

Universidade Federal de Juiz de Fora
Instituto de Ciências Exatas
Programa de Pós-Graduação em Física

Geissy de Azevedo Mendes

**ESPECTROSCOPIA ÓTICA PARA DISCRIMINAÇÃO DE MISTURAS
DE CAFÉ ARÁBICA E ROBUSTA**

Juiz de Fora

2018

Geissy de Azevedo Mendes

**ESPECTROSCOPIA ÓTICA PARA DISCRIMINAÇÃO DE MISTURAS
DE CAFÉ ARÁBICA E ROBUSTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Física.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Jose Valenzuela Bell

Coorientadora: Prof.^a Dra. Mirian Pereira Rodarte

Juiz de Fora

2018

Aos meus pais, Valci e Ione.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por iluminar todos meus dias. Agradeço também a minha orientadora Maria Jose Bell, pela oportunidade, confiança e orientação durante todo o mestrado, ao professor Virgilio dos Anjos, por todas as conversas e ensinamentos, à professora Mirian Pereira pela coorientação, ideias e sugestões para este trabalho, ao Domingos, nosso querido secretário e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Juiz de Fora por todo conhecimento ensinado.

Agradeço aos amigos de longas datas e as novas amizades feitas em Juiz de Fora, em especial à Isis e Igor, por todas correções, ensinamentos e momentos de alegria compartilhados, à Angélica, que mesmo distante está sempre presente e às minhas amigas companheiras de república, Daniela, Lais e Laura.

Agradeço a toda minha família e de maneira muito especial aos meus pais, Valci e Ione, que sempre acreditaram em mim, me deram apoio e amor incondicional, compreenderam minha ausência nos últimos anos e me proporcionam momentos incríveis, à minha irmã Géssica e ao meu cunhado Geovane, por todo incentivo durante essa jornada, à Sônia e Magno, que me receberam em sua família como filha. Ao Julian, agradeço por todo companheirismo e paciência.

Agradeço ao Grupo de Espectroscopia e Engenharia de Materiais (GE2M) da UFJF, onde realizei as medidas deste trabalho e a todos amigos de laboratório, em especial à Cristina, ao Jonathan e ao Cassiano por todas correções e ensinamentos. À Thamiris agradeço pela amizade e por ter me apoiado em todas as etapas deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Classificação e Degustação de Café (IFES/Campus Alegre), onde realizei a torra das amostras, ao coordenador desse laboratório, professor João Batista Pavesi Simão e aos técnicos, Jeziane e Ítalo, que gentilmente me ajudaram, ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos (UFJF) onde realizei as medidas de colorimetria e à sua técnica, Louise que me ajudou nas medidas, à minha instituição, Universidade Federal de Juiz de Fora, ao Departamento de Física e aos colegas da Pós-Graduação.

Agradeço aos membros da banca examinadora pelas contribuições positivas para este trabalho e aos órgãos de pesquisa Capes, FAPEMIG, CNPq pelo incentivo à pesquisa e apoio financeiro ao projeto.

À todos que de alguma forma fizeram parte da minha formação e deste trabalho, deixo meu muito obrigada.

"Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos."

Isaac Newton

RESUMO

O café é um dos mais importantes produtos alimentares na economia mundial. O Brasil é o maior produtor e exportador do grão e o segundo maior consumidor do produto no mundo. A maior parte do café disponível comercialmente são as espécies do tipo café arábica (*Coffea arabica L.*) e café robusta/conilon (*Coffea canephora L.*), além de suas misturas. O café arábica tem maior valor comercial e suas características sensoriais gerais são mais apreciadas quando comparadas ao robusta. O objetivo deste trabalho é diferenciar as espécies de café após a torrefação por espectroscopia óptica. Assim, misturas com diferentes proporções de cafés arábica/robusta torrado e moído, em três graus de torrefação (claro, médio e escuro) foram estudados utilizando as técnicas de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), fluorescência e fluorescência resolvida no tempo (TCSPC). Notória a similaridade existente na composição química das amostras, dois métodos multivariados foram aplicados para avaliação dos espectros de infravermelho: análise de componentes principais (PCA) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). A partir dos espectros avaliados com o PCA, foi possível diferenciar as espécies de café e identificar compostos que são bons discriminantes entre elas, como a cafeína e os lipídeos, presentes em quantidades maiores no café robusta e arábica, respectivamente. Além disso, ao associar os espectros do FTIR ao PLS, foi desenvolvido um modelo capaz de prever quantitativamente a proporção de cada espécie nas amostras estudadas, com coeficiente de determinação superior a 0,99. As análises de fluorescência e fluorescência resolvida no tempo foram realizadas utilizando-se comprimentos de onda de excitação/emissão em 280/480 nm, 310/470 nm e 400/605 nm. Os espectros de emissão obtidos pela técnica discriminam as espécies e indicam a presença de fluoróforos em apenas um dos cafés analisados. Já pela contagem de fóton único correlacionado no tempo (TCSPC), obteve-se intensidade média do tempo de vida de emissão, no qual o conjunto 310/470 nm apresentou diferença entre as espécies superior a 20%. Os resultados obtidos neste trabalho, evidenciam o fato de que as técnicas empregadas são promissoras, uma vez que são capazes de distinguir com rapidez as espécies ou até mesmo quantificar a porcentagem das misturas.

Palavras-chave: Café, Arábica, Robusta, FTIR, TCSPC.

ABSTRACT

Coffee is one of the most important food products in the world economy. Brazil is the largest producer and exporter of the grain and the second largest consumer of coffee in the world. Most commercially available coffee is arabica coffee (*Coffea arabica L.*) and robusta/conilon coffee (*Coffea canephora L.*) type species as well their blends. The arabica coffee has higher commercial value and its general sensorial characteristics are more favorable when compared to robusta coffee one. This work aimed to differentiate coffee species after roasting by optical spectroscopy. Thus, blends with different ratios of roasted and ground arabica/robusta coffees in three grades of roasting (light, medium and dark) were studied using the Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), fluorescence and time resolved fluorescence (TCSPC) spectroscopy techniques. Notably similar in their chemical composition, two multivariate methods were used to analyze the sample spectra: principal component analysis (PCA) and partial least squares regression (PLS). From the spectra analyzed with PCA, it was possible to differentiate the coffee species and to identify compounds that are good discriminants among them, such as caffeine and lipids, present in larger quantities in the robusta and arabica coffee, respectively. In addition, by associating the FTIR spectra to the PLS, a model capable of quantitatively predict the proportion of each specie in the studied samples was developed, with a determination coefficient higher than 0.99. Time resolved fluorescence and fluorescence analyzes were performed using excitation/emission wavelengths at 280/480 nm, 310/470 nm and 400/605 nm. The emission spectra obtained by the technique discriminate the species and indicate the presence of fluorophores in only one of the coffees analyzed. As for the time-correlated single photon count (TCSPC), the mean intensity of the emission lifetime was calculated, in which the set 310/470 nm showed a difference between species of more than 20%. The results obtained in this work demonstrate the fact that the techniques employed are promising since they are able to quickly distinguish the species or even quantify the percentage of the blends.

Keywords: Coffee, arabica, robusta, FTIR, TCSPC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Escala das Fases Fenológicas Reprodutivas do Cafeeiro. Adaptado de: [23].	5
Figura 2 – Espaço de cor CIELAB [33].	11
Figura 3 – Diagrama de cromaticidade, plano a*, b* do espaço de cor apresentado na Figura 2. Fonte: [34]	11
Figura 4 – Interação da radiação eletromagnética com a matéria [37].	12
Figura 5 – Representação das regiões do espectro eletromagnético [39].	13
Figura 6 – Representação dos diferentes tipos de vibrações moleculares. (a) Estiramento, (b) Dobramento, (c) Vibração de estiramento simétrico, (d) Vibração de estiramento assimétrico, (e) Vibração de deformação tipo tesoura (<i>scissoring</i>), (f) Vibração de deformação tipo oscilação, rotação (<i>rocking</i>), (g) Vibração de deformação tipo balanço (<i>wagging</i>), (h) Vibração de deformação tipo torção (<i>twisting</i>) [39].	15
Figura 7 – Regiões aproximadas em que vários tipos comuns de ligação absorvem (apenas vibrações de estiramento) [39].	16
Figura 8 – Ajuste por mínimos quadrados.	19
Figura 9 – Dados para análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear nos parâmetros. n_i = número de repetições no nível i; m = número de níveis distintos da variável independente; n = $\sum n_i$ = número total de observações; p = número de parâmetros do modelo [45].	22
Figura 10 – Diagrama de <i>Jablonski</i> com estados eletrônicos singletos, fundamental, S_0 , primeiro, S_1 , e segundo, S_2 [47].	24
Figura 11 – Amostra de café em grãos verdes: arábica (esquerda) e robusta (direita).	25
Figura 12 – Torrador de amostras - <i>Paline Alves</i>	26
Figura 13 – Referência Agtron para classificação dos padrões de torra de café [49].	26
Figura 14 – Pastilha produzida com café torrado e moído.	27
Figura 15 – Cabeçote de medição de cor, modelo CR-400 - <i>Konica Minolta</i> [50].	28
Figura 16 – Placa de Petri com amostra de café utilizada para medição de cor.	29
Figura 17 – Espectrômetro FTIR modelo Vertex 70 - <i>Bruker</i>	30
Figura 18 – Diagrama representando os principais componentes de um espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier [39].	31
Figura 19 – Pontos utilizados para a calibração e validação da curva na regressão PLS.	32
Figura 20 – Espectrômetro de Fluorescência - <i>Edinburgh Instruments</i>	33
Figura 21 – Representação de um espectrofluorímetro.	34
Figura 22 – Representação do princípio de funcionamento da contagem de fóton único correlacionado no tempo (TCSPC). Adaptado de: [47].	35
Figura 23 – Arranjo experimental para medidas do tempo de vida. Adaptado: [47].	36

Figura 24 – Diferença de cor entre as amostras. 1-2: 100% e 90% arábica; 2-3: 90% e 80% arábica; 3-4: 80% e 70% arábica; 4-5: 70% e 60% arábica; 5-6: 60% e 50% arábica; 6-7: 50% e 40% arábica; 7-8: 40% e 30% arábica; 8-9: 30% e 20% arábica; 9-10: 20% arábica e 10% arábica; 10-11: 10% arábica e 100% robusta; 11-1: 100% robusta e 100% arábica.	39
Figura 25 – Espectros obtidos no FTIR das amostras submetidas a torra clara (A). Foram exibidos apenas as amostras 1A: 100% arábica, 3A: 80% arábica; 5A: 60% arábica; 7A: 40% arábica; 9A: 20 % arábica; 11A: 100% robusta.	42
Figura 26 – Espectros obtidos no FTIR das amostras submetidas a torra média (B).Foram exibidos apenas as amostras 1B: 100% arábica, 3B: 80% arábica; 5B: 60% arábica; 7B: 40% arábica; 9B: 20 % arábica; 11B: 100% robusta.	43
Figura 27 – Espectros obtidos no FTIR das amostras submetidas a torra escura (C). Foram exibidos apenas as amostras 1C: 100% arábica, 3C: 80% arábica; 5C: 60% arábica; 7C: 40% arábica; 9C: 20 % arábica; 11C: 100% robusta.	44
Figura 28 – Análise dos componentes principais dos espectros das onze amostras em torra clara (A): Correlação entre as amostras (<i>scores</i>). 1A: 100% arábica; 2A: 90% arábica; 3A: 80% arábica; 4A: 70% arábica; 5A: 60% arábica; 6A: 50% arábica; 7A: 40% arábica; 8A: 30% arábica;9A: 20% arábica; 10A: 10% arábica; 11A: 100% robusta.	46
Figura 29 – Análise dos componentes principais dos espectros das onze amostras em torra clara (A): Influência dos números de onda (<i>loadings</i>).	47
Figura 30 – Análise dos componentes principais dos espectros das onze amostras em torra média (B): Correlação entre as amostras (<i>scores</i>). 1B: 100% arábica; 2B: 90% arábica; 3B: 80% arábica; 4B: 70% arábica; 5B: 60% arábica; 6B: 50% arábica; 7B: 40% arábica; 8B: 30% arábica;9B: 20% arábica; 10B: 10% arábica; 11B: 100% robusta.	48
Figura 31 – Análise dos componentes principais dos espectros das onze amostras em torra média (B): Influência dos números de onda (<i>loadings</i>).	49
Figura 32 – Análise dos componentes principais dos espectros das onze amostras em torra escura (C): Correlação entre as amostras (<i>scores</i>). 1C: 100% arábica; 2C: 90% arábica; 3C: 80% arábica; 4C: 70% arábica; 5C: 60% arábica; 6C: 50% arábica; 7C: 40% arábica; 8C: 30% arábica;9C: 20% arábica; 10C: 10% arábica; 11C: 100% robusta.	50
Figura 33 – Análise dos componentes principais dos espectros das onze amostras em torra escura (C): Influência dos números de onda (<i>loadings</i>).	51
Figura 34 – Regressão linear dos valores observados e preditos pelo modelo para a adulteração de café robusta para o conjunto de calibração.	52
Figura 35 – Gráfico de resíduos do conjunto de calibração.	53

Figura 36 – Regressão linear dos valores observados e preditos pelo modelo para a adulteração de café robusta para o conjunto de validação.	53
Figura 37 – Gráfico de resíduos do conjunto de validação.	54
Figura 38 – Mapa de Emissão das amostras de café arábica puro (1A) excitadas em diferentes comprimentos de onda.	55
Figura 39 – Mapa de Emissão do conjunto de amostras em torra clara (Tabela2) excitadas em 280 nm.	56
Figura 40 – Mapa de Emissão do conjunto de amostras em torra clara (Tabela2) excitadas em 310 nm.	56
Figura 41 – Mapa de Emissão do conjunto de amostras em torra clara (Tabela2) excitadas em 400 nm.	57
Figura 42 – Curvas de decaimento de fluorescência resolvida no tempo das amostras de café com diferentes proporções de café arábica e robusta (1A: 100% arábica; 2A: 90% arábica; 3A: 80% arábica; 4A: 70% arábica; 5A: 60% arábica; 6A: 50% arábica; 7A: 40% arábica; 8A: 30% arábica; 9A: 20% arábica; 10A: 10% arábica; 11A: 100% robusta.), com excitação em 280 nm e emissão em 480 nm.	59
Figura 43 – Curvas de decaimento de fluorescência resolvida no tempo das amostras de café com diferentes proporções de café arábica e robusta (1A: 100% arábica; 2A: 90% arábica; 3A: 80% arábica; 4A: 70% arábica; 5A: 60% arábica; 6A: 50% arábica; 7A: 40% arábica; 8A: 30% arábica; 9A: 20% arábica; 10A: 10% arábica; 11A: 100% robusta.), com excitação em 310 nm e emissão em 470 nm.	59
Figura 44 – Curvas de decaimento de fluorescência resolvida no tempo das amostras de café com diferentes proporções de café arábica e robusta (1A: 100% arábica; 2A: 90% arábica; 3A: 80% arábica; 4A: 70% arábica; 5A: 60% arábica; 6A: 50% arábica; 7A: 40% arábica; 8A: 30% arábica; 9A: 20% arábica; 10A: 10% arábica; 11A: 100% robusta.), com excitação em 400 nm e emissão em 605 nm.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição (% em base seca) de grãos de café arábica e robusta, crus e torrados [5].	7
Tabela 2 – Conjunto de amostras utilizado nas análises.	28
Tabela 3 – Parâmetros médios de cor para pó de café com amostras em torra clara (A).	37
Tabela 4 – Parâmetros médios de cor para pó de café com amostras em torra média (B).	38
Tabela 5 – Parâmetros médios de cor para pó de café com amostras em torra escura (C).	38
Tabela 6 – Modos vibracionais e compostos encontrados em cada região de absorção [14].	40
Tabela 7 – Porcentagem de variância para cada fator do modelo PLS.	52
Tabela 8 – Modelo PLS relativo à quantificação de café robusta adicionado nas amostras.	54
Tabela 9 – Coeficientes obtidos através da equação de ajuste referente à 280/480 nm (excitação/emissão) para o conjunto de amostras em torra clara (A).	62
Tabela 10 – Coeficientes obtidos através da equação de ajuste referente à 310/470 nm (excitação/emissão) para o conjunto de amostras em torra clara (A).	62
Tabela 11 – Coeficientes obtidos através da equação de ajuste referente à 400/605 nm (excitação/emissão) para o conjunto de amostras em torra clara (A).	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>).
TCSPC	Contagem de Fóton Único Correlacionado no Tempo (<i>Time-Correlated Single Photon Counting</i>).
DRIFTS	Espectroscopia de Reflexão Difusa no infravermelho por Transformada de Fourier (<i>Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy</i>).
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta-visível (<i>Ultraviolet-Visible Spectroscopy</i>).
NMR	Espectroscopia por ressonância magnética nuclear (<i>Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy</i>).
PCA	Análise de Componentes Principais (<i>Principal Component Analysis</i>).
PLS	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (<i>Partial Least Squares</i>).
CEPEA	Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada.
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora.
SCAA	Specialty Coffee Association of America.
ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café.
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
d.C.	Depois de Cristo.
COB	Classificação Oficial Brasileira.
PQC	Programa de Qualidade do Café.
CIE	Commission Internationale de l'Eclairage.
GE2M	Grupo de Espectroscopia e Engenharia de Materiais.
LEM	Laboratório de Espectroscopia de Materiais.
MIR	Infravermelho Médio (<i>Medium Infrared</i>).
NIR	Infravermelho Próximo (<i>Near Infrared</i>).
IFES	Instituto Federal do Espírito Santo.
CFD	Discriminador de Fração Constante (<i>Constant Fraction Discriminator</i>).

TAC	Conversor de Tempo-Amplitude (<i>Time-Amplitude Converter</i>).
PGA	Amplificador de Ganho Programável (<i>Programmable-Gain Amplifier</i>).
ADC	Conversor analógico-digital (<i>Analog-Digital Converter</i>).
WD	Janela Discriminadora (<i>Window Discriminator</i>).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	2
1.2	ESTRUTURA DO TRABALHO	2
2	CAFÉ	4
2.1	HISTÓRIA	4
2.2	PROCESSO DE PRODUÇÃO E CLASSIFICAÇÃO	5
2.3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ	7
2.4	ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ (ABIC)	7
2.5	TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS APLICADAS AO CAFÉ	8
3	CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS	10
3.1	COLORIMETRIA	10
3.2	ABSORÇÃO	12
3.2.1	Lei de Lambert-Beer	12
3.2.2	Espectroscopia Molecular	13
3.3	QUIMIOMETRIA	16
3.3.1	Análise de Componentes Principais (PCA)	16
3.3.2	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)	18
3.4	ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS	25
4.1.1	Conjunto de Amostras	27
4.2	ANÁLISE COLORIMÉTRICA	28
4.3	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	29
4.4	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	31
4.5	REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS)	32
4.6	ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	33
4.6.1	Espectroscopia de Fluorescência Resolvida no Tempo	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
5.1	ANÁLISE COLORIMÉTRICA	37
5.2	ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO MÉDIO	39
5.3	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	45
5.4	REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS)	51

5.5	ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	54
5.6	ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO	59
6	CONCLUSÕES	64
6.1	TRABALHOS FUTUROS	65
	 REFERÊNCIAS	 66

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador de café e o segundo maior consumidor mundial do produto [1]. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) [2] entre os anos de 2016 e 2017 foram produzidas 45 milhões de sacas de 60 kg, dos quais 33,7 milhões foram exportados e o consumo nacional foi aproximadamente 20 milhões de sacas no mesmo período. A maior porcentagem das exportações são de grãos verdes [2]. A baixa participação brasileira no mercado internacional de café torrado e moído se deve, principalmente, à falta de padrão de qualidade do produto, que está diretamente associada a dificuldade de identificar impurezas e, principalmente, misturas entre as espécies após a torrefação, impossibilitando a autenticação do produto [3].

Os cafés disponíveis comercialmente são as espécies do tipo arábica (*Coffea arabica L.*) e robusta/conilon (*Coffea canephora L.*), além de suas misturas. O café arábica é cultivado predominantemente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Bahia, Rio de Janeiro e em parte do Espírito Santo [1]. Sua bebida possui aroma e doçura intensos com muitas variações de acidez e sabor, além de atributos sensoriais superiores se comparado ao robusta [4].

Já o café robusta prevalece nas lavouras do Espírito Santo, em Rondônia, em parte da Bahia e de Minas Gerais [1]. Seus grãos apresentam menos acidez, sabor amargo e o teor de cafeína é maior, quando comparados aos grãos de café arábica [4, 5]. Tais características influenciam diretamente no valor de cada café. De acordo com o último relatório da Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA) [6], as sacas de 60 kg do café verde custam cerca de R\$ 445,71 para o café arábica e R\$ 316,38 para o café robusta.

Essas espécies são usualmente misturadas para comercialização, conhecidos como *blends*, e não há problemas em realizar essas misturas. Eles são realizados a fim de obter características adequadas aos consumidores do produto, como, coloração, sabor, preço, dentre outras características. O problema é realizar misturas e não informar ao consumidor, rotulando os cafés como 100% arábica e cobrando o valor referente a um café puro, quando na realidade há mistura das espécies.

Metologias analíticas são capazes de identificar compostos químicos e consequentemente diferenciar as espécies de café [7–11], porém esses métodos costumam ser na maioria das vezes de difícil elaboração, alto custo de preparo e processo lento de análise. Técnicas espectroscópicas associadas a quimiometria podem ser empregadas como alternativa rápida e simples na identificação de adulterantes como, cascas de café, milho e cevada [12, 13], discriminação de grãos defeituosos [14, 15] e de espécies [16–18].

1.1 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Esse trabalho tem como objetivo classificar e discriminar as espécies de café do tipo arábica e robusta a partir das técnicas espectroscópicas – absorção no infravermelho médio, fotoluminescência e fotoluminescência resolvida no tempo no Grupo de Espectroscopia e Engenharia de Materiais (GE2M) , dentro do qual está o LEM (Laboratório de Espectroscopia de Materiais).

As classificações são feitas inicialmente para as espécies 100% arábica e 100% robusta, submetendo-as a técnicas espectroscópicas citadas anteriormente, com intuito de identificar o perfil de cada espécie e discriminá-las após a torrefação.

Também foram analisados misturas de café arábica e robusta em diferentes proporções a fim de quantificar a presença de cada espécie nas amostras. Assim, o método poderá ser empregado para fiscalizar possíveis fraudes em cafés distribuídos comercialmente e que rotulam-se como grãos 100% arábica. Com este intuito, os grãos avaliados em três níveis de torra que geralmente são encontradas no mercado, pois eles mudam consideravelmente sua composição durante este processo.

É importante destacar que estes cafés puros ou cafés especiais, possuem alto valor agregado comparado aos demais. Assim, indústrias que visam apenas lucros poderiam adicionar café robusta, sem informar ao consumidor em suas embalagens, pois a legislação atual possui restrições apenas ao que se refere a impurezas como galhos, milho, insetos, dentre outros.

A principal motivação para este trabalho está relacionado com a carência de métodos rápidos e precisos, empregados em análises rotineiras no setor cafeeiro, desde o grão verde até o produto final entregue aos consumidores, que certifiquem a espécie do grão.

Portanto, a espectroscopia surge como resposta para este problema, pois empregada ao setor seria capaz de identificar com objetividade e rapidez as espécies, defeitos e adulterações.

1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO

Esta dissertação está estruturada em cinco capítulos que pospõe-se à presente introdução.

O capítulo 2 apresenta de maneira breve a história da produção de café, com destaque para a produção no Brasil. Mostra-se quais regiões são possíveis encontrar cada espécie, seu valor comercial, as classificações e as técnicas espectroscópicas aplicadas para o estudo do café.

O capítulo 3 expõe os conceitos fundamentais das técnicas utilizadas para o processo

de medida das amostras. Na sequência têm-se o capítulo 4 apresentando o material utilizado e como é o procedimento de cada técnica.

No capítulo 5 são analisadas as medidas referentes a cada procedimento aplicado nas amostras de café. Por fim, no capítulo 6 são apresentadas as conclusões e trabalhos futuros.

2 CAFÉ

2.1 HISTÓRIA

Evidências concretas sobre a origem do café são desconhecidas. Algumas lendas contam que o pastor Kaldi, que viveu na Absínia, hoje Etiópia, ao observar suas cabras, percebeu que o rebanho ficava alegre, saltitante e conseguia andar por vários quilômetros quando consumiam um fruto de coloração amarelo-avermelhada, existentes em alguns arbustos dos campos de pastoreio. Intrigado com o assunto, Kaldi comentou o fato com um monge que decidiu testar a eficácia dos frutos. No monastério, ele começou a utilizar os frutos *in natura* na forma de infusão e constatou que eles eram capazes de ajudá-los a resistirem ao sono durante suas orações. O fato se espalhou pelos monastérios, que culminou na necessidade da produção do fruto [19].

De acordo com manuscritos mais antigos, que datam de 575 d.C., o café foi cultivado pela primeira vez nos monastérios islâmicos no Iêmen e somente no século XIV, os primeiros grãos de café foram torrados para o consumo. A planta de café é originária da África, onde ainda hoje faz parte da vegetação natural [19]. O nome café vem da palavra árabe *Kahwah*, cujo significado quer dizer força [20].

Posteriormente a bebida se espalhou pelo continente Europeu trazido por viajantes, mas até o século XVII apenas os árabes detinham controle sobre o cultivo e preparação da planta. Assim alemães, franceses e italianos buscavam maneiras de cultivar a planta em suas colônias. No entanto, os holandeses conseguiram as primeiras mudas e as cultivaram nas estufas do jardim botânico de Amsterdã, passando a ter em mãos o segredo dos árabes, que foi repassado a outros países e levou a expansão do cultivo de café tão repentinamente quanto o crescimento do mercado consumidor [20].

No Brasil, as primeiras sementes e mudas chegaram pelas mãos de Francisco Meio Palheta, em 1727, na região do Pará. A planta encontrou condições adequadas para seu cultivo e por isso se espalhou rapidamente, tornando-se o produto base da economia brasileira. Desta forma, por muitas décadas o café foi a grande riqueza brasileira, responsável por acelerar o desenvolvimento do Brasil e o inserir nas relações internacionais de comércio. O cultivo do café dominou o país e estimulou o surgimento de cidades e centros urbanos em todo o interior do estado de São Paulo, sul de Minas Gerais e norte do Paraná, além de impulsionar a construção de ferrovias para otimizar o escoamento da produção [21]. Assim, a união de sucesso entre o café e o povo brasileiro tornou-se irrevogável.

