



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VALDERI CRISTIANO

**VALIDAÇÃO ANALÍTICA E DETERMINAÇÃO DE
OCRATOXINA A EM QUALIDADES DE BEBIDAS DE CAFÉ
CORRELACIONANDO DEFEITOS, CARBOIDRATOS E
MICROBIOTA FÚNGICA**

Londrina
2010

VALDERI CRISTIANO

**VALIDAÇÃO ANALÍTICA E DETERMINAÇÃO DE
OCRATOXINA A EM QUALIDADES DE BEBIDAS DE CAFÉ
CORRELACIONANDO DEFEITOS, CARBOIDRATOS E
MICROBIOTA FÚNGICA**

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

Orientadora: Prof^ª Dra. Suzana Lucy Nixdorf

Londrina
2010

VALDERI CRISTIANO

**VALIDAÇÃO ANALÍTICA E DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM
QUALIDADES DE BEBIDAS DE CAFÉ CORRELACIONANDO
DEFEITOS, CARBOIDRATOS E
MICROBIOTA FÚNGICA**

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Adriana Farah de Miranda Pereira
UFRJ – Rio de Janeiro - RJ

Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka
UEL – Londrina - PR

Londrina, 2 de Fevereiro de 2010.

DEDICATÓRIA

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

Aos meus filhos Ana Julia e Rafael, pela paciência e compreensão pela minha ausência ao longo do trabalho.

A minha querida esposa, Vania, minha companheira, pelo carinho, compreensão, incentivo a superar qualquer dificuldade e por acreditar nos meus sonhos.

A minha mãe, Dona Maria, por ser uma das razões de eu ter galgado toda esta trajetória.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora e amiga Prof^ª. Dra. 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 Prof^ª. Dra. Ilza Lobo pela orientação ajuda e apoio ao longo do mestrado.

A Companhia Cacique de Café Solúvel, nas pessoas do Srs. João da Graça Cruz, Julio Cezar Pereira Grassano e Edenir Gualtieri, pela apoio, pela confiança e acreditar na conclusão deste projeto.

A Prof^ª. Dra. Maria Helena P. Fúngaro por disponibilizar a estrutura do seu laboratório, com reagentes, pessoal e pela atenção dispensada cujos os conhecimentos e discussões foram de grande valia para o desenvolvimento do trabalho.

A Prof^ª Dr^a. Maria Josefa Santos Yabe pela ajuda, apoio e interpretação dos dados por análise multivariada.

A mestranda Elis Daiane Pauli pela sua disponibilidade e ajuda com as análises dos carboidratos.

Ao meu amigo Marcos Vallim pela amizade, pelas constantes trocas de idéias enriquecedoras e principalmente pelo incentivo constante para a conclusão deste projeto.

A minha amiga e irmã Vanessa Simioli pela amizade, pelo incentivo, pelo companheirismo e por converter as idéias em realidades.

Aos meus amigos, Ulisses Colonheze e Silvio Victorino pela ajuda ao longo do trabalho.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, acreditaram e me incentivaram a correr atrás dos meus ideais.

CRISTIANO, Valderi. **Validação analítica e determinação de ocratoxina A em qualidades de bebidas de café correlacionando defeitos, carboidratos e microbiota fúngica**. 2010. 126fls. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

Um dos critérios mais importantes referente à qualidade do café, que determina sua aceitabilidade e valor comercial, consiste no tipo de bebida, avaliada por análise sensorial. O objetivo do presente trabalho foi investigar possíveis correlações entre o parâmetro subjetivo do tipo de bebida com atributos como defeitos, microbiota fúngica, ocratoxina A(OTA) e carboidratos, verificando contribuições para a qualidade. Quinze amostras de café cru de 4 diferentes Estados brasileiros foram avaliadas pela prova de xícara, classificadas em mole, dura, rio/riado e riozona, e quanto aos defeitos. O defeito predominante foi o ardido presente em 100% das amostras, em quantidades elevadas na bebida de pior qualidade, seguido do preto-verde e brocado. Para a caracterização microbiológica os microrganismos apropriados foram analisados geneticamente por RAPD, que proporcionou identificação morfológica de 617 isolados, com representantes pertencentes aos gêneros *Eurotium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e ordem *Mucorales*, além de alguns poucos representantes de leveduras. Dos fungos isolados houve predomínio do gênero *Aspergillus* (439 isolados) que contém espécies produtores de OTA, com 370 isolados pertencentes à secção *Nigri* e 69 à secção *Circumdati*. A determinação de OTA foi feita por método modificado e validado empregando colunas de imunoafinidade baseado HPLC-FL. O método mostrou-se linear ($r = 0,9993$) para a faixa dinâmica de trabalho de 1,00 a 33,52 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com repetitividade (CV = 1,36%), precisão intermediária (CV < 5,0%), exatidão por fortificação com recuperação de 89,5 a 105,1%, reprodutibilidade em ensaios de proficiência intra e interlaboratorial (FAPAS-z-score < 2,0); com limite de detecção (LD) de 0,227 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e limite de quantificação (LQ) de 0,783 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O teor de OTA ficou abaixo do LD para 4 amostras, todas de bebida de boa qualidade. Amostras de pior qualidade de bebida rio/riado e riozona apresentaram teores variando de 0,38 a 12,49 $\mu\text{g kg}^{-1}$, tendo sido maior que o limite permitido pela União Européia (5,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) em 3 amostras. Os carboidratos analisados empregando HPAEC-PAD, mostraram para o café verde níveis mais altos de galactose (6,65 % m/m), manose (4,58%) e arabinose (3,43%). A glicose (3,65%) e a frutose (2,60%) foram os que apresentaram maiores reduções da bebida mole para a riozona em cerca de 27%. As relações entre as variáveis individuais concordaram com a Análise de Componentes Principais e a análise multivariada, permitindo avaliar a influência e estabelecer correlações entre as qualidades de bebida. O estudo mostrou que a bebida do café está inversamente correlacionada com os defeitos, especialmente o ardido, com os fungos da secção *Nigri* e diretamente correlacionada com glicose e frutose. A OTA está diretamente correlacionada com a presença do defeito preto e com os fungos da secção *Nigri*. Os carboidratos estão diretamente correlacionados com a bebida e inversamente com os defeitos preto e ardido.

Palavras-chaves: Café. Ocratoxina A. HPLC-FL. Validação. Carboidratos. Microbiota.

CRISTIANO, Valderi. **Quality evaluation of different types of Brazilian coffee beans taste and its correlation with defects, ochratoxin A, caffeine and carbohydrates.** 2010. 126fls. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

One of the most important criteria referring to coffee quality, that determines its acceptability and commercial value, consists on the cup quality, evaluated through sensory analysis. The objective of this work was to investigate possible correlations between subjective parameter of cup quality with attributes like defects, fungal microbiota, ochratoxin A (OTA) and carbohydrates, verifying its contributions to the quality. Fifteen samples of raw coffee from 4 different Brazilian States were evaluated by cupping section, classified into soft, hard, rioysh and 'riozona', and as for defects. The predominant defect was the sour one present in 100% of the samples, in higher quantities of poor cup quality, followed by black-green and insect damaged. To the microbiological characterization proper microorganisms were genetically analyzed through RAPD, that provided morphological identification of 617 isolated ones, with representatives belonging to *Eurotium*, *Cladosporium*, *Fusarium* and *Penicillium* gender and *Mucolares* order, besides a few representatives from yeast group. From isolated fungi there was predominance of *Aspergillums* gender (439 isolated ones) which includes ochratoxin A producers' species, with 370 isolated ones belonging to *Nigri* section and 69 to *Circumdati* section. OTA determination has been done by modified and validated method using columns of immunoaffinity based on HPLC-Fluorescence. This method has shown itself linear ($r = 0.9993$) to dynamic working range of 1.00 to 33.52 ug kg^{-1} , with repeatability ($CV = 1.36\%$), intermediate precision ($CV < 5.0\%$) accuracy by fortification with recovery of 89.5 to 105.1% , reproducibility in proficiency assays intra and inter-lab test (FAPAS-z-score < 2.0); with detection limit (LOD) of 0.227 ug kg^{-1} and quantification limit (LOQ) of 0.783 ug kg^{-1} . The level of OTA was below of the LOD to 4 samples, all of them of good cup quality. Samples of poor cup quality rioysh and 'riozona' presented levels that vary from 0.38 to 12.49 ug kg^{-1} , being higher than the limit allowed by European Union (5.0 ug kg^{-1}) in 3 samples. Carbohydrates analyzed using HPAEC-PAD, showed higher levels of galactose (6.65% w/w), mannose (4.58%) and arabinose (3.43%) to green coffee. Glucose (3.65%) and fructose (2.60%) were those that presented more reductions of the soft beverage to 'riozona' around 27% . Relations among individual variables accord to Principal Component Analysis and multivariate analysis, enabling to evaluate influence and establish correlations of cup's qualities. This work showed that coffee cup quality is inversely correlated with defects, especially the sour one, with fungi from *Nigri* section straightly correlated to glucose and fructose. OTA is straightly correlated to presence of the black defect and with *Nigri* section fungi. Carbohydrates are straightly correlated to the cup quality and inversely correlated to black and sour defects.

Key-words: Coffee. Ochratoxin A. HPLC. Validation. Carbohydrates. Microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Defeitos intrínseco e extrínsecos dos grãos de café	22
Figura 2 - Símbolos de qualidade das bebidas de café	27
Figura 3 - Estrutura de um galactomanano.....	30
Figura 4 - Estrutura de um arabinogalactano.....	30
Figura 5 - Estrutura molecular da Ocratoxina (L-fenilalanina N-[5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1 -oxo-1 H ² -benzopiran-7-ila] carbonila-(H)-isocumarina	33
Figura 6 - Análise sensorial do café empregando a prova de xícara	47
Figura 7 - Teste de seletividade - Sobreposição de cromatogramas de 4 mostras de café cru não contaminadas - "branco", destacando ausência de interferentes co-eluido no tempo de retenção da OTA (3,850 minutos	55
Figura 8 - Cromatograma do solvente - solução de metanol:ácido acético (98:2 v/v) (padrão 1 - Tabela 6) utilizando sistema HPLC-FL: fase móvel: ACN: MeOH: H ₂ O:HAc (33:33:33:1) v/v/v/v à 1,0 mL min ⁻¹ ; vol. inj.: 100,0 [^] L; coluna: Nova-Pak C-18 (T ^o C ambiente); detector FL com X Ex = 333 nm e X Em = 443 nm	56
Figura 9 - Cromatogramas dos padrões de OTA.....	57
Figura 10 - Curva de calibração de OTA gerada pelo sistema HPLC-FL, mostrando a faixa linear de trabalho com seus limites de confiança determinados pelos cálculos de incerteza.....	58
Figura 11 - Teste de robustez - Estabilidade do padrão de OTA seco (Sigma-Aldrich O-1877) diluído em solução de bezeno:ácido acético (99:1 v/v)ao longo de anos	63
Figura 12 - Quantidade de defeitos nas 15 amostras de café cru avaliadas. P:preto; A:ardido; VP:verde-preto; V:verde; M:marinheiro; Co:coco; Cas:casca; Cho:chochos ou mal granados; B:brocado; Q: quebrado; Con:conchas; Paus; Pe:pedras; To:torrões. F:fundo; I:impurezas	70

Figura 13 - Fungos filamentosos plaqueamento crescidos após incubação das amostras de café cru de bebida mole (amostra A); dura (amostra B); rio/riado(amostra C) e riozona (amostra D).....	72
Figura 14 - Imagens do grão de café por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	74
Figura 15 - Amplificação de DNA polimórfico de isolados de <i>A.westerdijkiae</i> (Linhas 1 - 21) e isolados de <i>A.ochraceus</i> (Linha 22). As amplificações foram feitas com auxílio do <i>primer</i> OPX-7. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular - Ladder DNA 1 Kb plus (Invitrogen).....	79
Figura 16 - Amplificação de DNA polimórfico de isolados de <i>A. niger/lacticofeatus</i> (Linhas 1 - 38), isolados de <i>A.tubingensis</i> (Linhas 39 - 42) e isolado pertencente ao Agregado niger (Linha 43). As amplificações foram feitas com auxílio do <i>primer</i> OPX-7. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular - Ladder DNA 1 Kb plus (Invitrogen).....	79
Figura 17 - Árvore filogenética de isolados de <i>Aspergillus</i> baseada nas sequências de nucleotídeos de parte do gene da (3-tubulina. Os números situados nas ramificações correspondem aos valores de bootstrap (%) gerados pelo programa CLUSTAL X 1.6.....	80
Figura 18 - Cromatogramas de carboidratos utilizando o método HPAEC-PAD obtidos para café arábica verde de distintas bebidas sobrepostos: (A) riozona, (B) rio/riado, (C) dura, (D) mole, (E) padrão. Picos: (1) Manitol, (2) Arabinose, (3) Galactose, (4) Glicose, (5) Xilose, (6) Manose e (7) Frutose. Fase móvel - isocrático: NaOH 1,4 mmolL ⁻¹	86
Figura 19 - Componentes principais (PC) 1 e 2 do conjunto de dados, onde os símbolos em vermelho representam os <i>scores</i> (amostras 01 a 15) e em azul os <i>loadings</i> com as projeções das variáveis. Os círculos em vermelho representam as separações entre os grupos de I a IV por similaridade de amostras (Dendrogramas,	

Figs. 27 e 28), enquanto as letras em azul representam a separação entre as variáveis. Tipos de bebidas para as amostras: mole (amostras 1,14,5); dura (2, 6, 7,8, 15); rio/riado (3, 10,11,12) e riozona (4,9,12). Bbd = bebida; Pto = preto; Ard=ardido; Brc = brocado; TD = total de defeitos; C50 = % de grãos contaminados em 50; Cdt = *Circundati*; Ert = *Eurotium*; Ngr = *Nigri*; TM = total de microrganismos; OCR = ocratoxina A; Gli = glicose; Fru = frutose; Caf = cafeína93

Figura 20 - Dendrograma de similaridade entre as amostras94

Figura 21 - Dendrograma de similaridade entre as variáveis.....94

Figura 22 - Componentes principais 1 e 3 do conjunto de dados, onde os símbolos em vermelho referem aos *scores* (amostras 01 a 15) e em azul aos *loadings* as projeções das variáveis. Bbd = bebida; Pto = preto; Ard=ardido; Brc = brocado; TD = total de defeitos; C50 = % de grãos contaminados em 50; Cdt = *Circundati*; Ert = *Eurotium*; Ngr = *Nigri*; TM = total de microrganismos; OCR = ocratoxina A; Gli = glicose; Fru = frutose; Caf = cafeína.....96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação Oficial Brasileira de defeitos	24
Tabela 2 - Classificação oficial do café brasileiro de acordo com suas características de bebida.....	26
Tabela 3 - Composição de carboidratos em grãos de café Arábica verde e torrado (% m/m).....	29
Tabela 4 - Teores máximos de OTA estabelecidos pela União Européia para diferentes gêneros alimentícios	36
Tabela 5 - Parâmetros de validação utilizados pelo INMETRO e ANVISA.....	43
Tabela 6 - Planejamento para o levantamento da curva de calibração de OTA.....	56
Tabela 7 - Resultados obtidos na análise dos padrões preparados para a obtenção da curva analítica de calibração empregados nos cálculos da precisão (repetitividade)	57
Tabela 8 - Resultados obtidos no estudo de recuperação das amostras de café cru.....	60
Tabela 9 - Resultados do desempenho dos analistas em teste de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial	62
Tabela 10 - Resultado do desempenho da participação do Laboratório em ensaios de OTA em testes interlaboratoriais de proficiência FAPAS e RMMG.....	62
Tabela 11 - Características das 15 amostras de café cru de diferentes estados brasileiros, quanto ao tipo de bebida, defeitos, porcentagem de fundo/ impurezas e teor de umidade.....	68
Tabela 12 - Controle de contaminação microbiológico com quantidade de grãos contaminados e tipos de fungos encontrados nas amostras de café cru de diferentes regiões incubadas em função do tipo da bebida.....	72
Tabela 13 - Identificação molecular de fungos isolados de grãos de café representantes de 15 regiões distintas.....	77

Tabela 14 - Teores de OTA para as 15 amostras de café verde de distintas bebidas e procedência.....	82
Tabela 15 - Grau de contaminação por OTA em função do tipo da bebidas das 15 amostras de café	84
Tabela 16 - Teores de carboidratos totais determinados nas 15 amostras de café cru	87
Tabela 17 - Teores médios para os carboidratos das bebidas mole, dura, rio/riado e riozona	88
Tabela 18 - Tabela geral de resultados sensoriais, físico-químicos, microbiológicos e químicos para as 15 amostras de café verde	90
Tabela 19 - Variância total explicada para o conjunto de dados. São consideradas as componentes principais com autovalores maiores que 1,0	91
Tabela 20 - Matriz de correlação entre as variáveis	97

LISTA DE ABREVIATURAS

, <i>a</i>	Ordenada na origem da recta de calibração
ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café
ACP	Análise de Componentes Principais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Analytical Communities
<i>aw</i>	Atividade de água
<i>b</i>	Inclinação da curva de calibração
cal. <i>y</i>	Valores das áreas de OTA calculadas
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CEN	Comité Européen de Normalisation
CG-FID	Cromatografia Gasosa - Flame Ionization Detection
CG-MS	Cromatografia Gasosa - Mass Spectrometry
Cia Cacique	Companhia Cacique de Café Solúvel
CLAE (HPLC-FL)	Cromatografia Líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência.
CNC	Conselho Nacional do Café
CNP&D	Consortio Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento
CP	Componente Principal
CSL	Central Science Laboratory
CV	Coeficiente de variação
DNA	DesoxirriboNucleic Acid
ES	Espírito Santo
FAO	Food and Agriculture Organization
FAPAS	Food Analysis Performance Assessment Scheme
FL	Fluorescência
GPES	General Purpose Electrochemical System
IARC	International Agency for Research on Cancer
<i>ICa</i>	Intervalo de confiança para a ordenada na origem da curva de calibração
<i>ICb</i>	Intervalo de confiança para a inclinação da curva de calibração
ICH	International Conference on Harmonisation
<i>imaxy</i>	Valor máximo dos valores das áreas de OTA obtidos experimentalmente
<i>iminy</i>	Valor mínimo dos valores das áreas de OTA obtidos experimentalmente

INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IR	Índice de Reflexão
i_x	Concentração do padrão i
i_y	Valores das áreas de OTA obtidos experimentalmente
i_{um}	Erro associado à medição de um determinado parâmetro
HPAEC	High Performance Anion Exchange Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
max a	Valor máximo da ordenada na origem da curva de calibração
max b	Valor máximo do declive da curva de calibração
MEA	Agar Extrato de Malte
MeOH	Metanol
MG	Minas Gerais
min a	Valor mínimo da ordenada na origem da curva de calibração
min b	Valor mínimo do declive da curva de calibração
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
n.d.	Não detectado
NMQ	Nível Mínimo de Qualidade
OIC	Organização Internacional do Café
OMS	Organização Mundial da Saúde
OsO ₄	Óxido de ósmio
OTA	Ocratoxina A
OTB	Ocratoxina B
OTC	Ocratoxina C
OT β	Ocratoxina β
p	Nível de significância
PAD	Pulsed Amperometric Detector
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	Potencial hidrogeniônico
PQC	Programa de Qualidade de Café
PR	Paraná
RAPD	Análise do Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
RMMG	Rede Metrológica de Minas Gerais
Sa	Desvio padrão associado à ordenada na origem da curva de calibração
	Desvio padrão associado à inclinação da curva de calibração
SP	São Paulo

y / xs	Desvio padrão residual
UE	União Européia
U1	Incerteza na preparação dos padrões de ocratoxina A
U2	Incerteza associada à curva de calibração
U3	Incerteza associada à precisão
U4	Incerteza associada à exatidão
WHO	World Health Organization
x	Média dos valores de concentração dos padrões
y	Média dos valores das áreas obtidas experimentalmente
YES	Yeast extract sucrose
€	Emissividade
A	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 QUALIDADE DO CAFÉ	19
2.1.1 Classificação: Tipo, Características e Defeitos	21
2.1.2 Classificação Sensorial: Prova de Xícara	24
2.1.3 Composição Química – Carboidratos	27
2.2 MICROBIOTA E METABÓLITOS DO TIPO MLCOTOXINAS	32
2.3 VALIDAÇÃO	40
3 OBJETIVOS	44
3.1 OBJETIVO GERAL	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 AMOSTRAGEM	46
4.2 ANÁLISE SENSORIAL - PROVA DE XÍCARA	46
4.3 CLASSIFICAÇÃO POR TIPO E DEFEITOS	48
4.4 METODOLOGIA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	48
4.5 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA	50
4.5.1 Obtenção de Micélio, Extração e Quantificação de DNA Genômico	50
4.5.2 Análise do Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD)	51
4.5.3 Amplificação Parcial do Gene da β -tubulina	51
4.5.4 Sequenciamento do Produto de PCR da Região Parcial do Gene da β - tubulina	51
4.5.5 Análise das Sequências de Nucleotídeos	52
4.6 ANÁLISE DE OCRATOXINA A, CARBOIDRATOS E CAFEÍNA	52
4.6.1 Metodologia para Determinação de OTA	52
4.6.1.1 Validação da metodologia para OTA	54

4.6.2 Metodologia para Determinação dos Carboidratos Totais.....	64
4.6.3 Metodologia para Determinação de Cafeína.....	66
4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	67
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1 CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL E FÍSICO-QUÍMICA.....	68
5.2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA	71
5.3 DETERMINAÇÃO DA OTA POR HPLC- FL EM CAFÉ VERDE	81
5.4 DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS POR HPAEC-PAD.....	85
CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS.....	101
ANEXO	115
ANEXO A – Incerteza Global do Método	116

1 INTRODUÇÃO

A qualidade do café brasileiro tem melhorado substancialmente desde que a ABIC (Associação Brasileira das Indústrias de Café) adotou o Programa de Qualidade do Café (PQC) baseado em critérios de qualidade mínima para a bebida, avaliados por meio da análise sensorial, que define a categoria a que pertencem. O nível de qualidade pode ser verificado nas embalagens do café torrado e moído pelo símbolo de qualidade, classificados em Tradicional, Superior e Gourmet. Contudo, esta qualidade final do produto está diretamente correlacionada à matéria-prima, iniciando-se com a qualidade dos grãos de café cru empregados, que são avaliados convencionalmente pela classificação dos defeitos e pela análise sensorial do tipo de bebida em mole, dura, rio/riado e riozona. Embora, o emprego destas análises seja decisivo por representar os anseios do consumidor, o mercado está carente de técnicas e metodologias mais precisas e menos subjetivas, que dependam menos da percepção de poucos analistas treinados, que associadas a estas, venham dar um maior suporte ao controle de qualidade.

Considerando outro aspecto da qualidade, o fato das micotoxinas, como a ocratoxina A (OTA) que pode aparecer no café, serem prejudiciais ao ser humano mesmo em concentrações muito baixas na ordem de nanogramas, também justifica a necessidade de se ter uma metodologia mais sensível, capaz de determiná-la em nível traços de forma precisa e confiável, o que demanda um grau de exigência maior, com equipamentos mais sofisticados e mão de obra apta e criteriosa. Uma metodologia modificada foi validada neste trabalho para assegurar os resultados de OTA. O estudo genético também contribui grandemente neste quesito, já que permite conhecer quais das espécies de fungos presentes são potencialmente produtoras de OTA. Estes conhecimentos permitem relacionar sua produção a fatores geradores e capacitam a exercer um maior controle, a fim de assegurar que os alimentos estejam livres de contaminação, ou ao menos que contenham teores consideráveis aceitáveis, no aspecto de segurança alimentar. Embora a OTA já tenha limites bem estabelecidos na Comunidade Européia, exigidos como pré-requisito para exportação, porém, no Brasil

só agora está sendo objeto de regulamentação por parte da ANVISA, em consulta pública nº 100 lançada em 21 de dezembro de 2009. Observa-se que os contínuos esforços de pesquisadores do Ministério da Agricultura e Instituto de Tecnologia de Alimentos na conscientização do manejo do café no campo, têm contribuído para abaixar os teores ao longo dos anos.

Neste sentido uma das finalidades deste trabalho foi associar o parâmetro subjetivo do tipo de bebida á técnicas químicas e microbiológicas mais avançadas. Para isto, foram feitas no conjunto de amostras, provas de xícara e análises de classificação de defeitos; determinações de carboidratos e ocratoxina A (OTA) empregando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC); e isolados microrganismos, avaliados por biologia molecular. A técnica de análise multivariável foi empregada visando procurar correlacionar todos os parâmetros citados, por permitir avaliar a contribuição individual destas variáveis ao todo de forma simultânea.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 QUALIDADE DO CAFÉ

O café é a 2^ª bebida mais popular depois da água e o 2^º maior gerador de riquezas do mundo, sendo superado apenas pelo petróleo. O Brasil está consolidado como o maior produtor e exportador mundial do grão. O consumo mundial no ano de 2008 foi estimado em 130 milhões de sacas, representando um aumento de 2,3% em relação a 2007. Nos países exportadores o consumo interno aumentou 4,8%; esse consumo responde por 27,8% da demanda mundial. O consumo brasileiro de café vem crescendo continuamente e estima-se que o país consumirá 21 milhões de sacas em 2010, podendo tornar-se o maior consumidor mundial, posto ocupado atualmente pelos Estados Unidos (ABIC, 2009).

O crescimento do consumo interno pode ser atribuído à melhoria da qualidade do café em termos de produtividade, dentro de princípios de preservação ambiental, assegurando a qualidade total certificada, à diversidade de variedades de café desenvolvidas pelos Institutos de Pesquisa, e ainda, devido à crescente disseminação de informações sobre os seus benefícios a saúde, confirmados pela pesquisa realizada pela InterScience (ABIC, 2009; CNC, 2009, OIC, 2009).

Consumido diariamente por milhões de pessoas, o café é uma das bebidas mais aceitas e apreciadas em diversos países no mundo por sabor e aroma distintos, e por potenciais efeitos benéficos à saúde humana (TRUGO, 2003). De acordo com pesquisa, 9 em cada 10 brasileiros com idade acima de 15 anos consomem diariamente café, fazendo desta a 2^ª bebida com maior penetração na população, atrás apenas da água e a frente dos refrigerantes e do leite. Já no cenário internacional, o Brasil tem papel de destaque, por ser o maior exportador desse grão no mundo (ABIC, 2009).

As diferentes espécies e variedades de café produzidas, associadas à diversidade na ocupação geográfica das plantações do produto brasileiro e nos

processos empregados, possibilitam à indústria nacional a elaboração de um grande número de misturas de grãos (*blends*) para atender aos consumidores (EMBRAPA, 2009). Dentre às 100 espécies conhecidas do gênero *Coffea*, somente 10 são cultivadas em todo o mundo. Duas delas são consideradas as mais importantes por corresponderem a 90% da produção mundial: *Coffea arabica* (arábica) e o *Coffea canephora* (robusta - conilon), que diferem consideravelmente no preço, qualidade e aceitabilidade (CARVALHO et al., 2001; CEPLAC, 2009; CONAB, 2009).

o café arábica é mais valioso por oferecer sabor mais apurado, seus frutos são verde claro e ovais e amadurecem de 7 a 9 meses. É fácil distinguir entre grãos crus de café arábica e robusta, pelas diferenças de tamanho e cor. Porém, após torra e moagem, estas deixam de existir e, como pertencem ao mesmo gênero, há poucas diferenças físico-químicas para permitir a detecção e/ou quantificação da adição de café conilon, de menor valor comercial, ao arábica (ALVES et al., 2006, SOUZA, 2009).

A demanda por cafés diferenciados intensificou-se a partir da década de 90, criando novas oportunidades e estimulando a relação entre o cafeicultor e o cliente (CAIXETA, 1998). A fim de se obter cafés de qualidade superior, os cuidados com a colheita e o manejo pós-colheita tornaram-se fundamentais na comercialização, cuja qualidade está diretamente relacionada com suas características sensoriais. A baixa qualidade do produto pode ser atribuída à espécie e à variedades menos nobres, a técnicas inadequadas de colheita e/ou de processamento ou, ainda, a adição de substâncias que não fazem parte de sua composição natural (MOREIRA; TRUGO; DE MARIA, 1997).

Devido a essa grande importância econômica do café, há uma constante busca por métodos que detectem fraudes, consideradas misturas intencionais ou não, de materiais estranhos ao produto, normalmente de baixo custo, que alteram a qualidade e causam danos ao consumidor, especialmente, os de ordem financeira (ASSAD et al., 2002). Neste quesito a análise de carboidratos totais presentes no café, apresenta-se como um importante indicador de qualidade do produto (PAULI, 2007; GARCIA et al.; 2009; NAKAMURA, 2009). Portanto, fica evidenciado que a qualidade do produto final depende totalmente da matéria-prima empregada, sendo de

fundamental importância conhecer seus atributos sensoriais, físicos e químicos, especialmente àqueles que tem implicações diretas, como os carboidratos.

2.1.1 Classificação: Tipo, Características e Defeitos

A valorização da qualidade do café é uma antiga preocupação, levando os setores ligados à atividade cafeeira no Brasil a elaborar normas de classificação do café em 1917 (CHAGAS; COSTA, 1996). Atualmente a classificação do café cru segue a normativa nº 8 de 11/06/2003 do Ministério da Agricultura e Abastecimento (BRASIL, 2003), que tem como base a Classificação Oficial Brasileira - Dec. LEI nº 27.173 de 14/9/49) que é determinada através de características e do tipo, baseada nos defeitos e pela qualidade de bebida. Com relação ao tamanho dos grãos, que é uma das qualificações apreciadas no Decreto nº 27.173, estes são qualificados segundo as dimensões dos crivos das peneiras oficiais que os retenham. Sob o ponto de vista técnico, é de suma importância a separação por peneiras, pois permite a seleção e a diferenciação dos grãos por tamanho, o que possibilita uma torração mais uniforme.

No Brasil, as primeiras pesquisas a respeito da qualidade do café enfocaram a origem dos defeitos ou grãos imperfeitos, como os grãos pretos e ardidos. Em 1956, Bittancourt (apud SILVA et al., 2004), observou que a ocorrência de processos fermentativos durante o processamento dos grãos resultaria na formação dos ácidos acético e láctico, induzindo à formação de grãos pretos, a deterioração da qualidade e a produção de bebida rí.

A classificação das amostras de café cru beneficiado obedece à Tabela Oficial Brasileira para Classificação, que considera como defeitos os grãos imperfeitos (chamados defeitos intrínsecos) - grãos pretos, ardidos, verdes, chochos, mal granados, quebrados e brocados - e as impurezas (defeitos extrínsecos) - tais como cascas, paus, pedras, cafés em coco ou marinheiros encontrados na amostra, os quais podem ser observados nas Figuras 1-(a) a 1-(h).



