based on the first component. Evaluation of the loadings plot (not shown) indicated that the spectral ranges that presented the highest influence on PC1 values in association with the immature coffees were the following: 1552-1554 and 3020-3100  $\text{cm}^{-1}$ .

## **Conclusions**



The feasibility of employing FTIR as a methodology for the separation between defective and non-defective coffees was evaluated. PCA results based on first-derivatives of the KBr-transmittance spectra showed that non-defective and defective coffee samples were clearly separated into distinct groups. A certain degree of sample separation was observed among the defective coffee samples, with two separate clusters respectively corresponding to immature and fermented (black/sour) coffees. PCA results based on normalized ATR-FTIR reflectance spectra indicated separation of the samples into two major groups: non-defective/light sour and black/dark sour/immature. ATR-FTIR was further investigated regarding the separation between non-defective and immature coffees, since such separation cannot be accomplished by color sorting. The major difference that could be observed regarding the spectra was associated to the non-defective coffees presenting higher absorbance intensity, in comparison to immature coffees. The preliminary results obtained in the present study confirm that FTIR analysis presents potential for the development of an analytical methodology for separation between defective and non-defective coffee beans. Further studies will be conducted employing a larger set of samples in order to develop predictive models. The methodology will be also tested for roasted coffee samples.

## **Acknowledgements**

The authors acknowledge financial support from the following Brazilian Government Agencies: CNPq and FAPEMIG.

## **References**

Argyri, A.A., Panagou, E.Z., Tarantilis, P.A., Polysiou, M., Nychas, G.-J.E. (2010). Rapid qualitative and quantitative detection of beef fillets spoilage based on Fourier transform infrared spectroscopy data and artificial neural networks, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 145, 146-154.

Briandet, R., Kemsley, E.K., Wilson, R.H. (1996). Approaches to Adulteration Detection in Instant Coffees using Infrared Spectroscopy and Chemometrics, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 359-366.

Clarke, R. J., & Macrae, R. (1987). *Coffee Vol. 2: Technology*. London: Elsevier Applied Science.

Clifford, M. N. & Kazi, T. (1987) The influence of coffee bean maturity on the content of chlorogenic acids, caffeine and trigonelline, *Food Chemistry*, 26, 59-69.

Farah, A., Monteiro, M.C., Calado, V., Franca, A.S., Trugo, L.C. (2006). Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry*, 98, 373-380.

Franca, A.S., Oliveira, L.S., Mendonça, J.C.F., Silva, X.A. (2005a). Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans, *Food Chemistry*, 90, 89-94.

Franca, A.S., Mendonca, J.C.F., Oliveira, S.D. (2005b). Composition of green and roasted coffees of different cup qualities, *LWT - Food Science and Technology*, 38, 709-715.

Franca, A.S., & Oliveira, L.S. (2008). Chemistry of Defective Coffee Beans. In E. N. Koeffler (Ed.), *Food Chemistry Research Developments* (pp. 105-138). New York, NY, USA: Nova Publishers.

Kemsley, E. K., Ruault, S., Wilson, R. H. (1995). Discrimination between *Coffea arabica* and *Coffea canephora* variant robusta beans using infrared spectroscopy, *Food Chemistry*, *54*, 321-326.

Koca, N., Rodriguez-Saona, L.E., Harper, W.J., Alvarez, V.B. (2007). Application of Fourier transform infrared spectroscopy for monitoring short-chain free fatty acids in Swiss cheese, *Journal of Dairy Science*, *90*, 3596–3603.

Lyman, D.J., Benck, R., Dell, S., Merle, S., Murray-Wijelath, J. (2003). FTIR-ATR analysis of brewed coffee: effect of roasting conditions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 3268-3272.

Mancha Agresti, P.C.M., Franca, A.S., Oliveira, L.S., Augusti, R. (2008). Discrimination between defective and non-defective Brazilian coffee beans by their volatile profile, *Food Chemistry*, *106*, 787-796.