2.2 PROCESSO DE PRODUÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

A planta café é um gênero da família *Rubiaceae* com inúmeras espécies. A maior parte do café disponível comercialmente são as espécies do tipo *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* L. (café robusta *var.* conilon), além de suas misturas, denominadas *blends* [4, 22].

O café arábica é cultivado em regiões montanhosas e temperaturas amenas e representam cerca de 70% do café produzido no mundo. A espécie é mais sensível à doenças, pestes e geadas e produz grãos maiores que os de robusta. Já o café robusta é mais resistente, produzido em maiores temperaturas e sua produção mundial é inferior a 30%, pois sua bebida não é tão apreciada, o que influencia diretamente no preço dos grãos, tornando-os mais baratos [3].

O processo de produção dessas espécies inicia-se com o plantio da semente, que necessita de uma série de cuidados, até a planta começar a produzir, o que acontece efetivamente em cerca de cinco anos. Antes de produzir os grãos, a planta passa por um período de florada. Estas flores dão origem ao "chumbinho", pequeno grão de café, que irá desenvolver-se ao longo de 6 a 8 meses, formando o grão de café. Na Figura 1 estão dispostas as etapas do grão de café.



Figura 1: Escala das Fases Fenológicas Reprodutivas do Cafeeiro. Adaptado de: [23].

O grão é colhido, preferencialmente, na fase cereja (etapa 9 da Figura 1), e sua secagem pode ser via seca (sem eliminação da casca resultando no café natural) ou via úmida (com eliminação da casca e da mucilagem resultando no café despulpado). Após a secagem, os grãos de café ainda com cascas podem ser estocados em tulhas e pouco antes da comercialização os grãos são submetidos ao beneficiamento com máquinas, que fazem a separação entre a casca e o grão e são embalados em sacos de aniagem.

Segundo a Instrução Normativa nº 8 desenvolvida pelo MAPA [4] existe uma classificação oficial para comercialização dos grãos que determina critérios específicos, como a espécie, o formato do grão, a coloração, a umidade (tolerância de até 12,5%), impurezas, o aroma e o sabor. O aroma e o sabor são definidos pela "prova de xícara", onde são provadas de 3 a 10 xícaras da mesma amostra de café preparadas de maneira

padronizada. Esta avaliação é uma classificação sensorial dos grãos, que classificam os cafés em duas categorias: Grupo I (café proveniente da espécie *Coffea arabica*) e Grupo II (café proveniente da espécie *Coffea canephora*) e em subgrupos, listado à seguir, que interferem diretamente no valor das sacas de café [4].

Bebidas Finas do Grupo I - Café Arábica

- Estritamente mole: Café que apresenta, em conjunto, todos os requisitos de aroma e sabor “mole”, porém mais acentuado;
- Mole: Café que apresenta aroma e sabor agradável, brando e adocicado;
- Apenas mole: Café que apresenta sabor levemente doce e suave, mas sem adstringência ou aspereza de paladar;
- Duro: Café que apresenta sabor acre, adstringente e áspero, porém não apresenta paladares estranhos.

Bebidas Fenicadas do Grupo I - Café Arábica

- Riado: Café que apresenta leve sabor, típico de iodofórmio;
- Rio: Café que apresenta sabor típico e acentuado de iodofórmio;
- Rio Zona: Café que apresenta aroma e sabor muito acentuado, assemelhado ao iodofórmio ou ao ácido fênico, sendo repugnante, ao paladar.

Grupo II - Café Robusta

- Excelente: Café que apresenta sabor neutro e acidez mediana;
- Boa: Café que apresenta sabor neutro e ligeira acidez;
- Regular: Café que apresenta sabor típico de robusta sem acidez;
- Anormal: Café que apresenta sabor não característico ao produto.

2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ

A espécie e a variedade do café influenciam fortemente na composição química dos grãos, mas outros fatores como, condições de cultivo, grau de maturação, métodos de colheita, condições de armazenamento, processamento do grão (secagem e beneficiamento) e níveis de torra, também devem ser considerados [5].

Dentre estes fatores, o processo de torrefação promove mudanças consideráveis nos grãos e é essencial para a produção de compostos que conferem as características da bebida. Durante a torra, diferentes compostos são degradados ou modificados, formando novos compostos, como os aromáticos, responsáveis pelas características de sabor e aroma do produto final [3].

Na Tabela 1, são apresentados os teores de alguns componentes químicos presentes no grão cru e torrado de café arábica e robusta.

Tabela 1: Composição (% em base seca) de grãos de café arábica e robusta, crus e torrados [5].

Componente	Arábica		Robusta	
	Cru	Torrado	Cru	Torrado
Minerais	3,0-4,2	3,5- 4,5	4,0- 4,5	4,6- 5,0
Cafeína	0,9-1,2	1,0	1,6- 2,4	2,0
Trigonelina	1,0-1,2	0,5- 1,0	0,6- 0,75	0,3- 0,6
Lipídeos	12,0- 18,0	14,5- 20,0	9,0- 13,0	11,0- 16,0
Ácido Clorogênico Total	5,5-8,0	1,2- 2,3	7,0- 10,0	3,9- 4,6
Ácidos Alifáticos	1,5-2,0	1,0- 1,5	1,5- 2,0	1,0- 1,5
Oligossacarídeos	6,0-8,0	0- 3,5	5,0- 7,0	0- 3,5
Polissacarídeos Totais	50,0-55,0	24,0- 39,0	37,0- 47,0	-
Aminoácidos	2,0	0,0	2,0	0,0
Proteínas	11,0-13,0	13,0- 15,0	11,0-13,0	13,0- 15

O mercado interno brasileiro possui inúmeros cafés de qualidade. A torra é uma das etapas importantes para alcançar essa qualidade e é realizada de acordo com a aceitação da bebida pelo consumidor. No entanto, o nível de torra elevada pode estar associada a necessidade de mascarar à presença de defeitos ou alterações comuns em alguns cafés comerciais [24].

2.4 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ (ABIC)

A Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC) foi fundada em março de 1973 e representa as indústrias de torrefação e moagem de café de todo o país. O surgimento desta associação fez-se necessário quando o setor vivenciou uma queda no número de sacas industrializadas entre os anos de 1965 à 1985 , cerca de 1,65 milhões de saca/ano foram processadas a menos [25]. Dentre os motivos que geraram esta queda, tem-se a proliferação de empresas que adulteravam seus produtos.

Empenhada em melhorar a qualidade do café consumido no Brasil, a ABIC lançou em 1989, o Programa de Autofiscalização da Indústria de Café, mais conhecido como Selo de Pureza ABIC. Esta decisão reverteu o quadro de queda do consumo, a tal ponto que o mercado interno brasileiro é o que mais cresce em todo o mundo atualmente [25].

A ABIC possui uma série de recomendações técnicas para melhoria da qualidade dos grãos comercializados, como os grãos de café tipo 8 na Classificação Oficial Brasileira (COB). Esta classificação compreende sete tipos de café arábica (seção 2.2), que variam de 2 à 8, e dizem respeito a quantidade de defeitos (grão de café preto, ardido, pedra ou pau) encontradas em uma amostra de 300 g de grão de café verde. As recomendações técnicas deliberam ainda que os grãos podem ser 100% arábica ou *blendados* (combinados) com robusta/conilon, ou 100% robusta/conilon, torrados em grão ou torrados e moídos, que obtenham a nota de qualidade global igual ou maior 4,5 pontos numa escala sensorial (de 0 à 10) conforme metodologia do Programa de Qualidade do Café (PQC) [26].

A legislação vigente [4] permite, no máximo, 1% de impurezas e matérias estranhas (cascas e paus), em g/100g. Adicionalmente, pode-se exigir como forma de comprovar a pureza, o Selo de Pureza ABIC [26]. Os testes são realizados em laboratórios credenciados e a metodologia oficial empregada é a microscopia.

2.5 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS APLICADAS AO CAFÉ

Análises sensoriais são utilizada para classificar as bebidas. No entanto, esta técnica é subjetiva, demorada e necessita de pessoas treinadas.

Em contrapartida, métodos analíticas para avaliar a composição química dos grãos e identificar diferenças têm sido desenvolvidos e vêm alcançando ótimos resultados [7–11]. No entanto, ambos não são adequados para análises rotineiras em larga escala, pois são técnicas trabalhosas, que demandam tempo e dinheiro para sua execução. Em vista disso, tem-se buscado novas técnicas analíticas, que forneçam dados rápidos e confiáveis sobre a qualidade do café [15].

Nos últimos anos a espectroscopia ganhou destaque como ferramenta analítica para avaliação objetiva de café por sua rapidez, simplicidade e segurança. Especialmente, os métodos de espectroscopia na região do visível, infravermelho médio e próximo, que são técnicas de baixo custo, não destrutivas, sem o uso de produtos químicos, ou processamento de amostras e adequadas a análises de rotinas [3, 15].

Existem inúmeros estudos relacionando café e espectroscopia, eles buscam identificar adulterantes presentes no café torrado e moído como, casca de café, milho, cevada, etc. (FTIR, DRIFTS) [12, 13, 15, 27], apontar compostos presentes nos cafés, principalmente os que são bons discriminantes (FTIR) [3, 28], diferenciar grãos defeituosos e sadios (FTIR e NIR) [3, 14, 15], discriminar o café arábica do café robusta (FTIR, NIR, NMR) [15–17, 29, 30]

e quantificar a presença de arábica e de robusta em misturas (UV-Vis, Fluorescência, Raman, FTIR) [15, 18, 31]. É importante observar que a maior parte desses trabalhos estão associados a análises estatística devido a complexibilidade dos espectros [3].

O presente trabalho faz uso da Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para diferenciar as espécies de café, quantificar a presença de cada espécie em misturas e analisar a influência de diferentes torras na composição química dos grãos. Além disso, o trabalho propõe o estudo da fluorescência, a fim de averiguar a emissão dos grãos e o tempo de vida característico de cada espécie de café. É importante destacar que poucos trabalhos foram encontrados na literatura sobre fluorescência do café [18, 32] e nenhum dado sobre o tempo de vida do café foi encontrado na literatura.

3 CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

3.1 COLORIMETRIA

A cor não é uma característica absoluta de um objeto, mas sim, uma percepção humana. Os seres humanos distinguem cores por meio de células sensíveis à luz presentes na retina. Essas células são nomeadas bastonetes, responsáveis pela percepção de intensidade luminosa e cones, responsáveis por proporcionar melhor distinção entre as cores. Há três tipos de cones (L, M e S), os quais são diferenciados pelo comprimento de onda que são capazes de estimulá-los. Os cones dos tipos L, M e S são sensíveis a comprimentos de onda longos (espectro de cores avermelhadas), médios (espectro de cores esverdeadas) e curtos (espectro de cores azuladas), respectivamente. As cores que percebemos estão relacionadas ao número de cones estimulados de cada tipo [33].

Para expressar as cores numericamente, um sistema análogo ao olho humano foi desenvolvido, denominado espaços de cor. Dentre os vários espaços de cor existentes na literatura [33], a *Commission Internationale de l'Éclairage* (CIE), órgão internacional de padronização de cor e luz definiu três espaços de cor, CIE XYZ, CIE L*a*b* e CIE L*C*h para a comunicação e expressão das cores. O primeiro deles, CIE XYZ, foi desenvolvido baseando-se em um experimento para analisar como os seres humanos percebem a cor. Neste experimento o observador deveria formar uma dada cor por meio da projeção de três fontes de luz de cores diferentes (vermelho, verde e azul) em uma tela. No entanto, o método desenvolvido se mostrou ineficiente para reproduzir qualquer cor, já que utilizava apenas combinações positivas das cores primárias (X, Y, Z).

Posteriormente, foi desenvolvido o espaço de cor L*a*b*, também conhecido como espaço de cor CIELAB. Esse sistema tem sido mais utilizado para avaliar as cores, por associar coerentemente os valores de cor com a percepção visual e foi criado após a teoria de cores opostas, na qual duas cores não podem ser verdes e vermelhas ao mesmo tempo, ou amarelas e azuis ao mesmo tempo [33]. Como ilustrado na Figura 2, o L* indica a luminosidade, que pode variar de 0 à 100, representando o preto absoluto e o branco total, respectivamente. Já o a* e b*, são as coordenadas cromáticas, no qual a* indica a coordenada vermelho (+a) e verde (-a), e b* indica a coordenada amarelo (+b) e azul (-b) [34].

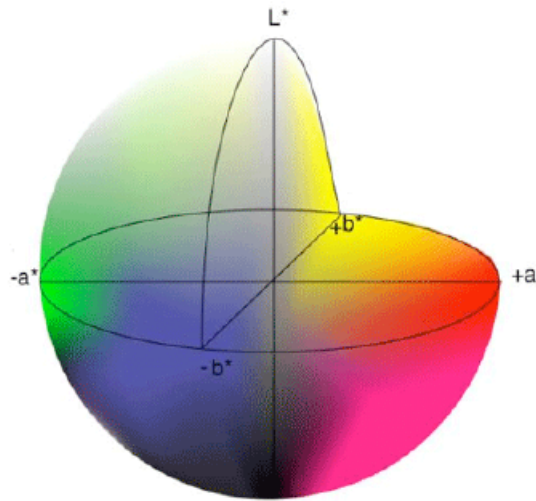


Figura 2: Espaço de cor CIELAB [33].

Já o espaço de cor L^*C^*h , semelhante ao CIELab, é preferido por alguns profissionais, pois seu sistema se correlaciona melhor com a forma como o olho humano percebe a cor. O sistema L^*C^*h utiliza o mesmo diagrama que o espaço de cor $L^*a^*b^*$, como visto na Figura 2. A luminosidade L^* é a mesma que no espaço de cor $L^*a^*b^*$, o cromatismo/saturação, denominado C^* e o ângulo de tonalidade h são definidos pelas seguintes expressões:

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \tag{3.1}$$

$$h = \tan^{-1} \frac{a^*}{b^*} \tag{3.2}$$

onde, a^* e b^* são as coordenadas de cromaticidade no espaço de cor $L^*a^*b^*$. O valor de cromatismo C^* é zero no centro e aumenta conforme se distancia deste. O ângulo de tonalidade (h) começa no eixo $+a^*$, e sua variação ocorre em sentido anti-horário, como ilustrado na Figura 3, indicando a variação da tonalidade.

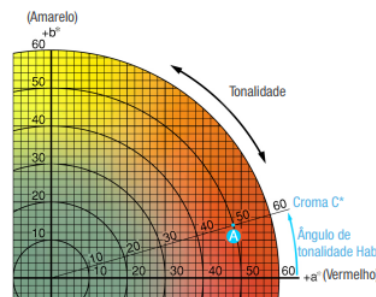


Figura 3: Diagrama de cromaticidade, plano a^*, b^* do espaço de cor apresentado na Figura 2. Fonte: [34]

A diferença de cor é calculada pela distância Euclidiana (distância geométrica)

entre dois pontos no espaço de cor CIE L^*a^*b , conforme Equação 3.3 [35]:

$$\Delta E_{12} = \sqrt{(L_1^* - L_2^*)^2 + (a_1^* - a_2^*)^2 + (b_1^* - b_2^*)^2} \quad (3.3)$$

em que ΔE_{12} é a diferença de cor entre duas amostras quaisquer.

3.2 ABSORÇÃO

3.2.1 Lei de Lambert-Beer

A propagação de luz em um material pode ser descrita pela lei de Lambert-Beer, que descreve a interação da radiação eletromagnética com a matéria [36].

Quando a luz interage com a matéria, parte da intensidade de luz incidente (I_0) no material é absorvida pela amostra (I_A), parte é refletida (I_R), parte é espalhada (I_E) e o restante é transmitida (I), como ilustrado na Figura 4.

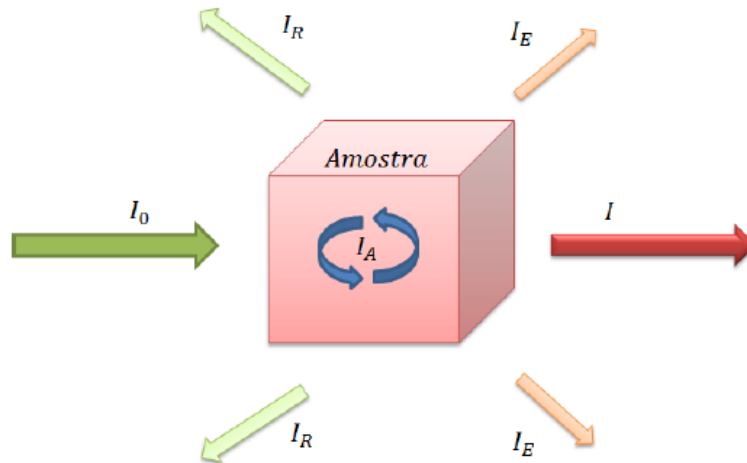


Figura 4: Interação da radiação eletromagnética com a matéria [37].

A transmitância (T), é dada pela razão entre a intensidade de luz que atravessa o material e a intensidade de luz que incide sobre o material [38].

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (3.4)$$

A porcentagem da transmitância [38] é dada pela relação:

$$\%T = 100\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (3.5)$$

Quando a porcentagem de radiação transmitida for igual à radiação incidente, nenhuma porcentagem de luz foi absorvida, transmitida ou espalhada. Portanto, quando $T < 1$, alguma parte da radiação foi absorvida pelo material. A intensidade de absorção do material, denominada Absorbância (A), depende do número de moléculas que possuem

iguais capacidades de absorção e estão situados no caminho óptico do feixe de radiação eletromagnética [38]. Essa relação é conhecida como Lei de Lambert-Beer:

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon lc \quad (3.6)$$

onde $\varepsilon(\lambda)$ é o coeficiente de absorção molar [$\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$], que depende do comprimento de onda dado por λ , l é o caminho óptico [cm] e c é a concentração molar da amostra [mol L^{-1}]. A relação entre a absorbância (A) e a concentração da amostra é linear.

O coeficiente de absorção, $\alpha = \varepsilon c$ [cm^{-1}], Assim, a equação 3.6 pode ser expressa pela relação:

$$I = I_0 e^{-\alpha l} \quad (3.7)$$

Vale destacar que a lei de Lambert-Beer é limitada por alguns parâmetros como, mudanças no índice de refração e mudanças na concentração química da amostra [38].

3.2.2 Espectroscopia Molecular

A espectroscopia consiste no estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria como uma função dependente do comprimento de onda ou da frequência [38].

Parte do espectro eletromagnético está ilustrado na Figura 5. Para este trabalho o interesse consiste principalmente na região do infravermelho, que inclui radiação com comprimentos de onda (λ) entre $2,5 \mu\text{m}$ e $25 \mu\text{m}$ [38].

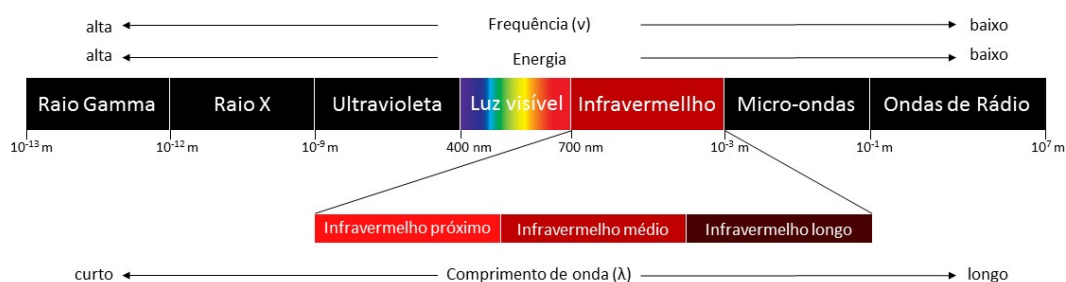


Figura 5: Representação das regiões do espectro eletromagnético [39].

A Figura 5 mostra também que a energia é diretamente proporcional à frequência ν :

$$E = h\nu \quad (3.8)$$

em que h é constante de Planck, e que o comprimento de onda λ é inversamente proporcional à frequência ν por meio da relação:

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (3.9)$$

onde c é a velocidade da luz.

Cada região do espectro está associada a um diferente tipo de energia molecular e por questão de conveniência é comumente utilizado uma relação entre frequência e comprimento de onda, conhecida como número de onda ($\bar{\nu}$) e definida por:

$$[\bar{\nu}] = \left[\frac{1}{\lambda}\right] = \text{cm}^{-1} \quad (3.10)$$

Além disso, o número de onda é diretamente proporcional à energia. A região do infravermelho vibracional vai de 4000 à 400 cm^{-1} .

Em uma molécula os átomos nunca estão fixos. Mesmo a baixas temperaturas eles possuem oscilações contínuas em torno da posição de equilíbrio. Em uma dada molécula com N átomos há $3N$ graus de liberdade (movimentos nas direções x , y e z). No movimento vibracional, pode-se desconsiderar os graus de liberdade para movimentos translacionais do centro de massa e os movimentos rotacionais da molécula, ou seja, teremos $3N-6$ graus de liberdade restantes, correspondentes aos movimentos vibracionais. Já para moléculas lineares há apenas 2 graus de liberdade rotacionais, pois ao considerar os núcleos como pontuais, não ocorre rotação no eixo da molécula e haverá $3N-5$ graus de liberdade vibracionais [40].

Os graus de liberdade correspondem aos diferentes modos normais de vibração em uma molécula e podem apresentar diferentes tipos de vibração, os modos mais simples são os de estiramento e dobramento, Figura 6 (a) e (b), respectivamente, e podem apresentar outros modos mais complexos, também ativos nesta região, Figura 6(c) a 6(h).

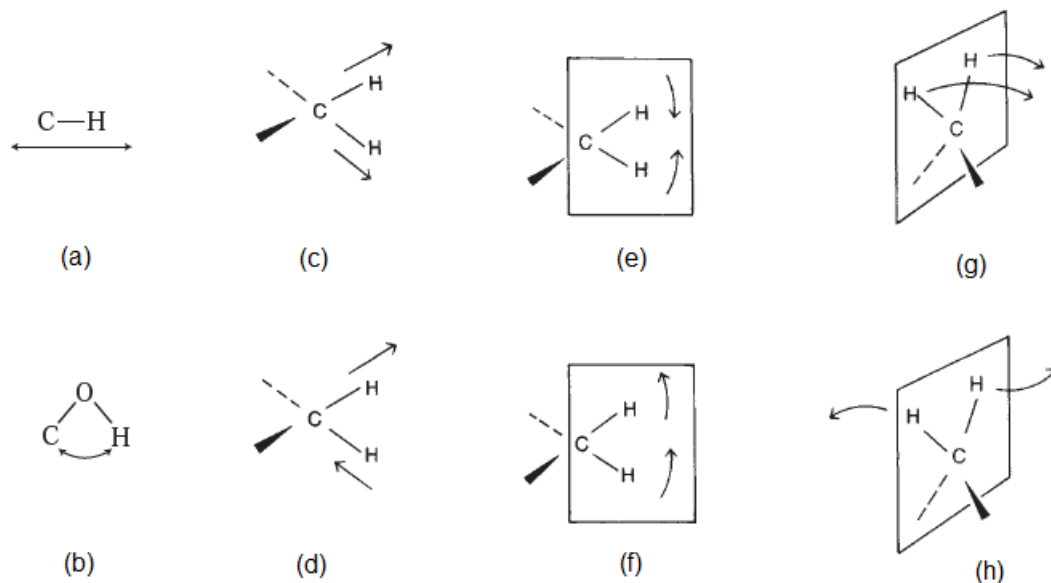


Figura 6: Representação dos diferentes tipos de vibrações moleculares. (a) Estiramento, (b) Dobramento, (c) Vibração de estiramento simétrico, (d) Vibração de estiramento assimétrico, (e) Vibração de deformação tipo tesoura (*scissoring*), (f) Vibração de deformação tipo oscilação, rotação (*rocking*), (g) Vibração de deformação tipo balanço (*wagging*), (h) Vibração de deformação tipo torção (*twisting*) [39].

A radiação eletromagnética é uma oscilação em fase dos campos elétrico e magnético, perpendiculares entre si e que podem ser entendidas como a propagação de uma onda transversal. Do ponto de vista da Mecânica Quântica, pode ser entendida, ainda, como o deslocamento de pequenas partículas, os fótons. A energia de um fóton associado a radiação eletromagnética é dada por:

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (3.11)$$

Quando a radiação eletromagnética no infravermelho interage com a matéria, ela pode ser absorvida se sua frequência corresponder à frequência de vibração natural da molécula que a compõe, aumentando sua energia vibracional.

Cada molécula apresenta um espectro de absorção característico. As ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, que dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria, das massas dos átomos e da forma de vibração. Tais frequências correspondem a níveis de energia da molécula [38].

O espectro infravermelho fornece informação estrutural de uma molécula. A absorção de cada tipo de ligação, geralmente são encontradas apenas em certas pequenas regiões do infravermelho vibracional, como ilustrado na Figura 7.

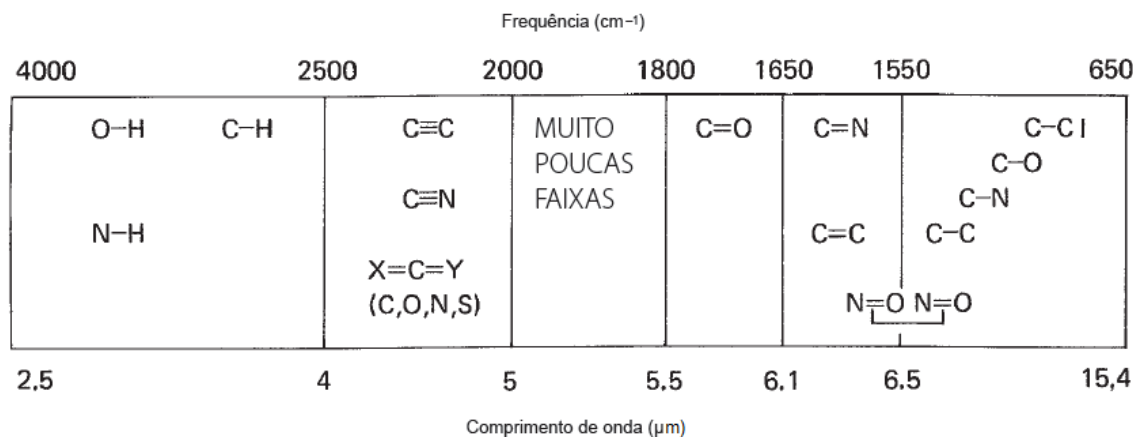


Figura 7: Regiões aproximadas em que vários tipos comuns de ligação absorvem (apenas vibrações de estiramento) [39].

