



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DIEGO SOARES DOMINGUES

DETECÇÃO DE ADULTERANTES EM CAFÉ ARÁBICA POR
SISTEMAS DE CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA

DIEGO SOARES DOMINGUES

DETECÇÃO DE ADULTERANTES EM CAFÉ ARÁBICA POR
SISTEMAS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Química da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Química

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Josefa Santos
Yabe

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Suzana Lucy
Nixdorf

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

D671d Domingues, Diego Soares.
Detecção de adulterantes em café arábica por sistemas de cromatografia líquida /
Diego Soares Domingues. – Londrina, 2011.
56 f. : il.

Orientador: Maria Josefa Santos Yabe.

Co-orientador: Suzana Lucy Nixdorf.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica – Teses. 2. Café – Processamento – Teses. 3. Eletroquímica
– Teses. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 5. Café – Adulteração –
Teses. I. Yabe, Maria Josefa Santos. II. Nixdorf, Suzana Lucy. III. Universidade
Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em
Química. IV. Título.

CDU 543

DIEGO SOARES DOMINGUES

DETECÇÃO DE ADULTERANTES EM CAFÉ ARÁBICA POR
SISTEMAS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Química da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Química

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Suzana Lucy Nixdorf
UEL – Londrina – PR

Prof^a. Dr^a. Maria Brigida dos Santos Scholz
IAPAR – Londrina – PR

Prof. Dr. Rui Sérgio dos Santos Ferreira da
Silva
UEL – Londrina – PR

Londrina, 18 de Maio de 2011.

À Deus, por acreditar que nossa existência
pressupõe outra infinitamente superior.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter conseguido superar todas as adversidades encontradas neste período.

A minha orientadora e amiga Prof^a. Dr^a. Suzana Lucy Nixdorf, pela orientação, paciência e ajuda incansável durante toda a trajetória do mestrado, pelos esforços não medidos e pela confiança em mim depositada no desenvolvimento deste trabalho.

A orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Josefa Santos Yabe pelos conhecimentos transmitidos, sem os quais, este trabalho não poderia ter sido desenvolvido.

A CAPES, pelo apoio financeiro, concedendo a Bolsa, sem a qual não poderia ter realizado este trabalho.

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial a Prof^a. Dra. Marta de Toledo Benassi pela oportunidade de estar presente na banca de qualificação, e por toda a atenção a mim dispensada.

Ao IAPAR – Instituto Agrônômico do Paraná, em especial a Prof^a. Dra. Maria Brigida dos Santos Scholz por estar presente na banca de defesa, e por toda contribuição na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rui Sérgio dos Santos Ferreira da Silva pela oportunidade de estar presente na banca de defesa.

À Companhia Cacique de Café Solúvel, nas pessoas do Sr. Valderi Cristiano, Sr. Edenir José Gualtieri e Sr. Silvio Victorino, por disponibilizarem as amostras de café.

Ao professor Carlos Alberto Paulinetti da Camara pela grande ajuda.

As amigas Elis Daiane Pauli e Julia Estéfane Martins de Abreu pela ajuda incansável, disponibilidade e amizade.

Aos amigos de laboratório Francys William Massura, Jaqueline Tobias de Moraes, Franciele Barbieri, Jayme Toledo Piza, Felipe Gorla, Patrícia Salomão Garcia, Estéfano Nakamura e Matheus Sampaio Goveia pelos momentos de descontração e alegria.

Aos meus pais, Acacio e Malu, por todos os esforços realizado.

DOMINGUES, D. S. **Detecção de adulterantes em café arábica por sistemas de cromatografia líquida.** 56f. 2011. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo. Devido à sua grande importância comercial, a detecção de impurezas, sedimentos e matérias estranhas, tem sido preocupação constante na averiguação de fraudes, especialmente pela dificuldade de percepção de adulterações à olho nu, em amostras de café torrado e moído. No Brasil as adições mais frequentes são materiais torrados como cascas e paus, milho, trigoilho, soja e mais recentemente sementes de açaí. Com o objetivo de verificar a mistura em diferentes proporções de triticale e açaí ao café torrado e moído, aplicou-se um planejamento experimental do tipo centróide-simplex. Avaliou-se o desempenho de dois métodos distintos aplicados às mesmas amostras extraídas, empregando o método internacionalmente adotado ISO 11292, inicialmente estabelecido para a determinação de carboidratos em café solúvel, baseado na técnica de HPLC-HPAE-PAD, e posteriormente validado para café torrado e moído, com resultados comparados aos obtidos pelo método não normalizado de detecção pós-coluna por ultravioleta-visível (HPLC-UV/VIS). A HPAE é uma técnica conhecida como cromatografia de alta eficiência que emprega coluna de troca aniônica forte, a qual associada à detecção por amperometria pulsada (PAD) permite a quantificação direta de carboidratos, sem derivatização, com excelente resolução, em uma única corrida, apresentando boa sensibilidade, portanto, possibilitando a detecção em baixos níveis de concentração. A segunda técnica cromatográfica, consiste no uso de coluna de troca iônica catiônica com temperatura elevada, e exige a derivatização com adição de cromóforo pós-coluna, pelo fato dos carboidratos não apresentarem ligações π conjugadas, entretanto, possibilita o emprego de detector UV-VIS, equipamento existente na maioria de laboratórios de controle de qualidade. Embora, a sensibilidade do sistema UV-VIS tenha apresentado menor resolução e sensibilidade, observou-se potencialidade na sua utilização para triagem de adulterantes em rotina no controle de qualidade do café, já que pela avaliação quimiométrica, as matrizes puderam ser correlacionadas, agrupadas e distinguidas por meio de carboidratos característicos. Modelos matemáticos foram elaborados para explicar a influência de cada carboidrato, permitindo prever quanti e qualitativamente pelas superfícies de resposta traçadas, a proporção de mistura destes adulterantes no café. O monossacarídeo característico para o café puro foi a galactose com concentrações de 5,59% (m/m) empregando o sistema HPLC-HPAE-PAD, e de 3,67% (m/m) para o sistema HPLC-UV/VIS com pós-coluna. Para o triticale puro, o carboidrato característico foi a glicose, detectada em maior quantidade, com 46,34%(m/m) e 26,13%(m/m), para os dois sistemas, respectivamente. Enquanto, o carboidrato característico e predominantemente detectado para o açaí foi manose com teores de 24,54%(m/m) e 10,78%(m/m) respectivamente.

Palavras-Chave: Café torrado e moído. Fraudes. Carboidratos. Detecção eletroquímica.

DOMINGUES. D. S. **Detection of adulterants in arabic coffee by liquid chromatography systems.** 56f. 2011. Dissertation (Master Degree in Chemistry) – Londrina State University, Londrina.

ABSTRACT

Coffee is one of the most consumed beverages in the world. Due to its commercial importance, the detection of impurities, sediments and foreign matter has been a constant concern in fraud verification, especially by the difficulty in perception of adulterations with naked eye, in samples of roasted and ground coffee. In Brazil, the most common additions are roasted material as husks and sticks, corn, wheat middling, soybean and recently acai seeds. With the objective of verify the mixture in different proportions of triticale and acai in roasted and ground coffee, was applied an experimental design simplex centroid. Was evaluated the performance of two distinct methods applied to the same samples, extracted using the internationally adopted method ISO 11292, first established to the determination of carbohydrates in soluble coffee, based on HPLC-HPAE-PAD technique, and later validated to roasted and ground coffee, with results compared to the ones obtained by the non-normalized method by HPLC-UV-VIS with postcolumn derivatization system. HPAEC is a technique known as High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (PAD) enables straight quantification of carbohydrates, without derivatization, with excellent resolution, in a single run, showing good sensitivity, therefore, enabling detection in low concentration levels. The second chromatography technique consists in the use of cationic exchange column with high temperature, and requires derivatization with addition of chromophore postcolumn reagent by the fact that carbohydrates don't present conjugated π bonding, but enables the use of UV-VIS detector, equipment existent in most of quality control laboratories. However UV-VIS system's has shown less resolution and sensitivity was observed potentiality in its utilization in the selection of adulterants in coffee quality control routines, since by chemometric evaluation, matrixes could be correlated, grouped and distinguished by characteristics carbohydrates. Mathematical models were developed to explain the influence of each carbohydrate, enabling to predict quantitatively and qualitatively by response surface analysis, the mixture proportion of these adulterants in coffee. Characteristic monosaccharide to pure coffee was galactose with concentrations of 5.59% (w/w) using HPLC-HPAE-PAD system, and 3.67%(w/w) to the HPLC-UV/VIS with postcolumn derivatization system. To pure triticale, glucose was the characterized carbohydrate, detected in more quantity, with 46.34%(w/w) and 26.13%(w/w) to both systems, respectively. While characteristic and predominant carbohydrate detected to acai was mannose, with contents of 24.54%(w/w) and 10.78%(w/w) respectively.

Key words: Rasted and grounded. Coffee. Fauds. Carbohydrates. Electrochemistry detection.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – (A) Representação do espaço experimental para processos com três fatores independentes, onde todos os pontos estão inclusos dentro do cubo e o espaço experimental de uma mistura de três componentes limita-se aos pontos pertencentes ao triângulo. (B) Representa uma superfície de resposta para todas as possíveis misturas dos componentes 1, 2 e 3, e em (C) suas curvas de nível26
- Figura 2** – Planejamento de misturas do tipo centróide-simplex ampliada com três componentes: café*triticale*açaí29
- Figura 3** – Diagrama das condições metodológicas empregadas na extração dos carboidratos totais33
- Figura 4a** – Cromatogramas de carboidratos das matrizes puras utilizando o sistema HPLC-HPAE-PAD. (A) Padrão de monossacarídeos 10% (v/v), (B) Café arábica 100%, (C) Triticale 100%, (D) Açaí 100%. Picos: (1) Manitol, (2) Arabinose, (3) Galactose, (4) Glicose, (5) Xilose, (6) Manose e (7) Frutose35
- Figura 4b** – Cromatogramas de carboidratos utilizando o sistema HPLC-UV-VIS com reação pós-coluna. Café arábica 100%; Triticale 100% e Açaí 100%37
- Figura 5** – Superfície de contorno para concentração de: (a) arabinose, (b) galactose, (c) glicose, (d) xilose e (e) manose para o sistema HPLC-HPAE-PAD, de acordo com o planejamento centróide-simplex. (Os pontos assinalados correspondem aos ensaios realizados e delimitam a região experimental)43
- Figura 6** – Superfície de contorno para concentração de: (a) arabinose, (b) galactose, (c) glicose, (d) xilose e (e) manose para o sistema UV-VIS com reação pós-coluna, de acordo com o planejamento centróide-simplex. (Os pontos assinalados correspondem aos ensaios realizados e delimitam a região experimental)45

Figura 7 – Projeções das variáveis (A) e das amostras (B) nos Componentes Principais 1 e 2 para o sistema HPLC-HPAE-PAD	47
Figura 8 – Projeções das variáveis (A) e das amostras (B) nos Componentes Principais 1 e 2 para o sistema UV-VIS com reação pós-coluna	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição da amostragem para avaliação de adulterantes (café*triticale*açai).....	29
Tabela 2 -	Condições cromatográficas empregadas na análise de carboidratos totais pelo sistema HPAEC-PAD.....	34
Tabela 3 -	Condições cromatográficas empregadas na análise de carboidratos totais pelo sistema UV-VIS com reação pós-coluna	34
Tabela 4 -	Valores de luminosidade, tonalidade cromática e umidade (g/100 g) para matrizes puras de café arábica e de adulterantes – triticale e açai	35
Tabela 5 -	Concentrações de carboidratos totais em % (m/m) determinadas pelo sistema HPLC-HPAE-PAD, de acordo com o planejamento centróide-simplex das matrizes de café arábica, triticale e açai. C = café, T = Triticale e A = Açai (N = 2, exceto ponto central, onde N=3).....	39
Tabela 6 -	Concentrações de carboidratos totais em % (m/m) determinadas pelo HPLC-UV-VIS com reação pós-coluna de acordo com o planejamento centróide-simplex das matrizes de café arábica, triticale e açai. C = café, T = Triticale e A = Açai.....	39
Tabela 7 -	Coefficientes de regressão e análise de variância do modelo linear das respostas de concentração de carboidratos (% - m/m) para um sistema HPLC-HPAE-PAD de acordo com um planejamento centróide-simplex	42
Tabela 8 -	Coefficientes de regressão e análise de variância dos modelos ajustados para concentração de carboidratos (% - m/m) em um sistema UV-VIS com reação pós-coluna de acordo com um planejamento centróide-simplex.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a*	Componente vermelho-verde
ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café
ACP	Análise de Componentes Principais
b*	Componente amarelo-azul
CEPLAC	Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira
CLAE (HPLC)	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNC	Conselho Nacional do Café
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DCTA	Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos
DIA	Desenvolvimento de Instrumentação, Automação e Metodologia Analítica
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
H*	Tonalidade cromática
HPAEC-PAD	High Performance Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detector
ISO	International Organization for Standardization
L*	Luminosidade
m/m	Razão entre massas
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ms	milissegundos
NIR	Near-infrared
IR	Infrared
OIC	Organização Internacional do Café
p	Nível de significância
R ²	Coeficiente de determinação
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UV-Vis	Regiões do espectro Ultravioleta e Visível
v/v	Razão entre volumes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	CAFÉ – ASPECTOS CULTURAIS E SOCIOECONÔMICOS	15
2.2	CAFÉ – ESPÉCIES E COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	16
2.2.1	Carboidratos	18
2.2.1.1	Carboidratos em café arábico torrado e moído.....	20
2.3	ADULTERANTES EM CAFÉ.....	21
2.4	SISTEMAS EMPREGADOS NA ANÁLISE DOS CARBOIDRATOS DE TRITICALE, AÇAÍ E CAFÉ	23
2.5	QUIMIOMETRIA APLICADA NA ANÁLISE CARBOIDRATOS NAS MATRIZES DE CAFÉ E SEUS ADULTERANTES	24
3	OBJETIVOS	27
3.1	GERAL.....	27
3.2	ESPECÍFICOS	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	AMOSTRAS DE CAFÉ ARÁBICA, TRITICALE E AÇAÍ.....	28
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CAFÉ ARÁBICA E ADULTERANTES.....	28
4.2.1	Determinação da Umidade	28
4.2.2	Análise de Cor	28
4.3	PREPARO DE AMOSTRAS DE CAFÉ ARÁBICA E OS ADULTERANTES TRITICALE E AÇAÍ	29
4.4	REAGENTES E PADRÕES	30
4.5	SOLUÇÕES PADRÃO	30
4.5.1	Análise por HPLC-HPAE-PAD	30
4.5.2	Análise por HPLC-UV-VIS com Reação Pós-Coluna.....	31
4.6	SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS	31
4.6.1	HPLC-HPAE-PAD	31
4.6.2	HPLC-UV-VIS com Reação Pós-Coluna	32

4.7	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CAFÉ ARÁBICA E ADULTERANTES.....	35
5.2	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS MISTURAS NAS CONCENTRAÇÕES DOS CARBOIDRATOS.....	36
5.2.1	Planejamento Experimental para Estudo das Misturas de Café Arábica, Triticale e Açai nos Sistemas HPLC: HPAE-PAD e UV- VIS com Reação Pós-Coluna	36
6	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

O café é um dos produtos básicos mais valiosos, constituindo-se na segunda maior mercadoria comercializada, permanecendo atrás somente do petróleo (OIC, 2011; NABAIS et al., 2008), tendo como os maiores canais de comercialização e formação de preços no contexto mundial, as bolsas de “*commodities*” de Nova York e Londres (NOBRE et al., 2007). Segundo a Organização Internacional do Café (OIC, 2011), a produção total de café para a safra 2009/2010 foi em torno de 132 milhões de sacas de 60 kg, equivalendo a um aumento de 2,0% em relação ao mesmo período anterior, sendo a produção brasileira representante de cerca de 35% do total da exportação mundial com o equivalente a 46 milhões de sacas.

