



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELIS DAIANE PAULI

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO DE ADULTERANTES EM CAFÉ
EMPREGANDO HPAEC-PAD E QUIMIOMETRIA**

ELIS DAIANE PAULI

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO DE ADULTERANTES EM CAFÉ
EMPREGANDO HPAEC-PAD E QUIMIOMETRIA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Suzana Lucy
Nixdorf Co-Orientadora: Profa. Dra. Ieda
Spacino Scarminio

Londrina
2010

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P327d Pauli, Elis Daiane.
Desenvolvimento de metodologia para determinação de adulterantes em café empregando HPAEC-PAD e quimiometria / Elis Daiane Pauli. – Londrina, 2010. 116 f. : il.

Orientador: Suzana Lucy Nixdorf.

Co-orientador: Ieda Spacino Scarminio.

Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química dos Recursos Naturais, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica – Teses. 2. Café – Adulteração e inspeção – Teses. 3. Quimiometria – Teses. I. Nixdorf, Suzana Lucy. II. Scarminio, Ieda Spacino. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química dos Recursos Naturais. IV. Título.

CDU 543

ELIS DAIANE PAULI

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO
DE ADULTERANTES EM CAFÉ EMPREGANDO HPAEC-PAD E
QUIMIOMETRIA**

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf (Depto. de Química/Laboratório DIA/UEL)

Prof. Dr. Nilson Evelázio de Souza (Depto. de Química/UEM)

Dr. Juliano Smanioto Barin (Depto. de Ciência de Alimentos/UFSM)

Londrina, 04 de Fevereiro de 2010.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus simplesmente por tudo.

A orientadora e amiga Prof^a. Dr^a. Suzana Lucy Nixdorf pelo conhecimento repassado. Obrigada pelo carinho, paciência, atenção e confiança em mim depositada.

A co-orientadora Prof^a. Dr^a. Ieda Spacino Scarminio pelos conhecimentos transmitidos, sem os quais, este trabalho não poderia ter sido desenvolvido.

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

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial a Prof^a. Dra. Marta de Toledo Benassi pela disponibilidade dos equipamentos de análise de cor e umidade, por ceder amostras de cafés torrado e moídos comercializadas na região de Londrina analisadas na Dissertação da aluna Romilaine M. N. de Souza, e por toda a atenção a mim dispensada.

À Companhia Cacique de Café Solúvel, nas pessoas do Sr. Valderi Cristiano, Sr. Edénir José Gualtieri e Sr. Silvio Victorino, por disponibilizarem as amostras de café e efetuarem a torrefação de outras matrizes.

A Cooperativa Agroindustrial COROL pelas amostras de milho, soja e trigo disponibilizadas.

Ao Centro do Comércio do Café Norte Paraná pela amostra de cascas de café.

A ABIC - Associação Brasileira da Indústria de Café, nas pessoas do Sr. Nathan Herszkowicz - Presidente Executivo da ABIC, Sr. Fernando Giachini Lopes do Instituto TOTUM - Responsável Selo de Pureza ABIC - Divisão Sustentabilidade e Selos, a Sra. Mônica Pinto - Coordenadora de Projetos da ABIC e Sr^a. Celina Almeida - Consultora do Instituto TOTUM, por acreditarem no nosso

trabalho, fornecendo as amostras comerciais adulteradas, analisadas por microscopia.

A professora Dr^a. Andréa Diniz pelos conselhos, nos momentos certos.

Ao professor Carlos Alberto Paulinetti da Camara pela grande ajuda.

Ao meu namorado, Rubinho, por não poupar esforços, pelo amor e principalmente pela infinita compreensão.

Aos meus pais, Valécio e Beatriz, pelo amor e incentivo, por acreditarem em meus sonhos e jamais medirem esforços para que eu os realizasse.

Aos meus irmãos pelo amor e amizade sincera.

Aos amigos Diego Soares Domingues e Franciele Barbieri pela disponibilidade, ajuda e amizade.

Aos amigos de laboratório Estéfano Nakamura, Francys William Massura, Jaqueline Tobias de Moraes, João Pereira dos Santos, Julia Estéfane Martins de Abreu, Patrícia Salomão Garcia e Matheus Sampaio Goveia pelo companheirismo.

Aos professores, funcionários e amigos do Departamento de Química, pelos ensinamentos, convivência e por trilharem junto comigo esta etapa importante da minha vida.

PAULI, E. D. **Desenvolvimento de metodologia para determinação de adulterantes em café empregando HPAEC-PAD e quimiometria.** 2010, 116fl. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

A detecção de impurezas em amostras de café torrado e moído é uma preocupação constante, principalmente para verificar a ocorrência de fraudes. A análise dos carboidratos é importante neste quesito, já que a variação nos constituintes originais das diferentes matrizes pode ser capaz de revelar a composição final do produto, ou seja, se o mesmo está puro ou foi adulterado, e em que proporção esta adulteração ocorreu, em função da proporção de cada um dos mono, oligo ou polissacarídeos. Deste modo, realizou-se, neste trabalho, um estudo para avaliar a qualidade através da concentração dos carboidratos totais de um café arábica torrado e moído. Métodos quimiométricos foram empregados para verificar um padrão de adulteração por soja, trigo, milho, café conilon, cascas e paus de café pela mistura de diferentes proporções destes contaminantes ao café, seguindo planejamento estatístico de misturas do tipo centróide simplex empregando: (café arábica*soja*trigo); (café arábica*soja*milho); (café arábica*milho*trigo); (café arábica*cascas de café*café conilon); (café arábica*cascas de café*paus de café) e (café arábica*café conilon*paus de café) utilizando a técnica de HPAEC-PAD. Concluiu-se que o método mostrou-se eficiente na distinção das diferentes matrizes. Para o café, os 2 monossacarídeos característicos da matriz, encontrados com elevados teores em relação aos demais carboidratos foram a galactose em média de $5,55\% \pm 0,89$ (m/m) e a manose com $7,52\% \pm 0,91$ (m/m) para o café arábica, enquanto para o café conilon os valores médios foram semelhantes de $5,85\% \pm 0,30$ (m/m) e $6,37\% \pm 0,41$ (m/m), respectivamente. A casca de café apresentou maiores teores de carboidratos para o manitol de $1,03\% \pm 0,05$ (m/m), para a arabinose de $3,39\% \pm 0,15$ (m/m) e frutose de $2,64\% \pm 0,22$ (m/m). O carboidrato determinado com a maior concentração para o soja foi a frutose com $1,08\% \pm 0,03$ (m/m). Para a amostra de milho, a glicose foi detectada em maior quantidade com $45,72\% \pm 1,38$ (m/m), seguida do trigo com $41,16\% \pm 1,77$ (m/m). Os paus de café apresentaram os maiores teores de xilose ($5,75\% \pm 0,56$ (m/m)). Foram obtidos modelos matemáticos que mostraram a influência dos adulterantes incorporados ao café. Das amostras comerciais analisadas verificou-se adulteração em sua grande maioria com cascas de café e paus.

Palavras-Chave: café, adulterantes, carboidratos, quimiometria, HPAEC-PAD.

PAULI, E. D. **Development of methodology for determination of adulterants in coffee using HPAEC-PAD and chemometrics.** 2010. 116 fl. Dissertation (Masters in Chemistry of the Natural Resources) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ABSTRACT

The detection of impurities in roasted and ground coffee samples is a constant concern, especially in order to verify fraud occurrences. Carbohydrate analysis is important in this issue, since variation in original constituents from different raw materials may be able to reveal the final composition of the product, or in other words, if it's pure or if it has been adulterated, and in which proportion this adulteration happened, as a function of the proportion of each mono-, oligo-, and polysaccharides. Therefore, in this work, a study to evaluate the quality, through total carbohydrate concentration of *Arabic* roasted and ground coffee is done. Chemometric methods were used to verify an adulteration pattern by soybean, wheat, corn, *canephora coffea*, husks and sticks of coffee by the mixture of different proportions of these adulterants in coffee, following statistical model in a simplex-centroid mixture design applying: (*coffea arabica* soybean*wheat); (*coffea arabica* *soybean*corn); (*coffea arabica* *corn* wheat); (*coffea arabica* *coffee husks* *canephora coffea*); (*coffea arabica* *coffee husks*coffee sticks) (*coffea arabica* * *canephora coffea* *coffee sticks) using HPAEC-PAD technique. In conclusion, this method showed itself efficient in the distinction of different matrixes. To the coffee, 2 characteristic monosaccharides of the matrix found in a higher level in relation to the other carbohydrates were galactose, with an average of $5.55\% \pm 0.89$ (m/m) and mannose with $7.52\% \pm 0.91$ (m/m) to *coffea arabica*, while to *canephora coffea*, average were similar with $5.85\% \pm 0.30$ (m/m) and $6.37\% \pm 0.41$ (m/m), respectively. Coffee husks presented higher levels of carbohydrate, being $1.03\% \pm 0.05$ (m/m) to mannitol, $3.39\% \pm 0.15$ (m/m) to arabinose and $2.64\% \pm 0.22$ (m/m) to fructose. To soybean fructose was determined as the carbohydrate with higher concentration with $1.08\% \pm 0.03$ (m/m). To the corn sample, glucose was detected in higher quantity of $45.72\% \pm 1.38$ (m/m), followed by wheat with $41.16\% \pm 1.77$ (m/m). Coffee sticks presented xylose highest levels ($5.75\% \pm 0.56$ (m/m)). Mathematical models that showed influence of incorporated adulterants in coffee were obtained. Analyzed commercial samples in its majority were adulterated with coffee husks and sticks.

Key-words: Coffee. Adulterants. Carbohydrates. Chemometrics. HPAEC-PAD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas de polissacarídeos presentes nos grãos de café.....	23
Figura 2 - Mecanismo de oxidação da glicose sobre eletrodo de ouro.....	30
Figura 3 - Forma de onda utilizada pela técnica PAD.....	30
Figura 4 - Representação do espaço experimental para processos com três fatores independentes, superfície de resposta e suas curvas de nível.....	33
Figura 5 - Planejamento de misturas do tipo centróide simplex com três componentes.....	39
Figura 6 - Diagrama em blocos do sistema instrumental para a determinação de carboidratos totais.....	42
Figura 7 - Condições metodológicas para a extração de carboidratos totais.....	43
Figura 8 - Cromatogramas de carboidratos utilizando o método HPAEC-PAD: Padrão 10% (v/v), Café arábica 100%, Soja 100%, Trigo 100% (diluição 1:3 (v/v).....	49
Figura 9 - Cromatogramas de carboidratos utilizando o método HPAEC-PAD (café*soja*trigo).....	52
Figura 10 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, soja e trigo, mostrando o efeito das misturas na concentrações do carboidrato arabinose.....	55
Figura 11 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, soja e trigo, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato xilose.....	56
Figura 12 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, soja e trigo, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato frutose.....	56
Figura 13 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, soja e trigo, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato galactose.....	57
Figura 14 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, soja e trigo, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato manose.....	58
Figura 15 - Gráfico dos escores dos Fatores 1 e 2 dos dados cromatográficos das 20 amostras das matrizes puras e misturas de café arábica, soja e trigo.....	59
Figura 16 - Cromatogramas de carboidratos utilizando o método HPAEC-PAD: Padrão 10 % (v/v), Café arábica 100 %, Soja 100 %, Milho 100 % (diluição 1:3 (v/v).....	60
Figura 17 - Cromatogramas de carboidratos utilizando o método HPAEC-PAD (café*milho*soja).....	62
Figura 18 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, milho e soja, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato arabinose.....	65
Figura 19 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, milho e soja, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato galactose.....	65
Figura 20 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, milho e soja, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato glicose.....	66

Figura 21 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, milho e soja, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato manose	66
Figura 22 - Gráfico dos escores entre o Fator 1 com o Fator 2 dos resultados cromatográficos das 24 amostras das matrizes puras e misturas de café arábica, milho e soja	67
Figura 23 - Cromatogramas de carboidratos utilizando o método HPAEC-PAD: Padrão 10 % (v/v), Café arábica 100 %, Milho 100 % (diluição 1:3 (v/v), Trigo 100 % (diluição 1:3 (v/v)	68
Figura 24 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, milho e trigo, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato arabinose	72
Figura 25 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, milho e trigo, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato galactose	72
Figura 26 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, milho e trigo, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato manose	73
Figura 27 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, milho (m) e trigo (t), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato xilose.....	73
Figura 28 - Gráfico dos escores dos Fatores 1 e 2 dos dados cromatográficos das 24 amostras das matrizes puras e misturas de café Arábica, milho e soja	74
Figura 29 - Projeções das variáveis e das amostras nos Fatores 1 e 2	75
Figura 30 - Cromatogramas de carboidratos utilizando o método HPAEC-PAD: Padrão 10% (v/v), Café arábica 100%, Café conilon 100%, Cascas de café 100%.....	76
Figura 31 - Cromatogramas de carboidratos utilizando o método HPAEC-PAD (café arábica*casca*café conilon)	78
Figura 32 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, cascas de café e café conilon, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato manitol	82
Figura 33 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, cascas de café e café conilon, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato glicose.....	82
Figura 34 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, cascas de café e café conilon, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato xilose.....	83
Figura 35 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, cascas de café e café conilon, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato frutose.....	83
Figura 36 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, cascas de café e café conilon, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato arabinose	84
Figura 37 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, cascas de café e café conilon, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato manose	85

Figura 38 - Gráfico dos escores dos Fatores 1 e 2 dos dados cromatográficos das 21 amostras das matrizes puras e misturas de café arábica, cascas de café e café conilon.....	86
Figura 39 - Cromatogramas de carboidratos utilizando o método HPAEC-PAD: Padrão 10% (v/v), Café arábica 100%, Cascas de café 100%, Paus de café 100%.....	87
Figura 40 - Cromatogramas de carboidratos utilizando o método HPAEC-PAD (café arábica*cascas*paus).....	89
Figura 41 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, cascas de café e paus de café, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato xilose.....	93
Figura 42 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, cascas de café e paus de café, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato manose.....	93
Figura 43 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, cascas de café e paus de café, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato arabinose.....	94
Figura 44 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, cascas de café e paus de café, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato glicose.....	95
Figura 45 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, cascas de café e paus de café, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato frutose.....	95
Figura 46 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, cascas de café) e paus de café, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato galactose.....	96
Figura 47 - Gráfico dos escores dos Fatores 1 e 2 dos resultados cromatográficos das 21 amostras das matrizes puras e misturas de café arábica, cascas e paus de café.....	97
Figura 48 - Cromatogramas de carboidratos utilizando o método HPAEC-PAD: Padrão 10% (v/v), Café arábica 100%, Café conilon 100%, Paus de café 100%.....	98
Figura 49 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, café conilon e paus de café, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato manitol.....	102
Figura 50 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica, café conilon e paus de café, mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato glicose.....	102
Figura 51 - Gráfico dos escores dos Fatores 1 e 2 dos resultados cromatográficos das 21 amostras das matrizes puras e misturas de café arábica, café conilon e paus de café.....	103
Figura 52 - Projeções das variáveis e das amostras nos Fatores 1 e 2.....	104
Figura 53 - Gráfico dos loadings dos Fatores 1 e 2 das amostras comercializadas em Londrina.....	106
Figura 54 - Gráfico dos loadings dos Fatores 1 e 2 das amostras comerciais fornecidas pela ABIC.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da amostragem para avaliação de adulterantes (café*soja*trigo); (café*milho*soja); (café*milho*trigo).....	39
Tabela 2 - Composição da amostragem para avaliação de adulterantes (café arábica*cascas de café* café conilon); (café arábica*cascas de café*paus de café); (café arábica*café conilon*paus de café)	40
Tabela 3 - Condições cromatográficas empregadas na análise de carboidratos totais.....	44
Tabela 4 - Concentrações dos carboidratos utilizadas para o levantamento da curva de calibração	45
Tabela 5 - Equações das retas, coeficientes de correlação linear e faixa dinâmica de trabalho de cada carboidrato	45
Tabela 6 - Repetitividade da mistura do padrão analítico 10% (v/v) injetados sob as mesmas condições (n =7).....	46
Tabela 7 - Valores de luminosidade, tonalidade cromática e umidade (g/100 g) para matrizes puras de café arábica e conilon torrado e moído; de adulterantes - trigo, soja, milho, cascas e paus; e de cafés brasileiros comerciais torrado e moído	47
Tabela 8 - Teores em % (m/m) dos monossacarídeos de acordo com o planejamento centroide simplex das matrizes de café arábica, soja e trigo, resultados em duplicata.....	50
Tabela 9 - Análise da variância (ANOVA) para ajuste dos modelos adotados para as concentrações de carboidratos totais das matrizes puras de café arábica, soja e trigo e suas misturas	53
Tabela 10 - Teste de significância para os coeficientes dos modelos lineares e quadráticos para as concentrações de carboidratos totais obtidos através do planejamento centroide simplex das misturas de café arábica, soja e trigo.....	54
Tabela 11 - Concentrações em % (m/m) dos monossacarídeos de acordo com o planejamento centroide simplex das matrizes de café arábica, milho e soja, realizados em duplicata.....	61
Tabela 12 - Análise da variância para ajuste dos modelos adotados para as concentrações de carboidratos totais das matrizes puras de café arábica, milho e soja e suas misturas.....	63
Tabela 13 - Teste de significância para os coeficientes dos modelos lineares para as concentrações de carboidratos totais obtidos através do planejamento centroide simplex das misturas de café arábica, milho e soja.....	64
Tabela 14 - Concentrações em % (m/m) dos monossacarídeos de acordo com o planejamento centróide-simplex das matrizes de café arábica, milho e trigo, resultados em duplicata.....	69
Tabela 15 - Análise da variância para ajuste dos modelos adotados para as concentrações de carboidratos totais das matrizes puras de café arábica, milho e trigo e suas misturas	70
Tabela 16 - Teste de significância para os coeficientes dos modelos lineares e quadráticos para as concentrações de carboidratos totais obtidos através	

do planejamento centróide simplex das misturas de café arábica, milho e trigo	71
Tabela 17 - Teores em % (m/m) dos monossacarídeos de acordo com o planejamento centróide simplex das matrizes de café arábica, cascas e café conilon.....	77
Tabela 18 - Análise da variância para ajuste dos modelos adotados para as concentrações de carboidratos totais das matrizes puras de cafés arábica e conilon e cascas de café e suas misturas	79
Tabela 19 - Teste de significância para os coeficientes dos modelos lineares e cúbicos especiais.....	81
Tabela 20 - Concentrações em % (m/m) dos monossacarídeos de acordo com o planejamento centróide simplex das matrizes de café arábica, cascas e paus de café, resultados em duplicata	88
Tabela 21 - Análise da variância para ajuste dos modelos adotados para as concentrações de carboidratos totais das matrizes puras de café arábica, cascas e paus de café e suas misturas	90
Tabela 22 - Teste de significância para os coeficientes dos modelos lineares, quadráticos e cúbicos	92
Tabela 23 - Concentrações em % (m/m) dos monossacarídeos de acordo com o planejamento centróide- simplex das matrizes de café arábica, café conilon e paus de café, resultados em duplicata	99
Tabela 24 - Análise da variância para ajuste dos modelos adotados para as concentrações de carboidratos totais das matrizes puras de café arábica, café conilon e paus de café	100
Tabela 25 - Teste de significância para os coeficientes dos modelos cúbico e quadrático	101
Tabela 26 - Concentrações em % (m/m) dos carboidratos totais das amostras de cafés torrado e moídos comercializadas na região de Londrina	105
Tabela 27 - Concentrações em % (m/m) dos carboidratos totais das amostras de cafés torrado e moídos comerciais, fornecidas pela ABIC	107

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 História do Café	15
2.2 Mercado Atual do Café	16
2.3 Espécies de Café.....	18
2.4 Composição Química do Café	19
2.4.1 Carboidratos	19
2.4.1.1 Carboidratos em Grãos de Café Arábica Verde.....	22
2.4.1.2 Carboidratos em Café Arábica Torrado e Moído	23
2.5 Adulteração do Café Torrado e Moído	24
2.6 Quimiometria	32
3 OBJETIVOS	36
3.1 Geral.....	36
3.2 Específicos	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Amostras de café arábica, adulterantes e cafés torrados e moídos comerciais.....	37
4.2 Caracterização das amostras de café arábica e adulterantes	38
4.2.1 Determinação da umidade	38
4.2.2 Análise de cor	38
4.3 Preparo de amostras de café arábica, adulterantes e cafés torrados e moídos comerciais	38
4.4 Reagentes e Padrões.....	40
4.5 Soluções Padrões	40
4.6 Equipamento	41
4.7 Análises Cromatográficas.....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Validação.....	44
5.2 Caracterização das amostras de café arábica e adulterantes	46
5.3 Avaliação dos efeitos das misturas nas concentrações dos carboidratos	48
5.3.1 Planejamento experimental para estudo das misturas de café arábica, trigo e soja.....	48
5.3.2 Planejamento experimental para estudo das misturas de café arábica, milho e soja	59
5.3.3 Planejamento experimental para estudo das misturas de café Arábica, milho e trigo	67
5.3.4 Planejamento experimental para estudo das misturas de café arábica, cascas de café e café conilon	76
5.3.5 Planejamento experimental para estudo das misturas de café arábica, cascas e paus de café	86
5.3.6 Planejamento experimental para estudo das misturas de café arábica, café conilon e paus de café	97
5.3.7 Análise das amostras de café torrados e moídos comerciais	105
6 CONCLUSÃO	109
7 REFERÊNCIAS	110

1 INTRODUÇÃO

O café é um dos produtos básicos mais valiosos, constituindo-se na segunda maior mercadoria comercializada, permanecendo atrás somente do petróleo (OIC, 2009; NABAIS et al., 2008), tendo como os maiores canais de comercialização e formação de preços no contexto mundial, as bolsas de “*commodities*” de Nova York e Londres (NOBRE et al., 2007). Segundo a Organização Internacional do Café (OIC, 2009), a produção total de café para a safra 2008/2009 foi estimada em 126 milhões de sacas de 60 kg, equivalendo a um aumento de 6,8% em relação ao mesmo período do ano anterior, que alcançou 96,7 milhões de sacas de 60 kg com cerca de US\$ 15,2 bilhões.

A importância econômica do café deixa claro que estudos relacionados à sua composição, detecção de fraudes e avaliação de sua qualidade são de suma importância (MOREIRA; TRUGO, 1997), constituindo-se em pré-requisitos à comercialização, especialmente em um mercado cada vez mais globalizado, que controla com eficácia a qualidade dos produtos (ISO, 1995; ABIC, 2009).

No Brasil, as impurezas, com maior frequência, adicionadas ao café segundo Assad et al.(2002) são cascas e paus, milho, cevada, trigoilho, açúcar mascavo e soja.

De acordo com Bernal *et al.* (1996) a determinação individual de carboidratos tem ganhado importância significativa não somente por prover informação composicional das amostras, mas também, por auxiliar na identificação de adulterantes.

Estudos sobre o perfil dos carboidratos realizados por Blanc, Davis e Parchet e colaboradores em centenas de amostras de cafés solúveis de várias nacionalidades, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis e utilizando um sistema de derivatização pós-coluna, permitiram verificar que extratos de cascas de café estavam sendo incorporados em alguns cafés, vendidos comercialmente, em concentrações superiores a 25% (BLANC; DAVIS; PARCHET, 1989). Nestes estudos, valores das análises dos carboidratos livres e totais, possibilitaram evidenciar fraudes pela determinação de que a contaminação proposital por casca de café ocasiona um aumento no teor de

manitol, xilose, glicose e frutose; enquanto a adição de material lenhoso (paus) resulta no aumento da concentração de xilose, glicose e frutose, permitindo diferenciar produtos puros de produtos adulterados, identificando a natureza do adulterante. Há uma distinção entre a análise de carboidratos totais, que trata do conteúdo individual de cada monossacarídeo (arabinose, galactose, glicose, xilose, manose), feita a partir de uma etapa de hidrólise em meio ácido em ebulição; e a análise de carboidratos livres, a qual permite determinar o teor dos monossacarídeos (arabinose, galactose, glicose, manose, frutose) e de sacarose e manitol, extraídos de uma amostra sem que haja hidrólise, realizada simplesmente pela diluição do café solúvel em água.

Segundo Bernal et al. (1996) os carboidratos podem ser determinados utilizando o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), baseados em combinações apropriadas da fase estacionária e do sistema da detecção. A técnica de cromatografia de troca aniônica acoplada com detecção por amperometria pulsada (HPAEC-PAD) tem sido a técnica preferencial adotada internacionalmente para a análise de carboidratos em café (ISO 11292, 1995) por exigir pouco preparo da amostra com excelente resolução e sensibilidade, quando comparado à detecção por índice de refração (RI) ou UV-Vis (COUTINHO, 2003; DIONEX, 2010a).

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

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 História do Café

A origem da palavra café ainda não está bem esclarecida, pode significar tanto a bebida quanto a planta ou o fruto. Pode vir da palavra *kaffa*, da Abissínia – atual Etiópia; também ser originária do árabe *karah* (ou *gavah*), que quer dizer vinho, ou então *kahwah* (ou *cahue*), que significa força, ou pode ainda ter origem no idioma turco, nas palavras *koveh* ou *kaveh*, que também denominam o vinho (ABIC, 2009; EMBRAPA, 2009).

Há várias lendas em torno da descoberta do café, porém a mais conhecida é a lenda de Kaldi, registrada em manuscritos de Iêmen, do ano de 575, é considerada a primeira referência alusiva do café. Kaldi era um pastor de cabras nas montanhas da Abissínia, atual Etiópia, que observou o efeito estimulante que as folhas e frutos de determinado arbusto produziam em seu rebanho. Os animais ao mastigarem a planta subiam as montanhas com agilidade e aparentavam melhor resistência. Ao provar o fruto, o pastor confirmou os estímulos (ABIC, 2009; EMBRAPA, 2009; MARTINS, 2008).

A África foi o território de origem do café, mas após atravessar o Mar Vermelho e ser levado para a Península Arábica, foram os árabes que inicialmente dominaram a técnica de plantio e preparação do produto (MARTINS, 2008). Até o século XVII, somente os árabes produziam café. Alemães, franceses e italianos procuravam uma maneira de desenvolver o plantio em suas colônias. A partir de 1615 o café começou a ser saboreado no Continente Europeu, trazido por viajantes em suas freqüentes viagens ao oriente (ABIC, 2009). Embora os árabes tenham tomado certas medidas para manter o monopólio da produção do café, os holandeses conseguiram contrabandear frutos frescos para suas colônias asiáticas (Java, Ceilão e Sumatra) e, posteriormente, para as Antilhas Holandesas, na América Central. Graças aos holandeses, o café começou a ser conhecido no mundo (EMBRAPA, 2009). A partir destas plantas, os holandeses iniciaram em 1699, plantios experimentais em Java. Essa experiência de sucesso trouxe lucro, encorajando outros países a tentarem o mesmo. A Europa maravilhava-se com o cafeeiro como planta decorativa, enquanto os holandeses

ampliavam o cultivo para Sumatra, e os franceses, presenteados com um pé de café pelo burgomestre de Amsterdã, iniciavam testes nas ilhas de Sandwich e Bourbon (ABIC, 2009; MARTINS, 2008).

Com as experiências holandesa e francesa, o cultivo de café foi levado para outras colônias européias. O crescente mercado consumidor europeu propiciou a expansão do plantio de café em países africanos e a sua chegada ao Novo Mundo. Pelas mãos dos colonizadores europeus, o café chegou ao Suriname, São Domingos, Cuba, Porto Rico e Guianas. Foi por meio das Guianas que chegou ao norte do Brasil. Desta maneira, o segredo dos árabes se espalhou por todos os cantos do mundo (ABIC, 2009).

Desde sua descoberta na Abissínia, o café levou cerca de nove séculos até sua chegada ao Brasil, em 1727. Entrou no país pelo Estado do Pará, trazido da Guiana Francesa pelas mãos do sargento-mor Francisco de Melo Palheta que, a pretexto de resolver oficialmente questões de fronteiras, havia sido enviado àquele país para conseguir mudas da planta. A missão foi difícil, já que naquele país as mudas de café eram inacessíveis a qualquer estrangeiro (EMBRAPA, 2009).

Posteriormente o café foi cultivado no Nordeste, no caso no Maranhão, Ceará, Pernambuco e Bahia, até chegar, em 1773, ao Rio de Janeiro. Expandiu-se pela Serra do Mar, atingindo, em 1825, o Vale do Paraíba, daí alcançando os Estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais, onde encontrou condições para o seu desenvolvimento. Num espaço de tempo relativamente curto, o café passou de uma posição relativamente secundária para a de produto-base da economia brasileira, onde em 1845, o Brasil já era responsável por 45% das exportações mundiais dos produtos (ABIC, 2009; CNC, 2009; EMBRAPA, 2009).

2.2 Mercado atual do Café

Segundo Nobre *et al.* (2007) as bolsas de “*commodities*” de Nova York e Londres são os maiores canais de comercialização e de formação de preços do café no contexto mundial. O café é um dos produtos básicos mais valiosos, ou seja, é a segunda maior mercadoria comercializada no mundo, permanecendo atrás somente do petróleo (OIC, 2009; NABAIS *et al.*, 2008). Segundo a

Organização Internacional do Café (OIC, 2009), a produção total de café para a safra 2008/2009 foi estimada em 126 milhões de sacas, equivalente a um aumento de 6,8% em relação ao mesmo período do ano anterior. As exportações efetuadas no ano de 2008 alcançaram 96,68 milhões de sacas. Estima-se que o valor dessas exportações alcançou US\$ 15,22 bilhões em 2008. Em 2008 o consumo mundial de café foi cerca de 128 milhões de sacas (OIC, 2009).

O Brasil é o maior produtor mundial de café, atualmente, sendo responsável por 30% do mercado internacional. É também o segundo mercado consumidor, atrás somente dos Estados Unidos (ABIC, 2009). A estimativa da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) para a produção total de café, na safra 2009, indica que o país deverá colher 39,07 milhões de sacas de café beneficiado. A produção do café arábica representa 72,49% (28,3 milhões de sacas de café beneficiado) da produção do país e tem como maior produtor o estado de Minas Gerais, com 66% (18,97 milhões de sacas de café beneficiado). O café conilon (robusta) participa da produção nacional com 27,51% (10,75 milhões de sacas de café beneficiado) (CONAB, 2009).

O café está presente em 1,9 mil municípios brasileiros, com 250 mil produtos e este agronegócio brasileiro é gerador de mais de 8,5 milhões de empregos. A área total cultivada com café está estimada em 2.342.438 hectares, Desse total, 11,70% (245.296 mil hectares) estão em formação e 88,3% (2.097.142 mil hectares) estão em produção (CONAB, 2009). A produção de café arábica se concentra em São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Bahia e parte do Espírito Santo, enquanto o café robusta é plantado principalmente no Espírito Santo e Rondônia. A exportação de café torrado e moído totalizou US\$ 35,6 milhões em 2008, contra US\$ 26,0 milhões em 2007, um crescimento de 37%. Em sete anos, as vendas aumentaram em quase 800%, considerando que em 2002 os embarques foram de US\$4 milhões. Os principais mercados são, respectivamente, os Estados Unidos, a Itália, a Argentina e o Japão (ABIC, 2009).

Pesquisa realizada pela InterScience, encomendada pelo GGM/Funcafê através de convênio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA com contrapartida da ABIC sobre "Tendências do Consumo do Café no Brasil em 2008", demonstrou que, 97% das 2.173 pessoas consomem café, e

93% consomem coado/filtrado (ABIC, 2009; BRASIL, 2009). No período entre Novembro/2007 e Outubro/2008, a ABIC registrou o consumo de 17,66 milhões de sacas, representando um aumento de 3,21% em relação ao mesmo período anterior (Nov/06 a Out/07), que havia sido de 17,11 milhões de sacas. Para 2009 a ABIC projeta um crescimento em torno de 3,0%, o que elevaria o consumo para 18,2 milhões de sacas (ABIC, 2009).

2.3 Espécies de Café

São conhecidas aproximadamente 100 espécies do gênero *Coffea L* (Rubiaceae), sendo as mais importantes *Coffea arabica* (arábica) e *Coffea canephora*, genericamente conhecido por robusta, é de cultivar conilon, que representam respectivamente 70 e 30% da produção mundial (BRAGANÇA, et al. 2001; CEPLAC, 2009; ALVES; DIAS; BENASSI, 2006; CARVALHO et al., 2001; CASTRO; MARRACCINI, 2006). Produz flores com aroma de jasmim e frutos conhecidos como cerejas, onde dentro de cada fruto há dois invólucros, ou seja, uma polpa e um pergaminho, e ainda, dentro de cada fruto há dois grãos de café (MARTINS, 2008).

Estas duas espécies apresentam uma série de características diferentes. *C. arabica* é um tetraplóide ($2n = 44$ cromossomos), a espécie é autocompatível, multiplicando-se por autofecundação, é cultivada em altitudes mais elevadas com temperaturas entre 18 e 22°C, ou seja, cresce em climas mais amenos, é tem um grão verde claro de formato ovalar que pode ser vendido puro, ou seja, sem *blend*. As cultivares de *C. arabica* mais indicadas para plantio são Mundo Novo, Catuaí Amarelo, Catuaí Vermelho, Acaiá e Icatu. O *Coffea canephora* é um diplóide ($2n = 22$ cromossomos) que se reproduz por fecundação cruzada principalmente pela ação do vento e dos insetos, adaptada a regiões de baixa altitude e temperaturas elevadas, de grande rusticidade, clima úmido, oferece maior resistência às pragas, seu grão é arredondado e de coloração castanho (AGUIAR et al., 2005; BOAVENTURA, 1990; CASTRO; MARRACCINI, 2006; CLARINDO; CARVALHO, 2009; CEPLAC, 2009; GASPARI-PEZZOPANE, 2007; ALVES; DIAS; BENASSI, 2006, MARTINS, 2008). Os pés de café atingem de 2 a 2,5 metros, podendo chegar a 10 metros de altura (MARTINS, 2008).

Ambas as espécies não se diferem somente pelas características botânicas, mas também em termos de valores comerciais, onde o *C. arabica* tem valores de 20 a 25% maiores que o *Coffea canephora* (PIZARRO; ESTEBAN-DÍEZ; GONZÁLEZ-SÁIZ, 2007). Esta valorização se deve ao *C. arabica* produzir um café fino, de aroma e sabor mais apreciado no mundo. O *C. canephora* produz um café com sabor mais adstringente e amargo, é muito usado em *blends*, é considerado neutro e tem maior concentração de sólidos solúveis, resultando em um maior rendimento industrial (CEPLAC, 2009; MARTINS, 2008).

Segundo o regulamento técnico de identidade e de qualidade o café é classificado em arábica e robusta. De acordo com a classificação para o café arábica há sete subgrupos de bebida, sendo os primeiros quatro subgrupos de bebidas finas e os três últimos de bebidas fenicadas: estritamente mole; mole; levemente mole; dura; riado; rio e riozona. O grupo robusta é classificado em quatro subgrupos: excelente; boa; regular e anormal (BRASIL, 2003).

2.4 Composição Química do Café

A composição química do café verde varia de acordo com a espécie e variedade estudada, como também esta relacionada com outros fatores como solo, clima, altitude, do tipo de manejo no campo, grau de maturação e do tipo de acondicionamento dado ao grão colhido (COFFEE BREAK, 2009). Vários são os componentes químicos presentes no grão de café cru, entre eles os voláteis, que são degradados á componentes de menor peso molecular durante a torração, que são os principais responsáveis pelas características sensoriais que determinam a qualidade da bebida. Segundo Silva, Ascheri e Pereira (2007) o café torrado e moído apresenta concentrações médias em g/100 g de amostra: umidade: 5,2 a 9,6; proteínas: 13,8 a 17,7; lipídios: 6,9 a 11,1; carboidratos: 62,7 a 72,0; cinzas: 4,6 a 5,0; e fibra bruta: 14,6 a 21,5. Por representarem uma fatia significativa da composição do café os carboidratos merecem estudos à parte.

2.4.1 Carboidratos

Os açúcares simples, monossacarídeos, são compostos cuja fórmula geral é representada por $C_n(H_2O)_n$. Outros tipos de carboidratos, oligossacarídeos

e polissacarídeos, são baseados nas unidades de monossacarídeos e apresentam uma pequena diferença na fórmula geral. Oligossacarídeos são formados quando poucos monossacarídeos estão ligados; polissacarídeos são formados quando muitos monossacarídeos estão ligados (CAMPBELL, 2000). Segundo seu tamanho existem três classes principais de carboidratos: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

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

O amido é um polissacarídeo bem adaptado a função de reserva nas células vegetais (BUCKERIDGE, *et al.*, 2000). É uma associação de dois polissacarídeos, amilopectina e amilose. A amilopectina é a mais abundante entre as duas estruturas, com aproximadamente 70-80% (m/m) do grânulo de amido. A amilose são cadeia longas, não-ramificadas de unidades D-glicose unidas por ligações α (1 \rightarrow 4) (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995). Na amilopectina há uma ramificação na hidroxila de C6 com uma ligação α -(1 \rightarrow 6). Porém, as ligações α -(1 \rightarrow 4) continuam no polímero (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009). A amilose é mais solúvel do que a amilopectina (STONE, 1996).

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

A celulose é o principal constituinte da parede celular de plantas. É um polímero do tipo homopolissacarídeo linear, constituído de alto peso molecular, de cadeia linear e elevado grau de polimerização das unidades D-glicose unidas por ligações do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ e $\beta(1\rightarrow6)$. Possui configuração alongada e agrega-se lado a lado formando microfibrilas insolúveis unidas por fortes ligações inter e intramoleculares como as pontes de hidrogênio (BRITO et al., 2008; MEURER; HAYASHI, 2003).