Figura 1 – Defeitos intrínsecos e extrínsecos dos grãos de café.

A cada um desses grãos imperfeitos ou impurezas corresponde uma medida de equivalência de defeitos, que rege a classificação por tipo. A base para se estabelecer a equivalência dos defeitos é o grão preto, que é considerado o padrão dos defeitos ou defeito capital devido ao alto comprometimento da bebida. Como se pode ver no Tabela 1, em geral são necessários vários grãos imperfeitos para se obter 1 defeito, enquanto o grão preto, por si só, corresponde a 1 defeito (BANDEIRA et al.; 2008; MORAIS et al.; 2007).

O defeito preto é caracterizado pela cor preto-opaco do grão. Trata-se de um defeito bastante visível e facilmente reconhecido. É originado da deterioração dos grãos que permanecem por um longo tempo em contato com o solo ou na planta, possibilitando a ocorrência de fermentações e infecções microbianas. O grão ardido é de cor parda ou marrom do grão e possuem sabor azedo, e assim como os grãos pretos, podem ser provenientes de frutos caídos no chão ou seco na própria planta. O verde tem como característica a cor verde-cana da película prateada. As paredes da célula e a estrutura interna não estão totalmente desenvolvidas e são provenientes de cafés colhidos antes do completo amadurecimento (ILLY; VIANE 2005 apud GONÇALVES, 2006).

Tabela 1 - Classificação Oficial Brasileira de defeitos.

EQUIVALÊNCIA DE GRÃOS IMPERFEITOS E IMPUREZAS	
GRÃOS IMPERFEITOS E IMPUREZAS	DEFEITOS
1 grão preto	1
1 pedra, pau ou torrão grande	5
1 pedra, pau ou torrão regular	2
1 pedra, pau ou torrão pequeno	1
1 coco	1
1 casca grande	1
2 ardidos	1
2 marinheiros	1
2 a 3 cascas pequenas	1
2 a 5 brocados	1
3 conchas	1
5 verdes	1
5 quebrados	1

Fonte: COB - Classificação Oficial Brasileira - Dec. LEI nº 27.173 de 14/9/49

Depois da classificação física em tamanho, tipo e defeitos, a etapa seguinte consiste em efetuar a avaliação sensorial da matéria-prima, classificando o tipo da bebida do café, por meio da prova de xícara.

2.1.2 Classificação Sensorial: Prova de Xícara

A determinação da classificação da bebida, conhecida como prova de xícara, analisa o café em função de suas características sensoriais, como aspecto, textura, sabor e aroma. A prova de xícara permite o estudo das propriedades sensoriais do café usando o ser humano como instrumento de medida. Conseqüentemente, esta

análise requer a confiabilidade dos resultados dados por pessoas treinadas, chamados provadores, que executam as análises dos produtos (LATREILLE et al., 2006).

Os aspectos sensoriais da bebida, conhecida pelo sabor e aroma forte característico, são influenciados pela safra, espécie, tratos agrícolas (colheita, local de cultivo, umidade), processos de secagem, fermentação, torra, moagem e acondicionamento (FERNANDES et al., 2003; RUBAYIZA; MEURENS, 2005). A prova de xícara é determinante para a classificação do tipo de bebida do café, por, em última instância, refletir a preferência dos consumidores e determinar a escolha e a compra de uma marca. A metodologia de avaliação da qualidade de cafés pelos compradores e vendedores no Brasil é feita por meio da prova de cheiro e sabor que consiste em verter 150 mL de água em ebulição sob 10 gramas de grãos de café de torra clara moídos (LINGLE, 1993). A classificação é feita por provadores treinados, e as denominações do tipo de bebida, da melhor para pior, são: estritamente mole, mole, levemente mole, dura, riado, rio e riozona. Os cafés de mais baixa qualidade (riado, rio e riozona) estão associados a bebida rio, normalmente descrita como adstringente, apresentando gosto de remédio, fenólico ou iodo, lembrando mofo (LINGLE, 1993).

A validade dos resultados na análise sensorial baseia-se na sensibilidade e capacidade dos provadores de reproduzirem seus julgamentos sobre os produtos em estudo (CASTURA et al., 2005; FERREIRA; OLIVEIRA, 2007).

No Brasil, os cafés são oficialmente classificados em sete categorias: estritamente mole, mole, levemente mole, duro, riado, rio e riozona, Tabela 3 (BARTHOLO; GUIMARÃES, 1997 apud FARAH 2006).

Tabela 2 - Classificação oficial do café brasileiro de acordo com suas características de bebida.

Bebida	Característica
Estritamente mole	sabor muito suave; ligeiramente adocicado; baixa acidez
Mole	sabor suave; ligeiramente adocicado
Levemente mole	sabor suave, mas com leve adstringência
Dura	sabor adstringente, gosto áspero; ausência de adocicado
Riado	gosto leve de iodofórmio ou ácido fenólico
Rio	gosto desagradável forte, lembrando iodofórmio ou ácido fenólico
Riozona	gosto e cheiro intoleráveis

Fonte: (BARTHOLO; GUIMARÃES, 1997 apud FARAH 2006).

Através do PQC (Programa de Qualidade do Café) a ABIC (Associação Brasileira das Indústrias de Café) estabeleceu junto aos organismos federais, estaduais e municipais, bem como, empresas do setor privado, a adoção de critérios de qualidade mínima para a bebida do café. Para tanto, os organismos podem adotar o NMQ (nível mínimo de qualidade) igual ou maior a 4,5 pontos, para referir-se às categorias de qualidade superiores. A avaliação de todas as características sensoriais do produto é determinada por meio de análise sensorial, que define a qual categoria ele pertence (Figura 2). Os cafés tradicionais, que sugerem a adição de até 30% de conilon ao arábica (SOUZA, 2009), devem passar na avaliação com nota igual ou superior a 4,5 (numa escala de 0,0 a 10,0). Os produtos que passam a receber o Símbolo de Qualidade Superior são aqueles que obtiveram nota igual ou superior a 6,0 pontos e inferior a 7,3. Já o Símbolo de Qualidade Gourmet, que destaca a linha Top dos melhores cafés, compostos por produtos 100% arábica, será conferido aos produtos que consigam nota igual ou superior a 7,3 até 10,0 pontos (ABIC, 2009), mostrados na Figura 2.



Figura 2 – Símbolos de Qualidade das bebidas de café segundo o Programa de Qualidade do Café da ABIC.

Embora, por anos, a qualidade da bebida tenha sido adotada, em última análise, como o critério final para aprovação do produto, com o advento de técnicas mais sensíveis, como o HPLC com fluorescência e/ou espectrometria de massas; e aprimoradas, como as de caracterização genotípica, do tipo PCR em tempo real e seqüenciadores de DNA, os estudos da microbiota e a determinação de seus metabólitos ganharam destaque e passaram até mesmo a serem exigidas como pré-requisito, a exemplo das micotoxinas, constituindo-se inclusive em barreiras comerciais restritivas, mesmo em baixíssimas concentrações, devido aos impactos significativos por elas causados à qualidade de vida do ser humano.

2.1.3 Composição Química - Carboidratos

A química do aroma desenvolvido durante o processo de torra do café é altamente complexa e ainda não foi completamente entendida. Embora o processo de

torrefação pareça ser simples em termos de condições de processamento é bastante complexo do ponto de vista químico, uma vez que acontecem centenas de reações químicas simultaneamente. Exemplos incluem reações de Maillard, com degradação de proteínas, polissacarídeos, trigonelina e ácidos clorogênicos (DE MARIA et al., 1996). Açúcares, particularmente a sacarose como o mais abundante, agirão como precursores de aroma, originando várias substâncias (furanos, aldeídos, ácidos carboxílicos, etc.), os quais afetam o sabor e o aroma da bebida. A trigonelina é um derivado de piridina, conhecido por contribuir indiretamente com a formação de aromas desejáveis durante a torra (KY et al., 2001). A cafeína, um derivado de xantina, apresenta como característica gosto amargo, importante para o sabor do café (TRUGO; MACRAE, 1984). Esta combinação também foi assunto de várias pesquisas devido a seus efeitos farmacológicos (AZAM, 2003; BARONE; ROBERTS, 1996). Os ácidos clorogênicos (CGA), um grupo de compostos fenólicos representa de 6-12% da composição do café em massa (FARAH et al., 2006), são conhecidos por serem responsáveis pela pigmentação de café, formação de aroma e adstringência (DE MARIA et al., 1995; TRUGO; MACRAE, 1984). Além disso, a degradação térmica destes ácidos durante a torra resultará em substâncias fenólicas que contribuem para o sabor amargo. Os subgrupos dos principais CGA em café são os ácidos de cafeoilquínico (CQA), ferúlico (FQA) e dicafeoilquínico (diCQA). Suas combinações receberam muita atenção devido a várias atividades farmacológicas observadas *in vitro* e *in vivo* (FARAH et al., 2005; FARAH et al., 2006).

Embora, mais de oitocentos compostos voláteis e não-voláteis já tenham sido identificados no café, a questão de quais os constituintes que mais contribuem para baixa qualidade da bebida é controversa e está longe de ser respondida completamente, especialmente com respeito ao sabor da bebida rio (FARAH et al., 2006). De acordo com Spadone, Takeoka e Liardon (1990), foram identificados o 2,4,6-tricloroanisol e 2,4,6-triclorofenol, como dois dos componentes responsáveis pela bebida rio. Amorim et al., (1977) não observaram uma correlação entre a qualidade da bebida e os níveis de poliaminas. Oliveira et. al., (2005) encontraram níveis mais altos de amins em amostras de café de qualidade mais baixa, comparativamente aos de boa qualidade. Mazzafera (1999) e França et al., (2005)

associaram a alta acidez à baixa qualidade de bebida, possivelmente devido à presença de grãos de café defeituosos, especificamente os que sofreram fermentação. Carvalho et al., (1994) observaram uma associação positiva entre os níveis de açúcares redutores e não redutores com a qualidade da bebida. O 2-metilbutiraldeído e 3-metilbutiraldeído foram descritos como dois compostos voláteis característicos dos grãos verdes defeituosos associados à baixa qualidade das ligas de café (CUNHA, 2005).

A composição química do café cru varia de acordo com a espécie e variedade estudada, como também esta relacionada com outros fatores como solo, clima, altitude, do tipo de manejo no campo, grau de maturação e do tipo de acondicionamento dado ao grão colhido (BARCELOS, 2001). Segundo Oosterveld, Voragen e Schols (2003), o café verde pode ser descrito como sendo composto basicamente de carboidratos, lipídios e proteínas, como está apresentado na Tabela 3, com ênfase na composição de carboidratos.

Tabela 3 – Composição de carboidratos em grãos de café Arábica verde e torrado (%m/m)

	Café verde	Café torrado
Carboidratos	54,8	48,1
Ramnose	1	1
Arabinose	12	6
Xilose	2	0
Manose	43	51
Galactose	23	21
Glicose	15	16
Ácido urônico	4	4
Lipídios	11,3	15,9
Proteínas	5,8	6,8
Total	71,9	70,8

Fonte: Oosterveld, Voragen e Schols (2003).

Observa-se que do total de carboidratos presentes no café verde (Tabela 3) a manose representa cerca de 43%, já os galactomananos (Figura 3) e arabinogalactanos (Figura 4), juntos respondem por cerca de 35% (OOSTERVELD; VORAGEN; SCHOLS, 2003).

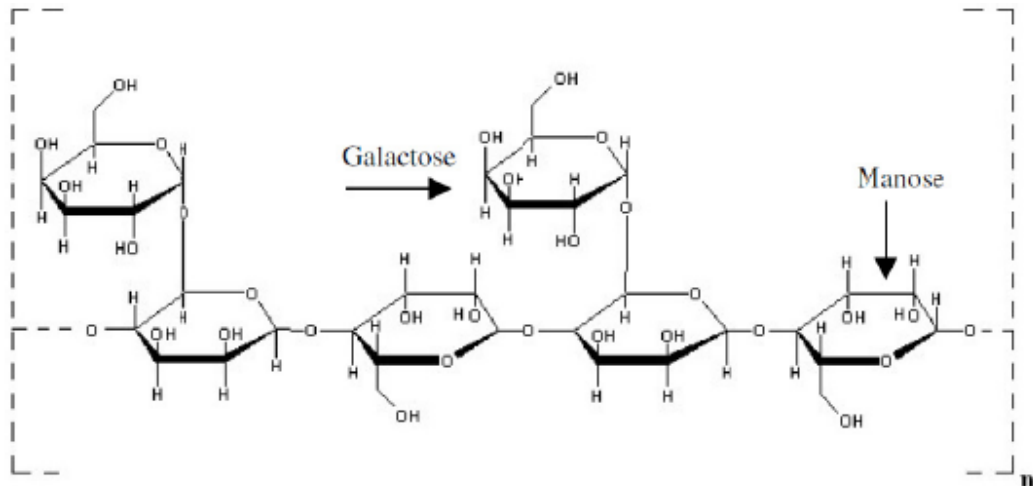


Figura 3 – Estrutura de um galactomanano (DELGADO, 2008).

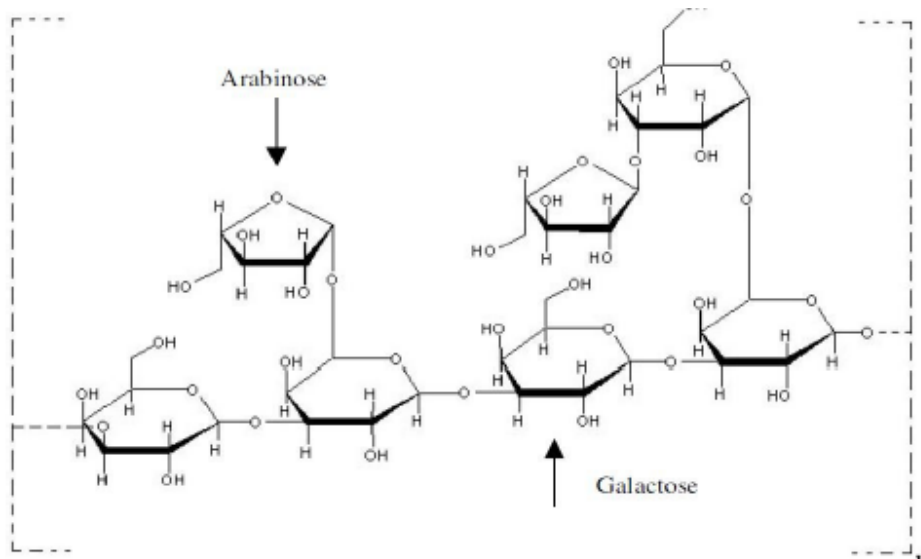


Figura 4 - Estrutura de um arabinogalactano (DELGADO, 2008).

O processo de torração do café compreende uma etapa importante, pois ocorrem consideráveis mudanças na composição em relação ao café verde, onde alguns componentes são degradados e outros interagem para formar outros compostos. Segundo Trugo (1985), o café é provavelmente um dos alimentos que mais se alteram durante o processo, refletindo tais alterações em suas características sensoriais.

Segundo Oosterveld, Voragen e Schols (2003), o processo de torração acarreta na perda de 20% da massa (em base seca) do grão de café. De acordo com a Tabela 3, o grão de café torrado possui uma composição de aproximadamente 48% de carboidratos, 16% de lipídios e 7% de proteínas. A queda do teor de carboidratos presentes no grão processado pode ser atribuída a conversão de parte dos açúcares a produtos de reações de Maillard e reações de pirólise. Já a maior proporção de lipídios pode na verdade ser explicada pela degradação dos carboidratos durante o processo de torração. A maior sensibilidade da arabinose, xilose e galactose ao processo térmico, provocam uma queda do teor desses açúcares e proporcionalmente ocorre um aumento relativo dos teores de manose e glicose, justificados pela menor sensibilidade ao processo térmico desses dois carboidratos.

Observa-se então, que o conhecimento do teor dos carboidratos é de fundamental importância para a qualidade, seja em função da sua degradação produzindo os aromas decorrente do processamento; para atestar seu grau de pureza; ou ainda, como fonte de carbono para o crescimento de microrganismos, que geram metabólitos. A cromatografia de troca aniônica (*High Performance Anion Exchange Chromatography* - HPAEC) acoplada a um detector de amperometria pulsada (Pulsed Amperometric Detector - PAD), tem sido utilizada para a detecção de adulterantes, por permitir a determinação de baixas concentrações dos carboidratos nas matérias-primas empregadas, por meio da aplicação de potenciais que geram oxidações eletrocatalisadas na superfície do eletrodo de ouro, que produzem correntes proporcionais às suas concentrações, características para cada matriz (GARCIA et. al., 2009).

2.2 MICROBIOTA E METABÓLITOS DO TIPO MLCOTOXINAS

Os grãos de café, em função de apresentarem celulose, hemicelulose, pectinases, açúcares redutores, amido, óleos, proteínas, ácidos e cafeína, permitem o desenvolvimento de fungos que ao secretarem seus produtos metabólicos podem modificar aspectos físico-químicos dos grãos e da bebida do café.

Um estudo da microbiota de amostra de café beneficiado de Minas Gerais, realizado por Carvalho, Chalfoun e Chagas (1989), sinalizou uma correlação entre a presença de algumas espécies de fungos e a qualidade da bebida. A incidência de *Fusarium roseum*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus flavus* foi acentuadamente menor nos cafés classificados como bebida mole e dura do que naqueles classificados como bebida rio e riada. Por outro lado, cafés classificados como bebidas mole e dura apresentaram índices igualmente elevados de fungos dos gêneros *Fusarium* e *Penicillium*. O fungo *Cladosporium cladosporioides* principalmente nos grãos beneficiados, esteve sempre associada à bebida de boa qualidade.

Segundo Forsythe (2002), a toxicidade das micotoxinas pode ser subdividida em aguda (provoca danos aos rins ou fígado), crônica (resulta em câncer de fígado), mutagênica (causa danos ao DNA) e teratogênica (má formação ao nascer). A preocupação reside também na possibilidade do aparecimento de tumores malignos relacionados com a ingestão repetida de baixas doses (subagudas) de micotoxinas.

Considerando-se a ocorrência de micotoxinas em alimentos é importante realçar que nem todas as cepas da mesma espécie são toxigênicas. A presença de fungo viável produtor de toxina não indica necessariamente que a toxina esteja presente. Além disso, pode-se detectar micotoxina na ausência de fungos viáveis. Os incidentes de casos de micotoxicidade aguda, nos quais se pode determinar a relação causa-efeito, são raros e afetam sempre espécies sensíveis expostas a alimentos muito contaminados. Algumas micotoxinas podem induzir a formação de lesões orgânicas em animais, após ingestão repetida de pequenas quantidades. O controle das micotoxinas deve buscar o equilíbrio prático entre a eliminação completa e

o nível baixo, porém tolerável (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF, 2000).

Numerosos fungos foram testados em laboratório visando detectar a produção de micotoxinas. As principais espécies produtoras pertencem aos gêneros *Alternaria sp* (muitas espécies), *Aspergillus sp* (mais de 20 espécies), *Chaetomium globosum*, *Cladosporium sp* (pelo menos 2 espécies), *Claviceps sp* (pelo menos 2 espécies), *Fusarium sp* (pelo menos 6 espécies), *Gibberella zea*, *Paecilomyces variota*, *Byssochlamys fulva*, *Penicillium sp* (mais de 15 espécies), *Myrothecium sp* (pelo menos 2 espécies), *Phoma herbarium*, *Pithomyces chartarum*, *Rhizopus oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stachybothys atra* e *Trichoderma lignorum* (SCUSSEL, 2000). Entretanto, os gêneros *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* e *Fusarium sp* são os mais freqüentemente associados com micotoxinas que ocorrem naturalmente em cereais, grãos e sementes em níveis que tornam os alimentos impróprios para consumo (APHA, 2001).

Segundo Scussel (1998), o grupo das ocratoxinas contém vários análogos, os principais são: ocratoxina A, ocratoxina B e ocratoxina C (Figura 5).

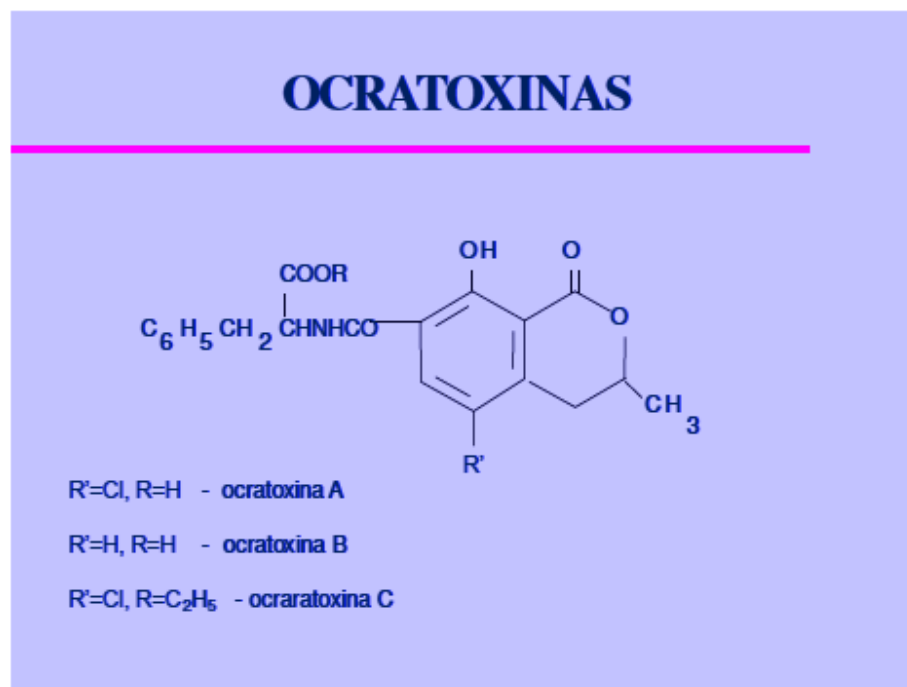


Figura 5 – Estrutura molecular da Ocratoxina (L-fenilalanina N-[5- cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H2-benzopirran-7-ila] carbonila-(R)-isocumarina.

Quimicamente, são compostos que apresentam uma (3-fenilalanina ligada a uma isocumarina por ligação amida. A ocratoxina A (OTA) apresenta fluorescência verde e uma molécula de cloro na fórmula (radical R1), responsável pelo caráter tóxico. A ocratoxina B, com fluorescência azulada, não revela toxicidade pela ausência de molécula de cloro. A ocratoxina C com fluorescência verde, constitui um etil éter da ocratoxina A, sendo muito menos tóxica que a outra.

Há de se destacar que atualmente o *Aspergillus westerdijkiae* é reconhecido como a mais importante espécie produtora de OTA em grãos de café. O *A. westerdijkiae* é uma nova espécie de fungo que foi desmembrada por Fúngaro et al. (2004) a partir do taxon *A. ochraceus*. Essa espécie é muito similar a *A. ochraceus* e vários isolados previamente identificados como *A. ochraceus* agora são identificados como *A. westerdijkiae*. De acordo com a literatura isolados de *A. westerdijkiae* são muito freqüentes e a maioria deles é capaz de produzir grandes quantidades de OTA.

A prevenção da deterioração fúngica e produção de micotoxinas em café, só ocorrem com sucesso, quando as espécies e os pontos críticos do pré-processamento são conhecidos. Os tipos de amostras de café analisadas podem ser responsáveis por níveis variados de OTA, o que pode ser observado pelo primeiro estudo em grãos de café realizado por Levi, Trenk e Mohr (1974), cujo grau de contaminação variou de traço a 360 u.g Kg^{-1} , sendo que os níveis mais elevados foram encontrados em amostras visualmente deterioradas. Desde então, vários estudos têm sido realizados, em diferentes tipos de café sendo detectados diferentes níveis de contaminação (BATISTA et al., 2003; CANTÁFORA et al., 1983; LEONI et al., 2001; MORAES; LUCHESE, 2003; NAKAJIMA et al., 1997; PASIN; ABREU, 2000; PRADO et al., 2004; ROBLEDO; MARÍN; RAMOS, 2001; ROMANI; PINNAVAIA; ROSA, 2000; TANIWAKI et al., 2003).

Apesar das doenças causadas por bactérias representarem a grande preocupação na maioria dos estudos e de se acreditar que, o número total de pessoas afetadas por fungos seja menor que o número total de afetados por infecções bacterianas, virais e por protozoários, atualmente as doenças fúngicas são um problema sério de saúde no mundo, uma vez que as micotoxinas em alimentos são responsáveis por um grande número de mortes (PITT et al.; 2000; BENNETT; KLICH,

2003). Embora as micotoxinas representem importância em nível mundial, são geralmente pouco entendidas e ignoradas pelo público em geral (PATERSON; VENÂNCIO; LIMA, 2004) e o número de pessoas afetadas por micotoxicoses é ainda desconhecido (BENNETT; KLICH, 2003). Um problema grave envolvendo as micotoxinas é o desenvolvimento e fabricação de armas biológicas (BENNETT; KLICH, 2003; PATERSON; VENÂNCIO; LIMA, 2004).

Vários fatores podem influenciar as decisões tomadas pelas autoridades sanitárias no sentido de estabelecer os limites aceitáveis para certas micotoxinas, os quais não se apresentam necessariamente apoiadas por conhecimentos científicos (BENNETT; KLICH, 2003). Alguns destes fatores podem estar relacionados com a disponibilidade de dados toxicológicos; a disponibilidade de dados analíticos de inspeções nos produtos; a distribuição das micotoxinas sobre os gêneros alimentícios; a disponibilidade de métodos para a análise; a existência de legislação em países com os quais se relacionam comercialmente; o suprimento suficiente de alimentos entre outros.

A avaliação de risco da OTA em alimentos ocorre oficialmente através de uma junta de especialistas da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS) que se reúne regularmente para as reavaliações pertinentes. Desde 1970, os contaminantes nos alimentos têm sido avaliados pelos comitês dos órgãos mundiais, entre eles, o *Codex Alimentarius*. São as resoluções tomadas a partir destes encontros que estabelecem os níveis a serem seguidos pela comunidade internacional para o comércio dos seus produtos (WHO, 2001).

Em relação à ocratoxina A, tem-se dado atenção especial desde 1993, quando a International Agency for Research on Câncer classificou esta toxina, no Grupo 2B, como potencialmente carcinogênica em humanos, baseado em suficientes evidências para carcinogenicidade em estudos em animais de laboratório (IARC, 1993; DRAGACCI et al., 1999). Em 2002 a Comissão da Comunidade Européia, estabeleceu uma taxa de ingestão tolerável de OTA, considerando que "é prudente reduzir a exposição à ocratoxina A o mais possível, assegurando que as exposições estejam no nível mais baixo da gama de doses diárias toleráveis de $1,214 \text{ ug Kg}^{-1}$ de peso corporal"

(Diretiva 2002/472/EC). Devido a toxicidade e presença em alimentos e rações para animais, a Comunidade Européia já emitiu diversas diretivas que contêm os níveis máximos de OTA permitidos em diversas matrizes alimentares (Diretiva 2005/123/EC; Diretiva 2006/576/EC), de forma a harmonizar a legislação existente em todos os estados membros da União (Tabela 4).

Tabela 4 – Teores máximos de OTA estabelecidos pela União Européia para diferentes gêneros alimentícios.

Produto	Teor máximo ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Método de amostragem e método oficial de análise
Cereais (incluindo arroz e trigo) e produtos à base de cereais	5,0	Diretiva 2002/26/EC
Cereais em grão (incluindo arroz em grão e trigo)	5,0	Diretiva 2002/26/EC
Todos os produtos derivados de cereais (incluindo produtos à base de cereais e grãos de cereais destinados a consumo humano direto)	3,0	Diretiva 2002/26/EC
Uvas passas	10,0	Diretiva 2002/26/EC
Café torrado em grão e moído	5,0	Diretiva 2002/26/EC
Café solúvel (café instantâneo)	10,0	Diretiva 2002/26/EC
Vinho e bebidas à base de mosto de uva	2,0	Diretiva 2002/26/EC
Suco de uva, ingredientes de suco de uva em outras bebidas, incluindo suco de uvas e suco de uva concentrado	2,0	Diretiva 2002/26/EC
Mosto de uva e concentrado de mosto de uva, destinados ao consumo humano direto	2,0	Diretiva 2002/26/EC
Alimento para bebês e alimentos processados à base de cereais destinados a lactantes e crianças	0,50	Diretiva 2002/26/EC
Alimentos dietéticos com fins medicinais, destinados às crianças	0,50	Diretiva 2002/26/EC
1) Matéria para rações: - Cereais e derivados 2) Ração final e complementos: - Para porcos - Para aves	0,25 $\times 10^{-3}$ 0,05 $\times 10^{-3}$ 0,10 $\times 10^{-3}$	Diretiva 2006/576/EC

O aumento da consciência do risco potencial que a exposição da OTA traz em termos de saúde, através do consumo de café e de gêneros alimentícios, requer que cada país desenvolva medidas sistemáticas de detecção da OTA em café e seus subprodutos, presentes no mercado. Devido a necessidade da detecção em quantidades - traço, metodologias de análises devem ser sensíveis o suficiente para cobrir não somente os limites permitidos pela legislação, mas também a detecção de substâncias já proibidas, especialmente para compostos potencialmente genotóxicos e carcinogênicos (RIDGWAY; LALLJIE; SMITH, 2007).

Como as micotoxinas aparecem como metabólitos de fungos, a incidência de microrganismos nas fases de pré e pós-colheita têm sido um dos fatores envolvidos na qualidade do café, principalmente nas modalidades de colheita e preparo mais adotado no Brasil que são: a colheita por meio de derraça, obtendo-se uma mistura de frutos com diferentes estágios de amadurecimento e preparo "via seca" ou "semi-seca"; ao contrário de outros países, como Colômbia, no qual o processo de colheita é seletivo (colheita a dedo) e os frutos são despolidos. Os trabalhos realizados por Carvalho, Chalfoun e Chagas (1999) e Meirelles (1990) demonstraram uma elevada taxa de infecção por fungos nos cafés de pior qualidade (riado e rio). Constatou-se também que nesses cafés a umidade dos grãos beneficiados apresentava teores superiores a 10%, valor esse, que segundo Moreau (1979), é favorável ao desenvolvimento de *Aspergillus flavus* e *A. niger*, agravando o perigo de contaminação durante a fase de armazenamento.

De acordo com Taniwaki et al. (2008), é indispensável que o café colhido seja preparado e submetido em seguida à secagem para evitar o desenvolvimento de processos fermentativos prejudiciais a qualidade da bebida. As características da bebida de café são influenciadas por modificações nos grãos atribuídas a distúrbios fisiológicos e às fermentações microbianas que degradam os açúcares da mucilagem dos frutos na planta, formando alcoóis ou ácidos carboxílicos (KRUG, 1940a, 1940b). Sob esse aspecto, é fundamental o manejo pós-colheita, em particular, o tempo de exposição aos microrganismos, os quais iniciam a multiplicação na planta e persistem após a colheita, até mesmo, em parte do período de secagem.

