



## CONSTRUÇÃO DE MODELO MATEMÁTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS EM GRÃOS DE CAFÉ EMPREGANDO ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

GIOVANA R. BARBOZA<sup>1</sup> ; TEREZINHA J. G. SALVA<sup>2</sup> ; PRISCILA BENAR<sup>3</sup>

Nº 12104

### RESUMO

O objetivo deste trabalho é a construção de um modelo matemático de calibração para quantificação total de lipídios em grãos de café por espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS), utilizando um número reduzido de análises pelo método de referência. Análises de café cru por NIRS, para qualquer finalidade, consistem em levantar espectros de reflexão de luz de grãos de café cru moídos, enquanto o método de referência de quantificação do óleo necessita de extração contínua com solvente do material moído por 16 h, consumindo tempo, reagentes e energia. Entretanto, NIRS requer modelos de calibração multivariada, os quais devem ser confiáveis e incluir a variabilidade apropriada dos componentes quantificados. Neste estudo, o modelo de calibração foi obtido por 6 diferentes espécies e variedades de café: *Coffea arabica* (Bourbon Amarelo), *Coffea racemosa* e *Coffea canephora* (Bukobensis, Apoatã, Conillon e EP189), com quantidades de lipídios variando de 6 a 12 %m/m. As amostras originais e extraídas foram utilizadas para preparar novas matrizes com menor conteúdo de lipídios. Espectros NIR foram obtidos em equipamento Foss NIRSystem 6500 (1100-2500 nm, 256 varreduras, resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, referência poliestireno, 3 replicatas) e seus dados adquiridos e matematicamente tratados pelo software Vision 2.22 (correção de espalhamento de luz, alisamento Savitzky-Golay, primeira derivada, calibração multivariada por PLS com validação cruzada, previsão). O modelo de calibração foi construído com 114 espectros, sem seleção de variáveis; apenas 3 espectros ficaram fora do padrão (*outliers*) deste modelo. Os resultados preliminares para o teor de lipídios de 4 amostras de previsão selecionadas mostram erros relativos médios na faixa de 0,3 a 5 % entre os valores previstos pelo modelo e valores obtidos do método de referência para quantificação de lipídios.

<sup>1</sup> Bolsista PIBITI/CNPq: Graduação em Farmácia, UNIP, Campinas-SP.

<sup>2</sup> Orientadora: Pesquisadora, Centro de Café "Alcides Carvalho"/IAC, Campinas-SP.

<sup>3</sup> Colaborador: Pesquisadora, Centro de Café "Alcides Carvalho"/IAC, Campinas-SP,

pbenar@iac.sp.gov.br



## ABSTRACT

The aim of this work is the construction of a mathematical model of calibration to quantify total lipids in coffee beans from near infrared spectroscopic (NIRS) data, using a reduced number of sample analyses by reference method. NIRS analysis of raw coffees, for any goal are only reflectance spectra of milled grains and are carried out with milled raw coffee, while the reference method for oil quantification needs continuous solvent extraction of the milled material for 16 h, spending chemicals, time and energy. However, NIRS requires multivariate calibration models, which must be reliable and include appropriate variability of the quantified component. In this work, a calibration model was obtained from 6 different coffee species and varieties: *Coffea arabica* (Bourbon Amarelo), *Coffea racemosa* and *Coffea canephora* (Bukobensis, Apoatã, Conillon e EP189), which lipid contents ranging from 6 to 12% m/m in accord of reference method. The original and the oil free samples are used to prepare new matrix with lower lipid contents. NIR spectra are obtained in Foss NIRSystem 6500 (1100-2500 nm, 256 scans, resolution 4 cm<sup>-1</sup>, poliestirene standard, 3 replicates) and their data are acquired and mathematical treated by Vision 2.22 software (multiplicative scatter correction, Savitzky-Golay smoothing, first derivative, PLS multivariate calibration model with cross validation, prediction). The calibration model was obtained with 114 spectra, without variable selection; only 3 spectra are outliers in this model. Preliminary results for lipid content of 5 selected predict samples show deviation in the range of 0.3 to 5 % between the predict values and reference results for lipid quantification.

## INTRODUÇÃO

O café é um importante produto para a economia do Brasil, tanto para o mercado interno como para exportação. É a segunda bebida mais consumida no mundo, sendo o Brasil seu maior produtor (MARTINS, 2008).