Hemiceluloses são heteropolissacarídeo de estrutura complexa com grau de polimerização inferior ao da celulose. São unidas por ligações β , aliadas a açúcares residuais como xilose, arabinose, glicose, galactose e ácido glicorônico. Podem ser classificadas em pentosanas ou hexanos (BRITO et al., 2008). A composição da hemicelulose varia de uma espécie para outra. Encontram-se intercaladas às microfibrilas de celulose, impedindo que elas se toquem, conferindo elasticidade e consistência a parede celular. Composta de hexoses (glicose), pentoses (arabinose, xilose) e ácido urônico (ácido glicorônico). Suas cadeias centrais são formadas, principalmente, por xilanos, galactanos ou mananos e as cadeias laterais por arabinose ou galactose (TAVERNARI et al., 2008). Podem ser classificadas em pentosanas e hexanos. Pentosanas contém polímeros de D-xilose unidas por ligações $\beta(1-4)$ com cadeias laterais curtas de arabinose (arabinoxilanos), ácido glucorônico, galactose e glicose (xilanos), ou ainda contendo resíduos de galactose unidos por ligações $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$, com cadeias laterais formadas por arabinose (arabinogalactanos). Hexanos contém cadeias de glicose e manose unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ (mananos) (BRITO et al., 2008)

Pectinas são polímeros do ácido 1,4- β -D-galacturônico que se encontram principalmente na lamela média e parede primária da célula vegetal, agindo como um elemento cimentante entre membranas. A cadeia helicoidal de

ácidos galacturônicos possivelmente está associada lateralmente com arabinoxilanos e galactomananos (BRITO et al., 2008).

2.4.1.1 Carboidratos em grãos de café arábica verde

Em sementes de café, os polissacarídeos compõem a parede celular do endosperma. A parede celular é composta de microfibrilas de celulose, envolvidas por uma rede que se interliga por polímeros de hemicelulose. Este domínio está imerso em uma matriz de polímeros pécticos, a qual cimenta todo o sistema (BUCKERIDGE et al., 2000).

Nos grãos de café verde a glicose corresponde 0,03%, a frutose a 0,04%, e sacarose de 5 a 12% do peso seco (ROGERS et al., 1999). Os polissacarídeos da parede celular representam 50% do peso seco do grão de café verde e consistem em três principais estruturas: mananos ou galactomananos, arabinogalactanos - proteínas e celulose. Além disso, existem pequenas quantidades de pectinas e xiloglucano (FISCHER et al., 2001; REDGWELL; FISCHER, 2006). Os arabinogalactanos são depósitos de polímeros derivados das pectinas, enquanto os mananos e xiloglucanos são depósitos de polímeros de hemicelulose (BUCKERIDGE et al., 2000).

Os galactomananos são polissacarídeos compostos por uma cadeia linear de resíduos de manose unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) com resíduos de galactose ramificados na posição O-6 (MARTINS et al., 2005). Os arabinogalactanos consistem em uma cadeia principal de galactose unidas por ligações β (1 \rightarrow 3) substituída na posição O-6 com resíduos de arabinose e/ou galactose. Essas ligações são características de arabinogalactanos do tipo II, um polímero que geralmente está ligado covalentemente à proteína (MARTINS et al., 2005). Galactomananos juntamente com arabinogalactano correspondem a 80% (m/m) dos polissacarídeos presentes no grão de café (OOSTERVELD et al., 2003a). Os xiloglucanos apresentam uma cadeia principal de β -D-(1 \rightarrow 4)-glucano ramificada com ligações α -(1 \rightarrow 6) por resíduos de D-xilopiranosídeos ou β -D-galactopiranosídeo- (1 \rightarrow 2)-D-xilopiranosídeos (BUCKERIDGE et al., 2000) este carboidrato junto com a celulose equivalem a 16% (m/m) dos polissacarídeos

presentes no café (OOSTERVELD et al., 2003a). As estruturas de galactomanano, arabinogalactano e xiloglucano são mostradas na Figura 1.

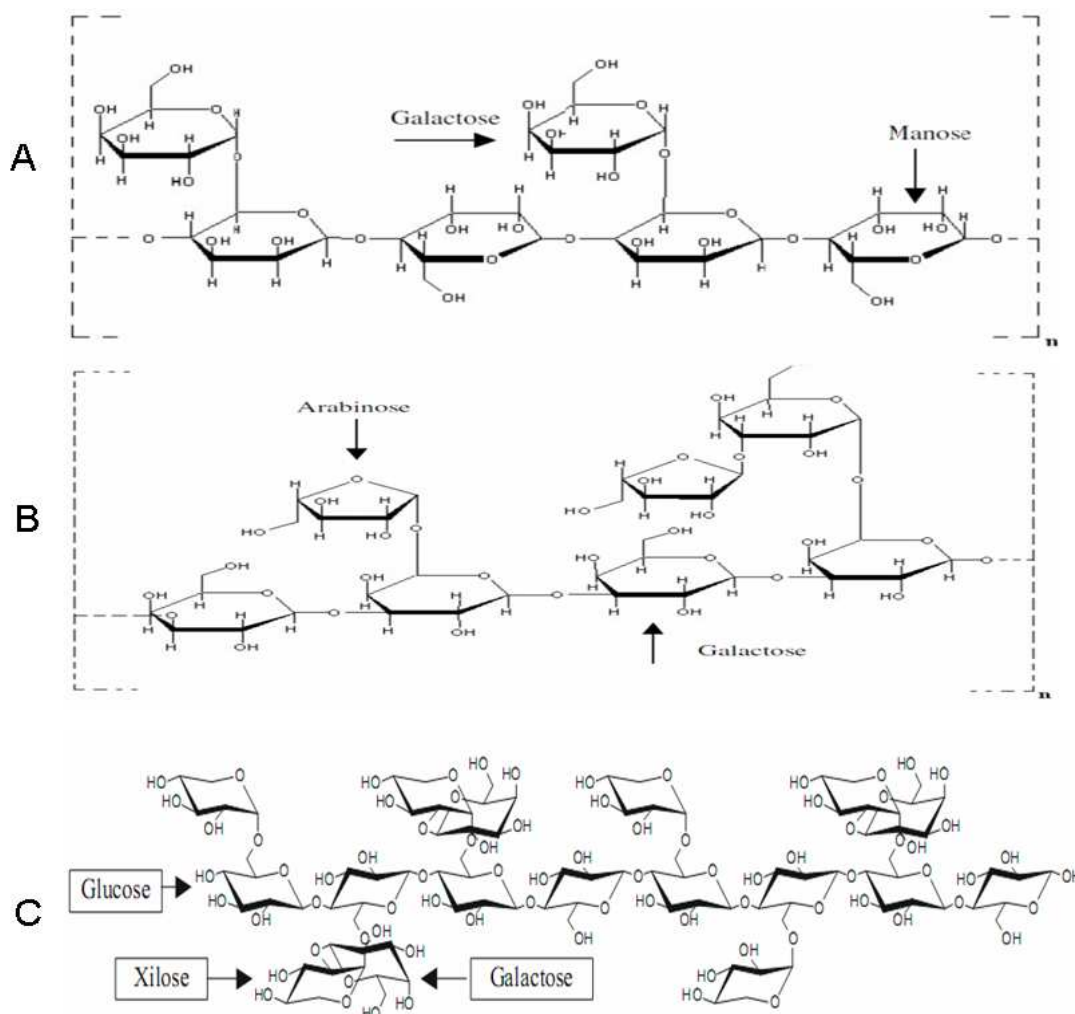


Figura 1 - Estruturas químicas de polissacarídeos presentes nos grãos de café: (A) galactomanano, (B) arabinogalactano e (C) xiloglucano (BUCKERIDGE et al., 2000; DELGADO, 2008).

2.4.1.2 Carboidratos em café arábica torrado e moído

A torra constitui uma etapa essencial na produção de café, pois afeta a formação dos compostos do sabor e aroma e a coloração dos grãos de café. Através da torra há o aumento da extração dos polissacarídeos devido às mudanças na microestrutura do grão, como o aumento do seu volume e a presença de microporos maiores na parede celular. Assim, há um aumento na acessibilidade dos polímeros da parede celular a qualquer extrator que favorece

uma maior solubilização de polissacarídeos (REDGWELL; FISCHER, 2006; REDGWELL et al., 2002; OOSTERVELD et al., 2003a).

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

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

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

A determinação individual de carboidratos tem tido crescente interesse não somente por prover informação composicional das amostras, mas também por auxiliar na identificação de adulterantes (BERNAL et al., 1996).

2.5 Adulteração do café torrado e moído

A detecção de impurezas e misturas no café é uma preocupação constante no que diz respeito principalmente à garantia da qualidade do produto.

Considera-se fraude a mistura, intencional ou não, de materiais estranhos ao produto, normalmente de baixo custo, que alterem a sua qualidade e causem danos ao consumidor, especialmente, os de ordem econômica (ASSAD et al., 2002). A *International Organization for Standardization (ISO)*, define impurezas ou “defeitos” como sendo: madeira, gravetos, cascas (ou palha), ou cerejas inteiras, que podem estar presentes no café (ISO 3509, 2003). No Brasil, as impurezas, com maior frequência, adicionadas ao café são cascas e paus, milho, cevada, trigoilho, açúcar mascavo e soja (ASSAD et al., 2002).

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

Em meados de 1989, a ABIC - Associação Brasileira da Indústria de Café criou o Selo de Pureza, para validar a qualidade das marcas de café distribuídas no Brasil, afim de que a qualidade do café seja equivalente ao exportado. Este selo garante o café com até 1% de impureza, previstas de acordo com a legislação. Somente as indústrias que comprovam ter um rígido controle de produção podem exibir o Selo de Pureza ABIC em suas embalagens. A qualidade do café está associada à combinação dos grãos (*blend*) e também aos variados pontos de torra que produzem diferentes sabores de café. Portanto, os cafés com selo da ABIC são produtos puros, mas não são produtos iguais (ABIC, 2009).

O aspecto exterior granuloso do café, com textura oleosa e aderente e sua cor, variando do castanho-avermelhado ao pardo escuro, contribuem grandemente a se tornarem imperceptíveis, a olho nu, substâncias estranhas, as mais diversas, a ele adicionadas. Desde que estejam com o mesmo grau de torra do café, estas substâncias são mascaradas pela absorção do óleo e aderência das partículas mais finas do pó de café à sua superfície, tornando-se difícil seu reconhecimento sem o auxílio de equipamentos e métodos analíticos especiais (ASSAD et al., 2002). Isso mostra que o ponto de torra escura não deve ser

somente atribuído aos costumes do consumidor, mas também utilizado com o intuito de mascarar a presença de defeitos ou alterações comuns em cafés usados comercialmente (FERNANDES et al., 2001).

Adulteração econômica tem sido praticada substituindo produtos alimentícios caros por materiais de custo mais baixo. Várias técnicas analíticas como CG, HPLC, análise isotópica estável, eletroforese, espectroscopia NIR, entre outras tem sido empregadas para análise de proteínas, carboidratos, pigmentos, ácidos orgânicos, com o propósito de detectar fraudes. A determinação de carboidratos empregando a cromatografia tem promovido a autenticidade do produto (PRODOLLIET; HISCENHUBER, 1998).

Segundo a literatura, em café solúvel a presença de xilose total tem sido indicativo de adição de casca de café e películas; os altos níveis de glicose indicam adulteração por malto-dextrose ou caramelo; e altos níveis de frutose livre podem ser indicativo de adulteração com chicória (BRIANDET; KEMSLEY; WILSON, 1996). Produtos adulterados com cascas de café ou pergaminhos apresentar elevados níveis de manitol e frutose livre, e ainda, glicose e xilose total. Produtos adulterados com amido (por exemplo, cereais ou malte), maltodextrinas ou açúcar caramelizado apresentam altas quantidades de frutose, glicose e sacarose livre, bem como, enormes níveis de glicose total (PRODOLLIET; HISCENHUBER, 1998).

O amido corresponde a aproximadamente a 80% do endosperma do trigo (POMERANZ, 1988), sendo que o endosperma equivale a 82% do peso seco do grão de trigo (ORTH; SHELLENBERGER, 1988). Dos polissacarídeos contidos na parede celular do endosperma do grão de trigo, os arabinoxilanos e a celulose correspondem a 88% e 4%, respectivamente (LINEBACK; RASPER, 1998). No milho, o endosperma também representa aproximadamente 83% do peso seco do grão, porém, embora constituído principalmente de amido como o trigo, sua percentagem é menor representando 88%, organizado na forma de *grânulos*. Dos polissacarídeos da parede celular o milho apresenta 8,1% não amiláceos (PNA), com predominância de arabinoxilanos (PAES, 2006; TAVERNARI et al., 2008). Já o soja é isento de amido, sendo composto por 5,0% de sacarose, 3,6% de arabinoxilanos e 2,3% de galactanos, segundo descrição de Liu (1997) e Rivas

(2006). Sua parede celular contém por volta de 30% de pectinas, 50% de hemicelulose e 20% de celulose.

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

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

Os carboidratos podem ser determinados utilizando cromatografia líquida e gasosa, baseados em combinações apropriadas da fase estacionária e do sistema da detecção (BERNAL et al., 1996). A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE do inglês HPLC) tem sido ferramenta importante para identificação e quantificação de carboidratos em alimentos e amostras de bebidas, representado uma medida chave para avaliar a qualidade, empregada no controle de propriedades, processos e produtos, na rotulagem nutritiva, e no teste da autenticidade e contaminação (DIONEX, 2010b).

A técnica de cromatografia de troca iônica empregando coluna de troca aniônica forte acoplada com detector eletroquímico aplicando a amperometria pulsada (HPAEC-PAD – *High Performance Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detector*) tem sido a técnica preferencialmente adotada internacionalmente, como metodologia normalizada ISO/TC-34/SC15 - ISO/DIS 11292 (1995) para determinação de carboidratos totais e livre contidos em cafés solúveis, uma vez que apresenta excelente resolução com quantificação em níveis de concentração baixos, quando comparada a detecção por índice de refração, que apesar de ser universal, apresenta uma sensibilidade reduzida

(COUTINHO, 2003). Pelo fato dos carboidratos não apresentarem ligações π conjugadas, estes não podem ser diretamente detectados por UV-Vis, requerendo assim derivatizações pós-coluna, capazes de gerar subprodutos fotometricamente ativos (PAULI, 2007). Apesar dessa técnica de detecção ser cerca de cem vezes mais sensível em relação à por IR, neste caso, o manitol não é detectado e a xilose, por estar em mais baixa concentração no café, apresenta dificuldades em sua quantificação (COUTINHO, 2003).

Diferentemente da técnica de detecção UV-Vis, a detecção amperométrica de carboidratos não necessita de derivatização e pode ser aplicada na detecção de qualquer carboidrato, já que todos possuem grupos oxidáveis (hidroxilas). Esta detecção se baseia na oxidação dos carboidratos em eletrodos de ouro, em $\text{pH} > 12$, pois a oxidação do carboidrato na superfície do eletrodo produz uma grande quantidade de H^+ que necessita ser neutralizado para que a cinética de oxidação seja favorecida. Esta técnica, quando acoplada a HPAEC, permite a detecção direta de carboidratos até níveis de 10 picomol injetados com excelente relação sinal-ruído (DIONEX, 2010a).

Portanto, como consequência de um mercado mundial cada vez mais globalizado, que controla com eficácia a qualidade dos produtos, fica claro que um dos pré-requisitos que se faz necessário à comercialização em larga escala do café brasileiro, está em dominar a elaborada e complexa técnica adotada internacionalmente para determinação dos carboidratos baseada na HPAEC-PAD. Esta técnica de separação utiliza-se do caráter fracamente ácido dos carboidratos para conferir alta seletividade na separação em um pH fortemente alcalino, utilizando-se de uma fase estacionária de troca aniônica forte.

Em pH elevado os carboidratos são, pelo menos, parcialmente ionizados, podendo desta forma, ser separados por mecanismos de troca iônica. Tal mecanismo de separação não é possível nas colunas clássicas de suporte de sílica que se dissolvem em pH elevado, sendo estas preenchidas com suporte de poliestireno com 2% de ligações cruzadas com divinilbenzeno de 10 μm de diâmetro, recoberto com a resina pelicular MicroBeadTM de 350 nm composta de aminas quaternárias em látex com 5% de ligações cruzadas, resina não-porosa, que exhibe rápido transporte de massa possibilitando separação mais rápida, com

alta estabilidade de fases móveis em pH de 0-14 e dispensa aquecimento (DIONEX, 2010a).

A fase móvel eluente deve ser suficientemente básica para garantir a detecção no eletrodo, mas não pode ser muito concentrada, pois senão a hidroxila do NaOH se ligará aos sítios ativos da coluna, reduzindo a retenção dos carboidratos. Isto também explica a necessidade da passagem de NaOH mais concentrado para a regeneração da coluna após a injeção de cada amostra (COUTINHO, 2003).

Em pH elevado, os carboidratos são eletrocataliticamente oxidados na superfície do eletrodo de Au pela aplicação de um potencial positivo. As principais reações da oxidação da glicose são dadas pelo mecanismo da Figura 2. A primeira etapa é uma oxidação muito rápida de 2 elétrons do grupo aldeído à ácido carboxílico. Esta é seguida por uma série de outras etapas rápidas que resultam na quebra da ligação C₁-C₂, com formação de HCO₂H (ácido fórmico), seguida da conversão de C₂ e C₆ aos correspondentes carboxilatos. Novas clivagens anódicas dos carbonos das extremidades podem ocorrer, mas ocorrem muito lentamente (JOHNSON; LACOURSE, 1990).

A corrente gerada pelos elétrons da oxidação é proporcional à concentração do carboidrato oxidado, desta maneira, os carboidratos podem ser detectados e quantificados. Entretanto, se utilizarmos a amperometria convencional – onde um potencial fixo é aplicado ao eletrodo – os produtos da oxidação gradualmente “envenenam” a superfície do eletrodo, causando perda do sinal analítico. Para prevenir essa perda uma técnica eletroquímica conhecida como detecção por amperometria pulsada (PAD – *Pulsed Amperometric Detection*) foi desenvolvida possibilitando uma limpeza eletroquímica do eletrodo entre duas medidas consecutivas. Isto é feito aplicando-se uma série de potenciais por períodos de tempo pré-determinados (NIXDORF, 2000).

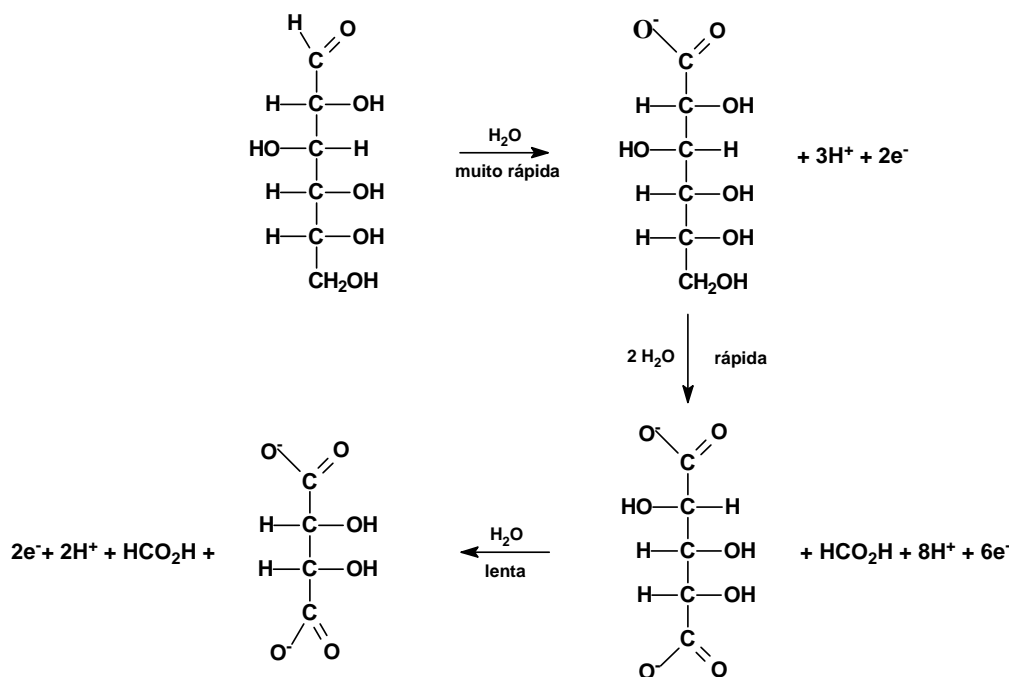


Figura 2 - Mecanismo de oxidação da glicose sobre eletrodo de ouro.

A técnica PAD utiliza uma forma de onda potencial-tempo ($E-t$) de três etapas que incorpora o processo de detecção amperométrica com alternância de polarizações anódica e catódica para a limpeza e reativação da superfície do eletrodo. A forma de onda $E-t$ está ilustrada na Figura 3.

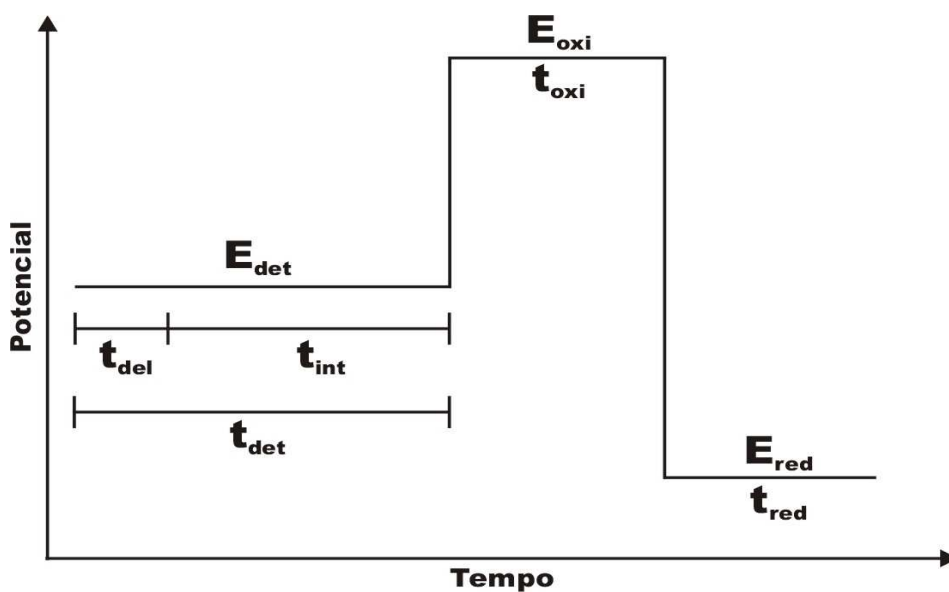


Figura 3 - Forma de onda utilizada pela técnica PAD. Fonte: NIXDORF, 2000

Inicialmente aplica-se um potencial de determinação (E_{det}) por um período de tempo (t_{det}). O sinal analítico será dado pela integração da corrente elétrica durante um intervalo de tempo (t_{int}) após um tempo de espera ($delay - t_{det}$). O tempo de espera é necessário para que a corrente capacitiva, causada pela inversão da polarização do eletrodo, não interfira na leitura da corrente faradáica, causada pela oxidação do carboidrato. Após o processo de detecção, os produtos da oxidação adsorvidos no eletrodo são desorvidos por um processo eletrocatalítico que ocorre simultaneamente com a formação anódica de óxido na superfície do eletrodo pela aplicação de um potencial (E_{oxi}) por um período (t_{oxi}). Em seguida, a atividade da superfície do eletrodo é regenerada pela dissolução catódica do filme de óxido, através da aplicação de um potencial negativo (E_{red}) por um período (t_{red}) (LACOURSE; JOHNSON, 1991).

Os potenciais E_{det} , E_{oxi} e E_{red} são determinados por voltametria cíclica, enquanto os tempos t_{del} , t_{int} , t_{oxi} e t_{red} são determinados por cronoamperometria. A voltametria cíclica consiste no acompanhamento da corrente elétrica que passa sobre o eletrodo de trabalho quando se faz uma varredura linear de uma faixa de potencial no seu sentido direto e inverso, ou seja, a varredura é feita de um potencial inicial até um potencial de reversão, onde o sentido da varredura é invertido, completando assim o ciclo quando se atinge novamente o potencial inicial. Já a cronoamperometria consiste em se acompanhar a corrente elétrica que passa sobre o eletrodo de trabalho quando há uma inversão de polaridade neste eletrodo (COUTINHO, 2003).

Os potenciais E_{det} , E_{oxi} e E_{red} são escolhidos de tal modo que E_{det} seja alto o suficiente para que ocorra a oxidação do carboidrato sem que simultaneamente ocorra a oxidação da superfície do eletrodo; E_{oxi} seja suficientemente alto para que ocorra a oxidação da superfície do eletrodo sem que este se desgaste muito rapidamente e, E_{red} seja negativo o suficiente para que ocorra a redução de todo óxido formado no potencial anterior, sem, contudo, que ocorram outras reações de redução (como por exemplo, a redução do oxigênio a peróxido) (COUTINHO, 2003).

Os tempos t_{del} , t_{int} , t_{oxi} e t_{red} são determinados de tal modo que, t_{del} seja longo o suficiente para que a corrente capacitiva atinja um valor mínimo que não

interfira de modo significativo na leitura e, ao mesmo tempo, suficientemente curto para que não haja passivação do eletrodo pelos produtos da oxidação antes da aquisição do sinal analítico ($t_{del} > \sim 50$ ms). O tempo t_{int} normalmente se encontra dentro de 50-600 ms. O tempo t_{oxi} deve ser escolhido de tal modo que a superfície do eletrodo seja completamente oxidada ($t_{oxi} \sim 100-200$ ms) enquanto que o tempo t_{red} deve ser suficiente para que ocorra a redução de todo o óxido formado no eletrodo pelo potencial anterior ($t_{red} \sim 200-400$ ms). Normalmente t_{red} é cerca de duas a três vezes t_{oxi} e a frequência do ciclo de $\sim 1-2$ Hz (COUTINHO, 2003)

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

2.6 Quimiometria

A década de 70 marca o início da atividade de pesquisa concentrada na quimiometria. Este campo é a parte da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para definir ou selecionar as condições ótimas de medidas e experiências, e visa permitir a obtenção do máximo de informações com um número reduzido de experimentos a partir da análise de dados químicos (BRUNS; FLAIGE, 1985).

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

Num planejamento de misturas, duas condições devem ser levadas em conta: as propriedades de uma mistura são determinadas pelas proporções de seus componentes e as proporções dos diversos componentes são dependentes

entre si. A soma das proporções numa mistura deve ser sempre 100%. Uma mistura de q componentes pode ser descrita pela Equação (1):

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

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

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

Numa mistura de três fatores independentes, a representação básica é um cubo, onde os experimentos realizados correspondem a qualquer ponto dentro desse cubo (Figura 4).

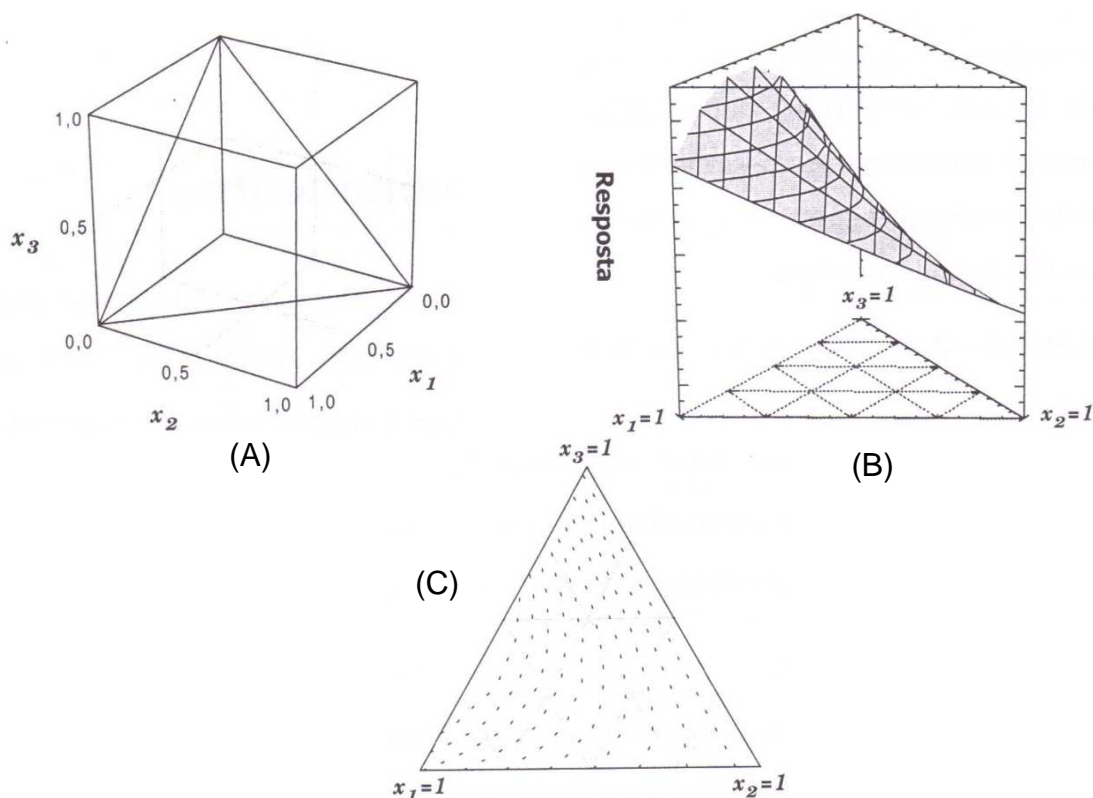


Figura 4 - (A) Representação do espaço experimental para processos com três fatores independentes, onde todos os pontos estão inclusos dentro do cubo e o espaço experimental de uma mistura de três componentes limita-se aos pontos pertencentes ao triângulo. (B) Representa uma superfície de resposta para todas as possíveis misturas dos componentes 1, 2 e 3, e em (C) suas curvas de nível (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

Todas as composições possíveis da mistura ternária são representadas pelos pontos pertencentes ao triângulo, onde os vértices correspondem aos componentes puros e as laterais às misturas binárias. Já os pontos situados no interior do triângulo, representam as misturas dos três componentes. A variação de uma dada propriedade com a composição da mistura pode ser representada por uma superfície de resposta traçada acima do triângulo, como observado na Figura 4 (b), e transcrevendo essa superfície por suas curvas de nível, se obtêm um diagrama triangular, representado na Figura 4 (c) (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

A equação polinomial, que descreve o modelo mais simples, linear, para os três componentes da mistura de interesse pode ser representada pela Equação (2):

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \varepsilon \quad (2)$$

onde, y_i é um valor experimental da resposta de interesse, β_0 e β_i são parâmetros do modelo, x_i representa as variáveis dependentes codificadas e ε é o erro aleatório.

Multiplicando-se β_0 pela identidade $(x_1 + x_2 + x_3)$ e isolando-se as variáveis, tem-se a chamada equação $\{q,m\}$ onde q é igual ao número de componentes e m ao grau da equação.

As Equações (3), (4) e (5) correspondem aos modelos linear, quadrático e cúbico especial, respectivamente.

$$y_i = b^*_1 x_1 + b^*_2 x_2 + b^*_3 x_3 \quad (3)$$

onde, $b^*_i = b_0 + b_i$

$$y_i = b^*_1 x_1 + b^*_2 x_2 + b^*_3 x_3 + b^*_{12} x_1 x_2 + b^*_{13} x_1 x_3 + b^*_{23} x_2 x_3 \quad (4)$$

onde, $b^*_i = b_0 + b_i + b_{ii}$

$$y_i = b^*_1 x_1 + b^*_2 x_2 + b^*_3 x_3 + b^*_{12} x_1 x_2 + b^*_{13} x_1 x_3 + b^*_{23} x_2 x_3 + b^*_{123} x_1 x_2 x_3 \quad (5)$$

onde, $b^*_i = b_0 + b_i + b_{ii} + b_{iii}$

Portanto, para a estimativa do valor dos coeficientes b^*_i são necessários pelo menos 3 ensaios experimentais. Da mesma forma, para modelos mais complexos, como o quadrático ou o cúbico especial, necessita-se de 6 e 7 ensaios, respectivamente. O planejamento experimental normalmente empregado para determinar os valores dos coeficientes do modelo cúbico

especial é chamado de centróide simplex, que obtemos acrescentando ao simplex em rede um ponto central correspondendo à mistura ternária em partes iguais (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003; BUENO, 2008).

Para avaliar o efeito da mistura de matrizes empregam-se diferentes modelos matemáticos. Estes modelos permitem explorar os efeitos de várias variáveis simultaneamente e extrair o máximo de informações do sistema que está sendo investigado. A Análise de Variância (ANOVA) é usada para testar a adequação dos modelos matemáticos aos resultados experimentais individuais obtidos por meio de um planejamento centróide simplex. Utilizando o teste F da razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro (MQ_{faj}/MQ_{eq}) para avaliar se o modelo está ou não ajustado aos resultados experimentais, com valor da distribuição de $F_{(m-p),(n-m)}$ onde m significa o número de níveis distintos da variável independente; p o número de parâmetros do modelo e n o número total de observações. Se F tabelado for maior que F experimental, não há indicação de falta de ajuste para o modelo. Através da razão entre as médias quadráticas da regressão e do resíduo (MQ_R/MQ_r), podemos testar se a equação de regressão é estatisticamente significativa e útil para fazer previsões, seguindo uma distribuição $F_{(p-1),(n-p)}$. Se F tabelado for menor que F experimental, a equação é significativa e útil para fazer previsões. Uma regra prática que podemos empregar é considerar a regressão como útil para fins de previsão se o valor de MQ_R/MQ_r for, pelo menos cerca de dez vezes o valor do ponto de distribuição F com o número apropriado de graus de liberdade, no nível de confiança escolhido (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

O coeficiente de determinação (R^2) para este ajuste é calculado pela razão da soma dos quadrados da regressão e total (SQ_R/SQ_T). O valor máximo que R^2 poderia explicar é dado pela subtração da soma quadrática total e do erro puro e este valor dividido pela soma quadrática total ($(SQ_T - SQ_{ep})/SQ_T$) (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

No caso das regressões obtidas de acordo com o melhor modelo ajustado, se o erro padrão calculado for maior que o valor do coeficiente, há uma forte indicação de que o efeito dessa variável não é significativo. Mais rigorosamente, pode-se dizer que ele deve ser pequeno o suficiente para que não

tenha sido possível estimá-lo através do planejamento empregado (REIS; ANDRADE, 1996). O intervalo de confiança é definido pela Equação 6 (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003), sendo que o valor do teste *t* de *Student* empregado deve corresponder ao número de graus de liberdade envolvidos no cálculo da estimativa de variância dos experimentos (REIS; ANDRADE, 1996). A média quadrática residual é uma estimativa com *n-2* graus de liberdade (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

$$b \pm t_{n-2} \times (\text{erro padrão de } b) \quad (6)$$

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a qualidade do café arábica torrado e moído, por meio da concentração dos carboidratos totais empregando HPAEC-PAD, utilizando ferramentas quimiométricas para verificar um padrão de adulteração por soja, milho, trigo, café conilon, cascas e paus de café, seguindo um planejamento estatístico do tipo centróide simplex de misturas de três componentes.

3.2 Específicos

- Aplicar a metodologia proposta pela a ISO 11292 para a determinação de carboidratos totais em café solúvel á café torrado e moído e aos adulterantes;
- Avaliar os cromatogramas em matrizes de adulterantes de café, verificando se os teores de carboidratos permitem a distinção quali e quantitativa entre os adulterantes mais comuns de café;
- Aplicar métodos quimiométricos com o propósito de encontrar modelos matemáticos preditivos que expliquem a partir de planejamentos experimentais de misturas do tipo centróide simplex um padrão de adulteração por soja, milho, trigo, café conilon, cascas e paus de café, baseado na contribuição individual dos carboidratos – manitol, arabinose, galactose, glicose, xilose, manose e frutose, destacando qual é característico de cada matriz .

- Avaliar se há diferenças significativas nas concentrações dos carboidratos para os cafés arábica e conilon;
- Efetuar a determinação de carboidratos em amostras comerciais adquiridas na região de Londrina para avaliar seu grau de contaminação.
- Analisar amostras comerciais fornecidas pela ABIC consideradas como adulteradas pela microscopia, em teste cego por HPAEC-PAD, para verificar a potencialidade da implementação desta metodologia para controle de qualidade no País.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras de café arábica, adulterantes e cafés torrados e moídos comerciais

Para o presente trabalho foi utilizada uma amostra de café 100% arábica classificada como bebida dura e o café 100% conilon, fornecida pela Companhia Cacique de Café Solúvel. Os grãos de milho, trigo e soja foram fornecidos pela COROL Cooperativa Agroindustrial. A casca de café foi fornecida pelo Centro do Comércio do Café e os paus pelo Sr. Silvio Victorino. As amostras de café, casca, milho e paus foram torradas separadamente em torrador (Rodibel, Brasil) na indústria até o ponto de torra mais próxima possível da torra média, encontrada na maioria das 22 amostras comerciais (SOUZA, 2009), trituradas e peneiradas (35 mesh – 500 mm). As onze amostras de cafés torrado e moído analisadas comercializadas na região de Londrina foram cedidas pela Profa. Marta de Toledo Benassi do DCTA/UEL. As quinze amostras de cafés torrados e moídos de diversas regiões do país, consideradas adulteradas por laudos de laboratórios credenciados empregando microscopia, analisadas por HPAEC-PAD foram fornecidas pela Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC).