A importância econômica do café deixa claro que estudos relacionados à sua composição, detecção de fraudes e avaliação de sua qualidade são de suma importância (MOREIRA; TRUGO, 1997), constituindo-se em pré-requisitos à comercialização, especialmente em um mercado cada vez mais globalizado, que controla com eficácia a qualidade dos produtos (ISSO 11292, 1995; ABIC, 2011a).

No Brasil, as impurezas, com maior frequência, adicionadas ao café segundo Assad et al. (2002) são cascas e paus, milho, cevada, trigoilho, açúcar mascavo e soja, e mais recentemente outros adulterantes têm sido adicionados ao café, como, tritcale e denúncias levaram a apreensão de produtos comerciais com sementes de açaí (ABIC 2011b). De acordo com Bernal et al. (1996) a determinação individual de carboidratos tem ganhado importância significativa não somente por prover informação composicional das amostras, mas também, por auxiliar na identificação de adulterantes.

Estudos sobre o perfil dos carboidratos realizados por Blanc, Davis e Parchet (1989) em centenas de amostras de cafés solúveis de várias nacionalidades, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-VIS e utilizando um sistema de derivatização pós-coluna, permitiram verificar que extratos de cascas de café estavam sendo incorporados a alguns cafés, vendidos comercialmente, em concentrações superiores a 25%. Nestes estudos, valores das análises dos carboidratos livres e totais, possibilitaram evidenciar fraudes pela determinação de que a contaminação proposital por casca de café ocasionava um

aumento no teor de manitol, xilose, glicose e frutose; enquanto a adição de material lenhoso (paus) resultava no aumento da concentração de xilose, glicose e frutose, permitindo diferenciar produtos puros de produtos adulterados, identificando a natureza do adulterante.

Segundo Bernal et al. (1996) os carboidratos podem ser determinados utilizando o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), baseados em combinações apropriadas da fase estacionária e do sistema da detecção. A técnica de cromatografia de troca aniônica acoplada com detecção por amperometria pulsada (HPAEC-PAD) tem sido a técnica preferencial adotada internacionalmente para a análise de carboidratos em café solúvel (ISO 11292, 1995) por exigir pouco preparo da amostra com excelente resolução e sensibilidade, quando comparado à detecção por índice de refração (IR) ou UV-VIS (COUTINHO, 2003; DIONEX, 2011a).

Atualmente, as técnicas analíticas vêm sendo cada vez mais, associadas a estudos quimiométricos, visando otimizar os resultados. Estes estudos, baseados na estatística, permitem avaliar a qualidade da matriz de forma planejada e detectar a existência de correlações entre diferentes perfis de matéria prima, valendo-se de técnicas de agrupamento. Segundo Reis e Andrade (1996), o propósito geral em um experimento com misturas é tornar possível, por meio de superfícies de respostas, a estimativa das propriedades de um sistema multicomponente, a partir de um número limitado de observações, onde estas observações são obtidas de combinações pré-selecionadas dos componentes na tentativa de se determinar quais delas, de alguma maneira, otimizam a resposta.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CAFÉ – ASPECTOS CULTURAIS E SOCIOECONÔMICOS

Até hoje não se sabe ao certo a origem da palavra café, podendo significar tanto a bebida quanto a planta ou o fruto. Pode vir da palavra *kaffa*, da Abissínia – atual Etiópia; também ser originária do árabe *karah* (ou *gavah*), que quer dizer vinho, ou então *kahwah* (ou *cahue*), que significa força, ou pode ainda ter origem no idioma turco, nas palavras *koveh* ou *kaveh*, que também denominam o vinho (ABIC, 2011a; EMBRAPA, 2011).

O café é originário do continente africano, mas após atravessar o Mar Vermelho e ser levado para a Península Arábica, foram os árabes que inicialmente dominaram a técnica de plantio e preparação deste produto (MARTINS, 2008). Até o século XVII, somente os árabes produziam café, enquanto que alemães, franceses e italianos procuravam uma maneira de desenvolver o plantio em suas colônias. A partir de 1615 o café começou a ser consumido no continente europeu, trazido por viajantes em suas freqüentes viagens ao oriente (ABIC, 2011a). Graças aos holandeses, o café começou a ser conhecido no mundo (EMBRAPA 2011). Com as experiências holandesa e francesa, o cultivo de café foi levado para outras colônias européias. O crescente mercado consumidor europeu propiciou a expansão do plantio de café em países africanos e a sua chegada ao Novo Mundo. Pelas mãos dos colonizadores europeus, o café chegou ao Suriname, São Domingos, Cuba, Porto Rico e Guianas. Foi por meio das Guianas que chegou ao norte do Brasil. Desta maneira, o segredo dos árabes se espalhou por todos os cantos do mundo (ABIC, 2011a).

Desde sua descoberta na Abissínia, o café levou cerca de nove séculos até sua chegada ao Brasil, em 1727. Entrou no país pelo Estado do Pará, trazido da Guiana Francesa pelas mãos do sargento-mor Francisco de Melo Palheta que, a pretexto de resolver oficialmente questões de fronteiras, havia sido enviado àquele país para conseguir mudas da planta. A missão foi difícil, já que naquele país as mudas de café eram inacessíveis a qualquer estrangeiro (EMBRAPA, 2011).

Posteriormente o café foi cultivado no Nordeste, no caso no Maranhão, Ceará, Pernambuco e Bahia, até chegar, em 1773, ao Rio de Janeiro. Expandiu-se pela Serra do Mar, atingindo, em 1825, o Vale do Paraíba, daí

alcançando os Estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais, onde encontrou condições para o seu desenvolvimento. Num espaço de tempo relativamente curto, o café passou de uma posição relativamente secundária para a de produto-base da economia brasileira, onde em 1845, o Brasil já era responsável por 45% das exportações mundiais dos produtos (ABIC, 2011a; CNC, 2011; EMBRAPA, 2011).

O café está presente em 1,9 mil municípios brasileiros, com 250 mil produtores e este agronegócio brasileiro é gerador de mais de 8,5 milhões de empregos. A área total cultivada com café está estimada em 2.342.438 hectares, desse total, 11,70% (245.296 mil hectares) estão em formação e 88,3% (2.097.142 mil hectares) estão em produção (CONAB, 2011). A produção de café arábica se concentra em São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Bahia e parte do Espírito Santo, enquanto o café robusta é plantado principalmente no Espírito Santo e Rondônia. Em 2009 o consumo brasileiro de café foi cerca de 19 milhões de sacas, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (OIC, 2011). A exportação de café torrado e moído totalizou US\$ 4,27 bilhões em 2009, contra US\$ 4,75 bilhões em 2008, apresentando queda de cerca de 10%, devendo ao fato na baixa no preço do café mediante a crise global ocorrida em 2009. Os principais mercados consumidores do café brasileiro são, respectivamente, Alemanha, Estados Unidos, Itália, Bélgica e Japão (ABIC, 2011a).

2.2 CAFÉ – ESPÉCIES E COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Aproximadamente 100 espécies do gênero *Coffea L* (Rubiacea) são conhecidas atualmente, sendo as mais importantes a *Coffea arabica* (arábica) e a *Coffea canephora*, genericamente conhecido por robusta, que representam respectivamente 70 e 30% da produção mundial (BRAGANÇA, et al. 2001; CEPLAC, 2011; CARVALHO et al., 2001; ALVES; DIAS; BENASSI, 2006; CASTRO; MARRACCINI, 2006). Produzem flores com aroma de jasmim e frutos conhecidos como cerejas, onde dentro de cada fruto há dois invólucros, ou seja, uma polpa e um pergaminho, e ainda, dentro de cada fruto existem dois grãos de café (MARTINS, 2008).

Estas duas espécies apresentam uma série de características diferentes, onde o *Coffea arabica* é um tetraplóide ($2n = 44$ cromossomos), multiplicando-se por autofecundação. É cultivada em altitudes mais elevadas com

temperaturas entre 18 e 22°C, ou seja, cresce em climas mais amenos, tem um grão verde claro de formato ovalar que pode ser vendido puro, ou seja, sem *blend*. As cultivares de *C. arabica* mais indicadas para plantio são Mundo Novo, Catuaí Amarelo, Catuaí Vermelho, Acaiá e Icatu.

O *Coffea canephora* é um diplóide ($2n = 22$ cromossomos) que se reproduz por fecundação cruzada principalmente pela ação do vento e dos insetos, adaptada a regiões de baixa altitude e temperaturas elevadas, de grande rusticidade, clima úmido, oferece maior resistência às pragas, seu grão é arredondado e de coloração castanho (BOAVENTURA, 1990; AGUIAR et al., 2005; ALVES; DIAS; BENASSI, 2006; CASTRO; MARRACCINI, 2006; CLARINDO; CARVALHO, 2009; GASPARI-PEZZOPANE, 2007; MARTINS, 2008; CEPLAC, 2011). Os pés de café atingem de 2 a 2,5 metros, podendo chegar a 10 metros de altura (MARTINS, 2008).

Ambas as espécies não se diferem somente pelas características botânicas, mas também em termos de valores comerciais, onde o *C. arabica* tem valores de 20 a 25% maiores que o *Coffea canephora* a nível mundial (PIZARRO; ESTEBAN-DÍEZ; GONZÁLEZ-SÁIZ, 2007), chegando a cerca de 50% de diferença para o mercado brasileiro (ABIC, 2011a). Esta valorização se deve ao *C. arabica* produzir um café fino, de aroma e sabor mais apreciado no mundo. O *C. canephora* produz um café com sabor mais adstringente e amargo, é muito usado em *blends*, é considerado neutro e tem maior concentração de sólidos solúveis, resultando em um maior rendimento industrial (MARTINS, 2008; CEPLAC, 2011).

Segundo o regulamento técnico de identidade e de qualidade o café é classificado em arábica e robusta. De acordo com a classificação para o café arábica há sete subgrupos de bebida, sendo os primeiros quatro subgrupos de bebidas finas e os três últimos de bebidas fenicadas: estritamente mole; mole; apenas mole; dura; riado; rio e rio zona. O grupo robusta é classificado em quatro subgrupos: excelente; boa; regular e anormal (BRASIL, 2010).

A composição química do café verde varia de acordo com a espécie e variedade estudada, como também está relacionada com outros fatores como solo, clima, altitude, tipo de manejo no campo, grau de maturação e do tipo de acondicionamento dado ao grão colhido (COFFEE BREAK, 2011). Vários são os componentes químicos presentes no grão de café cru, entre eles os voláteis, que são degradados à componentes de menor peso molecular durante a torração, e são

os principais responsáveis pelas características sensoriais que determinam a qualidade da bebida. Segundo Silva, Ascheri e Pereira (2007) o café torrado e moído apresenta concentrações médias em g/100 g de amostra: umidade: 5,2 a 9,6; proteínas: 13,8 a 17,7; lipídios: 6,9 a 11,1; carboidratos: 62,7 a 72,0, cinzas: 4,6 a 5,0; e fibra bruta: 14,6 a 21,5. Por representarem uma quantidade significativa da composição do café os carboidratos merecem estudos à parte.

2.2.1 Carboidratos

Os açúcares simples, monossacarídeos, são compostos cuja fórmula geral é representada por $C_n(H_2O)_n$. Outros tipos de carboidratos, oligossacarídeos e polissacarídeos, são baseados nas unidades de monossacarídeos e apresentam uma pequena diferença na fórmula geral. Oligossacarídeos são formados quando poucos monossacarídeos estão ligados; polissacarídeos são formados quando muitos monossacarídeos estão ligados (CAMPBELL, 2000). Segundo seu tamanho existem três classes principais de carboidratos: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Monossacarídeos possuem cadeia de três a sete átomos de carbono, unidas entre si por ligações covalentes simples e não ramificadas. Os monossacarídeos podem ser aldoses ou cetoses. Monossacarídeos com cadeia de três, quatro, cinco, seis e sete átomos de carbono são chamados de trioses, tetroses, pentoses, hexoses e heptoses, respectivamente. Os oligossacarídeos consistem de cadeias curtas de monossacarídeos unidas entre si por ligações glicosídicas características e os mais abundantes são os dissacarídeos com cadeias formadas por duas unidades de monossacarídeos, um exemplo é a sacarose formada por D-glicose e D-frutose. É na forma de polissacarídeos que a maioria dos carboidratos são encontrados na natureza. Os polissacarídeos diferem entre si pelas unidades de monossacarídeos e os tipos de ligações que as une, no comprimento de suas cadeias e no grau de ramificações. Os homopolissacarídeos contêm somente um único tipo de unidade monomérica, já os heteropolissacarídeos contêm dois ou mais tipos diferentes de unidades monoméricas (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

O amido é um polissacarídeo bem adaptado a função de reserva nas células vegetais (BUCKERIDGE et al., 2000). É uma associação de dois

polissacarídeos, amilopectina e amilose. A amilopectina é a mais abundante entre as duas estruturas, com cerca de 70-80% (m/m) do grânulo de amido. A amilose são cadeia longas, não-ramificadas de unidades D-glicose unidas por ligações α (1 \rightarrow 4) (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995). Na amilopectina há uma ramificação na hidroxila de C6 com uma ligação α (1 \rightarrow 6). Porém, as ligações α (1 \rightarrow 4) continuam no polímero (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009). A amilose é mais solúvel do que a amilopectina (STONE, 1996).

Os polissacarídeos não amiláceos (PNA) constituem a parede celular dos alimentos de origem vegetal e compreendem uma classe de polissacarídeos como celulose, hemicelulose e pectinas (ARRUDA et al., 2003; BRITO et al., 2008).

A celulose é o principal constituinte da parede celular de plantas. É um polímero do tipo homopolissacarídeo linear, constituído de alto peso molecular, de cadeia linear e elevado grau de polimerização das unidades D-glicose unidas por ligações do tipo β (1 \rightarrow 4) e β (1 \rightarrow 6). Possui configuração alongada e agrega-se lado a lado formando microfibrilas insolúveis unidas por fortes ligações inter e intramoleculares como as pontes de hidrogênio (BRITO et al., 2008; MEURER; HAYASHI, 2003).

