



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SANDRIEL TRINDADE ALVES

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DIFERENCIAÇÃO DE CAFÉ TORRADO ARÁBICA (*C.
arabica*) e CONILON (*C. canephora*) E MISTURAS**

Londrina
2004

SANDRIEL TRINDADE ALVES

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DIFERENCIAÇÃO DE CAFÉ TORRADO ARÁBICA (*C.
arabica*) e CONILON (*C. canephora*) E MISTURAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Ciências de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marta de Toledo Benassi

Londrina
2004

Alves, Sandriel Trindade

Desenvolvimento de metodologia analítica para diferenciação de café torrado arábica (*C. arabica*) e conilon (*C. canephora*) e misturas / Sandriel Trindade Alves. - Londrina, PR : [s.n], 2004.
104f.

Orientador: Drª Marta de Toledo Benassi.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina.

Bibliografia: f.

1. Análise. 2. Café. 3. Multivariada. I. Benassi, Marta de Toledo.
II. Universidade Estadual de Londrina.

SANDRIEL TRINDADE ALVES

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DIFERENCIAÇÃO DE CAFÉ TORRADO ARÁBICA (*C.
arabica*) e CONILON (*C. canephora*) E MISTURAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Ciências de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Marta de Toledo Benassi
Universidade Estadual de Londrina

Profª Drª Neura Bragagnolo
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Rui Sérgio dos Santos Ferreira
da Silva
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, ____ de _____ de 2004.

**A Deus, aos meus pais e aos meus amigos...
companheiros de todas as horas...**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais esta etapa vencida em minha vida, porque .Tudo posso naquele que me fortalece. (Fp. 4:13);

A Profª Drª Marta de Toledo Benassi, porque “Onde não há conselhos fracassam os projetos,...” (Pv. 15:22);

A Pesquisadora Maria Brígida dos Santos Scholz - IAPAR, por arranjar o problema e pelo apoio na solução;

A Profª Drª Neura Bragagnolo pelas informações e principalmente os padrões;

A minha família, pela confiança e motivação;

Aos amigos e colegas, que de uma forma ou de outra ajudaram na conclusão desse trabalho, seja de uma forma mais ativa ou com um simples sorriso ou uma palavra amiga nas horas de angustia;

Ao CNPQ pelo apoio financeiro;

Agradeço a cessão temporária do software Statistica 6.0 durante a realização do curso Estatística Multivariada: Análise de Agrupamentos e Componentes Principais à empresa “Estudar Consultoria e Empreendimentos” (www.agroescola.com.br);

Em último e não menos importante, a boa e velha musica raiz, seus compositores e interpretes, apenas porque “...toda moda é um remédio pros meus desenganos...”

“...O trabalho dá cansaço e suor de experiência
Trabalhar por trabalhar é relaxar a competência...
...No meu sistema de vida muita gente me critica...
...Da minha filosofia eu só vou dar uma dica
Eu não vou salvar o mundo pra essa gente que complica
Nem morrer de trabalhar pra deixar a viúva rica...”
"VIÚVA RICA" - (Edward de Marchi - Tião Carreiro - 1976)

ALVES, Sandriel Trindade. **Busca de informação:** Desenvolvimento de metodologia analítica para diferenciação de café torrado arábica (*C. arabica*) e conilon (*C. canephora*) e misturas. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos). UEL.

RESUMO

O elevado valor comercial do café arábica é um atrativo a adição fraudulenta de café conilon. Os grãos verdes podem ser visualmente identificados, porém, após torra e moagem não é possível o uso desse critério. Como pertencem ao mesmo gênero, as espécies possuem poucas diferenças na composição para detecção e/ou quantificação da adição. Na literatura existem várias técnicas para diferenciação, algumas muito complexas, exigindo o uso de equipamentos sofisticados. Como a avaliação de um único parâmetro não permite discriminação adequada, é interessante o emprego de Estatística Multivariada. O objetivo do trabalho foi o desenvolvimento de metodologia analítica para diferenciação de café torrado arábica (*C. arabica*) e conilon (*C. canephora*) e suas misturas. As amostras foram submetidas à torra média e, após a moagem, foram preparadas misturas, adicionando-se 5, 10, 15, 20, 25 e 50 % de café conilon ao arábica (IAPAR-59). No método espectrofotométrico, as amostras foram saponificadas em KOH alcoólico, extraído-se a fase orgânica com terc-butil-metil éter e clarificando-se com água. Após evaporação e secagem, o extrato foi ressuspenso em ácido acético glacial, e reagido com KI e HCl. A diferença de cor, verificada por medidas de absorvância a 290nm e 630nm, foi atribuída aos baixos valores de caveol no café conilon. A técnica mostrou-se também eficiente para discriminação de outras variedades de café arábica: Catuaí, Acaiá e Mundo Novo. A metodologia espectrofotométrica desenvolvida mostrou-se eficiente, simples e robusta, podendo ser utilizada como método de triagem na identificação da adição de café conilon ao arábica. Para determinação de trigonelina, ácido clorogênico (5- ACQ) e cafeína foi desenvolvida e validada uma metodologia por cromatografia a líquido de fase reversa utilizando gradiente de ácido acético e metanol e detecção no UV. A melhor condição de extração foi observada com emprego de água à 80 °C. A identificação foi feita com base no tempo de retenção e empregando-se co-cromatografia. A metodologia permitiu, ainda, a separação e detecção dos ácidos nicotínico, caféico, cumárico e ferúlico. Foram estudados como parâmetros para discriminação a absorvância dos extratos, a 290 e 630nm, após reações colorimétricas e os teores de trigonelina, ácido clorogênico (5-ACQ) e cafeína obtidos por CLAE. A avaliação dos resultados obtidos nas metodologias espectrofotométrica e cromatográfica utilizando Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise de Agrupamentos (AA) permitiu a separação entre cafés conilon e arábica IAPAR-59 e misturas acima de 25%. Para misturas com menos de 25% de café conilon possivelmente outras variáveis devem ser consideradas para melhorar a discriminação. A técnica proposta mostrou-se eficiente na discriminação das variedades de arábica mais plantadas no Brasil, minimizando tempo e custos da análise e possibilitando seu uso como método de rotina para diferenciação de café torrado arábica (*C. arabica*) e conilon (*C. canephora*) e misturas.

Palavras-chave: controle de qualidade, caveol, espectrofotometria, cromatografia líquida de alta eficiência, análise mutivariada,

ALVES, Sandriel Trindade. **Search of information:** Simple and effective method for differentiation between roasted arabica (*C. arabica*) and conilon coffee (*C. canephora*) and their blends. 2004. Dissertation (Master's degree in Food Science) . UEL.

ABSTRACT

Considering the high commercial value of arabica coffee, the fraudulent addition of conilon coffee is very attractive. The green bean can be visually identified, however, after the roasting process and grinding this criterion can not be applied. As they belong to the same kind, the species possess few differences for detection and/or quantification of the addition. There are several techniques for differentiation in the literature, some of them very complex and demanding the use of sophisticated equipment. The evaluation of a single parameter does not allow an appropriate discrimination, being necessary the application of multivariate statistical analysis. The aim of this study was to develop an analytical methods for discrimination between arabica and conilon roasted coffees and blends. The samples were medium roasted and ground. Blends were prepared adding 5, 10, 15, 20, 25 and 50% of conilon coffee to the arabica IAPAR-59. Saponification in alcoholic KOH, extraction with tert-butyl-methyl ether and clean up with water were preparatory steps for the spectrophotometric method. The dry extract was redissolved into glacial acetic acid and reacted with KI and HCl. The difference in absorbance measured at 290nm and 630nm was attributed to lower content of kahweol in conilon coffee. The colorimetric reactions were also efficient in discrimination of other arabica coffee varieties: .Catuaí., .Acaiá. and .Novo mundo.. The described spectrophotometric method was rapid, simple and rugged. It can also be used as a screening method in the identification of the addition of conilon to arabica coffee. It was developed and validated a method for simultaneous determination of trigonelline, chlorogenic acid (5-ACQ) and caffeine by reverse phase liquid chromatography. A gradient of acetic acid and acetonitrile was used as mobile phase and UV detection. The best extraction condition was observed with water at 80°C. The identification was based on retention time and cochromatography. The absorbance of the extract after colour reactions measured at 290 and 630 nm and contents of trigonelline, chlorogenic acid caffeine determined by HPLC were studied as discrimination parameters. These parameters were submitted to Principal Component Analysis (PCA) and Cluster Analysis (CA). The results allowed discrimination between coffees conilon and arabica IAPAR-59 and 25% blends. For blends with less of 25% of conilon coffee the introduction of other variables to improve the discrimination should be considered. The proposed technique was efficient in the discrimination of brazilian arabica coffee varieties decreasing time and costs of analysis. It can be applied as a routine method for differentiation of roasted arabica (*Coffea arabica*) and conilon coffee (*Coffea canephora*) and blends.

Key words: quality control, kahweol, spectrofotometry, liquid chromatography, multivariate analysis.

LISTA DE TABELAS

TABELA II.1 . Características sensoriais do café quanto aos diferentes tipos de torra	36
TABELA II.2 . Características sensoriais da bebida obtida a partir de diferentes tipos de torra e moagem de grãos de café	39
TABELA II.3 . Composição química aproximada(em base seca) do grão cru	40
TABELA II.4 - Principais ácidos encontrados no café	42
TABELA II.5 - Compostos que contribuem para o sabor amargo em Café	44
TABELA II.6 . Caracterização de alguns compostos do café	46
TABELA II.7 . Principais lipídios em grãos de café.....	50
TABELA II.8 - Teor de minerais em café torrado.....	52
TABELA II.9 . Análise de cafeína, trigonelina e compostos fenólicos em café verde por CLAE	61
TABELA II.10 . Análise de cafeína, trigonelina, compostos fenólicos e outros alcalóides e produtos de degradação em café torrado por CLAE	62
TABELA II.11 . Análise de cafeína, trigonelina, ácido nicotínico, ácidos clorogênicos e compostos de degradação em café verde e torrado por CLAE	63
TABELA IV.1 - Matriz de planejamento fatorial das variáveis selecionadas.....	73
TABELA V.1 . Características de cor das amostras de café arábica e conilon.....	78
TABELA V.2 - Matriz de planejamento fatorial e estimativas dos efeitos das Variáveis Selecionadas.....	85
TABELA V.3 - Tempos de retenção para mistura padrão de trigonelina, cafeína e 5- ACQ.....	103
TABELA V.4 - Resumo das condições cromatográficas propostas	104
TABELA V.5 - Concentrações de trigonelina, cafeína e 5-ACQ usadas na Construção das curvas analíticas	105
TABELA V.6 - Parâmetros da reta ($y = Ax + B$) para as curvas analíticas de trigonelina, 5-ACQ e cafeína.....	106
TABELA V.7 . Valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação para os ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade de trigonelina, 5-ACQ e cafeína	107

TABELA V.8 - Recuperação (%) observada para trigonelina, 5-ACQ e Cafeína	108
TABELA V.9 . Recuperação (%) observada para adição de solução padrão de concentração conhecida ao extrato obtido para ensaio de repetibilidade.....	109
TABELA V.10 - Valores de limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) para trigonelina 5-ACQ e cafeína	110
TABELA V.11 . Medidas de absorvância a 290 e 630 nm após reação colorimétrica com HCl e KI.....	111
TABELA V.12 . Teores de trigonelina, 5-ACQ e cafeína determinados por CLAE	115

LISTA DE FIGURAS

FIGURA II.1 - Grãos de café beneficiado das espécies <i>Coffea arábica</i> e <i>a Coffea Canephora</i>	28
FIGURA II.2 - Evolução da razão entre as concentrações de 5-ACQ/cafeína e trigonelina/cafeína durante a torra	35
FIGURA II.3 - Concentrações dos analitos nos diferentes extratos de café arábica	38
FIGURA II.4 . Provável via de degradação do 3,5 diACQ durante a torra	48
FIGURA II.5 . Estruturas do cafestol e do caveol.....	58
FIGURA II.6 . Mecanismo de adição de haleto de hidrogênio à dupla Ligação	59
FIGURA V.1 . Fluxograma do método espectrofotométrico	79
FIGURA V.2 . Cores relativas às reações colorimétricas com HCl e com KI para café arábica, conilon e misturas.....	83
FIGURA V.3 - Espectros de Absorção dos extratos, com t-BME, de amostra 100% Arábica antes da reação e após reação com KI, amostra 100% Arábica e 100% Conilon e após reação com HCl, amostra 100% Arábica e 100% Conilon.....	84
FIGURA V.4 - Gráfico e matriz de correlações das variáveis espectrofotométricas com os Componentes Principais 1 e 2, para reações colorimétricas de amostras arábica variedade IAPAR-59, Acaiá, Catuaí, Mundo Novo e Conilon.....	87
FIGURA V.5 - Dendrograma e Análise de Componentes Principais (CP1 e CP2) a partir dos resultados medidos para reações colorimétricas (HCl e KI a 630 e 290 nm) de amostras arábica variedade IAPAR-59, Acaiá, Catuaí, Mundo Novo e Conilon.....	88
FIGURA V.6 - Cromatograma de uma mistura padrão de trigonelina e ácido nicotínico com eluição isocrática empregando fase móvel de ácido fórmico/metanol	90

FIGURA V.7 . Comparação de cromatogramas de mistura padrão de trigonelina e ácido nicotínico empregando fase móvel isocrática com adição de ácido sulfúrico ou ácido fórmico.....	91
FIGURA V.8 - Cromatograma de uma mistura padrão de trigonelina e ácido nicotínico com eluição isocrática empregando fase móvel de ácido sulfúrico/metanol.....	91
FIGURA V.9 - Cromatograma de uma mistura padrão de trigonelina, ácido nicotínico, 5-ACQ, ácido caféico, ácido cumárico, cafeína com eluição isocrática empregando fase móvel de ácido sulfúrico/metanol.....	93
FIGURA V.10 - Cromatograma de uma mistura padrão de trigonelina, ácido nicotínico, 5-ACQ, ácido caféico, ácido cumárico, ácido ferúlico e cafeína com eluição isocrática empregando fase móvel de ácido acético/metanol.....	94
FIGURA V.11 - Cromatograma de uma mistura padrão de ácido nicotínico, trigonelina, 5-ACQ, ácido caféico, ácido cumárico, ácido ferúlico e cafeína com eluição gradiente empregando fase móvel de ácido acético/metanol.....	95
FIGURA V.12 - Cromatograma de uma amostra de café 100 % Arábica (IAPAR 59) submetida a diferentes condições de extração: solução MeOH/solução de ácido acético 5% (10:90) a 80 °C (A); H ₂ O a 80 °C (B) e H ₂ O a 100°C (C).....	97
FIGURA V.13 . Condições propostas para extração das amostras de café.....	98
FIGURA V.14 - Cromatograma do extrato de amostra 100% arábica (IAPAR 59).	99
FIGURA V.15 - Cromatograma do extrato de amostra 100% arábica (IAPAR 59).	99
FIGURA V.16 - Espectros de varredura de trigonelina, cafeína e 5- ACQ.....	100
FIGURA V.17 - Cromatograma do extrato de amostra 100% arábica (IAPAR 59) com detecção a diferentes comprimentos de ondas: 272nm, 280nm e 320nm.....	101
FIGURA V.18 - Cromatograma do extrato de amostra 100% arábica e de uma mistura padrão com eluição gradiente empregando fase móvel de ácido acético/acetonitrila	102
FIGURA V.19 - Cromatograma de mistura padrão de trigonelina, 5-ACQ e cafeína com eluição gradiente empregando fase móvel de ácido acético/acetonitrila	103

FIGURA V.20 - Curvas analíticas de trigonelina, 5-ACQ e cafeína.....	105
FIGURA V.21 - Gráfico e matriz de correlações das variáveis espectrofotométricas (HCl e KI a 630 e 290 nm) com os Componentes Principais 1 e 2	112
FIGURA V.22 - Dendrograma e Análise de Componentes Principais (CP1 e CP2) a partir dos resultados do método espectrofotométrico (HCl e KI a 630 e 290 nm).....	113
FIGURA V.23 . Relação entre as variáveis e dendrograma a partir dos resultados das reações colorimétricas: com HCl e KI para absorbância a 630 nm e a 290 nm	114
FIGURA V.24 - Gráfico e matriz de correlações das variáveis trigonelina, 5-ACQ e cafeína com os Componentes Principais 1 e 2.....	117
FIGURA V.25 . Dendrograma e Análise de Componentes Principais (CP1 e CP2) a partir dos teores de trigonelina, 5-ACQ e cafeína obtidos no método cromatográfico	118
FIGURA V.26 . Relação entre as variáveis e dendrograma a partir dos resultados das reações colorimétricas: cafeína x trigonelina cafeína x 5-ACQ e 5-ACQ x trigonelina.....	120
FIGURA V.27 - Gráfico e Matriz de Correlações das variáveis cromatográficas (cafeína, trigonelina e 5-ACQ) e espectrofotométricas (KI 630, HCL 630) com os Componentes Principais 1 e 2.....	122
FIGURA V.28 - Dendrograma e Análise de Componentes Principais (CP1 e CP2) a partir de resultados obtidos nos métodos cromatográfico (cafeína, trigonelina e 5-ACQ) e espectrofotométrico (KI 630, HCL 630)	123

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

a* - Componente vermelho-verde

ACQ - Ácido cafeoilquínico

ACG - Ácido clorogênico

AA - Análise de Agrupamentos

ACP - Análise de Componentes Principais

b* - Componente amarelo-azul

CLAE - Cromatografia Líquida de alta eficiência

Cs - Quantidade injetada do analito.

HCl - Ácido Clorídrico

HCl 630 nm - Absorção a 630 nm dos extratos, com t-BME, após reação com HCl

HCl 290nm - Absorção a 290 nm dos extratos, com t-BME, após reação com HCl

hn - Variação máxima do ruído no tempo de retenção do composto

hs - Altura do sinal cromatográfico

IV - Infravermelho

KI - Iodeto de Potássio

KI 630 nm - Absorção a 630 nm dos extratos, com t-BME, após reação com KI

KI 290nm - Absorção a 290 nm dos extratos, com t-BME, após reação com KI

KOH - Hidróxido de potássio

L* - Luminosidade

LD - Limite de Detecção

LQ - Limite de Quantificação

MeCN - Acetonitrila

MeOH - Metanol

MI - Matéria Insaponificável

t-BME - Terc-butil-metil éter

UV - Ultravioleta

VIS - Visível

□ - Diâmetro de partícula

λ - Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 HISTÓRICO	22
2.2 CARACTERÍSTICAS DAS ESPÉCIES E VARIEDADES	25
2.3 PÓS-COLHEITA E PROCESSAMENTO	29
2.3.1 Colheita, secagem e armazenamento	30
2.3.2 Beneficiamento e classificação	31
2.3.3 Torra e moagem	33
2.4 COMPOSIÇÃO, CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS E ESTABILIDADES À TORRA DE COMPOSTOS DO CAFÉ	39
2.5 DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES	52
2.5.1 Reações colorimétricas da matéria insaponificável	57
2.5.2 Análise de trigonelina, cafeína e compostos fenólicos por CLAE	60
3 OBJETIVOS	67
2.1 OBJETIVO GERAL	67
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	67
4 MATERIAL E MÉTODOS	69
4.1 MATERIAL	69
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CAFÉ	69
4.2.1 Análise de Umidade	69
4.2.2 Análise de Cor	69
4.3 REAGENTES	70
4.4 EQUIPAMENTOS	71
4.5 METODOLOGIA ESPECTROFOTOMETRICA	71
4.5.1 Avaliação dos Parâmetros Experimentais	71
4.5.2 Estudo da eficiência do método para outras variedades	73
4.6 METODOLOGIA CROMATOGRÁFICA	74
4.6.1 Preparo de Padrões	74

4.6.2 Otimização das Condições Cromatográficas.....	74
4.6.3 Identificação e Quantificação	75
4.6.4 Extração	75
4.6.5 Validação do Método.....	76
4.7 ANÁLISE DAS VARIEDADES E MISTURAS	77
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	78
5.2 METODOLOGIA ESPECTROFOTOMETRICA	79
5.2.1 Avaliação dos Parâmetros Experimentais	79
5.2.2 Avaliação da Rusticidade do Método	84
5.2.3 Estudo da eficiência do método para outras variedades	86
5.3 METODOLOGIA CROMATOGRÁFICA	89
5.3.1 Estudo das Condições Cromatográficas	89
5.3.1.1 Testes com padrões	89
5.3.1.2 Testes com Amostra Real	95
5.3.2 Validação do método.....	104
5.3.2.1 Linearidade.....	104
5.3.2.2 Precisão	106
5.3.2.3 Exatidão	107
5.3.2.4 Sensibilidade	109
5.4 DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES ARABICA (IAPAR-59) E CONILON E MISTURAS.....	110
5.4.1 Metodologia Espectrofotométrica	110
5.4.2 Metodologia Cromatográfica	115
5.4.3 Diferenciação das espécies e misturas de café utilizando parâmetros cromatográficos e espectrofotométricos	121
6 CONCLUSÃO	125
7 SUJESTÃO PARA PROJETO FUTURO	126
REFERÊNCIAS.....	127
APÊNDICES	134

APÊNDICE A – ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA DOS RESULTADOS OBTIDOS PELA REAÇÕES COLORIMÉTRICAS COM MISTURA DE CAFÉ ARABICA DE DIFERENTES VARIEDADES E CONILON	135
A1 . Analise de misturas de café conilon e arábica variedade Acaiá	135
A2 . Analise de misturas de café conilon e arábica variedade Catuaí.....	136
A3 . Analise de misturas de café conilon e arábica variedade Mundo Novo	137
ANEXOS	138
ANEXO - LEI Nº 13519 DA LEGISLAÇÃO ESTADUAL DA SECRETÁRIA DO ESTADO DO GOVERNO - 08/04/2002	139

1 INTRODUÇÃO

Bebida aromática e de hábito disseminado pelo mundo, a produção e comercialização de café têm hoje peso relevante na economia, sendo um dos principais produtos de exportação de cerca de 40 países menos desenvolvidos (ACHEIBEM, 2003). No Brasil, este grão de grande produção nas regiões sul e sudeste, destaca-se por ser um símbolo tradicional consumido em grande quantidade em todo território. A sua produção envolve milhões de pessoas direta e indiretamente, desde o plantio ao consumo final. Estima-se que cerca de 1700 municípios brasileiros sejam cafeeiros (CARVALHO *et al.*, 2001).

Uma das maiores preocupações atuais da cafeicultura nacional é tornar o café brasileiro competitivo internacionalmente em nível de qualidade, mudando sua imagem positiva que se baseia apenas no aspecto econômico (LOPES, 2000).

Mais de 80 espécies do gênero *Coffea* são conhecidas, e dentre estas as mais cultivadas são *Coffea arábica* e *Coffea canephora*, com cerca de 75 % e 24 %, respectivamente, da produção mundial (CASAL *et al.*, 2000). A produção de café de Brasil para 2003/04 está prevista em 33,6 milhões de sacas. A produção de café arábica está projetada para 23,3 milhões de sacas e a de conilon, para 10,3 milhões de sacas (FAS, 2003). No Brasil, a variedade mais plantada do *C. canephora* é o conilon, enquanto que, nos demais países, é a variedade robusta.

Os cafés arábica e conilon diferem consideravelmente no preço, qualidade e aceitabilidade, produzindo tipos de bebidas diferentes. Com o café arábica são feitas bebidas de melhor qualidade, enquanto que o conilon é utilizado preferencialmente para a fabricação de cafés solúveis por apresentar elevado teor

de sólidos solúveis (MENDES, 1999). Os grãos crus das duas espécies podem ser facilmente distinguidos visualmente: o de arábica é verde claro e de forma oval, enquanto que o de conilon tende a ser mais arredondado e castanho. Entretanto, estes indicadores visuais são eliminados nos processos de torra e moagem, requisitando métodos alternativos de diferenciação, pois, como as espécies pertencem ao mesmo gênero, possuem poucas diferenças físico-químicas (GONZALEZ *et al.*, 2001).

As características sensoriais da bebida café são influenciadas pela espécie utilizada, pelos tratamentos agrícolas do grão e processos de secagem, fermentação, torra, moagem e acondicionamento (MELLO, 2001). A torra é a etapa mais importante para o desenvolvimento do sabor e aroma, que são conferidos por compostos presentes antes e, principalmente desenvolvidos após a torra. Nesta etapa, os componentes dos grãos sofrem reações químicas e físicas importantes, necessárias à formação da qualidade sensorial (LOPES, 2000).

Algumas torrefadoras, além de não atenderem aos requisitos mínimos de qualidade dos grãos utilizados, adulteram seus produtos, através da adição de matérias estranhas ao café antes da torra. No Brasil, as fraudes encontradas com maior frequência são: a presença de cascas do café, paus, milho torrado, açúcar, cacau torrado, terra, areia (ASSAD *et al.* 2002). O aspecto granuloso do café, sua característica oleosa e aderente e a sua cor contribuem para que tais substâncias estranhas tornem-se quase imperceptíveis, tornando difícil seu reconhecimento sem o auxílio de equipamentos e métodos analíticos específicos. Devido à dificuldade na diferenciação das espécies, outro tipo de fraude que ocorre é a adição de café conilon, de menor valor comercial, ao arábica.

Existem várias técnicas para diferenciação das espécies arábica e robusta geralmente baseada na análise de diversos compostos: metais, compostos voláteis, ácidos clorogênicos, trigonelina, cafeína; cafeoiltirosina e ácidos hidroxicinâmicos. A composição de lipídios, e em particular, a fração de esteróis, ácidos graxos e álcoois diterpênicos, também tem sido empregada na diferenciação das espécies de cafés. Muitos trabalhos foram realizados com grãos verdes para diferenciação das espécies de cafés (KY *et al.*, 2001; MARTIN *et al.*, 1998; ANDRADE *et al.*, 1998; CARRERA *et al.*, 1998), sendo menos freqüentes estudos com produto torrado (CASAL *et al.*, 1998; DAGLIA *et al.*, 1994). Também é importante considerar que, não necessariamente os compostos que foram identificados como bons discriminantes para as espécies *arabica* e *canephora* em outros países serão eficientes para o produto brasileiro devido ao emprego de variedades diferenciadas.

Observou-se, também, que vários desses compostos propostos para a diferenciação apresentam uma grande variabilidade dentro da espécie e são fortemente influenciados pelas condições de torra. Assim, é necessário utilizar para a análise dos dados, métodos estatísticos multivariados, onde a caracterização do produto não é baseada em valores individuais de parâmetros, mas em sua combinação. Técnicas estatísticas como Análise de Componentes Principais e Análise de Agrupamentos vêm sendo empregadas para caracterizar ou agrupar produtos (MARTIN *et al.*, 1998; CASAL *et al.*, 1998; TZOUROS *et al.*, 2001).

As autoridades sanitárias, preocupadas com fraudes e visando garantir ao consumidor as características e qualidade dos produtos adquiridos, têm atualizado a legislação nacional na tentativa de coibir e impedir práticas que possam vir a provocar danos econômicos e/ou a saúde das pessoas.

A Portaria n o 377 do Ministério da Saúde (de 26 de abril de 1999), que aprova o “Regulamento Técnico para Fixação de Identificação e Qualidade de Café Torrado em Grão e Café Torrado e Moído”, permite um máximo de máximo 1% para impurezas presentes no café e menciona que no rótulo pode constar a variedade, origem e/ou denominação específica (ANVISA, 2003).

No Estado do Paraná está em estudo a implementação de uma legislação (Lei no 13.519, da Legislação Estadual da Secretaria do Estado do Governo, de 08 de abril de 2002) (SECRETARIA DO ESTADO DO GOVERNO DO PARANÁ, 2003) (ANEXOS) para estabelecer a obrigatoriedade de informação da espécie, conforme o transcrito abaixo:

“Art. 1º - Fica estabelecida a obrigatoriedade de informação, nos rótulos das embalagens de café comercializado no Paraná, da percentagem de cada espécie vegetal de que se compõe o produto.

§ 1º. O produto comercializado no Paraná com o nome de café, independentemente de sua apresentação, somente poderá ser produzido a partir de grãos de espécies vegetais do gênero Coffea.

Art. 2º. As disposições desta Lei aplicam-se ao café torrado em grão, ao café torrado moído, ao café solúvel e a todas as demais formas em que o café, destinado ao consumo humano, puro ou em mistura com outros produtos alimentícios, seja comercializados no Brasil.

Art. 5º. Constará das embalagens de todo o café comercializado no Paraná um selo da qualidade emitido pela produção, através da Associação Paranaense de Cafeicultores – APAC, com a fiscalização da EMATER-Paraná e aprovação técnica, através de laudo laboratorial a ser fornecido pelo Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR..”

A detecção da adição fraudulenta ou acidental de café conilon é de interesse das indústrias de café e autoridades reguladoras, necessitando-se de metodologias simples e quantitativas para monitoração da qualidade. Dessa forma, destaca-se a importância do estudo de parâmetros que permitam a identificação e/ou quantificação de café conilon em misturas com café arábica, bem como o desenvolvimento de ferramentas analíticas para essa avaliação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO

A palavra "café" vem do árabe .kahoua. ou .qahwa. (o excitante) e designa: o grão do cafeeiro; a bebida preparada por infusão de água fervente com café torrado e moído; o lugar público onde se toma café ou outras bebidas, sem esquecer a cor do café, um marrom escuro que lembra o grão de café torrado (CAFÉ BEIRA RIO, 2003).

Originário da Abissínia, atual Etiópia, o café tem várias histórias sobre seu emprego inicial e não se conhecem documentos que registrem com clareza sua descoberta e aproveitamento. Uma das versões diz que, por volta de 850 a.C., Kaldi, um pastor de um mosteiro, teria notado agitação no seu rebanho de cabras quando comiam os frutos vermelhos de um certo arbusto. Provando-o, Kaldi sentiu-se também bastante alegre e bem disposto. Seria o primeiro contato direto do homem com a planta que mais tarde daria origem ao produto (CAFÉ BEIRA RIO, 2003).

O café espalhou-se pelo Norte da África e chegou ao mundo árabe. A proibição de bebidas alcoólicas pela religião muçulmana ajudou na difusão do café, que passou a ser consumido por todos. Embora os árabes tenham tomado certas medidas para manter o monopólio da produção do café, só permitindo a exportação de frutos previamente fervidos para evitar que germinassem em outras terras, os holandeses conseguiram contrabandear frutos frescos para suas colônias asiáticas (Java, Ceilão e Sumatra) e posteriormente para as Antilhas Holandesas, na América Central, e Europa (AGROFOOD, 2003).

O café foi introduzido na Guiana Francesa através do Governador de Caiena que conseguiu um punhado de sementes, colhidas dos cafeeiros que os holandeses haviam plantado em Suriname, e as semeou no pomar de sua residência (CAFÉ SANTA CLARA, 2003). Em 1727, o Governador do Maranhão e Grão Pará, João da Maia da Gama, contrabandeou da Guiana Francesa algumas sementes e mudas que foram plantadas em Belém do Pará. No ano seguinte o café foi introduzido no Maranhão migrando em pequenas plantações, aos estados vizinhos, chegando à Bahia em 1770 (CAFÉ SANTA CLARA, 2003).

O café representava um novo e próspero ciclo econômico para o Brasil, contribuindo para a ocupação econômica do território, a elevação das rendas e da capitalização, o crescimento da classe média, a urbanização e a criação de atividades econômicas conexas (MELITTA, 2003). No Brasil inteiro, a cafeicultura gerou bilhões em receita e o café passou a ser cultivado em várias regiões no país.

Nas sesmarias de Vassouras, surgiria a primeira capital brasileira do café, nas primeiras décadas do século XIX (CAFÉ DO SÍTIO, 2003). Do Rio de Janeiro o café expandiu-se pelos contrafortes da Serra do Mar, atingindo em 1825 o Vale do Paraíba, tendo alcançado daí os Estados de São Paulo e Minas Gerais. (CAFÉ SANTA CLARA, 2003).

No centro-sul, em condições ecológicas altamente favoráveis, o café atingiu o oeste paulista, em 1840 (CAFÉ SANTA CLARA, 2003), sendo que em 1890, São Paulo produzia mais do que as outras regiões juntas, alcançando em pouco tempo, cinco milhões de sacas. (MELITTA, 2003). Em 1920, iniciou-se o plantio no Estado do Espírito Santo e o noroeste de São Paulo. Entre 1928 e 1930, o café chegou a Alta Sorocabana, a Alta Paulista e ao Estado do Paraná (CAFÉ SANTA CLARA, 2003).

Durante três quartos de séculos, concentrou-se na agricultura cafeeira quase toda riqueza do país. O Brasil dominava 70% da produção mundial e ditava as regras de mercado. A produção continuou a aumentar e a superprodução gerou várias crises desde o início do século XIX. Entre 1920 e 1930, o café representava 70% das exportações brasileiras. A produção era tão grande que, às vezes não era possível vendê-la toda. Com a crise, de 1929 sobrou café demais e o governo não comprou os estoques. Por esse motivo, os preços baixaram e centenas de fazendeiros e exportadores ficaram arruinados (MELITTA, 2003).

Mais tarde o centro de produção desceu para o Paraná, que assumiu a liderança na produção em 1960. As condições do solo e do clima, com as possíveis práticas de cultura extensiva permitiram a expansão do ciclo cafeeiro sustentado pela demanda crescente em decorrência da elevação das rendas do mundo ocidental (CAFÉ DO SÍTIO, 2003).