4.2 Caracterização das amostras de café arábica e adulterantes

4.2.1 Determinação da umidade

Foi determinada em Termobalança de infravermelho (Bel Engineering) utilizando-se 105°C, por 5 minutos. Os resultados, expressos em g/100 g, foram utilizados para o cálculo das concentrações dos constituintes químicos em base seca (SOUZA, 2009).

4.2.2 Análise de cor

As amostras de café foram acondicionadas em recipiente plásticos de 1 cm de altura e 4 cm de diâmetro. Para análise de cor foi empregado um colorímetro portátil CR-400 (Konica Minolta, Japão) com ângulo de observação de 0°, iluminante D65, com área de leitura de 8 mm, que indicam os valores no sistema $L^*a^*b^*$. Este sistema determina o padrão internacional para medidas de cores, adotado pela *Commission Internationale d'Eclairage* (CIE) em 1976. Seus parâmetros são indicados através de um valor L^* , que indica luminosidade, ou seja, descreve a cor em termos de mais clara ou mais escura, de preto a branco. Quanto maior for o valor de L^* , mais clara é a sua coloração, com escala de 0 a 100. O valor calculado da tonalidade é calculado pelo arco tangente da relação b^*/a^* , ou seja, ($H^* = \arctg b^*/a^*$) (ABNT 12694, 1992; PAPADASKI, et al., 2000).

4.3 Preparo de amostras de café arábica, adulterantes e cafés torrados e moídos comerciais

Para o estudo dos adulterantes, a amostragem seguiu um planejamento experimental do tipo centróide simplex, Figura 5, representado por um triângulo equilátero no qual seus vértices correspondem as matrizes puras, as arestas as misturas binárias de mesma proporção, o ponto central a mistura ternária de proporções iguais e três pontos axiais nas proporções de 4:1:1; 1:4:1; 1:1:4, totalizando 10 diferentes composições de misturas que foram codificadas de 1 a 10, feitas misturas de café arábica com trigo, milho, soja, café conilon, cascas e paus, conforme Tabela 1 e 2. As misturas foram preparadas em duplicatas e o ponto central em triplicata, e analisadas aleatoriamente no sistema cromatográfico. O preparo se deu por pesagem de diferentes proporções das

matrizes de forma sempre a atingir 0,3000 g em base seca. Para as amostras de café comerciais pesou-se 0,3000 g em base seca.

Para calcular os efeitos, bem como, para a modelagem de resposta o programa STATISTICA 6.0 foi utilizado.

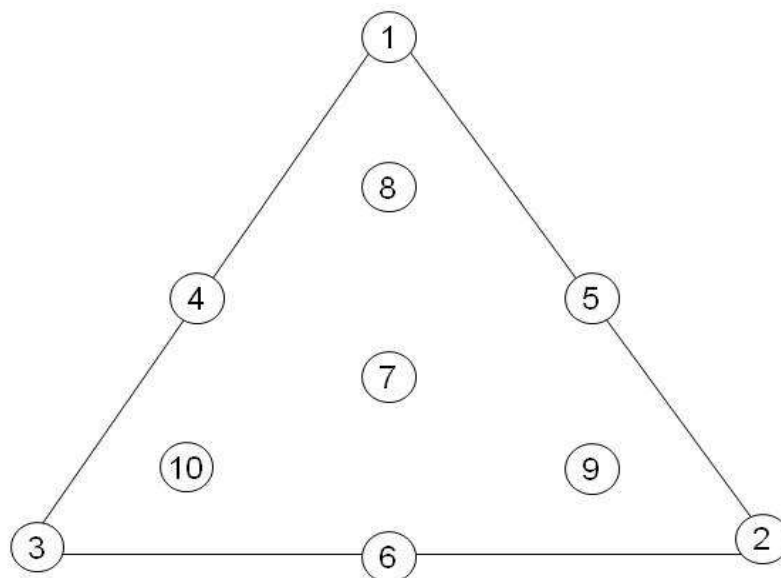


Figura 5 - Planejamento de misturas do tipo centróide simplex com três componentes.

Tabela 1 - Composição da amostragem para avaliação de adulterantes (café*soja*trigo); (café*milho*soja); (café*milho*trigo).

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

Tabela 2 - Composição da amostragem para avaliação de adulterantes (café arábica*cascas de café* café conilon); (café arábica*cascas de café*paus de café); (café arábica*café conilon*paus de café).

Código das amostras	café arábica:cascas:café conilon (%)	café arábica:cascas:paus (%)	café arábica:café conilon:paus (%)
1 - 1a	100:0:0	100:0:0	100:0:0
2 - 2a	0:100:0	0:100:0	0:100:0
3 - 3a	0:0:100	0:0:100	0:0:100
4 - 4a	50:0:50	50:0:50	50:0:50
5 - 5a	50:50:0	50:50:0	50:50:0
6 - 6a	0:50:50	0:50:50	0:50:50
7a – 7b – 7c	34:33:33	34:33:33	34:33:33
8 - 8a	66: 17:17	66: 17:17	66: 17:17
9 - 9a	17:66:17	17:66:17	17:66:17
10 - 10a	17:17:66	17:17:66	17:17:66

4.4 Reagentes e Padrões

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

Os padrões empregados foram: D(-) – Manitol, D(-) – Arabinose, D(+) – Galactose, D(+) – Glicose, D(+) – Xilose, D(+) – Manose, D(-) – Frutose todos da marca Merck (Alemanha, Darmstadt) com teores de pureza de 99,90%; 99,90%; 98,00%; 99,50%; 99,00%; 99,50%; 99,45% e 99,90%, respectivamente. Devido à grande higroscopicidade dos carboidratos, os padrões foram mantidos em dessecador de vidro, com vácuo e pentóxido de fósforo (Merck, Alemanha, Darmstadt) e foram utilizados somente depois de uma semana de dessecamento.

4.5 Soluções Padrões

Para o preparo da solução de mistura de padrões de carboidratos estoque pesou-se: 0,0030 g de Manitol; 0,0300 g de Arabinose; 0,1200 g de Galactose; 0,0450 g de Glicose; 0,0120 g de Xilose; 0,0900 g de Manose; 0,0450

g de Frutose, adicionando-se a um balão volumétrico de 100,0 mL e completando-se até a marca com água ultrapura. Sonicou-se a solução por 10 minutos em banho ultra-sônico.

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

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

4.6 Equipamento

Para as análises cromatográficas utilizou-se um sistema instrumental que consistiu em um Cromatógrafo Líquido inerte de *PEEK* composto por: dois frascos para armazenagem da fase móvel: eluente ($\text{NaOH } 1,4 \text{ mmol L}^{-1}$) e regeneradora ($\text{NaOH } 300 \text{ mmol L}^{-1}$); uma bomba de alta pressão inerte LC-10Ai – Shimadzu à 1,0 mL/min; uma válvula solenóide de baixa pressão de 3 vias Research - 1367-72 com um circuito externo de acionamento de válvula solenóide “lab-made” para troca de eluentes; uma válvula de alta pressão de 10 vias com acionamento eletrônico VICI - C2-2340 EP, para introdução de amostra em um *loop* de 20,0 μL ; uma pré-coluna (CarboPac PA1 – Dionex) e uma coluna de troca iônica aniônica de alta performance de resina de poliestireno-divinilbenzeno (CarboPac PA1 - 10 μm , 250 mm x 4 mm - Dionex); um forno termostatizado para coluna - Waters mantido a 28°C, controlado pelo controlador de temperatura CHX 650 – Pickering Laboratories; um amplificador de corrente - Stanford Research System RS570; uma fonte simétrica de $\pm 12 \text{ V}$ utilizada para o acionamento de um circuito externo de transmissão de sinais elétricos “lab-made”; uma célula eletroquímica ED-50 - Dionex; um potenciostato Autolab PGStat 30 – Eco-

Chemie; uma interface Autolab – Eco Chemie; um sistema de aquisição e tratamento de dados composto por um microcomputador Pentium IV, atuando com o programa GPES (General Purpose Electrochemical System) – Eco. Este sistema híbrido está representado no diagrama da Figura 6.

Para a integração dos cromatogramas, utilizou-se o *software* INTEGRA desenvolvido pelo professor Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara, que faz uso da Equação (7) para quantificar o teor de carboidratos (ω), expresso em porcentagem de massa:

$$\omega = \frac{Am_0V}{A_0mV_0} \times 100 \quad (7)$$

onde,

A – área do pico individual do carboidrato na amostra;

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

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

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

V – volume, em mililitros, da amostra;

V_0 – volume, em mililitros, da solução padrão.

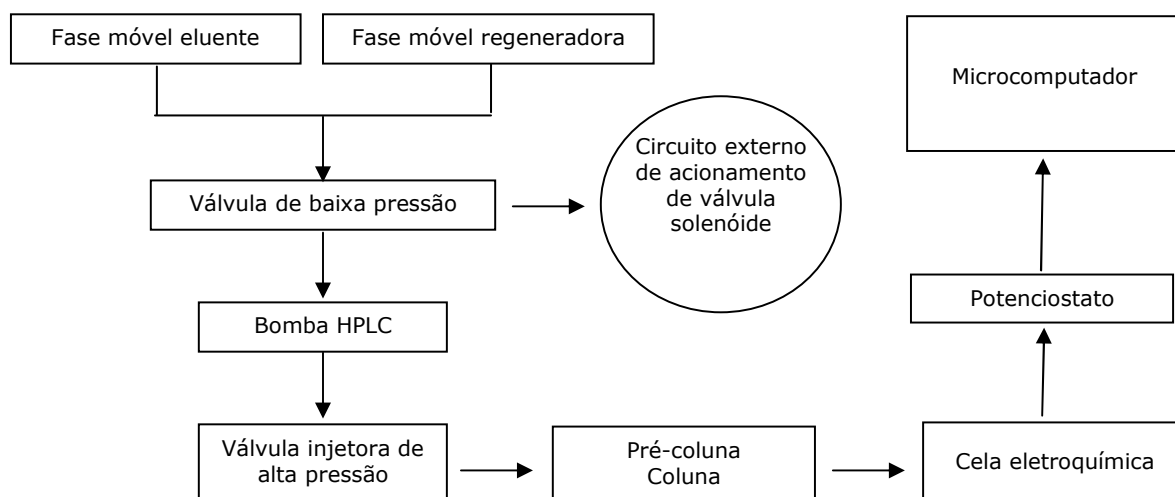


Figura 6 - Diagrama em blocos do sistema instrumental de equipamentos comerciais de diferentes marcas e modelos acoplados para a determinação de carboidratos totais utilizado neste trabalho.

4.7 Análises Cromatográficas

Para a extração dos carboidratos utilizou-se a metodologia descrita na Norma Padrão Internacional da ISO 11292 (1995), conforme esquema da Figura 7, fazendo as adaptações e adequações necessárias ao sistema instrumental, montado no Laboratório do Grupo DIA, pelo acoplamento de equipamentos comerciais de diferentes fornecedores.

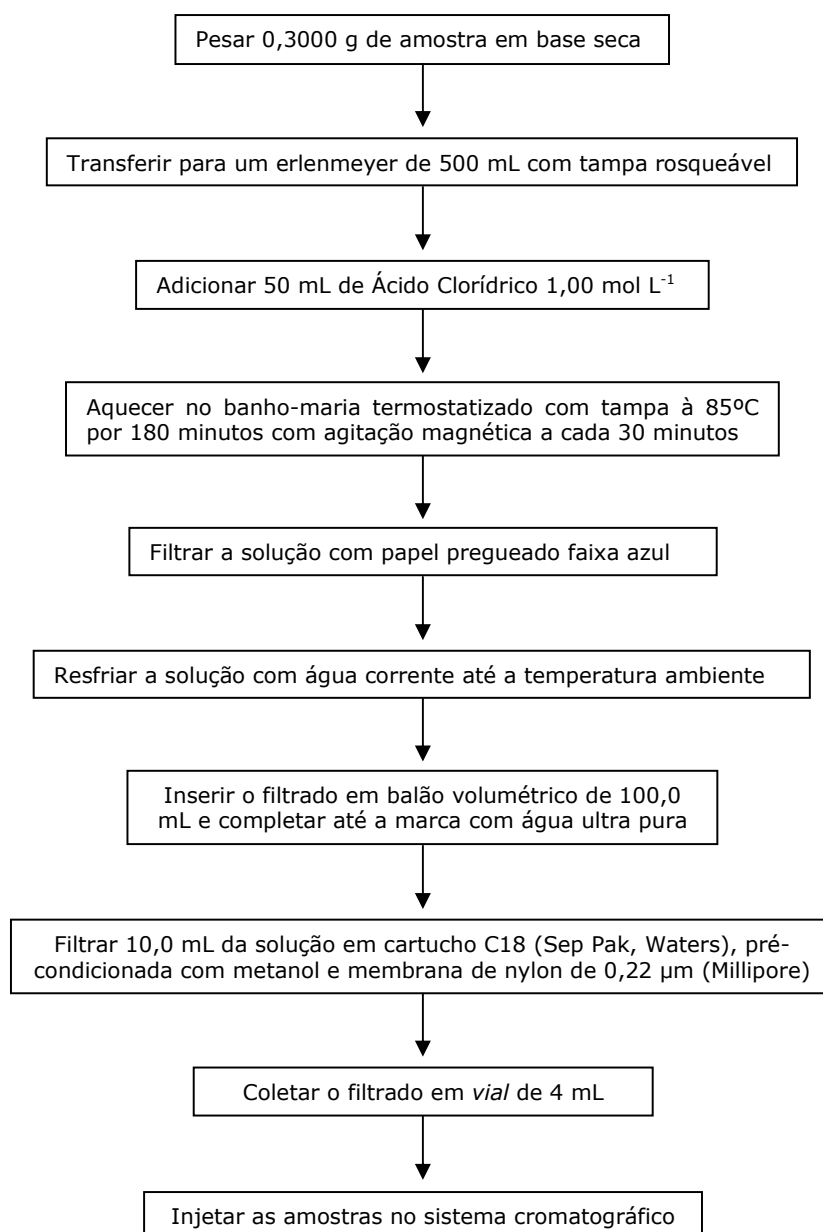


Figura 7 - Condições metodológicas para a extração de carboidratos totais.

As condições cromatográficas empregadas encontram-se descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições cromatográficas empregadas na análise de carboidratos totais.

Condições cromatográficas		Parâmetros
Fase Estacionária		Coluna CarboPac PA-1 (DIONEX, EUA): 250 mm x 4 mm, 10 μ m Pré-coluna: CarboPac PA-1
Fase Móvel(F.M.)	Composição	Eluente (NaOH): 1,4 mmol L ⁻¹ Regeneradora (NaOH): 300,0 mmol L ⁻¹
	Vazão	1,0 mL min ⁻¹
Detecção		Potencial determinação (E_{det}): +0,20 V (400 ms)
		Potencial oxidação (E_{ox}): +0,65 V (200 ms)
		Potencial redução (E_{red}): - 0,20 V (400 ms)
Programação de eventos da bomba (minutos)	Entrada de NaOH 1,4 mmol L ⁻¹ – corrida cromatográfica	0,01
	Injeção da amostra carregada no “loop”	0,01
	Entrada do Eluente NaOH 300,0 mmol L ⁻¹ - F.M. regeneradora	45,10
	Entrada do Eluente NaOH 1,4 mmol L ⁻¹ – F.M. re-equilíbrio	57,60
	Término de uma corrida cromatográfica	72,60
Volume loop		20,0 μ L
Temperatura do forno		28°C

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação

A validação do método foi feita considerando os parâmetros de linearidade, sensibilidade, precisão (repetitividade e intermediária) e faixa dinâmica de trabalho.

As curvas de calibração foram obtidas através das diluições e injeções feitas de forma aleatória em triplicata da mistura de padrões analíticos na concentração de 20% (m/v) de manitol, arabinose, galactose, glicose, xilose, manose e frutose, conforme Tabela 4.

Tabela 4 - Concentrações dos carboidratos utilizadas para o levantamento da curva de calibração.

Concentração (%) (v/v)	Alíquota do padrão analítico 20% (v/v) – (mL)	Volume final da solução (mL)
0,01	0,05	100,00
0,05	0,25	100,00
0,07	0,35	100,00
0,10	0,50	100,00
1,00	0,20	4,00
3,00	0,60	4,00
7,00	1,40	4,00
10,00	2,00	4,00
13,00	2,60	4,00

A Tabela 5 apresenta as Equações das retas, seus respectivos coeficientes de correlação linear e faixa dinâmica de trabalho para os carboidratos analisados.

Tabela 5 - Equações das retas, coeficientes de correlação linear e faixa dinâmica de trabalho de cada carboidrato.

Carboidratos	Equação da reta	Coefficiente de correlação linear	Faixa dinâmica (µg/mL)
Manitol	$y = 389,84 + 72045,92x$	0,9999	0,3 - 30
Arabinose	$y = 6038,37 + 50798,95x$	0,9971	1,5 – 210
Galactose	$y = 12956,60 + 53457,60x$	0,9951	1,5 – 300
Glicose	$y = 23952,00 + 54642,34x$	0,9938	2,1 – 390
Xilose	$y = 19451,66 + 69259,52x$	0,9981	1,5 – 210
Manose	$y = 12632,76 + 50454,69x$	0,9949	1,5 – 300
Frutose	$y = 1290,18 + 38560,40x$	0,9999	1,5 - 210

Os coeficientes de correlação linear da Tabela 5, todos acima de 0,99, demonstram que o método foi linear nas respectivas faixas dinâmicas de trabalho. O carboidrato mais sensível entre os analisados foi o manitol, expresso pela inclinação da reta de regressão da calibração de acordo com o INMETRO (2007),

parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito.

A precisão foi determinada pela repetitividade de sete injeções sucessivas de padrão analítico 10% (v/v), sendo que os coeficientes de variação determinados para as áreas foram inferiores a 5%, conforme Tabela 6.

Tabela 6 - Repetitividade da mistura do padrão analítico 10% (v/v) injetados sob as mesmas condições (N = 7).

	Manitol	Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose	Manose	Frutose
Média	8038,05	58303,88	260176,55	107592,31	29489,92	190658,08	56834,22
Desvio Padrão	294,50	1390,01	5421,20	3370,78	831,06	3995,55	2641,80
Coefficiente de Variação (%)	3,66	2,38	2,08	3,13	2,82	2,10	4,65

A precisão intermediária foi calculada a partir da injeção de amostras de casca de café, escolhida por conter teores relativamente elevados de todos os sete carboidratos analisados. O cálculo foi feito considerando amostras extraídas e analisadas em dias diferentes por analistas distintos, apresentando coeficientes de variação de 4,62%; 2,98%; 9,11%; 7,32%; 11,05%; 9,93% e 8,42% para manitol, arabinose, galactose, glicose, xilose, manose e frutose, respectivamente. O método mostrou boa precisão intermediária, considerando que os CV foram inferiores a 15 %, valor adotado como referência de acordo com a Resolução da ANVISA nº 899 de 29 de maio de 2003.

5.2 Caracterização das amostras de café arábica e adulterantes

As amostras de café arábica, adulterantes e torrado e moído comerciais foram caracterizadas quanto aos parâmetros de cor (L^* e H^*), devido à influência da torra na concentração de certos carboidratos, e quanto à umidade, para permitir efetuar a quantificação em base seca, os quais estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores de luminosidade, tonalidade cromática e umidade (g/100 g) para matrizes puras de café arábica e conilon torrado e moído; de adulterantes - trigo, soja, milho, cascas e paus; e de cafés brasileiros comerciais torrado e moído.

Matriz	Luminosidade (L*)	Tonalidade Cromática (H*)	Umidade (%)
Café arábica	18,0 ± 1,12	51,4 ± 0,2	3,88 ± 0,02
Trigo	47,4 ± 0,30	69,2 ± 0,0	1,78 ± 0,01
Soja	37,4 ± 3,23	64,0 ± 0,1	1,99 ± 0,01
Milho	44,4 ± 1,54	70,0 ± 0,4	2,00 ± 0,00
Café conilon	17,6 ± 0,6	55,7 ± 0,4	3,48 ± 0,01
Cascas	32,7 ± 0,6	61,6 ± 0,2	3,40 ± 0,01
Paus	29,4 ± 2,3	64,3 ± 0,2	2,51 ± 0,01
Amostra 1	19,8 ± 1,4	59,4 ± 0,4	3,90 ± 0,00
Amostra 2	18,3 ± 0,1	49,9 ± 0,1	3,85 ± 0,21
Amostra 3	19,3 ± 0,1	52,7 ± 0,7	5,15 ± 0,21
Amostra 4	20,8 ± 0,0	55,1 ± 0,4	4,15 ± 0,07
Amostra 5	29,4 ± 0,8	56,5 ± 0,9	4,15 ± 0,07
Amostra 6	21,7 ± 0,1	55,8 ± 0,4	3,90 ± 0,14
Amostra 7	23,4 ± 0,2	55,9 ± 1,1	4,00 ± 0,14
Amostra 8	19,4 ± 0,3	53,2 ± 0,6	2,80 ± 0,00
Amostra 9	30,0 ± 0,5	54,1 ± 0,9	4,15 ± 0,21
Amostra 10	19,7 ± 1,5	58,2 ± 1,8	2,60 ± 0,00
Amostra 11	20,4 ± 0,1	52,8 ± 0,5	4,35 ± 0,21
Amostra 12	9,0 ± 0,6	47,8 ± 0,6	6,21 ± 0,01
Amostra 13	8,7 ± 0,8	44,9 ± 0,8	7,18 ± 0,00
Amostra 14	11,9 ± 1,0	49,9 ± 0,6	6,01 ± 0,01
Amostra 15	13,5 ± 0,9	52,4 ± 0,4	6,13 ± 0,01
Amostra 16	17,4 ± 1,8	57,1 ± 0,2	6,02 ± 0,01
Amostra 17	12,6 ± 1,0	51,0 ± 0,7	4,30 ± 0,02
Amostra 18	14,2 ± 0,4	51,4 ± 0,2	3,32 ± 0,02
Amostra 19	16,0 ± 1,2	54,3 ± 0,4	4,83 ± 0,00
Amostra 20	11,6 ± 0,6	48,8 ± 0,4	4,84 ± 0,01
Amostra 21	9,4 ± 0,4	45,6 ± 0,8	2,48 ± 0,01
Amostra 22	10,5 ± 1,0	48,3 ± 0,6	4,29 ± 0,01
Amostra 23	8,8 ± 0,9	46,1 ± 1,1	4,87 ± 0,03
Amostra 24	13,2 ± 0,5	51,5 ± 0,0	5,33 ± 0,02
Amostra 25	10,2 ± 1,3	46,7 ± 1,3	4,25 ± 0,01
Amostra 26	12,2 ± 0,2	49,2 ± 0,1	4,29 ± 0,01

*Média ± desvio padrão das medidas realizadas em triplicata.

Segundo estudos realizados por Campanha (2008) e Dias (2005) com café arábica e conilon, as faixas apresentadas de L^* variaram entre 28 e 40 para a torra clara, 16 a 30 para torra média e de 13 a 21 para torra escura. Nesta mesma seqüência de grau de torra, os valores de H^* variaram de 57 a 70; 45 a 65 e 41 a 59, respectivamente. Os resultados apresentados na Tabela 7 sugerem

que as matrizes puras de cafés arábica e conilon utilizados neste experimento apresentaram grau de torra média, com o propósito de estarem o mais próximo possível da torra praticada para a grande maioria das amostras de café torrado e moído comercializadas no mercado com o Selo de Pureza ABIC, avaliadas por estudos de Souza (2009). Já o trigo, soja, milho, cascas e paus de café apresentaram torra clara. Estas amostras mostraram-se mais amareladas que o café, com o aumento do valor de H^* . Como nas matrizes de trigo, milho e soja predominantemente há glicose, xilose e frutose, que são menos suscetíveis ao grau de torra segundo a literatura, considera-se que variação no grau de torra para estes adulterantes não chega a alterar de forma significativa os teores das matrizes, sendo que em nível deste estudo estes resultados servem como referencial para a modelagem de fraudes. Por outro lado, observa-se que a grande maioria das 15 amostras adulteradas apresentou-se com grau de torra mais escura, indicando como forte indício de que houve propósito de mascarar a baixa qualidade do café em termos de defeitos, bebida e/ou a adição de adulterantes, considerando que ocorre redução expressiva no teor dos carboidratos com a intensidade de torra, de acordo com estudos de Oosterveld et al. (2003b), onde a ordem de suscetibilidade quanto ao grau de torra foi de arabinose>galactose>manose>glicose, comprovados por Garcia et al. (2009).

5.3 Avaliação dos efeitos das misturas nas concentrações dos carboidratos

5.3.1 Planejamento experimental para estudo das misturas de café arábica, trigo e soja

Considerando as misturas de trigo e soja adicionadas ao café, seguindo o planejamento experimental centróide simplex (Figura 8 – Tabela 1), pode-se observar, comparando-se na Figura 8 os cromatogramas dos padrões de carboidratos (A) com o das matrizes puras de café arábica (B), trigo (C), soja (D), que existem características distintas entre as matrizes, demonstradas pelos teores reportados na Tabela 8.

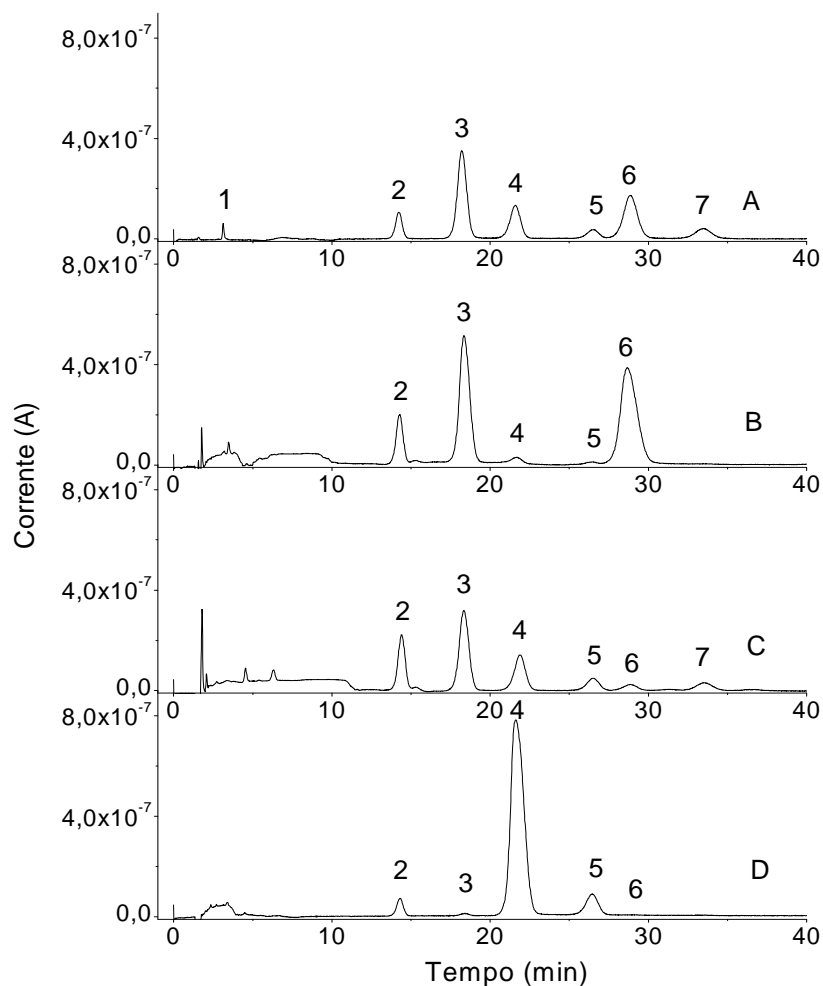


Figura 8 - Cromatogramas de carboidratos utilizando o método HPAEC-PAD: (A) Padrão 10% (v/v), (B) Café arábica 100%, (C) Soja 100%, (D) Trigo 100% (diluição 1:3 (v/v)). Picos: (1) Manitol, (2) Arabinose, (3) Galactose, (4) Glicose, (5) Xilose, (6) Manose e (7) Frutose. Fase móvel – isocrático: NaOH 1,4 mmol L⁻¹ (eluente: 0 – 45 min e re-equilíbrio: 57,6–72,6 min) e NaOH 300 mmol L⁻¹ (regeneração: 45,1- 57,5 min). Vazão: 1,0 mL min⁻¹; vol. injeção: 20,0 µL; pré-coluna e coluna: CarboPac PA-1 à T: 28°C; forma do pulso amperométrico - ED-50-Au: + 0,20 V (400 ms); + 0,65 V (200 ms) e - 0,20 V (400 ms).

Na matriz de café arábica puro destacam-se com as maiores concentrações a galactose (pico n^o 3) (5,76%) e a manose (pico n^o 6) (7,06%). Embora, existam poucos estudos citados na literatura com teores de carboidratos totais para o café, considerando-se ainda as variações de tipo de cultivar, condições de cultivo, safra, defeitos, bem como, da metodologia analítica empregada, estes valores confirmam a mesma tendência demonstrada nos estudos realizados por Oosterveld et al. (2003b) e Garcia et al. (2009), compatível se considerarmos a quebra dos constituintes da parede celular do café reportados por Buckeridge (2000), com predominância dos polissacarídeos arabinogalactanos e galactomananos, e em menor proporção de xiloglucanos.

Tabela 8 - Teores em % (m/m) dos monossacarídeos de acordo com o planejamento centróide simplex das matrizes de café arábica, soja e trigo. (N = 2 para todos os pontos, exceto para o ponto central da mistura ternária com N = 3)

Código (Tabela 1) Composição das amostras	1 café 100 %	2 soja 100 %	3 trigo 100 %	4 café 50 % soja 50%	5 café 50 % trigo 50%	6 trigo 50% soja 50%	7 café 34 % trigo 33% soja 33%	8 café 66% trigo17% soja 17%	9 café 17% soja 17 trigo 66%	10 café 17% soja 66% trigo 17%
Manitol*	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Arabinose	1,82	2,32	2,44	2,08	2,13	2,56	2,20 2,37	2,13	2,38	2,28
Arabinose*	2,23	2,39	2,81	2,28	2,26	2,44	2,24	2,24	2,35	-
Média ± s.d.	2,02 ±0,29	2,36 ±0,05	2,63 ±0,27	2,18 ±0,14	2,20 ±0,09	2,50 ±0,09	2,27 ±0,09	2,19 ±0,08	2,37 ±0,02	-
Galactose	5,65	3,40	0,35	4,58	3,21	2,01	3,48 3,65	4,74	1,94	3,66
Galactose*	5,87	3,48	0,40	4,88	3,23	2,09	3,62	4,97	2,08	-
Média ± s.d.	5,76 ±0,16	3,44 ±0,06	0,36 ±0,04	4,73 ±0,21	3,22 ±0,01	2,05 ±0,06	3,58 0,09	4,85 ±0,16	2,01 ±0,10	-
Glicose	0,29	1,47	38,68	0,88	19,59	19,52	11,47 11,80	7,59	29,39	7,63
Glicose*	0,22	1,51	42,82	0,90	19,52	20,66	12,11	8,04	31,06	-
Média ± s.d.	0,26 ±0,04	1,49 ±0,03	40,75 ±2,93	0,89 ±0,01	19,55 ±0,06	20,09 ±0,80	11,79 0,32	7,82 ±0,32	30,22 ±1,18	-
Xilose	0,08	0,54	3,89	0,34	2,13	2,13	1,57 1,63	0,76	2,55	1,01
Xilose*	0,07	0,59	4,48	0,31	2,09	2,36	1,55	0,81	2,84	-
Média ± s.d.	0,07 ±0,01	0,56 ±0,03	4,18 ±0,42	0,32 ±0,02	2,11 ±0,02	2,24 ±0,16	1,58 0,04	0,78 ±0,04	2,70 ±0,21	-
Manose	6,86	0,38	0,07	3,91	3,99	0,31	2,88 3,04	5,32	1,60	1,71
Manose*	7,26	0,36	0,00	4,30	4,29	0,28	3,15	5,36	1,67	-
Média ± s.d.	7,06 ±0,28	0,37 ±0,02	-	4,11 ±0,27	4,14 ±0,21	0,30 ±0,02	3,02 0,14	5,34 ±0,03	1,63 ±0,05	-
Frutose	n.d.	1,11	n.d.	0,49	0,09	0,53	0,33 0,44	0,20	0,20	0,70
Frutose*	n.d.	1,09	n.d.	0,52	n.d.	0,63	0,44	0,18	0,28	n.d
Média ± s.d.	n.d.	1,10 ±0,01	n.d.	0,50 ±0,02	-	0,58 ±0,07	0,41 0,07	0,19 ±0,02	0,24 ±0,05	n.d

* duplicata d.p = desvio padrão n.d. = não detectado

Observando-se o cromatograma para o soja puro, nota-se o aparecimento do pico nº 7 da frutose com um teor de 1,10%, que discrimina a matriz, uma vez que este não havia sido detectado nem para o café arábica e nem para o trigo, provavelmente, advindo da hidrólise da matriz que conforme descrição de Liu (1997) e Rivas (2006) contém 5,0% de sacarose, degradando-se em glicose e frutose. Segundo os autores, o soja é isento de amido e contém 3,6% de arabinosilanos e 2,3% de galactanos, o que justificaria a presença dos teores reportados na Tabela 8 de arabinose (pico nº 2 com 2,36%), galactose (pico nº 3 com 3,44%) e xilose (pico nº 5 com 0,56%).

Enquanto para trigo, pode-se observar que destacam-se as concentrações elevadas, principalmente de glicose (pico n° 4) apresentando um teor de 40,75% para a matriz pura, e em segundo lugar o pico n° 5 da xilose, amostra que necessitou ser diluída para a quantificação. Considerando a constituição do trigo, que segundo Pomeranz (1988), 80% do endosperma é amido, basicamente composto por glicose, justificaria os elevados teores obtidos para este carboidrato. Já os 88% do polissacarídeo arabinoxilano descrito por Lineback e Rasper (1998), contido na parede celular do endosperma do grão de trigo, deve ter produzido o teor de 4,18% para a xilose e de 2,63% para a arabinose.

A sobreposição dos cromatogramas na Figura 9 permite que se observe a variação de um determinado carboidrato, conforme a proporção de adição deste na mistura café-soja-trigo. É possível notar a redução no teor da manose na medida em que ocorre a adição de soja e trigo ao café, evidenciado pelo decréscimo gradual no pico n° 5 da seqüência do café 100%, 66%, 50%, 34% até a menor proporção de 17%. Por outro lado, ocorre um aumento acentuado da glicose na proporção de 33% de trigo, em função deste ser o carboidrato característico desta matriz. Nesta proporção de mistura também se observa o maior teor de frutose, referente ao soja. A arabinose (pico n° 1) praticamente não sofreu alteração.

A fim de avaliar o efeito da mistura de soja (*s*), trigo (*t*) e café arábica (*ca*) nos teores dos carboidratos totais, obtidos por meio de um planejamento centróide simplex, apresentados na Tabela 8, foram testados diferentes modelos matemáticos.

A Análise de Variância (ANOVA) foi usada para testar a adequação destes modelos aos resultados experimentais individuais dos carboidratos totais, conforme apresentado na Tabela 9.

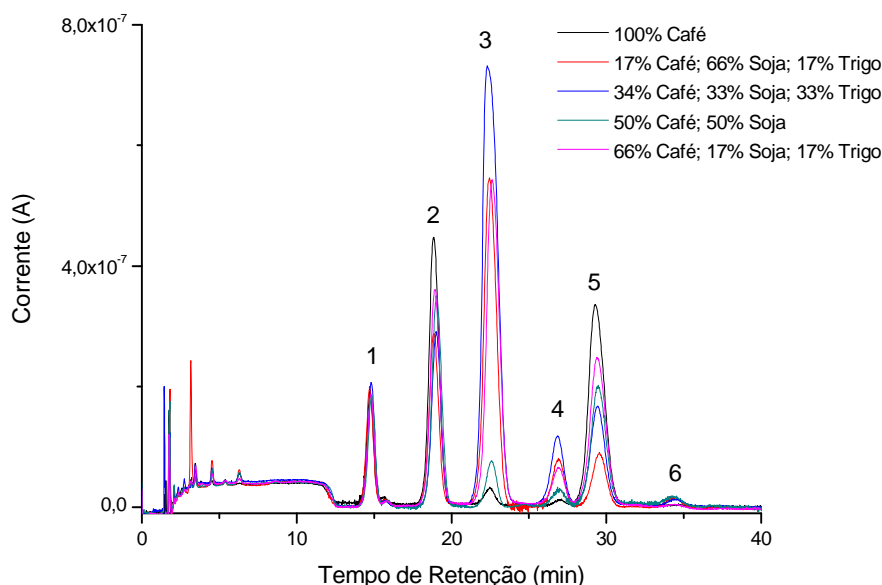


Figura 9 – Sobreposição dos cromatogramas de carboidratos de mistura de matrizes café-soja-trigo aplicando centróide simplex: Picos: (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose, (4) Xilose, (5) Manose e (6) Frutose. Fase móvel – isocrático: NaOH $1,4 \text{ mmol L}^{-1}$ (elute: 0 – 45 min e re-equilíbrio: 57,6–72,6 min) e NaOH 300 mmol L^{-1} (regeneração: 45,1- 57,5 min). Vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; vol. injeção: $20,0 \text{ }\mu\text{L}$; pré-coluna e coluna: CarboPac PA-1 à T: 28°C ; forma do pulso amperométrico - ED-50-Au: + $0,20 \text{ V}$ (400 ms); + $0,65 \text{ V}$ (200 ms) e - $0,20 \text{ V}$ (400 ms).

