

RELAÇÃO ENTRE ALGUNS COMPOSTOS ORGÂNICOS DO
GRÃO DO CAFÉ VERDE COM A QUALIDADE DA BEBIDA

HENRIQUE VIANNA DE AMORIM

Engenheiro-agrônomo, Master of Science,
Auxiliar de ensino da Disciplina Bioquí
mica do Departamento de Química da Esco
la Superior de Agricultura "Luiz de Quei
roz" da U.S.P.

Tese apresentada à Escola Su
perior de Agricultura "Luiz
de Queiroz", para obtenção
do título de "Doutor em Agro
nomia".

PIRACICABA
ESTADO DE SÃO PAULO

- 1972 -

E R R A T A

<u>pg</u>	<u>onde se lê</u>	<u>lê - se</u>
15	5ª linha LAYNE (1952)	LAYNE (1957)
18	ítem 1.3.2. 8ª linha LAYNE (1957)	LOWRY et al.(1951)
21	ítem 2.2.3. 6ª linha 1,0 ml	1,00 ml
22	1ª linha 1,0 ml	1,00 ml
37	Tabela 3-9. Corretamente é: Valores máx. e min. 5,16-5,97 5,88-6,57 6,11-8,10 em % encontrados nas amostras 6,62-6,76 7,18-7,33 5,64-7,20	
64	Tabela 3-26. Todos os dados de valores limites encontrados (%), corretamente é: ácido isoclorog.II Mole 0,60 - 0,97 + ác. cafêico Rio 0,71 - 1,17 ácido isoclorog. I Mole 0,93 - 1,15 Rio 0,75 - 1,21 ácido neoclorog. Mole 0,64 - 1,02 Rio 0,58 - 1,15	
68	3ª linha KRUC	KRUG

Aos meus pais

Henrique e Alca Luiza

D E D I C O

Theodomiro de Mendonça Uchôa Neto

HOMENAGEM PÓSTUMA

AGRADECIMENTOS

Prof. E. Malavolta, meu orientador, a quem devo minha formação científica.

Aos seguintes colegas, estudantes e funcionários que muito colaboraram para a realização deste trabalho.

Dr. Aldir Alves Teixeira

Prof. Darcy Martins da Silva

Dr. Vivaldo Francisco da Cruz

Edison Fossa

Miguel Antonio Guercio

Murilo de Melo

Odair Breviglieri

Salvador Ferrari

Claudio Berreta

Irani Rodrigues Coelho

Luiz Antonio de Moraes

As seguintes Instituições:

Instituto Brasileiro do Café

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Conselho Nacional de Pesquisas

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Revisão da literatura sobre química e qualidade do café.....	2
1.2. Revisão da literatura sobre métodos analíticos do grão do café.....	7
1.2.1. Compostos fenólicos.....	7
1.2.2. Carboidratos.....	10
1.2.2.1. Mono e oligossacarídeos.....	10
1.2.2.2. Polissacarídeos.....	12
1.2.3. Nitrogênio e proteínas.....	13
1.3. Objetivo do trabalho.....	15
1.3.1. Determinação das relações entre compostos químicos e qualidade da bebida.....	16
1.3.2. Adaptação de métodos.....	18
2. MATERIAL e MÉTODOS.....	19
2.1. Amostras.....	19
2.2. Métodos analíticos.....	20
2.2.1. Porcentagem de umidade.....	20
2.2.2. Ácidos fenólicos.....	20
2.2.3. Fenóis totais.....	21
2.2.4. Carboidratos livres totais, açúcares redutores e polissacarídeos.....	22
2.2.5. Nitrogênio e proteínas solúveis.....	24
2.3. Provas de xícara e análise estatística.....	26
2.4. Análises químicas e análise estatística.....	28
2.4.1. Análise de variância das análises químicas em porcentagem da matéria seca.....	28
2.4.2. Análise de variância das análises químicas em gramas do composto por grama de nitrogênio.....	30

2.4.3.	Análise de variância das análises químicas em relação com a matéria seca, incluindo os polissacarídeos e os isômeros do ácido clorogênico.....	30
2.4.4.	Correlações entre os compostos químicos analisados.....	31
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
3.1.	Adaptação de métodos.....	32
3.1.1.	Ácidos fenólicos.....	32
3.1.2.	Carboidratos.....	38
3.1.3.	Proteínas solúveis.....	46
3.1.3.1.	Método do ultra-violeta.....	46
3.1.3.2.	Método do micro-biureto.....	47
3.1.3.3.	Método de Folin-Lowry.....	49
3.1.4.	Eletroforese de proteínas solúveis....	57
3.2.	Dados experimentais.....	58
3.2.1.	Análise química e qualidade da bebida.	58
3.2.1.1.	Carboidratos.....	58
3.2.1.2.	Compostos fenólicos.....	63
3.2.1.3.	Nitrogênio e proteínas solúveis.....	69
3.2.1.4.	Eletroforese de proteínas.....	73
3.2.2.	Análise das correlações entre os compostos analisados.....	89
3.2.3.	Teor de compostos analisados em relação ao nitrogênio total.....	92
4.	RESUMO E CONCLUSÕES.....	93
4.1.	Objetivos do trabalho.....	93
4.2.	Metodologia.....	93
4.2.1.	Compostos fenólicos.....	93
4.2.2.	Carboidratos.....	94
4.2.3.	Proteínas solúveis.....	95

4.3. Dados e conclusões.....	96
4.3.1. Compostos fenólicos.....	96
4.3.2. Carboidratos.....	96
4.3.3. Proteínas solúveis.....	97
4.3.3.1. Proteínas solúveis precipitadas com TCA.....	97
4.3.3.2. Eletroforese de proteínas solúveis...	98
4.3.4. Compostos analisados em relação ao ni - trogênio total.....	99
4.3.5. Correlação entre os compostos analisa - dos.....	99
5. SUMMARY.....	100
5.1. Objectives of the work.....	100
5.2. Methodology.....	100
5.2.1. Phenolic compounds.....	100
5.2.2. Carbohydrates.....	101
5.2.3. Soluble proteins.....	102
5.3. Results and conclusions.....	103
5.3.1. Phenolic compounds.....	103
5.3.2. Carbohydrates.....	103
5.3.3. Soluble proteins.....	104
5.3.3.1. TCA precipitate of soluble proteins..	104
5.3.3.2. Eletrophoresis of the soluble prote - ins.....	104
5.3.4. Compounds content on total nitrogen ba - sis.....	106
5.3.5. Correlation between the estimated com - pounds.....	106
6. LITERATURA CITADA.....	107
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABELAS.....	V
ANEXO (Tabelas completas).....	127

Figura		página
1.2.	Ácido clorogênico.....	7
3.2.	Esquema do cromatograma monodimensional do extrato do grão de café verde.....	34
3.3.	Espectro no ultra-violeta da cafeína e da mancha nº 4.....	36
3.4.	Comportamento eletroforético em gel-agar das proteínas segundo a qualidade de bebida.....	75
3.5.	Comportamento eletroforético em gel-agar de proteínas de café Mole e Rio, utilizando-se diferentes tratamentos do extrato (ácido ascórbico e PVP).....	79
3.6.	Comportamento eletroforético em gel-agar de proteínas de café Mole e Rio, utilizando-se diferentes tratamentos do extrato (cisteína, PVP e β -mercaptoetanol).....	80
3.7.	Comportamento eletroforético em gel-agar de proteínas de café Mole e Rio, com diferentes tratamentos (pH e ácido ascórbico).....	82
3.8.	Comportamento eletroforético em gel-agar de proteínas de café Mole e Rio com diferentes tratamentos (Tween 80 e Dowex-1-X-8).....	84
3.9.	Comportamento eletroforético de proteínas purificadas tratadas com ácido ascórbico.....	85