O conhecimento da composição química do café, pela quantificação de seus diferentes componentes, é necessário por sua importância comercial como bebida e também para auxiliar pesquisas sobre melhoramento genético, resistência a pragas, segurança alimentar e para ser um parâmetro de distinção entre variedades de café. O grão de café cru possui centenas de diferentes compostos químicos, dentre os quais: cafeína, trigonelina, teobromina, teofilina, ácidos clorogênicos, proteínas, açúcares e lipídios (AGUIAR *et al*, 2005).

Os lipídios são componentes importantes da bebida e do aroma do café. Em grãos torrados, o óleo forma uma camada protetora que impede a volatilização de compostos relacionados ao aroma da bebida. No café solúvel, os lipídios são responsáveis por conferir aroma e impedir a fragmentação dos grânulos. Na indústria alimentícia, óleo de café é utilizado para conferir aroma a doces e bolos. A partir dos grãos verdes do café, podem ser extraídos lipídios que têm utilidade na indústria cosmética, por apresentarem rápida penetração e boa aderência em formulações para pele (WAGEMAKER, 2009). Estudos anteriores (AGUIAR *et al*, 2005; MAZZAFERA *et al*, 1998) relataram teores de lipídios bastante variáveis para diferentes espécies e variedades de cafés crus, de 6 até 29 % em massa, em base seca.

Tais valores foram determinados por método de referência para a quantificação de lipídios, no qual é realizada extração contínua com um solvente orgânico (éter de petróleo, hexano ou éter etílico) por períodos relativamente longos (8 a 16 horas sob refluxo), seguida de secagem e pesagem. Esse procedimento demanda considerável tempo, além de consumir solvente e energia, e gerar resíduos líquidos que devem ser posteriormente tratados. Devido a essas características, próprias da maioria dos procedimentos de quantificação por via úmida, há atualmente uma busca por procedimentos analíticos que sejam mais rápidos e menos custosos, desde que forneçam resultados com boa confiabilidade quando comparados aos métodos de referência.

Análises por espectroscopia na região do infravermelho próximo (em inglês, NIRS = Near Infrared Spectroscopy) começaram a se popularizar na década de 1980, principalmente por avanços nas áreas computacional e eletrônica, que permitiram que os dados obtidos por essa técnica pudessem ser corretamente obtidos e tratados (PASQUINI, 2003).

As vantagens da utilização do NIRS são: (a) têm aplicação quase universal para os compostos orgânicos, pois qualquer molécula contendo ligações C-H, N-H, S-H e O-H absorvem nesta região; (b) análise realizada em poucos minutos, com necessidade de um mínimo preparo prévio e não destrutiva das amostras; (c) incidência de radiação pode ser feita com o uso de fibras ópticas, permitindo a análise a distância (por exemplo, diretamente no interior de recipientes na indústria alimentícia); (d) disponibilidade de sistemas ópticos e detectores eficientes (PASQUINI, 2003; SOTELO, 2006). Utilizando-se a técnica de reflectância difusa, as amostras de grãos de café, por exemplo, podem ser analisadas após simples moagem, sem necessidade de modificação ou diluição.



No entanto, para que se tenha uma correta quantificação por NIRS é necessário que sejam construídas curvas de calibração multivariadas dos dados espectrais (ou seja, do conjunto de valores de intensidade de absorção ou reflectância) em função de resultados do método de referência. As amostras selecionadas para construção das curvas de calibração devem apresentar variabilidade da quantidade do componente químico em análise. Após a construção das curvas, elas devem ser validadas, conferindo-se os valores de quantificação previstos pela curva com valores determinados pelo método de referência. Uma vez obtida e validada a curva de calibração multivariada, ela poderá ser utilizada para previsão de valores para quantificação do componente em novas amostras (RIBEIRO *et al*, 2011, RIBEIRO e SALVA, 2011).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **A) Amostras de café**

Foram selecionadas 6 espécies e variedades de cafés: *Coffea arabica* (Bourbon Amarelo), *Coffea racemosa* e *Coffea canephora* (Bukobensis, Apoatã, Conillon e EP189). Os frutos foram colhidos em estágio cereja, manualmente despulpados, fermentados em recipiente de vidro por 24 h, lavados em água corrente para retirada da mucilagem, e secos ao sol até a umidade de aproximadamente 11-12%. Em seguida, o pergaminho foi retirado e os grãos secos foram armazenados a temperatura reduzida.

