UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Departamento de Química Analítica
Programa de Pós-graduação em Química

Maria Izabel Milani

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA AUTENTICAÇÃO DE CAFÉ TORRADO E ÓLEO DE CAFÉ VERDE

Araraquara
2020

Maria Izabel Milani

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA AUTENTICAÇÃO DE CAFÉ TORRADO E ÓLEO DE CAFÉ VERDE

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Redigolo Pezza
Coorientadora: Profa. Dra. Aline Theodoro Toci
Coorientador: Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto

Araraquara
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Milani, Maria Izabel
M637d Desenvolvimento de metodologias analíticas para autenticação de café torrado e óleo de café verde / Maria Izabel Milani. – Araraquara : [s.n.], 2020
134 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Helena Redigolo Pezza
Coorientador: Aline Theodoro Toci

1. Café. 2. Quimiometria. 3. Controle de qualidade. 4. Espectroscopia de ressonância nuclear. 5. Espectros vibracionais. I. Título.

Bibliotecária Responsável: Ana Carolina Gonçalves Bet - CRB8/8315

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Desenvolvimento de metodologias analíticas para autenticação de café torrado e óleo de café verde"

AUTORA: MARIA IZABEL MILANI
ORIENTADORA: HELENA REDIGOLO PEZZA
COORIENTADORA: ALINE THEODORO TOCI
COORIENTADOR: JOSE ANCHIETA GOMES NETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Prof.ª Dr.ª HELENA REDIGOLO PEZZA
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof.ª Dr.ª MIRIAN CRISTINA DOS SANTOS
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. MARIO HENRIQUE GONZALEZ
Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas - UNESP - São José do Rio Preto

Prof.ª Dr.ª SANDRA HELENA DA CRUZ
Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP - Piracicaba

Prof.ª Dr.ª ADRIANA VITORINO ROSSI
Departamento de Química Analítica. / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas

Araraquara, 13 de fevereiro de 2020

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: Maria Izabel Milani

Filiação: Angela Maria Gabriel Milani e Henrique Donizete Milani

Data de nascimento: 04/08/1991

Naturalidade: Jaú – SP

Nacionalidade: Brasileira

E-mail: mariaizabelmilani91@gmail.com

Formação acadêmica

1. Graduação

2010-2013: Bacharelado em Química pelo Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

2. Pós-Graduação

2014-2016: Mestrado em Química pelo Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) intitulado “Sistema de screening para detecção de furfural e hidroximetilfurfural em amostras de cachaça por espectroscopia de reflectância difusa” sob orientação da Profa. Dra. Helena Redigolo Pezza (CNPq processo nº 132651/2014-9)

2016-2020: Doutorado em Química pelo Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) intitulado “Desenvolvimento de metodologias analíticas para autenticação de café torrado e óleo de café verde” sob orientação da Profa. Dra. Helena Redigolo Pezza (Processo CNPq 141365/2016-1 e processo Fapesp 2016/14773-0)

Período sanduíche (outubro/2018 a setembro/2019) na Ohio State University no departamento de Food Science and Technology em Columbus, OH com trabalho intitulado “Novel analytical methodologies for determination of ground coffee and coffee oil adulteration” sob supervisão do Prof. Dr. Luis Enrique Rodriguez-Saona e sob orientação da Profa. Dra. Helena Redigolo Pezza (Processo Fapesp 2018/11095-6)

Trabalhos apresentados em congressos

1. 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia (SP) de 25 a 28 de maio de 2013.

Título do trabalho: Determinação de sódio em ração de animais domésticos por fotometria de chama

2. XXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP. Araraquara (SP) 18 e 19 de setembro de 2013.

Título do trabalho: Desenvolvimento de metodologia para determinação de sódio em rações de animais domésticos com extração assistida por ultrassom

3. 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia (SP) de 26 a 29 de maio de 2014.

Título do trabalho: Nova metodologia ambientalmente amigável de extração de sódio aplicada a rações animais com auxílio de ondas ultrassônica

4. 55ª Congresso Brasileiro de Química. Goiânia (GO) de 02 a 06 de novembro de 2015.

Título do trabalho: Determinação de furfural e hidroximetilfurfural em amostras de cachaça por espectroscopia de reflectância difusa.

5. 17º Encontro Nacional de Química Analítica. Florianópolis (SC) de 18 a 21 de setembro de 2016

Título do trabalho: Sistemas de screening para determinação de furfural e hidroximetilfurfural em amostras cachaça

6. I European Chemistry Conference. Roma (Itália) de 04 a 06 de julho de 2018

Título do trabalho: *NMR-Based methodology for roasted coffee adulteration*.

7. IFT19 Annual Meeting & Food Expo of International Food Technologists. New Orleans, LA (EUA) de 02 a 05 de junho de 2019.

Título do trabalho: *Authentication of Green Coffee Oil by Vibrational Spectroscopy*

Artigos Completos Publicados em Periódicos

1. MILANI, M. I.; ROSSINI, E. L; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Development of a new clean methodology with ultrasound-assisted extraction for analysis of sodium in pet foods. **Analytical Methods**, v. 7, p. 2433-2436. 2015.

2. CASTOLDI, K.; MILANI, M. I.; ROSSINI, E. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Flow injection analysis of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde in honey by a modified Winkler method. **Analytical Sciences**, v. 32, n. 4, 413-417. 2016.

3. ROSSINI, E. L.; MILANI, M. I.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. A new eco-friendly methodology for the determination of Amaranth dye in foodstuffs using diffuse reflectance spectroscopy. **Analytical Methods**, v. 8, p. 4086-4092. 2016.

4. MILANI, M. I.; ROSSINI, E. L.; CASTOLDI, K.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Paper platform for reflectometric determination of furfural and hydroxymethylfurfural in sugarcane liquor. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 286-292. 2017.

5. ROSSINI, E.L.; MILANI, M. I.; CARRILHO, E.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Simultaneous determination of renal function biomarkers in urine using a validated paper-based microfluidic analytical device. **Analytica Chimica Acta**, v. 997, p. 16-23. 2018.

6. SILVESTRE, A. L. P.; MILANI, M. I.; ROSSINI, E. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. A paper platform for colorimetric determination of aluminum hydrochloride in antiperspirant samples. **Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 204, p. 432-435. 2018.

7. ROSSINI, E. L.; MILANI, M. I.; PEZZA, H. R. Green synthesis of fluorescent carbon dots for determination of glucose in biofluids using a paper platform. **Talanta**, v. 201, p. 503-510, 2019.

8. MILANI, M. I.; ROSSINI, E. L.; CATELANI, T. A.; PEZZA, L.; TOCI, A. T.; PEZZA, H. R. Authentication of roasted and ground coffee samples containing multiple adulterants using NMR and a chemometric approach. **Food Control**, v. 112, p. 107104, 2020.

DEDICATÓRIA

Primeiramente, gostaria de dedicar este trabalho a meus pais, Angela e Henrique. Vocês são meu chão e meu farol.

À minha irmã, Ana Julia, a melhor amiga que a vida poderia me dar.

Ao meu melhor amigo e companheiro de aventuras, Eduardo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por todas as conquistas alcançadas e por permanecer junto a mim mesmo em momentos que me faltaram fé.

Agradeço a meus pais, por me proporcionar a oportunidade de chegar até aqui. Obrigada por vibrarem a cada conquista nossa e chorar comigo nossas derrotas. Vocês me ensinaram a superar os mais difíceis obstáculos.

Agradeço à minha irmã por cuidar tão bem da nossa família quando eu não estou por perto. Obrigada por sua força e por sua bondade.

Agradeço ao Eduardo por ser simplesmente quem é. Obrigada por me incentivar a seguir em frente, por me dar forças quando me faltam, por ser meu consolo e meu alento. Eu simplesmente não tenho palavras para agradecer o quanto você fez e faz por mim todos os dias.

Agradeço aos amigos do GPFF e LATIG, muito obrigada pelo companheirismo e pelas risadas durante todos esses anos.

Agradeço à Profa. Helena Redigolo Pezza, pela orientação, pela atenção em todos esses anos e, principalmente, pelo exemplo profissional.

Agradeço também ao Prof. Luis E. Roguiguez-Saona pela oportunidade de estágio em seu laboratório na Ohio State University e pelos ensinamentos compartilhados. Obrigada também ao seu grupo de pesquisa, em especial à Peren e Karla, por sempre serem tão solícitos e prestativos.

Agradeço à Cooperativa Regional de Cafeicultores em Guaxupé (Cooxupé), em especial ao Sr. Marcelo Casagrande dos Reis, pelo fornecimento das amostras de óleo de café verde.

Agradeço a todos os professores que tive até hoje. Obrigada sempre pelo exemplo dado e pelo conhecimento compartilhado.

Ao CNPq (processo 141365/2016-1) pela bolsa concedida e pelo auxílio financeiro.

À Fapesp (processos 2016/14473-0 e 2018/11095-6) pelas bolas concedidas e pelo auxílio financeiro concedidos para realização deste projeto.

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para esta conquista, meu mais sincero muito obrigada!

“A experiência é o nome que damos aos nossos erros”.

Oscar Wilde

“I failed my way to success”.
Thomas Edison

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

Erwin Schrödinger

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”.

George Bernard Shaw

RESUMO

O café é um produto fundamental para a economia brasileira. Em 2018 foram exportadas aproximadamente 58 milhões de sacas, mais de um terço da produção global do grão, o que equivale a mais de US$5,3 bilhões. Dessa maneira, é necessário um rígido controle de qualidade desse tipo de produto. Atualmente, a autenticação de amostras de café é feita por meio da técnica de microscopia, e, infelizmente, os resultados são subjetivos e a técnica é obsoleta. No presente trabalho propõe-se a utilização de metodologias espectroscópicas como alternativa para autenticação de amostras de café torrado e moído; as técnicas utilizadas foram a Ressonância Magnética Nuclear e absorção no Infravermelho em conjunto com ferramentas quimiométricas. A técnica de NMR mostra-se bastante robusta e permite identificar diretamente pela análise dos espectros amostras adulteradas, principalmente quando se trata de adulterantes com amido, atingindo limites de detecção que variam de 0,32 a 0,86% (g/100 g de café); contudo, as técnicas de espectroscopia no infravermelho, tanto próximo quanto médio, permitem uma maior frequência analítica e não necessitam etapas de pré-tratamento de amostra, tal qual ocorre com NMR; todos resultados das três técnicas analíticas foram submetidos a análises quimiométricas e obtiveram classificação correta em 100% dos casos, conforme o modelo SIMCA desenvolvido para cada uma delas. Um subproduto do café que vem ganhando espaço e atenção do mercado comercial é o óleo de café verde, extraído dos grãos de café não torrados, e possui uma série de benefícios associados ao seu consumo ou utilização devido a vários compostos benéficos em sua composição; o óleo de café verde possui elevado valor comercial e, com isso, sua autenticação se faz necessária tal qual ocorre com o próprio café ou com demais óleos vegetais de elevado valor comercial. Neste trabalho, propõe-se a autenticação de amostras comerciais de óleo de café verde utilizando espectroscopia vibracional associada com ferramentas quimiométricas e equipamentos portáteis e de fácil operação. O modelo SIMCA desenvolvido permitiu diferenciar amostras puras de amostras adulteradas com níveis de adulteração de até 1%. Também foi avaliada a conversão de componentes do óleo de café verde como marcadores do tempo de estocagem. As metodologias desenvolvidas são robustas, confiáveis, precisas e requerem mínimo ou nenhum preparo de amostra.

Palavras-chave: café, óleo de café, espectroscopia vibracional, RMN, controle de qualidade

ABSTRACT

Coffee is a fundamental commodity for Brazilian economy. In 2018, 58 million of coffee bags were exported, which is equivalent to more than a third of global coffee production, generating a revenue of US$5.3 billion. That is why is necessary a rigid quality control of this kind of product. Nowadays, coffee authentication is performed by microscopy technique and, unfortunately, the results obtained are subjective and the technique used is obsolete for the purpose. In this work, we propose the use of spectroscopic methodologies as alternative for microscopy techniques; Nuclear Magnetic Resonance and Infrared absorbance were used together with chemometric tools. NMR technique showed itself quite robust and allowed the identification of coffee fraud by the observation of NMR spectra, mainly when the adulterant utilized was starch-based, with detection limits ranging from 0.32 up to 0.86% (g each 100g of coffee); however, infrared spectroscopy techniques, both near and medium, allow a higher analytical frequency and they do not need any sample preparation steps, as occurs with samples in ^{1}H-NMR method; the results from all three methods were submitted to chemometric analysis and obtained a correct classification rate of 100% in all cases. A coffee by-product that has been gaining attention of commercial markets is the green coffee oil, which is obtained from unroasted coffee beans and has innumerous health benefits associated with its consumption and utilization due to its several compounds associated with beneficial properties; green coffee oil has a high commercial value and, with it, its authentication is necessary because, as occurs with coffee itself or other vegetable oils with high commercial value, green coffee oil may be subject of fraud. In this work, we intent to authenticate green coffee oil commercial samples using vibrational spectroscopy associated with chemometric tools and portable equipment with easy handling. The developed SIMCA model allowed us to differentiate adulterated samples from pure one with 1% adulteration limit. Also, it was evaluated the conversion rate from triacylglycerols in free fatty acids as markers of storage time. The methodologies developed proved to be robust, trustable, precise and require minimum or no sample preparation steps.

Keywords: coffee, coffee oil, vibrational spectroscopy, NMR, quality control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – À esquerda, grãos crus de café arábica e robusta, à direita, grãos torrados de cafés arábica e robusta.....20
Figura 2 – Fruto do cafeeiro (cereja) em diferentes estágios de maturação. Em (A) tem-se o fruto verde, em (B) no estágio ideal de maturação para colheita e em (C) o grão seco. 20
Figura 3 – Secção transversal de uma cereja de café madura. 21
Figura 4 – Esquema dos processos que envolvem o beneficiamento do café. 22
Figura 5 – Fórmulas estruturais do cafestol e caveol. 27
Figura 6 – Fórmula estrutural da cafeína. 28
Figura 7 – Ambos os estados de *spin* permitidos para o núcleo de ^{1}H 31
Figura 8 – Processo de ressonância para o núcleo de ^{1}H.....32
Figura 9 – A precessão do núcleo girando como resultado da influência de B_0.....33
Figura 10 – Processo de ressonância magnética de um núcleo atômico quando $\boldsymbol{\nu} = \boldsymbol{\omega}$. 33
Figura 11 – Blindagem diamagnética de um núcleo causada pela circulação de elétrons. 34
Figura 12 – Fórmula estrutural do (a) tetrametilsilano (TMS) e (b) Ácido trimetilsililpropanoico (TSP).....35
Figura 13 – Representação de parte do espectro eletromagnético mostrando a relação do infravermelho vibracional com outros tipos de radiação. 38
Figura 14 – Modos de vibração das moléculas no infravermelho. X é vetor que indica o movimento para dentro do campo e ● é o vetor indica o movimento para fora do campo. 39
Figura 15 – Esquema do equipamento de infravermelho com interferômetro. 41
Figura 16 – Representação do fenômeno da ATR em análises de IR. 42
Figura 17 – Representação dos fenômenos de reflectância especular e reflectância difusa.....43
Figura 18 – Representação esquemática do modelo de oscilar harmônico ideal.....45
Figura 19 – Esquematização do equipamento de espectroscopia de NIR. 46
Figura 20 – Diagrama de níveis de energia com os estados de energia na espectroscopia Raman.....48
Figura 21 – Esquema do espectrômetro Raman. 49
Figura 22 – Diagrama de um equipamento de cromatografia gasosa com detector por ionização em chama. 54
Figura 23 – Esquematização do funcionamento de um detector de ionização em chama. 55
Figura 24 – Escala Agtron para averiguar o grau de torra dos grãos de café 60
Figura 25 – Moedor de grão utilizado indicando a granulometria selecionada. 61
Figura 26 – Esquema de preparo de amostra para extração com D_2O. 62
Figura 27 – Esquematização da separação das frações de TAG e AGL. 63
Figura 28 – Esquema do processo de derivatização de ácidos graxos. 64
Figura 29 – Esquematização da metodologia de análise para as técnicas de (a) NIR e (b) Mid-IR. 67
Figura 30 – Esquematização da metodologia de análise para as técnicas de (a) Raman e (b) Mid-IR. 68
Figura 31 – Imagens de café torrado e moído de adulterantes com graus de torra e moagem semelhantes. 71
Figura 32 – Imagens de microscopia eletrônica para amostras de café torrado e

moído (a) puro, (b) adulterado com 5% de milho, (c) adulterado com 5% de cevada e (d) adulterado com 5% de trigo.....72
Figura 33 – Espectros de pre-sat ^{1}H-NMR de extratos aquosos da mesma amostra de café em dois graus de torra, média (marrom claro) e escura (marrom escuro). 73
Figura 34 – Espectros de pre-sat ^{1}H-NMR para amostras de café puro e com adulterantes (50:50 m/m). 74
Figura 35 – Representação do resíduo de glicose da molécula de amido com destaque para o hidrogênio do carbono da ligação (α-1,4) responsável pelo sinal em 5,40 ppm dos espectros pre-sat de ^{1}H-NMR.....74
Figura 36 – Estruturas das moléculas de 1,5-anidrofrutose e da estaquiose, com destaque para os hidrogênios responsáveis pelos sinais marcadores de adulteração com cascas de café e soja, respectivamente, observados nos espectros de pre-sat de ^{1}H-NMR 75
Figura 37 – Gráfico de *scores* para análises de ^{1}H-NMR amostras de café torrado e moído, sendo que as amostras em vermelho são de café adulterado e as amostras em azul são de café puro. 79
Figura 38 – Gráfico de *loadings* de PC1, PC2 e PC3 referente às análises de ^{1}H-NMR 80
Figura 39 – Espectros pre-sat de ^{1}H-NMR de duas amostras comerciais com selo de pureza ABIC uma adulterada (2, em vermelho) e outra pura (28, em azul). 84
Figura 40 – Espectros de Raman de duas amostras não adulteradas de óleo de café verde. 86
Figura 41 – Espectros de Raman de óleo de café verde e demais óleos vegetais. ..87
Figura 42 – Fórmulas estruturais do cafesol e caveol com os carbonos numerados. 88
Figura 43 – Espectros de Raman das 21 amostras comerciais de óleo de café verde. 88
Figura 44 – Projeção de classes e distância de classes do modelo SIMCA para as amostras de óleo de café verde. 89
Figura 45 – Capacidade discriminante do modelo SIMCA para espectroscopia Raman.....91
Figura 46 – Espectros de infravermelho médio de duas amostras de óleo de café verde. 92
Figura 47 – Espectros de infravermelho médio de óleo de café verde e demais óleos vegetais. 93
Figura 48 – Fórmula estrutural do ácido quínico. 94
Figura 49 – Espectros de infravermelho médio das amostras comerciais de óleo de café verde. 94
Figura 50 – Projeção de classes e distância entre classes do modelo SIMCA para análises de espectroscopia no infravermelho médio.....95
Figura 51 – Capacidade discriminante do modelo SIMCA para espectroscopia Raman.....97
Figura 52 – Comparação dos espectros de infravermelho próximo de café e possíveis adulterantes.....100
Figura 53 – Projeção de classes e distância de classes do modelo SIMCA para análises de café com espectroscopia no infravermelho próximo. 101
Figura 54 – Capacidade discriminante do modelo SIMCA para espectroscopia no infravermelho próximo.....102
Figura 55 – Espectros de infravermelho médio de uma amostra de café torrado e

moído e seus possíveis adulterantes. 103
Figura 56 – Projeção de classes e distância de classes do modelo SIMCA para análises de Mid-IR e amostras de café. 104
Figura 57 – Capacidade discriminante do modelo SIMCA para espectroscopia no infravermelho médio. 106
Figura 58 – Cromatograma da fração de TAG das amostras de óleo de café verde 107
Figura 59 – Cromatograma da fração de AGL das amostras de óleo de café verde. 107
Figura 60 – Diminuição da fração de TAG e aumento da fração de AGL ao longo do tempo. 110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre o valor da saca de café e demais grãos. 25
Tabela 2 – Principais constituintes do óleo de café verde.....27
Tabela 3 – Composição de ácidos graxos do óleo de café verde e de diferentes óleos vegetais.....28
Tabela 4 – Parâmetros analíticos para quantificação dos seis adulterantes estudados em dois graus de torra 77
Tabela 5 – Valores de repetibilidade intra-dia e inter-dia para amostras de café torrado adulterado com seis diferentes adulterantes em dois graus de torra.....77
Tabela 6 – Classificação das amostras para o modelo SIMCA.....81
Tabela 7 – Amostras comerciais de café torrado e moído e suas respectivas porcentagens de adulteração.....83
Tabela 8 – Distância interclasse para o modelo SIMCA das amostras de óleo de café verde. 90
Tabela 9 – Classificações incorretas do modelo SIMCA para amostras de óleo de café verde. 90
Tabela 10 – Distância interclasse do modelo SIMCA para espectroscopia no infravermelho médio das análises de óleo de café verde.....95
Tabela 11 – Classificações incorretas do modelo SIMCA para análises de óleo de café verde com espectroscopia no infravermelho médio. 96
Tabela 12 – Composição dos ácidos graxos de diferentes óleos vegetais encontrados por meio de GC-FID 98
Tabela 13 – Composição de ácidos graxos das amostras de óleo de café verde.....99
Tabela 14 – Distância interclasses do modelo SIMCA para análises de café torrado e moído com espectroscopia no infravermelho próximo. 102
Tabela 15 – Classificações incorretas do modelo SIMCA para análises de café torrado e moído com espectroscopia no infravermelho próximo.....102
Tabela 16 – Distância interclasses do modelo SIMCA para análises de café torrado e moído com espectroscopia no infravermelho médio. 105
Tabela 17 – Classificações incorretas do modelo SIMCA para análises de café torrado e moído com espectroscopia no infravermelho médio.....105
Tabela 18 – Valore das concentrações (g/100 g) de TAG AGL em amostras de óleo de café 109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácido graxo
TSP	Ácido trimetilsililpropanóico, do inglês *Trimethylsilylpropanoic acid*
AGL	Ácidos graxos livres
LDA	Análise discriminatória linear, do inglês *linear discriminatory analysis*
PCA	Análise dos componentes principais, do inglês *principal component analysis*
I_A	Área integrada do sinal do adulterante
I_{TSP}	Área integrada do sinal do TSP
B_0	Campo magnético aplicado
R	Coeficiente de correlação
R^2	Coeficiente de determinação
λ	Comprimento de onda
h	Constante de Planck
GC	Cromatografia gasosa, do inglês *gas chromatography*
δ	Deslocamento químico
RSD	Desvio padrão relativo
RSD	Desvio-padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*
FID	Detector por ionização em chama, do inglês *flame ionization detector*
D ou ^2H	Deutério
(d)	Dubleto
(dd)	Duplo dubleto
E	Energia
FAME	Éster metílico de ácido graxo, do inglês *fatty acid methyl ester*
ν	Frequência
ω	Frequência angular
Hz	Hertz
Mid-IR	Infravermelho médio, do inglês *medium Infrared*
NIR	Infravermelho próximo, do inglês *near Infrared*
KNN	K-ésimo vizinho mais próximo, do inglês *K- nearrest neighbor*
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de Quantificação
SIMCA	Modelagem independente da analogia de classes do inglês *soft independent modelin*
μ	Momento magnético
$\bar{\nu}$	Número de onda
υ	Número quântico vibracional
γ	Razão giromagnética
DRIFT	Reflectância difusa e infravermelho com transformada de Fourier, do inglês *diffuse ref transform*
ATR	Refletância total atenuada, do inglês *attenuated total reflectance*
NMR	Ressonância magnética nuclear, do inglês *nuclear magnetic ressonance*
Laser	Sigla inglesa para *light amplification by stimulated emission of radiation*
(s)	Singleto

TMS	Tetrametilsilano
FT	Transformada de Fourier, do inglês *Fourier transform*
TAG	Triacilgliceróis
UV	Ultravioleta
UA	Unidade arbitrária
c	Velocidade da luz

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19

1.1 Café 19

1.2 Óleo de café verde 26

1.3 Metodologias analíticas 30

1.3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 30

1.3.2 Espectroscopia Vibracional 37

1.3.2.1 Espectroscopia no infravermelho 37

1.3.2.2 Espectroscopia no infravermelho próximo 44

1.3.2.3 Espectroscopia Raman 47

1.3.3 Quimiometria 50

1.3.3.1 Análise dos componentes principais (PCA) 51

1.3.3.2 Modelagem Independente por Analogia de Classe (SIMCA) 51

1.3.4 Cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (GC-FID) 53

2 OBJETIVOS 56

3 PARTE EXPERIMENTAL 57

3.1 Equipamentos 57

3.2 Soluções e reagentes 58

3.3 Preparo de amostras 59

3.3.1 Amostras utilizadas: café, óleo de café e adulterantes 59

3.3.2 Café – torra e moagem 60

3.3.3 Adulteração de amostras em laboratório 61

3.3.4 Café – extração com D_2O 62

3.3.5 Análises de GC-FID para amostras de óleo de café verde 62

3.3.5.1 Separação das frações de TAG e AGL em óleo de café verde 63

3.3.5.2 Derivatização 64

3.4 Autenticação de amostras de café torrado e moído utilizado ^{1}H-NMR 65

3.5 Autenticação de café torrado e moído utilizando espectroscopia vibracional: infravermelho próximo e médio 66

3.6 Autenticação de amostras de óleo de café verde com espectroscopia vibracional: infravermelho médio e Raman 67

3.7 Análise de cromatografia gasosa com detector de ionização em chama para óleo de café verde 68

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 70

4.1 Grau de torra 70

4.2 Autenticação de amostras de café torrado e moído utilizando ^{1}H-NMR 72

4.2.1 Quantificação de adulterantes em amostras de café com ^{1}H-NMR 76

4.2.2 Ferramentas quimiométricas para análise e classificação das amostras de café 78

4.2.3 Amostras comerciais analisadas: autenticação e quantificação de adulterantes 82

4.3 Autenticação de amostras de óleo de café verde utilizando espectroscopia vibracional e quimiometria.....85

4.3.1 Classificação de amostras de óleo de café verde com espectroscopia Raman e SIMCA 85

4.3.2 Classificação de amostras de óleo de café verde com espectroscopia no infravermelho médio e SIMCA 92

4.3.3 Determinação da composição de ácidos graxos das amostras de óleos vegetais utilizando GC-FID 97

4.4 Autenticação de amostras de café torrado e moído utilizando espectroscopia vibracional e quimiometria.....100

4.4.1 Classificação de amostras de café torrado e moído utilizando espectroscopia no infravermelho próximo e SIMCA 100

4.4.2 Classificação de amostras de café torrado e moído utilizando espectroscopia no infravermelho médio e SIMCA 103

4.5 Determinação das concentrações de TAG e AGL em amostras de diferentes anos utilizando GC-FID.....106

5 CONCLUSÕES..... 111

REFERÊNCIAS..... 113

APÊNDICES 126

1. Introdução

1.1 Café

O café é o fruto do cafeeiro, que é um arbusto da família Rubiaceae e do gênero *Coffea L.* e, atualmente, são conhecidas mais de 100 espécies diferentes deste mesmo gênero. Contudo, somente duas dessas espécies possuem interesse comercial: *Coffea arabica*, popularmente conhecido como café arábica e *Coffea canephora*, também chamado de café robusta ou conilon (Kemsley, Ruault e Wilson, 1995).

As diferenças entre essas duas espécies de café são inúmeras, desde a altura do pé e temperatura ideal de plantio até a aparência do grão. Os grãos de café arábica são mais alongados enquanto os grãos de café robusta são mais arredondados (Figura 1). O café arábica responde melhor a temperaturas entre 15 e 25°C enquanto o café robusta suporta temperaturas mais elevadas, entre 20 e 30°C. Em relação a altitude de cultivo, o café arábica exige uma elevação de 1500 a 2500 metros acima do nível do mar, já o café robusta pode ser cultivado em elevações entre 0 e 900 metros acima do nível do mar. Os teores de lipídeos, açúcares e cafeína também diferem entre as duas espécies; enquanto no café arábica os valores encontrados são 15-17% de lipídeos, 6-9% de açúcares e 0,8-1,4% de cafeínas; os teores do café robusta são 10-12%, 3-7% e 1,7-4%, respectivamente. Essas distinções são responsáveis pelas diferenças sensoriais e econômicas entre as duas espécies; enquanto o café arábica possui sabor mais complexo, maior teor de acidez e também um valor econômico mais elevado, o café robusta possui maior teor de fenóis o que confere à bebida um sabor metálico e mais amargo (Moldvaer, 2016). Atualmente, cerca de 70% da produção mundial de café é referente ao café arábica, porém, o café robusta é importante pois é utilizado para construção de *blends* da bebida e, dado ao seu maior teor de sólidos solúveis, é responsável por dar mais “corpo” a bebida.

Figura 1 – À esquerda, grãos crus de café arábica e robusta, à direita, grãos torrados de cafés arábica e robusta
Fonte: adaptado de http://arabicarobustacoffeesupplier.com/differences-arabica-and-robusta-coffee/

O grão de café vem do fruto do cafeeiro conhecido como cereja, pois quando atinge o ponto ideal de maturação possui uma casca lisa e fina e coloração vermelho escuro. Na Figura 2 a seguir, é possível observar os vários estágios de maturação do fruto do cafeeiro.

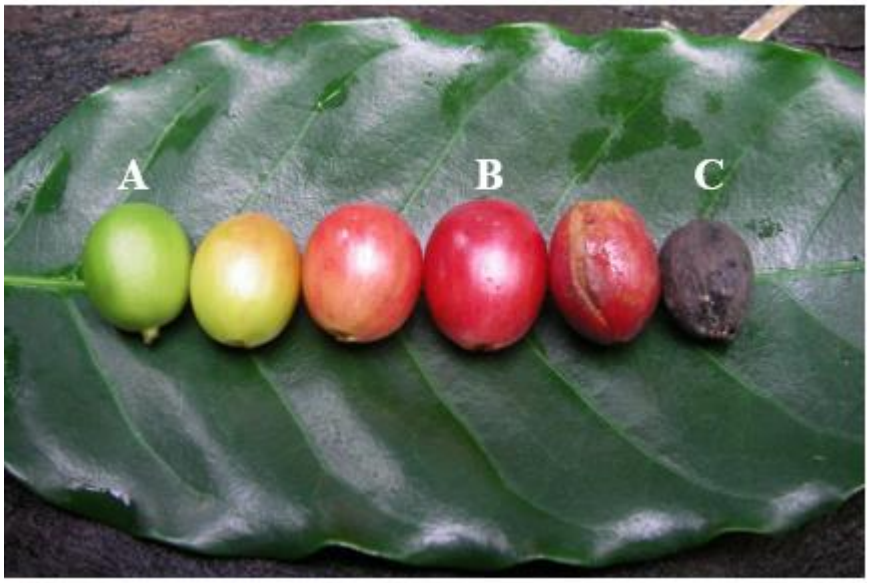


Figura 2 – Fruto do cafeeiro (cereja) em diferentes estágios de maturação. Em **(A)** tem-se o fruto verde, em **(B)** no estágio ideal de maturação para colheita e em **(C)** o grão seco.
Fonte: adaptado de https://karibukahawa.wordpress.com/2018/06/03/harvesting-post-harvesting-practices-green-coffee-guide/

Como é possível observar na Figura 3 a seguir, o fruto do café é composto, basicamente, por exocarpo (casca), mesocarpo (polpa), endocarpo (pergaminho) e

endosperma (grão). A casca envolve o fruto do cafeeiro e, quando madura, possui coloração vermelho escura. A polpa do fruto possui sabor adocicado devido ao alto teor de açúcares. O pergaminho trata-se de uma fina película que envolve o grão de café, produto de interesse comercial.

Figura 3 – Secção transversal de uma cereja de café madura.
Fonte: adaptado de https://www.tibaagan.com/coffea-arabica-rubiaceae/

Após a colheita dos frutos de café, dá-se início ao processo de beneficiamento que, resumidamente, trata-se de secar os frutos de café para retirada dos grãos de café prontos para comercialização.

Inicialmente tem-se o processo de limpeza, no qual são separadas possíveis impurezas trazidas da lavoura juntamente com os frutos, como folhas, gravetos e etc. então, dá-se o processamento no qual o café pode ser processado de três maneiras: por via úmida, via seca ou via semiúmida; no preparo por via úmida, o café é separado é lavado e segue então para o despolpador onde é descascado e despolpado, para eliminar quaisquer resquícios do fruto, estes são submersos em tanques de fermentação e são, em seguida, lavados; no processo por via seca, a secagem do café é feita com o grão ainda na casca, em seguida, dá-se o processo de lavagem, separação e secagem; já no processo por via semiúmida os frutos são limpos e separados por densidade, sendo que o café que boia é o menos denso e vai diretamente para a secagem. Após as etapas de lavagem e separação, nas quais as impurezas são eliminadas e são separados conforme o grau de maturação, tem-se o processo de secagem dos grãos sendo que esta pode ser feita em terreiros, secadores mecânicos ou a partir da combinação entre os dois; após a secagem dos grãos, o café está pronto para ser ensacado e comercializado. Na Figura 4, pode ser observado um esquema explicativo das etapas de beneficiamento do café (Degaspare, 2013).

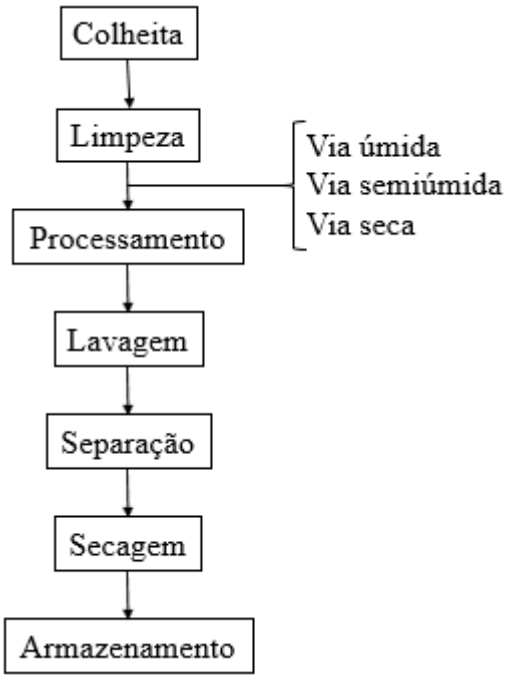


Figura 4 – Esquema dos processos que envolvem o beneficiamento do café.
Fonte: elaborado pela autora.

Há diversos relatos na literatura que associam o consumo moderado e regular de café a vários benefícios à saúde, como a diminuição do risco de doenças cardiovasculares, diminuição da incidência de doenças como Parkinson e Alzheimer, redução no risco de desenvolver diabetes do tipo 2, auxilia na diminuição da pressão arterial e também previne a formação de alguns tipos de tumores (O'Keefe *et al.*, 2013; Samoggia e Riedel, 2019) o que torna um café um produto único, o qual combina benefícios para a saúde do consumidor com a reconfortante sensação associada ao consumo da bebida.

O café teve origem na Etiópia, onde as tribos da região, desde a Antiguidade (4000 a.C. – 476 d. C.), conheciam seu poder estimulante; os nativos consumiam os frutos obtidos das plantas de café devido à sua polpa adocicada; também as folhas da planta eram mastigadas ou utilizadas para o preparo de chás (Associação Brasileira da Indústria de Café, 2010; Martins, 2008).

Mesmo tendo sua origem no continente africano, foi o povo árabe quem dominou as técnicas de plantio e preparação do café. Há indícios que desde 575 d. C. na região atualmente denominada como Iêmen, habitantes locais foram os primeiros a cultivarem as plantas de café fora da África. Até então, os povos árabes, assim como os etíopes, também consumiam o café em sua forma crua, fervendo os frutos do café

com finalidade medicinal (Associação Brasileira da Indústria de Café, 2010; Martins, 2008).

O café popularizou-se ao redor do mundo depois que chegou ao continente europeu. No Brasil, a primeira muda de café foi trazida da Guiana francesa em 1727 pelo sargento-mor Francisco de Mello Palheta a pedido do então governador do estado do Grão-Pará. As primeiras mudas foram plantadas na região norte e nordeste, mais especificamente nos atuais estados do Pará, Maranhão bem como na Bahia. No entanto, como o clima da região não é muito propício ao plantio do café, no início do século XIX deu-se início ao cultivo do café na região sudeste, principalmente nos estados de Minas Gerais e São Paulo, onde o clima, altura e solo são ideais para o plantio do café arábica, conforme enunciado anteriormente.

Desde então o café representa um papel fundamental na economia brasileira. Ao longo dos anos o Brasil se mantém como líder na produção e exportação de grãos de café. Somente no ano de 2018, a produção brasileira de café foi de 58 milhões de sacas[1] de café, enquanto a produção global do grão foi de aproximadamente 160 milhões de sacas de café, ou seja, a produção de café no Brasil representa cerca de 36,3% da produção global (Associação Brasileira da Indústria de Café, 2018; Ferreira e Santos, 2018). De acordo com a Organização Internacional do Café (ICO), a respeito dos países exportadores de café, se somadas as produções do 2º (Colômbia) e 3º (Vietnã) colocados no ranking de países exportadores, não se equivale à produção de café do Brasil (International Coffee Organization, 2019).

Quanto à safra de 2018/2019, as exportações de café aumentaram cerca de 30% em relação ao ano anterior, sendo assim, cerca de 41 milhões de sacas de café foram exportadas, gerando uma receita de cerca de 5,3 bilhões de dólares, o que representa um aumento de quase 10% em relação à safra anterior (Caetano, 2019).

Em relação ao mercado interno, o consumo de café vem crescendo gradativamente ao longo dos anos; em 2018, o brasileiro consumiu, em média, 6,02 kg de café ao ano, equivalente a 99,5L da bebida pronta, um aumento de 4,8% em relação ao ano anterior, em que o consumo médio foi de 5,81 kg (REUTERS, 2019).

Pelo exposto, é possível considerar o café como um valioso produto comercial, dado os benefícios à saúde relacionados ao seu consumo, bem como a complexidade da obtenção do produto comercial, desde o plantio dos cafeeiros até o beneficiamento

[1] Cada saca equivale a 60 quilogramas.

dos grãos. Usualmente uma única saca de café é exportada a valores que ultrapassam R$ 500. Sendo assim, não há estranhamento quanto surgem relatos que amostras de café são objetos de fraude.

Segundo a Comissão Europeia de Normalização, a fraude alimentar é definida como a alteração intencional do conteúdo ou formação de um produto alimentar. A fraude alimentar é ocasionada por motivação econômica e consiste em ações propositadas tomadas para enganar os consumidores, comprometendo a autenticidade, segurança, qualidade ou confiabilidade dos alimentos (Meng *et al.*, 2020).

Há inúmeros exemplos na literatura que podem ser citados a respeito de fraude alimentar como por exemplo a adulteração de leite com adição de melamina (Bittar *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2013) adicionada para falsificar um aumento no teor de proteínas, ou peróxido de hidrogênio (Abbas *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2020) utilizado para aumentar o tempo de prateleira do produto; adulteração de mel com xarope de alta frutose (Sobrino-Gregorio *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2015); adulteração de azeite de oliva com óleos vegetais de menor valor comercial (Mendes *et al.*, 2015), com óleo de cozimento (Li *et al.*, 2018); ou mesmo a adulteração de extrato de tomate com adição de sacarose para ocasionar o aumento da viscosidade do produto (Liu *et al.*, 2017). Esses são alguns exemplos encontrados na literatura de adulteração de alimentos, prática que, além de ser prejudicial à economia por gerar produtos de baixa qualidade, é danosa ao consumidor que, além de adquirir um produto com menor qualidade, pode ser vítima de sérias doenças ou alergias associadas ao consumo dos alimentos fraudados.

Em relação ao café, infelizmente a situação não é diferente. A adulteração deste tipo de produto se dá pela adição de materiais de menor valor comercial; esses materiais geralmente são grãos ou sementes, mas também podem ser as cascas do próprio café ou mesmo terra, galhos e folhas. A título de comparação na Tabela 1 a seguir é possível observar o valor de cada saca dos grãos comumente utilizados na adulteração do café.

Tabela 1 – Comparação entre o valor da saca de café e demais grãos.

Grão	Valor da saca (R$)
Café arábica	506,80
Café robusta	306,00
Milho	47,37
Soja	85,29
Arroz	46,25
Cevada	48,01
Trigo	47,94

Fonte: elaborado pela autora com base nas informações retiradas de https://www.noticiasagricolas.com.br/cotacoes e https://www.agrolink.com.br/cotacoes (em 26/11/2019)

Diversas metodologias retratadas previamente relatam a determinação de adulterantes em amostras de café (Toci *et al.*, 2016). Podem ser citados vários exemplos como a adulteração com milho e autenticação por meio de metodologia cromatográfica com detecção por fluorescência (Jham *et al.*, 2007) ou por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (Jham *et al.*, 2008); metodologias cromatográficas também foram utilizadas para determinar adulteração em amostras de café com soja e trigo com auxílio de análise quimiométrica (Pauli *et al.*, 2014). A quimiometria também foi aplicada a análises espectroscópicas como análise de infravermelho para determinação de diversos adulterantes como casca de café, milho, cevada e borra de café (Reis, Franca e Oliveira, 2016; Reis, Franca, Adriana S e Oliveira, 2013), ou mesmo a utilização de infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near-Infrared*) para detecção de adulteração por milho (Winkler-Moser *et al.*, 2015); outro exemplo de adulteração de amostras de café é a presença de café robusta em amostras declaradas como sendo “100% arábica”, sendo assim, é importante destacar o uso de metodologias para determinar a presença da espécie robusta em amostras de café como, por exemplo, com detecção por NIR (Pizzaro, Esteban-Diéz e González-Sáiz, 2007) ou mesmo por NMR (Monakhova *et al.*, 2015), dentre outros exemplos.

