



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Tese de doutorado

**“Exploração de técnicas analíticas limpas para a
avaliação da qualidade de café”**

Tiago Varão Silva

Araraquara – SP
2018

TIAGO VARÃO SILVA

Exploração de técnicas analíticas limpas para a avaliação da qualidade de café

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

Orientadora: Profa. Dra. Edilene Cristina Ferreira

Co-Orientador: Dr. Ednaldo José Ferreira

**Araraquara – SP
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

S586e Silva, Tiago Varão
Exploração de técnicas analíticas limpas para a avaliação da
qualidade do café / Tiago Varão Silva. –
Araraquara : [s.n.], 2018
116 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Insti-
tuto de Química
Orientador: Edinele Cristina Ferreira Coorienta-
dor: Ednaldo José Ferreira

1. Café. 2. Controle de qualidade. 3. Espectroscopia de
infravermelho. 4. Espectroscopia de emissão com plasma
induzido por laser. 5. Quimiometria. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Exploração de técnicas analíticas limpas para a avaliação da qualidade do café"

AUTOR: TIAGO VARÃO SILVA

ORIENTADORA: EDILENE CRISTINA FERREIRA

COORDENADOR: EDNALDO JOSÉ FERREIRA

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



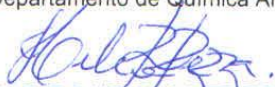
Profª. Drª. EDILENE CRISTINA FERREIRA

Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. PAULO CLAIRMONT FEITOSA DE LIMA GOMES

Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Profª. Drª. HELENA REDIGOLO PEZZA

Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. ARISTEU GOMES TININIS

Câmpus de Matão / Instituto Federal de São Paulo - IFSP - Matão



Prof. Dr. MARCOS YASSUO KAMOGAWA

Departamento de Química / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP - Piracicaba

Araraquara, 11 de maio de 2018

Tiago Varão Silva

Data de nascimento: 29/08/1985

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Guarulhos-SP

Filiação: Antônio Roberto Santos Silva

Justina Lopes Varão

Formação acadêmica

Graduação em Química – Bacharelado

Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista – IQ-UNESP, Araraquara-SP

Período (2007-2012)

Mestrado em Química

Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista – IQ-UNESP, Araraquara-SP

Período (2012-2014)

Doutorado em Química

Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista – IQ-UNESP, Araraquara-SP

Período (2014-2018)

1. Atividades acadêmicas relevantes

- Estágio-docência na disciplina Espectroanalítica
Supervisão: Edilene Cristina Ferreira
Período: 2º/2015
- Estágio-docência na disciplina Química Analítica Qualitativa (FCF)
Supervisão: Raquel Fernandes Pupo Nogueira
Período: 2º/2016

2. Principais participações em eventos científicos durante o doutorado:

- **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (março/2014).** Com apresentação do trabalho na forma de **pôster**, intitulado: Avaliação do teor de antimônio em embalagens de politereftalato de etileno empregando espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite e amostragem direta de sólidos.
- **Simpósio Nacional de Instrumentação Agropecuária, SIAGRO (novembro/2014).** Com apresentação do trabalho na forma de **pôster**, intitulado: Correlações entre o conteúdo de nitrogênio e a qualidade do café através do monitoramento de linhas de nitrogênio por espectrometria de emissão ótica com plasma induzido por laser (LIBS).
- **II WORKSHOP SOBRE LASER EM QUÍMICA ANALÍTICA (junho/2015).**
- **4º Congresso Analítica Latin America (setembro/2015):** Com apresentação do trabalho na forma de **pôster**, intitulado: Avaliação da distribuição de Ni em amostras de bijuteria empregando espectrometria de emissão ótica com plasma induzido por laser.
- **18º Encontro Nacional de Química Analítica (setembro/2016):** Com apresentação do trabalho na forma de **pôster** e **oral**, intitulado: Avaliação do potencial da técnica LIBS para a discriminação de classes de café não torrados.
- **9th Euro-Mediterranean Symposium on LIBS (Pisa-IT) (junho/2017):** Com apresentação do trabalho na forma **oral**, intitulado: Quantitative prediction of coffee adulteration by defective beans using Laser-induced breakdown spectroscopy.
- **III Escola de Inverno em Quimiometria (julho/2017)**
- **IX Workshop de Quimiometria (abril/2018):** Com apresentação do trabalho na forma de **pôster**, intitulado: Autenticação de origem geográfica de arroz integral

usando espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser e algoritmos de classificação supervisionada.

- **1º Escola de Verão em Química (fevereiro/2018)**

3. Trabalhos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados no período:

- **Silva, T. V.**, Rêgo, J. F., Moraes, M. De, Cavalheiro, A. J., Anchieta, J., & Neto, G. Multi-Element Determination of Calcium, Potassium and Magnesium in Medicinal Plant By High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry. *Eclética Química* (2012), 45–50.
- **Silva, T. V.**, Miranda, K., Ferreira, E. C., Santos, M. C., Neto, J. A. G., & Barbosa, F. Determination of lead in plastic food packaging by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Atomic Spectroscopy*, 36(4), 182–186 (2015).
- Barros, A., **Silva, T. V.**, Ferreira, E. C., & Gomes Neto, J. A. Determination of Lead in Coal Using Direct Solid Sampling and High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Microchim Acta*, 26 (1), 140–146 (2015).
- **Silva, T. V.**, Hubinger, S. Z., Neto, J. A. G., Milori, D. M. B. P., Ferreira, E. J., and Ferreira, E. C. Potential of Laser Induced Breakdown Spectroscopy for analyzing the quality of unroasted and ground coffee. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 135, 29–33 (2017).
- Vieira, A. L., **Silva, T. V.**, de Sousa, F. S. I., Senesi, G. S., Júnior, D. S., Ferreira, E. C., & Neto, J. A. G. Determinations of phosphorus in fertilizers by spark discharge-assisted laser-induced breakdown spectroscopy. *Microchemical Journal*, 139, 322–326 (2018).
- C. P. de Moraes, Barros, A. I., Bechlin, M.A., **Silva, T.V.**, Júnior, D. S., Senesi, G. S., M. S. Crespi, C. A. Ribeiro, Neto, J.A.G. and E. D. Ferreira. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy analysis of K in biochar-based fertilizers in the presence of easily ionizable element (SUBMETIDO) *Talanta*, (2018).

- **Silva, T.V.**, J. A. G., Milori, D. M. B. P., Ferreira, E. J., and Ferreira, E. C. Prediction of coffee defective beans using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (SUBMETIDO), *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2018)

4. Supervisão científica dos alunos:

- Carla Pereira de Moraes:
Período: 2014
- Jaqueline Maria Felipe:
Período: 2015
- Bruno Abranches:
Período: 2015/2016
- João Paulo Varoni:
Período: 2017/2018
- Fernanda Grespi:
Período: 2017/2018

Dedico esse trabalho...

A minha companheira, amiga e namorada Juliana, e aos meu pais, por todo o carinho, apoio e compreensão.

Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos iniciais vão para a minha namorada Juliana, por toda a paciência, carinho, apoio e ajuda dada. Já são 8 anos de companheirismo verdadeiro e nesse período só nós sabemos o quanto trabalhamos por isso. Podemos não ser as melhores pessoas, mas do seu lado me sinto uma pessoa melhor a cada dia. Me inspiro muito no seu poder de organização e calma. Espero que continuemos assim nos completando, porque eu te amo muito e sempre amarei.

A professora Edilene e ao meu co-orientador Edinaldo, pela orientação e boas discussões dos resultados obtidos pela tese.

Ao Grupo GEA: Alan, Maisa, Thaila, Sâmia, Augusto, João, Fernanda e antigos Geanos: Marcão, Felipe, Ariane, Carla, Jaqueline, pelo apoio incondicional prestado, discussões científicas ou não, mas principalmente por serem pessoas especiais, no qual tive o prazer e trabalhar.

A todos os meus amigos da ex-república Xurupitas, Alan, Rodolfo, Marco, Vitor, Marcelo, Ricardo, Leonardo, Robert, Leopoldo e João, por todo apoio científico e grandes momentos de descontração.

Aos meus pais, por serem guerreiros e me proporcionar condições de seguir com a carreira acadêmica.

Aos professores do Departamento de Química Analítica, pelos ensinamentos constantes.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial a todos da seção de pós-graduação e da biblioteca pela atenção dada em todos os momentos.

Ao Instituto de Química por todo o suporte dado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES – pela bolsa concedida.

*“Sábio é aquele que admite não saber algo,
pois se um homem não sabe o que uma coisa é,
já é um avanço de conhecimento.
entretanto, se ele não sabe, mas finge saber,
engana-se e retrocede,
pois inibe a busca do conhecimento”*

Carl Jung

RESUMO

O café é uma importante *commodity* e uma bebida popular no mundo todo. O seu valor econômico é decorrente da qualidade da bebida, a qual está intrinsecamente relacionada à qualidade dos grãos. Misturas de grãos defeituosos do tipo Pretos, Verdes e Ardidos (PVA), a grãos de boa qualidade causam impactos negativos à qualidade global das bebidas. A agroindústria cafeeira é carente de métodos capazes de prever a concentração de PVAs em amostras de cafés. Assim, a presente proposta teve por objetivo explorar um pouco da composição de cafés bons e PVAs empregando técnicas analíticas de análise direta e propor métodos para predição da concentração de PVAs em amostras de café não torrados. Espectrometria no Infravermelho Próximo (NIRS) e espectrometria de emissão óptica em plasma induzido por laser (LIBS) foram as técnicas avaliadas. Os resultados mostraram que bandas monitoradas por NIRS, atribuídas à compostos como proteínas, lipídios, açúcares e ácidos carboxílicos, e linhas de emissão observadas por LIBS, atribuídas à C, Ca, Mg, K, CN, C₂ e N apresentavam potenciais para discriminação de café sadio e PVAs. Assim, foram desenvolvidos diferentes métodos analíticos para a quantificação de PVAs utilizando NIRS e LIBS e diferentes conjuntos de variáveis. O método utilizando a técnica NIRS e variáveis relacionadas à proteínas, lipídeos, açúcares e ácidos carboxílicos apresentou bom desempenho de predição com $R^2 > 0,9$, raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração (RMSEC) de 1,68% e raiz quadrada do erro médio quadrático de predição (RMSEP) de 1,69%. Os métodos analíticos utilizando a técnica LIBS e variáveis altamente correlacionadas com compostos orgânicos, apresentaram $R^2 > 0,8$ e RMSEC e RMSEP respectivamente inferiores a 2,2% e 3,8%. Por fim, os métodos analíticos empregando a técnica LIBS e variáveis relacionadas à composição mineral apresentaram bom desempenho apenas para a predição dos defeitos verdes e pretos, com $R^2 > 0,7$ e RMSEC e RMSEP respectivamente inferiores a 2,2% e 2,8%. Os métodos desenvolvidos podem ser considerados limpos, versáteis, com o mínimo preparo de amostra, capazes de detectar e quantificar misturas de PVAs em amostras de cafés não torrados.

Palavras chave: Qualidade de café, Grãos defeituosos, PVA, Seleção de variáveis, MLR, NIRS, LIBS

ABSTRACT

Coffee is an important commodity and a popular drink worldwide. Its economic value is due to the quality of the beverage, which is intrinsically related to the quality of the beans. Blends of defective beans containing Black, Green and Sour (BSG) with good beans cause negative impacts on beverages. The coffee agroindustry is devoid of methods capable of predicting the concentration of PVAs in coffee samples. Thus, the present proposal aimed to explore the composition of good coffees and PVAs using analytical techniques of direct analysis and propose methods for predicting the concentration of PVAs in samples of unroasted coffee. Near Infrared Spectrometry (NIRS) and Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) were evaluated. The NIRS results showed bands attributed to compounds such as proteins, lipids, sugars and carboxylic acids, and emission lines observed by LIBS, attributed to C, Ca, Mg, K, CN, C₂ and N had potential for discrimination of good coffee and BGSs. Methods were developed for the quantification of BGSs using NIRS and LIBS and different sets of variables. The method using NIRS technique and variables related to proteins, lipids, sugars and carboxylic acids presented good prediction performance with $R^2 > 0.9$, square root mean square error of calibration (RMSEC) of 1.68% and square root mean error of prediction (RMSEP) of 1.69%. Analytical methods using the LIBS technique and variables highly correlated with organic compounds presented $R^2 > 0.8$ and RMSEC and RMSEP respectively lower than 2.2% and 3.8%. Finally, analytical methods using the LIBS technique and variables related to mineral composition showed good performance only for the prediction of green and black defects, with $R^2 > 0.7$ and RMSEC and RMSEP respectively lower than 2.2% and 2.8 %. Developed methods can be considered clean, safe using minimal sample preparation, capable to detect and quantify mixtures of BGS in coffee samples before roasted step.

Key words: Coffee quality, Defective beans, BGS, Variables selection, MLR, NIRS, LIBS

Lista de figuras

Figura 1: Representação esquemática do experimento de Frederick William Herschel em 1800.	25
Figura 2: Espectro da radiação eletromagnética dividida por respectivos números de onda.	27
Figura 3: Representação esquemática dos diagramas de energia potencial: (--) oscilador harmônico e (—) oscilador anarmônico.	29
Figura 4: Representação esquemática de um espectrômetro NIRS.	30
Figura 5: Sistema LIBS básico.	34
Figura 6: Representação esquemática simplificada de um laser visando a emissão estimulada e consequentemente formação da luz laser.	36
Figura 7: Evolução temporal do plasma após o pulso do laser.	37
Figura 8: Representação esquemática do fenômeno de emissão (A) atômica e iônica, (B) molecular, em LIBS.	39
Figura 9: Moinho criogênico SPEX CertiPrep 6800 Freezer/Mill empregado para as moagens das amostras.	56
Figura 10: Em (A) Prensa mecânica Solab SL - 10/15 e em (B) molde empregado para confecções das pastilhas.	57
Figura 11: Espectrômetro no infravermelho próximo utilizados para as análises dos grãos de café (Disponível na Embrapa Instrumentação- São Carlos).....	58
Figura 12: Sistema LIBS montado modelo LIBS2500plus utilizado para a aquisição dos dados. (A) <i>Q-switched</i> Laser de Nd:YAG em 1064 nm, (B) câmara de ablação, (C) cabos de ótica do tipo <i>bundle</i> , (D) espectrômetro equipado com detector CCD e (E) microcomputador para o monitoramento dos espectros das amostras de café (Disponível na Embrapa Instrumentação- São Carlos).	59

Figura 13: Pastilha de amostra de café em comparação com uma moeda de dez centavos.	61
Figura 14: Espectros NIR sem tratamento espectral obtidos para as amostras de grãos pertencentes a diferentes classes.	67
Figura 15: Taxa de variação de 1° ordem dos espectros NIR para as diferentes amostras de grãos das diferentes classes.	68
Figura 16: Resultados da análise das componentes principais (PC1xPC2): (A) Gráfico de <i>scores</i> e (B) Variáveis que contribuem para a discriminação das classes (<i>loadings</i>).	69
Figura 17: Espectros LIBS obtidos para a amostra de grãos defeituosos do tipo ardido.	71
Figura 18: Fragmentos de espectros LIBS de amostra de café ardido referentes a região de emissão de: (A) CN ($B^2\Sigma^+ \rightarrow X^2\Sigma$), (B) C ₂ ($d^3\Pi_g \rightarrow a^3\Pi_u$).	72
Figura 19: Áreas médias referentes a integração dos sinais de emissão de CN 388,5 nm ($n=40$) para cada tipo de grão defeituoso e sadio de café.	75
Figura 20: Teste estatístico Tukey para as diferentes amostras no comprimento de onda 388,5 nm, (■) amostras significativamente diferentes (95% de confiança).	76
Figura 21: Resultados da análise das componentes principais (PC1xPC2): (A) Gráfico de <i>scores</i> e (B) Variáveis que contribuem para a discriminação das classes (<i>loadings</i>).	78
Figura 22: Teste estatístico Tukey para os valores médios ($n=5$) (A) pH e (B) teor de umidade obtidos nas diferentes amostras de café. Os símbolos ■ e ■ representam a não diferença significativa e diferença significativa (95% de confiança) entre as classes de grãos, respectivamente.	82
Figura 23: Gráficos das predições de defeitos, (A) ardido, (B) preto, (C) verde e (D) PVA, utilizando variáveis selecionadas por algoritmo <i>Wrapper</i>	87

Figura 24: Espectros LIBS ($n=40$) para um ponto no conjunto de calibração com diferentes tratamentos espectrais: (A) dados sem pré-processamento, (B) dados processados por SNV e (C) dados processados por SNV e primeira derivada.	90
Figura 25: Taxas de variações máximas e mínimas relativas as linhas de emissão previamente selecionadas para um ponto no conjunto de calibração: (A) C (I) 193,0 nm; (B) CN (1.1) 387,0 nm e CN (0.0) 388,5 nm; (C) C ₂ (0.0) 516,6 nm; (D) N (I) 742,3 nm, 744,2 nm e 746,8 nm e (E) O (I) 777,4 nm.....	91
Figura 26: Relação entre atual vs predito do conjunto de validação para cada tipo de grão defeituoso: (A) ardido, (B) preto e (C) verde.	93
Figura 27: Áreas médias referentes a integração dos sinais de emissão de Ca (II) 396,8 nm ($n=40$) para cada tipo de grão defeituoso e sadio de café.	96
Figura 28: Resultados da análise das componentes principais (PC1xPC2): (A) Gráfico de <i>scores</i> e (B) Gráfico de <i>loadings</i>	98
Figura 29: Relação entre atual vs predito do conjunto de validação para cada tipo de grão defeituoso: (A) ardido, (B) preto e (C) verde.	101

Lista de tabelas

Tabela 1: Regiões espectrais do infravermelho.....	28
Tabela 2: Lasers comumente empregados em LIBS	35
Tabela 3: Programa de moagem criogênica empregado para as amostras de café. 60	
Tabela 4: Média e desvio-padrão ($n=5$) dos parâmetros físico-químicos avaliados para as diferentes amostras de grãos café.	82
Tabela 5: Comprimentos de onda dos elementos e moléculas presentes nas amostras de café atribuídos com auxílio do NIST.....	72
Tabela 6: Classes de cafés discriminadas de acordo com as linhas de emissão selecionadas no espectro LIBS.	77
Tabela 7: Módulos dos coeficientes de correlação linear (r) entre as inflexões descendentes diferenciadas dos sinais de LIBS e NIRS.....	80
Tabela 8: Módulos dos coeficientes de correlação (r) entre os parâmetros físico-químicos e os dados obtidos em NIRS e LIBS.....	84
Tabela 9: Variáveis selecionadas por <i>Wrapper</i> para a construção de modelos de predição de defeitos em grãos sadios.	86
Tabela 10: Resultados estatísticos do MLR obtido para cada modelo de predição de defeitos.....	87
Tabela 11: Resultados de desempenho dos modelos MLRs desenvolvidos para cada tipo de defeito misturado ao grão sadio.	94
Tabela 12: Classes de cafés discriminadas de acordo com as linhas de emissão elementares selecionadas no espectro LIBS.	97

Tabela 13: Resultados de desempenho dos modelos MLRs desenvolvidos para cada tipo de defeito misturado ao grão sadio empregando variáveis correspondentes a linhas elementares.	102
---	-----

Lista de abreviaturas

ABIC	Associação Brasileira das Indústrias de Café
ANOVA	Analysis of variance
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
AOTF	Acousto-Optical Tunable Filters
ATR	Attenuated total reflectance
CCD	Charge-Coupled Device
CT	Czerny-Turner
DR	Diffuse reflectance
DTGS	Deuterated Triglycine Sulfate
ESI-MS	Electrospray ionization – mass spectrometry
FAAS	Flame Atomic Absorption Spectrometry
FT	Fourier Transform
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
FWHM	full width at half maximum
GA	Genetic algorithm
GC-MS	Gas chromatography – mass spectrometry
HCA	Hierarchical cluster analysis
ICCD	Intensified Charge-Coupled Device
ICO	International Coffee Organization
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
IR	Infrared
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LIBS	Laser Induced Breakdown Spectroscopy
MLR	Multiple linear regression
MSC	Multiplicative scatter correction
NASA	National Aeronautics and Space Administration
ND:YAG	Neodymium-Doped Yttrium Aluminium Garnet
NIRS	Near Infrared Spectroscopy
NIST	National Institute of Standards and Technology
PCA	Principal component analysis
PCR	Principal component regression

PLS	Partial least squares regression
PLS-DA	Partial least squares-discriminant analysis
PLSR	Partial least squares regression
PQC	Programa da Qualidade do Café
PVA	Pretos, Verdes e Ardidos
QG	Qualidade Global
R²	Coeficiente de determinação
RAE	Relative absolute error
RBFNN	Radial basis function neural network
RMSEC	Root mean squares error of calibration
RMSEP	Root mean squares error of validation
SAA	Secretaria de Agricultura e Abastecimento
SNV	Standard normal variate
SPA	Successive projection algorithm
SVD	Singular values decomposition
SVM	Support vector machine
SW	Stepwise
UV	Ultravioleta

Sumário

1. Introdução	21
2. Revisão Bibliográfica	25
2.1. NIRS	25
2.1.1. Histórico	25
2.1.2. Fundamentos	27
2.2. LIBS	32
2.2.1. Histórico	32
2.2.2. Fundamentos	34
2.3. Pré-tratamento dos dados e Ferramentas Quimiométricas	40
2.3.1. Transformações – Derivadas	41
2.3.2. Transformações – Correção multiplicativa de espalhamento (MSC)	42
2.3.3. Transformações – Variação normal padrão (SNV)	42
2.3.4. Pré-processamento dos dados – centrar na média e autoescalamento	43
2.3.5. Ferramentas Quimiométricas – PCA	44
2.3.6. Ferramentas Quimiométricas – Métodos de regressão multivariada (Calibração e Validação)	45
2.3.7. Ferramentas Quimiométricas – Seleção de variáveis	47
2.4. Análise da Qualidade do Café	48
3. Objetivos Gerais	54
3.1. Objetivos Específicos	54
4. Materiais e Métodos	55
4.1. Amostras	55
4.2. Equipamentos	55
4.3. Procedimento Experimental	60
4.3.1. Avaliação individual das técnicas LIBS e NIRS para obtenção de informações químicas e posterior associação dos dados das duas técnicas	60
4.3.2. Correlação do teor de umidade dos grãos e pH dos extratos com dados de LIBS e NIRS	62
4.3.3. Desenvolvimento e avaliação de modelos de predição para quantidades PVAs em amostras cafés, utilizando as técnicas NIRS e LIBS	63
4.3.4. Avaliação da técnica LIBS para obtenção de informações químicas elementares potenciais para discriminação das classes de grãos estudadas	65
4.3.5. Desenvolvimento de modelos de regressão empregando dados elementares observados por LIBS	65

5. Resultados e discussão	66
5.1. Avaliação individual das técnicas LIBS e NIRS para obtenção de informações químicas e posterior associação dos dados das duas técnicas	66
5.2. Verificação de correlação entre pH e teor de umidade com dados de LIBS e NIRS	81
5.3. Desenvolvimento e avaliação de modelos de predição para quantidades PVAs em amostras cafés, utilizando as técnicas NIRS e LIBS	84
5.3.1. Processamento dos dados e desenvolvimento do método empregando NIRS	85
5.3.2. Processamento dos dados e desenvolvimento do método empregando LIBS	89
5.4. Avaliação da técnica LIBS para obtenção de informações químicas elementares potenciais para discriminação das classes de grãos estudadas	95
5.5. Desenvolvimento de modelos de regressão empregando dados elementares observados por LIBS	99
6. Conclusões	103
7 Perspectivas Futuras	104
REFERÊNCIAS	105

1. Introdução

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo. Segundo a *International Coffee Organization* (ICO) estima-se que o consumo mundial foi de aproximadamente 158,7 milhões de sacas de 60 kg, no ano de 2017 [1]. Nesse âmbito, o Brasil apresenta relativo destaque, pois é o maior produtor (com cerca de 55 milhões de sacas) e o segundo maior consumidor, perdendo apenas para os Estados Unidos [2,3]. A disseminação mundial do consumo da bebida veio acompanhada de um aumento na exigência por qualidade do café, deixando esse parâmetro de ser um simples diferencial, para se tornar um requisito essencial.

A qualidade do café está intimamente relacionada com suas propriedades organolépticas que, por sua vez, dependem da composição química dos grãos. Porém, diversos fatores podem influenciar nessa composição química como a variedade da planta, condições de cultivo e o pré-processamento pós colheita [4].

Segundo provadores especializados, dentre os fatores preponderantes para qualidade o café, a variedade do grão é tida como a mais importante [3]. No Brasil, as variedades mais produzidas são a *Coffea arabica* e a *Coffea canephora*, geralmente conhecidas como arábica e conilon/robusta, respectivamente [5,6]. Entre as duas variedades citadas, o café arábica é considerado de mais alta qualidade por apresentar maior concentração de açúcar e menor concentração de cafeína, o que proporciona um sabor mais suave a bebida [7]. Entretanto, a qualidade do café não está somente relacionada à variedade, mas também a isenção de misturas. Assim, um café de alta qualidade é aquele que apresenta essencialmente grãos da espécie arábica sadios, sendo inadmissível qualquer tipo de mistura, ainda que sejam grãos da espécie arábica que apresente defeito [8,9]. A introdução de defeitos de qualquer natureza deprecia a qualidade final da bebida [10].

No agronegócio cafeeiro, os defeitos são classificados como intrínsecos ou extrínsecos. Defeitos extrínsecos são provenientes de impurezas que são incorporadas ao café durante o processo de colheita [11,12]. Essas impurezas podem ser pedras, gravetos, cascas, folhas, entre outros [10]. Já os defeitos intrínsecos são provenientes de modificações fisiológicas ou genéticas nos frutos, associadas às colheitas prematuras ou tardias.

Os defeitos intrínsecos mais frequentes em misturas com grãos sadios, são os grãos Pretos, Verdes e Ardidos, comumente intitulados como PVA. Os grãos verdes

são obtidos por meio da colheita prematura, os ardidos são ocasionados pela escassez hídrica durante o cultivo ou por processo de fermentação anormal dos grãos verdes e os pretos são grãos passados, resultantes de colheita tardia [13]. A mistura de PVAs à grãos sadios ocasiona depreciação da qualidade por inserir sabores intenso, azedo e adstringente à bebida [14].

Atualmente, estima-se que a produção dos grãos defeituosos seja de 15 a 20% do total colhido [15,16]. Assim, considerando a possibilidade de aproveitamento dos grãos defeituosos e tendo em vista a problemática das misturas, normativas nacionais e internacionais foram desenvolvidas para estabelecer um padrão técnico para a certificação da qualidade do café.

A normativa internacional proposta pela ICO, recomenda no máximo 86 defeitos por 300 g de grãos sadios da espécie arábica. Para cafés constituídos por grãos da espécie robusta, a quantidade de defeito permitida aumenta, sendo 150 defeitos por 300 g [17,18].

As normativas brasileiras foram propostas pela Associação Brasileira das Indústrias de Café (ABIC) juntamente com a Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA), por meio do Programa da Qualidade do Café (PQC) [3,19] e da resolução normativa SAA-28 de 01 de junho de 2007 [20], respectivamente. De acordo com essas regulamentações, o café brasileiro é categorizado como Gourmet, Superior e Tradicional.

No PQC a categorização é feita por degustadores altamente treinados, que experimentam a bebida e, a partir de características como aroma, acidez, corpo, adstringência, fragrância do pó e amargor, entre outras, classificam o café de acordo com a qualidade global (QG) através de notas que variam de 0 a 10. Deste modo, os cafés com notas entre 4,5 a 6,0 são classificados como Tradicionais; 6,1 a 7,2 como Superiores e 7,3 a 10 como Gourmets. Cafés que apresentarem QG inferiores a 4,5, são denominados impróprios para o consumo [3]. Embora, a categorização de cafés feitas pelo PQC seja de extrema importância para a cafeicultura nacional, ela pode estar sujeita a subjetividade, por se tratarem de medidas que dependem de sentidos humanos [21,22].

Pela normativa SAA-28, os cafés são categorizados pelo teor de PVAs presentes. Cafés Gourmet devem conter apenas grãos da espécie arábica e não podem apresentar PVAs na composição de suas misturas. Para as classes Superior e Tradicional são permitidas misturas de PVAs no máximo de 10% e 20%,

respectivamente, além de grãos conilon/robusta, desde que o sabor na análise sensorial não seja pronunciado [20]. Embora essa normativa tenha por objetivo controlar o emprego dos PVAs nas misturas de café, atualmente estima-se que no mercado interno haja a inserção de até 50% de PVAs, sendo o máximo recomendado 20% [13]. Como a obtenção dos grãos demanda tempo e investimento, mesmo após a separação dos grãos, os rejeitados são novamente misturados aos grãos sadios em uma porcentagem conhecida. Essa mistura é destinada ao mercado interno com o valor relativamente inferior [9,15,16].

Para checar infringência à essa normativa ou controlar as misturas de PVAs, há três procedimentos amplamente difundidos em fazendas e cooperativas: separação manual, separação eletrônica e a classificação por cor, sendo esse último o mais amplamente empregado. Contudo, como os grãos verdes, ardidos e sadios apresentam praticamente a mesma coloração, a eficiência do procedimento de classificação por cores é baixa e pode apresentar uma alta porcentagem de rejeição de grãos sadios [23,24]. Já os procedimentos baseados em separação manual são morosos e altamente sujeito à erros. Além disso, nenhum dos procedimentos supracitados podem ser empregados na análise de pó.

Diante desse cenário, inúmeros métodos analíticos oficiais são frequentemente utilizados para determinação de parâmetros considerados importantes para a qualidade do café, como: o método do Instituto Adolfo Lutz (1985) para determinação do pH e da solubilidade em água [25], o método da *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC) (1945) para determinação de cafeína [26], o método AOAC (1980) para determinação de proteínas [26] e o método descrito por Browning (1967) para determinação de polissacarídeos totais [26].

Os referidos métodos apresentam resultados bastante satisfatórios, todavia demandam grandes quantidades de reagentes químicos (orgânicos e inorgânicos), possuem baixa frequência analítica e geram grandes quantidades de resíduos. Além disso, esses métodos são morosos, o que inviabiliza o seu emprego para a obtenção de parâmetros analíticos para classificação rotineira de café.

A partir do exposto observa-se a necessidade por métodos analíticos limpos (sem geração de resíduos) que estudem os PVAs de maneira, simples, rápida e de baixo custo [27–29]. Assim, o presente trabalho teve por objetivo atuar nessa lacuna empregando técnicas espectroscópicas para análise da composição orgânica e da composição elementar de grãos bons e PVAs. Para esse propósito foram

selecionadas a espectroscopia no infravermelho próximo, (NIRS, do inglês *Near Infrared Spectroscopy*) e a espectrometria de emissão óptica em plasma induzido por laser (LIBS, do inglês *Laser Induced Breakdown Spectroscopy*).