Atualmente, as áreas cafeeiras estão concentradas no centro-sul e sudeste do país. Destacam-se quatro estados produtores: Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Paraná. A região Nordeste também tem plantações na Bahia, e da região Norte pode-se destacar Rondônia (MELITTA, 2003).

Em 2002/2003, a distribuição da produção brasileira de café por Estado da Federação encontra-se da seguinte forma: Minas Gerais (52%), São Paulo (12,3%), Espírito Santo (19%), Paraná (4,9%) e os demais contribuem com 11,8% (CANÇADO, 2003).

Segundo a Organização Internacional do Café (OIC), na safra 2002/2003 houve um recorde de produção mundial, com o Brasil respondendo por cerca de 37%, Colômbia e Vietnã por 9%, cada um. O Brasil colheu no ano-safra 2002/2003, a maior quantidade de café da sua história: 51,6 milhões de sacas. Líder

na produção e exportação do produto, o país superou o estágio do extrativismo. Esse desempenho no rendimento da produção cafeeira é o resultado do trabalho de Institutos de Pesquisas, do Programa de Modernização da Frota de Tratores Agrícolas e Implementos Associados e Colheitadeiras (MODERFROTA) e pelo alongamento de dívidas amparadas pelo Fundo para a Renovação da Cultura do Café (FUNCAFÉ). (CANÇADO, 2003; FAS, 2003).

2.2 CARACTERÍSTICAS DAS ESPÉCIES E VARIEDADES

O gênero *Coffea* apresenta aproximadamente 100 espécies de cafeeiros, mas apenas cinco são cultivados comercialmente e, entre estes, *Coffea arábica* (cafeeiro arábica) e *C. canephora* Pierre (cafeeiro robusta) são os mais comercializados (CARVALHO *et al.*, 2001).

A planta de *Coffea arábica* tem a altura média de 3 a 5 metros, podendo chegar a 10 metros. O tronco tem de 8 a 10 centímetros de diâmetro e as raízes podem chegar até 1,5 m de profundidade. Apresenta flores com fragrância próxima ao jasmim, e seus frutos vão do verde ao vermelho, passando pelo amarelo. A espécie arábica é de grande significado econômico para as regiões que a cultivam, especialmente nas Américas, uma vez que seu produto é de qualidade sensorial superior e de maior aceitação em todos os mercados consumidores (CAFÉ DO SÍTIO, 2003).

Existe um grande número de variedades, sendo que as duas mais cultivadas no Brasil são o Catuaí, com aproximadamente 60% do total, e o Mundo Novo, com cerca de 35% (MATIELLO, 2004). A segunda tem esse nome porque

teve origem na década de 1940, no município paulista de Mundo Novo, hoje chamado Urupês. Essa variedade foi criada pelo IAC (Instituto Agrônomo de Campinas), apresentando como uma das principais características a alta produtividade. Apesar dessa vantagem, o grande porte do Mundo Novo dificulta sua colheita (COFFEEBREAK, 2003 b). Devido a essa constatação, o IAC realizou novos estudos e o resultado foi o surgimento da variedade Catuaí, que significa "muito bom". Dentro desta variedade, existem duas linhagens: o Catuaí Vermelho e o Catuaí Amarelo (COFFEEBREAK, 2003 b).

Mesmo estando presentes em grande parte da área brasileira destinada ao cultivo de café, as variedades Mundo Novo e Catuaí estão sendo lentamente substituídas por novas variedades. Atualmente, o produtor pode escolher a variedade que vai plantar com base na produtividade que almeja, no espaço que tem à disposição, no tipo de relevo do solo e de acordo com sua opção por lavoura mecanizada ou manual. Além de observar as características físicas do cafeeiro, o produtor hoje também pode avaliar o grau de resistência dos cultivares, que são as linhagens criadas por institutos de pesquisa, como o IAC e o IAPAR (Instituto Agrônomo do Paraná) (COFFEEBREAK, 2003b).

As linhagens da variedade Acaíá, por exemplo, têm boa capacidade de adaptação às diferentes regiões e sendo especialmente indicadas para plantio adensado. Outra característica que o diferencia são os grãos, maiores que os do Mundo Novo e suas linhagens. É uma variedade especialmente indicado quando se pretende utilizar colheita mecânica (IAC).

A variedade IAPAR 59 originou-se do cruzamento entre *Coffea arabica*, Villa Sarchi 971/10 e o Híbrido de Timor 832/2, realizado no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro em Portugal, onde recebeu a denominação

de H361. Após bom desempenho nas regiões de Londrina, Loanda e Carlópolis, foi lançada como variedade, passando a receber a denominação de IAPAR 59. A média da produção anual por planta demonstrou que a variedade é altamente competitiva, no mesmo espaçamento em comparação com as variedades comerciais em uso, com a vantagem de não necessitar tratamentos químicos para o controle da ferrugem. É preferencialmente indicada para regiões mais frias e chuvosas, por amadurecer mais precoce e uniformemente que Catuaí, antecipando a colheita e escapando do dano das geadas precoces sobre frutos verdes. Deve ser plantada preferencialmente em partes altas da propriedade, onde o calor e a geada são menos intensos (IAPAR).

Outras variedades de café arábica são Icatu Vermelho e Amarelo, Tupi, Obatã, Catuaí Rubi, Topázio, Katipó, Catucaí Vermelho e Amarelo, Oeiras-MG 6851 e outras ainda com diversas linhagens estão disponíveis para cultivos comerciais (COFFEEBREAK, 2003

a).

A *Coffea canephora* é uma espécie originária da África Central, tem um trato cultural mais rude e pode ser cultivada ao nível do mar. Não possui sabores variados nem refinados como o arábica. Diz-se que tem um "sabor típico e único". Sua acidez é mais baixa e, por ter mais sólidos solúveis, é utilizado intensamente nos cafés solúveis. Seu teor de cafeína é o dobro do arábica. O *canephora* adapta-se melhor em regiões quentes e úmidas e é mais resistente à ferrugem do cafeeiro (CAFÉ ALVORADA, 2003).

No Brasil, a quase-totalidade das lavouras de café *canephora*, genericamente conhecido por robusta, é da cultivar Conilon, e o estado do Espírito

Santo é o maior produtor nacional, destacando-se ainda os estados de Rondônia, Minas Gerais, Mato Grosso, Bahia e Rio de Janeiro. Atualmente, mais de 60% do café produzido no Espírito Santo se origina desta variedade, e o estado responde por cerca de 70% da produção brasileira. Apesar de sua importância sócio-econômica, a produtividade do café conilon ainda é baixa, aquém do potencial desta variedade (BRAGANÇA *et al.*, 2001).

O fruto do cafeeiro é uma drupa, de 10 a 15 mm de diâmetro, por 17 a 18 mm de altura (CAFÉ BEIRA RIO, 2003), composta do exocarpo ou epiderme do fruto; do mesocarpo ou polpa - a mucilagem; do endocarpo ou pergaminho, e por último de dois grãos ou sementes (CAFÉ DO SÍTIO, 2003). A FIGURA II.1 mostra uma comparação entre os grãos verdes das espécies *Coffea arábica* e a *Coffea canephora* (CAFÉ ALVORADA, 2003).



FIGURA II.1 . Grãos de café beneficiado das espécies *Coffea arábica* e a *Coffea canephora*
Fonte: (CAFÉ ALVORADA, 2003)

2.3 PÓS-COLHEITA E PROCESSAMENTO

A qualidade do café depende na fase pré e pós-colheita de uma interação de fatores que garantam características desejáveis de sabor e aroma. Aos fatores pré-colheita somam-se os cuidados exigidos nas fases de colheita e o preparo do café. Finalmente, a realização adequada do processo de armazenamento e beneficiamento, torra, moagem e preparo da infusão, que modificam a constituição química do grão, garantem a qualidade final do produto. A incidência de microrganismos nas fases pré e pós-colheita tem sido um dos principais fatores envolvidos na qualidade do café, principalmente na modalidade de colheita e preparo adotados no Brasil (CARVALHO *et al.*, 1997).

Da produção ao consumo o café passa por um longo ciclo. As sementes são plantadas nos viveiros para obtenção, seis meses a um ano depois, das mudas. Estas são plantadas no campo, e recebendo os tratamentos necessários, os cafeeiros crescem e aos 2,5 anos já iniciam a produção. As plantas florescem, frutificam e quando os frutos estão maduros são colhidos e postos a secar. O café é então armazenado e beneficiado, eliminando-se a casca do fruto. O café, assim preparado, está em condições de ser exportado ou industrializado, quando o café é torrado e moído ou solubilizado e tornando-se pronto para consumo (CAFÉ DO SÍTIO, 2003).

2.3.1 Colheita, secagem e armazenamento

A colheita do café é feita quando a maioria dos frutos estão maduros ou secos. No centro-sul do Brasil isto ocorre de abril a agosto. A colheita compreende várias operações que, no método mais usual, a derriça no chão abrange (CAFÉ DO SÍTIO, 2003):

- arruação ou coroação: limpeza da área onde cairá o café;
- varrição: levantamento do café caído naturalmente, antes da derriça;
- derriça: derrubada dos frutos manualmente;
- levantamento: ajuntamento do café derriçado em peneiras, onde se efetua a abanação;
- esparramação: leiras ou .coroas. são desmanchadas após a colheita.

Depois de colhido, o café é transportado para ser preparado, o que pode ser realizado por duas vias: a seca e a úmida.

A via úmida é empregada no Brasil quase que exclusivamente para produção de sementes. O café é despulpado em equipamentos especiais, degomado e seco, sendo este um processo que requer maior demanda de trabalho (CAFÉ DO SÍTIO, 2003).

Pela via seca, o café colhido é conduzido aos terreiros ou aos secadores para secagem. Nos terreiros os cafés são revolvidos constantemente, para expor os grãos ao sol, e a secagem se completa em 15-20 dias. Nos secadores o café é seco pelo calor produzido pela queima de lenha ou de palha. A temperatura

é mantida em torno de 45/60°C, e a secagem se completa em dois ou três dias (CAFÉ DO SÍTIO, 2003).

Quando o café estiver com umidade em torno de 12% pode ser recolhido, e armazenado Bem .coco. em tulhas nas próprias fazendas. O café beneficiado é ensacado e guardado em armazéns. O combate às pragas com produtos inseticidas é realizado periodicamente, visando eliminar carunchos e traças (CAFÉ DO SÍTIO, 2003).

2.3.2 Beneficiamento e classificação

O beneficiamento é o conjunto de operações que retira a casca do café, em “coco”, seco, a casca, elimina as impurezas e separa os grãos em diferentes tamanhos de favas, sendo posteriormente ensacados em sacos de juta de 60,5kg. A retirada da casca é feita por uma peça cilíndrica giratória, que atrita os grãos, descascando-os. A separação das impurezas e a classificação são efetuadas através de peneiras, ventilação, catadores de pedras e separadores magnéticos. Quando se deseja um café com melhores características comerciais faz-se o rebenefício, que padroniza o tipo, aspecto, e tamanho de fava. Isto é feito pela separação manual, mecânica ou eletrônica, segundo os princípios de tamanho e forma do grão, peso específico e cor (CAFÉ DO SÍTIO, 2003).

A classificação do café pode ser efetuada através da determinação do tipo e da bebida.

A classificação por tipo admite 07 tipos de valores decrescentes de 2 a 8, em função dos defeitos constatados numa amostra de 300 gramas, segundo

as normas estabelecidas na Tabela Oficial Brasileira de Classificação. Os defeitos podem ser de natureza intrínseca, que se constituem de grãos alterados pelos processamentos agrícolas e industriais, por modificações genéticas ou fisiológicas (grãos pretos, ardidados, verdes, chochos, mal granados, quebrados, brocados), e extrínseca, que são representados pelos elementos estranhos ao café beneficiado (cocos, marinheiros, cascas, paus e pedras). O tipo 4 é denominado .tipo base. por corresponder à grande porcentagem dos cafés que aparecem nos lotes para exportação, principalmente no Porto de Santos. A classificação por tipo ainda considera outras características como: tamanho e forma da fava, aspecto, cor e teor de umidade (CAFÉ DO SÍTIO, 2003).

A classificação por bebida é o fator mais importante na determinação da qualidade do produto. A avaliação é realizada por provadores que, em prova de xícara, determinam a qualidade sensorial do produto, sendo um trabalho complexo, exigindo não somente conhecimento e grande prática, como também treinamento prolongado. Esse treinamento visa possibilitar a distinção com precisão, não apenas das categorias de bebidas que vão desde um padrão estritamente mole (bebida de sabor suavíssimo e adocicado) a um gosto rígo (bebida com sabor forte e desagradável, lembrando iodofórmio ou ácido fênico), mas também das suas respectivas nuances como aroma, corpo, acidez e adstringência que se constituem em .marcas. de cada região e determinam a forma dos famosos .blends. (CARVALHO *et al.*, 1997). A Organização Internacional do Café utiliza uma descrição de atributos sensoriais para a bebida do café, designando para o sabor/aroma características como animal, borracha, caramelo, cereal/malte, chocolate, cinza, fruta/citros, grama/mato/ervas, madeira, nozes, queimado/fumaça, químico/medicinal, ranço/podre, tabaco, terra e vinho. Para o gosto descreve: ácido,

amargo, azedo, doce e salgado e ainda as características corpo, cobertura na língua, e adstringência e ardido/acre e picante correspondendo às sensações bucais (PEREIRA *et al.*, 2000).

Deve-se considerar também, na apreciação da bebida, a possibilidade de ocorrência de gostos estranhos. O café tem grande capacidade de absorver aromas de outros produtos que estejam próximos (perfumes, inseticidas, combustíveis etc) (CAFÉ DO SÍTIO, 2003).

2.3.3 Torra e moagem

A torra provoca mudanças nos grãos tanto físicas, com modificações na forma, cor, tamanho, quanto químicas, devidas principalmente às reações pirolíticas que provocam alterações nos compostos orgânicos do grão cru gerando produtos como caramelos, ácidos, carbonilas e sulfetos (CAFÉ ALVORADA, 2003).

O tempo total gasto na torra, desde a entrada do grão verde até a descarga, varia em geral de 5 a 10 minutos em torrador contínuo até mais de 20 minutos em torrador não contínuo. A maioria das máquinas artesanais de torra funciona a gás. Durante o processo atingem-se temperaturas de cerca de 290 °C. Os equipamentos de maior dimensão fazem circular os grãos no interior de um tambor até à altura de um parafuso. Quando os grãos atingem a extremidade desse parafuso significa que o processo encontra-se concluído. Existem ainda torradores que consistem num tambor que gira na horizontal.

O processo pode ser dividido em três estágios consecutivos: secagem, torra e resfriamento (BORGES *et al.*, 2002).

O estágio de secagem é caracterizado pela liberação de água e compostos voláteis. No início, a cor muda de verde para amarelo e o grão perde água, enquanto sua temperatura permanece constante ao redor de 100 a 104°C (BORGES *et al.*, 2002). Quando o teor de água evaporada chega a 10% do peso, a temperatura começa a se elevar lentamente. Até esse ponto, ocorrem apenas mudanças físicas no grão sem desenvolvimento de sabor do café (VILAS BOAS *et al.*, 2001).

No segundo estágio, ou torra propriamente dita, a cor dos grãos varia de marrom claro a escuro (BORGES *et al.*, 2002). Em torno de 204°C, a temperatura do grão é acentuadamente aumentada pela liberação de calor produzido nas reações de pirólise que se processam no interior dele. A pirólise é uma reação química na qual ocorrem simultaneamente degradação e síntese de compostos. Apesar das altas temperaturas, a torra do café não provoca a queima dos grãos, porque ocorre dentro das células e na ausência de ar. Os produtos da pirólise são os açúcares caramelizados, carboidratos, ácido acético e seus homólogos aldeídos, cetonas, furfural, ésteres, ácidos graxos, aminas, CO₂, sulfetos etc. Todos esses constituintes contribuirão para um desenvolvimento do sabor do café. A reação ocorre em intervalos de tempo muito curto (décimos de segundo) e deve ser paralisada abruptamente no ponto de torra desejado, determinado pela mudança de coloração do grão (VILAS BOAS *et al.*, 2001).

A partir deste ponto, faz-se necessário o resfriamento imediato dos grãos (terceiro estágio), para evitar a carbonização (BORGES *et al.*, 2002). Os torrefadores usam resfriamento com banhos, o que provoca uma absorção de água

pelos grãos. Para evitar efeitos sensoriais indesejáveis, é necessário que a umidade máxima na torra seja de aproximadamente 3%, valores superiores correspondem a grãos amolecidos, reduzindo o número de partículas finas na moagem (CARVALHO *et al.*, 1997).

Existe escassez de informação que permita o estabelecimento de correlação entre as características da matéria-prima, os parâmetros do processo de torra e a qualidade final do produto (BORGES *et al.*, 2002). A única terminologia universal usada entre os torrefadores de café, são os termos subjetivos "baixa", "média" e "elevada" ou, por vezes, "ligeira", "média" e "escura". Os graus de torra são avaliados pela sua cor externa, sabor e aroma dos grãos.

O grau de torra também pode ser avaliado pela relação entre as concentrações de 5-ACQ e cafeína (VITORINO e FRANÇA, 2001). A evolução da razão entre as concentrações de 5-ACQ/cafeína e trigonelina/cafeína durante a torra pode ser observado na FIGURA II.2.

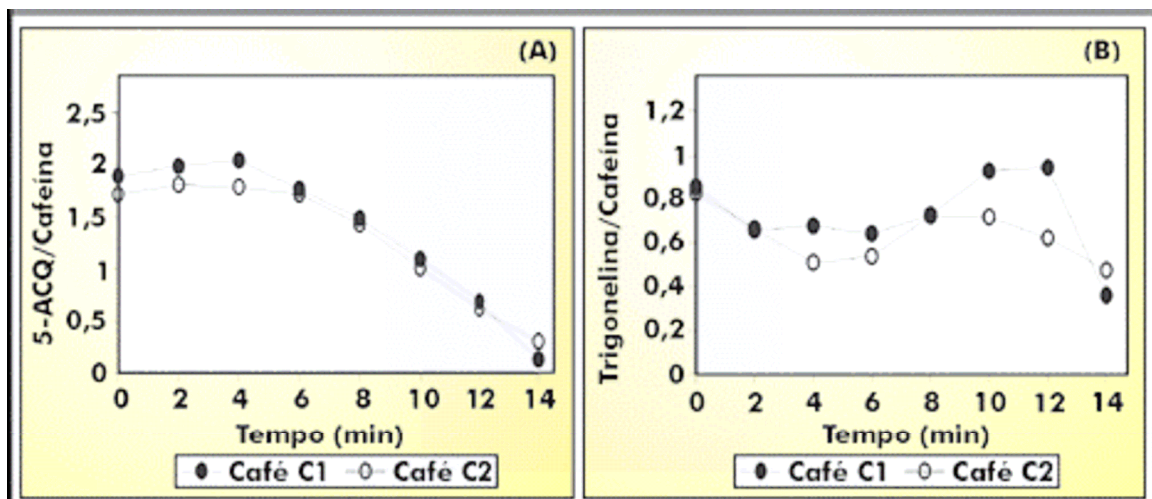


FIGURA II.2 - Evolução da razão entre as concentrações de 5-ACQ/cafeína (a) e trigonelina/cafeína (b) durante a torra.

Obs: C1 - café bebida riada/rio e C2 . café bebida mole. **Fonte:** (VITORINO e FRANÇA, 2001).

A torra escura dá ao grão um aspecto oleoso, que é o resultado da perda dos óleos aromáticos do café, produzindo uma bebida com pouco aroma e sabor mais amargo. A torra clara preserva mais os óleos aromáticos (os grãos permanecem secos), mas acentua a acidez da bebida. A TABELA II.1 mostra as características sensoriais do café em decorrência dos diferentes tipos de torra (CAFÉ ALVORADA, 2003).

TABELA II.1 . Características sensoriais do café quanto aos diferentes tipos de torra

Grau de torra	Características
Clara	Acentua acidez, suavidade do aroma e sabor; menos amargor
Média	Acentua o aroma e o sabor
Escura	Diminui a acidez e acentua o sabor amargo

Fonte: (CAFÉ ALVORADA, 2003).

Com relação à cor do café, MONTEIRO (2002) trabalhou para amostras de *Coffea arábica* com temperatura/tempo médios de 165,55°C/ 9,09 minutos, 226,66°C/ 10,62 minutos, 226,66°C/ 11,63 minutos para as torras clara, expresso e escura, respectivamente. Obteve-se, respectivamente, valores médios de L, a, b, de 17,2; 21 e 10,9 para torra clara com 10,5% de perda de peso; 9,98, 16,9 e 6,16 para torra expresso com 14% de perda; e de 8,14; 14,7 e 5,07 torra escura com 17,2% de perda de peso.

MENDES *et al.* (2001) estudou a otimização das condições de torra do café conilon aplicando Metodologia de Superfície de Resposta e avaliando medidas instrumentais de coloração (com os parâmetros L*, a* e b*) e aceitabilidade sensorial. As condições ideais de torra encontradas quanto ao tempo e temperatura foram: 22 a 28 minutos e 225 a 230°C, respectivamente, com valores dos

parâmetros de cor entre 37,05 e 40,69 para L^* entre, 2,29 e 4,15 para a^* e entre 2,70 e 6,29 para b^* .

Observa-se que a luminosidade decresce ao longo da torra, em função do escurecimento dos grãos devido a caramelização dos açúcares e reações de Maillard. (BORGES *et al.*, 2002).

Assim como a torra, a moagem é fundamental para a obtenção da bebida, se grande quantidade de calor é gerada, ocorre perda de voláteis imprescindíveis na composição do aroma e outros produtos, influenciando a qualidade do produto final.

A granulometria do café é definida industrialmente como grossa, média e fina, seguindo as recomendações dos fabricantes de moinhos. Na prática, o método de filtração ou extração é que irá definir as características da moagem do pó de café.

O tempo de preparo do café é diretamente influenciado pela moagem. A extratividade e a velocidade de fluxo durante o preparo da bebida dependem do tamanho médio das partículas produzidas no processo. A granulometria também pode ser relevante para a extração de sólidos totais, relacionando-se com a composição química e definindo de forma direta o rendimento do produto (MORAES *et al.*, 2001). Com moagem muito fina, a água levará mais tempo para passar pelo pó, resultando numa extração superior. A temperatura final da bebida pode diminuir, tornando-a desagradável. Porém, se a moagem for muito grossa, a água passará rapidamente pelo pó, não permitindo extração adequada. Por isso, a moagem média é a mais encontrada no mercado (CAFÉ ALVORADA, 2003).

MORAES *et al.* (2001) estudaram o efeito da torra e da granulometria na composição química do café, analisando teores de trigonelina, cafeína, ácido 3-cafeoilquínico e ácido 5-cafeoilquínico. Foram utilizados 10 g de pó para 100 mL de água, à primeira fervura, extraídos em coador de pano e filtro de papel (Melita, nº 103). A variação da concentração (em g%) dos analitos nos diferentes extratos de café do tipo arábica (bebida do tipo riada, do Espírito Santo, safra de 2000, 11,8% de umidade) avaliando-se dois pontos de torra comercial: torra média e torra escura (TM e TE) e três granulometrias diferentes: fina, média e grossa (MF, MM e MG) é apresentado na FIGURA II.3. Não foi observada diferença na extratibilidade de sólidos totais nem na distribuição dos compostos químicos com as diferentes granulometrias e métodos de extração empregados.

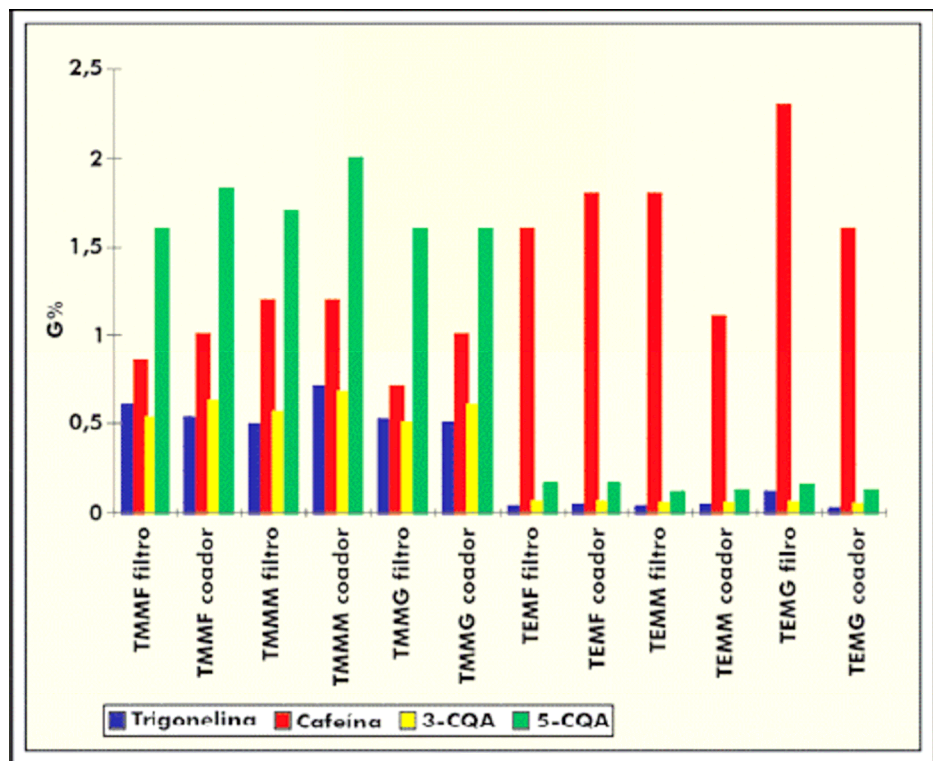


FIGURA II.3 - Concentrações dos analitos nos diferentes extratos de café arábica. TM: torra média; e TE: torra escura; MF: granulometria fina; MM: granulometria média e MG: granulometria grossa. Concentrações em %. **Fonte:** MORAES *et al.* (2001)

Na TABELA II.2 pode-se verificar que as características da bebida, em cada grau de torra, dependem também da moagem dos grãos de café (CAFÉ ALVORADA, 2003).

TABELA II.2 . Características sensoriais da bebida obtida a partir de diferentes tipos de torra e moagem de grãos de café

Torra	Moagem média	Moagem grossa
Clara	Bebida fraca	Bebida mais fraca
Média	Bebida ideal	Bebida fraca
Escura	Bebida mais forte	Bebida forte

Fonte: (CAFÉ ALVORADA, 2003).

2.4 COMPOSIÇÃO, CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS E ESTABILIDADES À TORRA DE COMPOSTOS DO CAFÉ

Durante o processamento tecnológico do café cru, diversas transformações químicas ocorrem, principalmente devidas às altas temperaturas utilizadas na torra. Todas essas transformações que ocorrem no grão de café cru, verde, extremamente duro, amargo e sem nenhum atrativo sensorial, irão gerar um produto frágil, de coloração marrom escuro, de aroma característico e acentuado, cuja bebida é extremamente agradável e de grande aceitação e consumo em todos os países (TRUGO, 2001). A composição química do grão cru é apresentada resumidamente na TABELA II.3 (CARVALHO *et al.*, 1997).

TABELA II.3 . Composição química aproximada (em base seca) do grão cru.

Classes e componentes	Solubilidade em Água	Porcentagem
Açúcares redutores	Solúvel	1,0
Sacarose	Solúvel	7,0
Pectina	Solúvel	2,0
Amido	Facilmente solubilizado	10,0
Pentosanas	Facilmente solubilizado	5,0
Hemicelulose	Hidrolisáveis	15,0
Celulose	Fibra não-hidrolizável	18,0
Lignina	Fibra não-hidrolizável	2,0
Óleos	Insolúveis	13,0
Proteínas	Depende do grau de desnaturação	13,0
Cinza	Depende da percentagem hidrolisada	4,0
Ácidos Clorogênicos	Solúvel	7,0
Ácidos Oxálico	Solúvel	0,2
Ácidos Málico	Solúvel	0,3
Ácidos Cítrico	Solúvel	0,3
Ácidos Tartárico	Solúvel	0,4
Trigonelina	Solúvel	1,0
Cafeína	Solúvel	arábica 1% robusta 2%

Obs: Composição em base seca. **Fonte:** (CARVALHO *et al.*, 1997).

O café é uma bebida com potencial para "bebida funcional", oferece cálcio, vitamina B (niacina) e nutrientes básicos para a saúde humana. Contém cafeína, que apresenta diversas propriedades fisiológicas, como por exemplo à estimulação do músculo cardíaco e do sistema nervoso central e a diminuição do sono. Recentemente outros compostos presentes no café têm despertado o interesse de diversos pesquisadores devido às suas funções biológicas. Compostos fenólicos, classificáveis no grupo dos chamados ácidos clorogênicos, e seus derivados parecem desempenhar papel relevante na neutralização de radicais livres. (TRUGO, 2001).

O aroma do café é responsável por todos os atributos do sabor, à exceção dos que são percebidos pela língua, sendo percebido por dois mecanismos diferentes: detectado através do nariz ao cheirar o café ou retronasal. A percepção de retronasal ocorre quando o café está presente na boca ou, ao ser engolido, os

compostos aromáticos temporários dirigem-se para a passagem nasal (COFFEE RESEARCH INSTITUTE, 2004).

O número de compostos aromáticos descritos no café tem aumentado a cada ano, sendo atualmente já superior a 800, e com o avanço na sensibilidade dos métodos analíticos novos voláteis poderão ser detectados (COFFEE RESEARCH INSTITUTE, 2004).

A percepção do aroma é dependente da concentração do composto e do limiar de detecção. É provável que um grupo relativamente pequeno dos compostos que compartilham uma concentração elevada e um ponto inicial baixo do odor sejam responsáveis pelo aroma característico do café. As principais reações através das quais são formados os compostos voláteis do café são do tipo Maillard (entre substâncias que contêm nitrogênio e trigonelina ou carboidratos); degradações de aminoácidos individuais, trigonelina, compostos fenólicos e lipídios de baixo peso molecular; e interação entre produtos intermediários de decomposição (COFFEE RESEARCH INSTITUTE, 2004).

O sabor característico do café deve-se à presença e aos teores de vários constituintes, destacando-se, entre eles, os ácidos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, compostos fenólicos, e também a ação de enzimas em alguns destes constituintes (COFFEE RESEARCH INSTITUTE, 2004).

No café o sabor amargo está associado ao procedimento (tempo, teor de minerais e temperatura da água) e à extensão da extração (que é dependente da torra e do tamanho das partículas), podendo ser correlacionado com o teor de sólidos solúveis totais. Para reduzir o sabor amargo podem ser

considerados a redução na intensidade da torra e a descafeinação (COFFEE RESEARCH INSTITUTE, 2004).

MENDES (1999) conclui em seu trabalho que a mistura com 20% de café robusta não alterou as características sensoriais da bebida se comparada com a de arábica 100%. Houve aceitação acima da média em misturas com até 50 % de robusta, por provadores profissionais.

A acidez está associada aos cafés plantados em alturas muito elevadas e em solos vulcânicos ricos em minerais (COFFEE RESEARCH INSTITUTE, 2004), sendo o sabor ácido também extremamente dependente do grau de torra, do tipo de torrador e do método de extração.

Na TABELA II.4 pode-se observar os principais ácidos encontrados no café e, na TABELA II-5, os compostos responsáveis pelo sabor amargo, com a concentração no grão torrado e limiar de detecção para percepção do amargo (COFFEE RESEARCH INSTITUTE, 2004).

TABELA II.4 - Principais ácidos encontrados no café.

Ácidos	Classe	Ácidos	Classe
Fórmico	a	Málico	b
Acético	a	Tartárico	b
Propanóico	a	Cis- e trans-butenodióico	b
Butanóico	a	Cis- e trans-metilbutenodióico	b
Metilpropanóico	a	Metilenobutanodióico	b
Pentanóico	a	Cítrico	b
2-Metilbutanóico	a	Propeno- 1,2,3-tricarboxílico	b
3-Metilbutanóico	a	2-furóico	c
Hexanóico	a	3-monocafeoilquínico	d
Heptanóico	a	4-monocafeoilquínico	d
Octanóico	a	5-monocafeoilquínico	d
Nonanóico	a	3,4-dicafeoilquínico	d
Decanóico	a	3,5-dicafeoilquínico	d
Láctico	b	4,5-dicafeoilquínico	d
Pirúvico	b	3-feruloilquínico	d
cis- e trans-but-2-enóico	b	4-feruloilquínico	d
cis- e trans-2-metilbut-2-enóico	b	5-feruloilquínico	d
3-metilbut-2-enóico	b	3,4-p-cumaroilquínico	d
Metilpropenóico	b	3,5-p-cumaroilquínico	d
Oxálico	b	4,5-p-cumaroilquínico	d
Malônico	b	Quínico	e
Succínico	b	Ferúlico	e
3-metileno butanodióico	b	Caféico	e
Glutárico	b	Fosfórico	f

Obs.: a - carboxílicos alifáticos voláteis; b - carboxílicos alifáticos não-voláteis; c - carboxílicos furanóicos heterocíclicos; d - clorogênicos; e - alicíclicos/fenólicos; f - inorgânicos.