Tabela		Página
1.1.	Compostos fenólicos encontrados no grão de café.....	8
1.2.	Polissacarídeos encontrados no grão de café	13
2.3.	Delineamento para a análise estatística da prova de xícara.....	28
2.4.	Delineamento para a análise estatística dos teores de carboidratos solúveis, açúcares redutores, ácido clorogênico total, proteínas solúveis e nitrogênio total.....	29
2.5.	Delineamento para a análise estatística dos teores de fenóis totais e eletroforese de proteínas.....	29
2.6.	Delineamento para a análise estatística dos compostos em relação ao N total.....	30
2.7.	Delineamento para a análise estatística do teor de polissacarídeos.....	31
2.8.	Delineamento para a análise estatística dos teores de ácido clorogênico, isoclorogênicos e neoclorogênico	31
3.9.	Resultados da análise estatística dos tres métodos de determinação do ácido clorogênico	37
3.10.	Efeito do tempo e número de extrações na remoção de carboidratos solúveis em etanol a 80% de grãos de café.....	39
3.11.	pH dos eluidos de extratos etanólicos de café, passados por diferentes colunas de resina de troca iônica.....	40
3.12.	Deteção dos carboidratos dos eluidos das diferentes colunas e a quantidade total de carboidratos encontrados nos eluidos.....	41
3.13.	Efeito do ácido clorogênico na determinação de carboidratos pelo método fenol-sulfúrico	42

Tabela		Página
3.14	Utilização do método fenol-sulfúrico para determinação de açúcares fosforilados....	44
3.15	Efeito do ácido clorogênico na determinação de açúcares redutores com o reativo de Somogy e Nelson.....	45
3.16	Determinação de proteína solúvel do café pelo método de Folin-Lowry e pelo $N \times 6,25$	50
3.17.	Efeito do ácido ascórbico na determinação de proteínas solúveis do café pelo método de Folin-Lowry e pelo $N \times 6,25$	50
3.18.	Efeito do desengorduramento com éter etílico do grão de café verde moído na determinação de proteínas.....	51
3.19.	Efeito da lavagem do precipitado protéico com etanol a 80% na determinação de proteínas.....	53
3.20.	Efeito de diversos tratamentos do precipitado protéico na determinação de proteínas..	54
3.21.	Análises de proteínas solúveis precipitadas com TCA tratadas e não tratadas com acetona, e estimadas pelos métodos de Folin-Lowry e $N \times 6,25$	54
3.22.	Média do teor dos carboidratos livres totais segundo a qualidade de bebida (material seco)	59
3.23.	Média do teor de açúcares redutores segundo a qualidade de bebida (material seco).....	61
3.24.	Média do teor de polissacarídeos solúveis segundo a qualidade de bebida (material seco)	62
3.25.	Média do teor de ácido clorogênico total segundo a qualidade de bebida (material seco)...	63
3.26.	Média dos teores de ácidos isoclorogênicos e ácido neoclorogênico segundo a qualidade de bebida (material seco).....	64

3.27.	Média do teor dos compostos fenólicos totais solúveis em metanol a 80% segundo a qualidade de bebida (material seco).....	67
3.28.	Média do teor dos compostos fenólicos totais solúveis em água segundo a qualidade de bebida (material seco).....	68
3.29.	Média do teor de nitrogênio total segundo a qualidade de bebida (material seco).....	69
3.30.	Média do teor de proteína solúvel em tampão fosfato segundo a qualidade de bebida (material seco).....	70
3.31.	Média do teor de proteína solúvel em NaCl segundo a qualidade de bebida (material seco).	71
3.32.	Média da distância percorrida pelas proteínas solúveis e corridas em gel-agar segundo a qualidade de bebida (material seco).....	74
3.33.	Correlação entre as médias das análises químicas dos compostos analisados.....	90
3.34.	Relação entre as quantidades dos compostos analisados com • nitrogênio total, segundo a qualidade de bebida.....	92
A-35.	Teor de ácido clorogênico total.....	127
A-36.	Teor de fenóis totais solúveis em água.....	128
A-37.	Teor de fenóis totais solúveis em metanol...	129
A-38.	Teor de carboidratos livres totais.....	130
A-39.	Teor de açúcares redutores.....	131
A-40.	Teor de nitrogênio total.....	132
A-41.	Teor de proteína solúvel em tampão fosfato..	133
A-42.	Teor de proteína solúvel em NaCl.....	134
A-43.	Comportamento eletroforético em gel-agar das proteínas solúveis.....	135
A-44.	Relação em gramas do composto por grama de nitrogênio total.....	136

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior país produtor de café do mundo e contribui com cerca de 30% da produção mundial. É também o maior exportador, com cerca de 15 a 20 milhões de sacas anuais. O nosso consumo interno é cerca de 8 - 9 milhões de sacas de café verde (beneficiado).

Por outro lado, o café ocupa o segundo lugar, depois do petróleo, no comércio mundial.

O preço de venda do café depende de dois fatores, segundo TEIXEIRA (1971): a) qualidade e b) tipo. A qualidade depende do aspecto, cor, tamanho do grão, bebida, etc. A qualidade da bebida é o fator mais importante na classificação por qualidade, e esta é estipulada por provadores oficiais e treinados para diferenciar os cafés quanto a suas qualidades organolépticas. A classificação adotada no Brasil divide os cafés pelas seguintes denominações, do melhor para o pior: Estritamente Mole, Mole, Apenas Mole, Duro, Riado e Rio. O tipo do café é dado pelo número de defeitos, isto é, grãos pretos, pedra, pau, grãos brocados, etc. A cada defeito se dá um número de pontos que depois de somados determinam uma certa classificação; assim, por exemplo, se o café possuir 26 defeitos, é classificado como tipo 4 e, se possuir 360, como tipo 8.

O tipo e a qualidade da bebida combinados dão o preço pelo qual o café será comercializado.

Portanto o preço pago por um saco de café depende diretamente de suas propriedades físicas e químicas.

Embora ainda não se tenha chegado a um método ideal para a classificação por defeitos, por outro lado, em relação à qualidade da bebida, os problemas são bem maiores porque envolvem gosto e aroma, qualidades puramente subjetivas. Os estudos estatísticos realizados por BARBOSA et al. (1962) e DEPLEDT (1967) colocam em dúvida a se -

gurança com que os provadores classificam o café quanto à qualidade da bebida.

Em produtos como o chocolate e o chá, também estimulantes, a pesquisa química está bem mais avançada e bem mais conclusiva a respeito da qualidade do produto em relação à composição química (ROHAN e NEIRINCKX (1963), ROBERTS (1958), BHATIA e ULLAH (1965)). Portanto a qualidade do produto pode ser determinada por análises químicas.