Para os resultados das concentrações obtidas na Tabela 8 o modelo que melhor se ajustou foi o linear, para arabinose, xilose e frutose, considerando que os valores de F reportados na Tabela 9 de 0,28; 0,37 e 0,91, respectivamente, foram menores que o valor da distribuição F com 7 e 10 graus de liberdade ($F_{7,10}$) tabelado de 3,14, indicando que não houve falta de ajuste para o modelo selecionado em nível de confiança de 95%. Além disso, os valores da razão entre as médias quadráticas da regressão e do resíduo (MQ_R/MQ_r), em nível de confiança de 95%, foram de 16,24; 777,56 e 533,66, respectivamente, sendo maiores quando comparados ao valor da distribuição $F_{2,17}$ tabelado de 3,59, indicando que a regressão foi significativa e útil para fazer previsões. Para a galactose e a manose, o modelo que melhor se ajustou foi o quadrático, não apresentando falta de ajuste no valor da distribuição de $F_{4,10}$ (3,48), ao nível de confiança de 95%. A regressão foi altamente significativa no valor da distribuição de $F_{5,14}$ (2,96) e mostrou-se útil para fazer previsões.

Tabela 9 - Análise da variância (ANOVA) para ajuste dos modelos adotados para as concentrações de carboidratos totais das matrizes puras de café arábica, soja e trigo e suas misturas.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MQ)	F	p
Arabinose					
Regressão (R)	0,491825	2	0,245912	16,24	0,00
Resíduos (r)	0,267442	17	0,015144		
F. Ajuste (f_{aj})	0,042169	7	0,006024	0,28	0,95
E. puro (eq)	0,215272	10	0,021527		
Total (T)	0,749267	19	0,039435		
% de variância explicada = 65,60; % máxima de variância explicável = 71,67					
Galactose					
Regressão (R)	44,77753	5	8,95550	490,96	0,00
Resíduos (r)	0,25537	14	0,01824		
F. Ajuste (f_{aj})	0,12308	4	0,03077	2,33	0,13
E. puro (eq)	0,13228	10	0,01323		
Total (T)	45,032890	19	2,37015		
% de variância explicada = 99,43; % máxima de variância explicável = 99,71					
Xilose					
Regressão (R)	28,77152	2	14,38576	777,56	0,00
Resíduos (r)	0,31452	17	0,01850		
F. Ajuste (f_{aj})	0,06451	7	0,00922	0,37	0,90
E. puro (eq)	0,25001	10	0,02500		
Total (T)	29,08604	19	1,53084		
% de variância explicada = 98,92; % máxima de variância explicável = 99,14					
Manose					
Regressão (R)	99,83192	5	19,96638	994,09	0,00
Resíduos (r)	0,28119	14	0,02008		
F. Ajuste (f_{aj})	0,03904	4	0,00976	0,40	0,80
E. puro (eq)	0,24215	10	0,02421		
Total (T)	100,11311	19	5,26911		
% de variância explicada = 99,72; % máxima de variância explicável = 99,76					
Frutose					
Regressão (R)	2,14363398823	2	1,07182	533,66	0,00
Resíduos (r)	0,034143553760 58	17	0,00201		
F. Ajuste (f_{aj})	0,013271612093 9	7	0,00190	0,91	0,54
E. puro (eq)	0,020871941666 666	10	0,00209		
Total (T)	2,17777754	19	0,11462		
% de variância explicada = 98,43; % máxima de variância explicável = 99,08					

Os coeficientes de determinação (R^2) para o ajuste dos modelos foram calculados segundo Barros Neto; Scarminio; Bruns (2003) e o intervalo de confiança pela Equação (7), cujos resultados para os modelos lineares e quadrático com o teste de significância estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Teste de significância para os coeficientes dos modelos lineares e quadráticos para as concentrações de carboidratos totais obtidos através do planejamento centróide simplex das misturas de café arábica, soja e trigo.

Coeficiente	Valor calculado	Erro padrão	Intervalo de confiança (95%)
Arabinose			
x_1	1,99	0,06	1,85 a 2,12
x_2	2,35	0,07	2,21 a 2,50
x_3	2,56	0,06	2,42 a 2,69
Galactose			
x_1	5,78	0,09	5,58 a 5,98
x_2	3,43	0,09	3,23 a 3,63
x_3	0,34	0,09	0,14 a 0,54
$x_1 x_2$	0,99	0,42	0,09 a 1,89
$x_1 x_3$	1,02	0,42	0,13 a 1,92
$x_2 x_3$	0,92	0,42	0,02 a 1,82
Xilose			
x_1	0,07	0,07	-0,08 a 0,22
x_2	0,52	0,07	0,36 a 0,68
x_3	4,10	0,07	3,95 a 4,25
Manose			
x_1	7,09	0,10	6,88 a 7,30
x_2	0,36	0,10	0,15 a 0,57
x_3	0,02	0,10	-0,18 a 0,23
$x_1 x_2$	1,67	0,44	0,72 a 2,61
$x_1 x_3$	2,47	0,44	1,53 a 3,41
$x_2 x_3$	0,38	0,44	-0,57 a 1,33
Frutose			
x_1	0,00	0,02	-0,04 a 0,05
x_2	1,09	0,02	1,04 a 1,14
x_3	0,04	0,02	0,00 a 0,09

x_1 = café arábica; x_2 = soja e x_3 = milho

Observando-se os resultados dos valores calculados para cada carboidrato na Tabela 10, considerando que seus valores estiveram dentro do intervalo de confiança de 95%, estes coeficientes foram utilizados para expressar as Equações descritivas para cada mistura (Equações (8) a (12)), onde, \hat{y} foi a resposta prevista pelo modelo para o café arábica (representado por ca), para a

soja (s) e para o trigo (t), sendo os valores entre parênteses os erros padrão destes coeficientes, que estão apresentadas conjuntamente com as respostas gráficas dada pelas superfícies de resposta, mostradas nas Figuras de 10 a 14.

Quanto maior for o valor do coeficiente para cada matriz, maior será sua contribuição para o referido carboidrato. Portanto, observando os valores dos coeficientes para a Equação (8), nota-se que as três matrizes, café (ca), soja (s) e trigo (t) contribuíram para o aumento do teor de arabinose, sendo que o maior aumento foi observado pelo valor do coeficiente do trigo (2,56). A Figura 10 ilustra a superfície de resposta para esta regressão linear e nela pode-se visualizar melhor esta afirmação, observando a coloração mais intensa no vértice do triângulo com composição de trigo puro, reduzindo-se a coloração na medida em que se vai para o vértice em que se tem café puro, sendo possível desta maneira verificar a predominância de cada matriz.

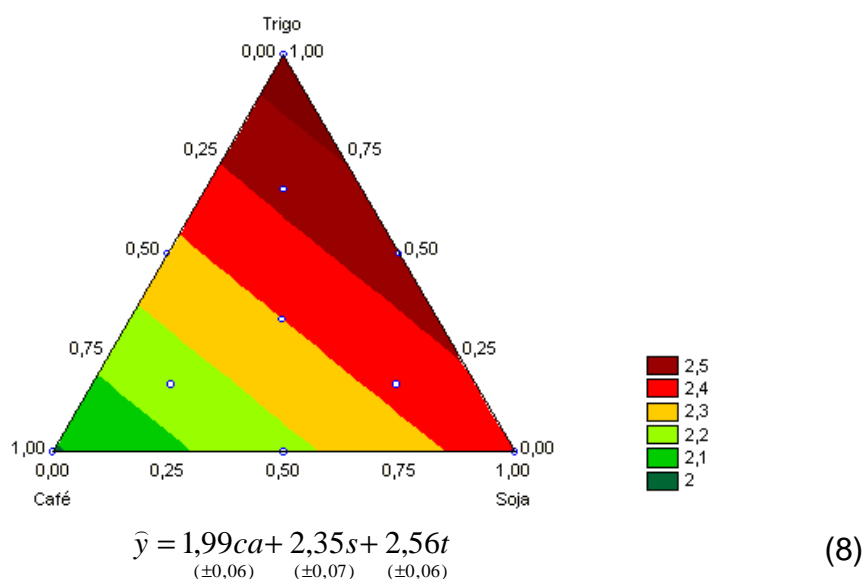


Figura 10 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (ca), soja (s) e trigo (t), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato arabinose, apresentando-se predominante na matriz de trigo.

Por semelhante modo, é possível notar observando a Figura 11, que a concentração de xilose foi a mais afetada pelo componente trigo, apresentando um coeficiente de 4,10 na Equação (9), onde a coloração foi mais intensa no vértice do triângulo com composição de trigo puro. Na Equação (9) o coeficiente para o café (0,07) não foi significativo, o que concorda com estudos de Garcia et

al. (2009), que descrevem o baixo teor de xilose como sendo característico do café, com um valor encontrado para este carboidrato de 0,14% (m/m).

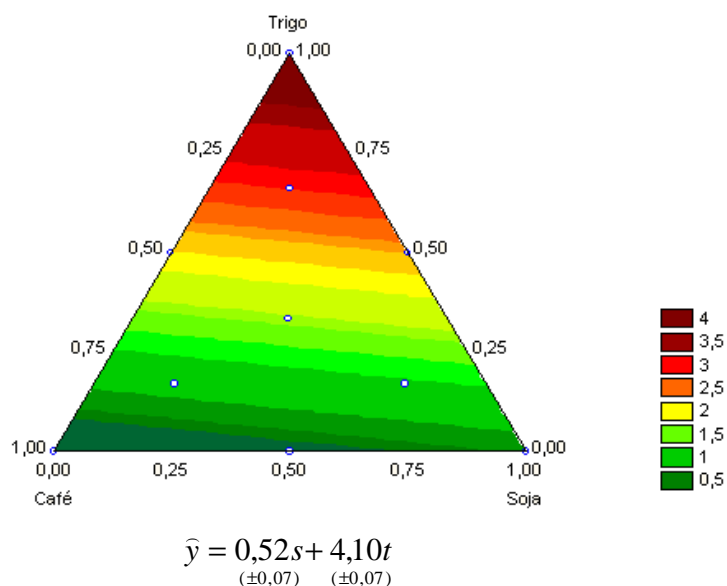


Figura 11 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), soja (*s*) e trigo (*t*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato xilose, apresentando-se predominante na matriz de trigo.

Na Equação (10), os coeficientes de café (0,00) e trigo (0,04) não foram significativos, portanto, os mesmos não aparecem na Equação. Observa-se pelo coeficiente de 1,09 que somente o soja contém frutose, onde a Figura 12 mostra uma coloração mais intensa no vértice do triângulo com composição deste cereal.

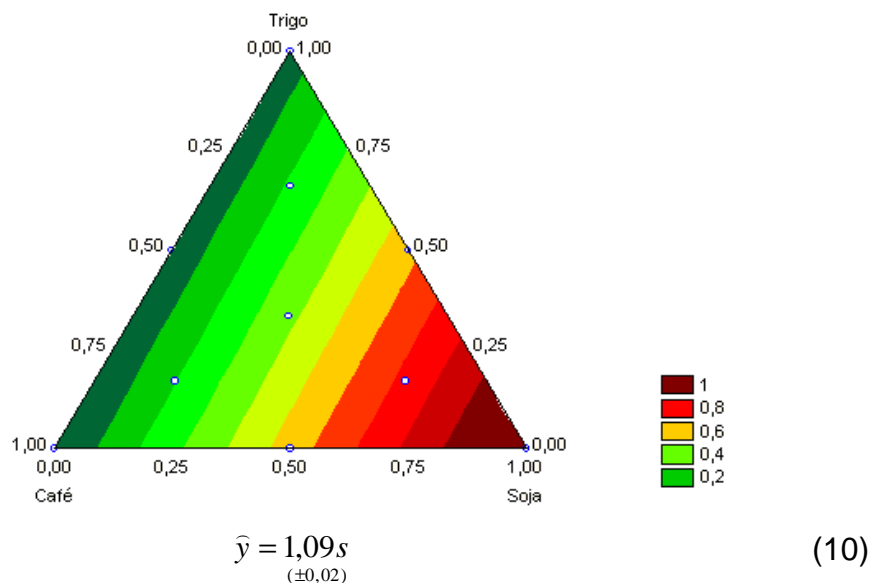
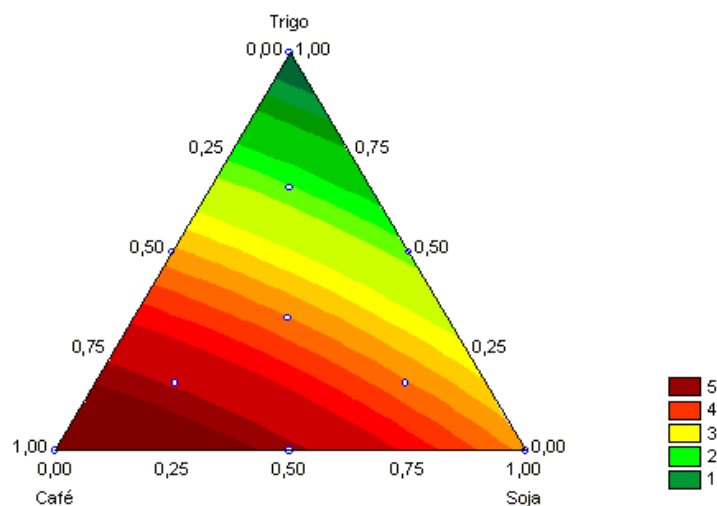


Figura 12 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), soja (*s*) e trigo (*t*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato frutose, apresentando-se predominante na matriz de soja.

Já na Figura 13, observa-se pela Equação (11), que as matrizes de café (*ca*), soja (*s*) e trigo (*t*) contribuem para o aumento do teor de galactose, sendo que o café (5,78) foi o maior responsável seguido da soja (3,43), podendo-se notar ainda pelo modelo quadrático, um maior efeito sinérgico entre as interações binárias ocorreu entre café e trigo (*cat*) (1,02).



$$\hat{y} = 5,78ca + 3,43s + 0,34t + 0,99cas + 1,02cat + 0,92st \quad (11)$$

$(\pm 0,09) \quad (\pm 0,09) \quad (\pm 0,09) \quad (\pm 0,42) \quad (\pm 0,42) \quad (\pm 0,43)$

Figura 13 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), soja (*s*) e trigo (*t*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato galactose, apresentando-se predominante na matriz de café.

Observando-se a Figura 14 é possível verificar que os teores de manose tiveram maiores contribuições da matriz café (7,09), conforme o modelo linear descrito pela Equação (12). Entre as interações binárias o maior efeito sinérgico foi entre café e trigo (*cat*) com coeficiente de 2,47.

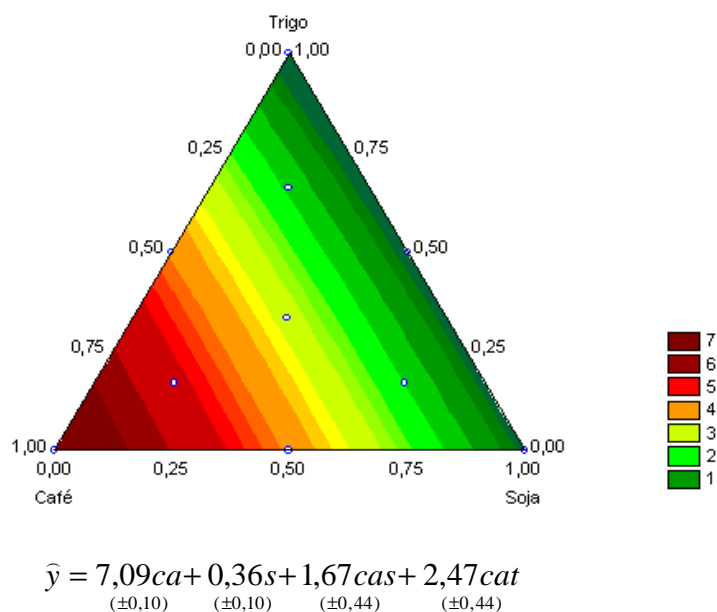


Figura 14 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), soja (*s*) e trigo (*t*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato manose, apresentando-se predominante na matriz de café.

Para a glicose nenhum modelo se ajustou aos resultados das concentrações obtidas através do planejamento experimental. O baixo teor de glicose encontrado de 0,26% (m/m), conforme Tabela 8, é característico do café, segundo Garcia et al. (2009), que encontrou para amostra de café arábica um teor de 0,18% (m/m). Portanto, altos teores de glicose em amostras de café podem ser indicativos da adição de trigo.

Através da Tabela 8 podemos ainda observar que não foi possível detectar manitol para estas matrizes nas condições experimentais utilizadas, cujo limite de detecção para este carboidrato foi de 0,01% (m/m).

Após o estudo dos modelos matemáticos individuais para os planejamentos experimentais, aplicou-se uma ferramenta estatística para verificar a consistência dos resultados, baseada na distribuição expressa pela variância do conjunto de dados.

A Figura 15 representa o gráfico dos escores dos Fatores 1 e 2, onde este dois primeiros fatores explicam juntos 94,80% da variância total contida nos dados. Neste gráfico é possível observar a distribuição dos resultados, com a

formação do triângulo, separando visivelmente as matrizes puras, as misturas binárias e ternárias e ainda seus pontos axiais.

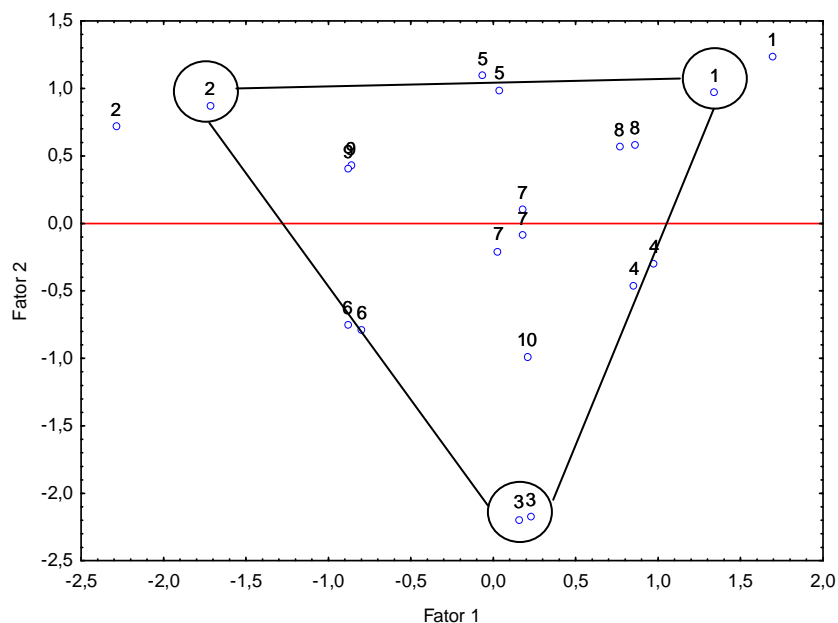


Figura 15 - Gráfico dos escores entre o Fator 1 com o Fator 2 dos dados cromatográficos das 20 amostras das matrizes puras e misturas de café arábica, soja e trigo.

Na seqüência são apresentados os resultados para misturas de outras matrizes, efetuadas e analisadas de semelhante forma, à descrita anteriormente.

5.3.2 Planejamento experimental para estudo das misturas de café arábica, milho e soja

Considerando as misturas de milho e soja adicionadas ao café, seguindo o planejamento experimental do tipo centróide simplex, pode-se observar pelos cromatogramas mostrados na Figura 16 para as matrizes puras de café arábica, milho e soja e misturas dos padrões de carboidratos, que é possível distingui-las, pelas características distintas existentes entre elas (Tabela 11).

Na matriz de café arábica puro destacaram-se as maiores concentrações de galactose (6,38%) e manose (8,18% (m/m)). Para a soja 100% o maior teor foi de frutose (1,07%), valores similares que concordaram com o

estudo anteriormente descrito para o café, trigo e soja, considerando o coeficiente de variação (CV) de 2,86%. Já para o milho puro destacaram-se os elevados teores de glicose e xilose de 44,53% e 1,99%, respectivamente.

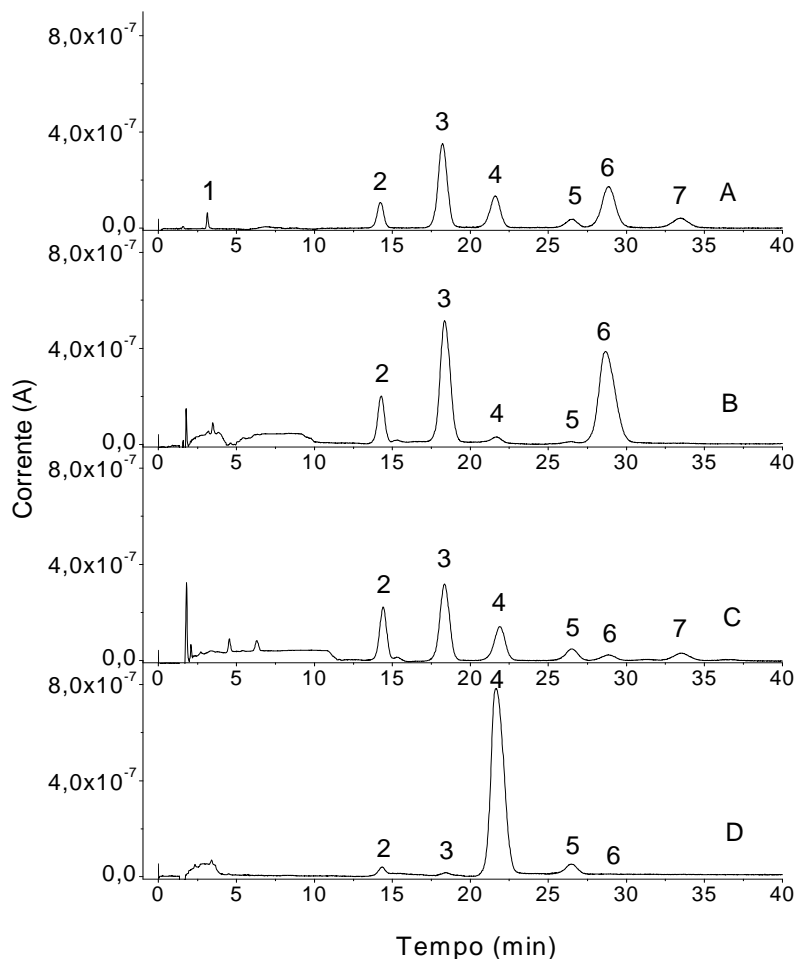


Figura 16 - Cromatogramas de carboidratos utilizando HPAEC-PAD: (A) Padrão 10% (v/v), (B) Café arábica 100%, (C) Soja 100%, (D) Milho 100% (diluição 1:3 (v/v)). Picos: (1) Manitol, (2) Arabinose, (3) Galactose, (4) Glicose, (5) Xilose, (6) Manose e (7) Frutose. Fase móvel – isocrático: NaOH 1,4 mmol L⁻¹ (elute: 0 – 45 min e re-equilíbrio: 57,6–72,6 min) e NaOH 300 mmol L⁻¹ (regeneração: 45,1- 57,5 min). Vazão: 1,0 mL min⁻¹; vol. injeção: 20,0 µL; pré-coluna e coluna: CarboPac PA-1 à T: 28°C; forma do pulso amperométrico - ED-50-Au: + 0,20 V (400 ms); + 0,65 V (200 ms) e - 0,20 V (400 ms).

Tabela 11 - Concentrações em % (m/m) dos monossacarídeos de acordo com o planejamento centróide simplex das matrizes de café arábica, milho e soja. (N = 2 para todos os pontos, exceto para o ponto central da mistura ternária com N = 3)

Código (Tabela 1)	1 café 100 %	2 milho 100 %	3 soja 100 %	4 café 50 % soja 50%	5 café 50 % milho 50%	6 soja 50% milho 50%	7 café 34 % soja 33% trigo 33%	8 café 66% soja 17% milho 17%	9 café 17% soja 17% milho 66%	10 café 17% soja 66% milho 17%
Manitol*	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Arabinose	2,18	1,01	2,38	2,33	1,60	1,76	1,82 1,90 1,78	1,98	1,41	2,11
Arabinose*	1,99	1,12	2,43	2,29	1,68	1,74	1,86 1,74 1,76	1,95	1,45	2,13
Média ± s.d.	2,09 ±0,13	1,06 ±0,07	2,40 ±0,04	2,31 ±0,03	1,64 ±0,06	1,76 ±0,01	1,81 ±0,06	1,97 ±0,02	1,43 ±0,03	2,12 ±0,02
Galactose	6,40	0,34	3,81	4,99	3,37	2,14	3,44 3,59 3,64	4,52	2,06	3,42
Galactose*	6,36	0,34	3,88	5,01	3,46	2,18	3,46 3,37 3,26	4,44	1,92	3,40
Média ± s.d.	6,38 ±0,037	0,34 ±0,00	3,84 ±0,05	5,00 ±0,01	3,42 ±0,07	2,16 ±0,02	3,46 ±0,14	4,48 ±0,05	1,99 ±0,10	3,41 ±0,01
Glicose	0,25	44,67	1,68	0,96	22,32	26,08	13,93 13,92 13,99	8,00	30,89	7,95
Glicose*	0,24	44,39	1,68	0,89	22,93	24,51	13,24 13,27 13,07	7,79	30,56	7,97
Média ± s.d.	0,24 ±0,01	44,53 ±0,19	1,68 ±0,00	0,93 ±0,05	22,62 ±0,44	25,29 ±1,11	13,57 ±0,42	7,89 ±0,15	30,73 ±0,23	7,96 ±0,04
Xilose	0,07	2,08	0,60	0,33	1,10	1,36	0,91 0,87 0,98	3,08	1,70	0,77
Xilose*	0,06	1,91	0,61	0,34	1,16	1,39	0,87 0,85 0,86	3,01	1,40	0,70
Média ± s.d.	0,07 ±0,00	1,99 ±0,12	0,61 ±0,01	0,33 ±0,01	1,13 ±0,04	1,38 ±0,02	0,89 ±0,05	3,04 ±0,05	1,55 ±0,21	0,74 ±0,05
Manose	8,15	0,03	0,37	4,68	4,48	0,22	3,13 3,60 3,22	5,20	1,59	1,60
Manose*	8,22	0,03	0,36	4,60	4,65	0,20	3,00 3,94 2,87	5,12	1,53	1,57
Média ± s.d.	8,18 ±0,05	0,03 ±0,00	0,36 ±0,01	4,64 ±0,05	4,56 ±0,12	0,21 ±0,01	3,29 ±0,40	5,16 ±0,05	1,56 ±0,04	1,58 ±0,02
Frutose	n.d	n.d	1,04	0,55	n.d	0,50	0,36 0,38 0,37	0,24	0,18	0,58
Frutose*	n.d	n.d	1,10	0,49	n.d	0,43	0,31 0,32 0,38	0,17	0,18	0,64
Média ± s.d.	n.d	n.d	1,07 ±0,04	0,52 ±0,04	n.d	0,47 ±0,05	0,35 ±0,03	0,20 ±0,05	0,18 ±0,00	0,61 ±0,04

*duplicata

d.p. = desvio padrão

n.d. = não detectado

A sobreposição dos cromatogramas na Figura 17 permite que se observe a variação de um determinado carboidrato, conforme a proporção de adição deste na mistura café-soja-milho. Da mesma maneira que a sobreposição para o café-soja-trigo da Figura 9, ocorre a redução da manose com a adição de soja e trigo ao café, percebida pelo decréscimo gradual no pico n° 5 da seqüência do café 100%, 66%, 50%, 34% e 17%. Por outro lado, o teor de glicose está acentuado na proporção de 17% de milho, em função deste ser o carboidrato característico desta matriz, elevando também a xilose. Porém, a adição do soja eleva a frutose, característico desta matriz. A arabinose (pico n°1) se mantém praticamente estável.

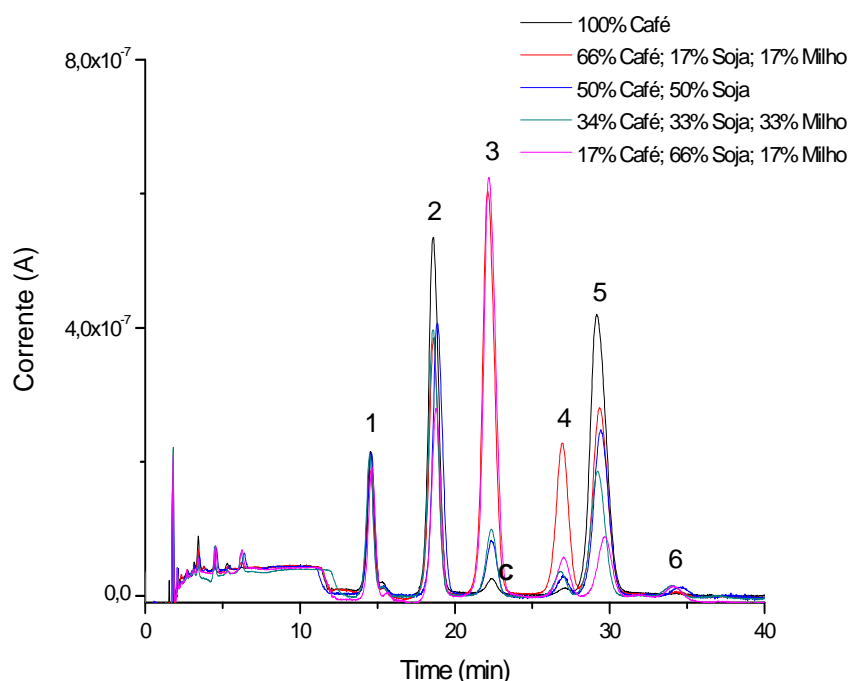


Figura 17 - Sobreposição dos cromatogramas de carboidratos de mistura de matrizes café-soja-milho aplicando centróide simplex: Picos: (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose, (4) Xilose, (5) Manose e (6) Frutose. Fase móvel – isocrático: NaOH $1,4 \text{ mmol L}^{-1}$ (elute: 0 – 45 min e re-equilíbrio: 57,6–72,6 min) e NaOH 300 mmol L^{-1} (regeneração: 45,1- 57,5 min). Vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; vol. injeção: $20,0 \text{ }\mu\text{L}$; pré-coluna e coluna: CarboPac PA-1 à T: 28°C ; forma do pulso amperométrico - ED-50-Au: + $0,20 \text{ V}$ (400 ms); + $0,65 \text{ V}$ (200 ms) e - $0,20 \text{ V}$ (400 ms).

A fim de avaliar o efeito da adição de milho (*m*) e soja (*s*) ao café arábica (*ca*), efetuada por planejamento de misturas do tipo centróide simplex, utilizando-se os teores dos carboidratos totais da Tabela 11, diferentes modelos matemáticos foram testados para os carboidratos individuais e sua adequação

aos dados experimentais foi verificada por ANOVA, resultados reportados na Tabela 12.

Tabela 12 - Análise da variância para ajuste dos modelos adotados para as concentrações de carboidratos totais das matrizes puras de café arábica, milho e soja e suas misturas.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MQ)	F	p
Arabinose					
Regressão (R)	2,27580	2	1,13790	31,92	0,00*
Resíduos (r)	0,71294	20	0,03565		
F. Ajuste (f_{aj})	0,30447	7	0,04350	1,38	0,29*
E. puro (eq)	0,40847	13	0,03142		
Total (T)	2,98874	22	0,13585		
% de variância explicada = 76,15; % máxima de variância explicável = 86,29					
Galactose					
Regressão (R)	42,84922	2	21,42461	49,57	0,00
Resíduos (r)	8,64465	20	0,43223		
F. Ajuste (f_{aj})	4,57148	7	0,65307	2,08	0,12
E. puro (eq)	4,07317	13	0,31332		
Total (T)	51,49388	22	2,34063		
% de variância explicada = 83,21; % máxima de variância explicável = 92,10					
Glicose					
Regressão (R)	2992,87506	2	1496,43753	32,55	0,00
Resíduos (r)	919,42365	20	45,97120		
F. Ajuste (f_{aj})	394,53566	7	56,36224	1,40	0,29
E. puro (eq)	524,88799	13	40,37600		
Total (T)	3912,29871	22	177,83176		
% de variância explicada = 76,50; % máxima de variância explicável = 86,58					
Manose					
Regressão (R)	114,99109	2	57,49554	90,44	0,00*
Resíduos (r)	12,71416	20	0,63571		
F. Ajuste (f_{aj})	5,65589	7	0,80798	1,49	0,25*
E. puro (eq)	7,05827	13	0,54294		
Total (T)	127,70526	22	5,80478		
% de variância explicada = 86,66; % máxima de variância explicável = 94,47					

Para os resultados das concentrações obtidas por meio do planejamento experimental para arabinose, galactose, glicose e manose, o modelo que melhor se ajustou foi o linear, não apresentando falta de ajuste no valor da distribuição de $F_{2,20}$ (3,49), no nível de confiança de 95%. A regressão foi

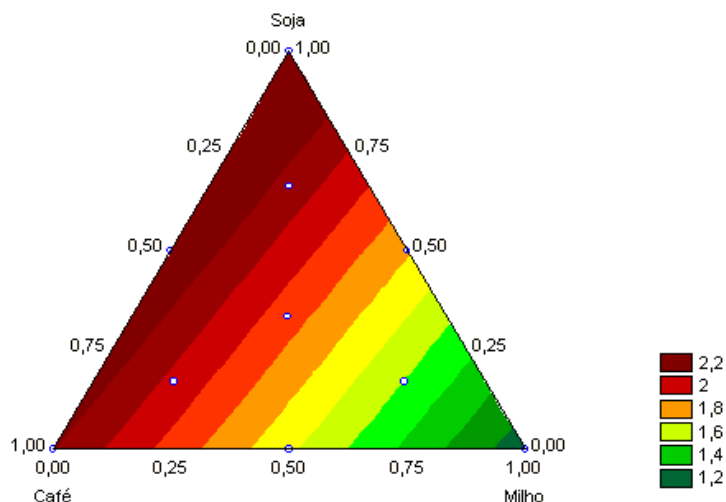
altamente significativa e útil para fazer previsões. Os coeficientes e os resultados dos testes de significância encontram-se na Tabela 13. As Equações (13) a (16) se referem aos modelos lineares para arabinose, galactose, glicose e manose, juntamente com as superfícies de resposta (Figuras 18 a 21).

Tabela 13 - Teste de significância para os coeficientes dos modelos lineares para as concentrações de carboidratos totais obtidos através do planejamento centróide simplex das misturas de café arábica, milho e soja.

Coeficiente	Valor calculado	Erro padrão	Intervalo de confiança (95%)
Arabinose			
x_1	2,10	0,10	1,89 a 2,32
x_2	1,14	0,10	0,93 a 1,34
x_3	2,29	0,10	2,09 a 2,49
Galactose			
x_1	6,26	0,35	5,52 a 7,00
x_2	0,78	0,34	0,07 a 1,49
x_3	3,47	0,34	2,77 a 4,18
Xilose			
x_1	-0,57	3,65	-8,18 a 7,04
x_2	41,17	3,50	33,87 a 48,47
x_3	5,11	3,50	-2,19 a 12,40
Manose			
x_1	8,39	0,43	7,50 a 9,28
x_2	0,74	0,41	-0,12 a 1,60
x_3	0,40	0,41	-0,46 a 1,26

x_1 = café arábica; x_2 = milho e x_3 = soja

Na Equação (13), observa-se que as três matrizes, café (*ca*), milho (*m*) e soja (*s*) contribuem para o aumento do teor de arabinose, sendo que o maior aumento ocorreu para o soja (2,29), através da superfície de resposta desta Equação pode-se visualizar esta afirmação (Figura 18).

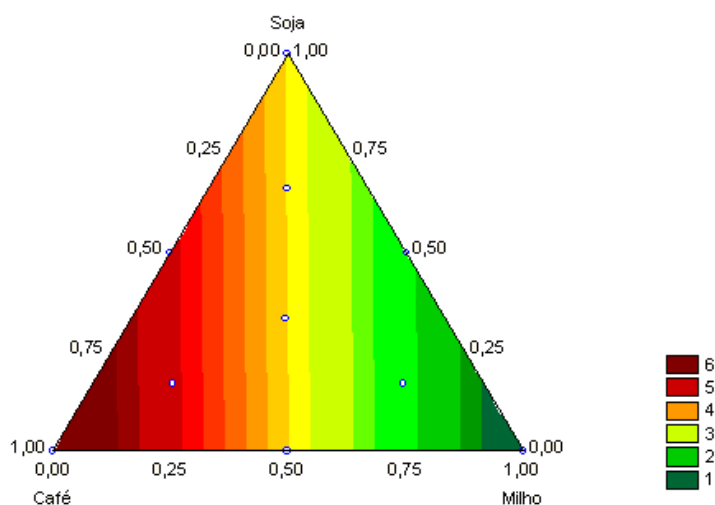


$$\hat{y} = 2,10ca + 1,14m + 2,29s \quad (13)$$

$(\pm 0,10) \quad (\pm 0,10) \quad (\pm 0,10)$

Figura 18 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (ca), milho (m) e soja (s), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato arabinose, apresentando-se predominante nas matrizes de soja e café.

Na Equação (14) o café (ca) é a matriz que mais contribui para o aumento do teor de galactose (6,26), seguido pela soja (s) (3,47) (Figura 19).



$$\hat{y} = 6,26ca + 0,78m + 3,47s \quad (14)$$

$(\pm 0,35) \quad (\pm 0,34) \quad (\pm 0,34)$

Figura 19 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (ca), milho (m) e soja (s), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato galactose, apresentando-se predominante na matriz de café.

Na Equação (15), podemos observar que o milho contribui para o aumento nos teores de glicose (41,17) quando adicionadas ao café. A Figura 20 ilustra a superfície de resposta para esta regressão e nela podemos melhor visualizar esta

afirmação, observando a coloração mais intensa no vértice do triângulo com composição de milho puro, os demais coeficientes não foram significativos.