A NIRS destaca-se por apresentar relativas vantagens em comparação à outras técnicas dedicadas à análise da composição orgânica, uma vez que possibilita a análise rápida, direta, dispensando complexos procedimentos de preparo da amostra [17,30,31]. Considerando que em NIRS, as bandas moleculares mais frequentes são associadas à estiramentos C-H, N-H e O-H, os quais são geralmente atribuídos à compostos orgânicos como proteínas, lipídeos, açúcares e água [32,33], essa técnica pode fornecer informações importantes para discriminar as classes de grãos. Apesar da NIRS ser amplamente empregada para a análise da qualidade de café, sua aplicação na análise de PVAs em cafés não torrados e moídos é ainda um tema inédito, assim como a associação dos dados analíticos de NIRS e de LIBS.

A LIBS quando comparada às técnicas espectroanalíticas atômicas bem estabelecidas apresenta-se como uma alternativa atraente e versátil. Pois, além de permitir análises diretas em amostras sólidas, líquidas ou gasosas, a técnica apresenta uma série de outras vantagens como reduzido custo por análise, possibilidade da análise *in-situ* [34–36], simplicidade, rapidez na obtenção de resultados, detecção simultânea da composição elementar da amostra e potencialidade para avaliar espécies orgânicas por meio das linhas de emissão de elementos como C, H, O, N e P e das estruturas rotacionais finas de moléculas diatômicas como CN [37] e C₂ [38]. Essas características da LIBS têm sido amplamente exploradas para avaliação de materiais biológicos [35,39–41], óleos [42–44], plantas [45–48], explosivos [38,49], alimentos [50–55] entre outros.

Considerando o acima exposto, no presente trabalho as técnicas LIBS e NIRS foram exploradas para análise qualitativa e quantitativa de PVAs sendo possível acessar seus potenciais analíticos a partir da aplicação de adequados tratamentos espectral, método de seleção de variáveis e estratégias quimiométricas. potencialidade analíticas das técnicas foi utilizando análise estatística e ferramentas quimiométricas.

2. Revisão Bibliográfica

Considerando os temas que motivaram o desenvolvimento desse trabalho essa revisão bibliográfica aborda um panorama das técnicas LIBS e NIRS, das principais ferramentas avaliadas para tratamentos dos dados espectrais e obtenção da informação analítica e do estado da arte na análise de qualidade de café.

2.1. NIRS

2.1.1. Histórico

O conhecimento da espectroscopia na região do infravermelho próximo se iniciou com o cientista alemão Frederick William Herschel em 1800, por meio de um de seus experimentos que buscava compreender qual cor da radiação solar produzia mais calor. Herschel com o auxílio de um prisma de vidro, para dispersar a radiação solar e um termômetro com bulbos negros, observou que a temperatura aumentava ao aproximar o termômetro na região vermelha visível (Figura1).

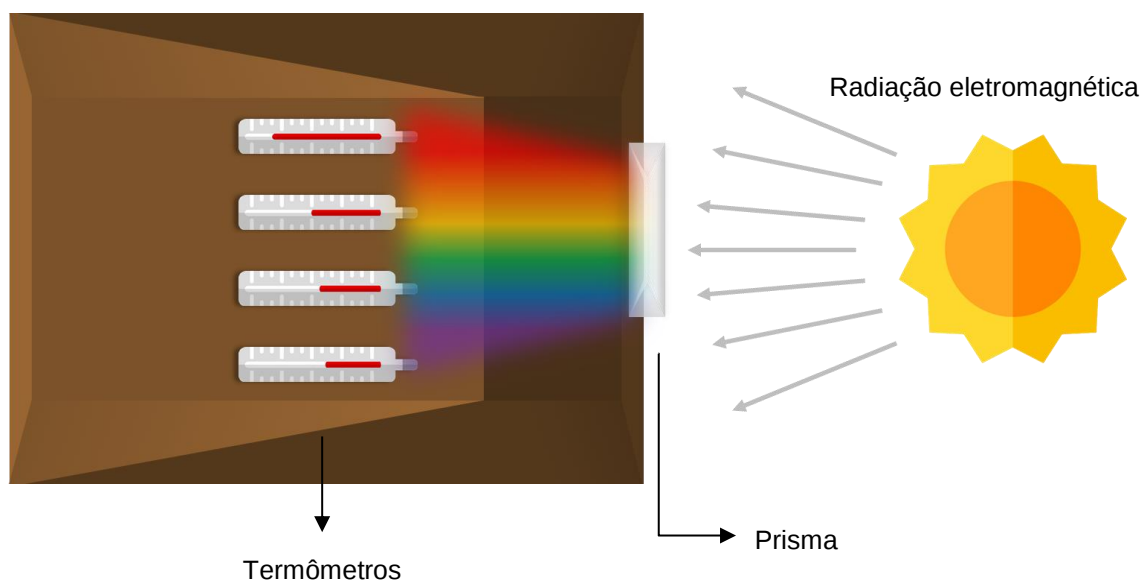


Figura 1: Representação esquemática do experimento de Frederick William Herschel em 1800.

Fonte: Adaptado de Barr [56].

Contudo, o pesquisador não se limitou a esses resultados e continuou aprimorando seus experimentos, indo além da região vermelha visível, e sua observação foi que a temperatura ainda continuava a aumentar. Devido a esses resultados, Herschel relatou sua conquista denominando a região encontrada além do vermelho como raios caloríficos. Posteriormente, esses raios caloríficos foram denominados como região do infravermelho próximo [56,57].

Até o início dos anos 1880 sua descoberta ficou adormecida impedindo seu progresso, devido à falta de tecnologia adequada para compreender a parte fora do espectro visível.

Nessa década houve um importante avanço na espectroscopia do infravermelho próximo, pois Abney e Festing conseguiram obter o primeiro espectro nas amostras de reagentes orgânicos líquidos. Isso ocorreu, por meio de uma fotografia especial desenvolvida por Niepce e Daguerre, anos antes. A obtenção desses espectros, marcou não só a primeira medida em NIRS, mas também permitiu as primeiras interpretações, uma vez que Abney e Festing conseguiram atribuir as respectivas bandas observadas e começaram a compreender a importância da ligação de hidrogênio para os espectros NIRS [58].

Com o decorrer dos anos, as tecnologias para a obtenção dos espectros foram evoluindo e alguns trabalhos foram desenvolvidos, porém focando apenas as análises qualitativas. No entanto, no ano de 1938, Joseph W. Ellis e Jean Bath conseguiram determinar a quantidade de água presente na amostra de gelatina. Mais tarde, no início dos anos 50, o alto investimento do departamento de agricultura dos Estados Unidos gerou um grande impulso para análises que visavam o emprego de NIRS. Neste sentido, um pesquisador chamado de Karl Norris apresentou relativo destaque, pois desenvolveu métodos para análises qualitativas e quantitativas de produtos agrícolas e alimentos [57,59].

No Brasil, o primeiro trabalho relatado na literatura foi em meados da década de 90, utilizando o NIRS para a análise de edulcorantes em plantas nativas da América do Sul.

Atualmente a técnica NIRS é amplamente desenvolvida e fundamentada, além de ser usualmente empregada para a análise qualitativa de diferentes analitos em variadas amostras. No entanto, a análise quantitativa ainda é uma questão a ser explorada, pois os métodos com este propósito somente são alcançados com o emprego de ferramentas quimiométricas.

2.1.2. Fundamentos

Nesta seção serão abordados, de maneira geral, conceitos da radiação eletromagnética e suas possíveis divisões, espectroscopia vibracional associada a modelos de osciladores harmônicos e anarmônicos e obtenção dos espectros de absorção por meio de instrumentação adequada.

O espectro da radiação eletromagnética abrange uma extensa faixa de números de onda e é usualmente dividido como ondas de rádio, micro-ondas, infravermelho (IR, do inglês *infrared*) (IV), luz visível, ultravioleta (UV), raios-x e raios-gama [60], o qual pode ser observado na Figura 2.

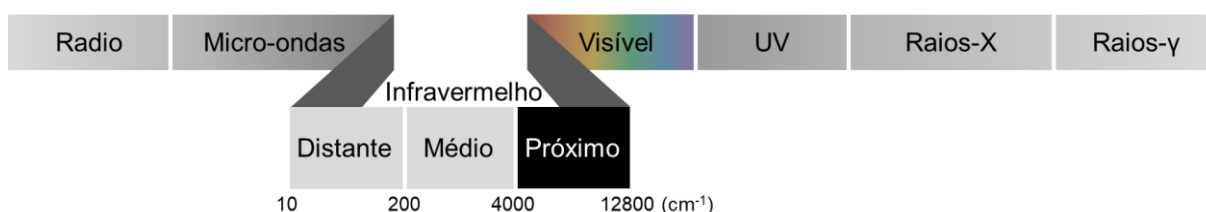


Figura 2: Espectro da radiação eletromagnética dividida por respectivos números de onda.

Fonte: Adaptado de Skoog [60].

Dadas as divisões do espectro de radiação, ainda de acordo com a Figura 2, a região espectral do infravermelho compreende o intervalo de números de onda entre 12800 a 10 cm^{-1} (780 a 100.000 nm). Por sua vez, esse intervalo é subdividido em outras três regiões, denominadas IR-próximo, IR-médio e IR-distante e seus respectivos números de onda estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Regiões espectrais do infravermelho.

Região	Número de onda (cm^{-1})	Comprimento de onda (nm)
Próximo	12800 – 4000	780 – 2500
Médio	4000 – 200	2500 – 5000
Distante	200 – 10	5000 – 100.000

Fonte: Adaptado de Donald [57].

Para compreender a origem do espectro NIRS e consequentemente empregá-lo como importante ferramenta analítica é necessário ter em vista os conhecimentos da espectroscopia vibracional.

A radiação infravermelha não apresenta energia suficiente para promover uma transição eletrônica, no entanto, absorções dessa radiação é limitada apenas as moléculas que apresentem baixos níveis de energia vibracionais e rotacionais. Para que uma dada molécula absorva radiação IR é necessário que haja uma variação no momento de dipolo durante os movimentos de vibração e rotação. Em outras palavras, se a frequência da radiação incidente é igual a frequência de vibração natural da molécula, há uma mudança no momento de dipolo, ocasionando uma amplitude da vibração molecular, dando origem ao espectro de absorção. De maneira análoga, o movimento rotacional molecular em torno do seu centro de massa, promove mudanças no momento de dipolo, possibilitando assim a interação da radiação eletromagnética [61].

Considerando o acima exposto e que NIRS está fundamentada nas interações da radiação eletromagnética (12800 a 4000 cm^{-1}) com os constituintes da amostra, as vibrações naturais das moléculas resultam em mudanças na energia potencial do sistema, que por sua vez são descritas por um oscilador anarmônico quântico [57,62].

Embora o modelo harmônico ajude a compreender a espectroscopia vibracional, ele é simples, pois considera que a variação da energia potencial seja descrita por uma parábola, uma vez que se aproxima a um modelo mecânico constituído de duas massas conectadas a uma mola. Enquanto, o modelo anarmônico considera a variação da energia potencial da molécula em relação à oscilação da distância entre os átomos presentes. A Figura 3 ilustra esquematicamente os modelos harmônicos e anarmônicos quânticos [33,59].

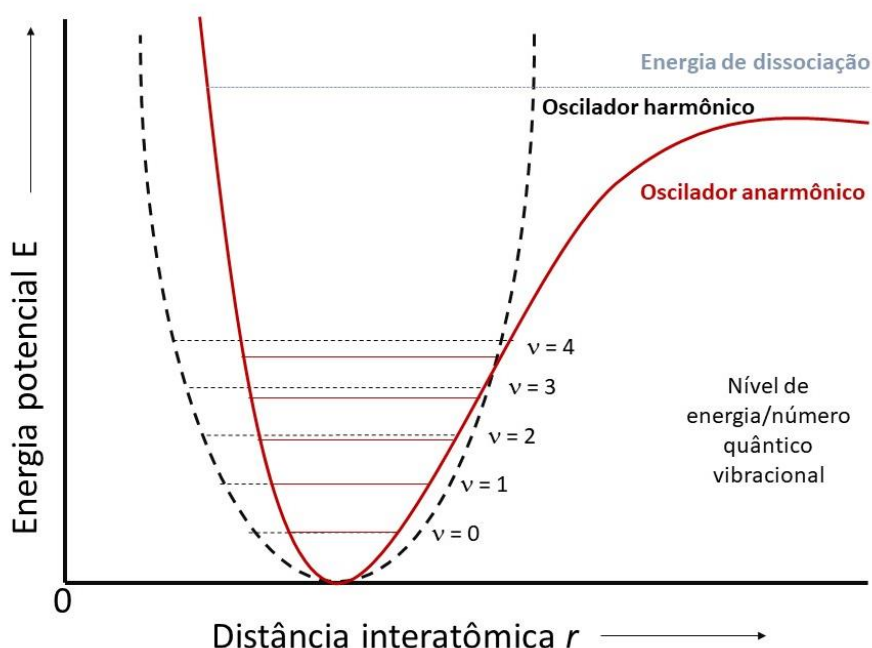


Figura 3: Representação esquemática dos diagramas de energia potencial: (--) oscilador harmônico e (—) oscilador anarmônico.

Fonte: autor

De acordo com a Figura 3 é possível observar que as curvas harmônicas e anarmônicas são praticamente idênticas em energia potencial baixa. Entretanto, o modelo anarmônico é considerado mais realista para representar as energias potenciais de uma molécula diatômica, pois este oscilador leva em conta comportamentos não ideais em um sistema, tais como a repulsão de nuvens eletrônicas quando há aproximação dos núcleos dos átomos e o comportamento variável da força de ligação quando os átomos são separados. Além disso, os níveis vibracionais são igualmente espaçados para o oscilador harmônico e segue a regra de seleção, que estabelece por meio da teoria quântica que as transições vibracionais só podem ocorrer quando o número quântico vibracional varia em uma unidade, isto é, $\Delta v = \pm 1$. Deste modo, o espectro de absorção em NIRS apresentaria um único pico [33]. Adicionalmente a isso, o modelo anarmônico prevê que para números quânticos altos $v=3$ ou $v=4$, ΔE apresenta-se menor e que a regra de seleção não é rigorosamente seguida [59].

Devida a essa anarmônica, transições fracas denominadas sobretons (do inglês, *Overtones*) e bandas de combinações advindas da absorção de um fóton por dois modos vibracionais, são observadas. Neste sentido, como o átomo de hidrogênio vibra em uma amplitude maior devido à sua pequena massa, os espectros em NIRS consequentemente são basicamente constituído por interações das ligações de C-H, N-H e O-H. Interações das ligações de outros átomos como C-C, C-N, C=O podem ser observados, no entanto com uma menor intensidade [57,59,63].

Como as ligações C-H, N-H e O-H basicamente constituem o espectro NIRS, análises de humidade, proteínas, açúcares e gorduras são favorecidas. Assim, para a detecção desses sinais é necessário ter um arranjo instrumental adequado.

Nesse sentido, a instrumentação NIRS é constituída por cinco componentes fundamentais: a fonte de radiação contínua, o porta-amostras, um seletor de comprimento de onda (monocromador), detector, além de um processador de sinal responsável por converter o sinal elétrico advindo do detector em sinal analítico. O diagrama de blocos da Figura 4 ilustra a disposição dos componentes instrumentais de um espectrômetro NIRS.



Figura 4: Representação esquemática de um espectrômetro NIRS.

Fonte: Autor

As fontes de radiação devem ser intensas e estáveis para evitar variações no sinal analítico. Assim, as lâmpadas tungstênio-halogênio, que emitem radiação contínua em uma faixa espectral de 13.000 a 4000 cm^{-1} , são amplamente empregadas como fonte em NIRS. Essa fonte é composta de um filamento de tungstênio envolto em um cilindro de quartzo preenchido com gás inerte e um halogênio, como Br_2 e I_2 [61].

O porta-amostras para as medidas de absorção são transparentes e em geral o material é constituído de sílica ou quartzo apresentando o caminho óptico variável de 0,1 a 10 cm [60].

Dependendo da configuração do monocromador, a aquisição do espectro NIRS pode ser feita por diferentes princípios. Esses princípios consideram os modos da interação da radiação eletromagnética com a matriz e são compreendidos por: reflectância especular, reflectância difusa, absorção, refração e espalhamento. Essas interações podem ocasionar ao espectro NIRS algumas dependências de parâmetros físicos como: tamanho de partícula, umidade, compactação entre outros. Pensando nisso, a evolução da tecnologia proporcionou a técnica NIRS, o emprego de espectrômetros equipados com monocromadores baseados em redes de difração, sistemas interferométricos (FT, do inglês *Fourier Transform*) e Filtros Ópticos Acústicos Sintonizáveis (AOTF, do inglês *Acousto-Optical Tunable Filters*) [64]. Atualmente, os espectrômetros mais utilizados são aqueles baseados em FT, pois apresentam relativas vantagens em relação aos outros nos quesitos de tempo de análise, relação sinal-ruído e precisão e exatidão das medidas [59].

Os detectores ideais devem apresentar alta sensibilidade e curto tempo de resposta para registro do sinal. Nesse sentido, os detectores comumente utilizados são os fotocondutores de sulfeto de chumbo e fotodiodos de antimoneto de índio. Atualmente outros arranjos de detectores vêm sendo empregados, como detectores fotovoltaicos de arseneto de gálio e índio (InGaAs) e sulfato de triglicina deuterada (DTGS, do inglês *Deuterated Triglycine Sulfate*), tais detectores são vantajosos devido à boa sensibilidade, ampla faixa espectral de resposta e velocidade na aquisição dos dados [61].

De acordo com acima exposto, observa-se que a espectroscopia do infravermelho próximo apresenta valor incontestável devido a sua praticidade de análise, pois além de fornecer resultados rápidos e confiáveis, possibilita o desenvolvimento de métodos não destrutivos com a mínima geração de resíduos, sendo a sua maior desvantagem, a baixa sensibilidade para analitos em baixas concentrações.

2.2. LIBS

2.2.1. Histórico

LIBS (do inglês, *Laser-induced breakdown spectroscopy*) é uma técnica que vem apresentando um franco desenvolvimento, principalmente nas duas últimas décadas. [65]. Sua evolução instrumental está intimamente relacionada com os avanços tecnológicos dos lasers, que por sua vez, foram iniciados com a descoberta da emissão estimulada por Albert Einstein, em 1917 [66].

A teoria de emissão estimulada incentivou inúmeros estudos até que em 1960, Theodore Maiman construiu o primeiro laser de rubi [66,67]. Posteriormente, em 1962, os pesquisadores Fred Brech e Lloyd Cross, relataram o primeiro espectro obtido por plasma induzido sobre um material vaporizado [67]. Neste experimento, os autores empregaram um laser de rubi para produzir vapores na superfície das amostras e posteriormente, com o auxílio de uma fonte de centelha, esses vapores eram reexcitados formando um plasma dando origem ao espectro de emissão [68]. Dessa maneira, esse trabalho marca o início do emprego do laser como fonte de excitação, ou seja, o nascimento da LIBS [69].

A partir dessa nova abordagem, alguns trabalhos como os dos pesquisadores Debras-Guédon e Liodec, bem como o de Maker e colaboradores, no ano de 1963, contribuíram para o início das análises qualitativas empregando a técnica [68]. Entretanto, no ano de 1964, a primeira análise quantitativa direta foi feita por Runge e colaboradores. Nesse trabalho, os autores empregaram pulsos de um laser de rubi diretamente nas amostras de liga metálica, visando produzir a excitação de elementos como Ni e Cr. Deste modo, foram obtidas curvas de calibração lineares com desvios padrões relativos de 3,8% e 8,2% para Ni e Cr, respectivamente [70].

Com o desenvolvimento das análises químicas utilizando LIBS, o interesse em entender o fenômeno de ruptura e formação do plasma também foram despertados. Nesse sentido, Zel'dovich e Raizer, propuseram o primeiro modelo teórico que descrevia os processos físicos intrínsecos na ruptura de gases induzida por laser [66]. Esse modelo foi apontado como um estudo completo, uma vez que considerava a dinâmica dos choques entre as moléculas, além do aquecimento e resfriamento do plasma bem como os possíveis efeitos que esses fatores poderiam acarretar ao

espectro [68]. Esses trabalhos minuciosos geraram entusiasmos na comunidade científica, despertando interesses de empresas focadas em instrumentação analítica.

Assim, no início dos anos 70, empresas como Jarrell-Ash dos Estados Unidos e Carl Zeiss da Alemanha, apresentaram os primeiros instrumentos baseados em laser como um fonte para promover a amostragem e um arco de centelha para excitar as espécies das amostras [66,67]. Porém, com o avançar dos anos durante esta década, observou-se um declínio em pesquisas envolvendo LIBS. Já que seu custo era relativamente alto e o desempenho analítico limitado, quando comparadas às técnicas analíticas em franca ascensão com a espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS, do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) e espectrometria de emissão óptica em plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) [36].

O início da década de 80 marca o renascimento da técnica LIBS, devido ao desenvolvimento de lasers mais robustos, estáveis, baratos e leves, juntamente com detectores mais sensíveis, versáteis e menores, como os dispositivos de cargas acopladas intensificadas (ICCD, do inglês *Intensified Charge-Coupled Device*). Esses detectores permitiram melhor sensibilidade, resolução espectral e discriminação entre a emissão do analito e o fundo gerado pelo contínuo do plasma [34,71]. Dessa maneira, o LIBS apresentou outras capacidades, como por exemplo a possibilidade de análise *in situ*, multielementar e com o mínimo preparo de amostra. Essas virtudes e potencialidades motivaram pesquisadores a uma nova geração de desenvolvimento de métodos empregando LIBS [67,68,71].

Atualmente, LIBS é uma técnica com grande destaque na comunidade científica, pois é amplamente empregada para o desenvolvimento de métodos em variadas matrizes, sejam sólidas, líquidas ou gasosas [71–73]. Em relação a evolução instrumental, hoje é possível encontrar LIBS miniaturizados, embarcados e com possibilidade de análise a distância, haja vista o projeto da *National Aeronautics and Space Administration* (NASA) para a análise e exploração do planeta Marte. Neste projeto, um robô-rover chamando Curiosity foi desenvolvido e embarcado várias técnicas analíticas, dentre elas o LIBS [68,74–78]. Porém, mesmo com todos os avanços tecnológicos e apoio de grandes centros de pesquisas, LIBS ainda apresenta alguns obstáculos a serem contornados para que se torne uma técnica consagrada e amplamente empregada para as análises de rotina em indústrias [65,67].

2.2.2. Fundamentos

Em linhas gerais, LIBS é uma técnica espectroanalítica que está fundamentada no emprego de pulsos de laser de alta energia capazes de promover em uma única etapa uma microamostragem, quebra das estruturas originalmente presentes nas amostras, excitação de átomos, íons e fragmentos moleculares [65]. Sua configuração básica é composta por um laser pulsado para a formação do plasma, um sistema de lentes para a focalização do feixe do laser na superfície da amostra, um porta-amostras, um sistema de lentes para a captura do sinal de emissão, cabos de fibra óptica para levar o sinal de emissão até o espectrômetro, dispositivos para a detecção/conversão do sinal de emissão em sinal elétrico e um computador para transformar os sinais elétricos em espectros de emissão. Para exemplificar, na Figura 5 é mostrada esquematicamente a configuração de um sistema LIBS básico.

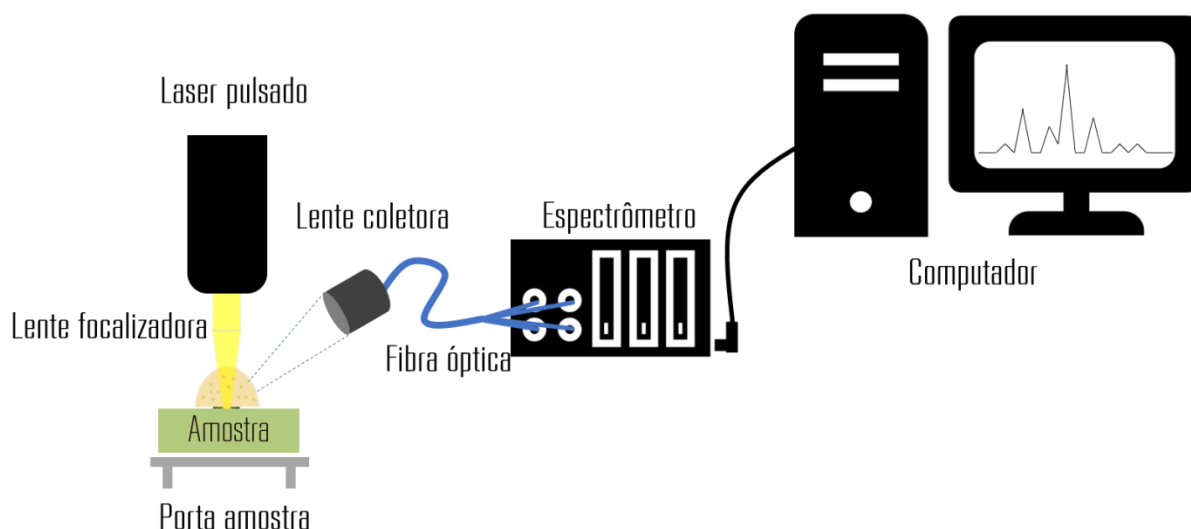


Figura 5: Sistema LIBS básico.

Fonte: Autor

Dentre os dispositivos citados, cabe ressaltar que os mais importantes são o laser e o espectrômetro, sendo o laser o coração da técnica. Nesse sentido, nessa seção serão abordados, de forma resumida, conceitos de laser, formação do plasma e obtenção do sinal analítico em LIBS.

O nome laser é uma sigla oriunda do inglês *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* e é baseada na teoria da emissão estimulada descrita por Albert Einstein, em 1917 [67]. Atualmente existem diferentes tipos de lasers que podem ser empregados em LIBS como laser CO₂, excímeros (halogênios ligados a gases nobres) e lasers de estado sólido, cujos meios ativos são constituídos por cristais dopados com uma espécie ativa (átomo), sendo os mais comuns o Nd:YAG (do inglês, *Neodymium-Doped Yttrium Aluminium Garnet*) e Ti:Safira. Cada um deles emite em um respectivo comprimento de onda e apresenta diferentes energias de pulso. A Tabela 2 lista os diferentes lasers comumente empregados em LIBS e suas respectivas características.

Tabela 2: Lasers comumente empregados em LIBS

Tipo de laser	Comprimento de onda (nm)	Energia por pulso (mJ)
Exímeros (g)	308 (XeCl), 248 (KrF) e (194) ArF	0,5 a 200
CO ₂ (g)	10600	1 a 500
N ₂ (g)	337	0,1 a 0,6
Microship (s)	1064	<0,1
Ti:Safira (s)	800	0,01 a 6
Nd:YAG (s)	1064	10 a 1000

(g) laser no estado gasoso; (s) laser no estado sólido

Fonte: Adaptado de Radziemski [68] e Cremers [69].

O laser mais utilizado em LIBS é o Nd:YAG, devido à características como: baixo custo relativo (aproximadamente U\$ 15000), demandar pouca manutenção, ser compacto e apresentar pouca flutuação [66]. Esse laser é constituído por uma matriz de óxido de alumínio e ítrio (Y₂Al₂O₃) dopado com o íon neodímio (Nd⁺) e proporciona, através de seus pulsos, temperaturas de plasmas em torno de 10.000 – 20.000 K, possibilitando inúmeras aplicações [47,65].

Um laser de estado sólido é constituído basicamente por três partes principais, uma fonte externa, um conjunto de espelhos e um meio ativo. A representação esquemática de um laser está disposta na Figura 6.



Figura 6: Representação esquemática simplificada de um laser visando a emissão estimulada e consequentemente formação da luz laser.

Fonte: Autor.

O processo de formação da luz laser ocorre da seguinte maneira: inicialmente, os átomos do meio ativo estão em seu estado fundamental e através de um estímulo da fonte externa, a maioria dos átomos é excitada, ocorrendo o fenômeno denominado de inversão de população. A fonte externa normalmente excita os átomos do meio ativo pela incidência de radiação eletromagnética. A emissão espontânea de um fóton, por um dos átomos excitados, estimula a desativação do estado excitado de outro átomo, gerando um fóton idêntico ao que desencadeou a emissão. Esse processo em cadeia gera uma avalanche de emissões estimuladas. A amplificação dessas emissões ocorre na cavidade do laser, pela reflexão dos fótons nos espelhos, concentrando os fótons no meio ativo e provocando mais emissões estimuladas. A pequena porção da radiação estimulada que emerge continuamente através do semi-espelho é denominada luz laser [79]. Para produção do laser pulsado, algumas estratégias para concentração da luz laser são utilizadas, como por exemplo o Q-Switch. Esse dispositivo possui a função de concentrar a liberação da luz em um curto espaço de tempo (micro, nano ou femtossegundos). A liberação da radiação laser concentrada em curto espaço de tempo confere maior energia aos lasers pulsados, comparados aos de emissão contínua [36,80]. Assim, com o objetivo de concentrar a energia no ponto focal de uma amostra e gerar um plasma a partir do material amostrado, os lasers utilizados em LIBS são os lasers pulsados

Quando um pulso de laser é focalizado na superfície da amostra, a irradiância no ponto focal promove a remoção de uma pequena fração, em um fenômeno conhecido como ablação. Assim, essa porção da amostra ablada começa a vaporizar. Sob a ação do pulso do laser as estruturas químicas, originalmente presentes na amostra se rompem (Breakdown). Posteriormente ocorre a expansão do material vaporizado na forma de uma pluma sobre a superfície da amostra e, devido às altas temperaturas no local (aproximadamente 10.000 K), bem como a avalanche de elétrons advindo das quebras das ligações, o plasma é formado. Esse plasma contém espécies excitadas do material ablado, cuja radiação emitida constitui o sinal analítico a ser estudado [34,36,69,81]. A compreensão da obtenção do sinal analítico está relacionada com a evolução temporal do plasma. Nesse sentido, a Figura 7 ilustra a evolução temporal de um plasma gerado por um pulso de laser Nd:YAG.

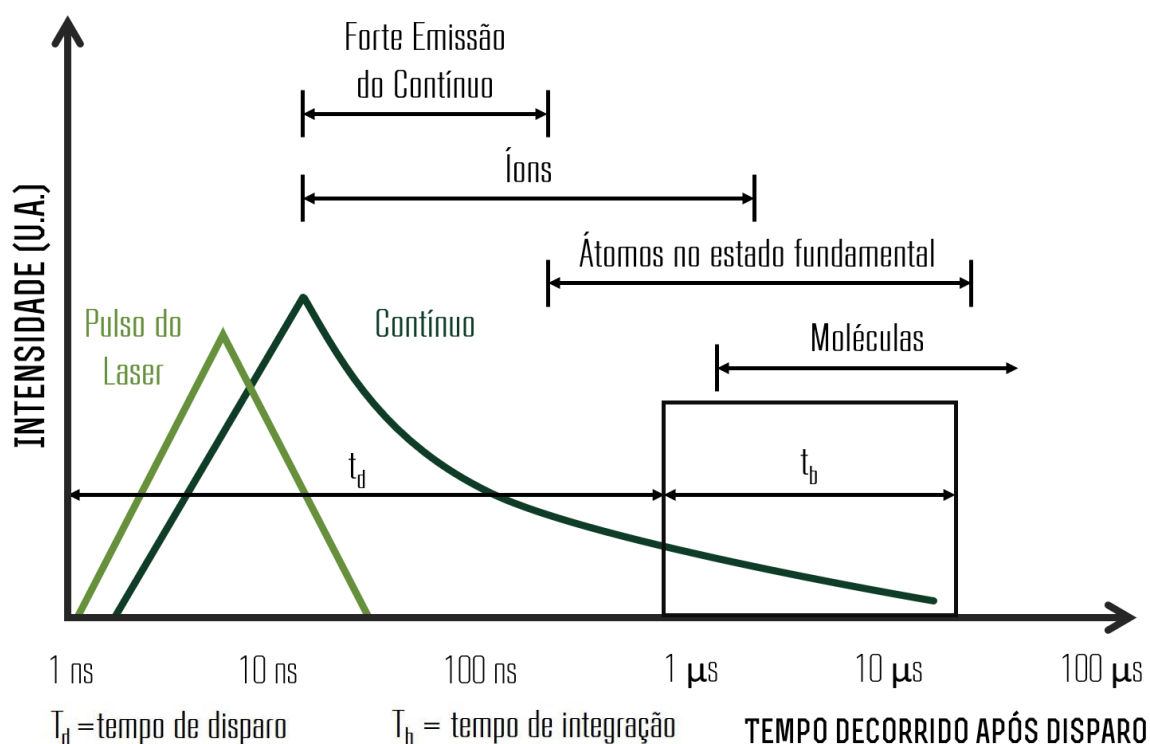


Figura 7: Evolução temporal do plasma após o pulso do laser.

