

ABORDAGEM METABOLÔMICA: DISCRIMINAÇÃO DE TRATAMENTO PÓS-COLHEITA DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE (*Coffea arabica* L.) DO PARANÁ¹

Anna Tsukui²; Ana Laura Macedo Brand³; Pedro Henrique Vendramini⁴; Marcos Nogueira Eberlin⁵; Maria Brígida dos Santos Scholz⁶; Cláudia Moraes de Rezende⁷

¹Trabalho financiado pela Embrapa Café, CNPq, CAPES

²Bolsista Doutorado CAPES, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos; Universidade Federal do Rio de Janeiro. annatsukui@ufrj.br

³Bolsista Iniciação Científica PIBIC; Universidade Federal do Rio de Janeiro. alaurambrand@gmail.com

⁴Bolsista Petróleo Brasileiro S/A., Programa de Pós-graduação em Química; Universidade Estadual de Campinas. ph_vendramini@yahoo.com.br

⁵Pesquisador, Doutor, Programa de Pós-graduação em Química; Universidade Estadual de Campinas.

⁶Pesquisador, Doutor, Instituto Agrônomo do Paraná. mbscholz@iapar.br

⁷Pesquisador, Doutor, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Instituto de Química; Universidade Federal do Rio de Janeiro. crezende@iq.ufrj.br

RESUMO: Os grãos de café verde (*Coffea arabica* L.) foram quantificados em cafeína e ácidos clorogênicos por CLAE/UV-Vis, teor em óleo por extração Soxhlet (4h) e análise do perfil químico por ESI(-)-QTOF-MS, em busca da relação composição química: tratamento pós-colheita para cafés naturais (CN) e cerejas descascados (CD), com auxílio da ferramenta estatística PCA e PLS-DA. Foi possível observar diferenciação entre os tratamentos com base na análise do perfil químico por ESI(-)-QTOF, além da classificação de amostras desconhecidas a partir da calibração e validação dos dados. Os resultados indicam um grande potencial do emprego da análise do perfil químico associado à estatística multivariada na diferenciação entre os tratamentos pós-colheita a partir da identificação das substâncias químicas que melhor classificam os grupos, sugerindo um possível marcador químico para esses grãos de cafés.

PALAVRAS-CHAVE: Café verde, metabolômica, espectrometria de massas, pós-colheita, PCA e PLS-DA.

METABOLOMIC APPROACH: DISCRIMINATION GREEN COFFEE BEANS (*Coffea arabica* L.) OF POST-HARVEST TREATMENT OF PARANÁ

ABSTRACT: Green coffee beans (*Coffea arabica* L.) were quantified in caffeine and chlorogenic acid by HPLC/UV-Vis, oil by Soxhlet extraction (4h) and chemical profile by ESI(-)-QTOF-MS. Searching on the relationship between chemical composition and post-harvest treatment, natural (CN) and peeled coffees (CD) were investigated with statistical tools as PCA and PLS-DA. Differences between the two treatments were observed on the chemical profile for ESI(-)-QTOF-MS, in addition of classifying unknown samples by calibration and validation data. The results indicate a great potential by the use of chemical profile analysis and multivariate statistics in the differentiation of post-harvest treatments from of the chemicals compounds identification that better classify the groups, suggesting a possible chemical marker for this green coffee beans.