Para o caso do café, até hoje o homem não foi substituído pela análise química devido a) não terem sido descobertas correlações entre ela e propriedades organolépticas que pudessem ser aplicadas de uma maneira geral. Para casos isolados algumas publicações já apareceram, e serão relatadas no item 1.1.

Os problemas mais importantes que têm contribuído para que a química do grão do café relacionada à bebida não tenha evoluído no sentido de dados conclusivos são: a) dificuldade de separação e estimação dos compostos do grão do café devido à sua complexa composição química; b) grande heterogeneidade das amostras, principalmente por causa dos cafés "ligados"; c) segredo industrial por parte dos grandes compradores de café.

Por essas razões a química do grão do café nos países produtores é quase inexistente.

1.1. Revisão da literatura sobre química e qualidade do café.

Alguns testes qualitativos para determinação da qualidade do café foram desenvolvidos na Colômbia por CALLE (1955, 1963), mas até hoje não têm sido utilizados na prática devido à sua alta variabilidade e falta de provas mais conclusivas.

MENCHU (1966), na Guatemala, encontrou correlação entre extrato etéreo e quantidade de fibra crua com a qua

lidade da bebida. Quanto maior a quantidade do extrato etéreo e menor a quantidade de fibra crua, melhor era o café. Posteriormente, o mesmo autor (MENCHU e IBARRA (1967), analisando cafés de várias regiões, não encontrou essa mesma relação. A correlação da qualidade da bebida com a composição química (extrato etéreo, nitrogênio, cafeína, trigonelina e fibra crua) variava dependendo da região considerada.

WURZIGER (1963), medindo o índice de oxidação, por uma solução de bicromato de potássio em meio de ácido sulfúrico, de vapores emitidos por café torrado e moído, encontrou um valor maior para os cafés preparados logo depois de torrados e moídos do que para os cafés estocados.

Em 1967, WURZIGER e DICKHAUT (1967) isolaram vários compostos fenólicos da cera que envolve o grão de café e verificaram que estes fenóis tinham um alto poder antioxidante. Observaram também que, dependendo da procedência, a quantidade desses compostos variava.

Mais tarde, WURZIGER e HARMS (1969) isolaram e determinaram a estrutura e a quantidade de três destes componentes e que são: 48% de 5-hidroxitriptamida do ácido gálico, 48% do ácido behênico e 4% do ácido lignocérico. Analisando quantitativamente para estes compostos várias amostras de café arábica de Quênia, as quais diferiam quanto à qualidade da bebida, encontraram uma correlação interessante: quanto pior o café, menor a quantidade de 5-hidroxitriptamida e mais amarela ou marrom a cor do grão se apresentava.

A cor do grão já havia sido correlacionada com a qualidade da bebida para os cafés de Quênia (WOOTON (1963)); posteriormente NORTHMORE (1965 e 1967) encontrou uma maior quantidade de clorogenato de magnésio nos melhores cafés, correlacionando este composto com a cor verde azulada dos bons cafés.

Em seguida GIBSON (1971a e 1971b) isolou clorofila, "Cafestol" e "Kahweol" e responsabilizou estes pigmentos pela coloração verde-azulada, característica dos bons cafés.

A coloração do grão de café pode ser afetada pela nutrição mineral da planta. ROBINSON (1960) observou que a deficiência de ferro causava um prejuízo na qualidade da bebida e os grãos tinham uma coloração amarelada. O excesso de potássio pode causar um prejuízo também, fato este observado por NORTHMORE (1965) e AMORIM et al. (1967). Em recente revisão, AMORIM (1970a) abordou o problema da nutrição mineral do cafeeiro em relação à qualidade da bebida, lançando algumas hipóteses sobre como os níveis de alguns elementos no grão poderiam alterar as qualidades organolépticas do mesmo.

ILLY e RUZZIER (1967) através da cromatografia de gás, procuraram correlacionar os defeitos do café com a qualidade da bebida e a forma das curvas no cromatograma.

Encontraram relação entre a intensidade de alguns picos e ombros e o gosto amargo, mas em nenhum caso tentaram identificar os compostos responsáveis pelo sabor ou aroma.

Utilizando também a cromatografia de gás, BIGGERS et al. (1969) compararam a forma dos picos e a qualidade da bebida e por uma avaliação programada em um computador eletrônico puderam diferenciar café robusta de arábica.

AMORIM e SILVA (1968a e 1968b) encontraram uma correlação positiva entre a qualidade da bebida do café brasileiro e a atividade enzimática da polifenol oxidase. Os autores acham que os melhores cafés possuem uma atividade relativamente maior devido ao fato de que os piores cafés passaram por condições de injúria (que pode ser patológica) e assim a quantidade de fenóis oxidados (enzimaticamente ou não) aumentou, inativando desta maneira a enzima

polifenol oxidase. O mecanismo de inativação da polifenol oxidase pelas quinonas formadas já é conhecido na literatura (FORSYTH (1964)).

Posteriormente, no Instituto de Tecnologia Nacional do Rio de Janeiro, esses resultados foram também confirmados (ROTEMBERG e IACHAN (1970)). Induzindo em cafés despolpados diferentes qualidades de bebida por meio de diversos tempos de fermentação, SANINI e VALÊNCIA (1970), na Colômbia, observaram que também para cafés despolpados a atividade da polifenol oxidase era maior nos melhores cafés.

Em um estudo dos componentes voláteis do café verde submetido a diferentes processos de desmucilagem, a composição química e a prova de xícara não apresentaram diferenças sensíveis. Mas, quando RODRIGUEZ et al. (1969) submeteram o café a 5 e 7 dias de fermentação, a qualidade do café piorou bastante e a quantidade de aldeído acético detectado dobrou. Paralelamente, os teores de dimetil sulfeto, acetona e aldeído isobutírico decresceram.

Uma série de trabalhos, ao mencionar a composição química, fazem alusão à importância de alguns compostos para a qualidade da bebida; em alguns deles, porém, os dados são apenas qualitativos e em outros nenhuma diferença foi encontrada. Entre eles citam-se MERRITT et al. (1969); GAUTSCHI et al. (1967); THALER (1963); SMITH (1963); TELLEGDY-KOVATS (1963); CHASSEVENT et al. (1969).

CORTE DOS SANTOS et al. (1971), estudando o efeito da umidade do ambiente na qualidade da bebida e na atividade de algumas enzimas, observaram que somente quando a umidade relativa do ar era de 90% havia um aumento na atividade da lipase. Por outro lado, não conseguiram adaptar um método para a determinação da ribonuclease e não encontraram diferença significativa na atividade das enzimas proteolíticas.

Revisão feita por LOCKHART (1957) sobre química do

café, abrangendo desde café verde ao café na xícara, não lança nenhuma luz sobre diferenças químicas responsáveis por diversidades na qualidade da bebida. O mesmo pode se dizer da revisão de SIVETZ e FOOTE (1963).

Um estudo mais detalhado foi conduzido pelos pesquisadores da General Foods Co., FELDMAN et al. (1969), que estudaram as proteínas, aminoácidos, carboidratos e ácidos fenólicos no café verde e sua variação durante a torração. Chegaram à conclusão de que com os atuais métodos utilizados era praticamente impossível correlacionar qualidade da bebida com a composição química.