Cantafora et al. (1983) introduziram a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência para separar a ocratoxina A. Reduziram o limite de detecção em 100 vezes ($0,2 \mu\text{g Kg}^{-1}$) quando comparado ao do método oficial (de $20,0 \mu\text{g Kg}^{-1}$), descrito primeiramente em 1975 e mantido pelos procedimentos analíticos contidos na AOAC INTERNATIONAL (1995).

Tsubouchi et al. (1988) isolaram em grãos de café verde uma cepa de *Aspergillus ochraceus* produtora de OTA e avaliaram sua estabilidade ao calor, após torrefação dos grãos artificialmente contaminados a 200°C , verificando que a OTA foi reduzida em apenas 12%.

Micco et al. (1989) avaliaram 627 amostras de grãos de café verde provenientes do Brasil, da Costa Rica, do México e da África. Afirmaram que 56 (9%) estavam contaminadas com OTA em níveis que variaram entre 0,5 e $360 \mu\text{g Kg}^{-1}$ e que a incidência independe da espécie cultivada (*C. arábica* ou *C. canephora*).

Apesar do *Aspergillus ochraceus* desenvolver-se a partir de 0,76 de atividade de água (a_w), a ocratoxina é produzida a partir de 0,85 (sendo 0,97 sua a_w ótima). A temperatura em que ocorre a produção da toxina situa-se entre 12°C e 37°C (ótima de 25°C) e o pH ótimo de produção entre 5-6 (MOSS, 1996).

Diversos pesquisadores isolaram cepas de fungos em amostras de grãos de café verde e torrado, avaliando a produção de OTA. Das 991 cepas de *Aspergillus sp* e *Penicillium sp* de amostras de grãos de café verde do Egito, isoladas por Abd-Alla, Sahab e Aly (1997), 45 (4,54%) eram produtoras de Ocratoxina A. De 25 amostras de grãos de café exportados para a Suíça, avaliadas por Studer-Rohr et al. (1995), 13 (52%) continham OTA em níveis de até $7,8 \mu\text{g Kg}^{-1}$.

Stegen et al. (1997) avaliaram a presença de OTA em 633 amostras de café solúvel comercializado em diversos países da Europa. Dessas, 299 (47,23%) apresentaram resultado positivo (4 em níveis entre 10,0 e $27,2 \mu\text{g Kg}^{-1}$ e as demais inferiores a $10,0 \mu\text{g Kg}^{-1}$).

Patel et al. (1997) pesquisaram a presença de OTA em 100 amostras de café solúvel comercializado na Inglaterra, reportando que 64 apresentaram níveis de contaminação entre 0,1 e $8,0 \mu\text{g Kg}^{-1}$.

Furlani, Oliveira e Soares (1999) consideram que a produção de OTA ocorre no café principalmente na etapa pós-colheita, quando os grãos são transportados e armazenados em condições de umidade relativa alta ou ainda úmidos, independentemente da espécie (*C. arabica* ou *C. canephora*).

Furlani, Oliveira e Soares (1999) analisaram 50 amostras de café verde provenientes do Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Roraima e Bahia. Encontraram OTA em 15 (30%) amostras, em níveis que variaram entre 0,8 a 117,4 $\mu\text{g Kg}^{-1}$.

Burdaspal e Legarda (1998) analisaram 37 amostras de café torrado comercializado na Espanha e observaram que todas apresentaram contaminação com níveis de OTA entre 0,19 e 5,65 $\mu\text{g Kg}^{-1}$.

Prado et al. (2000) verificaram que 73% das amostras de café torrado comercializado em Minas Gerais apresentavam contaminação por OTA entre 0,31 e 5,87 $\mu\text{g Kg}^{-1}$.

Segundo Borém (2008) o Consórcio Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CNP&D) fez uma avaliação no Brasil em 289 amostras de cafés torrado e instantâneo na região do Sul de Minas Gerais, maior região produtora de café do país, e constatou que das amostras avaliadas, 75,09% apresentaram valores de ocratoxina A (OTA) abaixo de 5 ppb (limite proposto pela União Européia). Os frutos submetidos ao contato com o solo foram os que apresentaram níveis mais elevados de OTA, devido a ser o local onde há grande concentração de microrganismos.

Para minimizar o impacto sobre a exportação do café brasileiro torna-se necessário, além de identificar os fatores críticos que contribuem para a contaminação, adequar a metodologia empregada na quantificação da OTA para níveis traços. Segundo a APHA (2001), os extratos devem ser adequadamente purificados para remover substâncias presentes nos substratos como lipídios e pigmentos que possam interferir nas técnicas analíticas. A quantificação pode ser realizada por cromatografia em camada delgada (CCD ou TLC), cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC), dependendo da metodologia, associada a luz ultravioleta, fluorescência, eletroquímica, ou por espectrometria de massas (SULYOK; KRSKA; SCHUHMACHER, 2007),

cromatografia a gás por ionização (CG-FID) ou acoplada à espectrometria de massa (CG/EM ou GC/MS) (APHA, 2001).

No sentido de procurar a normalização das metodologias, estudos interlaboratoriais colaborativos vêm sendo realizado por vários laboratórios nacional e internacionais (FAPAS - Food Analysis Performance Assessment Scheme e RMMG - Rede Metrológica de Minas Gerais), visando padronizar a metodologia, cujos resultados preliminares demonstraram-se satisfatórios (CRISTIANO et al., 2008). A metodologia sugerida fundamenta-se na extração da ocratoxina A com metanol e solução aquosa de bicarbonato de sódio 3%, filtração e diluição do extrato com solução tampão salina fosfatada (PBS - phosphate buffered saline), purificação em coluna de imunoafinidade contendo anticorpos específicos, lavagem, eluição com metanol e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (Vargas et al., 2002). Entretanto, para se garantir a qualidade dos resultados é necessário ainda avaliar a eficiência da metodologia proposta por meio da validação.

2.3 VALIDAÇÃO

A necessidade de demonstrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento. Assim, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, incluindo aquelas atribuídas aos equipamentos, padrões, calibrações, analista e ambiente (RIBANI et al., 2004).

Algumas vezes, a validação é mencionada como o processo que fornece uma evidência documentada de que o método é indicado para o que se propõe

a fazer, assegurando assim, a credibilidade (VIEIRA; LICHTIG, 2004; RIBANI et al., 2004).

Vários autores definem validação de métodos e pode-se dizer que os conceitos continuam evoluindo e estão constantemente sob consideração pelas Agências Reguladoras. Segundo a Agência Brasileira Reguladora para Alimentos e Medicamentos - ANVISA (2003), "a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados". Pela definição da ISO/IEC 17025:2005, que descreve os requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração, a validação é a "confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional" (ABNT NBR ISO/IEC 9000). Já pela definição da Farmacopéia americana (1999), a validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o "processo que fornece uma evidência documentada de que o método é indicado, pois realiza aquilo a que se propõe a fazer".

Subentende-se que no processo de validação do método, os equipamentos utilizados encontram-se dentro das especificações, funcionando corretamente e calibrados adequadamente. Também, o operador precisa ser competente e ter conhecimento suficiente para tomar as decisões apropriadas no decorrer do estudo. No entanto, os erros aleatórios, também chamados de erros randômicos ou indeterminados, ao contrário dos erros sistemáticos, são inevitáveis e não podem ser controlados. Vários fatores estão envolvidos, mas nenhum pode ser determinado individualmente. Para expressar estes erros associados às medidas, a estatística descritiva se vale de: um número para representar o conjunto, chamado de medida de tendência central, dado pela média; um número para mostrar a variabilidade dos dados, chamado de medida de dispersão, que pode ser dado pelo: desvio padrão, coeficiente de variação, variância, amplitude, erro padrão, mínimo e máximo e por fim, combina esta variabilidade com o seu tamanho, em um intervalo de confiança que é expresso pela incerteza. Portanto, o cálculo da incerteza, se torna interessante por exprimir o nível do erro associado as várias etapas do processo, verificando o nível de confiança da inferência realizada. Considerando a metrologia, o cálculo da incerteza, já

é um dos itens da validação exigidos em laboratórios acreditados, tendendo a ser aplicado à todo trabalho científico, amplamente descrito por organismos de normalização internacionais (ELLISON; ROSSLEIN; WILLIAMS, 2000).

Além do estudo da incerteza, a habilidade de prover dados precisos e seguros, fundamental em trabalhos analíticos, a validação deve incluir estudos de parâmetros como: especificidade e seletividade, linearidade, intervalo de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e tendência, precisão, e robustez (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2007).

O conhecimento e o modo com que cada um destes parâmetros é calculado, bem como, quais os órgãos que regulamentam as normas e métodos, tanto nacional como internacionalmente, é de fundamental importância, a fim de se basear em diretrizes, que possam assegurar a qualidade dos resultados obtidos, quando aplicadas ao trabalho experimental.

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de Junho/2007 e a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003. Suas similaridades e diferenças estão apresentadas no Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros de validação utilizados pelo INMETRO e ANVISA.

INMETRO	ANVISA
Especificidade/Seletividade	Especificidade/Seletividade
Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho	Intervalo da curva de calibração
Linearidade	Linearidade
	Curva de Calibração
Limite de Detecção (LD)	Limite de Detecção (LD)
Limite de Quantificação (LQ)	Limite de Quantificação (LQ)
Sensibilidade (inclinação da curva)	-
Exatidão e tendência (<i>bias</i>)	Exatidão
Precisão	Precisão
Repetitividade	Repetitividade (precisão intra-corrída)
Precisão intermediária	Precisão intermediária (precisão inter-corrída)
Reprodutibilidade	Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)
Robustez	Robustez
Incerteza de medição	-

Fonte: Ribani et al. (2004).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho consistiu em validar uma metodologia analítica e determinar o teor de ocratoxina A de grãos de cafés procedentes de diferentes estados brasileiros de distintos tipos de bebidas mole, dura, rio, riado e riozona, correlacionando com defeitos, carboidratos e microbiota fúngica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a qualidade de 15 amostras de café cru, procedentes de 4 estados brasileiros: São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Espírito Santo, avaliando-as convencionalmente pela classificação dos defeitos (COB) e pela análise sensorial da prova de xícara de acordo com o tipo de bebida em mole, dura, rio/riado e riozona.

Efetuar a caracterização microbiológica das amostras de diferentes qualidades de bebida do café, pelo estudo da presença de microrganismos observados por microscopia de varredura eletrônica (MEV), feita pelo isolamento dos fungos filamentosos plaqueados e caracterização em espécies pela biologia molecular por RAPD.

Validar uma metodologia modificada, baseada na técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com fluorescência (HPLC-FL) com coluna de imunoafinidade, para efetuar a detecção de contaminação por ocratoxina A (OTA) com sensibilidade em quantidades traço de forma confiável, conhecendo suas incertezas.

Efetuar a determinação dos teores de OTA (HPLC-FL) e carboidratos (HPAEC-PAD) por metodologias validadas para as 15 amostras selecionadas. Estudar possíveis correlações dos teores de OTA, com os defeitos, carboidratos e microbiota

fúngica, encontrados para as diferentes qualidades de bebidas, empregando análise multivariada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM

Os cafés crus estudados foram cedidos por indústria local, procedentes de 4 estados brasileiros, a fim de se conseguir uma mais ampla gama de dados que pudessem espelhar a diversidade da microbiota e permitissem correlacionar a qualidade da bebida aos fatores estudados. Salienta-se a dificuldade de obtenção das amostras de diferentes estados em termos de quantidade e qualidade, principalmente as de má qualidade, talvez explicada pelos baixos índices pluviométricos apresentados no ano. As 15 amostras (safra 2006/2007) foram acondicionadas em potes plásticos, armazenadas em local seco até o momento das análises.

4.2 ANÁLISE SENSORIAL - PROVA DE XÍCARA

Como o critério do estudo baseou-se no tipo de bebida, para a escolha das amostras, esta foi a primeira classificação realizada. Inicialmente as amostras foram torradas no ponto de prova (torra clara - 60 IR) e passadas por um moinho (ROD BEL, Brasil) regulado para a moagem grossa (*mesh* 10). Para cada amostra uma pequena quantidade do café torrado, a ser submetido à prova de xícara, foi moída e descartada, a fim de eliminar possíveis contaminações cruzadas. Porções de 8 a 10 gramas de café torrado foram moídas e colocadas nas xícaras para a prova (Figura 6). Foram preparadas 7 (sete) xícaras para cada amostra avaliada. Em seguida em uma mesa de prova circular e giratória, utilizando água destilada em ponto de fervura, o pó foi esquentado, vertendo-a cuidadosamente sobre o produto.

A partir deste momento, o procedimento da avaliação sensorial propriamente dito é iniciado. A infusão foi mexida com a colher de prova pelo provador

que a cheirou para obter um julgamento preliminar dos vapores desprendidos e retirou a espuma sobrenadante. Por meio dos aromas desprendidos, um juízo prévio da qualidade da bebida de cada amostra foi estabelecido, separando-se as bebidas de características mais favoráveis que foram degustadas em primeiro lugar, seguidas então, daquelas de características menos favoráveis, degustadas posteriormente. A colher de prova foi lavada com água sempre ao se passar de uma amostra para outra em xícaras colocadas no braço fixo anexo à mesa giratória.

Aguardou-se a decantação do pó e em seguida retirou-se com a colher de prova a espuma e os resíduos que ficaram na borda da xícara. A temperatura média para a execução da análise foi de 38°C.

A prova foi iniciada mergulhando-se a colher suavemente na xícara, de forma que a infusão entrasse na mesma. A colher foi então levada à boca, succionando fortemente, fazendo com que um pouco da bebida aspergida fosse ao encontro da língua e ao palatino, conservando-a na boca apenas o tempo suficiente para sentir o sabor e os aromas, expelindo-a em seguida na cuspeira.



Figura 6 – Análise sensorial do café empregando a prova de xícara

4.3 CLASSIFICAÇÃO POR TIPO E DEFEITOS

Uma porção de 300 g foi retirada de cada amostra de café e espalhada sobre uma folha de cartolina preta em uma mesa provida de boa iluminação. Os defeitos foram separados e contados segundo a Tabela de equivalência de grãos imperfeitos e impurezas (COB - Tabela 1).

A porcentagem de impurezas foi determinada considerando a quantidade de cascas, paus, pedras, cafés em coco ou marinheiros encontrados na amostra.

Os fundos foram dados pela porcentagem de grãos da porção inicial que passou na peneira 10 padrão internacional (Pinhalense, Brasil).

A determinação da umidade foi feita utilizando-se um analisador de umidade (GEOLE modelo 500).

4.4 METODOLOGIA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia de varredura eletrônica (MEV) das amostras de grãos de café cru foram realizadas no Laboratório de Microscopia da UEL, utilizando-se um microscópio Philips (FEI -QUANTA 200).

O pré-requisito para se efetuar a análise no MEV é que a amostra esteja completamente seca e apresente condutividade elétrica, para isto, os seguintes procedimentos foram adotados.

Aos grãos de café foram adicionados 2,0 mL de fixador (glutaraldeído 2,5% (m/v), 10,0 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e 8,0 mL de água ultrapura, reservados em geladeira "over-night". Em seguida, lavou-se por três vezes consecutivas com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,2) para retirada total do fixador, aguardando por 15 minutos. Retirou-se então o tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e os grãos foram banhados em solução de OsO₄ 2% (m/v) em tampão cacodilato de sódio 0,2 mol

L⁻¹, reservados por 2 hora. As amostras foram novamente lavadas com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,2), por três vezes, para a retirada do ósmio.

Após a lavagem, iniciou-se a fase de desidratação, cobrindo as amostras com etanol 70% e reservando-as "over-night". Em seguida, foram lavadas duas vezes com etanol 70%, seguido de três vezes com etanol 80%, depois com 90%, e por último, quatro vezes com etanol p.a. Nesta etapa, toda água foi substituída por etanol e as amostras foram mantidas a temperatura ambiente.

O ponto crítico foi realizado em equipamento Baltec (SCD 050) para a desidratação completa. As amostras colocadas em um "container" e levadas a uma câmara fechada para a secagem ao ponto crítico, ainda na presença de etanol p.a. para evitar a rehidratação. O etanol da amostra foi substituído lentamente por CO₂ líquido, na câmara que permaneceu a 4 °C e pressão de 50 barr. Quando todo etanol foi retirado, a câmara foi aquecida até 31 °C, com conseqüente aumento de pressão para 70 barr, retirando todo o CO₂ líquido pela passagem ao estado gasoso.

A metalização foi feita colocando-se a amostra em uma superfície denominada "stub" (plaquinha de alumínio de aproximadamente 1 cm de diâmetro), levando-se para uma câmara em um metalizador. Nesta câmara foi gerado vácuo (5×10^{-1} barr) e alta voltagem (40 mA), para efetuar o desprendimento de átomos de uma placa de ouro, com introdução de pequenas quantidades de argônio, para promover a retirada de resíduos de umidade e impurezas, afim de gerar um movimento circular dos átomos de ouro (nuvem de átomos de ouro), facilitando sua deposição por toda a superfície do grão de café, criando uma camada de ouro de 20 nm.

Após o preparo, os grãos foram levados ao microscópio eletrônico de varredura. O MEV gera um plasma de elétrons a partir de um filete de tungstênio e alta tensão ($\cong 3000^\circ\text{C}$). Deste plasma é originado um feixe de elétrons a partir de um orifício de 200 um que percorre uma coluna constituída por diversas lentes até incidir sobre a amostra revestida com ouro, ocasionando o desprendimento de elétrons deste metal. As imagens apresentada na Figura 14(a) à 14(f) foram constituída dos elétrons captados depois de expelidos do ouro, após a regulagem e ampliação para melhor visualização da área e espécie de interesse.

4.5 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Para o isolamento dos fungos presente nos grãos de café utilizou-se 50 grãos de cada amostra proveniente de 15 regiões distintas. Os grãos foram desinfectados externamente com solução de hipoclorito de sódio 0,4 % por 1 minuto e plaqueados assepticamente em meio Agar Dicloran 18 % Glicerol (DG18) de acordo com a metodologia proposta por Pitt e Hocking (1997). As placas foram incubadas a 25°C por um período de 7 a 15 dias. As colônias de fungos exteriorizadas foram isoladas em meio Agar Extrato de Malte (MEA) e incubadas a 28°C por 5 dias. A identificação morfológica dos fungos foi feita de acordo com Klich e Pitt (1988).

Para a identificação das espécies contaminantes de grãos de café foi feita a caracterização molecular dos isolados fúngicos utilizando as metodologias de RAPD e sequenciamento de regiões parciais do gene da β -tubulina.

4.5.1 Obtenção de Micélio, Extração e Quantificação de DNA Genômico

Para cada isolado foi feita uma suspensão de aproximadamente 10^7 conídios por mL em "Tween 80". Um mL desta suspensão foi inoculado em 50 mL de meio completo líquido (PONTECORVO et al. 1953). Após a preparação do inóculo, as culturas foram incubadas sob agitação de 180 rpm a 28°C durante 24 horas. Em seguida, o micélio foi coletado por filtração e lavado em água destilada esterilizada para retirada de resíduos do meio de cultura. O peso úmido do micélio foi determinado, e este utilizado para o processo de extração de DNA conforme Azevedo et al. (2000). O DNA extraído foi quantificado utilizando-se de fluorímetro "DyNA Quant 200" (Hofer) e solução padrão de dosagem (Hoescht dye H33258).

4.5.2 Análise do Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD)

Para a análise de RAPD cerca de 5 ng de DNA genômico foi utilizado nas reações de amplificações conforme descrito por Fungaro et al. (1996). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) Após o processo de amplificação, os produtos de RAPD foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,4%, em tampão TBE (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Os géis foram corados com brometo de etídio 1 µg/mL e fotografados em fotodocumentador Digi Doc.

4.5.3 Amplificação Parcial do Gene da β -tubulina

Amostras do DNA genômico foram submetidos à amplificação, utilizando-se os *primers* Bt1 e Bt2 descritos por Glass e Donaldson (1995). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.). Após a amplificação, as amostras foram submetidas a reações de sequenciamento.

4.5.4 Sequenciamento do Produto de PCR da Região Parcial do Gene da β -tubulina

Os produtos da PCR foram sequenciados através do método de Sanger, Nicklen e Coulso (1977) utilizando-se dos mesmos *primers* já descritos para a obtenção dos respectivos fragmentos. As reações foram feitas em um volume final de 10 µl, contendo 2,0 µl do produto da PCR (100 ng µl⁻¹), 1,0 µl de *primer* (10 pM µl⁻¹), 4,0 µl do kit "DYEnamic ET dye terminator Cycle Sequencing" (Amersham Biosciences) e 3,0 µl de água ultrapura. Estas foram submetidas a um termociclador "Mastercycler gradient" (Eppendorf), previamente programado: desnaturação inicial 95°C, 1 min. seguido por 35 ciclos de desnaturação (95°C, 20 seg.), anelamento (55°C, 15 seg.) e

extensão (60°C, 1 min). Após a amplificação, a precipitação foi realizada com 65 µL de etanol 96% e 2 µL de acetato de amônio 7,5 M. O produto foi ressuspendido em 10 µL de água ultrapura, e em seguida submetido à leitura em sequenciador do tipo "MegaBace™ 1000 *Molecular Dynamics*" (Amersham Biosciences).

4.5.5 Análise das Sequências de Nucleotídeos

A qualidade das sequências foi analisada com auxílio do pacote computacional "Phred/Phrap/Consed". As sequências obtidas foram alinhadas usando o "software" CLUSTAL X versão 1.6 e comparadas com aquelas depositadas no "Banco de Dados do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia" (NCBI), com o auxílio da ferramenta "BLAST Search" (ALTSCHUL et al. 1990).

4.6 ANÁLISE DE OCRATOXINA A, CARBOIDRATOS E CAFEÍNA

4.6.1 Metodologia para Determinação de OTA

A metodologia utilizada para extração da ocratoxina A foi a descrita por Vargas et al. (2002) com algumas modificações. Para a extração pesou-se 10,00 g (Mettler Toledo Pb3002) de café verde, seco em estufa (FANEM 515/C2) a 105°C por 8 horas, triturado em moinho de facas (IKA A11) até *mesh* 35, e adicionou-se 200 mL de solução de 1% (m/V) de bicarbonato de sódio (CINÉTICA, Brasil). A micotoxina foi extraída em liquidificador (WARING 51BL31 (7011), USA) por 5 minutos em alta rotação e 50 mL foram centrifugados (FANEM Baby II, Brasil) a 4000 rpm, seguida de filtração em papel de filtro microfibras (Whatman tipo GF/1 -55mm). Uma alíquota de 20,0 mL foi retirada e diluída com 20,0 mL de solução tampão PBS (OXOID BR 0014G, England) e

passada por coluna de imunoensaio (Ocrhaprep[®] Rhône Ltd, UK) em vazão de 2-3 mL min⁻¹. Em seguida a coluna foi lavada com 20 mL de solução tampão PBS e seca com ar. A ocratoxina A foi eluída com 1,5 mL de solução de metanol: ácido acético 99:1 (v/v), seguida de 1,5 mL de água ultrapura (Milli-Q[®]), e filtrada em membrana filtrante de 0,22 µm (Millipore GVWP 02500-Brasil).

Uma alíquota de 100,0 µL do extrato foi analisada e quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Waters, Milford, USA,) com detector de fluorescência (Waters 474, Milford, USA) ($\lambda_{excitação} = 333 \text{ nm}$ e $\lambda_{emissão} = 443 \text{ nm}$), injetor automático (717 Autosampler, Waters, Milford, USA), empregando fase móvel acetronitrila:metanol:água:ácido acético (33:33:33:1) (v/v/v/v) a 1,0 mLmin⁻¹, com coluna Nova-Pak C-18 (Waters, Milford, USA, 150 mm x 3,9 mm, 4,0 µm) mantida à temperatura de 25°C.

A preparação do padrão foi feita seguindo o método descrito pelo comitê de normalização europeu para análise de OTA (CEN, 2001). Ao frasco original de OTA (Sigma O-1877 - 5 mg) foram adicionados 5,0 mL da solução de bezeno:ácido acético (99:1 v/v), deixando-se em repouso ao abrigo de luz por 24 h, denominado padrão mãe de OTA. Deste padrão mãe, uma alíquota de 2,0 mL foi retirada e dispensada em um balão de 50,0 mL, completando-se até a marca com a solução de bezeno:ácido acético (99:1 v/v), constituindo a solução mãe de OTA.

A absorvância máxima desta solução mãe de OTA foi medida em espectrofotômetro (Detector UV/ Vis Waters - 2489) com comprimento de onda de 333 nm, cuja concentração final foi determinada através da Equação (1).

$$[\mu\text{g OTA/mL}] = \frac{AM1000}{\varepsilon\delta} \quad (1)$$

onde, A = absorvância máxima da solução no $\lambda = 333 \text{ nm}$; M = massa molar da OTA (403,8 g/mol); ε = coeficiente de absorvidade molar da OTA neste solvente (5550 mol⁻¹); δ = caminho óptico da cubeta (1 cm).

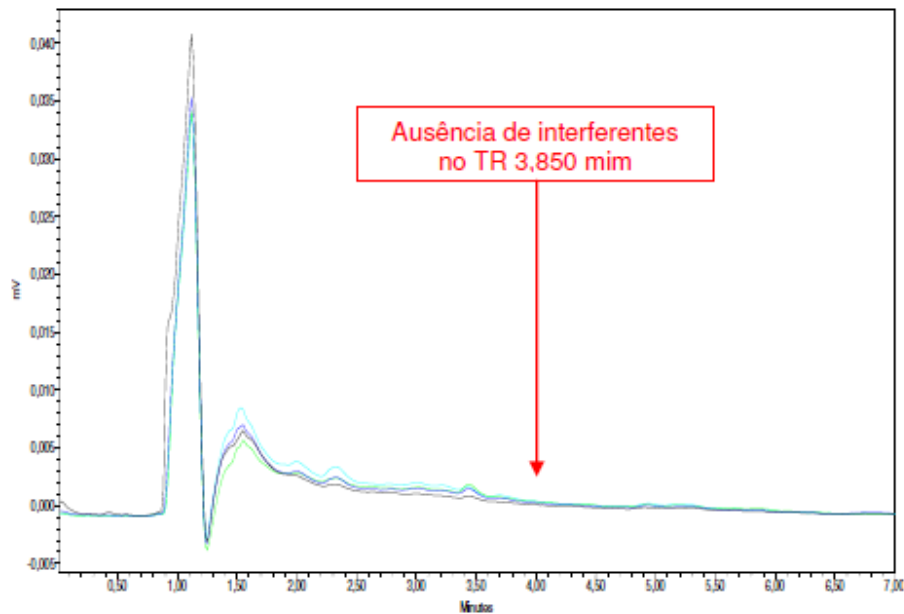
Uma solução estoque de $100,6 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de OTA foi obtida a partir da retirada de uma alíquota de $34,8 \mu\text{L}$ da solução mãe e transferência para um balão de $10,0 \text{ mL}$, completando-se até a marca com metanol (grau HPLC, Merck, Darmstadt, Alemanha). A solução trabalho utilizada foi de $3,35 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de OTA, obtida a partir da mistura de $100,0 \mu\text{L}$ da solução de estoque OTA ($100,6 \mu\text{g Kg}^{-1}$), $1400,0 \mu\text{L}$ de solução de metanol:ácido acético 98:2 (v/v) e $1500,0 \mu\text{L}$ de água ultrapura (Milli-Q[®]).

Um cuidado especial foi tomado em relação à limpeza da vidraria. Após ser utilizada no procedimento de extração, toda a vidraria foi deixada em descanso, em uma solução de Extran neutro 5% (v/v), para remoção de qualquer resíduo do analito. Depois, foi lavada, enxaguada em água corrente, com água deionizada e álcool etílico comercial, e então deixada secar à temperatura ambiente e armazenada em armário fechado.

4.6.1.1 Validação da metodologia para OTA

Inicialmente o método analítico para determinação da OTA teve que ser validado para as amostras de café verde, para garantir a confiabilidade dos resultados analíticos em quantidades traços, visto que, a forma de extração, os solventes e concentração utilizadas para a eluição e fase móvel e as colunas de imunoafinidade foram alteradas em relação ao método de Vargas et al. (2002). A validação envolveu oito fatores críticos: (I) seletividade; (II) limite de detecção; (III) limite de determinação; (IV) linearidade; (V) precisão: (V-a) repetitividade; (V-b) reprodutibilidade; (VI) recuperação; (VII) exatidão e (VIII) robustez, baseando-se nos documentos: INMETRO DOQ-CGCRE-008; Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1) do ICH (2005).

A seletividade (especificidade) do método foi avaliada para 4 amostras de café verde de diferentes estados SP, PR, MG e ES, naturalmente não contaminadas (isentas de OTA) consideradas como o "branco", submetidas ao procedimento analítico de extração e cromatografia (Figura 7).



AMOSTRA	TR (min)	INTERFERENTES
SP	3,865	n.d.
Pr	3,851	n.d.
MG	3,850	n.d.
ES	3,855	n.d.

TR: tempo de retenção; n.d.: não detectado – abaixo do limite de detecção.

Figura 7 – Teste de seletividade - Sobreposição de cromatogramas de 4 amostras de café cru não contaminadas - “branco”, destacando a ausência de interferentes co-eluído no tempo de retenção da OTA (3,850 minutos).

Observando a Figura 7 verificou-se a ausência de qualquer resposta analítica, seja de interferente da matriz ou dos reagentes, co-eluído no mesmo tempo de retenção do analito (OTA) em 3,85 minutos, comprovando a seletividade e especificidade do método.

A linearidade foi avaliada por meio da curva de calibração preparada a partir de procedimentos descritos pelo comitê de normalização europeu para análise de OTA (CEN, 2001).

A curva de calibração foi levantada, conforme planejamento mostrado na Tabela 6, pela injeção de uma solução de metanol:ácido acético (98:2 v/v) (padrão 1

- Figura 8) e 4 padrões (2 a 5 - Figura 9) de OTA em metanol:ácido acético (98:2 v/v) nas concentrações de 8,38 a 33,52 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, obtidas a partir da injeção em duplicata de diferentes volumes pelo injetor automático (Waters 717 plus), cujos resultados estão na Tabela 7.

Tabela 6 – Planejamento para o levantamento da curva de calibração de OTA.