Fonte: COFFEE RESEARCH INSTITUTE, 2004

TABELA II.5 - Compostos que contribuem para o sabor amargo em café.

Composto	Concentração no Café Torrado (mg/L)	Limiar de detecção (mg/mL)
Quínico	3200-8700	10
5-hidroximetilfurfural	10-35	200
2-Metil Furano	0.05	
Furfuril Álcool	300	25
Trigonelina	3,000-10,000	25
Ácido Clorogênico	20-100	25
Ácido Caféico		10-90
Ácido Cítrico	1,800-8,700	96-590
Ácido Málico	1,900-3,900	107-350
Ácido Láctico	0-3,200	144-400
Ácido Pirúvico	400-1,700	
Ácido Acético	900-4,000	22-70
Pirazina	17-40	1
Tiazol		
Quinolina		
Fenil piridina		
Cafeína	10,000-20,000	78-155
Peptídeos		
Proteínas		
Cetonas Alicíclicas		
Cetonas Aromáticas		

Fonte: COFFEE RESEARCH INSTITUTE, 2004

A cafeína (TABELA II.6) é o principal alcalóide presente no café, porém quantidades reduzidas de teofilina e teobromina também estão presentes. Os três compostos contêm um esqueleto de purina que é amplamente difundido pela natureza, sendo detectado em componentes metabólicos importantes, tais como a xantina, ácidos nucleicos e ácidos úrico (TRUGO *et al.*, 2000). A cafeína tem um gosto amargo distinto e tem um baixo Limiar de detecção (TABELA II.5).

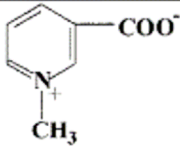
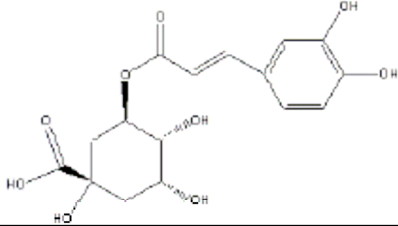
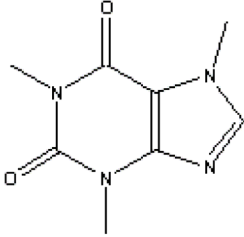
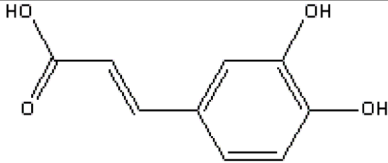
O conteúdo de cafeína no café verde varia amplamente de uma espécie para outra, sendo possível, também, encontrar variações significativas dentro de uma mesma espécie. A literatura descreve também possibilidade de variações relacionadas à utilização de diferentes métodos analíticos. Valores médios entre 0,9 e 1,3% foram relatados para o café arábica, e entre 1,2 e 2,5% para o café

robusta. Para o café torrado, resultados de 1,0% e de 2,0% foram encontrados nas variedades arábica e robusta, respectivamente (TRUGO *et al.*, 2000; KY *et al.*, 2001).

Quanto à estabilidade térmica, a cafeína é relativamente resistente às temperaturas utilizadas na torra do café. Na substância pura, perdas pequenas de cafeína podem ocorrer por

sublimação a 178°. Como o processo de torra é realizado a temperaturas em torno de 200- 230°C, uma perda considerável deveria ser observada durante o processamento mas isso não ocorre. Os dois fatores que mais contribuem para a estabilidade são provavelmente, um aumento no ponto de sublimação da cafeína, como resultado de pressões internas mais elevadas geradas dentro do grão e uma baixa taxa de difusão do vapor através das camadas externas do grão (TRUGO *et al.*, 2000).

TABELA II.6 – Caracterização de alguns compostos do café.

Composto	Fórmula	Estrutura
Trigonelina 1-Metilpiridinium-3-carboxilato monohidrato)	$C_7H_9NO_3$ P.M. 155,153	
Ácido clorogênico ácido 3-[[3-(3,4-dihidroxifenil)-1-oxo-2-propenil]oxi] 1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico	$C_{16}H_{18}O_9$ P.M. 354,3128	
Cafeína 1,3,7-trimetilxantina	$C_8H_{10}N_4O_2$ P.M. 194,1926	
Ácido caféico ácido 3,4-dihidroxi-cinâmico	C_6H_8O P.M. 180,1598	

Fonte: COFFEE RESEARCH INSTITUTE, 2004

A trigonelina (TABELA II.6) é percebida como amarga em concentrações de 0,25% (TABELA II.5). A literatura cita variações significativas no teor de trigonelina com a espécie e dependendo do método analítico empregado. São reportados valores de 0,3 a 0,9 % no café robusta e de 0,6 a 1,2% no arábica. A trigonelina é sensível a altas temperaturas, e o grau de degradação térmica varia conforme as condições (tempo e temperatura) de torra do café. Somente 15% da trigonelina inicial permanece após o processo de torra a 230 °C por 15 minutos. A 180°C, foi observada perda pequena após 15 min (2%), chegando a 60 % com o aumento do tempo de torra para 45 min. A degradação da trigonelina gera compostos não voláteis e voláteis, sendo um deles o ácido nicotínico (TRUGO *et al.*, 1999).

Os ácidos clorogênicos (ACGs) (TABELA II.6) são os principais compostos fenólicos não-voláteis encontrados no café. São formados pela esterificação do ácido quínico com os ácido caféico, ferúlico ou p-cumárico. A esterificação também pode ocorrer entre o ácido quínico e dois ácidos caféicos ou, então, entre o ácido quínico mais o ferúlico. Isso explica a pequena quantidade dos ácidos fenólicos livres encontrados no café verde. Os principais grupos de ACGs são os cafeoilquínicos, os feruloilquínicos e os dicafeoilquínicos, sendo cada um composto por três isômeros constitucionais. (TRUGO *et al.*, 1999; MAZZAFERA, 1991).

O conteúdo total de ACGs citado em cafés varia conforme a espécie e a variedade, assim como com a técnica de extração e o método de análise empregados. Com o uso de uma técnica de espectrofotometria na região do UV na faixa de 320-330 nm, com purificação prévia do extrato de café verde por cromatografia ou precipitação com acetato de chumbo, foram relatados valores em torno de 6,9 a 8,0% e 10,8 a 11,7% para arábica e robusta, respectivamente. Em análises por CLAE, foram descritos valores na faixa de 5,5 a 6,5% e 9,0 a 10,0% para arábica e robusta, respectivamente. Estudos dos isômeros individuais, também por CLAE, descrevem valores de 5,8%, 0,87% e 0,25% para os ácidos cafeoilquínicos, os dicafeoilquínicos e o 5-feruloilquínico, respectivamente no café arábica. Para o café robusta, os resultados foram de 6,8% para o ácidos cafeoilquínicos, 1,4% para o dicafeoilquínicos e 0,6% para o 5-feruloilquínico. (TRUGO *et al.*, 1999).

Os ACGs sofrem degradação durante a torra (FIGURA II.4). Estudando o efeito da temperatura (TRUGO *et al.*, 1999), observou-se perdas de 60,9% e 59,7% para arábica e robusta respectivamente, após torra leve do café

(205°C por 7 minutos) e aumento da perda em condições mais severas. Aproximadamente metade do conteúdo total de ACGs perdidos na torra pode ser encontrada na fração pigmentos, na forma de ácido quínico livre e como compostos fenólicos de baixo peso molecular. Foi verificado ainda, que parte dos produtos da degradação desses ácidos foi perdida por volatilização, porém uma grande quantidade permaneceu sem caracterização. Os ACGs são, portanto, precursores importantes dos ácidos fenólicos livres e, por conseguinte, dos compostos fenólicos voláteis que participam da formação do aroma do café processado (LELOUP *et al.*, 1995; TRUGO *et al.*, 1999)

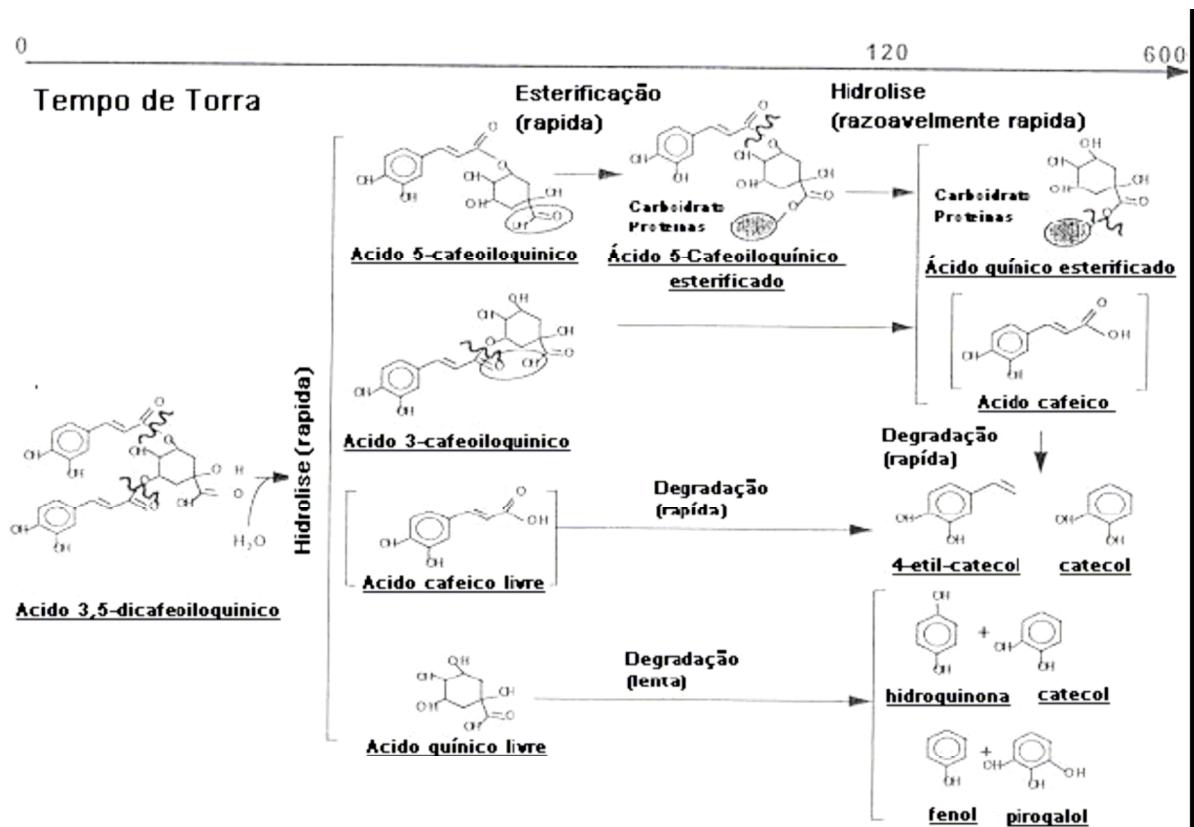


FIGURA II.4 – Provável via de degradação do 3,5 diACQ durante a torra.

Fonte: (LELOUP *et al.*, 1995).

Os compostos fenólicos, principalmente os ácidos clorogênicos e caféico, exercem uma ação protetora antioxidante dos aldeídos. Quando há

qualquer condição adversa aos grãos, como colheita inadequada, problemas no processamento e armazenamento, as polifenoxidasas agem sobre os polifénóis (TRUGO *et al.*, 1999).

Além dos componentes discutidos anteriormente, várias outras classes de compostos aparecem com teores expressivos no café como carboidratos, proteínas, lipídios e minerais (TABELA II.3).

Os polissacarídeos da parede constituem a metade de peso seco do café nativo mas ainda existe muito a ser revelado sobre a estrutura detalhada dos polissacarídeos individuais e como estes interagem para dar a estrutura integral da parede da célula. (FISCHER *et al.*, 2001).

No grão cru, a sacarose é encontrada em torno de 7%, sendo termicamente instável, decompondo-se a mais ou menos 130°C. Durante a torra, a sacarose é transformada em produtos caramelizados, que são os responsáveis pela cor marrom do café torrado. A sacarose sofre inicialmente uma desidratação, seguida de hidrólise, transformando-se em açúcares redutores, devido à elevação de temperatura na pirólise. Esses compostos são desidratados, polimerizados e parcialmente degradados a ácidos carboxílicos, água e gás carbônico, ou reagem com outros componentes, como aminoácidos e proteínas. Durante o processo de torra ocorrem simultaneamente formação e decomposição de ácidos (FIGURA II.4), acarretando um alto pH (em torno de 6,0) em bebidas de torrações leves. Noventa por cento da sacarose presente no grão cru é degradada por uma torra leve, e a degradação é completa no café com torra escura (CARVALHO *et al.*, 1997, VILAS BOAS *et al.*, 2001,).

Os lipídios do grão de café verde (.óleo de café.) estão presentes, principalmente, no endosperma e pequenas quantidades de ceras encontram-se na

camada externa do grão. O teor de lipídios aumenta proporcionalmente após a torra devido à degradação de carboidratos. No café arábica o aumento relatado foi de 11,4 para 15,4% e, no robusta, de 6,1% para 9,6% . Além dos triacilgliceróis observa-se proporção considerável de outros componentes lipídicos específicos (TABELA II.7) (LAGO, 2001).

TABELA II.7 – Principais lipídios em grãos de café.

Classes	Café Arábica		Café Robusta	
	Cru	Torrado	Cru	Torrado
AGL	0,95	0,72	0,98	0,09
Não-Identificados	0,53	0,86	tr	tr
Esteróis	0,06	0,06	tr	tr
DG + AD	15,46	14,15	7,04	10,95
TG + E	83	84,21	91,98	88,95

Obs: AGL=ácidos graxos livres, DG=diacilgliceróis; AD=álcoois diterpênicos; TG= triacilgliceróis; E= outros ésteres. tr = quantidades traço, nas condições utilizadas.

Resultados expressos em %. Fonte: (LAGO, 2001).

O teor de matéria insaponificável (MI) em óleos vegetais é em geral, ao redor de 1%, porém no óleo de café este valor é anormalmente alto, em média 12%, com autores citando valores entre 9,0 e 13,4%. Os principais constituintes do material insaponificável são dois álcoois diterpênicos, cafestol e caveol, que ocorrem na forma livre ou como monoésteres de ácidos graxos. Para café arábica, o percentual de caveol em relação ao de cafestol variou de 1,0% (amostra proveniente das Filipinas) até 7% (amostra proveniente da Uganda), mas em nenhum caso foi observado ausência do composto. O caveol está também presente em cafés robusta, porém em quantidades baixas. Outro diterpênico, o 16-O-metil-cafestol, foi encontrado apenas em cafés robusta e excelsa, encontrando-se no café robusta o total de 0,67 a 1,54 g de 16-O-metilcafestol/kg de amostra (base úmida), sendo 1,7% na forma livre. Esse diterpeno não sofre modificações com a torra, enquanto cafestol

e o caveol podem sofrer desidratação formando dehidroderivados (LAGO, 2001; KURZROCK e SPEER, 2001).

Em teores de aproximadamente 13% no grão cru, as proteínas dão contribuições marcantes ao sabor do café através dos produtos de sua decomposição nas reações de pirólise durante a torra. Durante a torra ocorre hidrólise das ligações peptídicas das moléculas protéicas com liberação de carbonilas e aminas, os aminoácidos reagem com carboidratos, polimerizam e produzem produtos caramelizados escuros. Há também produção de aminas responsáveis pelo odor de peixe e de amoníaco dos cafés excessivamente torrados. Nenhum aminoácido está ainda livre após a torra por 5 minutos em 220°C. Uma outra contribuição importante para as características do café, ligada a substâncias protéicas, deve-se ao fato de as partículas insolúveis de proteínas se ligarem a substâncias graxas formando no café coado partículas coloidais responsáveis pela turbidez da bebida (CARVALHO *et al.*, 1997).

Os minerais existentes nos cafés durante a torra são separados dos compostos orgânicos e catalizam as reações de pirólise (CARVALHO *et al.*, 1997). O conteúdo de alguns elementos químicos para amostras de café torrado de diferentes espécies foi determinado por MARTIN *et al.* (1999) conforme apresentado na TABELA II.8

TABELA II.8 - Teor de minerais em café torrado.

	ROBUSTA	ARABICA
Zn	3,94E-04	4,50E-04
P	0,174	0,1352
Mn	1,39E-03	2,68E-03
Fe	5,96E-03	4,87E-03
Mg	0,1664	0,1808
Cu	1,58E-03	1,30E-03
Ca	0,1114	0,0988
Sr	6,39E-04	5,16E-04
Ba	3,43E-04	4,97E-04
Na	2,35E-03	2,03E-03
K	1,44E-03	1,39E-03

Obs: E-x = 10^x (% m/m em base seca). Fonte: (MARTIN *et al.*, 1999)

2.5 DIFERENCIÇÃO DAS ESPÉCIES

O elevado valor comercial do café, principalmente da espécie arábica, é um atrativo para adição fraudulenta de materiais estranhos. O material para fraudar o café tem que ser o mais barato possível, estar disponível em grande quantidade e apresentar perfeita semelhança com o café ao ser torrado e moído (AMBONI *et al.*, 1999). São misturados cascas, paus, milho torrado, cascas de sementes, cevada, arroz, entre outros. Como esses materiais possuem características físico-químicas e histológicas diferentes do café existem métodos que permitem, com relativa facilidade, a identificação destas substâncias. O processo convencional consiste na preparação de lâminas microscópicas com análise visual usando microscópio eletrônico e os métodos mais recentes que utilizam câmera de vídeo para captura de imagens (ASSAD *et al.*, 2002). Existem métodos que utilizam cromatografia de troca iônica de alta eficiência e água como fase móvel, onde os cromatogramas obtidos do extrato de café puro são comparados com os de amostras suspeitas (HENSHALL, 1999).

Um outro tipo de fraude é a adição do café conilon ou robusta ao café arábica. Antes de serem torradas, as espécies de café podem ser facilmente identificadas, pois apresentam características visuais suficientes para diferenciação. O grão de café arábica é verde claro e tem uma forma mais ovalada, enquanto que os grãos de robusta tendem a ser mais arredondados e de cor castanha. Porém, após a torra e moagem, é impossível distinguir as espécies visualmente, tornando-se necessário à aplicação de outros métodos para diferenciação. Como ambas pertencem ao mesmo gênero, possuem poucas diferenças físicoquímicas significativas que possam ser medidas para detectar e quantificar esse tipo de fraude (GONZALEZ *et al.*, 2001).

Com o uso de provadores treinados é possível detectar misturas contendo 15% de café robusta em arábica, por análise sensorial, mas esses resultados são baseados em impressões subjetivas (SPEER *et al.*, 1991). O aumento no tempo de torra e a adição de impurezas no café podem mascarar o sabor do café robusta dificultando a sua diferenciação sensorial (MENDES, 1999).

Uma característica que tem sido bastante estudada quanto ao potencial para discriminação é o teor e composição da matéria insaponificável (MI).

O diterpênico 16-o-metilcafestol, presente apenas na espécie *canephora*, poderia permitir a discriminação. O método por CLAE pode detectar 0,1g/kg de 16-O-metilcafestol em um café torrado desconhecido o que corresponde de 7 a 13% de robusta adicionado a café arábica, com 80% de probabilidade de acerto (SPEER *et al.*, 1991, KAMM *et al.*, 2002). Porém, não existe para esse diterpeno um padrão comercial disponível com um grau de pureza certificado. Os trabalhos encontrados empregando-se Cromatografia Gasosa (CG) ou CLAE usam o

composto obtido de frações do óleo purificadas e caracterizadas por Espectrometria de Massas, o que inviabilizaria como método de controle de rotina.

Outro álcool diterpênico de interesse é o caveol, que pode ocorrer na forma livre ou como monoéster de ácidos graxos e corresponde a 20% da MI, com teores de 430 a 660 mg/100g de lipídios no café verde e 370 a 670 mg/100g no torrado, para café arábica, e de 14 mg/100g no verde e 3 a 12 mg/100g no torrado, para robusta (LAGO, 2001). A literatura cita que os grãos de café verde e torrados poderiam ser identificados utilizando algumas reações colorimétricas do extrato de éter de petróleo com iodeto de potássio e ácido acético glacial.

Outros componentes da MI citados como tendo potencial para diferenciação são o sitostanol e o Δ^5 -avenasterol (LAGO, 2001).

Outros trabalhos empregando as mais diversas técnicas de análise, mostraram algum sucesso no propósito de diferenciação das variedades, porém muitos deles são excessivamente onerosos, além de exigir o uso de equipamentos bastantes sofisticados. Além disso, a maior parte dos trabalhos citados faz diferenciação apenas entre os grãos verdes. Na revisão apresentada por GONZÁLEZ *et al.* (2001) são citados como parâmetros utilizados para caracterização de arábica e robusta o teor de metais; compostos voláteis; ácidos clorogênicos e cafeína; e a composição de lipídios, em particular a fração de esteróis, ácidos graxos e álcoois diterpênicos. ANDRADE *et al.* (1998) relata o emprego de lipídios em geral, cafeína, trigonelina, terpenos e ácidos clorogênicos, sendo, ainda, mencionados cafeoil tirosina e ácidos hidroxicinâmicos. O Laboratório de Bordeaux (LABORATOIRE DE BORDEAUX, 2003) faz diferenciação das espécies, por ACP, utilizando teores de metais, analisados por ICP, e teores de cafeína e ácidos fenólicos.

BICCHI *et al.* (1995), realizou testes sensoriais e análise de ACGs (cafeoilquínico, dicafeoilquínico, feruloilquínico e isômeros) por CLAE-UV em café verde e torrado visando à diferenciação quanto à origem da espécie, processos de torra e de misturas (80, 60, 50, 40, 20 % de café robusta), conseguindo diferenciação entre amostras contendo 80 e 20 % de robusta.

ANDRADE *et al.* (1998) isolaram e caracterizaram os ácidos p-cumárico, ocumárico, ferúlico, caféico, sinápico, 3,4-dimetoxicinâmico e o 3,4,5-trimetoxicinâmico e 4- metoxicinâmico de grãos verdes de café e concluíram que a variedade robusta contém maiores quantidades de 3,4-dimetoxicinâmico e ferúlico comparadas ao arábica. Os ácidos caféico e ferúlico foram encontrados em todas as amostras.

Em 2001, GONZÁLEZ *et al.* utilizaram os teores de tocoferóis (α , β e γ - tocoferóis) e de triglicerídeos como parâmetros de caracterização das duas espécies de café verde. Os pesquisadores utilizaram CLAE de fase reversa e de fase normal para as análises.

Conforme discutido anteriormente, os teores dos compostos químicos nas duas espécies apresentam uma grande amplitude. Dessa forma, para se conseguir discriminação adequada, os dados obtidos por diferentes técnicas devem ser analisados com auxílio de técnicas Estatísticas Multivariadas, como Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise de Agrupamentos (AA).

A Análise de Agrupamento (AA) tem por objetivo agrupar os dados de forma a permitir identificar semelhanças entre objetos. É um problema de otimização em que se pretende de uma forma geral maximizar a semelhança inter grupo e a dissemelhança entre grupos. São utilizadas diferentes técnicas para associação e medida da similaridade para conseguir a separação das amostras em grupos. No

método por agrupamentos hierárquicos, parte-se de uma matriz simétrica de coeficientes de associação entre itens. Para a combinação dos mesmos, segundo níveis hierárquicos de similaridade, utiliza-se de um procedimento aglomerativo de tal modo que cada ciclo de agrupamento obedeça a uma ordem sucessiva no sentido do decréscimo de similaridade. As medidas de similaridade podem ser, mais comumente, obtidas pela distância entre pares de pontos num espaço multidimensional. A forma gráfica mais usada para representação dos resultados é feita num gráfico com uma estrutura de árvore denominado dendrograma (SIOTANI, 1985).

A Análise de Componentes Principais (ACP) é uma das técnicas estatísticas mais utilizadas e apropriadas para detectar a importância relativa das variáveis individuais na caracterização e separação dos dados. A técnica visa reduzir o número de dimensões do espaço criando eixos ortogonais que são combinações lineares das variáveis originais denominados componentes principais. Assim, a ACP é empregada para transformar um determinado número de variáveis em um número menor de componentes, de maneira que o primeiro componente tenha máxima correlação com as variáveis e seja o maior responsável pela variância observada. O segundo componente seria o responsável pela segunda maior variância, e assim sucessivamente. As variáveis são distribuídas em gráficos bidimensionais ou tridimensionais onde os eixos ortogonais são os componentes principais. É medido o peso de cada variável no seu respectivo componente, o que permite diminuir a estrutura de variáveis originais numa nova estrutura menor que a inicial. Os dados de cada amostra podem, então, ser representados como um ponto no espaço; amostras com similaridades em uma ou mais propriedades ou relação de propriedades serão pontos próximos nesse espaço padrão (SIOTANI, 1985).

Embora, do ponto de vista matemático, a Análise de Agrupamentos apresente uma metodologia bastante simples e a Análise de Componentes Principais uma metodologia mais complexa, espera-se uma boa concordância entre os resultados de ambas, podendo ser utilizadas de forma complementar.

Entre as técnicas analíticas mais utilizadas pela indústria, ainda, tem tido destaque o emprego de infravermelho, porém o equipamento e sua manutenção são relativamente caros. A calibração do aparelho é bastante complexa, sendo feita com base em espectros da cafeína e outros alcalóides do café, exigindo um grande número de análises, a diferenciação das espécies também é obtida por Análise Multivariada (DOWNEY & BOUSSION, 1996; BRIANDET *et al.*, 1996).

2.5.1 Reações colorimétricas da matéria insaponificável

Wurziger, no decorrer da década de setenta, desenvolveu uma metodologia para diferenciação de grãos de café verde e torrado das espécies arábica e robusta e alguns blends, utilizando reações colorimétricas do extrato de éter de petróleo ressuspenso em ácido acético glacial com iodeto de potássio e ácido clorídrico. A diferença de cor entre espécies, verificada por medidas de absorvância a 290nm (λ máximo do caveol) e 630 nm (λ máximo dos produtos de reação), era devida aos baixos valores de caveol no café robusta (WURZIGER, 1985).

A reação proposta está baseada no fato do caveol, diferentemente do cafestol e outros diterpenos, apresentar uma dupla ligação na posição 1-2 (FIGURA II.5).

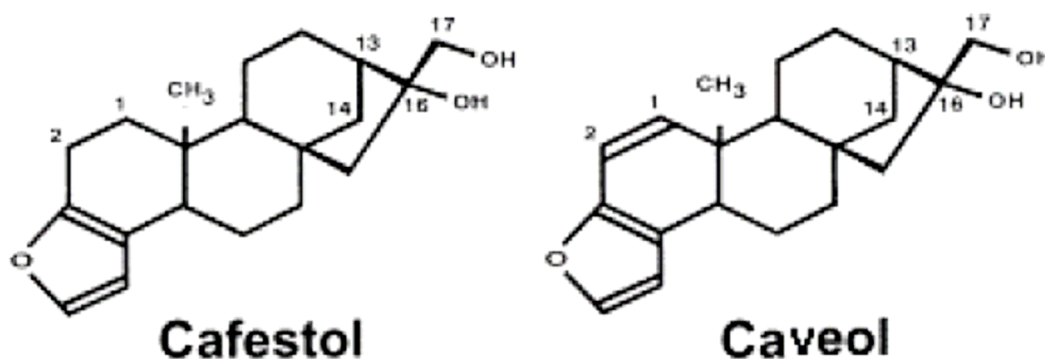


FIGURA II.5 . Estruturas do cafestol e do caveol

No método apresentado por WURZIGER *et al.* (1979), foi feita a extração da fração lipídica de 10 gramas de café em extrator Soxhlet usando éter de petróleo por 3 horas, tempo que o autor cita ser insuficiente para uma extração quantitativa. Após a extração, o volume final foi completado com solvente e adicionou-se 2 mL de solução de hidróxido de potássio alcoólico, a frio. Após a separação das fases, a fase aquosa foi usada para outras medidas de absorvidade e 1 mL da fase orgânica (correspondente a 0,1 g da massa inicial de café) foi usada nas reações colorimétricas. Foram, então, adicionados 2 mL de ácido acético glacial e 0,1 mL de solução saturada de iodeto de potássio, e a mistura foi aquecida em ar seco a 105 °C por 10 minutos. Após o aquecimento, a solução adquiriu uma coloração amarela (café robusta) ou verde-azulado (café arábica). Em seguida foi adicionado um pequeno cristal de tiosulfato de sódio, o que tornou a solução incolor para o robusta e fortemente azulada para o arábica, e mediu-se a absorvidade a 630 nm.

O ácido acético funcionaria apenas como solvente para a dissolução do extrato etéreo. A reação de adição se processaria em duas etapas. Na primeira etapa, a dupla ligação aceitará um próton do haleto de hidrogênio, formando um carbocátion (muito endotérmica e com energia livre de ativação muito elevada). Na

segunda etapa, o carbocátion, muito reativo, se estabilizaria pela combinação com o íon haleto (essa reação é exotérmica e tem energia livre de ativação muito baixa e se passa muito rapidamente) (FIGURA II.6). A presença de água no meio de reação é indesejável porque poderia provocar a adição desta à dupla ligação, reação catalisada por ácido, formando um álcool (SOLOMONS, 1996).

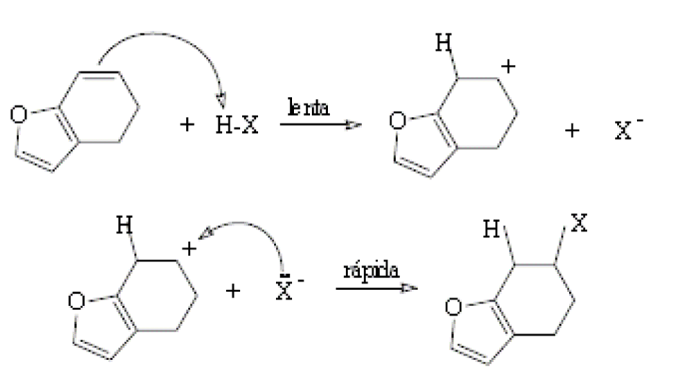
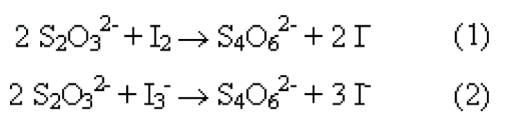


FIGURA II.6 . Mecanismo de adição de haleto de hidrogênio à dupla ligação.
Fonte: (SOLOMONS, 1996).

O iodeto em solução pode se oxidar a I₂, que, em solventes polares, apresenta coloração castanha. O I₂ também pode reagir com o íon iodeto formando o íon castanho de I₃⁻. O tiossulfato age como agente redutor eliminando o iodo formado em solução que pode interferir nas medidas de absorvidade (VOGEL, 1981). A reação que ocorre rápida e estequiometricamente sob as condições experimentais (pH <5) está descrita nas equações 1 e 2:



A adição de tiossulfato requer cuidado, pois o ácido correspondente, ácido tiossulfúrico, é instável mesmo em solução. Ao se acidular uma solução de tiossulfato há formação de enxofre primeiro como um colóide e depois como uma suspensão leitosa, que geralmente se coagula e sedimenta (VOGEL, 1981).

O autor publicou vários trabalhos nessa linha de pesquisa (WURZIGER *et al.*, 1976; WURZIGER, 1977; WURZIGER *et al.*, 1979; WURZIGER, 1985) e relatou que depois de prolongado tempo de armazenamento as propriedades dos extratos de grãos arábica tendem a assemelhar-se àquelas de robusta, mas a possibilidade de discriminação ainda existe (WURZIGER, 1976). A reação colorimétrica do caveol pode também ser aplicada ao café torrado ou resíduo de produção de extrato de café (WURZIGER, 1977). Este autor (WURZIGER, 1985) também discutiu e apresentou dados referentes às medidas de cor e reações para café robusta, arabusta, catimor e arábica de diferentes países, alguns subprodutos destes e misturas arábica:robusta (50:50 e 65:35). No entanto, como o método empregado era empírico e pouco quantitativo, não foi mais encontrada referência a sua aplicação a partir desse período.

2.5.2 Análise de trigonelina, cafeína e compostos fenólicos por CLAE

A técnica de cromatografia a líquido (CLAE) é amplamente empregada para determinação de diferentes compostos em café, sendo a mais utilizada para detecção e quantificação.

A seguir temos a descrição das condições de análise de cafeína, trigonelina, ácido nicotínico, ácidos cinâmicos, outros alcalóides e alguns produtos de degradação em café por CLAE. Foram selecionados os trabalhos mais relevantes consultados para escolha das condições de análise a serem testadas no desenvolvimento da metodologia analítica. Os resultados estão separados por tipo de amostra: metodologias que foram empregadas somente para café verde

(TABELA II.9) ou torrado (TABELA II.10) e aquelas que relatam o uso tanto para amostras verdes quanto torradas (TABELA II.11).

TABELA II.9 – Análise de cafeína, trigonelina e compostos fenólicos em café verde por CLAE.