CENTI-GROSSI et al. (1969) tentaram correlacionar os teores das albuminas removidas de quatro diferentes cafés arábicas (Colômbia-Armenia; Costa Rica-S. Rosa; Brasil-Santos; Venezuela-Perla) e de dois robustas (*C. canephora* - Indiano e do Congo), separando-as por eletroforese em gel de poliacrilamida. Os resultados obtidos não mostraram diferenças sensíveis entre os cafés estudados.

FERRAZ e VEIGA (1954 e 1959), estudando o efeito da temperatura de secagem do café na qualidade da bebida, verificaram que em certas temperaturas o café produzido era de boa qualidade e em outras, não. Lançaram algumas hipóteses sobre a influência das enzimas que poderiam afetar a qualidade, assim como relacionaram os melhores cafés com os de maior poder germinativo.

No Brasil, KRUG (1940 a,b,c) observou uma correlação positiva entre ataque de fungos e bactérias e bebidas piores. Responsabilizou Fusarium sp., principalmente, pelas bebidas Duras, Riadas e Rio.

GARRUTI et al. (1962), analisando a qualidade da bebida de cafés de diversas regiões do Brasil, não encontraram diferença significativa no teor de sólidos-solúveis, embora as diferenças na qualidade da bebida tivessem sido significativamente diferentes.

I.O.ABRAHÃO e L.F.MIRANDA (1970) (não publicado), tentaram aplicar o método de Pfeiffer (cristalização do $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) na determinação da qualidade do café. Os autores fizeram 52 séries de cristalizações em 156 placas e, embora tenham observado diferenças nos modelos de cristalização, não obtiveram modelos típicos para a diferenciação dos padrões de bebidas.

1.2. Revisão da literatura sobre métodos analíticos para o grão do café

Não se pretendeu fazer uma revisão exaustiva sobre todos os métodos e adaptações encontrados na literatura; o que se buscou foi tentar utilizar os métodos mais empregados para material vegetal e aplicá-los para o grão do café.

1.2.1. Compostos fenólicos

O grão do café possui vários tipos de compostos fenólicos e os mais importantes, segundo a quantidade encontrada no grão, são os ácidos clorogênicos. A Figura 1.1. mostra a fórmula do ácido clorogênico e na Tabela 1-1. são apresentados alguns resultados sobre a quantidade destes compostos fenólicos no café verde, expressos em relação à matéria seca.

FIGURA 1.1. Ácido clorogênico. A diferença com seus isômeros consiste na ligação do ácido cafêico com o ácido quínico, que é feita em carbonos diferentes.

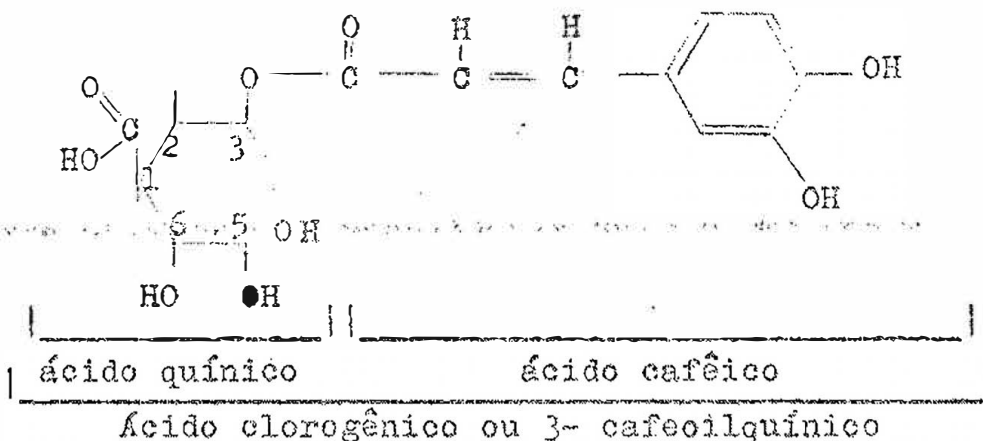


TABELA 1-1. Compostos fenólicos encontrados no grão de café, e variação dos teores segundo diversas fontes.

COMPOSTO FENÓLICO	QUANTIDADE	FONTE
Ácido clorogênico total	2 - 8%	LOCKHART (1957)
	4,5 - 8,5%	STREULI (1970)
	4,0 - 10,0%	NAVELLIER(1970)
	7,6%	FELDMAN et al(1969)
Ácido clorogênico ou ác. 3-cafeoilquínico	3,1 - 6,2%	STREULI (1970)
	3,77- 5,56%	FELDMAN et al(1969)
Ác. criptoclorogênico ou ác. 4-cafeoilquínico	0,42- 0,44%	STREULI (1970)
	0,41 %	FELDMAN et al(1969)
Ác. neoclorogênico ou ác. 5-cafeoilquínico	0,12- 1,00%	STREULI (1970)
	0,68 %	FELDMAN et al(1969)
Ác. isoclorogênico ou ác. 3-4,3-5 e 4-5 dicafe- oilquínico	0,35- 1,40%	STREULI (1970)
	0,60 %	FELDMAN et al(1969)
Ácido cafêico	0,17- 0,24%	FELDMAN et al(1969)
	1 %	LOCKHART (1957)
5-hidroxitriptamida	50-180ng/100g	WURZIGER e HARMS (1969)

Segundo NAVELLIER (1970), o ácido clorogênico foi descoberto no café por Payesse em 1802, que lhe deu o nome de ácido cáfico. Posteriormente outros nomes foram dados ao ácido clorogênico como por exemplo, ácido cafetânico, al ácido verídico, tanino clorogênico, etc.

No que se refere à determinação quantitativa dos

ácidos clorogênicos, será dada ênfase à literatura de 10 a 12 anos passados, devido ao fato de que somente há 7 anos a estrutura destes isômeros foi elucidada, CORSE et al. - (1965). A confusão na literatura sobre os ácidos clorogênicos é freqüente devido à existência dos 6 isômeros, fato esse que pode ser apreciado nas discussões de SONDHEIMER et al. (1961) e CORSE et al. (1965).

NAVELLIER (1970) relatou e discutiu desde as primeiras tentativas de determinação do ácido clorogênico no café feitas há 60 anos atrás, até a metodologia mais sofisticada dos dias atuais.

Entre os métodos mais modernos e que têm sido aplicados atualmente encontra-se a adaptação feita por MOORES et al. (1948). Posteriormente esse método sofreu pequenas modificações (WEISS (1957) e foi aceito pela A.O.A.C. (1965), embora até hoje não tenha sido considerado como método definitivo (A.O.A.C. (1970).

Em 1967, LEHMANN e HAHN (1967) descreveram um método no qual os grãos de café são extraídos com metanol e posteriormente o extrato é passado por uma coluna de poliamida onde os compostos interferentes são separados. No primeiro eluído da coluna pode-se determinar trigonelina; logo em seguida o ácido clorogênico é eluído e a solução é lida no espectrofotômetro a 324 nm.

Um outro método para separar e determinar quantitativamente os ácidos clorogênicos do café foi idealizado por GNAGY (1961 e 1962), onde se usa cromatografia mono dimensional e se faz a leitura, em espectrofotômetro a 328 nm, da intensidade da cor das manchas eluídas. Com esse método, o autor conseguia separar quatro isômeros do ácido clorogênico.