3.3 QUIMIOMETRIA

Análises com instrumentos modernos em amostras complexas, como de fármacos, alimentos ou amostras biológicas, fornecem medidas instrumentais (espectros) com um número elevado de variáveis e que precisam ser analisadas simultaneamente para gerar uma percepção integral do sistema. A Quimiometria surgiu a partir da necessidade de analisar e extrair dados químicos de natureza multivariada por intermédio de métodos matemáticos e estatísticos [42]. Além disso, faz-se necessário métodos estatísticos, pois sem tratamentos específicos, os espectros obtidos neste estudo não apresentam diferenças perceptíveis, o que impossibilita a obtenção de resultados conclusivos na distinção das espécies. Portanto, serão apresentados dois métodos de análise multivariadas, que foram utilizadas no tratamento de dados deste trabalho.

3.3.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

Análise de Componentes Principais, do inglês *Principal Component Analysis* (PCA) é uma técnica exploratória multivariada que propõe um novo espaço de variáveis, de menor dimensão e que contenha a informação mais relevante dos dados originais. O novo sistema de eixos para representar as amostras são denominados: componentes principais, variáveis latentes, fatores ou ainda autovetores [43], sendo que o primeiro eixo do novo subespaço tem a característica de ser a direção que contém a maior variação dos dados originais e as demais variáveis deste subespaço são ortogonais às anteriores e descrevem a variação restante dos dados originais. O PCA busca combinações lineares das variáveis iniciais que expliquem ao máximo a variação existente nos dados e os permitam descrever e reduzir dimensões.

Os dados de entrada numa análise PCA podem ser organizados numa matriz \mathbf{X} (n

$\times p$), de variáveis independentes,

$$X = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1p} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2p} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{np} \end{bmatrix} \quad (3.12)$$

onde cada linha representa uma amostra e cada coluna corresponde a um número de onda específico [43]. Assim, a análise de componentes principais irá transformar a matriz X em um novo conjunto de dados, representado pelas variáveis Y_1, Y_2, \dots, Y_p , não correlacionadas e com variâncias ordenadas, para que seja possível comparar os indivíduos usando apenas as variáveis de maior variância.

A interdependência entre as variáveis da matriz X é representada pela matriz de correlação R ou pela matriz covariância S , simétrica e de ordem ' $p \times p$ '

Normalmente essas matrizes são expressas em unidades de medidas distintas entre si, e neste caso, é apropriado normalizar as variáveis X_i ($i=1, 2, \dots, p$). A normalização pode ser feita com variância 1 e média zero ou variância 1 e média qualquer, que é descrita com detalhes por Varella [44]. A normalização gera uma nova matriz Z :

$$Z = \begin{bmatrix} z_{11} & z_{12} & \dots & z_{1p} \\ z_{21} & z_{22} & \dots & z_{2p} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ z_{n1} & z_{n2} & \dots & z_{np} \end{bmatrix} \quad (3.13)$$

É importante destacar que, o resultado obtido pela normalização a partir da matriz S pode ser diferente do resultado encontrado a partir da matriz R . A matriz padronizada, Z , é igual a matriz de correlação da matriz de dados X .

Os componentes principais são determinados a partir da equação 3.14.

$$\det[R - \lambda I] = 0 \text{ ou } |R - \lambda I| = 0 \quad (3.14)$$

Se a matriz R não apresentar nenhuma coluna que seja combinação linear de outra, a equação $|R - \lambda I| = 0$ terá p raízes, chamadas de autovalores.

Sejam $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_p$ as raízes características da matriz R ou S , então:

$$\lambda_1 > \lambda_2, \dots, \lambda_p$$

Para cada autovalor λ_i , existe um autovetor \tilde{a} :

$$\tilde{a} = \begin{bmatrix} a_{i1} \\ a_{i2} \\ \vdots \\ a_{ip} \end{bmatrix} \quad (3.15)$$

Um autovetor corresponde a uma direção e um autovalor, um escalar, indica o quanto de variância há nos dados ao longo do autovetor (ou componente principal). Os autovetores \tilde{a}_i são normalizados, isto é, a soma dos quadrados dos coeficientes é igual a 1, e ainda são ortogonais entre si. O i -ésimo componente principal é dado por:

$$Y_i = a_{i1}X_1 + a_{i2}X_2 + \dots + a_{ip}X_p \quad (3.16)$$

e apresenta as seguintes propriedades [44]:

1. A variância do componente principal Y_i é igual ao valor do autovalor λ_i :

$$\hat{V}ar(Y_i) = \lambda_i$$

2. O primeiro componente é o que apresenta maior variância e assim por diante:

$$\hat{V}ar(Y_1) > \hat{V}ar(Y_2) > \dots > \hat{V}ar(Y_p)$$

3. O total de variância das variáveis originais é igual ao somatório dos autovalores que é igual ao total de variância dos componentes principais:

$$\sum \hat{V}ar(X_i) = \sum \lambda_i = \sum \hat{V}ar(Y_i)$$

4. Os componentes principais não são correlacionados entre si:

$$\hat{C}ov(Y_i, Y_j) = 0$$

A contribuição de cada componente principal é expressa em porcentagem e sua importância é avaliada segundo essa contribuição, ou seja, a parcela de variância total explicada pelo componente. A soma dos primeiros k autovalores representa a proporção de informação retida na redução de p para k dimensões e assim inferir quantos componentes serão utilizados na análise [44]. Comumente, o número de componentes utilizadas explicam 70% ou mais da variância total.

Outro resultado importante dessa técnica são os gráficos dos pesos das variáveis (*Loading Plot*), que estimam quais números de onda estão influenciando o posicionamento de cada amostra naquele componente principal. Assim, cada ponto no gráfico dos *loadings* corresponde a um número de onda específico.

3.3.2 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

A Regressão por Mínimos Quadrados Parciais, do inglês "*Partial Least Squares*" (PLS) é também uma técnica de análise de dados multivariados utilizada para relacionar uma ou mais variáveis resposta (Y) com diversas variáveis independentes (X).

A criação do modelo, denominado processo de calibração consiste em duas etapas: A primeira etapa é descritiva, ela estabelece uma correspondência matemática entre uma grandeza física conhecida, Y , e as leituras de um instrumento no qual esta grandeza é medida, X [43]. Estes dados, são geralmente organizados em matrizes, sendo Y uma matriz concentração contendo valores determinados por um método de referência confiável e independente, neste trabalho o método de referência é a balança analítica, e X uma matriz contendo os espectros obtidos, nos quais o número de linhas corresponde ao número de amostras e o de colunas ao de componentes, ou seja, cada coluna corresponde a um número de onda específico.

A segunda etapa é a validação, onde pretende-se validar o modelo. Esta etapa contém medidas de amostras conhecidas que sejam independentes das amostras usadas no conjunto para descrição do modelo, utilizado para avaliar o desempenho da calibração. Refere-se as amostras de validação como se seus valores de concentração fossem desconhecidos e utiliza-se a calibração construída com o conjunto treinamento para estimá-los. Ao fim, compara-se os valores estimados com os valores teóricos (determinados pelo método de referência), para avaliar o desempenho da calibração em amostras realmente desconhecidas [43].

Neste trabalho adotou-se o método de mínimo quadrados, no qual busca-se encontrar o melhor ajuste a um conjunto de dados, isto é, tenta-se minimizar a soma dos quadrados das diferenças entre o valor estimado \hat{y}_i e os valores observados y_i .

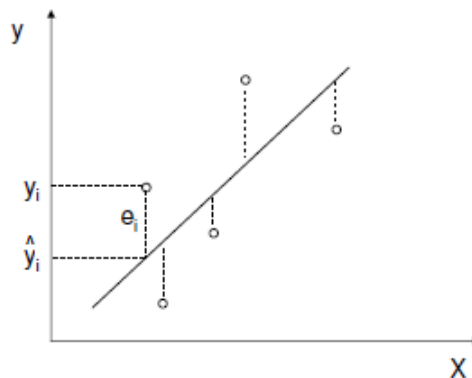


Figura 8: Ajuste por mínimos quadrados.

Uma relação linear entre uma variável aleatória y e uma variável não aleatória X é descrita pelo modelo:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X + \varepsilon \quad (3.17)$$

onde β_0 e β_1 são os parâmetros do modelo e ε é o erro aleatório associado à determinação de y . Geralmente, y é o sinal ou a resposta dada por um instrumento e X a concentração

se quer determinar [45]. Neste trabalho, a quantidade de interesse foi o café robusta adicionado as amostras.

Para cada sinal y_i observado numa concentração X_i , o modelo linear fornece uma estimativa \hat{y}_i , dada pela equação:

$$\hat{y}_i = b_0 + b_1 X_i \quad (3.18)$$

onde b_0 e b_1 são as estimativas dos parâmetros β_0 e β_1 , obtidas na etapa descritiva da calibração. As diferenças entre os valores observados e os valores estimados são os resíduos, dado por 3.19:

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \quad (3.19)$$

Em um modelo bem ajustado os resíduos estão distribuídos aleatoriamente. O erro relativo percentual (ER(%)) entre o método de referência e o método desenvolvido:

$$ER(\%) = \frac{(y_i - \hat{y}_i)}{y_i} 100 \quad (3.20)$$

Os valores b_0 e b_1 são estimados minimizando-se a soma quadrática dos resíduos, dada por:

$$SQ_r = \sum (e_i)^2 = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 = \sum (y_i - b_0 - b_1 X_i)^2 \quad (3.21)$$

Para simplificações na notação, os índices foram omitidos da equação 3.21, mas o somatório deve ser feito sobre todas os valores experimentais, ou seja, de $i = 1$ até $i = n$, onde n é o número total de amostras. Comumente, SQ_r é denominado PRESS, e a partir dele obtém-se a raiz quadrada do erro médio quadrático, do inglês "Root mean square error" (RMSE) [46], dado por:

$$RMSE = \sqrt{\frac{SQ_r}{n}} \quad (3.22)$$

Para minimizar a soma quadrática residual deriva-se a equação 3.21 em relação a b_0 e b_1 e iguala-se as derivadas a zero. Após manipular algebricamente os resultados, obtemos:

$$b_0 = \frac{(\sum y_i - b_1 \sum X_i)}{n} \quad (3.23)$$

$$b_1 = \frac{n \sum y_i X_i - \sum X_i \sum y_i}{[n \sum (X_i)^2 - (\sum X_i)^2]} \quad (3.24)$$

É importante observar que o tratamento estatístico dos resultados obtidos com o método dos mínimos quadrados exige que sejam válidas (pelo menos aproximadamente)

algumas suposições sobre a natureza dos erros associados às medidas. Resumidamente, elas são:

- Os únicos erros nas medidas são devidos a flutuações na variável dependente y ;
- Os erros ε_i são variáveis aleatórias com média zero e variância constante σ^2 (Homocedasticidade);
- Os erros ε_i não são correlacionados;
- Os erros ε seguem a distribuição normal.

Na presença de violações grosseiras dessas suposições, amostras diferentes extraídas do mesmo sistema podem levar a equações bastante diferentes, isto é, a modelos sem estabilidade.

O maior interesse do modelo é prever o valor da concentração a partir de uma resposta analítica medida, além, de ter uma estimativa do erro associado a essa previsão. Esse procedimento é chamado de regressão inversa.

$$(X_e)_0 = \frac{(y_0 - b_0)}{b_1} \quad (3.25)$$

A validade do modelo e a significância estatística da curva ajustada podem ser testadas por meio de análise da variância, cujos parâmetros estão descritos na Figura 9. Detalhes sobre esta análise são encontradas na referência [45].

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº de g. l.	Média Quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p - 1}$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n - p}$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m - p}$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n - m}$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	
% de variação explicada: $\frac{SQ_R}{SQ_T}$			
% máxima de variação explicável: $\frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T}$			

Figura 9: Dados para análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear nos parâmetros. n_i = número de repetições no nível i ; m = número de níveis distintos da variável independente; $n = \sum n_i$ = número total de observações; p = número de parâmetros do modelo [45].

O coeficiente de determinação, ou coeficiente de correlação múltipla, R^2 , é a razão entre a soma quadrática explicada pela regressão e a soma quadrática total:

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} \quad (3.26)$$

O coeficiente de determinação é comumente chamado de variação percentual explicada pelo modelo e quanto mais próximo de 1 estiver R^2 , mais o modelo consegue descrever a variação em y .

A validação tem por objetivo testar a capacidade preditiva do modelo, prevendo concentrações de amostras. Para realizar a validação do modelo aplicou-se aqui o método de validação cruzada, feita pela comparação das previsões das concentrações previamente conhecidas c_I , que em resumo consiste nas seguintes etapas:

1. Remove-se uma ou mais amostras do conjunto de calibração e constrói-se um novo modelo;
2. Usa-se o modelo pra prever os dados removidos \hat{c}_I ;

3. Calcula-se o erro de previsão ($c_I - \hat{c}_I$);
4. Calcula-se a soma dos quadrados dos erros, que é na realidade um desvio padrão,

$$\sqrt{\frac{\sum_I (c_I - \hat{c}_I)^2}{n}} \quad (3.27)$$

onde n é o número de amostras do conjunto de calibração. O processo é repetido até descobrir o melhor resultado, com menores erros de predição [43].

3.4 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A luminescência é o processo que ocorre quando um elétron, num estado excitado, decai para o estado fundamental emitindo um fóton. O fenômeno se divide em dois tipos: a fosforescência e a fluorescência.

A fosforescência é a emissão de luz a partir de um estado excitado tripleto, no qual o elétron excitado modifica sua orientação de spin, emparelhando-se com o elétron que permaneceu no estado fundamental. Assim, transições para o estado fundamental são proibidas e o tempo de vida desse tipo de emissão é da ordem de milissegundos (10^{-3} s) [47]. Já a fluorescência é a emissão de luz a partir de um estado excitado singlete, no qual o elétron excitado não muda a orientação de spin, continuando desemparelhado, conseqüentemente, o retorno ao estado fundamental é permitido e ocorre rapidamente via emissão de um fóton [47]. Seu tempo de vida é da ordem de nanossegundo (10^{-9} s), mais rápido quando comparado com a emissão anterior.

Os componentes responsáveis pela fluorescência em uma molécula são denominados fluoróforos, que geralmente emitem luz na faixa de comprimentos de onda do espectro visível. Em compostos orgânicos, o fenômeno da fluorescência ocorre tipicamente em estruturas aromáticas.

Os processos monomoleculares de absorção e emissão da luz estão representados no *Diagrama de Jablonski* ou ainda, *Perrin-Jablonski* (Figura 10), desenvolvidos por Alexander Jablonski, denominado o pai da espectroscopia de fluorescência. As transições eletrônicas mostradas na Figura 10 representam os processos de absorção da radiação eletromagnética, e de dissipação de energia por conversão interna, neste processo não ocorre emissão de fóton. Já na fluorescência e fosforescência há emissão de fótons.

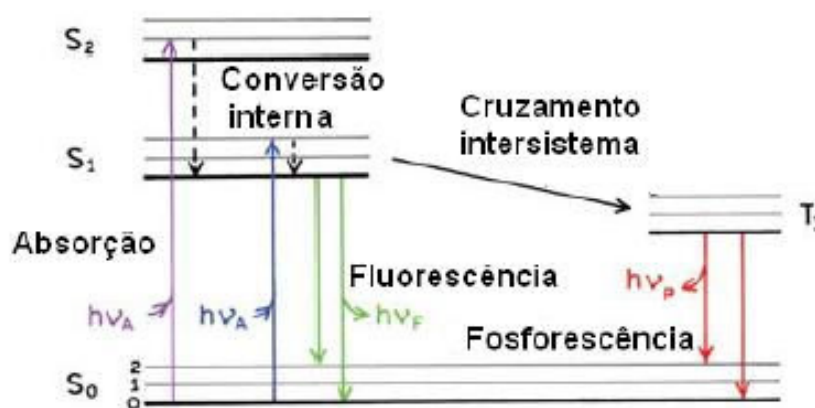


Figura 10: Diagrama de *Jablonski* com estados eletrônicos singletos, fundamental, S_0 , primeiro, S_1 , e segundo, S_2 [47].

A energia de emissão é menor que a energia de absorção, ou seja, a fluorescência acontece em energias menores, ou ainda, comprimentos de onda maiores, fenômeno conhecido como deslocamento de Stokes, observado por G. G. Stokes [47].

A determinação do tempo de permanência da molécula no estado excitado, chamado posteriormente de tempo de vida (τ) [48], fornece informações sobre a ocorrência de processos de transferência de energia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS

Este trabalho caracteriza-se como um estudo exploratório. Após testes iniciais, optou-se pelo estudo detalhado de duas técnicas espectroscópicas, Infravermelho Médio, do inglês *Medium Infrared* (MIR) e Luminescência e a Contagem de Fóton Único Correlacionada no Tempo, do inglês *Time-Correlated Single Photon Counting* (TCSPC), para caracterização inicial do café. Além disso, trabalhos derivados deste terão como objetivo a investigação de fraudes em cafés comercializados. Portanto, preferiu-se estudar os grãos torrados e moídos, por serem similares aos disponíveis no mercado para os consumidores.

As amostras são compostas das duas espécies de café comercialmente disponíveis, o café tipo arábica (*Coffea arabica L.*) e robusta (*Coffea canephora L.*), ilustrados respectivamente à esquerda e à direita da Figura 11. Para garantir resultados fidedignos, é indispensável conhecer a procedência dos grãos, por este motivo, todo o estudo foi realizado a partir dos grãos verdes, garantindo a procedência das espécies. Os grãos arábica foram coletados no município de Caparaó-MG e os robusta no município de Vila Valério-ES.



Figura 11: Amostra de café em grãos verdes: arábica (esquerda) e robusta (direita).

Os grãos foram submetidos ao mesmo processo de produção, colheita, secagem e beneficiamento, com o intuito de diminuir o número de variáveis que poderiam influenciar em sua composição química.

Os grãos verdes (Figura 11) foram recebidos e selecionados, onde foram removidos impurezas presentes. A seleção foi realizada de modo a uniformizar a amostra, eliminando assim grãos defeituosos, cascas, galhos, pedras, etc.

Os grãos foram submetidos a análise de umidade a fim de se ajustar os parâmetros de torra. A umidade representa a relação percentual entre a quantidade de água e a massa total da amostra, e gerou resultados de 11,7% para arábica e 13,9% para robusta. Em seguida, foram submetidas ao processo de torra, em torrador da marca *Paline Alves*, mostrado na Figura 12. A temperatura das amostras e do torrador foram verificadas com o auxílio de um termômetro a laser, pois este torrador fornece apenas o controle para a

pressão do gás. Este procedimento foi realizado no Instituto Federal do Espírito Santo (IFES) - Campus Alegre/ES no Laboratório de Classificação e Degustação de Café.



Figura 12: Torrador de amostras - *Paline Alves*.

Para verificar o ponto de torra de maneira eficaz a empresa Agtron desenvolveu um equipamento que possui um princípio de funcionamento similar ao colorímetro apresentado na seção 3.1, que determina a coloração da amostra em números e utiliza como base o padrão produzido pela *Specialty Coffee Association of America* (SCAA) e pela Agtron, chamado Sistema *Agtron/SCAA Roast Classification Color Disk*, constituído por 8 discos com diversos tons de marrom, onde cada uma possui um número referente aos graus de torra do café.

Com o intuito de difundir o conhecimento, a ABIC lançou uma pequena régua (Figura 13), que reproduz os discos do conjunto SCAA-Agtron, destacando os pontos de torra mais presentes nos cafés brasileiros.

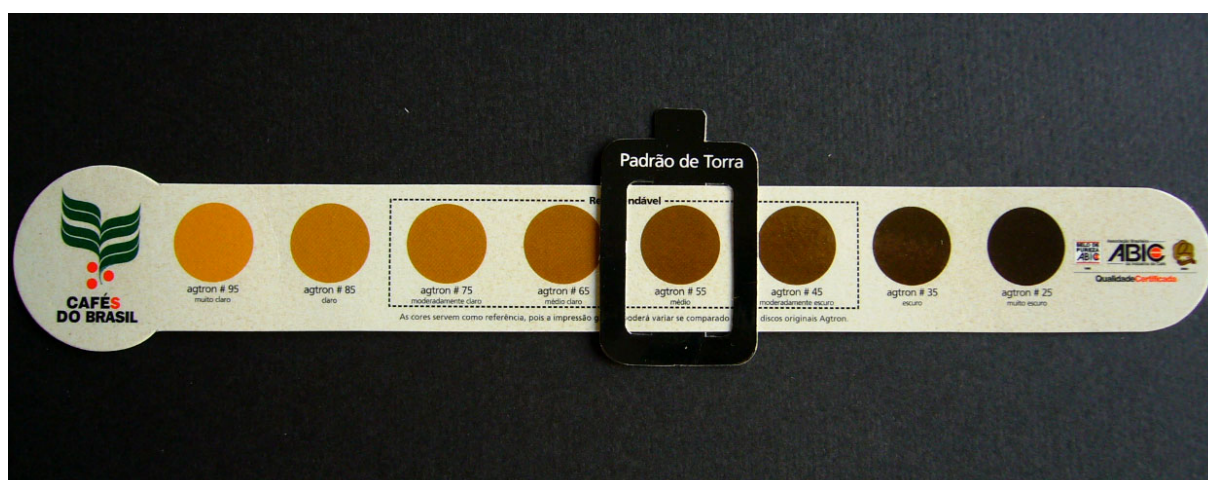


Figura 13: Referência Agtron para classificação dos padrões de torra de café [49].

A torra é uma etapa importante do café, nela parte dos compostos químicos podem ser perdidos, transformados ou até mesmo formados durante este processo. No mercado

há várias torras disponíveis e por isso, as amostras para este trabalho foram avaliadas em três níveis: torra clara, torra média e torra escura, com tempos de aproximadamente 9, 13 e 17 minutos, respectivamente, à cerca de 150°C. Após o processo de torra, as amostras foram moídas em um moedor elétrico para café.

No Grupo de Espectroscopia e Engenharia de Materiais (GE2M) da UFJF, dentro do qual está o LEM (Laboratório de Espectroscopia de Materiais), o pó obtido após a torra e moagem foi transformado em pastilha. Para fabricação das pastilhas foi utilizado o seguinte procedimento:

1. Tamisação;
2. Pesagem em balança analítica nas corretas proporções descritas na Tabela 2;
3. Homogeneização das misturas com gral e pistilo;
4. Prensa das amostras com três toneladas durante três segundos, utilizando uma prensa hidráulica automatizada (Atlas™ Power Hydraulic Press T25, SPECAC INC, Fort Washington, PA, USA).

O resultado deste procedimento foram pastilhas, similares à mostrada na Figura 14, com espessura média de 1,4 mm e diâmetro de 12,7 mm.



Figura 14: Pastilha produzida com café torrado e moído.

O conjunto final de amostras 4.1.1 e as técnicas utilizadas nesta dissertação, serão descritas nas próximas seções deste capítulo.

4.1.1 Conjunto de Amostras

As amostras utilizadas neste trabalho foram das espécies de café arábica (*C. arabica L.*) e robusta (*C. canephora L.*) e suas misturas. Foram feitas 11 pastilhas,

como mostrado na Tabela 2, que indica a massa de cada espécie, a incerteza da medição e a porcentagem de café robusta adicionado nas amostras. Após o preparo das misturas, foram utilizadas técnicas espectroscópicas (MIR e TCSPC) para sua caracterização.

Tabela 2: Conjunto de amostras utilizado nas análises.

Amostras	Arábica $\pm 0,001$ (g)	Robusta $\pm 0,001$ (g)	Adição de Robusta (%)
1	0,200	0,000	0,0 $\pm 0,1$
2	0,180	0,020	10,0 $\pm 0,1$
3	0,160	0,040	20,0 $\pm 0,2$
4	0,140	0,060	30,0 $\pm 0,2$
5	0,120	0,080	40,0 $\pm 0,3$
6	0,100	0,100	50,0 $\pm 0,3$
7	0,080	0,120	60,0 $\pm 0,3$
8	0,060	0,140	70,0 $\pm 0,4$
9	0,040	0,160	80,0 $\pm 0,4$
10	0,020	0,180	90,0 $\pm 0,5$
11	0,000	0,200	100,0 $\pm 0,5$

Estes *blends* foram feitos para três níveis de torra, clara (A), média (B) e escura (C), ou seja, analisou-se três conjuntos de amostras separadamente. É importante destacar que as pastilhas foram feitas diariamente, antes de cada medida, sem estocagem de amostras e todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

4.2 ANÁLISE COLORIMÉTRICA

As análises colorimétricas foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da UFJF, utilizando um colorímetro CR-400 (*Konica Minolta Sensing Americas*), ilustrado na Figura 15, um instrumento de medição portátil.



Figura 15: Cabeçote de medição de cor, modelo CR-400 - *Konica Minolta* [50].

As amostras de café em pó foram distribuídas em placas de Petri, de modo a cobrir completamente o fundo da placa, Figura 16. Para realização da medida, o colorímetro estava posicionado perpendicularmente a placa de Petri.

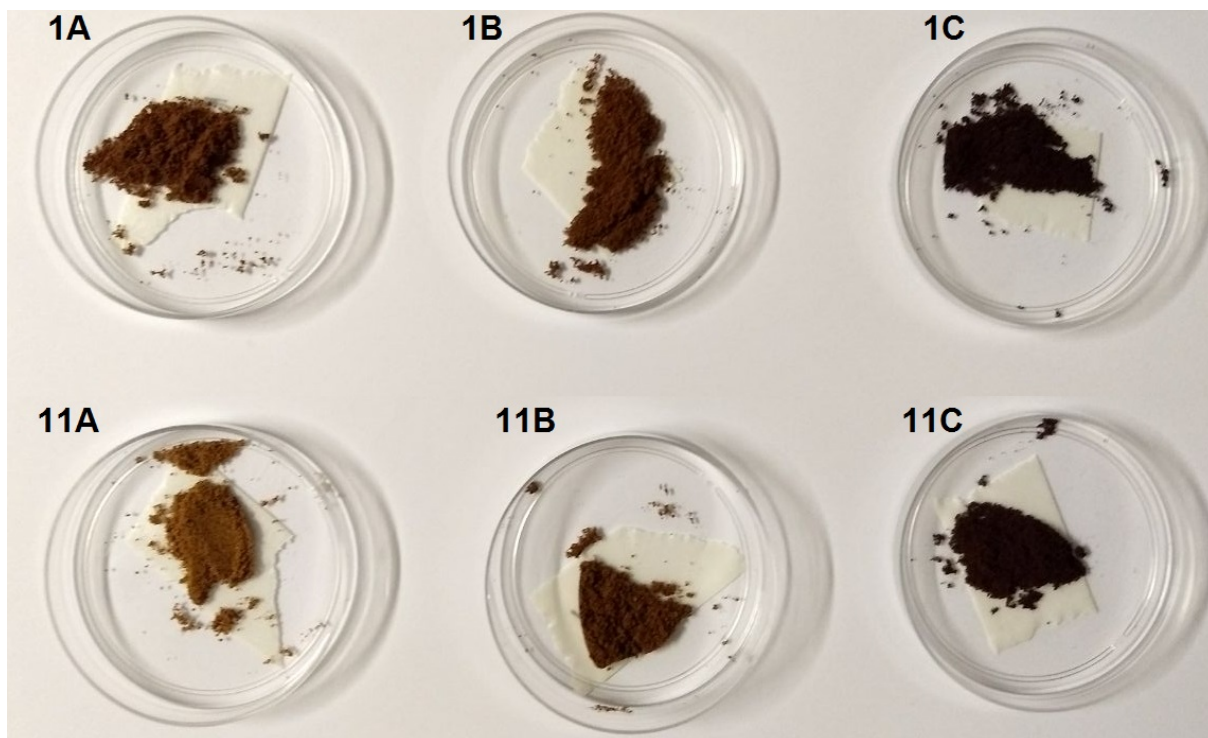


Figura 16: Placa de Petri com amostra de café utilizada para medição de cor.