### **B) Moagem dos grãos de café crus e determinação da umidade**

Os grãos crus e secos foram moídos em moinho de laboratório Perten 3600 equipado com disco rotatório para granulometria média. Foram realizadas 3 moagens e seleção em peneira de 0,5 mm. Ao final, as frações peneiradas e os resíduos retidos na peneira foram reunidos e homogeneizados.

Duas amostras de cerca de 1 g de cada café moído, pesadas em balança analítica, foram submetidas à secagem em estufa a 105°C até massa constante, para determinação do teor porcentual de umidade.

### **C) Extração de lipídios**

A extração de lipídios pelo método de referência foi realizada em duplicata ou triplicata, de acordo com o procedimento:

a) cartuchos de papel poroso foram preparados e amostras de 5-10 g de café moído, de umidade conhecida, foram pesadas em balança analítica, diretamente no cartucho;



- b) o cartucho contendo café moído foi colocado no extrator do tipo *Butt*;
- c) a um balão de vidro, previamente pesado, foram adicionados 80 mL de solvente éter de petróleo (faixa de ebulição de 30-70°C);
- d) o extrator *Butt* foi conectado ao balão, colocado em uma manta de aquecimento, e a um condensador de refluxo, resfriado por banho com circulação de água a 10°C.
- e) o refluxo do solvente foi mantido por 16 h.
- f) ao final do tempo de extração, o solvente do extrato contido no balão foi evaporado em evaporador rotativo com banho de aquecimento a 90°C. O óleo residual no balão foi seco em estufa a 100°C, resfriado em dessecador e pesado para determinação do teor de lipídios (% m/m em relação à massa inicial de café moído livre de umidade). O resíduo sólido (café extraído ou livre de lipídios) foi seco por cerca de 24 h em temperatura ambiente e depois em estufa a 80°C até massa constante.

#### **D) Preparo de novas matrizes de café moído**

A partir das 6 amostras originais de café moído e das 6 amostras extraídas (livre de lipídios), foram elaboradas misturas a fim de se obter novas matrizes com conteúdo de lipídios inferiores aos das amostras originais.

#### **E) Espectros na região do infravermelho próximo (NIRS)**

O levantamento dos espectros das amostras de café (originais, extraídos e novas matrizes) na região do infravermelho próximo foi realizado em equipamento Foss NIRSystems 6500, usando 256 varreduras na faixa de 1100 - 2500 nm, com 4 cm<sup>-1</sup> de resolução. Um padrão de poliestireno (4 picos) existente no próprio aparelho foi utilizado como branco. As análises pela técnica de reflectância difusa, em cela de amostragem de quartzo de 4 cm de diâmetro, foram realizadas em triplicada, com porções de aproximadamente 4 g de café moído.

A aquisição dos dados espectrais (intensidade de reflectância em função do comprimento de onda) foi feita utilizando-se o software Vision 2.22 (Foss NIRSystems, Holanda), assim como os pré-tratamentos matemáticos dos espectros (correção de espalhamento de luz, alisamento Savitzky-Golay, primeira derivada), a construção do modelo de calibração multivariada (PLS) com validação cruzada e os cálculos de previsão da quantidade (% m/m) de lipídios em algumas amostras selecionadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de lipídios do café cru foi realizada com sucesso para as 6 diferentes amostras selecionadas para a construção da curva de calibração multivariada. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1.