KEYWORDS: Green coffee, metabolomics, mass spectrometry, post-harvest, PCA and PLS-DA.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o primeiro produtor mundial de grãos de café verde e apresenta diversas regiões de plantio de cafés arábica com importante participação na economia brasileira. O Estado do Paraná deteve cerca de 3% da produção brasileira nos anos de 2013 (CONAB, 2014). Para o aprimoramento dos cafés, diversos produtores têm estabelecido colaborações com institutos de pesquisa, visando contribuições científicas que respaldem as certificações da região como produtora de cafés de qualidade, com o intuito de fortalecer o reconhecimento da região e dos próprios cafeicultores (IAPAR, 2012). O café é uma das principais fontes de ácidos clorogênicos na dieta humana, uma classe de compostos considerados como antioxidantes e que estão presentes tanto no café cru quanto na bebida, além de ser rico em cafeína e teor em óleo. Segundo Giomo (2012), a composição química dos grãos de café verde pode sofrer variação durante as diferentes etapas do processamento pós-colheita devidos as alterações bioquímicas nos grãos. Este trabalho tem como objetivo avaliar o relação dos teores de cafeína, ácidos clorogênicos (ácido 5-cafeoilquinico) e óleo, além da análise de perfil químico por técnicas modernas de análise química por ESI(-)-QTOF-MS, com base na influências dos diferentes processos pós-colheita dos grãos com auxílio de ferramentas estatísticas multivariadas e sugerir um possível marcador químico para os tratamentos pós colheita entre o café cereja natural e cereja descascado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os grãos verdes utilizados originaram-se de dois tipos de tratamento pós colheita, café natural (CN) e cereja descascado (CD). No total foram utilizadas 14 amostras CN, CD e Microlotes (mistura de CN e CD). A extração partiu de 1 g de grão moído com 4 mL de metanol à 45°C/20 minutos, seguido da filtração em membrana (42µm) e posterior diluição do extrato para análise por ESI(-)-QTOF-MS e CLAE/UV. As condições empregadas em CLAE foram de acordo com Alves et al., (2006) com adaptações: pré-coluna e coluna Regis ODS-1, 4,6 x 250mm, 5µm; fase móvel em modo isocrático com ácido acético/H₂O (5:95 v/v) e acetonitrila, em proporção de 95:5 (v/v), detecção UV-Vis em 320nm e 272nm para o ácido clorogênico e cafeína, respectivamente. Foram investigados os parâmetros de validação do método CLAE para ácidos clorogênicos e cafeína, como a precisão, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) e linearidade. O teor em óleo (massa óleo/100g grão) foi obtido via extração por Soxhlet (4 h) com éter de petróleo. Para análise química do extrato por ESI(-)-QTOF-MS foram utilizadas as seguintes condições: injeção de 0,20 µL da amostra em fluxo de 0,25 µL com lavagem do sistema de injeção com solução metanol e água deionizada (70:30, v/v), adicionado 0,1% hidróxido de amônio. Foram utilizadas as seguintes condições de operação: fonte de ionização *electrospray*, voltagem do capilar 3,5kV, temperatura de dessolvatação 225°C, fluxo de dessolvatação 11L min⁻¹, gás de nebulização 25 psi e gás de contra fluxo a 275°C e 12 L min⁻¹, com tempo de aquisição dos dados de 2 minutos para cada injeção. Os dados foram adquiridos na faixa de *m/z* 100-1000 pelo software *Qualitative Analysis B.06.00*. Os dados de composição química e perfil químico foram processados e análises por componentes principais (PCA) e discriminação por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foram utilizadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método empregado para a quantificação de ácido clorogênico e cafeína revelou-se satisfatório em linearidade e precisão (Tabela 1). A curva analítica para ambas substâncias estão apresentadas na Figura 1.

Tabela 1. Parâmetros da curva analítica para cafeína e ácido clorogênico.

Parâmetros	Ácido clorogênico	Cafeína
Equação	$y = 69662x - 100,24$	$y = 108231x + 12,405$
r	0,9968	0,9980
LD	0,000263	0,002516
LQ	0,000796	0,007625
Precisão (CV%)	< 3,7	< 5