Padrão	Volume Injeção (μL)	Concentração de OTA $\mu\text{g Kg}^{-1}$
1	100	0
2	25	8,38
3	50	16,76
4	75	25,14
5	100	33,52

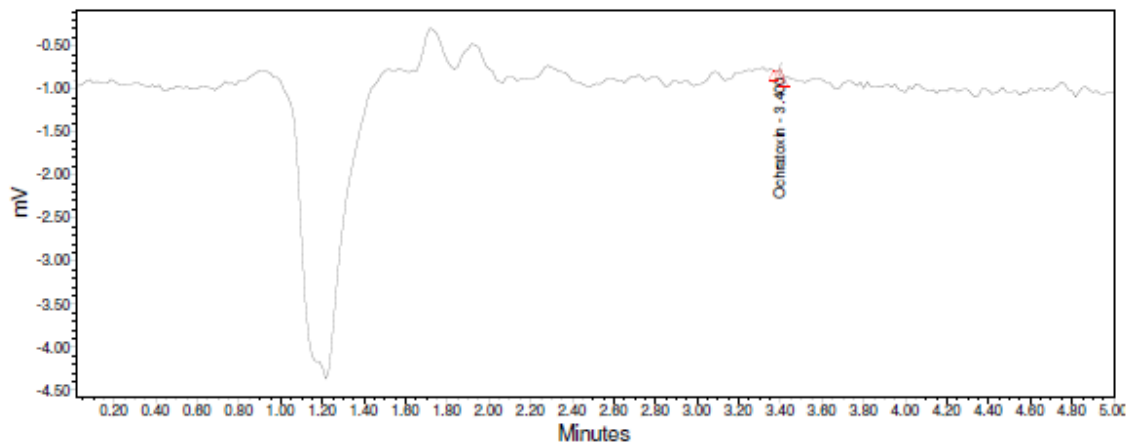


Figura 8 - Cromatograma do solvente - solução de metanol:ácido acético (98:2 v/v) (padrão 1 - Tabela 6) utilizando sistema HPLC-FL: fase móvel: ACN: MeOH: H₂O:HAc (33:33:33:1) v/v/v/v a 1,0 mL min⁻¹; vol. inj.: 100,0 μL ; coluna: Nova-Pak C-18 (25°C); detector FL com $\lambda_{\text{Ex}} = 333 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{Em}} = 443 \text{ nm}$.

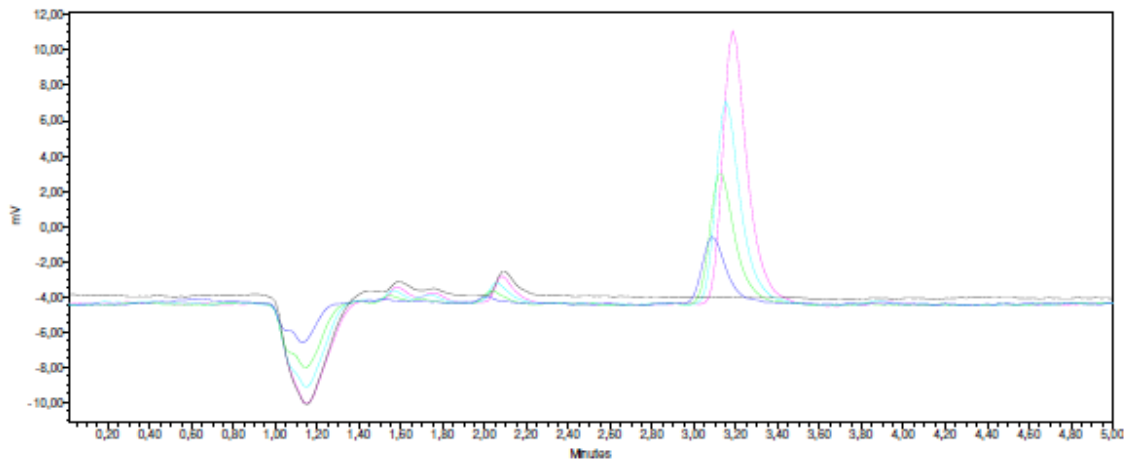


Figura 9 - Cromatogramas dos padrões de OTA (2 - 5 da Tabela 6) nas concentrações 8,38 a 33,52 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ em metanol: ácido acético (98:2 v/v), utilizados para a construção da curva de calibração (Figura 10) empregando o sistema HPLC-FL: fase móvel: acetonitrila: metanol: água: ácido acético (33:33:33:1) v/v/v/v; vazão de 1,0 mL min^{-1} ; vol. Inj.: 100,0 μL ; coluna: Nova-Pak C-18 mantida temperatura ambiente; detector de fluorescência com $\lambda_{\text{Ex}} = 333 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 443 \text{ nm}$.

Tabela 7 – Resultados obtidos na análise dos padrões preparados para a obtenção da curva analítica de calibração empregados nos cálculos da precisão (repetitividade)

Padrão	Concentração $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Área do pico cromatográfico (mVmin^{-1}) (N = 2)	Média das áreas \pm d.p. (mV min^{-1})	CV(%)
1	0,00	n.d.	0 \pm 0,00	0,00
		n.d.		
2	8,38	30042	30028,5 \pm 19,09	0,06
		30015		
3	16,76	61650	61670,0 \pm 28,28	0,05
		61690		
4	25,14	95573	95599,0 \pm 36,77	0,04
		95625		
5	33,52	129287	129276,0 \pm 15,56	0,01
		129265		

d.p.: desvio padrão

A curva de calibração, obtida a partir das áreas dos picos cromatográficos em função das concentrações (Figura 9 e Tabela 7) é mostrada na Figura 10.

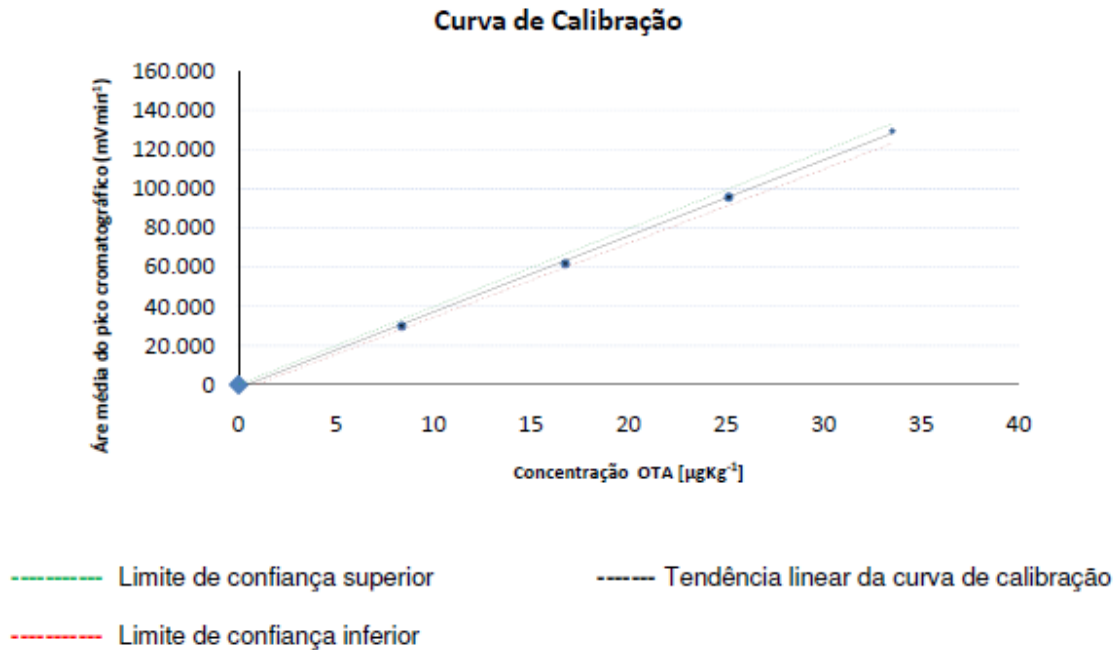


Figura 10 - Curva de calibração de OTA gerada pelo sistema HPLC-FL, mostrando a faixa linear de trabalho com seus limites de confiança determinados pelos cálculos de incerteza (ANEXO A).

Observando a Figura 10 é possível notar que o sistema mostrou-se linear para o intervalo de trabalho empregado (0,00 a 33,52 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de OTA), apresentando um coeficiente de correlação linear (r) de 0,9993, descrito pela Equação da reta (2):

$$\text{Área do pico cromatográfico (mV min}^{-1}\text{)} = 386748 \times [\text{OTA}] - 1509,7 \quad (2)$$

O limite de detecção (LD) foi de 0,227 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ e o limite de quantificação foi de 0,783 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ calculados pelos procedimentos descritos na EURACHEM (ELLISON; ROSSLEIN; WILLIAMS, 2000), determinados pelas Equações (3) e (4):

$$LD = a + 3 S_{\alpha} = -1509,7 + 3 S_{\alpha} = |89390,3 \text{ mVmin}^{-1} = 0,227 \mu\text{gKg}^{-1} \quad (3)$$

$$LQ = a + 10S_{\alpha} = -1509,7 + 10S_{\alpha} = 301409,3 \text{ mVmin}^{-1} = 0,783 \mu\text{gKg}^{-1} \quad (4)$$

onde, LD é limite de detecção e LQ é limite de quantificação; a é ordenada na origem; S_{α} é o desvio padrão associado à ordenada na origem (apresentados no cálculo das incertezas no Anexo A)

A precisão, em termos de repetitividade da resposta do instrumento empregado no método cromatográfico, foi avaliada efetuando-se 2 injeções de cada solução padrão de OTA de 8,38; 16,76; 25,14 e 33,52 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ em seqüência, injetando-se fase móvel entre cada corrida para evitar o "carry over", cujos resultados estão apresentados na Tabela 7. Os coeficientes de variação demonstram que o método foi repetitivo, uma vez que, os mesmos apresentaram valores baixos, variando de 0,0 a 0,06%.

Já a precisão intermediária, foi avaliada pela injeção de cada solução padrão de OTA em 4 dias diferentes. O CV para as 4 determinações apresentou variações maiores para as menores concentrações, com 4,03% para o padrão de 8,38 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ e 4,50% para o de 16,76 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, enquanto que para os padrões das maiores concentrações, de 25,14 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ e 33,52 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ os valores de CV foram menores, de 2,06% e 0,82%, respectivamente. Considerando que todos os CV estiveram abaixo dos 5,0%, avaliou-se que o método apresentou precisão inter-carridas.

Por sua vez, a recuperação foi avaliada pelo estudo da "fortificação", que consistiu na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse na amostra, seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. Observando na Tabela 8 as porcentagens de recuperação, que variaram de 78,00% a 109,00%, com uma recuperação média de 88,28%, foi possível afirmar que o método apresentou boa recuperação.

As porcentagens da recuperação ainda serviram de base para a avaliação da exatidão, que foi feita "fortificando-se" 03 amostras de café cru com alíquotas da solução estoque do padrão de OTA nas concentrações de 0,50, 10,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ e 11 amostras de café cru com alíquotas da solução estoque do padrão de OTA na concentração de 33,52 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. Após a extração do analito (OTA) das amostras "fortificadas" os extratos foram quantificados por HPLC-FL e os resultados reportados na Tabela 8. Observa-se que os valores em média obtidos foram próximos aos

esperados, sem desvios significativos (3,67 a 7,12), portanto, o método pôde ser considerado um método exato.

Tabela 8 – Resultados obtidos no estudo de recuperação de OTA em amostras de café cru

Padrão trabalho $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Recuperação (%)	Média (%)	Desvio Padrão	Desvio relativo
0,50	79,00	80,6	3,67	0,05
	84,80			
	78,00			
10,00	86,40	83,7	2,43	0,03
	83,00			
	81,70			
33,52	99,80	100,55	7,12	0,07
	98,70			
	104,00			
	89,60			
	109,00			
	102,80			
	104,00			
	89,50			
	109,00			
	93,20			
106,50				

O método foi ainda avaliado quanto à sua reprodutibilidade para os ensaios de OTA pela realização de diversos testes interlaboratoriais em ensaios de proficiência, nacionais (RMMG) e internacionais, como o FAPAS[®], gerenciado pelo CSL - Central Science Laboratory - Sand Hutton, York, UK, YO41 1LZ, como mostrados na Tabela 10.

Para o teste de desempenho interlaboratorial, a amostra adquirida (50 g) foi recebida com antecedência, conforme programação da entidade promotora, e

analisada pelo Laboratório por 2 analistas previamente selecionados em testes intralaboratoriais (Tabela 9), sendo 4 análises e 1 fortificação. Os resultados e a metodologia analítica utilizada foram reportados, via *site* (www.fapas.org.uk), sendo que nesta inclusão, foi fornecido um número referente à participação. Com este número foi possível verificar no relatório final, que continha os resultados das análises de todos os laboratórios, o desempenho do Laboratório em relação aos demais participantes, através do valor do *z-score*, que é considerado aprovado, se estiver entre ± 2 *z-score*, valor calculado pela Equação (5).

$$Z - SCORE = \frac{(x - \bar{X})}{S} \quad (5)$$

onde, *x*: resultado da análise do participante; \bar{X} : média geral de todos os participantes e *S*: desvio padrão amostral dos participantes.

A escolha dos 2 analistas que participaram do teste interlaboratorial foi feita baseada no desempenho de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial, dentre os que apresentaram os menores *z-score*, considerando o mesmo critério adotado para aceitação estabelecido pelo FAPAS, onde $|z| \leq 2,0$. O teste intralaboratorial utilizou uma mesma amostra contaminada por OTA, previamente selecionada, dividida em 6 porções de 50 g, a qual foi submetida aos analistas para análise em quadruplicada, cujo desempenho pode ser visto na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados do desempenho dos analistas em teste de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial

Analistas	Amostras	Concentração $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Média $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Desv. Padrão	CV(%)	Média $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Desvio Padrão	Recuperação (%)	z-Score
1	1	9,19	9,15	0,06	0,63%	9,31	0,20	89,50	0,17
	2	9,11							
	3	9,52							
	4	9,43							
2	1	7,84	7,86	0,03	0,39%	7,73	0,15	97,30	-0,94
	2	7,88							
	3	7,57							
	4	7,62							
3	1	8,15	8,18	0,04	0,51%	8,50	0,38	102,40	-0,40
	2	8,21							
	3	8,81							
	4	8,86							
4	1	9,61	9,58	0,05	0,53%	11,08	1,73	96,80	1,40
	2	9,54							
	3	12,49							
	4	12,65							
5	1	10,38	10,41	0,04	0,37%	10,15	0,30	105,10	0,75
	2	10,43							
	3	9,89							
	4	9,88							
6	1	7,91	7,87	0,05	0,65%	7,69	0,22	98,40	-0,97
	2	7,83							
	3	7,49							
	4	7,51							

Tabela 10 – Resultado do desempenho da participação do Laboratório em ensaios de OTA em testes interlaboratoriais de proficiência FAPAS e RMMG

Teste Interlaboratorial	Resultado ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	(%) Recuperação	z - score do Laboratório
FAPAS 1730	9,10	84,7	1,5
FAPAS1733	13,73	102,0	2,0
FAPAS 1741	7,02	89,6	0,4
FAPAS 1747	4,35	103,9	0,2
RMMG - PI -02/08	4,27	106,5	1,1

Observando-se as variações na Tabela 9, tanto dos valores de recuperação de 89,50 a 105,10%, como para o z-score entre 0,17 e 1,40, todos abaixo de 2,0, nota-se uma boa performance dos analistas nos testes intralaboratoriais, o que possivelmente se refletiu no bom desempenho alcançado pelo Laboratório nos diversos testes de proficiência realizados interlaboratorialmente (Tabela 10).

Percebe-se ainda, que o Laboratório foi se aprimorando, do primeiro FAPAS que participou 1730 para o último 1747, pela avaliação dos diversos z-score

produzidos com redução de 1,5 para 0,2. Portanto, os resultados demonstram uma boa reprodutibilidade para o método.

O último dos parâmetros avaliados para a validação foi o de robustez, checada pela resposta analítica ao longo do tempo, feita pelo teste de estabilidade do padrão de OTA, mostrada na Figura 11.

O padrão e a solução de trabalho de $1,65 \mu\text{g Kg}^{-1}$ foram estocados sob condições de refrigeração (4°C). Observou-se pelas razões sinal (mV min^{-1}) x concentração padrão ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) que o padrão permaneceu estável por períodos acima de 2 anos com um CV = 9,84%, valor abaixo do aceito pela União Européia de 32% para a faixa de concentração de $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$. Portanto, o método foi considerado robusto.

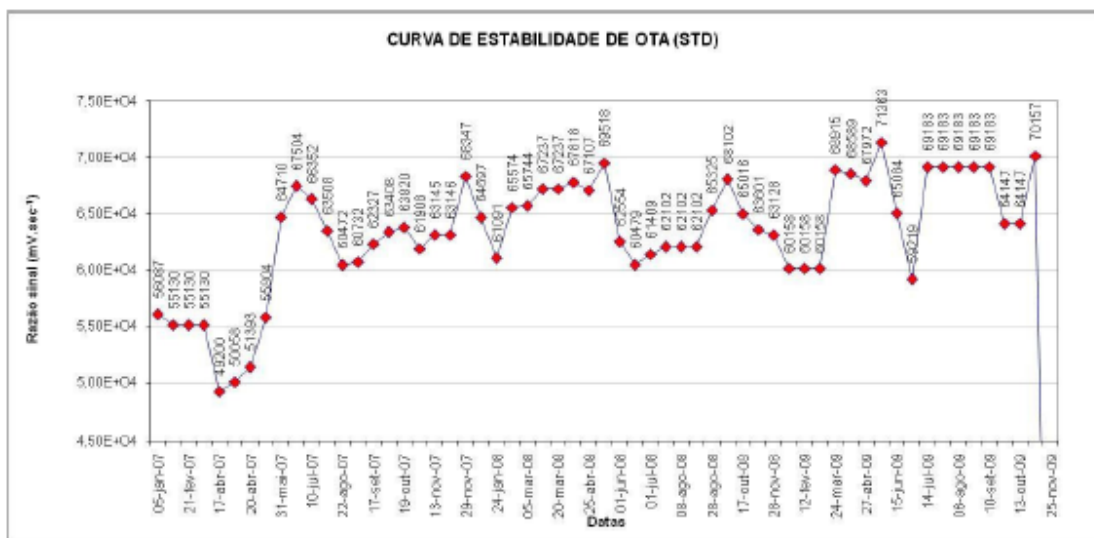


Figura 11 – Teste de robustez - Estabilidade do padrão de OTA seco (Sigma - Aldrich O-1877) diluído em solução de benzeno: ácido acético (99:1 v/v) ao longo de anos.

O processo de validação se completou com o cálculo da incerteza global preconizado pela Eurachem (ELLISON; ROSSLEIN; WILLIAMS, 2000) no EURACHEM/CITAC Guide CG 4 - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. A incerteza global do método, U, incluiu todos os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e limite de detecção, de forma a que o resultado final demonstrasse o erro associado ao método validado, pelo cálculo das incertezas associadas a cada uma das

etapas do método analítico, calculadas e expressadas em termos de desvio-padrão relativo, onde: U_1 - a incerteza na preparação dos padrões de OTA (dependente das diluições realizadas e material utilizado); U_2 -incerteza associada à reta de calibração; U_3 - incerteza associada à precisão; U_4 -incerteza associada à exatidão.

O valor da incerteza global encontrado para o método de OTA foi de 32,5%, valor considerado compatível com os encontrados em trabalhos internacionais que apresentam incertezas de 4,0 a 28,1% (RIBEIRO, 2007), cujo procedimento dos cálculos está apresentado detalhadamente (Anexo A).

4.6.2 Metodologia para Determinação dos Carboidratos Totais

As 15 amostras foram preparadas seguindo o procedimento da norma ISO 11292, conforme modificações propostas por Garcia et al. (2009). Uma quantidade de 0,3000 g foi pesada em base seca e transferida para um elermeyer com tampa rosquiável de 500 mL e uma solução de 50 mL de HCl 1,00 molL⁻¹ foi adicionada. O recipiente foi colocado em um banho-maria termostaticado mantido à 85 °C por 150 min. Após resfriamento a solução foi filtrada em papel de filtro faixa branca e coletada em balão volumétrico de 100,0 mL, completado com água ultrapura até a marca. Uma alíquota de 10,0 mL desta solução foi filtrada em Sep-Pak C18 (Waters), pré-condicionado com metanol e água e em membrana 0,22 um (GVWP 02500-Millipore), descartando os primeiros mililitros. O filtrado foi coletado em um frasco de 4 mL e submetido à análise cromatográfica.

Para a preparação da solução estoque de uma mistura de carboidratos, foram utilizados padrões certificados da Merck (Darmstadt, Alemanha), dessecados com Pentóxido de Fósforo, tendo sido pesados: 0,0030 g D(-) manitol; 0,0300 g D(-) arabinose; 0,1200 g D(+) galactose; 0,0450 g D(+) glicose; 0,0120 g D(+) xilose; 0,0900 g D(+) manose; 0,0450 g D(-) frutose, adicionados a um balão volumétrico de 100,00 mL usando água ultrapura do sistema Milli-Q® para completá-lo até a marca. Esta

solução foi posta no ultrassom por 10 minutos e mantida sob refrigeração. Para as análises uma diluição de 10 vezes foi feita a partir da solução estoque.

Para minimizar a contaminação da coluna com decréscimo de resolução por carbonato as fases móveis foram preparadas no dia da análise. As fases móveis de hidróxido de sódio $1,4 \text{ mmol L}^{-1}$ e $300,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foram preparadas de alíquotas extraídas do centro de uma solução certificada de NaOH 50% (*m/m*) (Fisher - $19,23 \text{ mol L}^{-1}$), e completadas com água ultrapura (Milli-Q[®]), filtradas através de membrana de $0,45 \mu\text{m}$ (HATF 04700 - Millipore), em sistema de filtração (Filterware[™] Labglass), desgaseificada pela aspensão de nitrogênio (99,997% -Linde) por 30 minutos.

O sistema instrumental aplicado consistiu de um cromatografo líquido inerte (PEEK) composto por: 2 frascos de fase móvel (2 litros HDPE Nalgene[®] com tampas); uma bomba de alta pressão inerte LC-10Ai - Shimadzu; uma válvula solenóide de baixa pressão de 3 vias NResearch - 1367-72; um circuito externo de chaveamento "lab-made"; uma válvula solenóide de alta pressão de 10 vias com ativação eletrônica VICI - C2-2340 EP ($20,0 \mu\text{L}$ loop); uma pré-coluna (CarboPac PA1 - Dionex) e uma coluna de troca aniônica CarboPac PA1 - (Dionex - $250 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$, $10 \mu\text{m}$ de polivinilestireno-divinilbenzeno, com ligações cruzadas, recoberta com amina quaternária); um forno de colunas - Waters, controlado por um controlador de temperatura CHX 650 - Pickering; e uma célula eletroquímica ED-50 - Dionex, composta por eletrodo de trabalho de ouro, eletrodo de referência Ag/AgCl em gel e contra-eletrodo; 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 com o programa GPES (General Purpose Electrochemical System) - Eco Chemie.

As condições analíticas adotadas foram: volume de injeção de $20,0 \mu\text{L}$, operando no modo isocrático com temperatura de 28°C , vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, com solução de NaOH $1,4 \text{ mmol L}^{-1}$, usada como eluente da corrida cromatográfica de 0 a 45 minutos. A solução de NaOH de $300,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi aplicada para regenerar a coluna de 45,1 a 57,5 minutos, removendo as impurezas retidas nos sítios ativos da coluna. Depois da regeneração, a solução de NaOH $1,4 \text{ mmol L}^{-1}$, foi novamente utilizada de

57,6 - 72,6 minutos, para reequilibrar a coluna, antes da próxima corrida cromatográfica. O Autolab age como detector, aplicando diferentes potenciais de oxidação e redução na célula eletroquímica ED-50, efetuando a leitura das correntes geradas, que são proporcionais a concentração dos carboidratos. A forma de onda amperométrica do pulso aplicado foi de + 0,25 V por 200 ms para a determinação do carboidrato; 0,75 V por 400 ms para a oxidação do ouro e - 0,15 V por 200 ms para a redução.

O padrão foi injetado após cada 2 injeções de amostras para quantificar e evitar qualquer alteração em função de modificações na superfície do eletrodo, que poderiam causar mudanças nas integrações dos picos.

A primeira injeção de cada dia foi desprezada, pela necessidade de que o sistema tem que realizar um ciclo completo.

4.6.3 Metodologia para Determinação de Cafeína

O método foi baseado na ISO 10095 (1992), método para determinação de cafeína em café utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para extração da cafeína pesou-se 3,0000 g de amostra e 6,00 g de óxido de magnésio pesado (Merck, Darmstadt, Alemanha) em um erlenmeyer de 500 mL, anotando o peso inicial do conjunto: erlenmeyer + amostra + óxido de magnésio, adicionando 100 mL de água destilada e fervendo a mistura por 15 minutos. Resfriou-se e pesou-se novamente o conjunto repondo a água perdida por evaporação completando-se até atingir 100 g acima do peso inicial. Filtrou-se o sobrenadante em membrana filtrante de 0,45 um e injetou-se no cromatógrafo líquido (LIMA; PEREIRA; ABRAHÃO, 2009).

4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os resultados foram avaliados através da técnica estatística de análise multivariada com aplicação do método de componentes principais, visando estabelecer relações e caracterizar as amostras através das variáveis estudadas. A análise das componentes principais (ACP) segue a associação entre as variáveis do trabalho, reduzindo a dimensionalidade da tabela dos dados, sendo isto acompanhado pela diagonalização da matriz de correlação dos dados. Desta forma, transforma as variáveis originais em variáveis ortogonais (não correlacionadas) chamadas de componentes principais (SCARMÍNIO, 1989).

Entre os métodos de reconhecimento de padrões, está o de análise de componentes principais, que são combinações lineares das variáveis originais. As novas variáveis são usadas para avaliar os dados através de algum tipo de projeção geométrica ou representação.

A solução multidimensional representa a configuração dos objetos em um gráfico, com tantos eixos quanto o número de descritores (variáveis) em estudo. Os descritores são usados para descrever ou qualificar os objetos e são características físicas, químicas ou biológicas do objeto de interesse. Neste estudo, as variáveis são as concentrações dos parâmetros analisados e os objetos são as 15 amostras de café cru estudada. Com a dimensionalidade reduzida, os novos eixos permitem uma representação ótima da maior variabilidade da matriz de dados multidimensional.

Neste momento a questão é definir quantas componentes poderiam ser eventualmente significantes na interpretação dos dados, uma vez que as componentes principais sucessivas correspondem a frações cada vez menores da variância total. De acordo com uma regra empírica (LEGENDRE, 1983), devem ser interpretadas somente aquelas correspondentes aos autovalores maiores do que a média dos mesmos. Os resultados foram avaliados através da técnica estatística de análise multivariada com aplicação da análise de componentes principais (ACP) empregando o programa MATLAB, versão 7.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO SENSORIAL E FÍSICO-QUÍMICA

As amostras de café cru de diferentes procedências selecionadas foram avaliadas por testes sensoriais de prova de xícara e tipo de defeitos, seguindo a classificação oficial do café brasileiro (COB) e os resultados desta caracterização estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Características das amostras de café cru de diferentes estados brasileiros, quanto ao tipo de bebida, defeitos, porcentagem de fundo/ impurezas e teor de umidade

Estado	Nº Amostra	TIPO DE BEBIDA					TIPO DE DEFEITOS														Total	F(%)	I(%)	UMIDADE (%)			
		Mole	Dura	Rio	Fiado	Rizoma	P	A	PV	V	M	Co	Cas	Cho	B	Q	Con	Paus	Pe	To							
SP	1							3		6				15	3	9	3							39	0,0	0,0	8,4
	13						6	48	12	12				6	66	24								174	0,0	0,0	9,0
	4						24	144	42	42			3	6	27	24								312			
	2						30	54	81	33			3	3	48	36	3		6					297	0,2	0,2	8,6
PR	6						18	9	18				6	12	6									69			
	7						63	30	15			6	12	6										132	0,0	0,0	8,5
	8						60	138	36			15	3	54	33	3								342	0,0	0,6	
	9						36	108	30				24	36	24									258			
ES	11						48	252	168	24			36	12	24	60			18					642	0,0	0,0	8,2
	12						3	48	45	3		3		12	69									183	0,2	0,0	8,0
	14							3						3										6	0,0	0,0	8,8
MG	10						12	258	72	12	6		9	12	84	12								477	0,0	0,1	7,0
	5						18		6					12	6									42			
	3						66	270	75	36	3	3	15	30	84									582			
	15						21	9	3				12		18									63	0,0	0,0	9,6
Soma						186	1251	792	318	12	0	89	123	345	477	21	0	24	0				3618				

P:preto; A:ardido; VP:verde-preto; V:verde; M:marinheiro; Co:coco; Cas:casca; Cho:chochos ou mal granados; B:brocado; Q: quebrado; Con:conchas; Paus; Pe:pedras; To:torrões; F:fundo; I:impurezas.

Das 15 amostras avaliadas sensorialmente, observando-se a Tabela 11, nota-se que praticamente a metade delas (8) apresentaram bebida de boa qualidade: 3 moles (1 de SP e 2 de MG) e 4 duras (todas do PR), enquanto, as outras sete amostras, foram de bebidas de má qualidade: rio/riada (3 do PR) e riozona (2 do ES e 2 de MG).

Embora, o ideal para efeito de comparação, seria ter os 4 tipos de bebidas, para uma mesma região; dos estados de São Paulo e do Espírito Santo, só foi possível conseguir 1 tipo de bebida, com amostras que se apresentaram com qualidades extremas, excelente (mole) e péssima (riozona), respectivamente. As amostras provenientes de Minas Gerais também apresentaram bebidas de qualidades extremas, contudo, deste pôde-se conseguir os 2 tipos de bebidas. As bebidas do Paraná, embora, também tenham sido dos 2 tipos, se encontraram em uma categoria intermediária, com qualidade boa (dura) e ruim (rio/riado).

Quanto aos defeitos, avaliando-se a incidência de ocorrência destes, observase pela Tabela 11, que os defeitos coco, paus e torrões não foram encontrados em nenhuma das amostras avaliadas, enquanto, o ardido teve um percentual de ocorrência de 100%, tendo sido observado nas 15 amostras analisadas. Seguido do ardido, os defeitos com maior incidência foram: o brocado e o verde, que aparecerem em 14 das 15 amostras, com 93,9%; o quebrado com 86,6% (13 em 15 amostras); e o verde-preto com 80%, ocorrendo em 12 das 15 amostras avaliadas.

Já em relação à quantidade dos defeitos (Tabela 11), o ardido aparece em 1º lugar com 1251 defeitos, considerando um total geral proveniente da soma de todos os defeitos para todas as amostras, que foi de 3618, o equivalente a 34,6% (Figura 12). É possível notar que o ardido se destaca aparecendo em quantidades significativas principalmente em algumas amostras de má qualidade de bebida rio, riado e riozona (amostras de nº 11 com 242 ardidos de um total de 642 defeitos (37,7%); nº 3 com 270 ardidos de um total de 582 defeitos (46,4%) e de nº 10 com 258 ardidos de 477 defeitos totais (54,1%)). Em 2º lugar em maior nº de defeitos, com praticamente metade dos defeitos do ardido, aparece o verde-preto com 792 defeitos (21,9%); seguido do quebrado com 477(13,2%); brocado com 345 (9,5%) e verde com 318 (8,8%).