Composto	Amostra	Fase Estacionária	Fase Móvel	Det/Quant.	Ref.
Trigonelina	Refluxo de 3g de amostra seca com H ₂ O quente (80°C) por 1 h. Injeção: 100 µL (Trigonelina) e 20 µL (Cafeína e Ácido Clorogênico)	Waters IC Pack C M/D (Coluna de Troca Iônica) (150 x 3,9 mm), Ø = 5 µm	1 mL/min	254 nm	MARTIN <i>et al.</i> , 1998
Cafeína e ácido clorogênico		Lichrosorb RP-18 (150 x 4 mm), Ø = 5 µm	Isocrática: 20:80 MeOH:H ₂ O (pH 4,5), 1,5 mL/min	254 nm	
Ac. caféico, p e o-cumárico, ferúlico, sinápico, 4-metoxicinâmico, 3,4-dimetoxicinâmico, 3,4,5-trimetoxicinâmico	5g de pó foi extraído com MeOH:H ₂ O (40:60) por 24h. Concentrou-se e hidrolizou-se com NaOH 2N por 240'. Ajustou-se o pH 7 e extraiu-se os fenóis com etilacetato. Injeção: 20 µL	Spherisorb ODS2 (250x4,6mm), Ø = 5µm.	H ₂ O:HCOOH (A) (19:1) MeOH (B) Gradiente: 0'-15%B, 10'-25%B, 25'-30%B, 30'-35%B, 34'-50%B, 41'-70%B, 43'-75%B, 47'-80% B 0,9 mL/min	320 nm (arranjo de diodos)	ANDRADE <i>et al.</i> , 1998
Cafeína e trigonelina	50 grãos foram congelados em N ₂ , moído e peneirado. 50 mg do pó + 500 mg de MgO + 25 mL de H ₂ O foi aquecidos a 105°C por 20' e filtrado.	Merck Superspher 100 RP 18 (250 x 4 mm), Ø = 5 µm. Temperatura ambiente	Trietilamina e ácido acético (pH 5,3) (A) e MeOH(B). Gradiente linear: A-B (70/30) por 15'. 1,0 mL/min.	Trigonelina 263nm e cafeína 272 nm.	KY <i>et al.</i> , 2001.

TABELA II.10 – Análise de cafeína, trigonelina, compostos fenólicos, outros alcalóides e produtos de degradação em café torrado por CLAE.

Composto	Amostra	Fase Estacionária	Fase Móvel	Det/Quant.	Ref.
Cafeína e teobromina	8,6 g de pó com 150 mL de H ₂ O Injeção: 20 µL	Waters µ Bondapak C18 (300 x 39 mm), Ø = 5 µm	Isocrática: 8:92 v/v MeCN:H ₂ O 2,0 mL/min	245 nm	BLAUCH & TARKA, 1983
Trigonelina, ac. caféico, cafeína, ac. nicotínico, 5-HMF, 5-ACQ	Amostra seca (6g) foi extraída com 100mL de água em ebulição por 10min. Uma alíquota de 10mL foi diluída para 100 mL	Lichrosorb 100 RP18 (250x 4 mm) Ø = 5µm C% = 21,4 T=28 °C	Gradiente: MeOH (A) e 1mM de ácido hidrocloreídrico (B), pH 3,27 0-7' - 17% A 12' - 23% A 1 mL/min	Trigonelina 260nm, cafeína 272nm e 5-ACQ- 320nm	DAGLIA <i>et al.</i> , 1994
Cafeína	Extração de 20g de pó com 250mL de H ₂ O. Limpeza com acetato de chumbo básico. Injeção: 5 µL	Merck ODS RP18 (150x4,6mm) Ø = 5 µm	25:75 v/v MeOH:H ₂ O 1,0 mL/min	254 nm	CAMARGO e TOLEDO 1998
Cafeína, teobromina e teofilina		Bondasil C18	2 tipos de F. M. EtOH:H ₂ O:ac. acético (20:75:5) e MeOH:H ₂ O:ac. acético (20:75:5). 0,7mL/min.	273 nm.	BISPO <i>et al.</i> 2002
Cafeína e trigonelina	0,2 g de café solúvel dissolvido em 100 mL de H ₂ O dest. a 80 °C, completado para 250 mL. Limpeza com acetato de chumbo.				
Ácido clorogênico	0,5 g de café solúvel dissolvido em 80 mL de MeOH:H ₂ O (40%), completado para 100 mL. Limpeza com 2mL de solução 21,9% de acetato de zinco em ácido acético e 10,6% de KFeCN em ácido acético Injeção: 20 µL	RP C18 (250 x 4,6 mm)	H ₂ O para trigonelina e MeOH:H ₂ O (40%) para a cafeína		NOGUEIRA <i>et al.</i> 2003

Obs: HMF - Hidroximetilfurfural; ACQ - Ácido cafeiloquinico.

TABELA II.11 – Análise de cafeína, trigonelina, ácido nicotínico, ácidos clorogênicos e compostos de degradação em café verde e torrado por CLAE

Composto	Amostra	Fase Estacionária	Fase Móvel	Det/Quant	Ref.
3ACQ;5ACQ; 4ACQ; 5AFQ; 4AFQ; 3,5-DiACQ; 3,4-DiACQ; 4,5-DiACQ; ACFQ-1; ACFQ-2; ACFQ-3	20 g foram extraídas com 200mL de H ₂ O por 7min, clarificada em cartucho sep-pak C18. Cartucho foi eluído com 20mL de MeOH:H ₂ O (40:60). O eluído foi diluído 50 vezes Injeção: 20 µL	ODA Hypersil (200x4,6mm) Ø = 5µm. T=25 °C	Gradiente Linear: 15% de MeOH em tampão citrato-HClO ₃ pH 3 para 45% MeOH em tampão citrato-HClO ₃ após 20 min.	325 nm (arranjo de diodos)	BICCHI <i>et al.</i> , 1995.
5-HMF, furfural, 5-ACQ, cafeína	Extração com água em ebulição e filtração	Spherisorb ODS 2 (250x4,6mm) Ø = 5 µm	Gradiente H ₂ O: ac. acético (0,2%) (A) e MeOH (B)	280 nm (arranjo de diodos)	CHAMBERLAIN <i>et al.</i> , 1997
Trigonelina, cafeína e ác. nicotínico	2g de amostra em 20mL de H ₂ O foram aquecidas com agitação. Injeção: 20 µL	Spherisorb ODS2 (250x4,6 mm) Ø = 5µm	Gradiente: Tampão Fosfato 0,1M (pH 4,0) (A) MeOH (B) 0'-7%B, 4'-9%B, 6'-25%B, 13'-29%B, 21'-50%B. 1,0 mL/min	Trigonelina 268 nm, cafeína 276 nm.	CASAL <i>et al.</i> , 1998.
Trigonelina, cafeína e ac. clorogênico, simultaneamente	Estuda-se preparo de amostra: (1) 4g c/ 120mL de H ₂ O, 83 °C, (2) 4g c/ 120mL de H ₂ O em ebulição por 2 min., (3) 4g c/ 120mL de H ₂ O em Soxhlet, (4) 2g c/ 20mL de H ₂ O agitando por 3min., em banho maria em ebulição, (5) 1g c/ 200mL de isopropanol/H ₂ O (70:30), em refluxo por 4 h	Lichrospher C18 (250x4,6mm) Ø = 5µm	Isocrática MeOH: H ₂ O: ac. acético (20:80:1 v/v) 1 mL/min.	272 nm (arranjo de diodos)	VITORINO <i>et al.</i> , 2001.

Obs: HMF - Hidroximetilfurfural; ACQ - Ácido cafeoilquinico; AFQ - Ácido feruoilquinico; DiACQ - Ácido dicafeoilquinico; ACFQ - Ácido cafeoil-feruoilquinico.

TABELA II.11 – Análise de cafeína, trigonelina, ácido nicotínico, ácidos clorogênicos e compostos de degradação em café verde e torrado por CLAE (Continuação).

Composto	Amostra	Fase Estacionária	Fase Móvel		Det/Quant	Ref.
Trigonelina cafeína e ac. clorogênico	Extração a 80°C. Injeção: 20 µL	TSK G3000 SW HPGF (300x8mm)	Correspondente a extração	Vazão:	272 nm (arranjo de diodos).	NOGUEI RA <i>et al.</i> , 2002
	H ₂ O deion.		H ₂ O deion.	0,5		
	H ₂ O deion.		H ₂ O deion.	0,9		
	MeOH 70%		H ₂ O deion.	0,9		
	MeOH 70% + H ₂ O pH 3,0		H ₂ O deion.	1,1		
	MeOH 70% + H ₂ O pH 3,0 (MeOH subst. por H ₂ O após ext.)		H ₂ O deion.	1,1		
	H ₂ O deion. pH 3,0		H ₂ O deion. pH 3,0	1,1		
	MeOH 70% + H ₂ O pH 1,5		H ₂ O pH 3 + MeOH (90:10)	0,9		
	MeOH 70% + H ₂ O pH 1,5 (MeOH subst. por H ₂ O após ext.)		H ₂ O deionizada fervida com trap	1,1		

Com relação ao preparo de amostra, foram descritas a quantidade de amostra, métodos de extração e limpeza empregados, diluição/concentração da amostra necessários para injeção. Quanto às fases móvel e estacionária e condições de operação empregadas foram descritos: tipos de fase móvel, condições de eluição (isocrática, gradiente), vazão, temperatura, especificações das colunas, tipo de detector e condições de detecção, entre outros.

As técnicas de preparo da amostra empregadas foram muito variadas em relação à massa de amostra, solução extratora, temperatura e diluição final. A temperatura da solução extratora utilizada variou de 80°C até temperatura de vaporização da água, empregando-se diferentes tempos (de 3 minutos a 1 hora). Alguns autores descrevem, ainda, o emprego de refluxo (MARTIN *et al.*, 1998) ou mesmo o uso do Soxhlet (VITORINO *et al.*, 2001). Existem também grandes diferenças na proporção amostra/solvente empregada, sendo citados desde 1/10 (BICCHI *et al.*, 1995; CASAL *et al.*, 1998) até 1/200 (VITORINO *et al.*, 2001). O

solvente mais utilizado nas extrações foi a água sendo também relatado o uso de misturas metanol/água (BICCHI *et al.*, 1995; ANDRADE *et al.*, 1998; NOGUEIRA *et al.*, 2002) e isopropanol/água (VITORINO *et al.*, 2001).

VITORINO *et al.* (2001) estudaram diferentes solventes para extração de cafeína, 5-ACQ e trigonelina, concluindo que todas as metodologias permitiram a extração simultânea dos compostos. As extrações com H₂O a 83 °C; H₂O em ponto de ebulição e H₂O, agitando por 3 min., em banho maria em ebulição, apresentaram valores similares de eficiência.

No trabalho de NOGUEIRA *et al.* (2002) a melhor condição de extração foi obtida com solução de metanol 70% em H₂O acidificada com HCl 0,1 N até pH 1,5. Segundo os autores, a acidificação foi realizada para evitar a isomerização dos ácidos clorogênicos durante a extração. Após a extração o MeOH deve ser evaporado e o volume completado com H₂O antes da injeção no cromatógrafo. Essa observação também foi feita por VITORINO *et al.* (2001), utilizando solução de isopropanol:H₂O (70:30).

A limpeza da amostra pode ser feita com MgO (KY *et al.* 2001), cartuchos ou colunas de limpeza Sepack C18 (BICCHI *et al.* 1995) e acetato básico de chumbo (CAMARGO e TOLEDO 1998). A combinação de acetato de chumbo e acetato de zinco em ácido acético pode ser usada para determinar cafeína e trigonelina (NOGUEIRA *et al.* 2003) e quando complementada com KFeCN em ácido acético prepara a amostra para análise de ácidos clorogênicos. Outros estudos recomendam somente a filtração da amostra antes da análise cromatográfica da amostra.

Como fase estacionária foram empregados principalmente colunas de fase reversa C18, com 250 x 4,6 mm, e diâmetro de partícula de 5µm, variando

bastante as características das colunas (porcentagem de recobrimento, formato de partículas, etc). Além da fase reversa é citado o emprego de permeação em gel (NOGUEIRA *et al.*,2002) para análise simultânea de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico, coluna de troca iônica para análise de trigonelina (MARTIN *et al.*,1998).

A fase móvel também foi muito variada, sendo empregadas principalmente misturas isocrática e gradiente de MeCN:H₂O e MeOH:H₂O, com pH na faixa de 2,5 a 3,5. É citado o uso de ácido fórmico, hidrocloreídrico e acético. O Laboratório de Bordeaux (LABORATOIRE DE BORDEAUX, 2003) analisa cafeína usando como fase móvel mistura de H₂O:MeOH:ácido acético e os ácidos fenólicos usando como fase móvel ácido acético 5%: MeCN. Alguns trabalhos fazem, ainda, uso de tampão (BICCHI *et al.*, 1995; CASAL *et al.*,1998) e par iônico (KY *et al.*, 2001). São descritas vazões de 0,5 a 1,5 mL/min.

A detecção é feita no comprimento de máxima absorção ou na região próxima a este. Foram citados para trigonelina detecção na faixa de 254 a 272 nm, para cafeína, de 254 a 282 nm, e, para 5-ACQ e fenóis livres, de 320 a 325 nm.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de metodologia analítica para diferenciação de café torrado arábica (*C. arabica*) e conilon (*C. canephora*) e misturas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma metodologia espectrofotométrica baseada em reações colorimétricas da matéria insaponificável para discriminação de espécies de café.
- Avaliar o comportamento da metodologia desenvolvida frente a pequenas alterações nas condições de análise, utilizando um planejamento fatorial fracionado.
- Estudar a eficiência da metodologia desenvolvida para diferenciação de variedades de café arábica (IAPAR 59, Acaiá, Catuaí, Mundo Novo) e conilon e misturas.
- Desenvolver uma metodologia analítica para determinação simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico (5-ACQ), cafeína e ácidos cinâmicos livres, por cromatografia líquida de fase reversa e detecção no UV.
- Validar a metodologia cromatográfica.
- Analisar café arábica IAPAR 59, conilon e misturas utilizando as metodologias cromatográfica e espectrofotométrica desenvolvidas.

- Caracterizar e separar misturas de café arábica (IAPAR 59) e conilon empregando técnicas estatísticas multivariadas (Análise de Componentes Principais e Análise de Agrupamentos).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

As amostras de café verde de origem conhecida foram obtidas junto ao Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR). Utilizou-se café arábica das variedades IAPAR 59, Acaiá, Catuai, Mundo Novo. O café conilon foi obtido no comércio local.

A torra foi feita em um torrador marca Rod-Bel, com a temperatura variando de 160 a 170 °C de 8 a 13 minutos de acordo com a variedade de café. As amostras foram moídas a uma granulometria em torno de 500 µm (peneira ABNT 35), armazenadas em sacos plásticos e acondicionadas em câmara fria (10°C).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CAFÉ

4.2.1 Análise de Umidade

A umidade foi determinada para 3 g de amostra pela secagem em estufa (105°C) com circulação de ar, até obtenção de peso constante (AOAC, 1995).

4.2.2 Análise de Cor

As amostras de café foram compactadas em placas de petri de vidro, sendo tomadas às imagens digitais utilizando-se um scanner comum de mesa, com

resolução de 9600 DPI. O brilho e o contraste do equipamento foram regulados em 75 e 80 % respectivamente. As análises foram realizadas conforme descrito por OLIVEIRA *et al.*, (2003). No programa .Microsoft[®] Paint Versão 5.1., selecionou-se, para cada figura scaneada da placa, uma área da região central de, aproximadamente, 3x3 cm². Empregandose o programa .Conversor em cor média RGB para imagens BMP. (SACHS *et al.*, 2002), as imagens foram convertidas a valores RGB médios, utilizando-se um aplicativo de leitura de cor pixel a pixel. Posteriormente, converteram-se os dados para o sistema CIELAB pelo programa .Munsell Conversion versão 4.01. (COLORPRO, 2002), obtendo-se valores de Luminosidade (L*), componente vermelho-verde (a*) e componente amarelo-azul (b*).

4.3 REAGENTES

Solventes: terc-butil-metil éter, hexano, dietil éter e etanol 96[°]GL de grau analítico; metanol, acetonitrila e ácido acético de grau cromatográfico; ácido fórmico (P.A.), ácido sulfúrico (P.A.) e ácido fosfórico (P.A.). A água empregada no preparo de padrões e soluções foi obtida por sistema de purificação e filtração Milli-Q (Millipore). Todos as fases móveis foram filtradas em sistema Millipore de filtração a vácuo, utilizando-se membranas de 0,45 μ m (Millipore) e degaseificadas, por 25 minutos antes de sua utilização, em degaseificador (Shimadzu, modelo DGU-2A).

Padrões (de grau analítico): ácido caféico (ácido 3,4-dihidroxicinâmico), ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi .3 .metoxicinâmico), ácido

cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico), ácido clorogênico (ácido 1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexanocarboxílico - 5-ACQ) , ácido nicotínico, cafeína e trigonelina;

Outros Reagentes (de grau analítico) : ácido clorídrico, hidróxido de potássio, iodeto de potássio, tiosulfato de sódio.

4.4 EQUIPAMENTOS

Para as análises espectrofotométricas foi utilizado um espectrofotômetro UVVis ível GBC Cintra 20, com faixa de detecção de 190 a 1000nm e abertura de fenda de 2nm.

Para as análises cromatográficas foi utilizado um cromatógrafo a líquido Shimadzu, constituído de um sistema de bombeamento de solvente (duas bombas modelo LC10AD) e válvula injetora Rheodyne, com alça de amostragem de 20 µL. O sistema está acoplado a um detector espectrofotométrico UV/visível Shimadzu (modelo SPD-10A) conectado por uma interface (CBM . 101) a um microcomputador para processamento de dados.

4.5 METODOLOGIA ESPECTROFOTOMÉTRICA

4.5.1 Avaliação dos Parâmetros Experimentais

Como o objetivo é a obtenção de maior massa ou concentração de caveol e a síntese de uma substância derivada deste, a escolha da propriedade a

ser otimizada recaiu sobre a extração e a quantidade de derivado colorido a ser produzido. Nesse caso a eficiência dependeria de diversos fatores ou propriedades, tais como: concentração dos reagentes que participam da extração e síntese, condições e temperatura de reação, etc. Para o estudo do rendimento, selecionaram-se as variáveis que poderiam ser responsáveis pela maior ou menor obtenção do produto desejado.

No desenvolvimento do método, a partir do proposto por WURZIGER (1985), foram otimizadas a extração do caveol e as condições das reações colorimétricas para amostras de café arábica IAPAR59 e conilon. Para se obter extração quantitativa, foram estudados a técnica e os possíveis solventes de extração, testando-se condições mais específicas para caveol utilizadas por autores que trabalharam com técnicas cromatográficas (URGERT *et al.*, 1995). Para as condições de reação, devido à falta de informações no método original, foram feitos testes de padronização das quantidades e forma de adição dos reagentes usados.

Como resposta foram obtidas leituras em espectrofotômetro a 290 e 630 nm do extrato após reação com HCl e KI. As medidas de absorvância foram corrigidas em função da massa de amostra inicial para eliminar a variabilidade devida a diferenças na pesagem.

Avaliou-se a rusticidade da metodologia utilizando um planejamento fatorial fracionado (26-3). As variáveis escolhidas foram: massa de amostra (MA), tempo de saponificação (TS), tempo de centrifugação (TC), volume de H₂O para limpeza do extrato (VL), volume de KI (VR) e tempo de reação (TR) (TABELA IV.1). Como variável resposta foi utilizado KI 630 nm. Os resultados foram analisados utilizando-se o procedimento "Experimental design" do programa Statistica 6.0

(STATSOFT, 2001), obtendo-se os efeitos e correspondentes níveis de significância para cada variável.

TABELA IV.1 - Matriz de planejamento fatorial das variáveis selecionadas.

Nível	MA (g)	TS (h)	TC (min)	VL (mL)	VR (mL)	TR (min)
+	0,20	1	1	1	0,2	5
-	0,25	3/4	2	2	0,1	10
Análise	MA	TS	TC	VL	VR	TR
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	-	+	-	-
3	+	-	+	-	+	-
4	+	-	-	-	-	+
5	-	+	+	-	-	+
6	-	+	-	-	+	-
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	-	+	+	+

MA - massa de amostra, TS - tempo de saponificação, TC - tempo de centrifugação, VL - volume de H₂O para limpeza do extrato, KI - volume de KI, TR - tempo de reação, p* - nível de significância.

4.5.2 Estudo da eficiência do método para outras variedades

Como no desenvolvimento da metodologia utilizou-se apenas amostras de café arábica da variedade IAPAR 59, foram feitos testes para verificar a aplicabilidade do método para outras variedades de café arábica (Acaiá, Catuai, Mundo Novo) e algumas misturas (20% e 50%) com o café conilon.

Para análise dos dados empregou-se Análise de Agrupamentos e Análise de Componentes Principais das variáveis medidas experimentalmente utilizando-se os procedimentos .Multivariate Exploratory Techniques. . .Cluster Analysis” e .Principal Components & Classification Analysis. do programa Statistica 6.0 (STATSOFT, 2001). Na elaboração do dendograma (cluster analysis) a

estratégia utilizada foi a de Agrupamento Não Ponderado aos Pares e, como coeficiente de semelhança, empregou-se a Distância Euclidiana.

4.6 METODOLOGIA CROMATOGRÁFICA

4.6.1 Preparo de Padrões

Foram preparadas soluções estoque com concentração de 500 mg/L para cafeína e de 100 mg/L para trigonelina, ácido nicotínico, ácido clorogênico (5-ACQ) e ácidos cinâmicos (caféico, ferúlico e cumárico).

A partir das soluções estoque foram preparadas novas soluções por diluições sucessivas para melhoramento das condições cromatográficas, preparo das curvas de calibração e determinação dos limites de detecção e quantificação de cada composto estudado.

4.6.2 Estudo das Condições Cromatográficas

Para encontrar as melhores condições cromatográficas para separação e quantificação dos compostos foram testadas duas colunas Spherisorb (Phase Separations) de mesma dimensão e tamanho de partícula (4,6mm x 250mm, partículas esféricas de 5 μ m) mas com diferentes taxas de recobrimento (ODS-2, capeada com 12 % de carbono em peso, e ODS-1, não capeada, e 7 % de recobrimento). No desenvolvimento, foram estudadas como fase móvel misturas

isocráticas e gradiente de MeCN/H₂O e MeOH/H₂O, testando-se diferentes valores de pH pela adição de ácido acético, ácido fórmico, ácido sulfúrico e ácido fosfórico. As análises foram realizadas à temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C.

No detector, foi empregada inicialmente uma programação de comprimento de onda, de maneira a detectar cada composto no comprimento de onda de sua máxima absorvância na região do ultravioleta. A trigonelina foi detectada à 260 nm, a cafeína à 272 nm, 5-ACQ e ácidos cinâmicos à 320 nm.

4.6.3 Identificação e Quantificação

A identificação dos compostos foi feita no próprio cromatógrafo a líquido, com base nos tempos de retenção dos solutos eluídos da coluna comparados com o do padrão e por co-cromatografia. A quantificação foi feita por padronização externa, construindo-se as curvas de calibração, na qual a área do pico cromatográfico é proporcional a quantidade de padrão injetado.

4.6.4 Extração

Como a literatura citava diferentes técnicas para preparo de amostra (BICCHI *et al.*,1995; CASAL *et al.*,1998; MARTIN *et al.*, 1998; ANDRADE *et al.*, 1998; VITORINO *et al.*,2001; NOGUEIRA *et al.*, 2002) foram testadas três condições de extração: H₂O a 80 °C e 100 °C, solução MeOH/solução de ácido acético 5% (10:90) a 80 °C. As amostras (0,500 g) foram extraídas com 30ml das soluções por

10 min., filtradas com papel de filtro qualitativo. Uma alíquota do filtrado foi transferida para um balão, completando-se o volume com a solução de extração. A solução final foi filtrada em membrana Millipore de 0,45 μm e então injetada diretamente no cromatógrafo sem etapas de limpeza.

4.6.5 Validação do Método

Para validação do método, seguiram-se as recomendações da ABNT (ABNT, 1998), estudando-se a linearidade, repetibilidade, recuperação e sensibilidade.

A linearidade do método foi determinada pela análise em triplicata de misturas padrão em cinco diferentes concentrações, construindo-se a curva analítica e calculando-se o coeficiente de determinação (R^2_{ajustado}) e nível de significância (p).

Para determinação da repetibilidade, foram analisados a mesma extração da amostra (0,500g) com cinco repetições de injeção, no mesmo equipamento, no menor espaço de tempo possível. Para reprodutibilidade, foram analisadas cinco extrações diferentes (0,500g) da mesma amostra, sujeitas às mesmas condições de extração e análise, no mesmo equipamento, no menor espaço de tempo possível. Avaliou-se também a reprodutibilidade em momentos diferentes, com intervalos de 24 horas, analisando-se uma mistura padrão dos compostos, que foi preparada e congelada a fim de evitar degradação.

A recuperação foi determinada a partir da adição de uma quantidade de padrão à amostra, de forma que a concentração adicionada fosse superior a 50%

da concentração inicialmente presente na amostra. Foi estudada também a resposta do equipamento pela adição de diferentes concentrações de solução padrão após a extração.

Na determinação da sensibilidade do método, o limite de detecção (LD) foi estabelecido empregando-se de soluções de concentrações decrescentes até o menor nível detectável e, o limite de quantificação (LQ), até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Os limites de detecção (*LD*) e de quantificação (*LQ*) foram estimados usando as equações 3 e 4 (FRANCOTTE, 1996).

$$LD = 2 CS \, hn/hS \quad (3)$$

$$LQ = 6 CS \, hn/hS \quad (4)$$

Onde: *hn* = variação máxima do ruído no tempo de retenção do composto; *hS* = altura do sinal cromatográfico; *CS*= quantidade injetada do analito.

4.7 ANÁLISE DAS VARIEDADES E MISTURAS

Após desenvolvimento, as metodologias espectrofotométrica e cromatográfica foram empregadas para diferenciação das espécies de café arábica (IAPAR 59) e conilon e suas misturas nas proporções de 5, 10, 15, 20, 25 e 50 %.

Para análise dos dados empregou-se Análise de Agrupamentos e Análise de Componentes Principais das variáveis medidas experimentalmente, conforme descrito no item 4.2 do MATERIAL E MÉTODOS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras utilizadas nas análises apresentaram perda de peso após a torra de aproximadamente 17 %, umidade de aproximadamente 5% e valores de L*, a* e b*, descritos na TABELA IV.1.

TABELA IV.1 – Características de cor das amostras de café arábica e conilon.

AMOSTRA	L*	a*	b*
IAPAR 59	14,46	-0,87	1,60
ACAÍÁ	14,46	-0,87	1,60
CATUAÍ	14,57	-0,54	1,80
MUNDO NOVO	14,74	0,35	2,04
CONILON	14,57	-0,76	1,70

L*=luminosidade, a*=componente vermelho-verde, b*=componente amarelo-azul.

Os valores de L* medidos estão situados entre os valores médios encontrados por MONTEIRO (2002) para torra clara (L* =17,2) e torra expresso ou média (L* =9,98), com valores de perda de massa para torra clara de 10,5%, para torra expresso 14% e torra escura de 17,2% de perda de peso.

Com relação a perda de massa, BORRELLI *et al.* (2002) caracterizam a torra como clara, média e escura para perdas a de 14,2, 16,2, e 18,9%, respectivamente, situando as amostra utilizadas no trabalho como tendo sido submetidas a torra entre média e escura. Valores semelhantes de perda de massa foram utilizados por DAGLIA (1994).

5.2 METODOLOGIA ESPECTROFOTOMÉTRICA

5.2.1 Avaliação dos Parâmetros Experimentais

A metodologia desenvolvida está representada na FIGURA V.1. O emprego de diferentes cores permite caracterizar que parte da metodologia veio do trabalho de WURZIGER *et al.* (1979) (azul), URGET *et al.* (1995) (vermelho) do que desenvolvido e adaptado nesse trabalho (preto).

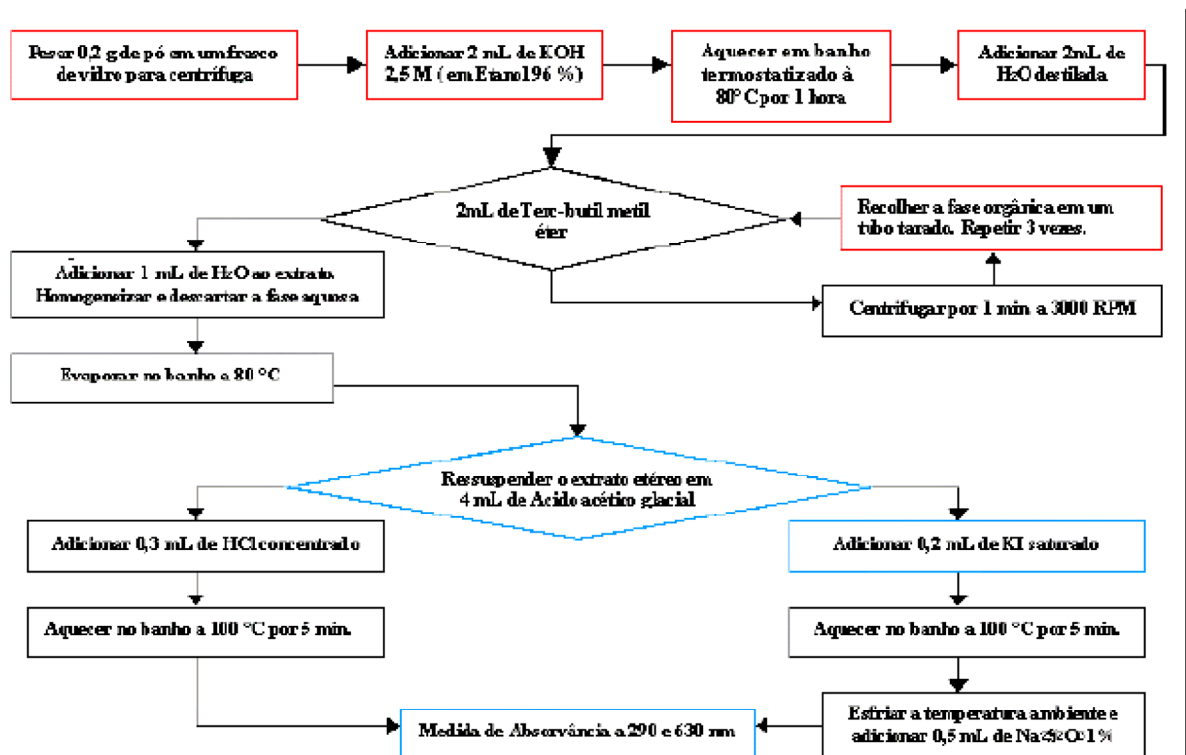


FIGURA V.1 – Fluxograma do método espectrofotométrico

Cores indicam que etapa é original de WURZIGER *et al.* (1979), URGET *et al.* (1995) ou foi desenvolvido e adaptado nesse trabalho.

Com a relação à técnica de extração apresentada por WURZIGER *et al.* (1979), o uso do Soxhlet tornava a extração muito onerosa e demorada. Para uma extração quantitativa da fração lipídica seria necessário deixar a amostra de 6 a 8 horas em refluxo no aparelho e utilizar grande volume de solvente, bem como de

massa de amostra. Além disso, extraindo-se toda a fração lipídica poder-se-ia extrair também interferentes que diminuiriam o rendimento da reação.

Como somente a matéria insaponificável da fração lipídica, que contém o caveol, é de interesse, foi utilizada como técnica de extração uma adaptação do método proposto por URGET *et al.* (1995) para quantificação de diterpenos em café. As operações referentes a essa metodologia, que foram utilizadas no desenvolvimento do método, estão destacadas em vermelho na FIGURA V.1.

Na extração proposta por URGET *et al.* (1995) era utilizado um banho termostatizado com agitação (.shaking.). Testes preliminares mostraram que o uso do .shaking. não melhorou a eficiência da extração em relação ao uso de banho termostatizado sem agitação. Pela rotação elevada empregada, o uso de shaking provocou o inconveniente de espirrar a borra de café nas paredes do tubo, dificultando a extração.

Deve-se também considerar que em relação ao método originalmente proposto por Wurziger, no método desenvolvido, pode-se saponificar várias amostras num mesmo banho, minimizando a perda de massa por transferência, devido a troca de tubo acontecer apenas uma vez.

Com relação ao solvente utilizado na extração, KURZROCK & SPEER (2001) citam que, na escolha deste, deve-se se levar em consideração que os diterpenos e seus compostos são relativamente polares. Assim solventes como o terc-butil-metil éter (t-BME), dietil éter e diisopropil éter (utilizado por URGET *et al.*, 1995) devem ser usados preferencialmente em relação a solventes não-polares, como o éter de petróleo, proposto por WURZIGER, ou o hexano.

Foram realizados testes com hexano, dietil éter e t-BME. Para reação com ácido clorídrico/ ácido acético glacial, os valores médios de absorvância a 630 nm, foram, respectivamente, $1,2 \pm 0,2$; $5,1 \pm 0,2$; $5,1 \pm 0,6$; dando uma indicação da maior eficiência do uso de solventes mais polares. Optou-se, então, pelo t-BME pela maior facilidade operacional na extração.

URGERT *et al.* (1995) recomendavam repetir a etapa de extração por três vezes. Em testes preliminares realizados com a borra extraída do café constatou-se a necessidade da repetição desta operação por três vezes para garantir a extração quantitativa.