O mais avançado método para separar e determinar quantitativamente os isômeros do ácido clorogênico, inclusive os 3 isômeros do ácido isoclorogênico, utiliza a cro-

matografia de gás como técnica (KUNG et al. (1967), empregando uma coluna capilar de 330 cm SE - 54. A volatilização dos ácidos clorogênicos é feita reagindo os ácidos fenólicos com BSA (bis-(trimetilsilil) acetamida) e HMDSi (hexametildisilazane). Atualmente os autores trabalham com uma coluna 3% OV-101 que é bem mais barata e fácil de preparar e conseguem os mesmos resultados (J.T.KUNG, comunicação pessoal).

A literatura sobre outros compostos fenólicos do grão do café é praticamente inexistente, talvez devido à pequena quantidade encontrada no grão.

WURZIGER e HARMS (1969) descreveram os compostos de 5-hidroxitriptamida e um método espectrofotométrico para sua determinação quantitativa.

No Brasil, FRANCO (1963) detectou taninos e ácido clorogênico em várias partes do cafeeiro, inclusive no grão, com testes histoquímicos.

Entre outros trabalhos que contribuíram para o isolamento, identificação e determinação dos compostos fenólicos do grão do café encontram-se os de BARNES et al. (1950) MABROUK e DEATHERAGE (1956), CLEMENTS e DEATHERAGE (1957), LENTINEF e DEATHERAGE (1958) e PICTET e BRANDENBERGER (1960).

1.2.2. Carboidratos

1.2.2.1. Mono e oligossacarídeos

Entre os mono e oligossacarídeos, o carboidrato encontrado em maior quantidade no grão verde de café é a sacarose, e seu teor pode variar de 1,9 a 10% na matéria seca (NAVILLIER (1970), LOCKHART (1957), FELDMAN et al.(1969), WOLFROM et al. (1960).

A presença de monossacarídeos no grão verde tem sido muito discutida porque, na extração dos carboidratos, enzimas hidrolíticas podem atuar sobre a sacarose ou polissacarídeos produzindo monossacarídeos (NAVILLIER (1970)).

A literatura aponta valores que vão de 0 a 5% entre monossacarídeos e açúcares redutores (LOCKHART (1957)).

Os monossacarídeos livres mais encontrados são a glicose e a frutose, sendo que na maioria dos trabalhos são calculados como açúcares redutores (FELDMAN et al (1969) e LOCKHART (1957)).

Enquanto WOLFROM et al. (1960) detectaram apenas traços de glicose, KROPLIEN (1971), analisando uma série de diferentes cafés, observou que a glicose era encontrada em tôdas as amostras analisadas; entretanto a frutose foi observada em algumas amostras e em outras não.

Recentemente, COURTOIS et al. (1963) e COURTOIS et al. (1965) descobriram mais dois oligossacarídeos no café verde (*C. canephora*): rafinose e estaquiose, na proporção de 0,69 a 2,18% dos oligossacarídeos totais. Esta descoberta foi confirmada posteriormente por SHADAKSHARASWAMY e RAMACHANDRA (1967) para cafés robusta e para dois cultivares de arabica.

KROPLIEN (1971), com uma nova técnica de separação, utilizando uma série de colunas (carvão, poliamida, celite e resina de troca iônica), observou que a quantidade de monossacarídeos nas diferentes amostras de café verde analisadas variava de 0,02% a 0,4%.

Os métodos quantitativos utilizados para carboidratos em café aconselhados por NAVELLIER (1970) e HART e FISHER (1971) são idênticos ou baseados, respectivamente, nos métodos utilizados pela A.O.A.C., (1970). De todos os trabalhos que versam sobre composição de carboidratos em café, nenhum deles utilizou os métodos da A.O.A.C. (1970), talvez por serem morosos e alguns deles não muito precisos.

Os métodos mais usados para determinar quantitativamente os carboidratos são os recomendados pela O.I.C.C. (1962), Antrona (HODGE e HOPREITER (1962), o fenol-sulfúrico (DUBOIS et al. (1956), cloreto de trifenil tetrazólio -

(VALÊNCIA e ARZOLLA (1967) e, evidentemente, os diretos usando o polarímetro.

A maioria dos métodos pode dar resultados satisfatórios, desde que sejam seguidas as normas para uma boa clarificação do extrato a ser usado, como acentua JOSLYN (1970).

1.2.2.2. Polissacarídeos

O grão de café verde possui de 50 a 60% de seu peso seco em carboidratos, sendo que a sacarose contribui com uma média de 8%, como já foi visto, a celulose com 5 a 12%, hemiceluloses com 23%, substâncias pécticas com cerca de 3% e o resto cabe a complexos polissacarídeos (WOLFROM et al, (1960), WOLFROM e PATIN (1964) e FELDMAN et al. (1969).

As percentagens acima, em sua maioria, não esclarecem muito sobre a identidade química dos carboidratos do café.

Até hoje não se chegou a um acordo sobre as exatas percentagens de hemicelulose, holocelulose e celulose. Esta confusão é devida ao método de extração desses polissacarídeos assim como aos métodos de hidrólise usados. Cada pesquisador emprega um diferente (Ver WOLFROM et al (1960), COURTOIS et al. (1963), THALER e ARNETH (1967) e PICTET e MOREAU (1969).

Devido a essas diferenças, as palavras "celulose", "hemicelulose", "holocelulose", etc. não deveriam ser empregadas, pois como já foi dito, não dizem respeito à identidade química. Nomes como manana, arabinogalactana, deveriam ser preferidos, assim como assinala COURTOIS et al. (1963).

Ácidos urônicos e galacturônicos em hidrolizados foram detectados por GLOMAUD et al. (1965) e CALZOLARI et al. (1967), respectivamente.

A Tabela 1-2 mostra os polissacarídeos encontrados no café verde. Omitiu-se o meio em que estes polissacaríde

os são solúveis devido à complexidade do assunto, pois a solubilidade de um polissacarídeo depende também da interação entre as macromoléculas do meio (WOLFROM et al. (1960). Holocelulose e hemicelulose também foram omitidas devido ao fato de que as composições variam de autor para autor.

Os métodos quantitativos para a determinação de polissacarídeos são baseados em reações, particulares ou não, para mono e oligossacarídeos. (Ver ítem 1.2.2.1.).

TABELA 1-2. Polissacarídeos encontrados no grão de café verde e as respectivas fontes.

NOME DO POLISSACARÍDEO	FONTE
β -D-(1 \rightarrow 4) Glucana (celulose).	WOLFROM et al. (1964)
Glucana.....	THALER e ARNETH(1967) PICTET e MOREAU(1969)
Galactana.....	THALER e ARNETH(1967)
Manana.....	THALER e ARNETH(1967) WOLFROM et al. (1961)
Arabana.....	THALER e ARNETH(1967)
Arabinogalactana.....	WOLFROM e PATIN(1965) PICTET e MOREAU(1969) COURTOIS et al.(1963) THALER e ARNETH(1967)
Galactoarabinomanana.....	THALER e ARNETH(1967)
Galactomanana.....	PICTET e MOREAU(1969)
Xilana.....	PICTET e MOREAU(1969)
Glucogalactomanana.....	COURTOIS et al.(1963)

1.2.3. Nitrogênio e proteínas

O teor de nitrogênio no grão de café pode variar de 1,7 a 3,0% (LOCKHART (1957), AMORIM et al.(1965 e 1967), NAVELLIER (1970)). A determinação do nitrogênio total na -

grande maioria dos trabalhos publicados baseia-se na digestão do material pelo ácido sulfúrico (mais redutores) com a formação de sulfato de amônio. A amônia é posteriormente liberada por hidróxido de sódio e titulada com ácido sulfúrico. O método mais utilizado é o Kjeldahl e o micro Kjeldahl empregados por LILLEVIK (1970a) e MALAVOLTA (1957).