No Brasil, o órgão responsável pele controle da qualidade do café é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que estabelece um limite de 1% (1 g a cada 100 g de café) para impurezas nas amostras de café (ANVISA - Agência Nacional de

Vigilância Sanitária, 1999a; Burns e Walker, 2019), porém, as impurezas tratam-se de pedaços de pau, folhas, pedras ou resíduos de terra, correspondentes à colheita e beneficiamento do café, portanto, não há um limite mínimo permitido para adição de outros grãos ou sementes às amostras de cafés, como milho, cevada, arroz, soja ou mesmo cascas de café.

Desde 1989, a ABIC (Agência Brasileira da Indústria de Café), uma agência não governamental, provê a marcas que solicitam o seu “selo de pureza”. O selo de pureza ABIC é fornecido a marcas que possuem somente café em sua composição. Mesmo não sendo obrigatório para comercialização de café no Brasil, uma marca que possui o selo de pureza ABIC pode passar maior confiabilidade ao consumidor. Contudo a metodologia utilizada pela ABIC para autenticação de amostras de café, microscopia ótica ou eletrônica, é bastante inapropriada para autenticação desse tipo de amostra (Amboni, Francisco e Teixeira, 1999; Menezes Jr., de e Bicudo, 1951).

Sendo assim, no presente trabalho, pretende-se utilizar metodologias limpas e confiáveis para autenticação de amostras de café torrado e moído. As metodologias selecionadas, e discutidas posteriormente, foram a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear bem como a Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier, tanto nos comprimentos do infravermelho próximo (NIR) quanto do infravermelho médio (Mid-IR).

1.2 Óleo de café verde

Nem todos os grãos de café produzidos são adequados para o consumo e estima-se que cerca de 28% desses grãos serão descartados pois não apresentam as características apropriadas para comercialização (Turratti, 2001). Como alternativa ao desperdício desses grãos de café defeituosos, é possível utilizá-los para a produção de uma matéria-prima de alto valor agregado e com propriedades únicas: o óleo de café verde.

O óleo de café verde é obtido a partir dos grãos crus de café, que possuem uma coloração esverdeada. Contudo, não se deve supor que o óleo de café verde é obtido através dos frutos imaturos.

Há diversos meios que podem ser utilizados para obtenção do óleo de café verde, dentre os quais podem ser citados a extração com fluido supercrítico utilizando

CO_2 (Araújo e Sandi, 2006; Azevedo *et al.*, 2008), a extração com auxílio de ondas ultrassônicas e éter de petróleo como solvente (Tsukui *et al.*, 2014), Soxhlet no qual hexano é geralmente usado como solvente e, o mais popular, a prensagem a frio; em média são necessário de 12 a 15 kg de café cru para produção de um litro do óleo de café (Casagrande, 2016).

O óleo de café verde apresenta propriedades únicas quando comparado aos demais óleos vegetais. Dentre seus constituintes (Tabela 2) estão os diterpenos cafestol e caveol (Figura 5), duas substâncias associadas a redução de tumores, como câncer colorretal, por exemplo; sendo assim, pode-se afirmar que o consumo desses diterpenos possui um efeito quimiopreventivo (Cavin *et al.*, 2002). Esses diterpenos também estão associados à apoptose celular[2] de tumores como mesotelioma pleural maligno, um tipo severo de câncer que envolve a membrana pulmonar, também conhecida como pleura; de acordo com estudos a presença de cafestol e caveol suprime a viabilidade das células do mesotelioma (Lee, Chae e Shim, 2012).

Tabela 2 – Principais constituintes do óleo de café verde.

Componentes	%em matéria seca
Triacilgliceróis	75,2
Ésteres de álcoois de diterpenos e ácidos graxos	18,5
Álcoois de diterpenos	0,4
Ésteres de esteróis e ácidos graxos	3,2
Esteróis	2,2
Tocoferóis	0,04-0,06

Fonte: adaptado de (Speer e Kölling-Speer, 2006)

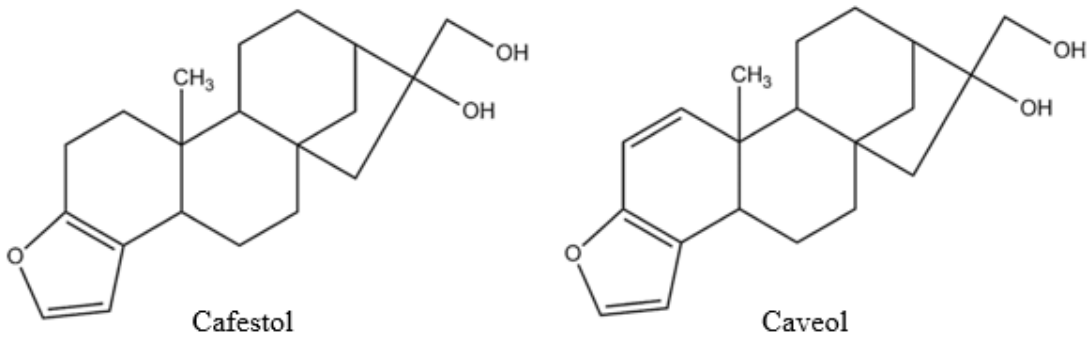


Figura 5 – Fórmulas estruturais do cafestol e caveol.
Fonte: adaptado de (Silva *et al.*, 2012)

[2] Morte celular programada.

Outra característica singular do óleo de café verde, que o difere dos demais óleos comerciais é a presença de cafeína (Figura 6) em sua composição. A cafeína é um poderoso estimulante do sistema nervoso central sendo também responsável por melhorar a memória e a concentração, bem como um melhor desempenho físico do consumidor de produtos contendo cafeína (Cappelletti *et al.*, 2014).

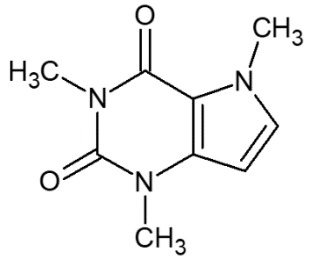


Figura 6 – Fórmula estrutural da cafeína.
Fonte: elaborado pela autora.

A composição de ácidos graxos encontrados no óleo de café verde é bastante singular quando comparado com os demais óleos vegetais, na Tabela 3, é possível observar mais detalhadamente essas diferenças, dentre as quais destacam-se as porcentagens de ácido palmítico (C16:0) e ácido araquídico (20:0) que são superiores a dos demais óleos vegetais avaliados.

Tabela 3 – Composição de ácidos graxos do óleo de café verde e de diferentes óleos vegetais

%AG / Óleo	Palmítico (C16:0)	Esteárico (C18:0)	Oleico (C18:1)	Linoleico (C18:2)	Linolênico (C18:3)	Araquídico (C20:0)	Referência
Café verde (arábica)	30,2	8,0	10,6	46,3	1,6	2,3	(Wagemaker *et al.*, 2011)
Café verde (robusta)	31,3	5,9	12,5	44,0	1,5	2,4	(Wagemaker *et al.*, 2011)
Canola	4,1	1,8	63,2	21,1	8,6	0,65	(Gunstone, 1996)
Chia	6,7	2,7	10,6	17,4	62,0	0,09	(Coelho e Salas-Mellado, 2014)
Milho	11,5	1,6	55,8	29,6	0,92	0,35	(Gunstone, 1996)
Gergelim	9,7	6,5	41,5	40,9	0,21	0,63	(Orsavova *et al.*, 2015)
Soja	11,1	4,7	20,5	53,9	8,9	0,34	(Gunstone, 1996)
Girassol	6,4	2,6	28,0	62,2	0,16	0,60	(Orsavova *et al.*, 2015)

Fonte: elaborado pela autora.

O óleo de café verde é alvo de grande interesse das indústrias cosmética e farmacêutica por uma série de fatores. Primeiramente, o óleo de café verde auxilia na manutenção da umidade natural da pele, melhorando sua hidratação; também possui a capacidade de absorção da radiação UV na faixa do UVB (que é a radiação que causa os maiores danos à pele humana) (Wagemaker *et al.*, 2011, 2015). Um dos ácidos graxos presentes na composição do óleo de café verde, o ácido linoleico (C18:2) promove o alívio para eczemas, bem como representa um importante papel no tratamento de casos de dermatite (Grollier e Plessis, 1988). Outras propriedades importantes do óleo de café verde são devido à presença dos diterpenos que, além de possuir ação antioxidante, previnem diversos tipos de câncer como de cólon e fígado e também previnem o estresse oxidativo e danos ao DNA (Cárdenas, Quesada e Medina, 2011).

O consumo do óleo de café verde também está associado a uma série de benefícios à saúde, devido ao alto teor de ácidos clorogênicos, que desempenham um importante papel no sistema circulatório. Também o consumo deste tipo de produto está associado à prevenção de uma série de doenças, como a prevenção de obesidade, hipertensão e tumores gastrointestinais (Garg, 2016).

Tendo em vista os fatores anteriormente expostos, justifica-se o porquê do elevado valor comercial do óleo de café verde: enquanto uma saca de café (de 60 kg) é vendida por cerca de R$ 500,00, um litro de óleo de café pode custar mais de US$ 400,00. Sendo assim, não seria inusitado surgirem adulterações nesse tipo de produto tal qual ocorre com o próprio café, ou mesmo com outros óleos vegetais de valor comercial considerável.

Dentre os exemplos de adulteração de óleos vegetais de interesse comercial é possível citar a adulteração de amostras de azeite de oliva extra virgem com óleos de baixo valor comercial como soja, girassol e milho (Aroca-Santos *et al.*, 2015; Durme, Van e Vandamme, 2016; Oussama *et al.*, 2012); óleo de argan adulterado com óleo de girassol, soja ou oliva (Oussama, Elabadi e Devos, 2012; Salghi, Armbruster e Schwack, 2014); óleo de coco extra virgem adulterado com gordura de porco, gordura de frango, sebo bovino, sebo de carneiro (Xu *et al.*, 2015), ou óleo de girassol e milho (Rohman e Che, 2011) ou também óleo de gergelim adulterado com óleo de milho, amendoim soja, girassol ou colza (Seo *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2016).

No entanto, por se tratar de um produto relativamente novo, não há relatos na literatura que abordem a adulteração em amostras de óleo de café verde e, conforme

estabelecido anteriormente, há indícios suficientes para supor que ocorram (ou venham ocorrer) esse tipo de prática. Sendo assim, pelo exposto, no presente projeto propõe-se o desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de adulterantes em amostras de óleo de café verde. As metodologias selecionadas foram a cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID) para determinação dos ácidos graxos e espectroscopia vibracional, mais especificamente infravermelho e Raman para determinação do padrão espectroscópico das amostras. A técnica de GC-FID foi também utilizada para avaliação da decomposição da fração de triacilgliceróis (TAG) em função do ano de produção.

1.3 Metodologias analíticas

Aqui serão descritas as técnicas e ferramentas analíticas selecionadas para autenticação das amostras de café torrado e moído bem como das amostras de óleo de café verde.

1.3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os primeiros estudos de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) foram realizados no início da década de 1930. A descoberta da NMR é creditada a Isidor Isaac Rabi (1898-1988), um físico americano de origem polonesa laureado com o Prêmio Nobel de Física em 1944 por suas pesquisas a respeito do fenômeno de ressonância magnética nuclear. Posteriormente, no final da década de 1940 e início da década de 1950, grupos de pesquisa das universidades de Stanford a Harvard desenvolveram, independentemente, a espectroscopia de NMR; como resultados, as pesquisas de Edward Mills Purcell (1912-1997) de Harvard e Felix Bloch (1905-1983) de Stanford foram laureados com o Prêmio Novel de Física em 1952 por seus estudos no desenvolvimento de novas maneiras e métodos para medidas precisas do magnetismo nuclear (Dieguez *et al.*, 2018).

Os núcleos atômicos apresentam uma propriedade intrínseca denominada *spin* nuclear que faz com que os núcleos estivessem girando em torno de um eixo. Na realidade, qualquer núcleo atômico que possua massa ímpar, número atômico ímpar

(ou ambos), possui momento angular magnético e momento angular de *spin*; os núcleos mais comuns com essas características são ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{17}O e ^{19}F.

Se um núcleo atômico possui momento angular de *spin*, o número de estados de *spin* permitidos é determinado pelo seu número quântico de *spin* nuclear I. Para cada núcleo, o número de I é uma constante física e existem 2I+1 estados de *spin* permitidos variando de +I a – I (Pavia, Donald L. *et al.*, 2010). Como os estados de *spin* permitidos não possuem a mesma energia em um campo magnético aplicado (B_0), já que o núcleo pode ser considerado uma partícula carregada e qualquer carga que se move gera seu próprio campo magnético, o núcleo atômico tem um momento magnético (μ) que é ocasionado por sua carga e seu *spin*. O núcleo de ^{1}H pode ter dois estados de *spin*: em sentido horário $(+ {}^{1}/_{2})$ e em sentido anti-horário $(- {}^{1}/_{2})$, sendo que os μ de ambos apontam em direções opostas. Em B_0, todos os prótons têm seus μ alinhados sendo eles contra ou a favor de B_0 (Pavia, Donald L. *et al.*, 2010), essas duas situações estão descritas na Figura 7. Das duas orientações permitidas para o núcleo de ^{1}H, o estado de *spin* $+ {}^{1}/_{2}$ tem menor energia que o estado de *spin* $- {}^{1}/_{2}$, pois o primeiro caso está a favor de B_0, enquanto no segundo caso o estado de spin é contrário a B_0.

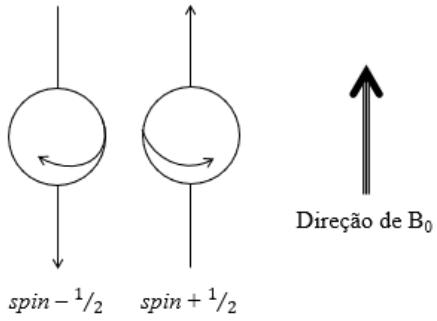


Figura 7 – Ambos os estados de *spin* permitidos para o núcleo de ^{1}H
Fonte: elaborado pela autora.

O fenômeno de ressonância magnética nuclear dá-se quando os núcleos alinhados com o campo aplicado são induzidos a absorver energia e, assim, trocam a sua orientação de *spin* em relação a B_0 (Pavia, Donald L. *et al.*, 2010), conforme esquematizado na Figura 8. Como a absorção de energia é um processo quantizado[3],

[3] Quantização: relativo à absorção de valores exatos de energia para transição entre subníveis energéticos.

a energia absorvida deve ser equivalente à diferença de energia entre os dois estados envolvidos, tendo em conta que a energia de um fóton é dada por E = hν.

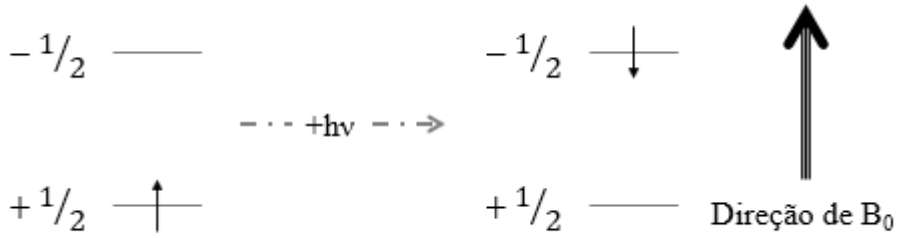


Figura 8 – Processo de ressonância para o núcleo de ^{1}H.
Fonte: elaborado pela autora.

A diferença de energia (ΔE) é uma função da intensidade do campo magnético aplicado (B_0), portanto, ΔE = $f(B_0)$. Quando maior a magnitude de B_0, maior será o valor da diferença entre os dois estados de *spin* permitidos. A amplitude dos níveis de energia também é dependente do núcleo atômico envolvido, pois cada núcleo possui uma diferente relação entre o momento magnético e o momento angular, uma vez que cada núcleo possui carga e massa diferentes; essa relação é conhecida como razão giromagnética (γ) e é constante para cada núcleo e determina a dependência da energia com o campo magnético. Como o momento angular do núcleo é quantizado em termos de h/2π, é possível reescrever a equação $\Delta E = \gamma \frac{h}{2\pi} B_0 = h\nu$ em função da frequência (ν) da energia absorvida como $\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$. Ao introduzir o valor da razão giromagnética do núcleo atômico na equação anterior e, tendo em vista a magnitude do campo magnético utilizado, é possível descobrir em qual frequência o núcleo do átomo estudado irá absorver energia (Pavia, D. L. *et al.*, 2010).

Os núcleos dos átomos entram em ressonância quando absorvem energia e realizam transições de *spin*; essas transições nucleares de *spin* ocorrem quando os núcleos atômicos absorvem energia e começam a mudar sua orientação no campo magnético aplicado, tem-se então o fenômeno de precessão, ou seja, o núcleo atômico girando sob influência de B_0, como pode ser visto na esquematização da Figura 9. Quando um campo magnético é aplicado, o núcleo do átomo começa a alterar sua direção sobre seu eixo de rotação com uma frequência angular ω que é proporcional à magnitude de B_0.

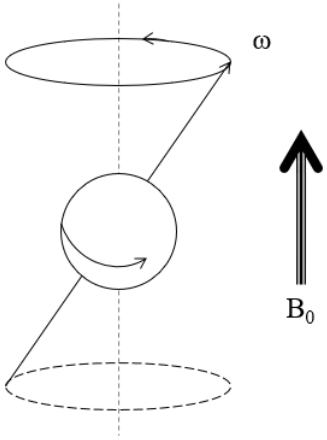


Figura 9 – A precessão do núcleo girando como resultado da influência de B_0.
Fonte: elaborado pela autora.

Uma vez que o núcleo apresenta carga, a precessão resulta em um campo elétrico oscilatório com frequência angular equivalente a ω. Caso as ondas eletromagnéticas de radiofrequência incidentes dessa mesma ω forem direcionadas ao núcleo atômico que está em processo de precessão, pode ocorrer absorção de energia por parte do núcleo. Ou seja, quando a frequência do componente do campo elétrico oscilatório da radiação incidente é igual à frequência do campo elétrico gerado pelo núcleo precessando, ambos os campos elétricos podem acoplar e assim será possível transferir a energia da radiação incidente para o núcleo do átomo, ocasionando uma alteração no *spin*. Esse fenômeno é denominado ressonância e então é possível afirmar que o núcleo entra em ressonância com a onda eletromagnética de radiofrequência que incide sobre ele (Pavia, Donald L. *et al.*, 2010).

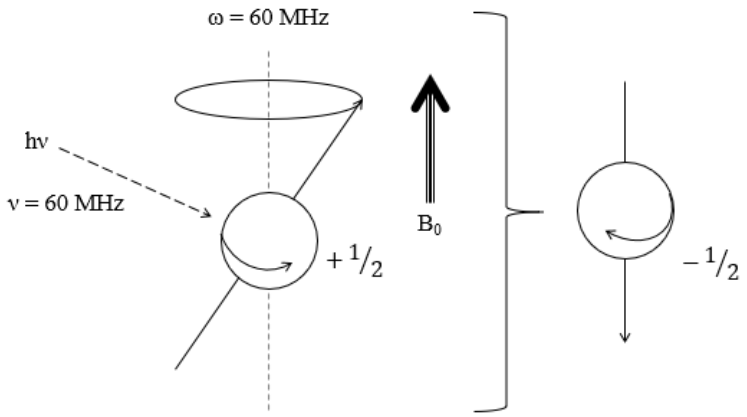
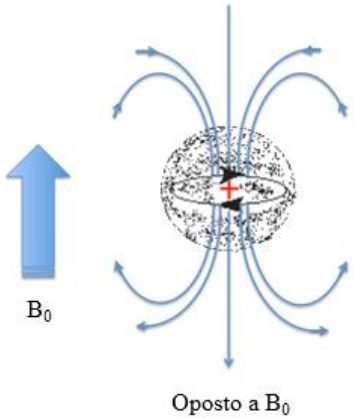


Figura 10 – Processo de ressonância magnética de um núcleo atômico quando $\boldsymbol{\nu = \omega}$.
Fonte: elaborado pela autora.

Em relação ao ^{1}H-NMR, são investigados os núcleos de hidrogênios na substância analisada e nem todos os núcleos de ^{1}H possuem a mesma ressonância na mesma frequência, isso deve-se ao fato de que os prótons em uma mesma molécula são rodeados por elétrons e estão em ambientes eletrônicos (e magnéticos) levemente distintos em relação aos demais. As densidades eletrônicas da camada de valência variam de um ^{1}H para outro. Diz-se que os prótons são blindados pelos elétrons em torno deles. Em B_0, os elétrons da camada de valência são forçados a circular, esse fenômeno ocasiona a corrente diamagnética local e ocasiona um campo magnético em direção oposta a B_0, esse fenômeno é denominado como blindagem



diamagnética ou anisotropia (Pavia, D. L. *et al.*, 2010) e está ilustrado na Figura 11.

Figura 11 – Blindagem diamagnética de um núcleo causada pela circulação de elétrons.
Fonte: adaptado de (Raja e Baron, 2019)

Em consequência da blindagem diamagnética, cada núcleo de ^{1}H é blindado contra B_0 com um a intensidade que dependerá da densidade eletrônica a sua volta; ou seja, quanto maior a densidade eletrônica em volta do núcleo, maior será o campo magnético induzido contrário a B_0.

Como o campo magnético contrário que blinda o núcleo diminui a intensidade que B_0 aplica no núcleo atômico, consequentemente, esse núcleo irá precessar com uma frequência mais baixa e é nessa frequência que o núcleo absorve radiação das ondas eletromagnéticas de radiofrequência. Cada ^{1}H de uma molécula encontra-se num ambiente químico ligeiramente diferente, logo, sua blindagem será ligeiramente diferente o que ocasiona em uma frequência de ressonância ligeiramente distinta.

Uma vez que as diferenças de frequências de ressonância são muito pequenas, elas são mensuradas para obtenção de resultados precisos; ao invés de mensurar essas pequenas diferenças de frequência é utilizada uma solução contendo um

padrão de referência e a substância a ser analisada. A frequência de ressonância de cada núcleo de ^{1}H é mensurada em relação à frequência de ressonância do material de referência, sendo assim, o que é medido é a diferença entre as frequências da substância de interesse e do material de referência. Um exemplo de material de referência bastante utilizado é o tetrametilsilano (TMS), representado na Figura 12, seus hidrogênios dos grupamentos metila são bastante blindados e quimicamente equivalentes; sendo assim, quando a medida de um composto é realizada, a ressonância de seus prótons é dada em função do deslocamento (em Hz) em relação aos prótons do TMS. Outro exemplo é o TSP, geralmente utilizada para solventes aquosos nas análises de NMR.

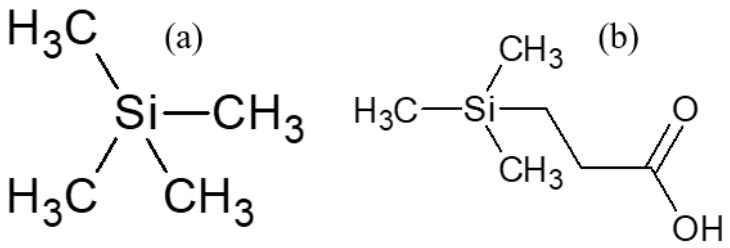


Figura 12 – Fórmula estrutural do **(a)** tetrametilsilano (TMS) e **(b)** Ácido trimetilsililpropanoico (TSP).
Fonte: elaborado pela autora.

Já que o deslocamento do núcleo atômico é dependente da intensidade de B_0, é usual expressar as medidas de ressonância em termos de deslocamento químico (δ) que é dado em partes por milhão (ppm) pois, para obter esse parâmetro divide-se o valor do deslocamento do núcleo (em Hz) pela frequência de operação do equipamento (em MHz). Sendo assim, δ expressa o quanto a ressonância do núcleo atômico é deslocada em relação ao padrão TMS e, por definição, $\delta_{\mathrm{TMS}} = 0{,}00\ \mathrm{ppm}$, bem como demais padrões de NMR (Pavia, D. L. *et al.*, 2010).

Uma importante observação a ser feita são os solventes utilizados no preparo de amostra para uma análise de NMR, principalmente quando o núcleo em questão é o ^{1}H. Para que o hidrogênio presente nos solventes não interfiram na análise da amostra, é necessário que eles sejam substituídos pelo isótopo ^{2}H, também conhecido como deutério (ou D). Como os átomos de D ressoam numa frequência diferente dos núcleos de ^{1}H, o solvente deuterados será “invisível” ao equipamento e somente os ^{1}H da substância analisada serão vistos no espectro de NMR.

A ressonância magnética nuclear é uma importante ferramenta de análise, uma vez que a partir dela é possível elucidar estruturas de moléculas orgânicas bastante

complexas (Tavares e Ferreira, 2006). No presente trabalho, a versatilidade da NMR será explorada ao utilizá-la como ferramenta analítica na autenticação e quantificação de amostras de café torrado e moído.

Quando se trata de fraude alimentar, a técnica de NMR mostra-se bastante promissora para análise de adulteração de uma série de matrizes, sejam elas alimentos ou mesmo bebidas (Hachem *et al.*, 2016; Hatzakis, 2019; Hong *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2015; Monakhova, Kuballa e Lachenmeier, 2013). Há inúmeros exemplos que podem ser citados dos mais variados tipos de matrizes, como a adulteração de amostras de azeite de oliva extra virgem com óleo vegetais de menor valor comercial, como avelã, amendoim, soja e girassol (Mannina *et al.*, 2009; Šmejkalová e Piccolo, 2010; Vigli *et al.*, 2003); a adulteração de suplementos alimentares de origem natural com inibidores de apetite sintéticos (Vaysse *et al.*, 2010); adulteração de açafrão com corante vermelho Sudan (Petrakis e Polissiou, 2017), adulteração de mel, cerveja e especiarias (Kuballa *et al.*, 2018; Lindner, Bermann e Gamarnik, 1996) ou mesmo autenticação de amostras de suco de laranja (Vogels *et al.*, 1996) e vinho tinto (Ferrari *et al.*, 2011).

Alguns estudos de NMR com amostras de café demostraram o potencial desta técnica para análise desse tipo de matriz. Dentre os estudos realizados é possível citar a quantificação da fração de café robusta em amostras de café arábica por meio do sinal marcador da presença de café conilon, 16-O-metilcafestol, em 3,165 ppm (Monakhova *et al.*, 2015), variação do grau de torra e sua influência nos principais compostos presentes no café desde o café cru, passando pelos graus de torra claro, médio e escuro (Wei *et al.*, 2012), determinação de origem do café de diferentes continentes: América, África e Ásia (Consonni, Cagliani e Cogliati, 2012), dentre outros estudos (Moura Ribeiro, de *et al.*, 2017; Tavares e Ferreira, 2006; Toci *et al.*, 2018). A técnica de ^{1}H-NMR foi utilizada para análises com equipamento de alta resolução em amostras de óleo de café (D'Amelio *et al.*, 2013) e a análise metabolômica do mesmo tipo de matriz (Kwon *et al.*, 2015) para identificação sinais dos constituintes desse tipo de amostra.

Aqui será descrito desenvolvimento de uma metodologia para autenticação de amostras de café torrado e moído com seis diferentes adulterantes (arroz, cascas de café, cevada, milho, soja e trigo) em dois graus de torra distintos (torra média e torra escura) utilizando a espectroscopia de ressonância magnética nuclear e ferramentas quimiométricas.

1.3.2 Espectroscopia Vibracional

A espectroscopia vibracional é um conjunto de técnicas não destrutivas que mensura a energia vibracional das ligaçõesem dado composto. Cada ligação química possui uma energia de vibração única e devido à singularidade dessa energia cada composto terá sua “impressão digital” (ou *fingerprint*, em inglês). Esse *fingerprint* pode ser utilizado para determinar estruturas de compostos, identificá-los, caracterizá-los ou mesmo para identificar impurezas.

Existem dois tipos de espectroscopia vibracional: a espectroscopia no infravermelho (IR) e a espectroscopia Raman. A principal diferença entre elas são os tipos de transições e vibrações medidas; geralmente, essas técnicas são usadas de forma conjunta para obter informações complementares sobre uma mesma amostra.

1.3.2.1 Espectroscopia no infravermelho

A radiação na região do infravermelho foi detectada por Fredereick William Hershel (1738-1822), um astrônomo e compositor alemão, em 1800 quando notou que filtros de diferentes cores deixavam passar quantidade diferentes de calor em suas observações da luz solar (Lovell, 1969). Todos os compostos que possuem ligações covalentes, sejam eles orgânicos ou inorgânicos, apresentam absorção na região do infravermelho do espectro eletromagnético (400 – 800 nm); a região vibracional do infravermelho (2,5 – 25 μm, correspondentes a 4000 – 400 cm^{-1}) é a qual será utilizada para a realização de medidas relacionadas à técnica de infravermelho como ferramenta espectroscópica, esta região está em destaque na Figura 13.

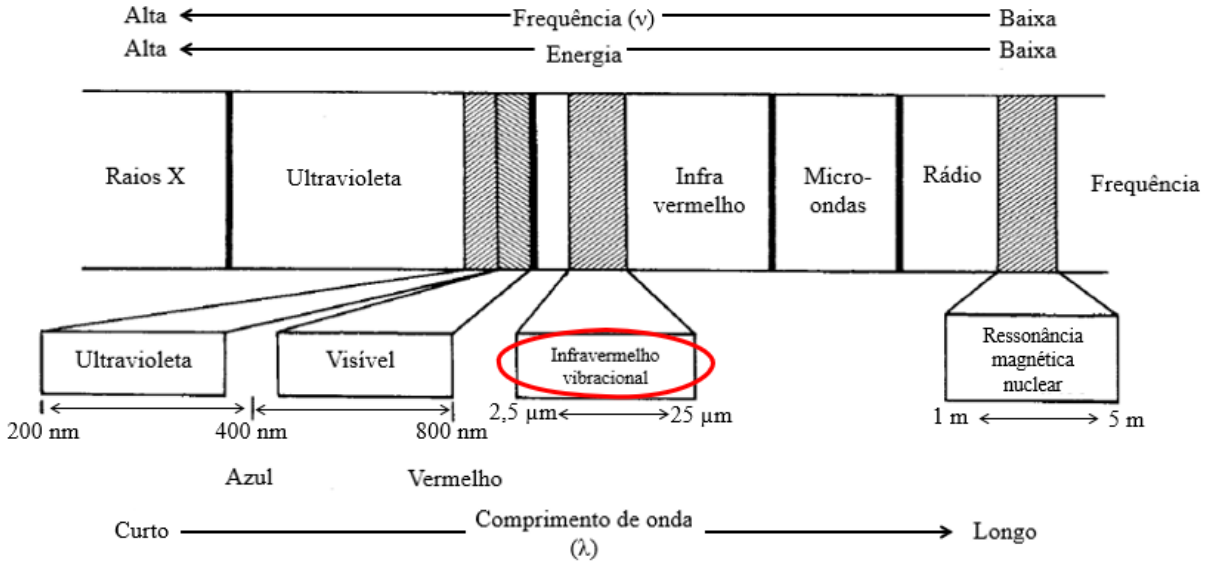


Figura 13 – Representação de parte do espectro eletromagnético mostrando a relação do infravermelho vibracional com outros tipos de radiação.
Fonte: adaptado de (Pavia *et al.*, 2014)

Como é possível observar na Figura 13, o comprimento de onda (λ) é inversamente proporcional à frequência (ν) de acordo com $\nu = c/\lambda$, com c sendo a velocidade da luz. No entanto, a energia é diretamente proporcional à frequência, de acordo com E = hν. No intuito de utilizar uma relação direta entre o comprimento de onda e a energia, nas medidas de infravermelho, utiliza-se o número de onda ($\bar{\nu}$), cuja unidade é dada em cm^{-1} e é facilmente convertido em frequência apenas pela multiplicação de $\bar{\nu}$ por c ($cm\ s^{-1}$). O número de onda é utilizado por ser diretamente proporcional à energia e, assim, tornar mais fácil a interpretação das informações adquiridas pelos equipamentos de infravermelho (Pavia, D. L. *et al.*, 2010).

Conforme ocorre em outros tipos de absorção de energia, as moléculas, quando absorvem radiação na região do infravermelho do espectro eletromagnético, sofrem excitação para atingir um estado de maior energia. Como em outros processos de absorção, a absorção de energia no infravermelho é um processo quantizado; a radiação nessa faixa de energia (8 – 40 kJ mol^{-1}) corresponde às frequências vibracionais de estiramento e dobramento das ligações, conforme ilustrado na Figura 14, de grande parte das moléculas covalentes.

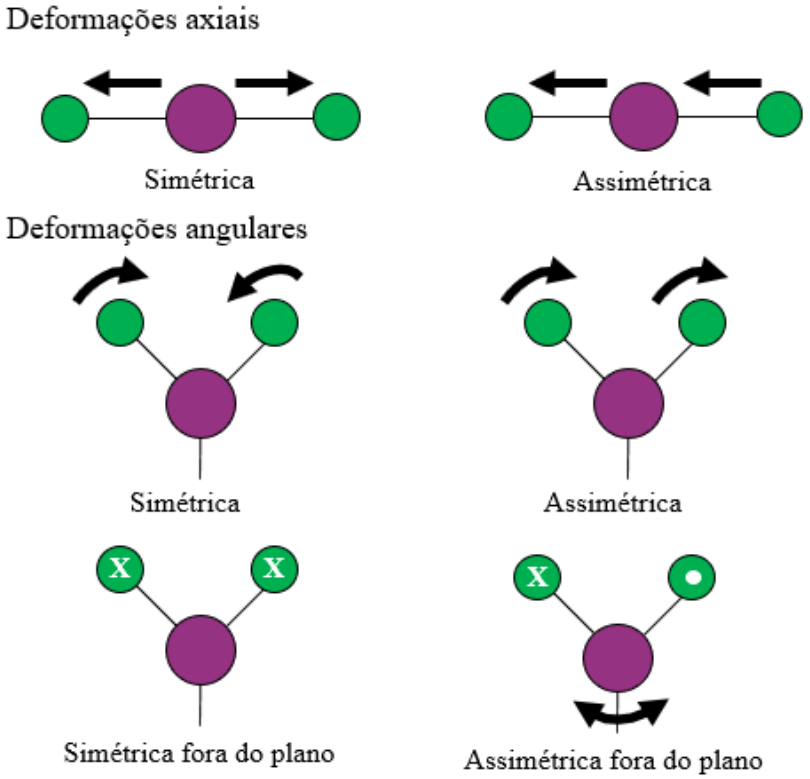


Figura 14 – Modos de vibração das moléculas no infravermelho. X é vetor que indica o movimento para dentro do campo e ● é o vetor indica o movimento para fora do campo.
Fonte: elaborado pela autora.

Há dois tipos de deformações em relação às moléculas no infravermelho: deformações axiais e angulares. As deformações axiais envolvem alterações no comprimento de ligação das moléculas e ocorrem na região do eixo dela; já as deformações angulares ocasionam alterações nos ângulos de ligação e correspondem ao movimento de um grupo de átomos em relação ao restante da molécula, sem que as posições relativas dos átomos dos grupos se alterem. Deformações podem também ser simétricas ou assimétricas; as deformações simétricas possuem menores valores de números de onda do que as deformações assimétricas e, consequentemente, envolvem menos energia também.

Apenas ligações que tem momento de dipolo que mudam em função do tempo são capazes de absorver radiação no infravermelho. Para transferir energia, uma ligação deve apresentar um dipolo elétrico que mude na mesma frequência da radiação que está sendo introduzida. O dipolo elétrico oscilante da ligação pode, então, acoplar-se com o campo eletromagnético da radiação incidente. Sendo assim, pode-se afirmar que a técnica de infravermelho é bastante sensível às moléculas e estruturas que possuem uma diferença de polaridade, porém, não apresenta boa resposta no caso de moléculas simétricas e apolares.

Na instrumentação clássica de infravermelho, tem-se que o aparelho dispersivo no espectro é registrado à medida que a frequência da radiação no infravermelho é alterada pela rotação da rede de difração, logo o espectro é obtido no domínio da frequência. Em equipamentos mais atuais, ao invés de registrar a variação da frequência, a radiação de infravermelho, emitida pela fonte (com todos os comprimentos de onda da faixa usada), é colimada por um espelho e, então, é introduzida em um interferômetro, formado por um divisor de feixes e dois espelhos, sendo um deles móvel e o outro fixo. A radiação que incide no divisor é separada em dois feixes que são novamente refletidos, um por cada espelho em direção ao divisor de feixes. Dessa forma, quando as duas partes voltam a se combinar ocorre o processo de interferência (Rangel *et al.*, 2017). Um esquema do equipamento pode ser observado na Figura 15. Depois de passar pela amostra, o sinal medido forma o interferograma que consiste num gráfico de intensidade em função do tempo e, por meio dele são obtidos resultados de difícil interpretação, mas, após a operação matemática de transformada de Fourier, o resultado é convertido em um gráfico de intensidade em função da frequência que é virtualmente idêntico aos resultados obtidos com os equipamentos dispersivos, porém, é utilizado um equipamento mais barato e mais rápido. Comumente refere-se à técnica de infravermelho como FTIR, ou seja, o infravermelho associado à transformada de Fourier.

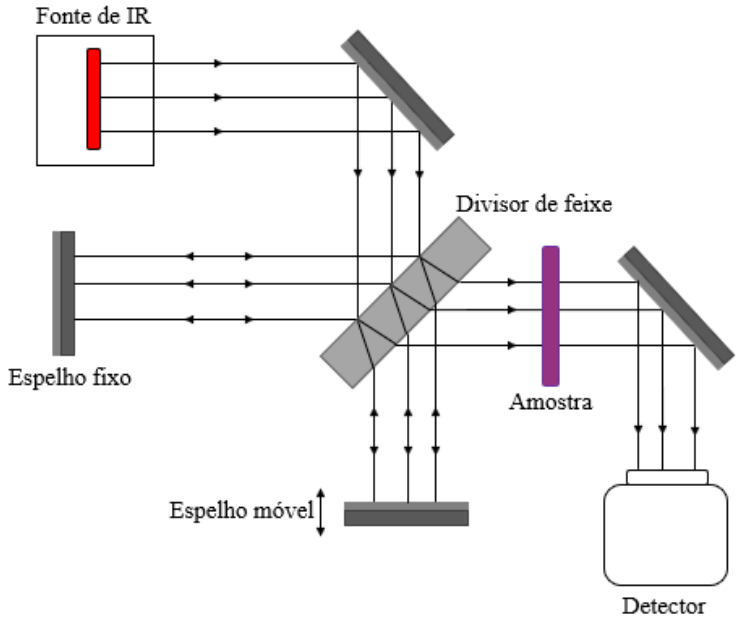


Figura 15 – Esquema do equipamento de infravermelho com interferômetro.
Fonte: elaborado pela autora.

Muitas das técnicas abordadas no presente trabalho utilizam-se do algoritmo matemático da transformada de Fourier para obtenção de seus espectros, desde a técnica de NMR, já mencionada anteriormente, como também as técnicas de NIR e Raman, a serem discutidas posteriormente. A transformada de Fourier é bastante popular pois, através dela, foi possível desenvolver equipamentos mais baratos e mais rápidos com a mesma eficiência, isso porque ela possibilita a conversão de dados obtidos no domínio do tempo em dados no domínio da frequência que, nada mais são do que os espectros associados a cada uma das citadas técnicas.

De acordo com o que foi anteriormente mencionado, a técnica de FTIR usa a transformada de Fourier para converter dados brutos de comprimentos de onda coletados pelo detector num espectro de infravermelho; sendo assim, o espectro é um produto das vibrações das ligações de uma molécula, essas vibrações são produzidas pela passagem do feixe de radiação de infravermelho através da amostra e então, a informação resultante é coletada sob a forma de um espectro.

Tradicionalmente amostras sólidas, para análises de FTIR, são misturadas a KBr para formação de uma pastilha feita com auxílio de uma prensa hidráulica. O brometo de potássio (KBr) é utilizado para o preparo de amostra pois possui uma ampla faixa espectral de trabalho e não apresenta sinais significativos na região do Mid-IR (Ferraro e Krishnan, 1989).

Outro método para amostragem no infravermelho é a ATR (reflexão total atenuada) que apresenta uma série de vantagens em relação à utilização da pastilha de KBr. O preparo de amostra é mais simples e menos laborioso, a variação espectral devido ao preparo de amostra é minimizada pois os efeitos relacionados ao preparo da pastilha de KBr, como o tamanho das partícula e grau de moagem, são eliminados (Thompson, Gauthier e Islam, 2009). Um feixe de luz na faixa do infravermelho passa através do cristal ATR (que pode ser ZnSe ou diamante) de maneira a refletir ao menos uma vez fora da superfície interna em contato com a amostra. Essa reflexão forma a onda evanescente que se estende para a amostra. A profundidade de penetração na amostra é tipicamente entre 0,5 e 2 µm. O número de reflexões pode variar de acordo com o ângulo de incidência. O feixe é então coletado por um detector quando sai do cristal (Figura 16). A maioria dos espectrômetros infravermelhos modernos pode ser convertida para caracterizar amostras por meio de ATR. Ao invés de misturar a amostra com KBr como no FTIR de transmissão, ela é colocada diretamente na placa de amostragem do dispositivo sobre a janela ótica com o cristal ZnSe (ou diamante) (Subramanian e Rodriguez-Saona, 2009).