Mazzafera, P. (1999). Chemical composition of defective coffee beans, *Food Chemistry*, *64*, 547–554.

Mendonça, J.C.F., Franca, A.S., Oliveira, L.S., Nunes, M. (2008). Chemical characterisation of non-defective and defective green arabica and robusta coffees by electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS), *Food Chemistry*, 111, 490-497.

Mendonça, J.C.F., Franca, A.S., Oliveira, L.S. (2009). Physical characterization of non-defective and defective Arabica and Robusta coffees before and after roasting, *Journal of Food Engineering*, 92, 474-479.

Oliveira, L.S., Franca, A.S., Mendonça, J.C.F., Barros-Junior, M.C. (2006). Proximate composition and fatty acids profile of green and roasted defective coffee beans, *LWT - Food Science and Technology*, 39, 235-239.

Paradkar, M.M., Irudayaraj, J. (2002). Rapid determination of caffeine content in soft drinks using FTIR-ATR spectroscopy, *Food Chemistry*, 78, 261-266.

Ramalakshmi, K., Kubra, I.R. and Rao, L.J.M. (2007). Physicochemical Characteristics of Green Coffee: Comparison of Graded and Defective Beans, *Journal of Food Science*, 72, S333-S337.

Ribeiro, J.S., Salva, T.J., Ferreira, M.M. (2010). Chemometric studies for quality control of processed brazilian coffees using Drifts, *Journal of Food Quality*, 33, 212–227.

Rodriguez-Saona, L., Allendorf, M. E. (2011). Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food, *Annual Review of Food Science and Technology*, in press, doi:10.1146/annurev-food-022510-133750.

Shiroma, C., Rodriguez-Saona, L. (2009). Application of NIR and MIR spectroscopy in quality control of potato chips, *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 596-605.

Vasconcelos, A.L.S., Franca, A.S., Glória, M.B.A., Mendonça, J.C.F. (2007). A comparative study of chemical attributes and levels of amines in defective green and roasted coffee beans. *Food Chemistry*, 101, 26-32.

Wang, J., Jun, S., Bittenbender, H.C., Gautz, L., Li, Q.X. (2009). Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Kona Coffee Authentication, *Journal of Food Science*, 74, C385 - C391.

## LIST OF FIGURES

**Figure 1: PCA scores scatter plot of L\*a\*b\* color parameters for whole coffee beans (PC1 vs. PC2). ○ non-defective; □ immature; △ sour (light); ▲ sour (dark); ● black.**

Figure 2: Typical green coffee bean FTIR spectra obtained by (a) transmittance readings employing KBr disks (b) reflectance readings employing an ATR accessory (Spectra manipulation consisted of baseline correction and normalization).

**Figure 3: PCA scores scatter plot of KBr transmission FTIR spectra submitted to (a) normalization and baseline correction and (b) first derivatives (PC1 vs. PC2). ○ non-defective; □ immature; △ sour (light and dark mixed); ● black.**

**Figure 4: PCA scores scatter plot of FTIR-ATR spectra submitted to normalization and baseline correction (PC1 vs. PC2). ○ non-defective; □ immature; △ sour (light); ▲ sour (dark); ● black.**