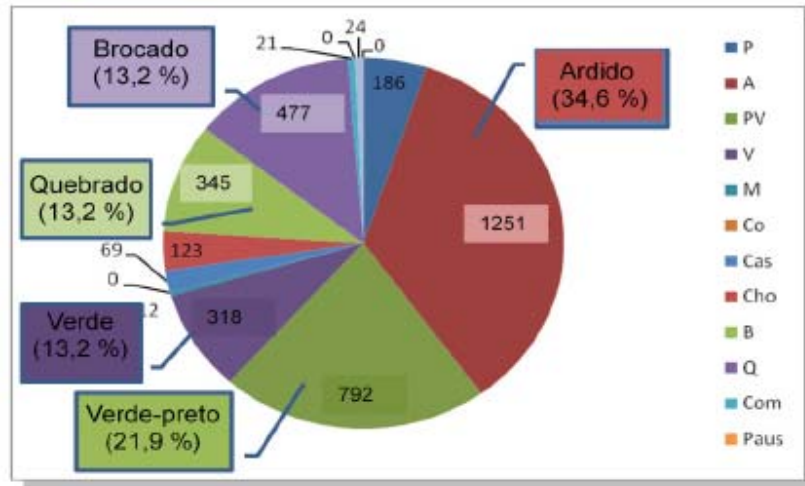


Figura 12 – Quantidade de defeitos nas 15 amostras de café cru avaliadas. P:preto; A:ardido; VP:verde-preto; V:verde; M:marinheiro; Co:coco; Cas:casca; Cho:chochos ou mal granados; B:brocado; Q: quebrado; Con:conchas; Paus; Pe:pedras; To:torrões. F:fundo; I:impurezas.

Observando este número total de defeitos foi possível notar que houve uma tendência mais definida nos extremos das qualidades, sendo que as melhores amostras de bebida mole foram as que apresentaram os menores números de defeitos, enquanto as piores, com bebida riozona, em geral, foram as que apresentaram os maiores número de defeitos, dados que concordam com a literatura, que apregoa uma relação direta da qualidade com o número de defeitos (FARAH et al.; 2006). Contudo, considerando as bebidas intermediárias, comparando os resultados para as bebidas de boa qualidade (dura) e de má qualidade (rio/riado) esta relação direta já não foi verificada, uma vez que um número elevado de defeitos foi observado tanto para amostras duras, como as de número 2 (297 defeitos) e 8 (342), quanto para amostras rio/riado, como as de número 4 (344) e 9 (258 defeitos).

Portanto, para efeito comparativo da bebida e dos defeitos com demais parâmetros analisados, foram considerados somente os defeitos pretos, ardidos e brocados, transpostos para uma Tabela geral de resultados (Tabela 18).

Com relação aos demais parâmetros apresentados na Tabela 11 estes parecem não ter interferido de forma significativa na qualidade da bebida, uma vez que os teores de umidade foram todos semelhantes para as amostras, em média de 8,5%,

variando de 7,0% (bebida riozona) a 9,6% (bebida dura) bem como, os cafés se apresentaram uniformes, com praticamente 0,0% de fundo e com baixos teores de impurezas, em sua maioria com 0,0%, apresentando 0,6% apenas para 1 das amostras.

5.2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA

A caracterização microbiológica foi feita pela observação dos fungos filamentosos plaqueados (Figura 13) empregados para a identificação dos gêneros encontrados para as 15 amostras analisadas, que estão apresentados na Tabela 12. Alguns isolados foram utilizados para identificação de espécie e caracterização molecular posterior, empregando técnicas de RAPD e seqüenciamento do DNAr.

Na Figura 13 é mostrado apenas um exemplar selecionado de cada tipo de bebida, para efeito de visualização do crescimento fúngico. Observando as placas fica nítido que as bebidas de boa qualidade, com poucos defeitos, apresentaram baixa contaminação por microrganismos, notada pelo baixo crescimento dos fungos (amostra A - bebida mole e amostra B - bebida dura) quando comparadas às amostras de bebida de má qualidade (amostra C - bebida rio/riada e amostra D -bebida riozona), que praticamente tomaram as placas.

Observando estas placas contaminadas foi possível notar a presença de fungos amarelos, identificados como da Seção *Circumdati*, e pretos da Seção *Nigri*, ambos capazes de produzir OTA. A identificação de fungos ocratoxigênicos em amostras de alimentos é demorada e exige um alto conhecimento da taxonomia do fungo.

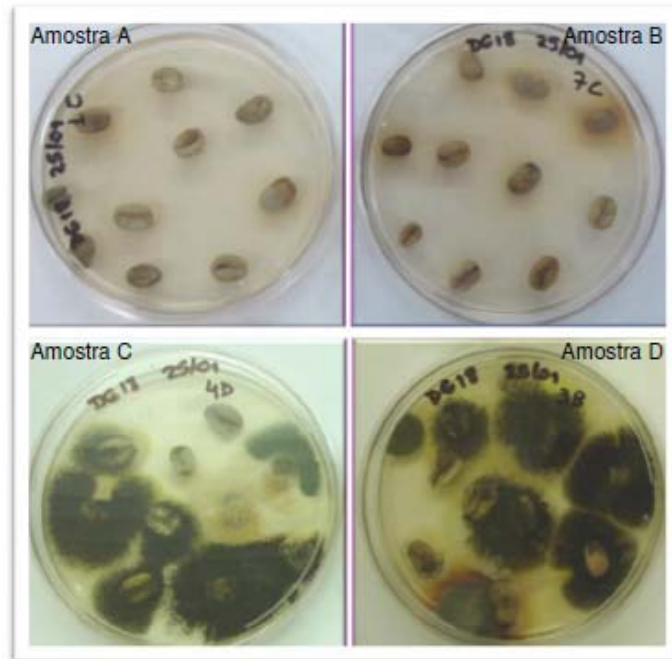


Figura 13 – Fungos filamentosos plaqueamento crescidos após incubação das amostras de café cru de bebida mole (amostra A); dura (amostra B); rio/riado (amostra C) e riozona (amostra D).

Tabela 12 – Controle de contaminação microbiológico com quantidade de grãos contaminados e tipos de fungos encontrados nas amostras de café cru de diferentes regiões incubadas em função do tipo da bebida.

Estado	Nº Amostra	TIPO DE BEBIDA					MICROBIOLOGIA									
		Mole	Dura	Rio	Riado	Riozona	Grãos contaminados/50	Circumdat	Cladosporium	Eurotium	Fusarium	Levedura	Mucorales	Nigr	Penicillium	Total
SP	1	■					6 em 50 (12%)			2	3	1	1	1		8
	13			■	■		50 em 50 (100%)	32	3	38	2	1	3	47		126
	4			■	■		50 em 50 (100%)	23		1	3		1	32	2	62
	2		■				44 em 50 (88%)	5		4				35		44
PR	6		■				31 em 50 (62%)			3	1			25		29
	7		■				3 em 50 (3%)			2				1		3
	8		■				12 em 50 (24%)	2						7		9
	9			■	■		24 em 50 (48%)			5			2	24		31
ES	11					■	46 em 50 (92%)			19				41		60
	12					■	49 em 50 (98%)			16				46		62
MG	14	■					46 em 50 (92%)	2		22	1			27		52
	10					■	28 em 50 (56%)			9			3	28		40
	5	■					15 em 50 (30%)	1		6	4			3		14
	3					■	48 em 50 (96%)		1	7			1	38		47
	15		■				45 em 50 (90%)	4		11				15		30
							Soma	69	4	145	14	2	11	370	2	617

Observando a Tabela 12, é possível verificar uma tendência de menor incidência de grãos contaminados por microrganismos nas bebidas de melhor qualidade, sendo que das 8 amostras, 5 (62,5%) apresentaram este comportamento. Já para as 7 amostras de má qualidade, 5 (71,4%) delas apresentaram alta contaminação (de 92% - 100%) e 2 delas - contaminação intermediária (48 e 56%).

Quanto à quantidade foram observados em menor número os *Penicillium* (2), leveduras (2), *Cladosporium* (4), *Mucurales* (11) e *Fusarium* (14), com predominância de ocorrência dos *Nigri* (59,9%); seguido dos *Eurotium* (23,5%) e dos da Seção *Circumdati* com 11,2%, aparecendo em 69 do total geral de 617.

Observa-se ainda pela Tabela 12, que em bebidas de má qualidade apareceram o *Cladosporium* (amostras de nº 13 e 3), a maioria dos *Mucurales* (amostras de nº 13, 4, 9, 10 e 3, exceto 1 identificado na amostra nº 1) e o *Penicillium* (amostra nº 4). Já a maioria dos *Fusarium* apareceu em amostras de bebida de boa qualidade (amostras de nº 1, 6, 14 e 4), porém, também foram encontrados para bebidas rio/riado nas amostras de nº 13 e 4, enquanto o *Circumdati* e o *Eurotium* predominam nas mesmas bebidas de má qualidade, porém aparecendo com menor incidência, também em bebidas de boa qualidade. Os *Nigri* apareceram em grande quantidade tanto nas bebidas de boa, como nas de má qualidade.

Não foi possível estabelecer relação entre o grau de umidade para os tipos de bebida e o desenvolvimento dos microrganismos, talvez pelos teores estarem abaixo dos 10%, preconizados na literatura para o desenvolvimento de alguns *Aspergillus* (PITT, 2000).

Para efeito comparativo dos resultados microbiológicos com outros parâmetros avaliados, apenas os fungos produtores de OTA, os da Seção *Circumdati* e *Nigri* foram considerados, sendo transpostos para a Tabela geral de resultados (Tabela 18).

Observado uma relação positiva maior entre os defeitos brocado, preto e ardido, com os microrganismos da Seção *Nigri* e *Cladosporium*, e menor com o *Mucurales* e o *Eurotium*, sendo negativa para a levedura, o que pode ser confirmado por imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV) feitas no Laboratório de Microscopia da UEL com níveis de ampliações diferentes para um grão de café ardido

da amostra de nº 10, Figura 14 (a) e 14(b), onde aparecem colônias de *Nigri* nas crateras, Figura 14(c).

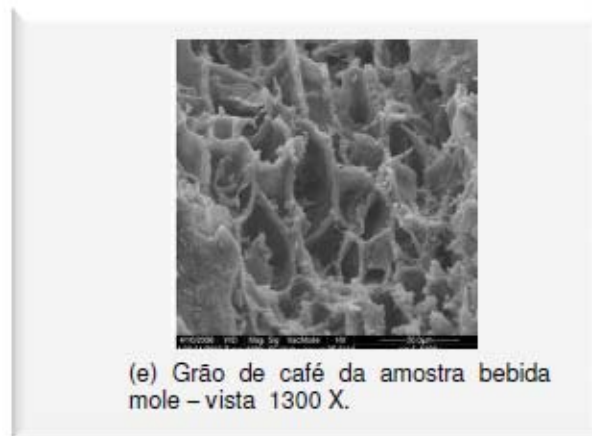
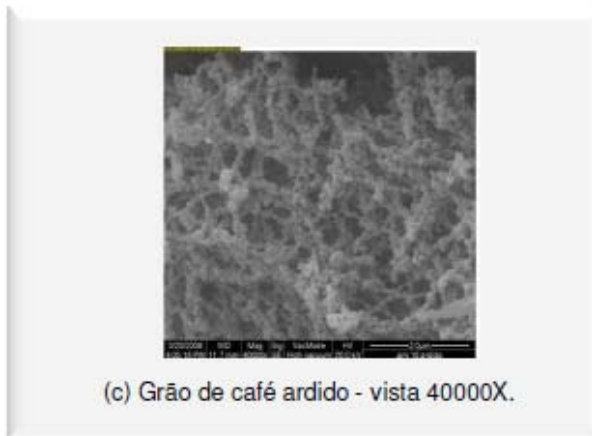
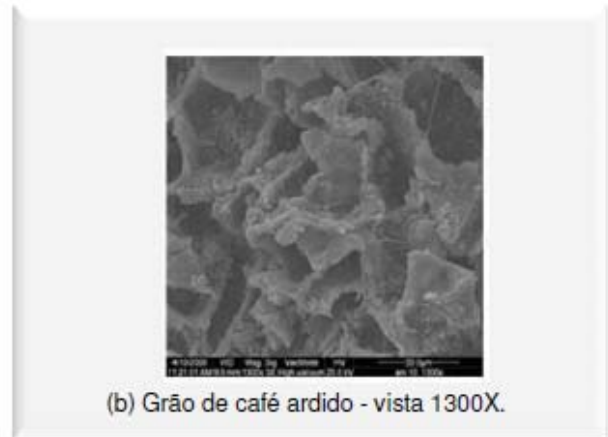


Figura 14 – Imagens do grão de café por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Um grão mais bem preservado, com menos orifícios, pode representar menos microrganismos e uma bebida de melhor qualidade, o que pode ser observado comparando-se o grão da amostra nº 10 (bebida riozona - Figura 14(a) e nº 5 (bebida mole - Figura 14(d), com as partes danificadas na mesma ampliação de 1300 vezes, formando crateras (Figuras 14(b) e 14(e), onde as suas crateras estão visivelmente menos contaminadas para a amostra nº 5 (Figura 14(f)) comparadas a Figura 14(c) onde podem ser vistos os *Nigri*.

O isolamento de fungos provenientes de grãos de café obtidos de 15 regiões distintas proporcionou a identificação morfológica de 617 isolados, representantes dos gêneros *Eurotium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e ordem *Mucorales*, além de alguns poucos representantes de leveduras (Tabela 12).

Dos 617 fungos isolados houve predomínio do gênero *Aspergillus* (439 isolados) o qual contém espécies produtores de OTA, com 370 isolados pertencentes à secção *Nigri* e 69 à secção *Circumdati*.

Em seguida, foi feita uma seleção morfológica de 69 isolados representantes pertencentes ao gênero *Aspergillus* (Tabela 13) dos quais 59 pertenciam à secção *Nigri* e 10 à secção *Circumdati*, para posterior análise de variabilidade genética por RAPD.

Segundo o perfil eletroforético obtido a partir da amplificação de RAPD, foi possível identificar 9 isolados representativos pertencentes à secção *Circumdati* como *A.westerdijkiae* e apenas 1 isolado como *A.ochraceus* através de comparação do perfil de RAPD de linhagens de *A.westerdijkiae* e *A.ochraceus* previamente caracterizadas por Fungaro et al., (2004) (Figura 15) resultados apresentados na Tabela 13.

Quanto aos isolados representativos da secção *Nigri* estes foram agrupados em dois grupos distintos (I e II) (Figura 16). Representantes dos grupos I e II foram amplificados gerando um produto de 595pb correspondente a região parcial do gene que codifica para a β -tubulina e posterior sequenciamento desta região. A análise da seqüência de nucleotídeos dos fragmentos amplificados permitiu a identificação da

maioria dos isolados no nível de espécie uma vez que a secção *Nigri* contém espécies produtoras e não produtoras de OTA em grãos de café.

A análise das sequências de nucleotídeos e construção de árvore filogenética (Figura 17) permitiu a identificação dos isolados do grupo I como *A.niger/lacticoffeatus*. Quanto aos isolados do grupo II a maioria foi identificado como *A.tubingensis*, espécie pertencente ao agregado niger, cujas espécies são morfologicamente indistinguíveis. A identificação ao nível de espécie do isolado UEL28 (grupo II) não foi possível devido ao fato de que os caracteres gerados pelo seqüenciamento da região parcial do gene que codifica para a β -tubulina, não foram suficientes para tal discriminação, mas foi possível observar que este isolado também pertence ao agregado niger, cuja taxonomia é complexa.

Os resultados de identificação molecular das espécies de fungos isoladas de grãos de café provenientes de 15 regiões distintas permitiram verificar a presença de espécies de *Aspergillus* potencialmente produtoras de OTA em todas as regiões, com maior freqüência das espécies *A.niger/lacticoffeatus*.

Tabela 13 – Identificação molecular de fungos isolados de grãos de café representantes de 15 regiões distintas.

Amostra 1	Espécie
UEL 102	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
Amostra 2	
UEL 2	<i>A.tubingensis</i>
UEL 3	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 6	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 8	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 9	<i>A.tubingensis</i>
UEL 10	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 11	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 13	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 14	<i>A.tubingensis</i>
Amostra 4	
UEL 62	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 64	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 67	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 74	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 77	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
Amostra 5	
UEL 120	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 126	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
Amostra 6	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 128	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 131	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 132	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 133	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 135	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 136	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 138	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 139	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
UEL 140	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
Amostra 7	
UEL 107	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
Amostra 8	
UEL 118	<i>A.niger/lacticofeatus</i>
Amostra 9	
UEL 22	<i>A.niger/lacticofeatus</i>

UEL 24	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 26	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 27	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 28	<i>Agregado niger</i>
UEL 29	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 31	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 32	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 36	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
Amostra 10	
UEL 45	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 46	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 50	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
Amostra 11	
UEL 11.03	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 11.07	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 11.12	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 11.18	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 11.25	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 11.31	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
Amostra 12	
UEL 12.01	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 12.07	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 12.17	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 12.33	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 12.41	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
Amostra 13	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 13.02	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 13.05	<i>A. westerdijkiae</i>
UEL 13.09	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 13.11	<i>A. westerdijkiae</i>
UEL 13.16	<i>A. westerdijkiae</i>
UEL 13.24	<i>A. westerdijkiae</i>
UEL 13.28	<i>A. westerdijkiae</i>
UEL 13.33	<i>A. westerdijkiae</i>
Amostra 14	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 14.02	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
Amostra 15	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 15.01	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 15.02	<i>A. westerdijkiae</i>
UEL 15.03	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 15.04	<i>A. westerdijkiae</i>
UEL 15.06	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 15.09	<i>A. westerdijkiae</i>
UEL 15.12	<i>A. ochraceus</i>
UEL 15.11	<i>A. niger/lacticofeatus</i>
UEL 15.15	<i>A. niger/lacticofeatus</i>

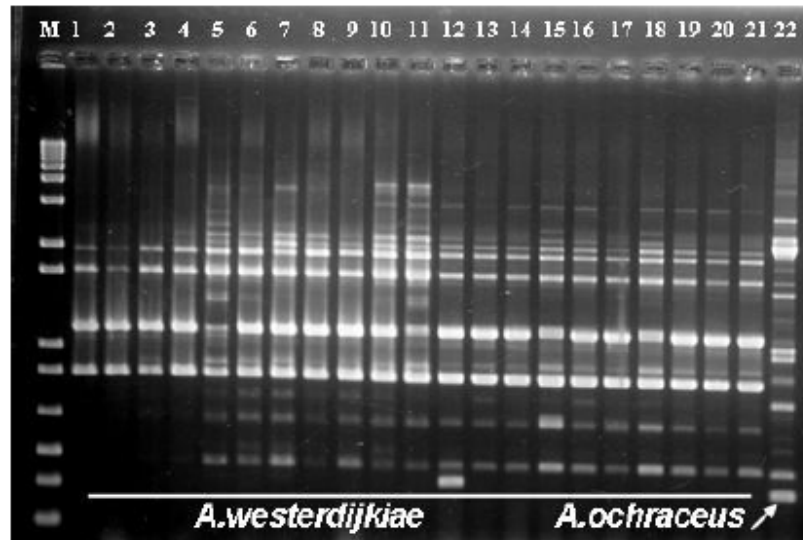


Figura 15 – Amplificação de DNA polimórfico de isolados de *A.westerdijkiae* (Linhas 1 – 21) e isolados de *A.ochraceus* (Linha 22). As amplificações foram feitas com auxílio do *primer* OPX-7. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular – Ladder DNA 1 Kb plus (Invitrogen).

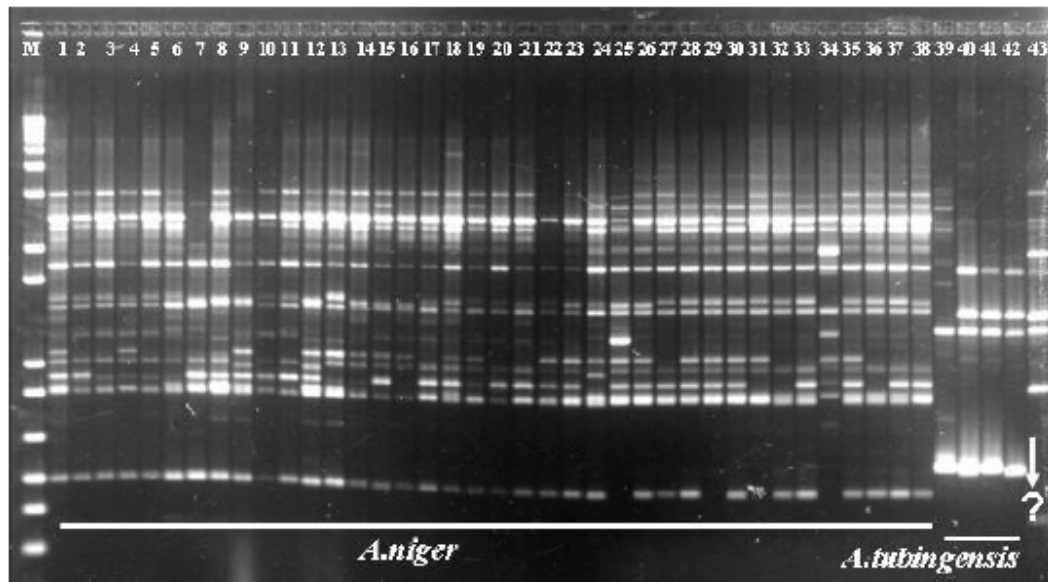


Figura 16 – Amplificação de DNA polimórfico de isolados de *A.niger/lacticofeatus* (Linhas 1 – 38), isolados de *A.tubingensis* (Linhas 39 – 42) e isolado pertencente ao Agregado *niger* (Linha 43). As amplificações foram feitas com auxílio do *primer* OPX-7. A linha M corresponde ao marcador de peso molecular – Ladder DNA 1 Kb plus (Invitrogen).

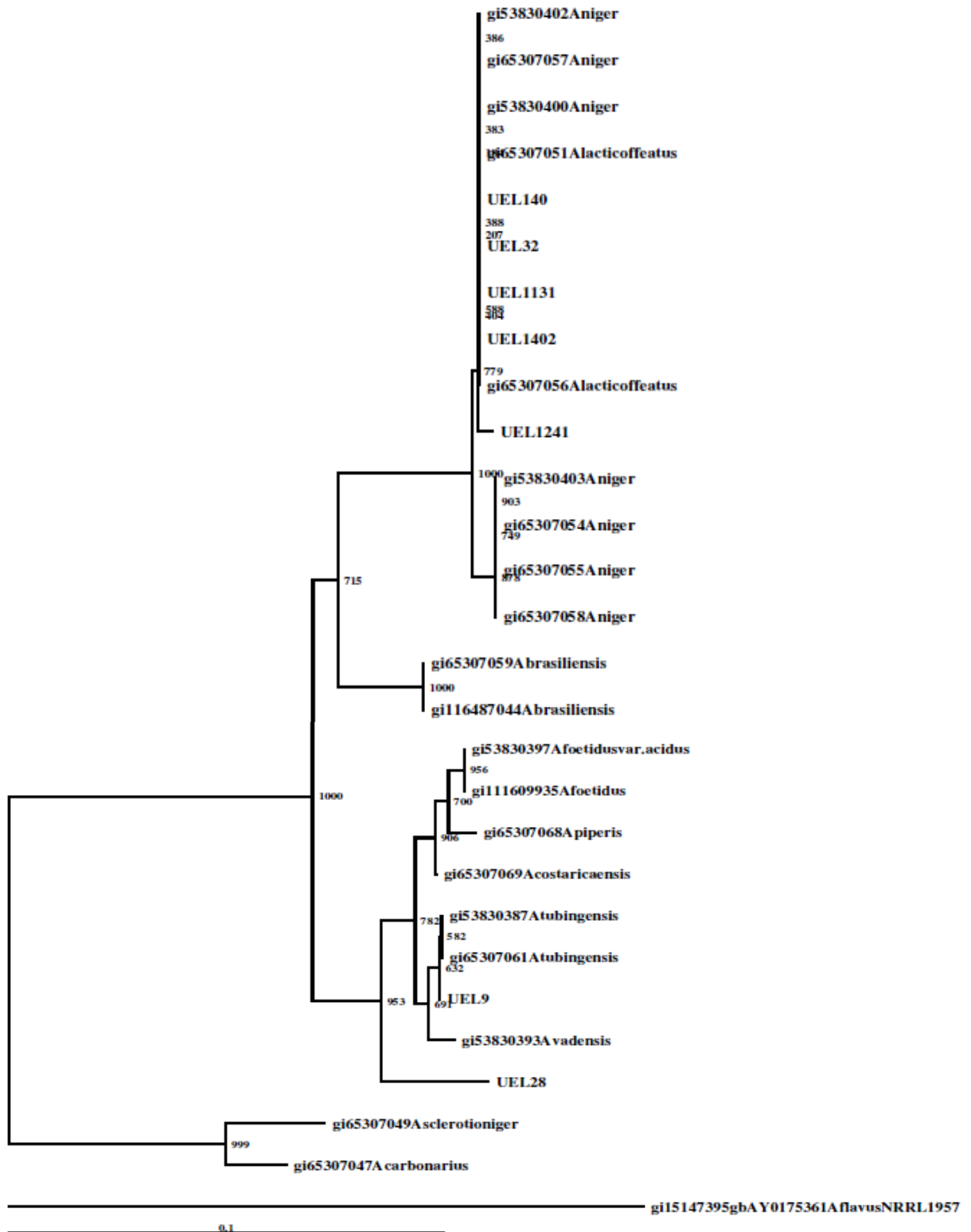


Figura 17 – Árvore filogenética de isolados de *Aspergillus* baseada nas sequências de nucleotídeos de parte do gene da β -tubulina. Os números situados nas ramificações correspondem aos valores de *bootstrap* (%) gerados pelo programa CLUSTAL X 1.6.

No café, Ocratoxina "A" é principalmente produzida pelos *Aspergillus westerdijkiae*, *steynii*, *ochraceus* e *carbonarius*, com um pequeno número de isolados de *Aspergillus niger* (FRISVAD et al., 2006; PARDO et al., 2004; TANIWAKI et al., 2003).

A contaminação do café pelos fungos pode ocorrer durante o processo de colheita que os grãos caem no solo e se adquirirem elevados teores de umidade durante o processo de secagem e armazenamento (BUCHELI; TANIWAKI, 2002; PARDO et al., 2004; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004).

Uma atenção especial foi dada para verificar a contaminação das amostras por OTA em função dos microrganismos produtores, uma vez que a produção de micotoxina afeta diretamente a qualidade.

5.3 DETERMINAÇÃO DA OTA POR HPLC- FL EM CAFÉ VERDE

As determinações dos teores de OTA para as 15 amostras de café verde de bebidas distintas foram realizadas pelo método validado, conforme descrito, em quadruplicata por 2 analistas e estão apresentadas na Tabela 14. Os resultados foram expressos pela média das análises (1^ª e 2^ª analista), com os coeficientes de variação (CV) decorrentes da aplicação do método, tendo sido feito na seqüência, a média das 2 determinações, para se obter o valor final de OTA e verificar por meio do CV, as variações entre as 2 amostragens

Tabela 14 – Teores de OTA para as 15 amostras de café verde de distintas bebidas e procedência

Estado	Nº Amostra	TIPO DE BEBIDA					OTA				OTA*				OTA(μgKg^{-1})	
		Mole	Dura	Rio	Riado	Riozona	1ª analista	2ª analista	média \pm d.p.	CV(%)	1ª analista	2ª analista	média* \pm d.p.	CV*(%)	média \pm d.p.	CV(%)
SP	1						n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	-
	13						7,88	7,90	7,89 \pm 0,01	0,18	10,04	10,16	10,10 \pm 0,08	0,84	9,00 \pm 1,11	12,29
	4						0,35	0,41	0,38 \pm 0,04	11,16	0,39	0,36	0,38 \pm 0,02	5,66	0,38 \pm 0,02	6,32
	2						3,36	3,40	3,38 \pm 0,03	0,84	7,87	7,96	7,92 \pm 0,06	0,80	5,65 \pm 2,27	40,16
PR	6						n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	-
	7						n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	-
	8						n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	-
	9						0,54	0,54	0,54 \pm 0,00	0,00	0,60	0,60	0,60 \pm 0,00	0,00	0,57 \pm 0,03	5,26
ES	11						12,38	12,39	12,38 \pm 0,01	0,06	12,59	12,59	12,59 \pm 0,00	0,00	12,49 \pm 0,10	0,82
	12						0,68	0,73	0,70 \pm 0,04	5,01	0,73	0,79	0,73 \pm 0,09	12,68	0,72 \pm 0,05	7,03
MG	14						0,62	0,70	0,66 \pm 0,06	8,57	0,62	0,66	0,64 \pm 0,03	4,42	0,65 \pm 0,03	5,10
	10						2,76	2,79	2,77 \pm 0,02	0,76	0,96	0,96	0,96 \pm 0,00	0,00	1,87 \pm 0,91	48,60
	5						0,54	0,56	0,55 \pm 0,01	2,57	0,69	0,67	0,68 \pm 0,01	2,08	0,62 \pm 0,07	10,69
	3						5,10	5,12	5,11 \pm 0,01	0,27	3,65	3,67	3,66 \pm 0,01	0,38	4,39 \pm 0,73	16,53
	15						0,88	0,88	0,88 \pm 0,00	0,00	0,81	0,81	0,81 \pm 0,00	0,00	0,85 \pm 0,04	4,14

*2ª análise

Os resultados obtidos nos processos de validação, de acordo com os parâmetros descritos, e os baixos valores de CV apresentados para 2 analistas diferentes (1ª e 2ª), variando de 0,00 a 12,68%, mostrados na Tabela 14, nos permitem concluir que o método foi apropriado para análise de OTA em quantidades traço.

A combinação de todas as variáveis, em suas diferentes etapas do processo analítico, nos leva à conclusão de que o procedimento completo, desde a coleta da amostra até a obtenção dos resultados experimentais, em especial a amostragem do café cru, é bastante complexa, uma vez que um único grão contaminado por micotoxina pode contribuir de forma significativa para a concentração final obtida, o que pode ser observado pelo CV entre as 2 determinações, que variou de 0,83 a 48,60%, sendo maior para a amostras que apresentaram-se contaminadas por OTA, como mostrado na Tabela 14. Esta afirmativa concorda com dados da literatura

que associam como maior fonte de erros a amostragem, sendo atribuída a ela uma variância de 75,7%, enquanto a subamostragem contribuiria com 15,9%, e a variância devida à análise seria de apenas 8,6%, de forma que, quanto maior for a amostragem, maior sua representatividade e menor sua variância (WHITAKER,1995; 1972).