Todas as leituras foram realizadas em triplicata. Nesta técnica a porcentagem de adulteração segue o mesmo parâmetro descrito na Tabela 2, mas a massa de cada amostra é maior (5,00 g) e elas não foram transformadas em pastilhas. Assim, as análises foram realizadas no próprio pó da amostra, nas torras clara (A), média (B) e escura (C), totalizando 99 leituras.

O colorímetro fornece as coordenadas de luminosidade (L^*), que assume valor 0 para o preto absoluto, e 100 para o branco total e a tonalidade, expressa pelas cores primárias nas coordenadas do eixo horizontal vermelho-verde ($+a^*$, $-a^*$) e coordenada do eixo vertical amarelo-azul ($+b^*$, $-b^*$). Os valores para a saturação ou cromaticidade (C^*), e o ângulo de tonalidade (h), derivado dos valores de a^* e b^* , também são fornecidos pelo equipamento.

4.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

As medidas na região do infravermelho médio (MIR, do inglês *Medium Infrared*) deste trabalho foram feitas utilizando-se um espectrofotômetro VERTEX-70 FTIR (*Fourier*

Transform Infrared Spectroscopy) fabricado pela *Bruker*. A Figura 17 ilustra o equipamento FTIR utilizado no LEM.

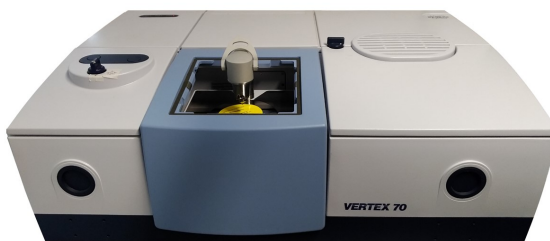


Figura 17: Espectrômetro FTIR modelo Vertex 70 - *Bruker*.

O espectrofotômetro Vertex 70 trabalha numa região de 8000 cm^{-1} à 400 cm^{-1} e sua resolução espectral é de $0,1\text{ cm}^{-1}$. As medidas foram realizadas na região de 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1} .

Espectrofotômetros que trabalham na região do infravermelho, operam baseados nos princípios de um interferômetro de Michelson, cujo funcionamento é fundamentado na interferência da luz. Neles, o traçado do caminho óptico produz um padrão chamado interferograma, que é representado em um gráfico de intensidade *versus* tempo, que não é muito útil para o estudo espectroscópico. Em espectroscopia, é mais esclarecedor obter o espectro que relaciona intensidade *versus* números de onda. Se a forma matemática do interferograma é conhecida, é possível calcular o espectro correspondente usando a técnica matemática conhecida como Transformada de Fourier. Este tipo de instrumento é um espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier, do inglês, *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR), que produz interferogramas rapidamente, possibilitando a realização de várias medidas em um curto intervalo de tempo [39].

O FTIR usa um interferômetro de Michelson para manipular a energia enviada à amostra. O interferômetro é composto fundamentalmente por dois espelhos planos, posicionados perpendicularmente um ao outro, em que um deles é fixo e o outro é móvel, e por um espelho semitransparente posicionado em um ângulo de 45° em relação a radiação incidente, denominado divisor de feixes. Quando a energia da fonte MIR (infravermelho médio) incide sobre o divisor de feixes, metade dos feixes segue na direção original, e a outra metade é desviada por um ângulo de 90° , em direção ao espelho estacionário. Ambos são refletidos novamente para o divisor de feixes, onde há uma recombinação das ondas, gerando um padrão de interferência. [38, 39, 41]. A Figura 18 ilustra o funcionamento de um FTIR.

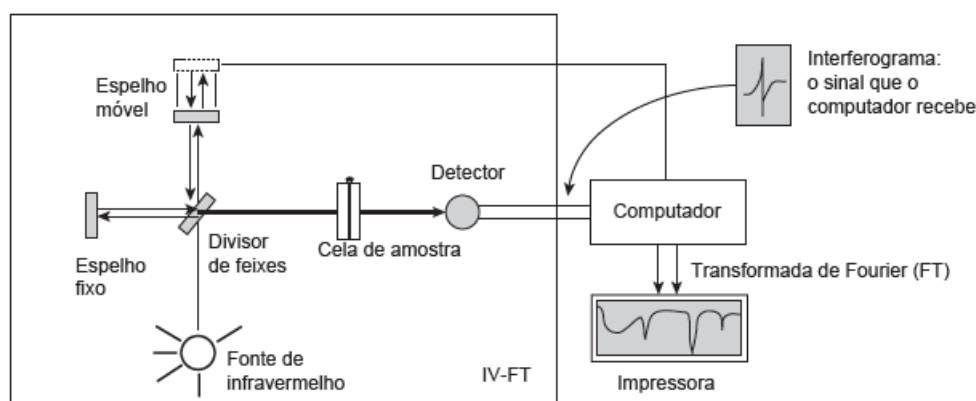


Figura 18: Diagrama representando os principais componentes de um espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier [39].

A radiação que emerge do divisor de feixes que vai em direção à amostra e, em seguida, ao detector, denominada radiação transmitida, contém informações sobre a intensidade de energia absorvida em cada comprimento de onda (frequência). O programa compara o interferograma modificado com o interferograma produzido por um feixe de laser de referência para obter um padrão de comparação. O interferograma final contém toda a informação de um sinal de domínio temporal. Nele é aplicada a transformada de Fourier pelo próprio computador para extrair as frequências individuais que foram absorvidas e, então, reconstruir o típico espectro infravermelho (intensidade *versus* número de onda) [39].

Vale destacar que a calibração e o alinhamento desses equipamentos com transformada de Fourier são feitos automaticamente pela utilização de um laser de He-Ne, que monitora a posição do espelho móvel durante a varredura. Outro fato importante é que antes da troca de pastilha seja feito um espectro da própria emissão da amostra, denominado *background*, que remove os fatores que influenciam negativamente no espectro, como contribuições do equipamento e do meio ambiente.

4.4 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

Os dados espectrais de absorbância obtidos no FTIR foram organizados em uma matriz de 11 linhas e 708 colunas, onde cada linha representa uma amostra (11 misturas, descritas na seção 4.1.1) e cada coluna representa uma variável de número de onda distinto.

As análises foram feitas nas regiões entre 3000 e 2800 cm^{-1} , e entre 1800 e 700 cm^{-1} e os dados foram submetidos a cálculos de análise de componentes principais (PCA) utilizando o *software* MINITAB 16, no qual obteve-se um novo sistema de eixos (componentes principais), cujos gráficos ilustram a correlação entre as amostras (*scores*) e a influência dos números de onda (*loadings*) [43]. O método foi repetido para os três conjuntos de amostras, nas torras clara (A), média (B) e escura (C).

4.5 REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS)

Os dados espectrais obtidos no FTIR também foram utilizados na construção das curvas de calibração. Num primeiro instante, as curvas foram construídas com os três conjuntos (A,B,C) de 11 amostras cada um, mas sem validações, como teste inicial.

Posteriormente, para a torra clara, realizou-se outro grupo de medidas, no qual a cada nova pastilha foi acrescido 2,5% de café robusta e retirado a mesma proporção de café arábica. Essas misturas forneceram um conjunto de 41 amostras, das quais 30 foram utilizadas na calibração e 11 na validação do modelo. As análises foram realizadas no *software OriginPro 2015*, na região entre 3060 e 2800 cm^{-1} , e entre 1800 e 700 cm^{-1} , no qual os dados foram organizados em duas matrizes. A primeira possui os valores de referência (balança), em porcentagens de substituição e a segunda possui 30 linhas e 708 colunas, onde cada linha representa uma amostra e cada coluna uma variável de número de onda distinto [43].

As amostras foram divididas em dois conjuntos, um de calibração (30) e outro de validação (11). Para validação do modelo foram escolhidas amostras aleatórias, mas de maneira que tais pontos ficassem uniformemente distribuídos entre as demais amostras. A localização desses pontos pode ser observada na Figura 19.

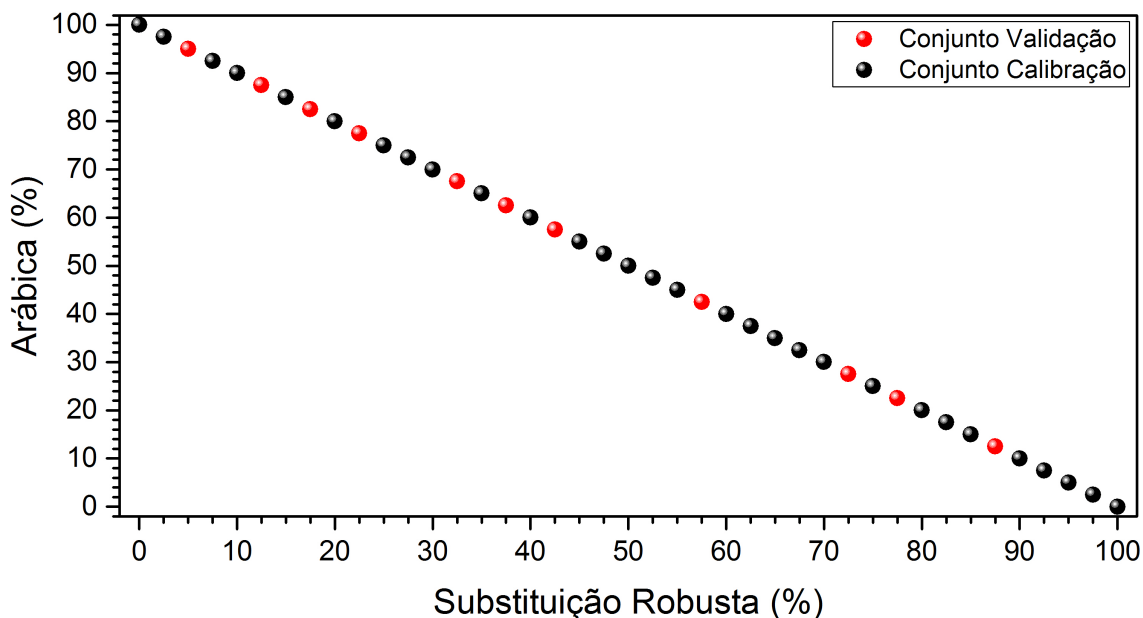


Figura 19: Pontos utilizados para a calibração e validação da curva na regressão PLS.

Na determinação no número de fatores empregados no modelo, denominada PRESS é feita uma validação cruzada [46], descrita na seção 3.3.2. Nesta seção também estão descritos os parâmetros de erro empregados no modelo.

4.6 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As análises de fluorescência foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia de Materiais (LEM), que faz parte do Grupo de Espectroscopia e Engenharia de Materiais (GE2M) e foram obtidas excitando as amostras com uma lâmpada de gás hidrogênio ultra rápida de nanosegundos (nF920 Ultrafast Nanosecond Flashlamp, Edinburgh Instruments, Livingston, UK), que opera na frequência de 40 kHz, tensão de 6,8 kV e pressão variável entre 0,4 e 0,7 bar. A detecção da emissão de fótons foi realizada em espectrômetro modelo FL920, Edinburgh Instruments (Livingston, UK) com fotomultiplicadora que opera na região do azul, como ilustrado na Figura 20.



Figura 20: Espectrômetro de Fluorescência - *Edinburgh Instruments*.

A espectroscopia de fluorescência foi realizada com uma fonte de iluminação que constantemente irradia um feixe de luz monocromático na amostra. Para detecção da luz emitida pela amostra foi utilizado um detector posicionado à um ângulo de 90° da fonte, responsável por detectar a intensidade de emissão da amostra em função do comprimento de onda na região do visível, como representado na Figura 21.

A técnica de fluorescência possui alta sensibilidade à estrutura química dos fluoróforos e apresenta como resposta uma curva de intensidade *versus* comprimento de onda (nm) [47].

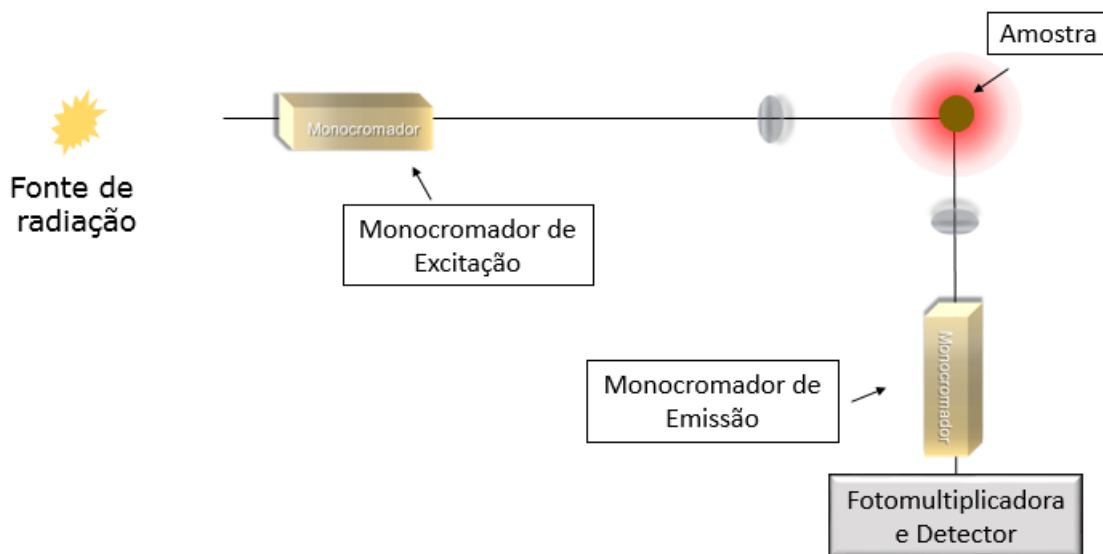


Figura 21: Representação de um espectrofluorímetro.

O tempo de exposição à fonte foi de 0,1 segundo, e para cada emissão, o resultado obtido foi a soma de 3 varreduras. A excitação da lâmpada pode variar entre 200 a 400 nm. Para as medidas testes, os cafés arábica e robusta foram submetidas a toda região de excitação do equipamento com intervalos de 10 nm. A partir dos resultados obtidos foram escolhidos 3 comprimentos de onda (que apresentaram maior intensidade de emissão) para análises mais detalhadas. Os comprimentos de onda de excitação que produziram as maiores intensidades de emissão foram 280 nm, 310 nm e 400 nm, como será mostrado nos resultados.

4.6.1 Espectroscopia de Fluorescência Resolvida no Tempo

A fluorescência resolvida no tempo também foi realizada utilizando os mesmos equipamentos da *Edinburgh Instruments*, uma lâmpada de gás hidrogênio ultra rápida de nanosegundos, que opera na frequência de 40 kHz, tensão de 6,8 kV e pressão variável entre 0,4 e 0,7 bar. A detecção da emissão de fótons foi realizada com espectrômetro modelo FL920 e fotomultiplicadora que opera na região do azul, porém configurada para realizar medidas no modo de contagem de fóton único correlacionado no tempo, do inglês, *Time Correlated Single Photon Counting* (TCSPC).

As amostras de café foram expostas a um pulso de luz, ilustrado em verde na Figura 22, que é particularmente mais curto que o tempo de decaimento da amostra. A curva de decaimento, em vermelho, é formada pelo acúmulo de fótons no detector em função do tempo de detecção. A técnica é ajustada de tal modo que no máximo um fóton seja detectado por pulso de luz, ou seja, apenas um fóton pode ser observado. A intensidade do decaimento foi registrada com um sistema de alta velocidade de detecção ($10^{-12}s$). O tempo é medido entre o pulso de excitação e o fóton observado. O resultado obtido pode

ser visto no histograma ilustrado na Figura 22, no qual o eixo x representa a diferença de tempo e o eixo y o número de fótons detectados para esta diferença de tempo [47].

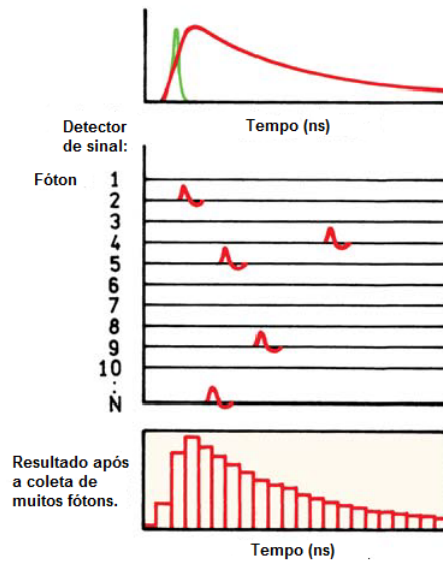


Figura 22: Representação do princípio de funcionamento da contagem de fóton único correlacionado no tempo (TCSPC). Adaptado de: [47].

Para realizar a medição do tempo de atraso entre a excitação e a emissão é necessário uma eletrônica especializada. O experimento inicia-se quando um pulso de luz é utilizado para excitar a amostra e envia este sinal para a eletrônica. Simultaneamente, outro canal possui um pulso elétrico utilizado como referência. Ambos os sinais são enviados a um discriminador de fração constante (CFD), que mede o tempo de chegada de cada pulso com alta precisão. Em seguida, os sinais são enviados para um conversor de tempo/amplitude (TAC). O pulso de excitação é usado para iniciar o TAC e gera uma rampa de tensão que aumenta linearmente com o tempo. Já o fóton detectado no pulso de emissão ativa um sinal eletrônico, o qual irá parar o TAC e conseqüentemente a rampa de tensão.

O TAC agora contém uma tensão proporcional ao tempo de atraso (Δt) entre os sinais de excitação e de emissão. A tensão é amplificada por um amplificador de ganho programável (PGA) e convertida em um valor numérico pelo conversor analógico-digital (ADC). Para minimizar leituras falsas o sinal é limitado a uma dada faixa de tensões. Se o sinal não está dentro desse intervalo, o evento é suprimido por uma janela discriminadora (WD). A tensão é convertida em um valor digital, e o valor de Δt é armazenado [47]. O esquema completo do experimento está ilustrado na Figura 23. Um histograma do número de contagens em função do tempo é construído repetindo-se este processo até detectar um determinado número de fótons para um elevado número de pulsos de excitação sobre a amostra.

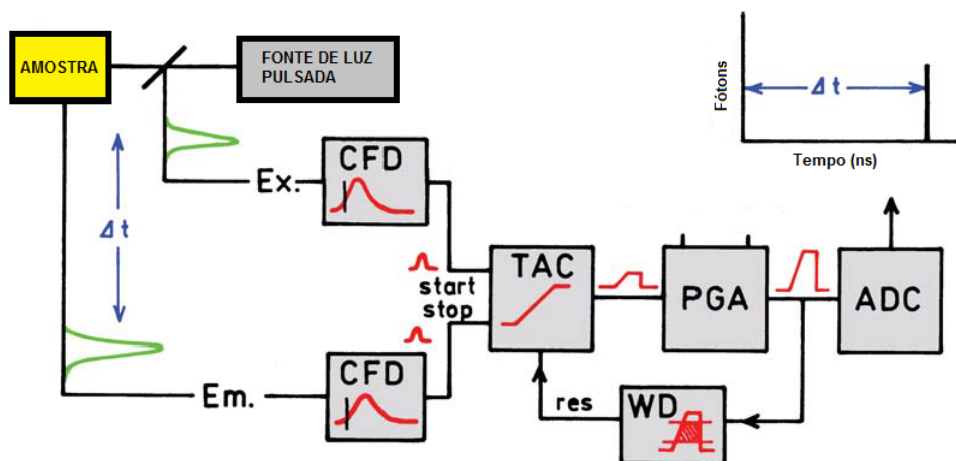


Figura 23: Arranjo experimental para medidas do tempo de vida. Adaptado: [47].

Para calcular o tempo de vida o *software* F900 (Edinburgh Instruments) faz o ajuste da curva de decaimento de fluorescência da amostra, utilizando a equação 4.1:

$$I(t) = A + \sum_{i=1} B_i e^{\frac{-t}{\tau_i}} \quad (4.1)$$

onde, I é a intensidade de luz irradiada, A é uma constante de ajuste, B_i são os fatores pré-exponenciais, t é o tempo e τ é o tempo de vida no estado singleto. A confiabilidade do ajuste é adquirida através do qui-quadrado reduzido χ^2 , também fornecido pelo *software*. Valores de χ^2 próximos de 1 indicam bons ajustes. Os resultados do ajuste são obtidos pela equação 4.1. O *software* também fornece os fatores pré-exponenciais B_1 , B_2 e B_3 , e os fatores pré-exponenciais normalizados B_{n1} , B_{n2} e B_{n3} , cuja soma é igual a 1.

Os valores de excitação e emissão encontrados anteriormente nas análises fluorescência 4.6 permanecem fixados afim de visualizar o tempo de decaimento de uma ou mais moléculas. As medidas foram realizadas com excitações fixadas em 280, 310 e 400 nm e suas respectivas emissões, 480, 470 e 605 nm, pois tais comprimentos de onda possuem maior intensidade de fluorescência, como será mostrado posteriormente nos resultados.

Para o processamento de dados obtidos, calculou-se a intensidade média de tempo de vida através da equação 4.2 [51–53]:

$$\langle \tau_i \rangle = \frac{\sum B_i \tau_i^2}{\sum B_i \tau_i} \quad (4.2)$$

onde $\langle \tau_i \rangle$ é a intensidade média de tempo de vida, β_i são coeficientes obtidos pelo ajuste dos decaimentos referentes à cada i -ésimo tempo de vida.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ANÁLISE COLORIMÉTRICA

Os resultados desta seção foram utilizados apenas para caracterização inicial das amostras, explicitando a tonalidade de cada torra e como elas influenciaram nos resultados finais. As tabelas 3, 4 e 5 apresentam os valores médios e o desvio padrão obtidos para as torras clara (A), média (B) e escura (C) utilizando um colorímetro. Foram observados maiores valores de luminosidade nas amostras de torra clara, seguidos da torra média e escura.

Em cada torra os valores de luminosidade aumentam a medida que adiciona-se café robusta nas amostras, indicando que a torra clara do café arábica não foi idêntica a torra clara do café robusta. Este fato já foi observado por outros autores [7]. Segundo eles, mesmo quando as espécies são submetidas aos mesmo parâmetros de torra, as amostras de café robusta são de cor mais clara e amarelada do que as amostras de arábica.

Tabela 3: Parâmetros médios de cor para pó de café com amostras em torra clara (A).

Amostra	L*(x10)	a*(x10)	b*(x10)	C*(x10)	h(x10)
1A	3,63±0,06	1,41±0,05	1,99±0,21	3,44±0,17	5,45±0,19
2A	3,78±0,07	1,35±0,02	1,76±0,18	2,22±0,16	5,23±0,26
3A	3,82±0,02	1,34±0,02	1,75±0,12	2,20±0,11	5,24±0,16
4A	3,92±0,51	1,31±0,01	1,64±0,06	2,10±0,04	5,14±0,10
5A	4,02±0,08	1,30±0,01	1,63±0,08	2,08±0,07	5,13±0,13
6A	4,07±0,03	1,32±0,03	1,81±0,12	2,24±0,11	5,39±0,13
7A	4,14±0,08	1,32±0,01	1,90±0,10	2,32±0,08	5,51±0,11
8A	4,11±0,01	1,33±0,01	2,00±0,10	2,39±0,08	5,61±0,12
9A	4,19±0,04	1,32±0,01	2,03±0,08	2,42±0,07	5,69±0,09
10A	4,23±0,02	1,31±0,01	2,14±0,03	2,51±0,02	5,86±0,05
11A	4,30±0,04	1,31±0,00	2,13±0,02	2,50±0,01	5,85±0,021

L*: luminosidade; a*: coordenadas cromáticas do eixo horizontal; b*: coordenadas cromáticas do eixo vertical; C*: saturação ou cromaticidade; h: ângulo de tonalidade; 1A: 100% arábica; 2A: 90% arábica; 3A: 80% arábica; 4A: 70% arábica; 5A: 60% arábica; 6A: 50% arábica; 7A: 40% arábica; 8A: 30% arábica; 9A: 20% arábica; 10A: 10% arábica; 11A: 100% robusta.

Tabela 4: Parâmetros médios de cor para pó de café com amostras em torra média (B).

Amostra	L*(x10)	a*(x10)	b*(x10)	C*(x10)	h (x10)
1B	3,45±0,01	1,37±0,03	1,44±0,10	1,99±0,09	4,66±0,13
2B	3,57±0,03	1,35±0,05	1,35±0,23	1,91±0,19	4,46±0,39
3B	3,59±0,05	1,32±0,05	1,45±0,23	1,96±0,20	4,74±0,35
4B	3,58±0,01	1,33±0,04	1,59±0,09	2,07±0,09	5,00±0,08
5B	3,56±0,01	13,10±0,04	1,51±0,12	2,00±0,12	4,92±0,18
6B	3,65±0,05	1,32±0,04	1,59±0,22	2,07±0,19	5,01±0,30
7B	3,57±0,09	1,33±0,03	1,64±0,20	2,12±0,17	5,08±0,31
8B	3,59±0,03	1,32±0,01	1,77±0,10	2,21±0,09	5,33±0,14
9B	3,61±0,02	1,33±0,01	1,85±0,06	2,28±0,06	5,43±0,08
10B	3,64±0,01	1,31±0,01	1,86±0,09	2,28±0,07	5,49±0,11
11B	3,71±0,02	1,31±0,01	2,00±0,02	2,40±0,01	5,68±0,03

L*: luminosidade; a*: coordenadas cromáticas do eixo horizontal; b*: coordenadas cromáticas do eixo vertical; C*: saturação ou cromaticidade; h: ângulo de tonalidade; 1B: 100% arábica; 2B: 90% arábica; 3B: 80% arábica; 4B: 70% arábica; 5B: 60% arábica; 6B: 50% arábica; 7B: 40% arábica; 8B: 30% arábica; 9B: 20% arábica; 10B: 10% arábica; 11B: 100% robusta.