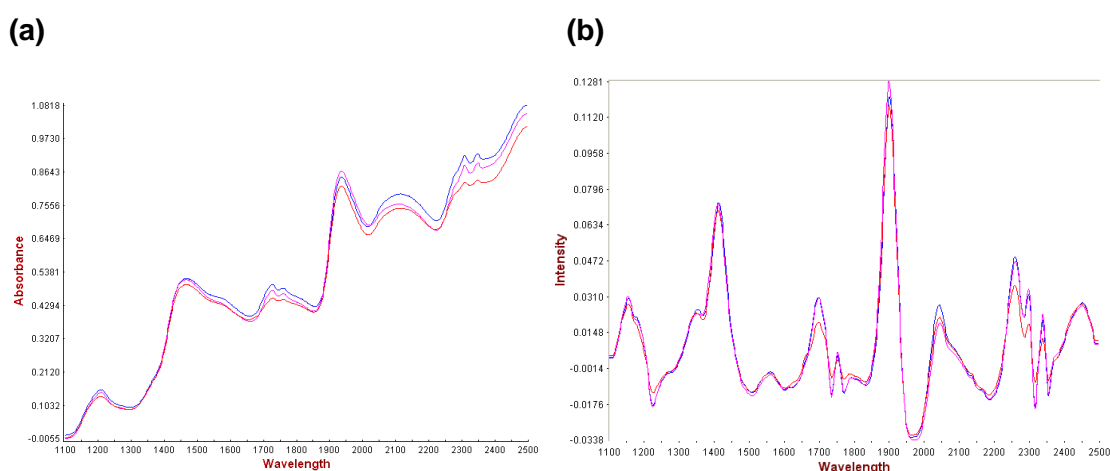
**TABELA 1** Resultados da quantificação de lipídios (óleo), em % m/m base seca, para 6 diferentes amostras de café cru moído utilizando o método de referência (extração contínua em *Butt*, éter de petróleo, 16 h)

Espécie de café	Varietade	massa café moído livre umidade (g)	massa óleo seco (g)	quantidade % m/m lipídios	média % m/m lipídios	dp
<i>C. arabica</i>	Bourbon Amarelo	4.53	0.54	11.91		
<i>C. arabica</i>	Bourbon Amarelo	9.45	1.15	12.22		
<i>C. arabica</i>	Bourbon Amarelo	9.08	1.12	12.36	12.16	0.23
<i>C. canephora</i>	Apoatã 3599-9	4.55	0.27	5.94		
<i>C. canephora</i>	Apoatã 3599-9	7.71	0.48	6.22		
<i>C. canephora</i>	Apoatã 3599-9	10.93	0.69	6.29	6.15	0.19
<i>C. canephora</i>	EP 189 C128	4.50	0.36	8.00		
<i>C. canephora</i>	EP 189 C128	8.65	0.69	7.99		
<i>C. canephora</i>	EP 189 C128	8.66	0.67	7.78	7.92	0.13
<i>C. canephora</i>	Bukobensis 3	8.73	0.60	6.87		
<i>C. canephora</i>	Bukobensis 3	6.98	0.49	7.02		
<i>C. canephora</i>	Bukobensis 3	4.52	0.31	6.85	6.92	0.09
<i>C. canephora</i>	Conillon 66-3	4.46	0.31	6.95		
<i>C. canephora</i>	Conillon 66-3	6.46	0.46	7.12		
<i>C. canephora</i>	Conillon 66-3	9.04	0.62	6.83	6.97	0.14
<i>C. racemosa</i>		8.09	0.96	11.90		
<i>C. racemosa</i>		8.46	0.99	11.74	11.82	0.11

Os resultados obtidos mostram concordância com dados da literatura. Cafés da espécie *C. arabica* apresentam teores de lipídios maiores do que cafés da espécie *C. canephora*. WAGEMAKER (2009) obteve também para *C. racemosa* valores percentuais de lipídios superiores a diferentes variedades de *C. canephora*: para amostras colhidas nos anos de 2007 e 2008, *C. racemosa* apresentou, em média, 12,00% de lipídios, enquanto Apoatã apresentou 7,45%, Bukobensis 9,66% e Conillon cerca de 5,60%. Em trabalho publicado por AGUIAR *et al* (2005), os valores médios de lipídios foram 9,36% para amostras de Apoatã, 9,44% para Bukobensis e 7,33% para Conillon.

Os valores apresentados na Tabela 1 foram utilizados para construção da curva de calibração multivariada. Além dos valores médios de teores de lipídios das 6 amostras originais de café, foram utilizados valores de lipídios zero para as 6 amostras dos cafés extraídos. Adicionalmente, foram feitas 26 misturas com quantidades variáveis das diferentes amostras originais e extraídas, a fim de se obter matrizes com teores de lipídios entre 0 e 6%, garantindo maior variabilidade dos valores calibrados. Portanto, para as 38 matrizes foram adquiridos os espectros na região do infravermelho próximo, em triplicata, totalizando 114 espectros para a construção do modelo matemático de calibração.

A Figura 1 mostra, para efeito de comparação, os espectros adquiridos (a) e os matematicamente pré-tratados (b) para amostras originais e extraídas de *C. arabica* (Bourbon Amarelo), *C. canephora* (Conillon 66-3) e *C. racemosa*. As transformações matemáticas feitas com os espectros originais têm a função de eliminar variabilidades não informativas dos espectros e ressaltar a variabilidade real, relacionada à composição química do material (PASQUINI, 2003).