Na Tabela 14 foram destacados em outra coloração todos os resultados que apresentaram valores dos teores de OTA acima dos permitidos pela legislação da EC ($> 5,00 \mu\text{gKg}^{-1}$) e os coeficientes de variação maiores que os apregoados como aceitáveis pela ANVISA (15%).

É preciso se ressaltar que estes valores ainda dependem do teor em que o componente analisado se encontra no alimento (SOARES, 2001), que pode ser descrito segundo Horwitz et al. (1980) pela equação: $\text{CV} (\%) = 2^{(1-0,5 \log C)}$, onde a concentração C é expressa como potência de 10. Como exemplo tem-se para 1 ppm = $10^{-6} \text{ g Kg}^{-1}$ um CV = 16%, lembrando que em quantidade traço um CV de 21% é considerado aceitável, pois as variações tendem a ser maiores quanto menores as concentrações que estão sendo medidas.

Outra observação importante está no fato de que, apesar de terem sido encontrados CV de valores elevados como: 16,53% para amostra de nº 3; 40,15% para amostra de nº 2 e 48,60% para amostra de nº 10, estes foram encontrados na média entre 2 amostragens, sugerindo dificuldades na tomada de amostras representativas, e não necessariamente, problemas de metodologia, visto que os CV entre 1ª e a 2ª análises, ficou na grande maioria das análises abaixo dos 5,0%, valor considerado aceitável para uma boa determinação analítica. Embora o valor de 48,60% a princípio pareça elevado, ainda sim, é considerado bem abaixo dos 150% obtidos para análise similares como da micotoxina Aflatoxina em amendoim (WHITAKER,1995). No caso desta amostragem em particular, devido à dificuldade da obtenção das amostras de bebida de má qualidade de diferentes estados na mesma safra, praticamente toda a amostra disponível foi utilizada.

Observando os resultados de teores da Tabela 14, nota-se que das 15 amostras analisadas, na média três amostras apresentaram níveis de OTA acima do permitido (amostras de nº 13, 2 e 11), enquanto a amostra nº 3, apresentou em uma análise em duplicata um nível um pouco acima ($5,11 \mu\text{g Kg}^{-1}$), enquanto sua 2ª

amostragem apresentou um valor mais baixo de $3,66 \mu\text{g Kg}^{-1}$, e que a amostra de nº 2, a 1ª amostragem também ficou abaixo do nível aceitável ($3,38 \mu\text{g Kg}^{-1}$), enquanto a 2ª apresentou um valor praticamente o dobro ($7,92 \mu\text{g Kg}^{-1}$), o que elevou a média para $5,65 \mu\text{g Kg}^{-1}$. Considerando o tipo da bebida, observa-se que as duas amostras que excederam o limite de OTA são de má qualidade, uma amostra rio/riada e outra riozona, sendo a amostra 3 também riozona. A amostra de nº 2, apesar de ser bebida dura, quando se observa na Tabela 12, é possível notar que esta apresentava 88% de grãos contaminados por fungos, o que sugere uma explicação de que na 2ª amostragem tenham sido tomados mais grãos contaminados para a análise do que não contaminados (1ª análise).

Para uma melhor visualização dos teores de OTA em função da qualidade das bebidas somente os valores médios foram transpostos da Tabela 14 para mais resumida (Tabela 15). E para efeito comparativo com os demais parâmetros analisados, estes foram transpostos para uma Tabela geral de resultados (Tabela 18).

Tabela 15 – Grau de contaminação por OTA em função do tipo da bebidas das 15 amostras de café.

Tipo de bebida	Nº Total de amostras	Nº de amostras contaminadas	(%) de amostras contaminadas	Grau médio do nível de contaminação por OTA ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)
Mole	3	2	50	n.d; 0,62; 0,65
Dura	5	2		n.d; n.d; n.d; 0,85; 5,65
Rio/Riada	3	3	100	0,38; 0,57; 9,00
Riozona	4	4		0,72; 1,87; 4,38; 12,49

Na Tabela 15 é possível observar que das 15 amostras analisadas, o teor de OTA ficou abaixo do limite de detecção para 4 amostras (mole e dura) e foi maior que o limite permitido de $5,0 \mu\text{g Kg}^{-1}$, para 3 outras amostras, das quais a maioria era de bebida rio/riado e riozona. Considerando a incidência de contaminação por OTA, apenas 50% das amostras de bebida boa estavam contaminadas, enquanto para as de má qualidade este percentual atingiu 100%. Quanto ao teores também se observa uma tendência de elevação da boa para má qualidade de bebida, com concentrações de OTA variando de valores não detectáveis à $12,49 \mu\text{g Kg}^{-1}$. Das amostras que

apresentaram teores acima dos aceitáveis pela legislação, observa-se que todas apresentavam grandes quantidades de fungos da Seção *Nigri*, potenciais produtores de OTA.

Estes índices contribuem para estabelecer correlações entre a qualidade da bebida do café e os atributos químicos e microbiológicos.

Como último atributo químico, estudou-se a composição dos carboidratos, para verificar sua possível influência na qualidade da bebida.

5.4 DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS POR HPAEC-PAD

Avaliou-se o teor dos carboidratos totais contidos nas 15 amostras de café cru das distintas bebidas por HPAEC-PAD, por método validado por Garcia et al. (2009) e os resultados encontram-se na Tabela 16.

A Figura 18 apresenta o cromatograma das análises dos carboidratos de um padrão e de uma amostra de café cru de cada tipo de bebida mole, dura, rio/riado e riozona.

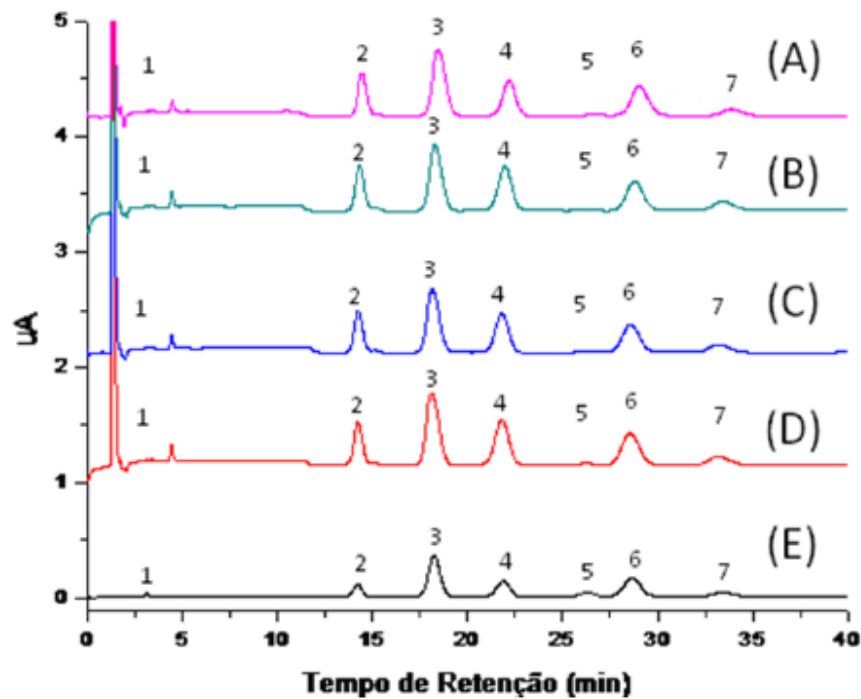


Figura 18 – Cromatogramas de carboidratos utilizando o método HPAEC-PAD obtidos para café arábica verde de distintas bebidas sobrepostos: (A) riozona, (B) rio/riado, (C) dura, (D) mole, (E) padrão. Picos: (1) Manitol, (2) Arabinose, (3) Galactose, (4) Glicose, (5) Xilose, (6) Manose e (7) Frutose. Fase móvel – isocrático: NaOH 1,4 mmol L⁻¹ (eluente: 0 – 45 min e re-equilíbrio: 57,6 – 72,6 min) e NaOH 300 mmol L⁻¹ (regeneração: 45,1 - 57,5 min). Vazão: 1,0 mL min⁻¹; vol. injeção: 20,0 µL; pré-coluna e coluna: CarboPac PA-1 à T: 28°C; forma do pulso amperométrico - ED-50-Au: +0,25 V (200 ms); +0,75 V (400 ms) e -0,15 V(200 ms).

Tabela 16 – Teores de carboidratos totais determinados nas 15 amostras de café cru

Estado	Nº Amostra	TIPO DE BEBIDA					CARBOIDRATOS (%) (m/m)						
		Mole	Dura	Rio	Riado	Riozona	Manitol	Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose	Manose	Frutose
SP	1						0,01	3,47	7,53	4,08	0,15	5,29	2,84
	13						0,01	3,69	6,69	3,94	0,17	4,73	2,95
	4						0,02	3,03	6,09	3,71	0,18	4,23	2,29
PR	2						0,01	3,61	7,18	3,57	0,18	5,16	2,35
	6						0,02	3,33	6,29	3,90	0,14	4,57	2,86
	7						0,01	3,57	6,56	3,77	0,16	4,44	2,80
	8						0,02	3,48	6,33	3,58	0,24	4,39	2,68
	9						0,01	3,64	6,96	3,75	0,20	4,94	2,62
ES	11						0,01	3,50	6,37	2,76	0,14	4,62	1,89
	12						0,01	3,52	7,00	3,41	0,17	4,89	2,44
MG	14						0,01	3,60	6,55	4,00	0,14	4,71	3,10
	10						0,01	3,49	6,70	2,88	0,16	4,44	2,09
	5						0,08	3,32	6,94	4,20	0,14	4,89	2,85
	3						0,02	2,85	4,07	2,88	0,13	2,56	2,07
	15						0,02	3,23	6,46	3,87	0,18	4,51	2,91

Observando os cromatogramas da Figura 18 e os resultados da Tabela 16, nota-se que os 7 carboidratos foram encontrados nas amostras de café cru. Para efeito de facilitar a visualização e análise dos dados, agrupou-se quanto ao tipo de bebida, considerando um valor médio dos teores de cada carboidrato apresentado na Tabela 16, reportando-os na Tabela 17.

Tabela 17 – Teores médios para os carboidratos das bebidas mole, dura, rio/riado e riozona.

Nº	TIPO DE BEBIDA					CARBOIDRATOS (%) (m/m)							
	Amostras	Mole	Dura	Rio	Riado	Riozona	Manitol	Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose	Manose	Frutose
3						0,03	3,47	7,01	4,09	0,14	4,96	2,93	
5						0,02	3,45	6,56	3,74	0,18	4,61	2,72	
3						0,01	3,45	6,58	3,80	0,18	4,63	2,62	
4						0,01	3,34	6,04	2,98	0,15	4,13	2,12	
						Média	0,02	3,43	6,55	3,65	0,16	4,58	2,60
						DP	0,01	0,06	0,40	0,47	0,02	0,34	0,34
						CV(%)	52,30	1,71	6,08	12,96	11,64	7,51	13,16

Na Tabela 17 é possível observar que os maiores teores de carboidratos no café verde foram os de galactose (6,55%) e manose (4,58%), com uma quantidade expressiva de arabinose (3,43%), o que concorda qualitativamente com o esperado, uma vez que o fruto é descrito como sendo composto predominantemente por galactomananos, que geram ao ser hidrolisados galactose e manose, bem como, por arabinogalactanos, que geram arabinose e mais galactose. Quanto aos dados quantitativos, os mesmos são escassos na literatura e discordantes. Também se observa que os teores variaram pouco de um tipo de bebida para outro, expressos pelos baixos CV de 1,71% para a arabinose, 6,08% para a galactose, e 7,51% para a manose, fato este possivelmente explicado por serem polissacarídeos de parede celular e portanto, estarem menos disponíveis para degradação microbiológica pelos fungos.

Já os carboidratos glicose e frutose, formados a partir da hidrólise da sacarose, também aparecem em quantidades apreciáveis com 3,65% e 2,60%, respectivamente. Porém, nota-se que os mesmos sofreram uma maior variação, com CV bastante próximos entre si, de 12,96% para a glicose e 13,16% para frutose. Observando os teores de glicose e frutose, é possível perceber que houve uma tendência de redução destes carboidratos da bebida de boa qualidade para a de má

qualidade. Esta variação foi menor na faixa intermediária (bebidas dura e rio/riado) e maior nos extremos, comportamento já observado no estudo anterior, apresentado uma redução significativa de 27,14% para a glicose, com teores de 4,09% (bebida mole) á 2,98% (bebida riozona). Redução semelhante de 27,65% também foi observada para a frutose, esta redução é explicada pela quantidade dos defeitos ardidos e pretos presentes nestas amostras (Tabela 11).

Os carboidratos que apresentaram os menores teores foram o manitol com média de 0,02% e a xilose com 0,16%. As grandes variações observadas neste caso com CV de 11,64% para a xilose e 52,30% devem ser atribuídas às baixas concentrações destes carboidratos na matriz café.

Para efeito comparativo das qualidades das bebidas e do teor dos carboidratos com os demais parâmetros analisados, somente os teores de glicose e frutose foram transpostos para uma Tabela geral de resultados (Tabela 18).

Tabela 18 - Tabela geral de resultados sensoriais, físico-químicos, microbiológicos e químicos para as 15 amostras de café verde.

CARACTERIZAÇÃO		SENSORIAL					FÍSICO-QUÍMICA					MICROBIOLÓGICA							QUÍMICA			
Estado	Nº Amostra	TIPO DE BEBIDA					TIPO DE DEFETOS					CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO POR FUNGOS							OTA (ng/ g)	CARBOIDRATOS(%)		
		Mole	Dura	Fio	Fiado	Fiozona	Preto(Nº)	Ardido(Nº)	Brocado(Nº)	Ardido(%)	Total(Nº)	Graos(Nº)/50	Graos(%)	Circundati(Nº)	Eurotium(Nº)	Nigri(Nº)	Circundati(%)	Nigri(%)		Total(Nº)	Glicose	Frutose
SP	1							<u>3</u>	<u>3</u>	<u>7,7</u>	<u>39</u>	<u>6</u>	<u>12,0</u>		<u>2</u>	<u>1</u>	<u>0,0</u>	<u>12,5</u>	<u>8</u>	n.d.	<u>4,08</u>	<u>2,84</u>
PR	13						<u>6</u>	<u>48</u>	<u>66</u>	<u>27,6</u>	<u>174</u>	<u>50</u>	<u>100,0</u>	<u>32</u>	<u>38</u>	<u>47</u>	<u>25,4</u>	<u>37,3</u>	<u>126</u>	<u>9,00</u>	<u>3,94</u>	<u>2,95</u>
	4						<u>24</u>	<u>144</u>	<u>27</u>	<u>46,2</u>	<u>312</u>	<u>50</u>	<u>100,0</u>	<u>23</u>	<u>1</u>	<u>32</u>	<u>37,1</u>	<u>51,6</u>	<u>62</u>	<u>0,38</u>	<u>3,71</u>	<u>2,29</u>
	2						<u>30</u>	<u>54</u>	<u>48</u>	<u>18,2</u>	<u>297</u>	<u>44</u>	<u>88,0</u>	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>35</u>	<u>11,4</u>	<u>79,5</u>	<u>44</u>	<u>5,65</u>	<u>3,57</u>	<u>2,35</u>
	6							<u>18</u>	<u>12</u>	<u>26,1</u>	<u>69</u>	<u>31</u>	<u>62,0</u>		<u>3</u>	<u>25</u>	<u>0,0</u>	<u>86,2</u>	<u>29</u>	n.d.	<u>3,90</u>	<u>2,86</u>
	7							<u>63</u>	<u>6</u>	<u>47,7</u>	<u>132</u>	<u>3</u>	<u>6,0</u>		<u>2</u>	<u>1</u>	<u>0,0</u>	<u>33,3</u>	<u>3</u>	n.d.	<u>3,77</u>	<u>2,80</u>
	8							<u>60</u>	<u>54</u>	<u>17,5</u>	<u>342</u>	<u>12</u>	<u>24,0</u>	<u>2</u>		<u>7</u>	<u>22,2</u>	<u>77,8</u>	<u>9</u>	n.d.	<u>3,58</u>	<u>2,68</u>
	9							<u>36</u>	<u>36</u>	<u>14,0</u>	<u>258</u>	<u>24</u>	<u>48,0</u>		<u>5</u>	<u>24</u>	<u>0,0</u>	<u>77,4</u>	<u>31</u>	<u>0,57</u>	<u>3,75</u>	<u>2,62</u>
ES	11						<u>48</u>	<u>252</u>	<u>24</u>	<u>39,3</u>	<u>642</u>	<u>46</u>	<u>92,0</u>		<u>19</u>	<u>41</u>	<u>0,0</u>	<u>68,3</u>	<u>60</u>	<u>12,49</u>	<u>2,76</u>	<u>1,89</u>
	12							<u>3</u>	<u>12</u>	<u>1,6</u>	<u>183</u>	<u>49</u>	<u>98,0</u>		<u>16</u>	<u>46</u>	<u>0,0</u>	<u>74,2</u>	<u>62</u>	<u>0,72</u>	<u>3,41</u>	<u>2,44</u>
MG	14							<u>3</u>	<u>3</u>	<u>50,0</u>	<u>6</u>	<u>46</u>	<u>92,0</u>	<u>2</u>	<u>22</u>	<u>27</u>	<u>3,8</u>	<u>51,9</u>	<u>52</u>	<u>0,65</u>	<u>4,00</u>	<u>3,10</u>
	10						<u>12</u>	<u>258</u>	<u>12</u>	<u>54,1</u>	<u>477</u>	<u>28</u>	<u>56,0</u>		<u>9</u>	<u>28</u>	<u>0,0</u>	<u>70,0</u>	<u>40</u>	<u>1,87</u>	<u>2,88</u>	<u>2,09</u>
	5							<u>18</u>	<u>12</u>	<u>42,9</u>	<u>42</u>	<u>15</u>	<u>30,0</u>	<u>1</u>	<u>6</u>	<u>3</u>	<u>7,1</u>	<u>21,4</u>	<u>14</u>	<u>0,62</u>	<u>4,20</u>	<u>2,85</u>
	3						<u>66</u>	<u>270</u>	<u>30</u>	<u>46,4</u>	<u>582</u>	<u>48</u>	<u>96,0</u>		<u>7</u>	<u>38</u>	<u>0,0</u>	<u>80,9</u>	<u>47</u>	<u>4,39</u>	<u>2,88</u>	<u>2,07</u>
	15							<u>21</u>		<u>33,3</u>	<u>63</u>	<u>45</u>	<u>90,0</u>	<u>4</u>	<u>11</u>	<u>15</u>	<u>13,3</u>	<u>50,0</u>	<u>30</u>	<u>0,85</u>	<u>3,87</u>	<u>2,91</u>

Observa-se pelos resultados da Tabela 18, que as relações entre as variáveis ficaram mais evidenciadas nas qualidades de bebida extremas - boa (mole) e má (riozona), quando comparadas às intermediárias dura e rio/riado. Para as amostras de bebida mole foram observados um menor número de defeitos, uma menor contaminação microbiológica, com menores teores de OTA e maiores teores dos carboidratos glicose e frutose, em relação à riozona, o que pôde ser confirmado pela análise estatística multivariada, através da Análise de Componentes Principais (ACP) mostrada nas Figuras 19 e 22, pelos dendrogramas Figuras 20 e 21 e pela matriz de correlação entre as variáveis apresentada na Tabela 20.

Os tratamentos estatísticos de ACP e de similaridade entre variáveis e amostras (dendrogramas) foram feitos utilizando o software de simulação matemática MATLAB versão 7.7.0.471(R2008 b). A matriz de dados da Tabela 18 gerou os autovalores e variâncias iniciais mostrados na Tabela 19.

Tabela 19 – Variância total explicada para o conjunto de dados. São consideradas as componentes principais com autovalores maiores que 1,0.

Componente	Autovalores iniciais			Variâncias iniciais		
	Total	% Variância	Acumulado %	Total	% Variância	Acumulado %
1	6,711	47,936	47,936	6,711	47,936	47,936
2	3,399	24,276	72,212	3,399	24,276	72,212
3	1,448	10,344	82,556	1,448	10,344	82,556
4	,750	5,357	87,913			
5	,635	4,539	92,452			
6	,507	3,622	96,074			
7	,252	1,800	97,874			
8	,128	,914	98,787			
9	,089	,635	99,423			
10	,040	,284	99,706			
11	,022	,156	99,862			
12	,013	,095	99,957			
13	,006	,041	99,998			
14	,000	,002	100,000			

Das 14 componentes da Tabela 19, as três primeiras componentes principais geradas, com autovalor maior que 1,0, explicam em conjunto 82,55% da variância total do conjunto de dados (PC1 = 47,936%, PC2 = 24,276% e PC3 = 10,344%).

A Figura 19 mostra os *scores* e os *loadings* obtidos pelos autovalores das Equações (6) e (7) como projeções das variáveis nas coordenadas do gráfico de componentes principais (PCs) para as componentes 1 e 2, que juntas explicam 72,2% da variância total do conjunto de dados. Neste gráfico destaca-se a formação de quatro grupos, baseando-se na análise hierárquica, mostrada no dendrograma de similaridade para as amostras da Figura 20. O grupo I é formado pelas amostras 01, 05, 07 e 08 e o grupo II pelas amostras 02, 04, 06, 15, 09, 12 e 14, associados com no mínimo 60% de similaridade. O grupo III contém a amostra isolada 13 e o grupo IV é composto das amostras 03, 11 e 10 com grau de similaridade de 75%. Já a Figura 21, agrupa as variáveis ardido (Ard), preto (Pto) e o total de defeitos (TD) com similaridade acima de 75%. Portanto, os defeitos ardido e preto são os maiores contribuintes para os defeitos totais (grupo A). Observando a Figura 19 é possível notar que as amostras de má qualidade 03, 10 e 11 do grupo IV (riozona) são as que mais sofrem influência quanto a estas variáveis. Neste mesmo nível de similaridade há a formação de um segundo agrupamento (grupo B) composto das variáveis brocado (Bcr), *Circundati* (Cdt), grãos contaminados em 50 (C50), *Nigri* (Ngr), *Eurotium* (Ert), total de microrganismos (TM), ocratoxina A (OCR), no qual as amostras que sofreram maior influência foram as 02, 04 e 12 (grupo II - dura, rio/riada e riozona). Neste caso, a bebida de boa qualidade, foi associada com a glicose, frutose e cafeína e as amostras que sofrem maior influência destas variáveis foram 14 e 15 e em um nível menor foram 01, 05, 06, 07, 08, e 09.

A observação da Figura 19 confirma uma tendência gradual da bebida de boa qualidade dispersadas à direita para as de má qualidade dispersadas à esquerda, estando as de qualidade intermediária entre elas. As bebidas de característica dura também de boa qualidade estão mais próximas das de característica mole no quadrante de baixo, enquanto as rio/riado no quadrante de cima estão mais próximas à riozona. Mais afastada do seu grupo apareceu a amostra 02 (dura), provavelmente devido à grande quantidade de defeitos e contaminação microbiológica

(Tabela18). Já a 09 (rio/riado) apresentou-se menos contaminada por microrganismos, enquanto a 12 (riozona) esteve mais contaminada em relação às de seu grupo para o qual predominaram os defeitos.

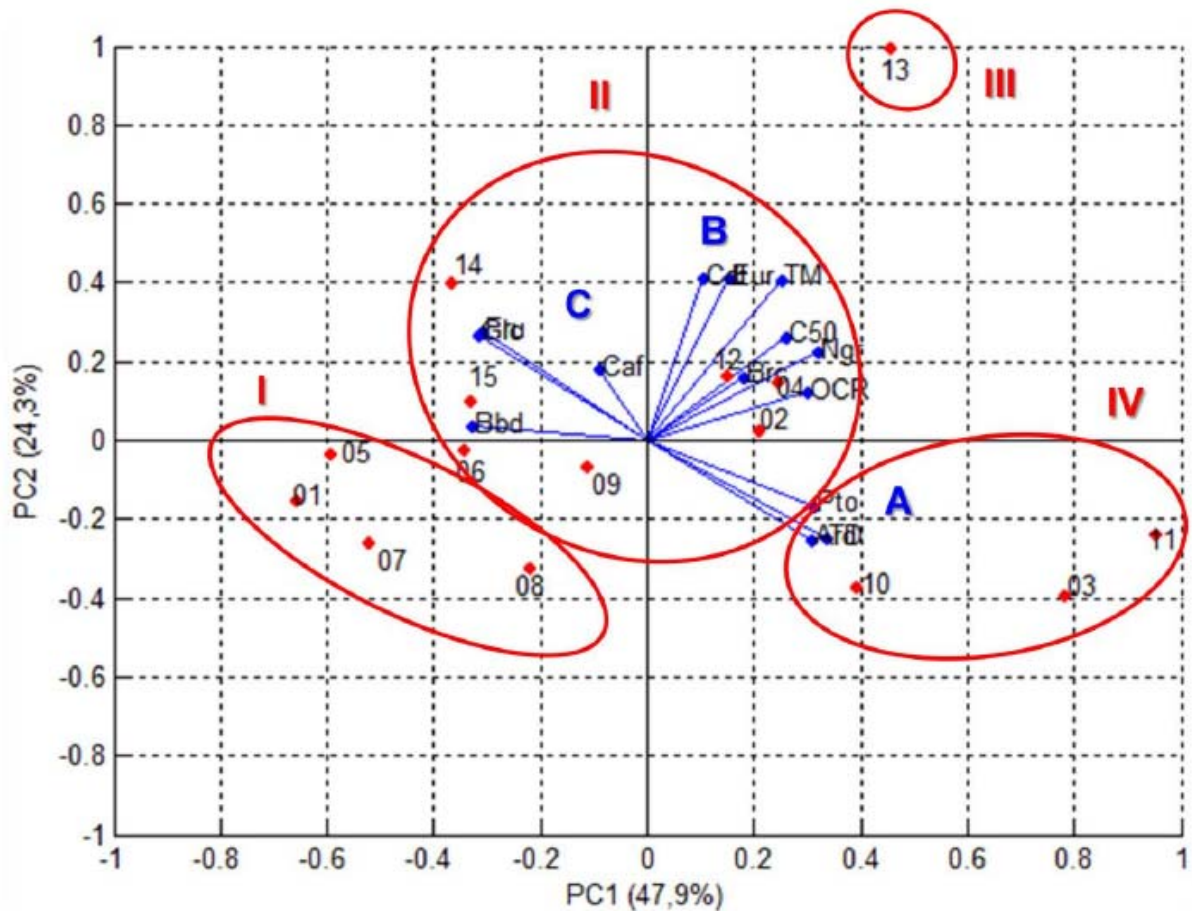


Figura 19 - Componentes principais (PC) 1 e 2 do conjunto de dados, onde os símbolos em vermelho representam os *scores* (amostras 01 a 15) e em azul os *loadings* com as projeções das variáveis. Os círculos em vermelho representam as separações entre os grupos de I a IV por similaridade de amostras (Dendrogramas, Figs. 27 e 28), enquanto as letras em azul representam a separação entre as variáveis. Tipos de bebidas para as amostras: mole (amostras 1,14,5); dura (2, 6, 7,8, 15); rio/riado (3, 10,11,12) e riozona (4,9,12).Bbd = bebida; Pto = preto; Ard=ardido; Brc = brocado; TD = total de defeitos; C50 = % de grãos contaminados em 50; Cdt = *Circundati*; Ert = *Eurotium*; Ngr = *Nigri*; TM = total de microrganismos; OCR = ocratoxina A; Gli = glicose; Fru = frutose; Caf = cafeína.

$$PC1 = - 0,856Bbd + 0,804Pto + 0,790Ard + 0,460Brc + 0,866TD + 0,667C50 + 0,269Cdt + 0,393Ert + 0,820Ngr + 0,648TM + 0,773OCR - 0,826Gli - 0,806Fru - 0,232Caf \quad (6)$$

$$PC2 = + 0,069Bbd - 0,304Pto - 0,463Ard + 0,300Brc - 0,458TD + 0,485C50 + 0,757Cdt + 0,759Ert + 0,415Ngr + 0,753TM + 0,224OCR + 0,496Gli + 0,509Fru + 0,333Caf \quad (7)$$

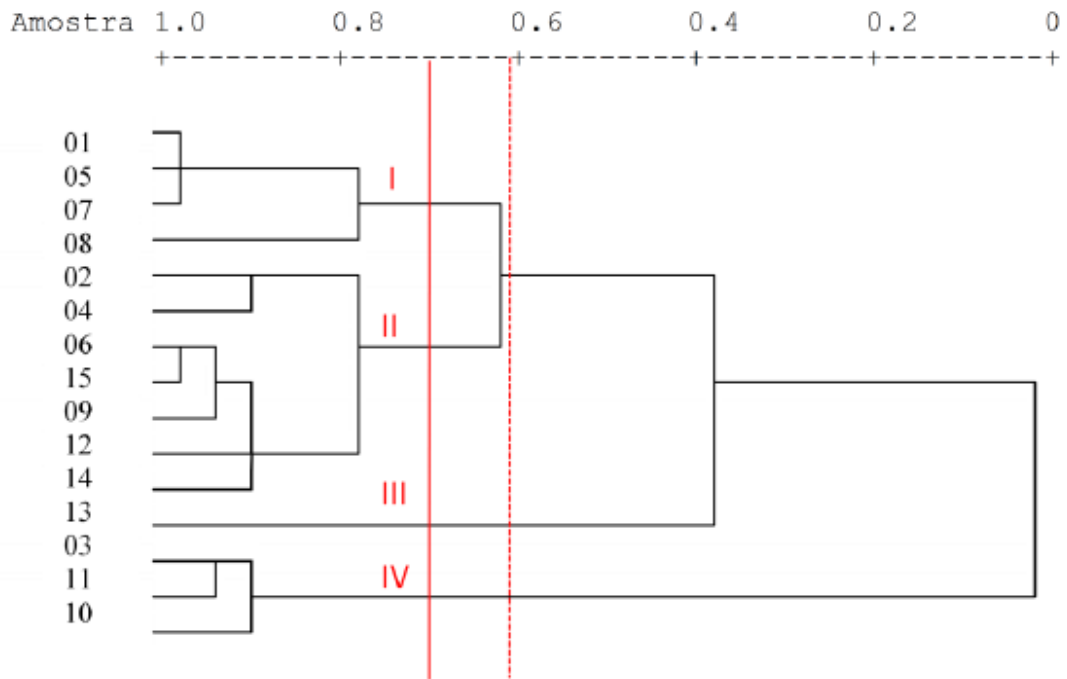


Figura 20 – Dendrograma de similaridade entre as amostras.