Hemiceluloses são heteropolissacarídeo de estrutura complexa com grau de polimerização inferior ao da celulose. São unidas por ligações β , aliadas a açúcares residuais como xilose, arabinose, glicose, galactose e ácido glicorônico. Podem ser classificadas em pentosanas ou hexosanas (BRITO et al., 2008). A composição da hemicelulose varia de uma espécie para outra. Encontram-se intercaladas às microfibrilas de celulose, impedindo que elas se toquem, conferindo elasticidade e consistência à parede celular. São compostas de hexoses (glicose), pentoses (arabinose, xilose) e ácido urônico (ácido glicorônico). Suas cadeias centrais são formadas, principalmente, por xilanos, galactanos ou mananos e as cadeias laterais por arabinose ou galactose (TAVERNARI et al., 2008). Pentosanas contém polímeros de D-xilose unidas por ligações β (1-4) com cadeias laterais curtas de arabinose (arabinoxilanos), ácido glucorônico, galactose e glicose (xilanos), ou ainda contendo resíduos de galactose unidos por ligações β (1 \rightarrow 3) e β (1 \rightarrow 6), com cadeias laterais formadas por arabinose (arabinogalactanos). Hexosanas contém cadeias de glicose e manose unidas por ligações β (1 \rightarrow 4) (mananos) (BRITO et al., 2008)

Pectinas são polímeros do ácido 1,4- β -D-galacturônico que se encontram principalmente na lamela média e parede primária da célula vegetal, agindo como um elemento cimentante entre membranas. A cadeia helicoidal de ácidos galacturônicos, possivelmente está associada lateralmente com arabinoxilanos e galactomananos (BRITO et al., 2008).

2.2.1.1 Carboidratos em Café Arábica Torrado e Moído

A torra constitui uma etapa essencial na produção de café, pois afeta a formação dos compostos do sabor e aroma e a coloração dos grãos de café. Através da torra há o aumento da extração dos polissacarídeos devido às mudanças na microestrutura do grão, como o aumento do seu volume e a presença de microporos maiores na parede celular. Assim, há um aumento na acessibilidade dos polímeros da parede celular a qualquer extrator que favorece uma maior solubilização de polissacarídeos (REDGWELL; FISCHER, 2006; REDGWEEL et al., 2002; OOSTERVELD et al., 2003a).

Segundo Oosterveld e colaboradores (2003a), o processo de torração acarreta a perda de 8% da massa (em base seca) do grão de café. A queda do teor de carboidratos presentes no grão processado pode ser atribuída à conversão de parte dos açúcares em produtos de pirólise nas reações de Maillard. Já a maior proporção de lipídios pode ser explicada pela degradação dos carboidratos durante o processo de torração. A arabinose demonstrou ser o carboidrato mais sensível ao grau de torra, seguido pela degradação de galactose, indicando que a composição de arabinogalactano em grãos de café muda significativamente com o aumento da torra, sendo a manose o menos sensível.

Segundo o estudo de Redgwell e colaboradores (2002) dos polissacarídeos individuais, a arabinogalactose é a mais sensível à degradação térmica, quando comparada à manose e à celulose, considerando-se as porcentagens obtidas de arabinose, galactose e manose representando 80, 50 e 35% respectivamente, estes valores são diferentes dos 60, 30 e 34%, dos mesmos monossacarídeos, encontrados no trabalho de Thaler (1979). Estudos dos açúcares de baixo peso molecular demonstram que estes são quase totalmente degradados e quantidades mínimas permanecem no grão após a torrefação (BRADBURY, 2001).

A degradação de xiloglucanos, que são uma parte do sistema celulose-xiloglucano e são responsáveis pela resistência da parede celular, pode ser um fator responsável pela perda da firmeza da parede celular durante a torra. Isso explicaria o aumento da acessibilidade descrita que resulta no aumento de solubilização de outros polissacarídeos (OOSTERVELD et al., 2003a).

2.3 ADULTERANTES EM CAFÉ

Detectar impurezas e misturas no café é uma preocupação constante no que diz respeito principalmente à garantia da qualidade do produto. Considera-se fraude a mistura, intencional ou não, de materiais estranhos ao produto, normalmente de baixo custo, que alteram a sua qualidade e podem causar danos ao consumidor, especialmente, os de ordem econômica (ASSAD et al., 2002). A *International Organization for Standardization (ISO)*, define impurezas ou “defeitos” como sendo: madeira, gravetos, cascas (ou palha), ou cerejas inteiras, que podem estar presentes no café (ISO 3509, 1989). No Brasil, as impurezas, com maior frequência, adicionadas ao café são cascas e paus, milho, cevada, trigoilho, açúcar mascavo e soja (ASSAD et al., 2002), podendo-se adicionar a esta lista o centeio, o tritcale e o açaí (ABIC, 2011b).

A Portaria nº 377, de 26 de abril de 1999 (Brasil 1999), foi criada com o objetivo de fixar a identidade e as características mínimas de qualidade a que devem obedecer, os cafés torrado em grão e torrado e moído. A legislação especifica os requisitos obrigatórios em relação à composição, características sensoriais e físico-químicas e estabelece normas para o uso de aditivos e para a presença de contaminantes. O teor máximo de impurezas tolerado em café torrado é de 1%.

Em meados de 1989, a ABIC - Associação Brasileira da Indústria de Café criou o Selo de Pureza, para validar a qualidade das marcas de café distribuídas no Brasil, afim de que a qualidade do café seja equivalente ao exportado. Este selo garante o café com até 1% de impureza, previstas de acordo com a legislação. Somente as indústrias que comprovam ter um rígido controle de produção podem exibir o Selo de Pureza ABIC em suas embalagens. A qualidade do café está associada à combinação dos grãos (*blend*) e também aos variados pontos

de torra que produzem diferentes sabores de café. Portanto, os cafés com selo da ABIC são produtos puros, mas não são produtos iguais.

Em 23 de fevereiro de 2011 entrou em vigor a Instrução Normativa N° 16 que cria o Regulamento Técnico para o Café Torrado em Grão e Café Torrado e Moído (Padrão Oficial de Classificação), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. O novo regulamento determina os limites máximos de 1% de impurezas (cascas e paus) e de 5% de teor de umidade (BRASIL, 2010).

O aspecto exterior granuloso do café, com textura oleosa e aderente e com cores características, variando do castanho-avermelhado ao pardo escuro, contribui fortemente quanto á dificuldade na identificação de substâncias estranhas a ele adicionadas. Desde que estejam com o mesmo grau de torra do café, estas substâncias são mascaradas pela absorção do óleo e aderência das partículas mais finas do pó de café à sua superfície, tornando-se difícil seu reconhecimento sem o auxílio de equipamentos e métodos analíticos especiais (ASSAD et al., 2002). Isso mostra que o ponto de torra escura não deve ser somente atribuído aos costumes do consumidor, mas também é utilizado com o intuito de mascarar a presença de defeitos ou alterações comuns em cafés usados comercialmente (FERNANDES et al., 2001).

A adulteração econômica tem sido praticada substituindo produtos alimentícios caros por materiais de custo mais baixo. Várias técnicas analíticas como CG, HPLC, análise isotópica estável, eletroforese, espectroscopia NIR, entre outras tem sido empregadas para análise de proteínas, carboidratos, pigmentos, ácidos orgânicos, com o propósito de detectar fraudes. A determinação de carboidratos empregando a cromatografia tem possibilitado a criação de parâmetros para a identificação de possíveis adulterantes (PRODOLLIET; HISCENHUBER, 1998; GARCIA, 2009).

Segundo a literatura, em café solúvel a presença de xilose total tem sido indicativo de adição de casca de café e películas; os altos níveis de glicose indicam adulteração por malto-dextrose ou caramelo; e altos níveis de frutose livre podem ser indicativo de adulteração com chicória (BRIANDET; KEMSLEY; WILSON, 1996). Produtos adulterados com cascas de café ou pergaminhos apresentam elevados níveis de manitol e frutose livre, e ainda, glicose e xilose total. Produtos adulterados com amido (por exemplo, cereais ou malte), maltodextrinas ou açúcar caramelizado apresentam altas quantidades de frutose, glicose e sacarose livre,

bem como, elevados níveis de glicose total (PRODOLLIET; HISCHENHUBER, 1998).

O processo convencionalmente utilizado para detecção de fraudes em café torrado e moído por laboratórios credenciados no Brasil consiste na preparação de lâminas microscópicas e na sua análise visual. Por tratar-se de análise microscópica, este processo constitui-se em um método subjetivo e, conseqüentemente, a confiabilidade dos resultados é pequena, já que depende da experiência do analista e, por isso, está sujeita a erros humanos (ASSAD et al., 2002). Assad e colaboradores (2002) usaram princípios físicos de sensoriamento remoto, empregando o comportamento espectral e análises de imagens digitais para quantificar impurezas e misturas adicionadas ao pó de café puro.

Pesquisas empregando a espectroscopia no infravermelho têm sido empregadas para averiguar a autenticidade de alimento, tendo sido utilizadas também para café torrado e moído (SANTOS, 2005) e café instantâneo (BRIANDET; KEMSLEY; WILSON, 1996).

Os carboidratos podem ser determinados utilizando cromatografia líquida e gasosa, baseados em combinações apropriadas da fase estacionária e do sistema da detecção (BERNAL et al., 1996). A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE do inglês HPLC) tem sido ferramenta importante para identificação e quantificação de carboidratos em alimentos e bebidas, representado uma medida chave para avaliar a qualidade, controlar propriedades, processos e produtos, na rotulagem nutritiva, e no teste da autenticidade e contaminação (DIONEX, 2011b).

2.4 SISTEMAS EMPREGADOS NA ANÁLISE DOS CARBOIDRATOS DE TRITICALE, AÇAI E CAFÉ

A técnica de cromatografia de troca iônica empregando coluna de troca aniônica forte acoplada com detector eletroquímico aplicando a amperometria pulsada (HPAEC-PAD – *High Performance Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detector*) tem sido a técnica preferencialmente adotada internacionalmente, como metodologia normalizada ISO/TC-34/SC15 - ISO/DIS 11292 (1995) para determinação de carboidratos totais e livre contidos em cafés solúveis. Esta apresenta excelente resolução com quantificação em níveis de

concentração baixos, quando comparada à detecção por Índice de Refração, que apesar de ser universal, apresenta uma sensibilidade reduzida (COUTINHO, 2003).

Pelo fato dos carboidratos não apresentarem ligações π conjugadas, estes não podem ser diretamente detectados por UV-VIS, requerendo assim derivatizações pós-coluna, capazes de gerar subprodutos fotometricamente ativos (PAULI, 2007). Apesar da técnica UV-VIS ser cerca de cem vezes mais sensível em relação detecção por IR, o manitol não é detectado e a xilose, por estar mais baixa concentração no café, apresenta dificuldades em sua quantificação (COUTINHO, 2003), no entanto, pode ser empregada como metodologia de triagem inicial na identificação de possíveis adulterantes (PAULI, 2011).

Diferentemente da técnica de detecção UV-VIS, a detecção amperométrica de carboidratos não necessita de derivatização e pode ser aplicada na detecção de qualquer carboidrato, já que todos possuem grupos oxidáveis (hidroxilas). Esta detecção se baseia na oxidação dos carboidratos em eletrodos de ouro, em $\text{pH} > 12$, pois a oxidação do carboidrato na superfície do eletrodo produz uma grande quantidade de H^+ que necessita ser neutralizado para que a cinética de oxidação seja favorecida. Esta técnica, quando acoplada a HPAEC, permite a detecção direta de carboidratos até níveis de 10 picomol injetados com excelente relação sinal-ruído (DIONEX, 2011a).

Para se garantir a qualidade total de medições químicas, portanto, não basta somente ter uma boa técnica analítica, porém, estas devem ser otimizadas e validadas pelo emprego de ferramentas estatísticas. Os estudos quimiométricos baseados na estatística permitem avaliar a qualidade da matriz de forma planejada, por meio de delineamento de misturas do tipo centróide-simplex, e detectar a existência de correlações entre diferentes perfis de adulterantes, utilizando-se técnicas de agrupamento por análises multivariadas.

2.5 QUIMIOMETRIA APLICADA NA ANÁLISE CARBOIDRATOS NAS MATRIZES DE CAFÉ E SEUS ADULTERANTES

A década de 70 marca o início da atividade de pesquisa concentrada na quimiometria. Este campo é a parte da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para definir ou selecionar as condições ótimas de medidas e experiências e visa permitir a obtenção do máximo de informações com um número

reduzido de experimentos a partir da análise de dados químicos (BRUNS; FLAIGE, 1985).

O experimento com misturas é feito com dois ou mais componentes, em adequadas proporções, sendo que uma resposta é obtida para cada conjunto de componentes. As propriedades de uma mistura são determinadas pelas proporções de seus componentes presentes e não somente pela quantidade total da mistura (REIS; ANDRADE, 1996; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

Num planejamento de misturas, duas condições devem ser levadas em conta: as propriedades de uma mistura são determinadas pelas proporções de seus componentes e as proporções dos diversos componentes são linearmente dependentes. A soma das proporções numa mistura deve ser sempre 100%. Uma mistura de q componentes pode ser descrita pela Equação (1):

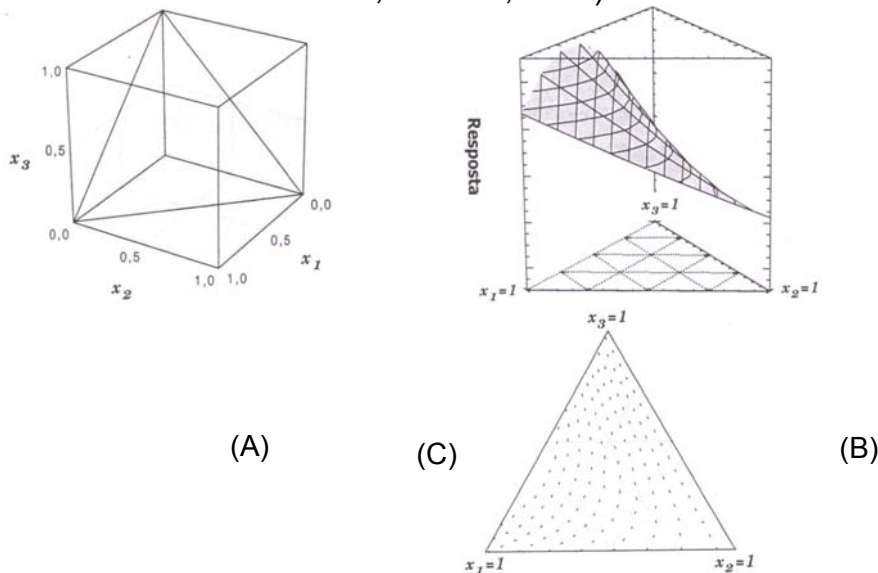
$$\sum_{i=1}^a x_i = 100\% \quad (1)$$

Onde, x_i representa a proporção do i -ésimo componente.