Tabela 5: Parâmetros médios de cor para pó de café com amostras em torra escura (C).

Amostra	L*(x10)	a*(x10)	b*(x10)	C*(x10)	h (x10)
1C	2,17±0,03	1,08±0,04	0,50±0,03	1,20±0,05	2,49±0,07
2C	2,30±0,07	1,02±0,03	0,22±0,03	1,04±0,03	1,23±0,14
3C	2,58±0,04	0,91±0,01	0,13±0,08	0,92±0,01	0,83±0,05
4C	2,62±0,06	0,91±0,03	0,14±0,08	0,92±0,04	0,90±0,09
5C	2,52±0,15	0,95±0,07	0,20±0,15	0,97±0,07	1,18±0,16
6C	2,59±0,08	0,91±0,05	0,13±0,07	0,92±0,06	0,82±0,37
7C	2,54±0,07	0,94±0,04	0,14±0,07	0,95±0,05	0,83±0,38
8C	2,55±0,07	0,91±0,03	0,24±0,14	0,95±0,05	1,48±0,38
9C	2,65±0,06	0,89±0,04	0,14±0,11	0,91±0,06	0,84±0,10
10C	2,62±0,07	0,93±0,04	0,10±0,01	0,94±0,05	0,62±0,38
11C	2,60±0,04	0,95±0,03	0,16±0,10	0,96±0,03	0,97±0,12

L*: luminosidade; a*: coordenadas cromáticas do eixo horizontal; b*: coordenadas cromáticas do eixo vertical; C*: saturação ou cromaticidade; h: ângulo de tonalidade; 1C: 100% arábica; 2C: 90% arábica; 3C: 80% arábica; 4C: 70% arábica; 5C: 60% arábica; 6C: 50% arábica; 7C: 40% arábica; 8C: 30% arábica; 9C: 20% arábica; 10C: 10% arábica; 11C: 100% robusta.

A Figura 24 ilustra a diferença de cor entre as amostras de uma mesma torra, calculada a partir da equação 3.3. Nela tem-se barras em três cores, azul, vermelho e verde, referentes as torras clara, média e escura, respectivamente. Cada torra foi comparada apenas a sua própria torra.

O eixo y representa a diferença de cor entre duas amostras e o eixo x especifica quais são essas amostras. Por exemplo, na torra clara (barras azuis) a diferença de cor entre as amostras 1 e 2, que representam respectivamente as amostras com 100 e 90% de café arábica, foi de aproximadamente 2,8%. Nas amostras seguintes, 2 até 10, as diferenças não foram superiores à 2%. No entanto, a diferença de cor entre as amostras 11 (café 100%

robusta) e 1 (100% arábica) foi cerca de 7,0%, ou seja, há uma diferença de cor evidente entre as amostras 1 e 11 na torra clara e mesmo que ambas tenham sido submetidas ao mesmo tempo de torra, como descrito na seção 4.1, elas atingiram níveis distintos de torra, possivelmente devido a umidade presente em cada espécie de café.

A mesma análise deve ser feita para torra média (barras vermelha) e torra escura (barras verdes). A maior diferença encontrada na torra média e na torra escura foi entre as amostras 1 e 11, cerca de 6,2 e 5,7% respectivamente.

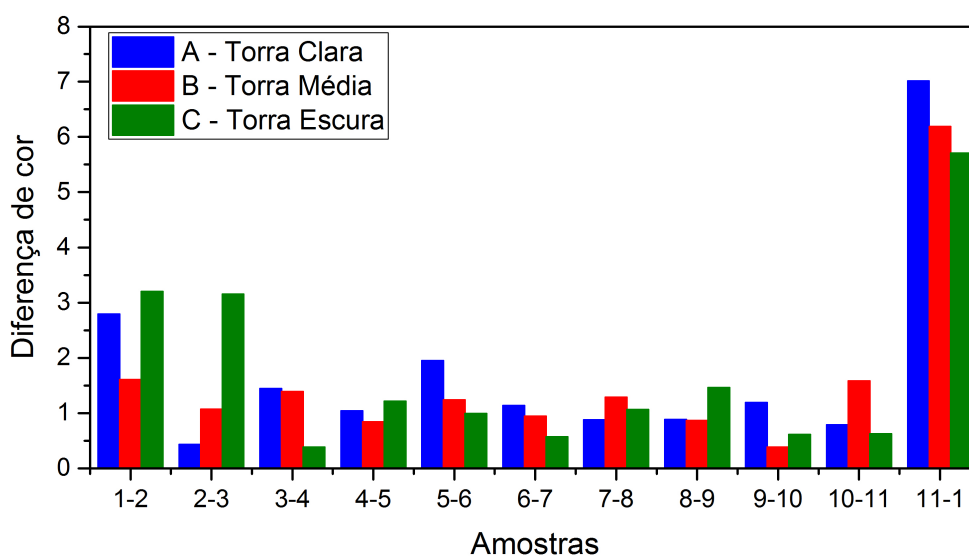


Figura 24: Diferença de cor entre as amostras. 1-2: 100% e 90% arábica; 2-3: 90% e 80% arábica; 3-4: 80% e 70% arábica; 4-5: 70% e 60% arábica; 5-6: 60% e 50% arábica; 6-7: 50% e 40% arábica; 7-8: 40% e 30% arábica; 8-9: 30% e 20% arábica; 9-10: 20% arábica e 10% arábica; 10-11: 10% arábica e 100% robusta; 11-1: 100% robusta e 100% arábica.

5.2 ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO MÉDIO

Os conjuntos de amostras foram submetidos ao FTIR-ATR, com faixa espectral entre 4000 e 400 cm^{-1} a qual foi analisada por possuir vários picos relacionados a distintas ligações moleculares dos componentes do café que interagem com a radiação no infravermelho. Os picos mais relevantes foram encontrados entre 3000 e 2800 cm^{-1} , e entre 1800 e 700 cm^{-1} , sendo cada espectro resultado de medidas em triplicata. Estas amostras são *blends* entre os cafés arábica e robusta. As principais bandas de absorção para cada estão destacados nas Figuras 25, 26 e 27 para cada ponto de torrefação.

A região entre 2800 e 1800 cm^{-1} não apresenta picos de absorção e assim não traz contribuições para estas análises, por isso a região foi removida do espectro e das análises, em conformidade com a literatura [14, 29].

Uma análise comparativa entre os espectros de café, desde arábica puro (1A) até robusta puro (11A) em torra clara, (Figura 25) revela que, independente da espécie de café ou da porcentagem de café robusta presente na amostra, todas as regiões de absorção

foram observados nos três níveis de torra. Este fato é aceitável, uma vez que o café possui os mesmos compostos [5] em ambas as espécies após o processo de torrefação, o que varia são as quantidades desses compostos e por isso, os espectros apresentam variações nas intensidades.

No conjunto de espectros da Figura 25, pode-se observar as principais bandas de absorção em 2921, 2852, 1743, 1646, 1456, 1375, 1240, 1155, 1025 e 811 e 711 cm^{-1} , que estão associados a compostos presentes nos grãos de café [5, 14] e seus respectivos modos vibracionais [14, 39], resumidamente ilustrados na Tabela 6.

Tabela 6: Modos vibracionais e compostos encontrados em cada região de absorção [14].

Região de Absorção (cm^{-1})	Modos de Vibração	Compostos
835-800	Dobramento CH fora do plano	Compostos Fenólicos
1039	Estiramento C-O	Celulose
1099	Estiramento C-O	Carboidratos
1132-1118	Estiramento C-O	Carboidratos
1165-1138	Estiramento C-O	Polissacarídeos, Celulose
1365-1334	Dobramento O-H no plano	Compostos Fenólicos
1589-1504	Dobramento simétrico de NH_3 e Amida II	Proteínas
1645-1610	NH_2 , NH e dobramentos de Amida II e Lactona	Proteínas
1646-1610	NH_2 , NH e dobramentos de amida II	Cafeína
1670-1649	Amida I	Proteínas
1701-1674	Estiramento C=O em ácidos conjugados com anilo	Ácidos Aromáticos e Ácidos Clorogênicos
1720-1705	Estiramento C=O	Ácidos Alifáticos
1759-1722	Estiramento C=O	Lipídeos, Aldeídos
2848-2810	Estiramento simétrico C-H e CH_2	Lipídeos
2877-2850	Estiramento simétrico de C-H e CH_3	Cafeína
2921-2908	Estiramento assimétrico CH_2	Lipídeos
2970-2935	Estiramento assimétrico CH_3	Cafeína

Ao avaliar a intensidade dos picos de absorção da torra clara (Figura 25), pode-se verificar que as maiores intensidades estão relacionadas às amostras de arábica puro ou a misturas com maiores proporções de arábica e que as bandas de absorção diminuem a intensidade na mesma proporção em que é retirado café arábica e adicionado café robusta, exceto em 811 cm^{-1} , onde os espectros não possuem ordenação, e em 1025 cm^{-1} , onde a maior intensidade é proveniente da amostra de café robusta puro (11A).

Os espectros das Figuras 26 e 27 representam as torras média e escura, respectivamente, neles pode-se observar as mesmas bandas de absorção citadas para a torra clara (Tabela 6). O que varia entre as três torras estudadas são as intensidades dos picos, e o comportamento da intensidade quando relacionado à amostras com diferentes concentrações de cada espécie, elucidando o fato que o teor de cada composto é diferente para as espécie [5], pois a intensidade está diretamente relacionada a concentração de moléculas que absorvem em certa região.

As maiores intensidade dos picos de absorção da Figura 26 (torra média) continuam vinculadas as amostras de café arábica ou a misturas com maiores proporções de arábica e as bandas de absorção diminuem a intensidade na mesma proporção em que é retirado café arábica e adicionado café robusta, exceto em 811 e 1025 cm^{-1} , onde as maiores

intensidades estão relacionadas as amostras de café robusta puro (11A). Na região entre 1155 e 1646 cm^{-1} , não é possível ordenar as intensidades de acordo com a concentração de cada espécie.

As bandas de absorção em torra escura (Figura 27), também possuem maiores intensidades associadas as amostras de café arábica puro ou a misturas com maiores proporções de arábica e a intensidade das bandas de absorção diminuem a medida em que o café robusta é adicionado às amostras. No entanto, neste nível de torra, os picos 811, 1025, 1646, e 2921 cm^{-1} perdem completamente o padrão que associa quantidades de robusta e arábica. Na torra escura, em nenhum dos picos de absorção, o café puro robusta (11A) é mais intenso que o arábica.

Autores destacam que as diferenças nos espectros são causadas pela quantidade de cada composto nas espécies, tais como tococromanóis, polifenóis e clorofilas [18], ácidos graxos [9, 18] e os tocoferóis α e β , componentes da vitamina E [10] podem ser utilizados como discriminantes entre as espécies e eles apresentam pequenas variações durante a torra, mas em amostras de café robusta, o grau de degradação é maior, segundo estudos [10], devido ao tamanho menor dos grãos dessa espécie, eles oferecem menor resistência a transferência de calor, facilitando a degradação do composto.

É importante observar que o teor de cafeína só depende da espécie e pode ser considerada uma ferramenta importante para a discriminação espécies, independentemente do grau de torra [7]. Os lipídeos, presentes em quantidades maiores nos grãos de café arábica [5], também são bons discriminantes e apenas uma pequena porcentagem é perdida durante a torra. Em geral, eles exibem uma característica de banda resultante da vibração de carbonila ($\text{C}=\text{O}$), que pode ser identificado nas duas espécies de café. O fato do café arábica apresentar picos mais intensos que o café robusta é justificado pela diferença notória nos teores de lipídeos e composição de polissacarídeos entre as duas espécies [29].

Através de simples análise dos espectros, foi possível demonstrar um comportamento similar entre os diferentes níveis de torra e de espécies. A medida em que se realizou a substituição de arábica por robusta, houve também diminuição na intensidade da maioria dos picos dos espectros. Para validar as observações visuais descritas nesta seção, fez-se necessário uma análise estatística multivariada. Devido a similaridade e complexidade dos espectros foi utilizada a Análise de Componentes Principais (PCA) para verificar se os conjuntos amostrais estudados diferem entre si por suas características espectrais.

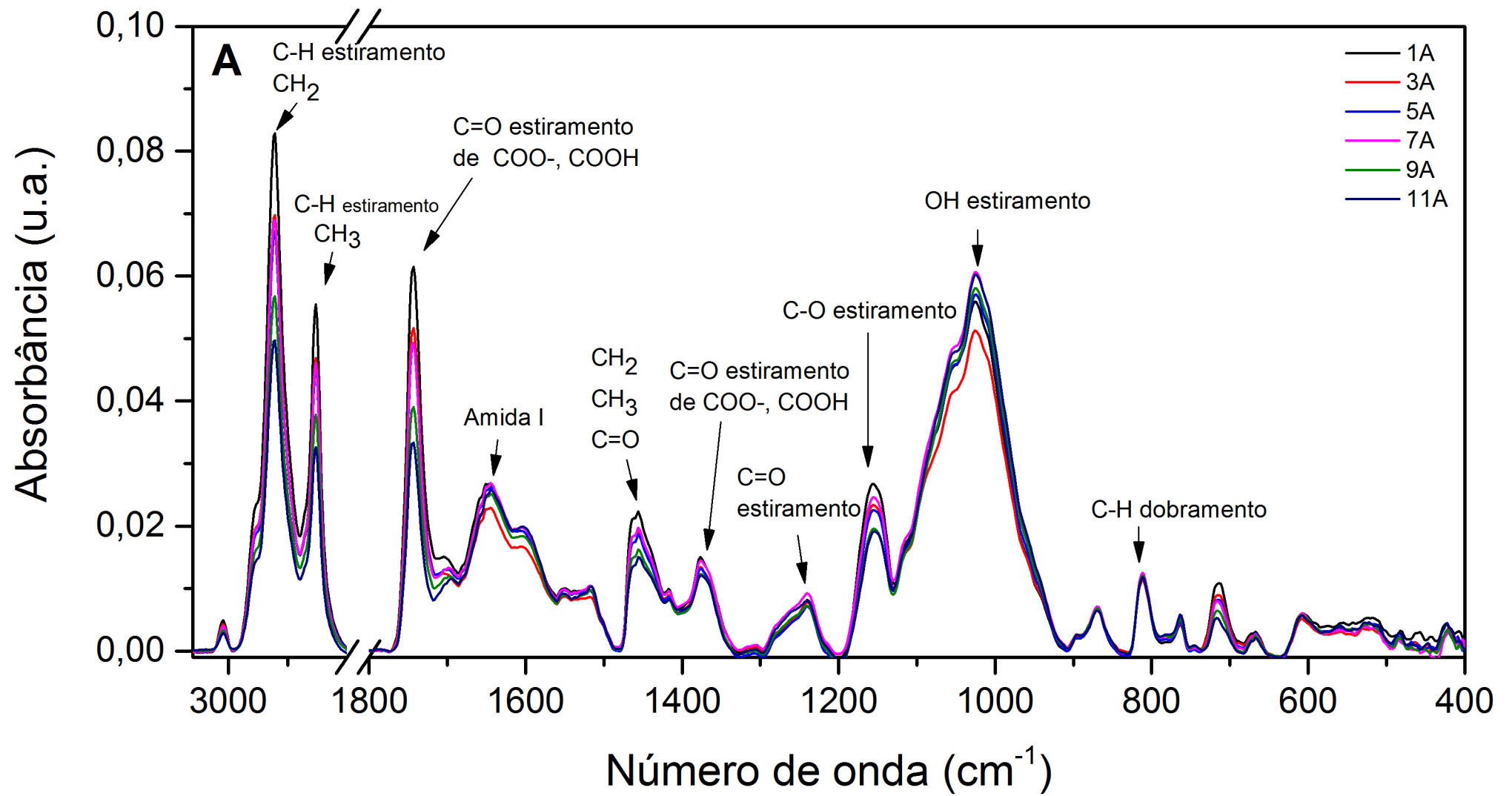


Figura 25: Espectros obtidos no FTIR das amostras submetidas a torra clara (A). Foram exibidos apenas as amostras 1A: 100% arábica, 3A: 80% arábica; 5A: 60% arábica; 7A: 40% arábica; 9A: 20 % arábica; 11A: 100% robusta.

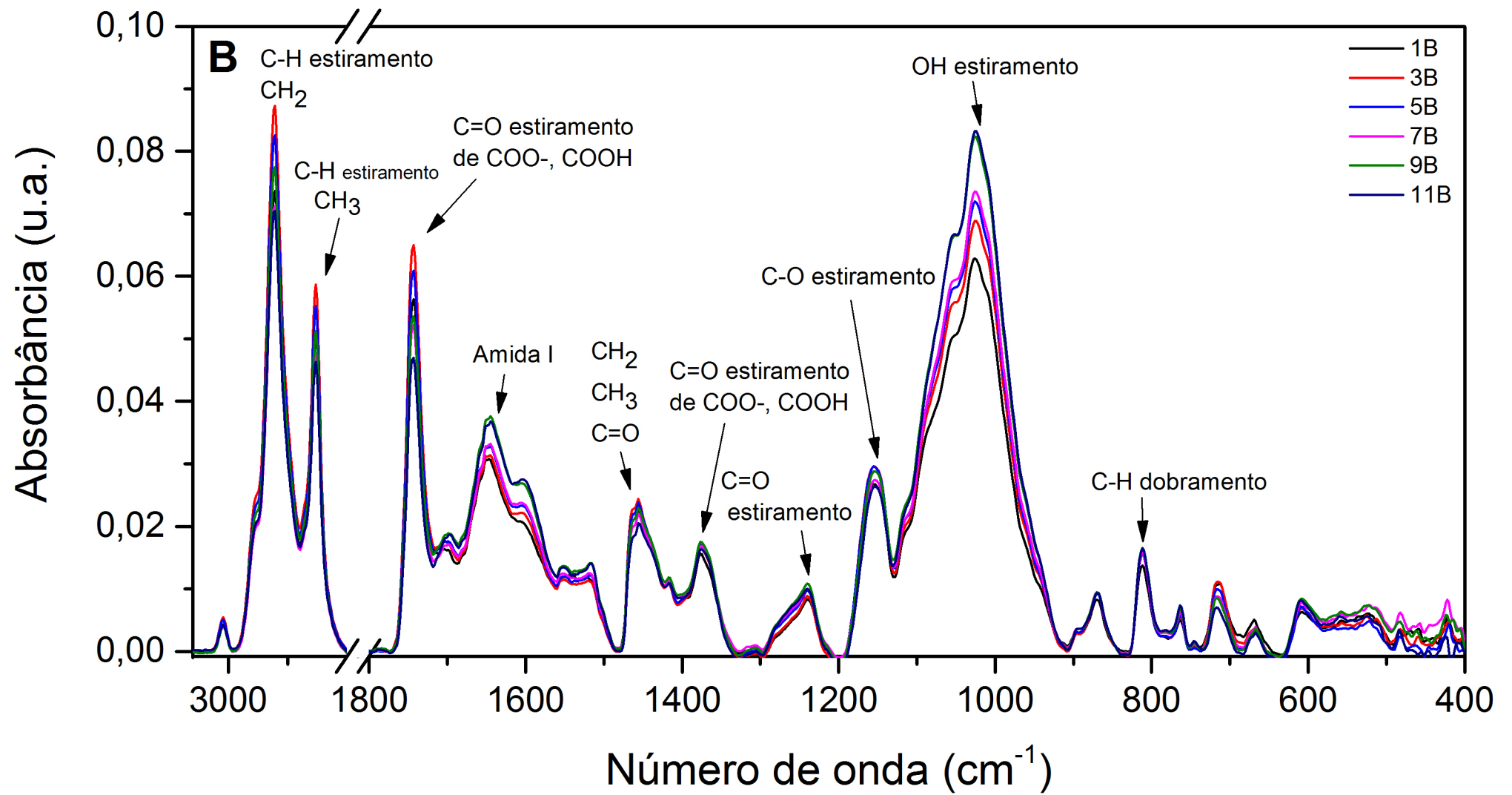


Figura 26: Espectros obtidos no FTIR das amostras submetidas a torra média (B). Foram exibidos apenas as amostras 1B: 100% arábica, 3B: 80% arábica; 5B: 60% arábica; 7B: 40% arábica; 9B: 20 % arábica; 11B: 100% robusta.

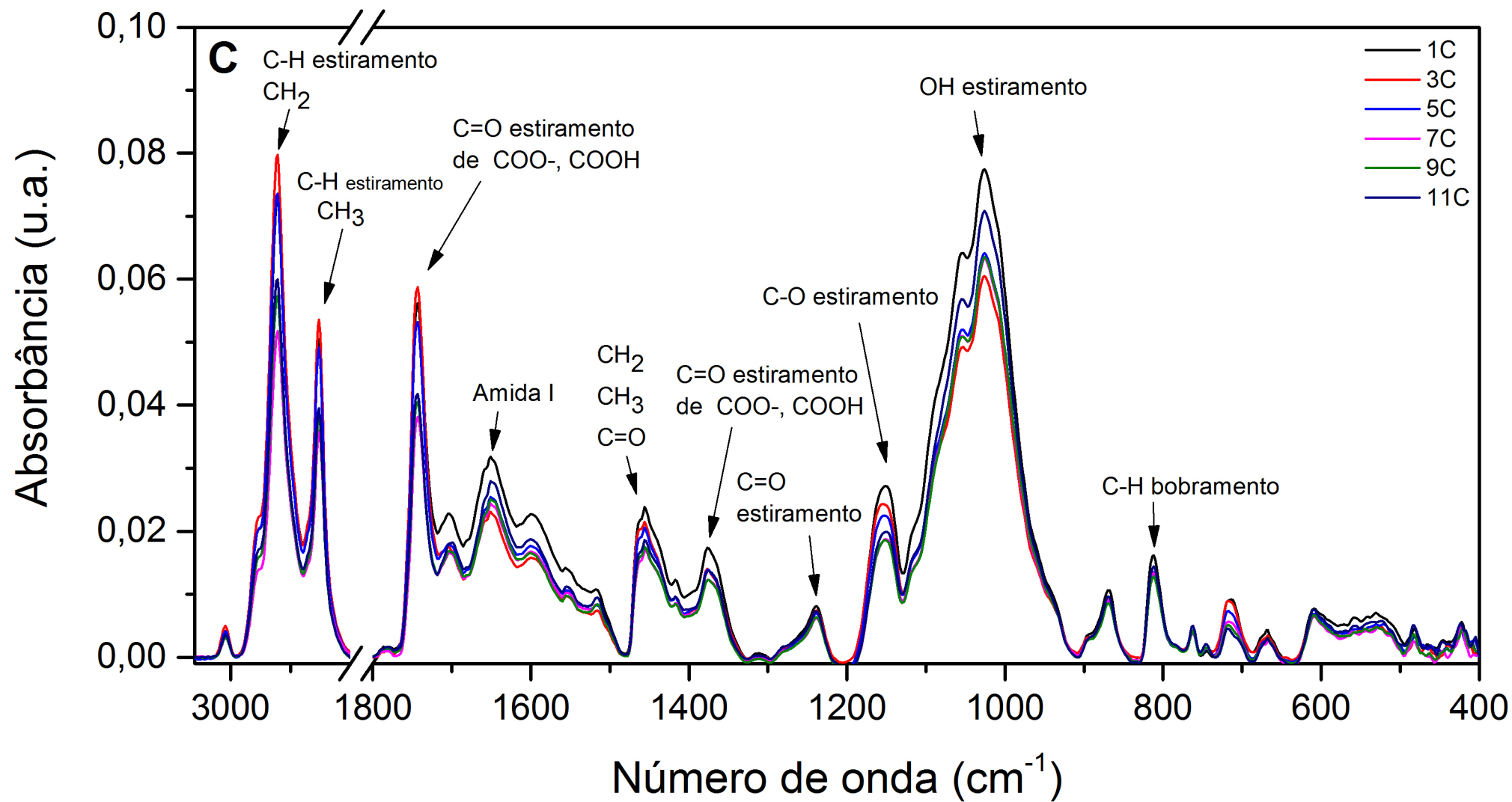


Figura 27: Espectros obtidos no FTIR das amostras submetidas a torra escura (C). Foram exibidos apenas as amostras 1C: 100% arábica, 3C: 80% arábica; 5C: 60% arábica; 7C: 40% arábica; 9C: 20 % arábica; 11C: 100% robusta.

5.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

A análise PCA foi realizada nas 11 amostras distintas, a fim de caracterizar os espectros de cada um dos *blends* nas três diferentes torras, diferenciando as amostras de acordo com sua espécie. Nos três tipos de torra estudados, o primeiro (PC1) e o segundo (PC2) componentes principais, descrevem mais de 75% da variância acumulada dos espectros.

Na torra clara (Figura 28), o PC1 e PC2 descrevem 46,9 e 30,8%, respectivamente, e a correlação PC1 x PC2 explica mais de 75% das alterações observadas entre os espectros das amostras. Na Figura 28 pode-se verificar que os *blends* estão distribuídas preferencialmente nos quadrantes superiores do gráfico. Horizontalmente, as amostras distribuem-se de maneira regular, desde 100% arábica (1A), eixo positivo do PC1, até 100% robusta (11A), eixo negativo do PC1 e, portanto, indicam distinção entre as duas espécies de café.

O espectro da amostra 8 não foi salvo durante as medições, devido a um erro operacional. Posteriormente foi feita a tentativa de reanálise da amostra, mas o espectro apresentou grande diferenças das medidas iniciais, possivelmente devido ao tempo de estocagem da amostra, que sofreu modificações com o tempo, por isso não foi possível utilizar o espectro dessa amostra e optou-se por retirar esta amostra das análises.

Faz-se necessário destacar que o tempo de estocagem causa mudanças significativas nas amostras e que amostras submetidas a torrefação e moagem, mas com diferentes tempos de estocagem não podem ser comparadas.