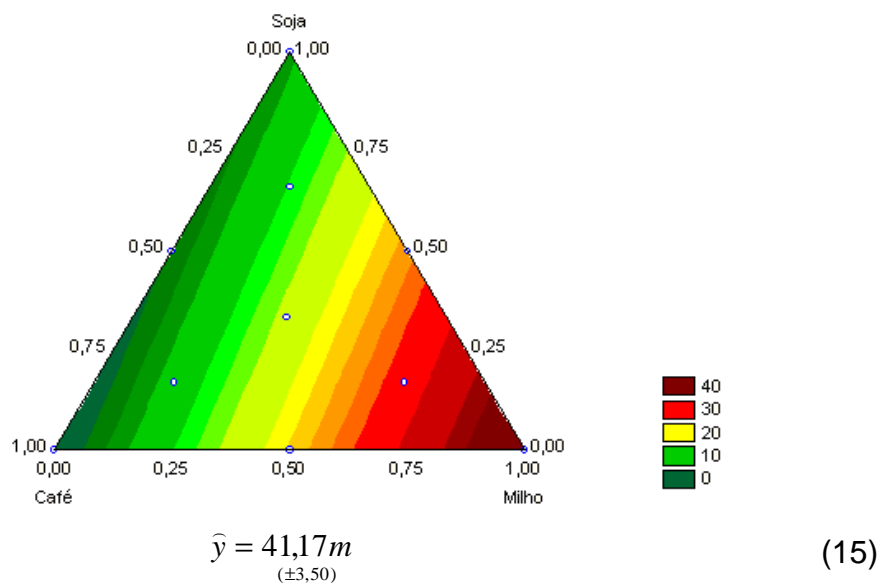


Figura 20 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), milho (*m*) e soja (*s*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato glicose, apresentando-se predominante na matriz de milho.

Pela Figura 21 é possível observar que a manose (8,39) é característica do café, sendo que através da Equação (16), podemos afirmar que os teores relativamente elevados de manose são provenientes somente do café. Os coeficientes de milho e soja para estes carboidratos não foram significativos.

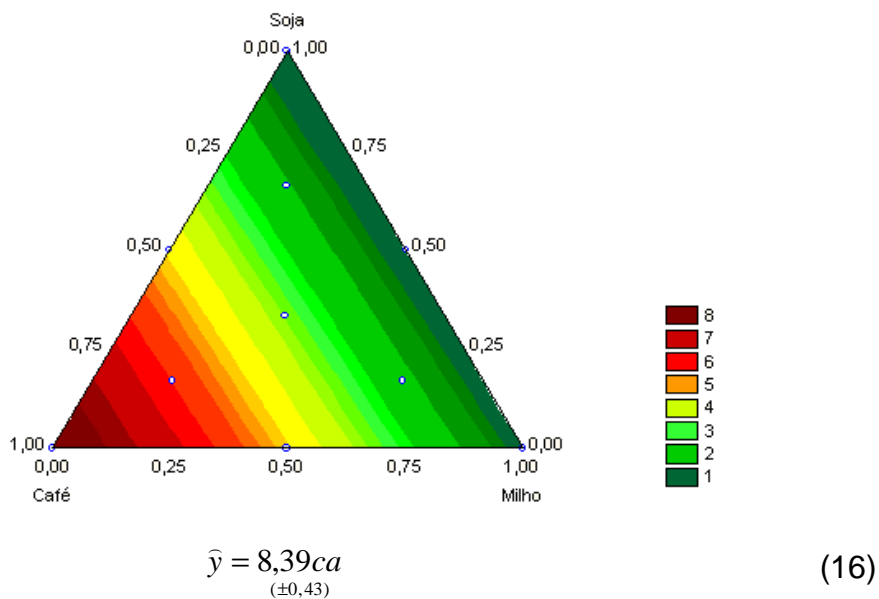


Figura 21 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), milho (*m*) e soja (*s*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato manose, apresentando-se predominante na matriz de café.

O manitol não foi detectado para estas amostras nestas condições experimentais, onde este resultado já era esperado, pois é o baixo teor de manitol é característico do café (GARCIA et al., 2009).

Para xilose e frutose nenhum modelo ajustou-se aos resultados das concentrações obtidas através deste planejamento experimental, embora elevados teores de frutose e xilose em café, segundo planejamento anterior, podem ser indicativos de adição de soja e milho, respectivamente.

A Figura 22 mostra o gráfico dos escores dos Fatores 1 e 2. Juntos estes dois fatores explicam 88,06% da variância total contida nos resultados. Neste gráfico é possível observar a distribuição dos dados, com a formação do triângulo, separando visivelmente as matrizes puras, as misturas binárias e ternárias, porém o mesmo não ocorre para os pontos axiais, quando comparado ao planejamento experimental anteriormente descrito.

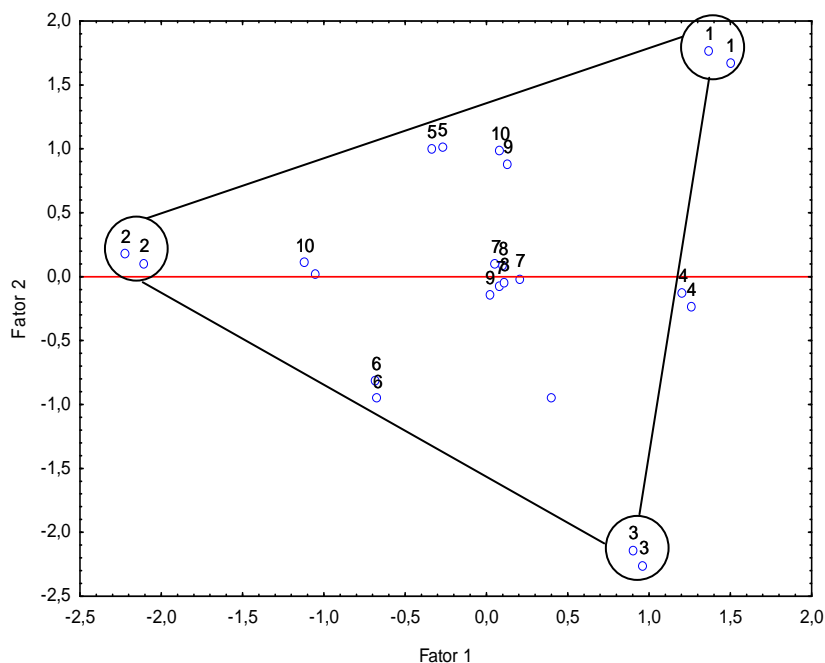


Figura 22 - Gráfico dos escores entre o Fator 1 com o Fator 2 dos resultados cromatográficos das 24 amostras das matrizes puras e misturas de café arábica, milho e soja.

5.3.3 Planejamento experimental para estudo das misturas de café Arábica, milho e trigo

Pode-se notar que existem características distintas, observando-se os cromatogramas das matrizes puras na Figura 23, para as misturas envolvendo adição de milho e trigo ao café arábica. Os teores reportados na Tabela 14 destacam para o café arábica puro, com as maiores concentrações para a galactose (6,75%) e a manose (8,88%), enquanto, o trigo apresenta maior teor de xilose (3,91%) e o milho de glicose (46,90%), valores que concordaram com o estudo anteriormente descrito para o café, soja e trigo e café, milho e soja, considerando os coeficientes de variação (CV) de 7,17% para a xilose e 3,01% para a glicose.

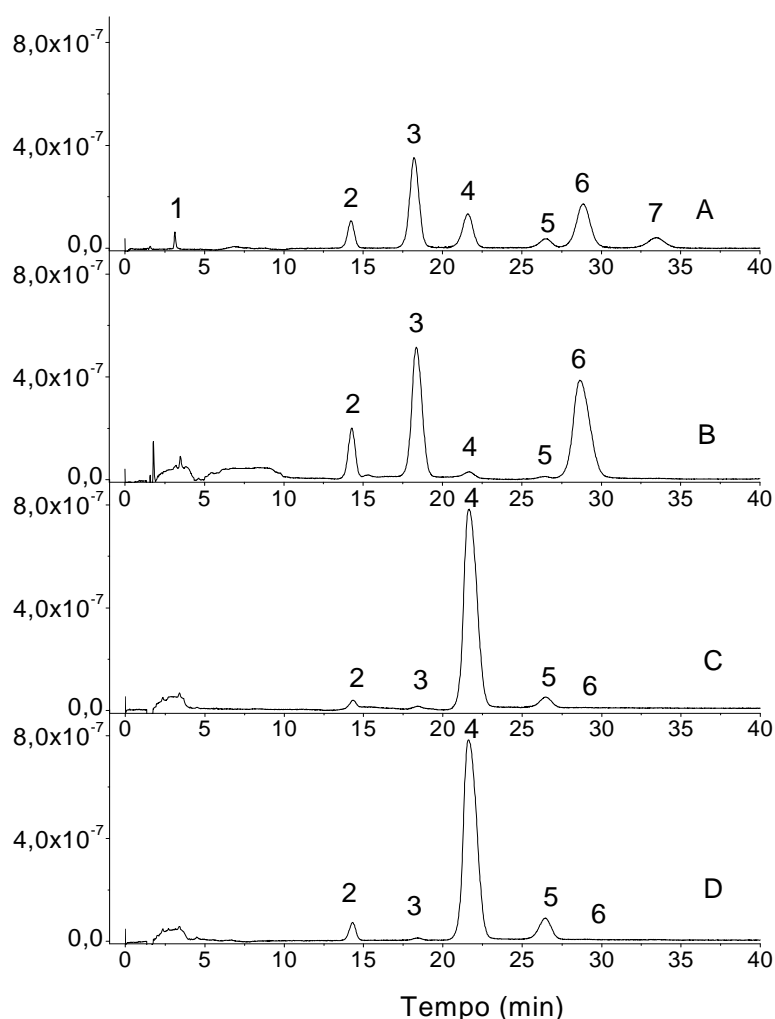


Figura 23 - Cromatogramas de carboidratos utilizando HPAEC-PAD: (A) Padrão 10% (v/v), (B) Café arábica 100%, (C) Milho 100% (diluição 1:3 (v/v)), (D) Trigo 100% (diluição 1:3 (v/v)). Picos: (1) Manitol, (2) Arabinose, (3) Galactose, (4) Glicose, (5) Xilose, (6) Manose e (7) Frutose. Fase móvel – isocrático: NaOH 1,4 mmol L⁻¹ (elute: 0 – 45 min e re-equilíbrio: 57,6–72,6 min) e NaOH 300 mmol L⁻¹ (regeneração: 45,1–57,5 min). Vazão: 1,0 mL min⁻¹; vol. injeção: 20,0 µL; pré-coluna e coluna: CarboPac PA-1 à T: 28°C; forma do pulso amperométrico - ED-50-Au: + 0,20 V (400 ms); + 0,65 V (200 ms) e - 0,20 V (400 ms).

Tabela 14 - Concentrações em % (m/m) dos monossacarídeos de acordo com o planejamento centróide-simplex das matrizes de café arábica, milho e trig. (N = 2 para todos os pontos, exceto para o ponto central da mistura ternária com N = 3)

Código (Tabela 1) Composição das amostras	1 café 100 %	2 milho 100 %	3 trigo 100 %	4 café 50 % trigo 50%	5 café 50 % milho 50%	6 trigo 50% milho 50%	7 café 34 % trigo 33% milho 33%	8 café 66% trigo 17% milho 17%	9 café 17% trigo 17 milho 66%	10 café 17% trigo 66% milho 17%
Manitol	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Arabinose	2,14	0,88	2,17	1,90	1,43	1,62	1,73 1,81	1,40	1,31	1,91
Arabinose*	2,00	1,09	2,16	1,96	1,05	1,43	1,68 1,72 1,78 1,78	1,82	1,32	1,99
Média ± s.d.	2,07 ±0,10	0,99 ±0,15	2,16 ±0,01	1,93 ±0,05	1,24 ±0,27	1,53 ±0,13	1,75 ±0,05	1,61 ±0,30	1,32 ±0,01	1,95 ±0,06
Galactose	6,74	0,34	0,33	3,60	3,60	0,34	2,30 2,38 2,36	3,21	1,12	1,11
Galactose*	6,76	0,32	0,32	3,66	2,52	0,36	2,41 2,44 2,50	3,69	1,17	1,16
Média ± s.d.	6,75 ±0,01	0,33 ±0,01	0,32 ±0,00	3,63 ±0,03	3,05 ±0,76	0,35 ±0,01	2,40 ±0,07	3,45 ±0,34	1,15 ±0,03	1,13 ±0,03
Glicose	0,27	47,00	41,30	22,15	24,07	46,80	30,40 31,72 31,57	10,99	34,39	31,83
Glicose*	0,28	46,80	41,83	22,40	24,02	45,91	31,84 30,81 31,17	12,60	32,36	31,96
Média ± s.d.	0,28 ±0,01	46,90 ±0,14	41,57 ±0,37	22,28 ±0,18	24,04 ±0,03	46,36 ±0,63	31,25 ±0,56	11,79 ±1,14	33,38 ±1,43	31,89 ±0,09
Xilose	0,08	2,18	3,90	2,05	0,92	2,81	2,00 2,02 1,85	0,86	1,90	2,91
Xilose*	0,05	2,22	3,91	2,05	0,62	2,85	1,94 2,04 2,05	0,94	1,88	2,98
Média ± s.d.	0,06 ±0,02	2,20 ±0,02	3,91 ±0,00	2,05 ±0,00	0,77 ±0,20	2,83 ±0,03	1,98 ±0,08	0,90 ±0,05	1,89 ±0,02	2,95 ±0,05
Manose	8,82	0,06	0,07	4,58	4,87	0,06	2,90 3,01 3,03	3,93	1,30	1,20
Manose*	8,94	0,03	0,04	4,65	3,42	0,06	3,14 3,09 3,04	4,87	1,26	1,20
Média ± s.d.	8,88 ±0,08	0,04 ±0,02	0,06 ±0,02	4,61 ±0,05	4,15 ±1,02	0,06 ±0,00	3,04 ±0,08	4,40 ±0,67	1,28 ±0,03	1,20 ±0,00
Frutose	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d n.d n.d	n.d	n.d	n.d
Frutose*	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d n.d	n.d	n.d	n.d
Média ± s.d.	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

*duplicata d.p. = desvio padrão n.d. = não detectado

A Análise de Variância (ANOVA) usada para testar a adequação dos modelos matemáticos para avaliar efeito nos teores dos carboidratos totais, empregando planejamento de misturas do tipo centróide simplex, de milho (*m*) e trigo (*t*) adicionados ao café arábica (*ca*) é apresentada na Tabela 15.

Tabela 15 - Análise da variância para ajuste dos modelos adotados para as concentrações de carboidratos totais das matrizes puras de café arábica, milho e trigo e suas misturas.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MQ)	F	p
Arabinose					
Regressão (<i>R</i>)	2,56839	2	1,28420	82,30	0,00*
Resíduos (<i>r</i>)	0,31208	20	0,01560		
F. Ajuste (<i>f_{aj}</i>)	0,17456	7	0,02494	2,36	0,09*
E. puro (<i>eq</i>)	0,13752	13	0,01058		
Total (<i>T</i>)	2,88047	22	0,13093		
% de variância explicada = 89,17; % máxima de variância explicável = 95,14					
Galactose					
Regressão (<i>R</i>)	73,72320	2	36,8616	448,07	0,00*
Resíduos (<i>r</i>)	1,64534	20	0,08227		
F. Ajuste (<i>f_{aj}</i>)	1,03420	7	0,14774	3,14	0,04*
E. puro (<i>eq</i>)	0,61114	13	0,04701		
Total (<i>T</i>)	75,36853	22	3,42584		
% de variância explicada = 97,82; % máxima de variância explicável = 99,19					
Xilose					
Regressão (<i>R</i>)	22,13826	5	4,42765	510,24	0,00*
Resíduos (<i>r</i>)	0,14752	17	0,00868		
F. Ajuste (<i>f_{aj}</i>)	0,07238	4	0,01809	3,13	0,05*
E. puro (<i>eq</i>)	0,07514	13	0,00578		
Total (<i>T</i>)	22,28578	22	1,01299		
% de variância explicada = 99,34; % máxima de variância explicável = 99,64					
Manose					
Regressão (<i>R</i>)	142,41911	2	71,20956	597,75	0,00*
Resíduos (<i>r</i>)	2,38257	20	0,11913		
F. Ajuste (<i>f_{aj}</i>)	1,29275	7	0,18468	2,20	0,10*
E. puro (<i>eq</i>)	1,08982	13	0,08383		
Total (<i>T</i>)	144,80169	22	6,58190		
% de variância explicada = 98,35; % máxima de variância explicável = 99,24					

Para os resultados das concentrações obtidas por meio do planejamento experimental de arabinose ($MQ_{if}/MQ_{pe} = 2,36$), manose (MQ_{if}/MQ_{pe}

= 2,20) e galactose ($MQ_{ff}/MQ_{pe} = 3,14$), o modelo que melhor se ajustou aos resultados experimentais foi o linear, não apresentando falta de ajuste no valor de $F_{7,13}$ (2,83) para arabinose e manose, no nível de confiança de 95% e no valor de $F_{7,13}$ (4,44) para galactose, no nível de confiança de 99%. A regressão é altamente significativa e útil para fazer previsões para arabinose ($MQ_R/MQ_r = 82,30$) e manose ($MQ_R/MQ_r = 597,95$) na distribuição de $F_{2,20}$ (3,49), no nível de confiança de 95% e no valor de $F_{2,20}$ (5,85) para galactose ($MQ_R/MQ_r = 448,07$), no nível de 99%. Para xylose ($MQ_{ff}/MQ_{pe} = 3,13$), o modelo que melhor se ajustou aos resultados foi o quadrático, não apresentando falta de ajuste no valor de $F_{4,13}$ (3,18), no nível de confiança de 95%. A regressão foi altamente significativa e útil para fazer previsões. Este modelo explicou para xilose 99,34% da variação em torno da média.

Os coeficientes para os modelos lineares e quadrático e os resultados dos testes de significância encontram-se na Tabela 16, considerando-se que os erros padrões dos coeficientes devem ser pequenos o suficiente para que não tenha sido possível estimá-lo através do planejamento empregado.

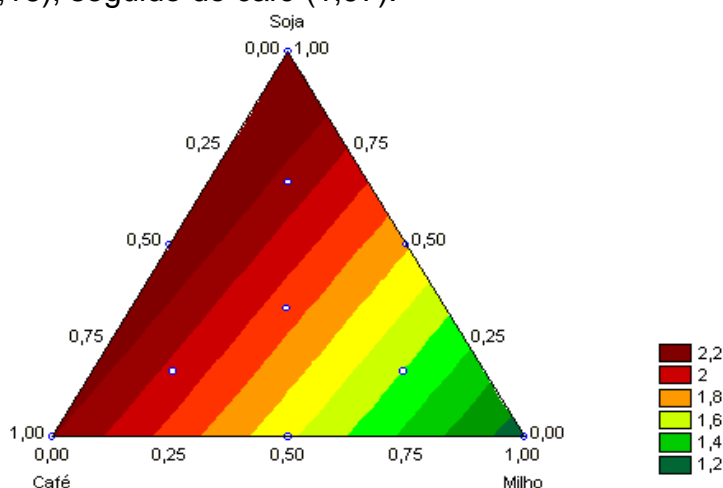
Tabela 16 - Teste de significância para os coeficientes dos modelos lineares e quadráticos para as concentrações de carboidratos totais obtidos através do planejamento centróide simplex das misturas de café arábica, milho e trigo.

Coeficiente	Valor calculado	Erro padrão	Intervalo de confiança (95%)
Arabinose			
x_1	1,97	0,07	1,83 a 2,11
x_2	0,94	0,06	0,80 a 1,07
x_3	2,16	0,06	2,03 a 2,30
Galactose			
x_1	6,50	0,15	6,17 a 6,82
x_2	0,14	0,15	-0,17 a 0,45
x_3	0,32	0,15	0,01 a 0,63
Xilose			
x_1	0,04	0,06	-0,10 a 0,18
x_2	2,17	0,06	2,03 a 2,30
x_3	3,90	0,06	3,76 a 4,03
$x_1 x_2$	-1,10	0,28	-1,70 a -0,50
$x_1 x_3$	0,66	0,28	0,07 a 1,26
$x_2 x_3$	-,052	0,28	-1,12 a 0,07
Manose			
x_1	8,68	0,18	8,29 a 9,07
x_2	-0,10	0,18	-0,47 a 0,28
x_3	0,04	0,18	-0,33 a 0,41

x_1 = café arábica; x_2 = milho e x_3 = trigo

As Equações (17), (18) e (19) referem-se aos modelos lineares para arabinose, galactose e manose, juntamente com suas respectivas superfícies de resposta (Figuras 24, 25 e 26). A Equação (20) em conjunto com sua superfície de resposta (Figura 27), refere-se ao modelo quadrático da xilose.

Na Equação (17), observa-se que as três matrizes, café, milho e trigo contribuíram para o aumento do teor de arabinose, sendo que o maior aumento foi para o trigo (2,16), seguido do café (1,97).

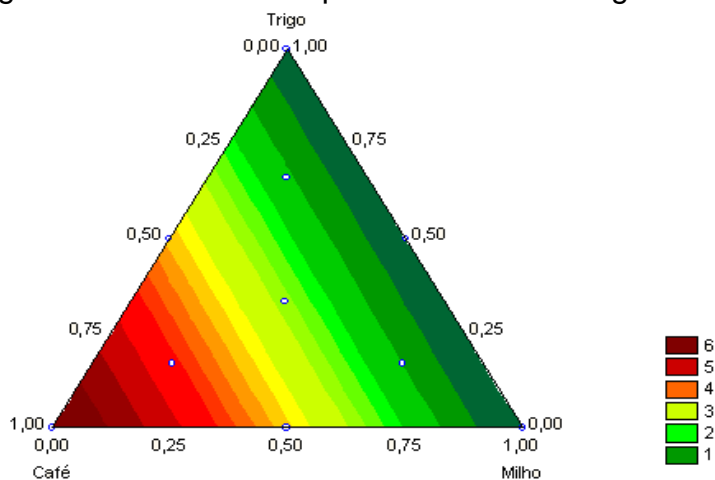


$$\hat{y} = 1,97ca + 0,94m + 2,16t \quad (17)$$

$(\pm 0,07) \quad (\pm 0,06) \quad (\pm 0,06)$

Figura 24 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), milho (*m*) e trigo (*t*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato arabinose, apresentando-se predominante nas matrizes de trigo e café.

O café foi a matriz que mais contribuiu para o aumento da galactose (6,50), conforme Figura 25. O coeficiente para milho não foi significativo, Equação (18).

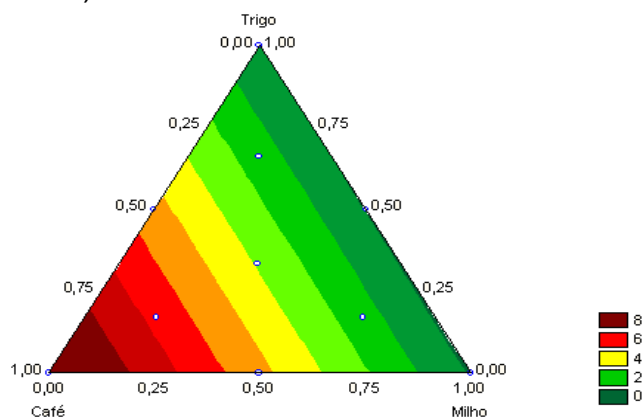


$$\hat{y} = 6,50ca + 0,32t \quad (18)$$

$(\pm 0,15) \quad (\pm 0,15)$

Figura 25 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), milho (*m*) e trigo (*t*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato galactose, apresentando-se predominante na matriz de café.

Na Equação (19), os coeficientes de milho (-0,10) e trigo (-0,04) não foram significativos, sendo que somente o café contribui para o aumento da manose (8,68) na mistura (Figura 26).

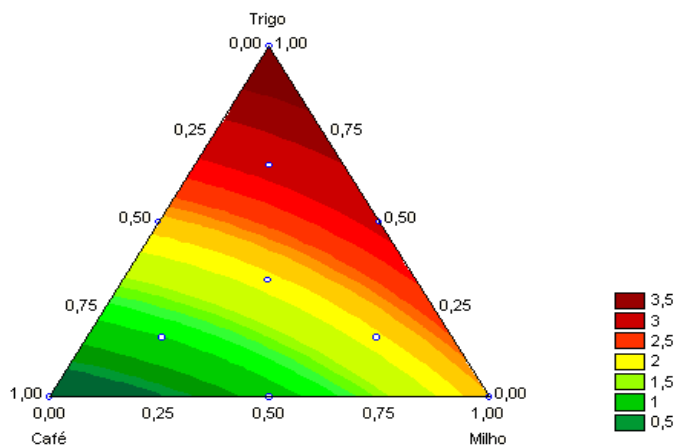


$$\hat{y} = 8,68ca \quad (19)$$

(±0,07)

Figura 26 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), milho (*m*) e trigo (*t*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato manose, apresentando-se predominante na matriz de café.

Na Equação (20), tem-se que as maiores concentrações de xilose foram observadas nos componentes de milho (*m*) (2,17) e trigo (*t*) (3,90). Através da superfície de resposta para esta regressão pode-se notar que à medida que aumenta a proporção de milho ou trigo, reduzindo a de café na mistura, observam-se maiores valores de concentração de xilose (Figuras 27). Os coeficientes de café e da interação binária entre milho e trigo (*mt*) não foram significativos.



$$\hat{y} = 2,17m + 3,90t - 1,10cam + 0,66cat \quad (20)$$

(±0,06) (±0,06) (±0,28) (±0,28)

Figura 27 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), milho (*m*) e trigo (*t*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato xilose, apresentando-se predominante na matriz de trigo.

Para a glicose nenhum modelo se ajustou aos resultados de suas concentrações obtidas através do planejamento centróide simplex, porém o baixo teor de glicose é característico do café, com isso podemos prever que altos teores deste carboidrato podem ser provenientes de adição de milho ou trigo. O manitol não foi detectado para estas amostras nestas condições experimentais.

A Figura 28 representa o gráfico dos escores dos Fatores 1 e 2, que juntos explicam 98,66% da variância total contida nos dados. Neste gráfico é possível observar a distribuição dos dados, com a formação do triângulo, separando visivelmente as matrizes puras, as misturas binárias e ternárias, bem como os pontos axiais.

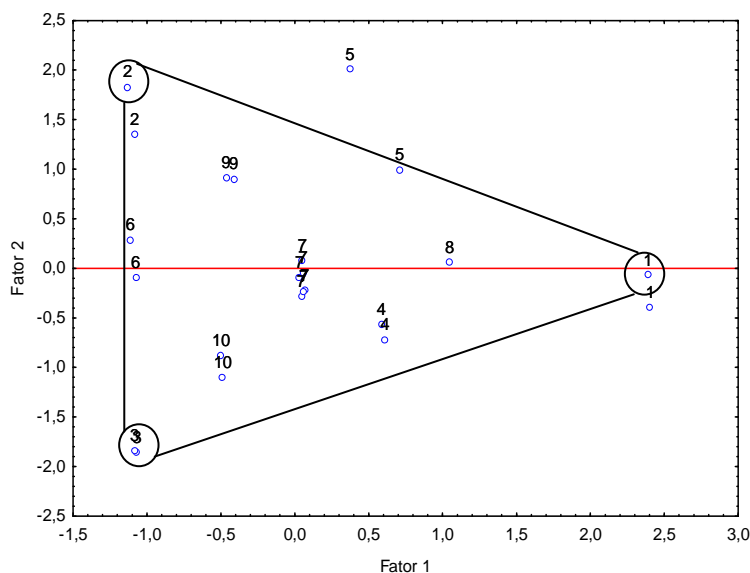


Figura 28 - Gráfico dos escores entre o Fator 1 e Fator 2 dos dados cromatográficos das 24 amostras das matrizes puras e misturas de café arábica, milho e soja.

Para uma avaliação em conjunto da capacidade de discriminação entre as amostras de café arábica, soja, milho e trigo pelas variáveis arabinose, galactose, glicose, xilose, manose e frutose, empregou-se a Análise de Componentes Principais (ACP) aos resultados dos 3 planejamentos de misturas centróides simplex anteriores, mostrados pela Figura 29.

Observando a Figura 29 (A) é possível notar que os Fatores 1 e 2 explicam juntos 84% da variabilidade dos dados. Analisando a projeção das variáveis nos Fatores 1 e 2 (Figura 29 A) os parâmetros de maior importância no eixo horizontal (Fator 1) com correlação positiva foram manose e galactose, caracterizando desta forma o café, enquanto glicose e xilose, apresentaram

correlação negativa no eixo horizontal, caracterizando outras matrizes, no caso, milho e trigo, respectivamente (Figura 29 B). Frutose e arabinose e foram os parâmetros de maior importância no eixo vertical, com correlação negativa, caracterizando assim outra matriz, que no caso foi o soja. A separação das matrizes puras pode ser visualizada em grupos bem distintos na Figura 29 B.

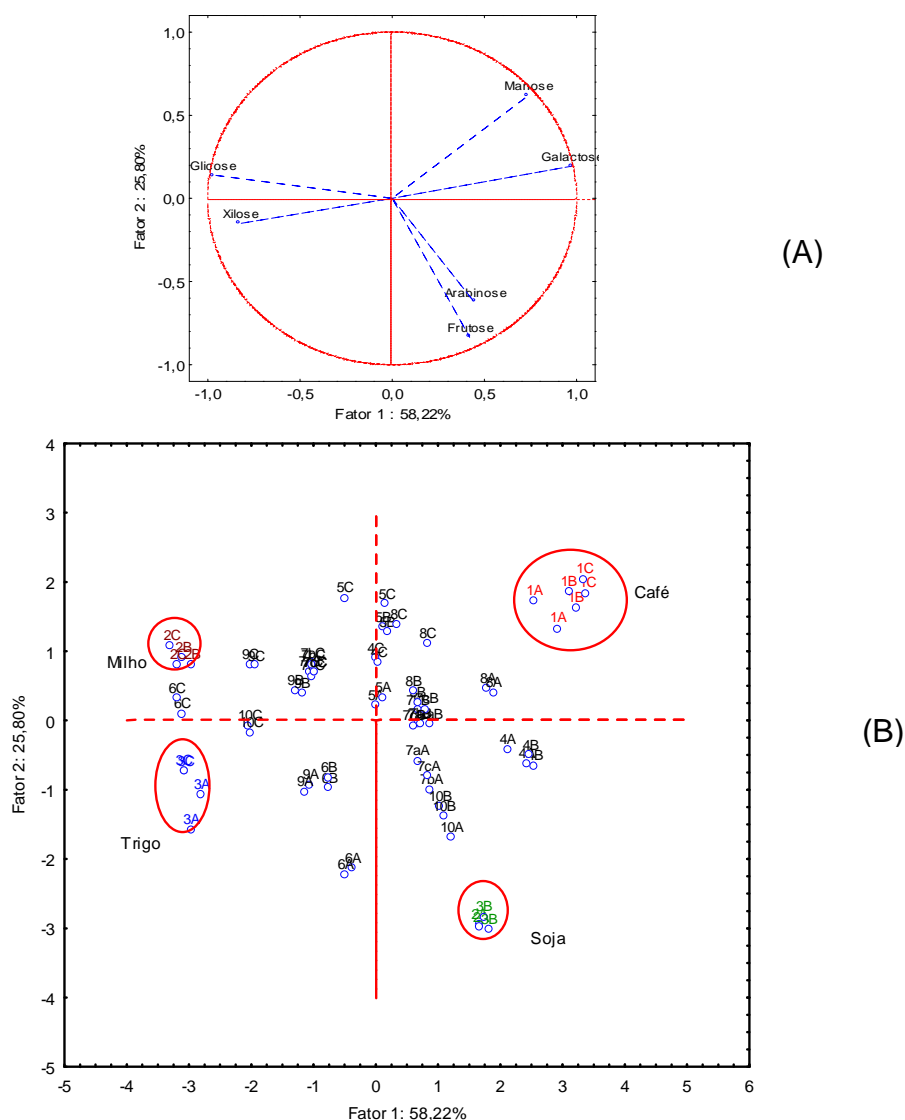


Figura 29 - Projeções das variáveis (A) e das amostras (B) nos Fatores 1 e 2. Números de 1A a 10 A pertencentes ao planejamento de café*soja*trigo, 1 B a 10 B ao planejamento de café*milho*soja e 1 C a 10 C ao planejamento do café*milho*trigo.

Visando verificar se é possível distinguir a adição de cascas de café e paus, bem como, se existem diferenças no teor de carboidratos entre as espécies de café arábica e conilon, outros planejamentos de misturas foram realizados, os quais estão descritos a seguir.

5.3.4 Planejamento experimental para estudo das misturas de café arábica, cascas de café e café conilon

Considerando as misturas de café conilon e cascas de café adicionadas ao café arábica, seguindo o planejamento experimental centróide simplex, a Figura 30 mostra os cromatogramas dos padrões de carboidratos e das matrizes puras de cafés arábica e conilon e cascas de café, com as concentrações reportadas na Tabela 17.

Nas matrizes de café arábica e conilon puras destacam-se com as maiores concentrações as de galactose (pico nº 3 com 4,64% e 5,50%) e de manose ((pico nº 6 com 6,61% e 6,58% (m/m)), respectivamente. Para a matriz de casca pura de café destacam-se os demais carboidratos, no caso, o manitol (pico nº 1 com 1,04%), a arabinose (pico nº 2 com 3,40%), glicose (pico nº 4 com 2,02%), xilose (pico nº 5 com 2,88%) e frutose (pico nº 7 com 2,51% (m/m)). Observa-se pelo fato das cascas de café ser parte do fruto, contém os mesmos carboidratos do café, porém em diferentes proporções. Estes dados concordam com os estudos de Blanc, Davis e Parchet (1989) que analisaram cascas e pergaminhos adicionados ao café solúvel.

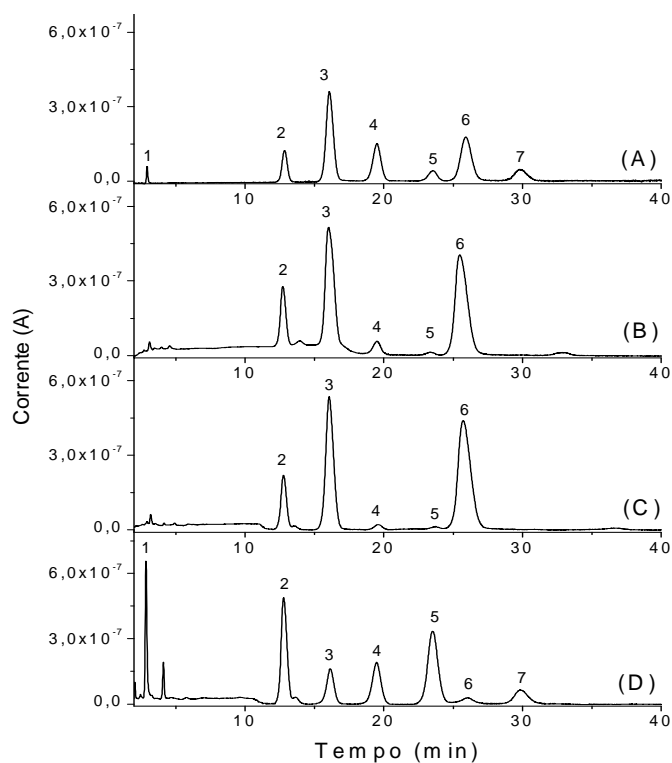


Figura 30 - Cromatogramas de carboidratos utilizando HPAEC-PAD: (A) Padrão 10% (v/v), (B) Café arábica 100%, (C) Café conilon 100%, (D) Cascas de café 100%. Picos: (1) Manitol, (2) Arabinose, (3) Galactose, (4) Glicose, (5) Xilose, (6) Manose e (7) Frutose. Condições cromatográficas Tabela 3.