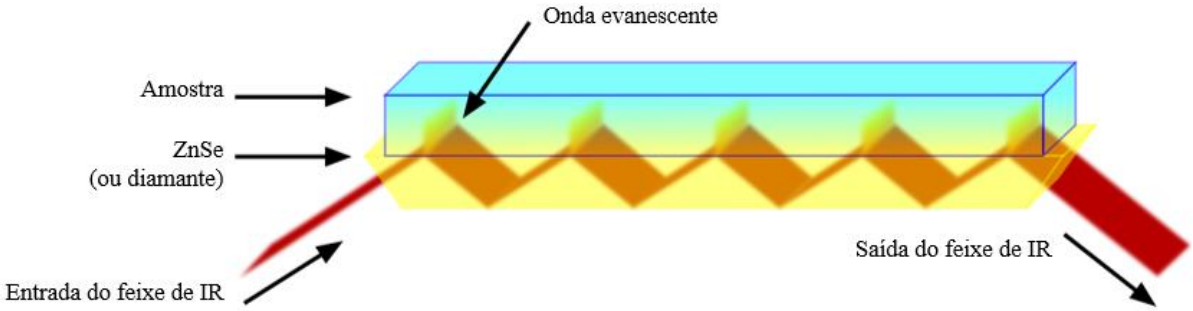


Figura 16 – Representação do fenômeno da ATR em análises de IR.
Fonte: adaptado de https://rtilab.com/techniques/ftir-analysis/

Um terceiro método utilizado para a amostragem na técnica de IR é conhecido como reflectância difusa para infravermelho com transformada de Fourier ou DRIFT. A técnica de preparação DRIFT é comumente usada em química para preparar amostras de pó e sólidos. Quando as amostras são penetradas com um feixe de radiação na faixa do infravermelho, há dois tipos de energia refletida gerada: refletância especular e difusa. A refletância especular ocorre na superfície da amostra e não possui interação de absorção com a amostra, enquanto a refletância difusa resulta da penetração na amostra interagindo com as partículas da amostra (Milani *et al.*, 2017), conforme ilustrado na Figura 17.

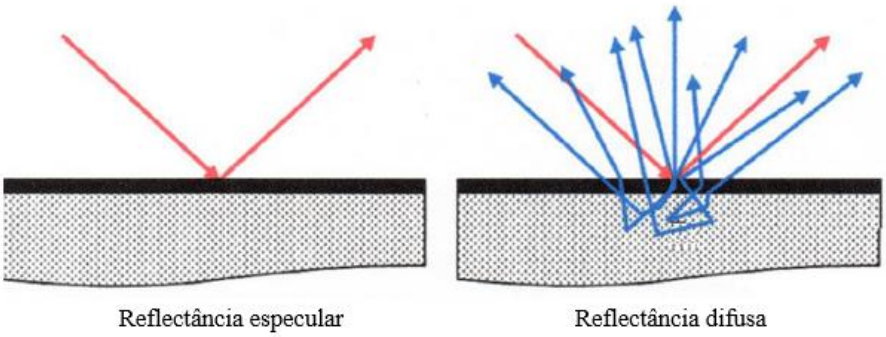


Figura 17 – Representação dos fenômenos de reflectância especular e reflectância difusa.
Fonte: adaptado de (Luiz *et al.*, 2015)

A refletância difusa contém as informações espectrais da absorção no infravermelho. O acessório DRIFT otimiza a coleta da energia refletida de maneira difusa ao mesmo tempo em que minimiza a energia refletida especular. A técnica de preparação DRIFT ainda exige que as amostras sejam misturadas com KBr, porém, evita a necessidade formação de uma pastilha com uma prensa hidráulica. Os resultados de DRIFT podem ser afetados adversamente por diferenças no tamanho das partículas e comprimentos de onda IR incidentes. Para compensar esses problemas, as amostras são misturadas com o KBr para obtenção dos espectros DRIFT precisos na região de 1200 – 400 cm^{-1} da região do Mid-IR. A técnica DRIFT pode resultar em maior resolução dos espectros e menor interferência das bandas de água em comparação com as técnicas de transmissão, na qual a amostra é preparada somente com o KBr (Haberhauer e Gerzabek, 1999; Subramanian e Rodriguez-Saona, 2009).

Dada a versatilidade da técnica de FTIR, sua utilização para detecção de fraudes alimentares é bastante abrangente, gerando metodologias confiáveis para os mais diversos tipos de matrizes (Rodriguez-Saona e Allendorf, 2011). A técnica de Mid-FTIR já foi descrita para autenticação de amostras de óleo de abacate com óleos vegetais de menor valor comercial, como girassol, soja e canola (Quiñones-Islas *et al.*, 2013); autenticação de amostras de suco concentrado de romã com suco concentrado de uva (Vardin *et al.*, 2008); análise de possíveis adulterantes em chocolate e seus subprodutos com gordura (Che Man *et al.*, 2005); a adulteração de almôndegas de carne bovina com carne de porco (Rohman e Che, 2011); bem como a adulteração de azeite de oliva extravirgem com óleo de palma (Rohman e Man, 2010), dentre outros exemplos em diferentes matrizes.

A análise de amostras de café torrado utilizando técnicas de FTIR foi realizada para determinação de múltiplos adulterantes com DRIFTS por meio da observação de sinais característicos das amostras de café que permitiam diferenciá-las dos adulterantes analisados utilizando ferramentas quimiométricas de PCA e LDA (Reis, Franca e Oliveira, 2013), análise do grau de torra por meio da análise do café coado utilizando ATR-FTIR, por meio da região entre 1800-1600 cm^{-1} responsável pelos sabores característicos de cada grau de torra estudado (Lyman *et al.*, 2003); determinação de ácido clorogênico e capacidade antioxidante dos grãos de café (Liang *et al.*, 2016) e estimação do teor de cafeína em amostras de cafés e chás (Paradkar e Irudayaraj, 2002). Em relação ao óleo de café verde há análise da capacidade antioxidante e comparação desses perfis em amostras de óleo de café verde e óleo de café torrado durante o aquecimento (Raba *et al.*, 2015).

No presente trabalho, a técnica de infravermelho será utilizada para análise de amostras de óleo de café verde e amostras de café torrado e moído para auxiliar na autenticação e determinação dos respectivos perfis, associado ao uso de ferramentas quimiométricas.

1.3.2.2 Espectroscopia no infravermelho próximo

A espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) é um tipo de espectroscopia vibracional cuja faixa compreende os comprimentos de onda variando de 750 a 2500 nm, que correspondem a 13300 – 400 cm^{-1}. Essa faixa de energia é superior àquela necessária para excitar a molécula para estados vibracionais de maior energia, porém, ainda é inferior a valores necessários para ocasionar excitação dos elétrons da molécula (Pasquini, 2003).

A técnica de NIR apresenta uma série de vantagens, dentre elas análises não destrutivas, não invasivas, rapidez, requer um preparo de amostra simples, é facilmente aplicável a equipamentos portáteis para análise *in situ* bem como para análise *online* e possui uma aplicação bastante ampla, sendo considerada praticamente universal, pois é sensível às ligações C-H, S-H, N-H ou O-H.

Enquanto a espectroscopia no infravermelho se desenvolve desde o século XIX, os avanços da técnica de NIR ocorreram a partir da década de 1980, juntamente com os avanços de técnicas quimiométricas que possibilitam a melhor interpretação dos resultados obtidos.

Para mensurar o nível da interação eletromagnética com átomos e moléculas, é necessário ter em vista a energia dos fótons (E = hυ) constituintes da radiação; esses fótons podem excitar as vibrações das ligações químicas das moléculas da amostra a ser analisada. As transições energéticas vibracionais fundamentais são correspondentes à região do infravermelho médio e os *overtones* (sobretons) e combinações dessas transições correspondem à região de infravermelho próximo.

Inicialmente, para entender o conceito de *overtone*, deve-se ter em mente o conceito do oscilador harmônico, uma vez que a ligação química entre dois átomos vibra em uma frequência característica semelhante a uma mola que pode ser representada pelo modelo do oscilador harmônico, representado esquematicamente pela Figura 18. No modelo do oscilador harmônio diatômico, dois átomos de massas m_1 e m_2, estão ligados por uma mola perfeitamente elástica; ambos os átomos oscilam em torno da distância de equilíbrio e a expressão da energia dos níveis vibracionais é descrita por $E_\upsilon = h\upsilon\left(\upsilon + {}^{1}/_{2}\right)$, na qual υ é o número quântico vibracional (υ = 0, 1, 2, 3,...) e ν é a frequência do oscilador harmônico; de acordo com este modelo, os níveis de energia de um oscilador estão igualmente espaçados, sendo a diferença entre eles igual a hυ (Pasquini, 2003).

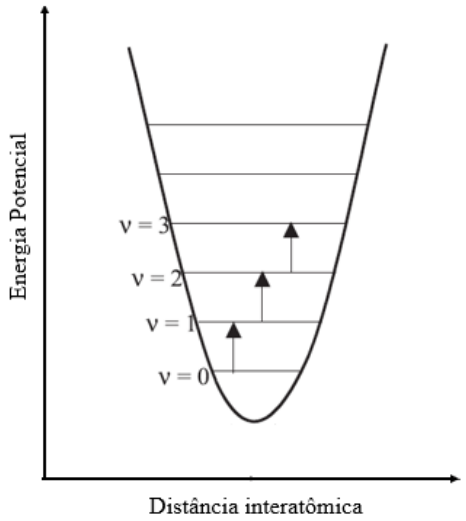


Figura 18 – Representação esquemática do modelo de oscilar harmônico ideal.
Fonte: adaptado de (Pasquini, 2003)

Os *overtones* na espectroscopia de NIR são formados por bandas de combinação, que são excitações dos elétrons aos níveis de energia maiores. O espectro do NIR contém até 4 *overtones*. Em termos do número quântico vibracional (ν) os *overtones* assumem as transições de ν = 0 para ν = 2 no primeiro *overtone*, ν = 0 para ν= 3 no segundo *overtone*, e ν = 0 para ν = 4 no terceiro *overtone*, o quarto

overtone é geralmente ignorado por ser pouco intenso (Subramanian e Rodriguez-Saona, 2009). Geralmente os espectros de NIR são bastante complexos, sendo difícil a atribuição precisa de suas bandas, tal qual é feito para a espectrometria do infravermelho médio. Por isso, geralmente a utilização da técnica de NIR está associada ao uso de ferramentas quimiométricas que são capazes de extrair informações e facilitar a interpretação dos dados de NIR. A utilização de diferentes ferramentas quimiométricas associada a técnicas espectroscópicas será discutida posteriormente.

O equipamento de infravermelho próximo com transformada de Fourier é bastante semelhante ao equipamento de FTIR e é composto de basicamente de uma fonte de emissão infravermelha, divisor de feixe e espelhos (móveis e fixos).

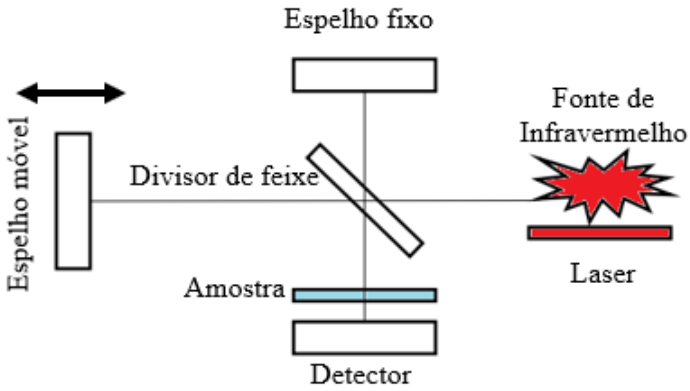


Figura 19 – Esquematização do equipamento de espectroscopia de NIR.
Fonte: adaptado de (Catelani, 2017).

As aplicações da espectroscopia de NIR às análises de fraudes alimentares são diversas (Downey, 1996), alguns exemplos que podem ser citados são da utilização de NIR na autenticação da origem botânica de amostras de mel (Ruoff *et al.*, 2006), autenticação de diversos tipos de bebidas alcoólicas, não alcoólicas e laticínios (Wang *et al.*, 2017); autenticação de amostras de leite orgânico (Liu *et al.*, 2018); autenticação de filé de peixe (Alamprese e Casiraghi, 2015); controle de qualidade e autenticação de pimentões (Sánchez *et al.*, 2019) e amostras de chá preto (Firmani *et al.*, 2019).

Em relação às análise de café utilizando a espectroscopia de NIR há trabalhos relatando a utilização da técnica para determinação do teor de açúcares em grãos de café verde utilizando a ferramenta quimiométrica de regressão dos mínimos quadrados por meio da determinação do teor de proteínas totais (Morgano *et al.*,

2005); avaliação da origem geográfica de grãos de café arábica (Marquetti *et al.*, 2016); monitoramento online do processo de torra do café (Catelani *et al.*, 2018); quantificação de grão de café defeituosos por meio da análise quimiométrica de partes dos espectros de grãos de café saudáveis e grãos de café impróprios para o consumo (Craig *et al.*, 2015) bem como a quantificação de ocratoxina A em amostras de café cru (Taradolsirithitikul, Sirisomboon e Dachoupakan Sirisomboon, 2017).

No presente trabalho, pretende-se avaliar a adulteração em amostras de café torrado e moído por meio de equipamento portátil de espectroscopia no infravermelho próximo sem preparo de amostras utilizando quatro tipos diferentes de adulterantes: soja, cevada, milho e cascas de café.

1.3.2.3 Espectroscopia Raman

A descoberta do chamado “espalhamento Raman” foi feita pelo físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman (1888 – 1970) em 1923 e trata-se do fenômeno de espalhamento inelástico da luz através da matéria; devido à sua descoberta C. V. Raman foi laureado em 1930 com o prêmio Nobel de Física. A técnica de Raman é um tipo de espectroscopia vibracional que faz uso da interação da luz com a matéria para determinar a constituição e/ou composição de amostra; enquanto na análise da espectroscopia no infravermelho utiliza o processo de absorção da radiação incidente, na espectroscopia Raman, faz-se uso do espalhamento da radiação incidente para realização das medidas.

O processo de difusão Raman, conforme descrito pela mecânica quântica, ocorre quando os fótons interagem com uma molécula que pode evoluir para um estado virtual de maior energia. A partir desse estado de maior energia, podem ocorrer diferentes resultados. Um desses resultados seria o relaxamento da molécula até um nível de energia vibracional que é diferente do nível de energia do seu estado inicial, produzindo um fóton de energia diferente. A diferença entre a energia do fóton incidente e a energia do fóton propagado é chamada de efeito Raman. Quando a luz interage com a matéria, a maior parte dos fótons dispersos ou propagados possui a mesma energia dos fótons incidentes, esse fenômeno é conhecido como espalhamento elástico ou espalhamento Rayleigh, como pode ser observado na Figura 20. Contudo cerca de 1 a cada 10^7 fótons é propagado com energia diferente daquela do fóton incidente, a esse efeito dá-se o nome de espalhamento inelástico

que pode ser do tipo Stokes ou anti-Stokes; quando a mudança na energia do fóton propagado é menor que a energia do fóton incidente, a espalhamento inelástico é chamado de Stokes. Algumas moléculas podem começar em um estado de excitação vibracional e, quando passam ao estado virtual de energia elevada, elas podem relaxar até um estado final de energia que é menor que a do estado de excitação inicial e esse espalhamento inelástico é chamado de anti-Stokes (Ferraro e Nakamoto, 2003), conforme exemplificado no diagrama da Figura 20:

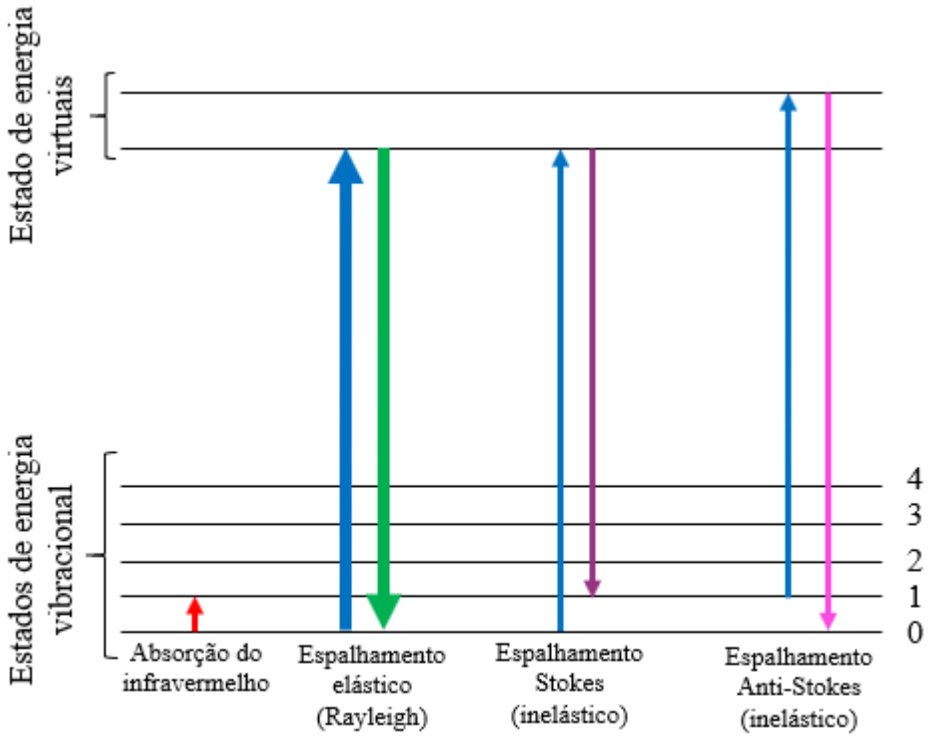


Figura 20 – Diagrama de níveis de energia com os estados de energia na espectroscopia Raman.
Fonte: elaborado pela autora.

A fonte de emissão de radiação no caso da espectroscopia Raman é um feixe de luz monocromática, geralmente um laser que, ao atingir a amostra, é espalhado por ela gerando radiação de mesma energia ou de energia diferente daquela que incide, o espalhamento inelástico da radiação resultante possibilita a obtenção de muitas informações relevantes sobre a composição química da amostra em questão e o espectro resultante equipare-se a uma impressão digital da amostra estudada, pois cada amostra espalha a energia incidente de uma maneira singular (Ferraro e Nakamoto, 2003).

O espectrômetro de Raman constitui-se basicamente em uma fonte de emissão de radiação, que geralmente é um laser, um filtro para coletar a radiação espalhada,

uma rede de difração e o detector, como é possível observar no esquema da Figura 21.

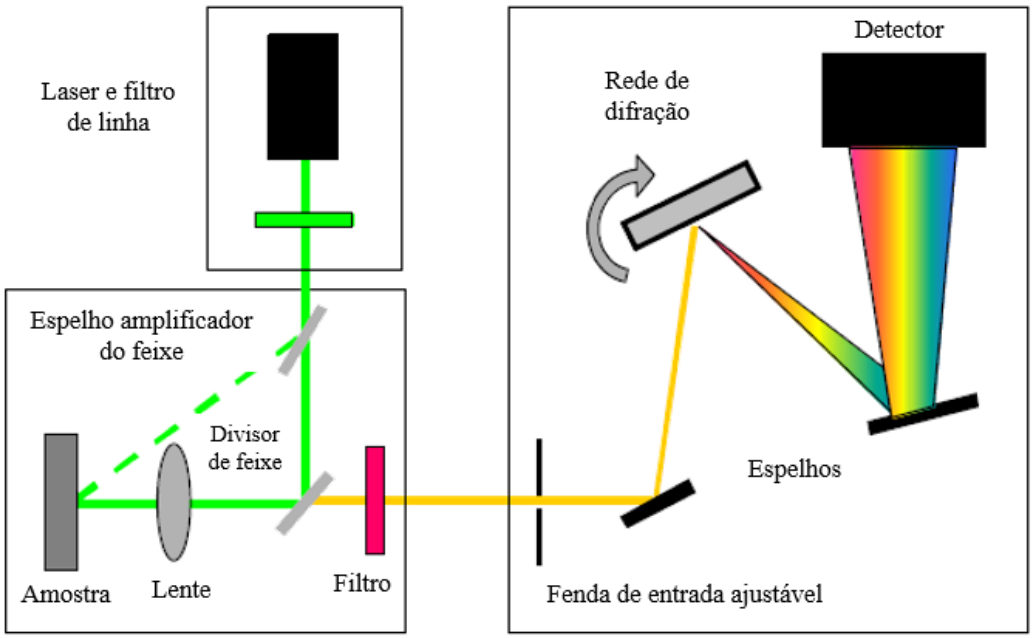


Figura 21 – Esquema do espectrômetro Raman.
Fonte: adaptado de https://www.sas.upenn.edu/crulli/TheRamanSpectrophotometer.html

Conforme afirmado anteriormente, a técnica de Raman é considerada complementar à técnica de infravermelho; isso ocorre porque enquanto o infravermelho possui boa resposta à grupamentos polares e moléculas assimétricas, a espectroscopia Raman é bastante sensível às moléculas apolares e cíclicas, que não apresentam boa resposta na espectroscopia no infravermelho. Isso ocorre porque na técnica de Raman mensura as mudanças na polarizabilidade das ligações moleculares, enquanto o infravermelho investiga alterações nos momentos dipolares das moléculas. As ligações moleculares têm transições de energia específicas nas quais ocorre uma mudança na polarizabilidade, dando origem aos modos ativos em Raman. As moléculas que contêm ligações entre átomos homonucleares sofrem uma mudança na polarizabilidade quando fótons interagem com elas e resultam nas bandas espectrais no espectro de Raman, porém, essas mesmas bandas seriam difíceis de visualizar no espectro de infravermelho (Ferraro e Nakamoto, 2003).

Os espectros de Raman são praticamente um *fingerprint* da amostra analisada, sendo assim, essa técnica apresenta grandes vantagens desejáveis à autenticação de amostras alimentares, como sensibilidade, pouca ou nenhuma necessidade no preparo de amostra, rapidez e analises não invasivas ou destrutivas.

O emprego da espectroscopia Raman na identificação de adulterantes e autenticação de amostras alimentares evidencia a versatilidade dessa ferramenta analítica (Danezis, Tsagkaris, Brusic, *et al.*, 2016; Danezis, Tsagkaris, Camin, *et al.*, 2016), como por exemplo na autenticação de amostras de azeites de oliva extravirgem (Wang *et al.*, 2016; Zou *et al.*, 2009) ou óleo vegetais (Park *et al.*, 2017), autenticação da origem geográfica de arroz (Sha *et al.*, 2019); autenticação da origem botânica de amostras de mel (Oroian e Ropciuc, 2018), autenticação de óleo de peixe como suplemento alimentar (Ellis *et al.*, 2005); autenticação de amostras de pisco em relação à origem das uvas (Rathmell, Rodriguez-saona e Meneseovglu, 2018) e a autenticação de queijo e derivados (Sowoidnich e Kronfeldt, 2016).

Em relação às análises de amostras de café utilizando a espectroscopia Raman, alguns exemplos são a utilização da técnica para o monitoramento da qualidade dos grãos de café crus durante a estocagem em até 18 meses utilizando diferentes materiais de embalagem, sendo que a espectroscopia Raman mostrou-se mais sensível que a análise sensorial às variações na composição dos grãos de café (Abreu *et al.*, 2019), diferenciação de genótipos de café arábica, um da variedade Novo Mundo e três da variedade Bourbon (Figueiredo *et al.*, 2019) também para o controle de qualidade do café utilizando lasers de diferentes comprimentos de onda e também variando a potência desses, porém, foi necessário extrair a fração oleosa das amostras de café analisadas pois, devido ao laser, ocorre a degradação das amostras de café (Dias e Yeretzian, 2016).

No presente trabalho, a espectroscopia Raman foi utilizada para autenticação frente a seis tipos diferentes de adulterantes (óleos de chia, canola, milho, gergelim, soja e girassol) em amostras comerciais de óleo de café verde.

1.3.3 Quimiometria

Quimiometria é uma área da Química que faz uso de ferramentas matemáticas e estatísticas para planejar e/ou determinar condições ideias de análise e de experimentos e extrair o máximo de informações dos dados químicos obtidos experimentalmente. A quimiometria surgiu e se popularizou à medida que equipamentos analíticos se modernizaram e passaram a gerar uma grande quantidade de dados que precisavam ser analisados de maneira mais eficiente; dessa forma, a quimiometria, aliada às técnicas analíticas convencionais, possibilita, de

forma rápida e eficiente, a análise e tratamento de um grande volume de dados.

Atualmente há uma série de ferramentas analíticas quimiométricas disponíveis para os mais distintos conjunto de dados e com as mais diferentes finalidades. Há três subconjuntos de ferramentas quimiométricas: análise exploratória, métodos de regressão e calibração e métodos de classificação (ou métodos supervisionados para reconhecimento de padrões).

No presente trabalho duas ferramentas quimiométricas foram exploradas para o tratamento dos dados experimentais referente às análises de amostras de café torrado e moído e óleo de café verde, utilizando as técnicas de ^{1}H-NMR e as espectroscopias vibracionais de infravermelho (médio e próximo) e Raman.

1.3.3.1 Análise dos componentes principais (PCA)

A análise dos componentes principais é uma ferramenta quimiométrica utilizada para análise exploratória multivariada de uma grande quantidade de dados analíticos. Essa ferramenta reduz a dimensionalidade do conjunto de dados, resultando em combinações lineares das variáveis independentes originais sem afetar a relação entre as amostras analisadas. A formação dos componentes principais, também chamados de PCs, resulta em um arranjo ortogonal que representa uma quantidade máxima de variáveis e cada componente principal é formado pela combinação linear das variáveis originais.

Na PCA, a matriz original de dados (X) é transformada num produto de duas matrizes, menores que a primeira de acordo com: $X = TP^t + E$, na qual T é a matriz de *scores* que *são* as coordenadas das amostras recalculadas em um novo sistema de eixos das PCs e representam a variância das amostras; P^t é a matriz transposta dos *loadings* que são coeficientes da combinação linear, representando a importância de cada variável no sistema e E é a matriz de erro (Ferreira, 2015; Ferreira *et al.*, 1999; Silva, da *et al.*, 2019).

1.3.3.2 Modelagem Independente por Analogia de Classe (SIMCA)

A ferramenta analítica também conhecida como SIMCA (*Soft Independent Model of Class Analogy*) que, ao contrário da PCA, é uma análise não supervisionada, ou seja, em SIMCA é necessário atribuir classes às amostras analisadas e uma PCA

é feita em cada classe do conjunto de dados, então certo número de PCs são selecionados para representar apropriadamente a maior parte da variância dentro de cada classe. Sendo assim, um modelo de componentes principais é usado para representar cada classe no conjunto de dados. O número de PCs selecionados em cada classe geralmente varia de uma classe para outra e é fundamental determinar o número correto de PCs pois, caso haja poucas PCs para representar o conjunto de dados, pode haver distorção das informações contidas no modelo de classes; se o número de PCs for maior do que o necessário, pode ocorrer diminuição da razão sinal/ruído (Ferreira, 2015).

Para garantir que o número correto de PCs sejam utilizados no modelo de SIMCA é necessário realizar um procedimento conhecido como validação cruzada, no qual parte dos dados experimentais são omitidos do modelo e então são comparados com os valores “oficiais” (que não forma retirados), esse processo é repetido até que todos os dados experimentais tenham sido excluídos uma vez do modelo. Dessa maneira, a validação cruzada pode ser utilizada para descrever os dados do modelo SIMCA e assegurar um alto valor para a razão sinal/ruído. A variância explicada por SIMCA é dita variância modelada e descreve o sinal analítico, enquanto o ruído é descrito pela variância residual (que não é levada em consideração no modelo) (Ferreira, 2015).

Há uma série de vantagens associadas a SIMCA que não se encontram em outras ferramentas de modelagem quimiométricas (como KNN ou LDA), como, por exemplo, o mapeamento dos dados por componentes principais o que, para amostras que são descritas por um espectro ou cromatogramas (elevado número de variáveis) possuem seus dados associados descritos numa menor dimensão para classificação na SIMCA. Quando uma amostra é semelhante a outra pertencente a mesma classe, elas estarão próximas no gráfico de PCs definido pelas amostras de uma mesma classe (Ferreira, 2015).

Outra vantagem apresentada é o fato de caso haja uma amostra “desconhecida”, ou seja, que não pertence e nenhuma das classes previamente determinadas no modelo, essas amostras somente será associada a uma das classes se possuir uma alta porcentagem de similaridade. Do contrário, se a variância residual for maior do que o limite pré-estabelecido para todas as classes modeladas no conjunto de dados essa amostra desconhecida não será designada a nenhuma das classes, podendo ser considerada como uma amostra anômala (*outlier*) ou

pertencente a uma classe não representada no conjunto de dados (Ferreira, 2015).

Também, o modelo SIMCA possui ferramentas de diagnóstico responsáveis por avaliar a qualidade dos dados utilizados para construção do modelo, como a “capacidade de modelagem” que descreve o quão bem uma variável auxilia as PCs a explicarem a variação do modelo SIMCA; também há a “capacidade discriminatória” que descreve o quão bem uma variável auxilia as PCs a classificarem as amostras no conjunto de dados, de maneira análoga ao gráfico de *loadings* no caso da PCA. Variáveis que possuem valores baixos das capacidades de modelagem e discriminatória geralmente são excluídas do modelo por contribuírem unicamente com o aumento do ruído (Ferreira, 2015).

1.3.4 Cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (GC-FID)

A cromatografia gasosa separa os componentes de uma amostra de acordo com seus respectivos pontos de ebulição, desde que esses componentes evaporem até 300°C. A amostra é injetada na coluna capilar revestida por um filme finamente depositado (fase estacionária) e passa através do cromatógrafo com auxílio de um gás de arraste inerte de elevada pureza (fase móvel). Para que uma amostra seja compatível com análises de cromatografia gasosa é necessário que ela seja volátil ou semi-volátil, que possua estabilidade térmica e que seja ao menos parcialmente solúvel no gás de arraste. Por vezes, os compostos de interesse não apresentam essas características, então é necessário realizar um processo de derivatização no qual, por meio de uma reação química apropriada, os analitos de interesse tornam-se compatíveis com análises em cromatografia gasosa (Poole, 2012).

A cromatografia gasosa é bastante versátil e compatível com diversos detectores com diferentes finalidades. No presente trabalho, foi utilizado o detector por ionização em chama que responde à grande maioria das substâncias orgânicas, sendo bastante sensível à presença de hidrocarbonetos e compostos orgânicos voláteis de uma maneira geral. Na Figura 22, é possível visualizar um esquema do equipamento de GC-FID.

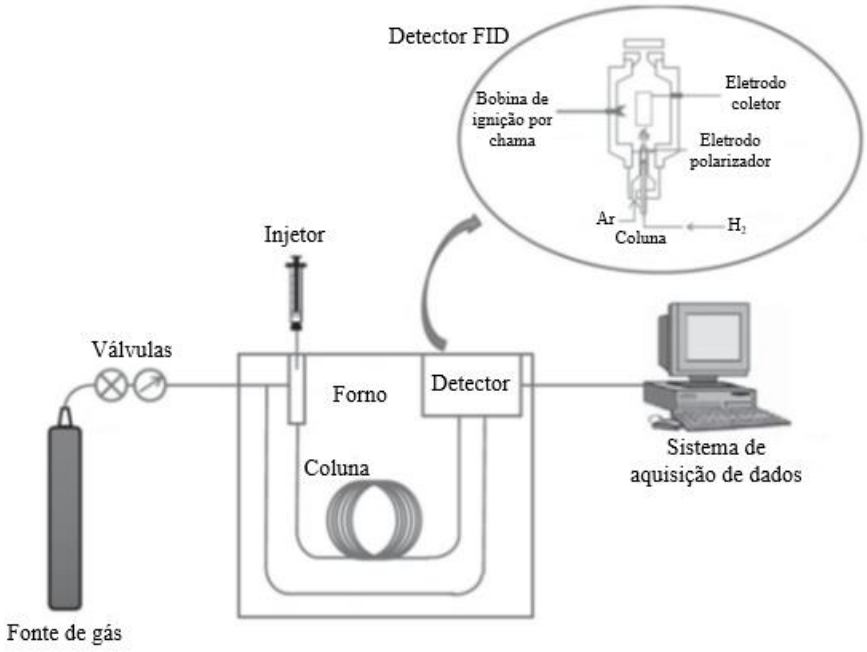


Figura 22 – Diagrama de um equipamento de cromatografia gasosa com detector por ionização em chama.
Fonte: adaptado de (Soria *et al.*, 2014)

Em um FID, a amostra sofre combustão em uma chama de H_2/ar sintético. Os íons e elétrons livres são formados na chama e as partículas carregadas produzem um fluxo de corrente mensurável no espaço entre dois eletrodos no detector. O fluxo de corrente resultante é mais forte que o sinal produzido pelo gás portador puro e somente pela chama do gás combustível. Esse diferencial de sinal fornece informações sobre a amostra, a corrente é proporcional à informação que depende da composição da amostra separada (Poole, 2012). Na Figura 23 é possível observar um desenho esquemático do funcionamento do detecto por ionização em chama.

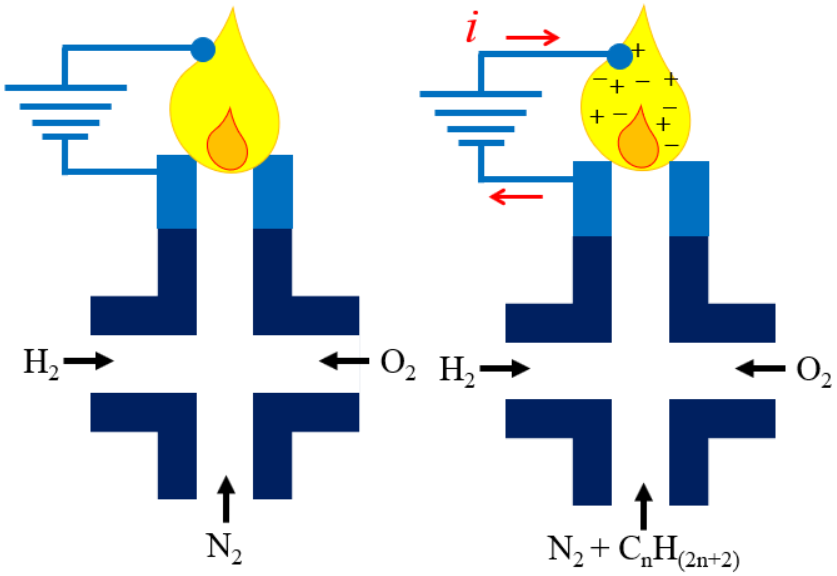


Figura 23 – Esquematização do funcionamento de um detector de ionização em chama.
Fonte: elabora pela autora.

O detector de ionização em chama (FID) utilizado é praticamente universal, uma vez que responde à presença de ligações entre carbono e hidrogênio presentes nas amostras (Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, 2006). O FID é sensível ao fluxo de massa e a ionização química que ocorre no detector dá-se conforme: $CH + O \rightarrow CHO + e^-$, como a espécie CHO é instável reage rapidamente com a água, de acordo com: $CHO + H_2O \rightarrow H_3O^+ + CO$ (Visentainer, 2012). A reação anterior ocorre para 100000 átomos de carbonos introduzidos na chama do detector, dessa maneira, é possível afirmar que a magnitude do sinal gerado pelo FID é proporcional ao número de átomos de carbono e hidrogênio presentes na amostra analisada (Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, 2006; Visentainer, 2012).

No presente trabalho a técnica de GC-FID foi utilizada com duas finalidades. Primeiramente, para confirmação da composição de ácidos graxos de amostras de óleo de café verde e seus possíveis adulterantes: óleos de girassol, soja, gergelim, milho, canola e chia. Também foi realizado estudo da decomposição da fração de triacilgliceróis em ácidos graxos livres de diferentes anos nas amostras de óleo de café verde.

2 Objetivos

Este projeto tem como objetivo geral o desenvolvimento de metodologias para a determinação e quantificação de adulterantes presentes em amostras de café torrado e óleo de café verde.

Os objetivos específicos do trabalho são:

- Estabelecer metodologia para identificação e quantificação de adulterantes em café torrado por ^{1}H-NMR;
- Determinar o perfil vibracional de café torrado e moído e do óleo de café verde;
- Utilizar quimiometria para interpretar os dados obtidos nas análises realizadas;
- Utilizar equipamentos portáteis e de fácil manuseio para realização das análises;
- Utilizar metodologias mais confiáveis e robustas do que aquelas usualmente utilizadas;
- Utilizar cromatografia gasosa para obtenção o perfil de ácidos graxos e avaliação de adulteração em óleos de café verde;
- Avaliar a conversão da fração de triacilgliceróis em ácidos graxos livres de diferentes anos em amostras de óleo de café verde de mesma origem.

3 Parte experimental

A seguir serão descritos os procedimentos experimentais para determinação de adulterantes em amostras de café torrado com as técnicas de ^{1}H-NMR, Mid-IR e NIR e determinação de adulterantes em amostras de óleo de café verde por meio das técnicas de Raman, Mid-IR e GC-FID.

3.1 Equipamentos

No presente trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos para obtenção dos resultados experimentais:

Torrador i-ROAST 2 Modelo 40010 utilizado para realizar as torras das amostras de café e dos possíveis adulterantes como milho, cevada, trigo, soja, cascas de café e arroz.

Moedor de grãos ajustável da marca Hamilton Beach, modelo 80374BZ, para garantir que as amostras de café e adulterantes torrados sejam moídos de maneira uniforme, garantindo maior homogeneidade das amostras.

Balança analítica da marca Mettler Toledo, modelo AG204.

Centrífuga refrigerada da marca Hettich, modelo Universal 320R e rotor para microtubos MIKRO 200/200R.

Tubos de NMR BORO ECO 7pol. (178 mm), diâmetro de 5 mm.

As análises de ^{1}H-NMR foram realizadas no equipamento institucional de NMR Heteronulclear Multidimensional, modelo Advance III, marca Bruker com frequência de 600 MHz para o núcleo de ^{1}H dotado de quatro canais e opera com amostras no estado líquido, também possui CrioProbe (criossonda) inversa que permite uma melhoria na relação sinal/ruído, gerando espectros com maior resolução; esse equipamento também possui automação de injeção de amostra.

Sistema de vácuo manifold para extração em fase sólida da marca Chromabond modelo 730150 acoplado com bomba de vácuo da marca Prismatec modelo 131.

Os cartuchos SPE utilizados na separação das frações TAG e AGL de ácidos graxos do óleo de café foram de aminopropil (NH_2) de 500 mg e 3 mL da marca BondElut (Agilent).

As medidas de Raman foram realizadas em equipamento de espectrômetro

portátil (Wasatch Photonics) com laser de Nd:YAG[4] utilizado como fonte de emissão em 1064 nm e detector de InGaAs[5]; uma geometria refrativa de retroespalhamento de 180º foi utilizada para minimizar possíveis interferências ocasionadas por fluorescência.

As medidas de Mid-IR foram feitas utilizando dos equipamentos portáteis de FTIR, um para amostras sólidas e outro para amostras líquidas. As análises de Mid-IR café torrado e moído foram feitas com auxílio de equipamento FTIR 4500 (Agilent Portable Series) equipado com cristal de ZnSe; as medidas de Mid-IR de amostras de óleo de café verde foram realizadas em equipamento portátil de FTIR 5500 (Agilent Series Compact) equipado com cristal de diamante.

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas em dois equipamentos. O primeiro deles, cromatógrafo a gás Agilent série 6890 com detector de ionização em chama equipado com coluna Agilent HP88 60m x 0.25 mm x 0.2µm e o gás de arraste utilizado foi He. O segundo cromatógrafo a gás da marca Shimadzu com detector de ionização em chama e coluna Omegawax 250 30m x 0,25mm x 0,25µm e o gás de arraste utilizado foi N_2.

Todos os tratamentos quimiométricos foram realizadas com auxílio do software Pirouette 4.5.

3.2 Soluções e reagentes

Para as análises de ^{1}H-NMR o solvente utilizado foi óxido de deutério (D_2O) com 0,1% de padrão TSP para ajuste dos deslocamentos químicos.

Para as análises cromatográficas do óleo de café verde e demais óleos vegetais foram utilizados solventes para o preparo de soluções utilizadas na separação das frações de TAG e AGL. Os solventes utilizados foram hexano 95,0% (Sigma-Aldrich), isopropanol 99,9% (Mallinckrodt), diclorometano 99,5% (Merck), clorofórmio 99,8% (Quemis), éter dietílico 99,8% (Honeywell), ácido acético 99% (Sigma-Aldrich) e metanol 99,9% (Tedia). Também foi utilizado um padrão de metil ésteres de ácidos graxos (FAME) Supelco 37 Component FAME Mix para identificação dos ácidos graxos presentes nas amostras de óleos vegetais; para quantificação das frações de TAG foi utilizado como padrão interno trinonadecanoato

[4] Laser sólido de óxido de ítrio e alumínio dopado com neodímio que formam a espécie ($Nd:Y_3Al_5O_{12}$).
[5] Arsenato de índio e gálio que formam um cristal utilizado como fotodetector de alta sensibilidade.

de gliceril (C19:0/ C19:0/ C19:0) 99% (Sigma-Aldrich) e, como padrão interno para quantificação de AGL, foi utilizado ácido heptadecanoico (C17:0) 98% (Sigma-Aldrich). Durante a etapa de derivatização foi utilizado hidróxido de potássio 85% (Merck) e sulfato de sódio anidro 99% (Merck).

As soluções preparadas para as etapas de separação e derivatização foram:

Solução de clorofórmio/isopropanol 2:1 (v/v)

Solução de ácido acético em éter dietílico 2% (v/v)

Solução de hexano/diclorometano/éter dietílico 89:10:1 (v/v)

Solução de hidróxido de potássio em metanol 2 mol L^{-1}

Solução de padrões internos 0,208 mg mL^{-1} de C17:0 e 1,50 mg mL^{-1} de C19:0/ C19:0/ C19:0

3.3 Preparo de amostras

A seguir tem-se a descrição dos preparos das amostras de café torrado e moído para análises de ^{1}H-NMR e de óleo de café verde e demais óleos vegetais para análises por GC-FID.