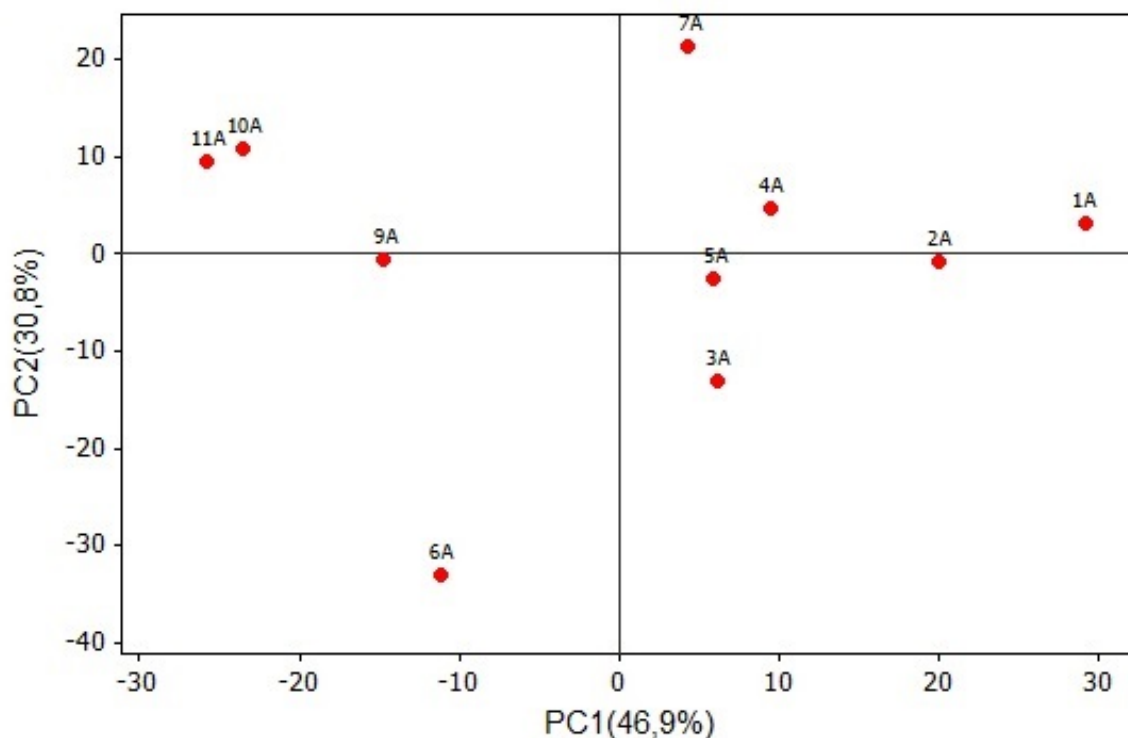


Figura 28: Análise dos componentes principais dos espectros das onze amostras em torra clara (A): Correlação entre as amostras (*scores*). 1A: 100% arábica; 2A: 90% arábica; 3A: 80% arábica; 4A: 70% arábica; 5A: 60% arábica; 6A: 50% arábica; 7A: 40% arábica; 8A: 30% arábica; 9A: 20% arábica; 10A: 10% arábica; 11A: 100% robusta.

Nos *loadings* (Figura 29) observou-se a influência dos números de onda no posicionamento das amostras no gráfico de scores. As amostras preferencialmente robusta são influenciadas por valores que fazem menção a cafeína ($2970-2935\text{ cm}^{-1}$) [14, 29] e a compostos fenólicos ($835-800\text{ cm}^{-1}$), as amostras centrais fazem menção a celulose ($1039, 1165-1138\text{ cm}^{-1}$), carboidratos ($1099, 1132-1118\text{ cm}^{-1}$), polissacarídeos ($1165-1138\text{ cm}^{-1}$), proteínas ($1670-1649, 1645-1610, 1589-1504\text{ cm}^{-1}$) e cafeína ($2877-2850\text{ cm}^{-1}$). Por fim, as amostras preferencialmente arábica, apresentam valores que representam compostos como, a proteína ($1670-1649\text{ cm}^{-1}$), ácidos clorogênicos e aromáticos ($1701-1674\text{ cm}^{-1}$), e de modo bastante intenso a cafeína ($2970-2935, 2877-2850\text{ cm}^{-1}$) e lipídeos ($2921-2908, 2848-2810\text{ cm}^{-1}$) [14]. Todas essas regiões estão descritas na Tabela 6, na seção 5.2.

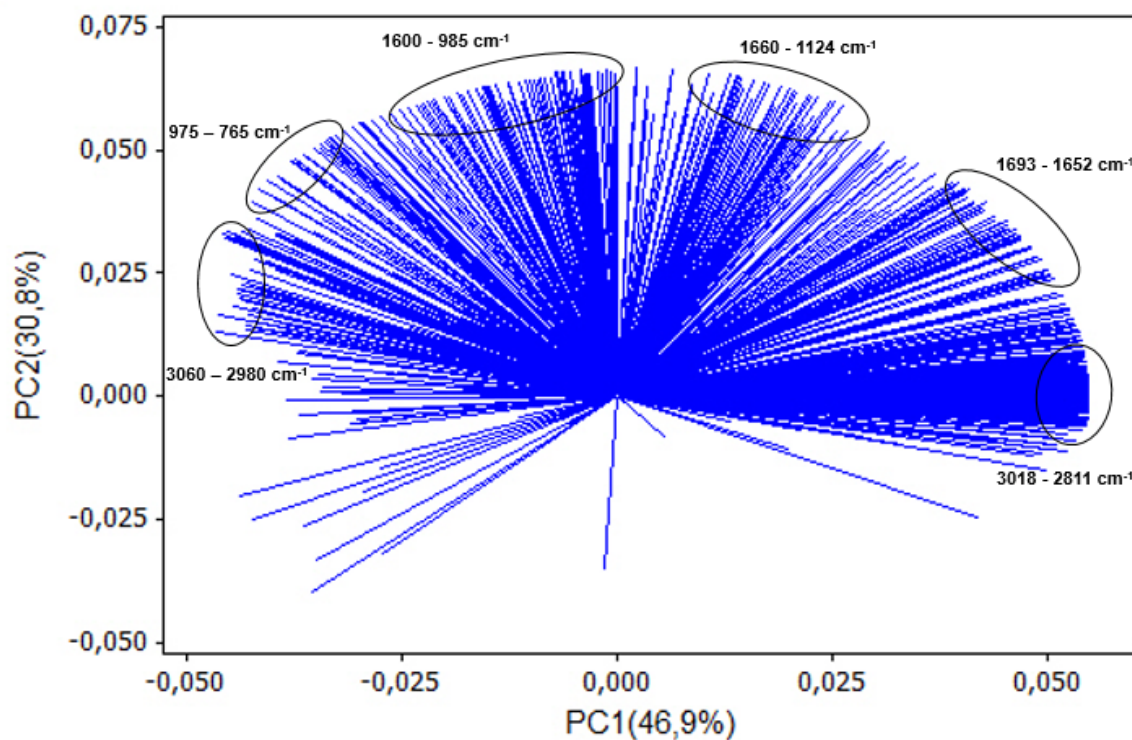


Figura 29: Análise dos componentes principais dos espectros das onze amostras em terra clara (A): Influência dos números de onda (*loadings*).

Na terra média, os *scores* (Figura 30), PC1 e PC2 descrevem 51,2 e 28,8%, respectivamente, e a correlação PC1 x PC2 explica cerca de 80% das alterações observadas entre os espectros das amostras. Neste gráfico, diferente da Figura 28, as amostras distribuíram-se de maneira contrária. Aqui, as amostras preferencialmente arábica estão no quadrante negativo do PC2, e as demais amostras distribuem-se de maneira regular no sentido positivo do eixo do PC1. A mesma inversão ocorre no eixo y. A princípio, este fato é justificável, uma vez que o *software* escolhe a melhor organização dos quadrantes.

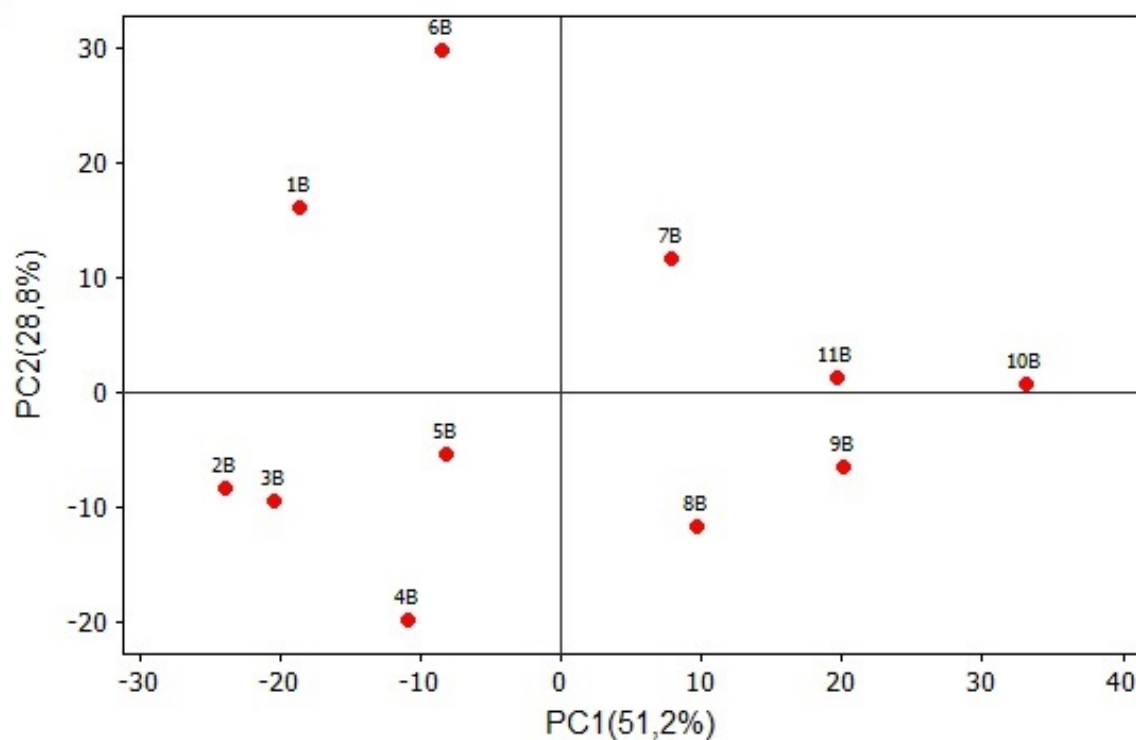


Figura 30: Análise dos componentes principais dos espectros das onze amostras em torra média (B): Correlação entre as amostras (*scores*). 1B: 100% arábica; 2B: 90% arábica; 3B: 80% arábica; 4B: 70% arábica; 5B: 60% arábica; 6B: 50% arábica; 7B: 40% arábica; 8B: 30% arábica; 9B: 20% arábica; 10B: 10% arábica; 11B: 100% robusta.

Contudo, mesmo apresentando comportamento inverso, na Figura 31, as amostras preferencialmente arábica continuam a ser influenciadas por compostos como cafeína, lipídeos e proteínas, as amostras centrais e preferencialmente robusta, por ácidos alifáticos, clorogênicos, cafeína, proteínas, aromáticos, aminoácidos, lipídeos e compostos fenólicos [3, 14, 29]. As regiões de absorção de cada composto estão descritas na Tabela 6, na seção 5.2.

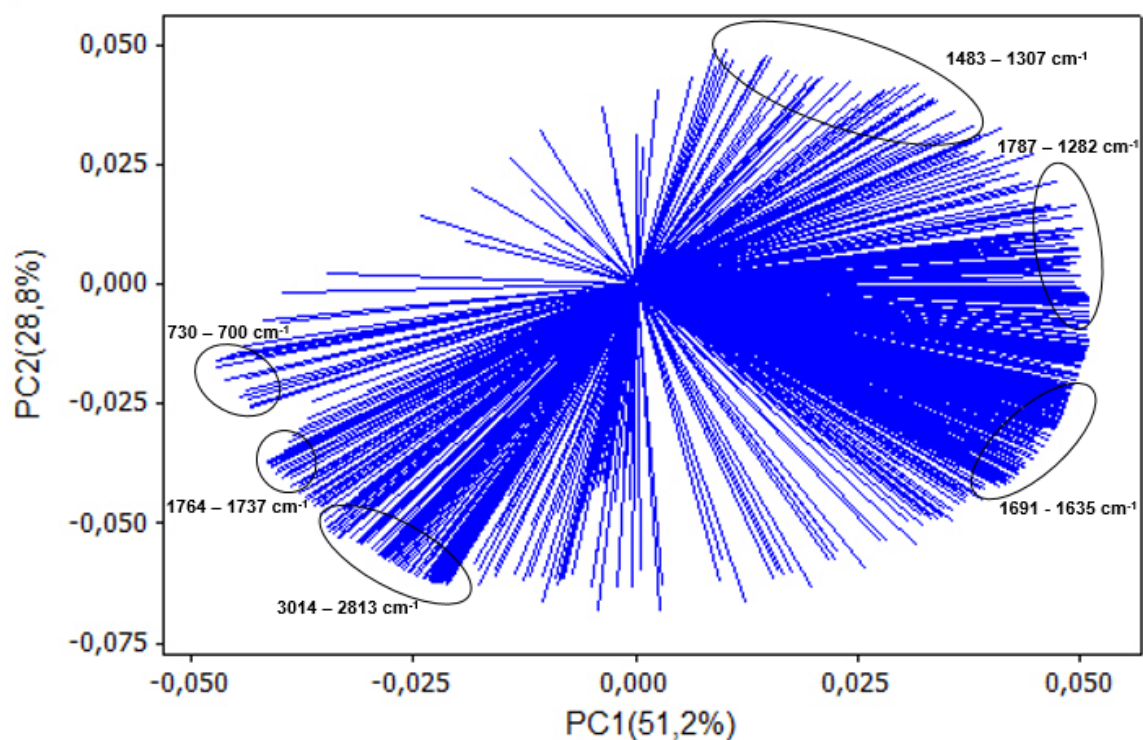


Figura 31: Análise dos componentes principais dos espectros das onze amostras em torra média (B): Influência dos números de onda (*loadings*).

Na torra escura, os *scores* (Figura 32), PC1 e PC2 descrevem 57,7 e 21,9%, respectivamente, e a correlação PC1 x PC2 explica mais de 75% das alterações observadas entre os espectros das amostras. Neste nível de torra, uma porcentagem elevada dos compostos são degradados ou transformados [54], dificultando a distinção entre as espécies de café. Pode-se observar este fato analisando as amostras 1A e 11A, que estão dispostas no mesmo quadrante, ou seja, a correlação entre elas é maior, e indicam que a diferenciação entre café robusta e arábica não é mais tão evidente, como nos casos anteriores.

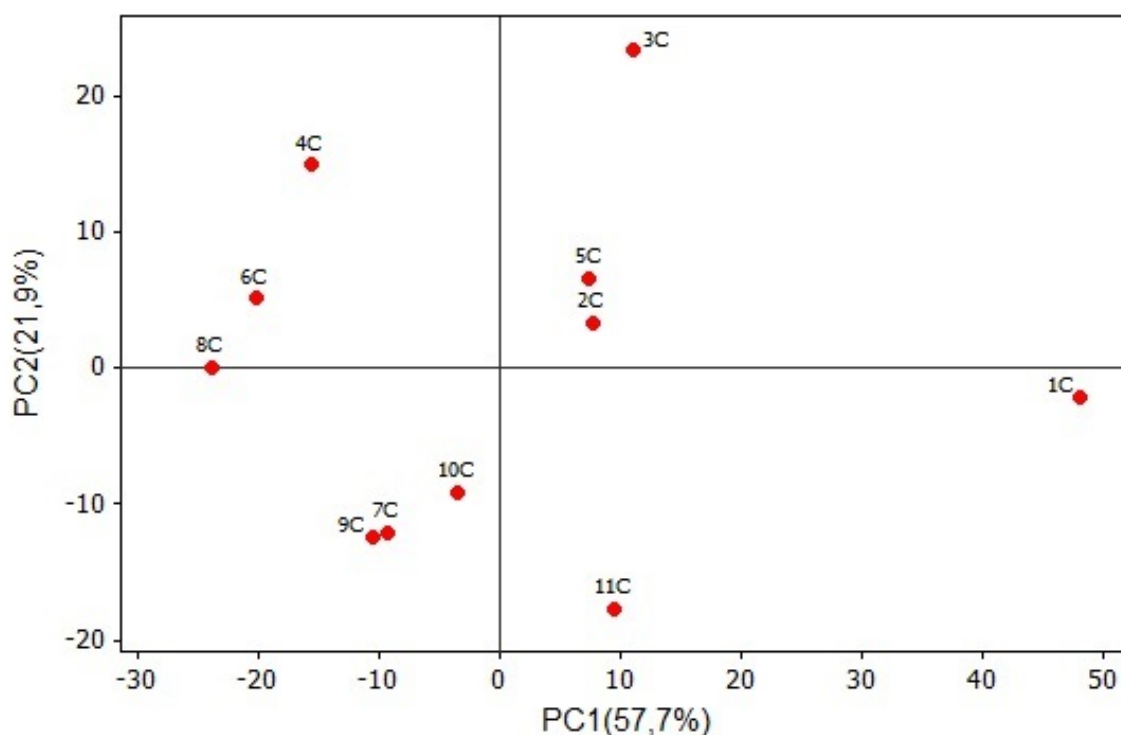


Figura 32: Análise dos componentes principais dos espectros das onze amostras em torra escura (C): Correlação entre as amostras (*scores*). 1C: 100% arábica; 2C: 90% arábica; 3C: 80% arábica; 4C: 70% arábica; 5C: 60% arábica; 6C: 50% arábica; 7C: 40% arábica; 8C: 30% arábica; 9C: 20% arábica; 10C: 10% arábica; 11C: 100% robusta.

Nos *loadings* (Figura 33) ainda observa-se a presença de cafeína e lipídeos [7, 29]. Na região onde encontra-se este compostos, (lado superior do gráfico - Figura 33), estão localizadas as amostras preferencialmente arábica. De acordo com a literatura, degradam menos os compostos, se comparadas as amostras de cafés robusta [29]. As amostras ainda são influenciadas por cetonas, ácidos alifáticos, aromáticos, clorogênicos, proteínas [14, 29], cafeína e aminoácidos, mas não mais de modo definitivo, como nas torras clara e média.

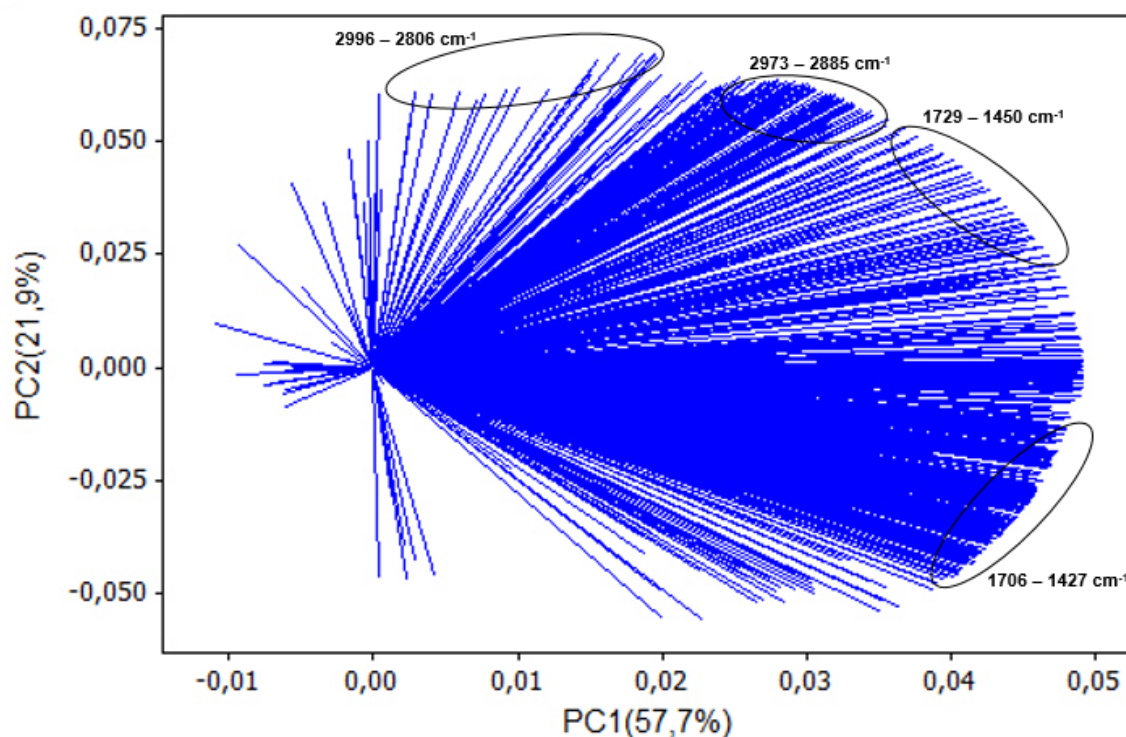


Figura 33: Análise dos componentes principais dos espectros das onze amostras em torra escura (C): Influência dos números de onda (*loadings*).

O fato da torra ser escura pode omitir fraudes entre espécies distintas de café, pois compostos que antes eram discriminantes entre as espécies são perdidos em torras elevadas.

5.4 REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS)

A regressão foi realizada na torra clara (A) para o conjunto de 41 amostras, e os espectros foram divididos em dois subconjuntos, calibração e validação, como mencionado na seção 4.5.

O valor mínimo de fatores, PRESS, exibido pelo método foi igual a 8, ou seja, oito fatores são mais indicados na construção do modelo de regressão PLS para determinar a quantidade de café robusta adicionado nas amostras. A Tabela 7 traz os valores de variância para cada fator, e mostram que a estrutura dominante dos dados, nos eixos X e Y são descritas basicamente pelo primeiro fator.

Tabela 7: Porcentagem de variância para cada fator do modelo PLS.

Nº de fatores	Variância X (%)	Variância Acumulada X (%)	Variância Y (%)	Variância Acumulada Y (%)
1	78,93	78,93	93,91	93,01
2	5,35	84,29	4,00	97,91
3	5,39	89,68	0,91	98,82
4	2,42	92,10	0,33	99,15
5	2,67	94,78	0,11	99,26
6	0,76	95,54	0,25	99,52
7	1,37	96,91	0,06	99,58
8	0,75	97,66	0,08	99,67

Os resultados da calibração podem ser visualizados na Figura 34, que apresenta os valores observados (atuais) *versus* os valores preditos pelo do modelo PLS. Os pontos representam os valores medidos e a reta em vermelho representa a previsão do modelo. O coeficiente de determinação obtido para o modelo foi $R^2 = 0,99669$, valor que representa a variação percentual explicada pelo modelo, ou seja, o modelo explica 99,66% da variação em y.

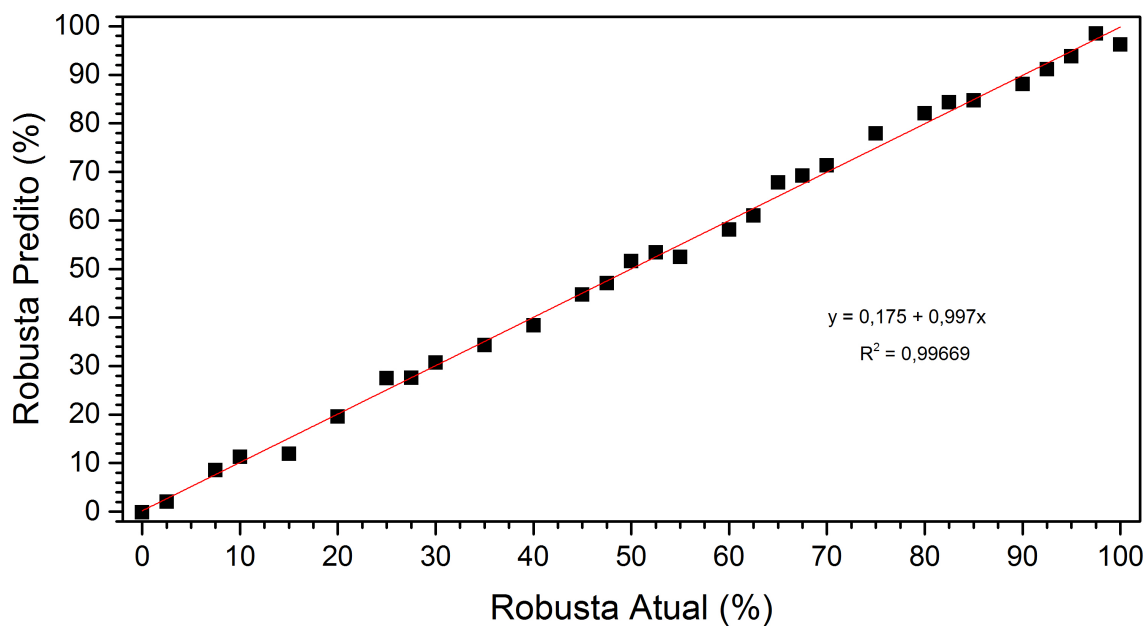


Figura 34: Regressão linear dos valores observados e preditos pelo modelo para a adulteração de café robusta para o conjunto de calibração.

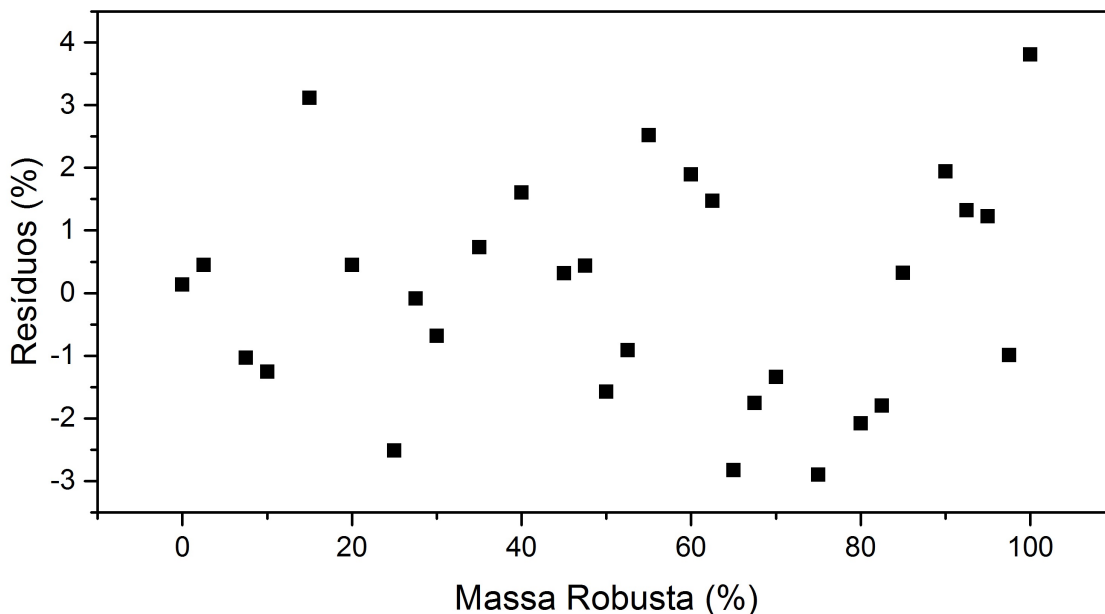


Figura 35: Gráfico de resíduos do conjunto de calibração.

