

Determinação de dióxido de carbono em café torrado por difusão gasosa e deteção UV-Vis num sistema automático multicomutado

Margarida Quintas Martins da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada à

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em

Métodos Avançados e Acreditação em Análise Química

2021



Determinação de dióxido de carbono em café torrado por difusão gasosa e deteção UV-Vis num sistema automático multicomutado

Margarida Quintas Martins da Silva

Mestrado em Métodos Avançados e Acreditação em Análise Química

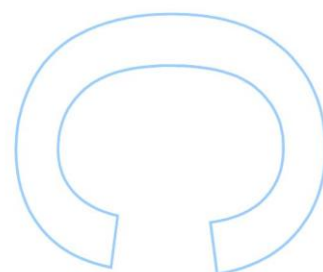
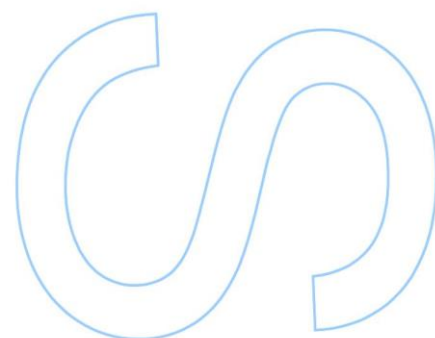
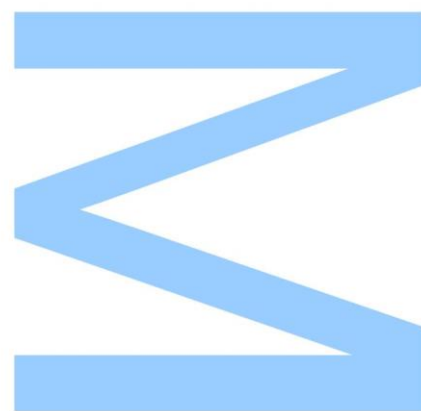
Departamento de Química e Bioquímica
2021

Orientador

Inês Maria Afonso Valente, Investigadora, REQUIMTE/LAQV

Co-Orientador

Paulo Joaquim Ferreira de Almeida, Professor auxiliar, FCUP
João Rodrigo da Silva Santos, Investigador, REQUIMTE/LAQV

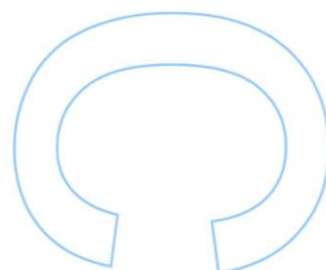
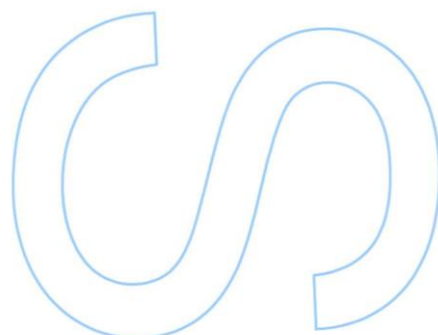
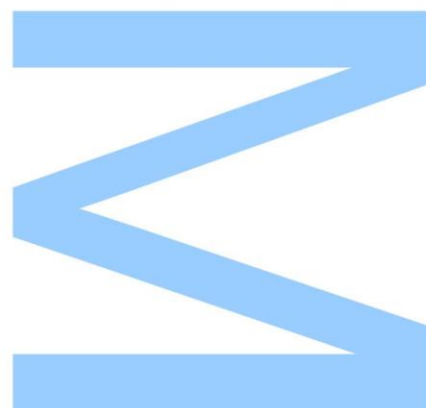




Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____ / ____ / ____



Agradecimentos

Tenho que começar por agradecer à Doutora Inês Valente pois o seu apoio, disponibilidade, paciência e amabilidade foram fundamentais. Sem os seus conhecimentos e a sua orientação ao longo de todas as etapas deste trabalho, este não teria sido realizado e por isso, deixo profundas palavras de agradecimento.

Agradeço também ao Doutor João Rodrigo Santos, por transmitir sempre algo mais para que o trabalho chegasse mais longe. As suas sugestões tiveram um impacto significativo no trabalho e como tal, muito obrigada.

Ao Professor Paulo Joaquim Almeida, que prontamente me integrou no seu grupo de investigação. A particular simpatia, as suas palavras de incentivo e conversas construtivas foram um contributo essencial para o trabalho.

Ao Professor José António Rodrigues e Professor Luís Ferreira Guido, do grupo QuAQuA agradeço em particular pela gentileza e conversas encorajadoras.

Aos investigadores e colegas com quem convivi no laboratório, nomeadamente o Dr. Daniel Carvalho, o Dr. Rui Ramos e a Sandra Teixeira, pela constante boa disposição e ajuda, que enriqueceram também esta experiência.

Agradeço aos meus amigos, especialmente ao André, à Beatriz, à Luiza, ao Pedro, ao Tiago e ao Tomás, pela amizade incansável ao longo desta etapa.

Aos meus pais, o meu inestimável agradecimento. Sem eles, nada disto tinha sido possível para mim, portanto por isto e tanto mais, a minha eterna gratidão.

A todos, o meu sincero **Obrigado**.

Resumo

O dióxido de carbono (CO_2) é um dos principais compostos que resulta da torrefação dos grãos de café, representando cerca de 1-2% da massa de café torrado. O teor de CO_2 tem um papel fundamental não só na experiência sensorial contribuindo para a formação do creme característico da bebida, tão apreciado pelos consumidores, mas também como indicador da frescura da torra sendo por isso um parâmetro de avaliação da qualidade.

A determinação do teor deste gás em amostras de café permanece pouco explorada. As metodologias analíticas descritas para o efeito baseiam-se em técnicas gravimétricas, que são caracterizadas por práticas exaustivas, laboriosas e pelos elevados tempos de análise associados. Este trabalho surgiu com o intuito de desenvolver uma metodologia alternativa para a quantificação de CO_2 em café torrado, recorrendo a técnicas de análise em fluxo, com vista a reduzir o manuseamento da amostra e automatizar o processo analítico. O protocolo desenvolvido baseia-se na acidificação dos grãos inteiros de café torrado para a extração do CO_2 dos grãos para o *headspace* de um vaso reacional, seguido de um passo de pervaporação deste analito para uma solução aceitadora contendo um indicador ácido-base (púrpura de bromocresol) e posterior deteção espectrofotométrica.

Neste trabalho foi otimizada a configuração do sistema de fluxo, bem como a composição da solução aceitadora através de um desenho experimental Simplex supermodificado. Foram igualmente estudadas as condições experimentais para a extração do CO_2 , nomeadamente a concentração de ácido necessário adicionar à amostra, a massa de amostra e o tempo de pervaporação. A metodologia foi caracterizada quanto à gama de linearidade, limites de deteção e quantificação, repetibilidade e precisão intermédia. A metodologia desenvolvida foi calibrada por recurso à metodologia de Hinman com amostras de café com diferentes níveis de torra.

Palavras-chave: Dióxido de carbono, café torrado, sistema de fluxo, deteção espectrofotométrica, indicador ácido-base, Simplex super-modificado, método de Hinman.

Abstract

Carbon dioxide (CO₂) is one of the main compounds formed by the coffee beans roasting process and represents approximately 1-2% of the roasted coffee mass. The CO₂ content not only has a key role in the sensorial experience of the coffee consumption, but it is also a marker of the roast freshness, acting as a quality parameter and contributing to the formation of the characteristic cream of the drink so appreciated by the consumers.

The determination of the content of this gas in coffee samples is still underexplored, and the analytical methodologies described for this purpose are based on gravimetric techniques, which are characterized by exhaustive, laborious practices and highly time-consuming. This work emerged with the aim of developing an alternative methodology for this quantification of CO₂ in roasted coffee, using flow analysis techniques and with reduced sample handling, in order to automate the analytical process. The developed protocol is based on the extraction of CO₂ from the whole roasted coffee beans by pervaporation from the headspace of a reaction vessel to an acid-base indicator acceptor solution (bromocresol purple) and subsequent spectrophotometric detection.

In this work, the configuration of the flow system was optimized, as well as the composition of the acceptor solution through a supermodified Simplex experimental design. The experimental conditions for CO₂ extraction were also studied, namely the acid concentration needed to add to the sample, the sample's mass and the pervaporation time. The methodology was characterized through the linearity range, detection and quantification limits, repeatability, and reproducibility. The Hinman methodology was applied in the determination of CO₂ in coffee samples with different roasting levels.

Keywords: Carbon dioxide, roasted coffee, flow system, spectrophotometric detection, acid-base indicator, supermodified Simplex, Hinman methodology.

Índice de figuras

Figura 1 - Imagem de grãos de café torrados representativos da espécie Arábica (à esquerda) e Robusta (à direita). ^[10]	20
Figura 2 - Imagem de uma planta <i>Coffea arabica</i> ^[12]	21
Figura 3 – Imagem do corte longitudinal da baga de café (imagem retirada de Mussatto ^[6]).....	23
Figura 4 - Representação esquemática dos traços gerais da progressão de uma torra (adaptado de Louzada Pereira ^[17] e Belitz ^[18]).	26
Figura 5 – Resumo das possíveis vias de formação de CO ₂	28
Figura 6 - Unidade de pervaporação. (A) peça de difusão gasosa constituída pela peça de acrílico estanque no suporte de alumínio com reforço de parafusos; (B) Canal cravado na peça de alumínio para a passagem da solução aceitadora; (C) peça de difusão gasosa acoplada à tampa do vaso reacional; (D) vaso reacional com a tampa colocada (unidade de pervaporação).	39
Figura 7 – Representação esquemática do sistema de fluxo multicomutado com detecção UV-Vis para a determinação de CO ₂ em amostras de café. T - Traps isoladoras; BP - Bomba peristáltica; D - damper; V₁ a V₄ – Válvulas solenóides; R - Reator; UD – Unidade de difusão gasosa; CF – Célula de fluxo espectrofotométrica. ..	40
Figura 8 – Fotografia da montagem experimental efetuada para a realização do método de referência (Hinman 1993).	43
Figura 9 – Fotografia da montagem em laboratório do sistema de fluxo multicomutado com detecção UV-Vis para a determinação de CO ₂ em amostras de café. Colunas para retenção de humidade e CO ₂ (A), o <i>damper</i> colocado no canal de água pré diluição (B) e <i>coil</i> de 300 cm após confluência (C).	44
Figura 10 - Espectro UV-Vis do indicador de púrpura de bromocresol. A roxo está representado o espectro da forma alcalina do indicador, nas condições [Ind.]= $1,25 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ e [NaOH]= $4,00 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , com o máximo de absorvância a aproximadamente 590 nm. A amarelo está representado o espectro do indicador na forma ácida, nas condições [Ind.]= $1,25 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ e [NaOH]= $2,10 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ , com o máximo de absorvância a aproximadamente 440 nm.	46
Figura 11 - Vista superior da confluência utilizada na diluição em linha da solução aceitadora, que permite a visualização da configuração em “Y”, com os canais de entrada de água (A) e de solução indicadora (B) e o canal de saída da mistura (C). ..	48
Figura 12 - Gráfico resultante do estudo de linearidade de resposta do detetor espectrofotométrico. Soluções preparadas em $2,00 \times 10^{-2}$ mol L ⁻¹ de NaOH. Tempo de pervaporação: 180 s.	49
Figura 13 - Fiagrama representativo de uma extração de CO ₂ em amostras de café. Sinal de uma amostra de café Arábica (Torra A ₃ da Tabela 4), durante um período de pervaporação total de 200 s.....	49
Figura 14 – Gráfico representativo da progressão da otimização segundo o método de Simplex supermodificado.	53
Figura 15 - Resultados obtidos para o estudo da extração de CO ₂ de grãos de café torrados utilizando diferentes massas de amostra.	55
Figura 16 – Curvas de calibração feitas para diferentes tempos de pervaporação (de 15 segundos a 200 segundos).	56
Figura 17 – Resultados do estudo do tempo total de pervaporação utilizando amostras de 2,5 g de grãos inteiros de café.	57

Figura 18 - Resultados dos estudos de repetibilidade. (A) estudo de repetibilidade do sinal de extrações de CO ₂ de solução padrão de Na ₂ CO ₃ 2,00×10 ⁻³ mol L ⁻¹ , com um tempo de pervaporação total de 200s. (B) estudo de repetibilidade do sinal de extrações de CO ₂ de amostras café Robusta (R4), com um tempo de pervaporação total de 200s.	59
Figura 19 - Resultado do estudo da precisão intermédia do sinal de extração de CO ₂ de soluções padrão de Na ₂ CO ₃ 2,00×10 ⁻³ mol L ⁻¹ , com um tempo de pervaporação total de 200s.	60
Figura 20 – Resultados obtidos para a calibração da metodologia desenvolvida com o método de referência.	62
Figura 21 – Resultados obtidos para a quantificação do teor de CO ₂ numa amostra de café Arábica (A4) ao longo de 8 dias de armazenamento.	65

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Valores típicos da composição do grão de café verde e do grão após torra média, referente às variedades Arábica e Robusta. ^a	24
Tabela 2 - Lista dos equipamentos utilizados	35
Tabela 3 - Fabricante, referência, pureza e densidade dos reagentes envolvidos no trabalho experimental	36
Tabela 4 - Descrição das amostras, segundo caracterização das respectivas torras face ao fator L ^[21]	38
Tabela 5 - Sequência do funcionamento do sistema de fluxo para a extração de CO ₂ em amostras de café. O símbolo ✓ indica que a válvula está ativada no respetivo passo.	42
Tabela 6 – Resumo do estudo das concentrações do indicador de púrpura de bromocresol e de hidróxido de sódio por Simplex super-modificado, com os valores de absorvância associados às coordenadas geradas (que correspondem aos valores de concentração). O estudo foi feito para [Na ₂ CO ₃] = 1,00×10 ⁻³ mol L ⁻¹	52
Tabela 7 – Resultados obtidos em valores de absorvância para o estudo do tempo de adição de ácido, que corresponde ao Passo 4 da Tabela 5, utilizando uma solução de Na ₂ CO ₃ 0,1 mmol.....	54
Tabela 8 – Gama de linearidade, equações das curvas de calibração, coeficientes de determinação (r ²), LD e LQ da metodologia desenvolvida para diferentes tempos de pervaporação.....	58
Tabela 9 - Resultados dos cálculos de coeficientes de variação para os estudos de repetibilidade e precisão intermédia.....	60
Tabela 10 – Resultados do estudo da calibração do método para amostras de torras frescas.	63

Acrónimos e siglas

CIELAB	Espaço de cor designado pela Comissão Internacional de Iluminação
FIA	Análise por injeção em fluxo
LD	Limite de deteção
LQ	Limite de quantificação
MCFIA	Análise por injeção em fluxo num sistema multicomutado
MPFS	Sistema de fluxo multibomba
MSFIA	Análise em fluxo com injeção por multisseringa
PTFE	Politetrafluoroetileno
rpm	Rotações por minuto
SFA	Análise em fluxo segmentado
SIA	Análise por injeção sequencial
UV-Vis	Ultravioleta visível

Índice

Agradecimentos	VII
Resumo.....	IX
Abstract.....	X
Índice de figuras	XI
Índice de Tabelas	XIII
Acrónimos e siglas	XIV
Introdução	18
Parte I - Teórica.....	19
1. Introdução Teórica	20
1.1. Café	20
1.1.1. Contextualização histórica	20
1.1.2. Processamento e composição química do café verde	22
1.1.3. Alterações no grão de café durante a torra	25
1.2. CO ₂ em grãos de café torrados	27
1.2.1. Origem do CO ₂ no café torrado	27
1.2.2. Metodologias para determinação de CO ₂ em café	29
1.3. Sistemas de fluxo	31
1.4. Objetivo.....	33
Parte II - Experimental.....	34
2. Material e métodos.....	35
2.1. Instrumentação e material.....	35
2.2. Reagentes, preparação de soluções e amostras.....	36
2.2.1. Reagentes	36
2.2.2. Preparação de soluções padrão de carbonato de sódio	36
2.2.3. Preparação da solução <i>stock</i> de púrpura de bromocresol	37
2.2.4. Preparação da solução de hidróxido de sódio	37
2.2.5. Preparação de soluções de ácido sulfúrico.....	37
2.2.6. Preparação da solução de citrato de sódio	37
2.2.7. Amostras de café.....	38
2.3. Sistema de Fluxo Multicomutado.....	39