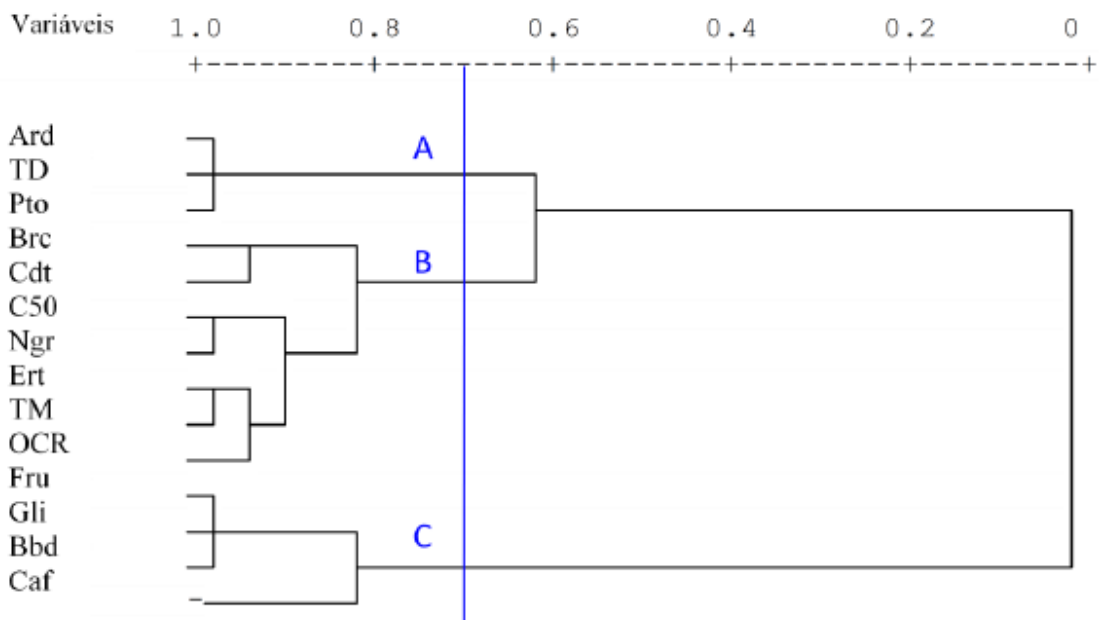


Figura 21 – Dendrograma de similaridade entre as variáveis.

Analisando a projeção das variáveis nas PCs da Figura 19 juntamente com as Equações (6) e (7), e considerando que a PC1 explica a maior parte da variância dos dados (47,9%) que influenciam a má qualidade, observou-se para o eixo horizontal da CP1 que os parâmetros que mais contribuíram no quadrante da direita com correlação positiva foram preto (0,804Pto), ardido (0,790Ard) e total de defeitos (0,866TD) para as amostras 10, 03 e 11 (riozona); seguida da contaminação em 50 grãos (0,667C50), *Nigri* (0,820Ngr), total de microrganismos (0,648TM), Ocratoxina A (0,773OCR) para as amostras 02(dura), 04 (rio/riado), 12 (riozona) e 13 (rio/riado). No quadrante da esquerda com correlação negativa bebida (-0,856Bbd), glicose (-0,826Gli) e frutose (-0,806Fru), foram os parâmetros que mais contribuíram para a separação as amostras 01, 14, 05 (mole), 06, 08 e 15 (dura), e 09 (rio/riado). Desses grãos com um maior número de defeitos, especialmente de ardidos e pretos, mais contaminados por microrganismos *Nigri*, que são potencialmente produtores de OTA.

Na PC2, que explica 24,3% da variância dos dados, os parâmetros com maior relevância no eixo vertical com correlação positiva foram *Circundati* (+0,757Cdt), Eurotiumf(+0,759Ert) e total de microrganismos (+0,753TM), Embora praticamente não associados à bebida, mostrados pelos baixos valores do coeficiente +0,069Bbd da Equação (7) e pela baixa correlação do total de microrganismos ($r = -0,541$) da Tabela 20, estes parâmetros apresentaram maior influência sobre as amostras de pior qualidade 13 (rio/riado), 12(riozona) e 4(rio/riado).

A dispersão das amostras sobre as componentes PC1 *versus* PC3 apresentada na Figura 22, explica 63,2% da variabilidade dos dados, que junto com os coeficientes da Equação (8), mostram variáveis de maior contribuição associadas entre si em posições antagônicas para o brocado (0,756Brc) com correlação positiva e cafeína com correlação negativa (-0,777Caf). Apesar da PC3 explicar somente 10,3% da variância, observada pela dispersão das amostras em relação às projeções, e que a bebida também praticamente não foi associada a estes parâmetros (+0,128Bbd) da Equação (8) e coeficientes de correlação da bebida com brocado ($r = -,283$) e com cafeína ($r = 0,155$) da Tabela 20), o brocado esteve deslocado para o lado da amostra 13 de pior qualidade de bebida e a cafeína para o lado da amostra 14 de bebida mole.

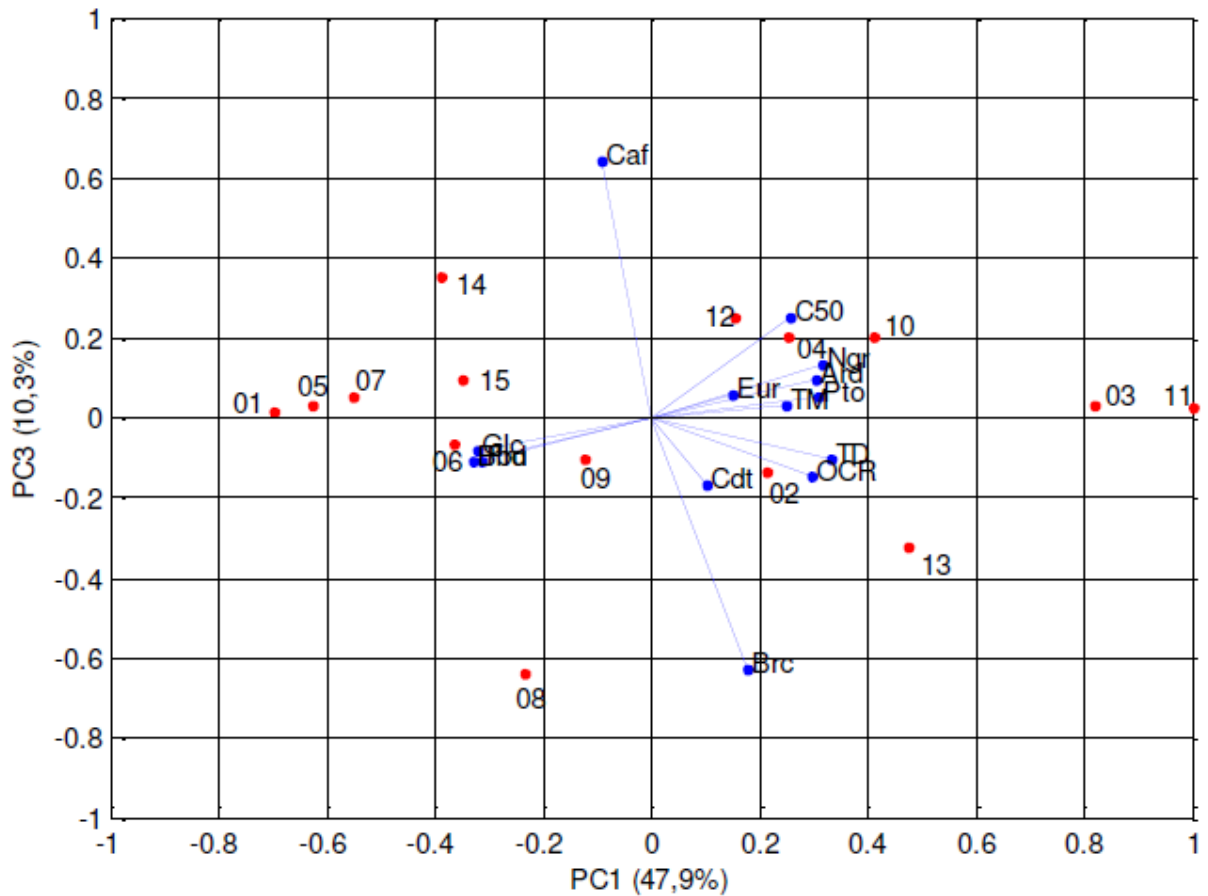


Figura 22 - Componentes principais 1 e 3 do conjunto de dados, onde os símbolos em vermelho referem aos *scores* (amostras 01 a 15) e em azul aos *loadings* as projeções das variáveis. Bbd = bebida; Pto = preto; Ard=ardido; Brc = brocado; TD = total de defeitos; C50 = % de grãos contaminados em 50; Cdt = *Circundati*; Ert = *Eurotium*; Ngr = *Nigri*; TM = total de microrganismos; OCR = ocratoxina A; Gli = glicose; Fru = frutose; Caf = cafeína.

$$CP3 = + 0,128Bbd - 0,067Pto - 0,116Ard + 0,756Brc + 0,125TD - 0,306C50 + 0,200Cdt + 0,069Ert - 0,162Ngr - 0,038TM + 0,176OCR + 0,094Gli + 0,130Fru - 0,777Caf \quad (8)$$

Na matriz de correlação (Tabela 20) entre as variáveis (bebida, preto, ardido, brocado, total de defeitos, grãos contaminados, *Circundati*, *Eurotium*, *Nigri*, total microorganismos, OTA, glicose, frutose e cafeína) é observado que algumas variáveis têm correlação positiva (direta) e correlação negativa (inversa) entre elas. Para análise das correlações entre as variáveis foi adotado o valor mínimo de $r = 0,600$.

Tabela 20 - Matriz de correlação entre as variáveis.

	Bbd	Pto	Ard	Brc	TD	C50	Cdt	Ert	Ngr	TM	OTA	Gli	Fru	Caf
Bebida	1,000	-,542	-,695	-,283	-,760	-,509	-,177	-,285	-,736	-,541	-,467	,787	,761	,155
Preto	-,542	1,000	,804	,252	,813	,474	,014	,019	,502	,266	,620	-,735	-,788	-,177
Ardido	-,695	,804	1,000	,126	,910	,260	-,031	-,006	,369	,181	,491	-,882	-,859	-,183
Brocado	-,283	,252	,126	1,000	,380	,211	,555	,249	,400	,491	,475	-,131	-,168	-,468
Total Defeito	-,760	,813	,910	,380	1,000	,290	-,053	-,016	,472	,212	,581	-,929	-,922	-,404
Grãos contam.	-,509	,474	,260	,211	,290	1,000	,430	,560	,878	,783	,490	-,328	-,317	,124
<i>Circundati</i>	-,177	,014	-,031	,555	-,053	,430	1,000	,496	,394	,749	,312	,236	,134	,180
<i>Eurotium</i>	-,285	,019	-,006	,249	-,016	,560	,496	1,000	,603	,833	,605	-,034	,146	,130
<i>Nigri</i>	-,736	,502	,369	,400	,472	,878	,394	,603	1,000	,854	,619	-,508	-,480	-,002
Total Micro	-,541	,266	,181	,491	,212	,783	,749	,833	,854	1,000	,633	-,174	-,144	,125
OTA	-,467	,620	,491	,475	,581	,490	,312	,605	,619	,633	1,000	-,499	-,468	-,215
Glicose	,787	-,735	-,882	-,131	-,929	-,328	,236	-,034	-,508	-,174	-,499	1,000	,908	,340
Frutose	,761	-,788	-,859	-,168	-,922	-,317	,134	,146	-,480	-,144	-,468	,908	1,000	,191
Cafeína	,155	-,177	-,183	-,468	-,404	,124	,180	,130	-,002	,125	-,215	,340	,191	1,000

Observando os valores da Tabela 20 é possível notar que:

A bebida de café foi influenciada negativamente pelo total de defeitos ($r = -0,760$), especialmente o ardido ($r = -0,695$), e pelos fungos da secção *Nigri* ($r = -0,736$) e foi diretamente correlacionada com altos teores de glicose e frutose ($r = 0,787$ e $r = 0,761$), resultados que concordam com a análise da ACP.

Os defeitos têm sido associados à má qualidade dos cafés com a formação de alguns aromas indesejáveis segundo Bandeira (2008). Considerando a matriz de correlação com todas as suas variáveis, do total de defeitos ($r = -0,760$), o que mais contribuiu foi o ardido ($r = 0,910$), seguido do preto ($r = 0,813$), tendo menos influência do brocado ($r = 0,380$).

A OTA está diretamente correlacionada com a presença do defeito preto ($r = 0,620$), com o total de microrganismos ($r = 0,633$), especialmente com os fungos da secção *Eurotium* e *Nigri* ($r = 0,605$ e $r = 0,620$), mesmo a literatura não correlacionando a produção de OTA com o fungo da secção *Eurotium*. Em contraposição à literatura, que não tem correlacionado a produção de OTA com o fungo da secção *Eurotium* (BATISTA; CHALFOUN, 2007).

Os altos teores dos carboidratos glicose e frutose estão diretamente correlacionados com a bebida de boa qualidade mole ($r = 0,787$ e $r = 0,761$) e

inversamente correlacionados com o total de defeitos ($r = -0,929$ e $r = -0,922$), especialmente o ardido ($r = 0,882$ e $r = ,859$) e o preto ($r = 0,735$ e $r = 0,788$). O valor de ($r = 0,908$) relacionando a frutose com a glicose, sugere que estes carboidratos ser provenientes da mesma fonte, a sacarose. Estes dados estão de acordo com Mazzafera (1999) redução da sacarose e glicose do café cru determinados por HPAEC referente aos defeitos verde preto, preto e grãos infestados devido ao metabolismo dos microrganismos, de acordo com Leloup et al. (2008). Isto sugere que a análise dos carboidratos é potencialmente útil para a avaliação da qualidade do café, seja no aspecto bebida, classificação de defeitos ou contaminação por microrganismos.

CONCLUSÕES

As correlações entre as variáveis individuais determinadas em 15 amostras de café cru e a Análise de Componentes Principais, permitiram avaliar a influência e estabelecer correlações entre as qualidades de bebida e a classificação de defeitos com técnicas mais avançadas e menos subjetivas de carboidratos, OTA e microbiota fúngica. O estudo mostrou que o tipo de bebida do café está inversamente correlacionado com os defeitos, especialmente o ardido, com os fungos da secção *Nigri* e diretamente correlacionada com glicose e frutose. A OTA está diretamente correlacionada com a presença do defeito preto e com os fungos da secção *Nigri*. Os carboidratos estão diretamente correlacionados com a bebida e inversamente com os defeitos preto e ardido.

A classificação mostrou uma relação direta entre o menor número de defeitos para as bebidas de boa qualidade (mole) em relação às de má qualidade (riozona), verificada principalmente nas qualidades extremas e menos para as bebidas intermediárias (dura e rio/riado), evidenciada pela separação hierárquica dos grupos. O ardido foi o defeito mais significativo e mais freqüente aparecendo em todas as amostras, contribuindo com 34,6% do total de defeitos, seguido dos verde-pretos com 21,9% e brocados com 9,5%. Apesar de menos freqüentes os pretos tiveram uma parcela significativa sobre a má qualidade. As porcentagens de fundos e impureza e o teor de umidade que variou de 7,0 a 9,5%, não se mostraram significativos.

A microscopia de varredura eletrônica demonstrou que um grão mais bem preservado, com menos defeitos, apresenta uma menor incidência de microrganismos, quando comparado à um ardido repleto de *Nigri* em seu interior.

A caracterização microbiológica permitiu verificar que as bebidas de boa qualidade apresentaram baixa contaminação por microrganismos, quando comparadas às amostras de bebida de má qualidade, que se proliferaram, tendo sido identificados no plaqueamento fungos da secção *Circumdati* (amarelos) e da secção *Nigri* (pretos), ambos capazes de produzir OTA. Verificou-se uma tendência de maior incidência de grãos contaminados nas amostras de má qualidade, onde 71,4%

apresentaram alta contaminação (de 92% - 100%). Houve predominância de ocorrência dos *Nigri* (59,9%); seguido dos *Eurotium* (23,5%) e *Circumdati* (11,2%), identificados em bebidas de má qualidade. Houve relação positiva entre os defeitos preto e ardido com os microrganismos da secção *Nigri*. O perfil eletroforético obtido a partir da amplificação de RAPD, possibilitou identificar que a maioria dos fungos da secção *Nigri* eram das espécies *A.niger/lacticofeatus*, e da secção *Circumdati*, nove isolados eram *A.westerdijkiae* e apenas um *A.ochraceus*.

O método modificado validado para determinação de ocratoxina A em café cru, empregando colunas de imunoafinidade Ochraprep[®], HPLC com detecção por fluorescência, mostrou-se adequado e confiável para análise em quantidades traço, considerando os teores máximos estabelecidos pela União Européia pela legislação de 5,0 µg kg⁻¹ para o café, com limite de detecção de 0,227 µg kg⁻¹ e limite de quantificação de 0,783 µg kg⁻¹. O método mostrou-se seletivo; linear na faixa de trabalho com coeficiente de correlação superior a 0,999; repetitivo (CV = 1,36%); com boa precisão intermediária (CV < 5%); reprodutível intra (*z-score* de 0,17 a 1,40) e inter-laboratório (FAPAS-*z-score* de 0,2 à 2,0) em ensaios de proficiência nacionais e internacionais; exato com recuperação de 89,50 a 105,10%; robusto com estabilidade do padrão de OTA por mais de 2 anos e com uma incerteza global associada de 32,5%.

A concentração de OTA nas 15 amostras analisadas variou de não detectável (4 amostras de bebida mole e dura) a 12,49 µg kg⁻¹, sendo maior que o limite permitido para 3 amostras, 2 de bebida rio/riado e riozona, destas todas apresentaram grandes quantidades de fungos da secção *Nigri* e uma *A.westerdijkiae* e *A.ochraceus*, potenciais produtores de OTA. O CV entre as 2 análises foram adequados à determinação analítica (0,00 a 12,68%), mostrando variância maior nas duplicatas com CV de 0,83 à 48,60%, atribuídos à amostragem.

Avaliando os carboidratos observou-se que a glicose e a frutose sofreram redução de cerca de 27% cada, da bebida de boa qualidade para a de má, o que sugere que a concentração de glicose e frutose provém da sacarose e está diretamente correlacionada com a quantidade de defeitos presentes. Estes dados estão de acordo com a literatura. O método mostrou potencial para avaliação da qualidade do café quanto a bebida, defeitos e microbiota fúngica.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE CAFÉ - ABIC. **Produção e exportação mundial do café**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 27 out. 2009.

ABD-ALLA, E. A. M.; SAHAB, A. F.; ALY, S. E. Formation of micotoxins by toxigenic fungi isolated from green coffee. **Egyptian Journal of Microbiology**, Cairo, v. 32, n. 4, p. 481-491, 1997.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaios e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.

_____. **ISO/IEC Guia 43-1**: ensaio de proficiência por comparações interlaboratoriais. Parte 1 : desenvolvimento e operação de programas de ensaios de proficiência. Rio de Janeiro: ABNT, 1999.

_____. **NBR ISO/IEC 9000**: sistemas de gestão da qualidade - fundamentos e vocabulário. Rio de Janeiro: ABNT, 2000.

_____. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Portaria n^o 377, de 26 de abril de 1999**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/377_99.htm>. Acesso em: 7 jun. 2009.

_____. **Resolução RE n^o 899, de 29 maio de 2003**. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15132eword>>. Acesso em: 21 dez. 2009.

AGRESTI, P. D. C. M.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; AUGUSTI, R. Discrimination between defective and non-defective Brazilian coffee beans by their volative profile. **Food Chemistry**, London, v. 106, n. 2, p 787-796, 2008.

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**, Londrina, v. 29, n. 6, p. 1164-1168, 2006.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21. ed. Washington: American Public Health Association, 2005.

AMORIM, H. V. et al. **Transformações químicas e estruturais durante a deterioração da qualidade do café.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Resumos...** Guarapari: IBC/GERCA, 1977. p. 15-18.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International.** 16th ed. Gaithersburg: AOAC, 1995.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4th ed. Washington: APHA, 2001.

ASSAD, E. D. et al. Identificação de impurezas e misturas em pó de café por meio de comportamento espectral e análise de imagens digitais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 211-216, 2002.

AZAM, S. et al. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. **Medical Science Monitor**, Warsaw, v. 9, n. 9, p. 330-335, 2003.

BANDEIRA, R. D. C. C. et al. A composição volátil dos defeitos intrínsecos do café por CG/MS-Headspace. **Química Nova**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 309-314, 2008.

BARCELOS, A. F. et al. Estimativa das frações dos carboidratos, da casca e polpa desidratada de café (*Coffea arabica* L.) armazenadas em diferentes períodos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1566-1571, 2001.

BARONE, J. J., ROBERTS, H. R. Caffeine consumption. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 119-129, 1996.

BATISTA, L. R. et al. Oxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, 2003.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. Incidência de ocratoxina A em diferentes frações do café (*coffea arábica*): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 804-813, maio/jun., 2007.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: a practical guide.** New York: John Wiley e Sons, Inc, 1998.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. *Mycotoxins.* **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

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

BORÉM, F. M. **Pós colheita do café**. Lavras: EDUFLA, 2008.

BRADBURY, A. G. W.; HALLIDAY, D. J. Chemical structures of green coffee bean polysaccharides. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 2, p. 389-392, 1990.

BRAGANÇA, S. M. et al. Variedades clonais de café conilon para o estado do Espírito Santo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 5, p. 765-770, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Departamento Nacional Vegetal, 1976.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Instrução normativa N° 8, de 11 de junho de 2003**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3476>>. Acesso em: 27 out. 2009.

BUCHELI, P.; TANIWAKI, M. H. Research on the origin, and the impact of postharvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 655-665, 2002.

BUCKERIDGE, M. S. et al. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, p. 137-162, 2000.

BURDASPAL, P. A.; LEGARDA, T. M. Ochratoxin a in roasted and soluble coffes marketed in Spain. **Alimentaria**, Lisboa, v. 296, p. 31-35, 1998.

CAIXETA, G. Z. T. Comportamento atual do mercado de café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 1, p. 9-13, 1998.

CANTÁFORA, A. et al. Determination of ochratoxin A in coffee beans using reversed-phase high performance liquid chromatography. **La Rivista della Società Italiana diSienza dell Alimentazione**, Roma, v. 12, n. 2, p. 103-108, 1983.

CARVALHO, L. M. et al. Aspectos morfofisiológicos dos cultivares de cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 411-416, 2001.

CARVALHO, et al. Relação entre a composição físico química e química do grão beneficiado e a qualidade da bebida do café. I. Atividade da polifenoloxidase e peroxidase, índice de coloração de acidez. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 449-454, 1994.

CARVALHO, V. D.; CHALFOUN, S. M. Aspectos qualitativos do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 79-92, 1985.

CARVALHO, V. D.; CHAGAS, S. J. R.; CHALFOUN, S. M. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 5-20, 1997.

CARVALHO, V. D.; CHALFOUN, S. M.; CHAGAS, S. J. R. Relação entre classificação do café pela bebida e composição físico-química, química e microflora do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15., 1989, Maringá. **Resumos...** Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989. p. 25-26.

CARVALHO, V. D.; CHALFOUN, S. M.; CHAGAS, S. J. R. Relação entre classificação do café pela bebida e composição físico-química, química e microflora do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15, 1999, Maringá. **Resumos...** Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1999. p. 25-26.

CASTURA, J. C.; FINDLAY, C. J.; LESSCHAEVE, I. Monitoring calibration of descriptive sensory panels using distance from target measurements. **Food Quality and Preference**, Essex, v. 16, n. 8, p. 682-690. 2005.

COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA - CEPLAC. **Café**. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/cafe.htm>>. Acesso em: 18 out. 2009.

CHAGAS, S. J. R. ; COSTA, L. **Análise da qualidade da bebida do café pelo método químico e pela "prova de xícara"**. Lavras: EPAMIG, 1996. (Circular Técnica, n. 68).

CLASSIFICAÇÃO OFICIAL BRASILEIRA - COB. Dec. LEI nº 27.173 de 14/9/49. CONSELHO NACIONAL DO CAFÉ - CNC. **Resumo das Exportações**. 2009. Disponível em: <http://www.cncafe.com.br/galeria/00000738_CECAFE%20-%20Resumo%20das%20Exportacoes%20de%20Cafe%20AGOSTO%202009.pdf>. Acesso em: 27 out. 2009.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de café: safra 2009, primeira estimativa**. Brasília: CONAB, 2009. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/1_levantamento_2009.pdf>. Acesso em: 18 out. 2009.

COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION - CEN. **Foodstuffs: determination of ochratoxin A in wine and beer - HPLC method with immunoaffinity column clean-up**. Brussels: CNE, 2003.

CRISTIANO, V., PAULI, E. D., LOBO, I., NIXDORF, S. L. Avaliação da influência da ocratoxina a na qualidade das bebidas mole, dura, rio, riado e riozona de cafés brasileiros empregando imunoafinidade HPLC/fluorescência In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CROMATOGRAFIA E TÉCNICAS RELACIONADAS, 2008, Florianópolis. **Resumos...** São Carlos: Instituto Internacional de Cromatografia, 2008. p.158-158. (Livro e CD)

CUNHA, R. D. C. **Identificação de compostos voláteis de café sadio e com defeitos por cromatografia gasosa e análise estatística multivariada**. 2005. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Rio de Janeiro.

DE MARIA, C. A. B. et al. Composition of green coffee water soluble fractions and identification of volatiles formed during roasting. **Food Chemistry**, Barking, v. 55, n. 3, p. 203-207, 1996.

_____. Simultaneous determination of total chlorogenic acids, trigonelline and caffeine in green coffee samples by high performance gel filtration chromatography. **Food Chemistry**, Barking, v. 52, n. 4, p. 447-449, 1995.

DELGADO, P. A. **Desenvolvimento de processo enzimático para redução de sedimentos em extratos de café solúvel**. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

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

DIAZ, G. J.; ARIZA, D.; PERILLA, N. S. Method validation for the determination of ochratoxin A in green and soluble coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography. **Mycotoxin Research**, New York, v. 20, n. 2, p. 59-67, 2004.

DRAGACCI, S. et al. A french monitoring programme for determining ochratoxin a occurrence in pig kidneys. **Natural Toxins**, New York, v. 7, n. 4, p. 167-173, 1999.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Embrapa café**. Disponível em: <<http://www22.sede.embrapa.br/cafe/outros/links.htm>>. Acesso em: 27 out. 2009.

ELLISON, S. L. R.; ROSSLEIN, M.; WILLIAMS, A. (Ed.). **Quantifying uncertainty in analytical measurement**. Eurachem/Citac Guide. 2. ed. 2000. Disponível em: <<http://www.farmacia.ufmg.br/lato/Quam2000.pdf>>. Acesso em: 18 out. 2009.

EUROPEAN COMMISSION. Directiva 2002/26/CE da Comissão de 13 de março de 2002. **Jornal Oficial das Comunidades Européias**. L75/384-3. 2002.

_____. Regulamento (CE) No. 472/2002 da Comissão de 12 de março de 2002. **Jornal Oficial das Comunidades Européias**. L75/1820. 2002.

FAO CORPORATE DOCUMENT REPOSITORY. Codex Alimentarius Commission On Methods Of Analysis And Sampling. **Criteria for evaluating acceptable methods of analysis for codex purposes**. 1995. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/meeting/005/X0830E/x0830e0a.htm#TopOfPage>>. Acesso em: 27 out. 2009.

- FAPAS. Food Chemistry. Food Analysis Performance Assessment Scheme. Disponível em: <<http://www.fapas.com/fapas.cfm>>. Acesso em: 27 out. 2009.
- FISHER, M. et al. Polysaccharides of green arabica and robusta coffee beans. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 330, n. 1, p. 93-101, 2001.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- FRANÇA, A. S. et al. Physical and chemical attributes of defectives crude and roasted coffee beans. **Food Chemistry**, Oxford, v. 90, n. 1/2, p. 89-94, 2005.
- FRANÇA, A. S.; MENDONÇA, J. C. F.; OLIVEIRA, S. D. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. **LWT - Food Science and Technology**, Oxford, v. 38, n. 7, p. 709-715, 2005.
- FARAH, A. et al. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 2, p. 374-381, 2006.
- _____. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, Oxford, v. 98, n. 2, p. 373-380, 2006.
- _____. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 5, p. 1505-1513, 2005.
- FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 23-26, 2006.
- FERNANDES, S. M. et al. Constituintes químicos e teor de extrato aquoso de cafés arábica (*Coffea arabica* L.) e conilon (*Coffea canephora* Pierre) torrados. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p.1076-1081, 2003.
- FERREIRA, E. B.; OLIVEIRA, M. S. **Sensometria: uma abordagem com ênfase em Procrustes**. Santa Maria: UFSM, 2007.
- FRISVAD, J. C. et al. Important mycotoxins and the fungi which produce them. In: HOCKING, A. D.; PITT, J. I.; SAMSON, R. A.; THRANE, U. (Ed.). **Advances in food mycology**. New York: Springer, 2006. p. 3-31.
- FÚNGARO, M. H. P. et al. Genetic relationships among Brazilian strains of *Aspergillus ochraceus* based on RAPD and ITS sequences. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, v. 50, n. 11, p. 985-988, 2004.
- FURLANI, R. P. Z.; SOARES, L. M. V.; OLIVEIRA, P. L. Avaliação de métodos para determinação de ocratoxina em cafés verdes e torrados. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n. 2, p. 87-98, 1999.

GARCIA, L. M. Z. et al. Chemometric evaluation of adulteration profile in coffee due to corn and husk by determining carbohydrates using HPAEC-PAD. **Journal of Chromatographic Science**, Evanston, v. 47, n. 9, p. 825-832, 2009.

GONÇALVES, A. M. O. **Influência dos defeitos dos grãos do café na percepção das características sensoriais da bebida pelo consumidor**. 2006. Disponível em: <http://bdtd.ufrj.br//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=102>. Acesso em: 25 nov. 2009.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **Summary of Data Reported and Evaluation**, v. 56, p. 489, 1993.

ICH Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology (2005). Disponível em: <<http://www.ich.org>>. Acesso em: 27 nov. 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008, Local, 2007. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/laboratorios/calibEnsaios.asp>>. Acesso em: 22 fev. 2009.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. Toxigenic fungi: aspergillus. In: _____. **Microorganisms in foods: characteristics of food pathogens**. London: Blackie, 1996. p. 341-381.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. **Microrganismos de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2000. v. 1.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO. **ISO 10095**: coffee - determination of caffeine content - method using high - performance liquid chromatography. Geneve, 1992.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO. **ISO 11292**: instant coffee - determination of free and total carbohydrate contents - method using high - performance anion-exchange chromatography. Geneve, 1995.

JR., E.S.G. Relação entre a composição físico-química e química do grão beneficiado e a qualidade de bebida do café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, p. 449-454, 1994.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guide to common aspergillus species and their teleomorphs**. North Ryde: CSIRO Division of Food Processing, 1988a.