Pelas recentes revisões feitas por LILLEVIK (1970a), HART e FISHER (1971) e pela A.O.A.C. (1970) parece não haver problema sério para a determinação do nitrogênio total.

Por outro lado, a determinação de proteína exige maiores cuidados, porque, dependendo da metodologia usada, os resultados podem diferir consideravelmente quando se passa de um material para outro (LAYNE (1952), KHANA (1969), POTTY (1969), ROBSON et al. (1968).

Por esta razão os manuais de análise química de alimentos adotam para a dosagem de proteínas o método da determinação do nitrogênio total, multiplicando depois o valor obtido pelo fator 6,25 (LILLEVIK (1970b), HART e FISHER (1971), A.O.A.C. (1970), O.I.C.C. (1962). Mesmo para o café, esse é o método mais adotado (A.O.A.C. (1970), NAVEL - LIER (1970).

Baseados em outras propriedades das proteínas, outros métodos, muitos deles mais simples e mais rápidos, são encontrados na literatura. Entre eles, o método turbidimétrico, que se baseia na turbidez da solução quando proteínas são misturadas com baixa concentração de qualquer precipitante (LAYNE (1957). Usando o reagente de Folin e Ciocalteu (1927), para fenóis, LOWRY et al. (1951) adaptaram um método que é largamente usado em bioquímica. GORNALL et al. (1949) adaptaram um método que utiliza a propriedade das ligações peptídicas (2 ou mais), que reagem com sais de cobre em solução alcalina e dão um complexo violeta. Este método é chamado "biureto" e foi modificado recentemente com o objetivo de melhorar sua sensibilidade e precisão. (ITZHAKI e -

GILL (1964) e CALDAS (1971).

A maior parte das proteínas exibe uma absorção máxima a 280 nm devido à presença de tirosina e triptofano; esta propriedade foi usada por WARBURG e CHRISTIAN (1941) (cit. por LAYNE (1952), para medir a concentração daquelas.

1.3. Objetivos do trabalho

Pela literatura revista pode-se avaliar a complexidade do assunto, não somente quanto à composição do grão e ao gosto e aroma do café, mas ainda mais quanto à variação dos mesmos com relação à composição química do grão verde.

Devido ao grande aumento no consumo de café solúvel nos últimos 10 anos, a tecnologia da fabricação desses cafés tem melhorado bastante uma vez que, na preparação do solúvel, muitos componentes do aroma e do gosto são perdidos. Daí a necessidade de um maior conhecimento da química do gosto e aroma, assim como dos seus precursores (GAUTSCHI et al. (1967).

Basicamente, dois caminhos podem ser tomados para resolver o problema do gosto e aroma do café. Dependendo dos resultados, as pesquisas conduzidas por estes dois caminhos, num futuro talvez não muito distante, possam se complementar.

Um dos rumos seria analisar o aroma do café por meio de cromatografia de gás acoplada com espectrofotômetro de massa e auxiliados pela análise na região do infra vermelho e ressonância nuclear magnética (NMR). São métodos sofisticados e que dependem de aparelhagem cara.

Outro caminho seria a análise dos precursores do gosto e aroma no café verde, partindo sempre de cafés conhecidos organolépticamente. Estudo deste tipo não envolveria pelo menos no início, aparelhagem tão cara.

Por outro lado, o Brasil como grande produtor necessita dispor de uma maior quantidade de dados sobre a química

do café, a fim de ter um conhecimento mais profundo das transformações que ocorrem no grão durante seu processamento e armazenagem, com o objetivo de um melhor controle da qualidade do produto. Além disso, um maior conhecimento químico do café que é vendido, talvez colocasse o Brasil em uma posição mais favorável no mercado internacional.

Para o estudo químico do grão verde, achou-se melhor partir dos compostos que mais se degradam na torração, inferindo-se que estes compostos devam contribuir com uma boa parte para o gosto e aroma do café. Dentre os compostos que mais sofrem transformações quando são torrados, FELDMAN et al. (1969) e MOORES e STEFANUCCI (1964), cit. por MERRIT et al. (1969), citam as proteínas, sacarose e ácido clorogênico.

Tomando por base cafés de uma mesma variedade e que deram qualidades de bebida diferentes, tentou-se estabelecer relações entre a quantidade de alguns compostos e a qualidade da bebida, provenientes destes cafés.

1.3.1. Determinação das relações entre compostos químicos e qualidade da bebida

Baseando-se na classificação das proteínas quanto à sua solubilidade em soluções aquosas (COHN (1943-65), YOUNG (1963)), tentou-se extrair e estimar as diferentes proteínas, uma vez que proteínas totais ou nitrogênio total não puderam ser correlacionados de uma maneira consistente com a qualidade da bebida (MENCHU e IBARRA (1967)). Como certos aminoácidos são degradados mais facilmente que outras na torração (FELDMAN et al. (1969)), seria lícito especular que talvez a diferença na qualidade da bebida fosse devida à natureza da proteína e não à sua quantidade total, a menos que esta qualidade estivesse bem correlacionada com o teor protéico total.

Um outro ponto a se levar em conta seria o já conhe

cido fato da interação entre proteínas e polifenóis na fermentação do cacau, o qual faz com que a quantidade de proteínas solúveis diminua consideravelmente ao longo do processo fermentativo (FORSYTH et al. (1958). Paralelamente, sabe-se que a fermentação do café na roça, causada por fungos, leva a uma bebida inferior (KRUG (1940a, b e c).

A análise do nitrogênio total foi indicada pois se poderia procurar relacionar os constituintes químicos com a matéria seca e o N total e verificar possíveis diferenças (F.E. DEATHERAGE, comunicação pessoal).

Embora não se tenha encontrado relação entre ácido clorogênico total entre cafés robusta que diferem pouco na qualidade da bebida (CHASSEVENT et al. (1969), nada existe na literatura sobre café arábica; além disso, a inexistência de dados sobre os isômeros do ácido clorogênico e qualidade da bebida foi notada. Por outro lado, é conhecido o fato de que o ácido neoclorogênico é menos degradado na torração em relação aos seus isômeros (FELDMAN et al. (1969).

A porcentagem de polifenóis na folha de chá diminui drasticamente com a fermentação (BHATIA e ULLAH (1965) e GOLDSTEIN e SWAIN (1963) observaram que durante o amadurecimento de vários frutos havia uma polimerização de fenóis com o tempo; esses fenóis polimerizados reagiam com menor intensidade com o reativo de Folin. Além disso, observaram também que os fenóis polimerizados eram mais solúveis em soluções alcoólicas a 50% do que em álcool absoluto.