Similarmente, para a validação tem-se a regressão, ilustrada na figura 36. Os pontos pretos também representam os valores medidos, desconhecidos pelo programa e a linha em vermelho representa a previsão do modelo, cuja coeficiente de determinação obtido para o modelo foi $R^2 = 0,96784$, indicando que o modelo explica 96,78% da variação em y .

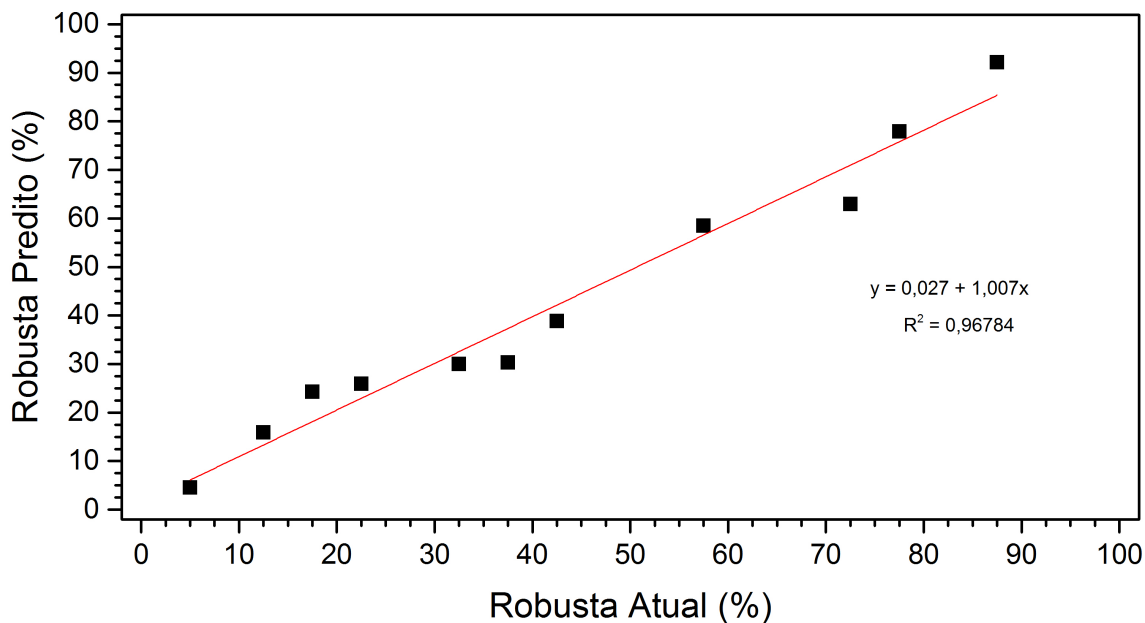


Figura 36: Regressão linear dos valores observados e preditos pelo modelo para a adulteração de café robusta para o conjunto de validação.

Os erros também seguem o princípio da aleatoriedade, como ilustrado na Figura 37.

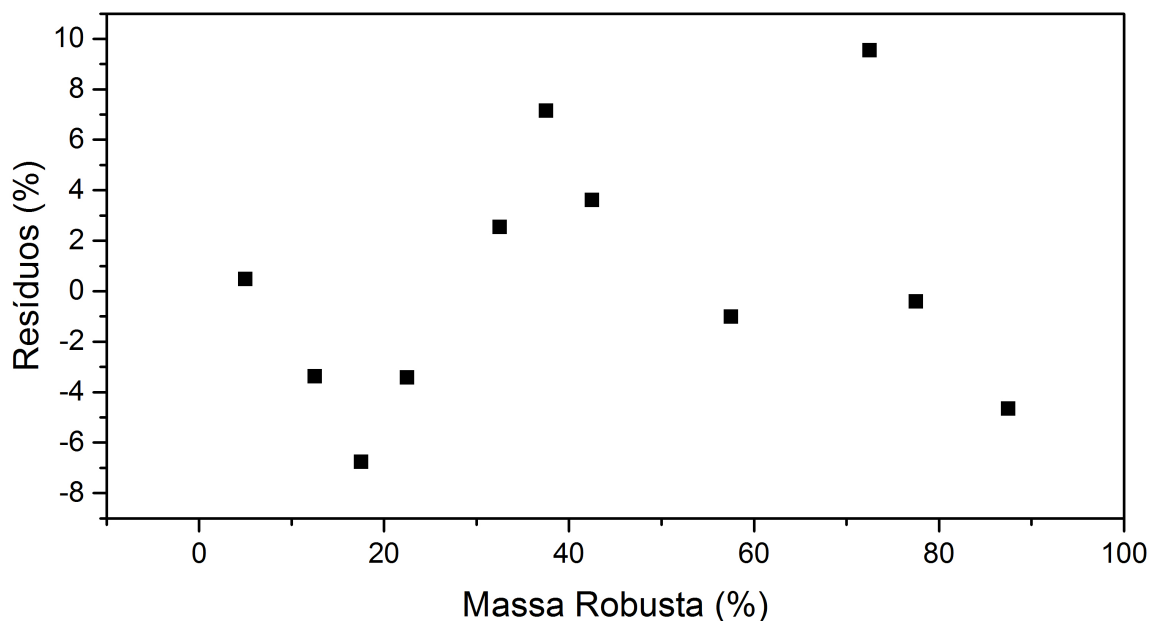


Figura 37: Gráfico de resíduos do conjunto de validação.

É importante observar que temos um erro grande na extremidade superior direita, provavelmente associado a um erro do método, que pode ser reduzido se o número de pontos for maior.

Os resultados gerados pelo modelo são apresentados na tabela 8, com valores do coeficiente de determinação (R^2), raiz quadrada do erro quadrático médio (RMSE), e o erro relativo percentual (RE%) para os conjuntos de dados de calibração e validação.

Tabela 8: Modelo PLS relativo à quantificação de café robusta adicionado nas amostras.

Medidas	Calibração n= 30			Validação n= 11		
	R^2	RMSE	RE	R^2	RMSE	RE
Proporção de Robusta Adicionado	0,99669	1,73067	0,03094	0,96784	4,80044	0,07548

Quanto mais próximo de zero a raiz quadrada do erro quadrático médio (RMSE) e o erro relativo percentual (RE%) estiverem, melhores previsões o modelo fará, pois ele estará bem ajustado. Para melhorar os resultados obtidos, faz-se necessário aumentar o número de medições.

5.5 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Inicialmente, realizou-se uma análise exploratória das possíveis regiões de interesse, fazendo a varredura de toda a faixa da lâmpada (200-400 nm). Nesta etapa, foi realizado um conjunto de medidas iniciais, nas quais buscava-se identificar regiões de maior fluorescência. Assim, alguns comprimentos de onda de excitação foram escolhidos com

base nos espectros que apresentaram maior intensidade de emissão. Os comprimentos de onda de excitação escolhidos para análise e comparação das amostras foram 280 nm, 310 nm e 400 nm.

Na Figura 38 pode-se observar o gráfico de intensidade de emissão *versus* comprimento de onda para diferentes excitações. Para as excitações de 280 nm foram obtidos emissões em 423 nm e 480 nm, já para excitação em 310 nm e 400 nm foram observados emissões em 470 nm e 605 nm, respectivamente. Observou-se também que as excitações em 340 nm e 370 nm não apresentam picos significativos de emissão e por isso foram retirados dos resultados.

É importante destacar que o equipamento possui uma alta sensibilidade de detecção (contagem de fótons), devido a isso pode-se analisar amostras que apresentem baixa intensidade de emissão.

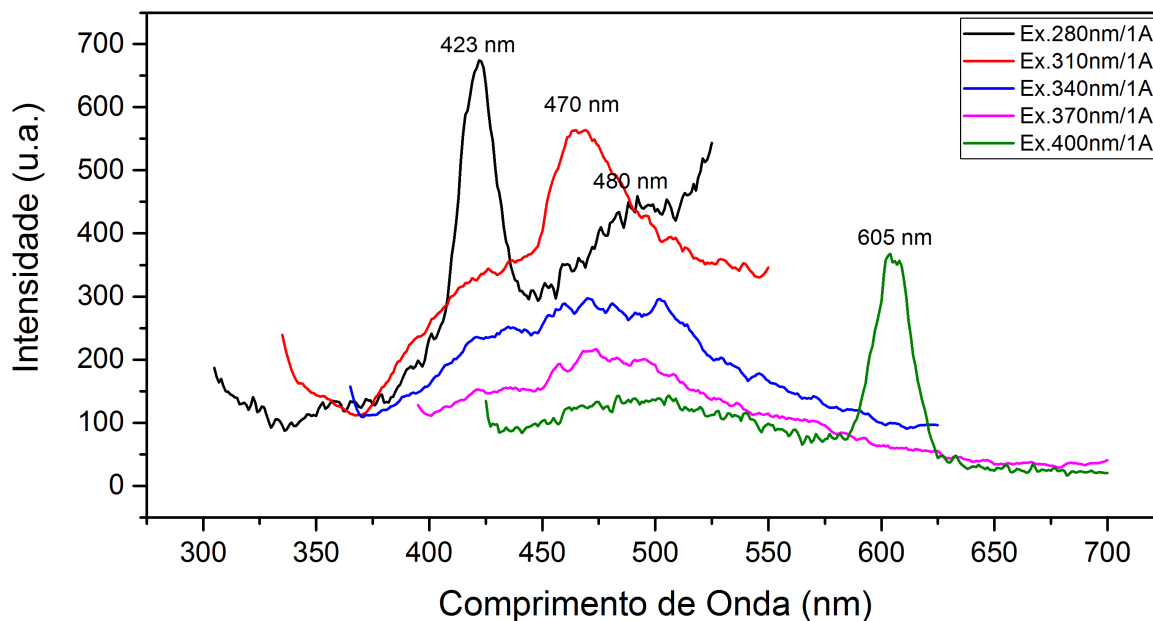


Figura 38: Mapa de Emissão das amostras de café arábica puro (1A) excitadas em diferentes comprimentos de onda.

Após a realização da análise exploratória para identificação dos comprimentos de onda de excitação que geravam melhores emissões para as amostras de café, iniciou-se as medidas para o conjunto de amostras em torra clara, com amostras de café arábica e robusta puro e variações de suas misturas.

Os comprimentos de onda de excitação e emissão observados anteriormente foram utilizados, e todas as amostras do conjunto foram submetidas ao mesmo procedimento de medidas. As Figuras 39, 40 e 41 mostram os resultados obtidos para as excitações em 280 nm, 310 nm e 400 nm, respectivamente. Cada figura compara a intensidade de emissão para diferentes amostras.

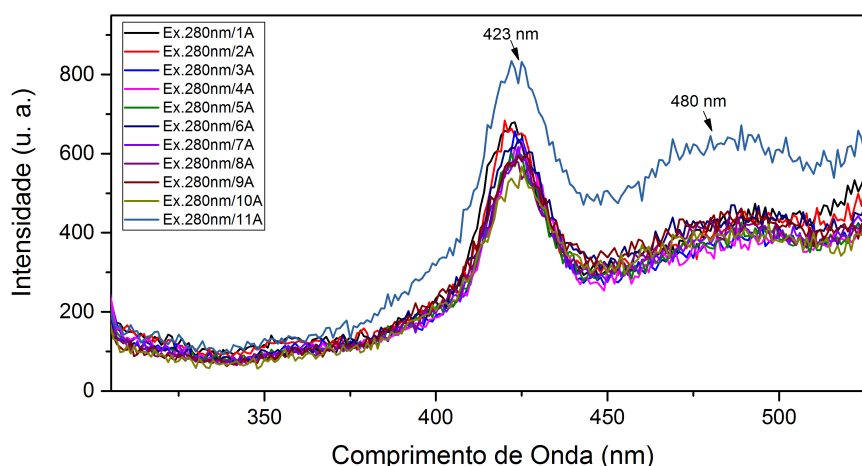


Figura 39: Mapa de Emissão do conjunto de amostras em torra clara (Tabela2) excitadas em 280 nm.

Estudos sobre a cafeína pura, revelam que ela apresenta máxima absorção em 272 nm e emissão em 397 nm [18]. No presente trabalho, ao excitar as amostras em 280 nm, foram observados bandas de emissão em 423 e 480 nm. Assim, há indícios que a fluorescência observada na Figura 39 está relacionada a presença de cafeína nas amostras.

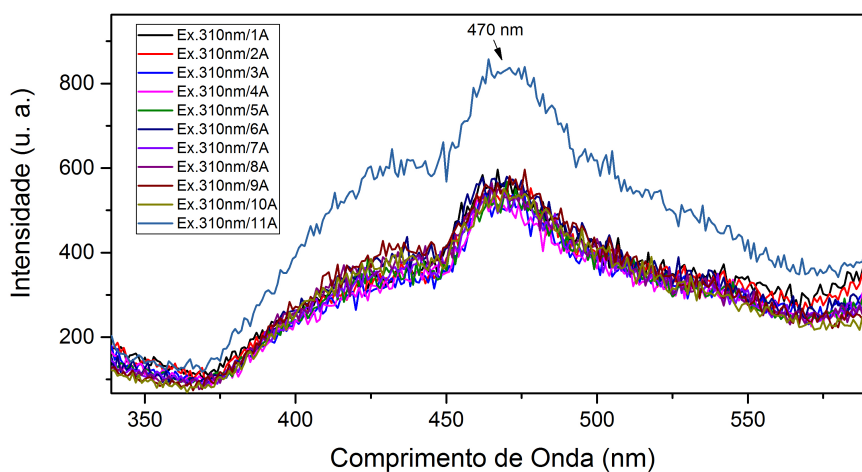


Figura 40: Mapa de Emissão do conjunto de amostras em torra clara (Tabela2) excitadas em 310 nm.

Também foram observadas emissões em torno de 470 nm, ao excitar as amostras em 310 nm. Nesta região há indícios que o fluoróforo responsável pela fluorescência, ilustrado na Figura 40, seja o ácido clorogênico ou ácido 5-cafeoilquinico (5-CQA), que puro, apresentam máxima absorção em 324 nm e emissão em 455 nm [55].

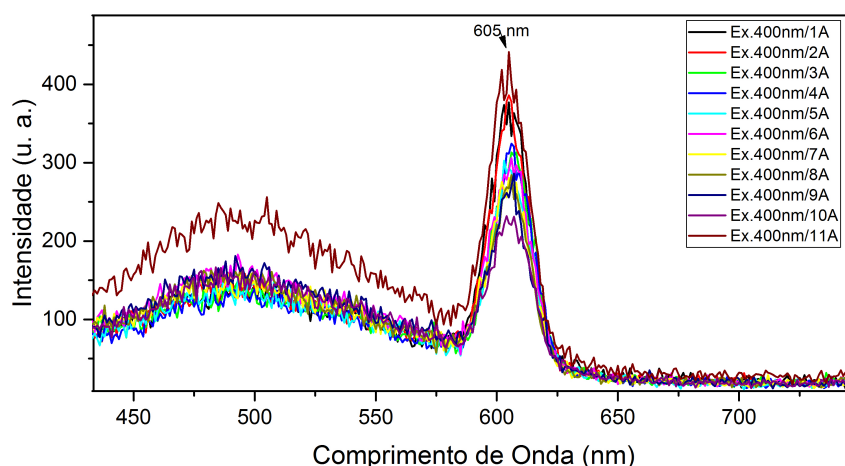


Figura 41: Mapa de Emissão do conjunto de amostras em torra clara (Tabela2) excitadas em 400 nm.

Por fim, a Figura 41 ilustra a excitação em 400 nm e emissão em 605 nm. O candidato a fluoróforo neste caso, é a clorofila, cuja absorção ocorre em 430 nm e emissão em 685 nm.

Nos três casos, os conjuntos de absorção e emissão encontrados apresentam defasagens em relação aos candidatos a fluoróforos da literatura. Este fato é justificável e esperado, uma vez que os resultados da literatura são referentes aos compostos puros. Já as amostras de café, possuem inúmeras compostos que podem interferir nos resultados finais de fluorescência.

Em todas as excitações analisadas, a amostra 11A, que representa o café 100% robusta afasta-se nitidamente das misturas e do café 100% arábica. Estes resultados sugerem que amostras de robusta contenham fluoróforos, sensíveis a diferentes comprimentos de onda ou que algum deles sofre supressão quando as amostras são misturadas [56]. Por exemplo, 16-O-metilcafestol, típico do café robusta e ausente no café arábica [18]. A presença desse composto nas amostras de café robusta indicam que misturas com maiores quantidades de café arábica irão distanciar-se do café robusta puro.

Autores destacam que compostos como os tococromanóis, clorofilas [18], ácidos graxos [9, 18] e os tocoferóis α e β , componentes da vitamina E [10, 57] são bons discriminantes entre as espécies e portanto podem apresentar emissões distintas por estarem presentes em quantidades distintas nas espécies. Além disso, as variações de intensidade nos espectros, confirmam que há quantidades diferentes de cada composto de uma espécie para outra, como era esperado [5].

Alguns trabalhos utilizam a técnica Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do inglês, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) que faz a separação de compostos da amostra analisada, também pode detectar fluorescência, através do acoplamento de um detector ao equipamento, escolhido de acordo com o interesse do pesquisador, para

detectar a presença de diversos compostos em amostras de café.

Por exemplo, os tocoferóis, responsáveis por boa parte das propriedades antioxidantes presentes no café, foram investigados por essa técnica [10]. Nesta pesquisa, as amostras foram excitadas em 290 nm, com o intuito de detectar tais compostos, presentes na vitamina E. Segundo eles, 90% dos tocoferóis permanecem após a torra, com exceção do β -tocoferol em robustas, cuja degradação média foi de 25%. Por fim, o estudo conclui que a quantidade de vitamina E presente no café arábica é maior que no café robusta. Tais compostos estão diretamente relacionados a quantidade de lipídeos nos grãos de café, sendo que o café arábica atinge quase o dobro da quantidade de lipídeos do robusta.

Os resultados desta seção mostraram maiores intensidades para os grãos de café robusta, independente da excitação, indicando que as emissões observadas não façam referência a lipídeos, uma vez que eles estão presentes em maiores quantidades no café arábica [10].

Outro estudo evidencia a importância dos ácidos graxos como discriminantes para as espécies de café [9]. A cromatografia gasosa foi a técnica utilizada para a separação dos compostos e quantificação de diferentes ácidos como o mirítico, oléico, linoléico e linolênico. Deles, o ácido oléico encontrado no café robusta, representa cerca de 12,3%, e no café arábica, 8,3%. Já o ácido linolênico está presente no café robusta em menor quantidade, 0,9%, enquanto no café arábica 1,5%.

Um fator importante é que nos ácidos graxos não há diferenças significativas entre as amostras verde e torrada [9]. No entanto, este trabalho não cita o comprimento de onda de excitação e emissão em que foram encontrados estes compostos, o que inviabiliza comparações, mas como o ácido oléico está presente no café robusta em maiores proporções, levando a indícios que ele pode ser um dos fluoróforos procurados.

Usualmente faz-se o mapa de emissão da amostra numa técnica de absorção, a fim de averiguar a amostra e identificar suas moléculas constituintes. Em seguida, identifica-se qual molécula é referente a um comprimento de onda de absorção e excita-a neste mesmo local, para investigar a emissão da molécula. Assim, amostras de café foram submetidas ao UV-Vis e a cafeína encontra máxima absorção em torno de 275 nm e em bandas em torno de 290 e 320 nm estão relacionadas a presença de ácidos clorogênicos e a trigonelina [18], valores próximos aos escolhidos por este trabalho.

As análises de fluorescência são um estudo preliminar, por este motivo realizou-se as medidas nesta técnica apenas para a torra clara, onde as diferenças são mais evidentes, devido a maior presença de compostos. Posteriormente, pretende-se ampliar os resultados para as demais torras.

5.6 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO

Na fluorescência resolvida no tempo, analisou-se a curva de decaimento da intensidade de fluorescência, após a detecção de um fóton num intervalo de tempo. Na excitação de 280 nm optou-se por analisar a emissão em 480 nm, pois mesmo com pico em 423 nm mais intenso, ele não apresentava diferenças no tempo de vida para amostras distintas. As outras excitações foram 310 nm e 400 nm, com emissões em 470 e 605 nm, respectivamente, como já mencionado anteriormente na seção 5.5.

Os decaimentos estão ilustrados nas Figuras 42, 43 e 44.

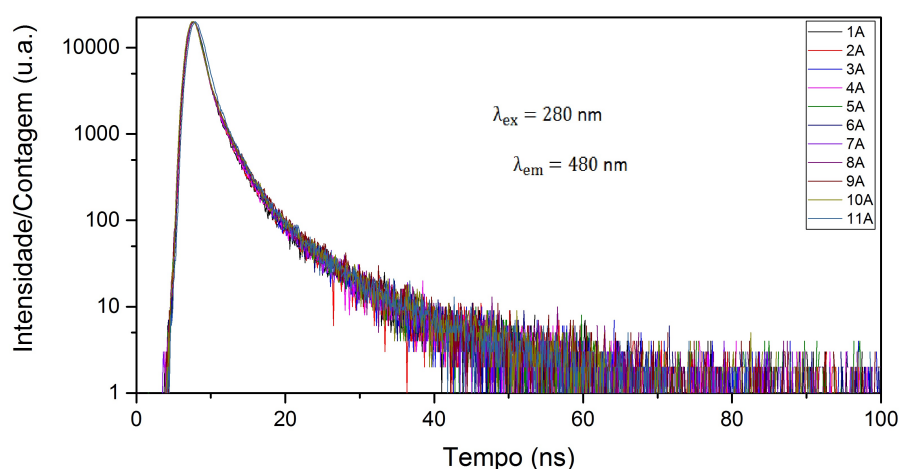


Figura 42: Curvas de decaimento de fluorescência resolvida no tempo das amostras de café com diferentes proporções de café arábica e robusta (1A: 100% arábica; 2A: 90% arábica; 3A: 80% arábica; 4A: 70% arábica; 5A: 60% arábica; 6A: 50% arábica; 7A: 40% arábica; 8A: 30% arábica; 9A: 20% arábica; 10A: 10% arábica; 11A: 100% robusta.), com excitação em 280 nm e emissão em 480 nm.

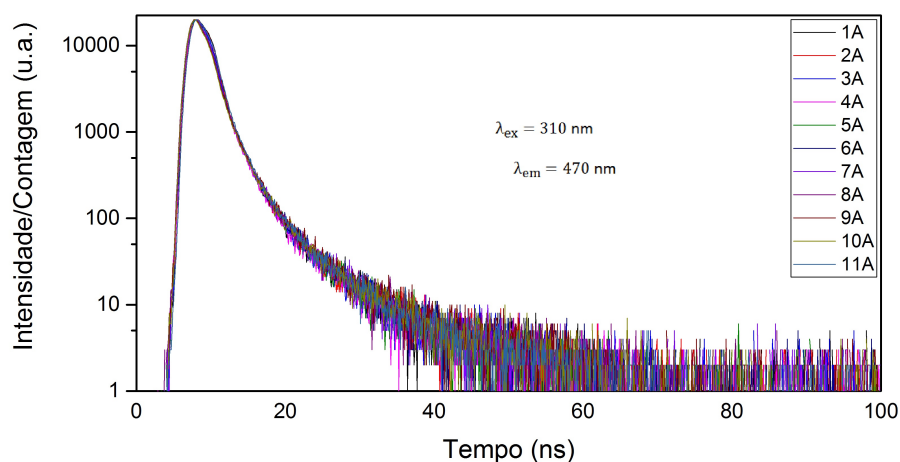


Figura 43: Curvas de decaimento de fluorescência resolvida no tempo das amostras de café com diferentes proporções de café arábica e robusta (1A: 100% arábica; 2A: 90% arábica; 3A: 80% arábica; 4A: 70% arábica; 5A: 60% arábica; 6A: 50% arábica; 7A: 40% arábica; 8A: 30% arábica; 9A: 20% arábica; 10A: 10% arábica; 11A: 100% robusta.), com excitação em 310 nm e emissão em 470 nm.

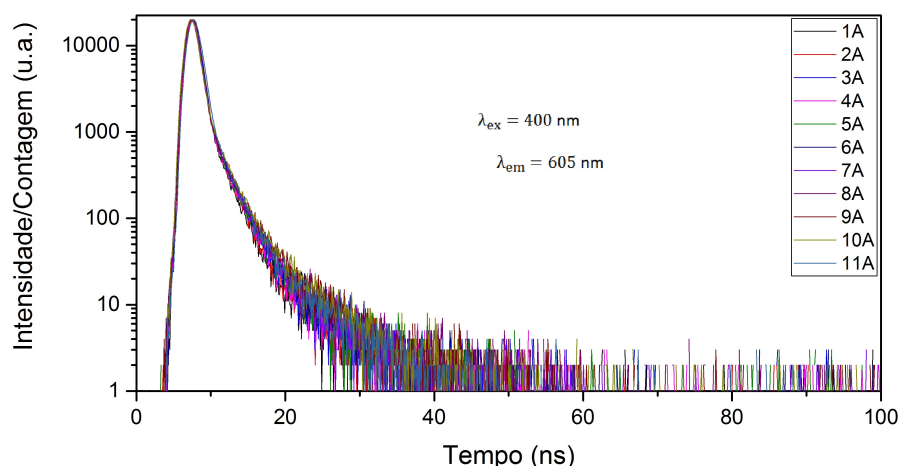


Figura 44: Curvas de decaimento de fluorescência resolvida no tempo das amostras de café com diferentes proporções de café arábica e robusta (1A: 100% arábica; 2A: 90% arábica; 3A: 80% arábica; 4A: 70% arábica; 5A: 60% arábica; 6A: 50% arábica; 7A: 40% arábica; 8A: 30% arábica; 9A: 20% arábica; 10A: 10% arábica; 11A: 100% robusta.), com excitação em 400 nm e emissão em 605 nm.

Para a excitação em 280 nm, os decaimentos foram bem ajustados à três parâmetros (Tabela 9). Nas excitações em 310 nm e 400 nm, dois parâmetros foram suficientes para bons ajustes, Tabelas 10 e 11, respectivamente. Os parâmetros são ajustados pela equação 4.1 e foram obtidos quando as amostras foram submetidas às excitações de 280 nm, 310 nm e 400 nm, onde foram analisados os tempos de vida de decaimento de suas respectivas emissões (480 nm, 470 nm e 605 nm).