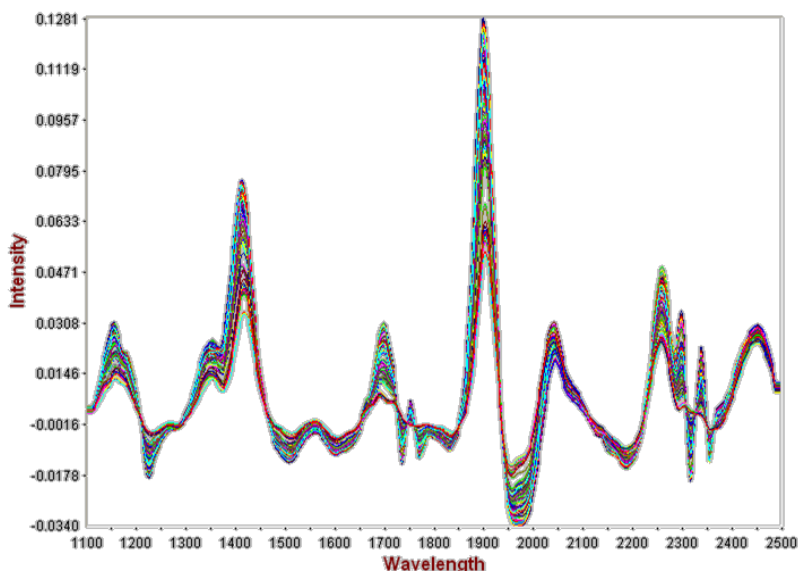


**FIGURA 1** Espectros originais (a) e pré-tratados matematicamente (b) para cafés moídos crus de três diferentes espécies de café: \**C. racemosa*; \**C. arabica* (Bourbon Amarelo); \**C. canephora* (Conillon 66-3).

A Figura 2 mostra o conjunto de 114 espectros pré-tratados matematicamente para todas as matrizes usadas na construção do modelo matemático de calibração multivariada.

As regiões dos espectros nas quais as intensidades apresentam variações mais significativas em função dos diferentes conteúdos de lipídios são as referentes aos sobretons (1100-1300 nm; 1300-1420 nm e 1600-1800 nm) e às combinações de vibrações (2200-2400 nm) das ligações C-H. Isso ocorre devido ao menor conteúdo de

extensas cadeias carbônicas das moléculas dos lipídios, os quais foram extraídos, mas possivelmente também por alterações em outros compostos orgânicos rompidos na parede celular durante a extração a quente com solvente orgânico.



**FIGURA 2** Espectros pré-tratados matematicamente (valores de intensidade de radiação refletida em função do comprimento de onda) para o conjunto de matrizes usadas na construção do modelo de calibração multivariada.

Na construção do primeiro modelo de calibração multivariada deste projeto, foram considerados todos os pontos dos espectros pré-tratados, sem seleção de variáveis, ou seja, não foram consideradas apenas as variações de intensidades nas regiões de comprimentos de onda com alterações mais significativas em função da quantidade de lipídios, mas sim os espectros totais.

Para cálculos de previsão de quantidade de lipídios, em % m/m, foram utilizadas 4 amostras dentre as mesmas espécies e variedades de café usadas no modelo de calibração. Os espectros das amostras de previsão foram adquiridos em duplicata ou triplicata, nas mesmas condições e com os mesmos pré-tratamentos matemáticos das amostras de calibração. Os resultados para as amostras de previsão do modelo e a comparação com os resultados do método de referência são apresentados na Tabela 2.

Os resultados de previsão pelo primeiro modelo construído de calibração multivariada para quantificação de lipídios apresentam valores de erros relativos médios aceitáveis e mostram que o modelo tem potencial para a quantificação proposta. Para a amostra de *C. arabica*, o erro médio relativo é de 2,55%. Para as amostras de *C. canephora*, tem-se os erros médios relativos de 3,28% para EP189,



4,88% para Conillon e 0,33% para Apoatã.