2.3.1.	Características da unidade de pervaporação	39
2.3.2.	Descrição do sistema fluxo	40
2.3.3.	Procedimento experimental para a determinação de CO ₂ em grãos de café torrado	41
2.4.	Método de referência	43
3.	Resultados experimentais e discussão.....	44
3.1.	Estudo da configuração do sistema de fluxo	44
3.2.	Estudo da composição da solução aceitadora.....	45
3.2.1.	Estabilidade da solução aceitadora	46
3.2.2.	Diluição em linha	47
3.2.3.	Leitura do sinal	48
3.2.4.	Otimização da composição da solução aceitadora	50
3.3	Otimização de condições experimentais no sistema de fluxo	53
3.3.1.	Estudo da etapa de adição de ácido	54
3.3.2.	Estudo da massa de amostra de café	55
3.3.3.	Estudo do efeito do tempo de pervaporação na extração de CO ₂	56
3.4	Parâmetros da metodologia	58
3.4.1	Linearidade e limites de detecção e quantificação	58
3.4.2	Repetibilidade e precisão intermédia	59
3.5	Quantificação de CO ₂ em amostras de café	61
3.5.1	Método de referência para a determinação do teor de CO ₂	61
3.5.2	Determinação do teor de CO ₂ em café torrado ao longo do período de armazenamento.....	64
	Conclusões e propostas de trabalho futuro	66
	Referências	68

Introdução

Da planta até à bebida, o grão de café passa por uma série de etapas de processamento, sendo uma dessas fases, o processo de torrefação. A torra tem um papel fundamental na qualidade do produto final, uma vez que aqui ocorrem reações químicas que definem o perfil qualitativo do café quanto à textura, sabor, aroma, creme e cor.^[1] Registam-se também transformações a nível estrutural^[2], com a perda de massa e aumento do volume, bem como alterações relativas à composição química, com a perda de humidade e formação de compostos voláteis, dos quais é possível destacar o dióxido de carbono, com um teor de até 2% da massa total de café torrado de fresco.^[3]

A determinação do teor de dióxido de carbono no café torrado é relevante para a indústria, uma vez que este gás tem implicações a nível da qualidade, influenciando o tempo útil de prateleira do produto.^[4] Como tal, este trabalho tem como objetivo determinar o dióxido de carbono em amostras de grão de café, utilizando um método de fluxo com difusão gasosa e deteção espectrofotométrica. Com esta metodologia de baixa pressão antevê-se uma execução simples, que permita uma eventual adaptação da técnica a situações *in situ*, para análises de rotina, contrastando desta forma com os escassos métodos já descritos na literatura, que envolvem técnicas exaustivas face os gastos de tempo e de recursos envolvidos.

Este trabalho está dividido em duas partes, sendo que a Parte I corresponde à contextualização do tema com uma descrição teórica, que engloba a caracterização do café e as suas origens, a sua composição e as vias de formação para o aparecimento do dióxido de carbono. Nesta parte são ainda apresentadas metodologias já disponíveis para a determinação deste gás neste tipo de amostras, bem como é feita uma breve abordagem aos sistemas de fluxo. Na Parte II, são descritos os equipamentos e materiais utilizados, as rotinas experimentais implementadas e abordam-se aspetos pertinentes da atividade experimental em laboratório, acabando com a apresentação e discussão dos resultados obtidos.

Parte I - Teórica

1. Introdução Teórica

1.1. Café

1.1.1. Contextualização histórica

O café é atualmente um dos bens mais procurados no mundo inteiro, com um mercado anual que movimenta cerca de 80 mil milhões de euros, sendo apenas ultrapassado pelo mercado do petróleo.^[2, 5, 6] A indústria crescente do café que garante a subsistência de pelo menos 100 milhões de pessoas inclui plantações que se estendem ao longo de mais de 10 milhões de hectares, em mais de 50 países sendo a Europa o continente onde se regista a maior procura por este bem alimentar.^[7]

O café que tem vindo a ser consumido há mais de mil anos consiste em bagas colhidas da planta *Coffea* (género proposto por Carl Linnaeus em 1737), cujas árvores ou arbustos pertencem à família *Rubiaceae*, com mais de 70 espécies reconhecidas de *Coffea* L.^[8] Segundo a plataforma *Statistic*, especializada no tratamento de dados, atualmente o maior exportador de café é o Brasil seguido pelo Vietname, em que se destacam duas variedades de relevo comercial: Arábica (*Coffea arabica* L) e Robusta (*Coffea canephora*)^[9], representadas na Figura 1.



Figura 1 - Imagem de grãos de café torrados representativos da espécie Arábica (à esquerda) e Robusta (à direita).^[10]

O café, semelhante a tantas outras plantas nativas, começou por ser empregue pelas tribos aborígenes africanas desde as suas folhas, frutos e polpa, sendo até utilizado enquanto mistura sólida, semelhante às barras de chocolate que conhecemos hoje em dia. O café era utilizado de várias formas, desde ser comprimido com óleos e gordura, misturado com manteiga e várias especiarias, cozido com leite ou combinado com mel. O café era ainda aproveitado como fonte energética na confeção de bolos, utilizado em práticas religiosas, sendo mais tarde até usado nos primórdios da medicina ou até como moeda de troca.^[7]

Não existe ainda um total consenso de quando e como o café arábica, endémico de certas regiões de África, chegou ao lémén. Está, contudo, reconhecido que o primeiro registo do café enquanto bebida (meados do século XV) ocorre na península arábica. Nos anos seguintes, a popularidade desta bebida expandiu-se para o ocidente, levando ao difundido hábito de beber café e ao aparecimento de *coffeehouses*, espaços de debates políticos, de ideias e acontecimentos, transversais às classes sociais.^[11]



Figura 2 - Imagem de uma planta *Coffea arabica* ^[12]

Contudo, até à abertura da primeira *coffeehouse* na Europa (Veneza, em 1645), o que simultaneamente despertou tanto o interesse dos consumidores, como o dos botânicos da época, já um arrevesado caminho tinha sido traçado para esta planta (Figura 2). Uma vez que o café se tornou num comércio lucrativo para os árabes, sendo que na última metade do século XV eram estes que detinham a exclusividade do seu cultivo, durante muito tempo registou-se um controlo cioso das plantações. Eram

proibidas visitas às mesmas e nenhum grão cru poderia ser comercializado sem que antes lhe fosse removido o potencial germinativo. Eventualmente, a disseminação global baseou-se então numa seleção limitada, com uma tentativa em 1715 por parte dos franceses, de cultivar o café na ilha de Reunião e em 1718 por parte de holandeses, com a plantação de café no Suriname. Efetivamente o ano de 1718 marca o início da chegada desta planta ao continente sul e central americano, o que consequentemente justifica a base genética mais frágil do café arábica, aliado ao facto desta espécie ser autogâmica.^[13]

Atualmente, as zonas ótimas para o cultivo das variantes desta espécie residem no *Bean Belt* - região equatorial limitada pelos trópicos de Caranguejo e Capricórnio – em que a variedade Robusta predomina em regiões de elevadas temperaturas ao passo que a variedade Arábica (representativa de aproximadamente 70% da produção a nível mundial) predomina em terrenos de elevada altitude, resultando num café com menor teor de cafeína e maior presença de lípidos.^[6]

1.1.2. Processamento e composição química do café verde

Sendo o café atualmente uma bebida de destaque, têm sido realizados vastos estudos que visam avaliar a sua qualidade, abrindo um debate acerca da experiência sensorial associada. Dos vários estudos feitos foi obtido um consenso: os atributos intrínsecos do café devem-se aos compostos químicos presentes nas bagas, ao clima e condições do solo no crescimento da planta, à sua colheita e o seu consequente tratamento.^{[14] [15]}

Existem variados procedimentos pós-colheita ao qual um produtor pode recorrer para tratar os grãos de café antes da torra. Como este é um dos fatores determinantes para o produto final, compreende-se assim o potencial do grão verde (considerado cru, ainda por secar e torrar) e a resultante diversidade encontrada no mercado do café. Contudo, o café ganha expressão com as reações químicas desencadeadas no processo da torra.

No entanto, até o grão verde do café estar pronto para ser torrado, existem várias etapas de processamento pós-colheita. No processamento do café, após a fase de plantação, é feita a colheita da baga (a cada 5 anos aproximadamente) após o fruto adquirir a cor vermelha e é então aqui que começa o tratamento do grão. Existem essencialmente dois métodos: o método por via seca e o método por via húmida. O método por via seca é um processamento mais simples e natural, normalmente realizado ao café Robusta em que o café é seco ao sol ou em secadores mecânicos com o objetivo de remover a humidade até serem atingidos níveis de humidade de cerca de 11%. Só posteriormente o exocarpo e o remanescente da polpa do café são removidos.

O método de processamento do café por via húmida, mais complexo e aplicado por norma ao café Arábica, implica o transporte do fruto por leitos de água para máquinas (despolpadores) que possibilitam a remoção do exocarpo e mesocarpo ainda com a baga fresca. Posteriormente, o café é levado a secar apenas envolto no endocarpo (ver Figura 3), até a uma redução do teor de humidade até cerca de 11%. Este valor de humidade final possibilita a conservação deste fruto durante o armazenamento e exportação.^[6, 14, 16]

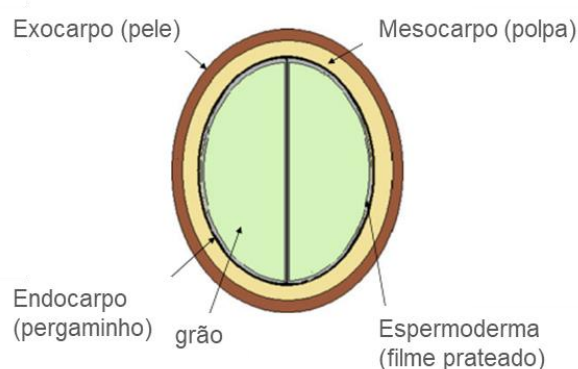


Figura 3 – Imagem do corte longitudinal da baga de café (imagem retirada de Mussatto ^[6])

As reações químicas determinantes para a formação da bebida final de café envolvem os componentes químicos que integram a composição do grão de café verde (pré-torra). Os grandes grupos de compostos aqui encontrados são os ácidos

clorogénicos, hidratos de carbono, compostos azotados (essencialmente trigonelina, aminoácidos e cafeína) e lípidos. Todos os grupos de compostos referidos sofrem variações de concentração significativas durante o processo de torra, excetuando a cafeína e os lípidos, cujos níveis se mantêm relativamente estáveis ao longo do processo da torra, não contribuindo substancialmente para o perfil aromático reconhecido do café.^[17]

De um modo geral, comparando a composição química das duas espécies de café mais correntemente comercializadas (Ver Tabela 1), no café Robusta (*C. canephora*) regista-se uma maior presença de cafeína e ácidos clorogénicos, e uma quantidade consideravelmente inferior de lípidos, sacarose e trigonelina, quando comparados com os teores detetados no café Arábica (*C. arabica*).^[18] [8]

Tabela 1 - Valores típicos da composição do grão de café verde e do grão após torra média, referente às variedades Arábica e Robusta.^a

Componente	Grão Verde 		Grão Torrado 	
	Arábica	Robusta	Arábica	Robusta
Ácidos clorogénicos	6,7-9,2	7,1-12,1	2,7	3,1
Hidratos de carbono	55,0-65,5	40,0-55,5	38,0	41,5
Compostos nitrogenados				
Trigonelina	0,6-1,2	0,3-0,9	1,0	0,7
Aminoácidos	8,7-12,8		10,0	
Cafeína	0,8-1,4	1,7-4,0	1,3	2,4
Lípidos	15-18	8-12	17	11

Nota: Tabela compilada com base em Belitz^[18], Stalmach A.^[19], Yamagata^[20].

^a Os valores encontram-se apresentados em %(m/m).

1.1.3. Alterações no grão de café durante a torra

O processo da torra do café é dependente quer do tempo, quer da temperatura, e é responsável pelas reações químicas que ocorrem no grão verde até à obtenção do grão torrado.^[21]

A matriz intercelular do grão de café, que é constituída por celulose, os polissacáridos arabinogalactanas e galactomananas, lenhina e ainda outros hidratos de carbono, é alterada a partir do momento que se inicia a torrefação. Este processo da torra é composto por essencialmente três etapas (evidenciadas na Figura 4) : etapa de secagem (abaixo dos 160 °C), a fase mais demorada do processo que implica uma diminuição significativa do teor de humidade (processo endotérmico que leva a um decréscimo do teor de água até uma percentagem residual), seguido da etapa do desenvolvimento do aroma e da cor, demarcada pelo primeiro *crack* do grão, por volta dos 200 °C, onde se registam várias reações pirolíticas, como as reações de Maillard, que levam à formação de CO₂ e dos compostos voláteis característicos e, por fim, a etapa do arrefecimento (fundamental para rapidamente cessar a torrefação), para prevenir uma torra excessiva que possa por em causa a qualidade do produto desejado. Esta última etapa normalmente realizada através de diferentes estratégias, por exemplo *quenching*, pulverização de água para rápida diminuição da temperatura ou através da circulação de ar frio.^[14]

Para a realização de uma torra uniforme, existem essencialmente 3 aspetos transversais a qualquer torrador. Independentemente do princípio mecânico e do tipo de equipamento, estes têm que integrar uma câmara que confina a amostra, um dispositivo de mistura que garanta uma exposição homogénea ao calor e um componente que permita regular a transferência de calor.

Todavia, o procedimento da torra, é aparentemente simples. As reações químicas ocorrem a partir de aproximadamente 120 °C e o processo atinge valores de temperatura de até cerca de 200 °C (consoante a extensão de torra pretendida).



Figura 4 - Representação esquemática dos traços gerais da progressão de uma torra (adaptado de Louzada Pereira^[17] e Belitz^[18]).

Durante este processo ocorre a alteração da cor, tamanho, textura, massa, estrutura, densidade e o desenvolvimento de sabores característicos do café (50% de incremento das propriedades organoléticas). Estes são resultado de uma sequência de complexas reações que requerem um preciso controlo do tempo e da temperatura de torra, para alcançar um perfil aromático específico.^[17] Como tal, na indústria, há uma rigorosa monitorização do processo, em que é comum que a torra seja finalizada entre o primeiro e o segundo *crack*. No primeiro *crack* admite-se uma expansão da estrutura rígida do grão resultante do aumento da pressão interna. Esta expansão deve-se à deformação da matriz (antecedida pelo aumento do seu volume e decréscimo mássico do grão), permitindo a libertação de humidade e de compostos voláteis (dando ênfase ao CO₂), através das falhas entretanto geradas na parede celular^[17, 22]. Com o progressivo escurecimento do grão, ocorre o segundo *crack*, já não tão intenso, que representa o aparecimento de sabores com um trazo a queimado, perda da riqueza de aromas e da acidez apreciável, surgindo igualmente na superfície do grão gotículas de óleo. Estas transformações vêm com a alteração do perfil químico do grão.^[5]

Face ao progressivo escurecimento do grão durante a torra, destacam-se as reações que envolvem hidratos de carbono, através da pirólise e caramelização da sacarose e a sua hidrolisação em frutose e glucose (os açúcares redutores para a reação de Maillard). Das várias reações complexas envolvidas no processo da torra, estas reações de Maillard, com a degradação de Strecker, são descritas como as principais responsáveis pelo aparecimento da cor e aroma no café. Como resultado da

degradação de açúcares e aminoácidos, surgem os furanos e outros compostos sulfurados com um teor considerável no café, face ao sabor terroso e levemente tostado que lhe atribuem.^[17]

Os ácidos clorogénicos, com a progressão do nível da torra, são também degradados levando à formação dos ácidos cafeico e quínico, compostos fenólicos que contribuem para um travo amargo à bebida.^[3] Observa-se também a degradação de um outro precursor, a trigonelina, que vai contribuir para a formação de piridinas, umas das classes de compostos voláteis com maior destaque a nível quantitativo e qualitativo no café.