Para especificar a composição da mistura, devem-se fixar as proporções de $q - 1$ componentes, onde a proporção do último componente será sempre o que faltar para completar 100% (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

Numa mistura de três fatores independentes, a representação básica é um cubo, onde os experimentos realizados correspondem a qualquer ponto dentro desse cubo (Figura 1 A).

Figura 1 - (A) Representação do espaço experimental para processos com três fatores independentes, onde todos os pontos estão inclusos dentro do cubo e o espaço experimental de uma mistura de três componentes limita-se aos pontos pertencentes ao triângulo. (B) Representa uma superfície de resposta para todas as possíveis misturas dos componentes 1, 2 e 3, e em (C) suas curvas de nível (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).



Todas as composições possíveis da mistura ternária são representadas pelos pontos pertencentes ao triângulo, onde os vértices correspondem aos componentes puros e as laterais às misturas binárias. Já os pontos situados no interior do triângulo, representam as misturas dos três componentes. A variação de uma dada propriedade com a composição da mistura pode ser representada por uma superfície de resposta traçada acima do triângulo, como observado na Figura 1 (B), e projetando e representando essa superfície por suas curvas de nível, se obtêm um diagrama triangular, representado na Figura 1 (C) (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

Para avaliar o efeito da mistura de matrizes empregam-se diferentes modelos matemáticos. Estes modelos permitem explorar os efeitos de várias variáveis simultaneamente e extrair o máximo de informações do sistema que está sendo investigado. A Análise de Componentes Principais é usada para testar a adequação dos modelos matemáticos aos resultados experimentais individuais obtidos por meio de um planejamento centróide-simplex (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Utilizar dois sistemas cromatográficos distintos para quantificar os carboidratos das matrizes puras e suas misturas, feitas por delineamento centróide-simplex, de café arábica, triticales e açai. Caracterizar os carboidratos predominantes, distinguindo-os em grupos pela análise de componentes principais. Ajustar modelos matemáticos e superfícies de resposta capazes de prever qual e quantitativamente as adições destes adulterantes no café. Avaliar a aplicação e o desempenho das técnicas de cromatografia líquida, verificando a correlação entre o método normalizado ISO 11292, validado para o café solúvel que emprega detecção eletroquímica (HPLC-HPAE-PAD), e o método por detecção com UV-VIS pós-coluna.

3.2 ESPECÍFICOS

- Efetuar a determinação de carboidratos totais em matrizes puras torradas e moídas e em misturas com diferentes proporções, preparadas de acordo com planejamento centróide-simplex de 3 componentes: café arábica*triticales*semente de açai, utilizando método normalizado ISO 11292 para extração e os sistemas de detecção que empregam a técnica HPLC-HPAE-PAD e HPLC-UV-VIS com reação pós-coluna;
- Aplicar métodos quimiométricos, ajustando modelos matemáticos preditivos que possibilitem caracterizar pelos cromatogramas, produzidos a partir do planejamento experimental, um padrão de adulteração por triticales e açai, baseando-se na contribuição individual dos carboidratos – arabinose, galactose, glicose, xilose, e manose, para ambas as técnicas; distinguindo os carboidratos predominantes para cada matriz e separando por análise de componentes principais;
- Comparar às duas metodologias de análise, avaliando seu desempenho, vantagens e desvantagens e aplicação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS DE CAFÉ ARÁBICA, TRITICALE E AÇAÍ

No presente trabalho foi utilizada uma amostra de café 100% arábica, fornecida pela Companhia Cacique de Café Solúvel. Os adulterantes triticales e açaí foram fornecidos pelo IAPAR – Instituto Agrônômico do Paraná. As amostras de café, triticales e açaí foram torradas separadamente em torrador (Rodibel, Brasil) e em panela de ferro até o ponto de torra mais próximo possível da torra média, trituradas e peneiradas (35 mesh – 500 μ m), e acondicionada em potes plásticos até o momento da análise.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CAFÉ ARÁBICA E ADULTERANTES

4.2.1 Determinação da Umidade

A umidade foi determinada em Termobalança de infravermelho (Bel Engineering) utilizando-se 105°C, por 5 minutos. Os resultados, expressos em g/100 g, foram utilizados para o cálculo das concentrações dos constituintes químicos em base seca.

4.2.2 Análise de Cor

Para análise de cor foi empregado um colorímetro portátil CR-400 (Konica Minolta, Japão) com ângulo de observação de 0°, iluminante D65, com área de leitura de 8 mm, que indicam os valores no sistema *CIELAB*. Seus parâmetros são indicados através de um valor de L^* , que indica luminosidade, ou seja, descreve a cor em termos de mais clara ou mais escura, de preto a branco. Quanto maior for o valor de L^* , mais clara é a sua coloração, com escala de 0 a 100. A tonalidade cromática H^* é calculada pelo arco tangente da relação b^*/a^* , ou seja, ($H^* = \arctg b^*/a^*$) As amostras de café foram acondicionadas em recipiente plásticos de 1 cm de altura e 4 cm de diâmetro para a leitura. (ABNT 12694, 1992; PAPADASKI, et al., 2000).

4.3 PREPARO DE AMOSTRAS DE CAFÉ ARÁBICA E OS ADULTERANTES TRITICALE E AÇAÍ

Para o estudo dos adulterantes, a amostragem seguiu um planejamento experimental do tipo centróide-simplex, representado por um triângulo eqüilátero (Figura 2). Os seus vértices correspondem as matrizes puras, as arestas as misturas binárias de mesma proporção, o ponto central a mistura ternária de proporções iguais, e os três pontos axiais, as proporções de 4:1:1; 1:4:1; 1:1:4, totalizando 10 diferentes composições, codificadas de 1 a 10. As misturas de café arábica* triticale*açai foram feitas conforme Tabela 1, todas preparadas em duplicatas exceto o ponto central feito em triplicata, e analisadas aleatoriamente nos sistemas cromatográficos. O preparo se deu por pesagem de diferentes proporções das matrizes de forma sempre a atingir 0,3000 g em base seca para a análise por HPAEC-PAD e 0,2000 g em base seca para a análise por UV-Vis Pós Coluna.

Figura 2 - Planejamento de misturas do tipo centróide-simplex ampliada com três componentes: café*triticale*açai

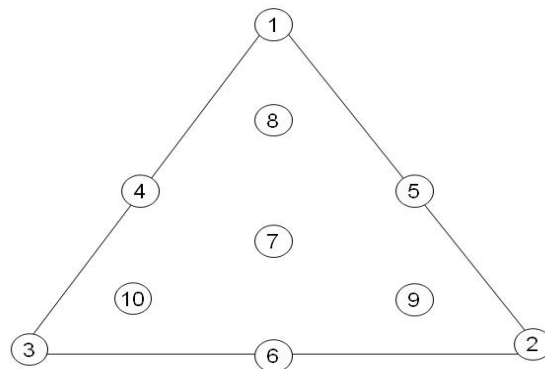


Tabela 1 - Composição da amostragem para avaliação de adulterantes (café*triticale*açai)

Código da Amostra	café:triticale:açaí (%)
1 – 1a	100:0:0
2 – 2a	0:100:0
3 – 3a	0:0:100
4 – 4a	50:50:0
5 – 5a	50:0:50
6 – 6a	0:50:50
7a – 7b – 7c	34:33:33
8 – 8a	66: 17:17
9 – 9a	17:17:66
10 – 10a	17:66:17

Para calcular os efeitos, bem como, para a modelagem de resposta foi utilizado o programa STATISTICA 6.0 e para a análise por componentes principais utilizou-se o software SPSS 18.0.

4.4 REAGENTES E PADRÕES

Foram utilizados como solventes para as etapas de extração e preparo da fase móvel: hidróxido de sódio, solução de 50%(Fisher, EUA e Isosol, Brasil), ácido clorídrico (F.MAIA, Brasil) de grau p.a. A água empregada no preparo de padrões e soluções foi purificada e filtrada pelo sistema Milli-Q[®] (Millipore, Milford, MA, EUA). As fases móveis foram desgaseificadas antes de sua utilização pela aspersão de nitrogênio (cilindro LINDE pureza 99,99973%, Brasil, com regulador de 2º estágio, Inpagás).

Os padrões empregados foram: D(-) – Manitol, D(-) – Arabinose, D(+) – Galactose, D(+) – Glicose, D(+) – Xilose, D(+) – Manose, D(-) – Frutose todos da marca Merck (Alemanha, Darmstadt). Devido à grande higroscopicidade dos carboidratos, os padrões foram mantidos em dessecador de vidro, com vácuo e pentóxido de fósforo (Merck, Alemanha, Darmstadt) e foram utilizados somente depois de uma semana de dessecamento.

4.5 SOLUÇÕES PADRÃO

4.5.1 Análise por HPLC-HPAE-PAD (ISO, 1995)

Para o preparo da solução de mistura de padrões de carboidratos estoque pesou-se: 0,0030 g de Manitol; 0,0300 g de Arabinose; 0,1200 g de Galactose; 0,0450 g de Glicose; 0,0120 g de Xilose; 0,0900 g de Manose; 0,0450 g de Frutose, adicionando-se a um balão volumétrico de 100,0 mL e completando-se até a marca com água ultrapura. Sonicou-se a solução por 10 minutos em banho ultrassônico.

A identificação e quantificação dos carboidratos foram realizadas, com base nos tempos de retenção dos componentes eluídos da coluna, comparados às concentrações conhecidas de padrões externos individuais e pela co-cromatografia.

Para a quantificação dos carboidratos nas amostras, injetou-se uma mistura de padrões analíticos 10% (v/v), onde tomou-se 10,0 mL da solução padrão estoque com uma pipeta e adicionou-se a um balão volumétrico de 100,0 mL até a marca com água ultrapura. Esta mistura de padrões corresponde às seguintes concentrações em relação aos 0,3000 g de amostra: 0,10% (m/m) de Manitol; 1,00% (m/m) de Arabinose; 4,00% (m/m) de Galactose; 1,50% (m/m) de Glicose; 0,40% (m/m) de Xilose; 3,00% (m/m) de Manose; 1,50% (m/m) de Frutose.

4.5.2 Análise por HPLC-UV-VIS com Reação Pós-Coluna (PAULI, 2011)

Para o preparo da solução de mistura de padrões de carboidratos estoque pesou-se: 0,030 g de Glicose, 0,020 g de Xilose, 0,110 g de Galactose, 0,040 g de Arabinose e 0,060 g de Manose, transferidos para um balão volumétrico de 100,00 mL e o volume foi completado com água ultrapura. Sonicou-se a solução por 5 min em banho ultrassônico. O padrão foi armazenado em geladeira a $\sim 4^{\circ}\text{C}$. Esta solução estoque foi diluída para a obtenção do padrão analítico de 25% (v/v) o qual foi injetado a cada dia utilizado para a quantificação.

4.6 SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS

4.6.1 HPLC-HPAE-PAD

Para a análise cromatográfica utilizou-se um sistema instrumental que consistiu em um Cromatógrafo Líquido inerte de *PEEK* composto por: dois frascos Nalgene[®] para armazenagem da fase móvel: eluente ($\text{NaOH } 1,4 \text{ mmol L}^{-1}$) e regeneradora ($\text{NaOH } 300 \text{ mmol L}^{-1}$); uma bomba de alta pressão inerte LC-10Ai – Shimadzu à $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; uma válvula solenóide de baixa pressão de 3 vias Research - 1367-72 com um circuito externo de acionamento de válvula solenóide “lab-made” para troca de eluentes; um injetor automático Shimadzu[®] (SIL – 20A Prominence) com volume de injeção de $20,0 \mu\text{L}$; uma pré-coluna (CarboPac PA1 – Dionex) e uma coluna de troca iônica aniônica de alta performance de resina de poliestireno-divinilbenzeno (CarboPac PA1 - $10 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$ - Dionex); um forno termostaticado para coluna - Waters mantido a 28°C , controlado pelo controlador de temperatura CHX 650 – Pickering Laboratories; um amplificador de

corrente - Stanford Research System RS570; uma fonte simétrica de ± 12 V utilizada para o acionamento de um circuito externo de transmissão de sinais elétricos “lab-made”; uma célula eletroquímica ED-50 - Dionex; um potenciostato Autolab PGStat 30 – Eco-Chemie; uma interface Autolab – Eco Chemie; um sistema de aquisição e tratamento de dados composto por um microcomputador Pentium IV, atuando com o programa GPES (General Purpose Electrochemical System) – Eco.

Para a integração dos cromatogramas, utilizou-se o *software* INTEGRA desenvolvido pelo professor Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara, do Depto de Química e Grupo DIA da UEL, que faz uso da Equação (2) para quantificar o teor de carboidratos (ω) por padronização externa, expresso em porcentagem de massa:

$$\omega = \frac{Am_0V}{A_0mV_0} \times 100 \quad (2)$$

onde,

A – área do pico individual do carboidrato na amostra;

A_0 – área do pico individual do carboidrato na solução padrão;

m – massa, em gramas, da alíquota da amostra, expressa em base seca;

m_0 – massa, em gramas, do carboidrato na solução padrão;

V – volume, em mililitros, da amostra;

V_0 – volume, em mililitros, da solução padrão.