O uso de solventes mais polares permitiu a solubilização de parte da fração pigmento do café, além de outras substâncias que tinham afinidade por esses solventes e que poderiam interferir nas medidas espectrofotométricas, deixando o extrato com uma coloração escura. A introdução de limpeza com água mostrou-se eficiente para redução da cor do extrato e testes realizados com a fase aquosa descartada na limpeza demonstraram que a etapa não implicava em perdas significativas de cafeol.

Quanto às reações colorimétricas, no método originalmente proposto por Wurziger (destacados em azul na FIGURA V.1) apenas o método de reação com iodeto de potássio apresentava uma descrição das condições utilizadas.

No método originalmente proposto por Wurziger após a evaporação a amostra foi ressuspensa em 2 mL de ácido acético glacial. No entanto, a coloração obtida na reação, medida através da absorvância, foi muito elevada. Para realizar a leitura no espectrofotômetro com soluções mais diluídas optou-se por ressuspender o extrato em 4 mL de ácido acético glacial.

Para reação com ácido clorídrico estudou-se o uso de ácido concentrado e algumas soluções diluídas (0,1 M, 1 M, e 5 M). Os melhores resultados foram obtidos com o uso de ácido concentrado. O próprio calor de dissolução do ácido concentrado no meio já foi suficiente para fornecer a energia de ativação necessária ao início da reação, ocorrendo uma pequena modificação na coloração do meio. Também foram realizados testes para padronização do volume de reagente, não obtendo modificação na coloração do meio para adição de volume de ácido superior a 0,3 mL.

Para reação com iodeto de potássio foram estudadas e padronizadas concentrações das soluções e forma de adição dos reagentes inicialmente propostas por Wurziger. No método original eram adicionados 0,1 mL de solução saturada de iodeto de potássio, porém testes indicaram que com um volume de 0,2 mL aumentava a eficiência da reação. A adição de tiosulfato era feita na forma de pequenos cristais o que dificultaria a padronização da reação, optou-se assim por trabalhar com uma solução 1 % de tiosulfato. Foram feitos, também, testes para a padronização do volume de tiosulfato adicionado para evitar a coagulação no meio.

No método originalmente proposto por Wurziger a mistura foi aquecida em ar seco a 105 °C por 10 minutos. Optou-se por trabalhar em banho a 100 °C pela maior facilidade.

Observou-se diferenciação visual clara entre variedades após as reações: para HCl as cores variaram de verde-escuro (arábica) a salmão (conilon) e, para KI, foram de verdeazulado (arábica) a amarelo/laranja (conilon) (FIGURA V.2).



FIGURA V.2 – Cores relativas às reações colorimétricas com HCl (A) e com KI (B) para café arábica, conilon e misturas.

Antes da reação, os espectros de varredura do extratos com t-BME obtidos com as duas espécies foram semelhantes, apresentando pequena absorção a 630 nm, como pode ser observado para amostras de café arábica na FIGURA V.3- A. Após reação com KI e HCl (FIGURA V.3- B e D), os espectros de varredura dos extratos de amostras de café arábica apresentaram grande absorbância a 630 nm, correspondente a absorção do produto de reação. A mesma absorção não é observada nos espectros de varredura dos extratos de amostras de café conilon após reação (FIGURA V.3- C e E).

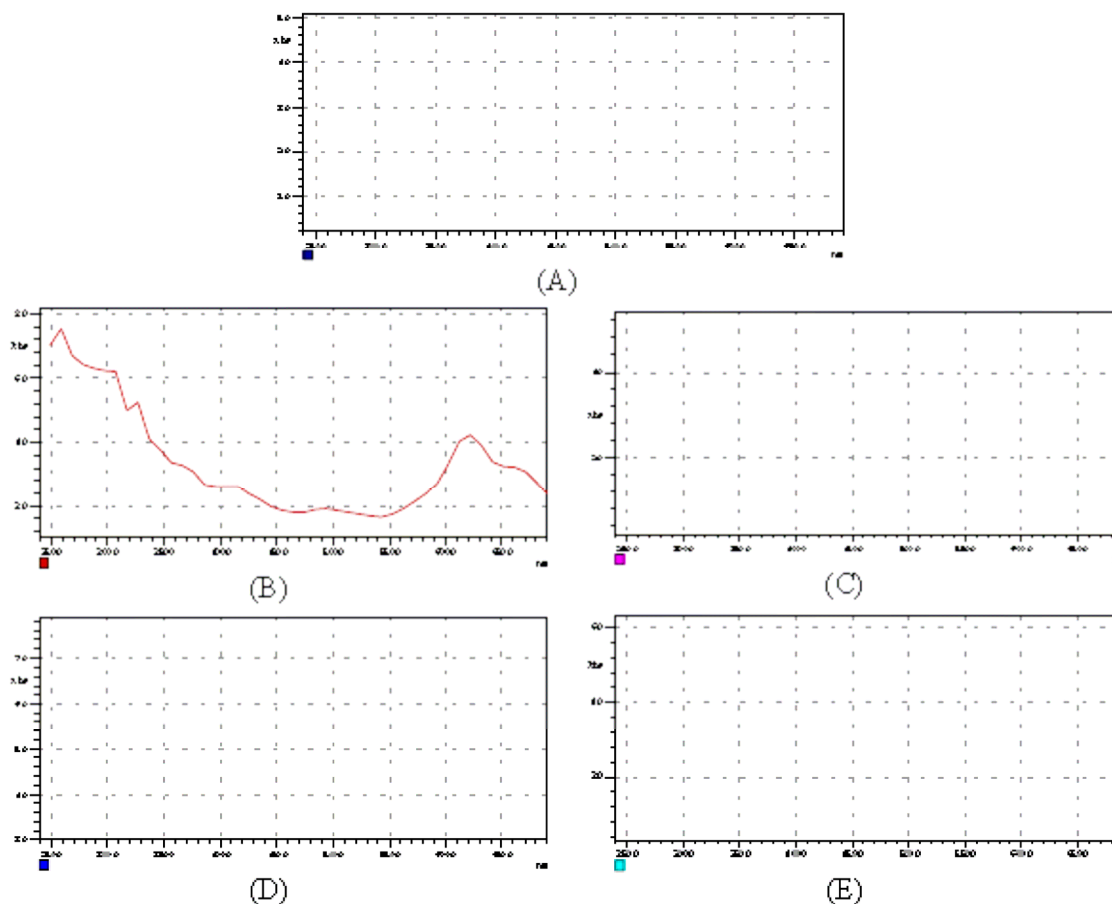


FIGURA V.3 - Espectros de Absorção dos extratos, com t-BME, de amostra 100% Arábica antes da reação (A) e após reação com KI, amostra 100% Arábica (B) e 100% Conilon (C) e após reação com HCl, amostra 100% Arábica (D) e 100% Conilon (E).

5.2.2 Avaliação da Rusticidade do Método

Tendo-se em vista que se pretende utilizar o método para controle de rotina em laboratório, após o desenvolvimento da metodologia realizaram-se ensaios para avaliação da rusticidade (TABELA V.2).

Os maiores efeitos foram observados para o volume de H₂O de limpeza do extrato (VL), melhorando a eficiência da extração com o aumento de 1mL para 2mL, e o volume do reagente KI (VR), que diminuiu significativamente a eficiência da reação quando reduzido de 0,2 para 0,1 mL. Conclui-se que um maior

VL deveria facilitar a solubilização de possíveis interferentes, que estariam reagindo com o iodeto e diminuindo sua disponibilidade, assim um maior valor de VL, associado a um maior VR, aumentaram a eficiência da reação.

TABELA V.2 - Matriz de planejamento fatorial e estimativas dos efeitos das variáveis selecionadas.

Nível	MA (g)	TS (min)	TC (min)	VL (mL)	VR (mL)	TR (min)	REPLICATAS (A 630nm)		
+	0,20	60	1	1	0,2	5			
-	0,25	45	2	2	0,1	10			
Análise	MA	TS	TC	VL	VR	TR	1 ^a	2 ^a	Média
1	+	+	+	+	+	+	16,67	19,26	17,97
2	+	+	-	+	-	-	10,74	12,95	11,85
3	+	-	+	-	+	-	21,74	20,32	21,03
4	+	-	-	-	-	+	12,91	11,85	12,38
5	-	+	+	-	-	+	13,23	14,84	14,03
6	-	+	-	-	+	-	21,15	25,52	23,34
7	-	-	+	+	-	-	10,35	10,89	10,62
8	-	-	-	+	+	+	16,99	15,82	16,40
p*	0,699	0,047	0,915	0,001	<0,001	0,069			
Efeito	0,29	-1,69	0,08	3,49	-7,46	1,51			

MA - massa de amostra, TS - tempo de saponificação, TC - tempo de centrifugação, VL - volume de H₂O para limpeza do extrato, KI - volume de KI, TR - tempo de reação, p* - nível de significância.

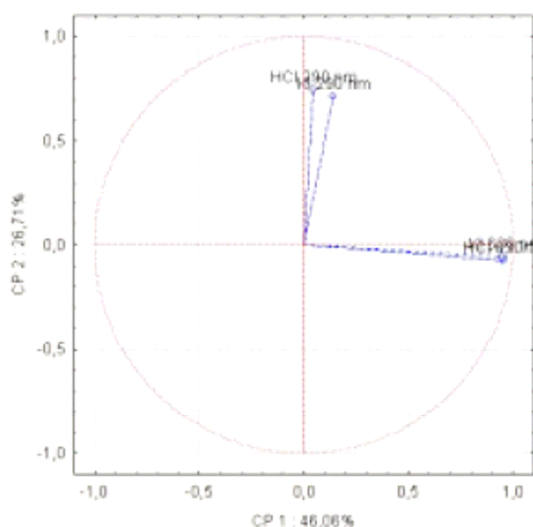
As variáveis massa de amostra e tempo de centrifugação não foram significativas a um nível de 5% e observou-se melhores resultados mantendo-se o tempo de saponificação de 1h. Apesar de apresentar um efeito menos pronunciado (p≈7%), observou-se melhora com um aumento de TR, optando-se, então, pelo tempo de reação de 10min.

5.2.3 Estudo da eficiência do método para outras variedades

Após o desenvolvimento da metodologia utilizando a variedade IAPAR 59, estudou-se a eficiência do método para caracterização de outras variedades de café arábica. Com relação ao aspecto visual, observado para cores das reações, todas as amostras apresentaram cores semelhantes à do IAPAR 59 (FIGURA V-2).

Na ACP, o maior autovalor ($\lambda_1 = 1,842$) gerou o componente principal que reteve quantidade maior da informação total, medida por sua variância. O segundo maior autovalor ($\lambda_2 = 1,068$) gerou o segundo componente principal, e assim o terceiro autovalor ($\lambda_3 = 0,928$) gerou o terceiro componente principal. Os componentes principais 1 e 2 retiveram 73 % da variabilidade (FIGURA V-4).

Com relação à importância das variáveis no processo classificatório, utilizou-se a correlação de cada variável com o componente principal. No primeiro componente, as variáveis mais importantes no eixo horizontal e com correlação positiva foram a HCI 630 e KI 630, enquanto que no segundo componente principal, as variáveis mais importantes foram HCI 290, com correlação negativa, e KI 290, com positiva (FIGURAS V.4 e V.5B).



	CP1	CP2
Autovalor	1,842	1,068
Variável	CP1	CP2
HCL630	0,951848	-0,077204
HCL290	0,042245	0,745084
KI630	0,956857	-0,058557
KI290	0,138147	0,709690

FIGURA V.4 - Gráfico e matriz de correlações das variáveis espectrofotométricas com os Componentes Principais 1 e 2, para reações colorimétricas de amostras arábica variedade IAPAR-59, Acaia, Catuaí, Mundo Novo e Conilon.

Analisando o dendrograma (FIGURA V.5-A) e o gráfico de componentes principais (FIGURA V.5-B) observa-se que foi possível a separação das amostras em dois grupos distintos: 1) café conilon, 2) misturas 50% e 20% e amostras de café arábica puras.

Pode-se também observar na FIGURA V.5-B que, no geral, as misturas estão localizadas na parte central do gráfico enquanto que as amostras de café arábica pura das diferentes variedades ficaram mais à direita, em relação ao café conilon. O primeiro componente, associado às leituras a 630 nm, permite a separação das amostras de conilon das misturas.

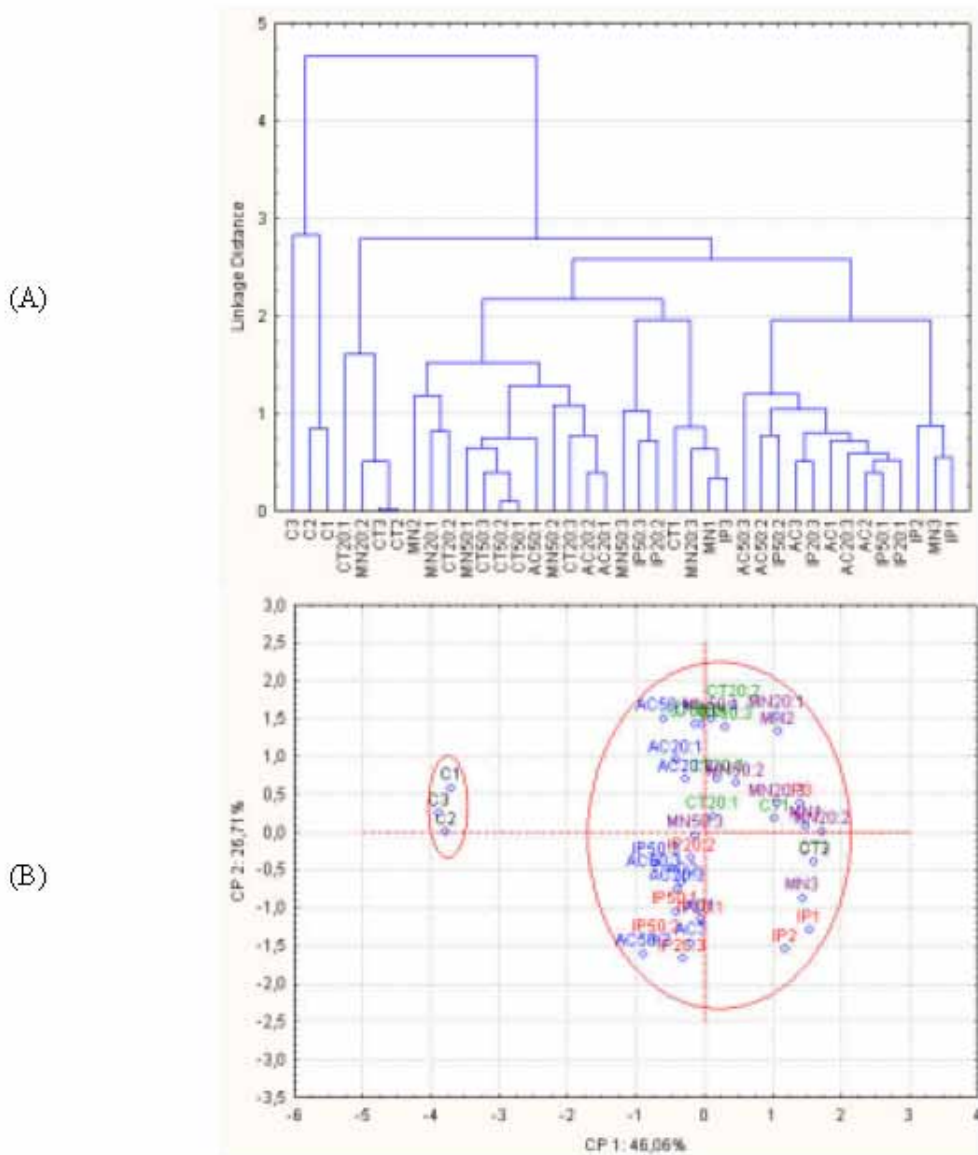


FIGURA V.5 - Dendrograma (A) e Análise de Componentes Principais (CP1 e CP2) (B) a partir dos resultados medidos para reações colorimétricas (HCl e KI a 630 e 290 nm) de amostras arábica variedade IAPAR-59, Acaíá, Catuaí, Mundo Novo e Conilon.

Amostras: 100% arábica IAPAR-59 (IP), Acaíá (AC), Catuaí (CT), Mundo novo (MN) e 100% conilon (C); e misturas com 20%(IP:20, AC:20, CT:20, MN:20) e 50% (IP:50, AC:50, CT:50, MN:50) de conilon aos arábica. Números 1, 2 e 3 à frente dos códigos correspondem à análise de três amostras.

Para uma avaliação mais detalhada da capacidade de discriminação do método, no APÊNDICE estão apresentados os resultados, em separado da análise multivariada para as variedades Acaíá, Catuaí e Novo Mundo e puras

misturas com conilon. Para a variedade IAPAR-59, a análise pode ser observada nas FIGURAS V-21 e V-22 do item 3, do RESULTADOS E DISCUSSÃO.

5.3 METODOLOGIA CROMATOGRÁFICA

5.3.1 Estudo das Condições Cromatográficas

5.3.1.1 Testes com padrões

Inicialmente trabalhou-se com a coluna Spherisorb ODS-2, utilizando como fase móvel uma mistura isocrática de MeOH/H₂O (20:80) pH 3,2 pela adição de ácido fórmico e programação de comprimento de onda (λ). Nessas condições a ordem de eluição foi a seguinte: trigonelina, ácido nicotínico, 5-ACQ, ácido caféico, cafeína e ácido cumárico, com tempo de retenção de aproximadamente 36 min. Observou-se que a trigonelina estava sendo encoberta (co-eluída) pelo ácido nicotínico, com o tempo de retenção para a trigonelina de 4,13 min. e do ácido nicotínico 4,27 min. A dificuldade na separação dos dois compostos foi atribuída ao fato do ácido nicotínico ser um produto de degradação da trigonelina, apresentando características físico-químicas semelhantes.

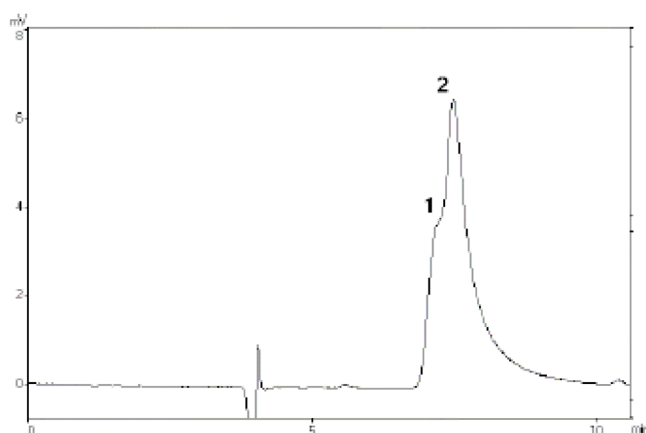


FIGURA V.6 - Cromatograma de uma mistura padrão de trigonelina (1) e ácido nicotínico (2) com eluição isocrática empregando fase móvel de ácido fórmico/metanol.

Condições: Coluna Spherisorb ODS-2 (Phase Separations), 4,6mm x 250mm, partículas esféricas de 5 μ m; Fase móvel: MeOH/solução de ácido fórmico pH3,2 (10:90 w/v), vazão: 0,7 mL.min⁻¹. **Deteção** : 260 nm.

Procurou-se, então, variar a proporção de MeOH da fase móvel, a fim de separar a trigonelina e o ácido nicotínico. Testou-se MeOH/H₂O pH 3,2 pela adição de ácido fórmico nas seguintes proporções 10:90, 15:85 e 35:65, não se obtendo sucesso na tentativa de separação (FIGURA V.6).

O principal problema na separação dos dois compostos era devido ao fato da trigonelina apresentar uma cauda, que não diminuía significativamente com aumento ou redução da polaridade da fase móvel.

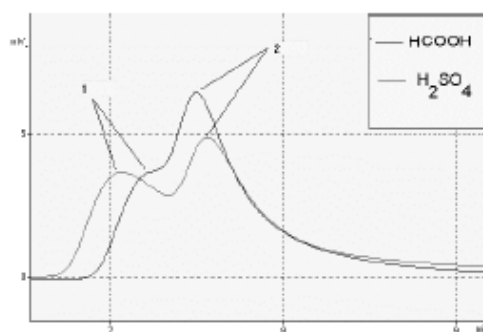


FIGURA V.7 – Comparação de cromatogramas de mistura padrão de trigonelina (1) e ácido nicotínico (2) empregando fase móvel isocrática com adição de ácido sulfúrico ou ácido fórmico.

Condições: Coluna Spherisorb ODS-2 (Phase Separations), 4,6mm x 250mm, partículas esféricas de 5 μ m. Fase móvel: MeOH/solução de ácido sulfúrico pH 3,2 (10:90 w/v) e MeOH/solução de ácido fórmico qual? (10:90 w/v), vazão: 0,7 mL.min⁻¹. **Deteção:** 260 nm.

Testou-se então o mesmo valor de pH (3,2) utilizando-se um ácido inorgânico (H₂SO₄). Observou-se melhora na separação entre os componentes não sendo, no entanto, ainda possível à quantificação dos compostos. A FIGURA V.7 mostra uma comparação da eficiência na separação utilizando ácido orgânico (fórmico) e ácido mineral (sulfúrico).

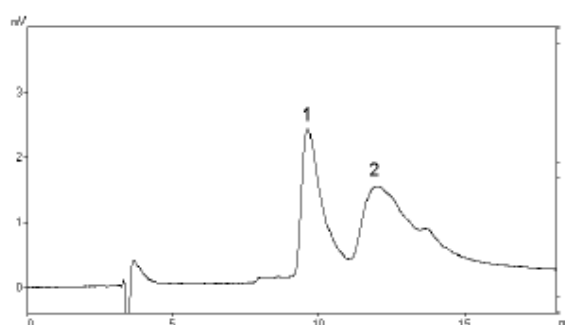


FIGURA V.8 - Cromatograma de uma mistura padrão de trigonelina (2) e ácido nicotínico (1) com eluição isocrática empregando fase móvel de ácido sulfúrico/metanol.

Condições: Coluna Spherisorb ODS-2 (Phase Separations), 4,6mm x 250mm, partículas esféricas de 5 μ m. Fase móvel: MeOH/solução de ácido sulfúrico 1,25 (10:90 w/v), vazão: 0,7 mL.min⁻¹. **Deteção:** 260 nm.

Estudou-se, então, a diminuição do pH pela adição de H₂SO₄ para 2,25 e 2,5 e H₃PO₄ para 2,5, observando-se praticamente a mesma separação entre os compostos. Observou-se melhora considerável em condições extremamente ácidas (pH = 1,5) (FIGURA V.8), porém esse pH inviabiliza o uso da metodologia, pela diminuição da vida útil da coluna.

Com adição de ácido mineral, observou-se um aumento no tempo de retenção dos outros compostos, principalmente os ácidos cinâmicos. Constatou-se também que a ordem de eluição foi alterada quando se modificou o pH. A cafeína em fase móvel com pH mais baixo (2,5) eluia depois dos ácidos cinâmicos e, com aumento de pH (3,2), eluia entre os ácidos caféico e cumárico. Os ácidos clorogênico e caféico necessitam de maior quantidade de metanol para uma separação eficiente, acima de 30%. Para eluição de cafeína e ácido cumárico necessita-se teores de metanol acima de 35%. A melhor condição observada foi utilizando-se gradiente não linear metanol em H₂SO₄ pH 2,5, mas ainda não se obteve separação adequada da trigonelina e do ácido nicotínico (FIGURA V.9).

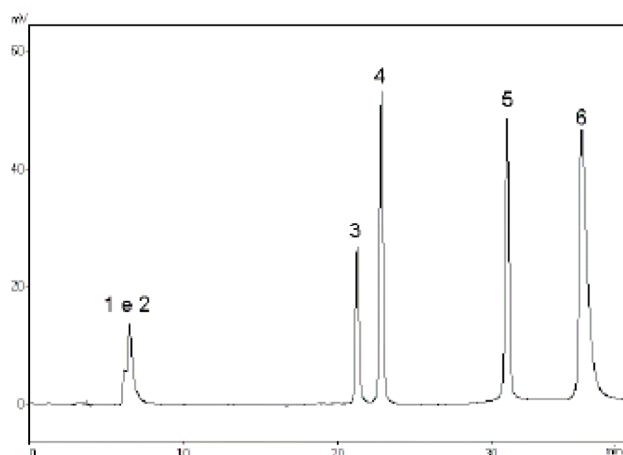


FIGURA V.9 - Cromatograma de uma mistura padrão de trigonelina (1), ácido nicotínico (2), 5-ACQ (3), ácido caféico (4), ácido cumárico (5), cafeína (6) com eluição isocrática empregando fase móvel de ácido sulfúrico/metanol.

Condições: Coluna Spherisorb ODS-2 (Phase Separations), 4,6mm x 250mm, partículas esféricas de 5 μ m. Fase Móvel: gradiente de solução de ácido sulfúrico pH 2,5(A) e MeOH(B), 0' - 15% B; 8' - 17% B; 10' a 20' - 30% B; 22' - 35% B, vazão: 0,7 mL.min⁻¹. **Deteção:** 260 nm de 0 a 10', 320 nm de 10 a 20' e 272 nm até o final.

Como não foi possível a separação da trigonelina e do ácido nicotínico com o uso de ácido mineral estudou-se o uso de outro ácido orgânico, o ácido acético. Com adição de 1% de ácido acético (pH mais alto) não ocorreu separação adequada e os picos não apresentavam boa resolução. Com ácido acético 5% ocorreu a troca na ordem de eluição (ácido nicotínico/ trigonelina), o que seria interessante pelo fato do ácido nicotínico ser encontrado em menor proporção no café e a trigonelina apresentar cauda. Testou-se o uso de gradiente e eluição isocrática, sendo que a melhor condição foi obtida usando mistura isocrática composta por MeOH/ solução de ácido acético 5% (25:75 v/v) (FIGURA V.10).

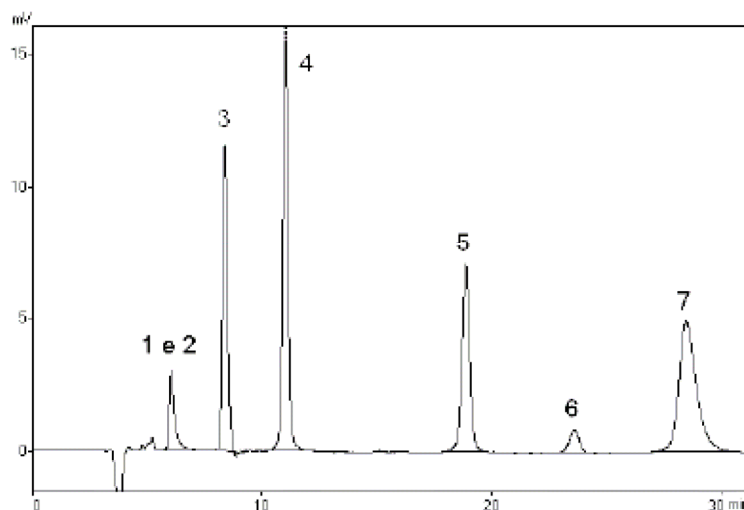


FIGURA V.10 - Cromatograma de uma mistura padrão de trigonelina (2), ácido nicotínico (1), 5-ACQ (3), ácido caféico (3), ácido cumárico (5), ácido ferúlico (6) e cafeína (7) com eluição isocrática empregando fase móvel de ácido acético/metanol.

Condições: Coluna Spherisorb ODS-2 (Phase Separations), 4,6mm x 250mm, partículas esféricas de 5µm. Fase móvel isocrática: MeOH/ solução de ácido acético 5% (25:75 v/v), vazão: 0,7 mL.min⁻¹. **Deteção** : 260 nm 0 a 8', 320 nm 8 a 25', 272 nm até o final.

Devido à dificuldade de separação da trigonelina do ácido nicotínico decidiu-se, então, testar outra coluna, Spherisorb ODS-1, utilizando a fase móvel com ácido acético 5%, que havia apresentado ordem de eluição e tempo de análise mais interessante.

A coluna ODS-1 permitiu a separação eficiente entre a trigonelina e o ácido nicotínico, apresentando melhor resolução para eluição isocrática em proporções inferiores a 20% de MeOH. No entanto, nessas condições o tempo total de análise foi muito alto, com tempo de retenção para a cafeína de 43 min. Ao se aplicar gradiente, a cafeína passou a ser eluída entre o ácido cumárico e ferúlico. Como a cafeína e os ácidos cinâmicos possuem propriedades físico-químicas (polaridade, solubilidade) diferentes esperava-se melhorar a separação variando as condições da fase móvel, mas não se encontrou nenhuma condição eficiente. Foram testadas várias condições de gradiente, porém, não foi possível obter um tempo de

separação entre os picos que permitisse a mudança do comprimento de onda para realizar a quantificação da cafeína e dos ácidos ferúlico e cumárico nos λ de máxima absorção, optando-se por fazê-lo em comprimento de onda fixo (272 nm) (FIGURA V.11).

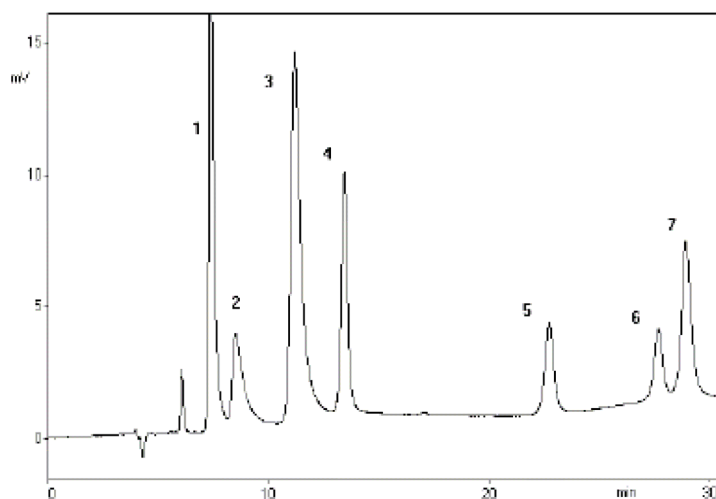


FIGURA V.11 - Cromatograma de uma mistura padrão de ácido nicotínico (1), trigonelina (2), 5-ACQ (3), ácido caféico (4), ácido cumárico (5), ácido ferúlico (6) e cafeína (7) com eluição gradiente empregando fase móvel de ácido acético/metanol.

Condições: Coluna Spherisorb ODS-1 (Phase Separations), 4,6mm x 250mm, partículas esféricas de 5 μ m. Fase móvel: gradiente solução de ácido acético 5% (A) e MeOH (B), de 0 a 15' - 25 % B; 20' até o final - 30% B, vazão: 0,7 mL.min⁻¹. **Deteção:** 260 nm de 0 a 10', 320 nm de 10 a 20', 272 nm até o final.

5.3.1.2 Testes com Amostra Real

Após os testes iniciais de desenvolvimento empregando padrões, analisou-se uma amostra real (café arábica - IAPAR 59). Foram testadas três condições de extração, conforme descrito no item 3.5 do MATERIAL E MÉTODOS. Extraíu-se 0,5 g de café com 30 mL da solução extratora, filtrando em papel qualitativo para balão volumétrico de 200 mL, filtrando novamente em membrana de

0,45 μm . Os cromatogramas para as diferentes condições de extração estão apresentados na FIGURA V.12.

A partir dos cromatogramas obtidos para as três condições, observa-se que elas não interferiram na separação e na área dos picos relativos a trigonelina, ácido clorogênico e cafeína. Para os compostos cinâmicos, no entanto, o uso de metanol favoreceu a extração. Como nas amostras a serem estudadas observou-se quantidades muito pequena desses compostos, optou-se pela extração com H_2O a 80°C . Testes de recuperação posteriores (item 4.2.3) adicionando-se quantidade de massa conhecida dos compostos analisados a amostra de café confirmam a eficiência dessa extração para os compostos de interesse.