Fonte: Adaptado Miziolek e colaboradores [36].

De acordo com a Figura 7, observa-se que a emissão oriunda da formação do plasma progride rapidamente com o tempo. Logo após o disparo do laser, a ionização é alta e o espectro é basicamente caracterizado pela formação do contínuo que, em

outras palavras, é a “luz branca” emitida pelo plasma proveniente de reações de recombinações, colisões e desaceleramento dos elétrons livres com os íons. Esse fenômeno é conhecido como *Bremsstrahlung*. Nesse estágio não é possível obter informações analíticas relevantes, pois pode haver interferências provenientes do contínuo que dificultem a detecção de espécies que estejam emitindo.

Com o decorrer do tempo, o plasma vai resfriando e conseqüentemente há um decaimento da emissão da luz branca. A partir desse momento, os espectros começam a ser caracterizados por emissões de íons, átomos e moléculas simples, formadas por recombinações de espécies excitadas ou por fragmentação parcial de uma molécula mais complexa. Por essa razão é importante a otimização dos parâmetros t_d e t_b que são definidos como o tempo que compreende o momento do disparo do laser até a abertura do espectrômetro para a observação do sinal analítico e o tempo que será feita a integração do sinal do analito, respectivamente. Dessa forma, a escolha dos tempos para obtenção dos espectros deverá ser feita buscando uma situação de compromisso entre t_d e t_b que minimize a detecção do contínuo, mas que evite integrar sinais em plasma mais frio, em tempos próximos à sua extinção.

Além da possibilidade da análise elementar de espécies atômicas e iônicas, uma versatilidade da técnica LIBS é a possibilidade do seu emprego para análise de moléculas diatômicas. Os processos de emissão das moléculas são relativamente diferentes daqueles associados às emissões espontâneas de átomos e íons. As emissões atômicas e iônicas estão associadas à uma única transição, produzindo uma linha em um comprimento de onda discreto. Isto é, com efeito da temperatura do plasma, os elétrons das espécies são excitados passando para um estado de maior energia. Quando o elétron excitado, retorna ao estado de menor energia, emite um fóton correspondente a um determinado comprimento de onda [36,82]. Enquanto as emissões atômicas e iônicas são exemplificadas por um diagrama comum de transição eletrônica (Figura 8 A), as emissões moleculares estão associadas à transições anarmônicas eletrônicas, vibracionais (representadas por $v=0,1,2$) e rotacionais (representadas pelas linhas), de acordo com a Figura 8 B.

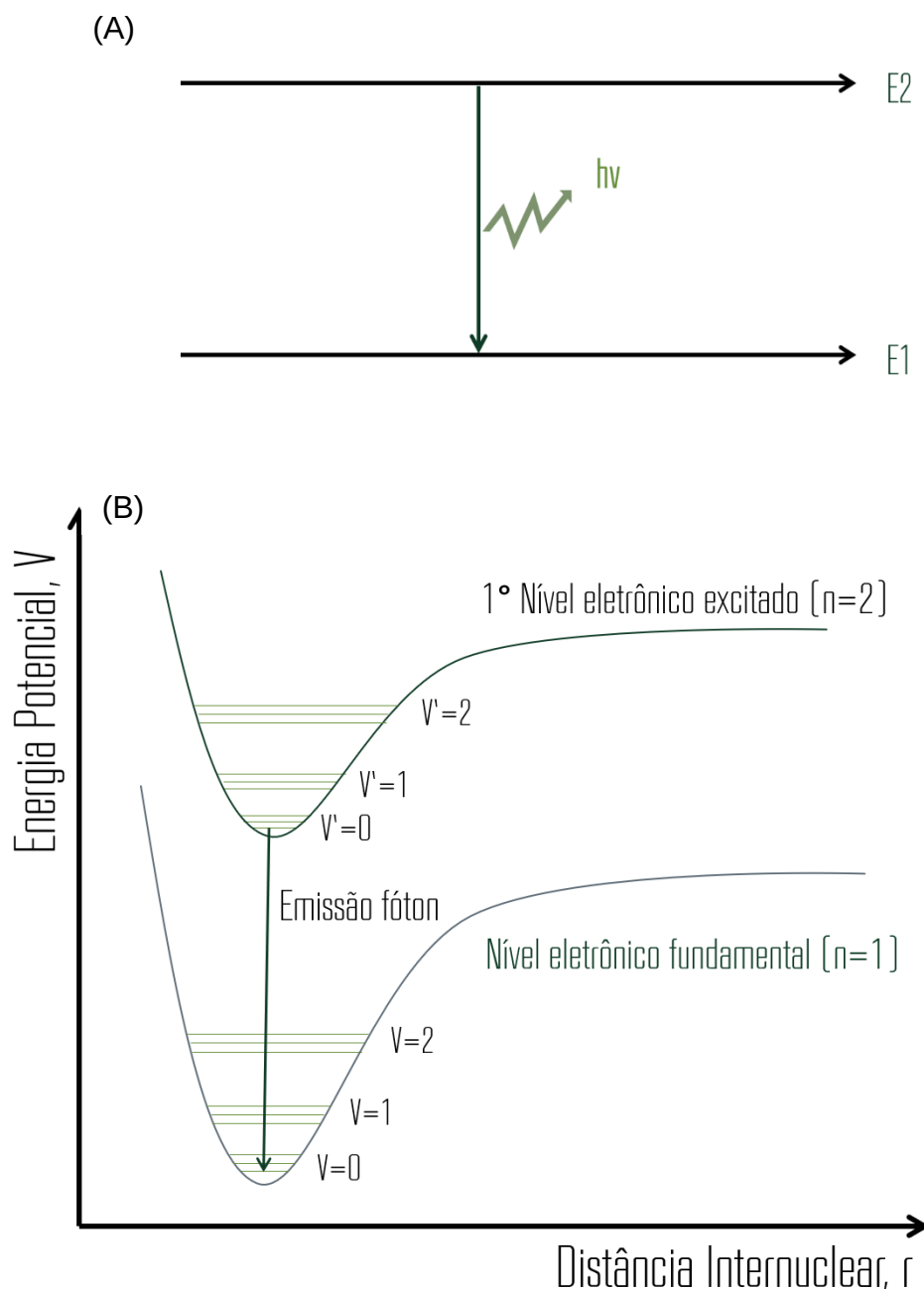


Figura 8: Representação esquemática do fenômeno de emissão (A) atômica e iônica, (B) molecular, em LIBS.

Fonte: Adaptado de Fernández-Bravo e colaboradores [37].

Para obtenção dos sinais de emissão de qualquer espécie, são necessários espectrômetros e sistemas de detecção com uma pequena faixa de tempo de integração, boa resolução e alcance espectral, pois as emissões em LIBS estão compreendidas desde o UV ao infravermelho (200-1000 nm). Neste sentido, os espectrômetros comumente empregados em LIBS são Czerny-Turner (CT) e rede

echelle, enquanto os detectores são os fotomultiplicadores, dispositivos de carga acoplada (CCD, do inglês *Charge-Coupled Device*) e o ICCD [83].

Os espectrômetros CT geralmente apresentam relativo baixo custo e tamanho reduzido, devido a isso é comum seu emprego em sistemas LIBS portáteis. Entretanto, sua resolução e alcance espectral são baixos, sendo necessário a utilização de multi-canais para obter um espectro inteiro. Já, os espectrômetros com rede echelle possibilita um espectro com boa resolução, auxiliando a análise de amostras mais complexas como por exemplo, os alimentos.

Em relação aos detectores, diferente da espectroscopia de emissão atômica tradicional, os espectros obtidos em LIBS possuem características resolvidas no tempo, uma vez que está intimamente ligada ao tempo de vida do plasma. Dessa maneira, os detectores CCD e ICCD são os mais indicados para a detecção do sinal [83,84]. Entretanto, segundo Pasquini e colaboradores, os detectores fotomultiplicadores apresentam bons resultados para aplicações específicas, devido a sua boa detectabilidade na região do visível. Ainda assim, há poucos trabalhos na literatura relatando o emprego desse detector. Um dos motivos principais seria que, esse detector restringe o número de linhas de emissão que podem ser detectados simultaneamente [66,85].

O desenvolvimento de detectores de estado sólido vem revolucionando a forma de obtenção dos sinais analíticos, principalmente em LIBS. Nesses detectores, há uma combinação de vários sensores chamados de *pixels* (pontos). Cada *pixel* tem a função de detectar simultaneamente sinais de emissão em vários comprimentos de onda. Atualmente há duas formas de disposição desses sensores, a linear e bi-dimensional [66].

2.3. Pré-tratamento dos dados e Ferramentas Quimiométricas

Espectros obtidos em NIRS e LIBS são ricos em informações, uma vez que apresentam sinais em uma ampla faixa de frequências. Porém para que esses dados sejam úteis para extração de informações químicas, muitas vezes são necessários pré-tratamentos espectrais para minimização de possíveis flutuações das medidas ou até mesmo correções de eventuais efeitos de matriz. Segundo Ferreira (2015) [86], os pré-tratamentos dos dados podem ser divididos em dois grupos denominados por

transformação (tratamento aplicados às amostras) e pré-processamento (tratamento aplicado às variáveis).

Outras abordagens que podem auxiliar o entendimento dos dados obtidos, bem como extrair mais informações contidas nos espectros de ambas as técnicas são, as análises exploratórias dos dados, seleção de informações relevantes e métodos de regressão. Dessa maneira, neste tópico serão abordados apenas as ferramentas que auxiliaram o cumprimento do objetivo do trabalho.

2.3.1. Transformações – Derivadas

A primeira derivada é uma transformação matemática que auxilia a correção do deslocamento da linha base ocasionada por algum problema instrumental ou de amostragem [86].

Por definição, a derivada de uma função em qualquer ponto é a inclinação da reta tangente ao ponto [87]. Nesse sentido, a derivada de um pico apresentará dois lobos, um máximo positivo e negativo, referente ao lado esquerdo e direito do pico, respectivamente. Por sua vez, o(s) ponto(s) cuja intensidade/absorbância é máxima, a inclinação da reta é nula, portanto, a derivada é zero. Assim, considerando também que a derivada de uma constante é zero, após a aplicação dessa transformação ao espectro inteiro, os deslocamentos da linha base serão corrigidos [62,86]. Além da primeira derivada promover a correção da linha base, seu emprego pode auxiliar melhora da resolução de picos parcialmente sobrepostos, isto é, essa transformação pode atuar como uma forma de deconvolução [59,86].

O artifício da utilização da primeira derivada não é único, muitas vezes para a obtenção correta da posição de um pico é necessário o emprego da segunda derivada, que em outras palavras, é a derivada da primeira derivada. Nessa segunda transformação, no ponto de inflexão a curvatura é zero e a intensidade/absorbância no topo do pico apresenta um máximo negativo. Dessa forma, o espectro derivado pela segunda vez assemelha-se ao espectro original, porém melhor definido para uma possível atribuição dos sinais [62,86].

É importante ressaltar que para ambas as transformações matemáticas, as relações entre as áreas de pico do analito de interesse e as suas respectivas concentrações, não sofrem alterações. Por outro lado, o emprego desses métodos promove uma redução do sinal, prejudicando a relação sinal/ruído [86]. Dessa

maneira, pode-se empregar um espectro previamente derivado para fins quantitativos, desde que a perda da relação sinal/ruído não seja significativa.

2.3.2. Transformações – Correção multiplicativa de espalhamento (MSC)

A correção multiplicativa de espalhamento (MSC do inglês, *Multiplicative scatter correction*) é uma transformação espectral proposta por Martens e colaboradores (1985) [88], cuja a função é corrigir efeitos de espalhamento aditivos e multiplicativos. Esses efeitos são ocasionados por fenômenos físicos compreendidos por mudanças no caminho óptico e na sensibilidade do detector, além de variações de temperatura durante a análise, bem como tamanho e forma das partículas da amostra [62].

O método para a correção consiste em obter regressão linear simples entre espectro de uma amostra a qual deseja-se corrigir por um espectro “ideal” (x_m), que pode ser a média dos espectros obtidos do conjunto de dados ou um espectro de um material certificado. De acordo com a regressão obtida (Equação 1), x_i é o sinal espectral i em um determinado comprimento de onda, b_i e a_i são os coeficientes angular e linear que correspondem aos parâmetros de correção dos efeitos multiplicativos e aditivos, respectivamente [89].

$$x_i = a_i + b_i x_m \quad \text{Equação (1)}$$

A correção obtida por meio do MSC permite contornar possíveis desvios multiplicativos, no entanto não é capaz de corrigir as inclinações da linha base. Devido a isso, é comum a aplicação do MSC seguida da primeira ou segunda derivada. Já que cada uma dessas transformações remove efeitos diferentes. Outra importante vantagem do emprego do MSC que é a preservação da forma original do espectro, uma vez que utiliza a projeção dos espectros em um espectro “ideal” [86,88,89].

2.3.3. Transformações – Variação normal padrão (SNV)

A transformação obtida pela variação normal padrão (SNV do inglês, *Standard normal variate*) é comumente empregada para remover ou minimizar possíveis

interferências causadas devido ao tamanho da partícula e de espalhamento de radiação, ou seja, correção de efeitos aditivos e multiplicativos, assim como o MSC.

Essa transformação foi proposta por Barnes e colaboradores (1989) e está fundamentada no princípio de uma correção que emprega a subtração dos espectros por um espectro médio (correção do efeito aditivo) e consequentemente, divisão pelo desvio-padrão dos espectros (correção do efeito multiplicativo) [90]. Dessa maneira, pode-se dizer que esse pré-tratamento equivale a autoescalar os dados originais. Essa transformação é descrita pela Equação 2.

$$x'_i = \frac{x_i - m_i}{s_i} \quad \text{Equação (2)}$$

onde,

$$\bar{x}_i = \frac{1}{J} \sum_{j=1}^J x_{ij} \text{ e } s_i = \sqrt{\sum_{j=1}^J (x_{ij} - \bar{x}_i)^2} \quad \text{Equações (3 e 4)}$$

Para o modelo descrito pela Equação 2 considera-se uma amostra i cuja a transformação do sinal espectral é dada pelo termo x'_i . A variável x_i representa o o sinal no espectro original. Já os termos m_i e s_i correspondem ao espectro médio e o desvio padrão para essa amostra, respectivamente. Por sua vez, o espectro médio $\bar{x}_i$ e o desvio padrão s_i estão pelas Equações 3 e 4 [86,90].

Assim como mencionado anteriormente, SNV se assemelha com MSC desde a eficácia para remover efeitos aditivos e multiplicativos até a preservação da característica inicial do espectro obtido. Por essa razão, o SNV também pode ser associado a primeira e segunda derivada.

2.3.4. Pré-processamento dos dados – centrar na média e autoescalamento

Após tratar de alguns pré-tratamentos de dados voltados às amostras, nesta seção serão abordados tratamentos aplicados às variáveis, antes da análise exploratória dos dados, como centrar os dados na média e autoescalar. Esses pré-processamentos utilizam conceitos matemáticos simples. Por esse motivo, são comumente empregados em análises quimiométricas [86].

Para centrar os dados na média, inicialmente é necessário obter o valor médio dos espectros em questão ($\bar{x}_j$) e assim, subtraí-lo de cada espectro individualmente (x_{ij}). A Equação 5 exemplifica o processo matemático envolvido.

$$x_{ij} = x_{ij} - \bar{x}_j \quad \text{Equação (5)}$$

onde

$$\bar{x}_j = \frac{1}{I} \sum_{i=1}^I x_{ij} \quad \text{é a média da j-ésima medida.}$$

O pré-processamento por autoescalamento também requer a subtração dos espectros pelo seu valor médio, conforme a Equação 5. No entanto, é necessário mais uma etapa, a divisão pelo valor obtido pelo desvio-padrão. É importante ressaltar, que nesse pré-processamento é útil quando as magnitudes dos sinais variam no espectro. Dessa forma, após sua aplicação as variáveis apresentam pesos iguais, contribuindo para que a análise de componentes principais dê uma representação mais equilibrada em relação as outras variáveis [86,91].

2.3.5. Ferramentas Quimiométricas – PCA

A quimiometria pode ser definida como a intersecção de três áreas, a química, a matemática e a estatística com o objetivo de auxiliar o planejamento e a otimização das condições experimentais, além da interpretação e previsão dos dados de uma análise multivariada [91,92].

As estratégias quimiométricas usualmente empregadas para uma análise de um conjunto de dados de maneira exploratória são, análise de componentes principais (PCA do inglês, *Principal component analysis*) e a análise hierárquica de agrupamento (HCA do inglês, *Hierarchical cluster analysis*). Nesse trabalho foi aplicado apenas PCA, dessa maneira serão abordados apenas seus conceitos e aplicações.

A PCA é um conceito que foi proposto por Person em 1901, porém somente ganhou notoriedade quando Hotelling, em 1930, empregou esse conceito para análise multivariada de dados na área da psicologia [86,93]. Este método matemático exploratório é fundamentado em projeções ortogonais de dados multivariados em dimensões menores, normalmente duas ou três, visando reduzir a dimensionalidade

do espaço original do conjunto de dados e facilitando a observação, visualização e interpretação das diferentes relações entre as variáveis e as amostras [91,94].

A decomposição ortogonal dos dados, em uma PCA, pode ser feita por meio do método da decomposição em valores singulares (SVD do inglês, *Singular values decomposition*), no qual, uma matriz X com “ i ” amostras e “ j ” variáveis é decomposta em matrizes menores denominadas, T , P e E , relativos aos *scores*, *loadings* e resíduos, respectivamente [87]. Neste procedimento, novos eixos ou componentes principais (PCs) são calculados no espaço multidimensional dos dados e as projeções dos *scores* e *loadings* são feitas visando explicar a maior variância dos dados. Assim, os *scores* projetados sobre as PCs fornecem as informações acerca da amostra, enquanto os *loadings* fornecem as informações das variáveis [87,95].

A PCA por ser um método de análise exploratória, além de agrupar possíveis tendências, também possibilita detectar possíveis anomalias entre as amostras (*outliers*), pois com as projeções esse comportamento atípico é pronunciado. Para facilitar essa detecção de amostras anômalas, muitas vezes é necessário o emprego de um pré-processamento dos dados, como centrar na média ou autoescalar [96]. Outra vantagem da utilização da PCA é a possibilidade de empregá-la como seletor de variáveis a serem utilizadas na construção de modelos de calibração. As variáveis que influenciam a separação de classes, podem ser úteis para obtenção de um modelo de regressão, seja por regressão múltipla linear (MLR do inglês, *Multiple linear regression*), regressão pelo método das componentes principais (PCR do inglês, *Principal component regression*), regressão pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS do inglês, *Partial least squares regression*) entre outros [97,98].

2.3.6. Ferramentas Quimiométricas – Métodos de regressão multivariada (Calibração e Validação)

A calibração multivariada tem como objetivo principal a utilização simultânea de várias variáveis, por exemplo sinais espectrais obtidos à diferentes frequências, para quantificar outra variável de interesse, como por exemplo concentração [91].

Dentre os diferentes métodos de calibração multivariada citado anteriormente, o mais simples é o MLR. Nesta regressão, a variável a ser predita, Y , é determinada por uma combinação linear das variáveis independentes contidas na matriz X . As equações matemáticas que descrevem a regressão e a solução dos mínimos

quadrados para a obtenção do parâmetro b estão descritos na Equação 6 e 7, respectivamente.

$$Y = Xb + a \text{ ou } y = a + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n \text{ Equação (6)}$$

Onde: a = intercepto no eixo y ; b_n = coeficientes de regressão n -ésima variável.

$$b = (X^T X)^{-1} X^T Y \text{ Equação (7)}$$

Onde: X^T é a matriz X transposta.

Tendo em vista a obtenção de um modelo matemático que melhor descreve a predição de uma propriedade, os cálculos de algumas figuras de mérito para o conjunto de calibração e validação ajudam a definir se o modelo obtido é robusto. Nesse contexto, a avaliação dos modelos é feita pelo coeficiente de determinação (R^2), raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração (RMSEC do inglês, *Root mean squares error of calibration*), raiz quadrada do erro médio quadrático de predição (RMSEP do inglês, *Root mean squares error of prediction*) e erro relativo absoluto (RAE, *Relative absolute error*). Sendo que para um modelo ser considerado satisfatório, os valores de R^2 devem ser próximo de 1, enquanto os valores de RMSEC e RMSEP devem ser os menores possíveis [30].

O valor RMSEC descreve o grau de concordância entre a concentração real e a concentração estimada pelo modelo nas amostras do conjunto de calibração. É comum que esse parâmetro apresente valores baixos, indicando que a capacidade preditiva do conjunto de calibração é boa. No entanto, para certificar essa afirmação, existem duas maneiras de validar o modelo proposto. Uma é empregar a validação cruzada empregando por exemplo, o método *leave one out*, onde uma amostra do conjunto de validação é deixada de fora durante o cálculo do modelo e posteriormente essa amostra é predita pelo modelo construído. Já a outra, é utilizar um conjunto de amostra externo ao conjunto de calibração e avaliar o valor obtido por RMSEP, esse procedimento é denominado validação externa [91]. O valor RMSEP analogamente ao RMSEC, também descreve a concordância entre a concentração real e a predita pelo modelo, só que para o conjunto de validação. Para a construção de um modelo de calibração e posterior avaliação desse modelo, algumas considerações devem ser feitas como, o número de amostras deve ser relativamente grande, porém, não maior que as amostras do conjunto de calibração, para que o erro de previsão estimado seja representativo em relação variabilidade ao modelo [91,98–100]. As equações que

descrevem os cálculos do RMSEC e RMSEP estão dispostas nas Equações 8 e 9, respectivamente.

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{I_c} (y_i - \hat{y}_i)^2}{I_c}} \quad \text{Equação (8)}$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{I_p} (y_i - \hat{y}_i)^2}{I_p}} \quad \text{Equação (9)}$$

Onde y_i e $\hat{y}_i$ representam as concentrações atuais e as previsões de uma amostra i ; já I_c e I_p representam os números totais de amostras dos conjuntos de calibração e validação, respetivamente.

A MLR apresenta vantagens e desvantagens, pode-se afirmar que essa regressão é a mais indicada para respostas instrumentais bem-comportadas, isto é, sinais analíticos lineares, com ausência de interferências e interações com outros analitos, com baixo ruído, além de não apresentar nenhuma colinearidade). Porém, uma das suas desvantagens é a utilização de todas as variáveis presentes na matriz X, independente se essas variáveis são relevantes ou não, isso pode inviabilizar o modelo desenvolvido pois, dá a origem à um fenómeno chamado *overfitting*. No qual se obtém altos valores de coeficiente de determinação advindos do número excessivo de variáveis e não do ajuste natural das amostras do conjunto [101]. Em virtude disso, a seleção de variável é fundamental para o desempenho desse modelo. Outro aspecto não menos relevante em MLR, é que o número de amostra deve ser maior que o número de variáveis, pois no desenvolvimento matemático da regressão é necessário inverter a matriz X. Deste modo, se a matriz X apresentar mais variáveis que amostras, ela não poderá ser invertida e a regressão não terá solução [96].

2.3.7. Ferramentas Quimiométricas – Seleção de variáveis

O avanço tecnológico para detecção de sinais analíticos associado ao desenvolvimento de softwares mais robustos permitiram à química analítica a obtenção de respostas instrumentais complexas, isto é, repletas de variáveis [102]. Por tal motivo, quando se emprega a calibração multivariada, principalmente a MLR,

é imprescindível a utilização de seleção de variáveis para melhorar significativamente a capacidade preditiva do modelo.

Atualmente, metodologias para a seleção de variáveis têm sido constantemente reportadas na literatura [91,103–106]. Essas metodologias vão desde a seleção manual, na qual o analista faz a seleção prévia das variáveis que serão empregadas para o desenvolvimento modelo [32], até o emprego de algoritmos sofisticados como o algoritmo genético (GA do inglês, *Genetic algorithm*) [101,107–109], algoritmo passo a passo (SW do inglês, *Stepwise*) [102,110,111], algoritmo *wrappers* [112,113] e o algoritmo de sucessão progressivas (SPA do inglês, *Successive projection algorithm*) [102,108].

Independentemente da metodologia a ser aplicada para a seleção de variáveis, todas convergem para um único fundamento que é a escolha de uma ou mais regiões do espectro, referentes às amostras do conjunto de calibração, que permitem minimizar os erros de predição do modelo, eliminando variáveis colineares, irrelevantes ou ruídos instrumentais. Como consequência da seleção de variáveis, os modelos de calibração desenvolvidos são mais robustos, precisos e exatos, além de serem de mais simples interpretação [110].

2.4. Análise da Qualidade do Café

Atualmente, a literatura relata inúmeros trabalhos científicos com o foco no desenvolvimento de metodologias que visam a certificação da qualidade do café torrado e moído, dentro dos parâmetros estipulados por normas nacionais e internacionais [4,13,117–120,17,22–24,30,114–116].

A seguir, será discutido brevemente, algumas identificações de parâmetros físico-químicos relevantes para certificação de café frente a inserção de PVAs, além de métodos analíticos disponíveis para esse fim. Os métodos em questão empregam diferentes técnicas analíticas, inclusive NIRS e LIBS, associadas às ferramentas quimiométricas.

Visando identificar características nos grãos de café que reduzem a qualidade da bebida, Mazzafera (1999) [114] investigou e comparou propriedades físico-químicas e a composição orgânica dos grãos sadios e defeituosos, especialmente os grãos pretos-imaturos e imaturos. Os resultados mostraram que os grãos sadios

apresentaram maior massa e teor de umidade comparados aos grãos defeituosos. Além disso, os grãos verdes apresentam maior valor de pH, contudo não houve uma diferença significativa entre as concentrações hidrogeniônica dos grãos estudados. Já para a composição orgânica, o maior teor de carboidrato foi determinado nas amostras dos grãos sadios, que por sua vez, também apresentaram maior concentração de açúcares redutores. Por fim e não menos importante, o autor determinou as concentrações de proteínas nos diferentes grãos, e concluiu que os grãos que apresentaram as maiores concentrações foram os sadios, seguidos dos grãos verdes e pretos-imaturos.

Em vista desses resultados, pode-se concluir que os estágios de maturação além de influenciar na composição orgânica, também interfere nas características físico-químicas dos grãos.

Ainda visando a composição orgânica e as propriedades físico-químicas dos diferentes tipos de grãos, Vasconcelos e colaboradores (2007) [24], compararam teores de umidade, lipídeos e proteínas antes da etapa de torra. A conclusão para esses parâmetros foi que para o teor de umidade e lipídeos, os grãos sadios apresentaram maior concentração quando comparados com os grãos pretos, verdes e imaturos. Já as concentrações obtidas para as proteínas nos grãos sadios e defeituosos, não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

Tendo em vista que a concentração de diversos compostos orgânicos pode variar nos diferentes tipos de grãos de café da espécie Arábica, Agresti e colaboradores (2008) [115] desenvolveram um método para avaliar e comparar os compostos voláteis obtidos durante a etapa de torra dos grãos PVA e sadios por meio da micro extração em fase sólida. Os extratos voláteis foram analisados por cromatografia gasosa com detector de massas acoplado (GC-MS do inglês, *Gas chromatography – mass spectrometry*). Várias substâncias foram identificadas e com o auxílio da como análise de componentes principais foi possível diferenciar os grãos defeituosos dos sadios. Os resultados ainda indicaram que os grãos pretos e ardidos podem ser associados a processos de fermentação dos grãos imaturos e sadios. No mesmo ano, Mendonça e colaboradores (2008) [23] estudaram o emprego da espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS do inglês, *Electrospray ionization – mass spectrometry*) para identificar características químicas que auxiliassem a diferenciação de grãos das espécies Robusta e Arábica, bem como os grãos sadios dos PVAs. Para essa proposta, espectros de massas de grãos não

torrados foram considerados como "impressão digital" das classes em questão e com a utilização de análise por componentes principais foi possível discriminar grãos bons de PVAs". Nesse caso, a discriminação entre PVAs e grãos sadios se deu principalmente através dos níveis de sacarose, os quais eram maiores para grãos sadios e menores para PVAs. Já a separação das espécies dos grãos foi feita por meio dos níveis de compostos fenólicos, principalmente o ácido clorogênico, sendo que a espécie Robusta foi a que apresentou maiores teores comparada à espécie Arábica. Além desse trabalho, alguns outros também foram desenvolvidos com foco em determinação da composição orgânica de grãos sadios e defeituosos [4,13,116,117].

No momento atual, grande parte do desenvolvimento dos estudos relacionados à qualidade do café, se concentram no emprego de técnicas analíticas instrumentais com análise direta ou com mínimo preparo da amostra. Tal fator, pode apresentar vantagens e desvantagens. Por exemplo, é simples observar que esses métodos apresentam maior velocidade de obtenção dos resultados, além de contribuir para a química verde. Por outro lado, efeitos de matriz, baixa homogeneidade das amostras entre outros fatores, ficam mais evidentes, tornando o emprego de ferramentas quimiométricas imprescindível para contornar essa desvantagem.