4.6.2 HPLC-UV-VIS com Reação Pós-Coluna

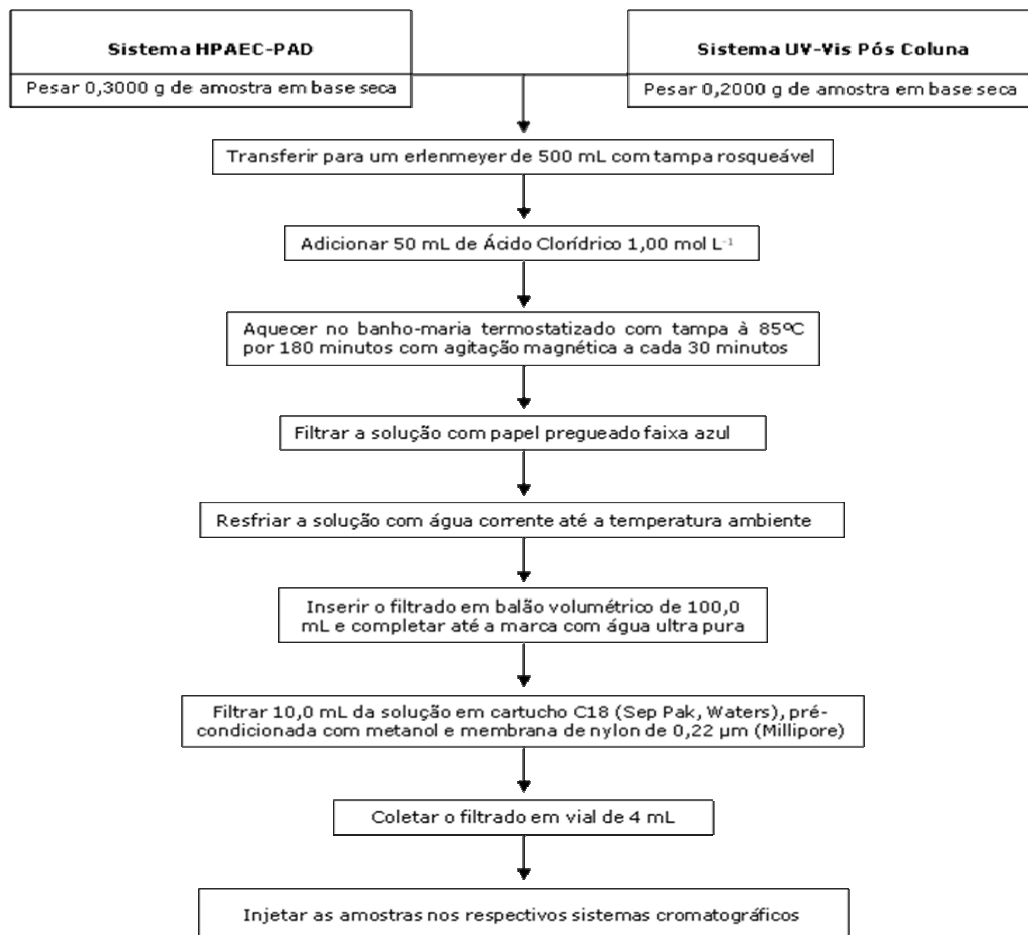
O sistema instrumental utilizado consistiu em um cromatógrafo líquido de alta eficiência composto de dois frascos âmbar para armazenagem da fase móvel eluente e pós-coluna; duas bombas de alta pressão Waters 515 (Milford, MA, EUA); um injetor automático Waters 717 Plus; uma pré-coluna SP 1010 P (6 x 50 mm; Shodex; NY, EUA); uma coluna de troca iônica catiônica Aminex HPX-87P (7,8 x 300 mm na forma iônica Pb^{2+} , Biorad, CA, EUA); um *tee* misturador; um forno termostatizado para coluna, acoplado com um controlador de temperatura módulo II Waters; um reator pós-coluna CRX 390 (Pickering Laboratories, Mountain View, CA, EUA) contendo uma bobina de reação de aço inox no interior do reator de temperatura controlada; regulador de pulso (*pulse dampener*) e restritor de pressão de 100 psi (*back pressure*) conectado na saída do detector; um detector UV-VIS

Waters 2487; e o *software* Empower Build 1154, para aquisição e tratamento de dados por um microcomputador.

4.7 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Para a extração dos carboidratos utilizou-se a metodologia descrita na Norma Padrão Internacional da ISO 11292 (1995), conforme esquema da Figura 3, fazendo as adaptações e adequações necessárias ao sistema instrumental, pelo acoplamento de equipamentos comerciais de diferentes fornecedores.

Figura 3 – Diagrama das condições metodológicas empregadas na extração dos carboidratos totais.



As condições cromatográficas utilizadas nos dois sistemas encontram-se descritas nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Condições cromatográficas empregadas na análise de carboidratos totais pelo sistema HPAEC-PAD

Condições cromatográficas		Parâmetros
Fase Estacionária		Pré-coluna: CarboPac PA-1 e Coluna: CarboPac PA-1 (DIONEX, EUA): 250 mm x 4 mm, 10 µm
Fase Móvel (F.M.)	Composição	Eluente (NaOH): 1,4 mmol L ⁻¹ Regeneradora (NaOH): 300,0 mmol L ⁻¹
	Vazão	1,0 mL min ⁻¹
Detecção: Forma da onda		Potencial determinação: +0,20 V (400 ms)
		Potencial oxidação: +0,65 V (200 ms)
		Potencial redução: -0,20 V (400 ms)
Tempo de corrida cromatográfica		72,60 minutos
Volume de injeção		20,0 µL
Temperatura da coluna		28°C

Tabela 3 - Condições cromatográficas empregadas na análise de carboidratos totais pelo sistema UV-VIS com reação pós-coluna

Condições cromatográficas		Parâmetros
Fase Estacionária		Coluna Aminex HPX-87P (BIORAD, EUA): 7,8 x 300 mm na forma iônica Pb ²⁺
Fase Móvel (F.M.)	Composição	Eluente A – Água ultrapura – Bomba 1 Eluente B – NaOH + ABH – Bomba 2
	Vazão	Bomba 1 – 0,5 mL min ⁻¹ Bomba 2 – 0,6 mL min ⁻¹
Detecção		410 nm
Tempo de corrida cromatográfica		25,00 minutos
Volume de injeção		20,0 µL
Temperatura da coluna		85°C
Temperatura do reator pós-coluna		100°C

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CAFÉ ARÁBICA E ADULTERANTES

As amostras de café arábica e dos adulterantes, triticale e açaí, foram caracterizadas quanto aos parâmetros de cor (L^* e H^*) e umidade, os quais estão apresentados na Tabela 4.

A avaliação da cor foi devido à influência importante que a torra provoca na redução na concentração dos carboidratos do café, comparando-se os grãos verdes da matéria prima e relação aos torrados, em torra clara, média e escura, comprovados por Garcia et al. (2009). Oosterveld et al. (2003b) demonstram não apenas haver redução expressiva no teor dos carboidratos, de acordo com a intensidade de torra, porém, que certos carboidratos como a arabinose e a galactose são mais suscetíveis, comparados a outros como a manose e a glicose.

A umidade foi analisada para permitir efetuar a quantificação em base seca.

Tabela 4a - Valores de luminosidade, tonalidade cromática e umidade (g/100 g) para matrizes puras de café arábica e de adulterantes – triticale e açaí

Matriz	Luminosidade (L^*)	Tonalidade Cromática (H^*)	Umidade (%)
Café arábica	22,80 ± 0,01	39,76 ± 0,01	3,88 ± 0,02
Triticale	26,16 ± 0,04	54,43 ± 0,08	2,83 ± 0,02
Açaí	23,11 ± 0,01	24,12 ± 0,46	6,20 ± 0,01

*Média ± desvio padrão das medidas realizadas em triplicata

Segundo estudos realizados por Campanha (2008) e Dias (2005) com café arábica e conilon, as faixas apresentadas de L^* variaram entre 28 e 40 para a torra clara, 16 a 30 para torra média e de 13 a 21 para torra escura. Nesta mesma seqüência de grau de torra, os valores de H^* variaram de 57 a 70; 45 a 65 e 41 a 59, respectivamente.

Os resultados apresentados na Tabela 4 sugerem que a matriz pura de café arábica utilizada neste experimento apresentou grau de torra média, com o propósito de estar o mais próximo possível da torra praticada para a grande maioria das amostras de café torrado e moído, comercializadas no mercado com o Selo de Pureza ABIC, avaliadas por estudos de Souza (2009). Já o triticale apresentou torra

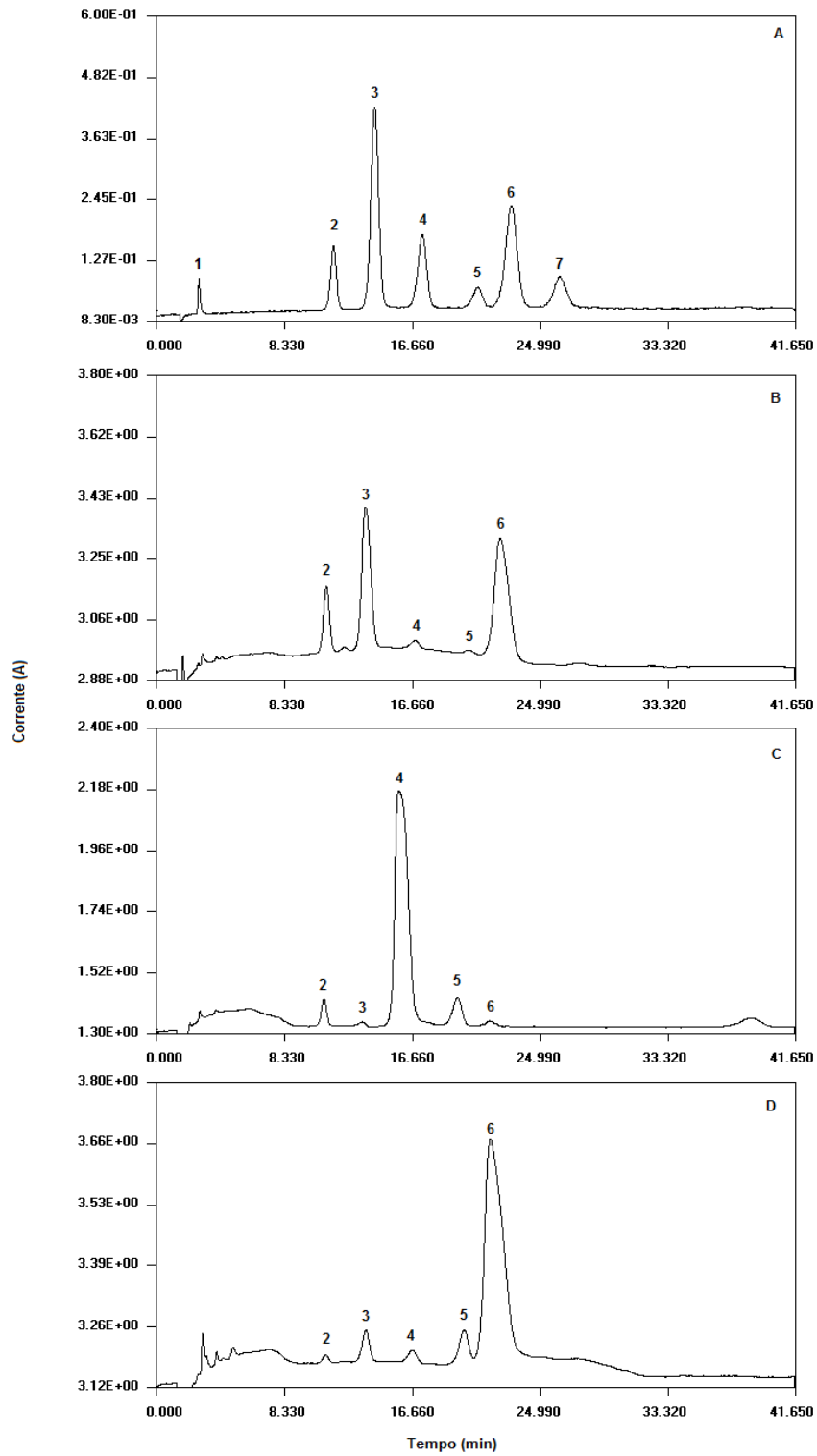
clara. Esta amostra mostrou-se mais amarelada que o café, com o aumento do valor de H^* . Considerando que nos constituintes da matriz de triticales há predominantemente glicose e xilose, que são menos suscetíveis ao grau de torra, bem como, no triticales há o predomínio de manose, considera-se que a variação no grau de torra para estes adulterantes para fins deste estudo não chega a alterar de forma significativa o teor da matriz, servindo este resultado como referencial para a modelagem de fraudes. Por outro lado, observa-se que o açaí apresentou-se com grau de torra mais escura, indicando a possibilidade de mascarar a qualidade do café em termos de defeitos, bebida e/ou a adição de adulterantes. Embora haja esta diferenciação não é possível efetuar a distinção visualmente quando são efetuadas as misturas.

5.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS MISTURAS NAS CONCENTRAÇÕES DOS CARBOIDRATOS

5.2.1 Planejamento Experimental para Estudo das Misturas de Café Arábica, Triticales e Açaí nos Sistemas HPLC: HPAE-PAD e UV-VIS com Reação Pós-Coluna

Considerando as misturas de triticales e açaí adicionadas ao café, seguindo o planejamento experimental centróide simplex (Figura 2 – Tabela 1), pode-se observar, comparando-se nas Figuras 4a e 4b os cromatogramas dos padrões de carboidratos (A) com o das matrizes puras de café arábica (B), triticales (C), açaí (D), que existem características distintas entre as matrizes tanto no sistema cromatográfico HPLC-HPAE-PAD como no sistema cromatográfico HPLC-UV-VIS com reação pós-coluna, demonstradas pelos teores reportados nas Tabelas 5 e 6.

Figura 4b - Cromatogramas de carboidratos utilizando o sistema HPLC-UV-VIS com reação pós-coluna. Café arábica 100%; Triticale 100% e Açaí 100%.



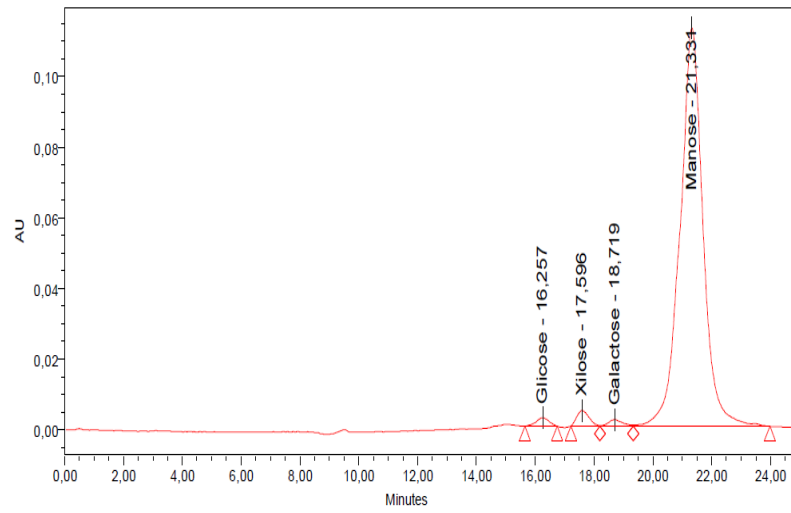
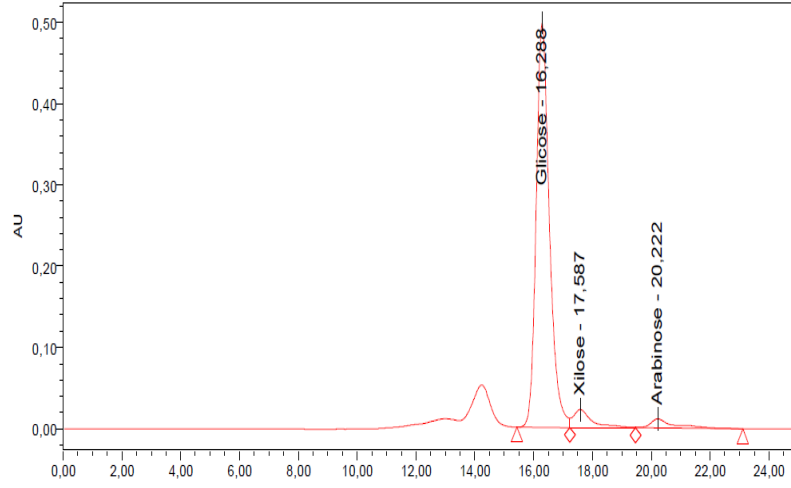
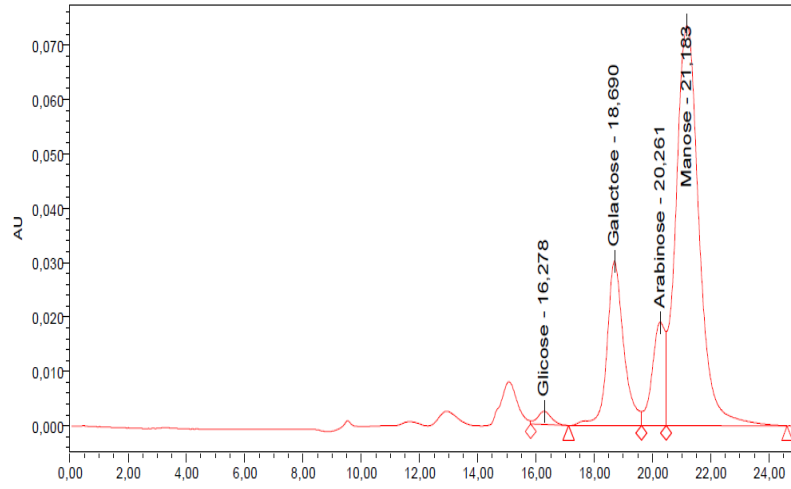