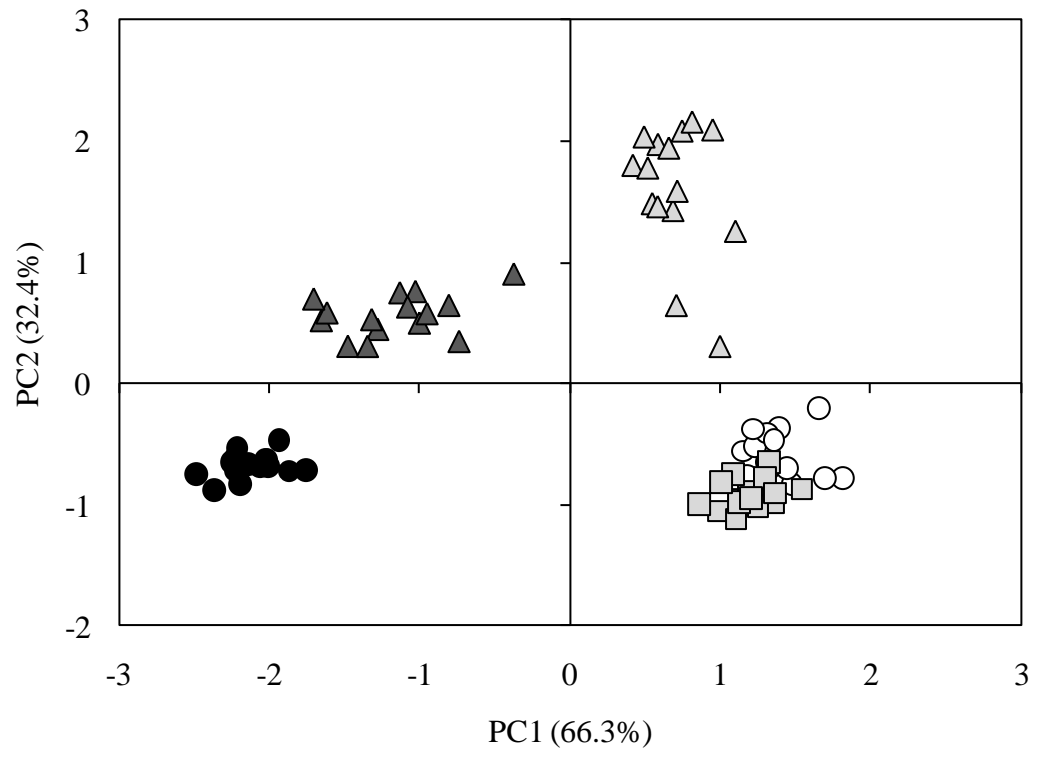


Figure 1

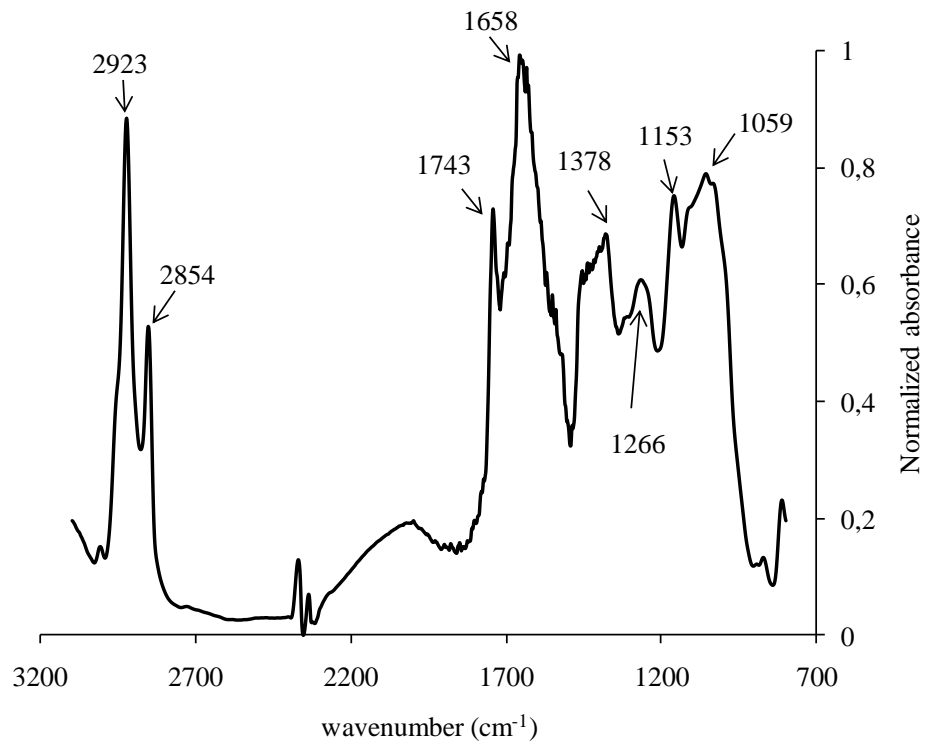


Figure 2 (a)