O perfil volátil do café arábica é caracterizado pelo aroma caramelizado e adocicado explicado pelo teor predominante de compostos da família do furfural, o que contrasta com o paladar térreo, apimentado e com sabores alusivos a nozes, característico do café robusta devido à contribuição das pirazinas na sua composição (cujo perfil sensorial varia consoante o tamanho e posição da cadeia alquilo). Estas diferenças notórias entre os dois perfis aromáticos destes cafés, reforçam o papel fundamental dos constituintes voláteis na bebida enquanto produto final^[17]. Após a torra, os compostos com os vários grupos funcionais que atribuem os notas aromáticas ao café, como aldeídos, cetonas, esteres, benzenos, álcoois, entre tantos outros, ficam retidos na estrutura porosa celular dos grãos de café acabados de torrar e gradualmente vão-se libertando.^[23-25]

1.2. CO₂ em grãos de café torrados

1.2.1. Origem do CO₂ no café torrado

Paralelamente ao desenvolvimento dos aromas e sabores do café, as reações químicas desencadeadas durante o processo de torra do café levam também à formação e libertação do CO₂, um gás que representa cerca de 87% da totalidade da formação de compostos voláteis^[15, 27], sendo que num lote fresco de café acabado de torrar, até 2% em massa pode ser atribuído a este gás inorgânico. Assim, justifica-se a

importância deste gás, atendendo à sua presença considerável.^[28] O dióxido de carbono, que surge com um maior teor em torras médias e fortes no café, tem vindo a ser descrito como resultado da decomposição de ácidos carboxílicos libertados no processo da torra através da reação de Maillard, da degradação de Strecker (pertencente à série de reações de Maillard), caramelização e pirólise de açúcares (exposto na Figura 5). A reação de Maillard envolve a condensação de grupos carbonilo de um açúcar redutor com um grupo amina de um aminoácido, levando à eventual formação de Produtos de Amadori (desoxicetoses resultantes de rearranjos nas bases de Schiff). Estes compostos levam à formação de aldeídos de Strecker numa seguinte etapa da reação de Maillard denominada por degradação de Strecker, na qual se regista a libertação de CO₂.

Tem vindo ainda a ser investigada a hipótese do CO₂ resultar da degradação de ácidos clorogénicos, tendo em conta o seu elevado teor no grão verde do café (varia de 3 a 12%) e ao desaparecimento quase total destes ácidos no café torrado, dependendo da extensão da torra^[15, 17, 29], como demonstra a Tabela 1.

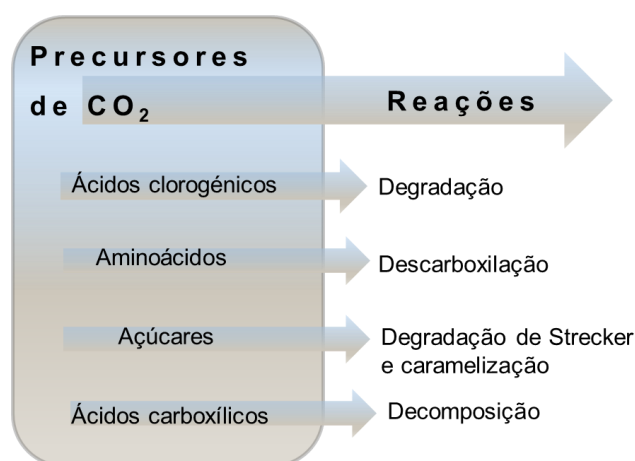


Figura 5 – Resumo das possíveis vias de formação de CO₂

A produção e subsequente quantidade de CO₂ retido nos grãos de café torrados têm sido indicados como independentes da temperatura da torra.^[14] Apenas o perfil de torra demonstra ter algum tipo de influência na taxa de desgaseificação do CO₂, nas quais torras mais rápidas e a elevadas temperaturas levam a uma taxa significativamente maior de libertação de CO₂ comparativamente com torras mais longas e a menores temperaturas.^[30] Embora uma porção considerável do CO₂ tenha sido já libertado durante o processo da torra, é durante o armazenamento dos grãos de café, que a libertação deste gás se torna matéria de discussão. Com a progressão da torra, vão

ocorrendo alterações microscópicas a nível estrutural, que culminam no aumento do volume do grão, ao ponto de se gerarem pequenas fendas e poros na estrutura original da matriz, por onde os compostos voláteis e, particularmente o dióxido de carbono, vão ser libertados. As estruturas porosas são determinantes nos processos de transferência de massa, na libertação do aroma, na migração dos óleos formados e claro, na libertação de CO₂. Estima-se que a maioria do CO₂ esteja retido em microporos (1,7 a 3,3 nm), mas é registada a formação também de mesoporos (2-50 nm) e macroporos (50 nm). Surge também descrito que o CO₂ pode ser retido em função de processos em equilíbrio, que vão desde a solubilidade deste gás no óleo e no teor baixo de humidade, à sua adsorção a grupos hidroxilo e amina.^[15, 17, 31]

Para a conservação e comercialização dos grãos de café, a evolução do CO₂ é um aspeto fundamental a ter sob controlo. A contínua libertação de CO₂ pode levar a que, após o empacotamento do café, haja risco de rutura da embalagem. Por esse motivo, em modo de prevenção, opta-se pela desgaseificação parcial do café após a torra. Contudo, esta medida preventiva pode a longo prazo levar ao deterioramento da qualidade do café, uma vez que este gás forma uma atmosfera protetora, que permite a conservação do perfil aromático e previne a oxidação.^[22] Na indústria, já são comercializadas embalagens com válvulas de ventilação que regulam a pressão interna da embalagem resultante da libertação do CO₂. Não obstante, é inevitável reconhecer também neste gás a sua vertente enquanto indicador da frescura e qualidade de uma torra.

1.2.2. Metodologias para determinação de CO₂ em café

O CO₂ tem um papel fundamental na preservação da qualidade do produto final, na medida em que contribui para a formação e volume do tão apreciado creme na infusão de café e impede a deterioração do produto durante o armazenamento, ao formar uma atmosfera protetora. Neste contexto, o estudo cinético da evolução deste gás nas amostras é pertinente. Grande parte da pesquisa na comunidade científica aborda assim o estudo das taxas de desgaseificação. Contudo este não é o objetivo deste trabalho, mas sim a determinação do teor de CO₂ nas amostras. Para isso, conhecem-se algumas metodologias já implementadas, embora seja de ressaltar que a determinação direta deste gás é um campo ainda pouco explorado. Porém, algumas

metodologias destacam-se. A determinação de CO₂ pelo Método de Hinman (1993), considerado neste trabalho como método de referência, quantifica por gravimetria o CO₂. Numa montagem que inclui um balão de 3 tubuladuras, um condensador e duas colunas dispostas em série, o procedimento experimental consiste em: no balão de 3 tubuladuras colocam-se os grãos de café moídos numa solução de citrato de sódio 50 g/L em NaOH 0,25 mol L⁻¹, o qual se adiciona uma solução de ácido sulfúrico 2,5 mol L⁻¹ para favorecer a libertação de CO₂ (extração realizada a uma temperatura de 50-70 °C). Auxiliado pelo fluxo constante de dinitrogénio por 1 hora, o dióxido de carbono é direcionado inicialmente para uma coluna de sulfato de cálcio anidro (coluna de Drierite cuja função passa por reter a humidade arrastada pelo fluxo de dinitrogénio), e posteriormente até uma coluna de Ascarite (sílica impregnada de NaOH) onde o CO₂ é retido. A quantificação de CO₂ é realizada por pesagem da coluna de Ascarite, antes e depois do processo de extração. Uma outra metodologia gravimétrica consiste na determinação do teor de CO₂ nas amostras de café (grãos inteiros e moídos) através do uso de um forno a uma temperatura controlada. Para tal, foram utilizadas entre cerca de 15 a 12 g de massa amostra de café, deixadas a repousar durante 1 hora antes das medições. Neste procedimento experimental, duas balanças de elevada precisão estão colocadas dentro de um forno a uma temperatura controlada de 35 ± 0,2 °C, que efetuam medições contínuas (com uma resolução de 10 µg) da massa do gás retido no *headspace* do recipiente de amostragem, até serem atingidos baixos níveis relativos de humidade (inferiores a 20%). Estas balanças fazem medições de massa a cada 90 s, sendo que a primeira medição feita ao fim dos primeiros 90 s serve como referência para valores de zero perda de massa. As balanças semi-micro utilizadas garantem ajustes contínuos e calibração interna automática a cada 3 horas, através dos dois pesos internos combinados - procedimento experimental que chega a alcançar 400 h.^[28]

Encontram-se ainda descritas outras técnicas associadas à determinação de CO₂ em amostras de grãos de café, baseadas na avaliação da pressão interna de um recipiente de armazenamento de café^[32]; através de um analisador de gás infravermelho não-dispersivo^[22, 30], entre outros. Porém estas técnicas são direcionadas na sua maioria, para a monitorização de torras relativamente às taxas de desgaseificação de CO₂ e aos fenómenos de difusão associados, o que face à quantificação que se pretende alcançar com este trabalho, estas técnicas não se enquadram totalmente enquanto suporte.

1.3. Sistemas de fluxo

Neste trabalho, as técnicas de fluxo surgem como um dos elementos essenciais para o desenvolvimento do método. De um modo geral, os sistemas de fluxo incluem um dispositivo de propulsão das soluções, um injetor, um reator, e um detetor.^[33] Assim, pretendeu-se explorar as vantagens dos sistemas de fluxo para o desenvolvimento de uma metodologia automática para a determinação de CO₂ em amostras de café.

No contexto da Química Analítica, a importância das técnicas de fluxo tem vindo a crescer desde o seu aparecimento, no final da década de 1950. Na área da medicina, a necessidade de análises clínicas de rotina no panorama preventivo foi um dos impulsionadores na utilização destas técnicas^[34]. A procura pela automatização do processo analítico, a miniaturização de equipamento, a vertente económica e a sustentabilidade dos procedimentos, conjuntamente com as elevadas taxas de amostragem, seletividade, repetibilidade e reprodutibilidade, justificaram a aplicação destas estratégias de gestão de fluídos. O aparecimento de computadores teve também um papel fundamental na extensão da aplicabilidade destas técnicas.^[34]

Das técnicas de fluxo inicialmente desenvolvidas, destacam-se a técnica de análise em fluxo segmentado (SFA) e a técnica de análise por injeção em fluxo (FIA). De um modo resumido, a técnica de SFA, desenvolvida por Skeggs em 1957^[35], consistia em aspirar continuamente a amostra e demais soluções, com inserção periódica e alternada de bolhas de ar. Pretendia-se deste modo, obter alíquotas sob condições de equilíbrio químico e físico previamente ao momento da deteção. Os sistemas FIA, desenvolvidos por Ruzicka e Hansen^[36] em 1975 apresentaram como principal característica a possibilidade de realizar a análise sob condições de não equilíbrio químico e/ou físico. Do ponto de vista da instrumentação envolvida, os sistemas FIA caracterizavam-se pelo uso de uma válvula de injeção de volume constante para efeitos de inserção da amostra no sistema de fluxo. Em suma, esta abordagem permitia a redução substancial do consumo do volume de amostra e/ou reagentes relativamente aos sistemas SFA, bem como tempos de resposta consideravelmente menores, com uma flexibilidade de montagem bastante acessível.

Com o acoplamento de computadores aos sistemas de análise em fluxo, surgiram novos desenvolvimentos das técnicas de fluxo. Destaca-se neste contexto a técnica SIA - análise por injeção sequencial, também desenvolvida por Ruzicka e Hansen^[36]. Nesta abordagem, o cerne do sistema de fluxo é uma válvula multiposição

que permite a implementação mais expedita de sistemas também mais complexos no qual se pode efetuar a inversão do sentido de fluxo. Em 1994 é apresentada a técnica MCFIA^[37] - análise por injeção em fluxo multicomutado. Nesta estratégia, que será igualmente explorada neste trabalho, é possível realizar a gestão das soluções utilizadas com base em tempo, através de válvulas solenoides para, por exemplo, controlar o consumo e/ou a mistura das soluções e amostras propulsionadas pelo sistema^[34]. Em 1999 surge a análise em fluxo com injeção através de sistemas de multisseringas, MSFIA^[38, 39]. A principal vantagem desta estratégia reside na elevada precisão e reprodutibilidade nos volumes dispensados resultantes do desempenho inerente do equipamento multisseringa. Neste grupo de estratégias de gestão de fluidos controlados por computador, enquadram-se ainda os sistemas de fluxo baseados em multibomba-MPFS^[40]. Este tipo de sistemas baseia-se em bombas solenoides enquanto unidades de propulsão das soluções, permitindo uma mistura mais rápida e eficiente entre soluções. Nesta área em particular, destacam-se as aplicações em estudos de luminescência.

Todas as técnicas referidas neste último grupo, apesar das variações que apresentam entre si, têm algo em comum que faz com que os sistemas de fluxo apresentem um desempenho analítico superior em comparação com os sistemas não automáticos. Destacam-se como principais vantagens, a reduzida intervenção do operador no processo de análise, a maior repetibilidade e reprodutibilidade de resposta e o reduzido consumo de soluções.

1.4. Objetivo

O CO_2 , gás produzido durante o processo de torra do café, assume um papel importante para a qualidade e preservação do grão, e como indicador da frescura da torra. Assim, neste trabalho, visou-se o desenvolvimento de um método para a determinação deste gás inorgânico em amostras de grãos de café torrados, que seja uma alternativa aos métodos convencionais disponíveis, na sua maioria gravimétricos, caracterizados pelo elevado consumo de tempo e recursos.

A metodologia desenvolvida permite aliar as particularidades de um sistema de fluxo, com a deteção por espectrofotometria de absorção UV-Vis.

Considerando a importância e alcance da indústria do café, torna-se relevante trabalhar no sentido de desenvolver um método numa vertente mais automatizada, económica, envolvendo um consumo mínimo de solventes, permitindo uma elevada taxa de amostragem. Prevê-se que o método possa vir a ser implementado em testes de rotina.

Parte II - Experimental

2. Material e métodos

2.1. Instrumentação e material

Ao longo do desenvolvimento do trabalho laboratorial, foram utilizados diversos equipamentos cuja descrição se encontra descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Lista dos equipamentos utilizados

Equipamento	Marca e modelo	Especificação
Balança analítica	Mettler AE50	para pesagem rigorosa de reagentes
Bomba peristáltica de 4 canais	Gilson, Minipuls 3	para propulsão das soluções no sistema de fluxo
Célula de fluxo espectrofotométrica	<i>Hellma Analytics</i> 1787121510-40	célula de quartzo (10 mm caminho ótico) com um volume de 18 μ L
Detetor UV-Vis	<i>USB 4000, Ocean Optics</i>	espectrofotómetro modular
Eléctrodo combinado de pH	Crison, 4193669	utilizado no ajuste de pH de soluções
Fibras óticas	QP600-2-UV/BX, <i>Ocean Optics</i>	caminho ótico do espectrofotómetro
Fonte de radiação UV-Vis	DT-MINI-2GS, <i>Ocean Optics</i>	fonte de luz proveniente de lâmpadas de tungsténio e deutério
Medidor de pH	HANNA Instruments 2550	milivoltímetro que converte o potencial do eléctrodo para a escala de pH
Membrana hidrofóbica	Millipore Mitex (25 mm, 5,0 μ m de tamanho de poro)	parte integrante da célula de difusão gasosa
Micropipetas	Gilson P200, P1000, P5000	para medição rigorosa de volumes iguais ou inferiores a 5 mL
Placa de agitação	Framo-Gerätetechnik	para agitação das soluções amostra no sistema de fluxo
Sistema de purificação de água	Millipore, Direct-Q 3UV	para produção de água ultrapura para preparação de soluções (resistividade > 18 M Ω cm e filtrada com filtro de 0,2 μ m)
Torrador de café	<i>CafeMasy</i> CCR-308	torrador de fluxo de ar quente para a torra de café verde
Válvulas solenoides de 3 vias	NResearch MAT031 MBT031	para automação do fluxo das soluções na tubagem do sistema

2.2. Reagentes, preparação de soluções e amostras

2.2.1. Reagentes

As características principais que descrevem os reagentes utilizados no decurso do trabalho experimental encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Fabricante, referência, pureza e densidade dos reagentes envolvidos no trabalho experimental

Reagente	Fórmula química	Fabricante e referência	Pureza
Ácido sulfúrico	H_2SO_4	Sigma-Aldrich 30743-M	95-97%
Carbonato de sódio	Na_2CO_3	Panreac 131648.1210	99,5%
Citrato de sódio di-hidratado	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fisher BioReagents BP 327-1	99,0-101,0%
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	Chem-Lab CL00.0507	96%
Hidróxido de sódio	NaOH	PanReac AppliChem 131687	98,0%
Púrpura de bromocresol	$\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$	Sigma-Aldrich 114375	>90%

2.2.2. Preparação de soluções padrão de carbonato de sódio

Para a preparação da solução *stock* de carbonato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pesaram-se cerca de 2,08 g do reagente comercial e dissolveu-se em 250,0 mL de água ultrapura. As soluções diluídas foram preparadas por diluição rigorosa desta em água ultrapura.