3.3.1 Amostras utilizadas: café, óleo de café e adulterantes

Para as análises utilizando a técnica de ^{1}H-NMR, realizadas no Instituto de Química da UNESP em Araraquara-SP, foram analisadas 39 amostras comerciais de cafés torrados e moídos. Desses cafés, três deles foram fornecidos pela Cooperativa de Cafeicultores em Guaxupé – MG na forma de grãos crus, os quais foram moídos e torrados conforme descrito no item 3.3.2. As demais amostras comerciais foram adquiridas no comércio local da cidade de Araraquara e região. Os seis tipos de adulterantes selecionados para essa parte do trabalho foram adquiridos na mesma cidade e também através de e-commerce. Foram utilizados cafés e adulterantes de diferentes regiões.

Em relação às análises utilizando espectroscopia vibracional realizadas no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Ohio State University em Columbus-OH, foram adquiridas 90 amostras de cafés torrados e, em sua maioria, moídos. Os cafés torrados adquiridos na forma de grão inteiro foram moídos no laboratório.

Todas as amostras de adulterantes foram torradas e moídas nas dependências do Instituto de Química da UNESP.

As amostras de óleo de café foram adquiridas através de comércio eletrônico, tanto em sites brasileiros como norte-americanos, ou foram gentilmente cedidas pela Cooxupé. Os óleos vegetais utilizados como adulterantes foram obtidos em comércios locais nas cidades de Araraquara-SP (Brasil), Columbus, OH (EUA) ou através de e-commerce.

3.3.2 Café – torra e moagem

Nem todas as amostras adquiridas para execução do presente trabalho foram adquiridas em sua forma torrada e moída. As amostras de café cru foram primeiramente torradas com auxílio de um torrador com programação de temperatura controlada, sendo 196ºC durante três minutos e 235ºC durante dois minutos resultando em um grau de torra médio conforme estabelecido pela escala Agtron 50-55 (Figura 24), também foi feito o grau de torra escura, utilizando o mesmo torrador com programação de temperatura controlada sendo 196ºC durante quatro minutos e 235ºC durante três minutos, os grãos obtidos podem ser classificados em torno 40-35 na escala Agtron (Wu e Sun, 2013). O mesmo processo foi aplicado aos grãos de adulterantes que foram obtidos todos em suas formas cruas. Os adulterantes torrados foram: cevada, soja, cascas de café, arroz, trigo e milho.

Figura 24 – Escala Agtron para averiguar o grau de torra dos grãos de café
Fonte: adaptado de http://www.agtron.net/Coffee1.html

Para moagem dos grãos de café e adulterantes torrados foi utilizado um moedor ajustável e a espessura para moagem foi ajustada como “fino (expresso)”, conforme apontado na Figura 25, para garantir maior poder de extração através do solvente utilizado. Após a moagem dos grãos, as amostras foram peneiradas utilizando uma peneira de 0,297 mesh para garantir maior uniformidade das amostras

Figura 25 – Moedor de grão utilizado indicando a granulometria selecionada.
Fonte: adaptado de http://www.hamiltonbeach.com.br/80374BZ.html.

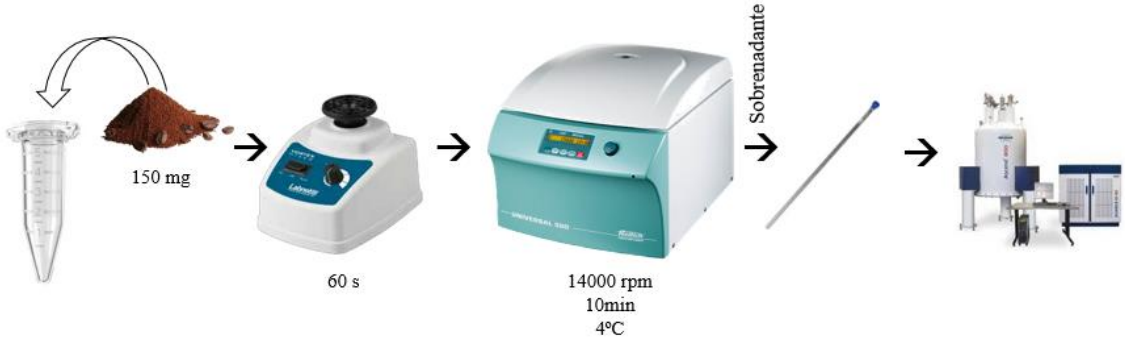
3.3.3 Adulteração de amostras em laboratório

Para as análises utilizando a técnica de ^{1}H-NMR, as amostras de café torrado e moído foram adulteradas por meio da mistura de massas apropriadas de uma amostra de café puro (amostra 1) e das formas torradas de cada um dos seis adulterantes nas seguintes proporções: 1, 2,5, 5, 10, 25 e 50% (m/m) em dois graus de torra diferentes. O mesmo procedimento foi tomado para as análises de espectroscopia vibracional desse tipo de amostra utilizando as seguintes proporções (m/m): 5, 10, 20, 40 e 60% de quatro diferentes adulterantes (cascas de café, soja, cevada e milho), utilizando para isso, uma amostra de café adquirida em grãos para que fosse certificado que não haviam quaisquer resquícios de adulteração na amostra.

Para as amostras de óleo de café verde adulteradas em laboratório foram utilizadas as amostras de óleo de café verde fornecidas pela Cooxupé como amostras puras que foram misturadas aos demais óleos vegetais (canola, chia, soja, milho, girassol, gergelim) nas seguintes proporções (v/v): 1, 2,5, 5, 10, 20, 50 e 75%.

3.3.4 Café – extração com D_2O

O processo de extração com óxido de deutério foi baseado no trabalho de Consonni, Cagliani e Cogliati (2012) com algumas modificações e consiste na pesagem de uma alíquota de 150 mg de cada amostra a ser analisada, incluindo amostras comerciais de café e os adulterantes selecionados, em um microtubo tipo eppendorff de 1,5 mL seguida da adição de 1 mL de D_2O e, em seguida, procedeu-se com agitação em vórtex por 60 segundos e, centrifugação a 14000 rpm e 4ºC durante por 10 minutos. O volume de sobrenadante (750 µL) foi então transferido para tubos de NMR de 5 mm de diâmetro (178 mm comprimento), que seguiam para análise de NMR. Uma esquematização do processo pode ser observada na Figura 26. Cada



análise foi feita em triplicata

Figura 26 – Esquema de preparo de amostra para extração com D_2O**.**
Fonte: elaborado pela autora.

3.3.5 Análises de GC-FID para amostras de óleo de café verde

Foram realizados dois tipos de análises utilizando GC-FID: a determinação da composição dos ácidos graxos nas amostras de óleo de café verde e demais óleos vegetais utilizados como adulterantes (canola, chia, gergelim, milho, soja e girassol) feitas no laboratório em Columbus-OH e a quantificação de TAG e AGL em amostras de óleo de café verde de diferentes anos que foi realizada no laboratório em Araraquara-SP. Para todos esses experimentos, as análises foram feitas em duplicata.

3.3.5.1 Separação das frações de TAG e AGL em óleo de café verde

As frações de TAG e AGL foram separadas de acordo com os procedimentos descritos por Lepage e Roy (1986) e Toci e colaboradores (2013) com algumas modificações. O processo de separação das frações lipídicas contidas nos óleos café verde analisados foi realizado por meio da extração em fase sólida utilizando cartuchos de aminopropil (500 mg/ 3mL). Aproximadamente 180 mg de óleo de café foram dissolvidas em 1,0 mL de $CHCl_3$ contendo os padrões internos nas seguintes concentrações: 0,2 mg mL^{-1} para C17:0 e 1,5 mg mL^{-1} para C19:0/C19:0/C19:0; então foram adicionadas ao cartucho SPE NH_2 condicionado com hexano; após a aplicação de vácuo para eliminação do hexano, foram recolhidos a fração que contém triacilglicerídios em um frasco coletor após a eluição com solução clorofórmio: isopropanol 2:1; em seguida, adicionou-se solução de ácido acético em éter 2% para eluir os ácidos graxos livres. A primeira fração recolhida foi evaporada com N_2 e redissolvida em hexano e, então adicionado a outro cartucho SPE NH_2; a fração de triacilglicerídeos foi coletada após a eluição com solução de hexano/diclorometano/dietil éter 89:10:1 (Lepage e Roy, 1986; Toci *et al.*, 2013) para as amostras preparadas com padrão interno, a diluição é feita numa solução de clorofórmio contendo as concentrações 0,208 mg mL^{-1} de C17:0 e 1,50 mg mL^{-1} de C19:0/ C19:0/ C19:0. Uma esquematização desse procedimento pode ser vista na Figura 27. Ambas as frações de TAG e AGL foram evaporadas com N_2 para posterior etapa de derivatização.

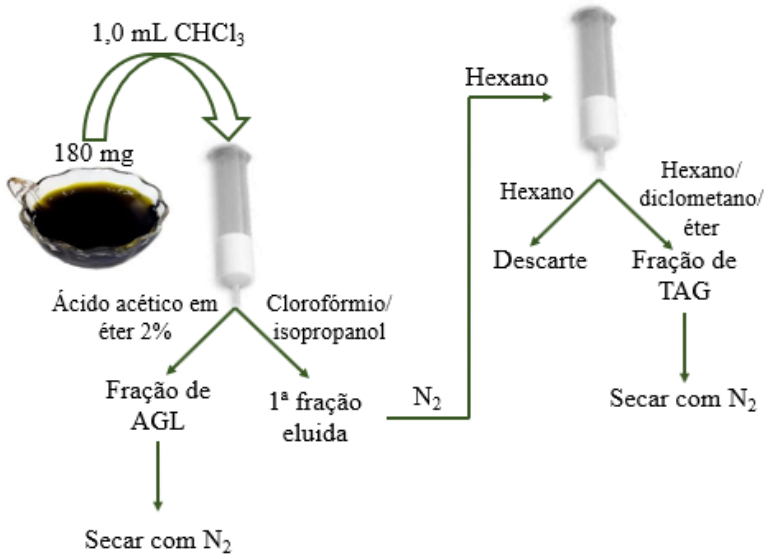


Figura 27 – Esquematização da separação das frações de TAG e AGL.
Fonte: elaborado pela autora.

3.3.5.2 Derivatização

O processo de derivatização foi realizado para determinação da constituição de ácidos graxos das amostras de café verde e possíveis adulterantes bem como para a análise das frações de TAG e AGL em amostras de óleo de café de diferentes anos. Para ambas as análises o procedimento foi praticamente o mesmo, baseado no procedimento descrito por Aykas e Rodriguez-Saona (2016) com modificações. Para determinação da composição dos ácidos graxos, uma alíquota de 100 µL de amostra de óleo foi adicionada num tubo de centrífuga do tipo Falcon de 15 mL contendo 10 mL de hexano e 100 µL de solução KOH 2 mol L^{-1} em metanol. Amostra foi submetida a agitação em vórtex por 30 segundos; após a etapa de agitação 1,5 mL da fase superior foi transferido para microtubos tipo eppendorff contendo uma ponta de espátula de Na_2SO_4 anidro que tem o papel de agente secante. O microtubo contendo a amostra foi centrifugado a 13200 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, cerca de 1,0 mL da fase superior foi transferida para vials âmbar com tampados com septo de teflon que ficaram armazenados a -15°C no congelador até as análises (Aykas e Rodriguez-Saona, 2016). O esquema da etapa de derivatização por ser observado na Figura 28.

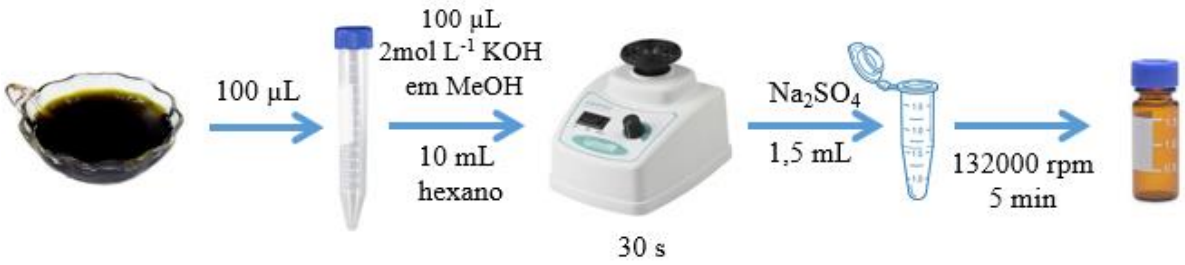


Figura 28 – Esquema do processo de derivatização de ácidos graxos.
Fonte: elaborado pela autora.

Em relação ao processo de derivatização das frações de TAG e AGL, após a evaporação com N_2, elas foram rediluídas em 2,0 mL de hexano, ao invés de 10 mL como no processo anterior, esquematizado na figura 28. Fora essa pequena alteração foi feita, pois, a quantidade de amostra utilizada era menor, a etapa de derivatização seguiu conforme descrito por Aykas e Rodriguez-Saona (2016).

3.4 Autenticação de amostras de café torrado e moído utilizado ^{1}H-NMR

Foram analisadas pela técnica de ^{1}H-NMR 39 amostras comerciais de café torrado e moído de diferentes localidades com diferentes graus de torra, também foram submetidas à análise amostras de café adulteradas em laboratório com concentrações de adulterantes variando de 1 a 50%, em dois graus de torra com seis diferentes adulterantes.

Os espectros de ^{1}H-NMR foram adquiridos no espectrômetro de 600 MHz (para o núcleo de ^{1}H) e campo de 14,1T, marca Brunker, modelo Avance III equipado com sonda SmartProbe BBOf e com bobina gradiente, operando na faixa de temperatura -150ºC a 180ºC com controle automático de turning e matching. As amostras foram medidas a 298 K (25ºC). Os pulsos de 90º foram determinados via comando PULSECAL. A homogeneização do campo magnético foi obtida via TOPSHIM.

Foram realizados dois experimentos unidimensionais de ^{1}H-NMR sendo o primeiro um procedimento de pulso simples (zg30) com tempo de aquisição (AQ) de 3,6 segundos, resultando em 64 decaimentos de indução livre (FID) formando um vetor de dados para formar um ponto-vetor do complexo de dados de 64k e janela espectral de 20,0276 ppm (partes por milhão) e ganho do detector (RG) de 18. Após a transformada de Fourier (FT) (sem apodização), foi aplicada a seleção automática de pico para determinação do sinal residual de água com deslocamento químico (δ ou f1) igual a 4,70 ppm. Os valores em 4,70 ppm foram usados como campo de saturação da banda seletiva no experimento seguinte. A fase e a linha-base foram ajustadas com auxílio do software MestReNova.

O segundo experimento consiste na supressão do sinal HOD, com sequência de pulso ZGCPPR, tempo de aquisição (AQ) de 2,76 segundos, FID 128 e supressão com irradiação de radiofrequência de baixa potência em 48,05 dB, usando sinal de água residual em 4,70 ppm. Foi aplicada uma função exponencial com LB = 0,3 antes da transformada de Fourier. Os espectros foram alinhados utilizando como padrão 3-ácido-propiônico-2,2,3,3-D4 (TSP) sendo atribuído sinal em 0 ppm. A análise dos dados foi feita usando o software MestReNova v. 9.0.

3.5 Autenticação de café torrado e moído utilizando espectroscopia vibracional: infravermelho próximo e médio

As determinações de adulterantes em amostras comerciais de cafés torrados e moídos por meio de espectroscopia vibracional foram realizadas com auxílio de duas técnicas diferentes: a espectroscopia no infravermelho médio e a espectroscopia no infravermelho próximo. Noventa amostras comerciais de cafés torrados e moídos provenientes de diferentes localidades foram submetidas às análises de Mid-IR e NIR, juntamente com amostras de café adulteradas em laboratório com quatro tipos diferentes de adulterantes: cascas de café, soja, cevada e milho.

Inicialmente as amostras de café foram analisadas com auxílio da técnica de NIR utilizando o equipamento portátil Neospectra de FT-NIR. Cerca de 5 g de amostra foram colocadas em uma placa de Petri e o ajuste no tempo de *scan* foi de 10 segundos. Os espectros foram coletados em triplicata e as porcentagens de adulterantes analisadas foram de 5, 10, 20, 40 e 60% com os seguintes adulterantes: cevada, soja, milho e cascas de café. O *background* do equipamento foi coletado a cada análise. O esquema das medições pode ser observado na parte (a) da Figura 29.

Em relação às determinações de adulteração pela técnica de Mid-IR, as mesmas amostras comerciais e amostras adulteradas em laboratório foram submetidas às análises, cuja faixa espectral selecionada foi de 700 a 4000 cm^{-1}, com resolução fixada em 4cm^{-1} e o *background* do equipamento foi coletado a cada análise. O equipamento portátil utilizado para realização dessas análises foi Agilent 4500 FTIR com cristal de ZnSe e cerca de 0,5 g de amostra foram utilizadas em cada uma das três replicatas realizadas. A esquematização das medições com o equipamento portátil de FTIR pode ser observada na parte (b) da Figura 29.

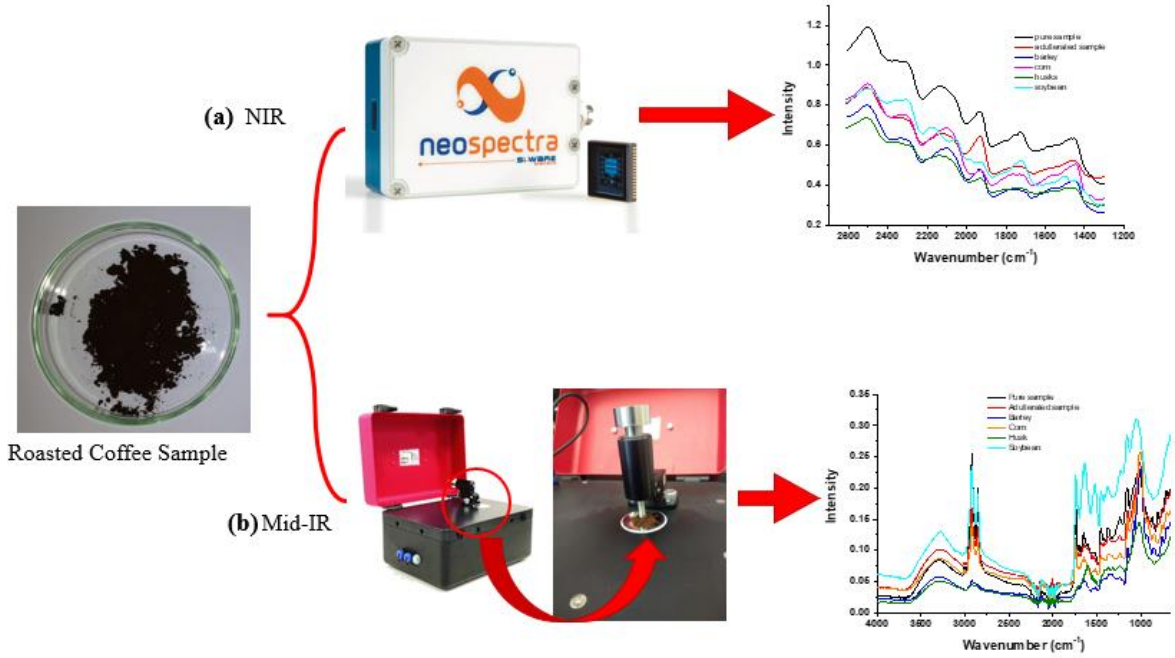


Figura 29 – Esquematização da metodologia de análise para as técnicas de **(a)** NIR e **(b)** Mid-IR.
Fonte: elaborado pela autora.

Um ponto bastante importante a ser ressaltado é que, além de não haver etapas de preparo de amostra, os equipamentos utilizados são portáteis. Essas vantagens, juntamente com os resultados obtidos, serão discutidas posteriormente.

3.6 Autenticação de amostras de óleo de café verde com espectroscopia vibracional: infravermelho médio e Raman

Vinte e uma amostras de óleo de café verde foram analisadas por meio das técnicas de espectroscopia vibracional juntamente com seis diferentes óleos vegetais: chia, canola, girassol, gergelim, milho e soja. As porcentagens de adulteração, das amostras adulteras em laboratório, variaram de 1 até 75%.

Inicialmente as amostras de óleo de café foram analisadas com auxílio da técnica de espectroscopia Raman, utilizando um equipamento portátil WP FT-Raman 1064. Cerca de 3 mL de amostra foram adicionados a uma cubeta de quartzo de um centímetro de caminho ótico; a cubeta era inserida no porta amostras do equipamento com configuração de tempo de integração de 3500 ms. O *background* do equipamento foi tomado a cada replicata da amostra e cada amostra foi analisada em duplicata. O procedimento de análise pode ser observado na parte (a) da Figura 30.

Já as análises de Mid-IR que foram realizadas em equipamento portátil Agilent 5500 FTIR equipado com cristal de diamante e faixa espectral selecionada de 700 a 4000 cm^{-1}, com resolução de 4 cm^{-1} o *background* do equipamento foi coletado a cada análise. Alíquotas de 150 µL de amostra foram colocadas no porta-amostras e cada amostra foi analisada em duplicata. O procedimento de análise encontra-se na parte (b) da Figura 30.

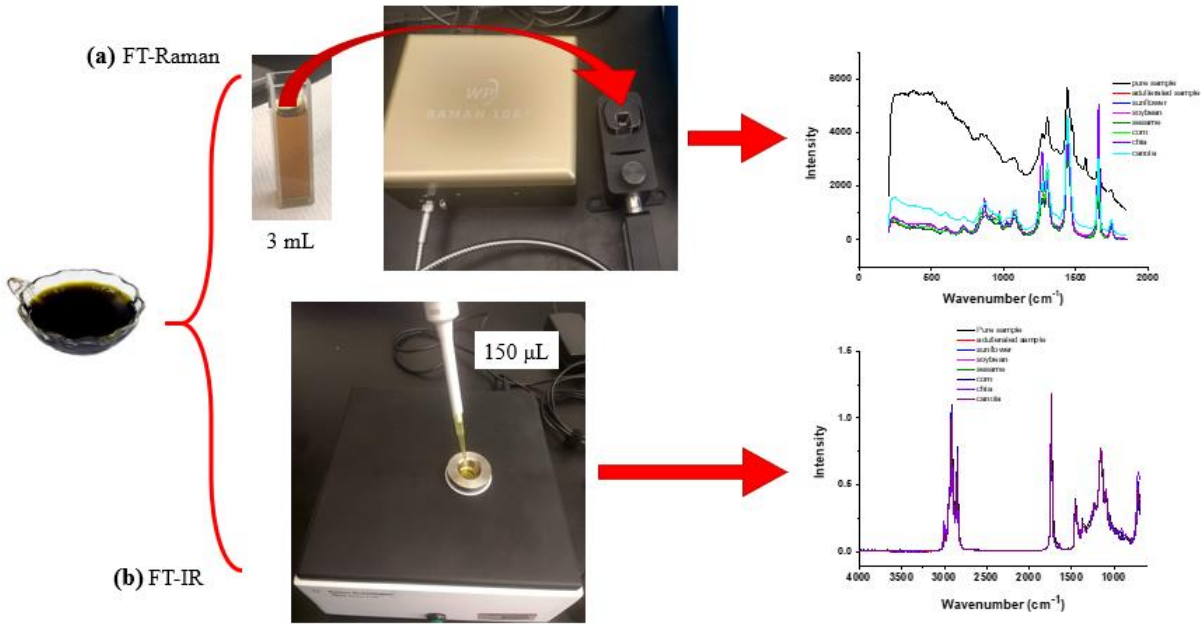


Figura 30 – Esquematização da metodologia de análise para as técnicas de **(a)** Raman e **(b)** Mid-IR.
Fonte: elaborado pela autora.

3.7 Análise de cromatografia gasosa com detector de ionização em chama para óleo de café verde

Em relação às determinações das frações de TAG e AGL, após o preparo de amostras, descrito anteriormente, as amostras foram submetidas a análises por GC-FID. As condições cromatográficas utilizadas foram: modo de injeção split com fração 1:20, temperatura de injeção de 250ºC, programação de temperatura de 160ºC a 210ºC por 150 minutos e 2,5ºC/min e a vazão do gás de arraste foi de 2,5 mL min^{-1}, o gás de arraste utilizado foi N_2. Para a quantificação das frações de AGT e TAG, foram utilizados os padrões internos de ácido heptadecanoico para o AGL e tricadecanoato de gliceril para o TAG.

Para a determinação da composição dos ácidos graxos do óleo de café e demais óleos vegetais, após o preparo de amostras, as condições cromatográficas utilizadas no equipamento de GC-FID foram: modo de injeção split com razão 1:20. Temperatura do injetor de 220°C e o gradiente de temperatura variando de 110°C até 220°C variando 5°C min^{-1}, o gás de arraste utilizado foi He e sua vazão foi de 2,0 mL min^{-1}. Em ambos os casos, a identificação dos sinais de ácidos graxos foi realizada pela comparação com o padrão de ácidos graxos Supelco 37 Component. Todas as análises cromatográficas foram feitas em duplicata.

4 Resultados e discussão

Aqui serão descritos e discutidos os resultados obtidos pelas metodologias empregando ^{1}H-NMR, espectroscopias vibracionais de infravermelho médio, próximo e Raman para amostras de cafés torrados e moídos e amostras de óleo de café verde. Como observado, vale salientar que as amostras de café analisadas não são as mesmas para as metodologias descritas, isso porque a autenticação das amostras de café com ^{1}H-NMR foi realizada no Instituto de Química da UNESP em Araraquara-SP, enquanto a autenticação de amostras por Mid-IR e NIR foi realizada no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Ohio State University em Columbus, OH. As análises de ^{1}H-NMR foram realizadas antes das análises de espectroscopia vibracional com amostras de diferentes origens e foram adquiridas no Brasil; as amostras analisadas com as técnicas de NIR e Mid-IR provem de diferentes lugares e foram adquiridas nos Estados Unidos.

4.1 Grau de torra

Dois graus de torra foram investigados devido à grande diversidade de graus de torra existentes em amostras comerciais. Sendo assim, deseja-se avaliar a robustez da metodologia proposta em relação a variabilidade das amostras. Os pontos de torra médio e escuro foram escolhidos por serem os mais utilizados comercialmente no Brasil.

A Figura 31 apresenta os diferentes tipos de adulterantes estudados e uma amostra de café utilizada no grau de torra médio. Pode-se observar que os adulterantes não possuem exatamente a mesma coloração da amostra; contudo isso não torna percebível a adulteração do café, uma vez que, quando misturados a amostra, os adulterantes e o café formam uma mistura bastante homogênea, tornando a adulteração visualmente imperceptível. Na prática, as indústrias cafeeiras de má fé, podem torrar separadamente os grãos de café dos adulterantes e, posteriormente, são misturados, tal qual realizado nos estudos do presente trabalho, ou podem adulterar o café antes do processo de torrefação e moagem.

Como pode ser observado na Figura 31, após torra e moagem, o aspecto físico de pó de café e adulterantes em pó é bastante semelhante. Desta forma, como mencionado anteriormente, a metodologia oficial para determinação de adulterantes

em amostras de café (Amboni, Francisco e Teixeira, 1999; Menezes Jr., de e Bicudo, 1951), é subjetiva, uma vez que o analista é responsável por determinar a autenticidade da amostra observando-a através do microscópio, tornado difícil a constatação da adulteração em amostras de café torrado como observado na Figura 32 que apresenta amostras adulteradas de café as quais não apresenta diferenças visuais significativas que permitem diferenciar amostras de café puras de adulteradas.

Figura 31 – Imagens de café torrado e moído de adulterantes com graus de torra e moagem semelhantes.
Fonte: elaborado pela autora.

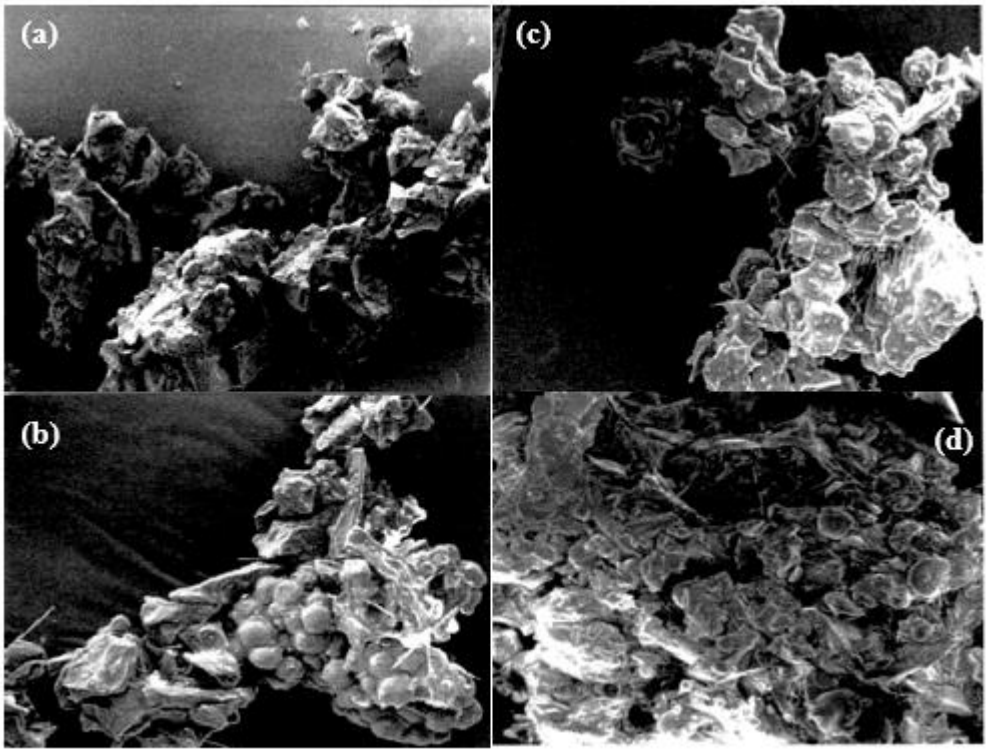


Figura 32 – Imagens de microscopia eletrônica para amostras de café torrado e moído **(a)** puro, **(b)** adulterado com 5% de milho, **(c)** adulterado com 5% de cevada e **(d)** adulterado com 5% de trigo.
Fonte: adaptado de (Amboni, Francisco e Teixeira, 1999).

4.2 Autenticação de amostras de café torrado e moído utilizando ^{1}H-NMR

O café é uma matriz extremamente complexa, apresentando compostos de diferentes classes. Durante o processo de torra, a elevação da temperatura promove uma série de alterações físicas e químicas que incluem hidrólises, pirólises e as reações de Maillard[6] e Strecker[7]; os produtos desses processos são ausentes nos grãos crus de café ou apresentam baixas concentrações, enquanto reações de degradação são responsáveis pela diminuição de outros compostos presentes no café durante o processo de torra (Toci *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2012). Algumas substâncias presentes no extrato aquoso, utilizando D_2O, são afetadas pela variação do grau de torra do café, como na Figura 33 tem-se a sobreposição de dois espectros de ^{1}H-NMR sendo um deles, de coloração marrom clara, representando a torra média de uma amostra de café, enquanto o outro, de coloração marrom escura, representa a mesma amostra de café na torra escura. Alguns exemplos de compostos que diminuíram de

[6] Reação entre carboidrato (ou proteína) e um açúcar redutor para produção, após várias etapas, de melanoidinas
[7] Síntese de aldeídos (ou cetonas) tendo aminoácidos como precursores.

concentração à medida que aumentou-se o grau de torra foram a cafeína, 5-hidroximetilfurfural e ácidos clorogênicos; por outro lado, outros compostos tiveram sua concentração aumentada à medida que o grau de torra escurece, como o ácido acético, ácido fórmico e também o ácido quínico, conforme pode ser observado na Figura 33 (Bosco *et al.*, 1999; Consonni e Cagliani, 2010; Toci *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2012).

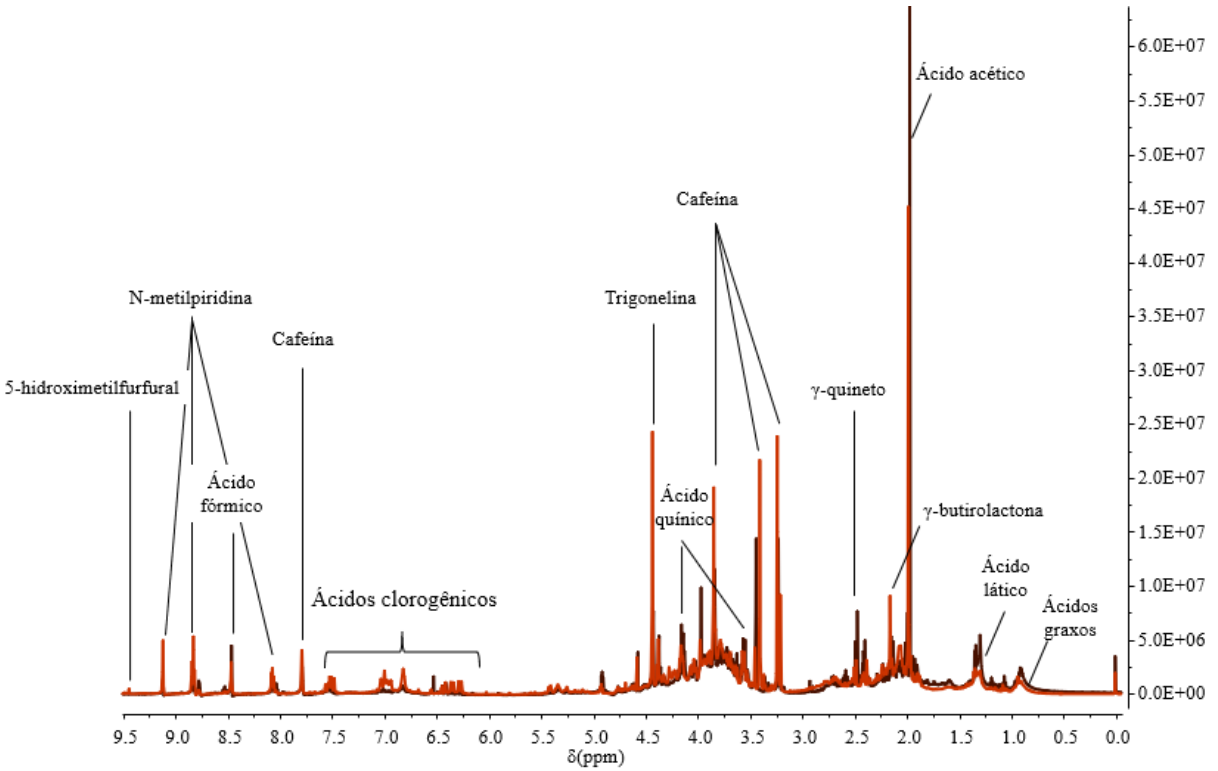


Figura 33 – Espectros de pre-sat ^{1}H-NMR de extratos aquosos da mesma amostra de café em dois graus de torra, média (marrom claro) e escura (marrom escuro).
Fonte: elaborado pela autora.

Os seis adulterantes estudados nesta parte do trabalho foram: cevada, milho, soja, cascas de café, trigo e arroz, e cada adulterante foi analisado em dois graus de torra: médio e escuro. Na Figura 34, pode-se observar os espectros de pre-sat de ^{1}H-NMR de uma amostra de café puro e de amostras adulteradas com os seis diferentes adulterantes (50:50 m/m). Em relação às amostras adulteradas, destaca-se a região do espectro entre 3,0 e 6,0 ppm, correspondente à região dos carboidratos (Bubb, 2003), na qual, em torno de 5,40 ppm tem-se os sinais correspondentes aos adulterantes, uma vez que o espectro de café puro não apresenta esses sinais. Para os adulterantes analisados que contém amido em sua composição (arroz, cevada, trigo e milho) o sinal em 5,40 ppm, um singleto (s), é um indicativo de sua presença em amostras adulteradas e esse sinal é relativo aos hidrogênios do carbono

anomérico (α-1,4) ligado a resíduos de glicose do amido e esse sinal foi usado para posterior quantificação de adulterantes em amostras de café adulteradas com trigo, soja, cevada e milho, o hidrogênio correspondente a esse sinal está representado na Figura 35.

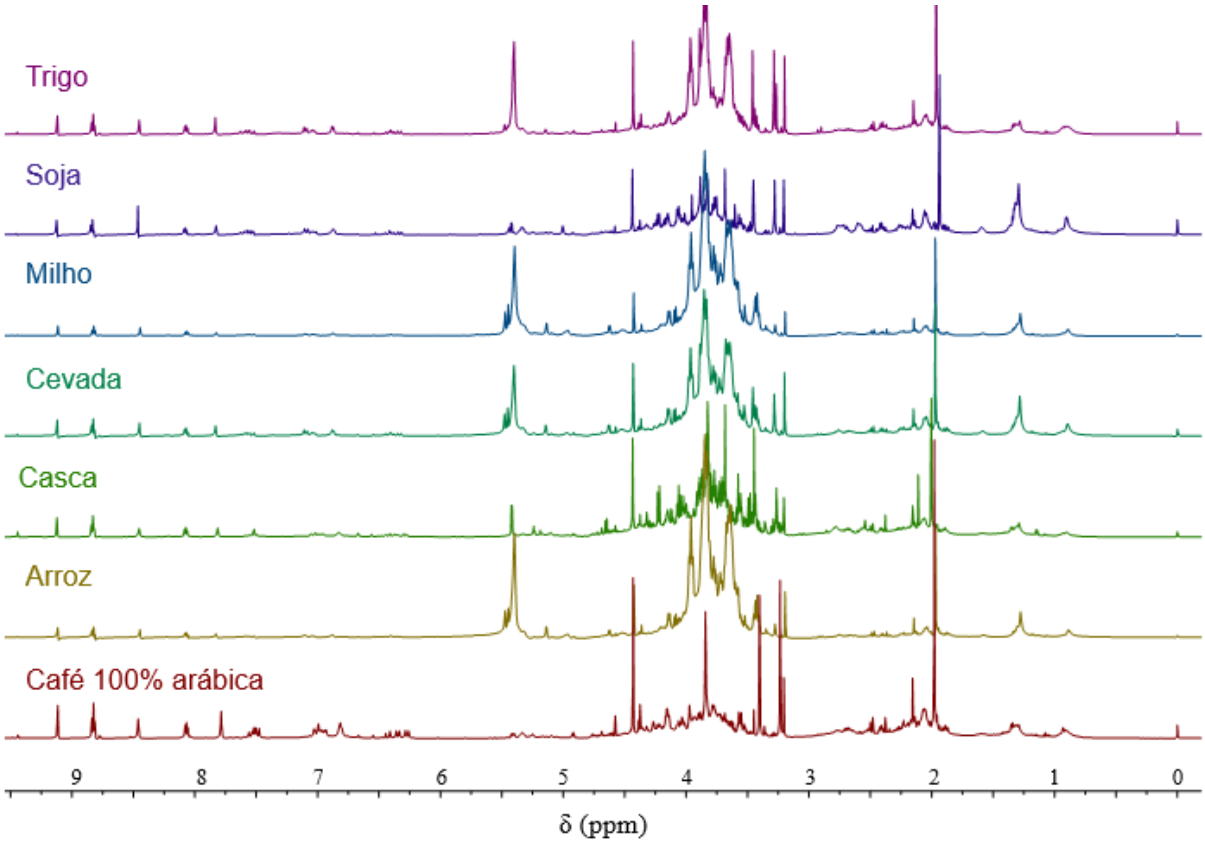


Figura 34 – Espectros de pre-sat ^{1}H-NMR para amostras de café puro e com adulterantes (50:50 m/m).
Fonte: elaborado pela autora.

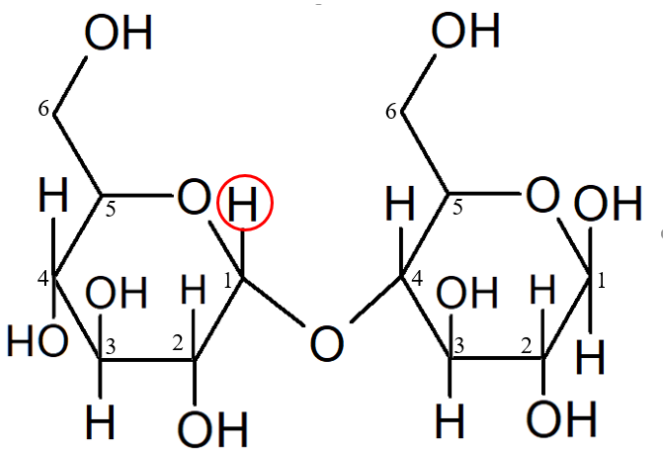


Figura 35 – Representação do resíduo de glicose da molécula de amido com destaque para o hidrogênio do carbono da ligação (α-1,4) responsável pelo sinal em 5,40 ppm dos espectros pre-sat de ^{1}H-NMR
Fonte: elaborado pela autora

Soja e cascas de café não possuem amido em sua composição, então o singleto característico não foi observado em espectros de amostras de café adulteradas com soja ou cascas de café. Ao invés desse singleto, observa-se um dublete (d) em torno de 5,42 ppm em amostras adulteradas com soja e para amostras adulteradas com cascas de café há um duplo dublete (dd) em torno de 5,42-5,45 ppm. O sinal em 5,42 (d) ppm correspondente à presença de cascas de café pode ser atribuído aos hidrogênios de carbonos anoméricos de açúcares presentes no endocarpo dos grãos (1,5-anidrofrutose ou 2S-(hidroximetil)-oxano-4,5-diona), conforme a Figura 36 (Kametani *et al.*, 1996; Lam, Sparnins e Wattenberg, 1982). No caso de cafés adulterados com soja o sinal característico do espectro em 5,42-5,45 (dd) ppm usado para identificação de adulteração corresponde aos hidrogênios dos carbonos anoméricos da estaquiose[8], cuja estrutura está descrita na Figura 36 (Monakhova e Diehl, 2016). Esses dois sinais, 5,42 (d) e 5,42-5,45 (dd) ppm, foram utilizados para posterior quantificação de adulteração de amostras de café torrado e moído com cascas de café e soja, respectivamente.