Tabela 5 - Concentrações de carboidratos totais em % (m/m) determinadas pelo sistema HPLC-HPAE-PAD, de acordo com o planejamento centróide-simplex das matrizes de café arábica, triticales e açai. C = café, T = Triticale e A = Açai (N = 2, exceto ponto central, onde N=3)

Carboidratos					
Composição das amostras	Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose	Manose
C1001	1,70	5,18	0,23	0,09	6,90
C1002	1,93	6,00	0,24	0,08	8,13
T1001	1,34	0,21	44,80	1,82	0,48
T1002	1,38	0,24	47,95	1,98	0,41
A1001	0,15	0,75	0,31	0,72	23,44
A1002	0,15	0,73	0,31	0,64	25,64
C50A501	0,95	3,53	0,25	0,35	20,00
C50A502	1,04	3,84	0,26	0,43	17,31
C50T501	1,46	3,42	23,46	0,93	4,11
C50T502	1,24	2,93	22,87	0,94	4,32
A50T501	0,67	0,42	18,19	1,16	10,31
A50T502	0,75	0,44	17,73	1,22	14,74
C34T33A331	0,96	2,47	15,13	0,86	11,74
C34T33A332	1,01	2,67	16,73	0,85	12,63
C34T33A333	1,06	2,85	16,05	0,91	12,41
C66T17A171	1,31	4,03	5,94	0,44	8,38
C66T17A172	1,19	3,84	5,37	0,41	6,93
T66C17A171	1,05	1,40	27,15	1,29	4,21
T66C17A172	1,08	1,42	30,15	1,31	4,42
A66C17T171	0,61	1,70	5,89	0,71	16,94
A66C17T172	0,63	1,69	6,66	0,79	14,93

Tabela 6 - Concentrações de carboidratos totais em % (m/m) determinadas pelo HPLC-UV-VIS com reação pós-coluna de acordo com o planejamento centróide-simplex das matrizes de café arábica, tritica e açai. C = café, T = Tritica e A = Açai.

Carboidratos					
Composição das amostras	Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose	Manose
UC100	1,36	3,66	0,14	n.d	6,98
UT100	1,46	n.d	26,13	2,15	n.d
UA100	n.d	0,20	0,12	0,27	10,78
UC50A50	n.d	1,83	0,11	0,17	10,95
UC50T50	1,08	1,89	12,66	0,85	3,60
UA50T50	n.d	0,34	12,04	1,05	7,25
UC34T33A331	n.d	1,36	7,30	0,48	6,42
UC34T33A332	n.d	1,37	7,61	0,52	6,57
UC34T33A333	n.d	1,34	7,43	0,50	5,83
UC66T17A17	0,86	2,65	4,29	0,28	6,75
UT66C17A17	0,50	0,52	7,56	0,45	1,78
UA66C17T17	n.d	0,57	2,55	0,27	5,97

n.d = não detectado.

Para o sistema HPLC-HPAE-PAD vemos que na matriz de café arábica puro destacam-se com as maiores concentrações a galactose (pico 3) (5,59% m/m) e a manose (pico 6) (7,52% m/m), seguindo a mesma tendência que o sistema UV-VIS com reação pós-coluna apresentando para a galactose 3,67% (m/m) e para a manose 6,98% (m/m).

Embora, haja poucos estudos citados na literatura com teores de carboidratos totais para o café, considerando-se ainda as variações de tipo de cultivar, condições de cultivo, safra, defeitos, bem como, da metodologia analítica empregada, estes valores confirmam a mesma tendência demonstrada nos estudos realizados por Osterveld et al. (2003b), Garcia et al. (2009) e Pauli, Cristiano e Nixdorf (2011), compatível se considerarmos a quebra dos constituintes da parede celular do café reportados por Buckeridge (2000), com predominância dos polissacarídeos arabinogalactanos e galactomananos, e em menor proporção de xiloglucanos.

Observando-se o cromatograma no sistema HPLC-HPAE-PAD para o tritica puro, nota-se o aparecimento do pico 4 característico da glicose com teor médio de 46,34%(m/m), discriminando assim a matriz, uma vez que este pico não é

representativo nas outras matrizes puras. Esse comportamento foi observado também no sistema UV-VIS com reação pós-coluna, onde a glicose apresentou teor de 26,13% (m/m).

Para o açaí, pode-se observar no sistema HPLC-HPAE-PAD que ocorre elevada concentração de manos e (pico 6) apresentando um teor de 24,54% (m/m) para a matriz pura, sendo observado o mesmo perfil cromatográfico no sistema UV-VIS com reação pós-coluna com teor de manos e igual a 10,78%(m/m).

O planejamento experimental centróide-simplex normalmente é empregado para determinar os valores dos coeficientes do modelo cúbico especial (NETO, SCARMINIO E BRUNS, 2003). Entretanto, modelos mais simples, desde que bem ajustados, podem ser escolhidos, pois facilitam a interpretação dos efeitos de cada componente presente na mistura.

O modelo matemático para o sistema HPLC-HPAE-PAD que melhor se ajustou aos resultados experimentais de concentração de arabinose, galactose, glicose, xilose e manose foi o linear (Tabela 7). Considerando que este modelo foi significativo ($p < 0.05$) na descrição dos resultados experimentais, e que a falta de ajuste foi não significativa ($p > 0,05$), o modelo linear pode ser utilizado para fins preditivos da concentração de arabinose, galactose, xilose e manose empregando o sistema HPLC-HPAE-PAD e um planejamento de mistura centróide-simplex onde os componentes são: café arábica, triticales e açaí. A falta de ajuste significativa ($p < 0.05$) do modelo ajustado para a concentração de glicose é consequência do baixo valor do erro puro, e, portanto, pode ser desconsiderada (Tabela 7).

O efeito linear dos três componentes da mistura (café arábica, triticales e açaí) foram positivos e significativos ($p < 0,05$) para a concentração de arabinose, galactose e xilose.

As concentrações de arabinose e galactose foram mais afetadas pelo efeito linear do componente café, indicando que maiores concentrações deste componente provocam um aumento na concentração destes açúcares. Isto está de acordo com o observado pelas curvas de nível apresentadas nas Figuras 5a e 5b, onde as concentrações de arabinose e galactose aumentam à medida que a porcentagem de café é aumentada.

O efeito linear do componente triticales exerceu maior influência nas concentrações de glicose e xilose. Este efeito foi positivo e significativo ($p < 0.05$) indicando que maiores concentrações destes açúcares podem ser obtidas com

maiores concentrações de triticales, conforme também pode ser visualizado pela Figura 5c e 5d.

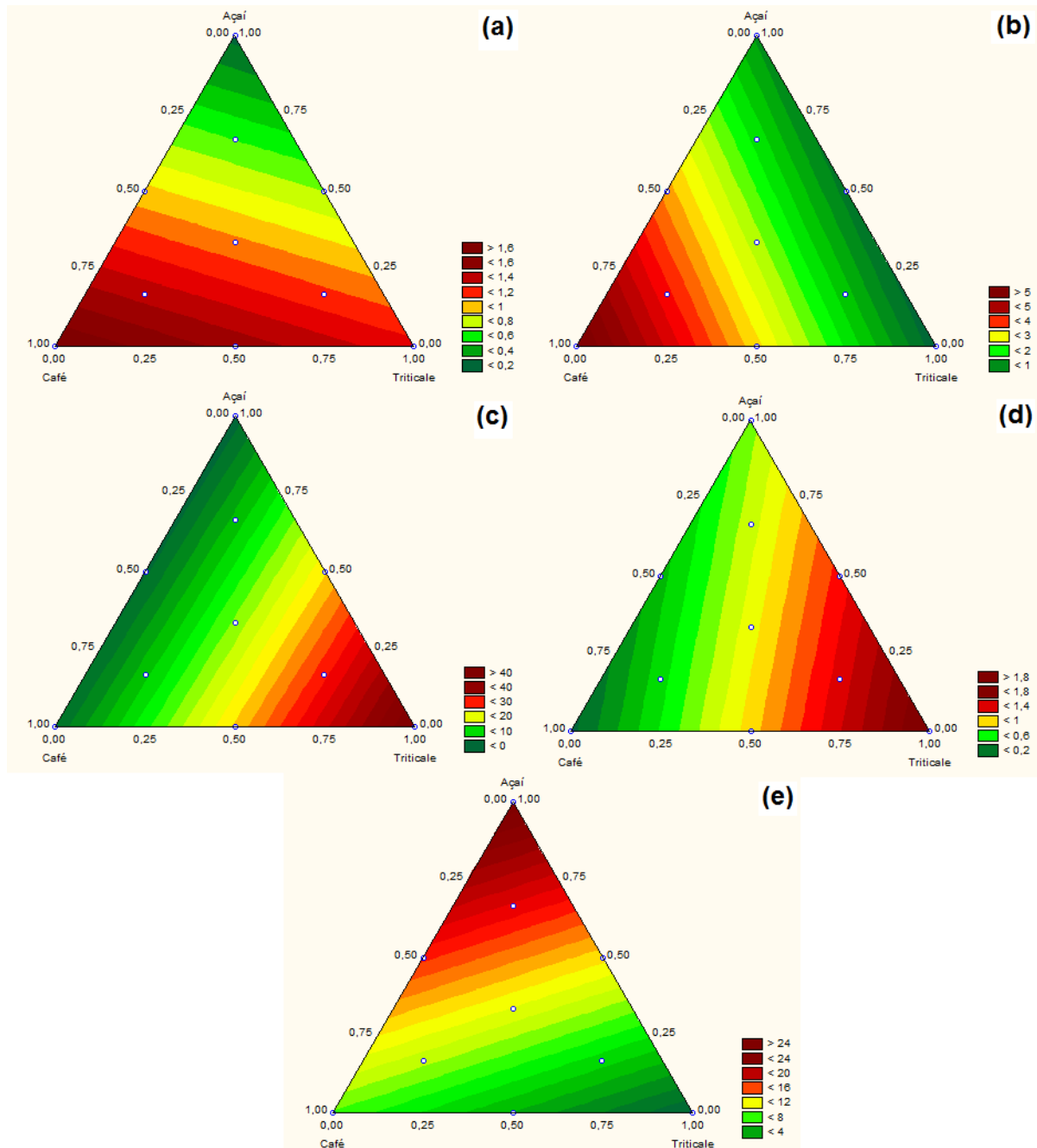
De acordo com o apresentado na Tabela 7 e Figura 5e, a concentração de manose foi mais afetada pelo efeito linear da concentração de açai. Este efeito foi positivo e significativo ($p < 0.05$), sugerindo que em maiores concentrações de açai ocorre um aumento na concentração de manose.

Tabela 7 - Coeficientes de regressão e análise de variância do modelo linear das respostas de concentração de carboidratos (% - m/m) para um sistema HPLC-HPAE-PAD de acordo com um planejamento centróide-simplex.

Coeficientes	Respostas (y)				
	Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose	Manose
β_1	1,696*	5,836*	0,273	0,068*	7,872*
β_2	1,236*	0,332*	44,600*	1,836*	0,002
β_3	0,163*	0,941*	-1,205	0,658*	24,752*
R^2	94,780	97,460	98,390	98,92	94,740
Significância do modelo (p)	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
Falta de ajuste (p)	0,054	0,119	0,002*	0,257	0,077

$y = \beta_1 C + \beta_2 T + \beta_3 A$, onde C: café, T: triticales e A: açai. * significativo em nível de 5% de significância ($p < 0.05$).

Figura 5 - Superfície de contorno para concentração de: (a) arabinose, (b) galactose, (c) glicose, (d) xilose e (e) manose para o sistema HPLC-HPAE-PAD, de acordo com o planejamento centróide-simplex. (Os pontos assinalados correspondem aos ensaios realizados e delimitam a região experimental).



O modelo matemático que melhor se ajustou aos resultados experimentais de concentração de galactose, glicose, xilose e manose sendo significativo na descrição dos resultados foi o linear. No entanto, para os resultados experimentais de concentração de arabinose o modelo matemático que melhor se ajustou foi o quadrático (Tabela 8).

Se comparado ao sistema HPLC-HPAE-PAD, os menores valores de R^2 dos modelos ajustados para a concentração dos carboidratos analisados pelo sistema UV-VIS com reação pós-coluna podem ser explicados, possivelmente, pelo fato de que em alguns ensaios estes valores não foram detectados.

Exceto o modelo ajustado para a concentração de manose onde a falta de ajuste foi não significativa ($p > 0.05$), a falta de ajuste significativa ($p < 0.05$) dos modelos ajustados para concentração de todos os carboidratos avaliados pelo sistema UV-VIS com reação pós-coluna é consequência do baixo valor do erro puro e, portanto, pode ser desconsiderada. Não foi possível observar a falta de ajuste para o modelo ajustado para a concentração de arabinose porque em alguns ensaios estes valores não foram detectados.