2.2.3. Preparação da solução *stock* de púrpura de bromocresol

Na preparação da solução indicadora de púrpura de bromocresol $2,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, dissolveram-se 0,1080 g deste reagente em 2 mL de etanol, perfazendo-se o volume final de solução, num balão volumétrico de 10,00 mL com água ultrapura.

2.2.4. Preparação da solução de hidróxido de sódio

Na preparação da solução de hidróxido de sódio $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, dissolveram-se 0,4 g deste reagente em água ultrapura, perfazendo um volume final de 500,0 mL. Esta solução foi utilizada na preparação da solução aceitadora.

2.2.5. Preparação de soluções de ácido sulfúrico

i. Solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$

Na preparação da solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, mediram-se 27 mL desta solução comercial, perfazendo a solução de 1 L com água ultrapura. Esta solução foi utilizada como uma das soluções em fluxo no sistema.

ii. Solução de ácido sulfúrico $2,5 \text{ mol L}^{-1}$

Para a preparação da solução de ácido sulfúrico $2,5 \text{ mol L}^{-1}$, mediram-se 33 mL da solução comercial, perfazendo a solução de 250 mL com água ultrapura. Esta solução foi utilizada no protocolo do Método de referência.

2.2.6. Preparação da solução de citrato de sódio

Na preparação da solução de citrato de sódio 50 g/L em hidróxido de sódio $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, dissolveram-se 5 g deste último reagente em água ultrapura. Seguidamente, foram para aqui foram dissolvidas 25 g do reagente de citrato de sódio. Com água ultrapura, fez-se um volume total de 500 mL.

2.2.7. Amostras de café

De modo a obter amostras de café com diferentes teores de CO₂, foram feitos vários níveis de torra de café verde das variedades Arábica e Robusta (proveniente do Brasil), de acordo com os parâmetros indicados na Tabela 4. Para este efeito, recorreu-se a um torrador de fluxo de ar quente (Tabela 2). Além destas amostras, foi analisada também uma amostra de café comercial, caracterizada por ser uma mistura das duas variedades Robusta e Arábica.

A intensidade da torra foi avaliada através da cor dos grãos, segundo o parâmetro de luminosidade do modelo CIELAB (L), caracterização esta que está presente na Tabela 4. Para tal, as amostras de café torrado foram comparadas com padrões de cor de café torrado.

Embora a apreciação da luminosidade seja algo subjetiva, a escala permite o enquadramento do nível da torra de uma forma prática e rápida, na qual, para referência, valores de L inferiores e aproximados de 20, representam torras fortes, enquanto um valor L de 30 já é indicativo de uma torra leve ^[21].

Relativamente às condições do torrador, optou-se pelo *setting* médio referente à velocidade da ventoinha e o *setting* mínimo relativo à temperatura, com um tempo de arrefecimento de 15 s. Estas definições foram aplicadas a todas as torras independentemente da variedade. Na torrefação dos grãos, usou-se uma massa de cerca de 40 g para os lotes, nas quais nenhuma das torras excedeu os 5 minutos (torras consideradas rápidas).

Tabela 4 - Descrição das amostras, segundo caracterização das respetivas torras face ao fator L^[21].

Origem	Amostra	Tempo de torra/min	L aprox.	Intensidade
Robusta	R ₁	2	27	Leve
	R ₂	2-3	25	Leve
	R ₃	3	23	Intermédia
	R ₄	4	16	Forte
Arábica	A ₁	2-3	23	Intermédia
	A ₂	3	16	Forte
	A ₃	3-4	16	Forte
	A ₄	5	15	Forte
Comercial	C ₁	-	30	Leve

2.3. Sistema de Fluxo Multicomutado

2.3.1. Características da unidade de pervaporação

A célula de pervaporação utilizada neste trabalho é constituída por: (1) uma peça de acrílico de 25 mm de diâmetro na qual foi gravado um canal (86 mm comprimento, 2 mm de largura e 1 mm de altura; 172 μ L), (2) membrana hidrofóbica de PTFE, e (3) uma peça de alumínio para permitir a fixação da membrana à parte inferior da peça de acrílico. De forma a reforçar a montagem das peças da célula de difusão gasosa e assegurar a sua estanquicidade, foi colocado um sistema de aperto tal como se observa na Figura 6A. Por fim, a célula de difusão gasosa foi montada numa tampa de plástico com um furo central (Figura 6C).

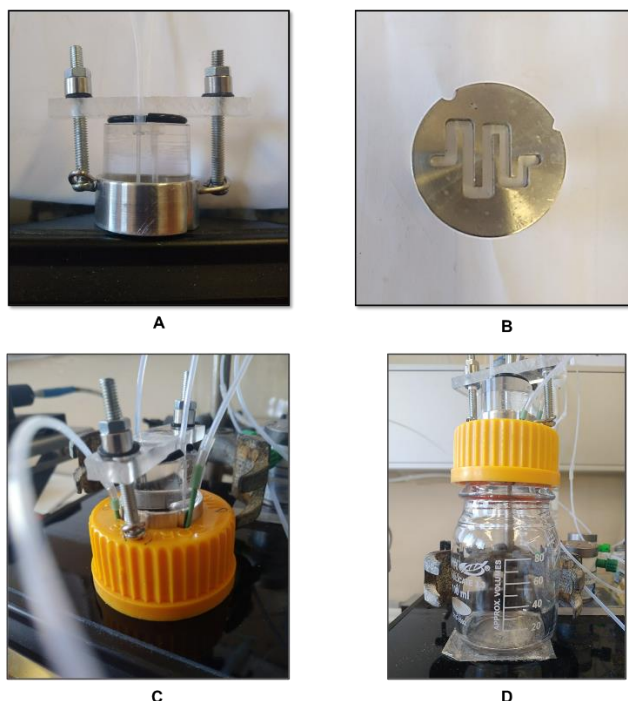


Figura 6 - Unidade de pervaporação. (A) peça de difusão gasosa constituída pela peça de acrílico estanque no suporte de alumínio com reforço de parafusos; (B) Canal cravado na peça de alumínio para a passagem da solução aceitadora; (C) peça de difusão gasosa acoplada à tampa do vaso reacional; (D) vaso reacional com a tampa colocada (unidade de pervaporação).

2.3.2. Descrição do sistema fluxo

O sistema de fluxo é constituído por uma bomba peristáltica de quatro canais, quatro válvulas solenoides, um vaso reacional e um sistema de deteção UV-Vis, dispostos conforme se ilustra na Figura 7.

A bomba peristáltica foi utilizada para propulsão de água (2 canais), solução aceitadora e ácido sulfúrico, a uma rotação de 6 rpm. Cada válvula solenoide foi acoplada, respetivamente, à saída de cada canal da bomba peristáltica. As válvulas solenoides tiveram como função redirecionar as soluções para o respetivo reservatório de modo a minimizar o consumo das mesmas.

O vaso reacional foi utilizado com a função de permitir a acomodação da amostra, a adição do ácido sobre a amostra, a diluição e homogeneização da mistura resultante e a pervaporação do CO₂ para a solução aceitadora. O vaso reacional possui uma entrada para o ácido sulfúrico e uma entrada para a água. Na tampa do vaso reacional foi acoplado a célula de difusão gasosa (detalhes no ponto 2.3.1).

À saída do vaso reacional montou-se a célula espectrofotométrica para medição dos valores de absorvância. De acordo com os critérios do software *Ocean Optics* foram adotados os seguintes parâmetros para a aquisição do sinal: tempo de integração de sinal, 400 ms, média de registo do sinal a cada 2 leituras e fator de suavizamento da imagem espectral, 4. Para a aquisição dos fiagramas, definiu-se o comprimento de onda de 590 ± 4 nm utilizando a função *Stripchart* do software de aquisição de dados.

Com o sistema descrito, obteve-se um ritmo de amostragem de aproximadamente 7 análises por hora, tendo-se utilizado em cada análise efetuada 0,7 mL de solução ácida, 0,4 mL de solução indicadora e 23,6 mL de água.

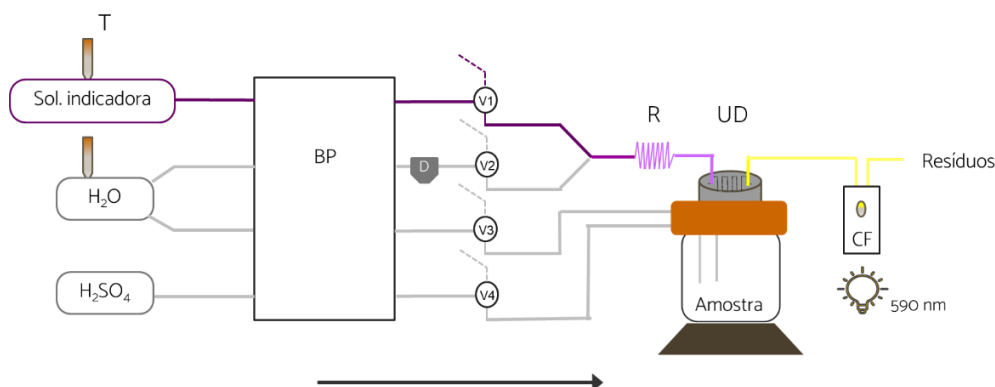
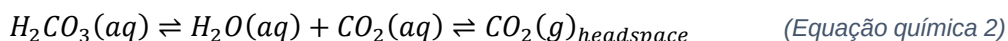
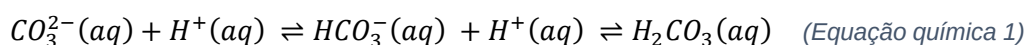


Figura 7 – Representação esquemática do sistema de fluxo multicamutado com deteção UV-Vis para a determinação de CO₂ em amostras de café. **T**- Traps isoladoras; **BP**- Bomba peristáltica; **D**- damper; **V₁** a **V₄** – Válvulas solenoides; **R**- Reator; **UD**– Unidade de difusão gasosa; **CF**– Célula de fluxo espectrofotométrica.

2.3.3. Procedimento experimental para a determinação de CO₂ em grãos de café torrado

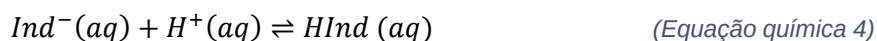
O procedimento experimental realizado pelo sistema de fluxo para proceder à análise de CO₂ compreendeu os seguintes 5 passos (descritos na Tabela 5): no passo 1, é transferido para o interior do vaso reacional 10 ml de água e simultaneamente bombeada a solução aceitadora (preparada por diluição em linha da solução de indicador) em direção ao reator, seguido da unidade de difusão gasosa e célula espectrofotométrica para estabilização da linha de base do detetor espectrofotométrico.

Seguidamente (passo 2), o vaso reacional é aberto exclusivamente para transferir a amostra para o seu interior, conjuntamente com uma barra magnética, sendo então posteriormente fechado. No passo 3, dá-se início ao processo de pervaporação em que, com a agitação em curso, é adicionada a solução de ácido sulfúrico para promover a libertação de CO₂ (Equação química 1 e Equação química 2).



Concluída a adição do ácido sulfúrico, o processo de pervaporação prossegue durante um período de tempo determinado (passo 4). Durante o período de pervaporação, o CO₂ presente no *headspace* atravessa a membrana semipermeável acoplada à unidade de difusão gasosa, reagindo com a solução aceitadora.

A etapa referente ao tempo de pervaporação é explicada quimicamente pelas equações em baixo.



No seguinte e último passo da rotina experimental, a solução aceitadora é novamente bombeada, no sentido da célula espectrofotométrica registando-se o valor de absorvância a 590 nm, que corresponde ao comprimento de onda máximo de absorção da forma alcalina da solução aceitadora.

O sinal registado é resultante da alteração da cor da solução aceitadora, que contém um indicador de pH, no qual durante o período de pervaporação, o CO₂ promove a sua forma ácida (alteração da cor púrpura para amarelo).

Tabela 5 - Sequência do funcionamento do sistema de fluxo para a extração de CO₂ em amostras de café. O símbolo ✓ indica que a válvula está ativada no respetivo passo.

	Passo				
	1	2	3	4	5
Designação	Enchimento da unidade de pervaporação		Adição de H ₂ SO ₄	Pervaporação	Análise
	Adição de água (vaso reacional)	Colocação amostra			
Tempo/s	188	20	15	t	60
V1	✓	✓			✓
V2	✓	✓			✓
V3	✓				
V4			✓		
BP	✓	✓	✓		✓

Nota: V₁ e V₂ – Válvulas solenoides que permitem respetivamente a passagem de água e de solução indicadora no sentido da unidade de difusão, para o estabelecimento da solução aceitadora; V₃ - Válvula solenoide que permite a passagem da água para o vaso reacional; V₄ – Válvula solenoide que permite a passagem da solução de H₂SO₄ para o vaso reacional.

2.4. Método de referência

A montagem experimental para a realização do método de referência (método de Hinman^[41]) foi realizada de acordo com o descrito por Shimoni e Lambuza^[42]; Anderson et al.^[15] e encontra-se representada na Figura 8. Utilizou-se um balão de fundo redondo de três tubuladuras, colocado em banho-maria numa placa de aquecimento com agitação magnética. As tubuladuras laterais são utilizadas para a entrada de dinitrogénio para o sistema (com um caudal entre 80 e 100 mL/min medido à entrada no sistema) e para a entrada de solução de ácido sulfúrico. Na tubuladura central foi encaixado um condensador de Liebig, ao qual foi ligado na outra extremidade uma coluna de *Drierite* (*Sigma-Aldrich, W.A Hammond Drierite CO. Ltd*) para retenção da humidade seguida de uma coluna de *Ascarite* (*Sigma-Aldrich, 223913*) para retenção do CO₂ libertado da amostra.

Os grãos de café inteiros são introduzidos no balão conjuntamente com 100 mL de uma solução de citrato de sódio 50 g/L em NaOH 0,25 mol L⁻¹ de. Para dar início à extração, fecha-se o sistema e é adicionado ao conteúdo do balão, 50 mL de H₂SO₄ (2,5 mol L⁻¹). Com a mistura em agitação, a extração decorre a ≈ 60 °C, durante 1 h. O CO₂ libertado pela amostra é quantificado por diferença de massa da coluna de *Ascarite*.



Figura 8 – Fotografia da montagem experimental efetuada para a realização do método de referência (Hinman 1993).

3. Resultados experimentais e discussão

3.1. Estudo da configuração do sistema de fluxo

No decorrer do trabalho experimental foram identificadas algumas situações de instabilidade da solução aceitadora que obrigaram a introduzir alguns elementos no sistema de fluxo de forma a melhorar a qualidade do sinal e a repetibilidade das medições. À montagem experimental genérica foram introduzidos os três elementos que se encontram representados na Figura 9: (A) colunas para retenção de humidade e CO_2 (*traps* de Ascarite e sílica), (B) câmara para amortecimento de pulsos (*dampner*) e (C) reator (*coil*).