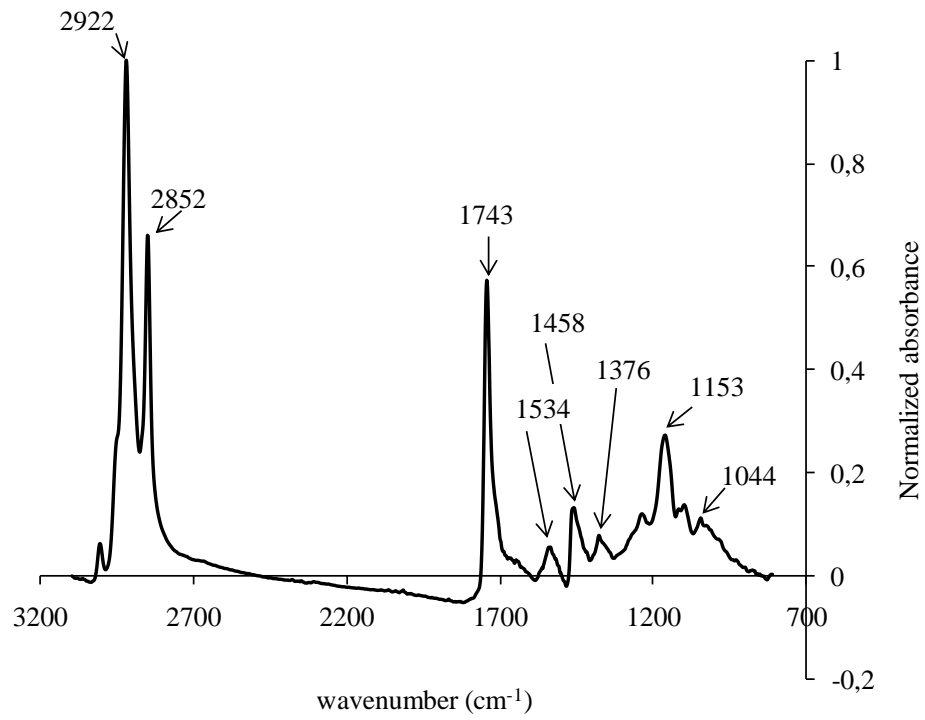


Figure 2 (b)