**TABELA 2** Resultados da quantificação de lipídios (óleo), em % m/m, para 4 amostras de café cru moído pelo modelo de calibração multivariada e comparação com o método de referência

Espécie de café	Variedade	% m/m lipídios prevista pelo modelo	% m/m lipídios pelo método de referência	Resíduo	Resíduo médio	Faixa
<i>C. arabica</i>	BSCA 240	11.63	12.16	-0.53		
<i>C. arabica</i>	BSCA 240	12.08	12.16	-0.08	-0.31	0.45
<i>C. canephora</i>	EP 189	7.97	7.92	0.05		
<i>C. canephora</i>	EP 189	8.12	7.92	0.20		
<i>C. canephora</i>	EP 189	8.23	7.92	0.31	0.19	0.26
<i>C. canephora</i>	Conillon 66-3	6.72	6.97	-0.25		
<i>C. canephora</i>	Conillon 66-3	6.92	6.97	-0.05		
<i>C. canephora</i>	Conillon 66-3	6.58	6.97	-0.39	-0.23	0.34
<i>C. canephora</i>	Apoatã 3597	6.08	6.15	-0.07		
<i>C. canephora</i>	Apoatã 3597	6.06	6.15	-0.09	-0.08	0.02

## CONCLUSÃO

O primeiro modelo de calibração multivariada construído mostrou-se útil e com bom potencial para a previsão de quantidades de lipídios em amostras de café cru moído das espécies e variedades selecionadas, pois os erros médios relativos das previsões ficaram dentro de uma faixa aceitável (0,3 a 5%).

O procedimento de calibração proposto utilizou um número significativo de espectros para calibração (38 matrizes em triplicata, totalizando 114 espectros), porém com a vantagem de exigir um número reduzido de análises pelo método de referência (6 amostras em triplicata). Assim, as demandas de reagentes, energia e tempo de análise foram minimizadas.

Para melhor avaliação, o modelo deve ser testado com um número maior de amostras de previsão. Novos resultados de previsão podem indicar a necessidade em se aumentar a variabilidade das amostras de calibração, incluindo outras espécies e variedades de café disponíveis no Banco de Germoplasma do Centro de Café do IAC com teores diferenciados de lipídios e a confecção de um número ainda maior de novas matrizes (misturas). Além disso, novos modelos de calibração deverão incluir a seleção de variáveis (regiões específicas de comprimentos de onda dos espectros)



para melhorar a eficácia das previsões de quantidade de lipídios nas amostras de café.

### AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBITI, pela bolsa concedida.

Ao IAC, pela oportunidade de estágio.

À Dra. Cássia R. Limonta Carvalho pelo auxílio e disponibilização do Laboratório de Fitoquímica do Centro de Recursos Genéticos Vegetais para os procedimentos de extração com solvente.

### REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. T. E.; FAZUOLI, L. C.; SALVA, T. J. G.; FAVARIN, J. L. Diversidade química de cafeeiros na espécie *Coffea Canephora*. **Bragantia**, Vol. 64, no.4, 577-582, Campinas: 2005

MARTINS, A. L. **História do café**. Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional, Vol. 4, n. 3, 170-173, Taubaté: 2008

MAZZAFERA, P.; SOAVE, D.; ZULLO, M. A. T.; GUERREIRO FILHO, O.; Oil content of green beans from some coffee species. **Bragantia**, Vol. 57, no.1, 45-48, Campinas: 1998.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 14, No. 2, 198-219, Campinas: 2003.

RIBEIRO, J.S., FERREIRA, M.M.C.; SALVA, T.J.G., Chemometric models for the quantitative descriptive sensory analysis of Arábica coffee beverages using near infrared spectroscopy, **Talanta**, v. 83, 1352-1358, 2011.

RIBEIRO, J.S.; SALVA, T.J.G., Proposta de metodologia para o estabelecimento de modelo de calibração multivariado para a previsão do teor de trigonelina em café cru baseado em espectroscopia no infravermelho próximo, **Anais do VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, Araxá/MG, 2011.

SOTELO, F. F. **Aplicação da Espectroscopia de Infravermelho Próximo na caracterização de petróleo. Simulação de uma Unidade de Destilação atmosférica.**; Tese de doutorado, Escola Politécnica, USP, São Paulo: 2006

WAGEMAKER, T. A. L. **Variabilidade do teor de óleo, de seu fator de proteção solar e de outros componentes da fração lipídica do gênero Coffea visando usos alternativos aos grãos.** Dissertação de mestrado, IAC Campinas, SP: 2009