As medidas foram realizadas em todos os *blends* da torra clara (A), tendo como resposta um gráfico de intensidade de emissão *versus* tempo.

O fato das amostras de café possuírem emissões em diferentes comprimentos de onda e tempos de vida diferentes, está diretamente relacionado com a presença de diferentes moléculas e tipos de ligações moleculares nas amostras. Além disso, o comportamento de decaimento de uma excitação específica pode conter informações referentes a quebra molecular [56]. O número de tempos de vida associados a uma emissão estará relacionado ao número de compostos que estão interagindo para ocorrer emissão. Dessa forma é interessante analisar separadamente os valores de tempo de vida de emissão, dados pelo ajuste da curva exponencial. A média dos tempos de vida (equação 4.1) também fornecem valores importantes e que merecem ser estudados [51–53].

Na tabela 9, referente à excitação em 280 nm e emissão em 480 nm, pode-se observar um indicativo da diferença entre as espécies de café. Nota-se no primeiro tempo de vida (τ_1) que a diferença entre as duas espécies é aproximadamente 19%. Já a diferença entre um café 100% robusta e um *blend* 50% é superior a 30%. Quando analisou-se a diferença entre o 100% arábica e o *blend*, nota-se uma variação de 16%.

As mudanças observadas nos valores de τ_1 são um indicativo de que há compostos

presentes no café que variam com as espécies. Esses compostos, quando identificados e bem caracterizados podem ser bons indicadores na avaliação de pureza e na identificação da concentração de certa espécie em um *blend*.

É interessante notar que os tempos de vida diminuem de 100% arábica até próximo do *blend* de 50%, em seguida voltam crescer até tornarem-se maiores do que o valor observado na amostra 100% arábica, indicando que a amostra capaz de emitir por mais tempo é a composta apenas pela espécie robusta. Este fato indica também uma maior proximidade entre os valores observados nos *blends* e a amostra de arábica pura.

Na Tabela 10, referente à excitação em 310 nm e emissão em 470 nm, também foi possível verificar a diferença entre as espécies. No primeiro tempo de vida a diferença apresentada é cerca de 24% e a tendência dos *blends* em se aproximarem da amostra 100% arábica também é mais evidente. A diferença no tempo de vida τ_1 entre a amostra 100% arábica e o *blend* de 50% é aproximadamente 6%, mas entre 50% a 100% robusta a diferença é superior a 18%. Neste caso, o comportamento observado foi análogo ao anterior, onde os tempos também diminuem até 50% e voltam a crescer, à medida que maiores quantidades de robusta são acrescidas nos *blends*.

Por fim, a Tabela 11, referente à excitação em 400 nm e emissão em 605 nm, exibe comportamento análogo aos demais. No entanto, a diferenciação entre as espécies no primeiro tempo de vida é menor comparado as outras excitações, cerca de 15% e ainda menor no τ_2 (0,5%). Mesmo assim, as amostras de arábica se aproximam dos *blends* com diferença de 18%. Em contrapartida, quando comparado o *blend* de 50% e a amostra 100% robusta observa-se variação superior a 30%.

Analisando de modo geral o decaimento para as três excitações, pode-se verificar que o primeiro tempo de vida (τ_1) nas excitações 280 e 310 nm e (τ_2) na excitação em 400 nm são bons indicadores para identificar a qual espécie uma dada amostra se refere, desde que a mesma possa ser comparada a uma amostra que se saiba a origem, ou seja, por enquanto, faz-se necessário um método comparativo para obtenção dos resultados.

As intensidades médias do tempo de vida, $\langle \tau \rangle$, calculadas para as três excitações são apresentadas nas Tabelas 9, 10 e 11. Para a excitação/emissão (280/480 nm) apresentada na Tabela 9, os menores tempo de vida de vida médio observados foram 3,02 e 3,01 ns, para as amostras 100% arábica e 90% arábica, respectivamente, e o tempo de vida médio mais longo foi 3,33 ns, observado para a amostra 40% arábica. Ao comparar o tempo de vida médio das amostras puras (1A-100% arábica e 11A-100% robusta), observou-se a diferença de apenas 3,51%.

Para a excitação/emissão (310/470 nm), Tabela 10, o maior tempo de vida média 2,88 ns foi observado para a amostra 9A (20% arábica) e o menor tempo de vida média de 2,46 ns para a amostra 11A (100 % robusta). A diferença de tempo de vida média entre

Tabela 9: Coeficientes obtidos através da equação de ajuste referente à 280/480 nm (excitação/emissão) para o conjunto de amostras em torra clara (A).

Parâmetros	1A*	2A*	3A*	4A*	5A*	6A*	7A*	8A*	9A*	10A*	11A*
τ_1 (ns)	0,57 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,57 ± 0,01	0,69 ± 0,01
τ_2 (ns)	2,17 ± 0,06	2,02 ± 0,05	2,01 ± 0,03	2,00 ± 0,05	2,10 ± 0,05	2,03 ± 0,04	2,20 ± 0,05	2,14 ± 0,05	2,06 ± 0,04	2,15 ± 0,05	2,42 ± 0,07
τ_3 (ns)	7,7 ± 0,2	7,3 ± 0,2	7,3 ± 0,02	7,3 ± 0,2	7,7 ± 0,2	7,5 ± 0,2	8,1 ± 0,2	7,7 ± 0,2	7,5 ± 0,2	7,8 ± 0,2	8,2 ± 0,2
$\langle \tau \rangle$	3,02	3,01	3,09	3,11	3,24	3,28	3,33	3,28	3,32	3,31	3,13
A	0,41	0,45	0,48	0,45	0,45	0,48	0,44	0,50	0,51	0,48	0,38
B_1	0,127 ± 0,001	0,193 ± 0,002	0,192 ± 0,061	0,194 ± 0,002	0,188 ± 0,002	0,200 ± 0,002	0,188 ± 0,002	0,181 ± 0,002	0,181 ± 0,051	0,171 ± 0,002	0,155 ± 0,001
B_2	0,012 ± 0,001	0,015 ± 0,001	0,017 ± 0,001	0,017 ± 0,001	0,063 ± 0,001	0,068 ± 0,001	0,016 ± 0,001	0,017 ± 0,001	0,019 ± 0,001	0,018 ± 0,001	0,448 ± 0,001
B_3	0,0007 ± 0,0007	0,0008 ± 0,0008	0,0010 ± 0,0009	0,0009 ± 0,0008	0,0008 ± 0,0007	0,0009 ± 0,0007	0,0007 ± 0,0006	0,0009 ± 0,0007	0,0010 ± 0,0008	0,0009 ± 0,0008	0,0007 ± 0,0007
β_1 (%)	77,25	72,79	70,60	70,78	70,63	67,81	71,02	69,43	66,60	68,10	75,46
β_2 (%)	18,82	22,73	24,70	24,54	24,72	27,21	24,69	25,81	28,03	27,01	20,64
β_3 (%)	3,93	4,51	4,70	4,68	4,65	4,97	4,29	4,76	5,37	4,89	3,90
χ^2	0,95	1,05	1,04	0,98	0,99	0,91	0,95	1,03	1,02	1,04	0,95

Tabela 10: Coeficientes obtidos através da equação de ajuste referente à 310/470 nm (excitação/emissão) para o conjunto de amostras em torra clara (A).

Parâmetros	1A*	2A*	3A*	4A*	5A*	6A*	7A*	8A*	9A*	10A*	11A*
τ_1 (ns)	0,44 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,58 ± 0,01
τ_2 (ns)	5,75 ± 0,08	5,41 ± 0,07	5,08 ± 0,06	5,01 ± 0,06	4,95 ± 0,05	4,92 ± 0,05	4,90 ± 0,05	4,89 ± 0,05	4,88 ± 0,05	4,77 ± 0,05	5,09 ± 0,06
$\langle \tau \rangle$	2,72	2,70	2,66	2,68	2,76	2,75	2,83	2,84	2,88	2,83	2,46
A	0,23	0,31	0,32	0,41	0,36	0,43	0,47	0,49	0,52	0,50	0,27
B_1	0,212 ± 0,004	0,205 ± 0,04	0,200 ± 0,004	0,202 ± 0,005	0,195 ± 0,004	0,179 ± 0,004	0,193 ± 0,005	0,182 ± 0,004	0,173 ± 0,004	0,173 ± 0,004	0,167 ± 0,002
B_2	0,00093 ± 0,00003	0,00111 ± 0,00003	0,00133 ± 0,00003	0,00135 ± 0,00003	0,00154 ± 0,00004	0,00163 ± 0,00004	0,00162 ± 0,00004	0,00171 ± 0,00004	0,00179 ± 0,00004	0,00186 ± 0,00004	0,00155 ± 0,00004
β_1 (%)	94,56	93,70	92,73	92,57	91,57	91,07	91,00	90,48	89,90	89,70	92,47
β_2 (%)	5,44	6,30	7,27	7,43	8,43	8,93	9,00	9,52	10,10	10,30	7,53
χ^2	3,01	2,10	1,54	1,35	1,47	1,44	1,38	1,32	1,39	1,13	1,37

Tabela 11: Coeficientes obtidos através da equação de ajuste referente à 400/605 nm (excitação/emissão) para o conjunto de amostras em torra clara (A).

Parâmetros	1A*	2A*	3A*	4A*	5A*	6A*	7A*	8A*	9A*	10A*	11A*
τ_1 (ns)	0,321 ± 0,004	0,302 ± 0,04	0,302 ± 0,004	0,275 ± 0,004	0,281 ± 0,005	0,259 ± 0,004	0,284 ± 0,004	0,286 ± 0,004	0,274 ± 0,004	0,304 ± 0,004	0,383 ± 0,004
τ_2 (ns)	4,03 ± 0,39	3,67 ± 0,07	3,57 ± 0,04	3,59 ± 0,06	3,62 ± 0,06	3,65 ± 0,05	3,77 ± 0,04	3,78 ± 0,05	3,70 ± 0,05	3,67 ± 0,04	4,05 ± 0,07
$\langle \tau \rangle$	1,16	1,29	1,43	1,52	1,60	1,82	1,75	1,82	1,93	1,93	1,51
A	0,33	0,31	1,44	0,41	0,43	0,42	0,44	0,45	0,47	0,53	0,38
B_1	0,326 ± 0,004	0,342 ± 0,05	0,346 ± 0,004	0,256 ± 0,005	0,367 ± 0,006	0,393 ± 0,006	0,365 ± 0,005	0,361 ± 0,005	0,370 ± 0,005	0,340 ± 0,004	0,281 ± 0,003
B_2	0,00060 ± 0,00004	0,00096 ± 0,00005	0,00129 ± 0,00005	0,00132 ± 0,00005	0,00146 ± 0,00005	0,00169 ± 0,00005	0,00150 ± 0,00005	0,00163 ± 0,00005	0,00193 ± 0,00005	0,00219 ± 0,00006	0,00113 ± 0,00004
β_1 (%)	97,74	96,70	95,75	95,60	95,16	94,29	94,84	94,36	93,43	92,77	95,94
β_2 (%)	2,26	3,30	4,25	4,40	4,84	5,71	5,16	5,64	6,53	7,23	4,06
χ^2	0,72	0,79	0,92	0,92	0,97	1,08	0,99	1,10	1,17	1,21	0,78

as amostras opostas (1A e 11A) foi 9,56%.

Para última excitação/emissão (400/605 nm) estudada, Tabela 11, menor tempo de vida média foi de 1,16 ns observado na amostra 1A e o maior tempo de vida média de 1,93 ns para as amostras 9 e 10A. Aqui, diferença entre as amostras de arábica puro e robusta pura é mais evidente, cerca de 23,17%, devido ao segundo tempo de vida, que apresentava grandes variações.

Assim, caso as amostras sejam analisadas pelo tempo de vida médio [51–53], o último conjunto de valores trará resultados mais eficazes na diferenciação das espécies.

Todavia, os resultados são inconclusivos na identificação das moléculas que estão fluorescendo nos comprimentos de onda estudados neste trabalho. Para trabalhos futuros, pretende-se separar os compostos presentes nos grãos de café e analisar cada um separadamente, a fim de identificar os compostos, seus valores de excitação e emissão, além do tempo de vida característico de cada espécie.

6 CONCLUSÕES

As espécies de café arábica (*Coffea arabica L.*), robusta (*Coffea canephora L.*) e suas misturas foram caracterizadas com as técnicas espectroscópicas – absorção (FTIR), fotoluminescência e fotoluminescência resolvida no tempo (TCSPC) e colorimetria, com o intuito de estudar as características das espécies, discriminá-las e quantificá-las posteriormente.

Na absorção, mediu-se o comportamento da luz incidente no material na região do infravermelho médio do espectro eletromagnético. Como resultado obteve-se espectros característicos do café, que apresentaram bandas de absorção similares para as espécies, de acordo com o esperado, pois elas possuem composição química semelhante. Na maior parte das análises a intensidade dos espectros variou conforme a porcentagem de cada espécie presente na amostra e conforme o nível de torra, pois o teor dos compostos pode variar de uma espécie para outra e pode variar ainda mais quando submetido a torrefação.

Para obter resultados conclusivos dos espectros, utilizou-se duas técnicas estatísticas, PCA e o PLS. O PCA foi capaz de distinguir as espécies e o PLS foi capaz de prever as quantidades adicionados em cada amostra, com coeficiente de determinação superior a 0,99, ou seja, a espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier é eficaz e produz resultados no que tange a discriminação e quantificação das espécies.

A colorimetria foi realizada para classificar a cor inicial das amostras avaliadas neste estudo e para futuras comparações. Com os resultados dessa técnica indicam que a torra clara do café arábica não apresenta a mesma cor que a da espécie robusta, mesmo sendo submetidos aos mesmos parâmetros de torra.

Na fluorescência, observou-se o comportamento das amostras de café na torra clara quando submetidas as excitações/emissões em 280/480 nm, 310/470 nm e 400/605 nm. A ausência de literatura comparativa impossibilitou concluir quais fluoróforos emitiam nessas regiões, encontrou-se apenas indícios e sugestões. Para excitações em 280 nm, 310 nm e 400 nm, os possíveis candidatos a fluoróforos são a cafeína, ácido clorogênico (5-CQA) e a clorofila, respectivamente.

Faz-se necessário trabalhos futuros que façam análises dos compostos presentes no café separadamente. O mesmo fato repetiu-se para o TCSPC, no qual mediu-se o tempo de vida das espécies de café e suas misturas em torra clara, mas nessa técnica não há dados comparativos na literatura.

Observou-se que as maiores intensidades de emissão são do café robusta e a intensidade de emissão de todos as misturas aproximam-se do café arábica e distanciam-se do café robusta. Além disso, a diferença de intensidade média do tempo de vida na excitação 400 nm e emissão em 605 nm entre as espécies foi superior à 20%. De modo geral,

o trabalho desenvolvido nesta dissertação foi um estudo exploratório, mas que apresentou resultados positivos, e indicam que técnicas espectroscópicas são rápidas e promissoras para avaliações do café.

6.1 TRABALHOS FUTUROS

- Estender o PLS e o TCSPC para as torras média e escura, a fim averiguar as possíveis variações e desenvolver um método que seja capaz de distinguir as espécies, ou identificar as porcentagens de *blends* em qualquer torra.
- Identificar quais fluoróforos são responsáveis pelas emissões em 470, 480 e 605 nm, e quais deles causam as diferenças nos tempos de vida. Para fazer essas afirmações será necessário analisar a fluorescência dos compostos separadamente.
- Padronizar o método, para que o setor cafeeiro e a indústria do café possam fornecer resultados mais objetivos e seguros sobre a qualidade do café consumido nacionalmente e dos grãos exportados.
- Reproduzir o estudo em várias regiões produtoras de cafés arábica e robusta, para que o estudo alcance o maior número de variáveis que possam influenciar na composição química dos grãos.

REFERÊNCIAS

- 1 Flávia Bessa and Lucas Tadeu Ferreira . *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Café no Brasil*. 2018. Disponível em: <<<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira>>>. Acesso em 27 de Janeiro 2018.
- 2 BRASIL . *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sumário Executivo de CAFÉ, de Janeiro de 2018*. 2018. Disponível em: <<http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/informe_estatistico/Sumario_Cafe_%20Janeiro_2018.pdf>>. Acesso em 27 de Janeiro 2018.
- 3 CARNEIREIRO, A. P. C. *Discriminação de cafés crus sadios e defeituosos por meio de espectroscopia no infravermelho médio*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- 4 BRASIL . *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 8, de 11 de Junho de 2003*. 2003. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/media/NMQ_LEGISLAcao_IN8.pdf>>. Acesso em 21 de Fevereiro 2017.
- 5 CLARKE, R. J.; MACRAE, R. *Coffee: Chemistry*. [S.l.: s.n.], 1985. v. 1. 1-41 p.
- 6 Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. *Indicador de Café Arábica CEPEA/ESALQ, 22 de Janeiro de 2018*. 2018. Disponível em: <<<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/cafe.aspx>>>. Acesso em 27 de Janeiro 2018.
- 7 DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. de T. *Discrimination between Arabica and Robusta Coffees Using Hydrosoluble Compounds: Is the Efficiency of the Parameters Dependent on the Roast Degree?* **Beverages**, v. 1, p. 127–139, 2015.
- 8 ROMANO, R. et al. *Identification markers based on fatty acid composition to differentiate between roasted Arabica and Canephora (Robusta) coffee varieties in mixtures*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 35, p. 1–9, 2014.
- 9 MARTIN, M. J. et al. *Fatty acid profiles as discriminant parameters for coffee varieties differentiation*. **Talanta**, v. 54, p. 291–297, 2001.
- 10 ALVES, R. et al. *Discrimination between arabica and robusta coffee species on the basis of their tocopherol profiles*. **Food Chemistry**, v. 114, p. 295–299, 2009.
- 11 FRANCA, A. S.; C.F.MENDONCA, J.; D.OLIVEIRA, S. *Composition of green and roasted coffees of different cup qualities*. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 709–715, 2005.
- 12 REIS, N.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S. *Quantitative evaluation of multiple adulterants in roasted coffee by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTS) and chemometrics*. **Talanta**, v. 115, p. 563–568, 2013.
- 13 REIS, N.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S. *Performance of diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy and chemometrics for detection of multiple adulterants in roasted and ground coffee*. **LWT Food Science and Technology**, v. 53, p. 395–401, 2013.

- 14 CRAIG, A. P. et al. *Application of elastic net and infrared spectroscopy in the discrimination between defective and non-defective roasted coffees*. **Talanta**, v. 128, p. 393–400, 2014.
- 15 BARBIN, D. F. et al. *Application of infrared spectral techniques on quality and compositional attributes of coffee: An overview*. **Food Research International**, v. 128, p. 23–32, 2014.
- 16 ZHANG, C. et al. *Mid-Infrared Spectroscopy for Coffee Variety Identification: Comparison of Pattern Recognition Methods*. **Journal of Spectroscopy**, v. 2016, p. 1–7, 2016.
- 17 BERTONE, E. et al. *Simultaneous determination by NIR spectroscopy of the roasting degree and Arabica/Robusta ratio in roasted and ground coffee*. **Food Control**, v. 59, p. 683–689, 2016.
- 18 DANKOWSKAA, A.; DOMAGAŁAB, A.; KOWALEWSKIC, W. *Quantification of Coffea arabica and Coffea canephora var. robusta concentration in blends by means of synchronous fluorescence and UV-Vis spectroscopies*. **Talanta**, v. 172, p. 215–220, 2017.
- 19 MARTINS, A. L. **História do Café**. [S.l.]: Ed. Contexto, 2008.
- 20 Associação Brasileira da Indústria do Café. *Os primeiros cultivos de café*. 2017. Disponível em: <<<http://abic.com.br/publico/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38#65>>>. Acesso em 17 de Fevereiro 2017.
- 21 Associação Brasileira da Indústria do Café. *O café no Brasil*. 2017. Disponível em: <<<http://abic.com.br/publico/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38#62>>>. Acesso em 18 de Fevereiro 2017.
- 22 Equipe do serviço de Microscopia de Produtos. *Atlas de Microscopia: Café Torrado e Moído (Coffea sp)*. 2017. Disponível em: <<<http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2012/01/Atlas-de-Microscopia-%E2%80%93Caf%C3%A9-Torrado-e-Mo%C3%ADdo.pdf>>>. Acesso em 18 de Fevereiro 2017.
- 23 MORAIS, H. et al. *Escala fenológica detalhada da fase reprodutiva de coffea arabica. Bragantia*, v. 67, p. 257–260, 2008.
- 24 SCHMIDT, C. A. P.; MIGLIORANZA, E.; PRUDÊNCIO, S. H. *Interação da torra e moagem do café na preferência do consumidor do oeste paranaense*. **Ciência Rural**, v. 38, 2008.
- 25 Associação Brasileira da Indústria do Café. *Histórico*. 2017. Disponível em: <<<http://abic.com.br/institucional/abic/>>>. Acesso em 26 de Janeiro 2018.
- 26 Associação Brasileira da Indústria do Café. *Recomendações Técnicas da ABIC*. 2017. Disponível em: <<<http://abic.com.br/recomendacoes-tecnicas/recomendacoes-tecnicas-da-abic/>>>. Acesso em 26 de Janeiro 2018.
- 27 TAVARES, K. M. et al. *Espectroscopia no infravermelho médio e análise sensorial aplicada à detecção de adulteração de café torrado por adição de cascas de café*. **Química Nova**, v. 35, p. 1164–1168, 2012.

- 28 TERRILE, A. E. et al. *Chemometric Analysis of UV Characteristic Profile and Infrared Fingerprint Variations of Coffea arabica Green Beans under Different Space Management Treatments*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 27, n. 7, p. 1254–1263, 2016.
- 29 REIS, N.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S. *Discrimination between roasted coffee, roasted corn and coffee husks by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*. **Food Science Technology**, v. 50, p. 715–722, 2013.
- 30 MONAKHOVA, Y. B. et al. *Rapid approach to identify the presence of Arabica and Robusta species in coffee using ¹H NMR spectroscopy*. **Food Chemistry**, v. 182, p. 178–184, 2015.
- 31 WERMELINGER, T. et al. *Quantification of the Robusta Fraction in a Coffee Blend via Raman Spectroscopy: Proof of Principle*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 9074–9079, 2011.
- 32 BOTELHO, B. G.; OLIVEIRA, L. S.; FRANCA, A. S. *Fluorescence spectroscopy as tool for the geographical discrimination of coffees produced in different regions of Minas Gerais State in Brazil*. **INFONA**, v. 77, p. 25–31, 2017.
- 33 OYAMA, P. I. de C. **Método para classificação de café em grãos por imagens digitais pelo uso de atributos selecionados de morfologia, cor e textura**. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.
- 34 Konica Minolta: Sensing Americas. *Compreendendo o Espaço de Cor CIE L*C*h*. 2017. Disponível em: <<<http://sensing.konicaminolta.com.br/2015/08/compreendendo-o-espaco-de-cor-cie-lch/>>>. Acesso em 06 de janeiro 2018.
- 35 BORGES M. L. A. AND FRANCA, A. S. et al. *Estudo da variação da coloração de café arábica durante a torra em diferentes condições de aquecimento*. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 5, p. 3–8, 2002.
- 36 SKOOG, D. A. et al. **Fundamentod de Química Analítica**. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2005.
- 37 BRANDAO, M. da C. N. P. **Análise Espectroscópica do Leite Bovino**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2006.
- 38 SMITH, B. C. **Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy**. [S.l.]: Taylor and Francis Group, 2011.
- 39 PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2015.
- 40 SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia ramam e no infravermelho**. São Paulo: Universidade Estadual Paulista em Franca, 2008.
- 41 RODRIGUES, L. do N. **Espectroscopia por FTIR de variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas para produção de etanol celulósico**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.
- 42 MENDES, T. de O. **Métodos multivariados para a elucidação de informações analíticas em amostras complexas**. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 8 2015.

- 43 FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria i: calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova*, v. 22, p. 724–731, 1999.
- 44 Carlos Alberto Alves Varella. *Análise de Componentes Principais*. 2017. Disponível em: <<<http://www.ufrj.br/institutos/it/deng/varella/Downloads/multivariada%20aplicada%20as%20ciencias%20agrarias/Aulas/analise%20de%20componentes%20principais.pdf>>>. Acesso em 10 de julho 2017.
- 45 NETO, B. D. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. ***Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria***. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.
- 46 MORGANO, M. A. et al. Determinação de açúcar total em café cru por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais. *Química Nova*, v. 30, p. 346–350, 2007.
- 47 LAKOWICZ, J. R. ***Principles of Fluorescence Spectroscopy***. New York: Springer Science and Business Media, LLC, 2006.
- 48 COSTA, C. B. ***Propriedades Fotofísicas da Hidróxido Ftalocianina de Alumínio em diferentes meios***. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.
- 49 MERCADO, E. N. . *Sutilezas do ton-sur-ton da torra do café*. 2007. Disponível em: <<<https://www.cafepoint.com.br/noticias/mercado/sutilezas-do-tonsurton-da-torra-do-cafe-41147n.aspx?r=665378584#>>>. Acesso em 16 de Agosto 2016.
- 50 Konica Minolta: Sensing Americas. *Colorímetro CR-400*. 2017. Disponível em: <<<http://sensing.konicaminolta.com.br/products/colorimetro-cr-400/>>>. Acesso em 10 de Dezembro 2017.
- 51 BRANDAO, M. P.; ANJOS, V. D. C. D.; BELL, M. J. V. *Time resolved fluorescence of cow and goat milk powder*. ***Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy***, v. 171, p. 193–199, 2017.
- 52 SILLEN, A.; ENGELBORGH, Y. *The correct use of “average” fluorescence parameters*. ***Photochemistry and Photobiology***, v. 67, p. 475–486, 1998.
- 53 TAYEH, N.; RUNGASSAMY, T.; ALBANI, J. *Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins*. ***PJournal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, v. 50, p. 107–116, 2009.
- 54 AGNOLETTI, B. Z. ***Avaliação da spropriedades físico-químicas de café arábica (Coffea arabia) e conilon (Coffea canephora) classificados quanto à qualidade da bebida***. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2015.
- 55 TALAMOND, P.; VERDEIL, J. L.; CONÉJÉRO, G. *Secondary Metabolite Localization by Autofluorescence in Living Plant Cells*. ***Molecules***, v. 20, p. 5024–5037, 2015.
- 56 VALEUR, B. ***Molecular Fluorescence: Principles and Applications***. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.

57 ARANDA, F. et al. *Fluorescence study of the location and dynamics of α -tocopherol in phospholipid vesicles.* ***Biochimica et Biophysica Acta***, v. 1989, p. 26–32, 1989.