Devido ao fato de que a qualidade da bebida do café está relacionada com a atividade da polifenol oxidase (AMORIM e SILVA (1968) e de que grãos verdes e pretos podem prejudicar a qualidade (TEIXEIRA e PIMENTEL GOMES (1970) e TEIXEIRA et al. (1968), tornou-se interessante a determinação de fenóis totais pelo reativo de Folin, usando extratos alcoólicos e aquosos.

Para NAVELLIER (1970), os carboidratos não contri -

buem para o gôsto e aroma do café, mas apenas para sua coloração escura devido à caramelização por altas temperaturas; outros autores, porém, indicam a importância dos carboidratos, principalmente a sacarose, que é quase totalmente degradada, e sua possível contribuição para o gosto do café, em particular devido às suas reações com aminoácidos e outros compostos (FELDMAN et al. (1969), THALER e ARNETH (1967)).

Para um melhor aproveitamento dos resultados obtidos das análises químicas, procurou-se a correlação existente entre os compostos analisados.

Os teores de carboidratos totais solúveis em etanol a 80%, açúcares redutores, ácido clorogênico total, isômeros do ácido clorogênico, nitrogênio total, proteínas solúveis em tampão fosfato pH 7,0 e 0,01 M (albuminas), proteínas solúveis em NaCl 10% pH 6,5 (globulinas), polissacarídeos extraíveis a quente em solução 0,5% de oxalato de amônio, e comportamento eletroforético de proteínas solúveis em tampão fosfato pH 7,0 e 0,05 M em agar foram estudados nas suas possíveis relações com a qualidade da bebida provenientes dos mesmos cafés analisados.

1.3.2. Adaptação de métodos

O método mais utilizado para a determinação de proteínas é baseado no teor de nitrogênio total, multiplicando-se pelo fator 6,25 a quantidade de nitrogênio determinada.

A digestão do material para a formação do sulfato de amônio é lenta, assim como a titulação posterior da amônia liberada. A determinação de proteínas solúveis (depois de precipitadas com ácido tricloro acético (TCA), pelos métodos do ultra violeta (U.V.), biureto e Folin (LAYNE, 1957) foi investigado com o objetivo de adaptar estes métodos para o grau do café.

A literatura sobre compostos que interferem na de -

terminação de proteínas é vasta (POTTY (1969), KHANNA et al. (1969) e LAYNE (1957); daí a necessidade do estudo dos interferentes do café nos atuais métodos empregados.

Para os carboidratos solúveis em etanol a 80% e açúcares redutores, tentou-se aumentar a rapidez da extração como evitar possíveis interferentes.

Os polissacarídeos foram extraídos segundo WOLFROM et al. (1960), mas procurou-se utilizar o método fenol-sulfúrico de DUBOIS et al. (1956) para a determinação quantitativa dos polissacarídeos, porque é uma técnica rápida, muito sensível e barata.

Os compostos fenólicos foram analisados pelo método de SWAIN e HILLIS (1959) adaptado por AMORIM (1970) para cultura de tecido. Foi necessária uma readaptação para o grão do café porque este tem uma consistência diferente, daí a necessidade de se verificar o número de extrações e o tempo exigido para retirar pelo menos 95% dos compostos fenólicos solúveis nos solventes utilizados. Quanto à determinação dos ácidos clorogênicos, somente o método de GNAGY (1961 e 1962) foi investigado mais profundamente, e depois foi comparado com o de MOORES et al. (1948) e o da A.O.A.C. (1970).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

Cento e quatro amostras (500 g) de Coffea arabica L. var. Mundo Novo foram coletadas pelo I.B.C., SERAC/S.P.1 nas mais diversas regiões cafeeiras do Estado de São Paulo. Todas as amostras eram de café de terreiro e pertenciam à safra de 71/72. Dentre estas amostras, as quarenta que apresentaram bebidas mais características foram selecionadas segundo a qualidade da bebida como segue: 10 amostras classificadas como bebida Mole (M); 10 como Dura (D); 10 como -

Riada (Ry) e 10 como Rio (R).

Essas 40 amostras foram submetidas novamente à prova de degustação e analisadas estatisticamente a fim de serem utilizados somente os cafés que pudessem ser enquadrados dentro de um determinado padrão de bebida (item 2.3.).

Apenas 28 amostras foram classificadas com segurança; destas somente os dados analíticos de 24 (6 de M, 5 de D, 6 de Ry e 6 de R) foram aproveitadas, por causa do delineamento estatístico.

2.2. Métodos analíticos

2.2.1. Porcentagem de umidade

Utilizou-se o método da A.O.A.C. (1970), que consiste no seguinte:

Aproximadamente 5 g de café foram pesados e colocados em uma boêmia tarada. As amostras em seguida foram levadas para uma estufa a vácuo e secas durante 6 horas a 98-100°C. Uma corrente de ar seco (2 bolhas/seg. em H₂SO₄ conc.) conduzia a unidade para fora da estufa.

Depois das amostras esfriarem em dessecador, eram pesadas.

Foram feitas três repetições para cada amostra.

2.2.2. Ácidos fenólicos

Para 40 amostras foram analisados os ácidos clorogênicos totais; entretanto, para os isômeros do ácido clorogênico só foram analisados os 3 melhores e os 3 piores cafés.

Para os ácidos clorogênicos totais utilizou-se o método de MOORES et al. (1948) sem alteração e para os ácidos clorogênico, isoclorogênicos, neoclorogênico e cafêico seguiu-se o método empregado por GNAGY (1961 e 1962) com-

profundas modificações.

Dois gramas de café moído eram imediatamente extraídos com 100 ml de metanol a 80% (70-80°C), com refluxo por 2 horas. O resíduo era extraído mais três vezes nas mesmas condições. Os extratos eram juntados e o volume era reduzido sob vácuo a 15 ml e guardado a -10°C sob atmosfera de nitrogênio até a hora de ser cromatografado.

Tomou-se 50 ml de cada amostra e aplicou-se em papel SCHLEICHER & SCHULL, DASSEL nº 2043a. O solvente usado era uma mistura de n-butanol: ácido acético: água (4:1:2,2-v/v/v). Utilizou-se cromatografia monodimensional ascendente.

Os cromatogramas foram secos durante 15 minutos e em seguida recortavam-se as manchas vistas na luz ultravioleta (longa) e eluiu-se o material com 10 ml de metanol a 80% durante 30 minutos. As soluções eram filtradas, a fim de remover fibras de celulose do papel, e lidas a 324 nm em espectrofotômetro Zeiss PM QII.

A reta padrão era feita com ácido clorogênico, aplicado no cromatograma também, nas concentrações de 10 a 70 µg. Seguiu-se a mesma marcha das amostras para eluição e leituras.

Eram feitos 3 cromatogramas para cada amostra, e em cada cromatograma, 3 repetições. Nove determinações, portanto, para cada amostra.

2.2.3. Fenóis totais

Um grama de café moído era refluxado com 50 ml de água destilada ou metanol a 80% por 15 min. Repetia-se a mesma marcha mais duas vezes. O extrato era filtrado a vácuo por papel whatman nº 1 e o volume completado a 200 ml com água ou metanol a 80%. Os extratos eram conservados durante 12 horas na geladeira. Depois de centrifugados, 1,00 ml do sobrenadante era diluído a 10,0 ml com água destilada.