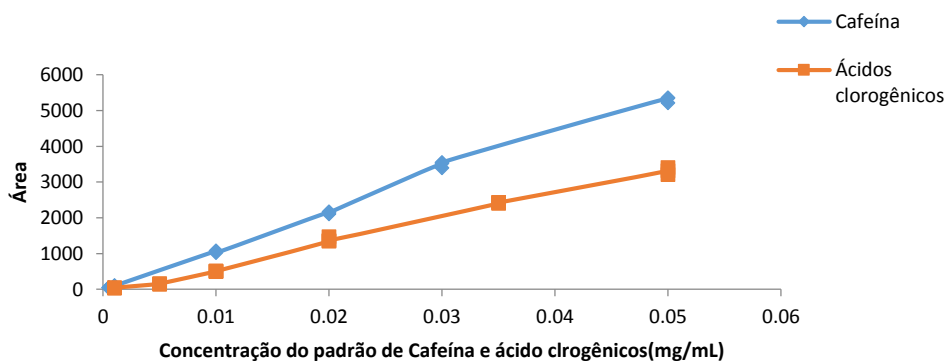


Figura 1. Curva analítica do padrão cafeína e ácido clorogênico.

O teor de ácido clorogênico foi de 1,7 a 3,0 g/ 100g de grão. Para cafeína, os grãos apresentaram variação entre 0,5- 0,9 g/ 100 g de grão. Para o teor de óleo, os grãos apresentaram variação 8 a 11,3 g/ 100g de grão. A Tabela 2 apresenta os valores das médias nos grãos, do desvio padrão e variância dos teores de cafeína, ácido clorogênico e óleo das amostras de tratamento pós-colheita CN, CD e microlotes.

Tabela 2. Parâmetros estatísticos para os teores de cafeína, ácidos clorogênicos e óleo em relação ao tratamento pós-colheita dos grãos de café verde.

	Amostras	Média* ± Desvio Padrão	Variância
Cafeína	Café natural (CN)	0,65 ± 0,10	0,01
	Café cereja descascado (CD)	0,76 ± 0,17	0,03
	Microlotes (CN e CD)	0,72 ± 0,11	0,01

Ácidos clorogênicos	Café natural (CN)	2,31 ± 0,46	0,21
	Café cereja descascado (CD)	2,26 ± 0,49	0,24
	Microlotes (CN e CD)	2,18 ± 0,28	0,07
Óleo	Café natural (CN)	9,69 ± 1,07	1,16
	Café cereja descascado (CD)	10,30 ± 0,63	0,39
	Microlotes (CN e CD)	10,78 ± 0,48	0,24

*Média (g/100 g de grão).

O desvio padrão e a variância dos teores mostram a dispersão das amostras em torno de sua média. As amostras tratamento CN e CD estão mais dispersas ao comparar com as amostras microlotes. Isso acarretou na não diferenciação entre as mesmas.

A partir dos resultados da análise de perfil químico foi possível identificar 13 substâncias no ESI(-)-QTOF, as de maior intensidade relativa (IR) foram ácido quínico (m/z 191,0561), sacarose (m/z 341,1089) e ácido cafeoilquínico (m/z 353,0878) (Tabela 3). Sete substâncias da fragmentação da estrutura do ácidos clorogênicos (ácido cafeico, ferúlico, quínico, coumaroilquínico, cafeoilquínico, feruloilquínico e dicafeoilquínico), seguido de ácidos graxos (palmítico, oleico e linoleico). A identificação foi realizada comparando a razão massa/carga experimental e teórica e a partir da comparação com base de dados de nosso grupo e outras publicações da literatura (Garrett et al., 2014; Garrett et al., 2013; Garrett, Rezende e Ifa, 2013; Rodrigues e Bragagnolo, 2013; Amorim et al., 2009; Clifford et al., 2005; Clifford et al., 2003;).

Tabela 3. Substâncias identificadas por ESI (-)-QTOF-MS.