Tabela 17 - Teores em % (m/m) dos monossacarídeos de acordo com o planejamento centróide simplex das matrizes de café arábica, cascas e café conilon. (N = 2 para todos os pontos, exceto para o ponto central da mistura ternária com N = 3)

Código (Tabela 2)	1 café ar. 100%	2 cascas 100%	3 café co. 100%	4 café ar. 50% café co. 50%	5 café ar. 50% cascas 50%	6 café co. 50% cascas 50%	7 café ar. 34 % café co. 33% cascas 33%	8 café ar. 66% café co. 17% cascas 17%	9 café ar. 17% café co. 17% Cascas 66%	10 café ar. 17% Café co. 66% Cascas 17%
Manitol	n.d.	1,00	n.d	n.d	0,54	0,42	0,34 0,37	0,19	0,80	0,23
Manitol*	n.d.	1,08	n.d	n.d	0,55	0,48	0,39	0,15	0,62	0,16
Média ± s.d.	n.d.	1,04 ±0,06	n.d	n.d	0,54 ±0,01	0,45 ±0,04	0,37 ±0,02	0,17 ±0,04	0,71 ±0,12	0,19 ±0,05
Arabinose	1,32	3,44	1,88	1,75	2,34	2,40	2,78 2,84	2,45	3,54	3,10
Arabinose*	1,50	3,35	1,77	1,66	2,39	2,38	2,90	1,72	2,57	2,68
Média ± s.d.	1,41 ±0,13	3,40 ±0,06	1,82 ±0,08	1,70 ±0,06	2,36 ±0,05	2,39 ±0,02	2,84 ±0,06	2,09 ±0,51	3,06 ±0,69	2,89 ±0,30
Galactose	4,52	1,58	5,80	5,77	3,49	3,83	5,74 5,63	5,65	3,75	7,04
Galactose*	4,76	1,55	5,21	5,05	3,49	3,67	5,65	4,39	3,05	6,69
Média ± s.d.	4,64 ±0,17	1,56 ±0,02	5,50 ±0,42	5,41 ±0,51	3,49 ±0,00	3,75 ±0,11	5,67 ±0,06	5,01 ±0,89	3,40 ±0,50	6,87 ±0,24
Glicose	0,17	1,90	0,44	0,36	1,21	1,00	1,05 1,25	0,64	1,82	0,84
Glicose*	0,18	2,15	0,38	0,31	1,24	1,21	0,96	0,61	1,36	0,86
Média ± s.d.	0,18 ±0,01	2,02 ±0,18	0,41 ±0,05	0,33 ±0,03	1,22 ±0,02	1,10 ±0,15	1,09 ±0,15	0,63 ±0,02	1,59 ±0,32	0,85 ±0,01
Xilose	0,09	3,23	0,09	0,09	1,77	1,16	1,27 1,17	0,50	2,14	0,50
Xilose*	0,09	2,52	0,08	0,08	1,60	1,11	1,48	0,47	1,70	0,45
Média ± s.d.	0,09 ±0,00	2,88 ±0,50	0,08 ±0,00	0,09 ±0,01	1,68 ±0,12	1,14 ±0,04	1,31 ±0,16	0,49 ±0,02	1,92 ±0,31	0,48 ±0,04
Manose	6,22	0,34	6,80	7,08	4,29	3,73	5,98 6,03	6,62	3,20	7,22
Manose*	7,00	0,41	6,36	6,53	4,13	3,72	5,49	5,59	2,87	6,81
Média ± s.d.	6,61 ±0,55	0,38 ±0,05	6,58 ±0,32	6,80 ±0,39	4,21 ±0,11	3,72 ±0,01	5,83 0,30	6,10 ±0,73	3,04 ±0,23	7,01 ±0,30
Frutose	n.d.	2,32	n.d.	n.d.	1,29	1,31	0,80 1,14	0,55	2,21	0,59
Frutose*	n.d.	2,70	n.d.	n.d.	1,43	1,23	0,88	0,39	1,76	0,69
Média ± s.d.	n.d.	2,51 ±0,27	n.d.	n.d.	1,36 ±0,10	1,27 ±0,06	0,94 0,18	0,47 ±0,11	1,98 ±0,32	0,64 ±0,08

* duplicata d,p= desvio padrão n.d. = não detectado

A sobreposição dos cromatogramas na Figura 31 permite que se observe a variação de um determinado carboidrato, conforme a proporção de adição deste na mistura café arábica-casca-café conilon. É possível notar que houve redução no teor da manose com a adição de casca ao café, observada pelo decréscimo no pico nº 6, porém este não seguiu a seqüência da porcentagem, facilmente perceptível como os estudos anteriores com matrizes que apresentavam composição bem distinta do café com comportamentos

lineares, A inversão só pode ser explicada pelo modelo matemático mais complexo do tipo cúbico especial, que permite verificar o sinergismo (Figura 37). Por outro lado, é facilmente observado que ocorre um aumento acentuado de manitol ao adicionar-se casca de café, em função deste ser o carboidrato característico desta matriz. Nesta mistura também se observa o aumento gradual nos teores de glicose (pico n° 4), xilose (pico n° 5) e frutose (pico n° 7) ao adicionar-se a casca, os quais seguem a seqüência de 100% café - linha preta (arábica); 87% café – linha vermelha (66% arábica + 17% conilon); 67% café – linha verde (34% arábica + 33% conilon), 50% café arabica – linha azul e 34% café – linha rosa(17% arábica e 17% conilon), relações evidenciadas pelos modelos lineares, obtidos dos tratamentos estatísticos (Figuras 32 a 35).

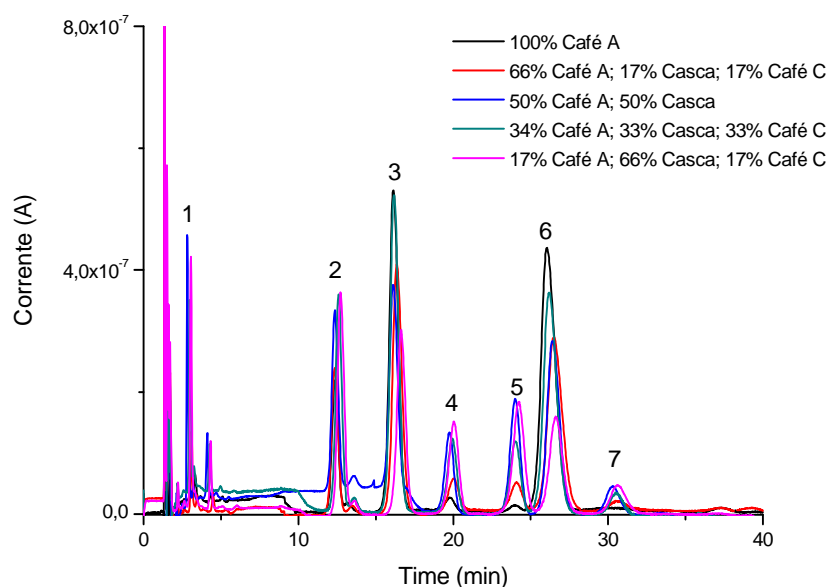


Figura 31 - Sobreposição dos cromatogramas de carboidratos de mistura de matrizes café arábica- casca de café- café conilon aplicando centróide simplex: Picos: (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose, (4) Xilose, (5) Manose e (6) Frutose. Fase móvel – isocrático: NaOH 1,4 mmol L⁻¹ (eluente: 0 – 45 min e re-equilíbrio: 57,6–72,6 min) e NaOH 300 mmol L⁻¹ (regeneração: 45,1- 57,5 min). Vazão: 1,0 mL min⁻¹; vol. injeção: 20,0 µL; pré-coluna e coluna: CarboPac PA-1 à T: 28°C; forma do pulso amperométrico - ED-50-Au: + 0,20 V (400 ms); + 0,65 V (200 ms) e - 0,20 V (400 ms).

Para análise do efeito da mistura de café arábica (*ca*), cascas de café (*cs*) e café conilon (*co*) nos teores dos carboidratos totais apresentados na Tabela 17, foram testados diferentes modelos de mistura. A Análise de Variância (ANOVA) foi usada para testar a adequação dos modelos dos resultados experimentais individuais dos carboidratos totais obtidos por meio de um planejamento centróide simplex, resultados que estão na Tabela 18.

Tabela 18 - Análise da variância para ajuste dos modelos adotados para as concentrações de carboidratos totais das matrizes puras de cafés arábica e conilon e cascas de café e suas misturas.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MQ)	F	p
Manitol					
Regressão (R)	2.11664	2	1.05832	502.94	0.00
Resíduos (r)	0.03794	18	0.00211		
F. Ajuste (f_{aj})	0.01285	7	0.00184	0.81	0.60
E. puro (eq)	0.0251	11	0.00228		
Total (T)	2.15458	20	0.10773		
% de variância explicada = 98,24; % máxima de variância explicável = 99,07					
Arabinose					
Regressão (R)	7.20431	6	1.20072	12.20	0.00
Resíduos (r)	1.37727	14	0.09838		
F. Ajuste (f_{aj})	0.50462	3	0.16821	2,12	0,16
E. puro (eq)	0.87265	11	0.07933		
Total (T)	8.58159	20	0.42908		
% de variância explicada = 83,95; % máxima de variância explicável = 89,86					
Glicose					
Regressão (R)	5.93764	2	2.96882	123.44	0.00
Resíduos (r)	0.43290	18	0.02405		0.21
F. Ajuste (f_{aj})	0.22298	7	0.03185	1.67	
E. puro (eq)	0.20992	11	0.01908		
Total (T)	6.37054	20	0.31853		
% de variância explicada = 93,20; % máxima de variância explicável = 96,70					
Xilose					
Regressão (R)	15.47637	2	7.73819	144.11	0.00
Resíduos (r)	0.96651	18	0.05369		
F. Ajuste (f_{aj})	0.55521	7	0.07932	2.12	0.13
E. puro (eq)	0.41130	11	0.03739		
Total (T)	16.44288	20	0.82214		
% de variância explicada = 94,12; % máxima de variância explicável = 97,51					
Manose					
Regressão (R)	82.91694	6	13.81949	70.67	0.00
Resíduos (r)	2.73771	14	0.19555		
F. Ajuste (f_{aj})	1.32321	3	0.44107	3.43	0.06
E. puro (eq)	1.41450	11	0.12859		
Total (T)	85.65465	20	4.28273		
% de variância explicada = 96,80; % máxima de variância explicável = 98,35					
Frutose					
Regressão (R)	13.41924	2	6.70962	252.30	0.00
Resíduos (r)	0.47869	18	0.02659		
F. Ajuste (f_{aj})	0.20833	7	0.02976	1.21	0.37
E. puro (eq)	0.27036	11	0.02458		
Total (T)	13.89792	20	0.69490		
% de variância explicada = 96,56; % máxima de variância explicável = 98,06					

Para os resultados das concentrações obtidas por meio do planejamento experimental para manitol, glicose, xilose e frutose, o modelo que melhor se ajustou foi o linear, onde os valores para a razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro (MQ_{faj}/MQ_{eq}) foram de 0,81; 1,67; 2,12 e 1,21, respectivamente, enquanto que o valor da distribuição F com 7 e 11 graus de liberdade ($F_{7,11}$) foi de 3,01. Como o valor de F tabelado, no nível de confiança de 95%, foi maior que as razões MQ_{faj}/MQ_{eq} não há indicação de falta de ajuste para o modelo linear. Os valores da razão entre as médias quadráticas da regressão e do resíduo (MQ_R/MQ_r) foram de 502,94; 123,44; 144,11 e 252,30, sendo maiores que o valor da distribuição $F_{2,18}$ de 3,55 no nível de confiança de 95%, indicando que a regressão é significativa e útil para fazer previsões.

Para arabinose e manose, o modelo que melhor se ajustou aos resultados de suas concentrações foi um modelo mais complexo: cúbico especial. Este modelo não apresentou falta de ajuste no valor da distribuição de $F_{3,11}$ (3,59), no nível de confiança de 95%, onde a regressão demonstrou ser altamente significativa no valor da distribuição de $F_{6,14}$ (2,85) e útil para fazer previsões. Os coeficientes para o modelo linear e o resultado do teste de significância encontram-se na Tabela 19.

As Equações dos modelos ajustados (21) a (24) com as respectivas superfícies de resposta, apresentadas nas Figuras de 32 a 35, elucidam as predominâncias de manitol, glicose, xilose e frutose, respectivamente, com relação às misturas feitas de acordo com o planejamento centróide simplex entre as três matrizes: café arábica, cascas de café e café conilon, onde, \hat{y} = resposta prevista pelo modelo, ca = café arábica, cs = cascas de café, co = café conilon e os valores entre parênteses representam os erros padrão dos coeficientes.

Através das Equações (21), (23) e (24) podemos afirmar que somente a cascas de café contribui para o aumento de manitol (1,04), xilose (2,89) e frutose (2,65) na mistura entre cafés arábica, cascas de café e café conilon. Para a glicose (2,10), a casca é o componente que mais contribui para seu aumento na mistura (Equação 22).

Tabela 19 - Teste de significância para os coeficientes dos modelos lineares e cúbicos especiais para o estudo das misturas de café arábica-café conilon-cascas de café.

Coeficiente	Valor calculado	Erro padrão	Intervalo de confiança (95%)
Manitol			
x_1	0,02	0,02	-0,03 a 0,07
x_2	1,04	0,02	0,99 a 1,09
x_3	-0,01	0,02	-0,06 a 0,04
Arabinose			
x_1	1,36	0,21	0,90 a 1,82
x_2	3,37	0,21	2,91 a 3,83
x_3	1,94	0,21	1,48 a 2,40
$x_1 x_2$	-0,33	1,08	-2,64 a 1,98
$x_1 x_3$	0,50	1,08	-1,81 a 2,82
$x_2 x_3$	-0,67	1,08	-2,98 a 1,64
$x_1 x_2 x_3$	20,94	6,59	6,80 a 35,08
Glicose			
x_1	0,28	0,08	0,11 a 0,45
x_2	2,10	0,08	1,93 a 2,27
x_3	0,47	0,08	0,30 a 0,64
Xilose			
x_1	0,20	0,12	-0,06 a 0,45
x_2	2,89	0,12	2,63 a 3,14
x_3	0,00	0,12	-0,25 a 0,26
Manose			
x_1	6,52	0,30	5,87 a 7,17
x_2	0,28	0,30	-0,37 a 0,93
x_3	6,78	0,30	6,13 a 7,43
$x_1 x_2$	2,50	1,52	-0,76 a 5,76
$x_1 x_3$	1,10	1,52	-2,16 a 4,36
$x_2 x_3$	1,21	1,52	-2,05 a 4,47
$x_1 x_2 x_3$	21,51	9,30	1,56 a 41,45
Frutose			
x_1	0,04	0,08	-0,14 a 0,22
x_2	2,65	0,08	2,47 a 2,83
x_3	0,07	0,08	-0,11 a 0,24

x_1 = café arábica; x_2 = cascas de café e x_3 = café conilon

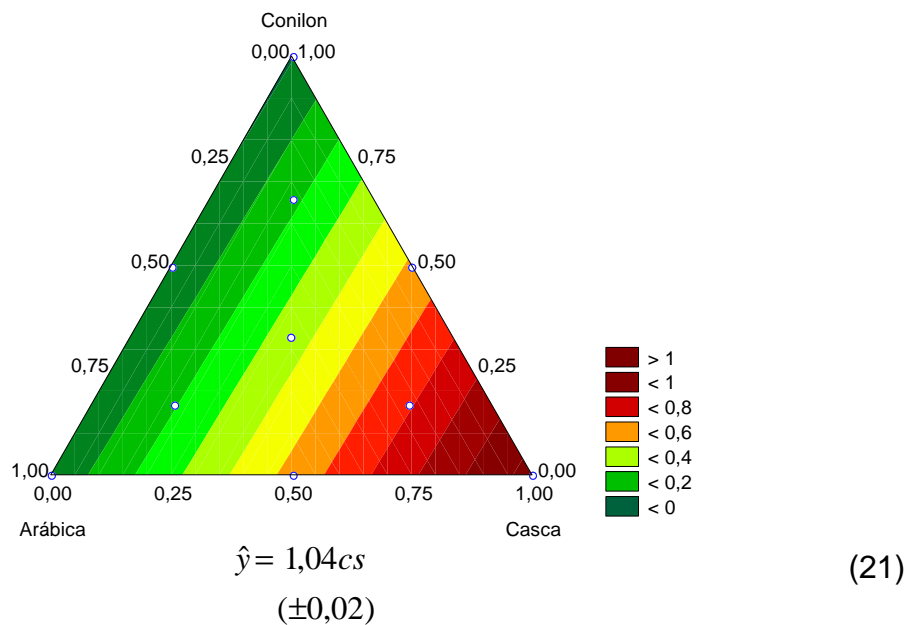


Figura 32 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), cascas de café (*cs*) e café conilon (*co*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato manitol, apresentando-se predominante na matriz de cascas de café.

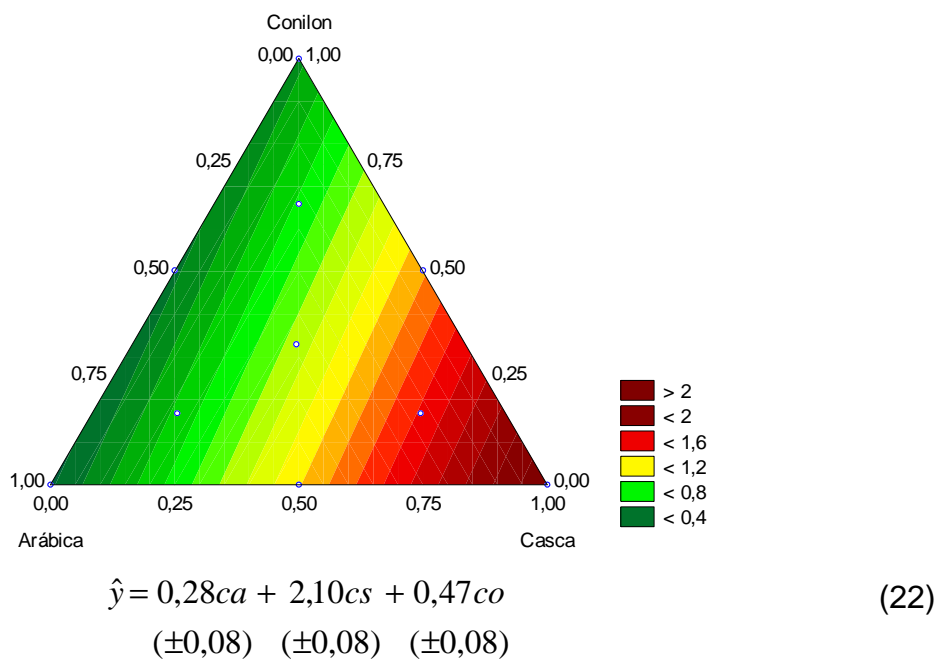
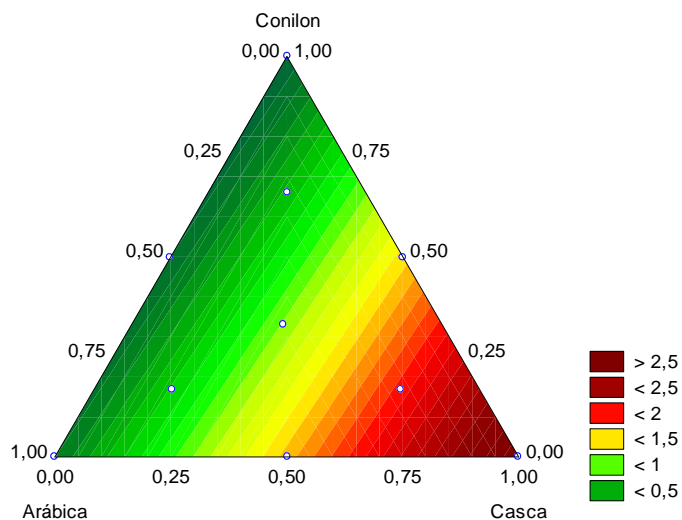


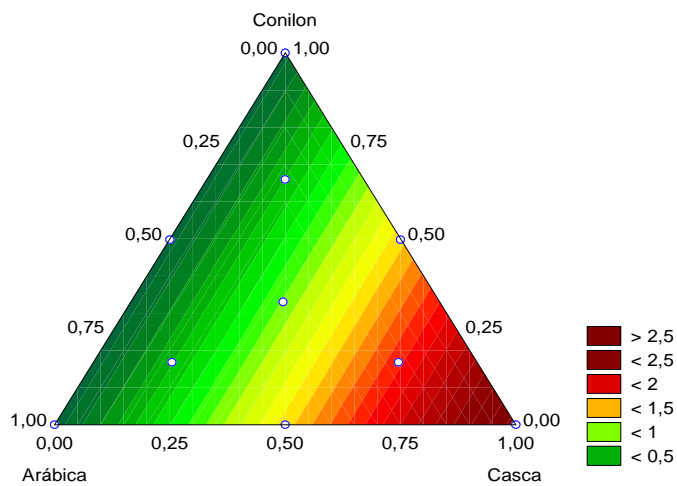
Figura 33 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), cascas de café (*cs*) e café conilon (*co*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato glicose, apresentando-se predominante na matriz de cascas de café.



$$\hat{y} = 2,89cs \quad (23)$$

$$(\pm 0,12)$$

Figura 34 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), cascas de café (*cs*) e café conilon (*co*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato xilose, apresentando-se predominante na matriz de cascas de café.



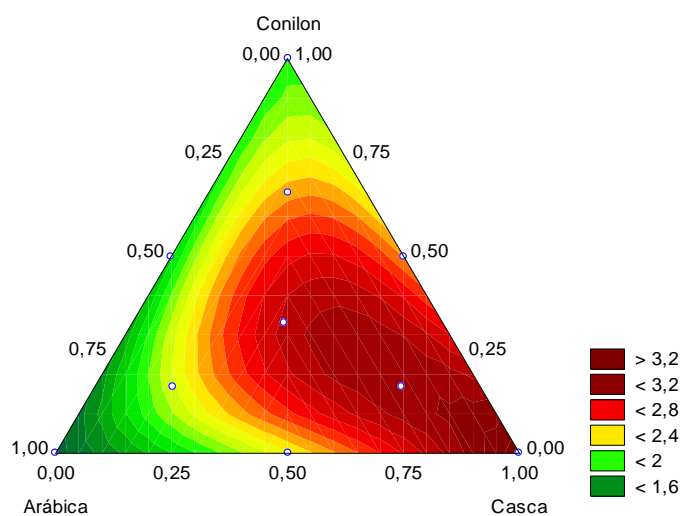
$$\hat{y} = 2,65cs \quad (24)$$

$$(\pm 0,08)$$

Figura 35 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), cascas de café (*cs*) e café conilon (*co*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato frutose, apresentando-se predominante na matriz de cascas de café.

As Equações (25) e (26) referem-se aos modelos cúbicos especial para estes dois carboidratos arabinose e manose, juntamente com suas superfícies de respostas correspondentes, Figuras 36 e 37.

O modelo cúbico especial nos mostra que a presença do componente de casca de café (*cs*) na mistura, proporciona uma maior contribuição para o aumento da concentração de arabinose (3,37) sendo que o café conilon (*co*) (1,97) contribui mais do que o café arábica (*ca*) (1,36), de acordo com a Equação (25). Através da Figura 36, podemos observar que há uma coloração mais intensa no vértice do triângulo com composição de cascas. A interação ternária (*ca*cs*co*) entre as três matrizes estudadas neste planejamento apresentaram um efeito sinérgico expressivo quanto à contribuição para o aumento de arabinose na mistura (20,94).

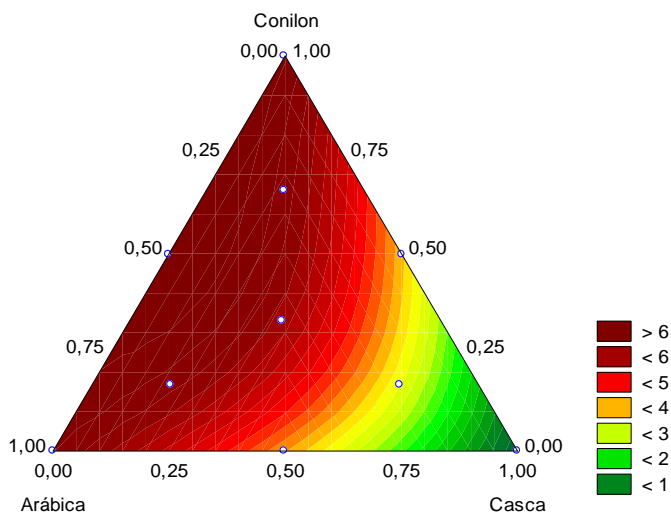


$$\hat{y} = 1,36ca + 3,37cs + 1,97co + 20,94cacsc o \quad (25)$$

$(\pm 0,21) \quad (\pm 0,21) \quad (\pm 0,21) \quad (\pm 6,59)$

Figura 36 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), cascas de café (*cs*) e café conilon (*co*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato arabinose, apresentando-se predominante na matriz de cascas de café.

Já na Figura 37, há uma coloração mais intensa nos vértices do triângulo com composição de café arábica e café conilon, correspondente a manose, ou seja, o teor elevado deste carboidrato é característico do café, independente de sua espécie, sendo demonstrada desta afirmação pela Equação (26), onde os maiores coeficientes pertencem ao café conilon (*co*) (6,78), seguido pelo café arábica (*ca*) (6,52). A interação ternária entre as três matrizes estudadas neste planejamento apresentaram um efeito sinérgico quanto à contribuição para o aumento de manose na mistura dada pelo valor de 21,51 para *ca*cs*co*.



$$\hat{y} = 6,52ca + 6,78co + 21,51casc o$$

$$(\pm 0,30) \quad (\pm 0,30) \quad (\pm 9,30) \quad (26)$$

Figura 37 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), cascas de café (*cs*) e café conilon (*co*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato manose, apresentando-se predominante nas matrizes de café arábica e café conilon.

Para a galactose nenhum modelo se ajustou aos resultados das concentrações obtidas através do planejamento experimental. No entanto, elevados teores de galactose se mostram característicos da matriz de café conforme estudos anteriores.

A Figura 38 representa o gráfico dos escores dos Fatores 1 e 2, sendo que estes dois fatores juntos explicam 97,80% da variância total contida nos dados. Neste gráfico, podemos notar a formação de três grupos distintos. O grupo I que é composto por dois subgrupos, o primeiro contendo as amostras 2 e 2a (cascas de café pura) e um segundo contendo as amostras 5 e 5a; 6 e 6a e 9 (misturas contendo 50% e 66% de cascas de café). O grupo II é formado pelas amostras 7a; 7b e 7c; 10 e 10a, e ainda 8 (com predominância de cafés arábica e conilon e pouca cascas). O grupo III que é formado pelas amostras 1 e 1a; 3 e 3a e 4 e 4a (cafés arábica e conilon puros e misturas de 50% dessas duas espécies).

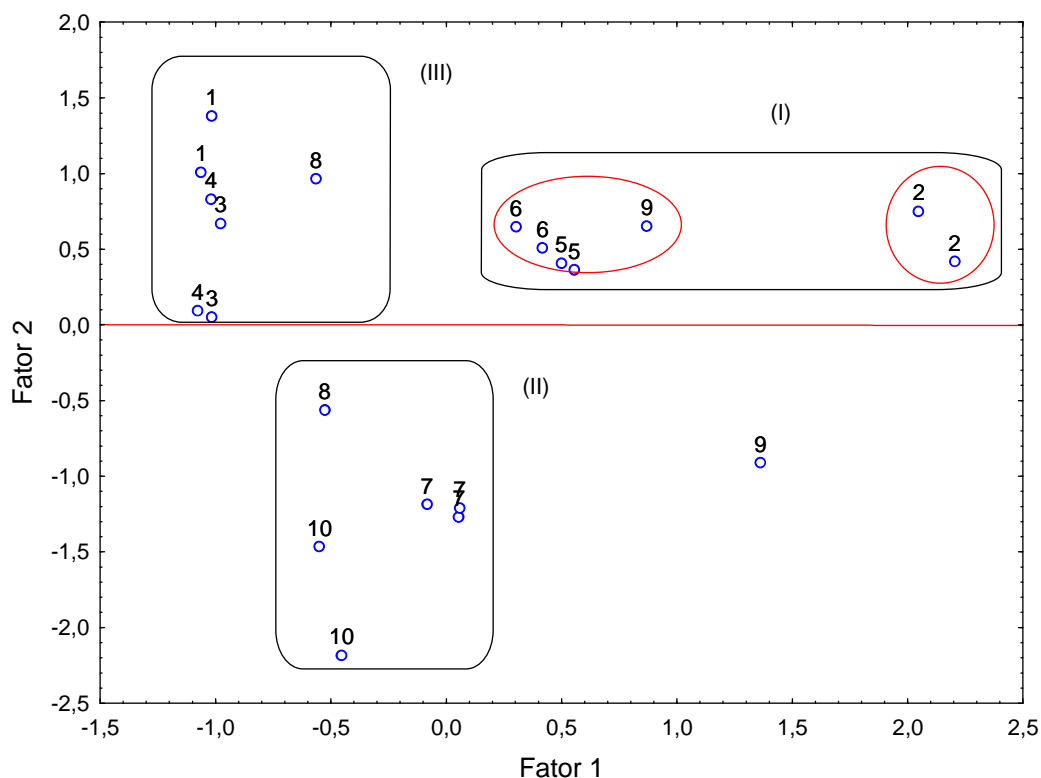


Figura 38 - Gráfico dos escores do Fator 1 com o Fator 2 dos dados cromatográficos das 21 amostras das matrizes puras e misturas de café arábica, cascas de café e café conilon.

5.3.5 Planejamento experimental para estudo das misturas de café arábica, cascas e paus de café

Considerando as misturas de cascas e paus de café adicionados ao café arábica, seguindo o planejamento experimental centróide simplex, os cromatogramas das matrizes puras de café arábica, cascas e paus de café e misturas dos padrões de carboidratos, mostrados na Figura 39 e os resultados dos teores de carboidratos reportados na Tabela 20, permitem inferir que existem características distintas entre elas.

Na matriz de café arábica puro destacaram-se as maiores concentrações de galactose (4,48%) e manose (6,72%). Na cascas os maiores teores encontrados foram de manitol (1,02%), arabinose (3,28%), glicose (2,22%) e frutose (2,76%) valores que concordaram com o estudo anteriormente descrito para o café arábica, cascas de café e café conilon, considerando o coeficiente de

variação (CV) de 4,62%; 2,98%; 7,32% e 8,42%, respectivamente. Já os paus de café destacaram-se pelo seu elevado teor de xilose (6,18% (m/m)).

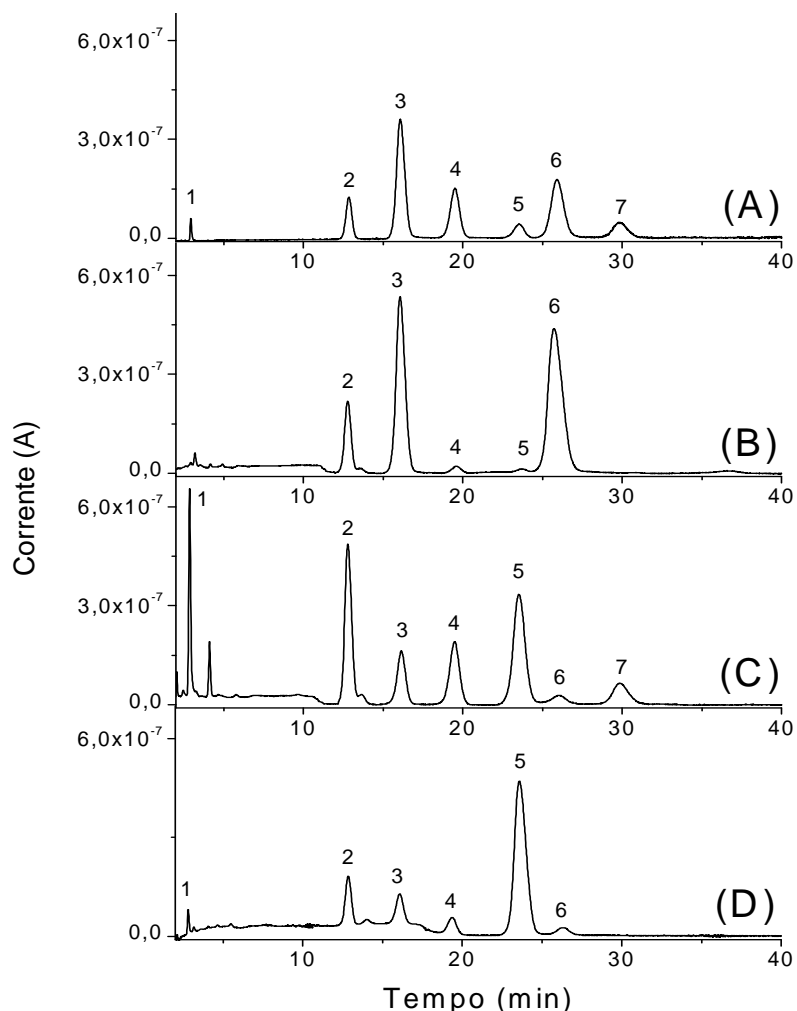


Figura 39 - Cromatogramas de carboidratos utilizando HPAEC-PAD: (A) Padrão 10% (v/v), (B) Café arábica 100%, (C) Cascas de café 100%, (D) Paus de café 100%. Picos: (1) Manitol, (2) Arabinose, (3) Galactose, (4) Glicose, (5) Xilose, (6) Manose e (7) Frutose. Fase móvel – isocrático: NaOH 1,4 mmol L⁻¹ (eluyente: 0 – 45 min e re-equilíbrio: 57,6–72,6 min) e NaOH 300 mmol L⁻¹ (regeneração: 45,1- 57,5 min). Vazão: 1,0 mL min⁻¹; vol. injeção: 20,0 µL; pré-coluna e coluna: CarboPac PA-1 à T: 28°C; forma do pulso amperométrico - ED-50-Au: + 0,20 V (400 ms); + 0,65 V (200 ms) e - 0,20 V (400 ms).

Tabela 20 - Concentrações em % (m/m) dos monossacarídeos de acordo com o planejamento centróide simplex das matrizes de café arábica, cascas e paus de café. (N = 2 para todos os pontos, exceto para o ponto central da mistura ternária com N = 3)

Código (Tabela 2)	1 café ar. 100%	2 cascas 100%	3 paus 100%	4 café ar. 50% paus 50%	5 café ar. 50% cascas 50%	6 paus 50% cascas 50%	7 café ar. 34 % paus 33% cascas 33%	8 café ar. 66% paus 17% cascas 17%	9 café ar. 17% paus 17% Cascas 66%	10 café ar. 17% paus 66% Cascas 17%
Manitol	n.d	1,06	0,11	0,04	0,51	0,74	0,53 0,54	0,31	0,88	0,36
Manitol*	n.d	0,98	0,09	0,03	0,54	0,71	0,53	0,30	0,87	0,35
Média ± s.d.	n.d	1,02 ±0,06	0,10 ±0,01	0,04 ±0,00	0,52 ±0,02	0,73 ±0,02	0,53 ±0,01	0,31 ±0,00	0,88 ±0,00	0,36 ±0,01
Arabinose	1,46	3,20	1,28	1,34	2,60	2,68	2,08 2,13	2,00	2,98	1,80
Arabinose*	1,40	3,35	1,25	1,29	2,69	2,51	2,14	1,92	2,97	1,80
Média ± s.d.	1,43 ±0,04	3,27 ±0,11	1,27 ±0,02	1,32 ±0,04	2,65 ±0,06	2,60 ±0,12	2,12 0,03	1,96 ±0,06	2,98 ±0,01	1,80 ±0,00
Galactose	4,66	1,50	0,96	3,42	4,00	1,36	2,38 2,95	4,42	2,53	2,18
Galactose*	4,31	1,83	0,97	3,33	3,89	1,37	2,87	4,25	2,44	2,14
Média ± s.d.	4,48 ±0,24	1,66 ±0,23	0,97 ±0,00	3,38 ±0,06	3,94 ±0,08	1,36 ±0,01	2,73 0,30	4,34 ±0,13	2,49 ±0,07	2,16 ±0,03
Glicose	0,16	2,20	0,48	0,17	1,36	1,60	1,03 1,16	0,69	1,78	0,69
Glicose*	0,15	2,25	0,52	0,16	1,49	1,51	1,24	0,73	1,88	0,79
Média ± s.d.	0,15 ±0,01	2,22 ±0,04	0,50 ±0,03	0,16 0,01	1,42 ±0,09	1,55 ±0,06	1,14 0,10	0,71 ±0,03	1,83 ±0,07	0,74 ±0,07
Xilose	0,10	2,75	6,50	2,91	1,40	3,80	2,51 2,93	1,41	2,90	4,30
Xilose*	0,07	2,66	5,85	2,86	1,25	3,98	2,83	1,35	2,60	4,66
Média ± s.d.	0,08 ±0,02	2,70 ±0,07	6,17 ±0,46	2,88 0,04	1,32 ±0,11	3,89 ±0,12	2,75 0,22	1,38 ±0,04	2,75 ±0,22	4,48 ±0,25
Manose	7,27	0,41	0,36	4,53	4,23	0,41	2,66 2,49	5,06	2,02	2,08
Manose*	6,17	0,43	0,38	4,36	4,09	0,42	3,34	4,90	1,90	2,00
Média ± s.d.	6,72 ±0,78	0,42 ±0,02	0,37 ±0,01	4,44 0,12	4,16 ±0,10	0,42 ±0,01	3,17 0,44	4,98 ±0,12	1,96 ±0,08	2,04 ±0,05
Frutose	n.d.	2,84	n.d.	n.d.	1,49	1,58	1,12 1,02	0,55	1,96	0,45
Frutose*	n.d.	2,68	n.d.	n.d.	1,55	1,54	1,01	0,45	1,93	0,50
Média ± s.d.	n.d.	2,76 ±0,11	n.d.	n.d.	1,52 ±0,04	1,56 ±0,03	1,05 0,06	0,50 ±0,07	1,95 ±0,03	0,48 ±0,04

*duplicata

d.p. = desvio padrão

n.d. = não detectado

A sobreposição dos cromatogramas na Figura 40 permite que se observe a variação de um determinado carboidrato, conforme a proporção de adição deste na mistura café arábica-casca-pau. É possível notar a redução nos teores de galactose e manose (picos n° 3 e 6) na medida em que ocorre a adição de casca e paus ao café, porém não são decréscimos graduais na seqüência. Por outro lado, ocorre um aumento acentuado de manitol (pico n° 1) ao adicionar-se casca ao café, linha preta (0% casca), linha vermelha (17% casca) e linha verde

(33% casca) em função de este ser o carboidrato característico desta matriz, bem como se observa o mesmo comportamento para a frutose (pico n^o 7). Nesta mistura também se observa uma tendência de aumento dos teores de xilose ao adicionar-se o pau, elevação no pico n^o 5 para patamares semelhantes aos de galactose e manose, do 0% paus (linha preta) para 66% paus (linha rosa), porém esta também não segue uma seqüência crescente na mistura.