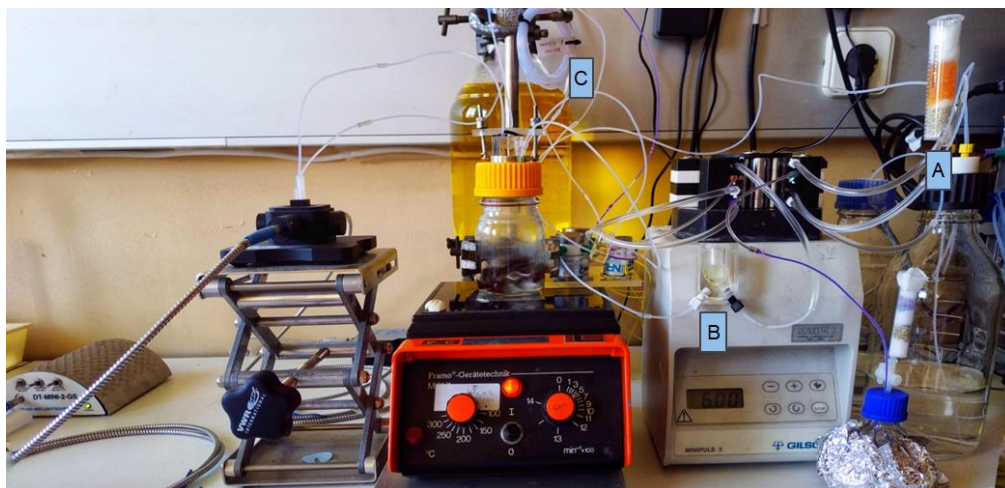


Figura 9 – Fotografia da montagem em laboratório do sistema de fluxo multicomutado com deteção UV-Vis para a determinação de CO_2 em amostras de café. Colunas para retenção de humidade e CO_2 (A), o *dampner* colocado no canal de água pré diluição (B) e *coil* de 300 cm após confluência (C).

Devido à diminuição da absorvância da solução aceitadora que se verificava ao longo do dia e suspeitando de que o CO_2 atmosférico poderia estar a alterar o pH da solução, optou-se por colocar umas colunas de Ascarite e sílica adaptadas nas tampas dos frascos da solução aceitadora. Com esta alternativa verificou-se que era possível estabilizar a composição da solução de indicador ao longo de um dia de análise.

Com a necessidade de se fazer uma diluição em linha da solução aceitadora, assunto que será discutido na secção 3.2.2, verificou-se que os caudais elevados provocavam muito ruído na linha de base. Assim, colocou-se uma câmara para amortecimento de pulsos à saída da bomba peristáltica tendo-se verificado uma diminuição da amplitude do ruído nas medições de intensidade de sinal de 0,06 para 0,02. Além disso, foi ainda introduzido um reator (300 cm) antes da célula de difusão, para melhorar a homogeneização da solução diluída de indicador e assim atenuar o ruído do sinal durante a deteção espectrofotométrica, uma vez que nos ensaios feitos, registou-se uma diminuição de ruído de 0,06 para 0,04. Após os ajustes feitos, foi possível alcançar uma amplitude de ruído de 0,005.

3.2. Estudo da composição da solução aceitadora

Com as alterações feitas na montagem do sistema, foi obtida a configuração final para prosseguir com os ensaios. Para aplicação do método, foi imperativo começar por estudos que permitissem definir qual o indicador ácido-base a utilizar na composição da solução aceitadora, bem como as condições da sua aplicação. Com base em estudos prévios, optou-se pelo indicador de púrpura de bromocresol, que exigiu estudos consequentes de estabilidade e otimização da sua composição. Nesta situação, a contribuição de uma solução tampão para a solução final aceitadora não foi relevante, uma vez que se optou pela contribuição de NaOH para conferir amplitude de resposta, conjuntamente com o indicador.

3.2.1. Estabilidade da solução aceitadora

No desenvolvimento deste método em sistema de fluxo, é fundamental definir o indicador de pH a integrar a composição da solução aceitadora, considerando que os valores de absorvância registados, são função da variação de pH. O recurso a indicadores de pH aplicados a sistemas de fluxo estende-se a estudos que visam determinar a presença de CO_2 com aplicações em diversos tipos de amostras. Nos estudos descritos, recorre-se na sua maioria ao indicador de púrpura de bromocresol, face à estabilidade da linha de base associada.^{[43] [44]}

Como tal, optou-se pelo indicador de púrpura de bromocresol (presente na Tabela 3), um indicador que em estudos preliminares demonstrou um comportamento adequado, suportado pela ampla capacidade de resposta, funcionando numa gama de viragem entre aproximadamente pH 5,2 a pH 6,8 com a transição de amarelo para púrpura (forma básica). Possibilita ainda uma linha de base estável^[45] e linearidade de resposta para registos de decréscimo de absorvância a 590 nm (ver Figura 10), representativo do desaparecimento da forma básica- o CO_2 acidifica a solução aceitadora durante o período de pervaporação, imediatamente antes do registo do sinal.

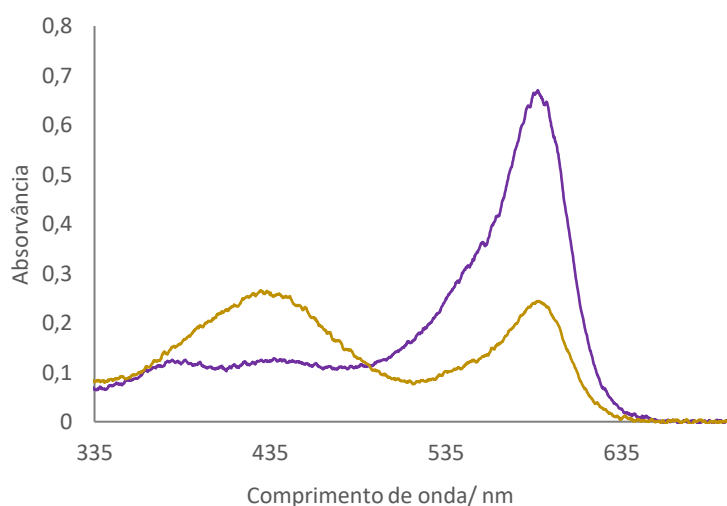


Figura 10 - Espectro UV-Vis do indicador de púrpura de bromocresol. A roxo está representado o espectro da forma alcalina do indicador, nas condições $[\text{Ind.}] = 1,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $[\text{NaOH}] = 4,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com o máximo de absorvância a aproximadamente 590 nm. A amarelo está representado o espectro do indicador na forma ácida, nas condições $[\text{Ind.}] = 1,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $[\text{NaOH}] = 2,10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com o máximo de absorvância a aproximadamente 440 nm.

Para possibilitar este tipo de medição, é imprescindível garantir a capacidade de resposta da solução aceitadora, partindo esta da sua forma básica, o que é alcançado através da participação de NaOH na composição da solução aceitadora (Ver 3.2.4).

Na realização dos ensaios iniciais, verificou-se que a solução de indicador não era estável em determinadas condições, refletido na inconsistência de resultados. Outro aspeto a garantir foi a atividade da forma alcalina da solução aceitadora, pois seria inviável trabalhar com uma solução aceitadora de partida amarela (pretende-se observar a alteração de pH do indicador com a mudança da cor púrpura para amarelo).

Foram preparadas soluções equimolares de solução de indicador de púrpura de bromocresol e de hidróxido de sódio (apenas com um ligeiro excesso deste último) com o intuito de alcalinizar a solução de partida de indicador (forma púrpura). Como tal, prepararam-se soluções com $[\text{Ind.}] = 1,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e sucessivamente ia-se adicionando uma maior quantidade de NaOH. Nas condições de $[\text{Ind.}] = 1,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e com $[\text{NaOH}] = 4,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, a solução ganhou a cor púrpura aquando da preparação.

Através de testes preliminares, percebeu-se que apesar de se confirmar a estabilidade da solução aceitadora a concentrações mais elevadas de NaOH, as soluções diluídas preparadas no próprio dia manifestavam diferentes valores na medição de absorvância ao longo do dia. Para ultrapassar este problema de estabilidade, foi proposta a diluição em linha (ver 3.2.2), uma vez que a janela de resposta por parte da solução aceitadora encontrava-se, neste ponto, numa amplitude satisfatória.

3.2.2. Diluição em linha

Com os testes feitos até aqui, consequentes dos ensaios de estabilidade da solução aceitadora (3.2.1), foi perceptível que as soluções preparadas reproduziam sinais com uma variação considerável, ainda no mesmo dia. Contudo, as soluções de partida com elevada concentração de NaOH e indicador de púrpura de bromocresol, mantiveram-se estáveis.

Com isto, a disposição do sistema de fluxo foi repensada recorrendo à diluição em linha. Foi colocada uma confluência na junção dos canais da água e solução indicadora para possibilitar a diluição *on-line* da solução aceitadora de maior concentração. Desta forma, foi dado também mais um passo na automatização do

processo. A câmara de confluência adaptada ao sistema, apresenta uma configuração em “Y”, como demonstra a Figura 11, para evitar um confronto frontal dos dois caudais consideravelmente diferentes (cerca de $3,80 \text{ ml min}^{-1}$ da água e $0,09 \text{ ml min}^{-1}$ da solução indicadora) evitando assim algum tipo de retorno indesejado.

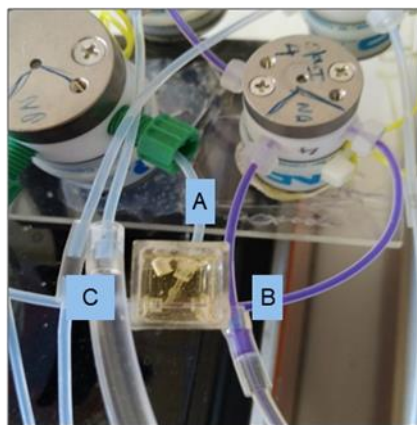


Figura 11 - Vista superior da confluência utilizada na diluição em linha da solução aceitadora, que permite a visualização da configuração em “Y”, com os canais de entrada de água (A) e de solução indicadora (B) e o canal de saída da mistura (C).

3.2.3. Leitura do sinal

Uma outra etapa necessária ao estudo recai sobre a realização de ensaios preliminares, que avaliem a linearidade da resposta do detetor espectrofotométrico face à concentração de indicador, segundo uma célula espectrofotométrica de fluxo. Uma vez obtido o intervalo de concentração para uma resposta linear segundo os valores de absorvância, pode-se então avançar para o estudo da otimização da composição da solução aceitadora. Com isto, mediu-se a absorvância (590 nm) de soluções de púrpura de bromocresol de diferentes concentrações (entre $2,50 \times 10^{-6}$ a $1,50 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) preparadas em NaOH ($2,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$).

Estes ensaios serviram para ficar a conhecer e afirmar a capacidade de resposta do detetor, para deste modo prosseguir com segurança, afirmada pela linearidade da resposta na gama de concentrações considerada, representa graficamente na Figura 12.

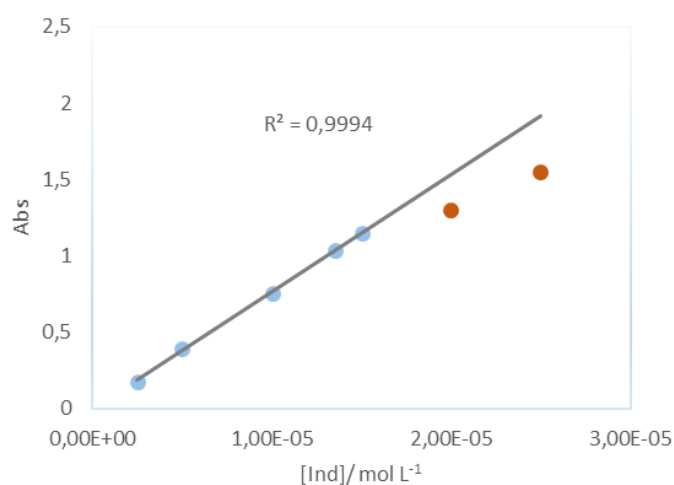


Figura 12 - Gráfico resultante do estudo de linearidade de resposta do detector espectrofotométrico. Soluções preparadas em $2,00 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de NaOH. Tempo de pervaporação: 180 s.

Tendo com ponto de partida uma linha de base estável, o registo do sinal foi feito tendo em conta o desaparecimento da forma alcalina (cor púrpura) da solução aceitadora a 590 nm, tal como exemplificado na Figura 13.

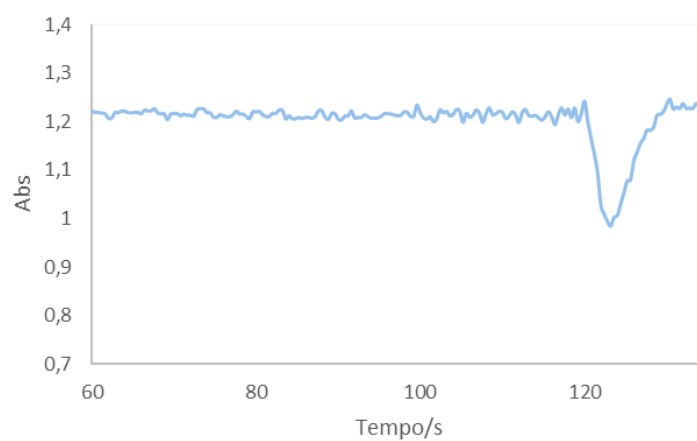


Figura 13 - Diagrama representativo de uma extração de CO₂ em amostras de café. Sinal de uma amostra de café Arábica (Torra A₃ da Tabela 4), durante um período de pervaporação total de 200 s.

3.2.4. Otimização da composição da solução aceitadora

a. Simplex: Estabelecimento dos pontos iniciais

Conhecendo os limites com os quais estamos a trabalhar, segue-se a otimização da composição da solução aceitadora.

Esta etapa do trabalho surge no seguimento daquilo que fundamentalmente integra a articulação de qualquer sistema analítico: a determinação dos parâmetros ótimos de funcionamento, no qual o mapeamento de uma superfície de resposta tem-se demonstrado capaz neste plano de otimização, especialmente quando envolve apenas duas variáveis interdependentes.^[45]

Para tal recorreu-se a um estudo através do método Simplex supermodificado, desenvolvido a partir da técnica de Simplex básica para significativamente afinar o desempenho perante flutuações de resposta aparentemente aleatórias^[45], no qual é necessário estabelecer os parâmetros de indicador e de NaOH, a partir dos quais o estudo será feito.

Este procedimento de otimização guiado por resultados empíricos, baseia-se no conjunto de restrições que delinea a superfície de resposta, tendo em vista a simetria da progressão dos pontos ótimos.^[46]

Como tal, os pontos iniciais foram escolhidos estrategicamente de forma a que os limites mínimos correspondam logicamente a um valor de zero concentração (ausência de participação do composto na solução aceitadora). Os limites máximos impostos foram resultantes dos estudos de linearidade do sistema de deteção para a solução indicadora ($6,30 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), e condicionados pela concentração da solução padrão de NaOH. O intervalo imposto foi tal que nos permitisse observar uma progressão dos vértices sem que se perdesse informação e dimensionalidade do processo.

No quadro abaixo encontram-se sumarizadas as condições experimentais.