Substâncias	Fórmula	Teórico (m/z)	Experimental (m/z)	Erro relativo (ppm)	IR ^a
ácido cafeico	$C_8H_7O_2$	135,0446	135,0448	1,4	2,79 ± 0,36
	$C_9H_8O_4$ [M-H] ⁻	179,0349	179,0348	0,5	1,49 ± 0,17
ácido ferúlico	$C_{10}H_{10}O_4$ [M-H] ⁻	193,0506	193,0522	8,2	4,91 ± 0,82
ácido quínico	$C_7H_{12}O_6$ [M-H] ⁻	191,0561	191,0560	0,5	76,18 ± 11,79
ácido palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$ [M-H] ⁻	255,2329	255,2322	2,7	1,84 ± 0,28
ácido linoleico	$C_{18}H_{32}O_2$ [M-H] ⁻	279,2329	279,2321	2,8	4,47 ± 1,71
ácido oleico	$C_{18}H_{34}O_2$ [M-H] ⁻	281,248	281,2475	1,7	1,63 ± 0,26
ácido coumaroilquínico	$C_{16}H_{18}O_8$ [M-H] ⁻	337,0928	337,0919	2,6	2,32 ± 0,57
sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11}$ [M-H] ⁻	341,1089	341,1086	0,8	91,15 ± 12,36
	[2M-H] ⁻	683,2225	683,2169	12,5	5,46 ± 1,10
ácido cafeoilquínico	$C_{16}H_{18}O_9$ [M-H] ⁻	353,0878	353,0873	1,4	69,62 ± 11,38
	[2M-H] ⁻	707,1828	707,1734	13,2	1,81 ± 0,35
ácido ferúlico-hexose	$C_{16}H_{20}O_9$ [M-H] ⁻	355,1034	355,0908	35,4	2,53 ± 0,79
ácido feruloilquínico	$C_{17}H_{20}O_9$ [M-H] ⁻	367,1034	367,1025	2,4	15,27 ± 3,25
atractilósido II	$C_{25}H_{38}O_9$ [M-H] ⁻	481,2443	481,2409	7,0	1,3 ± 0,00
ácido dicafeoilquínico	$C_{25}H_{24}O_{12}$ [M-H] ⁻	515,1190	515,1173	3,3	8,02 ± 0,91

^a Intensidade Relativa (média e desvio padrão); m/z : razão massa carga; ppm: parte por milhão.

A análise de componentes principais (PCA) referente ao perfil químico por ESI(-)-QTOF-MS das substâncias identificadas (Tabela 3) levou à classificação das amostras em relação aos dois tipos de tratamento pós-colheita (CN e CD), além de indicar a maior representação das amostras Microlotes como café cereja descascado (Figura 2). É possível observar os grupos de amostras CN (em preto) na região mais abaixo da linha interna no gráfico, o qual inicia do valor zero de cada eixo, juntamente com as amostras Microlotes (em verde). As amostras CD (em vermelho) estão agrupadas mais acima dessa mesma linha. Essa tipo de análise de dados é um indicativo a respeito das informações contida nas amostras. O que leva a sugerir uma diferenciação entre os tratamentos pós-colheita, apesar de apresentar baixa variabilidade dos dados para ambos componentes principais (40 e 10%). Isso é decorrente da dispersão entre as amostras (grãos de diversas regiões produtoras), mas com valor de coeficiente de variação menor que 0,3 para 11 das 13 substâncias identificadas, assim, os dados podem ser analisados estatisticamente.

A contribuição desse tipo de análise por ESI(-)-QTOF-MS na identificação rápida das substâncias químicas e análise de dados multivariados por componentes principais é aplicável para obter/tirar informações a respeito dos grãos de café verde, neste caso, o tratamento pós-colheita submetido nos mesmo.