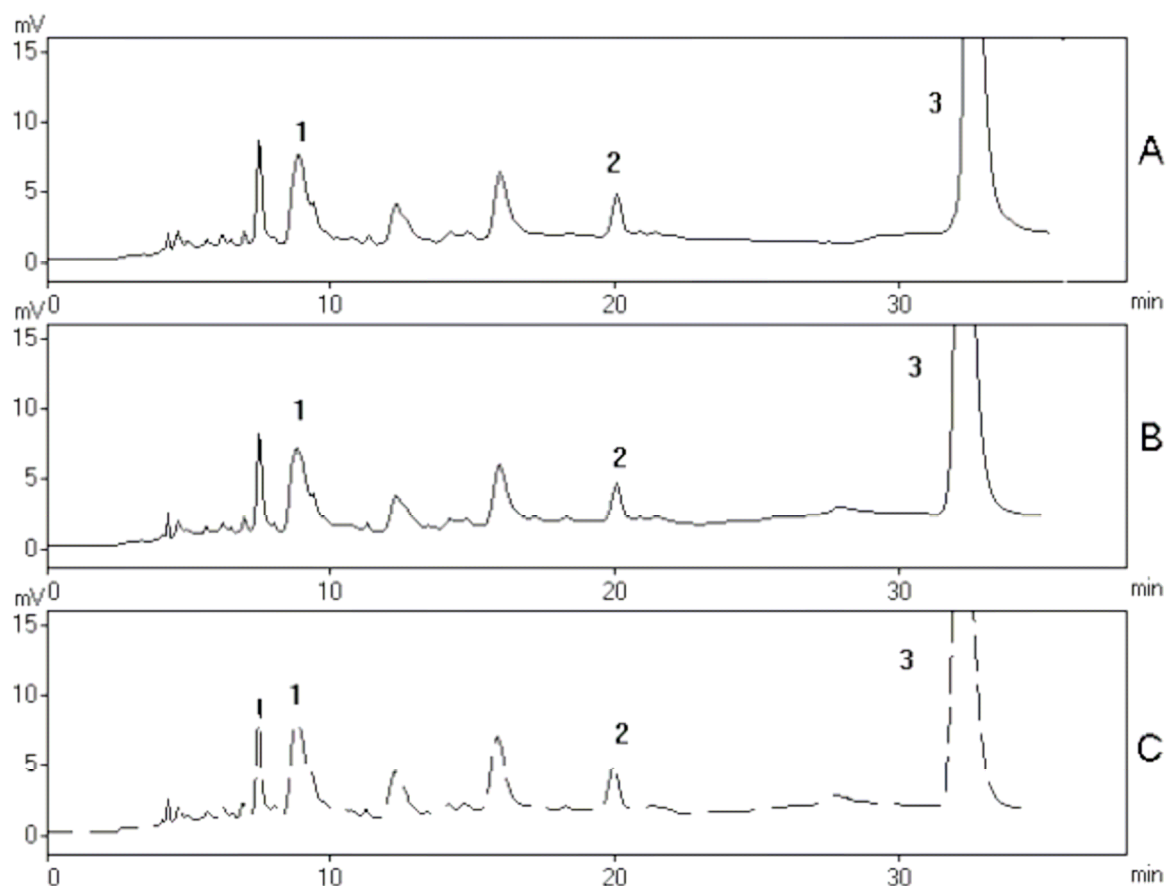


FIGURA V.12 - Cromatograma de uma amostra de café 100 % Arábica (LAPAR 59) submetida a diferentes condições de extração: solução MeOH/solução de ácido acético 5% (10:90) a 80 °C (A); H₂O a 80 °C (B) e H₂O a 100 °C (C).

Picos: (1) trigonelina, (2) 5-ACQ e (3) cafeína. **Condições:** Coluna Spherisorb ODS-1 (Phase Separations), 4,6mm x 250mm, partículas esféricas de 5µm. Fase móvel: gradiente de solução de ácido acético 5% (A) e MeOH (B), 0 a 5' - 20 % B; 10 a 15' - 25 % B e de 20 a 25' - 30 % B, vazão: 0,7 mL.min⁻¹. **Deteção:** 280 nm.

Para avaliação da melhor diluição a ser injetada no cromatográfico foram realizadas injeções do extrato inicial, completado para 200 mL em balão volumétrico, e duas diluições: até volume final de 400 e 600 mL. Nenhuma das diluições apresentou valores de absorvância acima ou abaixo do limite de detecção (LD), mas como na técnica cromatográfica deve-se dar preferência à injeção de soluções diluídas, optou-se por trabalhar com uma maior diluição. Para diminuir o volume de solvente necessário, resolveu-se extrair a amostra em 100 mL, transferir

uma alíquota de 5 mL para um balão de 25 mL, obtendo-se assim o equivalente a um volume de 500 mL do extrato inicial. O fluxograma proposto para o preparo da amostra está apresentado na FIGURA V.13.

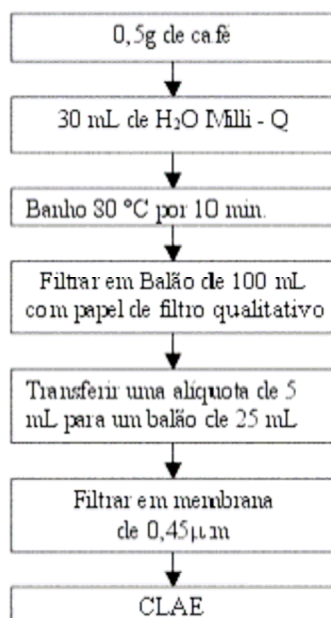


FIGURA V.13 – Condições propostas para extração das amostras de café

No cromatograma da amostra real (FIGURA V.14), seguindo a extração proposta na FIGURA V.13, observou-se que a trigonelina estava sendo co-eluída com outro composto, não identificado. Com relação aos outros compostos (5-ACQ e cafeína), observou-se boa discriminação. Os ácidos cinâmicos e nicotínico não estão indicados no cromatograma por estarem presentes em concentrações muito baixas, não sendo possível a visualização dos picos na atenuação apresentada. A detecção dos compostos nos testes iniciais com amostras foi realizada em apenas um comprimento de onda (280 nm), para evitar oscilações na linha de base até que estabelecesse as condições cromatográficas.

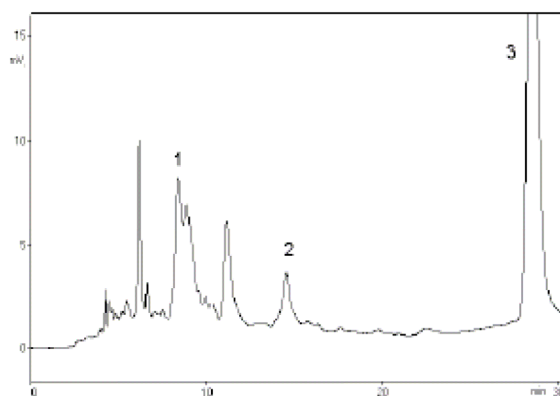


FIGURA V.14 - Cromatograma do extrato de amostra 100% arábica (LAPAR 59).

Picos: trigonelina (1), 5-ACQ (2), e cafeína (3). **Condições:** Coluna Spherisorb ODS-1 (Phase Separations), 4,6mm x 250mm, partículas esféricas de 5µm. Fase móvel: gradiente de solução de ácido acético 5% (A) e MeOH (B), 0 a 15' - 25 % B; 20' até o final - 30 % B, vazão: 0,7 mL.min⁻¹. **Deteção:** 280 nm.

Testou-se então outras variações de gradiente, a fim de separar o composto que estava sendo co-eluído com a trigonelina, sendo a melhor condição obtida observada na FIGURA V.15. Nessas condições, no entanto, ainda estava sendo eluído um interferente (pico 3). Quando foram testadas outras modificações na fase móvel, outros interferentes, correspondentes aos picos 2 e 4, mais sensíveis às variações na polaridade da fase móvel, eram eluídos junto com a trigonelina.

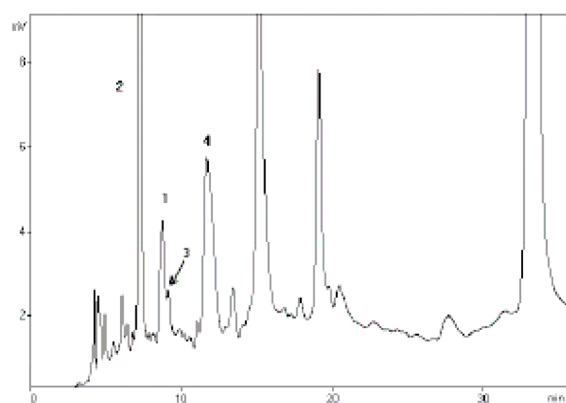


FIGURA V.15 - Cromatograma do extrato de amostra 100% arábica (LAPAR 59).

Picos: trigonelina (1), compostos não identificados (2, 3 e 4). **Condições:** Coluna Spherisorb ODS-1 (Phase Separations), 4,6mmx250mm, partículas esféricas de 5µm. Fase móvel: gradiente de solução de ácido acético 5% (A) e MeOH(B), 0 a 5'-20 %B; 10 a 15'-25 %B e de 20 a 25'-30 %B, vazão: 0,7 mL.min⁻¹. **Deteção:** 280 nm.

O detector utilizado permitia fazer programações de comprimentos de onda durante a corrida cromatográfica, decidiu-se, assim, avaliar o aumento na sensibilidade do método, com a detecção de cada composto no λ de sua máxima absorvância. Para escolha do λ máximo analisou-se o espectro ultravioleta de cada composto (FIGURA V.16).

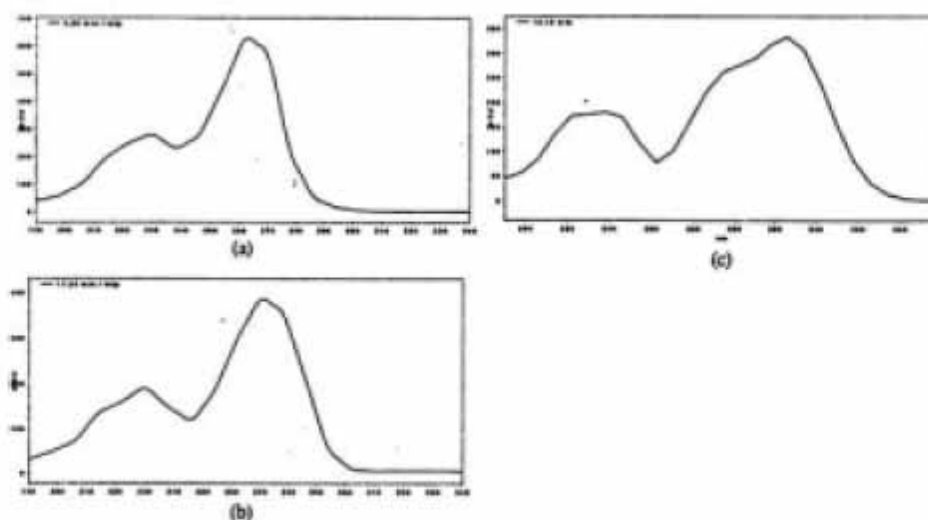


FIGURA V.16 - Espectros de varredura de trigonelina (a), cafeína(b) e 5- ACQ (c).

Como a mudança de comprimento poderia acarretar oscilações na linha de base e o λ de máxima absorvância da trigonelina e cafeína são próximos, optou-se por detectar os dois compostos a 272 nm e o 5.ACQ a 320 nm. A FIGURA V.17 mostra o ganho de sensibilidade com a programação de comprimento de onda. Na FIGURA V.17C, pode-se observar que os picos que aparecem com grande absorvância no cromatograma são pertencentes à classe dos ácidos cinâmicos (absorvância alta a 320 nm), sendo provavelmente de outros ácidos clorogênicos.

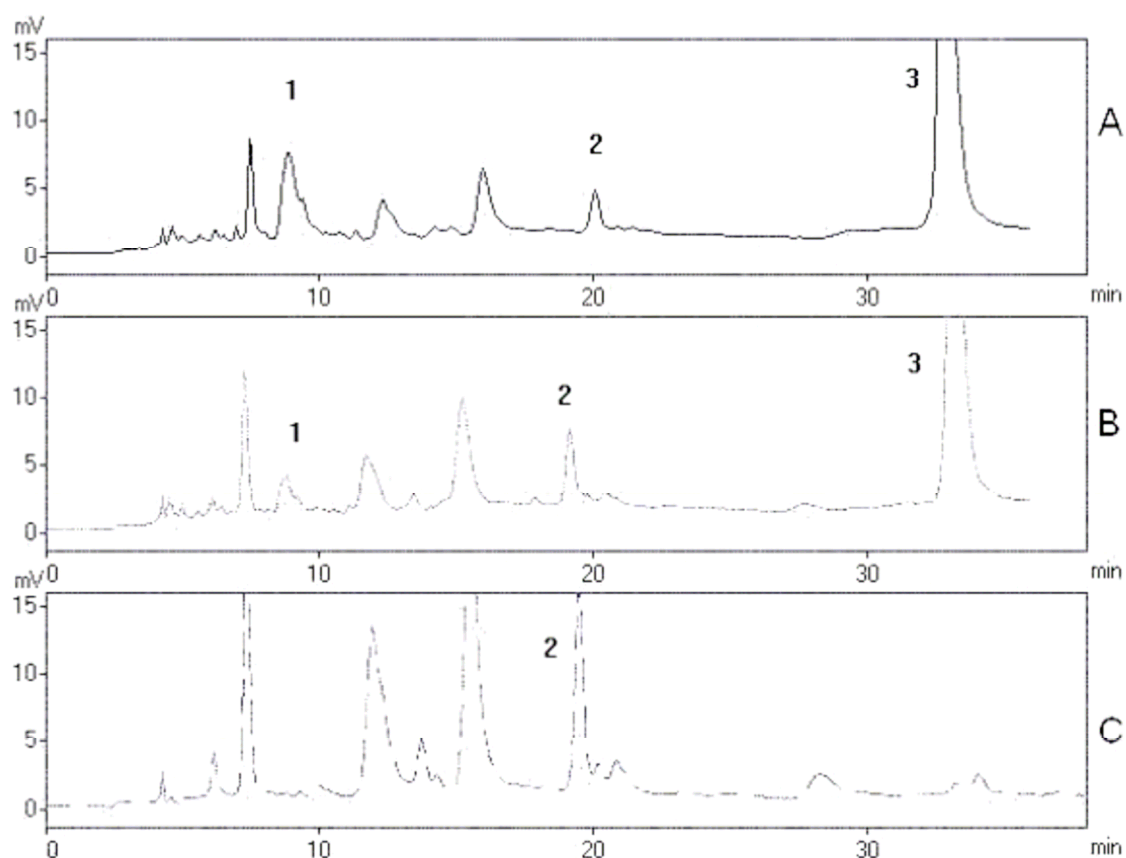


FIGURA V.17 - Cromatograma do extrato de amostra 100% arábica (IAPAR 59) com detecção a diferentes comprimentos de ondas: 272nm (A), 280nm (B) e 320nm (C).

Picos: trigonelina (1), 5-ACQ (2), cafeína (3). **Condições:** Coluna Spherisorb ODS-1 (Phase Separations), 4,6mm x 250mm, partículas esféricas de 5µm. Fase móvel: gradiente de solução de ácido acético 5% (A) e MeOH (B), 0 a 5' - 20 % B; 10 a 15' - 25 % B e de 20 a 25' - 30 % B, vazão: 0,7 mL.min⁻¹.

Como o uso de gradiente não resolveu a separação entre trigonelina e os interferentes, optou-se então pela mudança do modificador orgânico, trocando-se o MeOH por MeCN, conseguindo uma melhor separação e condição de análise. A FIGURA V.18A ilustra o cromatograma do extrato de café 100 % arábica (IAPAR 59) e a FIGURA V.18-B o cromatograma de uma mistura padrão nas condições cromatográficas otimizadas.

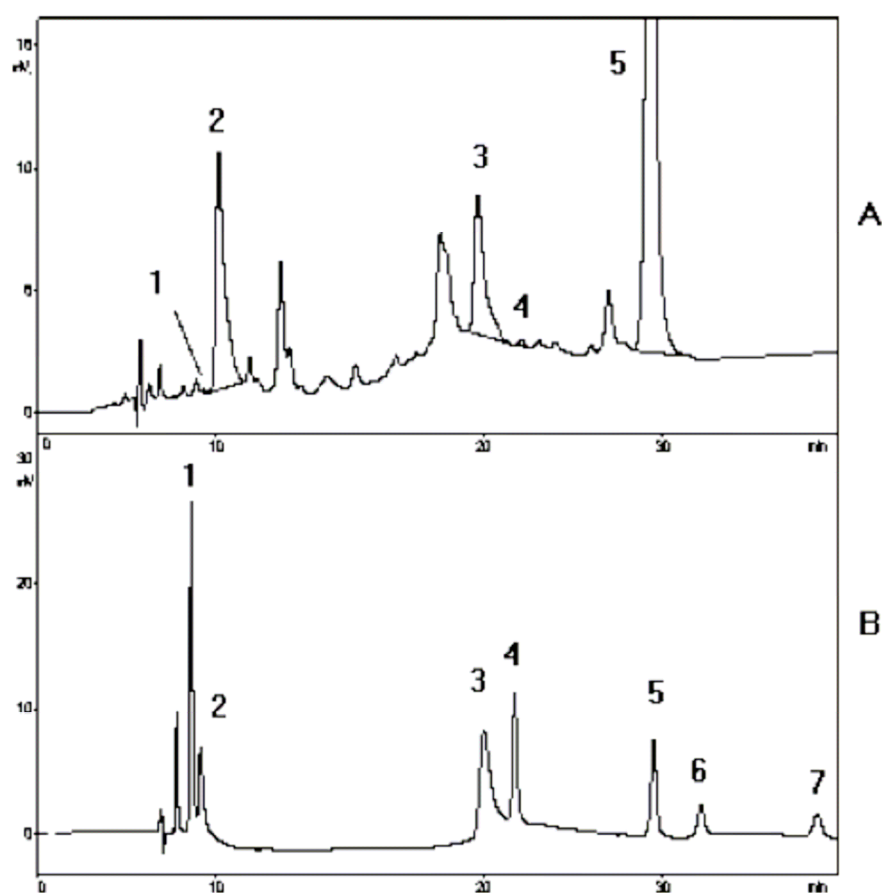


FIGURA V.18 - Cromatograma do extrato de amostra 100% arábica (A) e de uma mistura padrão (B) com eluição gradiente empregando fase móvel de ácido acético/acetoneitrila.

Picos: ácido nicotínico (1) trigonelina (2), 5-ACQ (3), ácido caféico (4), cafeína (5), ácido ferúlico (6) e cumárico (7). **Condições:** Coluna Spherisorb ODS-1 (Phase Separations), 4,6mm x 250mm, partículas esféricas de 5µm. Fase móvel: gradiente de solução de ácido acético 5% (A) e MeCN (B), 0 a 5' – 5% B; 10' até o final 13% B, vazão: 0,7 mL.min⁻¹. **Deteção:** 280 nm

Conforme discutido na revisão, o ácido nicotínico tem sido descrito como um bom diferenciador entre as espécies, não havendo interesse em sua quantificação. A separação deste do pico da trigonelina foi realizada para evitar interferência na quantificação. Os ácidos cinâmicos encontravam-se em pequenas concentrações nas amostras a serem estudadas, assim apesar de ser possível sua quantificação, mesmo dentro do LQ para esses compostos, optou-se por não quantificá-los a princípio.

A FIGURA V.19 ilustra o cromatograma de uma mistura padrão dos compostos que serão analisados (trigonelina, 5-ACQ e cafeína), onde se verifica uma resolução satisfatória dos picos em um tempo de análise relativamente curto (menos de 30 minutos).

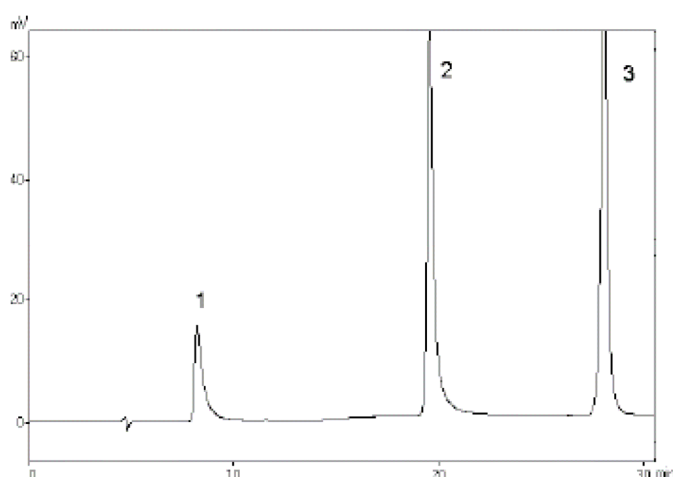


FIGURA V.19: Cromatograma de mistura padrão de trigonelina (1), 5-ACQ (2) e cafeína(3) com eluição gradiente empregando fase móvel de ácido acético/ acetonitrila.

Condições: Coluna Spherisorb ODS-1 (Phase Separations), 4,6mm x 250mm, partículas esféricas de 5µm. Fase móvel: gradiente de solução de ácido acético 5%(A) e MeCN (B); 0 a 5' – 5% B; 10' até o final 13% B, vazão: 0,7 mL.min⁻¹. **Deteção:** 0 a 15' – 272 nm, 15' a 23' – 320 nm e de 23' até o final 272 nm.

Na TABELA V.3 têm-se os tempos para 15 injeções consecutivas de mistura padrão de trigonelina, cafeína e 5-ACQ, seus respectivos desvios padrões e coeficiente de variação (C.V.), no método proposto.

TABELA V.3 - Tempos de retenção para mistura padrão de trigonelina, cafeína e 5-ACQ

Compostos	Tempo de Retenção (min)	Desvio	C.V. (%)
Trigonelina	8,3	0,2	1,88
5 - ACQ	20,2	0,4	1,94
Cafeína	28,6	0,5	1,71

Obs : média de 15 análises no mesmo dia.

A variação nos tempos de retenção foi pequena, podendo, em parte, ser atribuída ao fato das análises terem sido realizadas à temperatura ambiente. O uso de um sistema de controle de temperatura provavelmente diminuiria a variação.

As melhores condições cromatográficas encontradas para análise de café são descritas na TABELA V.4.

TABELA V.4 - Resumo das condições cromatográficas propostas

Fase Estacionária	Coluna	Spherisorb ODS 1 -250 mm X 4,6 mm Partículas de 5µm (C18)
Fase Móvel	Composição	Solução de ácido acético 5% (A) e MeCN (B)
	Vazão	0,7 ml/min
	Eluição	Gradiente : 0 a 5' - 5% B 10' - 13% B
Detecção		0 a 15' - 272 nm, 15' a 23' - 320 nm e de 23' até o final 272 nm. Sensibilidade: 0,008 UA
Injeção		Válvula Rheodyne com alça de amostragem de 20 µL
Tempo de Análise	Corrida	30 min
	Estabilização	10 min
Temperatura de análise		Ambiente

5.3.2 Validação do método

5.3.2.1 Linearidade

A TABELA V.5 mostra as concentrações de cada composto empregados na construção das curvas analíticas para quantificação. Os valores de concentrações padrão usadas na elaboração das curvas analíticas foram definidos com base nos teores médios desses compostos nas variedades de café citadas na literatura. Utilizou esse valor como concentração central da reta, calculando-se

valores equivalentes a 25% e 50%, a mais e a menos, para os demais valores de concentração, sendo que cada concentração foi analisada três vezes.

TABELA V.5 - Concentrações de trigonelina, cafeína e 5-ACQ usadas na construção das curvas analíticas

Compostos	Mistura 1 1 mg.L ⁻¹	Mistura 2 2 mg.L ⁻¹	Mistura 3 3 mg.L ⁻¹	Mistura 4 10 mg.L ⁻¹	Mistura 5 15 mg.L ⁻¹	Mistura 6 30 mg.L ⁻¹
Trigonelina	3	5	7	10	15	-
5 - ACQ	1	3	5	10	15	30
Cafeína	5	10	15	25	35	-

A FIGURA V.20 ilustra, respectivamente, as curvas analíticas da trigonelina (A), 5.ACQ (B) e cafeína (C).

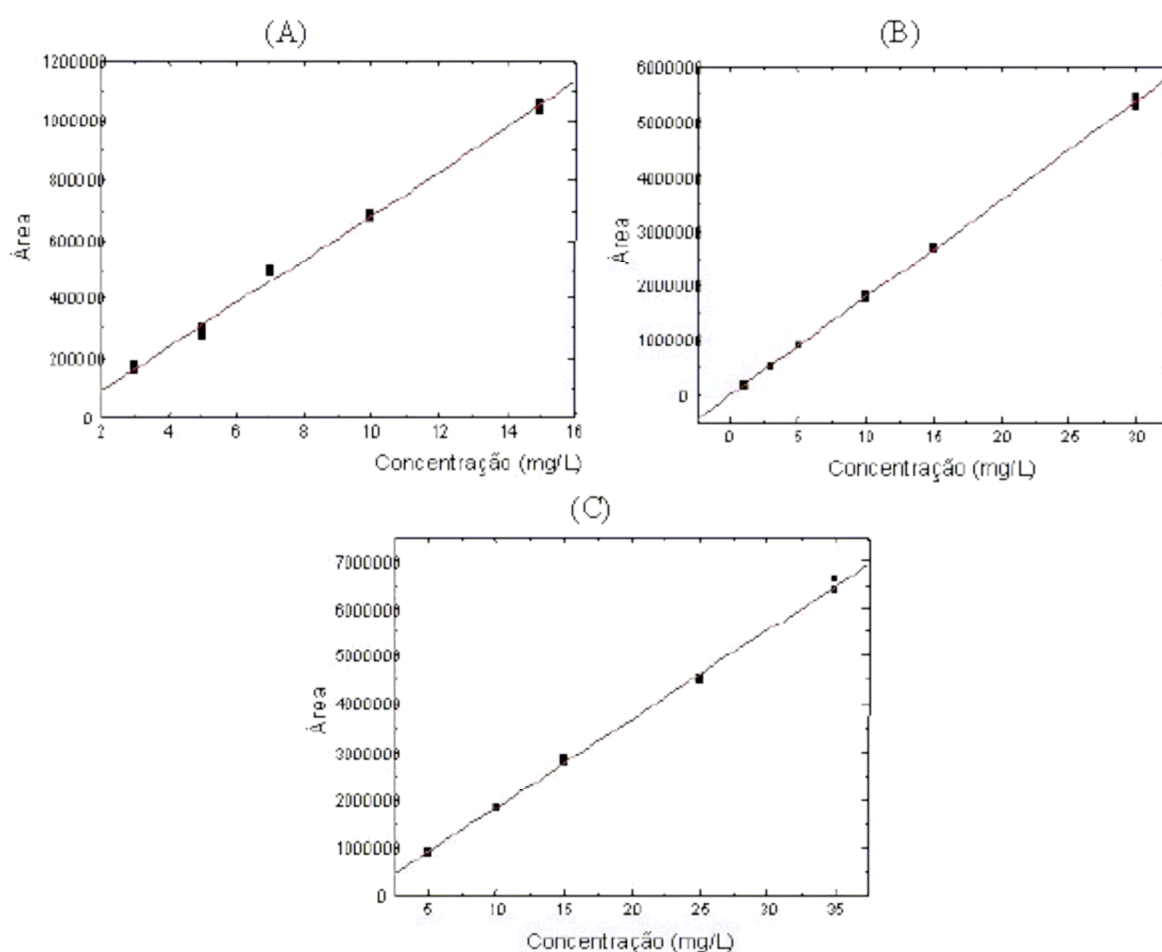


FIGURA V.20 - Curvas analíticas de trigonelina (A), 5-ACQ (B) e cafeína (C).

Analisando-se as curvas analíticas (FIGURA V.20), observou-se que todas apresentaram linearidade dentro da faixa de concentração utilizada com alta correlação. Os coeficientes das retas ($y = Ax + B$), coeficiente de explicação (r^2), nível de significância (p) e intervalos de concentração e correspondentes intervalos de massa que compreendem as faixas de linearidade estudadas nas curvas analíticas estão na TABELA V.6.

TABELA V.6 - Parâmetros da reta ($y = Ax + B$) para as curvas analíticas de trigonelina, 5-ACQ e cafeína.

Compostos	A	B	r^2	p	Intervalo de conc. (mg.L^{-1})	Intervalo de massa (μg)
Trigonelina	74045,1062	58283,7859	0,9957	1,4787E-15	3 - 15	60 - 300
5 - ACQ	178458,6821	14095,9469	0,9994	1,7359E-27	1 - 30	20 - 600
Cafeína	184407,8836	9547,7075	0,9984	8,4095E-17	5- 35	100 - 700

Obs: coeficiente de explicação (R^2), nível de significância (p), intervalo de linearidade em termos de concentração e massa.

5.3.2.2 Precisão

Os coeficientes de variação (C.V.) para os estudos de repetibilidade e reprodutibilidade estão apresentados na TABELA V.7. Conforme descrito no item 3.7, do MATERIAL E MÉTODOS, nos testes de repetibilidade e reprodutibilidade foram analisadas amostras reais e para a repetibilidade entre dias foi analisada uma mistura padrão, por isso os valores médios são diferentes.

TABELA V.7 – Valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação. para os ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade de trigonelina, 5-ACQ e cafeína.

Compostos	Precisão	Média	Desvio	CV %
Trigonelina	repetibilidade	37,8	0,6	1,5
	reprodutibilidade	35,9	1,6	4,4
	repetibilidade entre dias	68,5	2,6	3,7
5 - ACQ	repetibilidade	22,6	0,2	0,7
	reprodutibilidade	23,1	0,8	3,3
	repetibilidade entre dias	79,9	5,6	7,1
Cafeína	repetibilidade	62,5	1,1	1,7
	reprodutibilidade	62,5	1,4	2,2
	repetibilidade entre dias	89,2	3,5	3,9

Obs: média de cinco injeções

Para os ensaios de repetibilidade, o valor máximo de C.V. foi de 1,7 % para cafeína indicando uma boa repetibilidade para o método proposto. Na literatura são apresentados valores de repetibilidade no café torrado de 1,3% e 1,1% para a trigonelina e cafeína, respectivamente (CASAL *et al.*, 1998) e 0,62% e 0,14% para cafeína e 5-ACQ, respectivamente (CHAMBEL *et al.*, 1997).

Para os ensaios de reprodutibilidade, o valor máximo de C.V. foi de 4,4 % para trigonelina, indicando uma boa reprodutibilidade do método. Para os ensaios de repetidos em diferentes dias, o valor máximo de C.V. foi de 7,1 % para 5-ACQ, indicando também uma boa repetibilidade entre dias.

5.3.2.3 Exatidão

Foram realizados ensaios de recuperação adicionando-se uma massa conhecida de padrão, e realizando-se a extração conforme apresentado na

FIGURA V.13. A amostra final foi analisada em triplicata, sendo o valor médio de recuperação apresentado na TABELA V.8.

Os valores obtidos para os três compostos estão próximos de 100 %, indicando que a recuperação foi eficiente e dentro da faixa citada na literatura. Para trabalhos que utilizaram condições de extração semelhantes são descritos valores de recuperação no café torrado de 99% a 103% para cafeína (CAMARGO e TOLEDO, 1998) e 98% e 99% para trigonelina e cafeína, respectivamente (CASAL *et al.*, 1998.). NOGUEIRA *et al.*, (2002) relatam recuperação de 100%, 91% e 98% para 5-ACQ, trigonelina e cafeína, e CHAMBEL *et al.* (1997), entre 88 e 94% e 74 e 77% para 5-ACQ e cafeína.

TABELA V.8 - Recuperação (%) observada para trigonelina, 5-ACQ e cafeína.

Compostos	Conc. Amostra (mg/L)	M _{adc.} (mg)	M _{rec.} (mg)	% Rec.	Média
Trigonelina	3,6861	20,9000	20,8068	99,55	94,43
			19,7157	94,33	
			18,6881	89,42	
5-ACQ	2,2856	15,5000	17,0076	109,73	104,87
			16,2166	104,62	
			15,5385	100,25	
Cafeína	6,2469	40,1000	43,3887	108,20	103,18
			41,1580	102,64	
			39,5737	98,69	

M_{adc.} = massa adicionada, M_{rec.} = massa recuperada, % REC. = Recuperação

Foi analisada também a resposta do cromatógrafo para os compostos estudados, adicionando-se uma concentração conhecida de padrão ao extrato obtido para o ensaio de repetibilidade (TABELA V.9). Os valores também foram próximos de 100 % indicando que a integração dos picos, para determinação da área correspondente à concentração dos compostos analisados, estava sendo feita de forma eficiente.

TABELA V.9 – Recuperação (%) observada para adição de solução padrão de concentração conhecida ao extrato obtido para ensaio de repetibilidade.

Compostos	Conc. Teórica (mg/L)	Conc. Medida (mg/L)	%Rec.	Média
Trigonelina	2,9737	3,2765	110,18	114,73
	2,3920	2,8226	118,00	
	2,6829	3,1120	115,00	
5-ACQ	1,5385	1,4790	96,13	94,72
	1,7327	1,5976	92,20	
	1,9269	1,8463	95,82	
Cafeína	4,1090	4,1292	100,50	100,46
	4,6156	4,5907	99,46	
	5,1223	5,1341	100,23	

5.3.2.4 Sensibilidade

Os limites de detecção e limite de quantificação do sistema cromatográfico para trigonelina, 5-ACQ e cafeína foram calculados utilizando as equações (3) e (4) do item 5.5, do MATERIAL E MÉTODOS. Como na literatura é citado apenas que hS necessita ser de duas a dez vezes maior que h_n , decidiu-se trabalhar com um valor correspondente a 10 vezes para a trigonelina, que apresentava menor absorvidade e menor resolução, e, para os demais compostos, uma razão igual a 6.

Na literatura são apresentados valores de LD no café torrado de 0,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a trigonelina e cafeína, respectivamente (CASAL *et al.*, 1998) e 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a cafeína (BISPO *et al.*, 2002). A TABELA V.10 descreve os valores de LD dos compostos.

TABELA V.10 - Valores de limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ), para trigonelina, 5-ACQ e cafeína.

Compostos	Área	hn	hs	Cs	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
Trigonelina	4845	14	140	0,075	0,15	0,45
5-ACQ	2274	20	126	0,0125	0,04	0,12
Cafeína	2345	20	121	0,0125	0,04	0,12

hn - variação máxima do ruído no tempo de retenção do composto; hs - altura do sinal cromatográfico; Cs - quantidade injetada do composto.

5.4 DISCRIMINAÇÃO DAS ESPÉCIES, RARÁBICA (IAPAR-59) E CONILON, E MISTURAS

5.4.1 Metodologia Espectrofotométrica

Os valores referentes às análises para diferenciação das espécies (arábica IAPAR- 59 e conilon) e das misturas (5, 10, 15, 20, 25 e 50% de café conilon ao arábica) estão apresentados na TABELA V.11. Foram analisadas três pesagens iguais da mesma amostra. Os resultados estão expressos como absorvância a 290 e 630 nm após reação com HCl e KI.