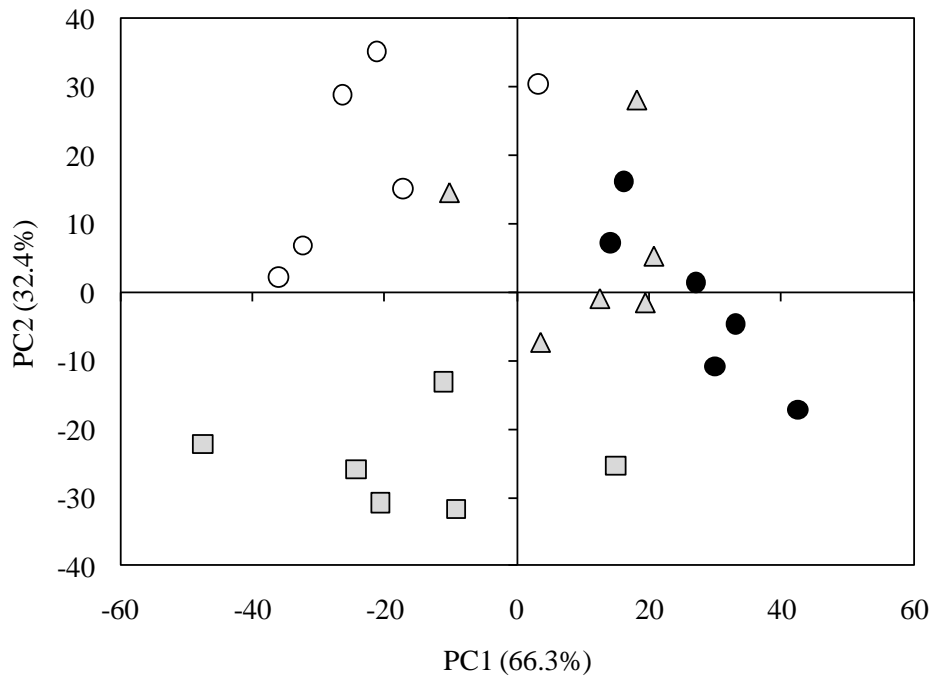


Figure 3 (a)

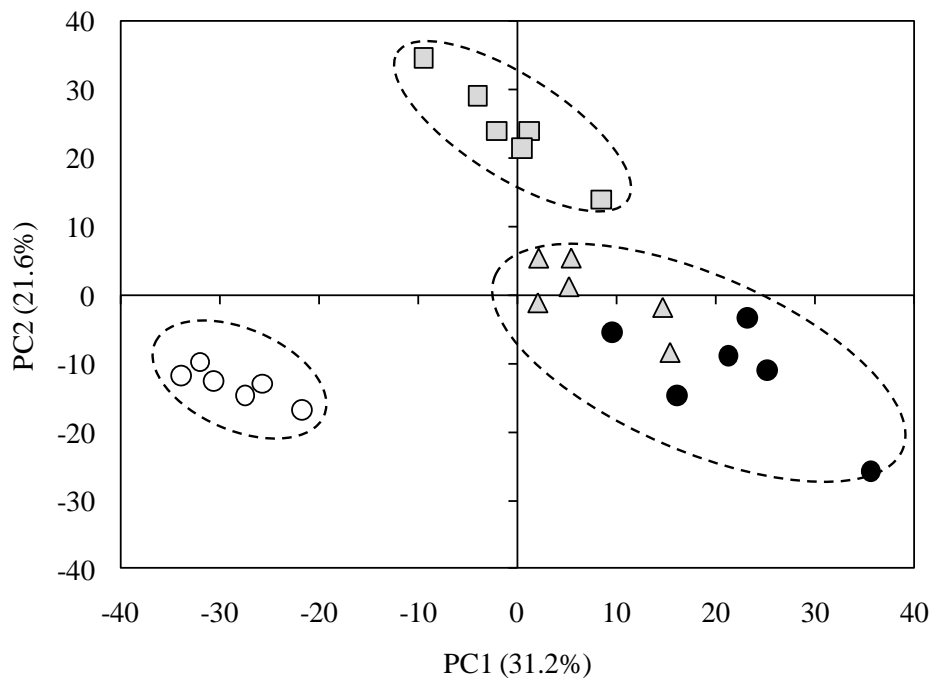


Figure 3 (b)