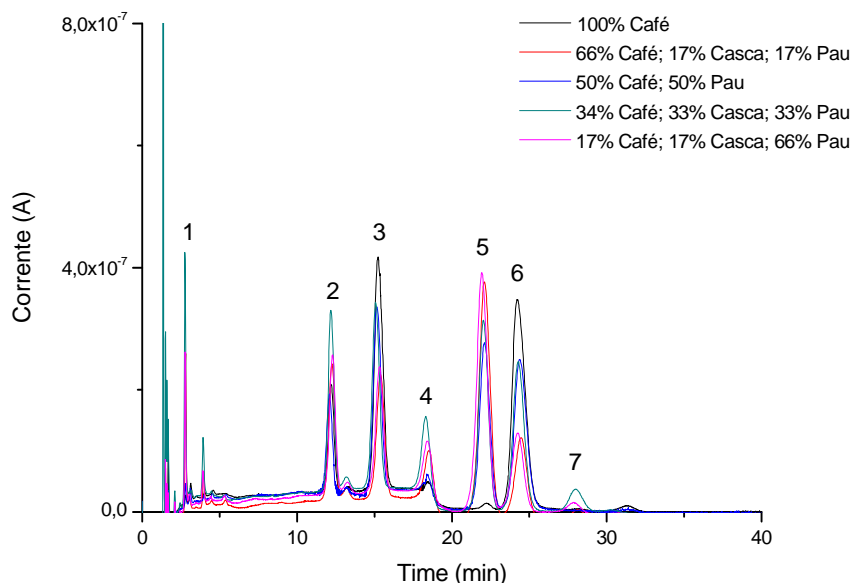


Figura 40 - Sobreposição dos cromatogramas de carboidratos de mistura de matrizes café arábica-casca de café-paus de café aplicando centróide simplex: Picos: (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose, (4) Xilose, (5) Manose e (6) Frutose. Fase móvel – isocrático: NaOH 1,4 mmol L⁻¹ (elute: 0 – 45 min e re-equilíbrio: 57,6–72,6 min) e NaOH 300 mmol L⁻¹ (regeneração: 45,1- 57,5 min). Vazão: 1,0 mL min⁻¹; vol. injeção: 20,0 µL; pré-coluna e coluna: CarboPac PA-1 à T: 28°C; forma do pulso amperométrico - ED-50-Au: + 0,20 V (400 ms); + 0,65 V (200 ms) e - 0,20 V (400 ms).

Os valores do teste ANOVA, para avaliar o efeito da mistura de cascas (*cs*) e paus (*pa*) de café no café arábica (*ca*) nos teores dos carboidratos totais apresentados na Tabela 20, para testar a adequação dos modelos matemáticos aos dados experimentais individuais dos carboidratos totais, empregando planejamento centróide simplex, estão dispostos na Tabela 21.

Tabela 21 - Análise da variância para ajuste dos modelos adotados para as concentrações de carboidratos totais das matrizes puras de café arábica, cascas e paus de café e suas misturas.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MQ)	F	p
Arabinose					
Regressão (R)	9.02742	5	1.80548	241.59	0.00
Resíduos (r)	0.11210	15	0.00747		
F. Ajuste (f_{aj})	0.07313	4	0.01828	5.16	0.01
E. puro (e q)	0.03896	11	0.00354		
Total (T)	9.13952	20	0.45698		
% de variância explicada = 98,77; % máxima de variância explicável = 99,56					
Galactose					
Regressão (R)	27.65164	5	5.53033	113.66	0.00
Resíduos (r)	0.72988	15	0.04866		
F. Ajuste (f_{aj})	0.39750	4	0.09937	3.29	0.05
E. puro (e q)	0.33238	11	0.03022		
Total (T)	28.38152	20	1.41908		
% de variância explicada = 97,32; % máxima de variância explicável = 98,84					
Glicose					
Regressão (R)	8.97384	5	1.79477	361.01	0.00
Resíduos (r)	0.07457	15	0.00497		
F. Ajuste (f_{aj})	0.02730	4	0.00682	1.59	0.24
E. puro (e q)	0.04727	11	0.00430		
Total (T)	9.04841	20	0.45242		
% de variância explicada = 99,18; % máxima de variância explicável = 99,45					
Xilose					
Regressão (R)	53.40041	2	26.70020	509.96	0.00
Resíduos (r)	0.94244	18	0.05236		
F. Ajuste (f_{aj})	0.48847	7	0.06978	1.69	0.21
E. puro (e q)	0.45396	11	0.04127		
Total (T)	54.34285	20	2.71714		
% de variância explicada = 98,27; % máxima de variância explicável = 99,17					
Manose					
Regressão (R)	84.66795	2	42.33397	275.12	0.00
Resíduos (r)	2.76977	18	0.15388		
F. Ajuste (f_{aj})	1.70846	7	0.24407	2.53	0.08
E. puro (e q)	1.06131	11	0.09648		
Total (T)	87.43772	20	4.37189		
% de variância explicada = 96,83; % máxima de variância explicável = 98,79					
Frutose					
Regressão (R)	16.19324	5	3.23865	1104.22	0.00
Resíduos (r)	0.04399	15	0.00293		
F. Ajuste (f_{aj})	0.01404	4	0.00351	1.29	0.33
E. puro (e q)	0.02995	11	0.00272		
Total (T)	16.23724	20	0.81186		
% de variância explicada = 99,73; % máxima de variância explicável = 99,82					

Para os resultados das concentrações obtidas por meio do planejamento experimental para xilose e manose, o modelo que melhor se ajustou foi o linear, não apresentando falta de ajuste no valor da distribuição de $F_{7,11}$ (3,01), no nível de confiança de 95%. A regressão foi altamente significativa e útil para fazer previsões. Já para arabinose, glicose e frutose o modelo que melhor se ajustou aos resultados de suas concentrações foi o quadrático, não apresentando falta de ajuste no valor da distribuição de $F_{4,11}$ (3,36), no nível de confiança de 95%. As regressões foram altamente significativas e úteis para fazer previsões. O modelo que melhor se ajustou as concentrações de galactose, não apresentando falta de ajuste na distribuição de $F_{4,11}$, no nível de confiança de 95%, foi o cúbico, com a retirada de alguns termos. A regressão foi altamente significativa e útil para fazer previsões. Os coeficientes para o modelo linear e o resultado do teste de significância encontram-se na Tabela 22.

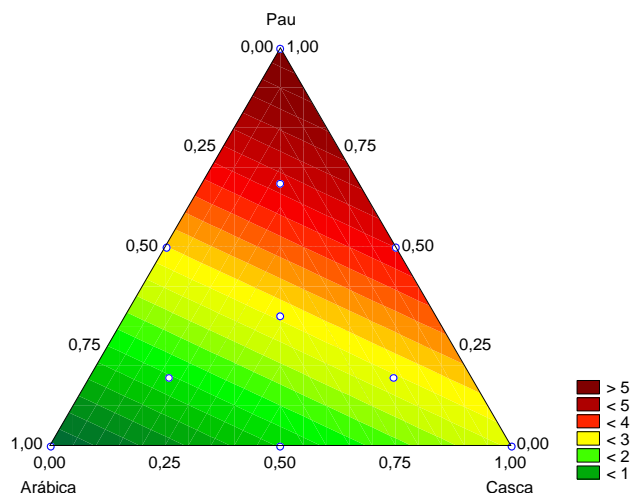
As Equações (27) e (28) se referem aos modelos lineares para xilose e manose, as Equações (29), (30) e (31) elucidam os modelos quadráticos para arabinose, glicose e frutose, respectivamente, já a Equação (32) é do modelo cúbico, para a galactose. Estas equações estão apresentadas juntamente com as respectivas superfícies de resposta nas Figuras 41 a 46, onde, \hat{y} = reposta prevista pelo modelo, *ca* = café arábica, *cs* = cascas de café, *pa* = paus de café, e os valores entre parênteses representam os erros padrão dos coeficientes.

Na Equação (27), observa-se que as cascas e os paus de café contribuíram para o aumento do teor de xilose, sendo que o maior aumento foi observado pelo valor do coeficiente dos paus (5,97). A Figura 41 ilustra a superfície de resposta para esta regressão e nela pode-se visualizar melhor esta afirmação, observando a coloração mais intensa no vértice do triângulo com composição de paus puros (100%).

Tabela 22 - Teste de significância para os coeficientes dos modelos lineares, quadráticos e cúbicos para o estudo das misturas de café arábica-cascas de café-paus de café.

Coeficiente	Valor calculado	Erro padrão	Intervalo de confiança (95%)
Arabinose			
x_1	1,45	0,06	1,33 a 1,58
x_2	3,30	0,06	3,17 a 3,42
x_3	1,27	0,06	1,14 a 1,39
$x_1 x_2$	1,11	0,27	0,54 a 1,68
$x_1 x_3$	-0,24	0,27	-0,81 a 0,34
$x_2 x_3$	1,18	0,27	0,60 a 1,75
Galactose			
x_1	4,53	0,15	4,21 a 4,86
x_2	1,70	0,14	1,40 a 2,00
x_3	0,99	0,13	0,70 a 1,27
$x_1 x_2$	3,12	0,68	1,66 a 4,57
$x_1 x_3$	2,21	0,69	0,74 a 3,67
$x_1 x_2(x_1 - x_2)$	2,41	2,20	-2,27 a 7,10
Glicose			
x_1	0,16	0,05	0,06 a 0,26
x_2	2,23	0,05	2,12 a 2,33
x_3	0,47	0,05	0,37 a 0,57
$x_1 x_2$	1,14	0,22	0,68 a 1,61
$x_1 x_3$	-0,51	0,22	-0,98 a -0,04
$x_2 x_3$	0,90	0,22	0,43 a 1,37
Xilose			
x_1	0,00	0,12	-0,24 a 0,26
x_2	2,55	0,12	2,30 a 2,80
x_3	5,97	0,12	5,72 a 6,22
Manose			
x_1	7,18	0,20	6,75 a 7,61
x_2	0,61	0,20	0,18 a 1,04
x_3	0,70	0,20	0,27 a 1,13
Frutose			
x_1	-0,00	0,04	-0,08 a 0,08
x_2	2,77	0,04	2,69 a 2,84
x_3	-0,01	0,04	-0,09 a 0,07
$x_1 x_2$	0,52	0,17	0,17 a 0,88
$x_1 x_3$	-0,08	0,17	-0,44 a 0,27
$x_2 x_3$	0,64	0,17	0,28 a 1,00

x_1 = café arábica; x_2 = cascas de café e x_3 = paus de café

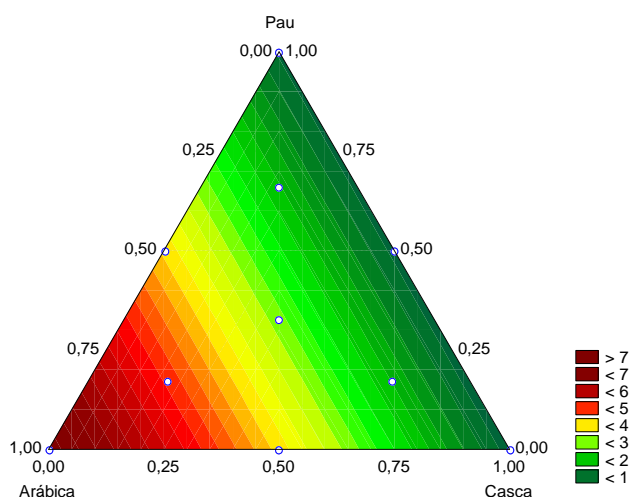


$$\hat{y} = 2,55cs + 5,97pa \quad (27)$$

$$(\pm 0,12) \quad (\pm 0,12)$$

Figura 41 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), cascas de café (*cs*) e paus de café (*pa*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato xilose, apresentando-se predominante na matriz de paus de café.

A Figura 42 demonstra que a concentração de manose é mais afetada pelo componente de café, sendo que a coloração mais intensa está no vértice do triângulo pertence ao café arábica 100%, apresentando na Equação (28) com um coeficiente de (7,18), praticamente não tendo influência da casca (0,61) e paus (0,70).

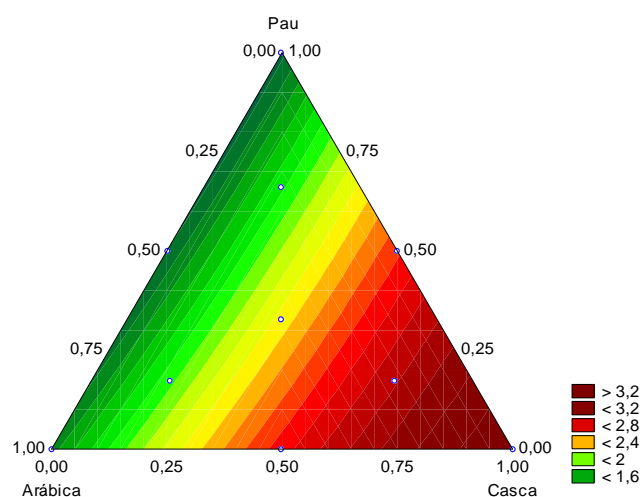


$$\hat{y} = 7,18ca + 0,61cs + 0,70pa \quad (28)$$

$$(\pm 0,20) \quad (\pm 0,20) \quad (\pm 0,20)$$

Figura 42 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), cascas de café (*cs*) e paus de café (*pa*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato manose, apresentando-se predominante na matriz de café arábica.

Para a arabinose as três matrizes puras de café arábica, cascas e paus de café contribuíram para o aumento do seu teor, sendo a maior contribuição da cascas de café (*cs*) de 3,30 - Equação (29), havendo ainda um efeito sinérgico entre as interação de café arábica e cascas de café (*cacs*) e entre cascas e paus de café (*cspa*).

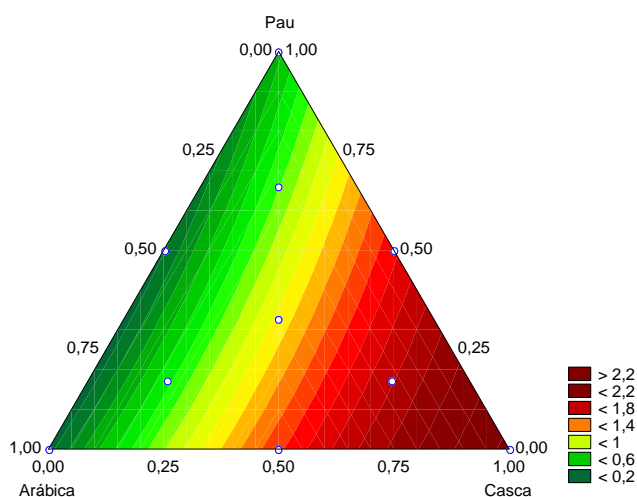


$$\hat{y} = 1,45ca + 3,30cs + 1,27pa + 1,11cacs + 1,18cspa \quad (29)$$

$(\pm 0,06) \quad (\pm 0,06) \quad (\pm 0,06) \quad (\pm 0,28) \quad (\pm 0,27)$

Figura 43 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), cascas de café (*cs*) e paus de café (*pa*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato arabinose, apresentando-se predominante na matriz de cascas de café.

Na Equação (30) (Figura 44), observou-se que a casca (*cs*) exerce maior influência quanto ao aumento da concentração de glicose (2,23) na mistura das três matrizes estudadas neste planejamento, houve também um efeito sinérgico entre as interações envolvendo café arábica e cascas de café (*cacs*) e entre as cascas e paus de café (*cspa*), porém, com um efeito antagônico entre a interação de café arábica e paus de café (*capa*), ou seja, que contribuiu para a redução na concentração deste carboidrato.

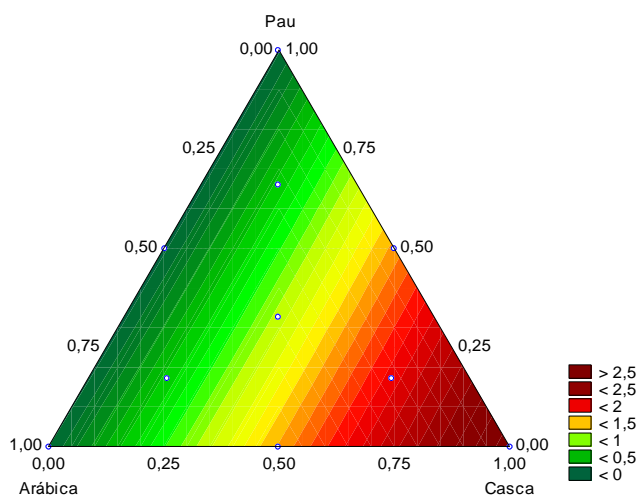


$$\hat{y} = 0,16ca + 2,23cs + 0,47pa + 1,14cacs - 0,51capa + 0,90cspa \quad (30)$$

$(\pm 0,05) \quad (\pm 0,05) \quad (\pm 0,05) \quad (\pm 0,22) \quad (\pm 0,22) \quad (\pm 0,22)$

Figura 44 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), cascas de café (*cs*) e paus de café (*pa*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato glicose, apresentando-se predominante na matriz de cascas de café.

Quanto ao aumento da concentração de frutose nesta mistura, a casca (*cs*) foi a matriz pura que contribui para esta afirmação (2,77), com certo efeito de sinergia entre as interações de café arábica e cascas (*cacs*) e cascas e paus de café (*cspa*), observados na Equação (31), reforçado pelo gráfico de superfície resposta mostrado na Figura 45, com o vértice mais intenso para o componente casca.

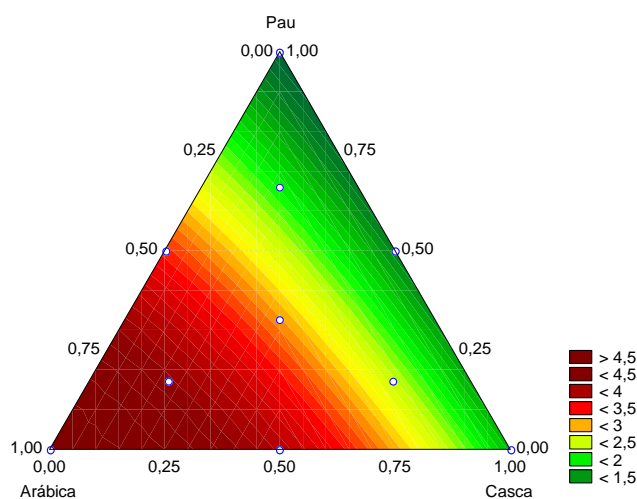


$$\hat{y} = 2,77cs + 0,52cacs + 0,64cspa \quad (31)$$

$(\pm 0,04) \quad (\pm 0,17) \quad (\pm 0,17)$

Figura 45 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), cascas de café (*cs*) e paus de café (*pa*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato frutose, apresentando-se predominante na matriz de cascas de café.

Na Equação (32), podemos observar que todas as matrizes contribuem para o aumento da concentração de galactose, porém a contribuição maior é proveniente do café arábica (*ca*) (4,53). As interações binárias envolvendo a matriz de café também são responsáveis por este aumento, sendo mais expressivos entre as matrizes de café arábica e cascas (*cacs*) (3,12).



$$\hat{y} = 4,53ca + 1,70cs + 0,99pa + 3,12cacs + 2,21capa \quad (32)$$

$$(\pm 0,15) \quad (\pm 0,14) \quad (\pm 0,13) \quad (\pm 0,68) \quad (\pm 0,69)$$

Figura 46 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), cascas de café (*cs*) e paus de café (*pa*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato galactose, apresentando-se predominante na matriz de café arábica.

Nenhum modelo ajustou-se aos dados das concentrações de manitol. No entanto, elevados teores deste carboidrato é característico da matriz de cascas de café de acordo com estudos de GARCIA et al., 2009.

A Figura 47 mostra o gráfico dos escores dos Fatores 1 e 2, que juntos explicam 97,78% da variância total contida nos dados. Neste gráfico é possível observar a distribuição dos resultados, com a formação do triângulo, separando visivelmente as matrizes puras, as misturas binárias e ternárias, e ainda os pontos axiais.

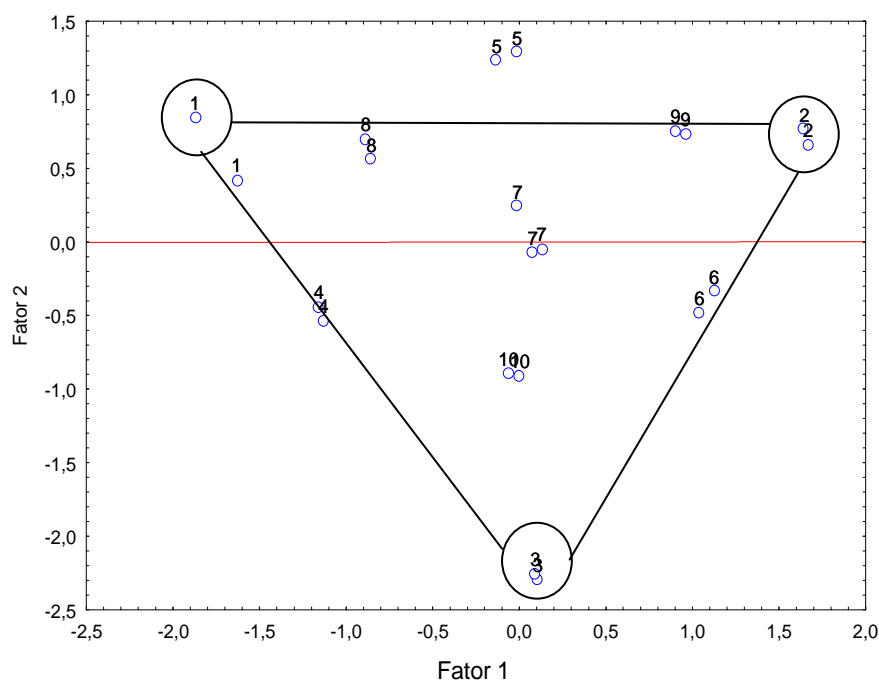


Figura 47 - Gráfico dos escores do Fator 1 com o Fator 2 dos resultados cromatográficos das 21 amostras das matrizes puras e misturas de café arábica, cascas e paus de café.

5.3.6 Planejamento experimental para estudo das misturas de café arábica, café conilon e paus de café

Para o último planejamento de misturas envolvendo a adição de café conilon e paus de café, a Figura 48 mostra os cromatogramas das matrizes puras dos cafés arábica, conilon, paus de café, e ainda do padrão de carboidratos. Pode-se notar que não há características muito distintas entre as duas espécies de café: arábica e conilon, já os paus de café apresentam um perfil cromatográfico característico. De acordo com a Tabela 23, nas matrizes de café arábica e conilon puras destacam-se respectivamente com as maiores concentrações, a galactose (5,26% e 5,79%) e a manose (7,69% e 6,67%). Nos paus de café puro destacam-se o manitol, pico n^o 1 do cromatograma com um teor de 0,08%, e principalmente o pico n^o 5 da xilose com 5,33% (m/m).

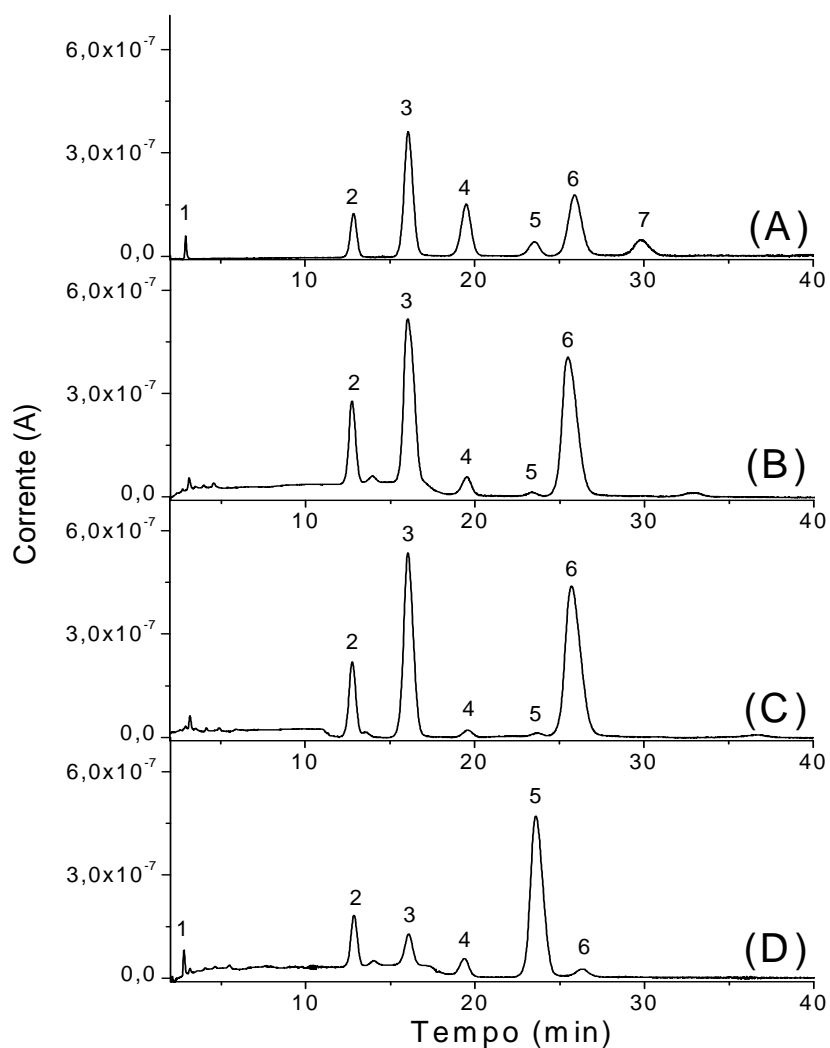


Figura 48 - Cromatogramas de carboidratos utilizando HPAEC-PAD: (A) Padrão 10% (v/v), (B) Café arábica 100%, (C) Café conilon 100%, (D) Paus de café 100%. Picos: (1) Manitol, (2) Arabinose, (3) Galactose, (4) Glicose, (5) Xilose, (6) Manose e (7) Frutose. Fase móvel – isocrático: NaOH $1,4 \text{ mmol L}^{-1}$ (elute: 0 – 45 min e re-equilíbrio: 57,6–72,6 min) e NaOH 300 mmol L^{-1} (regeneração: 45,1- 57,5 min). Vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; vol. injeção: $20,0 \mu\text{L}$; pré-coluna e coluna: CarboPac PA-1 à T: 28°C ; forma do pulso amperométrico - ED-50-Au: + $0,20 \text{ V}$ (400 ms); + $0,65 \text{ V}$ (200 ms) e - $0,20 \text{ V}$ (400 ms).

Tabela 23 - Concentrações em % (m/m) dos monossacarídeos de acordo com o planejamento centróide-simplex das matrizes de café arábica, café conilon e paus de café. (N = 2 para todos os pontos, exceto para o ponto central da mistura ternária com N = 3)

Código (Tabela 2)	1 café ar. 100%	2 Café co. 100%	3 paus 100%	4 café ar. 50% paus 50%	5 café ar. 50% Café co. 50%	6 Café co. 50% paus 50%	7 café ar. 34 % paus 33% café co. 33%	8 café ar. 66% paus 17% Café co. 17%	9 café ar. 17% paus 17% café co. 66%	10 café ar. 17% paus 66% café co. 17%
Manitol	n.d.	n.d.	0,08	0,04	n.d.	0,03	0,03	0,02	0,02	0,05
Manitol*	n.d.	n.d.	0,08	0,04	n.d.	0,03	0,03	0,02	0,02	0,05
Média ± s.d.	n.d.	n.d.	0,08 ±0,00	0,04 ±0,00	n.d.	0,03 ±0,00	0,03 ±0,00	0,02 ±0,00	0,02 ±0,00	0,05 ±0,00
Arabinose	1,56	1,82	1,52	1,39	1,40	1,50	1,52 1,54	1,32	1,56	1,35
Arabinose*	1,55	1,80	1,41	1,39	1,44	1,43	1,54	1,37	1,52	1,36
Média ± s.d.	1,56 ±0,01	1,81 ±0,01	1,46 ±0,08	1,39 ±0,00	1,42 ±0,03	1,46 ±0,04	1,53 ±0,01	1,34 ±0,04	1,54 ±0,03	1,36 ±0,00
Galactose	5,16	5,82	0,95	3,13	4,56	3,87	4,31 4,35	4,25	4,68	2,63
Galactose*	5,37	5,76	0,91	3,23	4,68	3,63	4,46	4,18	4,40	2,84
Média ± s.d.	5,26 ±0,15	5,79 ±0,04	0,93 ±0,03	3,18 ±0,07	4,62 ±0,08	3,75 ±0,17	4,37 ±0,08	4,21 ±0,05	4,54 ±0,20	2,74 ±0,15
Glicose	0,19	0,51	0,46	0,30	0,26	0,41	0,31 0,29	0,33	0,39	0,38
Glicose*	0,21	0,50	0,53	0,29	0,30	0,36	0,34	0,27	0,41	0,38
Média ± s.d.	0,20 ±0,01	0,50 ±0,01	0,50 ±0,05	0,29 ±0,01	0,28 ±0,02	0,38 ±0,04	0,32 ±0,02	0,30 ±0,04	0,40 ±0,02	0,38 ±0,00
Xilose	0,08	0,08	5,36	2,77	0,06	2,74	1,98 1,94	0,97	0,88	3,59
Xilose*	0,07	0,06	5,30	2,79	0,07	2,58	2,03	0,96	0,90	3,54
Média ± s.d.	0,07 ±0,00	0,07 ±0,01	5,33 ±0,04	2,78 ±0,01	0,06 ±0,00	2,66 ±0,11	1,98 ±0,04	0,96 ±0,01	0,89 ±0,01	3,56 ±0,03
Manose	7,58	6,74	0,32	4,13	5,47	3,80	5,18 5,06	5,21	5,14	2,84
Manose*	7,80	6,59	0,29	4,18	5,54	3,56	5,36	5,14	4,71	2,67
Média ± s.d.	7,69 ±0,15	6,67 ±0,11	0,31 ±0,02	4,16 ±0,03	5,50 ±0,05	3,68 ±0,17	5,20 ±0,15	5,18 ±0,05	4,93 ±0,30	2,76 ±0,12
Frutose	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d. n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Frutose*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Média ± s.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

*duplicata

d.p = desvio padrão

n.d. = não detectado

Com o propósito de se avaliar o efeito da mistura de café conilon (co) e paus de café (pa) ao café arábica (ca) provocada nos teores dos carboidratos totais apresentados na Tabela 23, foram testados diferentes modelos matemáticos, tendo sido a ANOVA usada para testar a adequação destes modelos aos dados experimentais individuais dos carboidratos no planejamento centróide simplex, tendo sido os dados apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 - Análise da variância para ajuste dos modelos adotados para as concentrações de carboidratos totais das matrizes puras de café arábica, café conilon e paus de café.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MQ)	F	p
Manitol					
Regressão (R)	0,0106	6	0,00212	951,14	0,00
Resíduos (r)	0,00004	14	0,00000		
F. Ajuste (f_{aj})	0,00002	3	0,00000	0,47	0,71
E. puro (eq)	0,00003	11	0,00000		
Total (T)	0,01064	20	0,00053		
% de variância explicada = 99,76; % máxima de variância explicável = 100					
Glicose					
Regressão (R)	0,16252	5	0,03250	30,14	0,00
Resíduos (r)	0,01617	15	0,00108		
F. Ajuste (f_{aj})	0,00785	4	0,00196	2,59	0,10
E. puro (eq)	0,00832	11	0,00076		
Total (T)	0,17869	20	0,00893		
% de variância explicada = 90,95; % máxima de variância explicável = 94,44					

Para os resultados das concentrações obtidas por meio do planejamento experimental para o manitol, o modelo que melhor se ajustou foi o cúbico, com a remoção de alguns termos, não apresentando falta de ajuste no valor da distribuição de $F_{7,11}$ (3,01), no nível de confiança de 95%. Já para glicose, o modelo que melhor se ajustou aos resultados de suas concentrações foi o quadrático, não apresentando falta de ajuste no valor da distribuição de $F_{4,11}$ (3,36), no nível de confiança de 95%. As regressões foram significativas e úteis para fazer previsões, onde os coeficientes para os modelos cúbico e quadrático e o resultado do teste de significância encontram-se na Tabela 25.

Para os demais carboidratos nenhum modelo se ajustou aos dados de suas concentrações, no caso, arabinose, galactose, xilose, manose e frutose, provavelmente devido ao perfil dos carboidratos entre os cafés das duas espécies serem muito parecidos.

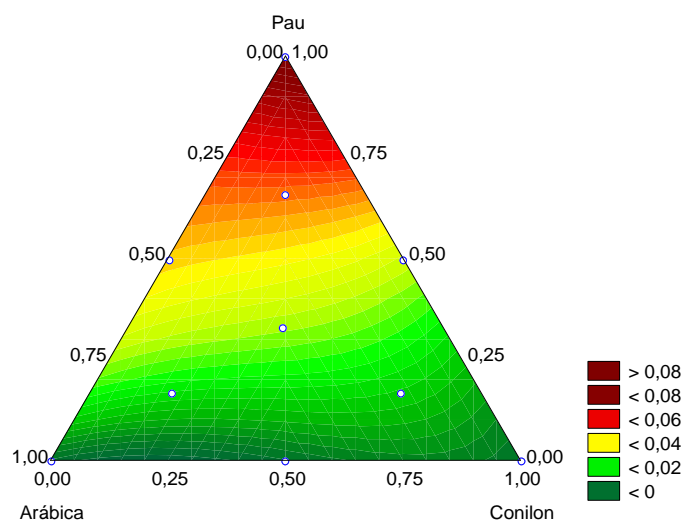
Tabela 25 - Teste de significância para os coeficientes dos modelos cúbico e quadrático para o estudo das misturas de café arábica, café conilon e paus de café.

Coeficiente	Valor calculado	Erro padrão	Intervalo de confiança (95%)
Manitol			
x_1	-0,00	0,00	0,00 a 0,00
x_2	0,00	0,00	0,00 a 0,00
x_3	0,08	0,00	0,08 a 0,08
$x_2 x_3$	-0,04	0,00	-0,05 a -0,03
$x_1 x_2 x_3$	0,14	0,02	0,08 a 0,19
$x_1 x_2(x_1-x_2)$	-0,04	0,02	-0,08 a 0,00
$x_1 x_3(x_1-x_3)$	0,09	0,02	0,05 a 0,12
Glicose			
x_1	0,21	0,02	0,16 a 0,25
x_2	0,50	0,02	0,46 a 0,55
x_3	0,49	0,02	0,44 a 0,54
$x_1 x_2$	-0,20	0,10	-0,41 a 0,02
$x_1 x_3$	-0,13	0,10	-0,35 a 0,08
$x_2 x_3$	-0,41	0,10	-0,63 a -0,19

x_1 = café arábica; x_2 = café conilon e x_3 = paus de café

As Equações (33) e (34) são dos modelos cúbico e quadrático referentes ao manitol e glicose, respectivamente, e suas superfícies de resposta elucidam estes modelos (Figuras 49 e 50), onde, \hat{y} = resposta prevista pelo modelo, ca = café arábica, co = café conilon, pa = paus de café, com seus respectivos erros padrão entre parênteses.

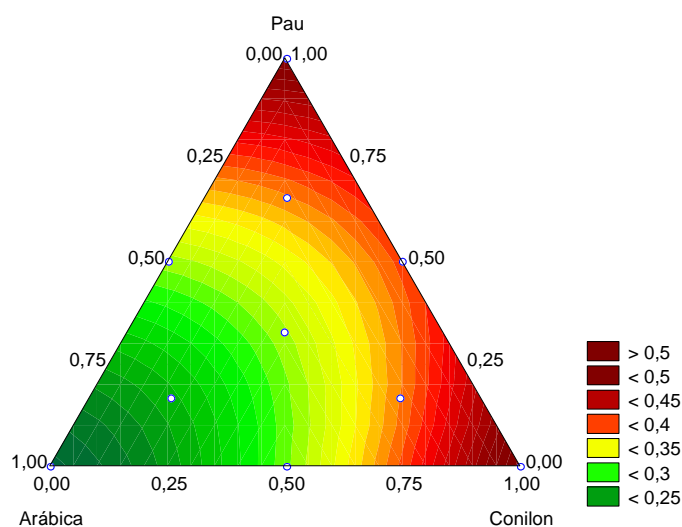
Na Equação (33), as maiores influências para o aumento da concentração de manitol referem-se aos paus de café puro (pa) (0,08), a interação ternária ($cacopa$) (0,14) entre as três matrizes utilizados neste planejamento e ainda a interação $capa(ca-pa)$ (0,09).



$$\hat{y} = 0,08pa - 0,04copa + 0,14cacopa - 0,04caco(ca - co) + 0,09capa(ca - pa) \quad (33)$$

$(\pm 0,00) \quad (\pm 0,00) \quad (\pm 0,02) \quad (\pm 0,02) \quad (\pm 0,02)$

Figura 49 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), café conilon (*co*) e paus de café (*pa*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato manitol, apresentando-se predominante na matriz de paus de café.



$$\hat{y} = 0,21ca + 0,50co + 0,49pa - 0,20caco - 0,13capa - 0,41copa \quad (34)$$

$(\pm 0,02) \quad (\pm 0,02) \quad (\pm 0,02) \quad (\pm 0,10) \quad (\pm 0,10) \quad (\pm 0,10)$

Figura 50 - Superfície de resposta para as componentes: café arábica (*ca*), café conilon (*co*) e paus de café (*pa*), mostrando o efeito das misturas na concentração do carboidrato glicose, apresentando-se predominante nas matrizes de paus de café e café conilon.