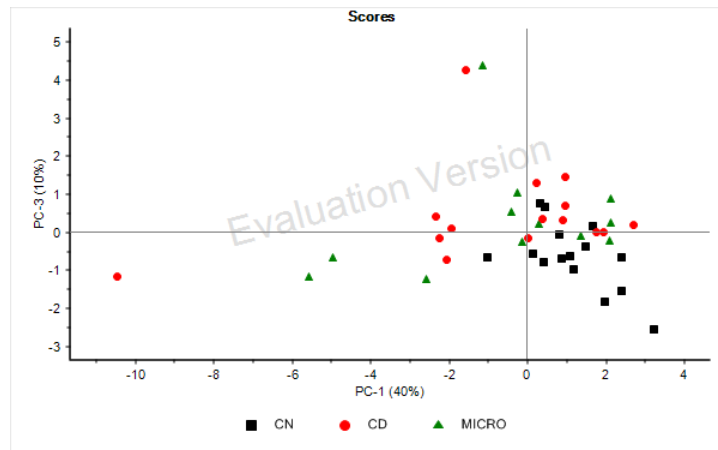


Figura 2. PCA as amostras de café verde (*Coffea arabica* L.) a partir das substâncias apresentadas na Tabela 3. Preto- café natural; vermelho- café descascado; verde- microlotes.

Outra análise de dados capaz de classificar as amostras em grupos é a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), para as mesmas amostras utilizadas no PCA, permitiu observar a discriminação entre os tratamentos pós-colheita (Figura 3).

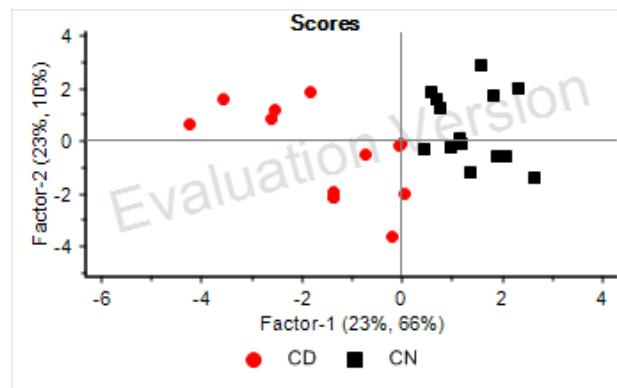


Figura 3. PLS-DA amostra calibração de grãos de café verde (*Coffea arabica* L.) a partir das substâncias apresentadas na Tabela 3. (a) Preto- café natural; vermelho- café descascado; (b) azul (café natural e cereja descascado), verde- microlotes.

Ao construir um modelo de calibração é necessário validar observando os seguintes parâmetros, R^2 , $RMSE$ de calibração e validação cruzada (*cross validation*) e *Slope* (Tabela 4). Os parâmetros foram satisfatórios para descrever adequadamente o modelo.

Tabela 4. Parâmetros de validação dos dados para calibração e validação.

	Calibração	Validação
$RMSE$	0.2766	0.5511
R^2	0.9232	0.7266
<i>Slope</i>	0.9232	0.7796

$RMSE$: (inglês: Root Mean Squared Erro) Erro quadrado médio; *Slope*: declive próximo de 1, dados bem modelados. Tipo de validação: Validação cruzada (*cross validation*).

A partir do modelo de calibração foi aplicado para prever as amostras desconhecidas, neste caso as microlotes. Com intuito de prever em qual grupo (CN ou CD) essas amostras são mais representativas. Na Figura 4, observa-se o agrupamento dessas amostras na região do grupo CD, podendo caracterizá-las como pertencentes em maior proporção como cereja descascado.

Pode-se constatar que a análise do perfil químico por ESI(-)-QTOF-MS e análise de dados por PCA e PLS-DA se mostraram boas ferramentas para diferenciação de tipos de tratamento pós colheita entre as amostras avaliadas produzidas no estado do Paraná. Abre-se, assim, novas possibilidades de caracterização de cafés desconhecidos, com sugestão das duas vias de tratamento pós-colheita a qual foram submetidos os grãos.