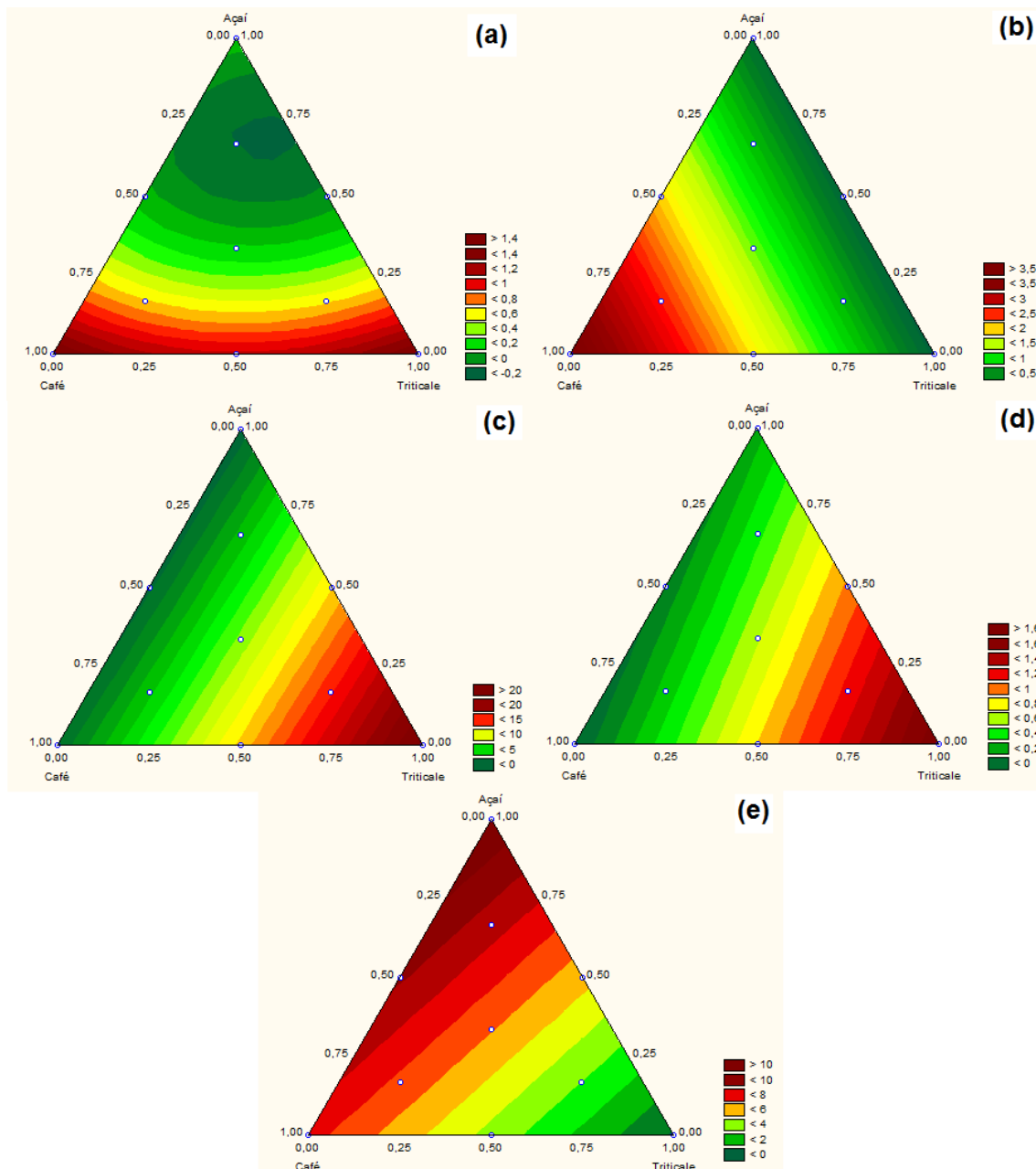
Tabela 8 - Coeficientes de regressão e análise de variância dos modelos ajustados para concentração de carboidratos (% - m/m) em um sistema UV-VIS com reação pós-coluna de acordo com um planejamento centróide-simplex.

Coeficientes	Respostas (y)				
	Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose	Manose
β_1	1,438*	3,699*	0,131	-0,093	7,424*
β_2	1,431*	0,052	22,524*	1,690*	-0,119
β_3	0,065	0,182	0,669	0,150	10,914*
β_{12}	-1,646				
β_{13}	-2,857*				
β_{23}	-3,271*				
R^2	95,64	98,83	87,830	78,320	86,360
Significância do modelo (p)	0,001*	0,000*	0,000*	0,001*	0,000*
Falta de ajuste (p)	-	0,011*	0,002*	0,004*	0,069

$y = \beta_1 C + \beta_2 T + \beta_3 A + \beta_{12} (C)(T) + \beta_{13} (C)(A) + \beta_{23} (T)(A)$, onde C: café, T: triticales e A: açai. * significativo em nível de 5% de significância ($p < 0.05$).

A concentração de arabinose sofreu maior influência da interação entre os componentes triticales e açai. Esta interação, bem como a interação café*açai foram antagônicas (sinal negativo) e significativas ($p < 0.05$), contribuindo para uma redução na concentração de arabinose, conforme também pode ser observado pela superfície de contorno apresentada na Figura 6a.

Figura 6 - Superfície de contorno para concentração de: (a) arabinose, (b) galactose, (c) glicose, (d) xilose e (e) manose para o sistema UV-VIS com reação pós-coluna, de acordo com o planejamento centróide-simplex. (Os pontos assinalados correspondem aos ensaios realizados e delimitam a região experimental).



A concentração de galactose foi mais afetada pelo efeito linear da concentração de café. Este efeito foi positivo e significativo ($p < 0.05$) indicando que maiores concentrações de café provocam aumento na concentração de galactose, conforme pode ser observado pelas superfícies de contorno na Figura 6b. O efeito linear do componente triticale exerceu maior influência nas concentrações de glicose

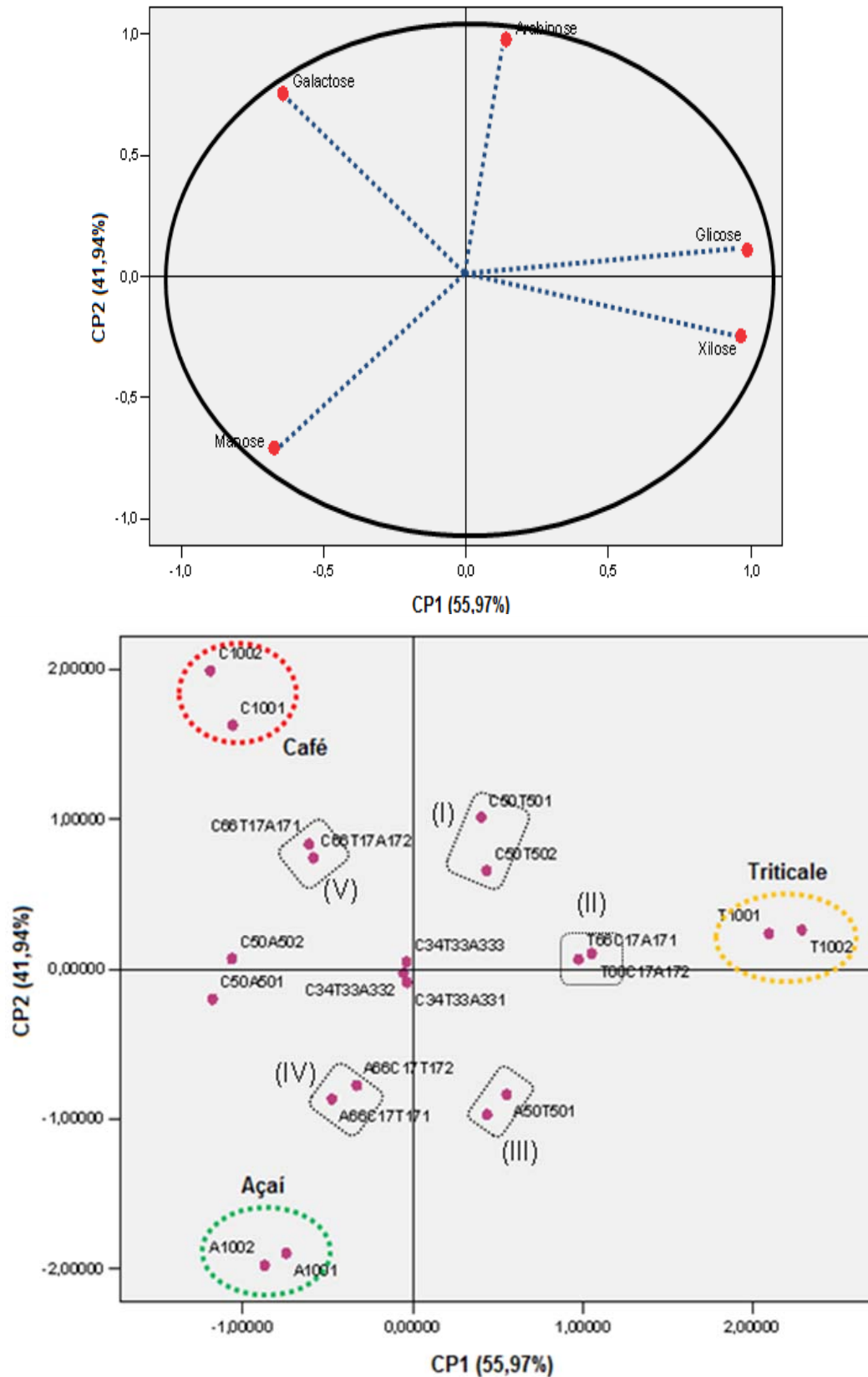
e xilose. Este efeito foi positivo e significativo ($p < 0.05$) indicando que em maiores proporções de triticales ocorre um aumento na concentração de glicose e xilose, conforme observado pela superfície de contorno apresentada nas Figuras 6c e 6d, respectivamente.

A concentração de manose foi mais afetada pelo efeito linear da concentração de açai. Este efeito foi positivo e significativo ($p < 0.05$) indicando que, assim como observado pelas superfícies de contorno apresentada na Figura 6e, à medida que a proporção de açai é aumentada, ocorre um aumento na concentração de manose. Há de se considerar ainda que para esta variável, o efeito linear da concentração de café também foi positivo e significativo ($p < 0.05$), indicando que maiores proporções de café também contribuem para maiores valores de concentração de glicose.

Para uma avaliação em conjunto da capacidade de discriminação entre as amostras de café arábica, triticales e açai pelas variáveis arabinose, galactose, glicose, xilose e manose, empregou-se a Análise de Componentes Principais (ACP) aos resultados dos planejamentos de misturas centróide-simplex de cada sistema, sendo mostrados pelas Figuras 7 e 8.

Para o sistema HPLC-HPAE-PAD, observa-se pela Figura 7A que os Componentes Principais 1 e 2 explicam juntos 97,91% da variabilidade dos dados. Analisando a projeção das variáveis nos Componentes Principais 1 e 2 (Figura 7A) verificou-se que os parâmetros de maior importância no eixo horizontal (Componente 1) com correlação positiva também foram a glicose e a xilose, caracterizando desta forma o adulterante triticales, enquanto a manose apresentou correlação negativa no eixo horizontal, caracterizando a matriz do adulterante açai (Figura 7A).

Figura 7 - Projeções das variáveis (A) e das amostras (B) nos Componentes Principais 1 e 2 para o sistema HPLC-HPAE-PAD.



A galactose foi o parâmetro de maior importância no eixo vertical (Componente 2), com correlação positiva, caracterizando assim a matriz do café. A

separação das matrizes puras pode ser visualizada em grupos bem distintos na Figura 7B.

Observando a Figura 8A é possível notar para o sistema UV-VIS com reação pós-coluna que os Componentes Principais 1 e 2 explicam juntos 90,64% da variabilidade dos dados. Analisando a projeção das variáveis nos Componentes Principais 1 e 2 (Figura 8A) os parâmetros de maior importância no eixo horizontal (Componente 1) com correlação positiva foram glicose e xilose, caracterizando desta forma o adulterante triticales, enquanto a manose apresentou correlação negativa no eixo horizontal, caracterizando a matriz do adulterante açai (Figura 8A).

A galactose foi o parâmetro de maior importância no eixo vertical (Componente 2), com correlação positiva, caracterizando assim a matriz do café. A separação das matrizes puras pode ser visualizada em grupos bem distintos na Figura 8B.

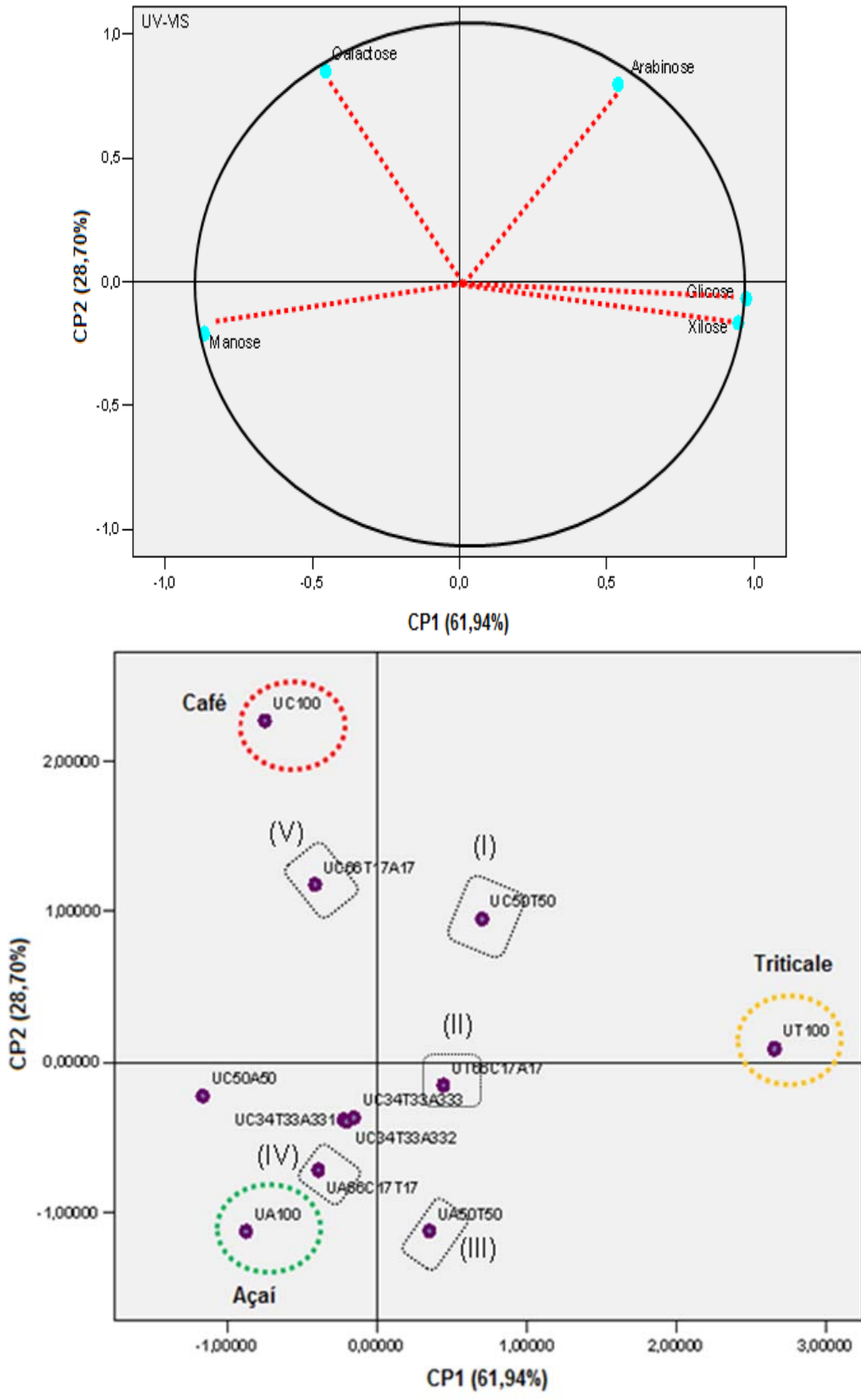
As Figuras 7A e 8A demonstram a correlação dos sistemas HPLC-HPAE-PAD e UV-VIS com reação pós-coluna e onde é possível notar uma grande similaridade entre as distribuições dos carboidratos.