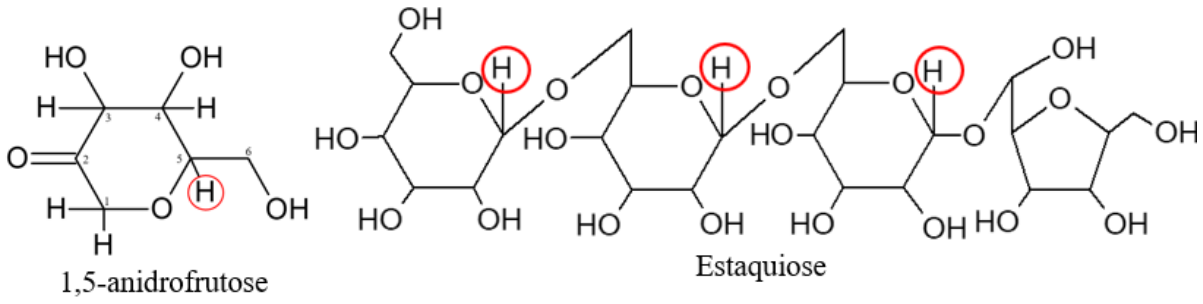


Figura 36 – Estruturas das moléculas de 1,5-anidrofrutose e da estaquiose, com destaque para os hidrogênios responsáveis pelos sinais marcadores de adulteração com cascas de café e soja, respectivamente, observados nos espectros de pre-sat de ^{1}H-NMR
Fonte: elaborado pela autora

[8] Tetrassacarídeo consistido de duas unidades de α-D- galactose, uma unidade de α- D-glicose e uma unidade de β- D - frutose sequencialmente ligados como gal (α1 → 6) gal (α1 → 6) glc (α1 ↔ 2β).

4.2.1 Quantificação de adulterantes em amostras de café com ^{1}H-NMR

Conforme afirmado anteriormente, os sinais selecionados para quantificação de adulterantes em amostras de café são referentes à compostos que não estão presentes em amostras de café puro. Os espectros das amostras utilizadas para construção das curvas analíticas da torra média podem ser observados nas Figuras A1 até A6 nos apêndices. As curvas analíticas obtidas para cada um dos adulterantes no grau de torra médio podem ser observadas nas Figuras A7 a A12 nos apêndices. As curvas analíticas foram elaboradas com a relação da área do sinal marcador do adulterante sobre a área do sinal do padrão de TSP (Área do adulterante/ Área do TSP) em função da porcentagem de adulterante presente no café (%adulterante). O TSP, além de ser a referência para os deslocamentos, pode também ser utilizado como padrão interno, uma vez que se trata de um composto estável e de concentração conhecida (0,05% da solução de D_2O). O uso de TSP como padrão interno em análises de ^{1}H-NMR já é conhecido e relatado previamente na literatura (Ishikawa *et al.*, 1999; Neumüller *et al.*, 2013; Shimizu, Ikeguchi e Sugai, 1994).

O mesmo processo foi aplicado às amostras de café adulteradas em torra escura e as respectivas curvas analíticas podem ser observadas nas Figuras A13 a A18 nos apêndices.

Na Tabela 4 é possível observar os parâmetros analíticos de curva de cada um dos adulterantes analisados nos dois graus de torra, também foi calculado o valor do limite de detecção conforme recomendado pela IUPAC (Rambla-Alegre, Esteve-Romero e Carda-Broch, 2012). O valor do limite de quantificação foi considerado como sendo o primeiro ponto de cada curva analítica (Konatu e Jardim, 2018; Shrivastava e Gupta, 2011).

Tabela 4 – Parâmetros analíticos para quantificação dos seis adulterantes estudados em dois graus de torra

Adulterante	Grau de torra	Curva Analítica	R	RSD (%)	LD (%m/m)
Cevada	Médio	$I_A/I_{TSP} = 1,2505A_{\%} + 2,734$	0,999	2,85 – 9,41	0,32
	Escuro	$I_A/I_{TSP} = 0,6278A_{\%} + 3,3657$	0,998	1,74 – 9,22	0,79
Cascas de café	Médio	$I_A/I_{TSP} = 0,1974A_{\%} + 1,880$	0,998	1,62 – 9,52	0,61
	Escuro	$I_A/I_{TSP} = 0,0849A_{\%} + 0,4655$	0,996	1,63 – 6,01	0,77
Milho	Médio	$I_A/I_{TSP} = 4,1929A_{\%} – 0,0274$	0,999	2,11 – 9,47	0,31
	Escuro	$I_A/I_{TSP} = 0,5242A_{\%} + 1,5663$	0,997	1,67 – 1,83	0,79
Arroz	Médio	$I_A/I_{TSP} = 4,2186A_{\%} + 1,792$	0,998	1,66 – 6,92	0,31
	Escuro	$I_A/I_{TSP} = 2,3025A_{\%} – 1,4332$	0,994	1,91 – 9,19	0,68
Soja	Médio	$I_A/I_{TSP} = 0,4885A_{\%} – 0,3403$	0,987	3,01 – 9,88	0,46
	Escuro	$I_A/I_{TSP} = 0,0305A_{\%} + 1,3603$	0,988	1,26 – 7,44	0,86
Trigo	Médio	$I_A/I_{TSP} = 1,0406A_{\%} – 0,7201$	0,999	2,66 – 9,45	0,33
	Escuro	$I_A/I_{TSP} = 0,9439A_{\%} + 4,6854$	0,996	1,59 – 9,87	0,39

Fonte: elaborado pela autora.

Os valores de repetibilidade intra-dia e inter-dia foram calculados utilizando dois pontos da curva analítica e estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores de repetibilidade intra-dia e inter-dia para amostras de café torrado adulterado com seis diferentes adulterantes em dois graus de torra

Torra média			
Adulterante	**%adulterante**	**Desvio intra-dia%**	**Desvio inter-dia%**
Arroz	5%	1,66	3,40
	25%	1,98	3,61
Cascas de café	5%	3,48	4,37
	25%	2,62	3,73
Cevada	5%	1,62	2,98
	25%	1,91	2,67
Milho	5%	1,75	3,58
	25%	1,64	3,49
Soja	5%	2,95	4,04
	25%	2,54	3,95
Trigo	5%	2,02	3,61
	25%	1,87	2,92
Torra escura			
Adulterante	**%adulterante**	**Desvio intra-dia%**	**Desvio inter-dia%**
Arroz	5%	3,15	4,76
	25%	3,03	4,59
Cascas de café	5%	5,15	7,02
	25%	4,98	6,99
Cevada	5%	3,23	4,87
	25%	3,17	4,76
Milho	5%	3,13	4,80
	25%	3,08	4,68
Soja	5%	5,09	7,14
	25%	5,01	7,05
Trigo	5%	3,29	5,01
	25%	3,14	4,92

Fonte: elaborado pela autora.

Como foi possível observar nos resultados expostos anteriormente, a quantificação de adulterantes utilizando ^{1}H-NMR como ferramenta analítica é viável, posto que os valores encontrados tanto para a repetibilidade intra-dia, feitas no mesmo dia em períodos diferentes, como a inter-dia, feitas em dias diferentes, são aceitáveis para matrizes complexas como o café (Huber, 1999). Também, à medida em que o grau de torra se torna mais escuro, há maior dificuldade na detecção e determinação da adulteração, isso porque os principais sinais de ^{1}H-NMR ficam menos intensos com o aumento do grau de torra das amostras de café devido à degradação térmica de uma série de compostos. Com isso, é de se esperar que em amostras de torra escura seja maior a incidência de adulterantes, uma vez que a detecção de adulterantes é mais difícil, tanto para metodologias analíticas, quanto para testes sensoriais.

Conforme afirmado anteriormente, a legislação brasileira (ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1999b) impõe um limite máximo para presença de materiais estranhos às amostras de café de 1g a cada 100g de amostra, contudo, como as adulterações possuem caráter econômico, visando somente aumentar o lucro dos produtores, as porcentagens de adulterantes que espera-se encontrar em amostras de café torrado e moído seriam bastantes superiores a 1% de adulterantes. Vale ressaltar que o limite imposto pela ANVISA se refere somente a materiais que resultariam da colheita, manuseio e beneficiamento do café, sendo assim, não há um limite mínimo aceitável para presença de adulterantes como milho, soja, cevada, trigo arroz ou mesmo cascas de café.

4.2.2 Ferramentas quimiométricas para análise e classificação das amostras de café

Com intuito de auxiliar na identificação das amostras adulteradas de café, as ferramentas quimiométricas PCA e SIMCA foram empregadas. Essas ferramentas quimiométricas são importantes pois possibilitam a análise e interpretação um conjunto de dados volumoso e complexo, possibilitando a extração de informações químicas relevantes. Análises não supervisionadas, como PCA, permitem a visualização de padrões nas amostras analisadas que permite a diferenciação entre amostras adulteradas e não adulteradas. Em contrapartida, ferramentas de classificação, como SIMCA, capazes de categorizar as amostras em classes pré-determinadas, neste caso em “adulteradas”, “não adulteradas” ou “sem classificação”,

utilizando conjuntos de calibração e predição.

Para evitar efeitos de variação, os espectros de ^{1}H-NMR das 39 amostras comerciais foram alinhados manualmente utilizando o software MestReNova, utilizando o sinal em 0,00 ppm do TSP como referência, a linha base foi corrigida utilizando o mesmo software.

A matriz de PCA foi construída utilizando as 39 amostras comerciais de café e 36 amostras de café adulteradas em laboratório dos seis adulterantes e em dois graus de torra diferentes, totalizando 75 amostras. A faixa de deslocamentos químicos selecionada para as análises varia de 0,60 até 5,74 ppm, totalizando 16811 variáveis resultando na matriz (75,16811); esse intervalo foi escolhido pois contém os sinais mais significativos para a separação das amostras analisadas. O pré-processamento de dados selecionado foi “centrar na média” (*mean-centering*) utilizado juntamente com as transformações matemáticas de “suavização” (*smooth*) e normalização.

Na Figura 37 é possível observar o gráfico de *scores* para o conjunto de amostras anteriormente citado, nesta é possível observar dois conjuntos distintos de amostras, sendo as amostras vermelhas aquelas adulteradas e as amostras puras estão identificadas pela cor azul. A variância explicada do conjunto de dados, utilizando as três primeiras PCs (PC1, PC2 e PC3) é 50,7%.

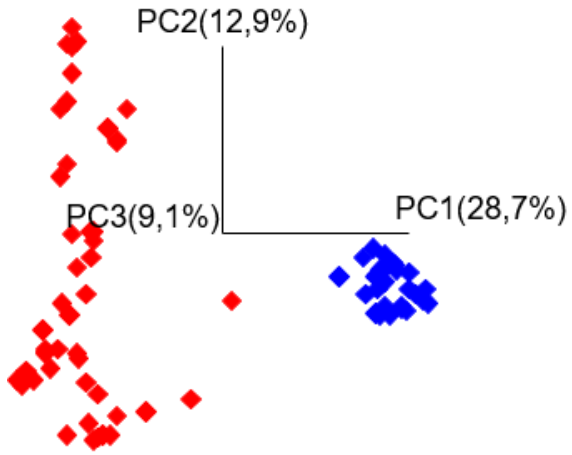


Figura 37 – Gráfico de *scores* para análises de ^{1}H-NMR amostras de café torrado e moído, sendo que as amostras em vermelho são de café adulterado e as amostras em azul são de café puro.
Fonte: elaborado pela autora.

O gráfico de *loadings* é apresentado na Figura 38; a partir dele, é possível estabelecer quais deslocamentos químicos são responsáveis pela separação das amostras observada no gráfico de scores da Figura 37.

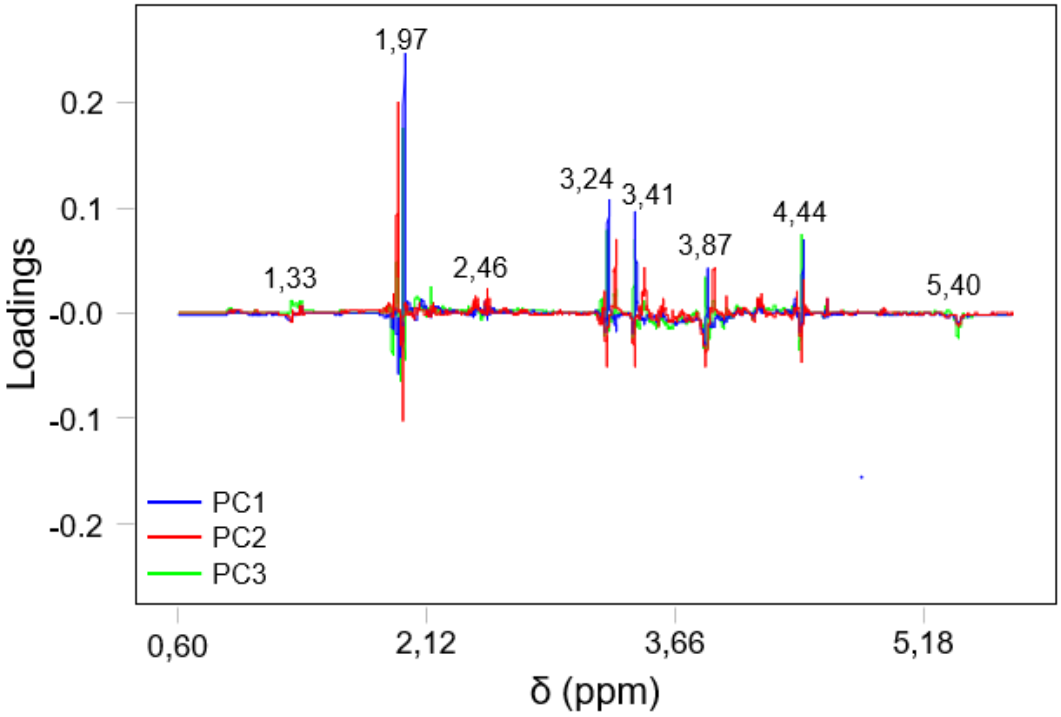


Figura 38 – Gráfico de *loadings* de PC1, PC2 e PC3 referente às análises de ^{1}H-NMR
Fonte: elaborado pela autora.

O gráfico de *loadings* para PC1 aponta deslocamentos positivos em δ 3,84 ppm e valores negativos δ 5,40 ppm, que indicam a presença de adulterantes. Já para PC2, o gráfico aponta valores positivos em δ 1,97, 3,24, 3,41, 3,87 e 4,44, e valores negativos em δ 5,40 ppm. Os valores indicados para PC3 são praticamente os mesmo que os de PC1 e PC2, com exceção δ 1,33 ppm. Valores negativos indicam que as amostras estarão deslocadas para o lado negativo no gráfico de *scores*, enquanto valores positivos no gráfico de *loadings* indicam que as amostras estarão deslocadas para a parte positiva no gráfico de *scores.*

Os deslocamentos químicos correspondentes aos principais sinais no gráfico de *loadings* são δ 1,33 ppm, correspondente aos H do grupamento metílico das moléculas de ácido lático, δ 1,97 ppm corresponde aos H do acetato, δ 3,24, 3,41 e 3,87 ppm são correspondentes aos H dos grupamentos metila da cafeína. O sinal em δ 4,44 é relativo ao grupamento metílico da molécula de trigonelina e em δ 5,40 há o H correspondente à presença de amido (no caso de adulterantes como milho, cevada, trigo e arroz). Sendo assim, os principais fatores que influenciam na separação das

amostras observada no gráfico de *scores* foram a quantidade de acetado presente nas amostras que depende do grau de torra da mesmo, ou seja, amostras com graus de torra mais claro possuem menos acetato (Wei *et al.*, 2012). Também o teor de cafeína é um indicativo da pureza das amostras, uma vez que nenhum dos adulterantes estudados possui cafeína em sua composição; além disso, a quantidade de trigonelina variou conforme o grau de torra, pois em amostras com grau de torra mais escuro os níveis de trigonelina são inferiores àquelas com grau de torra mais claro. Por fim, os sinais indicadores de adulterantes em δ 5,40-5,42 ppm, são responsáveis para separação observada entre amostras puras e adulteradas.

O modelo SIMCA foi construído usando duas classes designadas como 1 (amostras puras) e 2 (amostras adulteradas). O conjunto de calibração corresponde a 70% das amostras que compõe o conjunto de dados e foi selecionado a partir do algoritmo de Kennard-Stone, os 30% restantes correspondem ao conjunto de validação do modelo. O conjunto de dados selecionados foi o mesmo utilizado na PCA, com o mesmo pré-processamento (*mean-centering*) e as mesmas transformações matemáticas (*smooth* e normalização). Na Tabela 6 são encontrados os dados obtidos a partir do modelo SIMCA para os conjuntos de calibração e predição conhecido como "classificação incorreta" (*misclassification*) das amostras analisadas.

Tabela 6 – Classificação das amostras para o modelo SIMCA.

Calibração			
	Pred1@4[9]	Pred2@4	Sem correspondência
Classe1	20	0	0
Classe 2	0	31	0
Predição			
	Pred1@4	Pred2@4	Sem correspondência
Classe 1	9	0	0
Classe 2	0	15	0
Sem modelagem	0	0	0

Fonte: elaborado pela autora.

Como foi possível observar na tabela anterior, o modelo SIMCA pode classificar corretamente, utilizando quatro PCs, 100% das amostras tanto para o conjunto de calibração quanto para o conjunto de predição.

[9] @n indica o número de PCs necessárias para atingir os resultados obtidos, no caso foram necessárias 4 PCs

A utilização de ferramentas quimiométricas possibilitou a diminuição significativa do tempo de análise dos resultados, tornando desnecessária a análise individual dos espectros de ^{1}H-NMR.

4.2.3 Amostras comerciais analisadas: autenticação e quantificação de adulterantes

Das 39 amostras comerciais analisadas, 10 foram classificadas como adulteradas utilizando os sinais marcadores na técnica de ^{1}H-NMR e o modelo SIMCA. A porcentagem de adulteração de cada amostra encontra-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Amostras comerciais de café torrado e moído e suas respectivas porcentagens de adulteração.

Amostra	Grau de torra	Origem	Selo ABIC	%Adulteração
1	médio	Minas Gerais	N	-[10]
2	escuro	Minas Gerais	S	(28,7 ± 0,8) m[11]
3	escuro	Santa Catarina	S	(6,62 ± 0,08) cc[12]
4	médio	São Paulo	S	(3,77 ± 0,09) cc
5	escuro	Minas Gerais	S	-
6	escuro	Minas Gerais	N	(30 ± 3) m
7	escuro	Minas Gerais	S	(17,1 ± 0,4) m
8	escuro	Minas Gerais	S	(5,1 ± 0,1) cc
9	escuro	São Paulo	N	(11,0 ± 0,2) cc
10	escuro	São Paulo	N	(5,6 ± 0,3) cc
11	escuro	Minas Gerais	N	(40,0 ± 0,9) cc
12	médio	São Paulo	N	-
13	médio	Espanha	N	-
14	médio	Bahia	S	-
15	médio	Minas Gerais	N	-
16	médio	São Paulo	N	-
17	médio	Colômbia	N	-
18	médio	São Paulo	N	-
19	médio	São Paulo	S	-
20	médio	São Paulo	S	-
21	médio	São Paulo	N	-
22	médio	Minas Gerais	N	-
23	médio	Minas Gerais	N	-
24	médio	Minas Gerais	N	-
25	médio	São Paulo	N	-
26	médio	São Paulo	S	-
27	escuro	Espírito Santo	N	-
28	médio	Minas Gerais	S	-
29	médio	Itália	N	-
30	médio	Minas Gerais	S	-
31	médio	Argentina	N	(12,9 ± 0,5) cc
32	médio	Paraná	N	-
33	escuro	Minas Gerais	S	-
34	escuro	São Paulo	S	-
35	escuro	Paraná	S	-
36	escuro	São Paulo	S	-
37	escuro	Paraíba	S	-
38	médio	São Paulo	S	-
39	escuro	Maranhão	S	-

Fonte: elaborado pela autora.

[10] - = não adulterado
[11] m = milho
[12] cc = cascas de café

Algumas das marcas de café analisadas apresentaram porcentagens de adulteração relativamente altas, acima dos 30%, e cinco dessas marcas de café possuem o selo de pureza da ABIC. Sendo assim, é possível afirmar que de fato a metodologia de análise atualmente utilizada pela ABIC para determinar da pureza em amostras de café pode ser considerada subjetiva e imprópria para a análise desse tipo de amostra, o que é evidenciado pela Figura 39, na qual encontram-se dois espectros pre-sat de ^{1}H-NMR relativos a duas amostras comerciais (2 e 28) que possuem o selo de pureza ABIC, sendo que a amostra 28 é pura e a 2 é adulterada. Sendo assim, é seguro afirmar que os resultados obtidos pela metodologia proposta possuem uma interpretação diferente da dos resultados obtidos por meio da metodologia de microscopia geralmente utilizada.

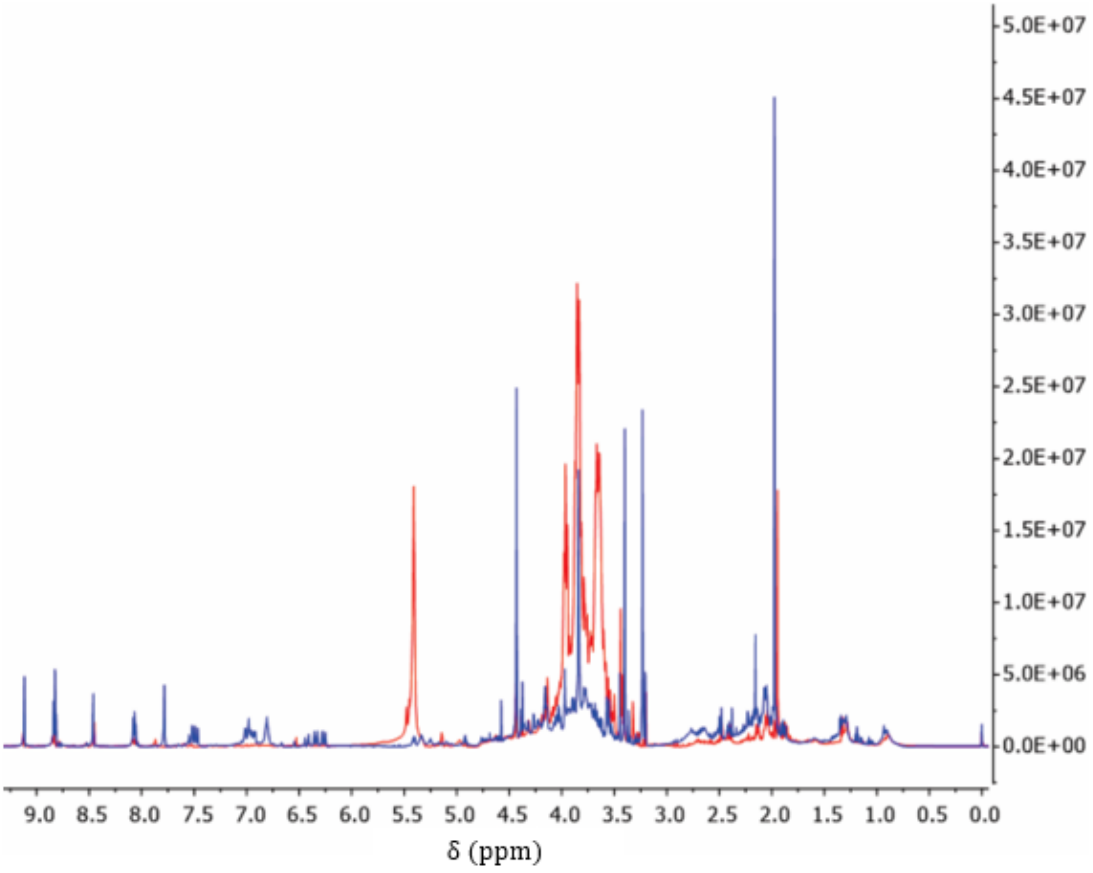


Figura 39 – Espectros pre-sat de ^{1}H-NMR de duas amostras comerciais com selo de pureza ABIC uma adulterada (2, em vermelho) e outra pura (28, em azul).
Fonte: elaborado pela autora.

É importante ressaltar que um café isento de adulterações não resulta, necessariamente, em uma bebida de qualidade. Para que se tenha um café de qualidade uma série de fatores devem serem levados em consideração, como a qualidade e variedade do grão, grau de torra, o aroma produzido após a torra, tipo de

beneficiamento, entre outros. Um café sem adulterantes ainda pode resultar em um produto de baixa qualidade, entretanto, um café adulterado jamais será um de produto qualidade.

Por meio da metodologia aqui descrita, foi possível classificar corretamente 100% das amostras de café analisadas e quantificar a porcentagem de adulterantes, bem como identificar quais adulterantes foram utilizados.

4.3 Autenticação de amostras de óleo de café verde utilizando espectroscopia vibracional e quimiometria

A autenticação de amostras de óleo de café verde foi realizada por meio das técnicas de espectroscopia Raman e espectroscopia no infravermelho médio (Mid-IR). Os resultados dessas metodologias foram confrontados com aqueles obtidos por meio da técnica de GC-FID para determinação dos teores de ácidos graxos em amostras comerciais de óleo de café verde e demais óleos vegetais.

4.3.1 Classificação de amostras de óleo de café verde com espectroscopia Raman e SIMCA

Os espectros de Raman para duas amostras de óleo de café verde sem adulteração podem ser observados na Figura 40. Essas amostras de óleo de café são de safras de anos diferentes, um de 2016 e outro de 2018.

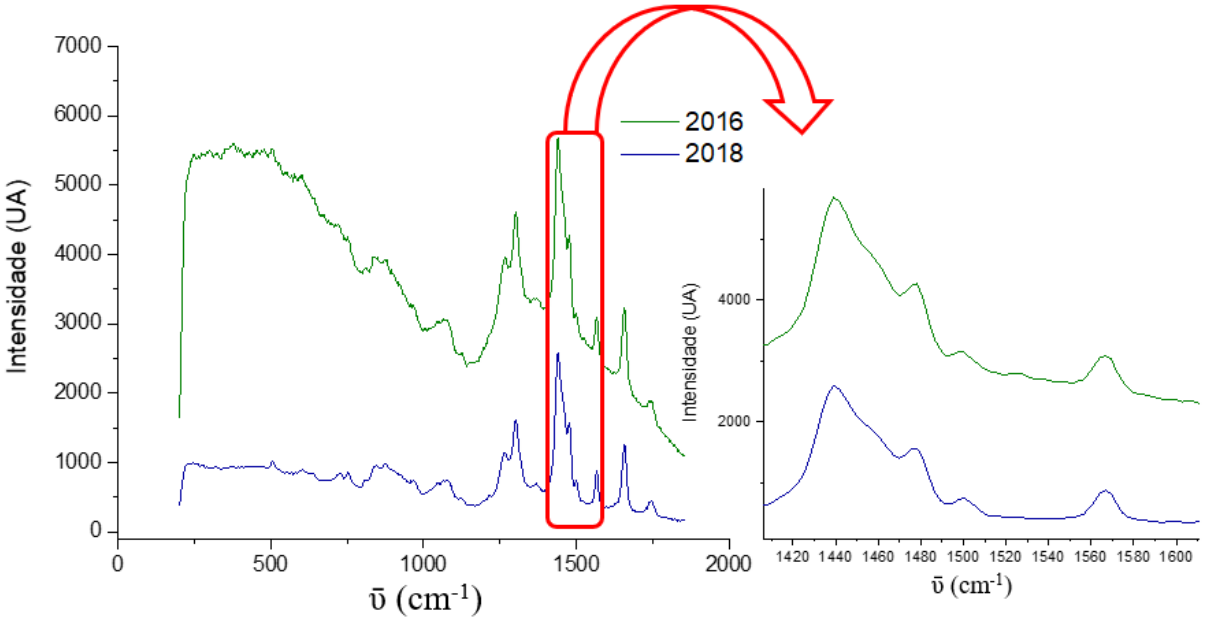


Figura 40 – Espectros de Raman de duas amostras não adulteradas de óleo de café verde.
Fonte: elaborado pela autora.

Nota-se que a intensidade dos sinais relativos à amostra de 2016 é maior que a intensidade da amostra de 2018, principalmente em ῡ variando de 300 a 1000 cm^{-1}. Como mencionado anteriormente, as medidas da espectroscopia Raman são tomadas de tal maneira para que haja minimização de possíveis efeitos da fluorescência, contudo, a presença de clorofila nas amostras de óleo de café verde pode ocasionar a banda observada na figura anterior (Tuccio *et al.*, 2019). A variação da intensidade das bandas pode estar correlacionada ao teor de clorofila apresentado por cada amostra; mesmo que os espectros sejam diferentes, são duas amostras autênticas, isso pode ser afirmado pelos sinais característicos do óleo de café verde encontrados em ῡ 1480 a 1520 cm^{-1}.

Na pode-se observar os espectros de amostras de óleo de café verde e demais óleos vegetais utilizados como possíveis adulterantes.

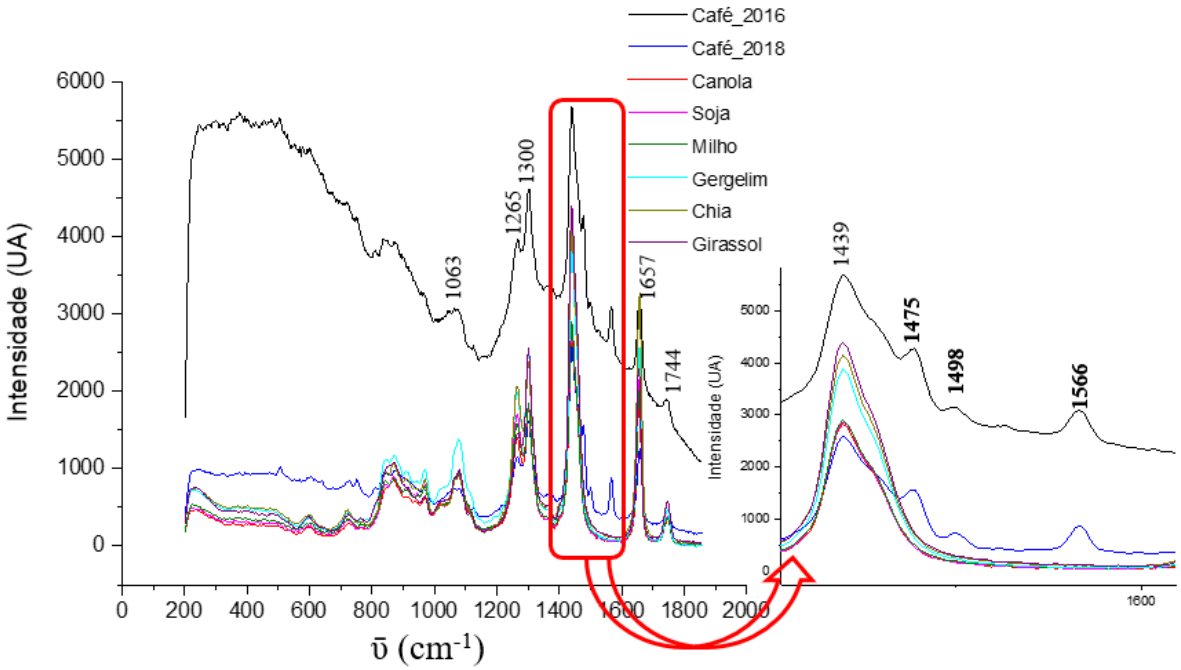


Figura 41 – Espectros de Raman de óleo de café verde e demais óleos vegetais.
Fonte: elaborado pela autora.

Basicamente todos os óleos vegetais analisados, incluindo o óleo de café verde, compartilham grande parte das bandas no espectro Raman. Em ῡ 1744 cm^{-1} há uma banda relacionada ao estiramento vibracional relativo à ligação C=O dos grupamentos RC=OOR de moléculas de ácidos graxos; em ῡ 1657 cm^{-1} há uma banda relativa ao estiramento vibracional de ligações C=C *cis*. Em ῡ 1439 cm^{-1} pode-se observar a banda de deformação da ligação C–H de grupamentos CH_2; a banda em ῡ 1265 cm^{-1} é relativa à deformação da ligação C–H na ligação C=C–H e a banda em ῡ 1063 cm^{-1} é devido ao estiramento das ligações C–C de –(CH_2)– das moléculas de ácidos graxos (Baeten *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2011). Contudo, as partes mais interessantes do espectro Raman são as singularidades relativas aos espectros do óleo de café verde, que estão relacionadas à presença dos diterpenos cafestol e caveol (Figura 42), as bandas não se encontram nos espectros dos demais óleos vegetais analisados: em ῡ 1566 cm^{-1} há uma banda relativa ao estiramento da ligação C_1=C_2 do anel A da molécula de caveol, em ῡ 1498 cm-1 há a banda correspondente ao estiramento C=C do anel furânico (E) da molécula de cafestol e em ῡ 1475 cm^{-1} há a banda resultante do estiramento C=C do anel furânico (E) da molécula de cafestol (Rubayiaza e Meurens, 2005).

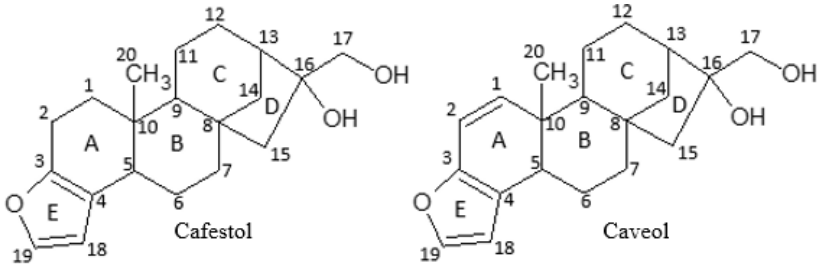


Figura 42 – Fórmulas estruturais do cafesol e caveol com os carbonos numerados.
Fonte: elaborado pela autora.

Ao todo foram analisadas 21 amostras comerciais diferentes de óleo de café verde e seus respectivos espectros Raman podem ser observados na Figura 43. Dessas 21 amostras, 10 apresentavam adulteração como pode ser observado na figura a seguir; das 10 amostras adulteradas, oito delas não apresentam qualquer indício da presença de óleo de café verde, pois não há sinal das bandas características de cafestol e caveol.

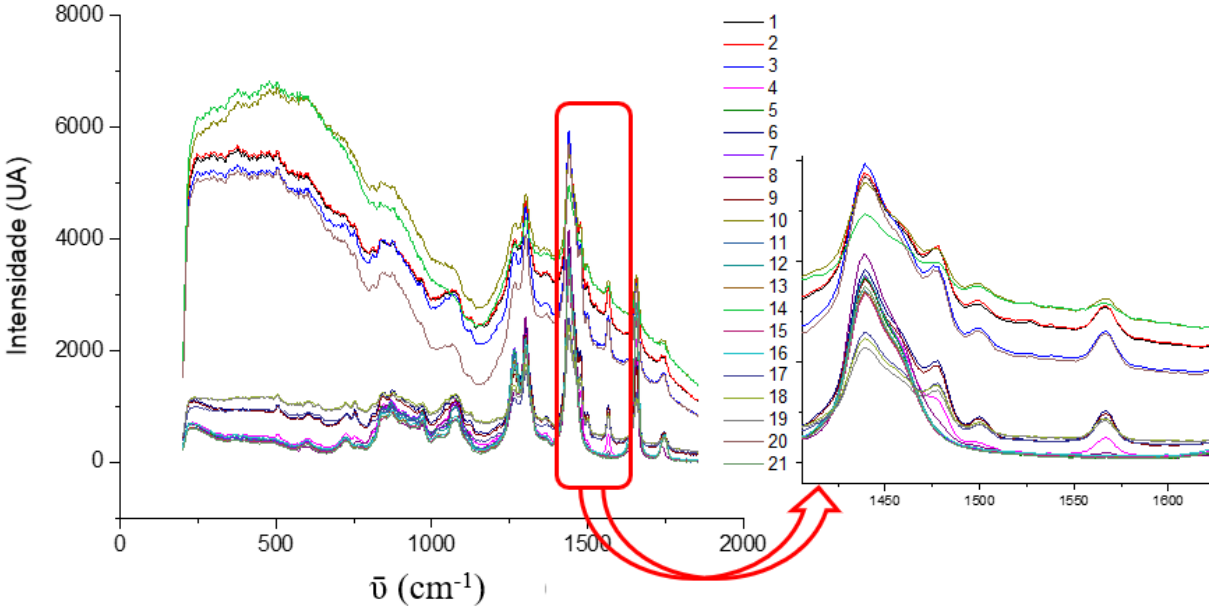


Figura 43 – Espectros de Raman das 21 amostras comerciais de óleo de café verde.
Fonte: elaborado pela autora.

Foi construído um modelo de SIMCA para classificar as amostras de óleo de café verde. Para os resultados apresentados no modelo SIMCA, as análises foram feitas em duplicata. Três classes foram atribuídas às amostras: classe 1 representando as amostras comerciais não adulteradas, classe 2 para as amostras comerciais adulteradas e classe 3 para as amostras adulteradas em laboratório (com seis óleos vegetais e porcentagens de adulterante de 1, 2,5, 5, 10, 20, 50 e 75%). O

intervalo espectral utilizado para na matriz de dados utilizada para construção do modelo SIMCA é ῡ 1456 – 1722 cm^{-1}, resultando em 129 variáveis; esse intervalo foi selecionado por conter os principais sinais responsáveis pela distinção entre amostras pura e adulteradas. Sendo assim, a matriz resultante (158, 129) possuía 157 amostras, dentre amostras comerciais e adulteradas em laboratório, com os espectros de cada uma delas tomado em duplicata.

Na Figura 43 foi possível observar os gráficos de projeção de classes e distância de classes para o modelo SIMCA obtidos utilizando pré-processamento centrado na média e as transformações matemáticas aplicadas foram normalização e suavização. Para tal modelo de classificação, foram utilizadas cinco PCs.

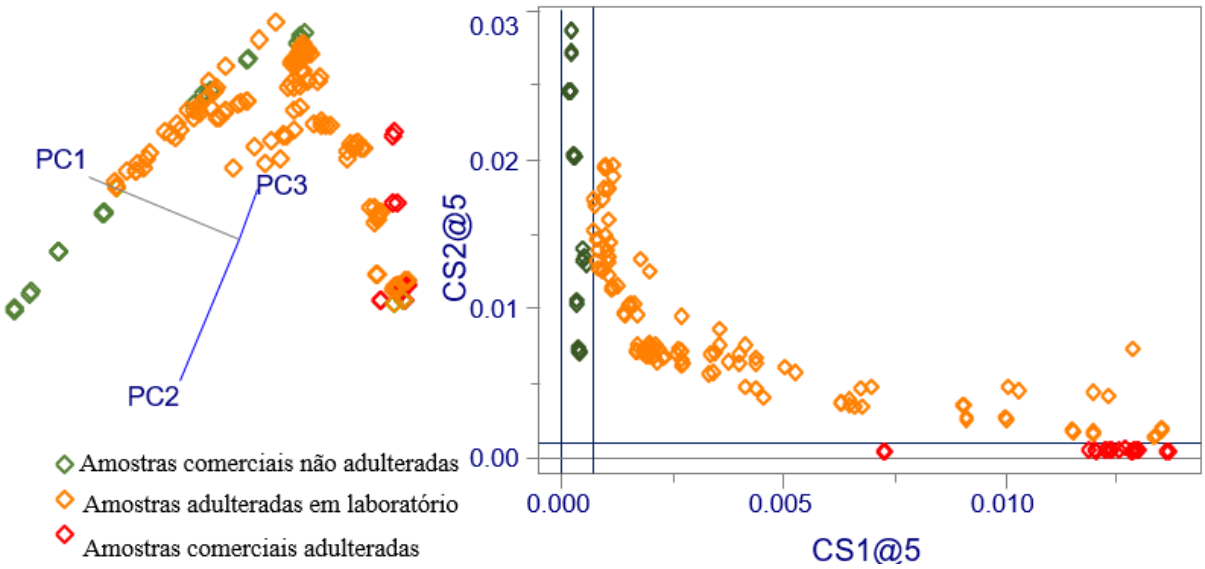


Figura 44 – Projeção de classes e distância de classes do modelo SIMCA para as amostras de óleo de café verde.
Fonte: elaborado pela autora.

Nas Tabela 8 podem ser observados as distâncias interclasses para o modelo de SIMCA construído; na Tabela 9 tem-se os dados de “classificações incorretas” (*misclassifications*) para o mesmo modelo quimiométrico.

Tabela 8 – Distância interclasse para o modelo SIMCA das amostras de óleo de café verde.

	CS1@5	**CS2@5**	**CS3@5**
CS1	0	40,75	4,66
CS2	40,75	0	8,74
CS3	4,66	8,74	0

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 9 – Classificações incorretas do modelo SIMCA para amostras de óleo de café verde.