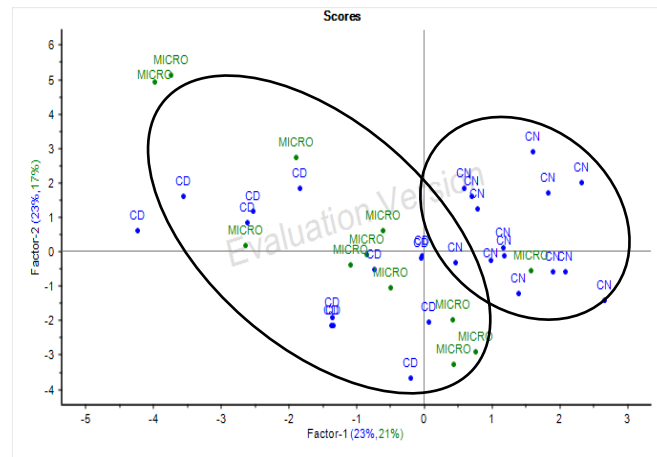


Figura 4. Amostras 'desconhecidas' como forma de caracterizá-los nos grupos observados na calibração obtida por PLS-DA.

CONCLUSÕES

1. A quantificação dos teores de cafeína e ácido clorogênicos não apresentou diferença das amostras em relação ao tratamento pós-colheita.
2. A análise do perfil químico dos grãos de café verde por ESI(-)-QTOF-MS levou à identificação de 13 substâncias.
3. A análise dos dados de perfil químico por ESI(-)-QTOF-MS em conjunto com PCA e PLS-DA foi capaz de classificar as amostras de acordo com o tratamento pós-colheita, café natural e cereja descascado, além de classificar amostras microlotes com maior representação por cereja descascado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Conab: Página na *internet* da Companhia Nacional de Abastecimento, <http://www.conab.gov.br/>, acessada em maio de 2012.
- IAPAR. Café especial produzido no Norte Pioneiro do Paraná recebe certificação de Indicação Geográfica, 2012. Disponível em: [http://www.iapar.br/modules/noticias/article.php?storyid=1421&tit=Cafe-especial produzido-no-Norte-Pioneiro-do-Parana-recebe-certificacao-de-Indicacao-Geografica](http://www.iapar.br/modules/noticias/article.php?storyid=1421&tit=Cafe-especial+produzido-no-Norte-Pioneiro-do-Parana-recebe-certificacao-de-Indicacao-Geografica), acessado em: 29/01/2013.
- GIOMO, G. S. Uma boa pós-colheita é segredo da qualidade, 2012. Disponível em: http://sna.agr.br/wp-content/uploads/alav688_cafe.pdf, acessado em: 06/05/2015.
- ALVES, S. T.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. T. Metodologia para análise simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em café torrado por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova* 29: 1164-1168, 2006.
- GARRETT, R.; SCHWAB, N.V.; CABRAL, E. C.; HENRIQUE, B.V.M.; IFA, D. R.; EBERLIN, M. N.; REZENDE, C. M. Ambient Mass Spectrometry Employed for Direct Analysis of Intact Arabica Coffee Beans. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 25: 1172-1177, 2014.
- GARRETT, R.; SCHMIDT, E.M.; PEREIRA, L.F.P.; KITZBERGER, C. S. G.; SCHOLZ, M.B.S.; EBERLIN, M. N.; REZENDE, C.M. Discrimination of Arabica coffee cultivars by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and chemometrics. *Food Science and Technology* 50:496-502, 2013.
- GARRETT, R.; REZENDE, C.M.; IFA, D.R. Coffee origin discrimination by paper spray mass spectrometry and direct coffee spray analysis. *Analytical Methods* 5: 5944-5948, 2013.
- RODRIGUES, N.P.; BRAGAGNOLO, N. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC-DAD-MSⁿ. *Journal of Food Composition and Analysis* 32: 105-115, 2013.
- AMORIM, A. C. L.; HOVELL, A. M. C.; PINTO, A. C.; EBERLIN, M. N.; ARRUDA, N. P.; PEREIRA, E. J.; BIZZO, H. R.; CATHARINO, R. R.; MORAIS FILHO, Z. B.; REZENDE, C. M. Green and roasted arabica coffees differentiated by ripeness, process and cup quality via Eletspray Ionization Mass Spectrometry fingerprinting. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20: 313-321, 2009
- CLIFFORD, M.N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 53:3821-3832, 2005.
- CLIFFORD, M.N.; JOHNSTON, K.L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:2900-2911, 2003.