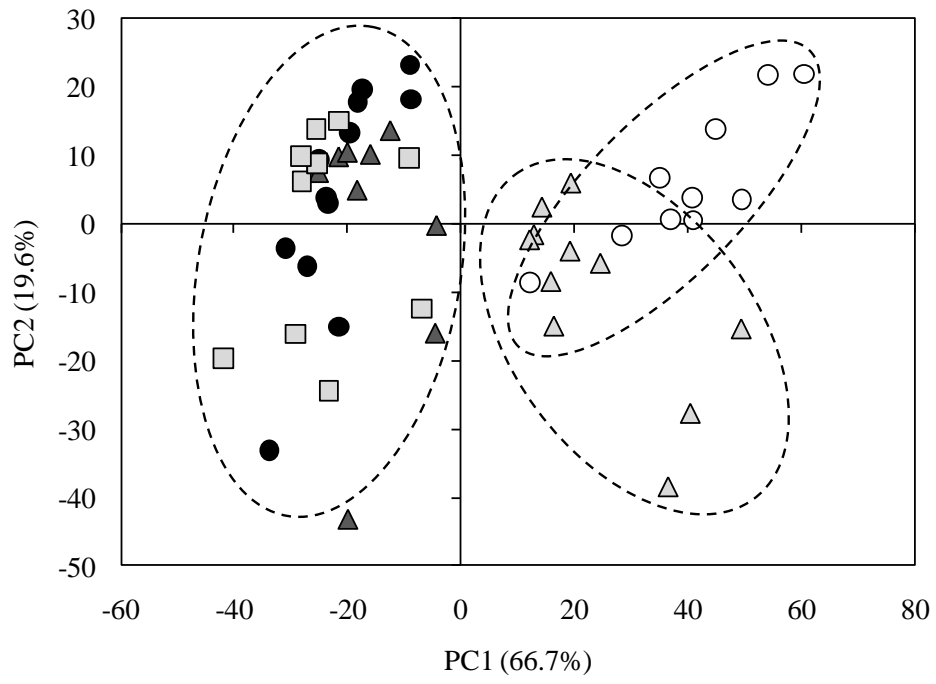


Figure 4

**Table 1:** Average color attributes of non-defective and defective coffee samples.

Sample	Whole beans					Ground beans				
	L*	a*	b*	h	c*	L*	a*	b*	h	c*
Non-defective	46.1±1.1 <sup>a</sup>	2.7±0.3 <sup>c</sup>	19.0±0.8 <sup>b</sup>	81.8±1.0 <sup>b</sup>	19.2±0.8 <sup>a</sup>	59.6±1.3 <sup>b</sup>	2.3±0.6 <sup>c</sup>	19.4±0.6 <sup>b</sup>	83.3±1.5 <sup>c</sup>	19.6±0.6 <sup>b</sup>
Immature	43.1±1.1 <sup>b</sup>	1.8±0.3 <sup>d</sup>	20.3±0.8 <sup>a</sup>	84.9±0.6 <sup>a</sup>	20.4±0.8 <sup>b</sup>	61.2±1.1 <sup>a</sup>	0.5±0.2 <sup>d</sup>	21.7±0.9 <sup>a</sup>	88.7±0.4 <sup>b</sup>	21.7±0.9 <sup>a</sup>
Sour (light)	37.1±2.1 <sup>c</sup>	6.5±1.0 <sup>a</sup>	16.8±0.9 <sup>c</sup>	68.8±3.4 <sup>c</sup>	18.1±0.8 <sup>c</sup>	55.7±0.6 <sup>c</sup>	4.1±0.3 <sup>a</sup>	18.1±0.5 <sup>c</sup>	77.3±0.7 <sup>e</sup>	18.6±0.6 <sup>c</sup>
Sour (dark)	29.6±2.0 <sup>d</sup>	3.7±0.4 <sup>b</sup>	10.2±1.4 <sup>d</sup>	70.0±1.8 <sup>c</sup>	10.9±1.4 <sup>d</sup>	48.2±0.5 <sup>d</sup>	3.5±0.1 <sup>b</sup>	18.0±0.2 <sup>c</sup>	78.9±0.4 <sup>d</sup>	18.4±0.2 <sup>c</sup>
Black	27.6±1.3 <sup>d</sup>	0.9±0.2 <sup>e</sup>	6.7±0.8 <sup>e</sup>	82.4±1.4 <sup>b</sup>	6.8±0.8 <sup>e</sup>	36.0±0.9 <sup>e</sup>	-1.3±0.4 <sup>e</sup>	10.9±0.9 <sup>d</sup>	97.0±2.1 <sup>a</sup>	11.0±0.9 <sup>d</sup>

Average±Standard deviation. Average values followed by the same letter in the same column do not differ significantly by the Tukey test at 5% probability.