TABELA V.11 – Medidas de absorvância a 290 e 630 nm após reação colorimétrica com HCl e KI.

Reação	Amostra	A 630nm			A 290nm		
		MÉDIA	DESVIO	C.V.%	MÉDIA	DESVIO	C.V.%
HCL	A	27,5	0,7	2,6	45,6	1,4	3,0
	M5	26,3	1,3	5,0	41,7	6,2	14,9
	M10	27,0	1,9	7,0	45,5	0,2	0,5
	M15	32,6	0,4	1,2	40,0	8,7	21,7
	M20	29,6	3,3	11,1	45,4	0,4	0,9
	M25	28,3	4,3	15,2	44,9	0,6	1,3
	M50	25,3	4,5	17,9	37,1	6,8	18,2
	C	9,0	0,8	9,2	32,3	2,5	7,8
KI	A	26,7	0,8	3,1	28,8	0,8	2,9
	M5	28,8	0,8	2,7	29,6	1,9	6,5
	M10	29,8	2,6	8,8	29,8	2,3	7,7
	M15	26,1	0,4	1,7	33,7	2,1	6,3
	M20	25,6	0,2	1,0	25,2	1,6	6,2
	M25	23,6	4,0	17,0	27,1	3,6	13,3
	M50	23,9	1,1	4,5	24,4	2,4	10,0
	C	2,1	0,2	7,9	19,3	3,3	17,0

Amostras: 100% arábica IAPAR-59 (A); 100% conilon (C); misturas com 5%(M5), 10% (M10), 15% (M15), 20% (M20), 25% (M25) e 50% (M50) de conilon ao arábica. Média de 3 repetições

Pode-se constatar que existe diferença numérica entre os resultados obtidos para as duas espécies puras. Amostras da espécie conilon apresentavam leitura de absorvância mais baixa em todos os parâmetros analisados. No geral, observou-se CV abaixo de 10%. As medidas a 290 nm, correspondentes a região do ultravioleta, sofrem muita interferência, principalmente atmosférica, que foram reduzidas na detecção na região do visível.

Quanto às misturas, analisando isoladamente cada parâmetro, observou-se que a adição de conilon em proporção inferior a 50% não poderia ser detectada pelo método.

Para uma avaliação em conjunto da capacidade de discriminação das variáveis obtidas na metodologia espectrofotométrica empregou-se Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise de Agrupamentos (AA). O primeiro (λ_1

□2,915) e segundo componentes (λ_2 □ 0,720) explicaram em conjunto 90,88 % da variabilidade dos dados (FIGURA V.21).

Com relação à importância das variáveis no processo classificatório, pode-se observar a correlação de cada variável com os componentes principais. No primeiro componente, temos em ordem decrescente de importância HCL 630nm, KI 630nm, HCl 290nm e KI 290nm, com correlação negativa. Amostras alocadas mais à esquerda apresentavam maior absorbância em todos os parâmetros, indicando um alto teor de caveol característico da espécie arábica. À medida que se aumentou a proporção de conilon (amostras 50% ou conilon puras) as amostras se configuravam mais à direita. No segundo componente, temos as medidas de absorbância a 290nm (HCl290 nm e KI290 nm) (FIGURAS V.21 e V.22-B).

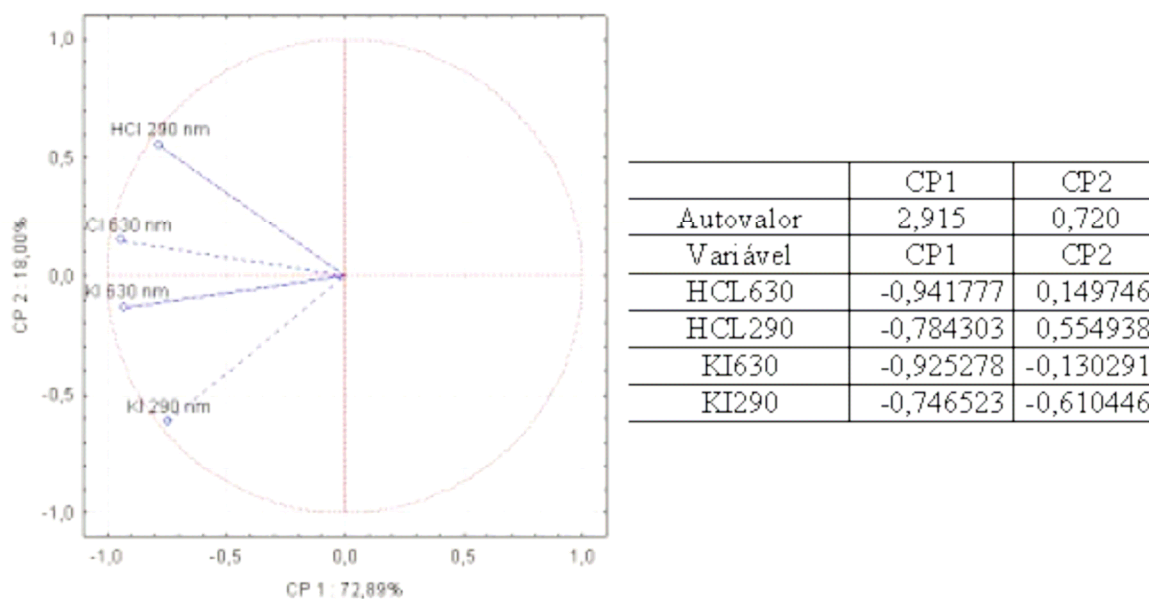


FIGURA V.21 - Gráfico e matriz de correlações das variáveis espectrofotométricas (HCl e KI a 630 e 290 nm) com os Componentes Principais 1 e 2.

Analisando-se o dendrograma (FIGURA V.22-A) constatou-se a separação das amostras em três grupos distintos: 1) café conilon, 2) mistura 50%, uma das triplicatas da mistura 15% e outra da mistura 5% 3) o restante das misturas

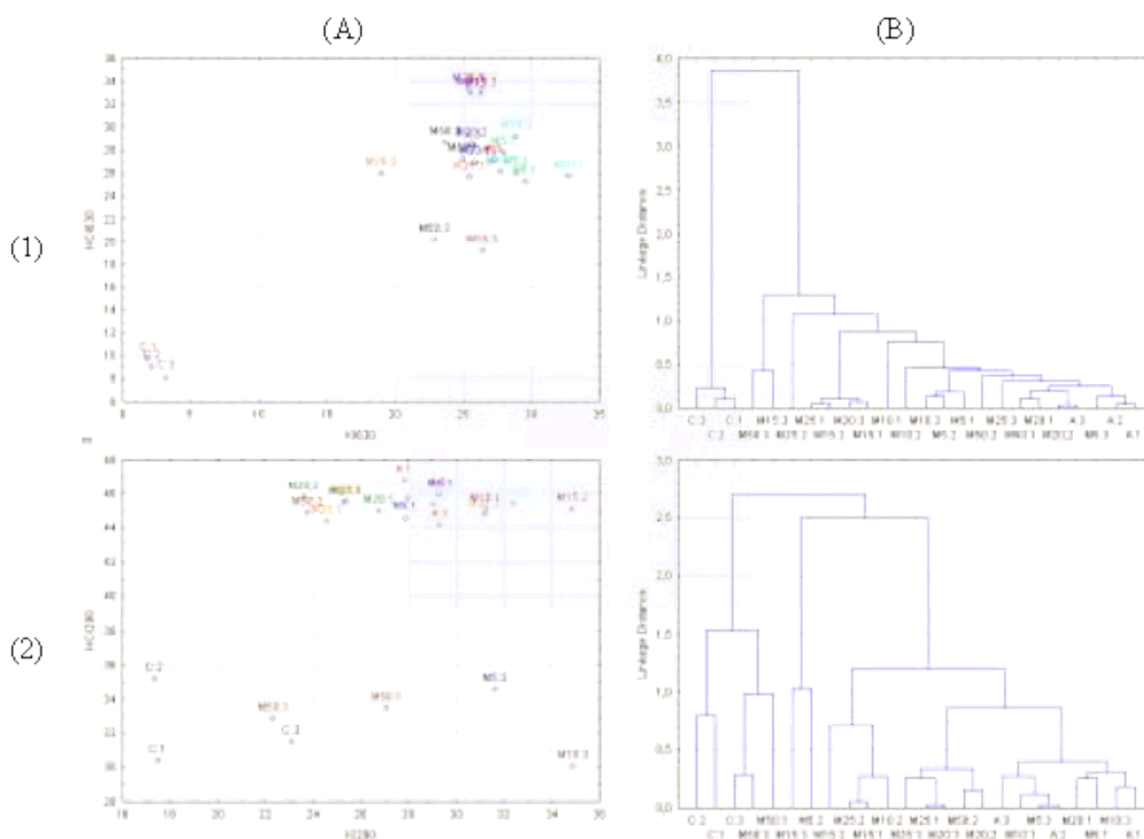


FIGURA V.23 – Relação entre as variáveis (A) e dendrograma(B) a partir dos resultados das reações colorimétricas: com HCl e KI para absorvância a 630 nm (1) e a 290 nm (2).

Amostras: 100% arábica IAPAR-59 (A), 100% conilon (C), misturas com 5%(M5), 10% (M10), 15% (M15), 20% (M20), 25% (M25) e 50% (M50) de conilon ao arábica. Números 1, 2 e 3 à frente dos códigos correspondem à análise de três amostras.

Para as medidas a 630 nm, FIGURA V.23-(1), observa-se que foi possível a separação das amostras em dois grupos distintos: 1) café conilon e 2) as misturas juntas com o café arábica. Já para as medidas a 290 nm, FIGURA V.23-(2), algumas misturas 50% ficaram juntas com as amostras de café conilon.

No caso específico analisado, as leituras de absorvância a 290 nm após reações colorimétricas mostraram-se pouco relevantes na caracterização, optando-se por continuar o tratamento dos dados apenas com os resultados de KI 630 e HCl 630. No entanto, como a leitura à 290nm pode ser feita facilmente nos extratos após reação quando se vai fazer a detecção à 630nm, não implicando em

nenhum trabalho adicional, recomenda-se que o parâmetro continue a ser estudado em trabalhos com um maior número de amostras para que sua capacidade de discriminação entre as espécies possa ser avaliada de forma mais abrangente.

5.4.2 Metodologia Cromatográfica

Os valores referentes às análises dos teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico (5-ACQ) por CLAE das espécies (arábica IAPAR-59 e conilon) e das misturas (5, 10, 15, 20, 25 e 50% de café conilon ao arábica) estão apresentados na TABELA V.12. As amostras foram analisadas em triplicata, sendo apresentado o valor médio, em base seca, correspondente a g dos compostos analisados por 100 g de amostra.

TABELA V.12 – Teores de trigonelina, 5-ACQ e cafeína determinados por CLAE

Amostra	TRIGONELINA			5-ACQ			CAFEÍNA		
	MÉDIA	D.P.	C.V.%	MÉDIA	D.P.	C.V.%	MÉDIA	D.P.	C.V.%
A	0,434	0,003	0,59	0,246	0,004	1,49	1,68	0,02	0,98
M5	0,410	0,007	1,63	0,235	0,004	1,87	1,66	0,01	0,49
M10	0,418	0,005	1,24	0,254	0,007	2,55	1,76	0,02	1,04
M15	0,424	0,008	1,92	0,248	0,007	2,70	1,77	0,02	1,31
M20	0,420	0,006	1,33	0,248	0,003	1,18	1,83	0,03	1,35
M25	0,424	0,009	2,00	0,265	0,007	2,59	1,92	0,05	2,41
M50	0,391	0,007	1,78	0,252	0,008	3,33	2,02	0,05	2,21
C	0,311	0,016	5,21	0,215	0,017	7,98	2,12	0,17	7,91

Amostras: 100% arábica IAPAR-59 (A); 100% conilon (C); misturas com 5%(M5), 10% (M10), 15% (M15), 20% (M20), 25% (M25) e 50% (M50) de conilon ao arábica. Resultados em g/100g de amostra (base seca), média de triplicata.

Foram encontrados para a variedade conilon valores mais altos de cafeína e mais baixos de trigonelina do que os constatados para o café arábica. Os teores de 5-ACQ apresentaram pouca variabilidade entre o café arábica e conilon.

Embora os valores de cafeína, trigonelina e 5-ACQ sejam influenciados pelos origem do café, grau de torra e método de análise os resultados encontrados foram compatíveis com os descritos na literatura.

DAGLIA *et al.* (1994) analisou amostras de café arábica torrado de vários países (18 % de perda de massa após torração) e encontrou teores na faixa de 0,323 a 0,659 g/100g, para 5-ACQ, de 0,466 a 0,732 g/100g para trigonelina, e de 0,884 a 1,084 g/100g para a cafeína. Para café robusta torrado (21 % de perda de massa após torração), descreveu valores de 0,081 até 0,508 g/100g para 5-ACQ, de 0,080 até 0,446 g/100g para trigonelina, e de 1,567 até 1,957 g/100g para cafeína. No mesmo trabalho, foram utilizadas amostras de café arábica do Brasil, com 18,7% de perda de massa após torração, encontrando-se valores médios de 0,323 g/100g para 5-ACQ, 0,466 g/100g para trigonelina, e 1,000 g/100g para a cafeína.

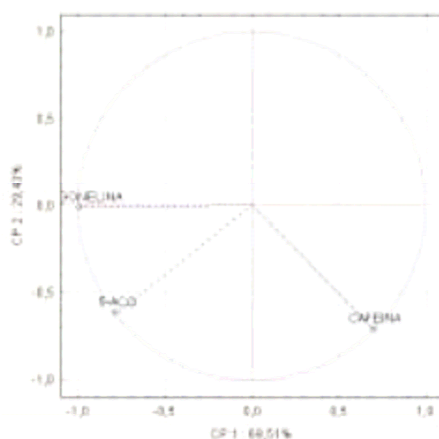
CASAL *et al.* (2000), trabalhando com amostras de café arábica torrado de vários países, relatou valores na faixa de 0,525 até 0,748 g/100g para trigonelina, e de 1,21 até 1,61 g/100g para cafeína. Para café robusta, encontrou teores de 0,308 até 0,554 g/100g para trigonelina, e de 2,08 até 2,68 g/100g para cafeína. Em outro trabalho, analisou amostras de café arábica do Brasil, descrevendo valores de $0,891 \pm 0,001$ g/100g para trigonelina, e de $1,236 \pm 0,010$ g/100g para cafeína; para amostras de café robusta, encontrou teores de $0,616 \pm 0,006$ g/100g para trigonelina, e de $2,083 \pm 0,022$ g/100g para cafeína (CASAL *et al.*, 1998).

NOGUEIRA *et al.* (2002) relata para amostras de café arábica provenientes do estado de São Paulo teores na faixa de 0,57 a 0,78 g/100g para a trigonelina e de 1,00 a 1,25 g/100g para a cafeína.

No geral, constatou-se que a variedade arábica IAPAR 59 apresentou elevado teor de cafeína e baixo teor de 5-ACQ. Encontrou-se também quantidades menores de trigonelina do que as descritas na maioria dos trabalhos, no entanto, DAGLIA *et al.* (1994), que trabalhou em condições cromatográficas semelhantes e utilizou grau de torra também parecido com o empregado nesse estudo, relatou teores bem próximos.

Quanto à espécie conilon, houve maior concordância com as faixas de valores descritos na literatura apesar da provável diferença entre espécies estudadas, devido a menor variabilidade destes compostos nas variedades de *C. canephora*.

Para uma avaliação em conjunto da capacidade de discriminação das variáveis obtidas na metodologia cromatográfica empregou-se ACP e AA. O primeiro ($\lambda_1 \square 2,085$) e segundo componentes ($\lambda_2 \square 0,883$) explicaram em conjunto 99 % da variabilidade dos dados (FIGURA V.24).



	CP1	CP2
Autovalor	2,085	0,883
Variável	CP1	CP2
Trigonelina	-0,991512	-0,014611
5-ACQ	-0,780712	-0,617892
Cafeína	0,701970	-0,707839

FIGURA V.24 - Gráfico e matriz de correlações das variáveis trigonelina, 5-ACQ e cafeína com os Componentes Principais 1 e 2.

Com relação à relevância de cada parâmetro no processo classificatório, a variável mais importante no eixo horizontal e com correlação positiva é a cafeína, indicando que amostras configuradas mais à direita tinham maior teor desse componente. Amostras mais à esquerda apresentavam maior teor de trigonelina e 5-ACQ (correlação negativa). Já no segundo componente principal, todas as variáveis tiveram correlação negativa, sendo as variáveis mais importantes cafeína e 5-ACQ, assim, amostras alocadas mais abaixo possuíam menor teor desses compostos (FIGURA V.24 e V.25-B).

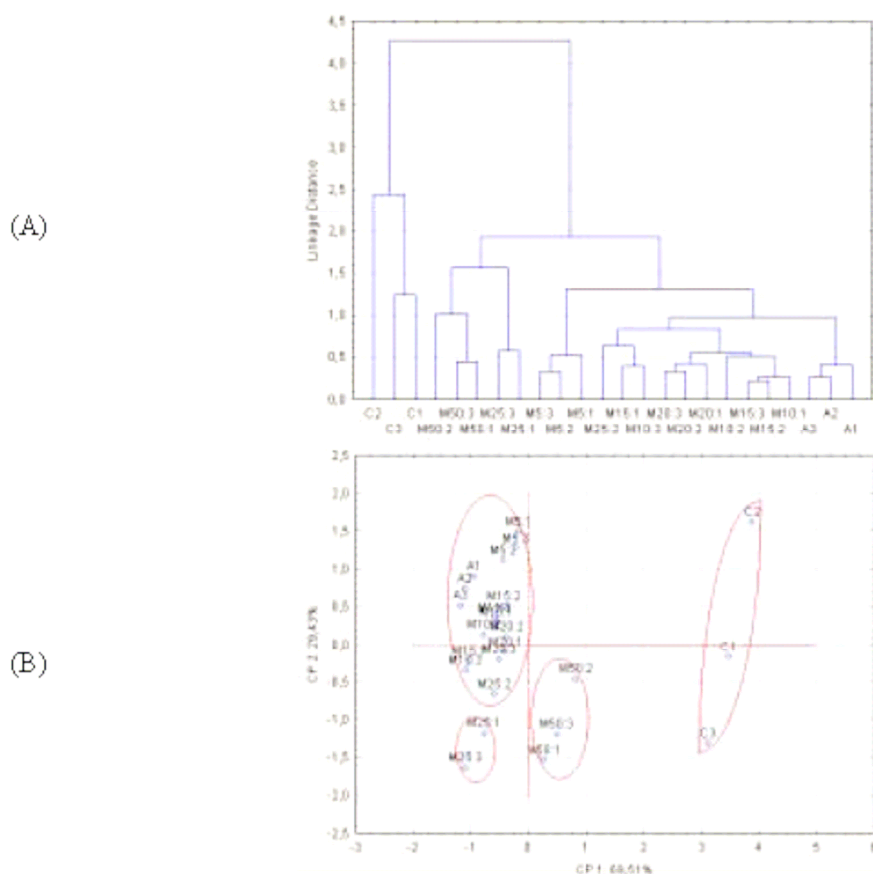


FIGURA V.25 – Dendrograma (A) e Análise de Componentes Principais (CP1 e CP2) (B) a partir dos teores de trigonelina, 5-ACQ e cafeína obtidos no método cromatográfico.

Amostras: 100% arábica IAPAR-59 (A); 100% comilon (C); misturas com 5%(M5), 10% (M10), 15% (M15), 20% (M20), 25% (M25) e 50% (M50) de comilon ao arábica. Números 1, 2 e 3 à frente dos códigos correspondem à análise de três amostras.

Analisando o dendrograma (FIGURA V.25-B) constatou-se que foi possível a separação das amostras em quatro grupos distintos: 1) café conilon, 2) mistura 50%, 3) mistura 25% e 4) o restante das misturas e uma das triplicatas da mistura 25 % juntas com o café arábica. No gráfico de componentes principais (FIGURA V.25-A) pode-se observar no CP1 a separação das amostras de café conilon e misturas 50% das amostras de arábica pura (IAPAR-59) e misturas até 25%. O CP2 permitiu discriminar, de forma menos eficiente, a mistura 25% das amostras de arábica pura e misturas até 20%.

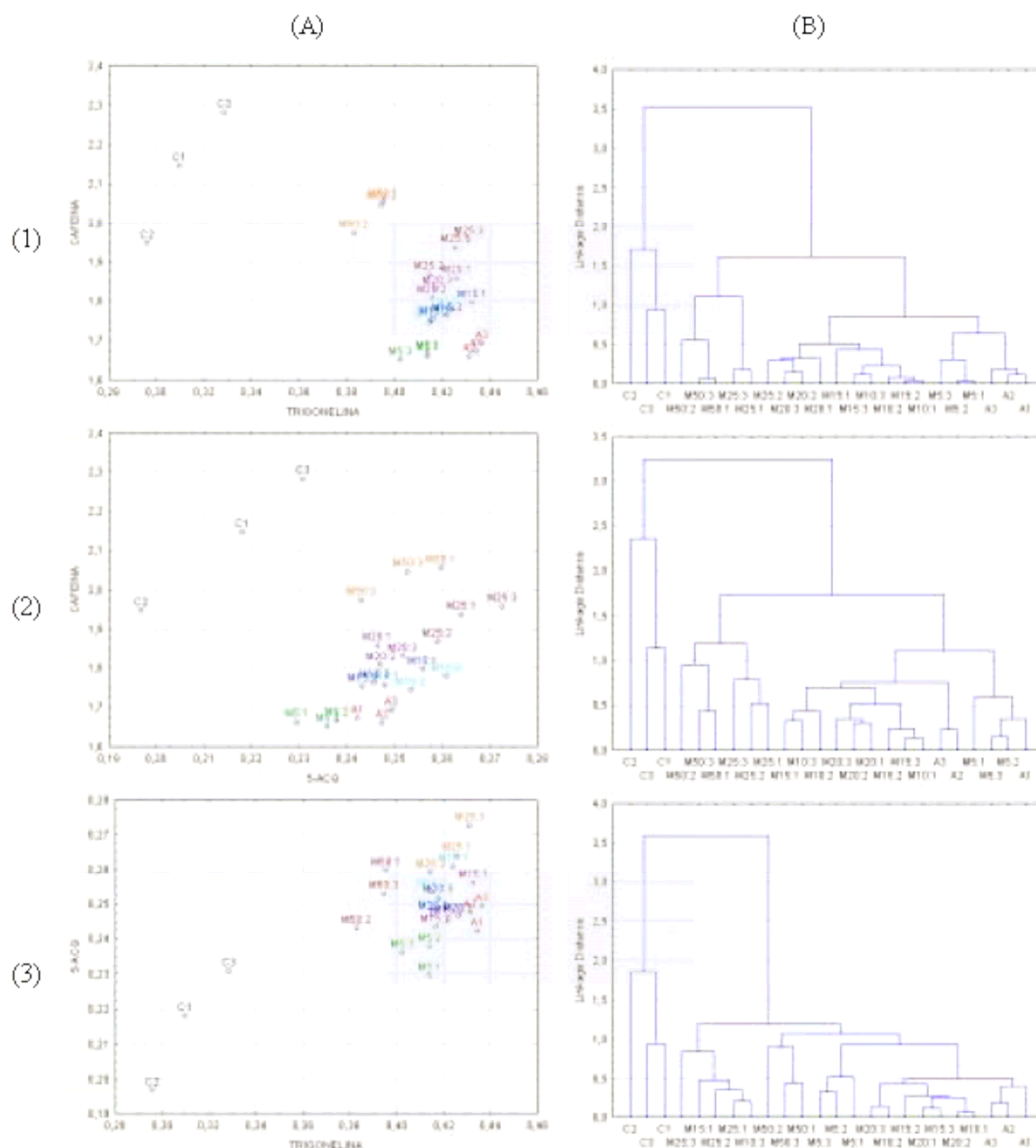


FIGURA V.26 – Relação entre as variáveis (A) e dendrograma(B) a partir dos resultados das reações colorimétricas: cafeína x trigonelina (1), cafeína x 5-ACQ (2) e 5-ACQ x trigonelina (3).

Amostras: 100% arábica IAPAR-59 (A); 100% conilon (C); misturas com 5%(M5), 10% (M10), 15% (M15), 20% (M20), 25% (M25) e 50% (M50) de conilon ao arábica. Números 1, 2 e 3 à frente dos códigos correspondem à análise de três amostras.

Assim, como foi feito para os resultados espectrofotométricos, estudou-se a relação entre as variáveis. Na FIGURA V.26 temos o dendrograma e o

gráfico dos resultados correspondentes, mostrando a boa capacidade de discriminação das três variáveis.

Os resultados mostram que não necessariamente componentes considerados na literatura como bons discriminadores para cada espécie poderiam ser aplicados ao café brasileiro com sucesso, devido a maior amplitude de valores de trigonelina, 5-ACQ e cafeína descritos para as espécies de café, enfatizando a necessidade de se avaliar os parâmetros para as variedades e tipos de torra mais usuais em cada local.

5.4.3 Diferenciação das espécies e misturas de café utilizando parâmetros cromatográficos e espectrofotométricos

Para uma avaliação em conjunto da capacidade de discriminação dos parâmetros obtidos nas metodologia cromatográfica e espectrofotométrica, empregou-se ACP e AA aos parâmetros considerados como melhores discriminadores anteriormente: cafeína, trigonelina, 5-ACQ, KI 630 e HCl 630.

O primeiro ($\lambda_1 = 3,777$) e segundo componentes ($\lambda_2 = 0,896$) explicaram em conjunto 95% da variabilidade dos dados (FIGURA V.27).

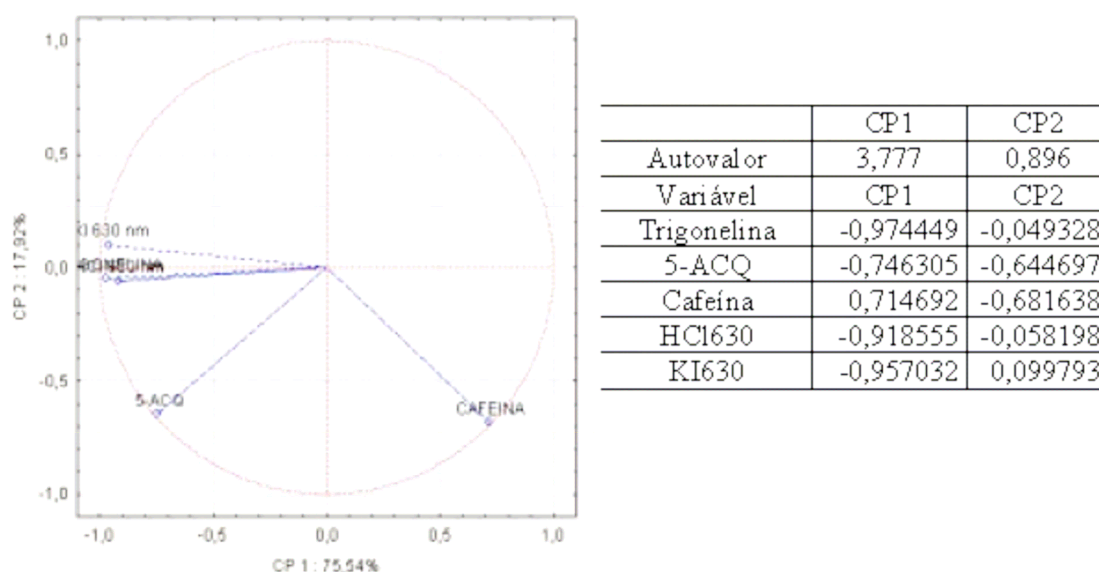


FIGURA V.27 - Gráfico e Matriz de Correlações das variáveis cromatográficas (cafeína, trigonelina e 5-ACQ) e espectrofotométricas (KI 630, HCL 630) com os Componentes Principais 1 e 2.

Com relação à importância de cada variável no processo classificatório, em ordem decrescente de importância no primeiro componente principal, com correlação positiva, cafeína, e com correlação negativa, trigonelina, KI 630, HCL 630 (não apresentando diferença significativa entre si) e 5-ACQ. No segundo componente, temos a cafeína e 5-ACQ como principais variáveis discriminadoras, positivas e sem diferença significativa entre si (FIGURA V.27 e V.28-B).

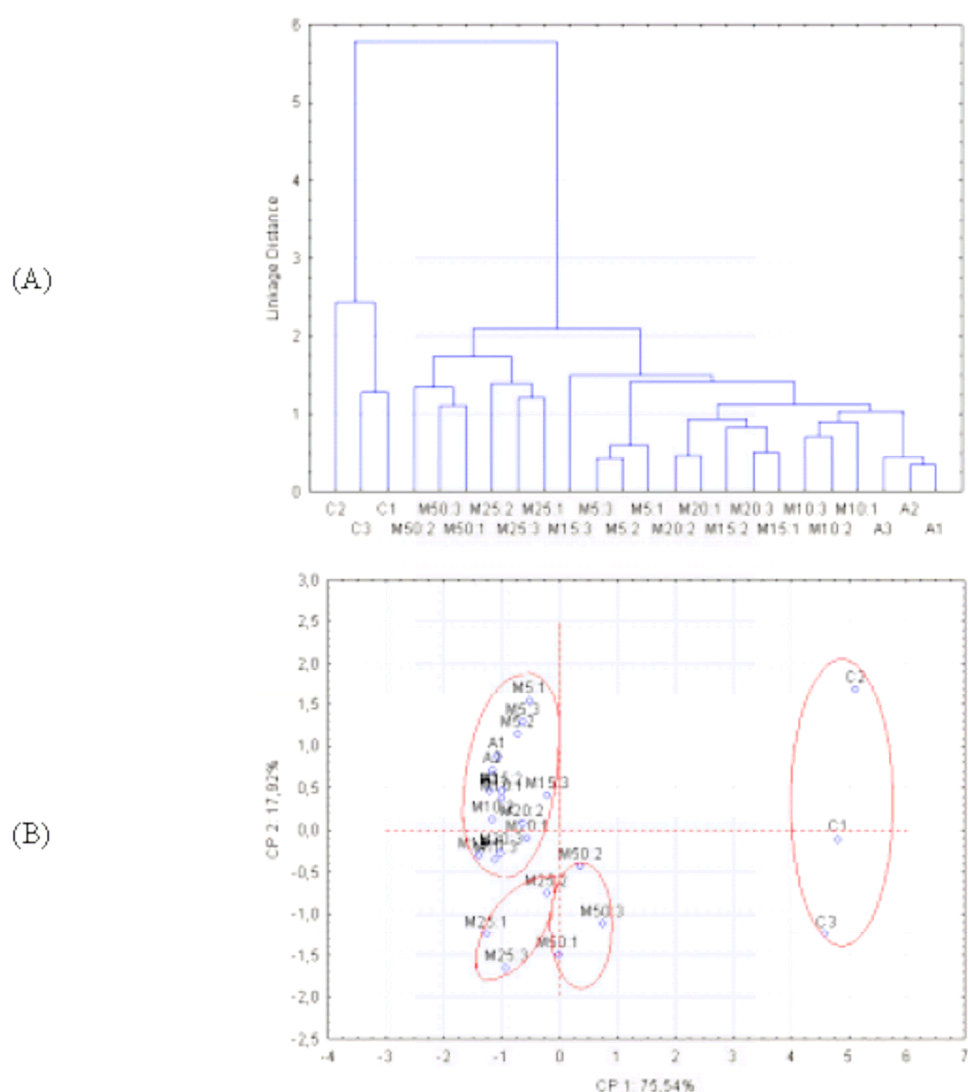


FIGURA V.28 - Dendrograma (A) e Análise de Componentes Principais (CP1 e CP2) (B) a partir de resultados obtidos nos métodos cromatográfico (cafeína, trigonelina e 5-ACQ) e espectrofotométrico (KI 630, HCL 630).

Amostras: 100% arábica IAPAR-59 (A); 100% conilon (C); misturas com 5%(M5), 10% (M10), 15% (M15), 20% (M20), 25% (M25) e 50% (M50) de conilon ao arábica. Números 1, 2 e 3 à frente dos códigos correspondem à análise de três amostras.

Analisando o dendrograma (FIGURA V.28-A) constatou-se a separação das amostras em quatro grupos distintos: 1) café conilon, 2) mistura 50%, 3) mistura 25 % e 4) o restante das misturas juntas com o café arábica. No gráfico de componentes principais (FIGURA V.28-B) obteve-se no CP1 a discriminação das

amostras de café conilon e misturas 50% das amostras de arábica pura (IAPAR-59) e misturas até 25%. O CP2 permitiu discriminar, a mistura 25% das amostras de arábica pura e misturas até 20%. Pode-se observar que a introdução das variáveis do método espectrofotométrico melhorou a discriminação.

6 CONCLUSÃO

O método espectrofotométrico desenvolvido mostrou-se eficiente e robusto, minimizando tempo e custos da análise, e permitindo a discriminação entre as espécies e variedades estudadas. Os resultados indicam que a técnica poderia ser utilizada como método de triagem na identificação da adição de café conilon ao arábica.