Nas Figuras 7B e 8B pode-se notar a separação das matrizes puras em grupos distintos, bem como a formação de cinco grupos para as matrizes contendo as misturas.

O grupo (I) sofre a influência tanto da galactose que é característico do café bem como da glicose e xilose que são características do triticales. No entanto, este grupo por apresentar misturas binárias de café e triticales, também sofre a influência do carboidrato arabinose.

No grupo (II) existe a predominância da glicose e xilose, sendo comprovado devido ao fato das misturas terciárias apresentarem maior proporção de triticales.

Figura 8 - Projeções das variáveis (A) e das amostras (B) nos Componentes Principais 1 e 2 para o sistema UV-VIS com reação pós-coluna



Já o grupo (III) apresenta influência maior para o adulterante açaí do que para o adulterante triticales, pois tanto em misturas binárias entre os dois adulterantes quanto em misturas, com maior proporção de açaí, a quantidade de manose é mais significativa do que as quantidades de glicose e xilose.

Para o grupo (IV) observa-se que como as misturas terciárias apresentam proporção de açaí muito maior do que dos outros componentes, ocorrendo somente a influência do carboidrato manose, sendo possível afirmar que existe correlação direta com esse adulterante.

E para o grupo (V) vemos que, tanto para misturas binárias entre o café e o adulterante açaí, como para as ternárias com maior proporção de café, existe somente a influência do carboidrato galactose evidenciando a possibilidade de identificação de possíveis fraudes. Diante dos resultados, é possível correlacionar entre si os sistemas avaliados, pois todos os parâmetros seguiram a mesma tendência.

6 CONCLUSÃO

A análise dos carboidratos totais pelos sistemas HPLC-HPAE-PAD e UV-VIS com reação pós-coluna empregando a metodologia ISO 11292 mostraram-se eficientes na determinação do teor de cada um dos monossacarídeos avaliados no café torrado e moído e nos adulterantes estudados, triticales e açai, considerando os constituintes originais das diferentes matrizes.

Á partir de planejamentos experimentais do tipo centróide-simplex de 3 componentes para as misturas de café arábica*triticales*açai, avaliados para os 2 sistemas, foi possível correlacionar o UV-VIS com reação pós-coluna com o HPLC-HPAE-PAD, onde a análise pelas componentes principais permitiu diferenciar os carboidratos para cada uma das matrizes, revelando tendências similares. As superfícies de resposta com seus autovalores permitem prever tanto qualitativamente quanto quantitativamente o comportamento das misturas em toda sua extensão.

A galactose apresentou-se característica da matriz de café arábica. A glicose e a xilose foram os carboidratos que predominaram no triticales. A manose em elevadas concentrações foi característica para a matriz de açai.

A determinação dos carboidratos pelo sistema UV-VIS com reação pós-coluna, embora com teores numericamente diferentes, com menor resolução e ajuste, mesmo sendo menos sensível que sistema o HPLC-HPAE-PAD, é mais rápida e mais de mais fácil operação, podendo ser utilizada na maioria dos laboratórios, que possuem detector UV-VIS. Portanto, mostrou potencialidade para ser utilizada em rotina para triagem de adulterantes no controle de qualidade do café, já que as amostras de matrizes puderam ser agrupadas e correlacionadas com cada carboidrato distinto. No entanto, para quantificação e previsão por modelagem matemática a técnica melhor ainda é a HPLC-HPAE-PAD, a qual exige uma instrumentação mais cara, específica e delicada, exigindo conhecimentos mais aprofundados de eletroquímica e diversos cuidados por parte do analista.

REFERÊNCIAS

ABIC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 07 mar. 2011a.

ABIC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em <http://www.abic.com.br/publique/media/CPQ_Informativo054-marco.pdf>. Acesso em: 03 abr. 2011b.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Especificação e de cores de acordo com o sistema de notação de Munsell. **NBR 12694**. Rio de Janeiro: ANBT, 1992.

AGUIAR, A. T. E.; SALVA, T. J. G.; FAZUOLI, L. C.; FAVARIN, J. L. Variação no teor de lipídeos em grãos de variedades de *coffea canephora*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 12, p. 1251-1254, dez. 2005.

ALVES, S. T.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. T. Metodologia para análise simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em café torrado por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1164-1168, 2006.

ARRUDA, A. M. V.; PEREIRA, E. S.; MIZUBUTI, I. Y.; SILVA, L. D. F. Importância da fibra na nutrição de coelho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 181-190, jan./jun. 2003.

ASSAD, E.D.; CORREA, T.B.S.; CUNHA, S. A. R. Identificação de impurezas e misturas em pó de café por meio de comportamento espectral de imagens digitais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.2, p.211-216, 2002.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 2 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2003. 401 p.

BERNAL, J.L.; DEL ALAMO, M.; DEL NOZAL, M.J. HPLC Analysis of carbohydrates in wines and instant coffees using anion exchange chromatography coupled to pulsed amperometric detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, n.2, p.507-511, 1996.

BLANC, M.B.; DAVIS, G.E., PARCHET, J.M. et al. Chromatographic profile of carbohydrates in commercial soluble coffees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 37, n. 4, p. 926-930, 1989.

BOAVENTURA, Y. M. S. Microsporogênese De Coffea Canephora Pierre Ex Froehner Com Número Duplicado De Cromossomos. **Bragantia**, Campinas, v. 49, n 2, p. 193 – 2004, 1990.

BRADBURY, A.G.W. Chemistry I: Non-Volatile Compounds, 1A - Carbohydrates. In: CLARKE, R. J.; VITZTHUM, O. G. **Coffee Recent Developments**. Ed Blackwell Science, Osney Mead, Oxford: 2001. cap. 1, p 1-17

BRAGANÇA, S. M.; CARVALHO, C. H. S.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G. Variedade clonais de café conilon para o estado do Espírito Santo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 5, p. 765-770, mai. 2001.

BRASIL. Instrução normativa nº 16, de 24 de maio de 2010. Regulamento técnico do café e normas correlatas. Disponível em <http://www.abic.com.br/publique/media/CONS_leg_regulamentotecnicoIN16.pdf> Acesso em: 03 de abr. de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 377 de 26 de abril de 1999. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, n. 80, p. 22-29, abr. 1999. Seção 1.

BRIANDET, R.; KEMSLEY, E. K.; WILSON, R.H. Approaches to adulteration detection in instant coffees using infrared spectroscopy and chemometric. **Journal Science Food Agriculture**, v.71, n.3, p.359-366, 1996.

BRITO, M.S.; OLIVEIRA, C.F.S.; SILVA, T.R.G.; LIMA, R.B.; MORAIS, S.N.; SILVA, J.H.V. Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de monogástricos – Revisão, **Acta Veterinária Brasilica**, Mossoró, v. 2, n. 4, p. 111-117, 2008.

BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. **Química Nova**, São Paulo, v. 8, n. 2, 1985.

BUCKERIDGE, M. S.; TINÉ, M. A. S.; SANTOS, H. P.; LIMA, D. U. Polissacarídeos de reserva da parede celular em semente, estruturas, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Paulo, v. 12, edição especial, p. 137-162, 2000.

CAMPANHA, F. G. **Discriminação de espécies de café (Coffea arabica e Coffea canephora) pela composição de diterpenos**. 2008. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

CAMPBELL, M. **Bioquímica**. 3.ed. Porto Alegre: Editora: Artmed–Bookman, 2000. p. 412.

CARVALHO, L. M.; SILVA, E. A. M.; AZEVEDO, A. A.; MOSQUIM, P. R.; CECON, P. R. Aspectos morfofisiológicos dos cultivares de cafeeiro catuaí-vermelho e conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 411-419, 2001

CASTRO, R. D.; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 175-199, 2006.

CEPLAC – COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA. Café. Disponível em <<http://www.ceplac.gov.br/radar/cafe.htm>>. Acesso em 28 de jan. de 2011.

CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R. Comparison of the Coffea canephora and C. arabica karyotype based on chromosomal DNA content. **Plant Cell Reports**, Berlin, v, 28, p. 73-81, jan. 2009.

CNC – CONSELHO NACIONAL DO CAFÉ. Disponível em <<http://www.cncafe.com.br>>. Acesso em 28 de jan. de 2011.

COFFEE BREAK. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br>>. Acesso em 28 de jan. de 2011.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Café: Safra 2009, Segunda Estimativa. Brasília, 2009. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/2cafe_09.pdf>. Acesso em 26 de jan. de 2011.

COUTINHO, L. F. M. **Desenvolvimento de sistema instrumental para determinação de carboidratos em café solúvel utilizando HPAE-PAD**. Trabalho de Conclusão de Curso, UEL, 2003.

DIAS, R. C. E. **Discriminação de espécies de café (Coffea arabica e Coffea canephora) em diferentes graus de torra**. 2005. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

DIONEX – Food and Beverage. Disponível em <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/61831-Bro_Carbohydrates_Food_Beverage_29Aug2007_LPN1971.pdf>, Acesso em 15 de jan. de 2011b.

DIONEX. Technical Note 20. **Analysis of carbohydrates by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD)**. Disponível na Internet via URL: <<http://www.dionex.com/servletw1/FileDownloader/slot114/77786/TN20releasedJC120600.pdf>>. Acesso em 25 de jan. de 2011a.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa Café. Disponível em <http://www22.sede.embrapa.br/cafe/outros/arq_Relat_Gestao/Hist%F3rico.pdf>. Acesso em 28 de jan. de 2011.

FERNANDES, S. M.; PINTO, N. A. V. D.; THÉ, P. M. P.; PEREIRA, R. G. F. A.; CARVALHO, V. D.; Teores de polifenóis, ácido clorogênico, cafeína e proteína em café torrado. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.7, n 3, p.197 - 1999 set - dez, 2001.

FERREIRA, V. F; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, São Paulo, 2009.

GARCIA, L.M.Z. ; PAULI, E.D.; CRISTIANO, V; CAMARA, C.A.P.; SCARMÍNIO, I.S.; NIXDORF, S. L. Chemometric evaluation of adulteration profile in coffee due to corn and husk by determining carbohydrates using HPAEC-PAD. **Journal of Chromatographic Science**, Niles, v. 47, p. 825-832, Evanston, 2009.

GASPARI-PEZZOPANE, C. **Atributos fenológicos, agronômicos e expressão gênica durante a frutificação do cafeeiro**. 2007. Teste (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11292: Instant Coffee – **Determination of Free and Total Carbohydrate Contents – Method Using High-Performance Anion-Exchange Chromatography.**, 1995.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 3509: **Coffee and its products – vocabulary.**1989.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995, 839p.

MARTINS, A. L. **História do Café.** São Paulo: Contexto, 2008. 320 p.

MEURER, F.; HAYASHI, C. Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de peixes - Revisão. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoológia.**, Umuarama, v. 6, n.6, p. 127-138, jul./dez. 2003.

MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C. Aplicação da cromatografia por exclusão e da cromatografia gasosa de alta resolução na análise do café. **Química Nova**, São Paulo, v.20, n.1, p.5-8, 1997.

NABAIS, J.V.; CARROTT, P.; CARROTT, M. M. L. R.; LUZ, V.; ORTIZ, A. L. Influence of preparation conditions in the textural and chemical properties of activated carbons from a novel biomass precursor: the coffee endocarp. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7224-7231, 2008.

NOBRE, G. W.; BORÉM, F. M.; FERNANDES, S. M.; PEREIRA, R. G. F. A. Alterações químicas do café-cereja descascado durante o armazenamento. **Coffee Science**, Lavras, v. 2, n. 1, p. 1-9, jan./jun. 2007.

OIC – ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ. Disponível em <<http://www.ico.org>>. Acesso em 28 de jan. de 2011.

OOSTERVELD A.; HARMSEN, J. S.; VORAGEN, A. G. J.; SCHOLS, H. A. Extraction and characterization of polysaccharides from green and roasted *Coffea arabica* beans. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 52, p. 285-296, 2003a.

OOSTERVELD, A. VORAGEN, A. G. J. SCHOLS, H. A. Effect of roasting on the carbohydrate composition of *Coffea arabica* beans. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 54, p. 183-192, 2003b.

PAPADASKI, S. E.; MALEK, S. A.; KAMDEM, R. E.; YAM, K. L. A Versatile and inexpensive technique for measuring color of food. **Food Technology Magazine**, v. 54, n. 12, dez, 2000.

PAULI, E. D.; CRISTIANO, V.; NIXDORF, S. L. Método para determinação de carboidratos empregado na triagem de adulterações em café. **Química Nova**. 2011. No prelo (impressa) On-line
<http://quimicanova.s bq.org.br/qn/No%20Prelo/NT/NT10341.pdf>

PIZARRO, C.; ESTEBAN-DÍEZ, I.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M. Mixture resolution according to the percentage of robusta variety in order to detect adulteration in

roasted coffee by near infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 585, p. 266-276, 2007.

PRODOLLIET, J. HISCENHUBER, C. **Food Authentication by Carbohydrate Chromatography**. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung, Berlin, v. 207, p. 1-12, 1998.

REDGWELL, R. J.; TROVATO, V.; CURTI, D. FISCHER, M., Effect of roasting on degradation and structural features of polysaccharides in Arabica coffee beans. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 421-431, 2002.

REDGWELL, R.J.; FISCHER, M.; Coffee carbohydrates. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18 n.1, p.165 - 174, 2006.

REIS, C.; ANDRADE, J. C. Planejamento experimental para misturas usando cromatografia em papel. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 3, 1996.

SANTOS, M.C.S. **Utilização da espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e quimiometria na identificação do café torrado e moído adulterado**. 2005. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVA, R. F. da; ASCHERI, J. L. R.; PEREIRA, R. G. F. A. Composição centesimal e perfil de aminoácidos de arroz e pó de café. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**. Araraquara, v.18, n.3, p. 325-330, jul./set. 2007.

SOUZA, R. M. N. **Caracterização e discriminação de cafés torrados e moídos comerciais pela composição de substâncias bioativas**. 2009. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

STONE, B. A. **Cereal grain carbohydrates**. In:HERRY, R.J.; KETTLEWELL, P. S. Cereal grain quality. 1 ed. London: Ed Chapman & Hall, 1996. cap. 9, p. 251-288.

TAVERNARI, F. C.; CARVALHO, T. A.; ASSIS, A. P.; LIMA, H. J. D. Polissacarídeos não-amiláceo solúvel na dieta de suínos e aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n. 5, p. 673-689, set.-out. 2008.