	Pred1@5	**Pred2@5**	**Pred3@5**	**Sem modelagem**
Classe1	22	0	0	0
Classe2	0	20	0	0
Classe3	0	0	120	0

Fonte: elaborado pela autora.

Como é possível observar nas figuras e tabelas anteriores, o modelo SIMCA classificou corretamente 100% das amostras analisadas, consequentemente, não apresentando nenhuma classificação incorreta no modelo. Os valores das distâncias interclasses também reforçam a capacidade do modelo quimiométrico em diferenciar as amostras adulteradas e não adulteradas de óleo de café verde, uma vez que o valor das distâncias interclasses é suficiente para garantir que as classes são, de fato, distintas. (Vogt e Knutsen, 1985).

Na Figura 45 apresentada é possível observar o gráfico de capacidade de discriminação do modelo SIMCA para averiguar quais bandas são responsáveis pela diferenciação das amostras puras e adulteradas.

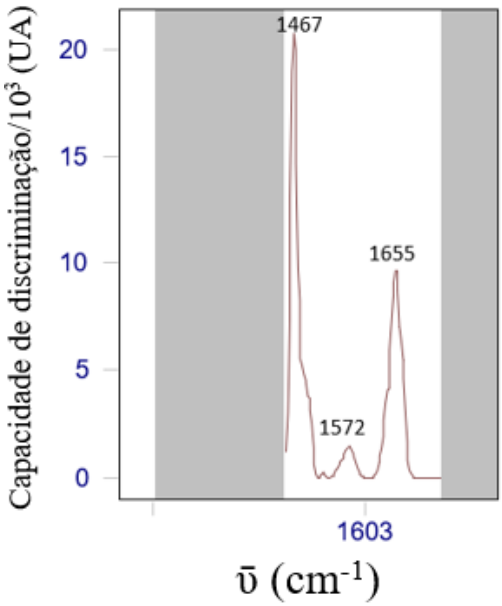


Figura 45 – Capacidade discriminante do modelo SIMCA para espectroscopia Raman.
Fonte: elaborado pela autora.

As principais bandas responsáveis pela discriminação entre amostras de óleo de café verde puras e adulteradas ῡ 1655 cm^{-1} característica do estiramento da ligação cis C=C em moléculas de ácidos graxos; ῡ 1572 cm^{-1} relativa ao estiramento dos carbonos C_1=C_2 do anel A na molécula de caveol e ῡ 1467 cm-1 que corresponde ao estiramento da ligação C=C do anel furânico da molécula de caveol (Figueiredo *et al.*, 2019).

Por meio da metodologia de espectroscopia Raman com auxílio da ferramenta quimiométrica SIMCA foi possível autenticar amostras de óleo de café verde com níveis de adulteração a partir de 1% com uma taxa de acerto de 100%. Dentre as 21 amostras comerciais analisadas, 10 apresentaram adulteração e 80% das amostras comerciais de “óleo de café verde” não continham sequer óleo de café em sua composição, conforme observado nos espectros Raman anteriormente apresentados.

4.3.2 Classificação de amostras de óleo de café verde com espectroscopia no infravermelho médio e SIMCA

As amostras de óleo de café verde também foram analisadas com auxílio de equipamento portátil de Mid-IR. Na Figura 46 foi possível observar os espectros de infravermelho próximo para as amostras de óleo de café verde dos anos de 2016 e 2018. Diferente do que acontece com a espectroscopia Raman, as amostras de óleo de café de anos diferentes não apresentaram diferenças significativas entre os espectros de Mid-IR.

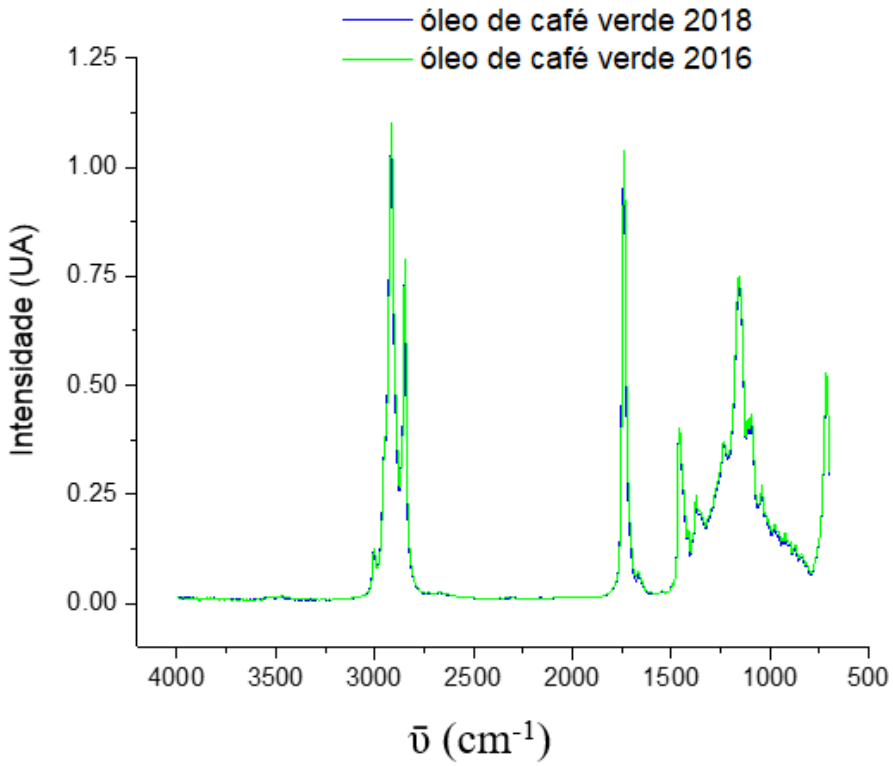


Figura 46 – Espectros de infravermelho médio de duas amostras de óleo de café verde.
Fonte: elaborado pela autora.

Na Figura 47 há uma sobreposição dos espectros de infravermelho médio de amostras de óleo de café e demais óleos vegetais utilizados como adulterante. Nota-se que na região de *fingerprint* do espectro de Mid-IR tem-se as principais distinções entre o espectro de óleo de café verde e seus possíveis adulterantes.

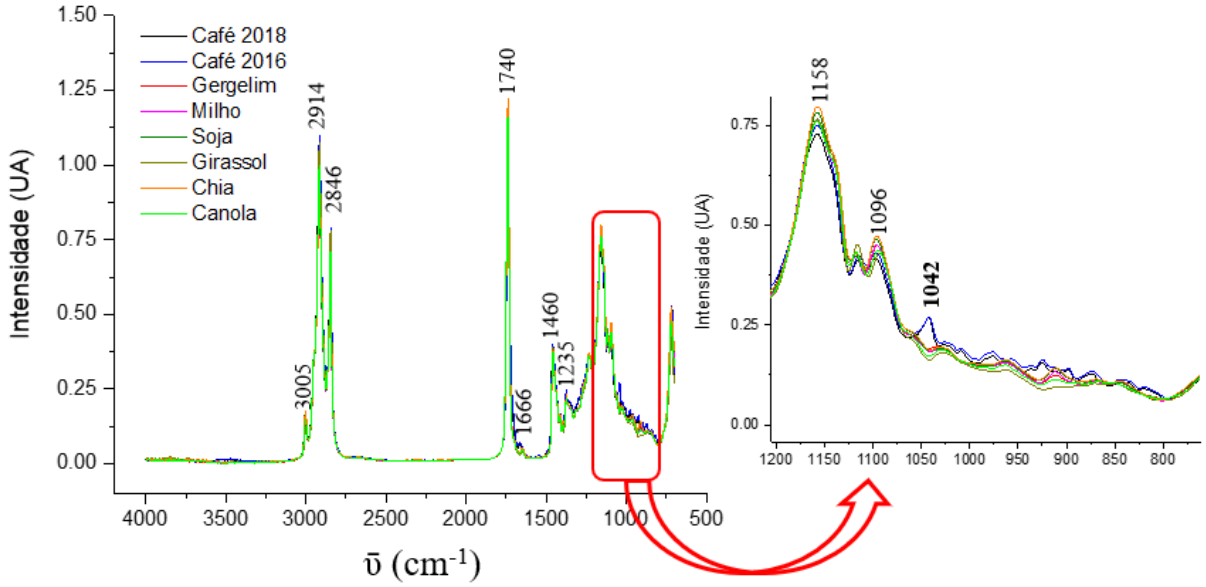


Figura 47 – Espectros de infravermelho médio de óleo de café verde e demais óleos vegetais.
Fonte: elaborado pela autora.

Os espectros de infravermelho médio dos óleos vegetais são bastante similares, apresentando os mesmos sinais: ῡ 3005 cm^{-1} há uma banda referente ao estiramento da ligação H–C= em moléculas insaturadas de ácidos graxos, em ῡ 2914 cm^{-1} tem-se a banda relativa aos estiramentos assimétricos das ligações de CH_2 e CH_3, já a banda em ῡ 2846 cm^{-1} corresponde aos estiramentos simétricos de ligações C–H em CH_2 e CH_3; a banda em ῡ 1730 cm^{-1} é referente ao estiramento da ligação C=O de ésteres de ácidos graxos e em ῡ 1666 cm^{-1} há uma banda correspondente à ligação C=O referente às ligações peptídicas em proteínas (Obeidat, Hammoudeh e Alomary, 2018). Em ῡ 1480 cm^{-1} pode ser observada uma banda relativa ao dobramento da ligação C–H (Topala e Tataru, 2015); em ῡ 1235 cm^{-1} há vibrações relativas ao estiramento das ligações C–O de ésteres de ácidos graxos (Atabani *et al.*, 2019); a banda em ῡ 1158 cm^{-1} está relacionada ligação C–N em aminas secundárias (Topala e Tataru, 2015). Em ῡ 1096 cm^{-1} há um abanda correspondente à ligação –C–O presente em ésteres e a banda em ῡ 718 cm^{-1} indica a existência de dobramentos de (-C=H) em alcenos *cis*-dissubstituídos e aromáticos funcionais (Atabani *et al.*, 2019).

Contudo, apesar das similaridades entre os espectros, na região de *fingerprint*, há em banda em ῡ 1042 cm^{-1} que pode estar correlacionada à presença de ácido quínico, presentes exclusivamente no óleo de café e, consequentemente, ausente nos demais óleos vegetais analisados; essa banda é resultado da deformação axial da

ligação C–O do ácido quínico, cuja estrutura encontra-se representada na Figura 48, que pode ocorrer na faixa de ῡ 1085-1050 cm^{-1}, bem como a ligação do tipo C–O–C de ésteres que possui uma banda de absorção entre ῡ 1300-1000 cm^{-1} (Pavia *et al.*, 2014).

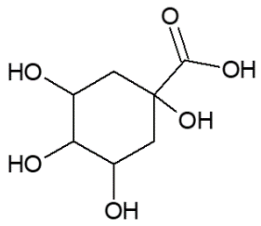


Figura 48 – Fórmula estrutural do ácido quínico.
Fonte: elaborado pela autora.

Os espectros das 21 amostras comerciais de óleo de café verde podem ser encontrados na Figura 49. Nota-se que a amostra 8 apresenta um comportamento anormal em relação as demais amostras, por esse motivo ela foi excluída do conjunto de dados para o tratamento quimiométrico.

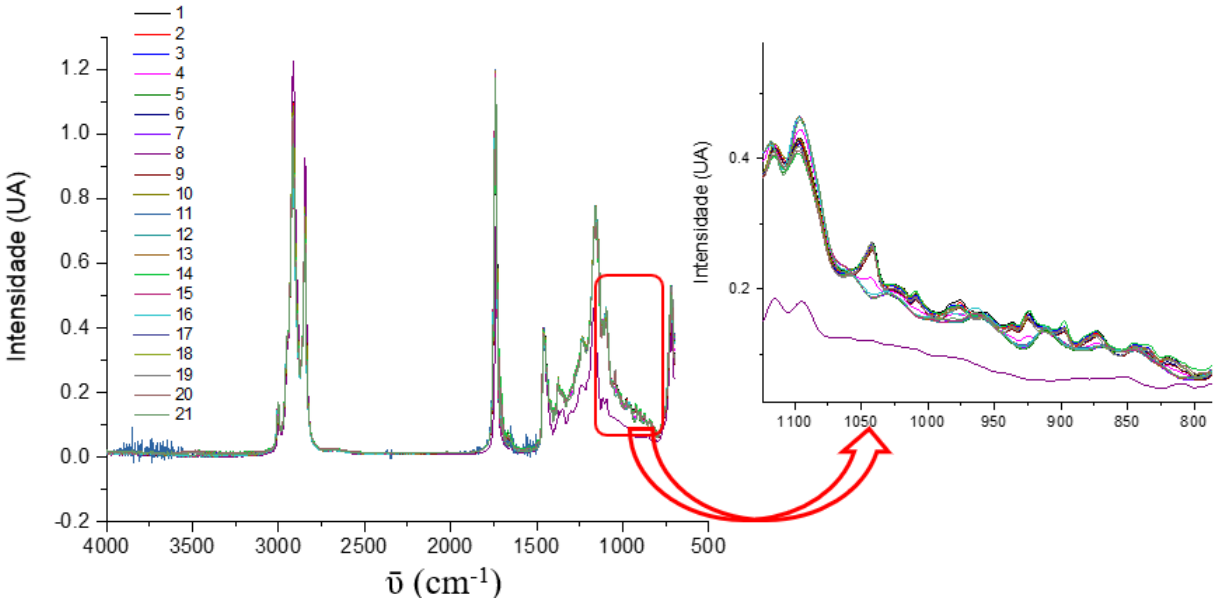


Figura 49 – Espectros de infravermelho médio das amostras comerciais de óleo de café verde.
Fonte: elaborado pela autora.

O tratamento quimiométrico escolhido para classificar as amostras de óleo de café verde foi SIMCA, cujo intervalo espectral selecionado varia de ῡ 1330 a 800 cm^{-1}, correspondente a 207 variáveis e 165 amostras, resultando em uma matriz de dados matiz de dados (165, 207). O pré-processamento aplicado foi centrar na média, enquanto as transformações matemáticas selecionadas consistiam em normalização

e suavização. Na Figura 50 é possível observar a projeção de classes e a distância entre classes obtidas para o modelo SIMCA relativo às análises de amostras de óleo de café verde por espectroscopia no infravermelho próximo. Três classes diferentes foram atribuídas às amostras: classe 1 representando as amostras comerciais não adulteradas, classe 2 para as amostras comerciais adulteradas e classe 3 para as amostras adulteradas em laboratório (com seis óleos vegetais e porcentagens de adulterante de 1, 2,5, 5, 10, 20, 50 e 75%). O número de PCs necessário para obtenção dos resultados foi igual a seis.

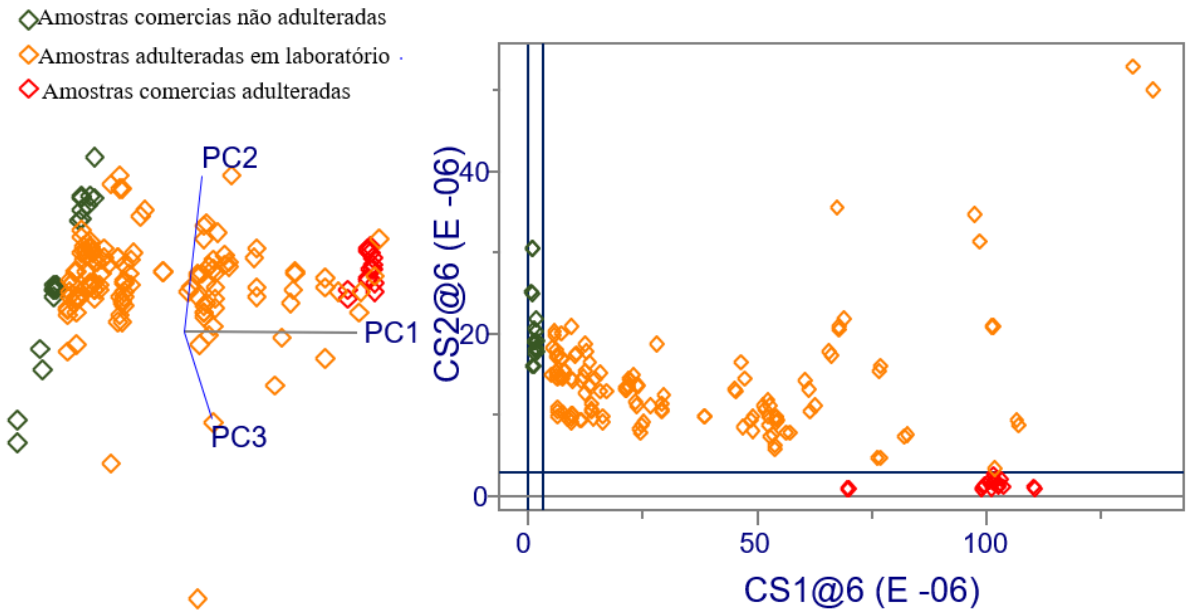


Figura 50 – Projeção de classes e distância entre classes do modelo SIMCA para análises de espectroscopia no infravermelho médio.

Fonte: elaborado pela autora.

Na Tabela 10 são apresentadas as distâncias interclasses obtidas para o modelo SIMCA para as análises de amostras de óleo de café verde com a técnica de Mid-IR; já na Tabela 11 podem ser observadas as classificações incorretas para o mesmo modelo SIMCA.

Tabela 10 – Distância interclasse do modelo SIMCA para espectroscopia no infravermelho médio das análises de óleo de café verde.

	CS1@6	**CS2@6**	**CS3@7**
CS1	0,00	51,53	14,22
CS2	51,53	0.00	4.50
CS3	14,22	4,50	0,00

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 11 – Classificações incorretas do modelo SIMCA para análises de óleo de café verde com espectroscopia no infravermelho médio.

	Pred1@5	**Pred2@5**	**Pred3@5**	**Sem modelagem**
Classe1	22	0	0	0
Classe2	0	18	0	0
Classe3	0	2	124	1

Fonte: elaborado pela autora.

Para obter os resultados expostos anteriormente, as análises foram feitas em duplicata, também foi necessário excluir a amostra 8 do conjunto de dados por tratar-se de um *outlier,* conforme evidenciado pela distância de Mahalanobis, conforme afirmado anteriormente, também os resultados apresentados para as análises realizadas com auxílio do equipamento de infravermelho médio não contêm as amostras adulteradas em laboratório com 1 e 2,5% de adulteração, uma vez que o modelo SIMCA não foi capaz de diferenciá-las das amostras de óleo de café verde não adulteradas.

O modelo SIMCA classificou corretamente 100% das amostras comerciais sejam elas adulteradas ou puras, em relação às amostras adulteradas em laboratório a taxa de classificação correta foi de 97,8% pois duas amostras foram classificadas como sendo comerciais e adulteradas, o que não interfere na qualidade do modelo uma vez que também são amostras adulteradas, mesmo tendo sido adulteradas em laboratório. Sendo assim, foi possível afirmar que o modelo SIMCA foi capaz de classificar corretamente amostras de óleo de café verde com níveis de adulteração de até 5% com auxílio da técnica de espectroscopia no infravermelho médio. Também vale ressaltar que as distâncias interclasses possuem grandeza suficiente para assegurar que as classes são, de fato, distintas (Vogt e Knutsen, 1985).

Os principais números de onda responsáveis pela diferenciação entre as amostras de óleo de café podem ser observados no gráfico de capacidade de discriminação encontrado na Figura 51.

.

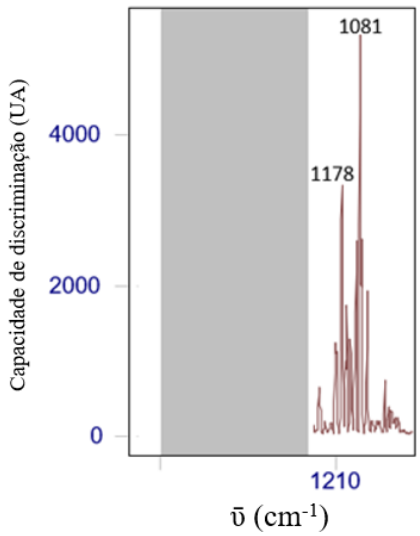


Figura 51 – Capacidade discriminante do modelo SIMCA para espectroscopia Raman.
Fonte: elaborado pela autora.

Tendo em vista a figura anterior, a principal região do espectro de infravermelho responsável pela classificação das amostras de óleo de café verde é ῡ 1085-1050 cm^{-1} – característica da presença de prensa de ácido quínico, por conta da deformação axial da ligação C–O (Craig, Franca e Oliveira, 2012).

4.3.3 Determinação da composição de ácidos graxos das amostras de óleos vegetais utilizando GC-FID

A fim de confirmar a composição da fração de ácidos graxos dos óleos vegetais estudados (café verde, soja, milho, canola, gergelim, girassol e chia) e corroborar os resultados encontrados nas análises de espectroscopia vibracional, as amostras foram submetidas à análise de cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama, conforme descrito anteriormente no item 3.7.

A análise cromatográfica aqui descrita utiliza altos volumes de solventes orgânicos, elevado custo associado a operação do equipamento, bem como análises demoradas e demanda de preparo de amostra. Em contrapartida, as metodologias de espectroscopia vibracional aqui utilizadas, conforme afirmado anteriormente, não necessitam de qualquer preparo de amostra e foram realizadas em equipamentos portáteis o que torna possível a realização de análises *in situ*, com menor custo e em equipamento de mais fácil operação.

Na Tabela 12 é possível encontrar as porcentagens de cada um dos principais ácidos graxos encontrados nas amostras de óleos vegetais estudados no presente trabalho. Nota-se que os resultados obtidos experimentalmente são bastante próximos aos resultados descritos previamente na literatura.

Tabela 12 – Composição dos ácidos graxos de diferentes óleos vegetais encontrados por meio de GC-FID

AG% / Óleo	C16:0 palmítico	C18:0 oleico	C18:1 esteárico	C18:2 linoleico	C20:0 araquídico	C18:3 linolênico
Café verde	32,2	8,35	8,62	45,3	3,08	1,67
Canola	4,13	1,91	63,0	21,1	0,638	8,88
Milho	11,5	1,62	29,6	55,8	0,353	0,921
Gergelim	10,1	4,62	38,9	45,3	0,572	0.,50
Soja	11.1	4,76	20,6	53,9	0,349	8,97
Chia	8,13	4,31	7,18	23,7	n.d[13]	54,70
Girassol	5,33	1,98	23,8	67,8	0,76	n.d.

Fonte: elaborado pela autora.

Na Tabela 13, estão descritas as porcentagens de ácidos graxos das 21 amostras comerciais de óleo de café verde analisadas.

[13] n.d. não detectado

Tabela 13 – Composição de ácidos graxos das amostras de óleo de café verde.

Amostra	Origem	%C16:0 (pal)	%C18:0 (est)	%C18:1 (ole)	%C18:2 (lin)	%C20:0 (arac)	%C18:3 (linol)	Fonte de Adulteração
1	Brasil	32,1	8,35	8,62	45,3	3,08	1,67	-
2	Brasil	32,6	8,14	8,53	45,3	3,00	1,68	-
3	Brasil	33,4	7,95	8,76	44,9	2,85	1,51	-
4	Brasil	15,7	5,20	27,3	49,1	1,30	0,70	Milho
5	Brasil	7,13	4,04	29,9	56,0	0,33	1,97	Milho
6	USA	32,3	8,45	8,46	45,0	3,35	1,71	-
7	USA	12,2	4,62	20,5	54,8	0,35	6,96	Soja
8	USA	8,37	2,09	9,90	11,3	0,74	67,2	Chia
9	USA	32,2	8,46	8,79	44,8	3,39	1,68	-
10	USA	35,0	6,94	7,89	45,3	2,77	1,47	-
11	USA	11,0	4,76	22,5	53,8	0,40	8,51	Soja
12	USA	10,9	4,68	21,0	54,2	0,35	8,49	Soja
13	USA	10,5	4,52	20,4	55,5	0,49	8,26	Soja
14	USA	32,6	7,95	7,16	46,7	3,21	1,62	-
15	USA	10,7	4,82	20,31	55,3	0,38	8,18	Soja
16	USA	14,0	2,55	14,5	68,1	0,14	0,21	Girassol
17	Brasil	31,4	8,71	9,66	44,5	3,30	1,64	-
18	Brasil	31,5	8,72	9,65	44,4	3,27	1,64	-
19	Brasil	31,6	8,69	9,63	44,4	3,28	1,64	-
20	Brasil	33,3	7,95	8,77	44,9	2,96	1,52	-
21	Brasil	5,9	3,69	20,97	59,3	0,24	0,08	Milho

Fonte: elaborado pela autora.

Como é possível observar na tabela apresentada anteriormente, das 21 amostras comerciais analisadas, 10 delas encontravam-se adulteradas e, com exceção das amostras 4 e 16, as demais amostras adulteradas não continham nenhum traço de óleo de café, o que é evidenciado pelos teores mais elevados de ácido palmítico e ácido araquídico, quando comparadas com as demais amostras adulteradas, nos espectros de Raman também é possível observar bandas com intensidades singelas relativas aos compostos cafestol e caveol, substâncias exclusivas do óleo de café verde. Também pode-se perceber que dentre as amostras adulteradas provenientes do Brasil, a principal fonte de adulteração é o óleo de milho; enquanto as amostras adulteradas provenientes dos Estados Unidos, em sua maioria, estão adulteradas com óleo de soja, com exceção das amostras 8 e 16 que, provavelmente, estão adulteradas com óleo de chia e girassol, respectivamente.

4.4 Autenticação de amostras de café torrado e moído utilizando espectroscopia vibracional e quimiometria

A autenticação de amostras de café torrado e moído foi realizada por meio das técnicas de espectroscopia no infravermelho médio (Mid-IR) e próximo (NIR). A confirmação dos resultados obtidos por Mid-IR e NIR das amostras de café foi feita por meio da técnica de ^{1}H-NMR.

4.4.1 Classificação de amostras de café torrado e moído utilizando espectroscopia no infravermelho próximo e SIMCA

Na Figura 52 foi possível observar os espectros de infravermelho próximo para uma amostra de café e dos adulterantes estudados. As principais bandas estão indicadas e serão discutidas a seguir.

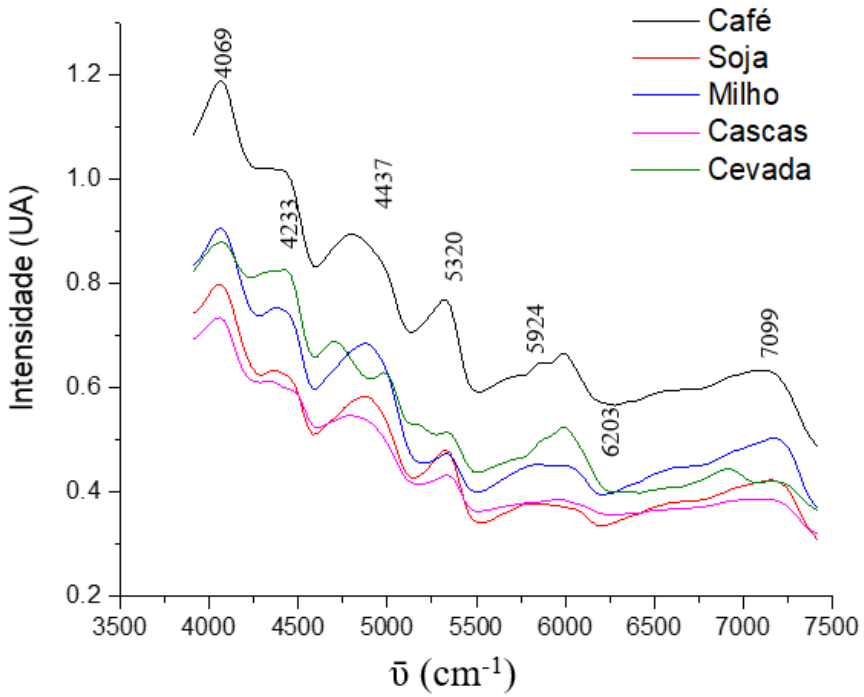


Figura 52 – Comparação dos espectros de infravermelho próximo de café e possíveis adulterantes.
Fonte: elaborado pela autora.

As bandas de absorção associadas com as ligações C–H da cafeína podem ser observadas em ῡ 4069 e 5924 cm^{-1}; essas mesmas bandas podem estar relacionadas às bandas de absorção das ligações C–H de ácidos graxos, aminoácidos e lignina. As bandas de absorção da ligação O–H são encontradas em ῡ 6203 e

5320 cm^{-1} e estão relacionas principalmente à presença de celulose; também a celulose é responsável pela banda em ῡ 4223 cm^{-1} atribuída às ligações C–H e O–H. Em ῡ 7099 cm^{-1} há uma banda de absorção relacionada à ligação N–H de poliamidas, já as bandas de proteínas podem ser observadas podem ser observadas em torno de ῡ 6200, 5900 e 4400 cm^{-1} (Giraudo *et al.*, 2019).

Para autenticação de amostras de café com auxílio da técnica de infravermelho próximo foi desenvolvido um modelo SIMCA com 90 amostras de café juntamente com 24 amostras de café adulterando em laboratório com os quatro adulterantes selecionadas, as porcentagens de adulteração variam de 5 até 60%. A matriz de dados consistia em 342 amostras e 168 variáveis (342, 168), uma vez que cada amostra foi analisada em triplicata. O pré-processamento selecionada foi centrar na média, juntamente com transformações matemáticas de normalização e suavização. Na Figura 53 são observadas a projeção de classes e a distância de classes para o modelo SIMCA de autenticação de amostras de café torrado e moído. As duas classes do modelo são para amostras comerciais (classe 1) e amostras adulteradas em laboratório (classe 2).

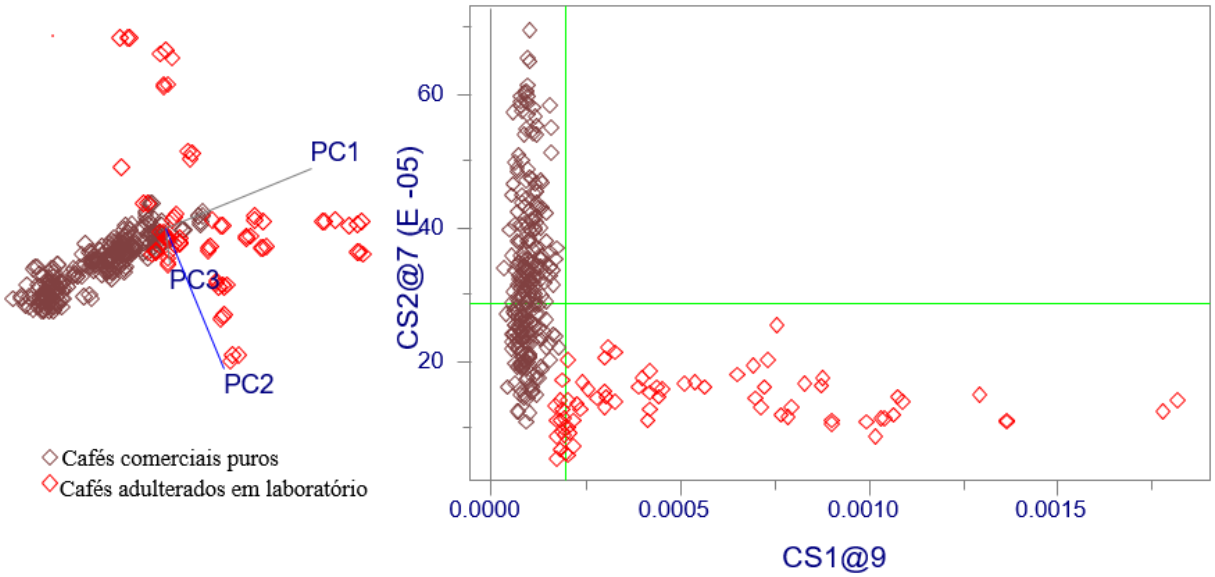


Figura 53 – Projeção de classes e distância de classes do modelo SIMCA para análises de café com espectroscopia no infravermelho próximo.
Fonte: elaborado pela autora.

Na Tabela 14 pode-se observar os valores de distância interclasses do modelo SIMCA e na Tabela 15 constam o número de classificações incorretas de amostras para o mesmo modelo obtido a partir das análises de infravermelho próximo. Para os resultados descritos foram selecionados 9 fatores para a classe 1 e 7 fatores para

classe 2.

Tabela 14 – Distância interclasses do modelo SIMCA para análises de café torrado e moído com espectroscopia no infravermelho próximo.

	CS1@9	CS2@7
CS1	0,00	3,52
CS2	3,52	0.00

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 15 – Classificações incorretas do modelo SIMCA para análises de café torrado e moído com espectroscopia no infravermelho próximo.

	Pred1@9	Pred2@7	Sem modelagem
Classe1	270	0	0
Classe2	0	72	0

Fonte: elaborado pela autora.

Como foi possível observar pelos resultados expostos nas tabelas anteriores, o modelo SIMCA foi capaz de classificar corretamente 100% das amostras de café, tanto em relação às amostras comerciais quanto aquelas adulteradas em laboratório. O valor da distância interclasse encontrado é suficiente para assegurar que, de fato, há duas classes distintas (Vogt e Knutsen, 1985).

Por meio do gráfico de capacidade discriminante do modelo, encontrado na Figura 54, foi possível observar quais bandas foram mais importantes para a classificação das amostras de café. No caso, a banda que mais contribuiu para diferenciação das amostras foi aquela em $\bar{\upsilon}$ 5703 cm^{-1} que provavelmente corresponde à ligação N–H de proteínas (Giraudo *et al.*, 2019).

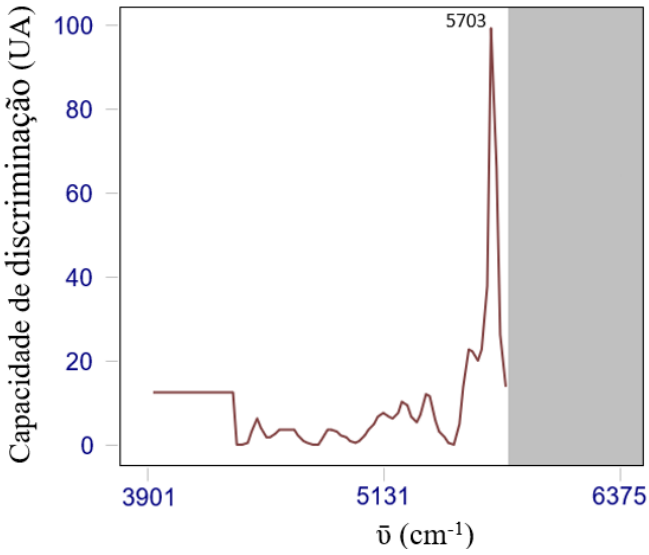


Figura 54 – Capacidade discriminante do modelo SIMCA para espectroscopia no infravermelho próximo

Fonte: elaborado pela autora.

Por meio das análises com a técnica de espectroscopia no infravermelho

próximo e do modelo SIMCA desenvolvido foi possível classificar corretamente 100% das 90 amostras de café analisadas com níveis de adulterantes de até 5% utilizando um equipamento portátil, de fácil manuseio, com rápida obtenção de dados e sem a necessidade de qualquer tipo de preparo de amostra.

4.4.2 Classificação de amostras de café torrado e moído utilizando espectroscopia no infravermelho médio e SIMCA

O espectro de infravermelho médio do café torrado e moído pode ser visualizado na Figura 55 juntamente com os espectros dos quatro possíveis adulterantes estudados também em suas formas torrados e moídos; também estão destacadas as principais bandas do espectro.

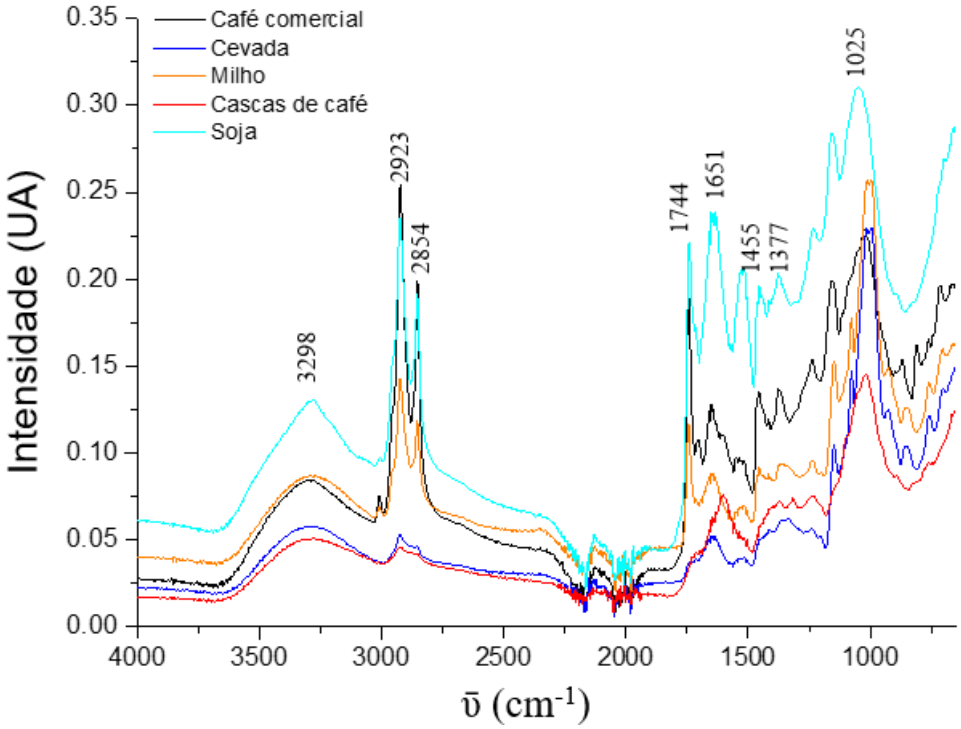


Figura 55 – Espectros de infravermelho médio de uma amostra de café torrado e moído e seus possíveis adulterantes.
Fonte: elaborado pelo autor.

A banda larga em ῡ 3298 cm^{-1} é relativa ao estiramento da ligação O–H e pode ser atribuída a compostos hidroxilados, como açúcares, fenóis ou mesmo ácidos carboxílicos. A banda em ῡ 2923 cm^{-1} está relacionada ao estiramento assimétrico de C–H alifático e a banda ῡ 2854 cm^{-1} corresponde ao estiramento simétrico do mesmo tipo de ligação. Em ῡ 1744 cm^{-1} há uma banda relativa à deformação axial da ligação C=O de ésteres. A banda em ῡ 1651 cm^{-1} é relativa ao estiramento da ligação C=C de

compostos aromáticos. Em ῡ 1455 cm-1 existe uma banda correspondente à deformação assimétrica de C–H alifático. As bandas em ῡ 1377 e 1025 cm^{-1} podem estar relacionadas ao estiramento e deformação da ligação C–O, respectivamente (Correia *et al.*, 2016).

O tratamento quimiométrico dos dados obtidos por meio da técnica de infravermelho médio para as análises de amostras de café torrado e moído teve como resultado um modelo SIMCA com o pré-processamento centrado na média e transformações de segunda derivada e suavização. Ao todo foram analisadas 90 amostras comerciais de café, juntamente com 24 amostras de café adulteradas em laboratório com cascas de café, soja, cevada e milho, com porcentagens de adulteração variando de 5 até 60%. Porém, após a construção do modelo quimiométrico, ao avaliar os resultados obtidos, optou-se por retirar 4 amostras para que fossem obtidos melhores resultados, uma vez que elas foram classificadas como outliers de acordo com os resultados do teste de distância de Mahalanobis. Como trata-se de uma redução de 4,44% do número de amostras, acredita-se que não há comprometimento da qualidade do modelo. Sendo assim, no modelo SIMCA final, o número de amostras comerciais analisado foi igual a 258 (86 amostras em triplicata) e as amostras de café adulteradas em laboratório é igual a 72 (24 amostras em triplicata), resultando em uma matriz com 330 amostras e 707 variáveis (330, 770).

Os gráficos de projeção de classes e distância de classe podem ser observados na Figura 56. Para obter os resultados descritos posteriormente foram necessárias 9 PCs para cada uma das classes, sendo que a classe 1 representa as amostras de café comerciais e classe 2 representa as amostras de café adulteradas em laboratório.

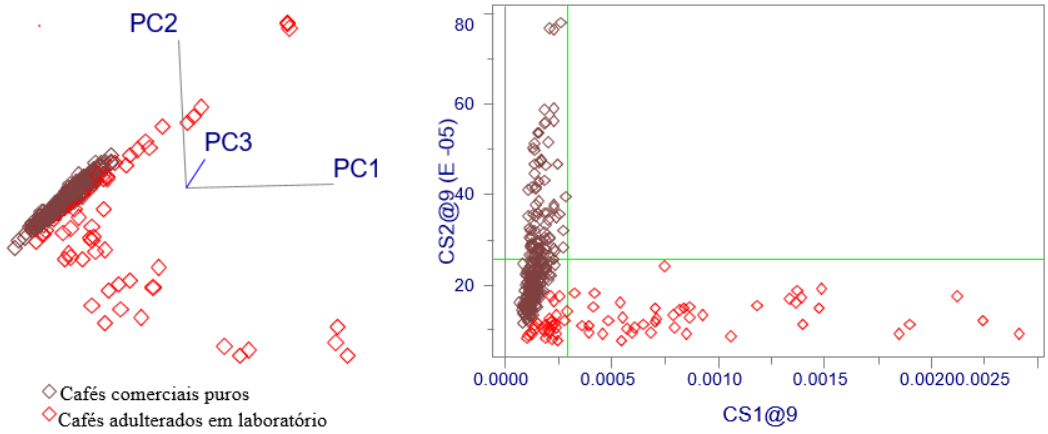


Figura 56 – Projeção de classes e distância de classes do modelo SIMCA para análises de Mid-IR e amostras de café.
Fonte: elaborado pela autora.