	[Ind]/ mol L ⁻¹	[NaOH]/ mol L ⁻¹
Pontos iniciais	$5,00 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-3}$
Intervalo	$2,00 \times 10^{-4}$	$2,00 \times 10^{-2}$
Limite mínimo	0,00	0,00
Limite máximo	$6,30 \times 10^{-4}$	$2,00 \times 10^{-2}$

Neste processo de maximização da resposta, os 3 pontos iniciais que delimitam o primeiro plano (triângulo) são previstos tendo em conta as margens acima e fatores de multiplicação para o cálculo de vértices^[47], tal que:

1º ponto: **[Ind]** $5,00 \times 10^{-4} + 0$

[NaOH] $1,00 \times 10^{-3} + 0$

2º ponto: **[Ind]** $5,00 \times 10^{-4} + 1 \times 2,00 \times 10^{-4}$

[NaOH] $1,00 \times 10^{-3} + 0$

3º ponto: **[Ind]** $5,00 \times 10^{-4} + 0,5 \times 2,00 \times 10^{-4}$

[NaOH] $1,00 \times 10^{-3} + 0,87 \times 2,00 \times 10^{-3}$

b. Condições de validade

Reunindo estes pontos para iniciar o procedimento Simplex, é necessário garantir que no decorrer do estudo certas condições se verificam, tal que o fator determinante do novo vértice se encontre entre -1 e 3, garantindo a viabilidade da progressão do estudo.^[47]

Para garantir a reprodução de pontos razoáveis é preciso assegurar que o fator, por um lado, ainda não esteja próximo de 1 - para evitar a proximidade do novo ponto ótimo ao centróide e assim restringir a progressão do estudo - e ainda que não esteja próximo de zero, sendo que assim a expansão do novo vértice tenderá para o pior cenário. Para salvaguardar estas situações, é aconselhável adicionar uma margem de 0.3 ao fator nestes episódios em que o descrito se pode verificar.^[47]

c. BNR

É de máxima importância que estas restrições admitam um nível de simetria do estudo, sendo que a cada ponto gerado que reproduza um resultado inferior ao do refletido imediatamente antes, um novo simplex deve ser começado tendo como pontos iniciais o último melhor (B), o segundo melhor (N) e o refletido em causa (R), em oposição ao ponto ótimo previamente calculado (O).^[45, 47]

d. Fim da otimização

O estudo através do Simplex progrediu segundo as coordenadas registadas no quadro abaixo, representado na Tabela 6.

Tabela 6 – Resumo do estudo das concentrações do indicador de púrpura de bromocresol e de hidróxido de sódio por Simplex super-modificado, com os valores de absorvância associados às coordenadas geradas (que correspondem aos valores de concentração). O estudo foi feito para $[\text{Na}_2\text{CO}_3] = 1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

Plano	Medição	Ponto	[Ind]/ mol L ⁻¹	[NaOH]/ mol L ⁻¹	CV (%)
1	0,197	1	$5,00 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-3}$	56,1
	0,104	2	$7,00 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-3}$	
	0,064	3	$6,00 \times 10^{-4}$	$2,73 \times 10^{-3}$	
2	0,197	1	$5,00 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-3}$	44,7
	0,104	2	$7,00 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-3}$	
	0,276	4	$6,00 \times 10^{-4}$	$1,52 \times 10^{-3}$	
3	0,197	1	$5,00 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-3}$	21,0
	0,276	4	$6,00 \times 10^{-4}$	$1,52 \times 10^{-3}$	
	0,301	R₂	$4,00 \times 10^{-4}$	$1,52 \times 10^{-3}$	
4	0,276	4	$6,00 \times 10^{-4}$	$1,52 \times 10^{-3}$	13,2
	0,301	R₂	$4,00 \times 10^{-4}$	$1,52 \times 10^{-3}$	
	0,356	4_a	$5,00 \times 10^{-4}$	$1,68 \times 10^{-3}$	
5	0,301	R₂	$4,00 \times 10^{-4}$	$1,52 \times 10^{-3}$	8,4
	0,356	4_a	$5,00 \times 10^{-4}$	$1,68 \times 10^{-3}$	
	0,329	5_a	$4,98 \times 10^{-4}$	$1,57 \times 10^{-3}$	
6	0,356	4_a	$5,00 \times 10^{-4}$	$1,68 \times 10^{-3}$	4,4
	0,329	5_a	$4,98 \times 10^{-4}$	$1,57 \times 10^{-3}$	
	0,354	R₃	$5,98 \times 10^{-4}$	$1,73 \times 10^{-3}$	
7	0,356	4_a	$5,00 \times 10^{-4}$	$1,68 \times 10^{-3}$	0,4

	0,354	R₃	$5,98 \times 10^{-4}$	$1,73 \times 10^{-3}$
	0,353	R1_b	$6,00 \times 10^{-4}$	$1,83 \times 10^{-3}$

Como critério para finalizar o estudo, foi tido em conta o cálculo do coeficiente de variação sobre os três pontos integrantes do último plano gerado, de modo a que este se encontrasse abaixo de 0,5%. Tal foi alcançado na gama de concentrações de $6,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de indicador e $1,83 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH (ainda sem considerar o fator de 42 de diluição, resultante da diluição em linha). No gráfico da Figura 14, representativo da evolução do processo de otimização, é também perceptível o desenvolvimento do estudo perante um patamar de valores, aprovando assim o sucesso do processo de otimização.

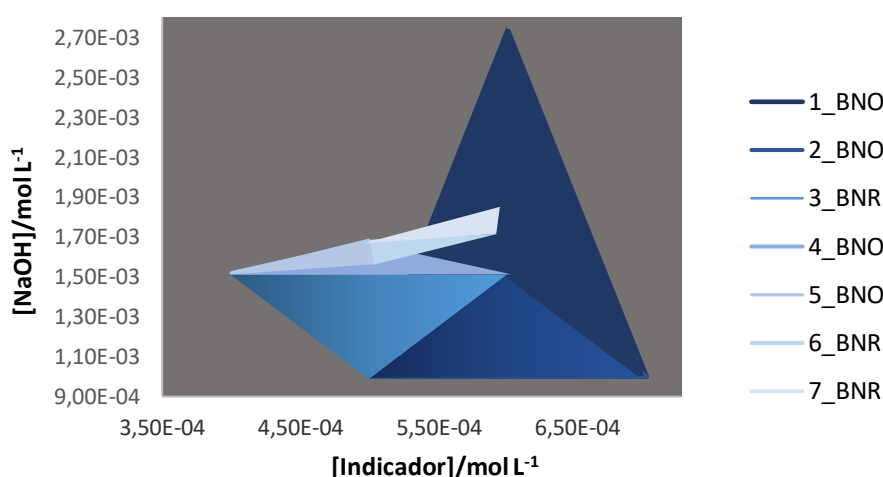


Figura 14 – Gráfico representativo da progressão da otimização segundo o método de Simplex supermodificado.

3.3 Otimização de condições experimentais no sistema de fluxo

Após os estudos de otimização da composição da solução aceitadora e estabelecidas as resultantes condições experimentais, foram estudados os parâmetros experimentais associadas à extração do CO_2 no sistema de fluxo. Tendo também presente o contributo das adaptações feitas ao sistema (descritas no capítulo do Estudo da configuração do sistema de fluxo), tal refletiu-se num aumento de sensibilidade e

precisão das medições. Uma vez que em estudos anteriores^[48] se verificou ser possível a extração de CO₂ à temperatura ambiente (20-25 °C) e com agitação da amostra, estes parâmetros não foram estudados neste trabalho. Por outro lado, foi então realizado um estudo mais exaustivo de outras variáveis com impacto na extração do CO₂, tal como descrito nos pontos seguintes.

3.3.1. Estudo da etapa de adição de ácido

Neste estudo, pretendeu-se verificar qual o efeito da concentração de ácido na extração de CO₂, sendo que a diminuição do pH da solução amostra de pelo menos duas unidades abaixo do pKa do ácido carbónico, garante a volatilização do CO₂. Assim, estudou-se o tempo da etapa de adição de ácido, que se traduz em diferentes volumes adicionados ao vaso reacional. Deste modo, e considerando a presença de água no vaso reacional (ver Tabela 5), foi possível através de diferentes volumes de ácido, obter diferentes concentrações na solução final.

Estudaram-se tempos de adição de ácido de 15, 50 e 100 s, utilizando para a extração uma solução de 0,1 mmol de Na₂CO₃. Os resultados encontram-se reunidos na Tabela 7. A quantidade de Na₂CO₃ foi selecionada para estes estudos de otimização das condições de extração por representar o máximo de linearidade obtido para o mínimo de tempo de pervaporação, como se poderá observar nos estudos apresentados na secção 3.3.3.

Tabela 7 – Resultados obtidos em valores de absorvância para o estudo do tempo de adição de ácido, que corresponde ao Passo 4 da Tabela 5, utilizando uma solução de Na₂CO₃ 0,1 mmol.

Período da etapa de adição de ácido/s	Abs
15	0,593
50	0,609
100	0,598

Verificou-se que com o aumento do tempo de adição de ácido, o sinal analítico não variou consideravelmente (Tabela 7). Para os estudos seguintes, numa perspetiva de tentar minimizar tanto o consumo de solventes como o tempo total da extração, optou-se pelo menor tempo necessário, correspondendo este a 15 s (concentração final no vaso reacional de $3,4 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de H₂SO₄).

3.3.2. Estudo da massa de amostra de café

Sendo o objetivo deste trabalho aplicar a metodologia a amostras de café torrado, foi feito um estudo da massa de amostra para a extração. Pretendeu-se obter o melhor compromisso entre sinal analítico e repetibilidade. Considerando que os grãos de café inteiros representam uma amostra bastante heterogênea e que existe um mínimo de massa no vaso reacional para que se possa obter um sinal analítico do CO_2 , considerou-se como valor mínimo de massa a estudar 0,5 g de amostra. O máximo de amostra a utilizar no sistema ficou limitado a 3,0 g dado que acima desse valor os grãos de café deixavam de ficar mergulhados na solução aquosa, diminuindo a repetibilidade das medições. A extração de CO_2 de grãos de café foi então estudada entre 0,5 e 3,0 g utilizando uma amostra de café comercial (Tabela 4) e um tempo de pervaporação de 300 s. Os resultados encontram-se na Figura 15.

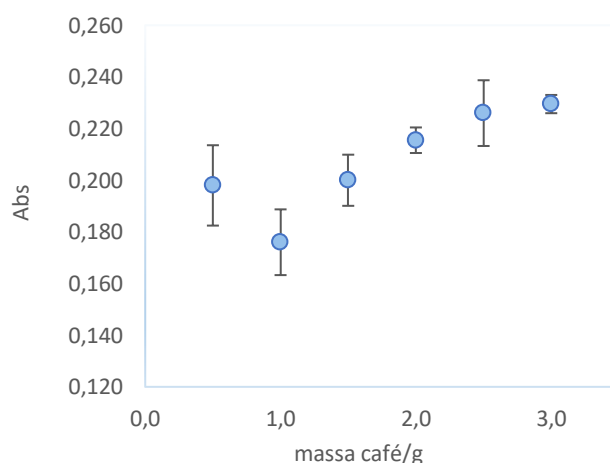


Figura 15 - Resultados obtidos para o estudo da extração de CO_2 de grãos de café torrados utilizando diferentes massas de amostra.

Dos resultados obtidos verificou-se um aumento do sinal analítico com o aumento da massa de amostra acima de 2,0 g. Verificou-se ainda que o desvio padrão das medições para cada massa de amostra não ultrapassou os 10% e, em geral, foi superior para as menores massas em estudo (abaixo de 1,5 g). De forma a assegurar boa representatividade da amostra e considerando como objetivo a obtenção do máximo de sinal analítico, selecionou-se uma massa de 2,5 g de café para estudos futuros.

3.3.3. Estudo do efeito do tempo de pervaporação na extração de CO₂

Para além do pH da solução e da massa de amostra estudadas nos pontos anteriores, avaliou-se o efeito do tempo de pervaporação na extração de CO₂. Inicialmente o estudo foi realizado com soluções padrão de Na₂CO₃ (0,01 - 0,1 mmol) utilizando diferentes tempos de extração (entre 15 e 200 s). Enquanto objetivo de estudo, para além de verificar qual o efeito do aumento do tempo no valor absoluto do sinal analítico, foi também verificar qual o impacto deste parâmetro na linearidade da extração. Os tempos de pervaporação escolhidos foram definidos de acordo com o mínimo possível, 15 s (correspondente só à etapa de adição do ácido), e um máximo razoável para um sistema de fluxo a funcionar em análises de rotina (200 s).

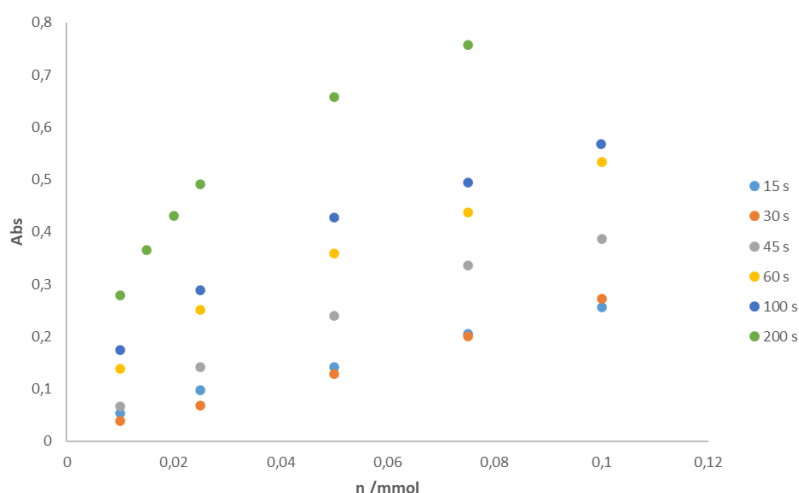


Figura 16 – Curvas de calibração feitas para diferentes tempos de pervaporação (de 15 segundos a 200 segundos).

A partir dos resultados obtidos (Figura 16) verificou-se um aumento do sinal analítico com o aumento do tempo de pervaporação, mais significativo acima dos 45 s. Verificou-se também que para tempos de pervaporação mais elevados, em particular para 200 s, atingiu-se a saturação da solução aceitadora para níveis de concentração de CO₂ no vaso reacional mais baixos, quando comparados com tempos inferiores. Desta forma, a partir destes resultados conclui-se que a escolha de tempos de pervaporação mais baixos (abaixo de 100 s) permitirá garantir a extração de CO₂ numa gama de concentrações mais alargada.

Ao compreender a influência que o parâmetro do tempo de pervaporação tem na extração de CO₂ em soluções padrão, impõe-se então um estudo do tempo total de

pervaporação aplicado a amostras de grãos de café para verificar se a extração de CO_2 seria afetada pela matriz da amostra. Ao contrário do que se observou com as soluções padrão, só acima de 50 s de pervaporação se conseguiu obter um sinal analítico. Isto poderá estar relacionado com o facto de, no caso dos grãos de café, existir um passo adicional que não se verifica nas soluções padrão. O CO_2 retido no interior dos grãos de café terá que ser inicialmente libertado para a solução do vaso reacional e só depois será volatilizado da solução para o *headspace*. Assim, o tempo necessário para que estes dois processos ocorram será necessariamente maior do que no caso das soluções padrão.

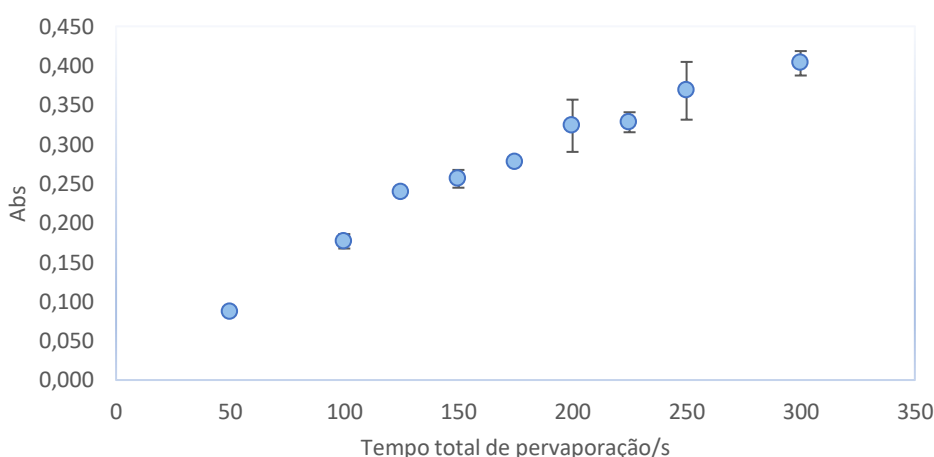


Figura 17 – Resultados do estudo do tempo total de pervaporação utilizando amostras de 2,5 g de grãos inteiros de café.