O método cromatográfico desenvolvido e validado, utilizando fase reversa e eluição por gradiente de ácido acético e acetonitrila, mostrou-se bastante eficaz e eficiente permitindo a separação e quantificação simultânea de trigonelina, 5-ACQ e cafeína. A metodologia permite, ainda, a separação e detecção dos ácidos nicotínico, caféico, cumárico e ferúlico.

A avaliação dos resultados obtidos nas metodologias espectrofotométrica e cromatográfica utilizando estatística multivariada (Análise de Componentes Principais e Análise de Agrupamentos) permitiu a separação entre cafés conilon e arábica IAPAR-59 e misturas acima de 25%. Para misturas com 25% ou menos de café conilon possivelmente outras variáveis devem ser consideradas para melhorar a discriminação. O método proposto mostrou-se eficiente na discriminação das variedades de arábica mais plantadas no Brasil, minimizando tempo e custos da análise e possibilitando seu uso como método de rotina para diferenciação de café torrado arábica (*C. arabica*) e conilon (*C. canephora*) e misturas.

7 SUJESTÃO PARA PROJETO FUTURO

Neste trabalho foi dada uma contribuição inicial à diferenciação das variedades de café, onde se verificou a viabilidade do uso das metodologias propostas.

Para o método espectrofotométrico, o emprego de um padrão comercial de cafeol permitiria trabalhar com a metodologia de forma quantitativa. Outro ponto interessante, seria a avaliação do impacto da presença de impurezas na eficiência do método.

A partir de todo trabalho realizado até o momento, avalia-se que a metodologia desenvolvida para diferenciação das espécies de café precisa ser estudada para as diferentes condições de torras, padronizando-se as medidas de cor e avaliando-se a possibilidade de introdução de outras variáveis. Outra sugestão é a avaliação de amostras de diferentes processamentos pós-colheita (secagem via úmida e seca, café despulpado).

REFERÊNCIAS

ABNT NBR 14029 - Validação de metodologia analítica para análise de teor de ingrediente ativo em produtos técnicos e formulações de agrotóxicos. 5 p., 1998.

ACHEIBEM Disponível em: <<http://www.acheibem.com.br/cafe.htm>>. Acesso em julho de 2002.

AGROFOOD - Importação e Exportação. Disponível em: <<http://www.agrofoodjmg.com/br>>. Acesso em maio de 2003.

AMBONI, R. D. M. C.; DE FRANCISCO, A.; TEIXEIRA, E. Utilização de microscopia eletrônica de varredura para detecção de fraudes em café torrado e moído. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 3, p.311-313, 1999.

ANDRADE, P. B.; LEITAO, R.; SEABRA, R. M.; OLIVEIRA, M. B.; FERREIRA, M. A. 3,4-Dimethoxycinnamic acid levels as a tool for differentiation of *Coffea canephora* var. robusta and *Coffea Arábica*. **Food Chemistry**, Oxford, v. 61, n. 4, p. 511-514, 1998.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis**. 16. ed. Washington: AOAC, cap. 30, p. 4-5, 1995.

ASSAD, E. D.; SANO, E. E.; CUNHA, S. A. R.; CORREA, T. B. S.; RODRIGUES, H. R.. 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.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso dia 15 de dezembro de 2003.

BICCHI, C. P.; BINELLO, A. E.; PELLEGRINO, G. M.; VANNI, A. C. Characterization of green and roasted coffees through the chlorogenic acid fraction by HPLC-UV and principal component analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.43, n.6, p. 1549-1555, 1995.

BISPO, M. S.; VELOSO, M. C. C.; PINHEIRO, H. L. C. ; OLIVEIRA, R. F. S.; REIS, J.; ANDRADE, J. B. Simultaneous determination of caffeine, theobromine, and theophylline by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, Niles, v.40, n. 1, p. 45-48, 2002.

BLAUCH, J. L.; TARKA, S. M. HPLC determination of caffeine and theobromine in coffee, tea and instant hot cocoa mixes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, n. 3, p.745-747, 1983.

BORGES, M. L. A.; FRANÇA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; CORRÊA, P. C.; GLORIA, M. B. A. Estudo da variação da coloração de café arábica durante a torra em diferentes condições de aquecimento. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, n 5, p. 3-8, 2002.

BORRELLI, R.C.; VISCONTI, A.; MENNELLA, C.; ANESE, M.; FOGLIANO, V. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. **Journal-of-Agriculturaland- Food-Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6527-6533, 2002.

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

BRIANDET, R.; KEMSLEY, E. K.; WILSON, R. H. Discrimination of Arábica and Robusta in instant coffee by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.44, n.1, p. 170-174, 1996.

CAFÉ ALVORADA S.A. Disponível em: <<http://www.cafealvorada.com.br/>>. Acesso em julho de 2002.

CAFÉ BEIRA RIO. Disponível em: <<http://members.tripod.com/~cafebrio/>>. Acesso em maio de 2003.

CAFÉ DO SÍTIO. Disponível em: <<http://www.cafedositio.com.br/>>. Acesso em maio de 2003.

CAFÉ PIMPINELA. Disponível em: <<http://www.pimpinela.com.br/>>. Acesso em maio de 2003.

CAFÉ SANTA CLARA. Disponível em: <<http://www.santaclara.com.br/>>. Acesso em maio de 2003.

CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F.. Teor de cafeína em cafés brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 421-424, 1998.

CANÇADO, O. H. A problemática do café. Disponível em: <<http://www.fpaa.com.br/FPAAartigos13.htm>>. Acesso em janeiro de 2004.

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

CARVALHO, L. M.; SILVA, E. A. M.; AZEVEDO, A. A.; MOSQUIM, P. R.; CECON, P. R. Aspectos morfofisiológicos dos cultivares de cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 411-416, 2001

CARRERA, F.; LEON-CAMACHO, M.; PABLOS, F.; GONZALEZ, A. G. Authentication of green coffee varieties according to their sterolic profile. **Analytica Chimica Acta**, New York, v.370, n.2/3, p. 131-139, 1998.

CASAL, S.; OLIVEIRA, B.; FERREIRA, M. A.. Development of an HPLC/diode-array detector method for simultaneous determination of trigonelline, nicotinic acid and

caffeine in coffee. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, NEW YORK, v. 21, n. 20, p. 3187-3195, 1998.

CASAL, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; ALVES, M. R.; FERREIRA, M. A.. Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.48, n.8, p. 3420-3424, 2000.

CHAMBEL, P.; OLIVEIRA, M. B.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; FERREIRA, M. A. Development of an HPLC/diode-array detector method for simultaneous determination of 5- HMF, furfural, 5-o-caffeoylquinic acid and caffeine in coffee. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, New York, v. 20, n. 18, p. 2949-2957, 1997.

COFFEEBREAK A cafeicultura no Brasil: diversidade é principal característica -. disponível em <<http://www.coffeebreak.com.br/assinantes/..locafezal.asp?SE=6&ID=34>>. Acessado em 26 de novembro de 2003^a

COFFEEBREAK. Espécies e variedades: características influenciam escolha - disponível em <<http://www.coffeebreak.com.br/assinantes/..locafezal.asp?SE=3&ID=16>>. Acessado em 26 de novembro de 2003^b

COFFEE RESEARCH INSTITUTE. Disponível em: <<http://www.coffeeresearch.org/>>. Acesso em julho de 2004.

COLORPRO . Munsell Conversion versão 4.01. Disponível em : <www.colorpro.com/info/software/munsell.htm>. Acesso em 12 de abril de 2002.

DAGLIA, M.; CUZZONI, M. T.; DACARRO, C. Antibacterial activity of coffee: relationship between biological activity and chemical markers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 42, n. 10, p. 2273-2277, 1994.

DOWNEY, G.; BOUSSION, J. Authentication of coffee bean variety by near-infrared reflectance spectroscopy of dried extract. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Avenel, v. 71, n. 1, p. 41-49, 1996.

FAS Foreign Agricultural Service-United States Department of Agriculture. Disponível em <<http://www.fas.usda.gov/http/tropical/2001/12%2D01/dectoc.htm>>. Acesso em outubro de 2003.

FISCHER, M.; REIMANN, S.; TROVATO, V.; REDGWEL, R. J. Polysaccharides of green Arabica and Robusta coffee beans. **Carbohydrate Research**, New York, v. 330, n. 1, p. 93. 101, 2001.

FRANCOTTE, E.; DAVATZ, A.; RICHERT, R. Development and validation of chiral high performance liquid chromatography methods for the quantitation of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester. **Journal of Chromatography B**, New York, v.686, n. 1, p.77- 83, 1996.

GONZÁLEZ, A. G.; PABLOS, F.; MARTÍN, M. J.; LEÓN-CAMACHO, M.; VALDENEBRO, M. S. HPLC analysis of tocopherols and triglycerides in coffee and their use as authentication parameters. **Food Chemistry**, Oxford, v. 73, n. 1, p. 93-101, 2001.

HENSHALL, A. Liquid chromatographic techniques for detecting economic adulteration of foods. **Cereals Foods World**, St. Cloud, v. 43, n. 2, p. 98-103, 1999.

IAC. Disponível em <<http://www.iac.sp.gov.br>>. Acesso em outubro de 2003.

IAPAR. Disponível em <<http://www.pr.gov.br/iapar/cafes/iapar59.html>>. Acesso em outubro de 2003.

KAMM, W.; DIONISI, F.; FAY, L. B.; HISCENHUBER, C.; SCHMARR, H. G.; ENGEL, K.H.. Rapid and simultaneous analysis of 16- o-methylcafestol and sterols as markers for assessment of green coffee bean authenticity by on .line LC-GC. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 79, n. 11, p. 1109-1113, 2002.

KY, C.-L.; LOUARN, J.; DUSSERT, S.; GUYOT, B.; HAMON, S.; NOIROT, M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. **Food Chemistry**, Oxford, v. 75, n.2, p. 223-230, 2001.

KURZROCK, T.; SPEER, K.. Diterpenes and Diterpene Esters in Coffee. **Food Reviews International**, New York, v. 17, n. 4, p. 433-450, 2001.

LABORATOIRE DE BORDEAUX Différenciation entre Arabica et Robusta dans les cafés moulus a partir de leur composition chimique. Disponível em <http://www.finances.gouv.fr/DGCCRF/activites/labos/2000/cafes.htm> . Acessado em outubro de 2003.

LAGO, R. C. A. Lipídios em grãos. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 319-340, 2001.

LELOUP, V.; LOUVRIER, A.; LIARDON, R. Degradation Mechanisms of Chlorogenic Acids During Roasting. In: International Scientific Colloquium on Coffee (ASIC), 16., 1995, Kyoto. **Proceedings...** Kyoto, 1995,p. 192-198.

LOPES, L. M. V.; PEREIRA, R. G. F. A.; MENDES, A. N. G.; EVÓDIO F. V., V. D. C. Avaliação da qualidade de grãos de diferentes cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, ESPECIAL, n.1, p.3-8, 2000.

MARTIN, M. J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A. G. Discrimination between arabica and robusta green coffee varieties according to their chemical composition. **Talanta**, London, v. 46, p. 1259-1264, 1998.

MARTIN, M. J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A.G. Characterization of arabica and robusta roasted coffee varieties and mixture resolution according to their metal content. **Food Chemistry**, Oxford, v.66, n.6, p. 365-370, 1999.

MATIELLO, J. B. A cafeicultura no Brasil: diversidade é principal característica. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/o cafezal.asp?SE=6&ID=34>>. Acesso em janeiro de 2004.

MAZZAFERA, P. Trigonelline in coffee. **Phytochemistry**, New York, v. 30, n. 7, p.2309- 2310, 1991.

MELITTA . Disponível em: <<http://www.melitta.com.br/>>. Acesso em maio de 2003.

MELLO, E.V. DE; BARROS, U.V.; GARÇON, C.L.P.; D'ALESSANDRO, S. C. Avaliação da qualidade organoléptica e classificação de linhagens de Coffea arabica. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 27., 2001, Uberaba. **Anais...** Rio de Janeiro, 2001, p. 56-57.

MENDES, L. C. **Otimização do processo de torração do café robusta (Coffea canephora Conillon) para formulação de blends com café arábica (Coffea arábica)**. 1999. 101p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) . Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas..

MENDES, L.C.; MENEZES, H.C.; DA SILVA, M.A. Optimization of the roasting of robusta coffee (C. canephora conilon) using acceptability tests and RSM. **Food Quality and Preference**, New York, v.12, n. 2, p. 153-162,. 2001.

MONTEIRO, M. A. M.; CHAVES, J. B. P.; MINIM, V. P. R.; SILVA, P. H. A. , STRINGHETA, P. C. Efeito do tipo de torra sobre o teor de compostos fenólicos e a cor dos grãos de café. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, Vol. Especial Café, n.5, p.55- 59, 2002.

MORAES, R. C. DE P.; TRUGO, L. C. Efeito da torrefação e da granulometria na composição química do café. In: Simpósio Brasileiro de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2., 2001, Vitória. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, 2001. p. 1511-1517. (CD-ROM).

NOGUEIRA, G. C.; BAGGIO, S. R.; BRAGAGNOLO, N.; MORAES, R. M.; MORI, E. E. M. Otimização da metodologia para determinação simultânea de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico em café utilizando HPLC com coluna de permeação em gel. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 1., 2000, Poços de Caldas. **Anais...** Brasília: Embrapa Café; Belo Horizonte : Minasplan, 2000, 2v., p. 646-649.

NOGUEIRA, M.; TRUGO, L. C. Distribuição de isômeros do ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas: v.23, n.2, p.296 - 299, 2003.

PEREIRA, R. G. F. A.; LOPES, M. V.; CORREIA, M. A, MENDES, A. N. G. Avaliação da qualidade sensorial de 15 linhagens de café (Coffea arabica L.) cultivadas na

região sul de Minas Gerais. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 1., 2000, Poços de Caldas. **Anais...** Brasília: Embrapa Café; Belo Horizonte : Minasplan, 2000, 2v., p. 641-642.

OLIVEIRA, A. P. V.; FRASSON, K.; YAMASHITA, F.; BENASSI, M. T. Medida instrumental de cor em sobremesas lácteas de chocolate: uma técnica de baixo custo e versátil utilizando câmara digital. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v.6, n.2, p. 191- 196, 2003.

SACHS, L.G.; PORTUGUAL, A.P.; PRUDENCIO-FERREIRA, S.H.; FELINTO, A.S. Conversor em cor média RGB para imagens BMP. Disponível em: <www.fflam.br>. Acesso em 15 de maio de 2002.

SECRETARIA DO ESTADO DO GOVERNO DO PARANÁ. Disponível em : <<http://www.pr.gov.br/seeg/legislacao2.html>.> Acesso em 25 de setembro de 2002.

SIOTANI, M. Modern Multivariate Statistical Analysis - A Graduate Course and Handbook American Sciences Press, 1985.

SOLOMONS, T. W. G. **Química Orgânica - vol. 1**. 6° ed. Rio de Janeiro: Editora Livros Técnicos e Científicos S.A., 1996. p. 340-351.

SPEER, K.; TEWIS, R.; MONTAG, A. 16-o-methylcafestol a quality indicator for coffee. In: International Scientific Colloquium on Coffee (ASIC), 14., 1991, San Francisco. **Proceedings...** San Francisco, 1991, p. 237-244.

STATSOFT. **STATISTICA for Windows – Computer program manual**. Versão 6.0 Tulsa:Statsoft Inc. 2001.

TZOUROS, N. E.; ARVANITOYANNIS, I. S. Quality control methods for the authentication of foods and application of chemometrics for the classification of foods according to their variety or geographical origin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v. 41, n. 4, p. 287-319, 2001.

TRUGO, L. C.; MOREIRA, R.F.A.; DE MARIA, C. A. B. Componentes voláteis do café torrado. Parte I: Compostos heterocíclicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 255-263, 1999.

TRUGO, L. C.; MOREIRA, R.F.A.; DE MARIA, C. A. B. Componentes voláteis do café torrado. Parte II: Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 195-203, 2000.

TRUGO, L. C.. Café: Composição Química e Potencial Nutracêutico. In: MERCADANTE, A. Z.; BOBBIO, F. O. BOOBIO, P. A.; PEREIRA, J. L.; PASTORE, G. M.. **Ciência de Alimentos: Avanços e Perspectivas**, Campinas, v. 2, 2001, p. 206-208.

URGERT, R.; VAN DER WEG, G.; KOSMEIJER-SCHUIL, T. G.; VAN DE BOVENKAMP, P.; HOVENIER, R.; KATAN, M.B.. Levels of the cholesterol-elevating

diterpenes cafestol and kahweol in various coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 43, n. 8, p. 2167-2172, 1995.

VILAS BOAS, B. M.; LICCIARDI, R.; MORAIS, A. R.; CARVALHO, V. D.. Seleção de extratores e tempo de extração para determinação de açúcares em café torrado. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.5, p. 1169-1173, 2001.

VITORINO, M.D.; FRANÇA, A.S. Variação de características físicas e químicas de café durante a torra. In: Simpósio Brasileiro de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2., 2001, Vitória. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, 2001, p. 1588-1604. (CD-ROM).

VITORINO, M.D.; FRANÇA, A.S.; OLIVEIRA, L.S.; BORGES, M.L. Metodologias de obtenção de extrato de café visando à dosagem de compostos não-voláteis. **Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, Vol. Especial Café, n. 3, p. 17-24, 2001.

VOGEL, A. **Análise Inorgânica Quantitativa**. 4° ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1981. p. 275-281.

WURZIGER, J. Kaffeecoel und Roestkaffeequalitaet. **Fette Seifen Anstrichmittel**; v. 87, n. 2, p. 82-87, 1985.

WURZIGER, J., DREWS, R., BUNDEDESEN, G. Uber Arabusta Roh- und Rostkoffee. In:Colloque International sur le Café, 8., 1977, Abidjan. **Proceedings...** Paris, p. 101-108, 1979.

WURZIGER, J. Evaluation of raw coffee type and processing method, on the basis of the diterpenes in coffee oils. **Fette Seifen Anstrichmittel.**; v. 79, n. 8: p.334-339; 1977.

WURZIGER, J; VINCENT, J C. Ueber Farbreaktionen mit Arabica-, Robusta- und Arabusta- Rohkaffees. In: International Colloquium on the Chemistry of Coffee, 7., 1976. **Proceedings...** p. 523-530, 1976.

APÊNDICES

APÊNDICE A - ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA DOS RESULTADOS OBTIDOS PELAS REAÇÕES COLORIMÉTRICAS COM MISTURA DE CAFÉ ARÁBICA DE DIFERENTES VARIEDADES E CONILON

APENDICE A1 – Análise de misturas de café conilon e arábica variedade Acaia.

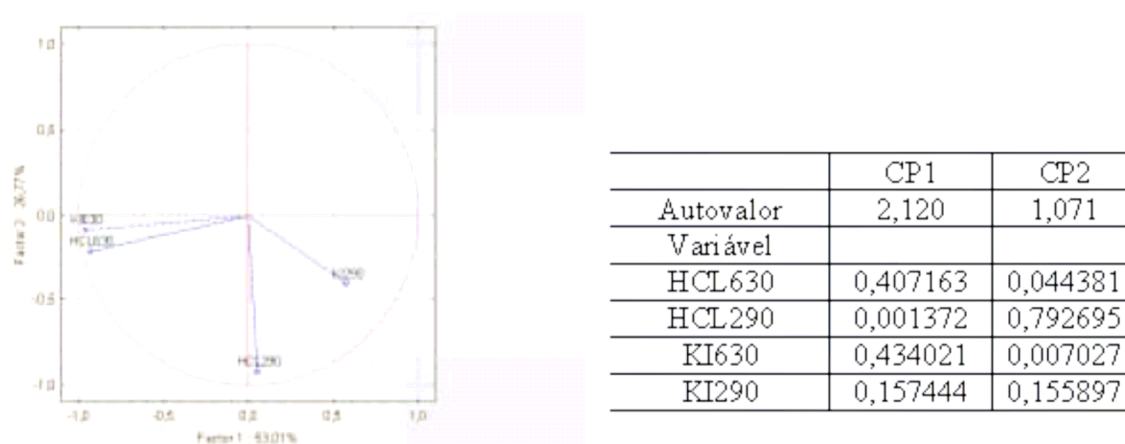


FIGURA 1 - Gráfico e matriz de correlações das variáveis espectrofotométricas com os Componentes Principais 1 e 2 para misturas de café conilon e arábica variedade Acaia.

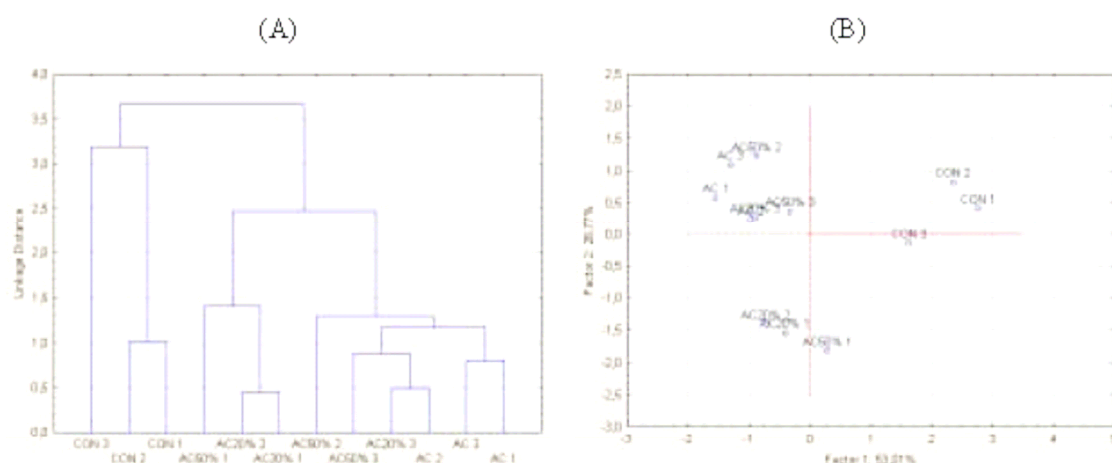
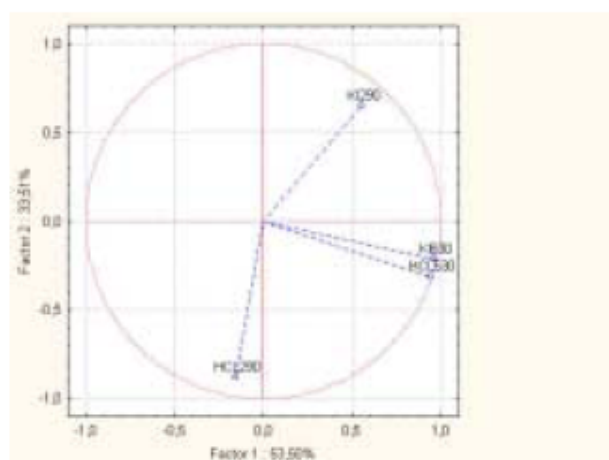


FIGURA 2 - Dendrograma (A) e Análise de Componentes Principais (CP1 e CP2) (B) a partir dos resultados do método espectrofotométrico (HCl e KI a 630 e 290 nm). Amostras: 100% arábica Acaia (AC); 100% conilon (CON); 20% (AC20%) e 50% (AC50%) de conilon ao arábica Acaia. Números 1, 2 e 3 à frente dos códigos correspondem à análise de três amostras.

APENDICE A2 – Análise de misturas de café conilon e arábica variedade Catuaí.



	CP1	CP2
Autovalor	2,140	1,341
Variável		
HCL630	0,413364	0,073192
HCL290	0,011795	0,577185
KI630	0,430937	0,034304
KI290	0,143904	0,315319

FIGURA 1 - Gráfico e matriz de correlações das variáveis espectrofotométricas com os Componentes Principais 1 e 2 para misturas de café conilon e arábica variedade Catuaí.

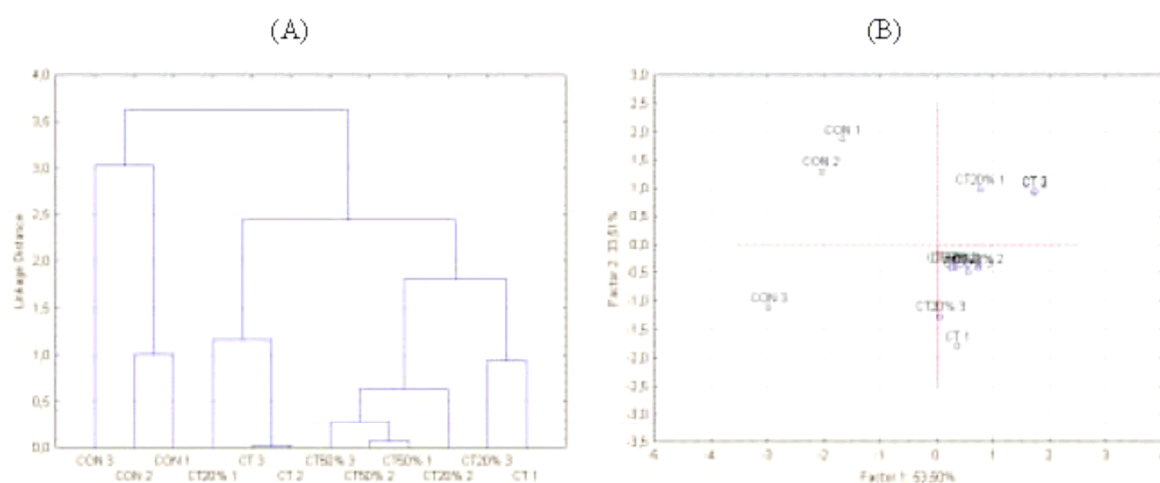


FIGURA 2 - Dendrograma (A) e Análise de Componentes Principais (CP1 e CP2) (B) a partir dos resultados do método espectrofotométrico (HCl e KI a 630 e 290 nm). Amostras: 100% arábica Catuaí (CT); 100% conilon (CON); 20% (CT20%) e 50% (CT50%) de conilon ao arábica Catuaí. Números 1, 2 e 3 à frente dos códigos correspondem à análise de três amostras.

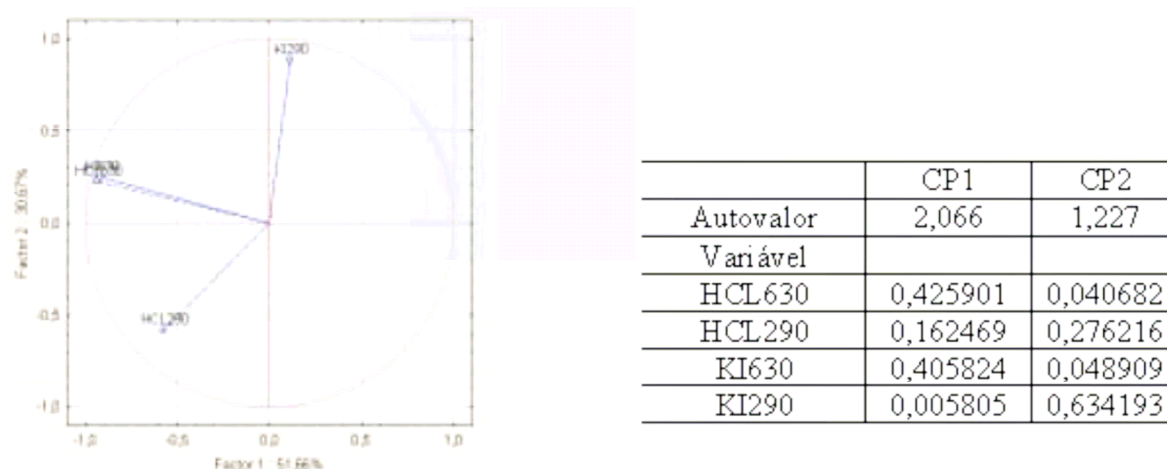
APENDICE A3 – Análise de misturas de café conilon e arabica variedade Mundo Novo


FIGURA 1 - Gráfico e matriz de correlações das variáveis espectrofotométricas com os Componentes Principais 1 e 2 para misturas de café conilon e arabica variedade Mundo Novo.

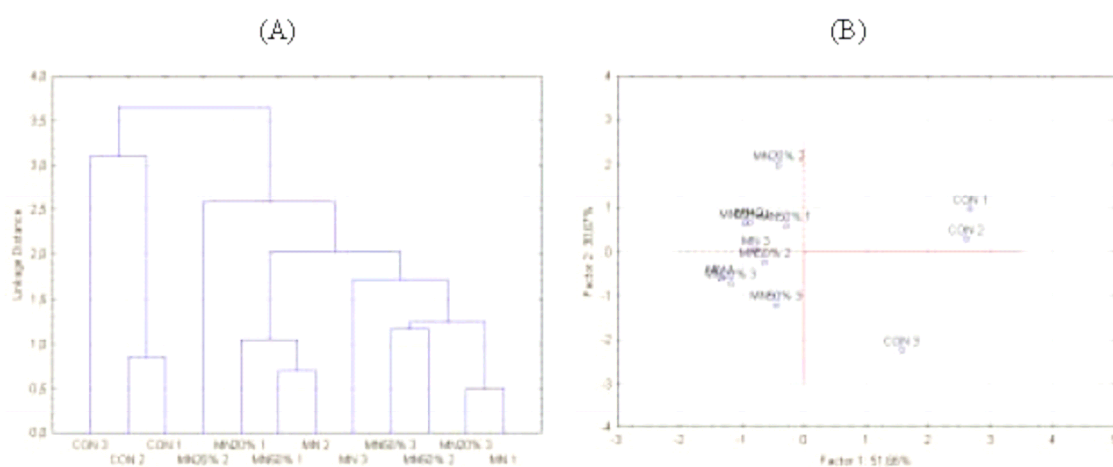


FIGURA 2 - Dendrograma (A) e Análise de Componentes Principais (CP1 e CP2) (B) a partir dos resultados do método espectrofotométrico (HCL e KI a 630 e 290 nm). Amostras: 100% arábica Mundo Novo (MN); 100% conilon (CON); 20% (MN20%) e 50% (MN50%) de conilon ao arábica Mundo Novo. Números 1, 2 e 3 à frente dos códigos correspondem à análise de três amostras.

ANEXOS

**ANEXO - LEI Nº 13519 da Legislação Estadual da Secretária do
Estado do Governo - 08/04/2002**

Publicado no Diário Oficial Nº 6205 de 09/04/2002

Estabelece obrigatoriedade de informação, conforme especifica, nos rótulos de embalagens de café comercializado no Paraná.

A Assembléia Legislativa do Estado do Paraná decretou e eu sanciono a seguinte lei:

Art. 1º. Fica estabelecida a obrigatoriedade de informação, nos rótulos das embalagens de café comercializado no Paraná, da percentagem de cada espécie vegetal de que se compõe o produto.

§ 1º. O produto comercializado no Paraná com o nome de café, independentemente de sua apresentação, somente poderá ser produzido a partir de grãos de espécies vegetais do gênero *Coffea*.

§ 2º. Nos casos em que se utilizarem grãos de plantas híbridas de diferentes espécies do gênero *Coffea*, especificar-se-á no rótulo do produto a participação percentual do híbrido.

Art. 2º. As disposições desta lei aplicam-se ao café torrado em grão, ao café torrado moído, ao café solúvel e a todas as demais formas em que o café, destinado ao consumo humano, puro ou em mistura com outros produtos alimentícios, seja comercializados no Brasil.

Art. 3º. Para os efeitos desta lei, adotam-se as seguintes definições:

I – Café Torrado em Grão: é o endosperma beneficiado do fruto maduro de uma ou mais espécies do gênero *Coffea*, submetido a tratamento térmico adequado, até atingir o ponto de torra escolhido;

II – Café Torrado Moído: é o Café Torrado em Grão submetido a adequado processo de moagem;

III – Café Solúvel: é o produto resultante da desidratação do extrato aquoso obtido exclusivamente do café torrado, através de métodos físicos, utilizando água como único agente extrator;

IV – Para os efeitos desta lei, entende-se por espécies do gênero *Coffea* as espécies "*Coffea* Arábica" e "*Coffea* Canephora";

a) a espécie *Canephora* será referida no rótulo de acordo com as variedades conhecidas como "*Robusta*" ou "*Conillon*".

b) A espécie *Arábica* será referida no rótulo com este próprio nome.

Art. 4º. O regulamento desta lei estabelecerá, entre outros aspectos, os requisitos relativos a características sensoriais, físicas, químicas e microbiológicas, acondicionamento e higiene, os teores máximos de impurezas ou contaminantes admitidos, os planos de amostragem e os métodos de análise a serem observados.

Art. 5º. Constará das embalagens de todo o café comercializado no Paraná um selo da qualidade emitido pela produção, através da Associação Paranaense de Cafeicultores – APAC, com a fiscalização da EMATER-Paraná e aprovação técnica, através de laudo laboratorial a ser fornecido pelo Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR.

Art. 6º. Esta Lei entrará em vigor 90 dias após a data de sua publicação, revogadas as disposições em contrário.

PALÁCIO DO GOVERNO EM CURITIBA, em 08 de abril de 2002.

Jaime Lerner

Governador do Estado

Deni Lineu Schwartz

Secretário de Estado da Agricultura e do Abastecimento

Miguel Salomão

Secretário de Estado da Indústria, do Comércio e do Turismo, em exercício

José Cid Campêlo Filho

Secretário de Estado do Governo