Diante desse cenário, Craig, Franca e Oliveira (2012) [118] avaliaram o potencial da espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR do inglês, *Fourier transform infrared spectroscopy*) para separar os grãos sadios dos defeituosos antes da torrefação e compararam com os dados obtidos com os da análise de cor dos grãos. As amostras de grãos sadios e PVA foram analisadas com o auxílio dos acessórios de atenuação total de reflectância (ATR do inglês, *Attenuated total reflectance*) e reflectância difusa (DR do inglês, *diffuse reflectance*). Posteriormente, os espectros foram pré-processados empregando a subtração do fundo, a correção de linha base via primeira derivada e um algoritmo para a normalização, cujo o valor máximo de absorbância era 1 e o mínimo zero. Em seguida, os dados foram submetidos à análise multivariada por PCA e análise de *clusters*. Tanto a PCA, quanto a análise de *clusters* indicaram que FTIR tem potencial para o desenvolvimento de um método analítico para a discriminação dos grãos de café. Vale ressaltar que, os mesmos autores em outro trabalho no ano de 2015, empregaram FTIR e NIRS, associado à regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR do inglês, *partial least squares regression*), para o desenvolvimento de um método que visava a

quantificação de grãos defeituosos em cafés torrados. Para tal propósito, amostras de grãos da espécie Arábica foram manualmente selecionadas, torradas, moídas e peneiradas. Para o conjunto de calibração, grãos defeituosos foram misturados aos grãos sadios em uma proporção que variou de 0 a 30% de defeitos. Os espectros obtidos a partir das misturas foram submetidos à correção pela aplicação de tratamentos matemáticos e modelos de regressão foram desenvolvidos para ambas as técnicas. Os coeficientes de correlação e RMSEP obtidos para os modelos de FTIR e NIRS foram 0,891 e 0,032, e 0,953 e 0,026, respectivamente. Assim, os autores concluíram que a técnica NIRS proporcionou a obtenção de modelos mais robustos [30].

Também utilizando a técnica NIRS, Santos e colaboradores [17] propuseram quatro métodos para quantificação dos teores de grãos defeituosos e defeitos, misturados à grãos sadios da espécie arábica e robusta. Para esse propósito, os autores empregaram diversas ferramentas quimiométricas como, planejamento experimental para otimizar as massas a serem utilizadas na obtenção das amostras de calibração e validação, algoritmo genético para obter a melhor réplica das amostras e PCA para selecionar previamente as variáveis que foram incluídas para o desenvolvimento do modelo de calibração por PLS. É importante citar que, antes do desenvolvimento do modelo de calibração, os espectros adquiridos foram pré-processados por SNV, MSC além da 1º e 2º Derivada. Em vista de todas as ferramentas aplicadas, os autores concluem que os métodos propostos são robustos, pois os erros relativos de predição apresentaram-se em torno de 5%.

Tolessa e colaboradores (2015) [22] empregando a técnica NIRS propuseram modelos de calibração para atribuição de qualidade de grãos de cafés não torrados da espécie arábica, tendo a prova da xícara como referência. Para o desenvolvimento do método os autores partiram da premissa que a composição química e as propriedades físico-químicas dos grãos dos cafés variam dependendo do grau de maturação. Foram utilizadas 86 amostras de grãos de café, compreendidas entre grãos sadios e defeituosos, das quais 66 compunham o conjunto de calibração e 20 o de validação. Os modelos de calibração foram desenvolvidos utilizando PLS, com os espectros previamente normalizados por MSC e 1º Derivada. Os coeficientes de correlação (r) e RMSEP obtidos foram superiores a 0,71% e 0,22%, respectivamente. Os resultados enfatizam que os modelos de regressão, associados à tratamentos

espectrais, permitiram a obtenção de um método rápido, simples, robusto e isento de subjetividade.

De acordo com os trabalhos descritos na literatura, observa-se que muito já foi feito para a avaliação e certificação da qualidade do café, empregando diversas técnicas analíticas que podem requerer um simples preparo da amostra (FTIR e NIRS) ou um preparo mais drástico (GC-MS e ESI-MS). No entanto, ressalta-se que esses métodos visam apenas a composição orgânica dos grãos. Nesse sentido, um estudo exploratório acerca da composição elementar pode apresentar variáveis importantes para a distinção dos diferentes tipos de grãos de café, e que conseqüentemente, podem ser empregadas para o desenvolvimento de um modelo de calibração visando a quantificação de PVA. Diante do exposto, técnicas como a LIBS, podem fornecer tanto informações sobre a composição orgânica, quanto à composição elementar dos grãos de café.

A utilização de LIBS para a análise da qualidade de café é ainda muito pouco explorada. Apenas dois trabalhos sobre a temática foram encontrados na literatura. Ferreira e colaboradores (2011) [119] utilizaram LIBS e árvores de decisão para diferenciar cafés comerciais torrados e moídos, de acordo com as classes: Gourmet, Superior, Tradicional e Inferior. Para a construção das árvores de decisão os autores utilizaram comprimentos de onda na região da linha de emissão de hidrogênio (aproximadamente 680 nm). Os resultados obtidos apresentaram exatidão acima de 84% para alguns intervalos de comprimento de onda. As melhores performances alcançadas foram para o intervalo compreendido entre 670 a 690 nm.

Zhang e colaboradores (2018) [120] utilizaram LIBS associada à ferramentas quimiométricas para identificar variedades de grãos de café antes da torra. PCA foi utilizada para selecionar as variáveis que distinguiam as amostras. Para a construção dos modelos de classificação foram utilizados os métodos quimiométricos de máquina de suporte de vetores (SVM do inglês, *Support vector machine*), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA do inglês, *Partial least squares-discriminant analysis*) e um algoritmo de redes neurais artificiais (RBFNN do inglês, *Radial basis function neural network*). Foram utilizadas vinte variáveis previamente selecionadas, compreendidas por linhas de emissão atômica, iônica e molecular, correspondentes à C (I), Mg (I), Mg (II), Al (II), CN (0.0), H, Ca (II), Fe (I), K (I), Na (I), N (I), e O (I). Os modelos desenvolvidos por SVM e RBFNN apresentaram melhores resultados, com exatidão superior a 80% para o conjunto de validação. Por fim, os autores concluíram

que, a associação da técnica LIBS à quimiometria é fundamental para a construção de modelos de classificação. Contudo, para a obtenção de um método mais robusto, um maior número amostras e outras ferramentas quimiométricas deveriam ser avaliadas.

Os relatos da literatura indicam que tanto NIRS, quanto LIBS, associadas à ferramentas quimiométricas, podem fornecer resultados interessantes para a construção de modelos de calibração capazes de acessar a qualidade de café.

Para NIRS, o desenvolvimento de modelos de calibração para a quantificação de PVA em misturas com grãos sadios ainda não foi completamente explorado, visto que grande parte dos métodos desenvolvidos empregaram grãos torrados. Durante o processo de torra alguns compostos orgânicos que auxiliariam a diferenciação dos grãos podem ser perdidos por volatilização. Além disso, os espectros empregados para a obtenção de modelos já divulgados, em sua maioria, não foram sistematicamente avaliados por um método de seleção de variável apropriado.

Para LIBS, há apenas um trabalho voltado à determinação da qualidade de cafés torrados e moídos. Dessa maneira entende-se que há muito a ser explorado com relação a utilização da LIBS para análise de qualidade de café, especialmente no que tange as misturas de PVAs aos grãos sadios. Os espectros obtidos por LIBS podem ampliar o conhecimento acerca da composição química dos grãos provenientes das diferentes classes de defeitos. Adicionalmente, a associação de dados obtidos por LIBS e por NIRS é algo novo, que pode trazer informações interessantes, tanto para a análise da qualidade do café, quanto para uma melhor interpretação dos espectros LIBS com relação as formas químicas originais dos elementos nas amostras.

3. Objetivos Gerais

A presente proposta tem como objetivo o desenvolvimento e validação de métodos analíticos limpos para determinação e avaliação da qualidade do café brasileiro, com relação a introdução de PVAs.

3.1. *Objetivos Específicos*

- Estudo sistemático da composição elementar e orgânica dos grãos sadios, pretos, verdes e ardidos empregando LIBS e NIRS, visando a identificação de variáveis para distinção das classes;
- Obtenção de correlações das linhas de emissão obtidas a partir dos espectros LIBS com bandas de absorção obtidas a partir do espectro NIRS;
- Obtenção de parâmetros físico-químicos, como pH e umidade, para possível correlação com bandas moleculares e linhas de emissão, em NIRS e LIBS, respectivamente;
- Desenvolvimento de modelos de calibração para determinação do percentual de grãos defeituosos misturados aos grãos bons empregando LIBS e NIRS.

4. Materiais e Métodos

A parte experimental do presente trabalho consistiu basicamente em cinco etapas: i) avaliação individual das técnicas LIBS e NIRS para obtenção de informações químicas e posterior associação dos dados das duas técnicas; ii) verificação de correlação entre pH e teor de umidade com dados de LIBS e NIRS; iii) desenvolvimento e avaliação de modelos de predição para quantidades PVAs em amostras cafés, utilizando individualmente as técnicas NIRS e LIBS; iv) avaliação da técnica LIBS para obtenção de informações químicas elementares potenciais para discriminação das classes de grãos estudadas e v) desenvolvimento de modelos de regressão empregando dados elementares observados por LIBS. Na sequência são descritas, de forma detalhada, as amostras, instrumentação e procedimentos experimentais referentes à cada uma das etapas executadas.

4.1. Amostras

Amostras grãos de café da espécie arábica não torrados classificados e separados por um especialista como bons (sadios), pretos, verdes e ardidos foram fornecidas por uma cooperativa brasileira de café, situada no sul do estado de Minas Gerais, em quantidades aproximadas de 2,0 kg. As amostras de cada classe são provenientes de misturas de grãos de diferentes produtores cooperados, as quais foram entregues à cooperativa durante a safra 2013/2014.

4.2. Equipamentos

Para as análises por LIBS e NIRS, as amostras das quatro classes estudadas foram submetidas à moagem criogênica visando melhor homogeneidade e menor tamanho de partícula. Para isto, utilizou-se um moinho criogênico SPEX CertiPrep 6800 Freezer/Mill que está ilustrado na Figura 9.



Figura 9: Moinho criogênico SPEX CertiPrep 6800 Freezer/Mill empregado para as moagens das amostras.

Fonte: Autor

Para medidas em LIBS foram confeccionadas pastilhas utilizando uma prensa mecânica Solab SL - 10/15, Piracicaba, Brazil, com auxílio de um molde de aço carbono Figura 10 A e B).

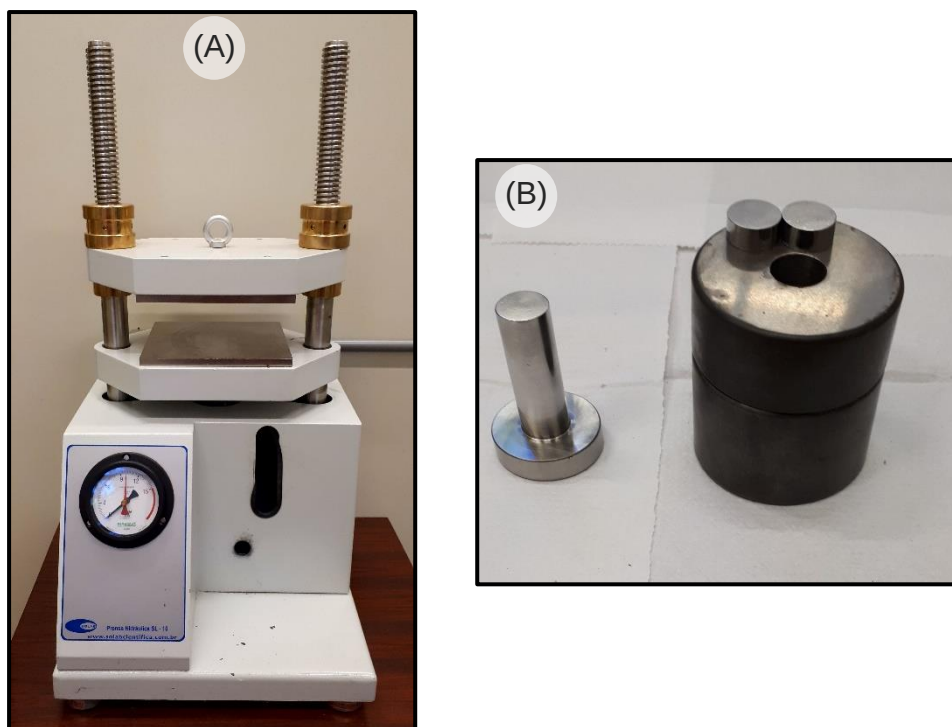


Figura 10: Em (A) Prensa mecânica Solab SL - 10/15 e em (B) molde empregado para confecções das pastilhas.

Fonte: Autor

Para a análise da composição orgânica foi empregado um espectrômetro de infravermelho próximo, modelo *Spectrum 100N* (Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT) (Figura 11), equipado com uma lâmpada de tungstênio emitindo radiação compreendida no intervalo de número de onda 4000 a 10000 cm^{-1} e um detector do tipo DTGS (do inglês, *Deuterated Triglycine Sulfate*) com resolução espectral de 2 cm^{-1} .



Figura 11: Espectrômetro no infravermelho próximo utilizados para as análises dos grãos de café (Disponível na Embrapa Instrumentação - São Carlos).

Fonte: Autor

A obtenção de informações analíticas sobre a composição elementar e molecular diatômica foi conduzida utilizando um sistema LIBS de bancada modelo LIBS2500plus (OceanOptics). Este equipamento é constituído por um laser *Q-switched* de Nd:YAG emitindo no comprimento de onda de 1064 nm, com energia máxima de pulso em torno de 50 mJ, duração de pulso de 10 ns, taxa de repetição de 10 Hz resultando em uma fluência próxima a $0,3 \text{ J cm}^{-2}$ e irradiância no ponto focal de $10^{12} \text{ W cm}^{-2}$. A focalização do pulso do laser obtido por meio de um conjunto de lentes apresentou um diâmetro do feixe do laser (laser spot) em torno de 0,5 mm. O sistema de detecção da emissão do plasma é composto por um conjunto de lentes de detecção acoplados a um cabo de fibra ótica do tipo *bundle*, que por sua vez, está conectado à sete espectrômetros, que permitem monitorar uma faixa espectral compreendida entre 189 a 966 nm, com resolução FWHM (do inglês: *full width at half maximum*) em torno de 0,1nm e detector CCD. O equipamento ainda apresenta uma câmara de ablação, no qual as pastilhas são acomodadas em um suporte com possibilidade de descolamento nos eixos x-y.

O parâmetro experimental *delay time*, isto é, tempo de atraso entre o pulso do laser e a abertura do espectrômetro para a aquisição dos sinais analíticos, foi de 11 μs .

O software para o controle do sistema bem como aquisição dos espectros foi o OOIBase 32, comercializado pela OceanOptics. A Figura 12 ilustra o sistema LIBS empregado para a aquisição dos dados.

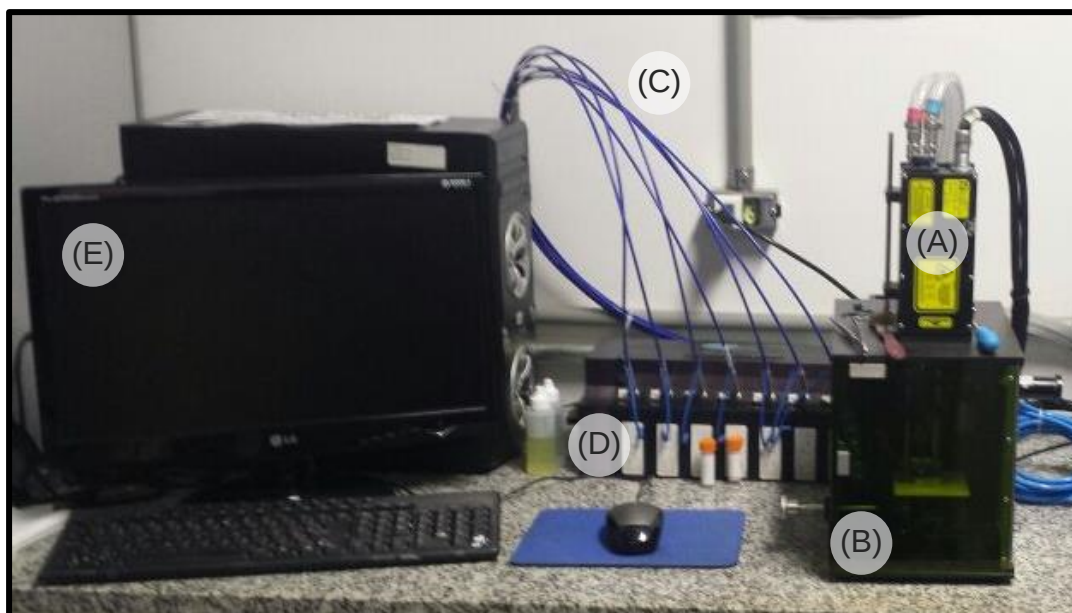


Figura 12: Sistema LIBS montado modelo LIBS2500plus utilizado para a aquisição dos dados. (A) Q-switched Laser de Nd:YAG em 1064 nm, (B) câmara de ablação, (C) cabos de ótica do tipo *bundle*, (D) espectrômetro equipado com detector CCD e (E) microcomputador para o monitoramento dos espectros das amostras de café (Disponível na Embrapa Instrumentação - São Carlos).

Fonte: Autor

Para os estudos de pH e teor de umidade, foram empregados um pHmetro marca Qualxtron® modelo 8010 provido de um eletrodo de membrana de vidro HI 1110T e uma estufa com circulação forçada de ar marca Tecnal (Piracicaba, SP, Brasil), modelo TE-394/2.

4.3. Procedimento Experimental

Nesse tópico serão abordadas cada uma das quatro etapas do procedimento experimental acima descritas. Para cada descrição foi reservado um subitem que contempla o preparo de amostra, a aquisição e o tratamento dos dados.

4.3.1. Avaliação individual das técnicas LIBS e NIRS para obtenção de informações químicas e posterior associação dos dados das duas técnicas

Esses estudos tiveram por objetivo avaliar as técnicas NIRS e LIBS para caracterização dos grãos das diferentes classes estudadas (sadios, pretos, verdes e ardidos).

Para a obtenção das porções analíticas, um procedimento de amostragem foi conduzido utilizando a técnica de quarteamento, na qual uma porção representativa (aproximadamente 10 g) da amostra é dividida em quatro partes e uma delas é tomada. O quarteamento foi repetido até a obtenção de cinco porções de amostra de cada classe de grão, com massas aproximadamente de 2,0 g. Posteriormente, cada porção foi homogeneizada em moinho criogênico, empregando o programa descrito na Tabela 3, desenvolvido para esta finalidade.

Tabela 3: Programa de moagem criogênica empregado para as amostras de café.

Etapas	Tempo (minutos)
Pré-Congelamento	3,0
Moagem*	2,0
Congelamento entre as moagens	2,0

*2 ciclos por moagem

Fonte: Autor

Para aquisição dos espectros de NIRS, de cada porção amostrada de cada classe, tomou-se 3 réplicas de 2,0 g, totalizando 15 subamostras. Cada uma delas foi então transferida para uma cubeta de vidro, a qual foi introduzida no porta amostra do

espectrômetro de infravermelho para aquisição dos espectros. Ao final, 15 espectros foram obtidos, sendo cada um referente a média de 32 leituras.

Após a obtenção dos espectros NIRS os mesmos foram individualmente submetidos à um pré-tratamento. Dentre os pré-tratamentos espectrais comumente utilizados para essa técnica, a primeira derivada foi selecionada para corrigir desvios da linha base de todos espectros. Posteriormente, foi conduzida uma PCA com os dados centrados na média, utilizando o programa computacional Pirouette, versão 4.5. As bandas espectrais sugeridas como potenciais para diferenciação das classes por PCA foram identificadas e associadas aos compostos presentes nas amostras.

Para LIBS, cerca de 200 mg de cada uma das cinco porções de cada classe de café foram introduzidas em um molde de aço carbono e submetidas à 10 toneladas de pressão de modo a obter 5 pastilhas por classe. As pastilhas obtidas apresentavam 12 mm de diâmetro por 2,6 mm de espessura. Na Figura 13 é mostrada uma pastilha, cujas dimensões são comparadas à uma moeda de dez centavos.



Figura 13: Pastilha de amostra de café em comparação com uma moeda de dez centavos.

Fonte: Autor.

As pastilhas foram individualmente introduzidas no porta amostras do sistema LIBS e vinte pulsos de laser foram aplicados na frente e verso de cada pastilha, de modo a capturar 40 espectros por pastilha.

Nos espectros LIBS, as intensidades de emissão foram conjuntamente avaliadas para cada classe de grão, com o objetivo de identificar as linhas de emissão

predominantes que poderiam ser associadas a compostos orgânicos e assim, empregá-las para distinguir as classes de café. Para o propósito de atribuição das linhas de emissão, a base de dados do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) [121] foi utilizada.

Posteriormente, áreas sob as linhas de emissão selecionadas foram ajustadas usando a função de Voigt e em seguida, integradas. Média das áreas referentes à sinais de emissão selecionados foram calculados, considerando todas as réplicas de cada classe. Em seguida, aos valores de médias obtidos, uma análise de variância (ANOVA do inglês, *Analysis of variance*), juntamente com o teste Tukey, considerando um nível de confiança de 95%, foi feita visando a comparação das classes. Além disso, para confirmar se os dados eram bons para a distinção das classes, uma PCA foi conduzida com os valores de médias autoescalados.

Com o objetivo de correlacionar os dados de LIBS e NIRS foi aplicado para os espectros LIBS pré-processamento de dados compatível com os utilizados em NIRS, ou seja, os espectros LIBS também foram processados pela primeira derivada. A partir da média dos espectros derivados de cada técnica, foram experimentadas correlações entre as taxas de variação mínimas de linhas de emissão em LIBS com taxas de variação mínimas de bandas derivadas dos espectros NIRS (correspondentes aos estiramentos C-H, C=O, N-H e O-H).

4.3.2. Correlação do teor de umidade dos grãos e pH dos extratos com dados de LIBS e NIRS

Para as determinações de pH das amostras de café foram preparados extratos, em quintuplicata, seguindo a metodologia da ABIC com modificações em relação a massa e volumes utilizados [122]. Assim, foi pesada em um béquer cerca de 1,0 g de amostra previamente moída e a esta foram adicionados 10,0 mL de H₂O a 92 °C. As amostras ficaram em repouso por aproximadamente 1 minuto e em seguida foram filtradas e armazenadas em frascos de polipropileno. Após o resfriamento e equilíbrio com a temperatura ambiente, as amostras foram submetidas à determinação do pH.

Para a obtenção do teor de umidade, massas de aproximadamente 0,5 g de amostras foram pesadas e em seguida levadas à estufa, a 110 °C por 24h. A perda de massa foi utilizada para o cálculo do teor de umidade, o qual foi expresso como a razão entre as massas final e inicial da amostra multiplicada por 100.

Visando compreender se algumas bandas moleculares, obtidas nos espectros de NIRS e algumas linhas de emissão, obtidas nos espectros de LIBS apresentavam relações com os teores de umidade e pH, foram verificadas a existência de correlações entre essas variáveis e os dados obtidos pelo procedimento descrito em 4.3.1.

4.3.3. Desenvolvimento e avaliação de modelos de predição para quantidades PVAs em amostras cafés, utilizando as técnicas NIRS e LIBS

Considerando as amostras de cada classe previamente moídas, foram preparadas misturas de grãos bons e PVAs em diferentes proporções para obtenção de amostras do conjunto de calibração e do conjunto de validação. Para o conjunto de calibração as concentrações de PVAs foram 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 e 100%, ressaltando que contribuições das concentrações individuais de cada defeito foram equivalentes. Assim para obtenção do padrão 3% de PVA, foram considerados 1% de grãos pretos, 1% de verdes e 1% de ardidos. O padrão 0% representa apenas os grãos sadios, enquanto 100% representa o padrão de cada defeito (Preto, Verde e Ardido), separadamente. Para as amostras de validação as concentrações de PVA foram de 7,8, 9,9, 13,8, 15,9, 21,9, 25,8 e 27,9%, de modo que a concentração de cada um dos defeitos individuais foi de 2,6, 3,3, 4,6, 5,3, 7,3, 8,6, 9,3%. Com o auxílio de um almofariz e pistilo de ágata, cinco réplicas foram preparadas para cada condição de mistura, tanto no conjunto de calibração quanto no de validação. Posteriormente, as misturas foram convertidas em pastilhas, aplicando-se 10 toneladas de pressão e em seguida, as pastilhas foram submetidas às análises em NIRS e LIBS.

4.3.3.1. Processamento dos dados e desenvolvimento do método empregando NIRS

Os espectros obtidos para o conjunto de calibração e validação foram derivados. A partir dos dados pré-processados foi então feita uma PCA, considerando apenas as amostras do conjunto de calibração. As variáveis que auxiliaram a formação de grupos na PCA foram selecionadas para serem utilizadas na construção dos modelos de calibração.

Duas abordagens foram consideradas para a construção dos modelos de predição de PVAs por MLR. A primeira foi a construção de modelos considerando cada defeito separado, porém misturados aos grãos sadios. Já a segunda abordagem consistiu em empregar todos os defeitos juntos e misturados aos grãos sadios. Independentemente das abordagens, para as seleções de variáveis, utilizou-se um algoritmo computacional chamado Wrapper, auxiliado pela busca exaustiva (ES). Tanto os modelos de calibração, quanto a heurística utilizada para a seleção de variáveis foram desenvolvidas utilizando o software WEKA (domínio público). Os desempenhos dos modelos de predição foram avaliados através da análise do RMSEC, RMSEP, RAE e R^2 .

4.3.3.2. Processamento dos dados e desenvolvimento do método empregando LIBS

Os espectros obtidos foram pré-processados empregando SNV e a primeira derivada.

Em seguida, visando empregar apenas linhas de emissão correspondentes à compostos orgânicos, as linhas de emissão selecionadas foram: C (I) 193,0 nm, CN (0.0) 387,0 nm, CN (1.1) 388,5 nm, C₂ (0.0) 516,6 nm, N (I) 742,3 nm, N (I) 744,2 nm, N (I) 746,8 nm e O (I) 777,4 nm.

Considerando apenas amostras do conjunto de calibração, foram comparados os valores médios das taxas de variação da primeira derivada entre as classes de amostras estudadas (Bons, P, V e A). Para o propósito de comparação das médias, ANOVA e o Teste Tukey foram aplicados. O objetivo dessa etapa foi selecionar, a partir do conjunto acima descrito, variáveis capazes de distinguir os grãos sadios dos grãos PVA, e assim, possibilitar o desenvolvimento de um modelo de predição para cada defeito.

A partir das variáveis selecionadas, três modelos de MLR foram construídos para a predição individual de P, V e A. Os modelos foram gerados utilizando o software WEKA e os resultados do desempenho dos modelos foram avaliados por meio da análise do RMSEC, RMSEP, RA e R^2 .

4.3.4. Avaliação da técnica LIBS para obtenção de informações químicas elementares potenciais para discriminação das classes de grãos estudadas

Analogamente ao procedimento experimental descrito na seção 4.3.2., as linhas de emissão correspondentes a composição elementar dos diferentes tipos de grãos estudados foram atribuídas empregando a base de dados NIST [121]. Após a identificação dos elementos, as áreas dos respectivos picos de emissão foram calculadas utilizando a função de Voigt. Em seguida, médias referentes às áreas dos sinais de emissão foram obtidas e um estudo de variância juntamente com o teste Tukey a 95% de confiança foi feito. Para confirmação das distinções dos tipos de grãos estudados foi feita uma PCA com os valores de áreas autoescalados.

4.3.5. Desenvolvimento de modelos de regressão empregando dados elementares observados por LIBS

Para o desenvolvimento dos modelos para a predição de PVA empregando linhas de emissão correspondentes a elementos presentes nos diferentes tipos de grãos de café, os espectros considerados foram os mesmos utilizados para o desenvolvimento de métodos que empregaram linhas de emissão correspondentes aos compostos orgânicos, ou seja, pré-processados com SNV e primeira derivada.

Assim como descrito na seção 4.3.4., considerando apenas o conjunto de calibração, as linhas de emissão selecionadas foram Mg (I) 285,2 nm, Ca (II) 393,3 nm, Ca (II) 396,8 nm, Ca (I) 422,6 nm, K (I) 766,5 nm e K (I) 769,9 nm. Em seguida, seleções de variáveis foram conduzidas utilizando os resultados obtidos de acordo com o teste Tukey.

Posteriormente, três modelos de MLR desenvolvidos empregando o *software* WEKA e os desempenhos dos modelos foram avaliados segundo os parâmetros RMSEC, RMSEP, RA e R^2 .

5. Resultados e discussão

5.1. Avaliação individual das técnicas LIBS e NIRS para obtenção de informações químicas e posterior associação dos dados das duas técnicas

Como outros alimentos, o café apresenta grande número de ligações moleculares, decorrentes de sua complexa composição orgânica, as quais absorvem radiação infravermelha em números de onda coincidentes. Isso favorece a obtenção de espectros com fortes sobreposições e recombinações de bandas, consequentemente, os espectros obtidos por NIRS não são facilmente interpretáveis [62,63]. Apesar da dificuldade inerente à interpretação, os espectros NIRS para as amostras de café são majoritariamente caracterizados por bandas de absorção referentes à estiramentos de ligações C-H, O-H e N-H [57]. Esses estiramentos podem ser observados na Figura 14, onde são mostrados 60 espectros NIRS obtidos pela análise das amostras dos diferentes grãos café.

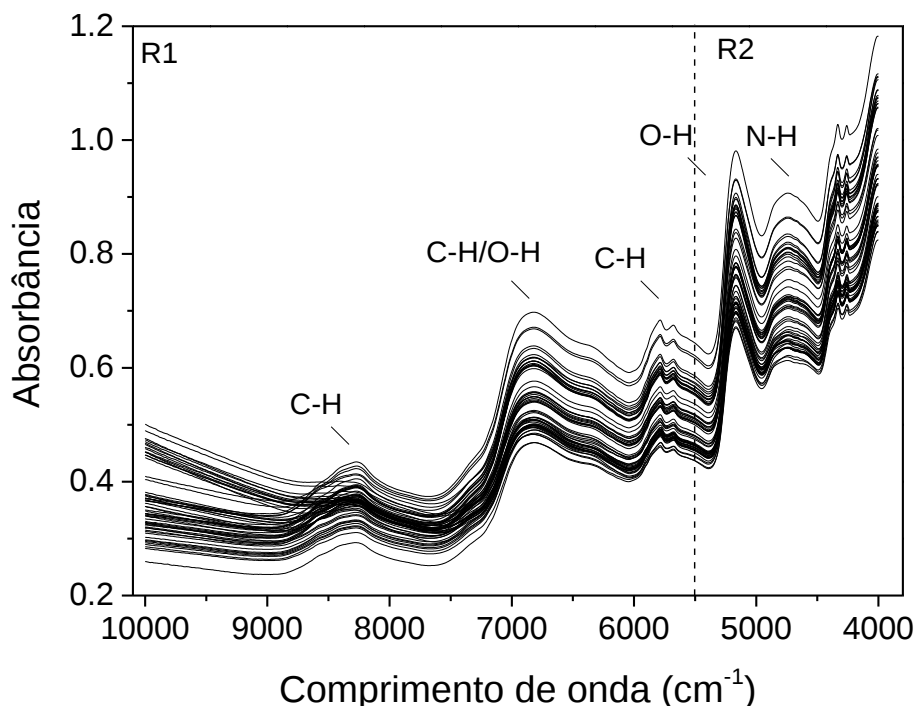


Figura 14: Espectros NIR sem tratamento espectral obtidos para as amostras de grãos pertencentes a diferentes classes.