Através da Equação (34), podemos observar que as três matrizes: café arábica (*ca*) (0,21), café conilon (*co*) (0,50) e paus de café (*pa*) (0,49), contribuem para o aumento da glicose, porém o café conilon e os paus são os

que mais contribuem, de modo similar, já que seus coeficientes são praticamente iguais. Quanto as interações binárias, todas apresentaram um efeito antagônico, sendo maior entre o café conilon e paus de café (*copa* com -0,41), podendo este efeito ser mais bem visualizado por meio da Figura 50, que apresenta uma coloração mais intensa nos vértices do triângulo compostos de café conilon e paus de café, e uma coloração menos intensa no meio da aresta.

A Figura 51 representa o gráfico dos escores dos Fatores 1 e 2, que juntos explicam 94,75% da variância total contida nos dados. Neste gráfico, podemos notar a formação de três grupos. O grupo I é composto pelas amostras 2 e 2a (paus de café puros). O grupo II é formado por amostras 3 e 3a (café conilon). O grupo III que é formado pelas demais amostras em duplicatas (com predominância de café arábica e conilon).

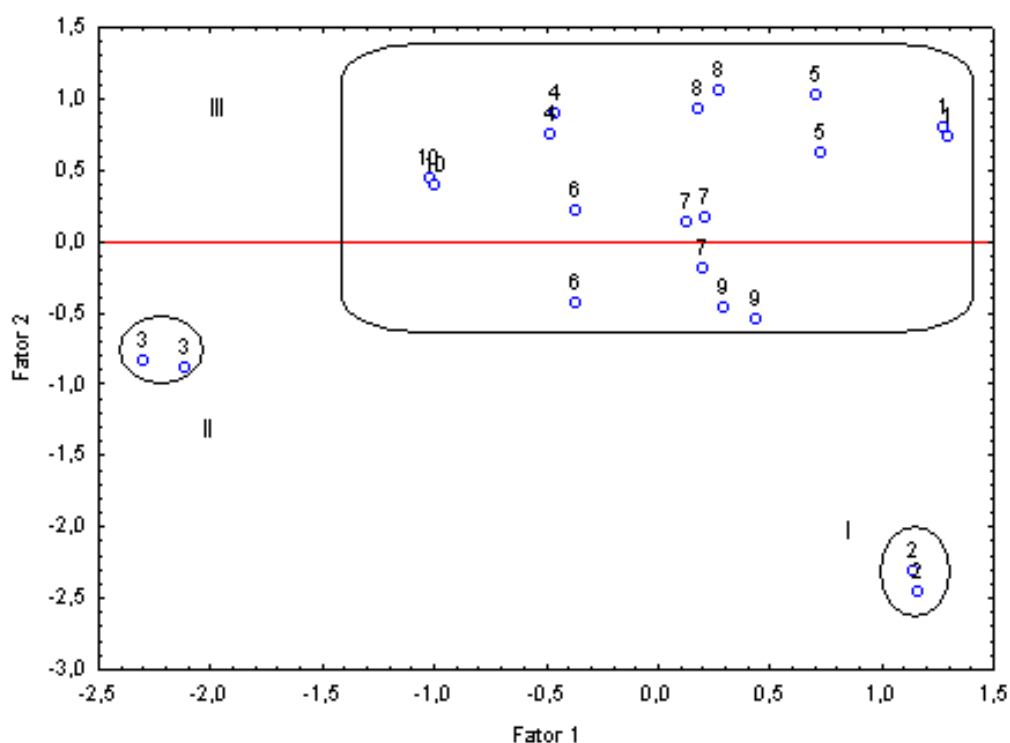


Figura 51 - Gráfico dos escores do Fator 1 com o Fator 2 dos resultados cromatográficos das 21 amostras das matrizes puras e misturas de café arábica, café conilon e paus de café.

Para uma avaliação em conjunto da capacidade de discriminação entre as amostras de café arábica, café conilon, cascas e paus de café nas variáveis manitol, arabinose, galactose, glicose, xilose, manose e frutose empregou-se Análise de Componentes Principais (ACP), apresentada na Figura 52.

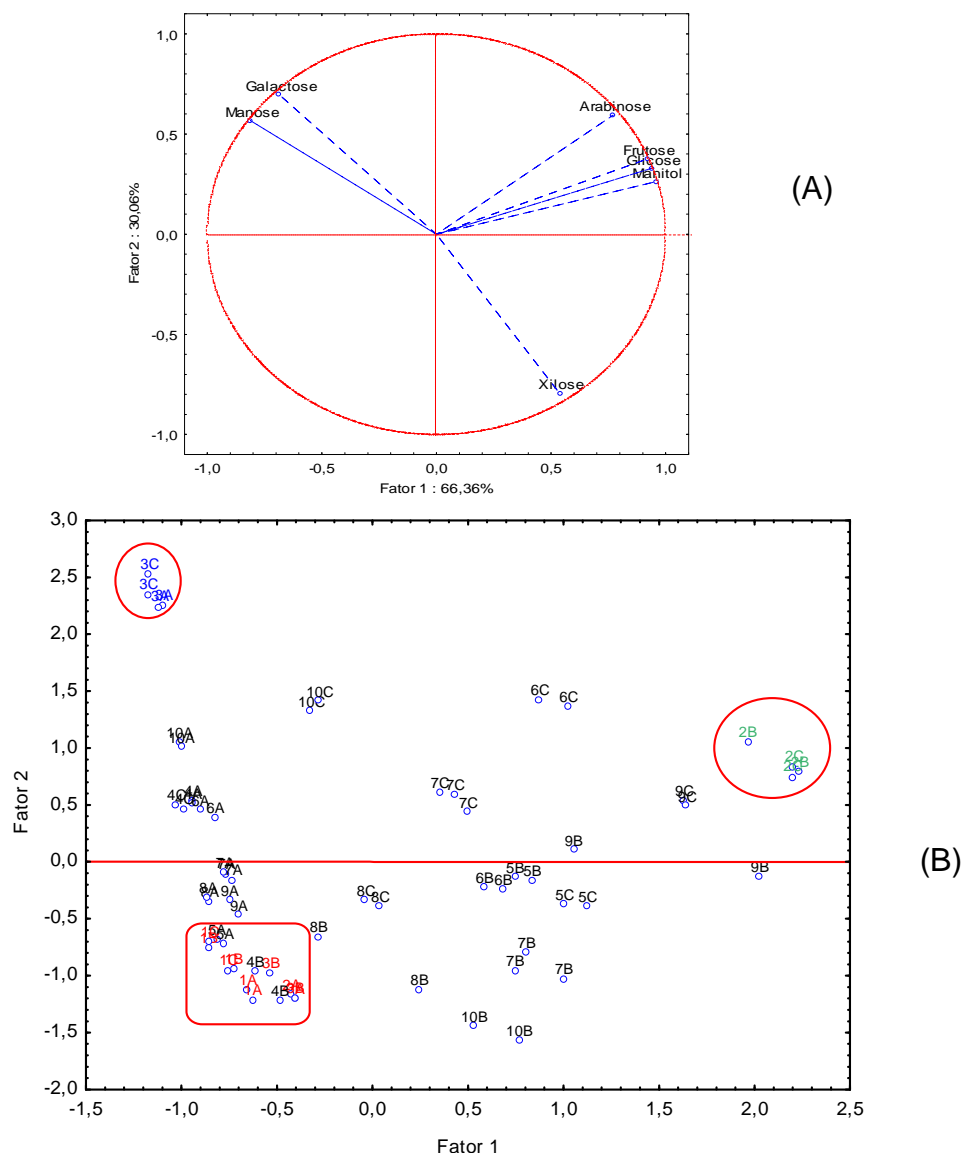


Figura 52 - Projeções das variáveis (A) e das amostras (B) nos Fatores 1 e 2. Números de 1A a 10 A pertencentes ao planejamento do café arábica*café conilon*paus de café, 1 B a 10 B ao planejamento do café arábica*cascas de café*café conilon e 1 C a 10 C ao planejamento do café arábica*cascas de café*paus de café.

Os Fatores 1 e 2 explicam juntos 96,42% da variabilidade dos dados (Figura 52 A). Analisando a projeção das variáveis nos Fatores 1 e 2 (Figura 52 A) os parâmetros de maior importância no eixo horizontal (Fator 1) foram arabinose, frutose, glicose e manitol, com correlação positiva, caracterizando desta forma as cascas de café; apresentando a galactose e manose correlação negativa no eixo horizontal, caracterizando cafés arábica e conilon. A xilose foi o parâmetro de maior importância no eixo vertical, com correlação negativa, caracterizando assim os paus de café.

5.3.7 Análise das amostras de café torrados e moídos comerciais

Inicialmente foram analisadas amostras de cafés torrado e moído comercializadas na região de Londrina, utilizadas na Dissertação de Mestrado de Romilaine M. N de Souza (2009), cedidas pela Profa. Dra. Marta Benassi do DCTA/UEL, em um trabalho que visava verificar a possibilidade de se determinar a proporção de conilon adicionado ao arábica, cujos resultados estão reportados na Tabela 26.

Tabela 26 - Concentrações em % (m/m) dos carboidratos totais das amostras de cafés torrado e moídos comercializadas na região de Londrina, realizadas em duplicata.

Amostras Comercias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Manitol	0,02	0,02	0,09	0,02	0,02	0,05	0,03	0,02	0,01	0,02	0,01
Manitol*	0,02	0,02	0,09	0,02	0,02	0,05	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01
Média ± s.d.	0,02 ±0,00	0,02 ±0,00	0,09 ±0,00	0,02 ±0,00	0,02 ±0,00	0,05 ±0,00	0,02 ±0,01	0,01 ±0,00	0,01 ±0,00	0,02 ±0,00	0,01 ±0,00
Arabinose	2,97	2,44	2,45	2,66	3,35	2,35	2,15	1,86	1,94	1,96	1,60
Arabinose*	3,05	2,51	2,53	3,02	3,24	2,45	2,10	1,76	2,09	2,00	1,65
Média ± s.d.	3,01 ±0,05	2,48 ±0,05	2,49 ±0,06	2,84 ±0,26	3,30 ±0,08	2,40 ±0,07	2,12 ±0,03	1,81 ±0,08	2,02 ±0,10	1,98 ±0,03	1,62 ±0,03
Galactose	6,18	5,88	5,65	6,05	6,69	5,06	5,36	5,13	5,42	5,88	4,52
Galactose*	6,21	5,91	5,60	6,74	6,39	5,21	5,17	4,98	5,99	5,96	4,52
Média ± s.d.	6,20 ±0,02	5,90 ±0,02	5,62 ±0,04	6,39 ±0,49	6,54 ±0,21	5,13 ±0,11	5,26 ±0,12	5,06 ±0,11	5,71 ±0,40	5,92 ±0,05	4,52 ±0,00
Glicose	0,76	0,38	0,64	0,49	0,94	0,49	0,46	0,27	0,50	0,26	0,27
Glicose*	1,17	0,64	0,61	0,54	1,08	0,51	0,48	0,31	0,49	0,39	0,25
Média ± s.d.	0,96 ±0,29	0,51 ±0,18	0,63 ±0,02	0,52 ±0,03	1,01 ±0,10	0,50 ±0,01	0,47 ±0,02	0,29 ±0,03	0,50 ±0,00	0,32 ±0,08	0,26 ±0,02
Xilose	0,11	0,16	0,26	0,13	0,13	0,11	0,09	0,09	0,13	0,12	0,13
Xilose*	0,10	0,16	0,27	0,14	0,14	0,11	0,09	0,09	0,13	0,13	0,12
Média ± s.d.	0,11 ±0,00	0,16 ±0,01	0,27 ±0,00	0,14 ±0,01	0,14 ±0,00	0,11 ±0,00	0,09 ±0,00	0,09 ±0,00	0,13 ±0,00	0,13 ±0,01	0,12 ±0,01
Manose	8,86	9,20	8,93	6,99	8,95	5,56	4,88	5,86	5,74	6,51	5,01
Manose*	8,96	9,50	8,95	7,89	8,55	5,84	5,27	5,78	5,73	6,58	5,27
Média ± s.d.	8,91 ±0,07	9,35 ±0,21	8,94 ±0,01	7,44 ±0,64	8,75 ±0,28	5,70 ±0,20	5,07 ±0,28	5,82 ±0,05	5,74 ±0,01	6,54 ±0,05	5,14 ±0,18
Frutose	n.d	n.d	0,12	0,02	n.d	0,16	0,55	n.d	n.d	n.d	n.d
Frutose*	n.d	0,07	0,13	n.d	n.d	0,16	0,51	n.d	n.d	n.d	n.d
Média ± s.d.	n.d	0,03 ±0,05	0,12 ±0,00	0,01 ±0,01	n.d	0,16 ±0,00	0,53 ±0,03	n.d	n.d	n.d	n.d

A Figura 53 representa o gráfico dos *loadings* dos Fatores 1 e 2, onde estão contidos os dados dos três planejamento feitos entre o café arábica, café

conilon, cascas de café e paus de café, soja, milho e trigo e as amostras comercializadas na região de Londrina.

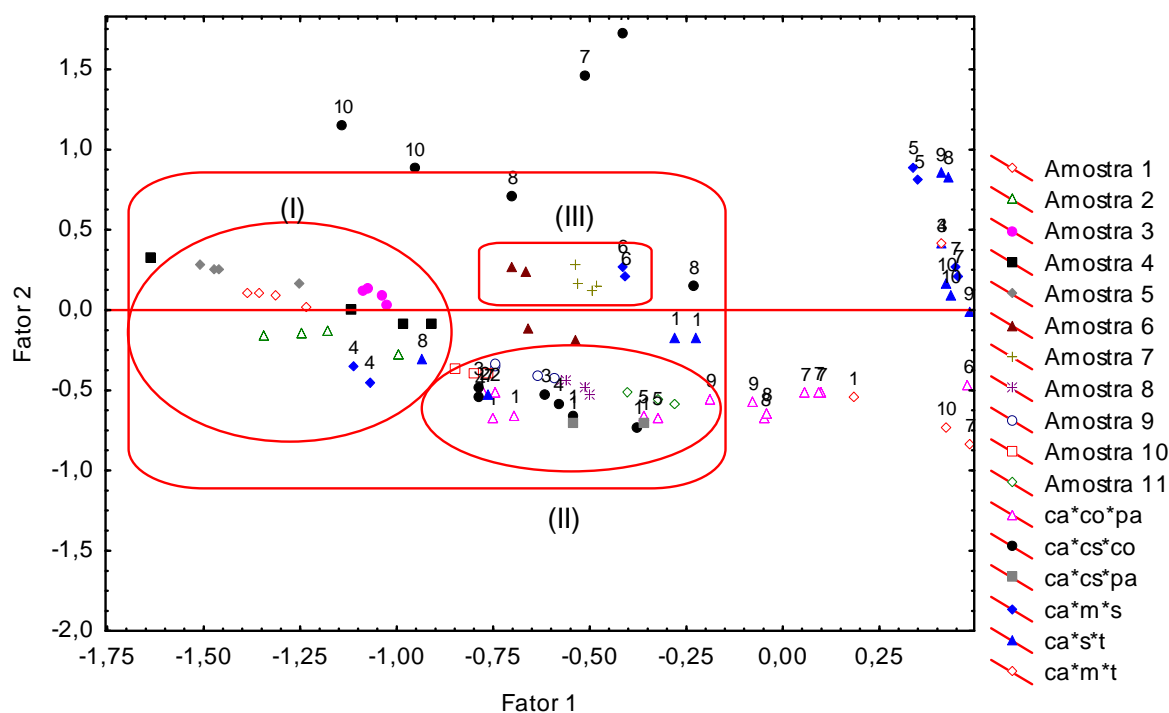


Figura 53 - Gráfico dos *loadings* do Fator 1 com o Fator 2 para as amostras comercializadas em Londrina (Amostras 1 a 11) e as misturas obtidas através do planejamento centróide simplex (*ca*co*pa*; *ca*cs*co*; *ca*cs*pa*; *ca*m*s*; *ca*s*t* e *ca*m*t*).

Pode-se notar que estas amostras comerciais permaneceram praticamente em uma mesma região, formando três grupos. O grupo I compreende as amostras de número 1, 2, 3, 4 e 5 que estão um pouco mais próximas a região da mistura binária do planejamento centróide simplex entre café arábica e soja (*ca*m*s* – representada pelo ponto 4 do planejamento centróide simples pelo losango azul) e mistura axial contendo a maior parte de café (*ca*s*t* - representada pelo ponto 8 do planejamento centróide simples pelo triângulo azul). O grupo II, formado pelas amostras 8, 9, 10 e 11, está mais próximo a região do café arábica (representada por todos os pontos 1) e conilon (representadas pelos pontos 2 do triângulo rosa e 3 do círculo preto), misturas binárias entre café arábica e conilon (*ca*cs*co* – representada pelo ponto 4 do círculo preto). O grupo III, formado pelas amostras 6 e 7 estão próximas a mistura binária entre milho e soja (*ca*m*s* – representada pelo ponto 6 do losango azul), através da Tabela 49, podemos notar que estas duas amostras permaneceram nesta região devido ao teor relativamente alto de frutose, característico da soja.

Com o objetivo de analisar amostras comerciais fornecidas pela ABIC consideradas como adulteradas pela microscopia, método adotado no Brasil para verificação de fraudes, para avaliar a consistência dos resultados aplicando HPAEC-PAD e verificar o potencial desta metodologia vir a ser implementada no País em complementação e/ou substituição da atual. Para isto foram enviadas as 15 amostras analisadas, porém, a nosso pedido, isto foi feito como teste cego, ou seja sem que o tipo e a proporção do adulterante fosse informado. A Tabela 27 mostra as concentrações dos carboidratos totais obtidas nas amostras de cafés torrados e moídos comerciais brasileiros fornecidas pela ABIC, consideradas por análise de microscopia com amostras adulteradas.

Tabela 27 - Concentrações em % (m/m) dos carboidratos totais das amostras de cafés torrado e moídos comerciais, fornecidas pela ABIC, realizadas em duplicata.

Amostras Comercias	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Manitol	n.d	0,04	0,02	0,03	0,11	0,20	0,02	0,49	0,10	0,02	0,44	0,45	0,14	n.d	0,26
Manitol*	n.d	0,03	0,02	0,03	0,11	0,20	0,03	0,62	0,11	0,02	0,45	0,56	0,12	n.d	0,29
Média ± s.d.	n.d	0,04 ±0,00	0,02 ±0,00	0,03 ±0,00	0,11 ±0,00	0,20 ±0,00	0,02 ±0,01	0,56 ±0,09	0,10 ±0,01	0,02 ±0,01	0,45 ±0,01	0,51 ±0,08	0,13 ±0,02	n.d	0,28 ±0,02
Arabinose	1,83	1,51	1,71	1,89	2,27	2,32	2,07	2,42	1,73	1,56	2,05	1,88	1,89	0,83	1,89
Arabinose*	2,20	1,78	2,15	1,85	2,07	2,18	1,88	2,33	1,67	1,53	2,10	1,78	1,87	0,77	1,86
Média ± s.d.	2,02 ±0,26	1,64 ±0,19	1,93 ±0,31	1,87 ±0,03	2,17 ±0,14	2,25 ±0,10	1,97 ±0,14	2,38 ±0,06	1,70 ±0,05	1,55 ±0,02	2,08 ±0,04	1,83 ±0,07	1,88 ±0,02	0,80 ±0,05	1,87 ±0,02
Galactose	3,78	4,34	4,63	5,10	5,25	4,59	5,20	4,56	4,53	4,65	4,20	3,27	4,77	3,46	4,52
Galactose*	4,12	5,12	5,65	5,13	5,45	4,19	5,08	4,32	4,73	4,83	4,17	3,23	4,88	3,37	4,56
Média ± s.d.	3,95 ±0,24	4,73 ±0,55	5,14 ±0,72	5,12 ±0,02	5,35 ±0,14	4,39 ±0,29	5,14 ±0,08	4,44 ±0,17	4,63 ±0,14	4,74 ±0,13	4,18 ±0,02	3,25 ±0,03	4,83 ±0,08	3,41 ±0,06	4,54 ±0,03
Glicose	0,23	0,17	0,32	0,40	1,38	0,48	0,29	1,47	0,29	0,12	0,38	0,29	0,19	7,06	0,37
Glicose*	0,24	0,25	0,36	0,35	1,41	0,47	0,28	1,66	0,10	0,11	0,47	0,23	0,24	6,88	0,33
Média ± s.d.	0,23 ±0,01	0,21 ±0,06	0,34 ±0,03	0,38 ±0,04	1,39 ±0,02	0,47 ±0,00	0,29 ±0,01	1,56 ±0,14	0,20 ±0,13	0,11 ±0,00	0,42 ±0,07	0,26 ±0,04	0,21 ±0,04	6,97 ±0,13	0,35 ±0,03
Xilose	0,45	0,22	0,09	0,20	0,27	0,42	0,06	0,75	0,22	0,08	0,73	0,88	0,29	0,09	0,45
Xilose*	0,44	0,18	0,15	0,16	0,29	0,39	0,12	0,87	0,23	0,08	0,81	0,92	0,33	0,09	0,51
Média ± s.d.	0,45 ±0,01	0,20 ±0,03	0,12 ±0,04	0,18 ±0,03	0,28 ±0,01	0,40 ±0,02	0,09 ±0,05	0,81 ±0,09	0,22 ±0,01	0,08 ±0,00	0,77 ±0,06	0,90 ±0,03	0,31 ±0,03	0,09 ±0,00	0,48 ±0,04
Manose	5,12	6,05	5,31	6,00	5,30	4,49	5,83	5,04	5,83	6,56	5,20	3,64	5,66	4,47	5,69
Manose*	5,26	5,61	5,90	5,91	5,36	4,49	5,97	5,10	6,08	6,69	4,79	3,75	5,96	4,41	5,79
Média ± s.d.	5,19 ±0,10	5,83 ±0,31	5,61 ±0,42	5,96 ±0,06	5,33 ±0,04	4,49 ±0,00	5,90 ±0,10	5,07 ±0,04	5,96 ±0,18	6,63 ±0,09	5,00 ±0,28	3,70 ±0,07	5,81 ±0,21	4,44 ±0,05	5,74 ±0,07
Frutose	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,21	n.d	1,30	n.d	n.d	0,20	0,14	n.d	n.d	0,20
Frutose*	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,23	n.d	1,50	n.d	n.d	0,23	0,15	n.d	n.d	0,13
Média ± s.d.	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,22 ±0,02	n.d	1,40 ±0,14	n.d	n.d	0,22 ±0,02	0,14 ±0,01	n.d	n.d	0,17 ±0,05

A Figura 54 representa o gráfico dos *loadings* dos Fatores 1 e 2, onde estão contidos os dados dos três planejamento feitos entre o café arábica, café conilon, cascas de café e paus de café e as amostras comerciais.

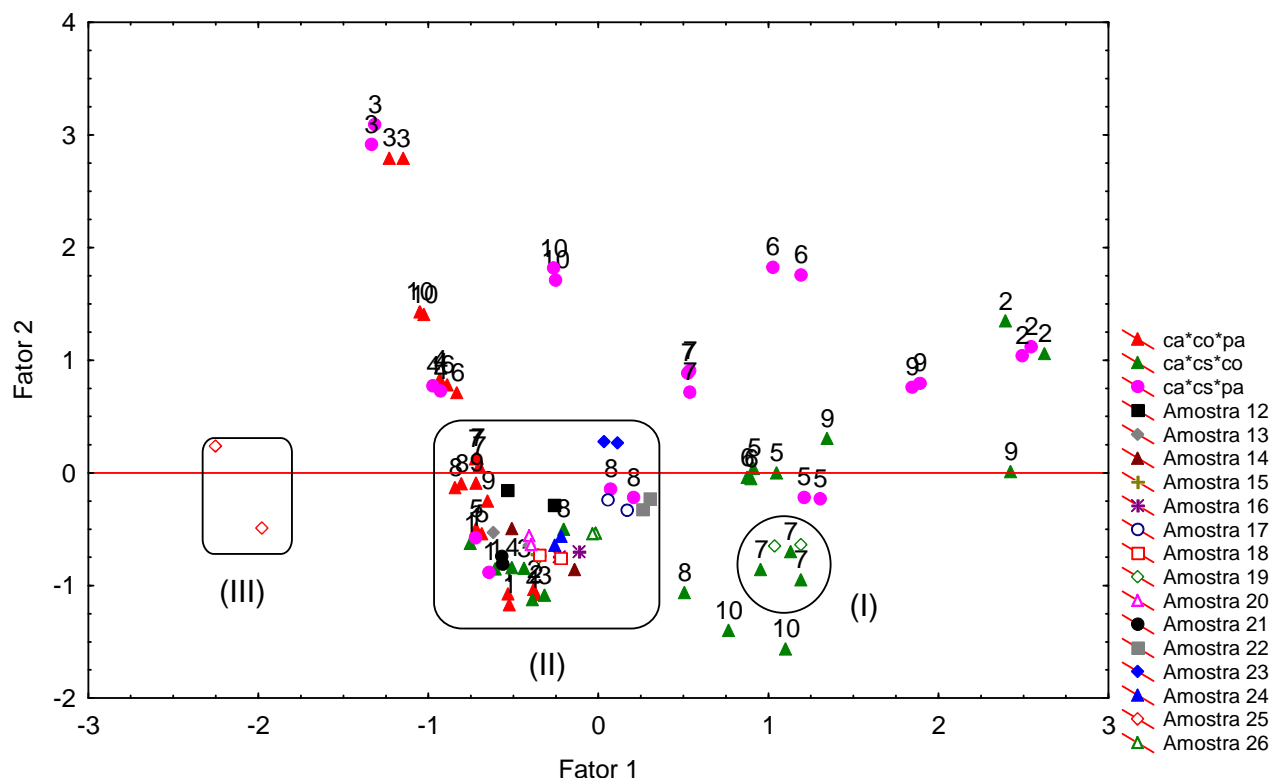


Figura 54 - Gráfico dos *loadings* do Fator 1 com o Fator 2 para as amostras comerciais fornecidas pela ABIC (Amostras 12 a 26) e as misturas obtidas através do planejamento centróide simplex (*ca*co*pa*; *ca*cs*co* e *ca*cs*pa*).

Pode-se notar que as amostras comerciais permaneceram praticamente em uma mesma região, formando três grupos. O grupo I, que compreende a amostra de número 19 (representada pelo quadrado cinza vazado), está numa região próxima da mistura ternária do planejamento centróide simplex entre café arábica, cascas de café e café conilon (*ca*cs*co* – representada ponto 7 do planejamento centróide simples pelo triângulo verde). O grupo II é composto de 13 amostras comerciais que estão próximas aos pontos onde há a maior concentração de café. As misturas próximas aos pontos das amostras comerciais são as misturas ternária do planejamento envolvendo na sua maioria cafés arábica e conilon e paus de café (*ca*co*pa* – representadas pelo triângulo vermelho) e em menor número cafés arábica, cascas e paus de café (*ca*cs*pa* -

representadas pelo círculo rosa), e ainda as misturas axiais contendo a maior parte de café. O grupo III, com a amostra 18 (representada pelo quadrado vermelho vazado) que não está próximo a nenhum grupo, pois conforme a Tabela 24, esta amostra comercial contém alto teor de glicose, sugerindo adulteração por milho.

6 CONCLUSÃO

A análise dos carboidratos totais por HPAEC-PAD empregando a metodologia ISO 11292 mostrou-se adequada na determinação do teor de cada um dos monossacarídeos presente no café torrado e moído e nos adulterantes estudados, soja, milho, trigo, cascas e paus de café, considerando os constituintes originais das diferentes matrizes descritos na literatura.

Á partir de planejamentos experimentais do tipo centróide simplex de 3 componentes para as misturas de café arábica*soja*trigo; café arábica*milho*soja; café arábica*milho*trigo, café arábica*cascas de café*café conilon; café arábica*cascas de café*paus de café e café arábica*café conilon*paus de café, foi possível ajustar modelos matemáticos preditivos em nível de confiança de 95% com superfícies de resposta para avaliação do efeito das misturas. A análise de fatores permitiu diferenciar os carboidratos para cada matriz.

A galactose e a manose apresentaram-se características das matrizes de cafés arábica e conilon, que não puderam ser distinguidos entre si. A frutose foi o carboidrato que mais contribuiu no soja. A glicose em elevadas concentrações foi característica para as matrizes de milho e trigo. A xilose destacou-se em maior concentração nos paus de café. As cascas de café apresentaram praticamente todos os componentes do café, com maiores teores de arabinose e xilose, sendo que o manitol a distinguiu por aparecer somente nesta matriz.

A determinação dos carboidratos por HPAEC-PAD mostrou potencialidade para ser utilizada em controle de qualidade do café, uma vez que as amostras comerciais brasileiras analisadas puderam ser agrupadas e correlacionadas com as matrizes estudadas, sendo que das 15 amostras

fornecidas pela ABIC, consideradas como adulteradas pela análise microscópica, verificou-se que 14 delas estavam fraudadas com cascas e paus de café, e 1 continha elevados teores de glicose, sugerindo adição de milho. No entanto, para ser implementada no País, uma complementação dos estudos deve ser realizada envolvendo planejamentos com outros adulterantes como centeio, cevada, arroz, feijão, açúcar mascavo e sementes de açaí e as variações em função do grau de torra das amostras devem ser mais bem avaliadas, bem como, para explicar como a contribuição individual de cada carboidrato se correlaciona com o todo, de forma a adotar parâmetros restritivos baseados em seus teores, modelagens mais complexas com análises multivariadas devem ser aplicadas.

7 REFERÊNCIAS

ABIC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em 28 mai. 2009.

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

AGUIAR, A. T. E.; SALVA, T. J. G.; FAZUOLI, L. C.; FAVARIN, J. L. Variação no Teor de Lipídeos em Grãos de Variedades de *Coffea canephora*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 12, p. 1251-1254, dez. 2005.

ALVES, S. T.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. T. Metodologia para Análise Simultânea de Ácido Nicotínico, Trigonelina, Ácido Clorogênico e Cafeína em Café Torrado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1164-1168, 2006.

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

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

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

BERNAL, J.L.; DEL ALAMO, M.; DEL NOZAL, M.J. HPLC Analysis of carbohydrates in wines and instant coffees using anion exchange chromatography

coupled to pulsed amperometric detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, n.2, p.507-511, 1996.

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

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

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

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 29 jun. 2009.

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

BRASIL. Instrução normativa nº 8, de 11 de junho de 2003. Regulamento técnico de identidade e de qualidade para a classificação do café beneficiado grão cru. Disponível em <http://www.abic.com.br/arquivos/leg_instnormativa08_2003.pdf> Acesso em : 28 de 01 de 2010.

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

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

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

BUCKERIDGE, M. S.; TINÉ, M. A. S.; SANTOS, H. P.; LIMA, D. U. Polissacarídeos de Reserva da Parede Celular em Semente, Estruturas, Metabolismo, Funções e Aspectos Ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Paulo, v. 12, edição especial, p. 137-162, 2000.

BUENO, L. Efeito Antagônico do Ferro e do Zinco em uma Formulação de Alimentação Enteral Utilizando Planejamento de Misturas da Metodologia de Superfície de Resposta. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 585-590, 2008.

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

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

CARVALHO, L. M.; SILVA, E. A. M.; AZEVEDO, A. A.; MOSQUIM, P. R.; CECON, P. R. Aspectos Morfofisiológicos dos Cultivares de Cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 411-419, 2001

CASTRO, R. D.; MARRACCINI, P. Cytology, Biochemistry and Molecular Changes During Coffee Fruit Development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 175-199, 2006.

CEPLAC – COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA. Café. Disponível em <<http://www.ceplac.gov.br/radar/cafe.htm>>. Acesso em 29 jun. 2009.

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

CNC – CONSELHO NACIONAL DO CAFÉ. Disponível em <<http://www.cncafe.com.br>>. Acesso em 26 junho 2009.

COFFEE BREAK. Disponível em: <<http://www.coffeefreak.com.br>>.. Acesso em 15 jul. de 2009

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

COUTINHO, L. F. M. **Desenvolvimento de Sistema Instrumental para Determinação de Carboidratos em Café Solúvel Utilizando HPAE-PAD.** Trabalho de Conclusão de Curso, UEL, 2003.

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

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

DIONEX. Technical Note 20. **Analysis of carbohydrates by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection**

(HPAE-PAD). Disponível na Internet via URL: <<http://www.dionex.com/servletw1/FileDownloader/slot114/77786/TN20releasedJC120600.pdf>>. Acesso em 25 de janeiro de 2010a.

DIONEX – Food and Beverage. Disponível em <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/61831-Bro_Carbohydrates_Food_Beverage_29Aug2007_LPN1971.pdf>, Acesso em 15 jan. 2010b

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa Café. Disponível em <http://www22.sede.embrapa.br/cafe/outros/arq_Relat_Gestao/Hist%F3rico.pdf>. Acesso em 28 maio 2009.

FERNANDES, S. M.; PINTO, N. A. V. D.; THÉ, P. M. P.; PEREIRA, R. G. F. A.; CARVALHO, V. D.; Teores de Polifenóis, Ácido Clorogênico, Cafeína e Proteína em Café Torrado. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.7, n 3, p.197 - 1999 set - dez, 2001.

FERREIRA, V. F; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C. Potencialidades e Oportunidades na Química da Sacarose e Outros Açúcares. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, São Paulo, 2009.

FISCHER, M.; REIMANN, S.; TROVATO, V.; REDGWELL, R.J.; Polysaccharides of green Arabica and Robusta coffee beans. **Carbohydrates Research**, v. 330, p. 93-101, 2001.

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

GASPARI-PEZZOPANE, C. **Atributos Fenológicos, Agronômicos e Expressão Gênica Durante a Frutificação do Cafeeiro**. 2007. Teste (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

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

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

JOHNSON, D. C.; LACOURSE, D. C. Liquid chromatography with pulsed electrochemical detection at gold and platinum electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 589–597, 1990.

LACOURSE, D. C.; JOHNSON, D. C. Optimization of waveforms for pulsed amperometric detection (p.a.d.) of carbohydrates following separation by liquid chromatography. **Carbohydrate Research**, , n. 215, p. 159-178, 1991.

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

LINEBACK, D.R.; RASPER V.F. Wheat Carbohydrates. In: POMERANZ, Y. **Wheat Chemistry and Technology**. 3. Ed. St. Paul, MN: AACC, 1988, cap. 6, p. 277-372.

LIU, KeShun. Chemistry and Nutritional Value of Soybean Components. In: LIU, K **Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization**. New York: Aspen Publisher, 1997. Cap. 2, p. 25-95.

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

MARTINS, M. C. M.; SILVA, C. O.; BUCKERIDGE, M. S.; VIEIRA, C. C. J. Carboidratos na Bebida do Café Preparado sob Diferentes Processos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25 n. 2, p. 382-386, abr.-jun., 2005.

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

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

NABAIS, J.V.; CARROTT, P.; CARROTT, M. M. L. R.; LUZ, V.; ORTIIZ, A. L. Influence of Preparation Conditions in the Textural and Chemical Properties of Activated Carbons from a Novel Biomass Precursor: The Coffe Endocarp. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7224-7231, 2008.

NIXDORF, S. L. **Desenvolvimento de sistema de instrumentação automatizado para cromatografia**. São Carlos, 2000. 165f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

NOBRE, G. W.; BORÉM, F. M.; FERNANDES, S. M.; PEREIRA, R. G. F. A. Alterações Químicas do Café-Cereja Descascado Durante o Armazenamento. **Coffee Science**, Lavras, v. 2, n. 1, p. 1-9, jan./jun. 2007.

OIC – ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ. Disponível em <<http://www.ico.org>>. Acesso em 26 jun. 2009.

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

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

ORTH, R.A.; SHELLENBERGER, J.A. Origin, Production, and Utilization of Wheat. In: POMERANZ, Y. **Wheat Chemistry and Technology**. 3. Ed. St. Paul, MN: AACC, 1988, cap. 1, p. 1-14.

PAES, M. C.D. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. **Circular Técnica**, n. 75, p. 1-6, 2006.

PAPADASKI, S. E.; MALEK, S. A.; KAMDEM, R. E.; YAM, K. L. A Versatile and Inexpensive Technique for Measuring Color of Food. **Food Technology Magazine**, v. 54, n. 12, dez, 2000.

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

PIZARRO, C.; ESTEBAN-DÍEZ, I.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M. Mixture resolution according to the percentage of robusta variety in order to detect adulteration in roasted coffee by near infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 585, p. 266-276, 2007.

POMERANZ, Y. Chemical Composition of Kernel Structures. In: POMERANZ, Y. **Wheat Chemistry and Technology**. 3. Ed. St. Paul, MN: AACC, 1988, cap. 4, p. 97-158.

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

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

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

REIS, C.; ANDRADE, J. C. Planejamento Experimental para Misturas Usando Cromatografia em Papel. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 3, 1996.

RIVAS, Mario Bouyssounade. Compostos da Soja. In: RIVAS, Mario Bouyssounade. **Soja: Qualidade de vida e saúde com prazer e sabor**. Porto Alegre: Age, 2006. p. 37-55.

ROGERS, w. J.; MICHAUX, S.; BASTIN, M.; BUCHELI, P. Changes to the Content of Sugars, Sugars Alcohols, Myo-Inositol, Carboxylic Acids and Inorganic Anions in Developing Grains Form Different Varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. Arabica*) Coffees. **Plant Science**, v. 149, p. 115-123, 1999.

SANTOS, M.C.S. **Utilização da espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e quimiometria na identificação do café torrado e moído adulterado**.

2005. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

SOUZA, R. M. N. **Caracterização e Discriminação de Cafés Torrados e Moídos Comerciais pela Composição de Substâncias Bioativas**. 2009. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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

TAVERNARI, F. C.; CARVALHO, T. A.; ASSIS, A. P.; LIMA, H. J. D. Polissacarídeos Não-Amiláceo Solúvel na Dieta de Suínos e Aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n. 5, p. 673-689, set.-out. 2008.