_____. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus parasiticus* and other closely related species. **Transaction British Mycological Society**, London, v. 94. n. 1, p. 99-108, 1988b.

KOOLMAN, J.; ROHM, K. H. **Bioquímica: texto e atlas**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

KRUG, H. P. Café duros. **Revista do Instituto do Café**, São Paulo, v. 26, p. 636638, 1940a.

_____. Café duros - II: um estudo sobre a qualidade dos cafés de varrição. **Revista do Instituto do Café**, São Paulo, v. 27, p. 1393-1396, 1940b.

KY, C. L. et al. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acid and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. **Food Chemistry**, Oxford, v. 75, n. 2, p. 223-230, 2001.

LATREILLE, J. et al. Measurement of the reliability of sensory panel performances. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 17, n. 5, p. 369-375, 2006.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 4. ed. Campinas: Átomo, 2002.

LEGENDRE, L.; LEGENDRE, P. **Numerical ecology**. Amsterdam: Elsevier, 1983.

COMISSÃO... **Legislação comunitária**. Directiva 2002/26/Ce da Comissão de 13 de março de 2002. Local, 2002.

_____. **Legislação comunitária**. Directiva 2002/472/Ce da Comissão de 12 de Março de 2002.

_____. **Legislação comunitária**. Directiva 2005/123/Ce da Comissão de 26 de Janeiro de 2005.

_____. **Legislação comunitária**. Recomendação da Comissão, Directiva 2006/576/Ce da Comissão de 17 de Agosto de 2006.

LELOUP, V. et al. **Evaluation of Chemical Composition and Processability of Defective Beans**. Orbe, Switzerland: Nestle Product Technology Centre, 2008.

LEONI, L. A. B. et al. Ochratoxin A in brazilian Green coffee. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 105-107, 2001.

LEVI, C. P.; TRENK, H. L.; MOHR, H. K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **Journal of the Association Official Analytical Chemists**, Washington, v. 57, n. 4, p. 866-870, 1974.

LIMA, I. M. H. **Confiabilidade metrológica do laboratório antidoping do Jockey Club Brasileiro, estudo de caso: validação de método analítico para determinação de**

caféina em urina de cavalos de corrida. 2004. Dissertação (Mestrado em Metrologia) - Pontifícia Universidade Católica - Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LIMA, A. R.; PEREIRA, R. G. F. A.; ABRAHÃO, S. A. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante "in vitro" do café verde e torrado antes e após a descafeinação. **Química Nova**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 20-24, 2010.

LINGLE, T. R. The basics of cupping coffee. Long Beach: Specialty Coffee Association of América, 1993.

MAZZAFERA, P. Chemical composition of defective coffee beans. **Food Chemistry**, Oxford, v. 64, n. 4, p. 547-554, 1999.

MEIRELLES, A. M. A. **Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais**. 1990. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MENDES, L. C. **Otimização do processo de torração do café robusta (*Coffea canephora conillon*) para formulação de blends com café arábica (*Coffea arabica*)**. 1999. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MENDES, L. C.; MENEZES, H. C.; SILVA, M. A. A. P. Optimization of the roasting of robusta coffee (*C. canephora conillon*) using acceptability tests and RMS. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 12, n. 1, p. 153-162, 2001.

MICCO, C. et al. A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 6, n. 3, p. 333-339, 1989.

MORAES, M. H. P.; LUCHESE, R. H. Ochratoxin A on green coffee: influence of harvest and drying processing procedures. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 19, p. 5824-5828, 2003.

MORAIS, S. A. L. et al. Análise química de café arábica (*Coffea Arabica* L.) e grãos pretos, verdes e ardidos (PVA) submetidos a diferentes graus de torração. **Coffee Science**, Lavras, v. 2, n. 2, p. 97-111, 2007.

MOREAU, C. **Moulds, toxins and food**. New York: John Wiley, 1979.

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; DE MARIA, C. A. B. 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.

MORI, E. E. M.; BRAGAGNOLO, N.; MORGANO, M. A.; ANJOS, V. D. A.; YOTSUYANAGI, K.; FARIA, E. V.; IYOMASA, J. M. Brazil coffee growing regions and quality of natural, pulped natural and washed coffees. **The FFI Journal**, Osaka, v. 208, n. 1, p. 416-423, 2003.

MOSS, M.O. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, Supplement, p. 5-9, 1996.

NAKAJIMA, M. et al. Survey of Aflatoxin B 1 and Ochratoxin A in commercial green coffee beans by high performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. **Food and Agricultural Immunology**, Oxon, v. 9, n. 2, p. 77-83, 1997.

NAKAMURA, E. **Avaliação da influência no teor de carboidratos com adição de milho e trigo em café torrado e moído**. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

NAVARINI, L. et al. R. Polysaccharides from hot water extracts of roasted *Coffea Arabica* beans: isolation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 40, n. 1, p. 71-81, 1999.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ - OIC. **Relatório sobre o mercado cafeeiro**. 2009. Disponível em: <<http://www.ico.org>>. Acesso em: 27 out. 2009.

OLIVEIRA, R. C. S. **Detecção de adulteração de café torrado e moído com cevada pelo perfil cromatográfico de voláteis**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OLIVEIRA, S. D. et al. The effect of roasting on the presence of bioactive amines in coffees of different qualities. **Food Chemistry**, Washington, v. 90, n. 1/2, p. 287-291, 2005.

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, n. 2, p. 183-192, 2003.

ORMOND, J. G. P.; PAULA, S. R. L.; FILHO, P. F. Café: (Re) Conquista dos mercados. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 10, p. 3-56, 1999.

PARDO, E., MARIN, S., RAMOS, A. J., ; SANCHIS. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, v. 10, p. 45-49, 2004.

PASIN, L. A. A. P.; ABREU, M. S. Fungos associados a grãos crus e ocorrência de ocratoxina A em diferentes cultivares de café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas, 2000. p. 1028-1031.

PAULI, E. D. **Metodologia para determinação de carboidratos em café solúvel com reação pós-coluna por CLAE/UV-Vis**. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

PATEL, S. et al. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 14, n. 3, p. 217-222, 1997.

PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Solutions to Penicillium taxonomy crucial to mycotoxin research and health. **Research in Microbiology**, Paris, v. 155, n. 7, p. 507-513, 2004.

PEREIRA, R. G. F. A. **Efeito da inclusão de grãos defeituosos na composição química e qualidade do café (Coffea arábica L.) "Estritamente Mole"**. 1997. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PITT, J. I. et al. Mycotoxins and toxigenic fungi. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, Suplemento 1, p. 41-46, 2000.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2. ed. Cambridge: Chapman & Hal., 1997.

PITT, J. I., HOCKING, A.; GLENN, D. R. Na improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 54, p. 109-114, 1983.

PRADO, E. et al. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxina A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, London, v. 10, n. 1, p. 45-49, 2004.

PRADO, G. et al. Incidência de ocratoxina a em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 192-196, 2000.

RAMALAKSHMI, K.; KUBRA, I. R.; RAO, L. J. M. Physicochemical characteristic of green coffee: comparison of graded and defective beans. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 72, n. 5, p. 333-337, 2007.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, E. A. R. **Contaminação toxicológica de resíduos vitivinícolas -ocratoxina A**. 2007. Tese (Mestrado em Engenharia do Ambiente) - Faculdade de Engenharia Universidade do Porto, Lisboa.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P. D.; SMITH, R. M., Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods, **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1153, p. 36-53, 2007.

REDE METROLÓGICA DE MINAS GERAIS - RMMG. Disponível em: <<http://www.fiemg.org.br/rmmg>>. Acesso em: 2 mar. 2010.

ROBLEDO, A. L.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J. Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit (México). **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 18, p. 141-144, 2001.

ROMANI, S. C. C.; PINNAVAIA, G. C.; ROSA, M. D. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3616-3619, 2000.

RUBAYIZA, A. B.; MEURENS, M. Chemical discrimination of arabica and robusta coffees by fourier transform raman spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 12, p. 4654-4659, 2005.

SANGER, F.; NICKLEN S.; COULSO; A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/74/12/5463.full.pdf+html>>. Acesso em: 21 jun. 2009.

SANTOS, E. A.; CASTRO, L.; VARGAS, E. A. Metodologias analíticas de referências para determinação de ocratoxina A em café beneficiado, torrado e/ou solúvel. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL E WORKSHOP INTERNACIONAL DE CAFÉ ; SAÚDE, 3., 2003, Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro, 2003. p. 178-179.

SCARMINIO, I. S. **Desenvolvimento de um sistema quimiométrico para microcomputadores e algumas aplicações**. 1989. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SILVA, C. F. **Sucessão microbiana e caracterização enzimática da microbiocratoxina A associada aos frutos e grãos de café (Coffea arábica L.) do município de Lavras- MG**. 2004. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVA, R. F. et. al. **Qualidade do café cereja descascado produzido na região sul de Minas Gerais**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SIQUEIRA, H. H.; ABREU, C. M. P. Composição físico-química e qualidade do café submetido a dois tipos de torração e com diferentes formas de processamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 112-117, 2006.

SMITH, J. E.; ROSS, K. The toxigenic aspergilli. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. (Ed.). **Mycotoxin and animal foods**. Boca Raton: CRC, 1991. p. 101-118.

SOARES, L. V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n.1, p. 79-84, 2001.

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

SOUZA, V. F. et al. Influência dos fatores demográfico e geográfico na preferência da bebida de café no estado do Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2004.

SPADONE, J. C.; TAKEOKA, G.; LIARDON, R. Analytical investigation of rancid off flavor in green coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, p. 226-233. 1990.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998.

_____. **Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos**. Florianópolis: Autora, 2000.

STEGEN, G. V. D. et al. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). **Food Additives and Contaminants**, Hants, v. 14, n. 3, p. 211-216, 1997.

STUDER-ROHR, I.; et al. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 341-355, 1995.

SULYOK, M.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. A liquid chromatography / tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Berlin, v. 389, p. 1505-1523, 2007.

TANIWAKI, M. H. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173-179, 2003.

TANIWAKI, M. H. et al. AN UPDATE ON OCHRATOXIN A IN COFFEE AFTER 10 YEARS OF RESEARCH. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 22., 2008. **Proceedings...** Campinas: ASIC, 2008. p. 1379-1381.

TEIXEIRA, A. S. **Adequação e apresentação de parâmetros de validação intralaboratorial de um ensaio para a quantificação de aflatoxinas em Castanha-do-Paraná (BERTHOLLETIA EXCELSA BONPL.) através de cromatografia líquida de alta eficiência**. 2008. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

TOCI, A. T.; FARAH, A., Volatile compounds as potential defective coffee beans markers. **Food Chemistry**, Berlin, v. 108, p. 1133-1141, 2008.

TOLEDO, J. L. B.; BARBOSA, A. T. **Classificação e degustação de café**. Brasília: SEBRAE, 1998. (Série Agronegócios).

TRUGO, L. C. Analysis of coffee products. In: CABALLERO, B.; TRUGO, L. C.; FINGLAS, P. M. (Org.). **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. 2. ed.

London: Academic Press, 2003. v. 3, p. 1498-1506.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. **Food Chemistry**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 219-227, 1984.

TRUGO, L. C. Carbohydrates. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.) **Coffee: chemistry**. London: Elsevier Applied Science, 1985. p. 83-152.

TSUBOUCHI, H. et al. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 36, p. 540-542, 1988.

URBANO, G. R. et al. Preliminary studies on destruction of ochratoxin A in coffee during roasting. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 19., 2001, Trieste, Italy. **Proceedings...** Trieste, 2001.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA). **Guidance for industry, bioanalytical method validation**. Rockville: MD, 2001.

VALENTE SOARES, L. M. et al. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n. 1, p. 79-84, 2001.

VARELI, C. S. **Desenvolvimento e validação de método para determinação de etilenotiouréia em urina empregando HPLC-UV**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

VARGAS, E. A.; SANTOS, E. A.; PITTET, A. **Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column clean up and LC**. Belo Horizonte: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, [2002].

XIAO, H.; MADHYASTHA, S.; MARQUARDT, R. R.; LI, S.; VODELA, J. K.; FROHLICH, A. A.; KEMPPAINEN, B. W. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 137, p. 182-192, 1996.

WHITAKER, J. R. Polyphenol oxidase. In: WONG, D. W. S. (Ed.). **Food enzymes: structure and mechanism**. New York: Chapman ; Hall, 1995. p. 271-307.

_____. **Principles of enzymology for the food science**. New York: Marcer Dekker Inc., 1972.

ANEXO

ANEXO A

Incerteza Global do Método

A incerteza global do método, U , inclui todos os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e limite de detecção, de forma a que o resultado final seja o erro associado ao método validado. Recorreu-se ao método de cálculo da incerteza global preconizado pela Eurachem (ELLISON; ROSSLEIN; WILLIAMS, 2000), onde foram consideradas as seguintes componentes, expressas em termos de desvio-padrão relativo:

U_1 – incerteza na preparação dos padrões de ocratoxina A (dependente das diluições realizadas e material utilizado),

U_2 – incerteza associada à reta de calibração,

U_3 – incerteza associada à precisão e,

U_4 – incerteza associada à exatidão.

Preparação das soluções de ocratoxina A

Neste tópico foram apresentados os cálculos para a preparação dos padrões de OTA utilizados para a obtenção da curva de calibração.

Solução Standard: Adicionou-se ao conteúdo do frasco original de OTA (5 mg) 5,0 mL da solução de benzeno:ácido acético (99:1 v/v), deixou em repouso por 24 h ao abrigo de luz.

Solução Mãe: Foi retirada uma alíquota de 2,0 mL da solução “*standard*” para um balão 50,0 mL e completou-se com solução de benzeno:ácido acético (99:1 v/v), verificou-se espectrofotometricamente ($MM = 403,8 \text{ g}$, $\lambda = 333 \text{ nm}$ $\epsilon = 5500 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a concentração, como sendo de $28,9 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de OTA em benzeno:ácido acético (99:1 v/v).

Solução Estoque: Foi retirada uma alíquota de 34,8 μL da solução mãe para uma balão de 10,0 mL e completou-se com metanol, tendo sido obtida uma solução de OTA com a concentração de $100,6 \mu\text{g Kg}^{-1}$.

Solução de Trabalho: A solução trabalho foi estabelecida em $3,35 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (100 μL da solução estoque OTA: 1400 μL de solução de metanol:ácido acético 98:2 (v/v): 1500 μL de água ultrapura).

Os padrões utilizados para determinar a curva de calibração foram preparados a partir do injetor (Waters 717 plus) conforme Tabela 1 apresentada abaixo.

Tabela 1 – Planejamento para o levantamento da curva de calibração de OTA.

Padrão	Volume Injeção (μL)	Concentração de OTA $\mu\text{g Kg}^{-1}$
1	100	0,00
2	25	8,38
3	50	16,76
4	75	25,14
5	100	33,52

Na Tabela 2 apresentam-se os resultados obtidos na análise dos padrões preparados para a determinação da curva de calibração.

Tabela 2 – Resultados obtidos na análise dos padrões preparados para a obtenção da curva analítica de calibração empregados nos cálculos da precisão (repetitividade).

Padrão	Concentração $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Área do pico cromatográfico (mV min^{-1}) (N = 2)	Média das áreas \pm d.p. (mV min^{-1})	CV (%)
1	0,00	n.d.	0 \pm 0,00	0,00
		n.d.		
2	8,38	30042	30028,5 \pm 19,09	0,06
		30015		
3	16,76	61650	61670,0 \pm 28,28	0,05
		61690		
4	25,14	95573	95599,0 \pm 36,77	0,04
		95625		
5	33,52	129287	129276,0 \pm 15,56	0,01
		129265		

d.p.:desvio padrão

A partir dos dados da Tabela 2 pode-se construir a curva de calibração, apresentada na Figura 1 e calcular os parâmetros da Tabela 3.

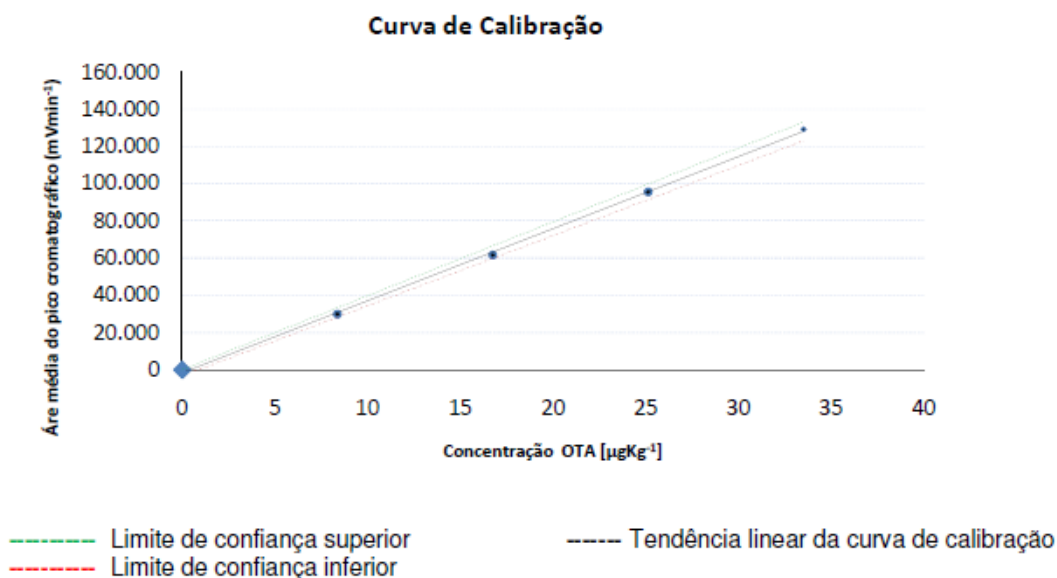


Figura 1 - Curva de calibração gerada pelo sistema HPLC. Fase móvel: acetonitrila: metanol: água: ácido acético (33:33:33:1) v/v/v/v; vazão de 1,0 mL min⁻¹; vol. Inj.: 100,0 µL; coluna: Nova-Pak C-18, temperatura ambiente; Fluorescência $\lambda_{Ex} = 333$ nm, $\lambda_{Em} = 443$ nm, faixa linear de 1,00 a 33,52 ng g⁻¹.

Observando a Figura 1 é possível notar que o sistema mostrou-se linear para o intervalo de trabalho empregado (0,00 a 33,52 µg Kg⁻¹ de OTA), apresentando um coeficiente de correlação linear (r) de 0,9993, descrito pela Equação da reta (1):

$$\text{Área do pico cromatográfico (mV min}^{-1}\text{)} = 386748 \times [\text{OTA}] - 1509,7 \quad (1)$$

Tabela 3 – Parâmetros necessários para o estudo da linearidade da resposta do HPLC-FL no método.

	X_i	Y_i	$Y_{cal.}$	X_i^2	$(X - \bar{X})^2$	$(Y - \bar{Y}_{cal.})^2$
	8,38	3,00E+04	3,24E+06	70,22	158,00	6,51E+13
	16,76	6,17E+04	6,48E+06	280,90	17,56	6,46E+13
	25,14	9,56E+04	9,72E+06	632,02	17,56	6,41E+13
	33,52	1,29E+05	1,30E+07	1123,59	158,00	6,35E+13
Média	20,95	7,91E+04	8,10E+06	526,68	87,78	6,43E+13
Soma	83,80	3,17E+05	3,24E+07	2106,73	351,12	2,57E+14

Com,

$$Y_{cal.} = 386748 \times (OTA) - 1509,7 \quad (2)$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{N-1}} = 2,47 \times 10^4 \quad (3)$$

onde,

x_i = concentração do padrão i ($i = 1;4$);

y_i = valores das áreas de OTA obtidos experimentalmente;

$y_{cal.}$ = valores das áreas de OTA calculadas, para cada valor de x_i , com base na curva de calibração;

$S_{y/x}$ = desvio padrão residual;

N = número de pontos experimentais ($N = 4$);

\bar{x} = média dos valores de concentração dos padrões;

\bar{y} = média dos valores das áreas obtidas experimentalmente.

Os parâmetros do estudo da linearidade foram determinados para um nível de 95% confiança com base nas Equações (1 a 8):

$$S_a = S_{y/x} \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i)^2}{N \times \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} = 3,03 \times 10^4 \quad (4)$$

$$a + S_a = 2,88 \times 10^4 \quad (5)$$

$$a - S_a = 3,18 \times 10^4 \quad (6)$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} = 1,32 \times 10^3 \quad (7)$$

$$\frac{S_b}{b} (\%) = \frac{1,32 \times 10^3}{386748} \times 100 = 0,34 \quad (8)$$

Considerando:

$$t_{\text{student}} = 3,18$$

onde, S_a e S_b são, respectivamente, o desvio padrão associado a ordenada na origem e o desvio padrão associado a inclinação da curva de calibração.

Com base nos valores das Equações (9 a 10) estabeleceu-se os intervalos de confiança para o declive b , IC_b e para a ordenada na origem a , IC_a , que se apresentam na Tabela 4.

$$IC_b = t_{student} \times S_b \quad (9)$$

$$IC_a = t_{student} \times S_a \quad (10)$$

Tabela 4 – Intervalos de confiança correspondentes ao declive e à ordenada na origem, para um nível de confiança de 95%.

	Intervalo de Confiança	Valor determinado	Mínimo	Máximo
Inclinação (b)	4195,88	386748	382552,12	390943,88
Ordenada na Origem (a)	96293,63	-1509,7	-97803,33	94783,93

A partir dos resultados da Tabela 4 empregando as Equações (11 e 12) foi obtida as faixas de confiança para cada valor de concentração da curva de calibração, permitindo traçar as retas de limite máximo e mínimo representadas na Figura 1. A partir dos resultados da Tabela 4 empregando as Equações (11 e 12) foi obtida as faixas de confiança para cada valor de concentração da curva de calibração, permitindo traçar as retas de limite máximo e mínimo representadas na Figura 1.

$$Y_{imax} = b_{max} \times X_i + a_{max} \quad (11)$$

$$Y_{imin} = b_{min} \times X_i + a_{min} \quad (12)$$

O limite de detecção (LD) foi de $0,227 \mu\text{g Kg}^{-1}$ e o limite de quantificação foi de $0,783 \mu\text{g Kg}^{-1}$ calculados pelos procedimentos descritos na EURACHEM (ELLISON; ROSSLEIN; WILLIAMS, 2000) determinados pelas Equações (13) e (14):

$$LD = a + 3 S_a = -1509,7 + 3 S_a = 89390,3 \text{ mVmin}^{-1} = 0,227 \mu\text{gKg}^{-1} \quad (13)$$

$$LQ = a + 10S_a = -1509,7 + 10S_a = 301409,3 \text{ mVmin}^{-1} = 0,783 \mu\text{gKg}^{-1} \quad (14)$$

onde, LD é limite de detecção e LQ é limite de quantificação; a é ordenada na origem; S_a é o desvio padrão associado à ordenada na origem.

Ensaio de precisão

Para a determinação da repetitividade foram utilizados os ensaios da curva de calibração da Tabela 5, enquanto para a precisão intermediária utilizaram-se os dados da Tabela 6.

Tabela 5 – Resultados obtidos na análise dos padrões preparados para a obtenção da curva analítica de calibração empregados nos cálculos da precisão (repetitividade).

Padrão	Concentração $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Area do pico cromatográfico (mVmin^{-1}) (N = 2)	Média das áreas \pm d.p. (mV min^{-1})	CV (%)
1	0,00	n.d.	0 \pm 0,00	0,00
		n.d		
2	8,38	30042	30028,5 \pm 19,09	0,06
		30015		
3	16,76	61650	61670,0 \pm 28,28	0,05
		61690		
4	25,14	95573	95599,0 \pm 36,77	0,04
		95625		
5	33,52	129287	129276,0 \pm 15,56	0,01
		129265		

d.p.:desvio padrão

Tabela 6 – Determinação da precisão intermédia para os padrões de concentração de 8,38, 16,76, 25,14 e 33,52 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, referentes à curva de calibração com determinações em 4 dias diferentes.

Padrão	Concentração $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Área do pico cromatográfico (mV min ⁻¹)	Média das áreas (mV min ⁻¹)	Desvio Padrão	CV(%)
1	8,38	30055	29021,75	1170,86	4,03
		30002			
		27846			
		28184			
2	16,76	61625	59358,50	2671,86	4,50
		61715			
		56905			
		57189			
3	25,14	95553	93926,00	1935,18	2,06
		95645			
		92121			
		92385			
4	32,52	129304	128360,50	1057,39	0,82
		129248			
		127452			
		127438			

Aqui estão reportados os dados relativos à validação do método analítico de determinação de OTA em café cru através do método cromatográfico HPLC-FL, com as incertezas parciais e o respectivo erro global do método de análise.

Incerteza associada à preparação de padrões, $U1$

A incerteza associada a preparação dos padrões levou em conta os erros dos instrumentos de medida, considerando-se os volumes utilizado na preparação das diluições empregadas nos experimentos.

As incertezas são calculadas recorrendo à expressão da Equação (15).

$$\text{Incerteza} = \sqrt{\sum_i \left(\frac{\Delta m_i}{m_i}\right)} \quad (15)$$

sendo, Δm_i o erro associado à medição de um determinado parâmetro, e m_i o valor medido do respectivo parâmetro.

A incerteza associada à preparação da solução mãe de OTA ($28,9 \mu\text{g Kg}^{-1}$) é indicada na Equação (16).

$$\text{Incerteza relativa} = \sqrt{0,0001^2 + \left(\frac{0,025}{10}\right)^2} = 2,5 \times 10^{-2} \quad (16)$$

Os padrões utilizados para se obter a curva de calibração foram preparados a partir da solução mãe supracitada.

Tabela 7 – Erro dos instrumentos de medida.

Equipamentos/Vidraria	Volume	Erro
Balão Volumétrico	10 mL	0,025 mL
Pipeta 10 – 200 μL	25 μL	0,001 μL
	100 μL	0,003 μL
Pipeta 200 – 1000 μL	750 μL	0,02 μL
Espectrofotômetro		0,0001
Injetor	25 μL	0,125 μL
	50 μL	0,250 μL
	75 μL	0,375 μL
	100 μL	0,500 μL

Na Tabela 8 apresentam-se a incerteza associada aos volumes medidos das soluções para cada padrão utilizado.

Tabela 8 – Cálculo de incerteza relativa à preparação dos padrões intermediários os preparados

Padrão	Medição	Incerteza Relativa
Solução Estoque 100,6 μg Kg^{-1}	$V_p = 33,5 \mu\text{L}$ $V_t = 10 \text{ mL}$	$\sqrt{(2,5 \times 10^{-2})^2 + \left(\frac{0,025}{10}\right)^2 + \left(\frac{2 \times 10^{-6}}{1}\right)^2} = 6,3 \times 10^{-4}$
Solução Trabalho 3,35 μg Kg^{-1}	$V_p = 100 \mu\text{L}$ $V_t = 3 \text{ mL}$	$\sqrt{(6,3 \times 10^{-4})^2 + \left(\frac{3 \times 10^{-6}}{0,1}\right)^2 + \left(\frac{2 \times 10^{-5}}{0,75}\right)^2 + \left(\frac{2 \times 10^{-5}}{0,75}\right)^2}$ $= 6,31 \times 10^{-4}$
Solução Trabalho 8,38 μg Kg^{-1}	$V_i = 25 \mu\text{L}$	$\sqrt{(6,31 \times 10^{-4})^2 + \left(\frac{1,25 \times 10^{-4}}{0,025}\right)^2} = 0,005$

Tabela 9 – Cálculo de incerteza relativa à preparação dos padrões presentes na curva de calibração.

(OTA) ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Volume de Injeção (mL)	Erro do Injetor (mL)	U_1
8,38	0,0250	$1,25 \times 10^{-4}$	0,005
16,76	0,0500	$2,5 \times 10^{-4}$	0,005
25,14	0,0750	$3,75 \times 10^{-4}$	0,005
33,52	0,1000	$5,0 \times 10^{-4}$	0,005

Incerteza associada à curva de calibração, U_2

Para o cálculo da incerteza associada à curva de calibração foram utilizados os parâmetros da Tabela 10 empregando as Equações (17 e 18).

Tabela 10 – Parâmetros para o cálculo de U_2 .

X_i	$(Y - \bar{Y})$	$(Y - Y_{cal.})^2$	S_{X_0}	X_0	U_2
8,38	-4,91E+04	1,03003E+13	0,0452	8,38	0,005
16,76	-1,75E+04	4,11999E+13	0,0452	16,76	0,003
25,14	1,65E+04	9,26548E+13	0,0452	25,14	0,002
33,52	5,01E+04	1,64686E+14	0,0452	33,52	0,001

Com,

$$S_{X_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \times \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(Y_i - \bar{Y})^2}{b^2 \times \sum (X_i - \bar{X})^2}} = 0,0452 \quad (17)$$

$$U_2 = \frac{S_{X_0}}{X_0} = 0,005 \quad (18)$$

Sendo,

$n \equiv$ número de injeções efetuadas para cada padrão

$a \equiv$ ordenada na origem na curva de calibração

$b \equiv$ declive da curva de calibração

Incerteza associada à precisão, U_3

A incerteza associada à precisão foi calculada levando-se em conta os parâmetros da Tabela 11 com Equação (19).

Tabela 11 – Parâmetros para o cálculo de U_3 .

X_i	CV(%)	X_0	U_3
8,38	0,06	8,38	0,2456
16,76	0,05	16,76	0,2894
25,14	0,04	25,14	0,2836
33,52	0,01	33,52	0,0819

Sendo,

$$U_3 = CV \times \sqrt{n \times X_0} \quad (19)$$

Incerteza associada à exatidão, U_4

Para a incerteza associada à exatidão empregou-se os parâmetros da Tabela 12 com a Equação (20).

Tabela 12 – Parâmetros para o cálculo de U_4 .

Padrão trabalho $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Recuperação (%)	Média (%)	Desvio Padrão	Desvio relativo	U_4
0,50	79,00	80,6	3,67	0,05	0,0789
	84,80				
	78,00				
10,00	86,40	83,7	2,43	0,03	0,0502
	83,00				
	81,70				
33,52	99,80	100,55	7,12	0,07	0,2349
	98,70				
	104,00				
	89,60				
	109,00				
	102,80				
	104,00				
	89,50				
	109,00				
	93,20				
	106,50				

Sendo,

$$U_4 = 0,07\sqrt{11} = 0,2348 \quad (20)$$

Incerteza global associada, U_t

$$U_t = \sqrt{U_1^2 + U_2^2 + U_3^2 + U_4^2} \quad (21)$$

A incerteza global associada foi calculada a partir da Equação (21), dada pela somatória das incertezas parciais com um valor de 32,5%, valor considerado compatível com os encontrados em trabalhos internacionais que apresentam incertezas de 4,0 a 28,1% (RIBEIRO, 2007).