Fonte: Autor

De acordo com a Figura 14, todos os espectros das diferentes classes de café apresentaram aspectos semelhantes em relação aos compostos químicos presentes. As atribuições das principais bandas foram feitas separando os espectros em duas regiões, R1 e R2. Para espectros NIRS, R1 é denominada região de sobreposição, enquanto R2 é conhecida como região de combinação [57]. A região R1, que compreende o intervalo espectral de $10000 - 9000 \text{ cm}^{-1}$, corresponde à região onde são evidenciadas algumas propriedades físicas das amostras, como formato e densidade das partículas. De $9000 - 8000 \text{ cm}^{-1}$ e $7100 - 6000 \text{ cm}^{-1}$, observam-se bandas associadas as ligações C-H e O-H correspondentes aos lipídeos e açúcares, respectivamente. Já na região R2, de $5500 - 5000$ são observadas bandas de O-H associadas a presença de água nos grãos, e por fim, de $5000 - 4530 \text{ cm}^{-1}$ são observadas bandas de estiramentos da ligação N-H atribuídas as proteínas [57,63,123].

A moagem criogênica é notadamente conhecida por promover a pulverização das amostras, possibilitando a obtenção de tamanhos de partículas inferiores a 100

μm , dependendo da natureza da amostra [124]. Mesmo com a distribuição homogênea do tamanho de partículas das amostras de café ($50\ \mu\text{m}$), os espectros NIRS obtidos mostram efeitos indesejáveis de espalhamento de luz, como desvios da linha base e variação do sinal de absorbância. Dessa maneira, pré-tratamentos espectrais são fundamentais para contornar esse problema [57].

Para minimizar o efeito de espalhamento da radiação, observado nos espectros NIRS devido à micro heterogeneidade das amostras, dados obtidos foram diferenciados (primeira derivada) e os resultados estão ilustrados Figura 15.

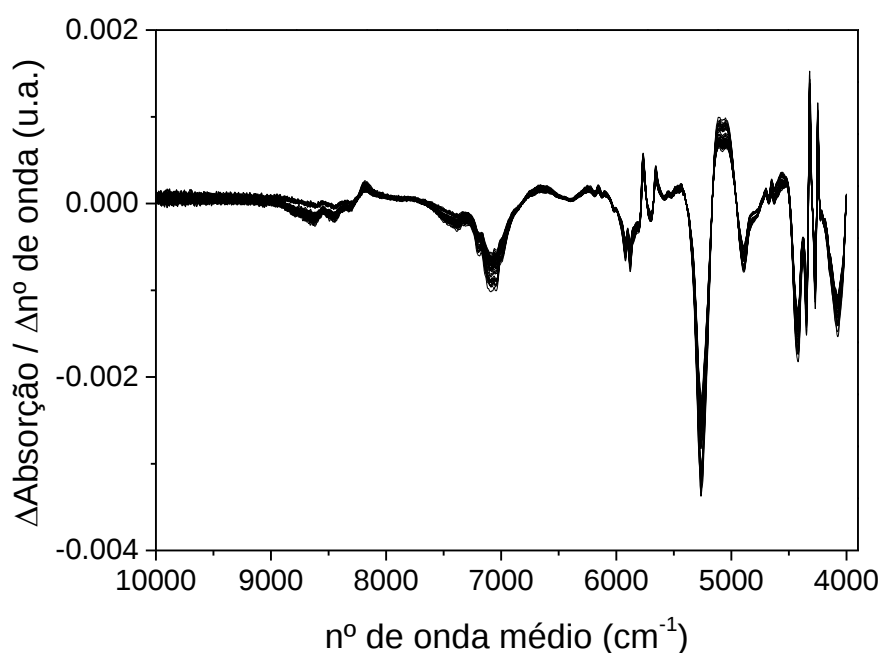


Figura 15: Taxa de variação de 1º ordem dos espectros NIR para as diferentes amostras de grãos das diferentes classes.

Fonte: Autor.

Observa-se que o tratamento espectral selecionado foi eficaz para minimização dos efeitos do espalhamento da radiação, uma vez que normalizou os efeitos de dispersão dos espectros com relação à linha base. A partir dos espectros processados pela primeira derivada, a discriminação das classes de café foi avaliada utilizando PCA, com os dados previamente centrados na média. Os resultados dessa análise são mostrados na Figura 16, onde PC1 representa 83,7% e PC2 10,3% da variância total explicada.

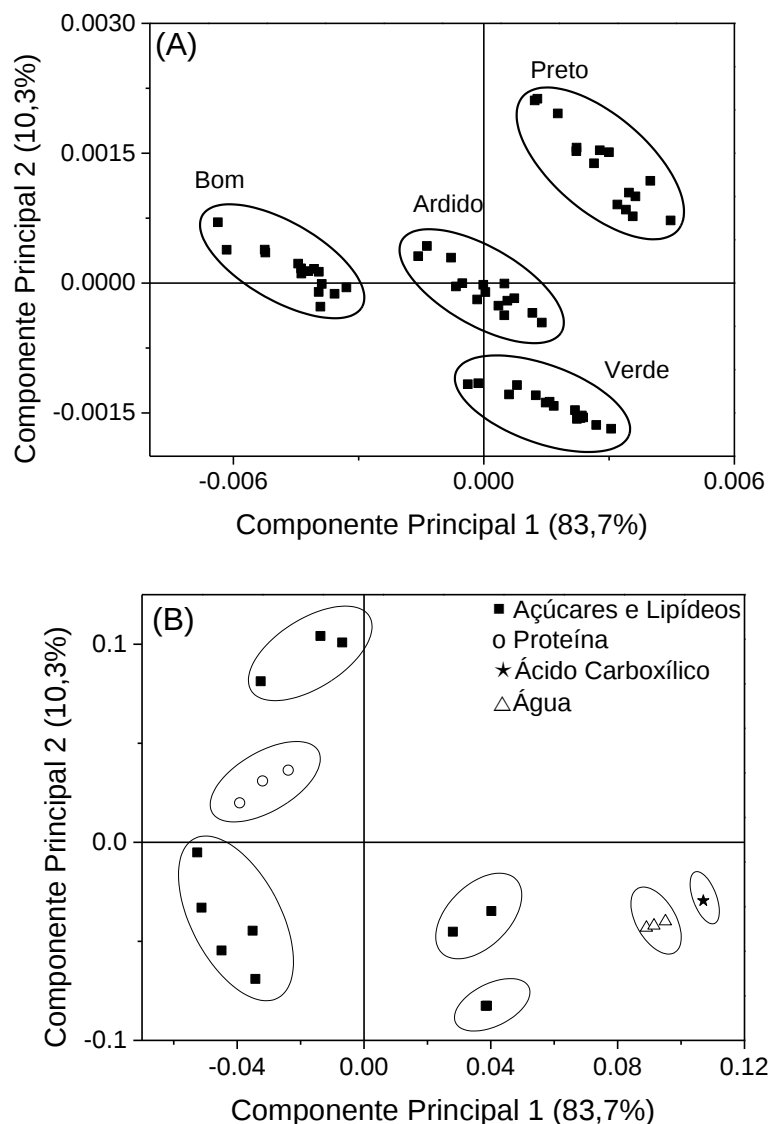


Figura 16: Resultados da análise das componentes principais (PC1xPC2): (A) Gráfico de scores e (B) Variáveis que contribuem para a discriminação das classes (*loadings*).

Fonte: Autor

Na Figura 16 A foram desenhadas elipses para evidenciar o agrupamento das classes obtidas por meio da análise. De acordo com a Figura 16 B os principais estiramentos que contribuíram para separação das classes foram C-H a 2844-2950 cm^{-1} atribuído à lipídeos, açúcares e proteínas, C=O a aproximadamente 1710 cm^{-1} atribuído a ácidos carboxílicos e O-H a 3200-3600 cm^{-1} atribuído a molécula de água [57,63].

A análise conjunta das Figura 16 A e B indica que grãos bons podem ter sido separados das demais classes, devido as influências positivas das variáveis correspondentes a lipídeos, açúcares e proteínas. A classe dos grãos verdes, no entanto, também foi influenciada pelas variáveis proteínas, lipídeos e açúcares, mas sua separação das demais classes foi ocasionada devido as fortes influências das bandas de água e ácidos carboxílicos. A classe dos grãos ardidos é pouco influenciada pelo peso das variáveis estudadas, assim admite-se que essa classe se distinguiu das demais devido a esse fator. Já o agrupamento das amostras relativas à classe dos grãos pretos, apresentaram peso positivo das variáveis, proteínas, açúcares, lipídeos além da água e ácidos carboxílicos.

A análise desses resultados sugere que, proteínas, lipídeos, açúcares, ácidos carboxílicos além da água, são compostos químicos importantes para a discriminação das classes dos cafés estudados. Assim, essas variáveis podem ser utilizadas na construção de modelos de regressão para predição da qualidade de cafés em relação à introdução de PVAs.

Tendo em vista as variáveis obtidas pela técnica NIRS, a próxima etapa foi avaliar o potencial dos espectros LIBS para diferenciação das classes de café. Os espectros LIBS, obtidos para cada réplica das amostras das diferentes classes de café apresentaram grande número de linhas de emissão no intervalo compreendido entre 190 a 970 nm. Na Figura 17 são mostrados 200 espectros correspondentes às análises das 5 pastilhas da amostra de café ardido. O elevado número de linhas de emissão observado nos espectros evidencia a complexidade da matriz analisada.

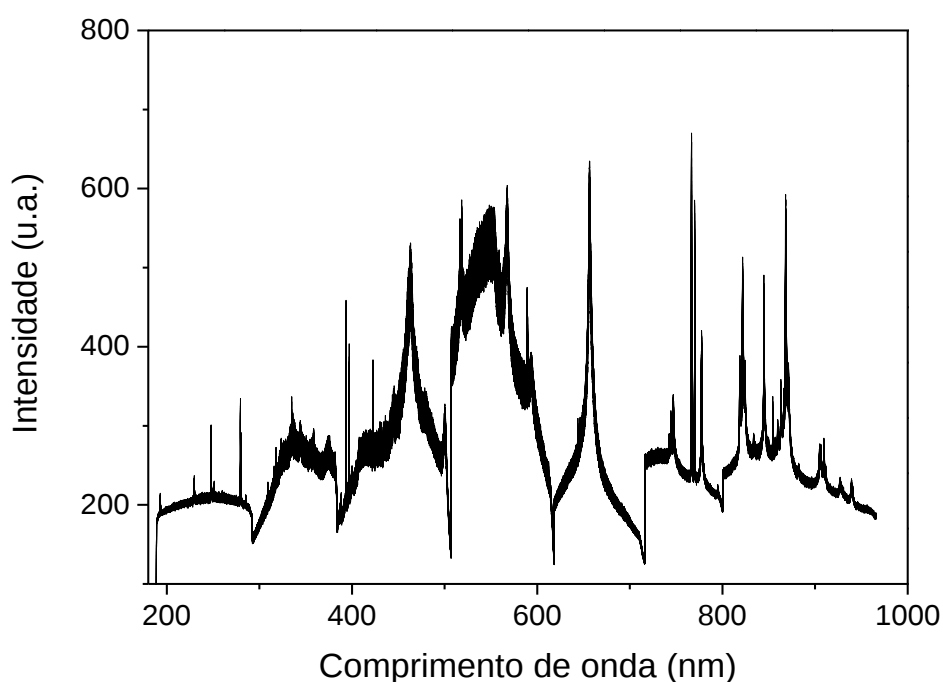


Figura 17: Espectros LIBS obtidos para a amostra de grãos defeituosos do tipo ardido.

Fonte: Autor.

As atribuições de algumas linhas de emissão para cada classe de café, utilizando a base de dados NIST e trabalhos da literatura, permitiu a identificação de linhas de emissão atômicas e iônicas referentes aos elementos como: carbono, oxigênio, hidrogênio, nitrogênio, cálcio, potássio, entre outros. Além de algumas linhas de emissões moleculares provenientes de estruturas rotacionais finas das espécies CN ($B^2\Sigma^+ \rightarrow X^2\Sigma$) e C_2 ($d^3\Pi_g \rightarrow a^3\Pi_u$), as quais podem ser observadas na Figura 18.

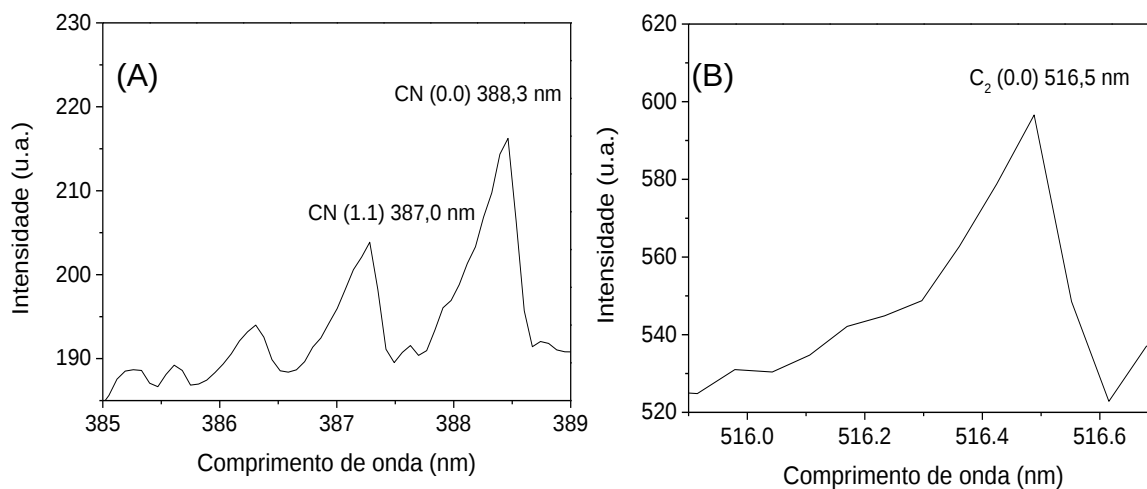


Figura 18: Fragmentos de espectros LIBS de amostra de café ardido referentes a região de emissão de: (A) CN ($B^2\Sigma^+ \rightarrow X^2\Sigma$), (B) C_2 ($d^3\Pi_g \rightarrow a^3\Pi_u$).

Fonte: Autor

A atribuição de linhas de emissão elementares e moleculares observadas nas amostras das diferentes classes de grãos analisadas estão dispostas na Tabela 4.

Tabela 4: Comprimentos de onda dos elementos e moléculas presentes nas amostras de café atribuídos com auxílio do NIST.

Elemento	Comprimento de onda (nm)
C (I)	193,0
CN (0.0)	387,0
CN (1.1)	388,5
C_2 (0.0)	515,6
H	656,2
N (I)	742,3
N (I)	744,2
N (I)	746,8
O (I)	777,4

(I) emissões atômicas; (II) emissões iônicas; (0.0) primeira transição rotacional e (1.1) segunda transição rotacional

Fonte: Autor

A partir das linhas atribuídas foram selecionadas linhas de emissão elementares ou moleculares diatômicas, utilizando como critério a presença de elementos que constituem moléculas orgânicas. Esse critério foi adotado considerando os interessantes resultados previamente obtidos, a partir dos dados da técnica NIRS. Em seguida, com o objetivo de restringir variáveis somente correlacionadas com as classes das moléculas orgânicas observadas nos espectros de NIRS, foram avaliadas correlações entre as linhas de emissão nos espectros LIBS e bandas nos espectros NIRS.

A verificação de correlação entre os dados das duas técnicas teve por objetivo selecionar somente variáveis com alto potencial de discriminação das classes de grãos, pois a linha de emissão de um elemento em LIBS pode ser proveniente da contribuição de uma grande diversidade de compostos. Adicionalmente, as linhas de emissão de moléculas diatômicas tanto podem ser decorrentes de processos de recombinação no plasma, como serem provenientes de processos de fragmentação incompletos, ocorridos durante a etapa de *breakdown*. Segundo Fernandez-Bravo e colaboradores [37], a obtenção do sinal analítico da molécula de CN pode ocorrer de duas maneiras, por meio do processo recombinaativo ou fragmentativo. O processo fragmentativo é dado pela Equação 10.



Nesta equação o CN é produto da recombinação do C presente na amostra, proveniente de uma ablação parcial de uma molécula orgânica, mais o N₂ do ar atmosférico. Para esse processo a estrutura rotacional fina molecular de CN observada é chamada de CN recombinaativo. Já a segunda maneira é a ablação parcial de uma molécula orgânica que contenha em sua estrutura a ligação carbono-nitrogênio, por exemplo, uma proteína, originando a espécie CN. Neste caso, a emissão molecular de CN é chamada de CN nativo. O tempo de atraso entre o pulso do laser e o início da aquisição dos sinais de emissão é de fundamental importância para distinguir as espécies de CN provenientes de cada processo de formação. Tempos curtos favorecem a observação da emissão de CN nativo, enquanto tempos maiores são requeridos para observação de processos de recombinação.

Já para a emissão molecular de C_2 , à estrutura molecular (linear ou cíclica) influência a obtenção do sinal analítico [125]. Segundo Kongbonga e colaboradores [42] para quebrar estruturas cíclicas é necessária maior energia quando comparadas a estruturas lineares. Considerando as observações da literatura, e as condições experimentais selecionadas para a aquisição dos espectros LIBS, tempo de atraso relativamente longo (11 μ s) e potência do laser (50 mJ), há probabilidade de ter-se monitorado CN proveniente de processo recombinaivo e C_2 proveniente de moléculas orgânicas lineares. Apesar dessas evidências, as correlações com as moléculas orgânicas monitoradas em NIRS, podem oferecer informações mais confiáveis sobre as espécies monitoradas.

Após o estudo sistemático para as atribuições das linhas de emissão dos elementos e moléculas em questão, observou-se que estas se repetem para todas as classes, assim as buscas de variáveis para a separação das classes foram feitas por meio das análises dos valores de área para cada linha de emissão observada.

Neste sentido, os picos foram integrados empregando a função Voigt. Essa função foi escolhida considerando que o perfil da linha de emissão pode sofrer alguns tipos de alargamentos, tais como alargamento natural, Doppler, por pressão e instrumental [36]. Cada espécie de alargamento é prevista por um perfil de pico descrito como Gaussiano ou Lorentziano. Contudo a somatória desses perfis é melhor ajustada por uma função de Voigt [34,36].

Com os valores de áreas obtidos, foram feitos então o cálculo das médias e desvio padrão de cada amostra de proveniente de grãos defeituosos e grão sadio. Essas médias foram dispostas em um gráfico de barras com o intuito de analisar se as médias eram visualmente diferentes entre as classes estudadas (Figura 19).

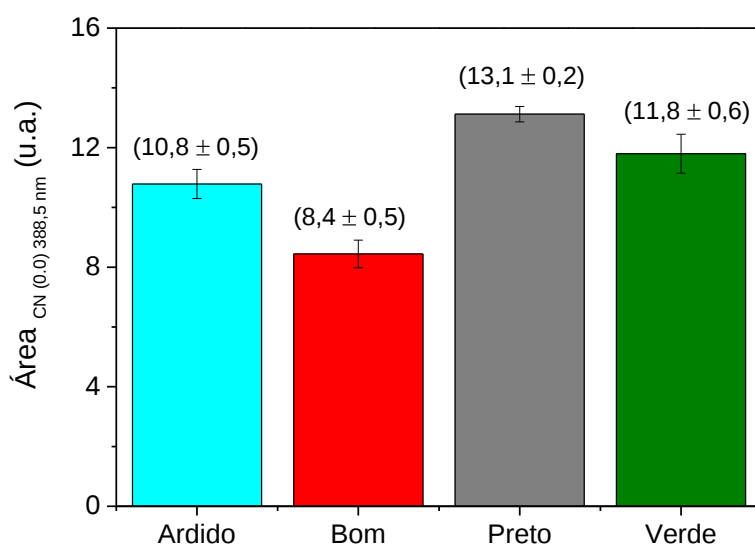


Figura 19: Áreas médias referentes a integração dos sinais de emissão de CN 388,5 nm ($n=40$) para cada tipo de grão defeituoso e sadio de café.

Fonte: Autor

Analisando a Figura 19, nota-se que há diferenças entre os valores obtidos das médias das áreas de cada amostra. No entanto, para melhor avaliar as diferenças entre as médias aplicou-se análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para comparação das médias em cada classe [42]. A Figura 20 ilustra o teste Tukey, para a comparação de médias par a par.

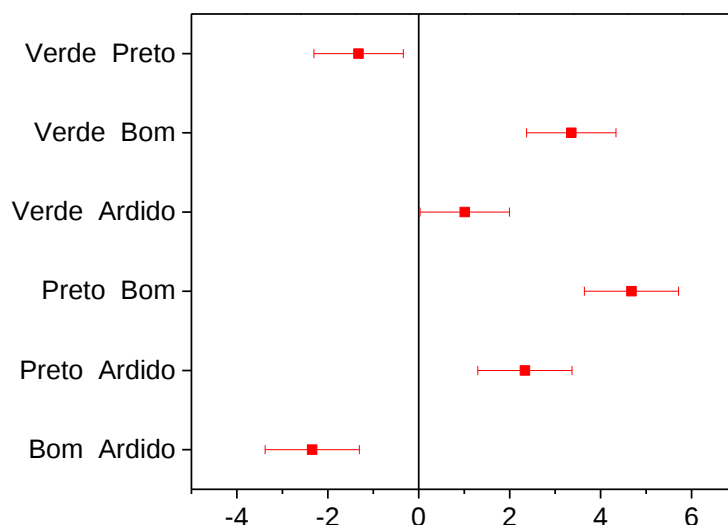


Figura 20: Teste estatístico Tukey para as diferentes amostras no comprimento de onda 388,5 nm, (■) amostras significativamente diferentes (95% de confiança).

Fonte: Autor

Os resultados da Figura 20 mostram que a linha de emissão CN (0.0) 388,5 nm é apropriada para diferenciar todas as classes de grãos defeituosos estudados, da classe dos grãos sadios. Esses resultados sugerem que as emissões da molécula de CN podem estar relacionadas a moléculas orgânicas mais complexas em diferentes concentrações que apresentam essa estrutura e favoreçam a emissão do CN nativo.

Analogamente a essas análises, repetiu-se o Teste Tukey para a avaliação de todas as demais linhas de emissão selecionadas e os resultados obtidos estão representados na Tabela 5.

Tabela 5: Classes de cafés discriminadas de acordo com as linhas de emissão selecionadas no espectro LIBS.

Linha de emissão selecionada	Classes diferenciadas (p<0.05)	Classes não diferenciadas (p<0.05)
C (I) 193,0nm	Verde – Bom Preto – Bom Ardido – Bom	Verde – Preto Verde – Ardido Preto – Ardido
CN (1.1) 387,0 nm	Verde – Bom Preto – Bom Ardido – Bom	Verde – Preto Verde – Ardido Preto – Ardido
CN (0.0) 388,5 nm	Verde – Bom Preto – Bom Ardido – Bom Verde – Preto Verde – Ardido Preto – Ardido	
C ₂ (0.0) 516,6 nm	Verde – Bom Preto – Bom Ardido – Bom Verde – Ardido Preto – Ardido	Verde – Preto
H 656,2 nm	Verde – Bom Verde – Preto	Verde – Ardido Preto – Bom Preto – Ardido Ardido – Bom
N (I) 742,3 nm	Verde – Preto Verde – Bom Preto – Bom Ardido – Bom	Verde – Ardido Preto – Ardido
N (I) 744,2 nm	Verde – Bom Preto – Bom Ardido – Bom Verde – Preto Verde – Ardido	Preto – Ardido
N (I) 746,8 nm	Verde – Bom Preto – Bom Ardido – Bom Verde – Preto Verde – Ardido	Preto – Ardido
O (I) 777,4 nm	Verde – Bom Verde – Preto Verde – Ardido Preto – Ardido	Preto – Bom Ardido – Bom

Fonte: Autor

Analisando os resultados obtidos para o teste estatístico Tukey, é possível observar que a linha CN (0.0) 388,5 foi a única que separou todas as classes. No entanto, outras linhas atômicas e moleculares compreendidas por N (I) 744,2 nm, N (I) 746,8 nm além C₂ (0.0) 516,6 nm mostraram-se promissoras para diferenciação de quase todas as classes avaliadas. Por outro lado, a linha que apresentou o pior desempenho foi o H 656,2 nm, que possibilitou apenas as distinções dos grãos defeituosos verdes dos grãos sadios e grãos pretos.

A partir dos resultados obtido pelo teste estatístico Tukey e visando uma melhor representação gráfica das separações das classes de café estudado, uma PCA foi feita e os resultados estão ilustrados na Figura 21, onde PC1 representa 69,8% e PC2 13,2% da variância total explicada.

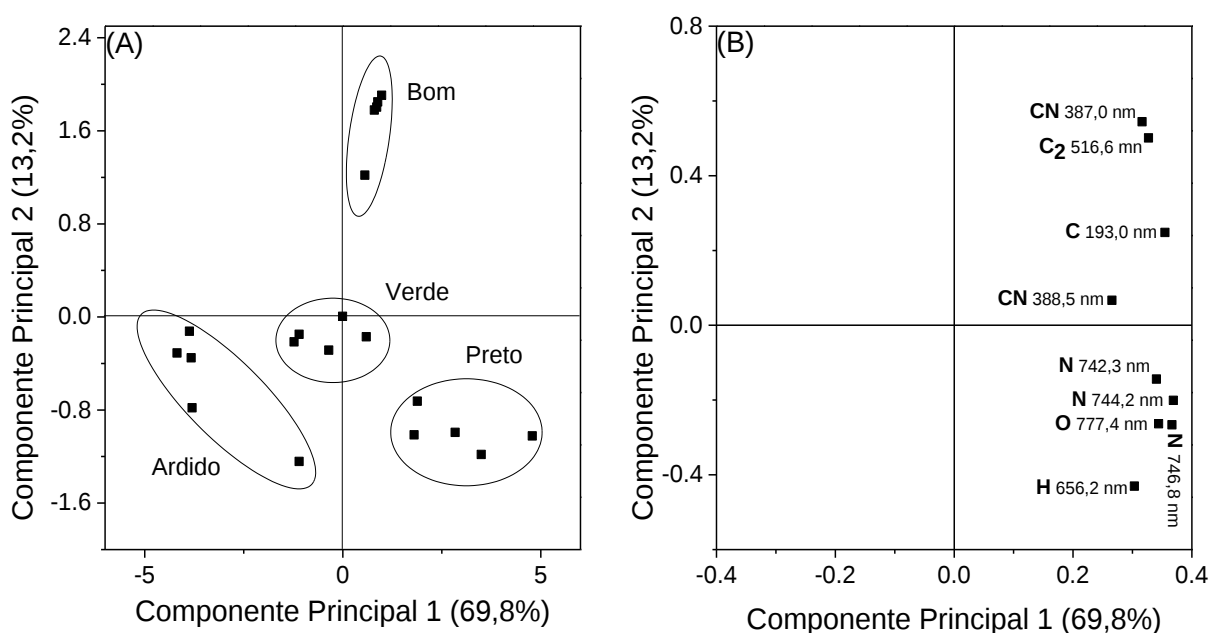


Figura 21: Resultados da análise das componentes principais (PC1xPC2): (A) Gráfico de scores e (B) Variáveis que contribuem para a discriminação das classes (*loadings*).

Fonte: Autor

De acordo com a PCA feita, observa-se que as variáveis estudadas são importantes para a discriminação das classes de café, uma vez que foi possível a separação de todas as classes. A análise conjunta de ambos os gráficos, permitiu concluir que o agrupamento das amostras dos grãos sadios e dos PVAs, ocorreu devido às influências das variáveis compreendidas pelas linhas de emissão de CN

(1.1) 387,0 nm, CN (0.0) 388,5 nm, C₂ (0.0) 516,6 nm e C (I) 193,0 nm. As demais classes, exceto os grãos verdes, sofreram maior influências das variáveis N, O e H. Ainda com base nos resultados, nota-se que por mais que a linha de emissão de H tenha apresentado baixo desempenho no teste Tukey, essa variável não pode ser descartada pois ainda foi relevante para a separação das classes. Esses resultados enfatizam o potencial de LIBS para detectar misturas impróprias de defeitos PVAs em grãos sadios.

De acordo com os resultados obtidos em NIRS e LIBS e com o objetivo de verificar se as linhas de emissão observadas em LIBS correspondem aos compostos monitorados por NIRS, um estudo foi conduzido de modo a verificar a existência de correlações entre sinais de absorção em NIRS e as linhas de emissão selecionadas em LIBS. Para este fim, inicialmente linhas de emissão de elementos ou espécies diatômicas majoritariamente presentes em compostos como proteínas, lipídeos, açúcares, água e ácidos carboxílicos foram selecionadas, a partir dos espectros LIBS para avaliação quanto a discriminação das classes. Posteriormente, para comparar as mesmas grandezas, os espectros LIBS foram derivados e as médias das taxas de variação mínima foram tomadas e comparadas com as médias das taxas de variação mínimas de bandas derivadas dos espectros NIRS. Esses dados foram dispostos em eixo das ordenadas e abcissas e a correlação linear entre elas foi avaliado por meio do valor de r . Na Tabela 6 estão compilados os valores de r em módulo para todas as correlações avaliadas.

Tabela 6: Módulos dos coeficientes de correlação linear (r) entre as inflexões descendentes diferenciadas dos sinais de LIBS e NIRS.

LIBS Comprimento de onda (nm)	C (I) 193,0	CN (1.1) 387,2	CN (0.0) 388,5	C ₂ (0.0) 516,6	H 656,2	N (I) 742,3	N (I) 744,2	N (I) 746,8	O(I) 777,4
NIRS Número de onda (cm ⁻¹)									
4244 ¹	0,894	0,821	0,815	0,663	0,948	0,935	0,922	0,898	0,872
4246 ¹	0,958	0,908	0,902	0,766	0,881	0,885	0,852	0,830	0,779
4248 ¹	0,990	0,962	0,956	0,839	0,799	0,818	0,768	0,748	0,675
4256 ²	0,903	0,955	0,951	0,924	0,348	0,415	0,315	0,309	0,175
4266 ²	0,970	0,802	0,796	0,640	0,958	0,942	0,933	0,908	0,887
4270 ²	0,965	0,919	0,913	0,782	0,868	0,874	0,838	0,816	0,761
4312 ²	0,115	0,021	0,016	0,146	0,760	0,657	0,753	0,721	0,847
4314 ²	0,289	0,157	0,162	0,020	0,859	0,763	0,845	0,810	0,916
4318 ²	0,745	0,650	0,652	0,507	0,980	0,927	0,950	0,914	0,942
4324 ²	0,993	0,997	0,996	0,923	0,651	0,579	0,613	0,592	0,501
4326 ²	0,964	0,993	0,992	0,944	0,510	0,482	0,472	0,457	0,345
4328 ²	0,910	0,961	0,960	0,939	0,362	0,379	0,326	0,315	0,188
4330 ²	0,816	0,892	0,892	0,904	0,182	0,251	0,147	0,141	0,003
4348 ¹	0,803	0,711	0,704	0,538	0,986	0,915	0,965	0,939	0,940
4350 ¹	0,800	0,707	0,701	0,536	0,986	0,907	0,965	0,938	0,940
5264 ³	0,990	0,961	0,941	0,793	0,768	0,640	0,754	0,752	0,647
5280 ⁴	0,983	0,945	0,923	0,764	0,801	0,653	0,790	0,788	0,689
5284 ⁴	0,980	0,940	0,919	0,758	0,811	0,657	0,800	0,798	0,701
5286 ⁴	0,979	0,937	0,916	0,754	0,817	0,661	0,806	0,803	0,708

¹ C-H proteínas; ² C-H lipídeos, açúcares; ³ C=O ácidos carboxílicos e ⁴ O-H água

Fonte: Autor

Os resultados mostram que os estiramentos provenientes das proteínas, lipídeos e açúcares e as linhas de emissão de C (I) 193,0 nm, CN (1.1) 387,0 nm, CN (0.0) 388,5 nm, apresentaram coeficiente de correlação superiores a 0,9, sugerindo o potencial dessas linhas para estimar esses compostos. O tripleto de nitrogênio em, N (I) 742,3 nm, 744,2 nm, e 746,8 nm, apresenta potencial para estimar o conteúdo de

proteínas e C₂ (0.0) 516,6 nm o de lipídeos, uma vez que essas linhas mostraram alta correlação com respectivos estiramentos em NIRS ($r \geq 0,9$).