Pelos resultados da Figura 17 observa-se que com o aumento do tempo, o sinal aumenta, tal como se verificou com as soluções padrão. Neste caso, ao utilizar a mesma massa de amostra para todos os estudos (já previamente definida no estudo anterior), conclui-se que com o aumento do tempo da etapa de pervaporação haverá maior extração de CO_2 dos grãos de café. Este estudo do tempo de pervaporação revelou que este parâmetro pode ser ajustado de acordo com os níveis de CO_2 da amostra, tendo sempre por base o compromisso entre sinal analítico e tempo de análise.

3.4 Parâmetros da metodologia

3.4.1 Linearidade e limites de deteção e quantificação

A linearidade da metodologia analítica foi avaliada através da construção de curvas de calibração ($Abs=f(nCO_2)$) utilizando quantidades de Na_2CO_3 entre 0,01 e 0,1 mmol. Tendo-se verificado que o tempo de pervaporação afetava a sensibilidade da medição (secção 3.3.3), foram construídas curvas de calibração usando diferentes tempos de pervaporação de forma a estabelecer as condições experimentais mais adequadas às amostras em estudo. Os resultados obtidos das curvas de calibração, limites de deteção (LD) e limites de quantificação (LQ) encontram-se na Tabela 8. LD e LQ foram calculados de acordo com o descrito por Miller & Miller^[49].

Tabela 8 – Gama de linearidade, equações das curvas de calibração, coeficientes de determinação (r^2), LD e LQ da metodologia desenvolvida para diferentes tempos de pervaporação.

$t_{pervaporação}$ /s	Gama de linearidade/mmol	m/ mmol ⁻¹	b	r^2	LD/ mmol	LQ/ mmol
15	0,01-0,1	$2,2 \pm 0,1$	$0,035 \pm 0,005$	0,9961	0,008	0,026
30	0,01-0,1	$2,6 \pm 0,1$	$0,005 \pm 0,006$	0,9957	0,008	0,028
45	0,01-0,075	$4,1 \pm 0,2$	$0,03 \pm 0,01$	0,9968	0,006	0,020
60	0,01-0,05	$5,4 \pm 0,8$	$0,10 \pm 0,03$	0,9757	0,014	0,045
100	0,01-0,05	$6,2 \pm 0,6$	$0,12 \pm 0,02$	0,9920	0,008	0,026
200	0,01-0,025	$14,0 \pm 0,9$	$0,15 \pm 0,02$	0,9918	0,002	0,007

* m: declive; b: ordenada na origem; r^2 : coeficiente de determinação; LD: limite de deteção; LQ: limite de quantificação.

Foi possível observar que quanto maior o tempo de pervaporação, menor a gama de linearidade e maior a sensibilidade da metodologia. Além disso, o aumento dos tempos de pervaporação permitem, geralmente, diminuir os LD e LQ. Tendo em conta o aumento significativo do declive, isto é, da sensibilidade com o aumento do tempo de pervaporação, aliado aos mais baixos limites de deteção e quantificação, justifica-se que o valor de 200 s seja o utilizado para as amostras.

3.4.2 Repetibilidade e precisão intermédia

Para a realização dos estudos de repetibilidade da metodologia (Figura 18), efetuaram-se extrações (5 réplicas) de soluções padrão Na_2CO_3 ($2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) no mesmo dia, utilizando o protocolo descrito na Tabela 5 para um tempo total de pervaporação de 200 s. Foi igualmente avaliada a repetibilidade para a análise de uma amostra de café torrado em laboratório (2,5 g). Os resultados obtidos calculados como coeficiente de variação dos 5 ensaios encontram-se na Tabela 9. Obtiveram-se coeficientes de variação de 1,7% e 5,5% para a repetibilidade utilizando soluções padrão e uma amostra, respetivamente.

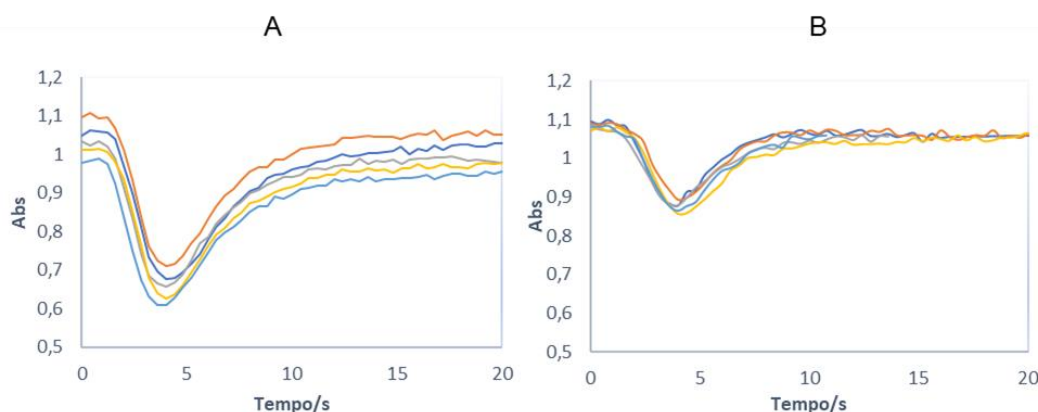


Figura 18 - Resultados dos estudos de repetibilidade. (A) estudo de repetibilidade do sinal de extrações de CO_2 de solução padrão de Na_2CO_3 $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com um tempo de pervaporação total de 200s. (B) estudo de repetibilidade do sinal de extrações de CO_2 de amostras café Robusta (R4), com um tempo de pervaporação total de 200s.

Para a avaliação da precisão intermédia da metodologia foram realizados ensaios com soluções padrão de Na_2CO_3 ($2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) através da extração de 5 réplicas em 3 dias diferentes, para um tempo total de 200 s de pervaporação (Figura 19). Ao realizar o mesmo estudo com amostras de café observaram-se coeficientes de variação bastante elevados (acima de 20%). Este facto está relacionado com a perda gradual de CO_2 dos grãos torrados durante o armazenamento^[50]. Assim, não foram considerados esses ensaios para a avaliação da precisão intermédia da metodologia. Os resultados de precisão intermédia considerados para a metodologia desenvolvida

foram os obtidos para as soluções padrão, tendo-se obtido um valor de 3,6% (Tabela 9).

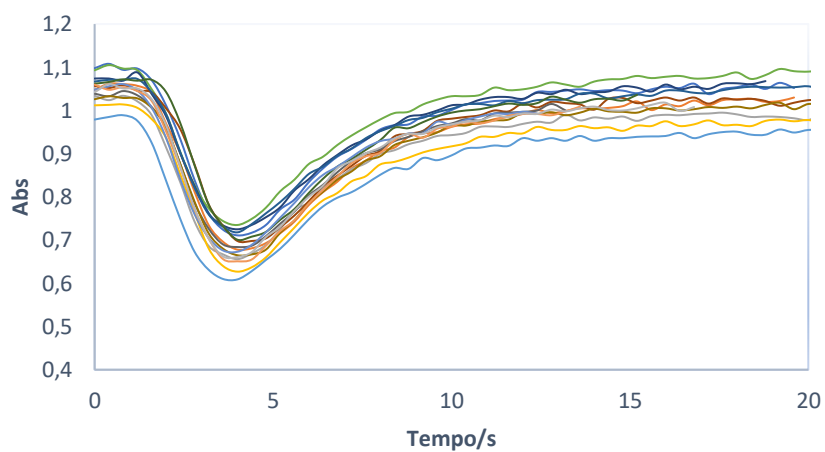


Figura 19 - Resultado do estudo da precisão intermédia do sinal de extração de CO₂ de soluções padrão de Na₂CO₃ 2,00×10⁻³ mol L⁻¹, com um tempo de pervaporação total de 200s.

Tabela 9 - Resultados dos cálculos de coeficientes de variação para os estudos de repetibilidade e precisão intermédia.

	Repetibilidade	Precisão intermédia
Solução padrão	1,7%	3,6%
Amostra de café torrado	5,5%	-

3.5 Quantificação de CO₂ em amostras de café

3.5.1 Método de referência para a determinação do teor de CO₂

Na metodologia de fluxo desenvolvida verificou-se que do CO₂ presente nas amostras de grão de café torrado, só uma pequena fração era extraída. Este facto está associado a diferentes características da metodologia:

- O tempo de pervaporação utilizado (200 s) não permite a extração total do CO₂ dos grãos, dado que a difusão do CO₂ do interior até à superfície dos grãos é um processo mais lento;
- Pressupõe-se que a temperatura a que decorre a extração (temperatura ambiente) não favorece a rápida libertação do CO₂ a partir dos grãos;
- O volume e concentração em indicador da solução aceitadora limita a quantidade de CO₂ a medir, tal como se verifica pela gama de linearidade obtida nos ensaios de calibração (secção 3.2.3).

Pelas razões acima mencionadas, surgiu a necessidade de correlacionar a quantidade de CO₂ medida pela metodologia desenvolvida com a quantidade total de CO₂ na amostra. Uma vez que não existe amostra de referência neste contexto, optou-se por adotar um método de referência, que garantisse a extração total do CO₂ e a partir deste, fosse feita a calibração do método de fluxo. Enquanto método de referência, adotou-se o Método de Hinman (1993) descrito em 2.4, caracterizado por um protocolo de extração exaustiva com duração de 1 h, a temperatura elevada (cerca de 60 °C), no qual para esta calibração, os dois métodos foram realizados ao mesmo tempo, sobre a mesma amostra.

Para o estudo foram utilizadas amostras de café comercial e de café torrado em laboratório (amostras descritas na Tabela 4). A torra de amostras em laboratório foi realizada de forma a obter amostras de diferentes graus de torra e, em princípio, com diferentes teores de CO₂. No entanto, uma vez que houve alguma dificuldade em gerar níveis diferentes de teor de CO₂ através apenas da torra, optou-se por deixar algumas

amostras de café torrado no laboratório armazenadas durante alguns dias até à sua análise, para possibilitar uma maior diversidade nas amostras utilizadas para a calibração do método. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 20, no qual no eixo das abcissas corresponde ao método de referência (resultados expressos em $\text{mmol}(\text{CO}_2)/\text{g}(\text{amostra})$) e o eixo das ordenadas ao método de fluxo, registado no valor de $\text{Abs}/\text{g}(\text{amostra})$. Os pontos encontram-se assinalados a cores diferentes, representando os diferentes graus de torra.

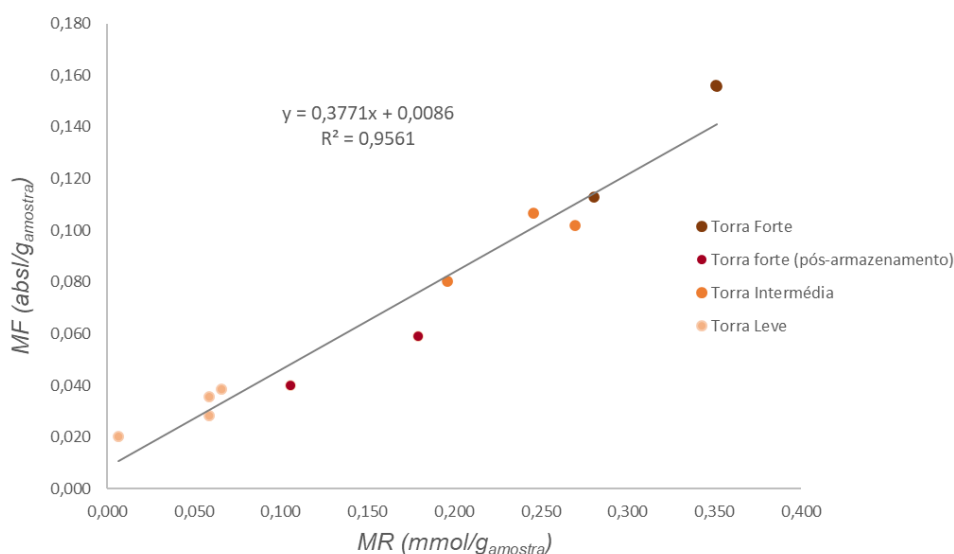


Figura 20 – Resultados obtidos para a calibração da metodologia desenvolvida com o método de referência.

Os resultados apresentaram uma boa correlação entre os dois métodos ($r^2 = 0,9561$), tendo até sido possível enquadrar as amostras segundo a extensão e condições da torra.

Tal como aparece na Figura 20, a proximidade dos pontos descreve a torra forte, com as amostras dos lotes frescos de A_2 e R_4 e a torra intermédia com os pontos referentes aos lotes A_1 e A_1 após 1 dia de armazenamento, R_3 e considerando o armazenamento de amostras de torra inicial forte, as amostras A_2 após 3 dias de armazenamento e R_4 após 1 dia de armazenamento.

Na reta, valores mais baixos de teor de CO_2 correspondem à torra leve, o que está de acordo com o esperado, uma vez que neste tipo de intensidade de torra, a extensão das reações é reduzida, levando a uma quantidade de CO_2 final inferior quando comparado com torras mais intensas^[15, 42]. Nos resultados da torra leve, encontram-se as amostras de grãos de café referentes aos lotes C_1 e C_1 após

armazenamento de 4 meses, R_1 após 1 dia e R_2 após 1 mês mantido ao ar. Estas classificações referentes às amostras, encontram-se discriminadas na Tabela 4.

Como é possível observar na Tabela 10, o teor de CO_2 vai aumentando conforme o aumento da intensidade do nível de torra, nos quais se podem observar valores a partir de $8,63 \text{ mg g}^{-1}$ na torra intermédia, até valores de $15,46 \text{ mg g}^{-1}$ já na torra forte. O contraste destes valores era esperado pois como também já tem vindo a ser descrito (Anderson et al.2003 ^[15]), a intensidade de torra é um fator importante na formação de CO_2 , devido à extensão das reações químicas que se observa em torras mais intensas. Com isto, os resultados obtidos confirmam que as torras fortes apresentam maiores teores de CO_2 quando comparados com valores associados a torras menos intensas (comparando os valores obtidos de torras frescas- amostras analisadas logo após a torra).

Tabela 10 – Resultados do estudo da calibração do método para amostras de torras frescas.

Intensidade torra	Amostras	Teor CO_2 (mg g^{-1})	$\overline{\text{Teor } CO_2}$ (mg g^{-1})	% m/m
Forte	A_2	15,46	13,91	1,55
	R_4	12,35		1,23
Intermédia	A_1	11,88	10,25	1,19
	R_3	8,63		0,86

Ao comparar os teores de CO_2 referidos em Shimoni e Lambuza (2000)^[42] com as amostras torradas de fresco, (sem que ainda tenham sido sujeitas a processos de desgaseificação ou moagem do grão), observam-se algumas diferenças. Para torras fortes, referem teores de CO_2 de $3,92 \text{ mg g}^{-1}$ e $4,30 \text{ mg g}^{-1}$ (torra rápida e longa respetivamente). Ao analisar os teores de CO_2 obtidos pelo método desenvolvido neste trabalho, as torras fortes apresentam uma média de valores de $13,91 \text{ mg g}^{-1}$. Observa-se que os valores referentes às torras fortes apresentam uma diferença considerável. Surge descrito em Smrke, Wellinger^[28] e Geiger et al.^[32] que o tempo de torra é um fator que dita também a libertação de CO_2 ainda durante a torra (numa torra longa há uma maior libertação de CO_2). Como tal, uma vez que as características de uma torra são determinantes para o estado final do grão torrado e tendo em conta que os tempos de torra descritos em Shimoni e Lambuza (2000)^[42] são, em torras mais rápidas, de 14 min (versus os máximos 5 min das torras feitas neste trabalho), esse pode ser um parâmetro que justifique a diferença dos valores nas torras mais intensas.

Ao observar os resultados do teor de CO_2 descrito por Wang e Lim (2014)^[22], associados aos vários tipos diferentes de torra descritos, os valores foram comparáveis, principalmente na gama de valores associados a torras intermédias e fortes: respetivamente $11,51 \text{ mg g}^{-1}$ e $15,36 \text{ mg g}^{-1}$ como exemplo. Para esta quantificação, os autores recorreram a um procedimento experimental do método gravimétrico que neste trabalho foi implementado como método de referência (2.4). Através disto, é possível afirmar numa primeira análise, que o método de fluxo aqui desenvolvido, através da calibração feita, representa uma alternativa viável à quantificação de CO_2 em amostras de café torrado. Ao comparar ainda o valor médio dos teores de CO_2 obtido para torras intermédias, reportado por Geiger et al (2005)^[32], de $9,9 \text{ mg g}^{-1}$, com a média de valores de teor de CO_2 obtida neste trabalho, considerando o mesmo tipo de intensidade de torra ($10,25 \text{ mg g}^{-1}$), é possível afirmar que os valores estão de acordo com o esperado, reforçando a abordagem seguida.