Na Tabela 16 foi possível observar os valores de distância interclasses para o modelo SIMCA; já na Tabela 17 tem-se os dados de classificações incorretas para o mesmo modelo.

Tabela 16 – Distância interclasses do modelo SIMCA para análises de café torrado e moído com espectroscopia no infravermelho médio.

	CS1@9	**CS2@9**
CS1	0,00	5,17
CS2	5,17	0.00

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 17 – Classificações incorretas do modelo SIMCA para análises de café torrado e moído com espectroscopia no infravermelho médio.

	Pred1@9	**Pred2@9**	**Sem modelagem**
Classe1	256	0	0
Classe2	0	72	0

Fonte: elaborado pela autora.

Observou-se pelos resultados expostos nas tabelas anteriores que o modelo SIMCA foi capaz de classificar corretamente 100% das amostras de café, tanto em relação às amostras comerciais quanto aquelas adulteradas em laboratório, com níveis de adulteração de até 5%. O valor da distância interclasse encontrado é suficiente para assegurar que, de fato, há duas classes distintas (Vogt e Knutsen, 1985).

Por meio do gráfico de capacidade discriminante do modelo, encontrado na Figura 57, observou-se quais bandas foram mais importantes para a classificação das amostras de café. No caso, a banda que mais contribuiu para diferenciação das amostras estava localiza em ῡ 950 cm^{-1} que possivelmente se refere à ligação O–H (Pavia *et al.*, 2014). A banda em torno de ῡ 2800 cm^{-1} é relativa ao estiramento simétrico da ligação C–H alifático e a banda em ῡ 1054 cm^{-1} representa a deformação da ligação C–O (Correia *et al.*, 2016).

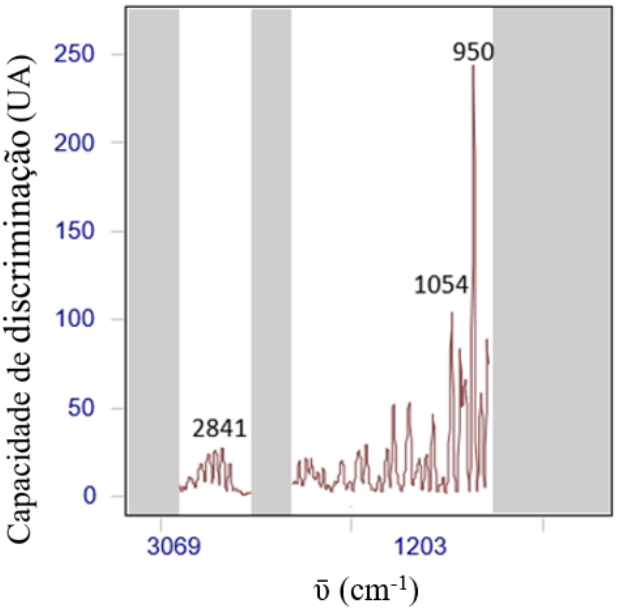


Figura 57 – Capacidade discriminante do modelo SIMCA para espectroscopia no infravermelho médio.
Fonte: elaborado pela autora.

Por meio das análises com a técnica de espectroscopia no infravermelho médio e do modelo SIMCA desenvolvido foi possível classificar corretamente 100% das amostras de café analisadas com níveis de adulteração de até 5% utilizando um equipamento de infravermelho portátil, de fácil manuseio, com rápida obtenção de dados e sem a necessidade de qualquer tipo de preparo de amostra.

4.5 Determinação das concentrações de TAG e AGL em amostras de diferentes anos utilizando GC-FID

A fim de averiguar a degradação da fração e triacilgliceróis (TAG) e consequente aumento da fração de ácidos graxos livres (AGL) em amostras de óleo de café verde foram analisadas amostras de cinco safras diferentes (2015, 2016, 2017, 2018 e 2019) todas provenientes da Cooperativa Regional de Cafeicultores em Guaxupé (Cooxupé). Como descrito por Toci e colaboradores (2013), a fração lipídica do café torrado se altera com o passar do tempo e a fração de TAG diminui à medida que a fração de AGL aumenta (Toci *et al.*, 2013), dessa forma essas duas classes de substâncias comportam-se como marcadores do tempo de estocagem, mas variam conforme a temperatura de estocagem e a atmosfera de armazenamento. Sendo assim, supõe-se que o óleo de café verde apresente comportamento semelhante, contudo, no presente trabalho o parâmetro avaliado foi o tempo de estocagem do

produto.

As amostras de óleo de café verde foram preparadas conforme descrito no item 3.3.3 acima e foram analisadas de acordo com a metodologia descrita no item 3.7, os experimentos foram realizados em duplicata. Os cromatogramas das frações de TAG (Figura 58) e AGL (Figura 59), de uma das replicatas, encontram-se nas figuras a seguir.

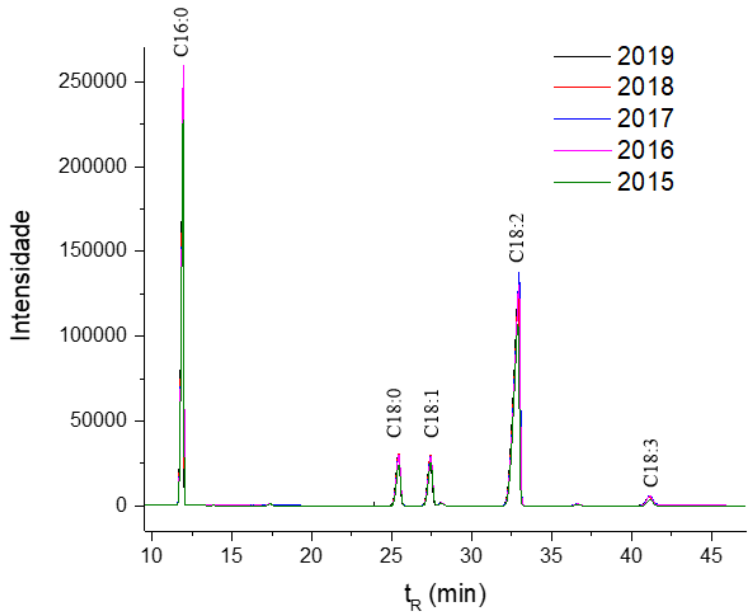


Figura 58 – Cromatograma da fração de TAG das amostras de óleo de café verde
Fonte: elaborado pela autora**.**

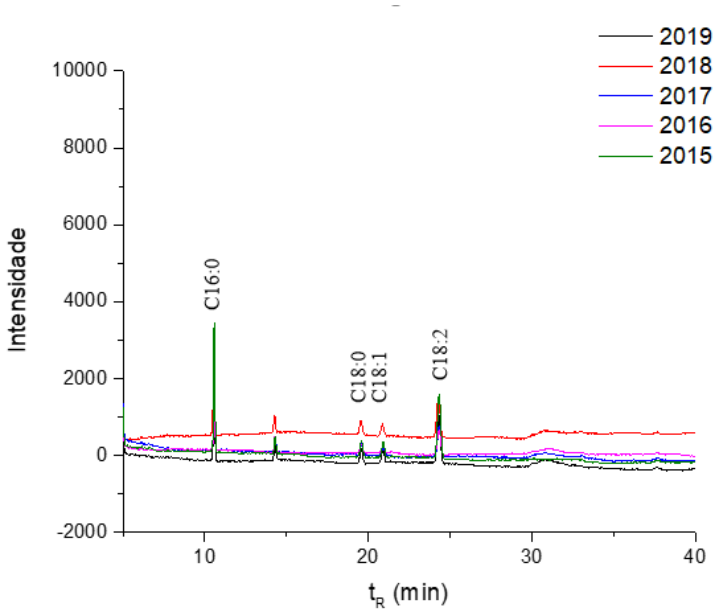


Figura 59 – Cromatograma da fração de AGL das amostras de óleo de café verde.
Fonte: elaborado pela autora.

Os principais ácidos graxos com compões as amostras de café verde, conforme mencionado anteriormente, são: palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolênico (C18:3) e araquídico (C20:0). Nas condições cromatográficas utilizadas, os ácidos graxos identificados nos cromatogramas, por meio da comparação com o padrão FAME foram C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3. A porcentagem relativa nas amostras de óleo de café verde de C20:0 é de cerca de 1,5%, sendo assim, o pico cromatográfico relativo a esse ácido graxo é relativamente menor quando comparo aos demais ácidos graxos, o que torna sua identificação e quantificação mais difícil. Portanto, para que os resultados obtidos fossem mais confiáveis, optou-se pela quantificação dos ácidos graxos relativos aos demais cinco picos encontrados no cromatograma da fração de TAG e quadro picos da fração de AGL, uma vez que o sinal de C18:3 era bastante baixo nessas amostras.

Como os ácidos graxos analisados possuem números diferentes de carbono e hidrogênio é necessário utilizar um fator de correção para calcular corretamente a concentração de cada um deles na amostra de óleo de café verde. Para tanto, foram utilizados os padrões internos (C17:0 para AGL e C19:0/C19:0/C19:0 para TAG) e os fatores de correção teóricos encontrados descritos por Visentainer (2012) de acordo com a equação:

$$M_X = \frac{M_P A_X F_{CT}}{A_P M_A F_{CEA}}$$

Na qual M_X é a massa do ácido graxo de interesse, M_P é a massa do padrão interno utilizado, A_X é a área do pico do ácido graxo de interesse, A_P é a área do pico do padrão interno, M_A é a massa de amostra, F_{CT} é o fator de correção teórico e F_{CEA} é o fator de conversão de éster metílico para ácido graxo (Visentainer, 2012).

Os valores calculados das concentrações de cada um dos ácidos graxos nas frações de TAG e AGL podem ser encontrados na Tabela 18.

Tabela 18 – Valore das concentrações (g/100 g) de TAG AGL em amostras de óleo de café

AG	**C_{TAG} 2015**	**C_{TAG} 2016**	**C_{TAG} 2017**	**C_{TAG} 2018**	**C_{TAG} 2019**
C16:0	26,32	26,93	27,549	29,61	28,46
C18:0	4,940	5,295	6,199	6,034	6,113
C18:1	5,485	5,183	6,328	6,074	6,156
C18:2	30,16	30,47	35,968	34,85	38,33
C18:3	1,992	2,294	2,407	2,714	2,275
ΣAG_{TAG}	68,90	70,17	78,45	79,29	81,34
AG	**C_{AGL} 2015**	**C_{AGL} 2016**	**C_{AGL} 2017**	**C_{AGL} 2018**	**C_{AGL} 2019**
C16:0	1,762	1,113	1,0646	0,5683	0,532
C18:0	0,407	0,273	0,3014	0,1357	0,123
C18:1	0,403	0,207	0,2359	0,0856	0,147
C18:2	1,967	1,056	1,0019	0,5313	0,532
ΣAG_{AGL}	4,538	2,649	2,6038	1,3209	1,335

Fonte: elaborado pela autora.

Na Figura 60 é possível observar um gráfico contendo a tendência da diminuição da fração de TAG e aumento da fração de AGL com o passar do tempo. Nota-se que existe um comportamento linear das duas frações que pode ser utilizado para estimar a taxa de degradação da fração de TAG e sua consequente conversão em AGL.

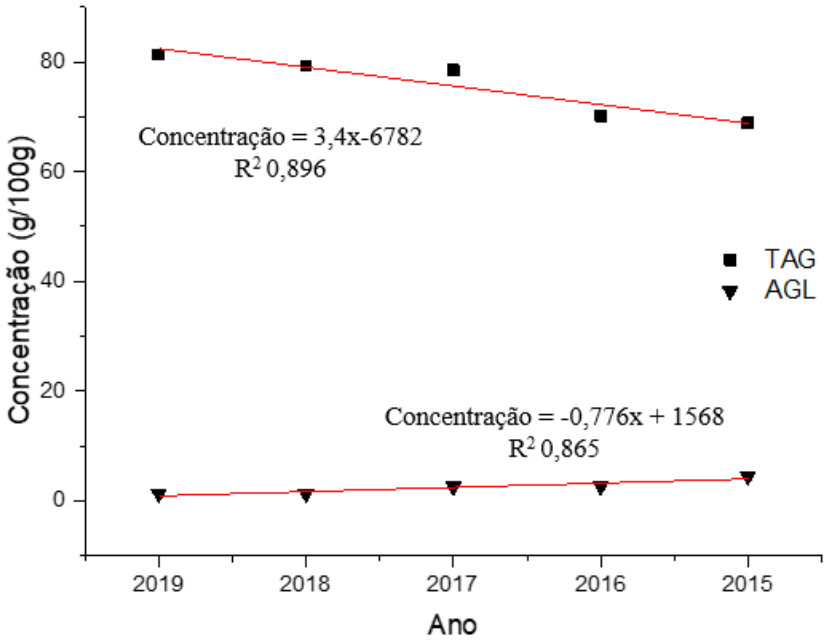


Figura 60 – Diminuição da fração de TAG e aumento da fração de AGL ao longo do tempo.
Fonte: elaborado pela autora.

Observando a Figura 60 em conjunto com a Tabela 18 notou-se que, como inicialmente especulado, ocorre de fato a diminuição da fração de TAG e consequente conversão em AGL de diferentes anos e de mesma procedência. Dessa maneira, foi possível afirmar que, tal qual ocorre para amostras de café torrado e moído (Toci *et al.*, 2013) as frações de TAG e AGL funcionam como marcadores do tempo de amostras de óleo de café verde.

5 Conclusões

Observando os resultados obtidos, após a realização dos experimentos de ^{1}H-NMR, foi possível concluir que 100% das amostras de cafés comerciais adulteradas foram corretamente classificadas utilizando o modelo SIMCA desenvolvido. Também foi possível avaliar ^{1}H-NMR como ferramenta analítica, permitindo a quantificação de seis diferentes adulterantes em dois graus de torra diferentes com parâmetros analíticos compatíveis com aqueles exigidos pelos órgãos responsáveis pelo controle desse tipo de alimento no Brasil e sem a utilização de preparo de amostra elaborado e moroso, resultando em resultados confiáveis, diferentemente daqueles fornecidos pela metodologia atualmente em vigor.

Também em relação às análises de café por meio de espectroscopia vibracional com auxílio de modelos classificatórios SIMCA foi possível enquadrar corretamente 100% das amostras analisadas e diferenciar amostras puras de adulteradas com níveis de adulterantes de até 5% por meio de equipamentos portáteis e nenhum preparo de amostra. A utilização de equipamentos portáteis vem se popularizando nos últimos anos pois fornece resultados rápidos e confiáveis utilizando equipamentos de fácil manipulação e relativamente mais baratos que aqueles usualmente encontrados em laboratórios de análise de controle de qualidade; outra vantagem é a possibilidade de análises *in situ*, tornando o controle de qualidade de alimentos e bebidas muito mais fácil.

Em relação à determinação da autenticidade de amostras comerciais de óleo de café verde com a utilização de espectroscopia vibracional e da ferramenta quimiométrica de SIMCA foi possível diferenciar amostra puras de adulteradas com níveis de adulteração de até 1% sem qualquer tipo de preparo de amostra. Dentre as amostras comerciais analisadas praticamente metade encontra-se adulterada e, dentre as amostras adulteradas, 80% não apresenta sequer óleo de café verde em sua composição. Dado o alto valor econômico do óleo de café verde, bem como suas inúmeras propriedades apreciadas tanto pelas indústrias cosmética e farmacêutica é de extrema necessidade que haja um rígido controle de qualidade para esse tipo de produto. Aqui, mais uma vez, prova-se a eficácia da utilização de equipamentos portáteis para o controle de qualidade de produtos de interesse comercial os quais podem ser operados sem a necessidade de operadores altamente qualificados e de maneira bastante simples para a obtenção de resultados comprovadamente

confiáveis.

Em relação às análises cromatográficas, além de determinar a composição dos ácidos graxos e, consequentemente, autenticar a adulteração das amostras comerciais de óleo de café verde, foi possível confirmar que, ao longo do tempo, a fração de triacilglicerol presente em amostras de óleo de café verde em ácidos graxos livres utilizando um preparo de amostra relativamente simples e equipamentos comuns a diversos laboratórios de controle de qualidade. As frações de TAG e AGL representam marcadores do tempo de estocagem do óleo de café verde, o que é fundamental para assegurar a qualidade de um produto de elevado valor comercial.

Das metodologias empregadas para a análise de amostras de café torrado e moído, o método de ^{1}H-NMR apresenta maior robustez e confiabilidade nos resultados, uma vez que a partir da observação dos espectros obtidos é possível afirmar se a amostra está ou não adulterada, principalmente quando há amido na composição do adulterante. Porém, as técnicas de espectroscopia no infravermelho, tanto próximo quanto médio, possuem uma frequência analítica maior e os dados obtidos podem ser interpretados por meio de ferramentas quimiométricas, também não há etapas de preparo de amostras como ocorre nas análises de ressonância, outro ponto positivo é a ausência de solventes necessário para realização das análises, o que torna a análise menos custosa dado o elevado valor dos solventes deuterados fundamentais para as análises de NMR.

Em relação às análises das amostras de óleo de café verde, as técnicas de espectroscopia vibracional apresentam um menor custo e maior frequência analítica do que a análise cromatográfica também empregada. Pela observação dos espectros obtidos, principalmente utilizando a espectroscopia Raman, é possível observar se há óleo de café na composição da amostra estudada, mais uma vez que não há necessidade de preparo de amostra, como se dá para as análises cromatográficas.

Em suma, a autenticação de amostras de café e óleo de café obtidos por meio das metodologias desenvolvidas permite rápido acesso aos resultados utilizando pouco ou nenhum preparo de amostra possibilitando a análise dessas duas matrizes de forma rápida, precisa e ambientalmente amigável.

Referências

ABBAS, M. E. *et al.* Fluorometric determination of hydrogen peroxide in milk by using a Fenton reaction system. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 327–331, 2010.

ABREU, G. F. *et al.* Raman spectroscopy: A new strategy for monitoring the quality of green coffee beans during storage. **Food Chemistry**, v. 287, n. June 2018, p. 241–248, 2019.

ALAMPRESE, C.; CASIRAGHI, E. Application of FT-NIR and FT-IR spectroscopy to fish fillet authentication. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 720–725, 2015.

AMBONI, R. D. DE M. C.; FRANCISCO, A. DE; TEIXEIRA, E. Utilização de microscopia eletrônica de varredura para detecção de fraudes em café torrado e moído. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, p. 1–6, 1999.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Portaria nº377 de 26 de abril de 1999**BrasíliaAnvisa- Legislação -Portarias, , 1999a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/portarias/377_99.htm>

___. **Portaria nº 377, de 26 de abril de 1999**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/portarias/377_99.htm>. Acesso em: 27 ago. 2018b.

ARAÚJO, J. M. A.; SANDI, D. Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1087–1094, 2006.

AROCA-SANTOS, R. *et al.* Identifying and quantifying adulterants in extra virgin olive oil of the picual varietal by absorption spectroscopy and nonlinear modeling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 23, p. 5646–5652, 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Origem do Café**. Disponível em: <http://abic.com.br/o-cafe/historia/origem-do-cafe/>. Acesso em: 22 nov. 2019.

___. **O café brasileiro na atualidade**. Disponível em: <http://abic.com.br/o-cafe/historia/o-cafe-brasileiro-na-atualidade/>. Acesso em: 25 nov. 2019.

ATABANI, A. E. *et al.* Integrated valorization of waste cooking oil and spent coffee grounds for biodiesel production: Blending with higher alcohols, FT–IR, TGA, DSC and NMR characterizations. **Fuel**, v. 244, n. January, p. 419–430, 2019.

AYKAS, D. P.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E. Analytical Methods Assessing potato chip oil quality using a portable infrared spectrometer combined with pattern recognition analysis. **Analytical Methods**, v. 8, p. 731–741, 2016.

AZEVEDO, A. B. A. DE *et al.* Extraction of green coffee oil using supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 44, p. 186–192, 2008.

BAETEN, V. *et al.* Oil and Fat Classification by FT-Raman Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2638–2646, 1998.

BITTAR, D. B. *et al.* Optimized Synthesis of Silver Nanoparticles by Factorial Design with Application for the Determination of Melamine in Milk. **Analytical Letters**, v. 50, n. 5, p. 829–841, 2017.

BOSCO, M. *et al.* High-resolution 1H NMR investigation of coffee. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 6, p. 869–878, 1999.

BUBB, W. A. NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity. **Concepts in Magnetic Resonance Part A: Bridging Education and Research**, v. 19, n. 1, p. 1–19, 2003.

BURNS, D. T.; WALKER, M. J. Critical Review of Analytical and Bioanalytical Verification of the Authenticity of Coffee. **Journal of AOAC Internation**, v. 102, p. 1–12, 2019.

CAETANO, M. **Volme das exportações de café no país bateu recorde na safra 2018/19**. Disponível em: <https://valor.globo.com/agronegocios/noticia/2019/07/08/volume-das-exportacoes-de-cafe-do-pais-bateu-recorde-na-safra-2018-19.ghtml>. Acesso em: 24 nov. 2019.

CAPPELLETTI, S. *et al.* Caffeine: Cognitive and Physical Performance Enhancer or Psychoactive Drug? **Current Neuropharmacology**, v. 13, n. 1, p. 71–88, 2014.

CÁRDENAS, C.; QUESADA, A. R.; MEDINA, M. A. Anti-angiogenic and anti-inflammatory properties of kahweol, a coffee diterpene. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. 1–9, 2011.

CASAGRANDE, M. DOS R. **PROCESSO PRODUTIVO PARA OBTENÇÃO DE ÓLEO DE CAFÉ VERDE**Brazil, 2016.

CATELANI, T. A. **Desenvolvimento de métodos analíticos ambientalmente amigáveis para a determinação de taninos hidrolisáveis, compostos antioxidantes e aminoácidos em alimentos**. [s.l.] Universidade Estadual PAulista, 2017.

CATELANI, T. A. *et al.* Real-time monitoring of a coffee roasting process with near infrared spectroscopy using multivariate statistical analysis: A feasibility study. **Talanta**, v. 179, n. August 2017, p. 292–299, 2018.

CAVIN, C. *et al.* Cafestol and kahweol , two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1155–1163, 2002.

CHE MAN, Y. B. *et al.* Analysis of potential lard adulteration in chocolate and chocolate products using Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 815–819, 2005.

COELHO, M. S.; SALAS-MELLADO, M. DE LAS M. Chemical Characterization of CHIA (Salvia hispanica L .) for Use in Food Products. **Journal of Food and Nutritrion Research**, v. 2, n. 5, p. 263–269, 2014.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1. ed. Campinas: Ed. Unicamp, 2006.

CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R. Nuclear magnetic resonance and chemometrics to assess gegraphical origin and quality of traditional food products. *In*: **Advances in Imaging and Electron Physics**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2010. v. 59p. 87–165.

CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R.; COGLIATI, C. NMR based geographical characterization of roasted coffee. **Talanta**, v. 88, p. 420–426, 2012.

CORREIA, R. M. *et al.* Chemical profiles of Robusta and Arabica coffee by ESI(-)FT-ICR and ATR-FTIR: a qualitative approach. **Analytical Methods**, v. 8, p. 7678–7688, 2016.

CRAIG, A. P. *et al.* Fourier transform infrared spectroscopy and near infrared spectroscopy for the quantification of defects in roasted coffees. **Talanta**, v. 134, p. 379–386, 2015.

CRAIG, A. P.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S. Evaluation of the potential of FTIR and chemometrics for separation between defective and non-defective coffees. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1368–1374, 2012.

D'AMELIO, N. *et al.* Green coffee oil analysis by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Talanta**, v. 110, p. 118–127, 2013.

DANEZIS, G. P.; TSAGKARIS, A. S.; CAMIN, F.; *et al.* Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 123–132, 2016.

DANEZIS, G. P.; TSAGKARIS, A. S.; BRUSIC, V.; *et al.* Food authentication: state of the art and prospects. **Current Opinion in Food Science**, v. 10, p. 22–31, 2016.

DEGASPARE, L. M. **Processamento e Beneficiamento de Café**. Disponível em: <http://esalq.usp.br/cprural/boaspraticas/mostra/88/processamento-e-beneficiamento-de-cafe.html>. Acesso em: 22 nov. 2019.

DIAS, R. C. E.; YERETZIAN, C. Investigating Coffee Samples by Raman Spectroscopy for Quality Control - Preliminary Study. **International Journal of Experimental Spectroscopic Techniques**, v. 1, n. 2, p. 1–5, 2016.

DIEGUEZ, C. M. T. *et al.* Os fundamentos quânticos da ressonância magnética nuclear. **Revista Brasileira de Ensino de Fisica**, v. 40, n. 1, p. e1310, 2018.

DOWNEY, G. Authentication of Food and Food Ingredients by Near Infrared Spectroscopy. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 4, n. 1, p. 47–61, 1996.

DURME, J. VAN; VANDAMME, J. Non-thermal plasma as preparative technique to evaluate olive oil adulteration. **Food Chemistry**, v. 208, p. 185–191, 2016.

ELLIS, D. I. *et al.* Rapid identification of closely related muscle foods by vibrational spectroscopy and machine learning. **Analyst**, v. 130, p. 1648–1654, 2005.

FERRARI, E. *et al.* Adulteration of the anthocyanin content of red wines: Perspectives for authentication by Fourier Transform-Near InfraRed and 1H NMR spectroscopies. **Analytica Chimica Acta**, v. 701, n. 2, p. 139–151, 2011.

FERRARO, J. F.; NAKAMOTO, K. **Introductory Raman Spectroscopy**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2003.

FERRARO, J.; KRISHNAN, K. **Practical Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Industrial and laboratory chemical analysis**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 1989.

FERREIRA, L. T.; SANTOS, J. **Produção dos Cafés do Brasil equivale a 36% da produção mundial em 2018**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/34724227/producao-dos-cafes-do-brasil-equivale-a-36-da-producao-mundial-em-2018>. Acesso em: 10 ago. 2019.

FERREIRA, M. M. C. *et al.* Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Quimica Nova**, v. 22, n. 5, p. 724–731, 1999.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações**. 1ª ed. Campinas - SP: Editora UNICAMP, 2015.

FIGUEIREDO, L. P. *et al.* Raman spectroscopy for the differentiation of Arabic coffee genotypes. **Food Chemistry**, v. 288, p. 262–267, 2019.

FIRMANI, P. *et al.* Near infrared (NIR) spectroscopy-based classification for the authentication of Darjeeling black tea. **Food Control**, v. 100, n. February, p. 292–299, 2019.

GARG, S. K. Green Coffee Bean. *In*: GUPTA, R. C. (Ed.). . **Nutraceuticals**. 1. ed. [s.l.] Academic Press, 2016. p. 653–667.

GIRAUDO, A. *et al.* Determination of the geographical origin of green coffee beans using NIR spectroscopy and multivariate data analysis. **Food Control**, v. 99, n. December 2018, p. 137–145, 2019.

GROLLIER, J. F.; PLESSIS, S. **USE OF COFFEE BEAN OIL AS A SUNFILTER**France, 1988.

GUNSTONE, F. **Fatty Acid and Lipid Chemistry**. 1. ed. Fife: Springer Science+Business Media Dordrecht, 1996.

HABERHAUER, G.; GERZABEK, M. H. Drift and transmission FT-IR spectroscopy of forest soils: An approach to determine decomposition processes of forest litter. **Vibrational Spectroscopy**, v. 19, n. 2, p. 413–417, 1999.

HACHEM, R. *et al.* Proton NMR for detection, identification and quantification of adulterants in 160 herbal food supplements marketed for weight loss. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 124, p. 34–47, 2016.

HATZAKIS, E. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science : A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 189–220, 2019.

HONG, E. *et al.* Modern analytical methods for the detection of food fraud and adulteration by food category. **Society of Chemical Industry**, v. 97, n. April, p. 3877–3896, 2017.

HU, B. *et al.* Proton nuclear magnetic ressonance Spectroscopic discrimination of wines reflects genetic homology of several different grape (V. vinifera L.) cultivars. **Plos One**, v. 10, n. 12, p. 1–16, 2015.

HUBER, L. Validation of Analytical Methods : Review and Strategy. **LC/GC Magazine**, v. 21, n. February, p. 1–17, 1999.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Coffee Market Report October 2019**, 2019. Disponível em: <www.ico.org/trade_statistics.asp%0A85>

ISHIKAWA, H. *et al.* Proton magnetic resonance assay of total and taurine-conjugated bile acids in bile. **Journal of Lipid Research**, v. 40, n. 10, p. 1920–4, 1999.

JHAM, G. N. *et al.* γ-tocopherol as a marker of Brazilian coffee (Coffea arabica L.) adulteration by corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 5995–5999, 2007.

___. The use of fatty acid profile as a potential marker for Brazilian coffee (Coffea arabica L.) for corn adulteration. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 8, p. 1462–1467, 2008.

KAMETANI, S. . *et al.* NMR of All-Carbon-13 Sugars : Analytical Method for a Novel An Application Natural Sugar , in Development of an. **Journal of Biochemistry**, v. 185, p. 180–185, 1996.

KEMSLEY, E. K.; RUAULT, S.; WILSON, R. H. Discrimination between Coffea arabica and Coffea canephora variant robusta beans using infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 321–326, 1995.

KONATU, F. RI. B.; JARDIM, I. C. S. F. Development and validation of an analytical method for multiresidue determination of pesticides in lettuce using QuEChERS–UHPLC–MS/MS. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 8, p. 1726–1733, 2018.

KUBALLA, T. *et al.* Application of NMR for authentication of honey, beer and spices. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 57–62, 2018.

KWON, D. J. *et al.* Assessment of green coffee bean metabolites dependent on coffee quality using a 1H NMR-based metabolomics approach. **Food Research International**, v. 67, p. 175–182, 2015.

LAM, L. K. T.; SPARNINS, V. L.; WATTENBERG, L. W. Isolation and Identification of Kahweol Palmitate and Cafestol Palmitate as Active Constituents of Green Coffee Beans That Enhance Glutathione S-Transf erase Activity in the Mouse. **Cancer Research**, v. 42, n. April, p. 1193–1199, 1982.

LEE, K.; CHAE, J.; SHIM, J. Natural diterpenes from coffee , cafestol and kahweol induce apoptosis through regulation of specificity protein 1 expression in human malignant pleural mesothelioma. **Journal of Biomedicinal Science**, v. 19, n. 60, p. 1–10, 2012.

LEPAGE, G.; ROY, C. C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. **Journal of Lipid Research**, v. 27, p. 114–120, 1986.

LI, Y. *et al.* Detection of olive oil adulteration with waste cooking oil via Raman spectroscopy combined with iPLS and SiPLS. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 189, p. 37–43, 2018.

LIANG, N. *et al.* Application of Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformed Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy to Determine the Chlorogenic Acid Isomer Profile and Antioxidant Capacity of Coffee Beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 681–689, 2016.

LIMA, L. S. *et al.* Bioactive paper platform for detection of hydrogen peroxide in milk. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and BiomolecularSpectroscopy**, v. 227, 2020.

LINDNER, P.; BERMANN, E.; GAMARNIK, B. Characterization of Citrus Honey by Deuterium NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 139–140, 1996.

LIU, C. *et al.* Potential of multispectral imaging combined with chemometric methods for rapid detection of sucrose adulteration in tomato paste. **Journal of Food Engineering**, v. 215, p. 78–83, 2017.

LIU, N. *et al.* Evaluation of portable near-infrared spectroscopy for organic milk authentication. **Talanta**, v. 184, n. February, p. 128–135, 2018.

LOVELL, D. J. Herschel's Dilemma in the Interpretation of Thermal Radiation. **Isis**, v. 59, n. 1, p. 46–60, 1969.

LUIZ, V. H. M. *et al.* Rapid determination of lead in progressive hair dye lotion by spot test/diffuse reflectance spectroscopy with a paper platform. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 10, p. 2137–2143, 2015.

LYMAN, D. J. *et al.* FTIR-ATR analysis of brewed coffee: Effect of roasting conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3268–3272, 2003.

MANNINA, L. *et al.* 1 H NMR-based protocol for the detection of adulterations of refined olive oil with refined hazelnut oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 24, p. 11550–11556, 2009.

MARQUETTI, I. *et al.* Partial least square with discriminant analysis and near infrared spectroscopy for evaluation of geographic and genotypic origin of arabica coffee. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 121, p. 313–319, 2016.

MARTINS, A. L. **A História do Café**. 2. ed. São Paulo: Editora COntexo, 2008.

MENDES, T. O. *et al.* Quantification of Extra-virgin Olive Oil Adulteration with Soybean Oil: a Comparative Study of NIR, MIR, and Raman Spectroscopy Associated with Chemometric Approaches. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 9, p. 2339–2346, 2015.

MENEZES JR., J. B. F. DE; BICUDO, B. A. A. Sobre um método miscroscópico para contagem de cascas no café em pó. **Revista do Instituto Adolpho Lutz**, p. 13–47, 1951.

MENG, X. *et al.* Ambient ionization coupled with a miniature mass spectrometer for rapid identification of unauthorized adulterants in food. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 85, n. October 2019, p. 103333, 2020.

MILANI, M. I. *et al.* Paper platform for reflectometric determination of furfural and hydroxymethylfurfural in sugarcane liquor. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 286–292, 2017.

MOLDVAER, A. **O Livro do Café**. 1. ed. São Paulo: Publifolha, 2016.

MONAKHOVA, Y. B. *et al.* Rapid approach to identify the presence of Arabica and Robusta species in coffee using ^{1}H NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 182, p. 178–184, 2015.

MONAKHOVA, Y. B.; DIEHL, B. W. K. Quantitative analysis of sunflower lecithin adulteration with soy species by NMR spectroscopy and PLS regression. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 1, p. 27–36, 2016.

MONAKHOVA, Y. B.; KUBALLA, T.; LACHENMEIER, D. W. Chemometric methods in NMR spectroscopic analysis of food products. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 68, n. 9, p. 755–766, 2013.

MORGANO, M. A. *et al.* Determinação de proteína em café cru por espectroscopia NIR e regressão PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 25–31, 2005.

MOURA RIBEIRO, M. V. DE *et al.* Authenticity of roasted coffee using1H NMR spectroscopy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 57, p. 24–30, 2017.

NEUMÜLLER, K. G. *et al.* Fast and robust method to determine phenoyl and acetyl esters of polysaccharides by quantitative 1H NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 26, p. 6282–6287, 2013.

O'KEEFE, J. H. *et al.* Effects of habitual coffee consumption on cardiometabolic disease, cardiovascular health, and all-cause mortality. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 12, p. 1043–1051, 2013.

OBEIDAT, S. M.; HAMMOUDEH, A. Y.; ALOMARY, A. A. Application of FTIR Spectroscopy for Assessment of Green Coffee Beans According to Their Origin. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 84, n. 6, p. 1051–1055, 2018.

OROIAN, M.; ROPCIUC, S. Botanical authentication of honeys based on Raman spectra. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 1, p. 545–554, 2018.

ORSAVOVA, J. *et al.* Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. **International Journal of Molecular Science**, v. 16, p. 12871–12890, 2015.

OUSSAMA, A. *et al.* Detection of olive oil adulteration using FT-IR spectroscopy nd PLS with variable importance of projection (VIP) scores. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 10, p. 1807–1812, 2012.

OUSSAMA, A.; ELABADI, F.; DEVOS, O. Analysis of argan oil adulteration using infrared spectroscopy. **Spectroscopy Letters**, v. 45, n. 6, p. 458–463, 2012.

PARADKAR, M. M.; IRUDAYARAJ, J. A rapid FTIR spectroscopic method for estimation of caffeine in soft drinks and total methylxanthines in tea and coffee. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 7, p. 2507–2511, 2002.

PARK, C. W. *et al.* Authentication of adulterated edible oil using coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 48, n. July, p. 1130–1336, 2017.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198–219, 2003.

PAULI, E. D. *et al.* Detection of ground roasted coffee adulteration with roasted soybean and wheat. **Food Research International**, v. 61, p. 112–119, 2014.

PAVIA, DONALD L. *et al.* Espectroscopia de ressonância magnética nuclear. *In*: **Introdução à Espectroscopia**. 4ª ed. São Paulo: Cengace Learning, 2010. p. 101–364.

PAVIA, D. L. *et al.* Espectroscopia de ressonância magnética nuclear. *In*: **Instrodução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. p. 101–168.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introduction to Spectroscopy**. 5. ed. Boston: Cengage Learning, 2014.

PETRAKIS, E. A.; POLISSIOU, M. G. Assessing saffron (Crocus sativus L.) adulteration with plant-derived adulterants by diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy coupled with chemometrics. **Talanta**, v. 162, n. August 2016, p. 558–566, 2017.

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

POOLE, C. **Gas Chromatography**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2012.

QUIÑONES-ISLAS, N. *et al.* Detection of adulterants in avocado oil by Mid-FTIR spectroscopy and multivariate analysis. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 148–154, 2013.

RABA, D. N. *et al.* Investigation on Crude and High-Temperature Heated Coffee Oil by ATR-FTIR Spectroscopy along with Antioxidant and Antimicrobial Properties. **Plos One**, v. 10, n. 9, p. 1–20, 2015.

RAJA, P. M. V.; BARON, A. R. **NMR Spectroscopy**. Disponível em: <https://chem.libretexts.org/Courses/University_of_Illinois%2C_Springfield/Introduction_to_Organic_Spectroscopy/5%3A_Proton_Nuclear_Magnetic_Resonance_Spectroscopy_(NMR)/5.03%3A_NMR_Spectroscopy>. Acesso em: 1 dez. 2019.

RAMBLA-ALEGRE, M.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Is it really necessary to validate an analytical method or not ? That is the question. **Journal of Chromatography A**, v. 1232, p. 101–109, 2012.

RANGEL, E. C. *et al.* **Espectroscopia de absorção no infravermelho**. Disponível em: <http://www2.sorocaba.unesp.br/gpm/ftir.htm>. Acesso em: 3 dez. 2019.

RATHMELL, C.; RODRIGUEZ-SAONA, L.; MENESEOVGLU, A. Authentication of Pisco From origin to alcohol content with Raman spectroscopy. **Óptica Pura y Aplicada**, v. 51, p. 5–8, 2018.

REIS, N.; FRANCA, ADRIANA S; OLIVEIRA, L. S. Performance of diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy and chemometrics for detection of multiple adulterants in roasted and ground coffee. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 395–401, 2013.

REIS, N.; FRANCA, ADRIANA S.; OLIVEIRA, L. S. Performance of diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy and chemometrics for detection of multiple adulterants in roasted and ground coffee. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 395–401, 2013.

REIS, N.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S. Concomitant Use of Fourier Transform Infrared Attenuated Total Reflectance Spectroscopy and Chemometrics for Quantification of Multiple Adulterants in Roasted and Ground Coffee. **Journal of Spectroscopy**, p. 1–7, 2016.

REUTERS. **Consumo de café no Brasil cresce com retomada econômica e mudança de hábitos, diz Abic**. Disponível em: <https://www1.folha.uol.com.br/mercado/2019/02/consumo-de-cafe-no-brasil-cresce-com-retomada-economica-e-mudanca-de-habitos-diz-abic.shtml>. Acesso em: 26 nov. 2019.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; ALLENDORF, M. E. Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 467–483, 2011.

ROHMAN, A.; CHE, Y. B. The use of Fourier transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy for detection and quantification of adulteration in virgin coconut oil. **Food Chemistry**, v. 129, p. 583–588, 2011.

ROHMAN, A.; MAN, Y. B. C. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. **Food Research International**, v. 43, n. 3, p. 886–892, 2010.

RUBAYIAZA, A. B.; MEURENS, M. Chemical Discrimination of Arabica and Robusta Coffees by Fourier Transform Raman Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4654–4659, 2005.

RUOFF, K. *et al.* Authentication of the botanical origin of honey by near-infrared spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 18, p. 6867–6872, 2006.

SALGHI, R.; ARMBRUSTER, W.; SCHWACK, W. Detection of argan oil adulteration with vegetable oils by high-performance liquid chromatography – evaporative light scattering detection. **Food Chemistry**, v. 153, p. 387–392, 2014.

SAMOGGIA, A.; RIEDEL, B. Consumers' perceptions of coffee health benefits and motives for coffee consumption and purchasing. **Nutrients**, v. 11, n. 3, p. 1–21, 2019.

SÁNCHEZ, M. T. *et al.* Rapid, simultaneous, and in situ authentication and quality assessment of intact bell peppers using near-infrared spectroscopy technology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 4, p. 1613–1622, 2019.

SEO, H. Y. *et al.* Detection of corn oil in adulterated sesame oil by chromatography and carbon isotope analysis. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, p. 621–626, 2010.

SHA, M. *et al.* Evaluation of sample pretreatment method for geographic authentication of rice using Raman spectroscopy. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, n. 3, p. 1705–1712, 2019.

SHIMIZU, A.; IKEGUCHI, M.; SUGAI, S. Appropriateness of DSS and TSP as internal references for 1H NMR studies of molten globule proteins in aqueous media. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 4, n. 6, p. 859–862, 1994.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chronicles of Young Scientists**, v. 2, n. 1, p. 21, 2011.

SILVA, J. A. *et al.* Method Validation for Cafestol and Kahweol Quantification in Coffee Brews by HPLC-DAD. **Food Analytical Methods**, v. 5, n. 6, p. 1404–1410, 2012.

SILVA, L. A. DA *et al.* Discrimination of Brazilian lager beer by ^{1}H NMR spectroscopy combined with chemometrics. **Food Chemistry**, v. 272, n. May 2018, p. 488–493, 2019.