A linha de emissão molecular em 388,5 nm proporcionou as melhores discriminações das classes e foi fortemente correlacionada com as taxas de variações máximas e mínimas das bandas de N-H, associadas as proteínas dos grãos de café, isso indica que as linhas de CN monitoradas são predominantemente advindas de fragmentações moleculares de proteínas e não proveniente de recombinação do carbono da amostra e o nitrogênio do ar. É interessante ressaltar ainda, que a as linhas de emissão de nitrogênio novamente apresentou resultados promissores, isso evidencia a importância do monitoramento desse elemento para a avaliação das classes de café.

Os resultados sugerem que LIBS além de apresentar o potencial para análises da composição elementar de diversas amostras, também demonstra potencialidade para análise de compostos orgânicos presentes em grãos de café cru.

5.2. Verificação de correlação entre pH e teor de umidade com dados de LIBS e NIRS

As buscas por atributos que possam contribuir para a discriminação dos diferentes grãos de café vão além da composição orgânica e inorgânica, ou seja, deve-se explorar também parâmetros físico-químicos. Neste sentido, os parâmetros mais relevantes são o pH e o teor de umidade, visto que, a literatura relata inúmeros trabalhos que explora a influência desses parâmetros na qualidade dos grãos e consequentemente da bebida [13,24,114,126,127].

Assim, medidas de pH e umidade foram feitas para as amostras das diferentes classes de cafés avaliadas e os resultados obtidos para esses parâmetros estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7: Média e desvio-padrão ($n=5$) dos parâmetros físico-químicos avaliados para as diferentes amostras de grãos café.

Amostras	pH	Umidade (%) (m/m)
Bom (sadios)	$5,1 \pm 0,1$	$9,94 \pm 0,12$
Preto	$5,8 \pm 0,1$	$9,86 \pm 0,35$
Verde	$5,1 \pm 0,1$	$9,20 \pm 0,10$
Ardido	$5,3 \pm 0,1$	$9,37 \pm 0,16$

Fonte: Autor.

Para avaliar se o pH e o teor de umidade poderiam constituir boas variáveis para discriminação das classes, ANOVA juntamente com o Teste de Tukey foram calculados e os resultados estão mostrados na Figura 22 A e B.

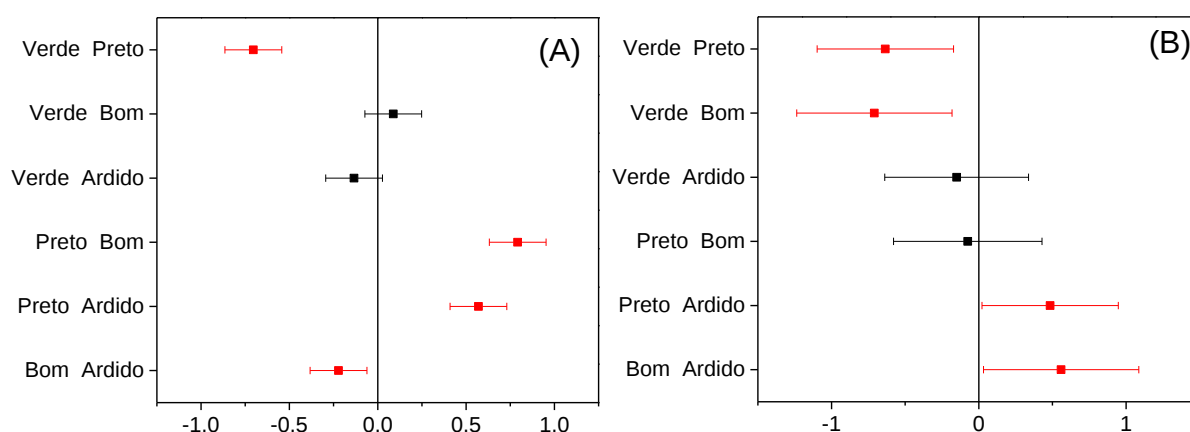


Figura 22: Teste estatístico Tukey para os valores médios ($n=5$) (A) pH e (B) teor de umidade obtidos nas diferentes amostras de café. Os símbolos ■ e ■ representam a não diferença significativa e diferença significativa (95% de confiança) entre as classes de grãos, respectivamente.

Fonte: Autor

Os resultados referentes ao parâmetro pH (Figura 22 A) mostram que os valores desse parâmetro permitiram diferenciar grãos bons dos defeitos pretos e ardidos. Esses resultados corroboram com as observações relatadas por Franca e Oliveira

(2008) que consideraram a acidez um importante atributo para a análise sensorial, uma vez que, cafés de alta qualidade apresentam menores valores de pH, enquanto cafés de baixa qualidade estão correlacionados com os valores maiores de pH [128].

O pH também apresentou potencial para discriminar grãos pretos de ardidos e grãos verdes de pretos constituindo, de forma geral, um parâmetro potencial para distinguir as classes de grãos estudadas.

A análise da umidade (Figura 22 B) mostra que esse parâmetro possui potencial para discriminar grãos bons de grãos verdes e de grãos ardidos. Esse resultado de certa forma, complementa os obtidos com o parâmetro pH, pois pelo pH não é possível discriminar grãos bons de verdes e pela umidade não é possível discriminar grãos bons de pretos.

Os parâmetros físico-químicos representados pelo pH e umidade apresentaram-se como boas variáveis para a separação das classes, porém utilizá-las em um modelo de predição é relativamente inviável devido ao tempo gasto para fazer as análises. Para simplificar o monitoramento desses parâmetros, correlacioná-los com linhas de emissão de oxigênio e hidrogênio obtidas no espectro LIBS e bandas moleculares de O-H por NIRS, podem sugerir resultados interessantes que, por sua vez, podem ser utilizados como variáveis no desenvolvimento de modelos de regressão.

Para este fim, os valores de área linhas de emissão de oxigênio (O (I) 777,4 nm) e hidrogênio (H 656,2 nm), além da taxa de variação máxima e mínima correspondente à O-H (5280 e 5284 cm^{-1} , respectivamente) foram selecionadas e correlacionadas com os valores de umidade e pH obtidos. Esta correlação seguiu o mesmo modelo citado anteriormente, isto é, os dados foram dispostos nos eixos das abcissas e ordenadas e os desempenhos das correlações foram avaliados por meio dos valores de r . A Tabela 8 descreve os resultados obtidos em módulo para essas correlações.

Tabela 8: Módulos dos coeficientes de correlação (r) entre os parâmetros físico-químicos e os dados obtidos em NIRS e LIBS.

Parâmetros físico- químicos	Técnicas analíticas			
	NIRS		LIBS	
	O-H (5280 cm^{-1})	O-H (5284 cm^{-1})	H 656,2 nm	O (I) 777,4 nm
pH	0,380	0,388	0,049	0,002
Umidade	0,494	0,554	0,921	0,639

Fonte: Autor

De acordo com os resultados obtidos, nota-se que os valores adquiridos para pH nas diferentes amostras de grãos de café, não apresentam correlações fortes ($r \leq 0,380$) tanto para os máximos e mínimos correspondentes ao estiramento O-H, quanto para as linhas de emissão de H e O. Já para os teores de umidade, os valores de correlação foram maiores especialmente para a linha de H ($r = 0,921$). Esse resultado indica que os teores de umidade dos grãos de café podem ser estimados por LIBS, porém a inserção dessa linha de emissão aos modelos de calibração deve ser condicionada ao desempenho de separação das classes observada pelo teste Tukey.

As correlações do teor de umidade com a taxa de variação máxima do estiramento O-H e a linha de emissão oxigênio apresentaram $r = 0,554$ e $r = 0,639$, respectivamente. Dessa maneira, essas correlações são consideradas moderadas [129], sugerindo que o estiramento e a linha de emissão observada nos respectivos espectros podem ser oriundos de outros compostos presentes nas amostras.

5.3. Desenvolvimento e avaliação de modelos de predição para quantidades PVAs em amostras cafés, utilizando as técnicas NIRS e LIBS

De acordo com os resultados promissores que as técnicas NIRS e LIBS apresentaram e visando o desenvolvimento de um método para a quantificação de

inserções de PVAs aos cafés de boa qualidade antes da etapa de torra, modelos de predição foram desenvolvidos utilizando regressões lineares múltiplas. Para isso, seleções de variáveis manuais (LIBS) ou por meio de algoritmos computacionais (NIRS) foram feitas visando diminuir a dimensionalidade do modelo, evitando assim um possível sobreajuste.

5.3.1. Processamento dos dados e desenvolvimento do método empregando NIRS

Para o desenvolvimento do modelo em NIRS, os espectros do conjunto de calibração e validação foram derivados e seleções de variáveis foram feitas. Como os espectros NIRS compreendem o intervalo de $4000 - 10000 \text{ cm}^{-1}$, com o número de onda variando de 2 em 2 cm^{-1} , um espectro NIRS apresenta 3000 mil variáveis. Assim, muitos valores de absorbância referentes a diversos números de onda devem ser irrelevantes para a classificação de um padrão. Dessa maneira, a primeira seleção de variável baseou-se nos resultados descritos pela PCA para os agrupamentos das classes de café. Após esta seleção, o número de variável que era de 3000 mil, foi para 19. Considerando que modelos de calibração, nos quais o número de variáveis é maior que número de amostras de calibração, são propensos a sobreajuste (*overfitting*), baixa capacidade de generalização e alta probabilidade de ponderação de variáveis espúrias, outras seleções de variáveis foram aplicadas dessa vez utilizando de algoritmos para seleção [86,91].

A literatura descreve inúmeros algoritmos computacionais que buscam as melhores variáveis para otimização de um modelo de calibração e consequentemente melhorar o desempenho preditivo. Em linhas gerais, esses algoritmos são divididos em algoritmos heurísticos e aproximativo. Enquanto os heurísticos são normalmente empregados para um número elevado variáveis, por exemplo 3000 mil, o algoritmo aproximativo, permite realizar uma busca exaustiva de variáveis em um conjunto menor, por exemplo 19 [113]. Assim, o algoritmo Wrapper, descrito por Kohavi e John (1997)[112], auxiliado pela busca exaustiva foi utilizado para selecionar as variáveis a partir do conjunto das 19 variáveis, previamente selecionadas pela PCA (seção 5.1). Para aplicar o algoritmo Wrapper foram consideradas apenas as variáveis das amostras do conjunto de calibração para cada defeito misturado aos grãos sadios. Posteriormente, em uma segunda abordagem, considerou-se o conjunto de calibração

com todos os defeitos presentes na mistura de cafés sadios. A Tabela 9 descreve as variáveis selecionadas para os respectivos conjuntos de calibração.

Tabela 9: Variáveis selecionadas por *Wrapper* para a construção de modelos de predição de defeitos em grãos sadios.

Modelo	Grão defeituoso	Variáveis selecionadas (cm ⁻¹)
A	Ardido	4248 ^{N-H} ; 4256 ^{C-H} ; 4266 ^{C-H} ; 4270 ^{C-H} ; 4328 ^{C-H} ; 5280 ^{O-H} e 5284 ^{O-H} .
B	Preto	4244 ^{N-H} ; 4248 ^{N-H} ; 4256 ^{C-H} ; 4266 ^{C-H} ; 4270 ^{C-H} ; 4324 ^{C-H} e 5280 ^{O-H} .
C	Verde	4248 ^{N-H} ; 4266 ^{C-H} ; 4324 ^{C-H} ; 4326 ^{C-H} ; 4348 ^{N-H} ; 4350 ^{N-H} ; 5280 ^{O-H} e 5284 ^{O-H}
D	Todos	4248 ^{N-H} ; 4266 ^{C-H} e 4314 ^{C-H}

N-H – proteínas; C-H – lipídeos e açúcares; O-H – água.

Fonte: Autor

De acordo com a Tabela 9, nota-se que das 19 variáveis, ao utilizar o algoritmo *Wrapper*, foram selecionadas 7 variáveis para o conjunto de calibração dos grãos ardidos e pretos, 8 para os grãos verdes e para todos os defeitos misturados 3 variáveis, sendo no total 13 variáveis diferentes. Nas quatro seleções de variáveis realizadas, os conjuntos selecionados apresentaram diferentes variáveis propiciando a predição de cada defeito ou a mistura deles aos grãos sadios. Ainda vale destacar os estiramentos N-H e C-H, estão presentes em todos os conjuntos selecionados para as diferentes classes de defeitos, evidenciando que proteínas, açúcares e lipídeos são variáveis importantes para as quantificações de PVAs.

Assim, a partir das variáveis selecionadas, modelos baseados em regressões lineares múltiplas foram gerados para predição de cada defeito individualmente e para predição conjunta de PVA. O desempenho dos modelos foi avaliado através da análise das amostras do conjunto de validação e os resultados dessas análises encontram-se na Figura 23 e na Tabela 10.

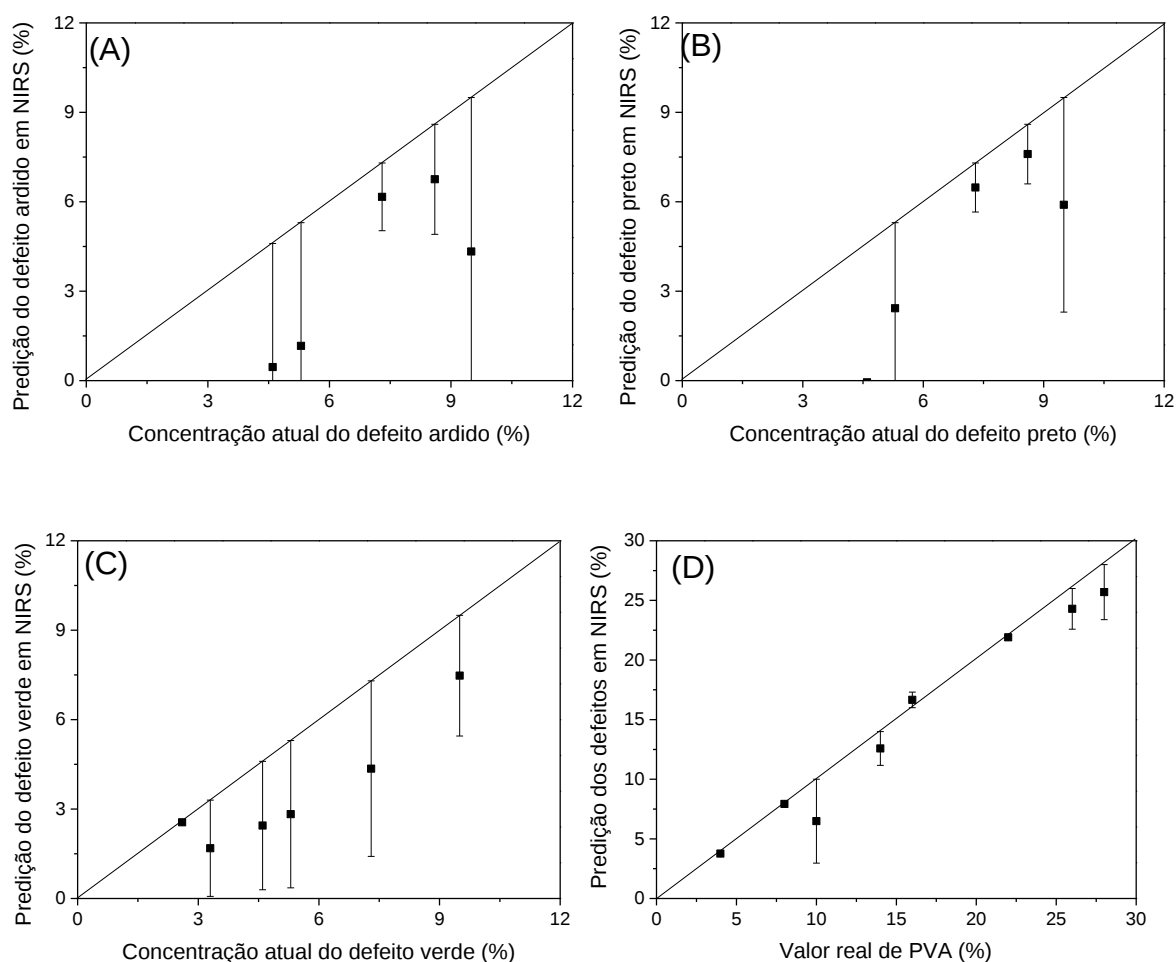


Figura 23: Gráficos das predições de defeitos, (A) ardido, (B) preto, (C) verde e (D) PVA, utilizando variáveis selecionadas por algoritmo *Wrapper*.

Fonte: Autor

Tabela 10: Resultados estatísticos do MLR obtido para cada modelo de predição de defeitos.

Modelo	Grãos defeituosos	RMSEC (%)	RMSEP (%)	RAE (%)	R ²
A	Ardido	1,93	4,48	50,0	0,904
B	Preto	0,709	3,40	41,3	0,938
C	Verde	2,77	3,01	27,7	0,748
D	Todos	1,68	1,69	17,1	0,987

Fonte: Autor

Segundo Gemperline (2006) [91] e Craig e colaboradores (2015) [30], um modelo para ser considerado satisfatório deve apresentar R^2 próximo a 1, RMSEC e RMSEP baixos, além de RAE menor que 30%. Nesse sentido, ao analisar os resultados obtidos, observa-se que para os defeitos ardido e preto, embora os modelos tenham apresentado $R^2 > 0,9$, os valores de RMSEP e RAE foram relativamente altos, inviabilizando a aplicação desses modelos para quantificação dos respectivos defeitos. Para a predição do defeito verde, os valores de RMSEC e RMSEP foram relativamente altos, contudo, os valores obtidos de RAE (27,7%) e R^2 (0,748) podem ser considerados razoáveis para quantificar esse defeito. O modelo ajustado para predição de PVAs foi o que melhor se enquadrou nos parâmetros estabelecidos por Gemperline (2006) [91] apresentando melhor desempenho de predição comparado aos demais modelos avaliados.

Uma proposição para explicar os diferentes comportamentos observados pode estar associada à dois fatores concomitantes relacionados as variáveis selecionadas pelo algoritmo *Wrapper*. O primeiro fator é dado pela relevância da repetição ou não da variável nos diferentes defeitos. O segundo fator é dado pela proporcionalização da relevância. Dessa forma, para que os modelos 1, 2 e 3, sejam considerados ideais, seria relevante a não repetição destas variáveis em cada modelo, uma vez que evidenciariam as distinções das classes estudadas, e que apresentassem proporção de 100% de variáveis relevantes em relação ao total de variáveis selecionadas.

A partir dessa proposição e observando a Tabela 10 juntamente com os resultados acima discutidos, nota-se que nos modelos 1 e 2, apenas uma de sete variáveis não se repetiu, sendo elas $4328^{C-H} \text{ cm}^{-1}$ para o modelo 1 e $4244^{N-H} \text{ cm}^{-1}$ para o modelo 2, representando uma proporção de 14%. Já para o modelo 3, das oito variáveis selecionadas, três não se repetem (4326^{C-H} , 4348^{N-H} e $4350^{N-H} \text{ cm}^{-1}$), representando uma proporção 37,5%. Estas baixas proporções poderiam comprovar os resultados obtidos.

No que se refere ao modelo 4, por apresentar todos os defeitos juntos misturados às amostras de grãos sadios, para ser considerado ideal, seria relevante a repetição das variáveis dos defeitos, de modo a obter uma proporção de relevância de 100%. Dessa maneira, de três variáveis selecionadas duas repetiram-se (4248^{N-H} e $4266^{C-H} \text{ cm}^{-1}$), representando uma proporção de 66%. Essa proporção possivelmente explica o bom resultado obtido para a predição dos defeitos.

Vale ressaltar, que a técnica NIRS já havia sido reportada na literatura como uma técnica robusta para a quantificação de PVA misturados a grãos sadios [17,30,123,130,131]. No entanto, esses modelos empregam inúmeras variáveis e ferramentas quimiométricas mais elaboradas. Em vista disso, o método proposto nesse trabalho otimizou as variáveis e por meio de um modelo simples de regressão linear múltipla foi possível obter uma predição de PVAs robusta e exata, que pode ser utilizado para a análise da qualidade do café brasileiro, antes da etapa da torra.

5.3.2. Processamento dos dados e desenvolvimento do método empregando LIBS

Após o estudo sistemático visando o emprego da técnica NIRS para o desenvolvimento de um método que quantificasse misturas de PVAs, um estudo similar foi conduzido empregando a técnica LIBS, considerando que, os resultados obtidos para a separação das diferentes classes de café apresentaram-se promissores.

Alimentos em geral, assim como café, apresentam além da composição elementar, inúmeros compostos orgânicos (proteínas, carboidratos, lipídeos, açúcares, entre outros) proporcionado uma evidente complexidade de matriz [114,132]. Devido à sua estrutura complexa, os grãos de café, quando analisados em LIBS, podem apresentar variações de sinais analíticos decorrentes da instabilidade do laser, interação laser/amostra, além de possíveis interferências da matriz ao analito prejudicando a reprodutibilidade das medidas [36].

Dessa maneira, alguns tratamentos espectrais amplamente empregados em NIRS e IV, como SNV, primeira e segunda derivada, têm sido aplicados aos espectros LIBS. De acordo com Syvilay e colaboradores (2015) [133] e Bilge e colaboradores (2016) [55], o emprego do SNV e a primeira derivada permite a diminuição dos possíveis efeitos de matriz e a correção da linha base.

Assim, após a aquisição dos espectros do conjunto de calibração e validação, todos foram pré-processados com SNV e a 1º derivada. A Figura 24 ilustra os espectros LIBS, para um tipo de grão defeituoso, obtidos após cada pré-processamento.

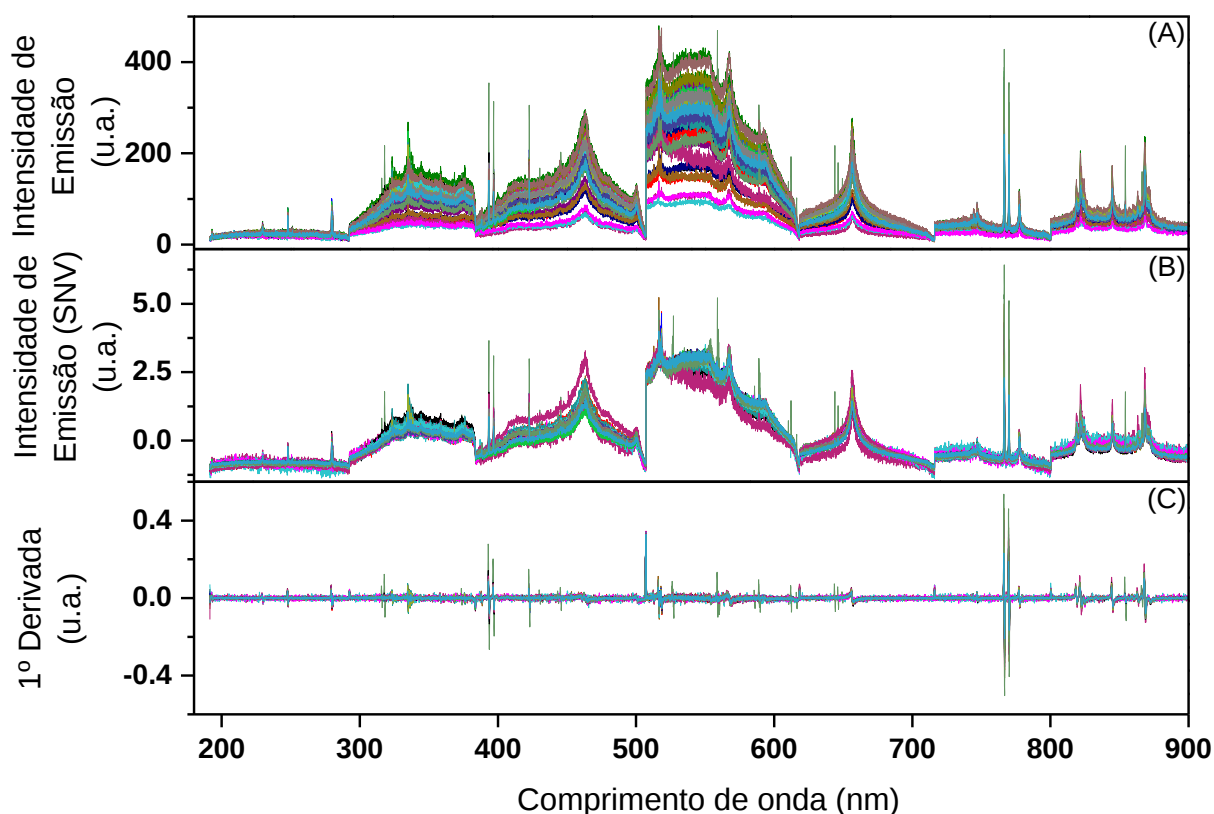


Figura 24: Espectros LIBS ($n=40$) para um ponto no conjunto de calibração com diferentes tratamentos espectrais: (A) dados sem pré-processamento, (B) dados processados por SNV e (C) dados processados por SNV e primeira derivada.

Fonte: Autor

Conforme ilustra a Figura 24, nota-se que a aplicação dos tratamentos espectrais permitiu a correção das flutuações das linhas de emissão bem como diminuição dos ruídos. Vale ressaltar também que a relação sinal ruído apresentou evidente diminuição. Porém, segundo Syvilay e colaboradores (2015) [133] e Ferreira (2015) [86] a relação entre a intensidade máxima e a concentração é preservada, ou seja, essa diminuição não prejudicará os estudos subsequentes.

Feitos os tratamentos espectrais e considerando que o espectro LIBS pode apresentar cerca de milhares de variáveis, uma seleção de variável inicial foi feita visando a diminuição da dimensionalidade dos dados [108]. Essa seleção de variável foi baseada no estudo exploratório descrito na seção 5.1., onde buscaram-se as melhores variáveis que distinguem as classes de grãos de café não torrados e moídos. Dessa maneira, as taxas de variação máximas e mínimas das linhas de emissão do C (I) 190,0 nm, CN (1.1) 387,0 nm, CN (0.0) 388,5 nm, C₂ (0.0) 516,6 nm,

N (I) 742,3 nm, N (I) 744,2 nm, N (I) 746,8 nm e O (I) 777,4 nm, ilustradas na Figura 25, foram selecionadas, .

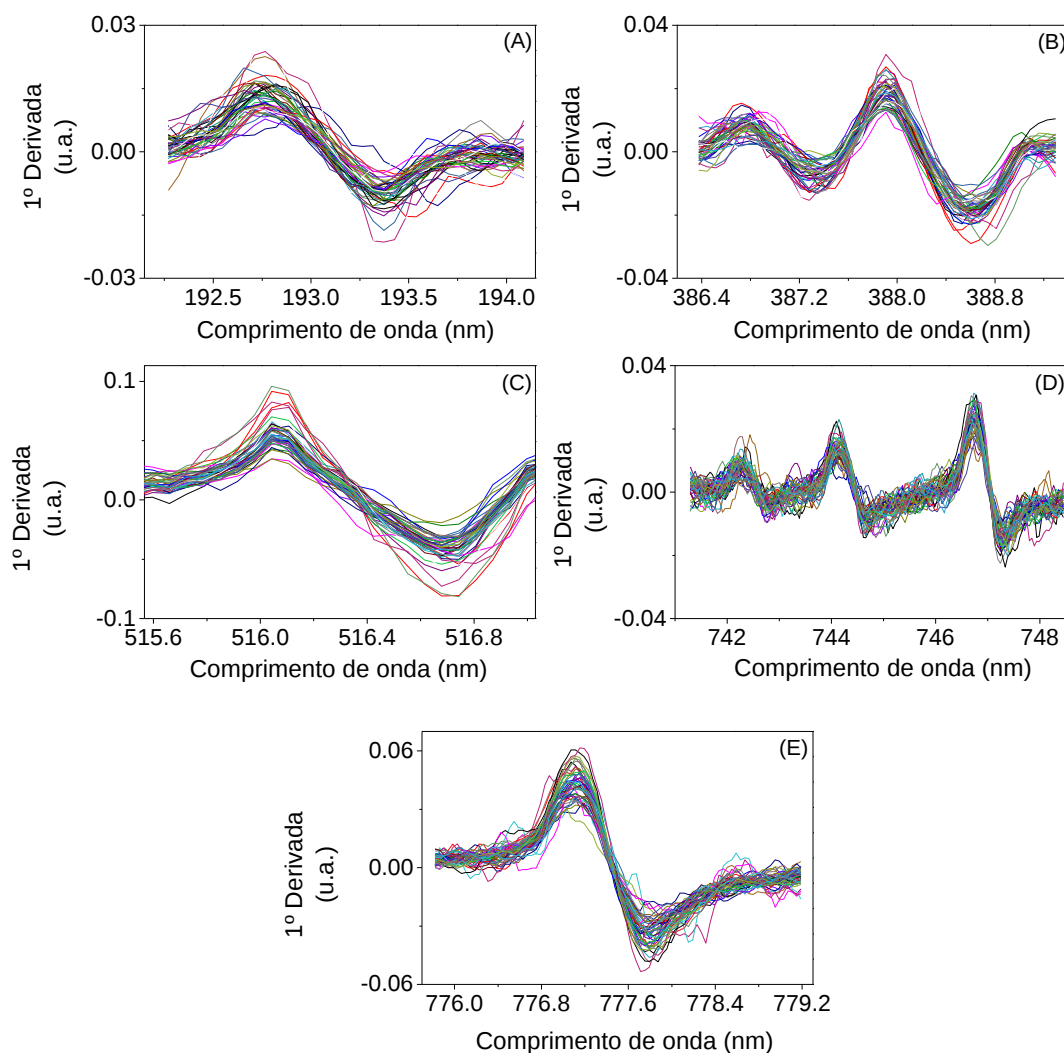


Figura 25: Taxas de variações máximas e mínimas relativas as linhas de emissão previamente selecionadas para um ponto no conjunto de calibração: (A) C (I) 193,0 nm; (B) CN (1.1) 387,0 nm e CN (0.0) 388,5 nm; (C) C₂ (0.0) 516,6 nm; (D) N (I) 742,3 nm, 744,2 nm e 746,8 nm e (E) O (I) 777,4 nm.