Analisando a Tabela 10, observam-se também as percentagens mássicas que relacionam a massa total de amostra, com o teor de CO_2 associado. Surge descrito na literatura que o CO_2 é uma das menores moléculas encontradas no café^[28], mas que representa 1-2% da massa do café acabado de torrar. As amostras A_2 , R_4 e A_1 indicadas na Tabela 10, representam amostras de lotes frescos de torras sobre os quais foram feitos ensaios e apresentam valores dentro do esperado: torras fortes com valores mais altos com A_2 com $1,55 \text{ \%m/m}$ e R_4 com $1,23 \text{ \%m/m}$ e A_1 em representação de uma torra intermédia, com um valor associado de $1,19 \text{ \%m/m}$.

3.5.2 Determinação do teor de CO_2 em café torrado ao longo do período de armazenamento

Nesta fase do trabalho, tendo já estabelecido uma correlação entre métodos, recorreu-se à equação resultante da calibração do método para a quantificação de CO_2 , segundo os dados obtidos com o método de fluxo.

Recorrendo a amostras A_4 (Tabela 4) foram feitos ensaios com o objetivo de quantificar teor de CO_2 nas mesmas e compreender, de um modo geral, a evolução/libertação do CO_2 de amostras torradas de fresco durante o armazenamento. Relativamente ao tipo de armazenamento, as amostras de grãos de café foram colocadas num frasco de âmbar, que era aberto apenas imediatamente antes das medições efetuadas.

Foram feitas medições em triplicado ao longo de um período de 8 dias, recorrendo ao método de fluxo.

Através do tratamento dos dados obtidos das extrações de CO₂ feitas em simultâneo com os dois métodos, verificou-se que a evolução do sinal foi concordante nos dois métodos, ou seja, ao longo do tempo, o sinal indicativo da presença de CO₂ na amostra decresceu e o cálculo quantitativo foi coincidente.

Os resultados da quantificação de CO₂ encontram-se na Figura 21. Verificou-se uma diminuição do teor de CO₂ na amostra ao longo do período em estudo, em particular acima dos 4 dias de armazenamento. No último dia de registo (dia 8), observava-se já uma diminuição no teor de CO₂ na amostra de 88%. De acordo com Wang e Lim (2014)^[22] e Smrke et al. (2018)^[28], a desgaseificação de CO₂ em amostras de grãos inteiros torrados é um processo demorado, no qual há registos que para a desgaseificação de cerca de 90% pode demorar até pelo menos 33 dias. É importante ressaltar que o perfil da torra tem uma influência determinante neste processo, em que em registos de desgaseificação num mesmo período de tempo, para uma mesma amostra, mas para uma torra mais longa a diminuição registada é de cerca de 60%.^[22]

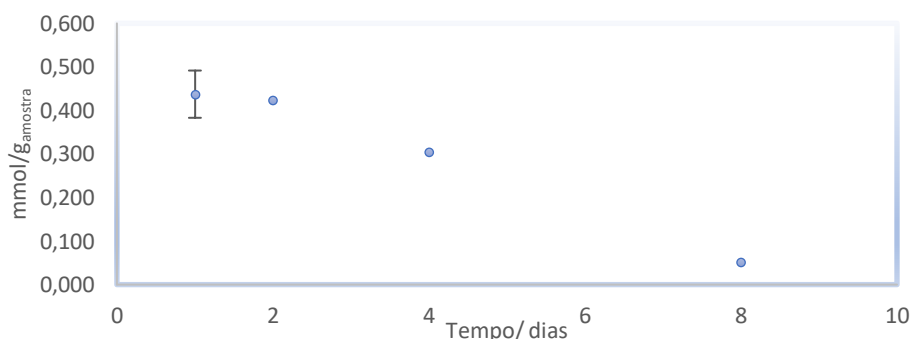


Figura 21 – Resultados obtidos para a quantificação do teor de CO₂ numa amostra de café Arábica (A4) ao longo de 8 dias de armazenamento.

Com este estudo, verificou-se a possibilidade de aplicação desta metodologia a análises de controlo da qualidade de armazenamento do café torrado através da medição dos níveis de CO₂.

Conclusões e propostas de trabalho futuro

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia para a determinação do CO₂ em amostras de grãos de café inteiros torrados, através de um método de fluxo acoplado a deteção UV-Vis. No desenvolvimento do método descrito neste trabalho, procurou-se combinar as potencialidades de um sistema de fluxo como forma de simplificar o processo analítico relativamente aos métodos existentes e aumentar o ritmo de análise. Esta estratégia analítica surge como um novo método de quantificação de CO₂ para o tipo de amostras em causa (grãos inteiros de café), de uma forma rápida, económica e mais sustentável em comparação com outras metodologias previamente utilizadas.

Através de um desenho experimental Simplex supermodificado, foi possível otimizar a composição da solução aceitadora ($6,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de indicador em $1,83 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de NaOH). A configuração do sistema de fluxo foi igualmente estudada e otimizada. Dos parâmetros experimentais estudados, tempo de pervaporação e massa de amostra, concluiu-se que ambos podem ser ajustados de acordo com os níveis de CO₂ existente nas amostras, o que torna a metodologia bastante versátil em termos de aplicabilidade. Nas condições de extração utilizadas neste trabalho, para um tempo total de pervaporação de 200 s, obtiveram-se limites de deteção e de quantificação de 0,002 mmol e 0,007 mmol, respetivamente.

A partir da calibração feita com o método de referência (Hinman, 1993), foi quantificado o CO₂ em amostras de grãos de café. Através do teor de CO₂ calculado, foi possível distinguir as amostras segundo o nível de torra. Dado isto, confirmou-se tanto a relação descrita face à intensidade de torra (torras menos intensas apresentam teores inferiores de CO₂), como se verificou que os valores obtidos se enquadraram na gama de resultados espectáveis. As médias dos teores de CO₂ calculados para torras fortes foi de 13,91 mg g⁻¹ e para torras intermédias 10,25 mg g⁻¹. Com a conclusão destes estudos, foi possível afirmar que este método desenvolvido é sensível na deteção de

CO₂ nas amostras dos grãos de café e adequado enquanto alternativa a métodos gravimétricos.

Desta forma, destaca-se assim o sucesso no desenvolvimento de um método de fluxo automático para a análise de amostras sólidas, com um ritmo de amostragem de aproximadamente 7 análises por hora, com um gasto reduzido de solventes por cada análise efetuada e com um reduzido manuseamento da amostra.

Com o sistema de fluxo desenvolvido, numa perspetiva futura, pretende-se estudar a taxa de desgaseificação de CO₂ de café torrado. Com este método, seria possível acompanhar a libertação gradual deste gás das amostras de café e assim caracterizar este processo com vista ao desenvolvimento de estratégias que permitam aumentar a durabilidade do produto durante o armazenamento.

De salientar, por fim, que as principais vantagens que o sistema de fluxo desenvolvido apresenta, particularmente, a capacidade de analisar amostras sólidas automaticamente, o baixo custo de implementação do sistema analítico, facilidade de manuseamento e a sensibilidade da resposta analítica, abrem boas perspetivas quanto à aplicabilidade deste sistema na determinação de outros analitos gasosos, nomeadamente SO₂ e NH₃ que possam ocorrer em amostras sólidas.

Referências

1. Baggenstoss, J., Poisson, L., Kaegi, R., Perren, R., & Escher, F., *Coffee Roasting and Aroma Formation: Application of Different Time-Temperatur conditions*. J. Agric. Food Chem, 2008. 56: p. 5836-5846.
2. Yeretizian, C., et al., *From the green bean to the cup of coffee: investigating coffee roasting by on-line monitoring of volatiles*. European Food Research and Technology, 2014. 214(2): p. 92-104.
3. Yeretizian, C., I. Blank, and Y. Wyser, *Protecting the Flavors—Freshness as a Key to Quality*, in *The Craft and Science of Coffee*. 2017. p. 329-353.
4. Wang, X. and L.T. Lim, *Investigation of CO₂ precursors in roasted coffee*. Food Chem, 2017. 219: p. 185-192.
5. Fadaei, N.T., et al., *A heat and mass transfer study of coffee bean roasting*. International Journal of Heat and Mass Transfer, 2017. 104: p. 787-799.
6. Mussatto, S.I., *Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues*. Food Bioprocess Technol, 2011: p. 661–672.
7. Vega, F.E., *The Rise of Coffee* American Scientist, 2008. 96: p. 7.
8. Pohlan, H.A.J., & Janssens, M. J., *Growth and production of coffee*. Soils, plant, growth and crop production, 2010. 3: p. 33.
9. Conway, J. *Coffee market worldwide - statistics & facts*. Consumer Goods & FMCG 2021 [cited 2021 march 8th].
10. Preuss, A., *The Tempest in a Coffee Pot: Is Coffee Good for You?*, in <https://www.coffeeness.de/en/is-coffee-healthy/>. 2021: Coffeeness.
11. Wellman, F.L., *Coffee: Botany, Cultivation and Utilization*. 1961, London: Leonard Hill (Books).
12. Kew, *Plants of the World Online: Coffea L.*, in <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:325985-2>. Royal Botanic Gardens.
13. Teketay, D., *History, botany and ecological requirements of coffee*. Walia, 1999. 20: p. 28-50.
14. Wang, X., *Understanding the Formation of CO₂ and Its Degassing Behaviours in Coffee*, in *Food Science*. 2014, University of Guelph: Ontario, Canada.
15. Anderson, B.A., et al., *The diffusion kinetics of carbon dioxide in fresh roasted and ground coffee*. Journal of Food Engineering, 2003. 59(1): p. 71-78.
16. *10 steps from seed to cup*, in <https://www.ncausa.org/about-coffee/10-steps-from-seed-to-cup>. National Coffee Association of U.S.A.
17. Louzada Pereira, L., Rizzo Moreira, T. , *Quality Determinants In Coffee Production*. . Food Engineering Series, 2021: p. 456.
18. Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P., *Food Chemistry*. 2004.

19. Stalmach A., M.W., Nagai C., Crozier A., *On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee*. Braz. J. Plant Physiol. , 2006. 18: p. 253-262.
20. Yamagata, K., *Do Coffee polyphenols Have a Preventive Action on Metabolic Syndrome Associated Endothelial Dysfunctions? An Assessment of the Current Evidence*. Antioxidants, 2018. 7(2): p. 26.
21. Wang, X.L., L-T., *Physicochemical Characteristics of Roasted Coffee*. Coffee in Health and Disease Prevention, 2015. Chapter 27 p. 247-254.
22. Wang, X.L., L-T., *Effect of roasting conditions on carbon dioxide degassing behaviour in coffee*. Food Research International, 2014. 61: p. 144–151.
23. Gloss, A.N., et al., *Freshness indices of roasted coffee: monitoring the loss of freshness for single serve capsules and roasted whole beans in different packaging*. Chimia (Aarau), 2014. 68(3): p. 179-82.
24. Moreira, R.F.A.T., L. C.; De Maria, C. A. B. , *Componentes voláteis do café torrado. Parte II. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos*. Química Nova, 2000. 23: p. 195-203.
25. Mondello, L., Costa, R., Tranchida, P. Q., Dugo, P., Lo Presti, M., Festa, S., Fazio, A., Dugo, G. , *Reliable characterization of coffee bean aroma profiles by automated headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry with the support of a dual-filter mass spectra library*. Journal of Separation Science, 2005. 28(9–10): p. 1101–1109.
26. Perez-Martinez, M., et al., *Influence of brewing method and acidity regulators on the antioxidant capacity of coffee brews*. J Agric Food Chem, 2010. 58(5): p. 2958-65.
27. Clarke, R.J.M., R., *Coffee*. Elsevier Applied Science Publishers, 1987. Vol. 2: Technology.
28. Smrke, S., et al., *Time-Resolved Gravimetric Method To Assess Degassing of Roasted Coffee*. J Agric Food Chem, 2018. 66(21): p. 5293-5300.
29. Schenker, S., & Rothgeb, T., *The roast- Creating the Beans' signature. In the craft and science of coffee* London: Academic Press. , 2017: p. 245–271.
30. Schenker, S., Heinemann, C., Huber, M., Pompizzi, R., Perren, R., & Escher, R., *Impact of Roasting Conditions on the Formation of Aroma Compounds in Coffee Beans*. Journal of Food Science, 2002. 67(1): p. 60-66.
31. S. Schenker, S.H., B. Frey, R. Perren, and F. Escher, *Pore Structure of Coffee Beans Affected by Roasting Conditions*. Food Engineering and Physical Properties, 2000. 65: p. 452-457.
32. Geiger, R., Perren, R., Kuenzli, R., & Escher, F., *Carbon Dioxide Evolution and Moisture Evaporation During Roasting of Coffee Beans*. Journal of Food Science, 2005. 70(2): p. 124-130.
33. Filomena, M., Camões, G.F.C., *Análise de injeção em fluxo (FIA)*, in Química. 1993.
34. Cerdà, V.F.A., L.; Cerdà, A., *Evolution and Description of the Principal Flow Techniques, in Flow Analysis*. 2014. p. 1-42.
35. Skeggs, L., *Automatic method for colorimetric analysis*. Am. J. Clin. Path, 1957. 28: p. 311 to 322.

36. J. Ruzicka, E.H.H., *Flow injection analyses. I. New concept of fast continuous flow analysis*. Anal. Chim., 1975. 78: p. 145 a 157.
37. B.F. Reis, M.F.G., E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A. Lapa, *Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests*. Anal. Chim., 1994. 293: p. 129 to 138.
38. V. Cerdà, J.M.E., R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altimira, P. Sitjar,, *Flow techniques in water analysis* Talanta 50, 1999: p. 695-705.
39. B. Horstkotte, O.E., V. Cerdà, *Review on automation using multisyringe flow injection analysis*. J. Flow Injection Anal., 2005. 22: p. 99-109.
40. Lapa, R.A.S., Lima, J.L.F.C., Reis, B.F., Santos, J.L.M., Zagatto, E.A.G. , *Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities*. Anal. Chim. Acta, 2002. 466: p. 125-132.
41. Hinman, D., *CO₂ sorption in roast and ground coffee*. Association Scientifique Internationale du Cafe, 1993: p. 694-701.
42. Shimoni, E., Labuza, T. P., *Degassing kinetics and sorption equilibrium of carbon dioxide in fresh roasted and ground coffee*. Journal of Food Process Engineering, 2000. 23: p. 419-436.
43. Ljunggren, E., Karlberg, B., *Determination of total carbon dioxide in beer and soft drinks by gas diffusion and flow injection analysis*. JAC, 1995. 17: p. 105-108.
44. Satienperakul, S., et al., *Determination of carbon dioxide in gaseous samples by gas diffusion-flow injection*. Talanta, 2004. 62(3): p. 631-6.
45. Routh, M.W., Swartz, P. A., Denton, M. B., *Performance of the Super Modified Simplex*. Analytical Chemistry, 1977. 49(9): p. 1422–1428.
46. Horstkotte, B., C.M. Duarte, and V. Cerdà, *Response functions for SIMPLEX optimization of flow-injection analysis and related techniques*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2010. 29(10): p. 1224-1235.
47. Morgan, E., Burton, K. W., & Nickless, G, *Optimization using the super-modified simplex method*. . Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 1990. 8(2): p. 97–107.
48. Monteiro, M.A.D., *Determinação de dióxido de carbono em café num sistema multicomutado com difusão gasosa e deteção espectralométrica*, P.J.F. de Almeida, Santos, J. R. S., Editor. 2020, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
49. Miller, J.N.M.e.J.C., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* 6ed. 2010: Pearson.
50. Xiuju Wang, L.-T.L., *Effect of roasting conditions on carbon dioxide degassing behavior in coffee*. Food Research International, 2014. 61: p. 144–151.