ŠMEJKALOVÁ, D.; PICCOLO, A. High-power gradient diffusion NMR spectroscopy for the rapid assessment of extra-virgin olive oil adulteration. **Food Chemistry**, v. 118, n. 1, p. 153–158, 2010.

SOBRINO-GREGORIO, L. *et al.* Monitoring honey adulteration with sugar syrups using an automatic pulse voltammetric electronic tongue. **Food Control**, v. 91, p. 254–260, 2018.

SORIA, A. C. *et al.* Gas Chromatographic Analysis of Food Bioactive Oligosaccharides. *In*: MORENO, F. J.; SANZ, M. L. (Eds.). . **Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity**. 1. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2014. v. 9781118426p. 370–398.

SOWOIDNICH, K.; KRONFELDT, H.-D. Shifted excitation Raman difference spectroscopy for authentication of cheese and cheese analogues. **Biophotonics**, v. 9887, n. April 2016, p. 98871Z, 2016.

SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 201–216, 2006.

SUBRAMANIAN, A.; RODRIGUEZ-SAONA, L. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *In*: SUN, D.-W. (Ed.). . **Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control**. [s.l.] Academic Press, 2009. p. 145–178.

TARADOLSIRITHITIKUL, P.; SIRISOMBOON, P.; DACHOUPAKAN SIRISOMBOON, C. Qualitative and quantitative analysis of ochratoxin A contamination in green coffee beans using Fourier transform near infrared spectroscopy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 4, p. 1260–1266, 2017.

TAVARES, L. A.; FERREIRA, A. G. Análises quali- e quantitativa de cafés comerciais via ressonância magnética nuclear. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 911–915, 2006.

THOMPSON, T. J. U.; GAUTHIER, M.; ISLAM, M. The application of a new method of Fourier Transform Infrared Spectroscopy to the analysis of burned bone. **Journal of Archaeological Science**, v. 36, n. 3, p. 910–914, 2009.

TOCI, A. T. *et al.* Changes in triacylglycerols and free fatty acids composition during storage of roasted coffee. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 581–590, 2013.

TOCI, A. T. *et al.* Coffee Adulteration: More than two decades of research. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 83–92, 2016.

TOCI, At. T. *et al*. Fingerprint and authenticity roasted coffees by ^{1}H-NMR : the Brazilian coffee case. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 19–26, 2018.

TOPALA, C. M.; TATARU, L. D. Infrared spectra of green arabica coffee extraction using supercritical carbon dioxide and soxhlet technique. **Revista de Chimie**, v. 66, n. 8, p. 1128–1131, 2015.

TSUKUI, A. *et al.* Microwave-assisted extraction of green coffee oil and quantification of diterpenes by HPLC. **FOOD CHEMISTRY**, v. 164, p. 266–271, 2014.

TUCCIO, L. *et al.* The chemical composition and quality of the Parainema coffee cultivar under different shading conditions, as assessed by a leaf flavonol optical index. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 8, p. 1733–1741, 2019.

TURRATTI, J. M. **Extração e caracterização de óleo de café**II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. **Anais**...Vitória, ES, Brazil: 2001

VARDIN, H. *et al.* Authentication of pomegranate juice concentrate using FTIR spectroscopy and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 742–748, 2008.

VAYSSE, J. *et al.* Analysis of adulterated herbal medicines and dietary supplements marketed for weight loss by DOSY 1H-NMR. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n. 7, p. 903–916, 2010.

VIGLI, G. *et al.* Classification of edible oils by employing 31P and 1H NMR spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis. A proposal for the detection of seed oil adulteration in virgin olive oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 19, p. 5715–5722, 2003.

VISENTAINER, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionizaçã o em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. **Quimica Nova**, v. 35, n. 2, p. 274–279, 2012.

VOGELS, J. T. W. E. *et al.* Detection of Adulteration in Orange Juices by a New Screening Method Using Proton NMR Spectroscopy in Combination with Pattern Recognition Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 175–180, 1996.

VOGT, N. B.; KNUTSEN, H. SIMCA pattern recognition classification of five infauna taxonomic groups using non-polar compounds analysed by high resolution gas chromatography. **Marine Ecology**, v. 26, p. 145–156, 1985.

WAGEMAKER, T. A. L. *et al.* Sun protection factor , content and composition of lipid fraction of green coffee beans. **Industrial Crops & Products**, v. 33, n. 2, p. 469–473, 2011.

WAGEMAKER, T. A. L. *et al.* Green Coffea arabica L: Seed oil influences the stability and protective effects of topical formulations. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 34–40, 2015.

WANG, L. *et al.* Quality analysis, classification, and authentication of liquid foods by near-infrared spectroscopy: A review of recent research developments. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 7, p. 1524–1538, 2017.

WANG, P. *et al.* Vibrational spectroscopic approaches for the quality evaluation and authentication of virgin olive oil. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 51, n. 10, p. 763–790, 2016.

WANG, S. *et al.* Detection of honey adulteration with starch syrup by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 172, p. 669–674, 2015.

WEI, F. *et al.* Roasting process of coffee beans as studied by nuclear magnetic resonance: Time course of changes in composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 1005–1012, 2012.

WINKLER-MOSER, J. K. *et al.* Detection of corn adulteration in Brazilian coffee (Coffea arabica) by yocopherol profiling and near-infrared (NIR) spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 10662–10668, 2015.

WU, D.; SUN, D. W. Colour measurements by computer vision for food quality control - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 5–20, 2013.

XU, B. *et al.* Detection of virgin coconut oil adulteration with animal fats using quantitative cholesterol by GC – TOF / MS analysis. **Food Chemistry**, v. 178, p. 128–135, 2015.

YANG, L. *et al.* Monitoring the adulteration of milk with melamine: a visualised sensor array approach. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 30, n. 5, p. 786–795, 2013.

ZHANG, L. *et al.* Ion mobility spectrometry fingerprints: A rapid detection technology for adulteration of sesame oil. **Food chemistry**, v. 192, p. 60–6, 2016.

ZHANG, X. *et al.* Rapid Authentication of Olive Oil by Raman Spectroscopy Using Principal Component Analysis. **Analytical Letters**, v. 44, n. June 2013, p. 2209–2220, 2011.

ZOU, M.-Q. *et al.* Rapid Authentication of Olive Oil Adulteration by Raman Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6001–6006, 2009.

Apêndices

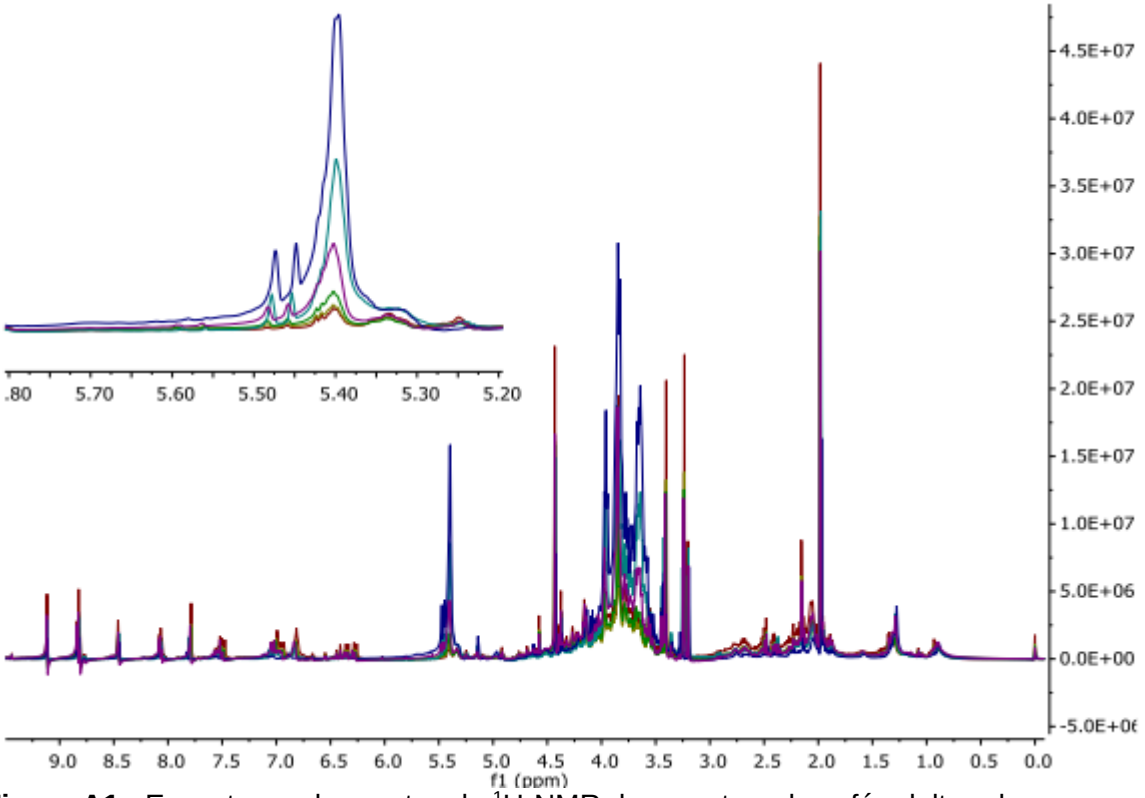


Figura A1 - Espectros sobrepostos de ^{1}H-NMR de amostras de café adulterado com arroz (1-50%) na torra média.

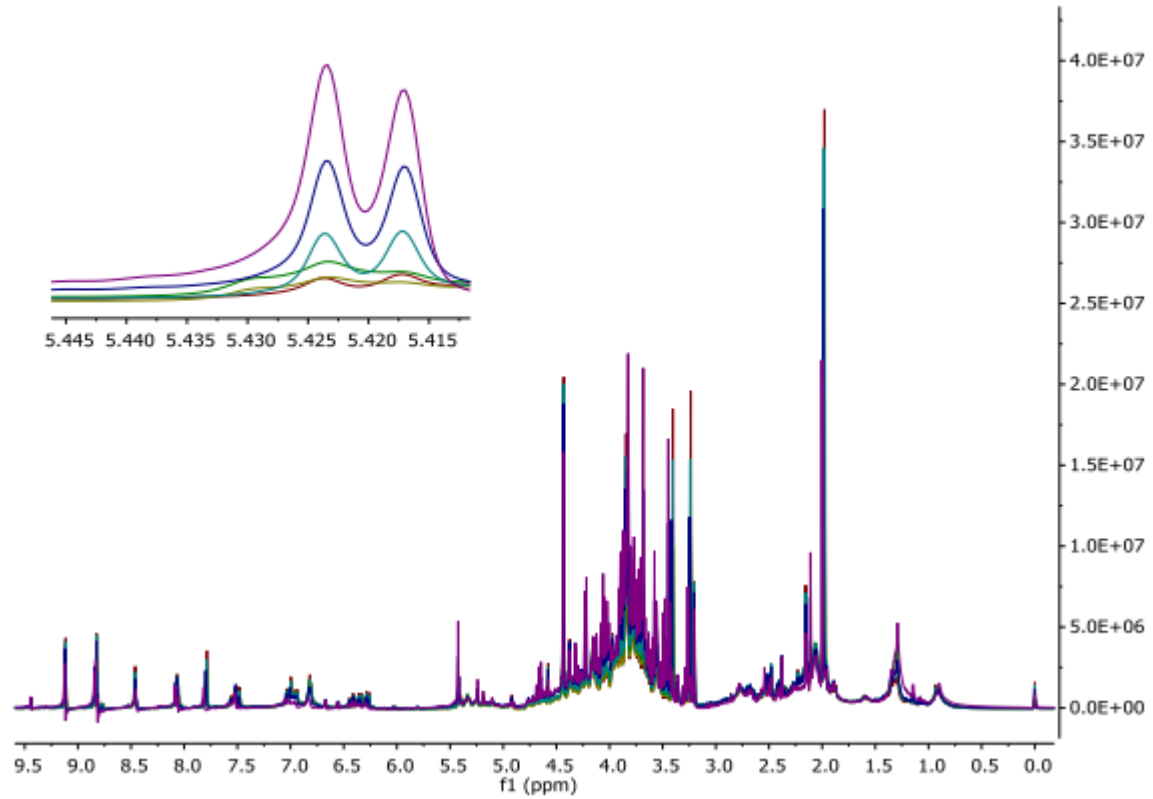


Figura A2 - Espectros sobrepostos de ^{1}H-NMR de amostras de café adulterado com cascas de café (1-50%) na torra média.

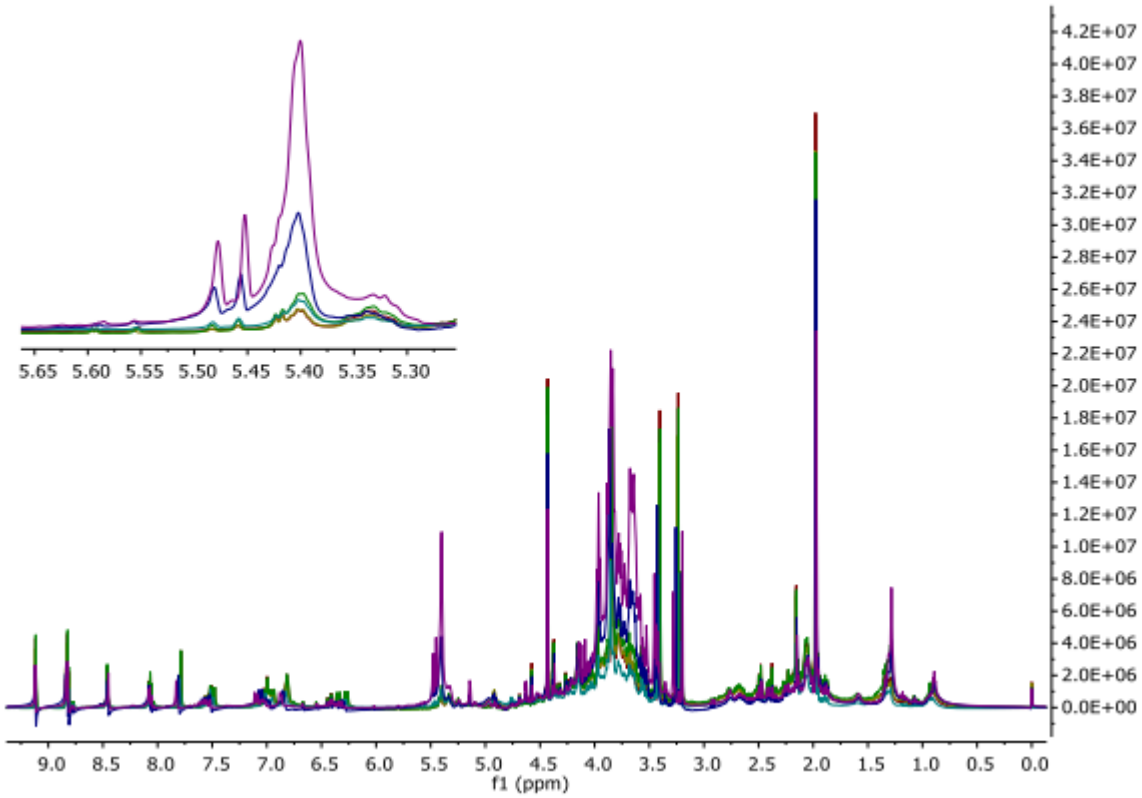


Figura A3 - Espectros sobrepostos de 1H-NMR de amostras de café adulterado com cevada (1-50%) na torra média.

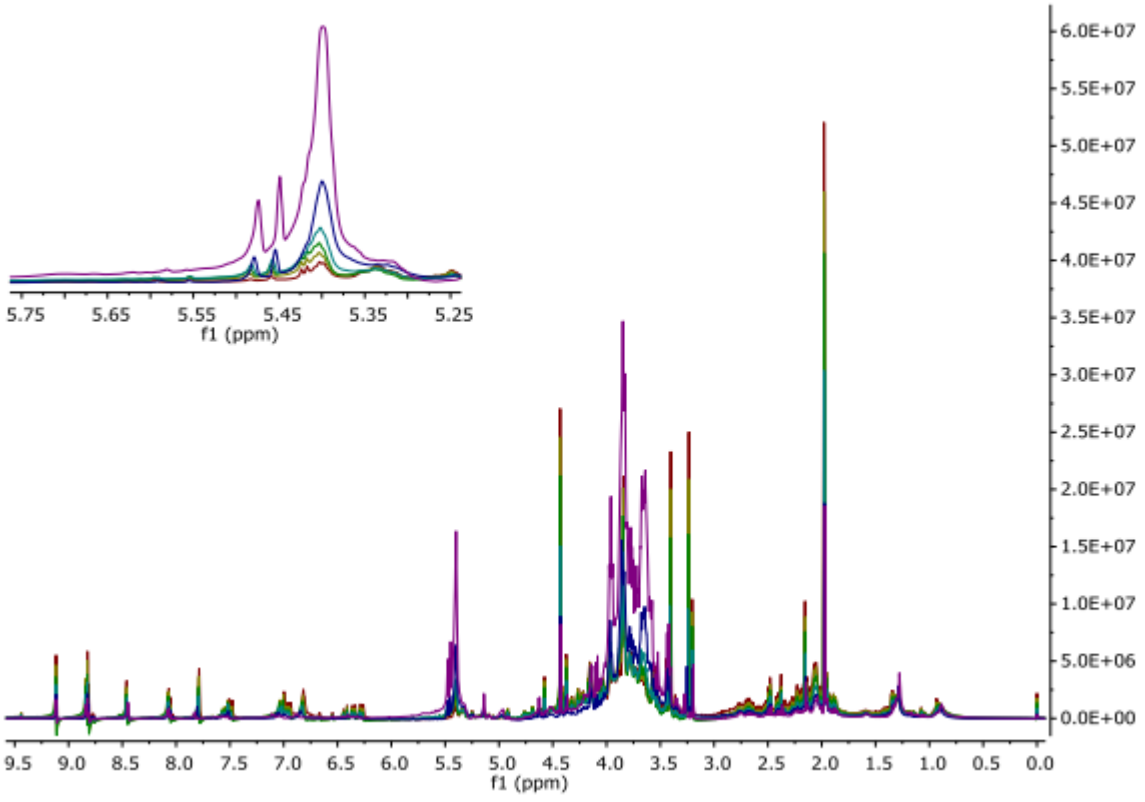


Figura A4 - Espectros sobrepostos de 1H-NMR de amostras de café adulterado com milho (1-50%) na torra média.

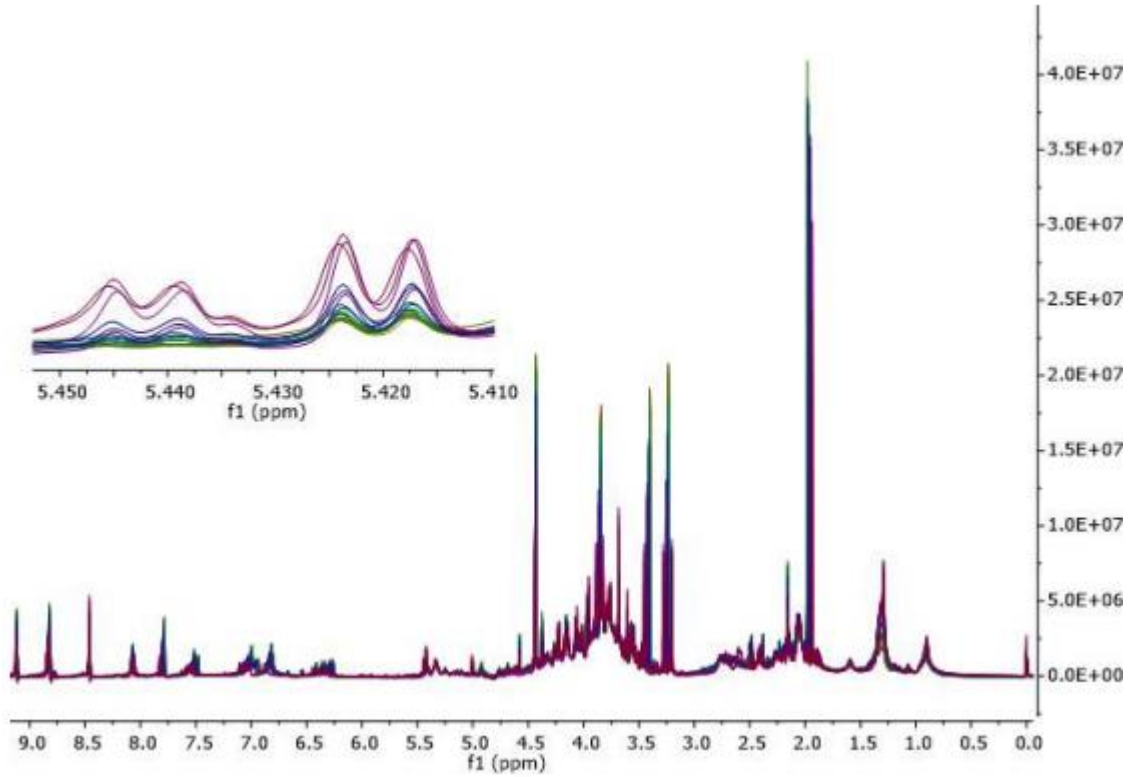


Figura A5 - Espectros sobrepostos de 1H-NMR de amostras de café adulterado com soja (1-50%) na torra média.

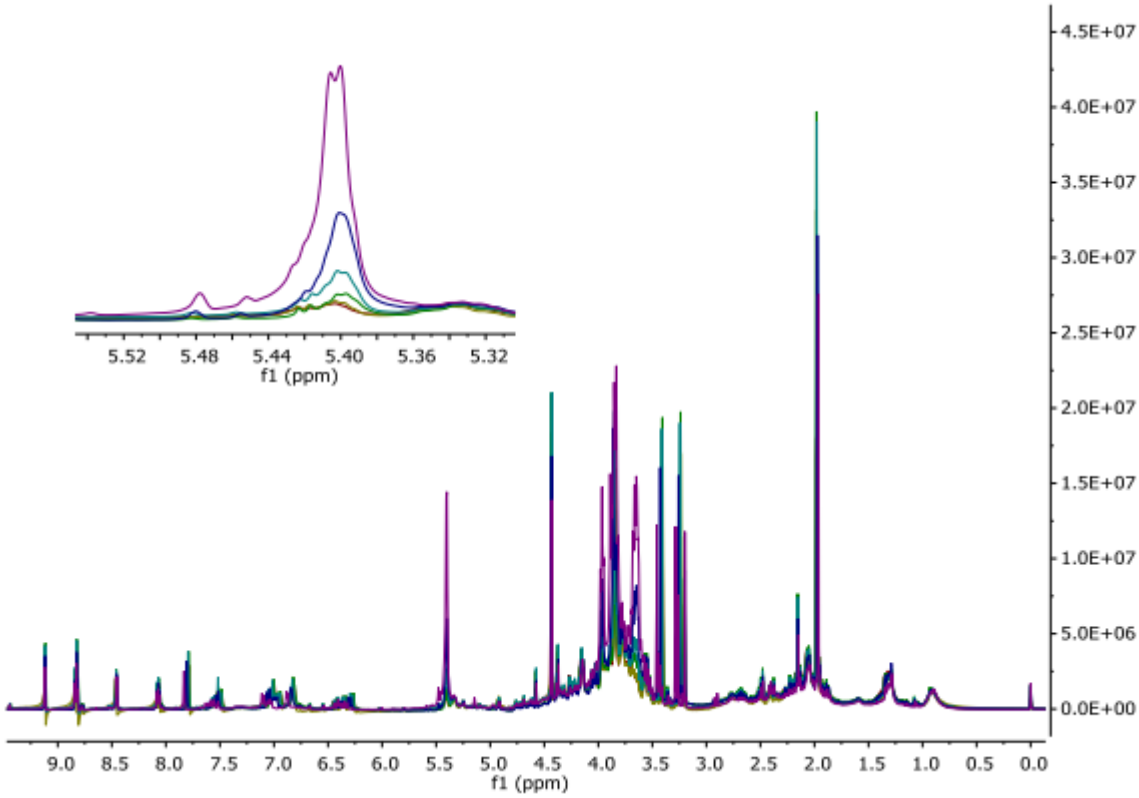


Figura A6 - Espectros sobrepostos de 1H-NMR de amostras de café adulterado com soja (1-50%) na torra média.

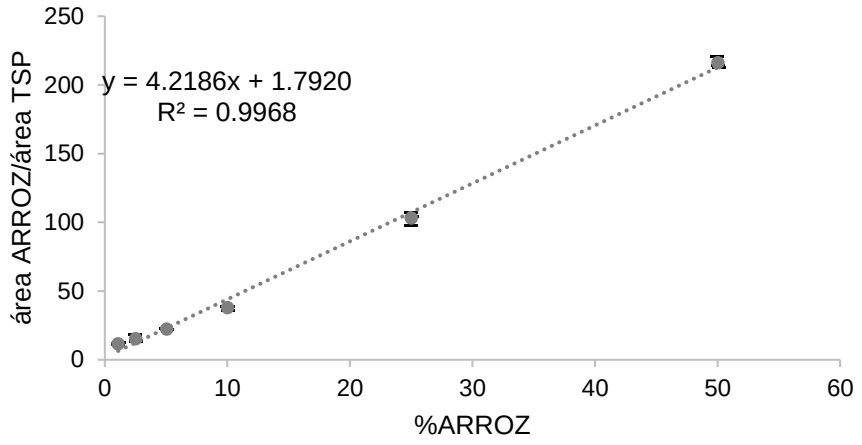


Figura A7 – Curva analítica de amostras café adulteradas com arroz no grau de torra médio

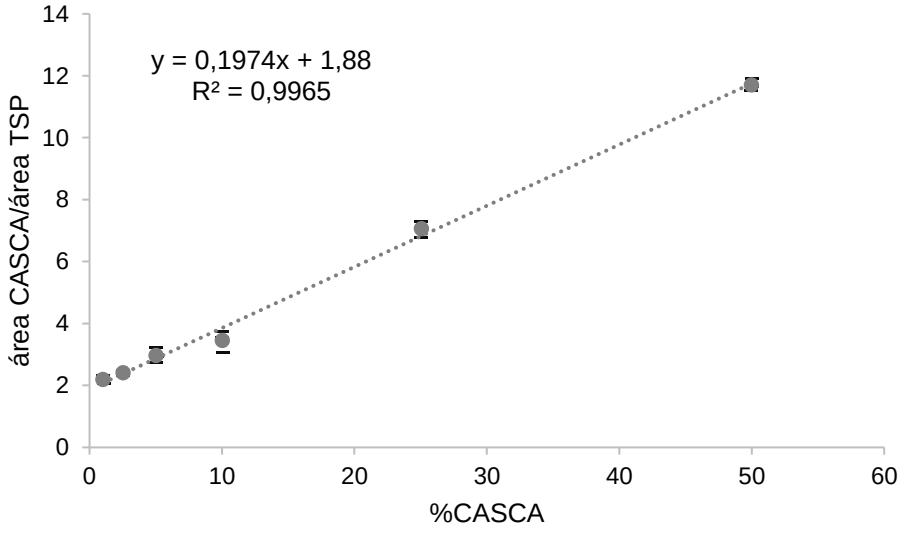


Figura A8 – Curva analítica de amostras café adulteradas com cascas de café no grau de torra médio

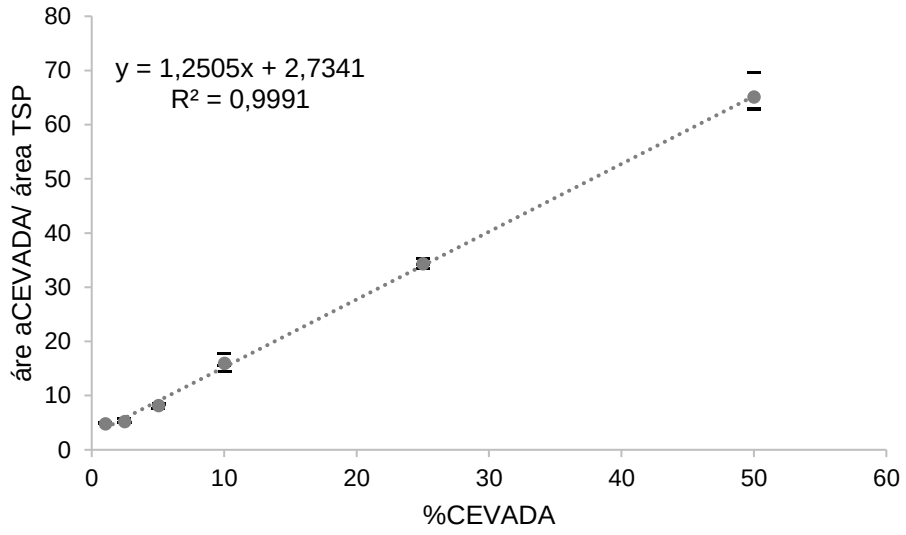


Figura A9 – Curva analítica de amostras café adulteradas com cevada no grau de torra médio

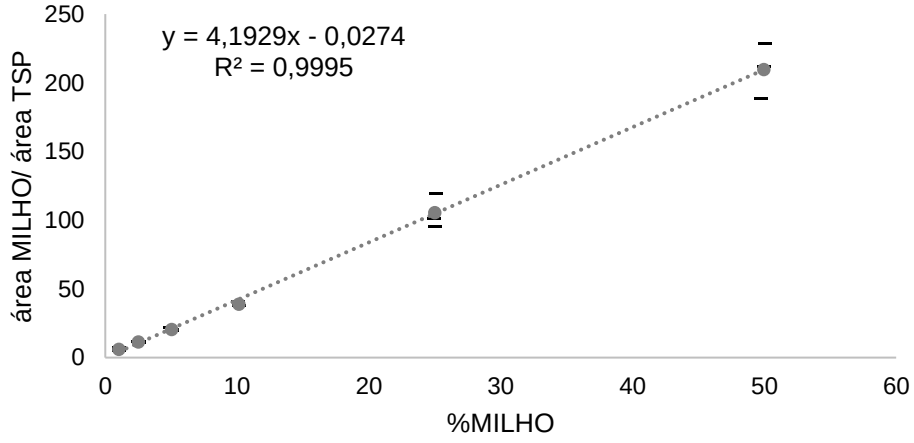


Figura A10 – Curva analítica de amostras café adulteradas com milho no grau de torra médio

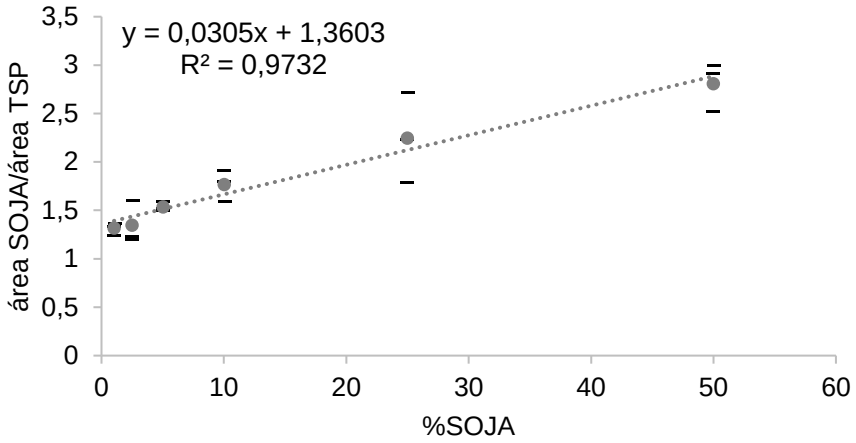


Figura A11 – Curva analítica de amostras café adulteradas com soja no grau de torra médio

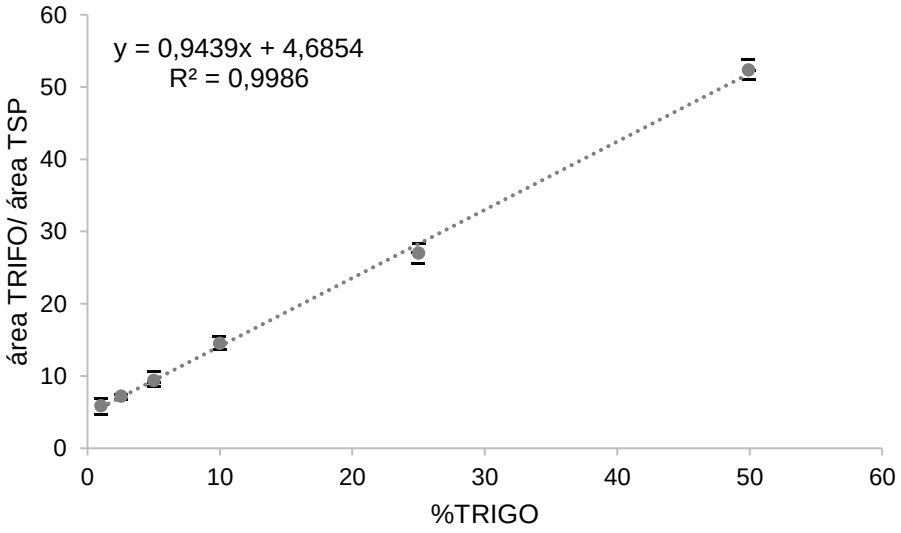


Figura A12 – Curva analítica de amostras café adulteradas com soja no grau de torra médio

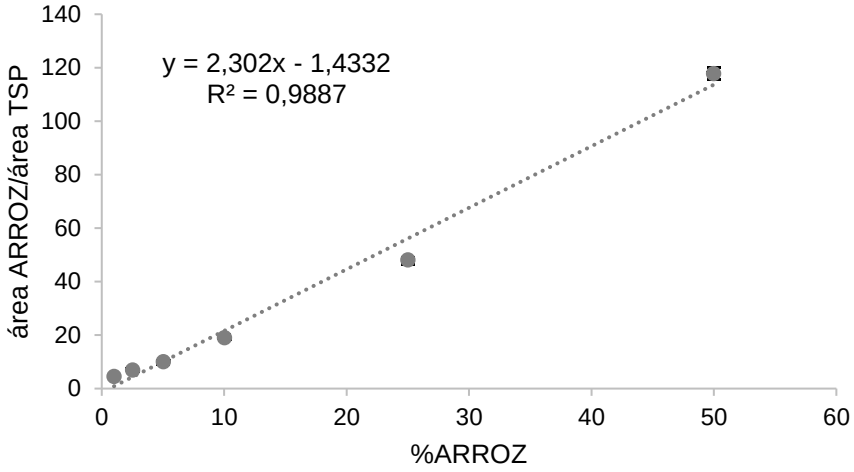


Figura A13 – Curva analítica de amostras café adulteradas com arroz no grau de torra escuro

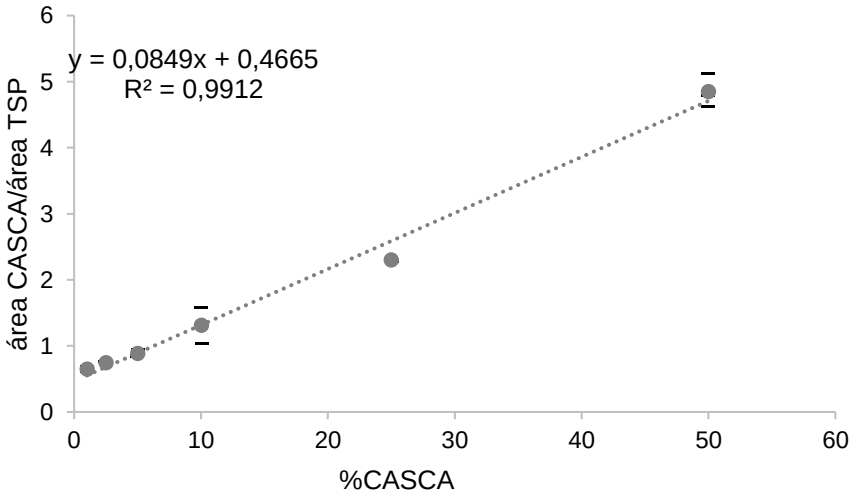


Figura A14 – Curva analítica de amostras café adulteradas com cascas de café no grau de torra escuro

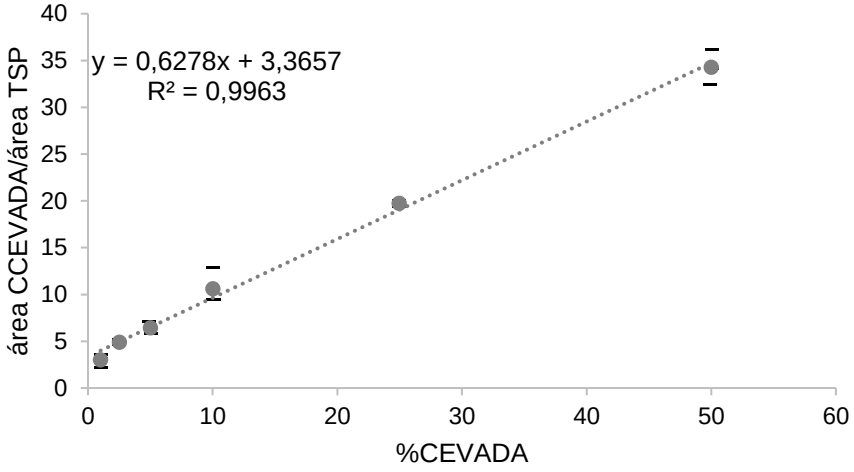


Figura A15 – Curva analítica de amostras café adulteradas com cevada no grau de torra escuro

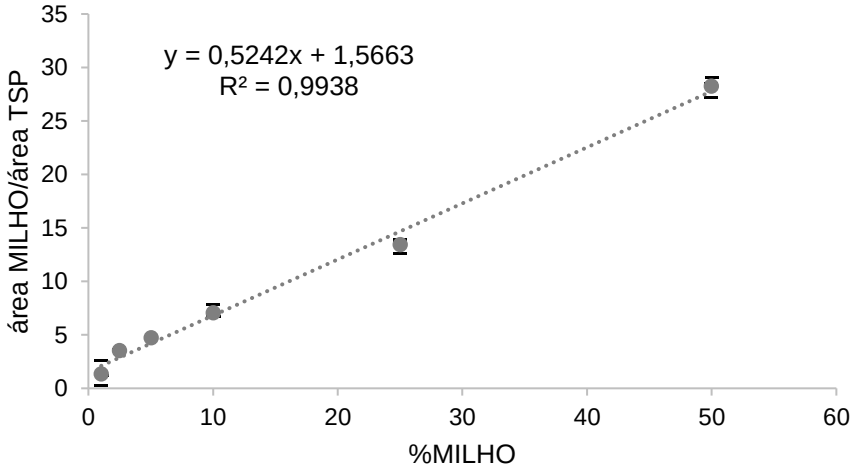


Figura A16 – Curva analítica de amostras café adulteradas com milho no grau de torra escuro

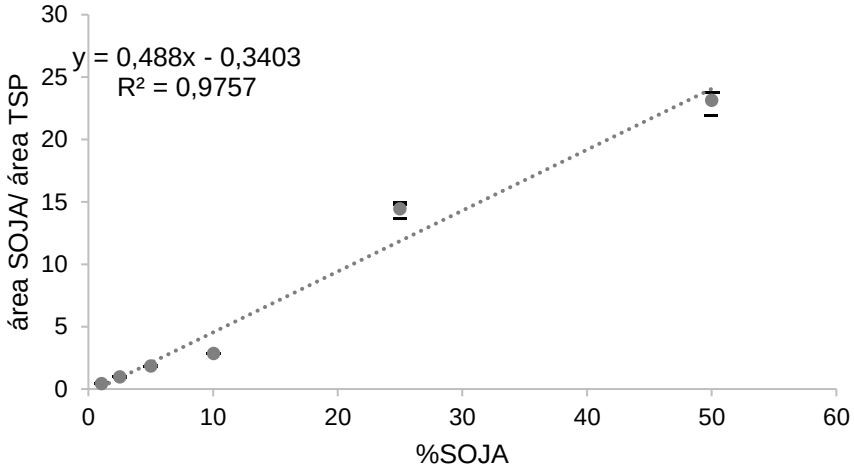


Figura A17 – Curva analítica de amostras café adulteradas com soja no grau de torra escuro

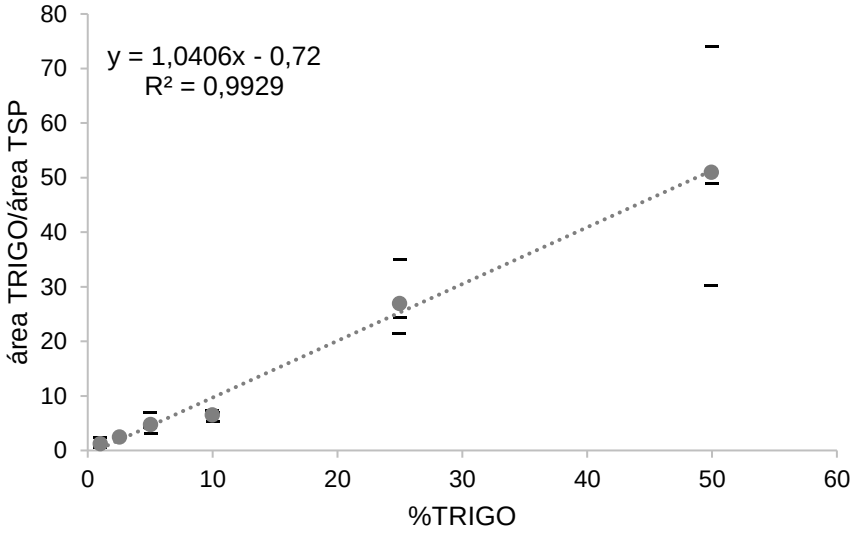


Figura A18 – Curva analítica de amostras café adulteradas com trigo no grau de torra escuro