Fonte: Autor

A partir das variáveis indicadas pela ANOVA e pela PCA, como potenciais para distinção das classes de defeitos, três novas seleções foram feitas com o objetivo de construir um modelo de predição para cada defeito (preto, verde e ardido). Nestas

seleções, buscaram-se os maiores números de variáveis que distinguiam todas ou pelo menos duas classes de grãos defeituosos, baseando-se nos resultados prévios de separação descrito na Tabela 5 (seção 5.1.).

Assim, para o modelo de calibração que visava a predição dos grãos pretos, as variáveis selecionadas foram as taxas de variação máximas e mínimas das linhas de emissão do CN (0.0) 388,5 nm, N (I) 742,3 nm, N (I) 744,2 nm e N (I) 746,8 nm. Segundo resultados prévios, a linha de emissão de CN discrimina os grãos pretos de todas as outras classes, enquanto as linhas correspondentes ao nitrogênio apresentaram comportamento similar entre si, no qual um dos resultados foi a não separação os grãos pretos dos ardidos. Isso pode ter ocorrido, pois esses grãos apresentam compostos orgânicos relativamente similares [115].

Já para a construção do modelo de calibração para o defeito verde, os máximos e mínimos correspondentes às linhas de emissão N (I) 744,2 nm, N (I) 746,8 nm e O (I) 777,4 nm foram selecionadas, pois permitiram a separação de todos os tipos de grãos do defeito verde.

Por fim, o modelo de calibração para o defeito ardido foi feito usando os máximos e mínimos das linhas de emissão do C₂ (0.0) 516,6 nm, N (I) 744,2 nm e N (I) 746,8 nm. As linhas de emissão correspondentes ao nitrogênio não discriminaram os grãos pretos dos ardidos, como descrito acima. Já a linha molecular C₂ apresentou um bom desempenho, uma vez que separou o grão ardido dos demais defeitos.

Vale ressaltar que, em todas as seleções de variáveis realizadas, as taxas de variação correspondentes às linhas de emissão do nitrogênio sempre foram selecionadas. Segundo Mazzafera e colaboradores (1999) [114], o teor de nitrogênio pode variar de acordo com os grãos defeituosos. Dessa maneira, acredita-se que a forte correlação entre as linhas de emissão de nitrogênio com as proteínas, coloca essas linhas de emissão em destaque para o estudo da qualidade de café.

Tendo em vista as seleções de variáveis para cada tipo de grão defeituoso, regressões lineares múltiplas foram feitas utilizando o conjunto de calibração. Para testar a capacidade preditiva dos modelos foram empregadas a validação externa, ou seja, um conjunto de dados que não foi utilizado na etapa de calibração. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 26.

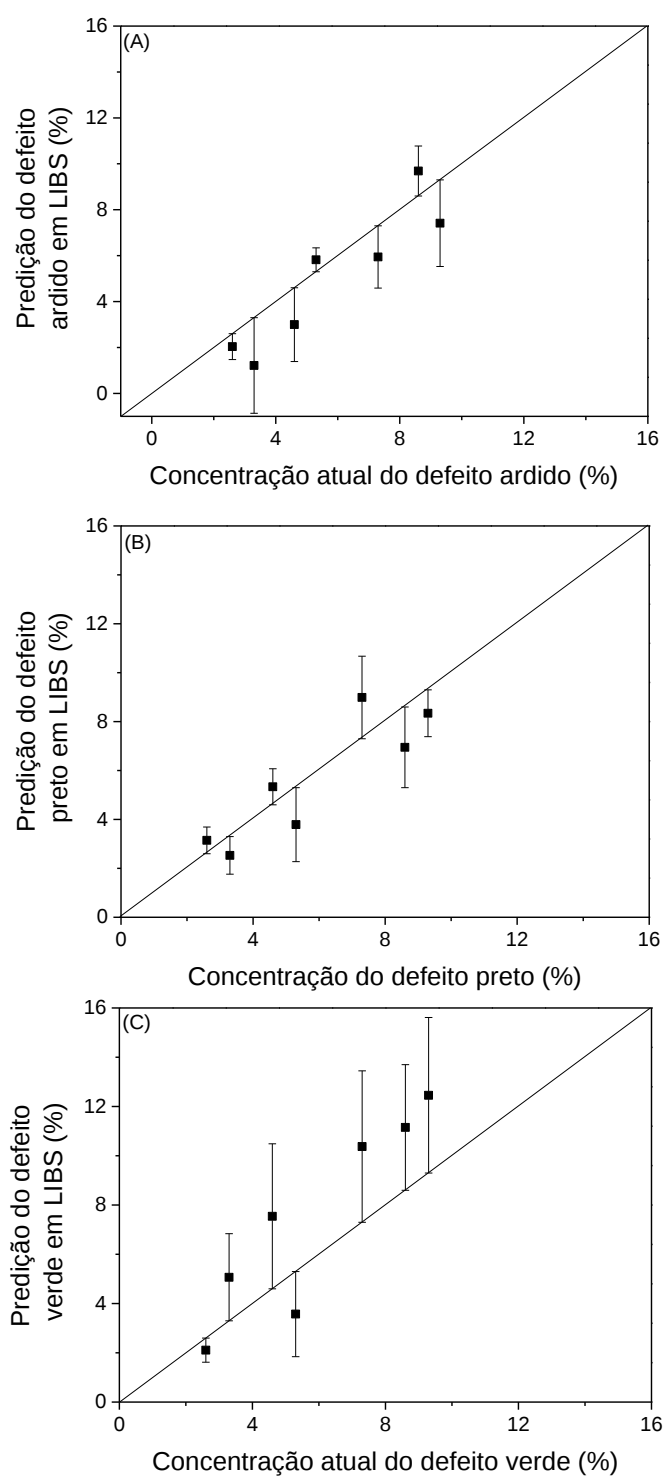


Figura 26: Relação entre atual vs predito do conjunto de validação para cada tipo de grão defeituoso: (A) ardido, (B) preto e (C) verde.

Fonte: Autor

Analisando a Figura 26, nota-se que os modelos são bons para a predição dos defeitos em misturas com café bom. Os modelos propostos para os grãos ardidos e pretos apresentaram melhores predições com menores desvios quando comparados ao modelo de predição de verdes, além de ficarem mais próximos da predição ideal (linha preta na diagonal do gráfico).

Porém, para uma avaliação mais precisa da exatidão e precisão dos modelos, bem como a qualidade da sua capacidade preditiva é necessário observar os parâmetros de desempenho de cada modelo. A Tabela 11 descreve os parâmetros estatísticos obtidos para cada modelo empregando MLR.

Tabela 11: Resultados de desempenho dos modelos MLRs desenvolvidos para cada tipo de defeito misturado ao grão sadio.

Modelo	Grãos defeituosos	RMSEC (%)	RMSEP (%)	RAE(%)	R ²
A	Ardido	1,7	2,5	22	0,804
B	Verde	2,2	3,8	33	0,902
C	Preto	0,7	1,7	18	0,801

Fonte: Autor

Todos os modelos apresentaram boa precisão, visto que os valores obtidos para RMSEC e RMSEP foram relativamente baixos, sendo (RMSEP > RMSEC), os coeficientes de determinação superiores a 0,8 e o RAE entre 18 a 33%. Dentre os resultados obtidos é importante destacar que, embora o modelo para o defeito verde tenha mostrado o maior coeficiente de determinação, este modelo também apresentou maiores RMSEC, RMSEP e RAE. Isso ocorre devido à similaridade da matriz do grão verde ao grão sadio. Portanto, a estimativa do defeito verde na presença do grão sadio tende a ser menos precisa.

Ainda de acordo com os resultados obtidos para os modelos preto e ardido, nota-se que, mesmo empregando as taxas de variação das linhas de nitrogênio que não são boas para a separação de ambos os defeitos, os modelos apresentaram-se diferentes e satisfatórios. Isso evidencia que as outras variáveis selecionadas para cada modelo também foram importantes para as predições dos respectivos defeitos.

Portanto, pode-se concluir que as seleções de variáveis para cada modelo foram imprescindíveis para a predição de um único defeito na presença dos demais. Desta

forma, a técnica LIBS além de apresentar potencialidade para discriminar as diferentes classes de grãos de café não torrados, permitiu o desenvolvimento de métodos para a quantificação de PVA na presença de grãos sadios.

5.4. Avaliação da técnica LIBS para obtenção de informações químicas elementares potenciais para discriminação das classes de grãos estudadas

De acordo com os resultados obtidos anteriormente para as linhas relacionadas aos compostos orgânicos, nesta etapa do trabalho, avaliaram-se os potenciais das linhas elementares com a mesma finalidade, ou seja, buscando encontrar possíveis variáveis que auxiliassem na distinção das diferentes classes de grãos estudadas.

A literatura relata vários trabalhos que visam a determinação elementar dos grãos de café, sendo que grande parte desses trabalhos associam apenas as concentrações obtidas com a composição nutricional do grão ou do solo [132,134–137]. No entanto, Krivan e colaboradores (1993) [138] e Zhang e colaboradores (2017) [120] utilizaram a composição elementar de cafés da espécie arábica, antes da etapa da torra, para identificar a origem geográfica dos referidos grãos. Além disso, Krivan e colaboradores ressaltam que elementos como Ca, Mg, C, H, K e N podem apresentar concentrações da ordem de %. Esses resultados reforçam a atribuição de linhas feitas a partir dos espectros LIBS, uma vez que essa técnica apresenta altos limites de detecção [65].

Considerando as linhas elementares de Mg (I) 285,2 nm, Ca (II) 393,3 nm, Ca (II) 396,8 nm, Ca (I) 422,6 nm, K (I) 766,5 nm e K (I) 769,9 nm, ajustou-se a função Voigt para obter os valores de área relativo a cada pico. Posteriormente, com os valores de áreas, foram calculados as médias e desvios padrões, os quais foram dispostos em um gráfico de barras. A Figura 27, ilustra o estudo feito para a linha de Ca (II) 396,8 nm.

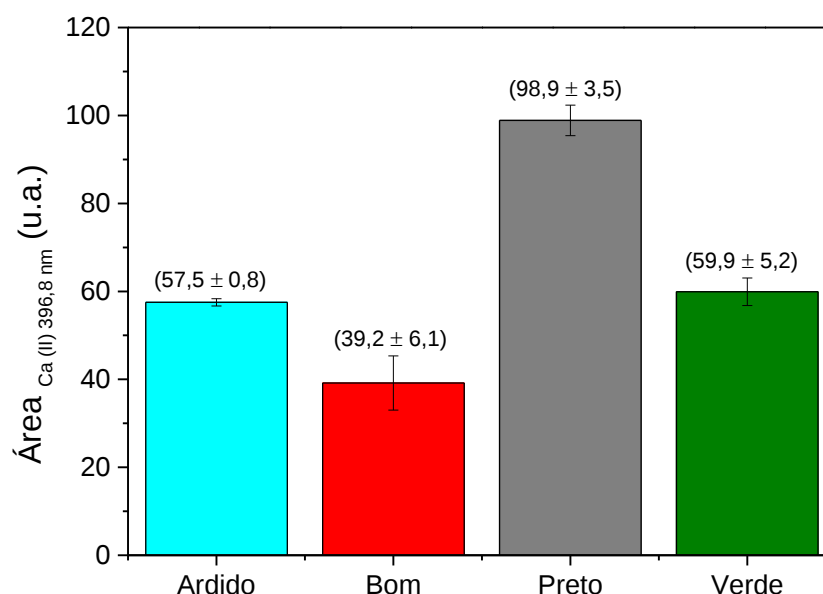


Figura 27: Áreas médias referentes a integração dos sinais de emissão de Ca (II) 396,8 nm ($n=40$) para cada tipo de grão defeituoso e sadio de café.

Fonte: Autor

Observando a Figura 27, nota-se a diferença entre os valores de áreas e seus respectivos desvios para as amostras de cada classe de café. As áreas médias obtidas para as amostras da classe preto ($98,9 \pm 3,5$) e da classe bom ($39,2 \pm 6,1$) apresentaram a maior diferença. Já as amostras das classes ardido e verde apresentaram valores próximos, em torno de 58 unidades, considerando seus respectivos desvios padrão. Além disso, esse resultado sugere que as concentrações de cálcio nos grãos aumentam na seguinte ordem Bom > A $\approx$ V > P.

Assim como feito para as linhas correspondentes aos compostos orgânicos, a análise de variância associada ao teste Tukey foi empregada para todas as linhas de emissão elementar, visando a comparação de médias. Os resultados obtidos para esta análise estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12: Classes de cafés discriminadas de acordo com as linhas de emissão elementares selecionadas no espectro LIBS.

Linha de emissão selecionada	Classes diferenciadas ($p < 0.05$)	Classes não diferenciadas ($p < 0.05$)
Mg (II) 285,2 nm	Verde – Bom; Verde – Preto; Preto – Bom; Preto – Ardido.	Verde – Ardido; Bom – Ardido.
Ca (II) 393,3 nm	Verde – Preto; Verde – Bom; Preto – Bom; Preto – Ardido.	Verde – Ardido.
Ca (II) 396,8 nm	Verde – Preto; Verde – Bom; Preto – Bom; Preto – Ardido.	Verde – Ardido.
Ca (I) 422,8 nm	Verde – Preto; Verde – Bom; Preto – Bom; Preto – Ardido; Bom – Ardido.	Bom – Ardido.
K (I) 766,5 nm	Verde – Bom; Verde – Ardido; Verde – Preto; Preto – Bom; Preto – Ardido.	Bom – Ardido.
K (I) 769,9 nm	Verde – Bom; Verde – Ardido; Verde – Preto; Preto – Bom; Preto – Ardido.	Bom – Ardido.

Fonte: Autor

Observando os dados dispostos na Tabela 12, nota-se que linhas atômicas e iônicas dos elementos estudados se mostraram boas para diferenciação de quase todas as classes avaliadas. Em todas as linhas estudadas, o defeito ardido não se distinguiu de um dos defeitos ou do grão sadio, em pelo menos uma situação. Por outro lado, o defeito preto se separou de todas as outras classes, inclusive da classe bom. Neste sentido, essas variáveis apresentam-se promissoras para o desenvolvimento de modelos de predição de defeitos.

Contudo para certificar se essas linhas de emissão constituíam boas variáveis para diferenciação das classes de café, uma PCA foi feita e os resultados estão ilustrados na Figura 28, cuja as componentes principais 1 e 2 explicam 87,9% e 7,2% da variância total dos dados, respectivamente.

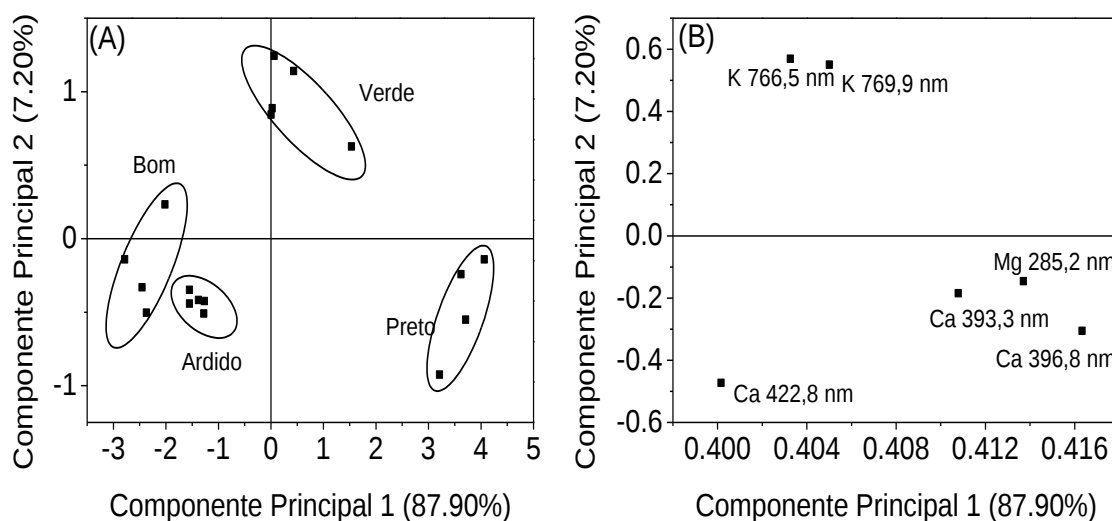


Figura 28: Resultados da análise das componentes principais (PC1xPC2): (A) Gráfico de *scores* e (B) Gráfico de *loadings*.

Fonte: Autor

De acordo com a PCA feita, nota-se que houveram separações das classes de amostras de grãos de café estudadas. Estes resultados confirmam o potencial das linhas de emissão elementar para distinção das classes de amostras. A análise simultânea dos gráficos de *scores* e *loadings* (Figura 28), sugere que a PC1 possibilitou o agrupamento das amostras dos grãos pretos, ardidos e bons, devido aos pesos dos valores de área das linhas correspondentes ao Ca e Mg. Enquanto a PC2 proporcionou o agrupamento dos grãos defeituosos verdes, devido as duas linhas de emissão correspondentes ao K.

Ainda de acordo com a PCA, observa-se que os conjuntos de amostras das classes bons e ardidos apresentaram-se próximos. Esses resultados corroboram com resultados obtidos pelo teste Tukey, visto que, exceto Ca (II) 393,3 nm e Ca (II) 396,8 nm, todas as outras linhas avaliadas não permitiram a separação dessas amostras. Neste sentido, visando obter melhores resultados para a distinção dessas classes, as introduções de outras linhas de emissão com bons potenciais classificadores deverão ser avaliadas.

5.5. Desenvolvimento de modelos de regressão empregando dados elementares observados por LIBS

Considerando os resultados obtidos a partir dos estudos para a separação das classes de grãos de café empregando linhas de emissão correspondentes a composição elementar, foram desenvolvidos métodos para a quantificação de PVAs misturados aos grãos sadios. Para tal propósito foram tomados os espectros do conjunto de calibração e validação previamente pré-processados por SNV e 1º derivada, descrito na seção 5.3.2..

Inicialmente, considerando o conjunto de calibração e os resultados obtidos pelo teste de Tukey (Tabela 12), as variáveis iniciais consideradas foram as taxas de variação máximas e mínimas das linhas de emissão referentes aos elementos Mg (I) 285,2 nm, Ca (II) 393,3 nm, Ca (II) 396,8 nm, Ca (I) 422,6 nm, K (I) 766,5 nm e K (I) 769,9 nm. Em seguida, três diferentes seleções de variáveis foram conduzidas, sendo uma para cada defeito.

Assim, para o modelo de predição do defeito ardido, as variáveis selecionadas foram aquelas capazes de separar a classe ardidos da classe sadios. Dessa maneira, as variáveis selecionadas foram as taxas de variações máximas e mínimas das linhas de emissões iônicas Ca (II) 393,3 nm, e Ca (II) 396,8 nm. Cabe ressaltar que essas linhas não separam a classe dos grãos ardidos dos grãos verdes.

Para o modelo de predição dos grãos pretos, as variáveis selecionadas foram todas as taxas de variação máximas e mínimas das linhas estudadas, pois, segundo os resultados prévios, todas as linhas de emissão estudadas eram boas variáveis para a separação dos grãos pretos dos demais. Contudo, o número de variáveis para o desenvolvimento do MLR apresentou-se superior ao número de amostras, sendo necessário a exclusão de variáveis que apresentavam colinearidades. Dessa maneira, as variáveis selecionadas para o desenvolvimento do modelo foram compreendidas pelas taxas de variação máxima e mínima de Mg (I) 285,2 nm, taxas de variação máximas de Ca (II) 393,3 nm, Ca (II) 396,8 nm e K (I) 766,5 nm, além da taxa de variação mínima da linha de emissão Ca (I) 422,6 nm.

Por fim, para a construção do modelo de predição do defeito verde, foram utilizadas as variáveis compreendidas pelas taxas de variação máxima e mínima dos

elementos Ca (I) 422,6 nm, K (I) 766,5 nm e K (I) 769,9 nm, uma vez que, essas linhas separam o defeito verde das demais classes estudadas.

De acordo com as seleções de variáveis para cada tipo de grão defeituoso, três modelos MLRs foram ajustados e, para testar as capacidades preditivas desses modelos, conjuntos de testes externos foram utilizados. Os resultados referentes às características dos modelos obtidos, bem como suas predições para amostras do conjunto de validação, estão dispostos na Figura 29 e na Tabela 13.

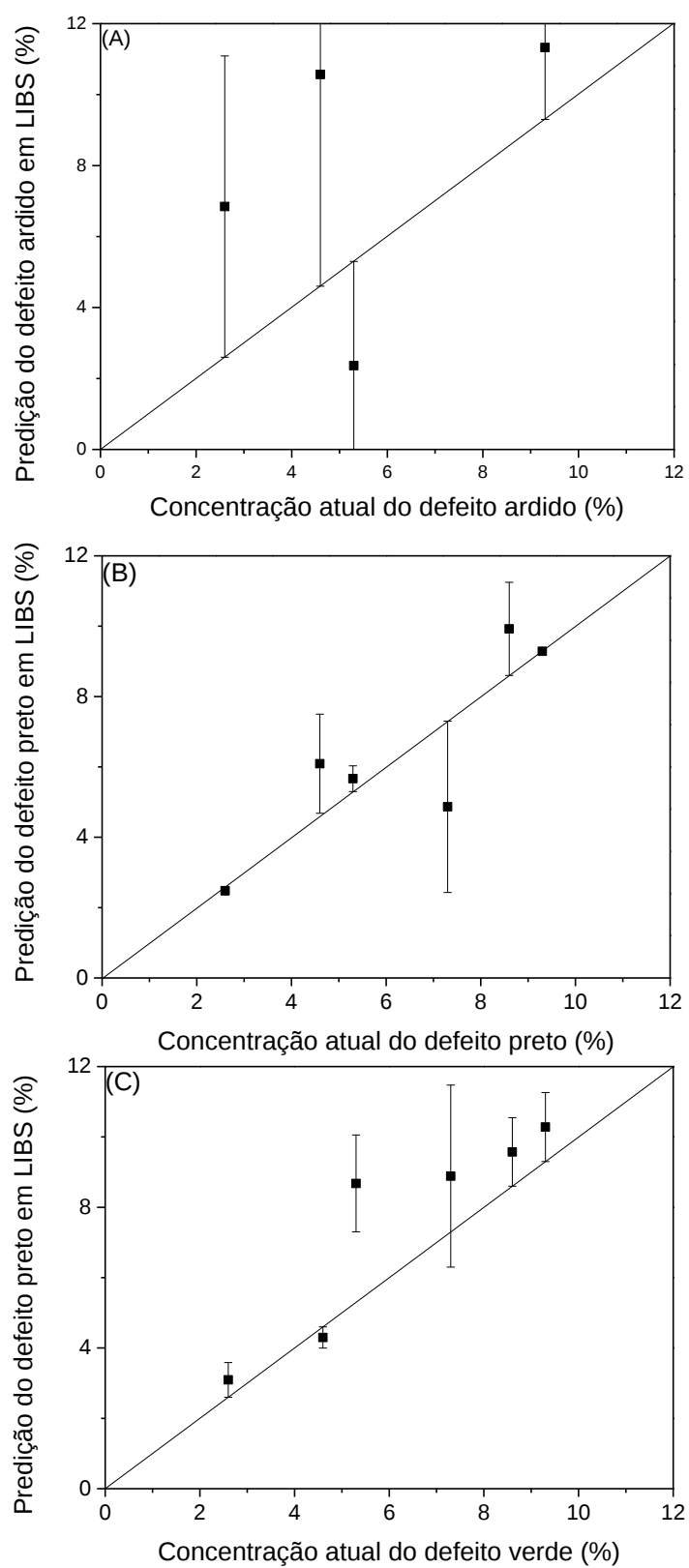


Figura 29: Relação entre atual vs predito do conjunto de validação para cada tipo de grão defeituoso: (A) ardido, (B) preto e (C) verde.

Fonte: Autor

Tabela 13: Resultados de desempenho dos modelos MLRs desenvolvidos para cada tipo de defeito misturado ao grão sadio empregando variáveis correspondentes a linhas elementares.

Modelo	Grãos defeituosos	RMSEC (%)	RMSEP (%)	RAE (%)	R ²
A	Ardido	2,8	9,2	96	0,602
B	Verde	2,2	2,8	29	0,785
C	Preto	1,2	1,9	21	0,805

Fonte: Autor

Os resultados mostram que os modelos propostos foram satisfatórios, exceto aquele para de predição do defeito ardido. Esse fato ocorreu, provavelmente porque as variáveis selecionadas não foram suficientes para predizer com precisão esse defeito, já que as linhas selecionadas não separavam as classes dos grãos ardidos dos grãos verdes. Devido a isso, nota-se na Tabela 13, que os parâmetros de desempenho do modelo foram ruins, visto que o coeficiente de determinação foi de 0,602 e os valores obtidos para RMSEP (9,2%) e RAE (96%) foram consideravelmente altos.

Os modelos propostos para as predições dos defeitos verde e preto, apresentaram desempenho relativamente semelhantes. Os valores de RMSEC e RMSEP para a predição dos defeitos verdes foram de 2,2 e 2,8, respectivamente, sendo o erro relativo absoluto de 29% e coeficiente de determinação igual 0,785. Já para o modelo dos grãos defeituosos pretos apresentou, RMSEC e RMSEP de 1,2% e 1,9%, respectivamente, com erro relativo absoluto de 21% e R² de 0,805.

Esses resultados sugerem, que os modelos MLRs para a predição dos defeitos verdes e pretos, são robustos e exatos para determinar as concentrações desses defeitos em misturas em cafés bons.

6. Conclusões

Estudos sistemáticos sobre a capacidade de NIRS e LIBS para avaliar a qualidade de cafés não torrados, com relação à inserção de PVAs, indicaram o potencial de ambas as técnicas. A composição orgânica de cada classe de cafés (bons, pretos, verdes e ardidos) acessada por NIRS sugere que compostos como proteínas, lipídeos, açúcares, ácidos carboxílicos e água são importantes para discriminação das classes. A composição elementar e diatômica de espécies constituintes de moléculas orgânicas, acessada pela técnica LIBS também mostrou potencial para discriminação das classes estudadas. Além disso, os estudos sugeriram que as emissões ópticas de N, CN, C e C₂ podem ser utilizadas para monitoramento de classes de compostos como proteínas e lipídeos devido suas altas correlações com as bandas de absorção desses compostos, analisadas por NIRS.

Os parâmetros físico-químicos, compreendidos por pH e teor de umidade, apresentaram resultados satisfatórios frente à distinção dos tipos de grãos. Os valores de pHs obtidos para soluções de cafés de diferentes classes, bem como os teores de umidade foram correlacionados com estiramentos de bandas e linhas de emissão observadas por NIRS e LIBS. Dentre todas as correlações feitas, destaca-se a obtida para o teor de umidade pela linha de emissão de H em LIBS, que apresentou $r > 0,9$ indicando que a umidade pode ser avaliada por LIBS. Contudo, esta linha de emissão, não foi selecionada para a construção de modelos de predição devido aos resultados insatisfatórios no teste Tukey.

Do ponto de vista da utilização das técnicas para desenvolvimento de métodos quantitativos para determinação de misturas de PVAs à cafés de alta qualidade, destaca-se a alta potencialidade NIRS. O modelo gerado para predição de PVAs empregando variáveis, previamente selecionadas por meio de um algoritmo computacional, apresentou excelente exatidão enfatizada pela alta correlação observada ($R^2 > 0,9$) entre os valores preditos pelo modelo para o conjunto de teste.

O desempenho da técnica LIBS para a predição de defeitos empregando linhas correspondentes à compostos orgânicos, foi mais satisfatório comparado ao da técnica NIRS, visto que, possibilitou a construção de três modelos robustos para a predição de PVA ($R^2 > 0,8$), sendo um para cada tipo de defeito. É importante enfatizar

que, esses modelos foram alcançados devido as minuciosas seleções de variáveis para cada defeito.

Outra potencialidade de LIBS que deve ser destacada é que as linhas atômicas e iônicas de elementos como Ca, Mg e K, possibilitaram a diferenciação das classes de grãos de café estudados, bem como o desenvolvimento de métodos para as predições dos defeitos verdes e pretos com $R^2 > 0,8$ na presença do grão sadio.

Por fim, este trabalho explorou de maneira, qualitativa e quantitativa as diferentes propriedades do café brasileiro, estabelecendo novas metodologias limpas, versáteis e consonantes a química verde, para controle da inserção de PVAs em cafés de alta qualidade

7. Perspectivas Futuras

- Avaliação da composição química dos grãos sadios e PVA em diferentes graus de torra empregando técnicas analíticas “limpas”;
- Desenvolvimento de modelos para a predição de PVA em grãos sadios com diferentes graus de torra, empregando variáveis que auxiliaram as separações das classes;
- Avaliação da composição química de possíveis adulterantes (arroz, milho, palha, cevada, entre outros), visando a sua detecção em cafés de alta qualidade;
- Desenvolvimento de modelos de predição de adulterantes em café de alta qualidade;
- Aplicação dos modelos desenvolvidos em cafés comerciais.

REFERÊNCIAS

- [1] ICO, International Coffee Organization, Merc. Recua Com Queda Dos Preços Dos Robustas. (2017).
- [2] Organização Internacional de Café, Preços sobem ante novas preocupações com a safra brasileira de 2017/18, Relatório Sobre o Merc. Café. Julho de 2 (2017).
- [3] ABIC, Assoc. Bras. Das Indústrias Café. (n.d.). <http://abic.com.br> (accessed January 2, 2018).
- [4] A.T. Toci, A. Farah, Volatile fingerprint of Brazilian defective coffee seeds: corroboration of potential marker compounds and identification of new low quality indicators., *Food Chem.* 153 (2014) 298–314. doi:10.1016/j.foodchem.2013.12.040.
- [5] I. Esteban-Díez, J.M. González-Sáiz, C. Sáenz-González, C. Pizarro, Coffee varietal differentiation based on near infrared spectroscopy, *Talanta*. 71 (2007) 221–229. doi:10.1016/j.talanta.2006.03.052.
- [6] M. Grembecka, E. Malinowska, P. Szefer, Differentiation of market coffee and its infusions in view of their mineral composition., *Sci. Total Environ.* 383 (2007) 59–69. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.04.031.
- [7] B. Cheng, A. Furtado, H.E. Smyth, R.J. Henry, Influence of genotype and environment on coffee quality, *Trends Food Sci. Technol.* 57 (2016) 20–30. doi:10.1016/j.tifs.2016.09.003.
- [8] A. Farah, M.C. Monteiro, V. Calado, A.S. Franca, L.C. Trugo, Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee, *Food Chem.* 98 (2006) 373–380. doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.032.
- [9] A.P. Craig, A.S. Franca, L.S. Oliveira, Discrimination between defective and non-defective roasted coffees by diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy, *LWT - Food Sci. Technol.* 47 (2012) 505–511. doi:10.1016/j.lwt.2012.02.016.
- [10] A.T. Toci, A. Farah, Volatile compounds as potential defective coffee beans' markers, *Food Chem.* 108 (2008) 1133–1141. doi:10.1016/j.foodchem.2007.11.064.
- [11] W.B. Sunarharum, D.J. Williams, H.E. Smyth, Complexity of coffee flavor : A compositional and sensory perspective, *Food Res. Int.* 62 (2014) 315–325.
- [12] N. Yang, C. Liu, X. Liu, T.K. Degn, M. Munchow, I. Fisk, Determination of volatile marker compounds of common coffee roast defects, *Food Chem.* 211 (2016) 206–214. doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.124.
- [13] A.S. Franca, L.S. Oliveira, Chemistry of defective coffee beans, 2008.

- <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84895401013&partnerID=40&md5=68858d241264e14ca649cec6d04c3d5c>.
- [14] R.J. Clarke, R. Macrae, *Coffee*, Volumen 2: Technology, 1987. doi:10.1007/978-94-009-3417-7.
 - [15] L.S. Oliveira, A.S. Franca, J.C.F. Mendonça, M.C. Barros-Júnior, Proximate composition and fatty acids profile of green and roasted defective coffee beans, *LWT - Food Sci. Technol.* 39 (2006) 235–239. doi:10.1016/j.lwt.2005.01.011.
 - [16] J.C.F. Mendonça, A.S. Franca, L.S. Oliveira, Physical characterization of non-defective and defective Arabica and Robusta coffees before and after roasting, *J. Food Eng.* 92 (2009) 474–479. doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.12.023.
 - [17] J.R. Santos, M.C. Sarraguça, A.O.S.S. Rangel, J.A. Lopes, Evaluation of green coffee beans quality using near infrared spectroscopy: A quantitative approach, *Food Chem.* 135 (2012) 1828–1835. doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.059.
 - [18] ICO, International coffee organization, *Coffee Qual. Program.* (2003) 1–3.
 - [19] ABIC, (n.d.). <http://abic.com.br/src/uploads/2017/07/2.8.1-Norma-de-qualidade-PQC.pdf> (accessed May 3, 2017).
 - [20] Codeagro, Resolução SAA - 28, de 01 de junho de 2007, (2007). http://www.codeagro.agricultura.sp.gov.br/arquivos/selo/saa_28a191a62ed1008f350553a619ba36f7e7.pdf (accessed April 15, 2016).
 - [21] I. Flament, *Coffee Flavor Chemistry.pdf*, John Wiley & Sons, Ltd, New York, 2002.
 - [22] K. Tolessa, M. Rademaker, B. De Baets, P. Boeckx, Prediction of specialty coffee cup quality based on near infrared spectra of green coffee beans, *Talanta.* 150 (2016) 367–374. doi:10.1016/j.talanta.2015.12.039.
 - [23] J.C.F. Mendonça, A.S. Franca, L.S. Oliveira, M. Nunes, Chemical characterisation of non-defective and defective green arabica and robusta coffees by electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS), *Food Chem.* 111 (2008) 490–497. doi:10.1016/j.foodchem.2008.03.080.
 - [24] A.L.S. Vasconcelos, A.S. Franca, M.B.A. Glória, J.C.F. Mendonça, A comparative study of chemical attributes and levels of amines in defective green and roasted coffee beans, *Food Chem.* 101 (2006) 26–32. doi:10.1016/j.foodchem.2005.12.049.
 - [25] I.A. LUTZ, *Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análise de alimento*, 3rd ed., IAL, São Paulo, 1985.
 - [26] G. a. Morais, S .A. L., Aquino, F. J. T., Chang, R., Nascimento, E. A., Oliveira, N.C. Santos, Chemical analysis of Arabica coffee (*Coffea arabica* L.) and defective beans submitted to different degrees of roasting, *Coffee Sci.* 2 (2007) 97–111.

- [27] P. Anastas, N. Eghbali, Green chemistry: principles and practice., Chem. Soc. Rev. 39 (2010) 301–12. doi:10.1039/b918763b.
- [28] P.T. Anastas, Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development, Crit. Rev. Anal. Chem. 29 (1999) 167–175. doi:10.1080/10408349891199356.
- [29] E.J. Lenardão, M.J. Dabdoub, C.F. Batista, “GREEN CHEMISTRY” – OS 12 PRINCÍPIOS DA QUÍMICA VERDE E SUA INSERÇÃO NAS ATIVIDADES DE ENSINO E PESQUISA, Quim. Nova. 26 (2003) 123–129.
- [30] A.P. Craig, A.S. Franca, L.S. Oliveira, J. Irudayaraj, K. Ileleji, Fourier transform infrared spectroscopy and near infrared spectroscopy for the quantification of defects in roasted coffees., Talanta. 134 (2015) 379–86. doi:10.1016/j.talanta.2014.11.038.
- [31] E. Bertone, A. Venturello, A. Giraudo, G. Pellegrino, F. Geobaldo, Simultaneous determination by NIR spectroscopy of the roasting degree and Arabica/Robusta ratio in roasted and ground coffee, Food Control. 59 (2016) 683–689. doi:10.1016/j.foodcont.2015.06.055.
- [32] T.V. Silva, S.Z. Hubinger, J.A.G. Neto, D.M.B.P. Milori, E.J. Ferreira, E.C. Ferreira, Potential of Laser Induced Breakdown Spectroscopy for analyzing the quality of unroasted and ground coffee, Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc. 135 (2017) 29–33. doi:10.1016/j.sab.2017.06.015.
- [33] D. Burns, E. Ciurczak, Handbook of Near-Infrared Analysis Second Edition, Revised and Expanded edited, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, 2001. <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=6EEed1a0uka0C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Handbook+of+Near-Infrared+Analysis+Second&ots=L1ceT2HQst&sig=XLPYEtMerTivJnDEhsU7rGiqyzo>.
- [34] D. Cremers, L.J. Radziemski, Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, 2006. doi:10.1002/0470093013.
- [35] S.J. Rehse, H. Salimnia, A.W. Miziolek, Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS): an overview of recent progress and future potential for biomedical applications, J. Med. Eng. Technol. 36 (2012) 77–89. doi:10.3109/03091902.2011.645946.
- [36] A.W. Miziolek, V. Palleschi, I. Schechter, LIBS Fundamentals and Applications, 2006. doi:10.1017/CBO9780511541261.
- [37] Á. Fernández-Bravo, T. Delgado, P. Lucena, J.J. Laserna, Vibrational emission analysis of the CN molecules in laser-induced breakdown spectroscopy of organic compounds, Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc. 89 (2013) 77–83. doi:10.1016/j.sab.2013.08.004.
- [38] P. Lucena, A. Doña, L.M. Tobaría, J.J. Laserna, New challenges and insights in the detection and spectral identification of organic explosives by laser induced breakdown spectroscopy, Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc. 66 (2011)

12–20. doi:10.1016/j.sab.2010.11.012.

- [39] X. Chen, X. Li, X. Yu, D. Chen, A. Liu, Diagnosis of human malignancies using laser-induced breakdown spectroscopy in combination with chemometric methods, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 139 (2018) 63–69. doi:10.1016/j.sab.2017.11.016.
- [40] D. Prochazka, M. Mazura, O. Samek, K. Rebrošová, P. Pořízka, J. Klus, P. Prochazková, J. Novotný, K. Novotný, J. Kaiser, Combination of laser-induced breakdown spectroscopy and Raman spectroscopy for multivariate classification of bacteria, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 139 (2018) 6–12. doi:10.1016/j.sab.2017.11.004.
- [41] B. Busser, S. Moncayo, J.L. Coll, L. Sancey, V. Motto-Ros, Elemental imaging using laser-induced breakdown spectroscopy: A new and promising approach for biological and medical applications, *Coord. Chem. Rev.* 358 (2018) 70–79. doi:10.1016/j.ccr.2017.12.006.
- [42] Y.G. Mbesse Kongbonga, H. Ghalila, M.B. Onana, Z. Ben Lakhdar, Classification of vegetable oils based on their concentration of saturated fatty acids using laser induced breakdown spectroscopy (LIBS), *Food Chem.* 147 (2014) 327–331. doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.145.
- [43] J.O. Caceres, S. Moncayo, J.D. Rosales, F.J.M. De Villena, F.C. Alvira, G.M. Bilmes, Application of laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and neural networks to olive oils analysis, *Appl. Spectrosc.* 67 (2013) 1064–1072. doi:10.1366/12-06916.
- [44] A. El-Hussein, A. Marzouk, M.A. Harith, Discriminating crude oil grades using laser-induced breakdown spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 113 (2015) 93–99. doi:10.1016/j.sab.2015.09.002.
- [45] L.C. Nunes, J.W. Batista Braga, L.C. Trevizan, P. Florêncio de Souza, G.G. Arantes de Carvalho, D.S. Júnior, R.J. Poppi, F.J. Krug, Optimization and validation of a LIBS method for the determination of macro and micronutrients in sugar cane leaves, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 1453. doi:10.1039/c003620j.
- [46] M. da Silva Gomes, G.G.A. de Carvalho, D. Santos, F.J. Krug, A novel strategy for preparing calibration standards for the analysis of plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy: A case study with pellets of sugar cane leaves, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 86 (2013) 137–141. doi:10.1016/j.sab.2013.03.009.
- [47] D. Santos, L.C. Nunes, G.G.A. de Carvalho, M.D.S. Gomes, P.F. de Souza, F.D.O. Leme, L.G.C. dos Santos, F.J. Krug, Laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of plant materials: A review, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 71–72 (2012) 3–13. doi:10.1016/j.sab.2012.05.005.
- [48] P. Florêncio, D. Souza, D. Santos, G. Gustinelli, A. De Carvalho, L. Cristina, S. Gomes, M. Braga, B. Guerra, F. José, Determination of silicon in plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part B.*

84 (2013) 61–65.

- [49] K. Sovová, K. Dryahina, P. Spanel, M. Kyncl, S. Civis, A study of the composition of the products of laser-induced breakdown of hexogen, octogen, pentrite and trinitrotoluene using selected ion flow tube mass spectrometry and UV-Vis spectrometry., *Analyst*. 135 (2010) 1106–1114. doi:10.1039/b926425f.
- [50] M.P. Casado-gavalda, Y. Dixit, D. Geulen, R. Cama-moncunill, X. Cama-moncunill, M. Markiewicz-keszycka, P.J. Cullen, C. Sullivan, Quantification of copper content with laser induced breakdown spectroscopy as a potential indicator of offal adulteration in beef, *Talanta*. 169 (2017) 123–129. doi:10.1016/j.talanta.2017.03.071.
- [51] Y. Dixit, M.P. Casado-Gavalda, R. Cama-Moncunill, X. Cama-Moncunill, M. Markiewicz-Keszycka, F. Jacoby, P.J. Cullen, C. Sullivan, Introduction to laser induced breakdown spectroscopy imaging in food: Salt diffusion in meat, *J. Food Eng.* 216 (2018) 120–124. doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.08.010.
- [52] G. Bilge, İ.H. Boyacı, K.E. Eseller, U. Tamer, S. Çakır, Analysis of bakery products by laser-induced breakdown spectroscopy, *Food Chem.* 181 (2015) 186–190. doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.090.
- [53] B. Sezer, G. Bilge, I. Hakki, Capabilities and limitations of LIBS in food analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 97 (2017) 345–353. doi:10.1016/J.TRAC.2017.10.003.
- [54] G. Bilge, H.M. Velioglu, B. Sezer, K.E. Eseller, İ.H. Boyaci, Identification of meat species by using laser-induced breakdown spectroscopy, *Meat Sci.* 119 (2016) 118–122. doi:10.1016/j.meatsci.2016.04.035.
- [55] G. Bilge, B. Sezer, K. Efe, H. Berberoglu, A. Topcu, I. Hakki, Determination of whey adulteration in milk powder by using laser induced breakdown spectroscopy, 212 (2016) 183–188.
- [56] E.S. Barr, Historical Survey of the Early Development of the Infrared Spectral Region, *Am. J. Phys.* 28 (1960) 42–54. doi:10.1119/1.1934975.
- [57] W.C. Donald A., Burns Emil, *Handbook of Near-Infrared Analysis*, Third Edition (Practical Spectroscopy), 3rd ed., Taylor & Francis, New York, 2008.
- [58] T. Davies, The history of near infrared spectroscopic analysis: Past, present and future “From sleeping technique to the morning star of spectroscopy,” *Analisis*. 26 (1998) 17–19. doi:10.1051/analisis:199826040017.
- [59] C. Pasquini, Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications, *J. Braz. Chem. Soc.* 14 (2003) 198–219. doi:10.1590/S0103-50532003000200006.
- [60] Skoog, *Fundamentos de Química Analítica*, 2005. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [61] D.A. Skoog, S.R. Crouch, *Principios de análisis instrumental*, 6 ed, n.d.

- [62] Y. Ozaki, W.F. McClure, A.A. Christy, Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology, 2006. doi:10.1002/0470047704.
- [63] J. Workman, L. Weyer, Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy, 2007. doi:10.1002/anie.200885575.
- [64] C.D. Tran, R.J. Furlan, Spectrofluorometer Based on Acousto-Optic Tunable Filters for Rapid Scanning and Multicomponent Sample Analyses, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1675–1681. doi:10.1021/ac00061a008.
- [65] D. Santos Junior, L.V.G. Tarelho, F.J. Krug, D.M.B.P. Milori, L. Martin Neto, N.D. Vieira Junior, A.E. Perspectivas, ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR LASER (LIBS) -, *Rev. Anal.* (2006) 10.
- [66] C. Pasquine, J. Cortez, L.M.C. Silva, F.B. Gonzaga, Laser-induced breakdown spectroscopy, *J. Brazilian Chem. Soc.* 18 (2007) 463. doi:10.1366/000370210793561691.
- [67] L.J. Radziemski, From LASER to LIBS, the path of technology development, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 57 (2002) 1109–1113. doi:10.1016/S0584-8547(02)00052-6.
- [68] L. Radziemski, D. Cremers, A brief history of laser-induced breakdown spectroscopy: From the concept of atoms to LIBS 2012, *Spectrochim. Acta Part B.* 87 (2013) 3–10. doi:10.1016/j.sab.2013.05.013.
- [69] D. Cremers, *Laser Induced Breakdown Spectroscopy*, (2007).
- [70] E.F. Rungle, Spectrochemical analysis using a pulsed laser source, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 52 (1962) 733–736.
- [71] J.D. Winefordner, I.B. Gornushkin, T. Correll, E. Gibb, B.W. Smith, N. Omenetto, Comparing several atomic spectrometric methods to the super stars: special emphasis on laser induced breakdown spectrometry, LIBS, a future super star, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1061. doi:10.1039/b400355c.
- [72] D.W. Hahn, N. Omenetto, Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), part II: Review of instrumental and methodological approaches to material analysis and applications to different fields, *Appl. Spectrosc.* 66 (2012) 347–419. doi:10.1366/11-06574.
- [73] D.A. Cremers, F.-Y. Yueh, J.P. Singh, H. Zhang, Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, *Elemental Analysis Update* based on the original article by Fang-Yu Yueh, Jagdish P. Singh, Hansheng Zhang, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, © 2000, John Wiley & Sons, Ltd., *Encycl. Anal. Chem.* (2012). doi:10.1002/9780470027318.a0708.pub2.
- [74] T. Takahashi, B. Thornton, Quantitative methods for compensation of matrix effects and self-absorption in LIBS signals of solids, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 138 (2017) 31–42. doi:10.1016/j.sab.2017.09.010.

- [75] J.-B. Sirven, B. Sallé, P. Mauchien, J.-L. Lacour, S. Maurice, G. Manhès, Feasibility study of rock identification at the surface of Mars by remote laser-induced breakdown spectroscopy and three chemometric methods, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 1471. doi:10.1039/b704868h.
- [76] W. Rapin, P.Y. Meslin, S. Maurice, R.C. Wiens, D. Laporte, B. Chauviré, O. Gasnault, S. Schröder, P. Beck, S. Bender, O. Beyssac, A. Cousin, E. Dehouck, C. Drouet, O. Forni, M. Nachon, N. Melikechi, B. Rondeau, N. Mangold, N.H. Thomas, Quantification of water content by laser induced breakdown spectroscopy on Mars, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 130 (2017) 82–100. doi:10.1016/j.sab.2017.02.007.
- [77] T. Dequaire, P.Y. Meslin, P. Beck, M. Jaber, A. Cousin, W. Rapin, J. Lasne, O. Gasnault, S. Maurice, A. Buch, C. Szopa, P. Coll, Analysis of carbon and nitrogen signatures with laser-induced breakdown spectroscopy; the quest for organics under Mars-like conditions, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 131 (2017) 8–17. doi:10.1016/j.sab.2017.02.015.
- [78] S.M. Clegg, R.C. Wiens, R. Anderson, O. Forni, J. Frydenvang, J. Lasue, A. Cousin, V. Payré, T. Boucher, M.D. Dyar, S.M. McLennan, R. V. Morris, T.G. Graff, S.A. Mertzman, B.L. Ehlmann, I. Belgacem, H. Newsom, B.C. Clark, N. Melikechi, A. Mezzacappa, R.E. McInroy, R. Martinez, P. Gasda, O. Gasnault, S. Maurice, Recalibration of the Mars Science Laboratory ChemCam instrument with an expanded geochemical database, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 129 (2017) 64–85. doi:10.1016/j.sab.2016.12.003.
- [79] V.S. Bagnato, Os Fundamentos da Luz Laser, *Física Na Esc.* 2 (2008) 4–9.
- [80] a L.S. a E. Siegman, *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*, Springer, 2014. doi:10.1007/978-3-642-45085-3.
- [81] D.W. Hahn, N. Omenetto, Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), part I: Review of basic diagnostics and plasmaparticle interactions: Still-challenging issues within the analytical plasma community, *Appl. Spectrosc.* 64 (2010). doi:10.1366/000370210793561691.
- [82] E. Tognoni, G. Cristoforetti, Signal and noise in Laser Induced Breakdown Spectroscopy: An introductory review, *Opt. Laser Technol.* 79 (2016) 164–172. doi:10.1016/j.optlastec.2015.12.010.
- [83] Q.Y. LIN, Y.X. DUAN, Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: From Experimental Platform to Field Instrument, *Chinese J. Anal. Chem.* 45 (2017) 1405–1414. doi:10.1016/S1872-2040(17)61040-5.
- [84] J.E. Carranza, E. Gibb, B.W. Smith, D.W. Hahn, J.D. Winefordner, Comparison of Nonintensified and Intensified CCD Detectors for Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, *Appl. Opt.* 42 (2003) 6016. doi:10.1364/AO.42.006016.
- [85] J. Rakovský, P. Čermák, O. Musset, P. Veis, A review of the development of portable laser induced breakdown spectroscopy and its applications, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 101 (2014) 269–287. doi:10.1016/j.sab.2014.09.015.

- [86] M.M.C. Ferreira, *Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações*, 1st ed., Campinas, 2015.
- [87] G. Strang, *Linear Algebra and its applications*, 4th ed., 2010. doi:10.1016/S1874-5679(13)60001-X.
- [88] P. Geladi, D. MacDougall, H. Martens, Correction for Near-Infrared Reflectance Spectra of Meat, *Appl. Spectrosc.* 39 (1985) 491–500. doi:10.1366/0003702854248656.
- [89] T. Isaksson, T. Naes, Effect of multiplicative scatter correction (MSC) and linearity improvement in NIR spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* 42 (1988) 1273–1284. doi:10.1366/0003702884429869.
- [90] R.J. Barnes, M.S. Dhanoa, S.J. Lister, Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra, *Appl. Spectrosc.* 43 (1989) 772–777. doi:10.1366/0003702894202201.
- [91] P. Gemperline, *Practical Guide to Chemometrics*, Second Edi, Taylor & Francis, 2006.
- [92] R.D. Tobias, *Chemometrics: A Practical Guide*, *Technometrics.* 41 (1999) 375. doi:10.2307/1271366.
- [93] K. Pearson, LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space, *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* 2 (1901) 559–572. doi:10.1080/14786440109462720.
- [94] E.C. Ferreira, S.H.B.G. Rodrigues, M.M.C. Ferreira, J.A. Nóbrega, A.R.A. Nogueira, Análise exploratória dos teores de constituintes inorgânicos em sucos e refrigerantes de uva, *Eclética Química.* 27 (2002) 77–90. doi:10.1590/S0100-46702002000200007.
- [95] L. Valderrama, V.B. Paiva, P.H. Março, P. Valderrama, Proposta experimental didática para o ensino de análise de componentes principais, *Quim. Nova.* 39 (2016) 245–249. doi:10.5935/0100-4042.20150166.
- [96] M.M. De Sena, R.J. Poppi, R.T.S. Frighetto, P.J. Valarini, Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos, *Quim. Nova.* 23 (2000) 547–556. doi:10.1590/S0100-40422000000400019.
- [97] S. Moncayo, S. Manzoor, F. Navarro-Villoslada, J.O. Cáceres, Evaluation of supervised chemometric methods for sample classification by Laser Induced Breakdown Spectroscopy, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 146 (2015) 354364. doi:10.1016/j.chemolab.2015.06.004.
- [98] M.M.C. Ferreira, A.M. Antunes, M.S. Melgo, P.L.O. Volpe, *Chemometrics I: multivariate calibration, a tutorial*, *Quim. Nova.* 22 (1999) 724–731. doi:10.1590/S0100-40421999000500016.
- [99] J.W.B. Braga, R.J. Poppi, Validação de modelos de calibração multivariada: Uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por

- espectroscopia no infravermelho próximo, *Quim. Nova.* 27 (2004) 1004–1011. doi:10.1016/S0378-5173(00)00335-5.
- [100] N. Reis, A.S. Franca, L.S. Oliveira, Quantitative evaluation of multiple adulterants in roasted coffee by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTS) and chemometrics, *Talanta.* 115 (2013) 563–568. doi:10.1016/j.talanta.2013.06.004.
- [101] M. Miguel, C. Ferreira, C.A. Montanari, Seleção de Variáveis em QSAR, *Quim. Nova.* 25 (2002) 439–448.
- [102] M.J.C. Pontes, J. Cortez, R.K.H. Galvão, C. Pasquini, M.C.U. Araújo, R.M. Coelho, M.K. Chiba, M.F. de Abreu, B.E. Madari, Classification of Brazilian soils by using LIBS and variable selection in the wavelet domain, *Anal. Chim. Acta.* 642 (2009) 12–18. doi:10.1016/j.aca.2009.03.001.
- [103] P. Zhang, L.X. Sun, H.Y. Kong, H.B. Yu, M.T. Guo, P. Zeng, A method derived from genetic algorithm, principal component analysis and artificial neural networks to enhance classification capability of laser-Induced breakdown spectroscopy, *Proc. SPIE - Int. Soc. Opt. Eng.* 10461 (2017). doi:10.1117/12.2281493.
- [104] G. Puchwein, Selection of Calibration Samples for Near-Infrared Spectrometry by Factor Analysis of Spectra, *Anal. Chem.* 60 (1988) 569–573. doi:10.1021/ac00157a015.
- [105] V. Centner, D.L. Massart, O.E. De Noord, S. De Jong, B.M. Vandeginste, C. Sterna, Elimination of Uninformative Variables for Multivariate Calibration, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3851–3858. doi:10.1021/ac960321m.
- [106] L. Norgaard, J. Wagner, J.P. Nielsen, L. Munc, S.B. Engelsen, Interval Partial Least-Squares Regression (iPLS): A Comparative Chemometric Study with an Example from Near-Infrared Spectroscopy, 54 (2000) 413–419.
- [107] P.A. Da Costa Filho, R.J. Poppi, Algoritmo genético em química, *Quim. Nova.* 22 (1999) 405–411. doi:10.1590/S0100-40421999000300019.
- [108] J. Guezenoc, L. Bassel, A. Gallet-Budynek, B. Bousquet, Variables selection: A critical issue for quantitative laser-induced breakdown spectroscopy, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 134 (2017) 6–10. doi:10.1016/j.sab.2017.05.009.
- [109] R. Leardi, L. Norgaard, Sequential application of backward interval partial least squares and genetic algorithms for the selection of relevant spectral regions, *J. Chemom.* 18 (2004) 486–497. doi:10.1002/cem.893.
- [110] A.R. Caneca, M.F. Pimentel, R.K.H. Galvão, C.E. da Matta, F.R. de Carvalho, I.M. Raimundo, C. Pasquini, J.J.R. Rohwedder, Assessment of infrared spectroscopy and multivariate techniques for monitoring the service condition of diesel-engine lubricating oils, *Talanta.* 70 (2006) 344–352. doi:10.1016/j.talanta.2006.02.054.

- [111] M. Forina, S. Lanteri, M.C.C. Oliveros, C.P. Millan, Selection of useful predictors in multivariate calibration, *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 397–418. doi:10.1007/s00216-004-2768-x.
- [112] R. Kohavi, G.H. John, Wrappers for feature subset selection, *Artif. Intell.* 97 (1997) 273–324. doi:10.1016/S0004-3702(97)00043-X.
- [113] R. Panthong, A. Srivihok, Wrapper Feature Subset Selection for Dimension Reduction Based on Ensemble Learning Algorithm, *Procedia Comput. Sci.* 72 (2015) 162–169. doi:10.1016/j.procs.2015.12.117.
- [114] P. Mazzafera, Chemical composition of defective coffee beans, *Food Chem.* 64 (1999) 547–554. doi:10.1016/S0308-8146(98)00167-8.
- [115] P.D.C. Mancha Agresti, A.S. Franca, L.S. Oliveira, R. Augusti, Discrimination between defective and non-defective Brazilian coffee beans by their volatile profile, *Food Chem.* 106 (2008) 787–796. doi:10.1016/j.foodchem.2007.06.019.
- [116] T. Cai, H. Ting, Z. Jin-Lan, Novel identification strategy for ground coffee adulteration based on UPLC-HRMS oligosaccharide profiling, *Food Chem.* 190 (2016) 1046–1049. doi:10.1016/j.foodchem.2015.06.084.
- [117] A.T. Toci, A. Farah, H.R. Pezza, L. Pezza, Coffee Adulteration: More than two decades of research, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 46 (2016) 83–92. doi:10.1080/10408347.2014.966185.
- [118] A.P. Craig, A.S. Franca, L.S. Oliveira, Evaluation of the potential of FTIR and chemometrics for separation between defective and non-defective coffees, *Food Chem.* 132 (2012) 1368–1374. doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.121.
- [119] E.J. Ferreira, E.C. Ferreira, A.C.B. Delbem, D.M.B.P. Milori, Ensemble of predictors and laser induced breakdown spectroscopy for certifying coffee, *Electron. Lett.* 47 (2011) 967–969. doi:10.1049/el.2011.1150.
- [120] C. Zhang, T. Shen, F. Liu, Y. He, Identification of Coffee Varieties Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy and Chemometrics, *Sensors.* 18 (2017) 95. doi:10.3390/s18010095.
- [121] NIST, National Institute of Standards and Technology, (2016) 1–100. <https://aset.az.gov/advanced-persistent-threatsapt-nist%5Cnhttp://www.nist.gov> (accessed April 15, 2016).
- [122] Associação Brasileira das Indústrias de Café, Norma de Qualidade Recomendável e Boas Práticas de Fabricação de Cafés Torrados em Grãos e Cafés Torrados e Moídos, *Planta.* 09 (2007) 1–38. <http://abic.com.br/src/uploads/2017/07/2.8.1-Norma-de-qualidade-PQC.pdf> (accessed January 30, 2015).
- [123] T.A. Catelani, R.N.M.J. Páscoa, J.R. Santos, L. Pezza, H.R. Pezza, J.L.F.C. Lima, J.A. Lopes, A Non-invasive Real-Time Methodology for the Quantification of Antioxidant Properties in Coffee During the Roasting Process Based on

- Near-Infrared Spectroscopy, *Food Bioprocess Technol.* 10 (2017) 630–638. doi:10.1007/s11947-016-1843-6.
- [124] F.J. Krug, *Métodos de Preparo de Amostra*, 1st ed., Cena/USP, Piracicaba, 2010.
- [125] L. St-Onge, R. Sing, S. Béchard, M. Sabsabi, Carbon emissions following 1.064 μm laser ablation of graphite and organic samples in ambient air, *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* 69 (1999) S913. doi:10.1007/s003390051557.
- [126] D.F. Barbin, A.L. de S.M. Felicio, D.W. Sun, S.L. Nixdorf, E.Y. Hirooka, Application of infrared spectral techniques on quality and compositional attributes of coffee: An overview, *Food Res. Int.* 61 (2014) 23–32. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.005.
- [127] M.A. MORGANO, C.G. FARIA, M.F. FERRÃO, N. BRAGAGNOLO, M.M.C. FERREIRA, Determinacao de umidade em café cru usand espectroscopia NIR e regressao multivariada, *Cienc. e Tecnol. Aliment.* 28 (2008) 12–17. doi:10.1590/S0101-20612008000100003.
- [128] A.S. Franca, J.C.F. Mendonça, S.D. Oliveira, Composition of green and roasted coffees of different cup qualities, *LWT - Food Sci. Technol.* 38 (2005) 709–715. doi:10.1016/j.lwt.2004.08.014.
- [129] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 6.ed, Pearson Education Limited, Edinburgh, 2010. doi:10.1198/tech.2004.s248.
- [130] M.A. MORGANO, C.G. FARIA, M.F. FERRÃO, N. BRAGAGNOLO, M.M.C. FERREIRA, Determinação de proteína em café cru por espectroscopia NIR e regressão PLS, *Ciência e Tecnol. Aliment.* 25 (2005) 25–31. doi:10.1590/S0101-20612005000100005.
- [131] M.C. Sarraguça, J.R. Santos, A.O.S.S. Rangel, J.A. Lopes, Authenticity Control of Roasted Coffee Brands Using Near-Infrared Spectroscopy, *Food Anal. Methods.* 6 (2013) 892–899. doi:10.1007/s12161-012-9499-y.
- [132] P. Pohl, E. Stelmach, M. Welna, A. Szymczycha-Madeja, Determination of the Elemental Composition of Coffee Using Instrumental Methods, *Food Anal. Methods.* 6 (2013) 598–613. doi:10.1007/s12161-012-9467-6.
- [133] D. Syvilay, N. Wilkie-Chancellier, B. Trichereau, A. Texier, L. Martinez, S. Serfaty, V. Detalle, Evaluation of the standard normal variate method for Laser-Induced Breakdown Spectroscopy data treatment applied to the discrimination of painting layers, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 114 (2015) 38–45. doi:10.1016/j.sab.2015.09.022.
- [134] S. Şemen, S. Mercan, M. Yayla, M. Açikkol, Elemental composition of green coffee and its contribution to dietary intake, *Food Chem.* 215 (2017) 92–100. doi:10.1016/j.foodchem.2016.07.176.
- [135] V.R.A. Filho, W.L. Polito, Comparative Studies of the Sample Decomposition of

Green and Roasted Coffee for Determination of Nutrients and Data Exploratory Analysis, 18 (2007) 47–53.

- [136] H. Santos, E. De Oliveira, Determination of Mineral Nutrients and Toxic Elements in Brazilian Soluble Coffee by ICP-AES, 531 (2001). doi:10.1006/jfca.2001.1012.
- [137] E. Stelmach, P. Pohl, A. Szymczycha-madeja, The content of Ca , Cu , Fe , Mg and Mn and antioxidant activity of green coffee brews, FOOD Chem. 182 (2015) 302–308. doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.105.
- [138] V. Krivan, P. Barth, A.F. Morales, Multielement analysis of green coffee and its possible use for the determination of origin, Mikrochim. Acta. 110 (1993) 217–236. doi:10.1007/BF01245106.