Destes, uma alíquota de 1,00ml era tomada para a determinação dos fenóis totais, utilizando o reagente para fenol de FOLIN-CIOCALTEU (1927) (1+2) (Merck) e seguindo a marcha adaptada por AMORIM (1970) do método de SWAIN e HILLIS(1959).

As 40 amostras foram analisadas para fenóis totais (água e metanol a 80%), sendo que foram feitas duas extrações para cada amostra e 6 determinações para cada extrato. Doze determinações para cada amostra, portanto.

2.2.4. Carboidratos livres totais, açúcares redutores e polissacarídeos.

Utilizou-se o mesmo extrato para a determinação dos carboidratos livres totais e dos açúcares redutores, embora com diluições diferentes.

De 10 g de café moído, tomou-se 1,0000g e extraiu-se com 40 ml de etanol a 80% em banho-maria fervente com refluxo por 5 min. O extrato foi filtrado a vácuo num filtro de porcelana ultra fino (SCHOTTUGEN, MAINS 3D4) e o resíduo foi extraído mais duas vezes com 40 ml de etanol a 80% por 5 min. em banho-maria fervente. Os extratos foram juntados e o volume completado a 250 ml com água destilada.

Alíquotas de 1,00 ml foram removidas para a determinação dos açúcares redutores, segundo adaptação de HODGE e HOFREITER (1962), utilizando-se os reativos de Somogy e Nelson.

Para cada amostra foram feitas 3 extrações, e para cada extrato duas determinações foram realizadas. Para cada grupo de análises eram feitos 2 padrões (30 e 60 µg de glucose), além da prova em branco.

Para determinar carboidratos livres totais, 10 ml do extrato eram diluídos a 100 ml com água destilada. Alíquotas de 2,00 ml eram misturadas em tubos de ensaio com 1,00 ml de uma solução de fenol a 5%; posteriormente adicionavam-se 5,0 ml de H₂SO₄ (Merck) conc.; depois de 10 min. de re-

pouso à temperatura ambiente, esfriava-se em água corrente por mais 10 min.

Em seguida a intensidade da cor da solução era lida num colorímetro Klet Summerson, usando-se filtro 50 (470 - 530 nm de transmissão).

Este método de DUBOIS et al. (1956) aconselha a determinação em duplicado para maior segurança. Foram feitas 3 análises para cada extração; 9 determinações, portanto, para cada amostra. Para cada grupo de determinações e ram feitos 2 padrões (80 e 160 µg de sacarose) em duplicado, além do branco.

Na determinação dos polissacarídeos seguiu-se a marcha utilizada por WOLFROM et al. (1960) e SHADAKSHARASWAMY e RAMACHANDRA (1967), com pequenas modificações.

Dois gramas do café moído eram extraídos durante 5 min. com 40 ml de etanol a 80% em banho maria em ebulição (com refluxo) por 3 vezes. O resíduo era seco ao ar livre e depois extraído 2 vezes com 50 ml de uma mistura de benzeno-etanol 2:1 (v/v) durante 30 min. cada vez.

Depois de nova secagem ao ar livre, extraía-se com 30 ml de éter etílico. Seco novamente, extraíam-se os polissacarídeos com 20 ml de uma solução de oxalato de amônia a 0,5% durante 10 min. a quente (água em ebulição). Repetiu-se a extração mais duas vezes.

Os extratos eram juntados e precipitavam-se os polissacarídeos com 3 volumes de etanol a 95%. Centrifugava-se por 15 min. a 5000 rpm. O sobrenadante era descartado e o precipitado dissolvido em oxalato de amônio 0,5%. Precipitava-se novamente com 3 volumes de etanol a 95% e centrifugava-se por 15 min., a 5000 rpm. Repetia-se uma vez mais a dissolução com oxalato de amônio a 0,5% e precipitação com etanol a 95%.

O precipitado final era dissolvido em oxalato de -

amônio a 0,5% e diluído a 100 ml. Dois ml desta solução eram utilizados para a determinação de carboidratos totais pelo método de DUBOIS et al. (1956).

Para cada amostra eram feitas duas extrações; cada extrato era analisado duas vezes, fazendo-se 3 repetições para cada análise. Portanto para cada amostra eram feitas 21 determinações. Para cada grupo de análises, além do branco, eram utilizados dois pontos da reta padrão (80 e 160 µg de sacarose) em duplicado.

Para carboidratos livres totais e açúcares redutores, 40 amostras foram analisadas. Para os polissacarídeos, somente os 3 melhores e os 3 piores cafés foram utilizados.

2.2.5. Nitrogênio total e proteínas solúveis

Cerca de 20 g de cada amostra de café foram moídos em um moinho Wiley com peneira 50; foram utilizados 100 mg para a determinação do nitrogênio pelo método do micro-Kjeldahl adaptado por MALAVOLTA (1957). Foram feitas três repetições, partindo do mesmo pó.

O cálculo para o teor de nitrogênio na matéria seca foi baseado nos dados do teor de umidade.

As proteínas solúveis em tampão fosfato pH 7,0, 0,01 M e NaCl 10%, pH 6,5 foram extraídas durante 2 horas em um agitador mecânico, utilizando-se 15 ml de solução - por grama de grão moído. O extrato foi passado por um pano de malha fina. Cinco ml da solução extratora foram adicionados ao resíduo e este passado novamente em pano de malha fina. Os extratos assim filtrados foram centrifugados por 15 minutos a 2000 rpm.

O sobrenadante foi transferido para um outro tubo de centrifuga e um volume de ácido tricloroacético (TCA) a 10% foi adicionado.

Deixou-se o extrato com TCA por 12 horas na geladeira (0-5°C). Em seguida o precipitado protéico foi centrifugado a 2000 rpm por 15 min., e o sobrenadante descartado.

Depois de corrido o TCA, as proteínas eram digeridas com 10 ml de mistura digestora (MALAVOLTA (1957)). A amônia era liberada com NaOH 17 N e recebida em uma solução de H_3BO_3 a 2% com indicador vermelho de metila e verde de bromocresol. A amônia foi titulada com uma solução de H_2SO_4 0,01 N.

O teor de proteína foi calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio por 6,25 (A.O.A.C. (1970)).

Posteriormente fizeram-se os cálculos baseados na matéria seca. Foram feitas 3 repetições para cada amostra, partindo do café em grão. Quarenta amostras foram analisadas.

A separação das proteínas solúveis por eletroforese foi feita baseada nas sugestões de MORRIS e MORRIS (1963) e MICHL (1967).

Um grama de café moído foi extraído com 5 ml de tampão fosfato pH 7,0, 0,05 M em um almofariz com ajuda de areia lavada. O extrato foi passado em pano de malha fina e centrifugado a 3000 rpm por 15 min. Do sobrenadante foram tomados três gotas e aplicadas no agar.

O agar foi aplicado sobre uma fôrma de vidro e tinha a concentração de 1%. Este foi preparado com uma solução de tampão fosfato pH 7,0 0,05 M. A corrente usada foi de 20 mA, 60 volts, por 24 horas.

As proteínas eram coradas com "amido black" 10b na concentração de 0,4% em solução de ácido acético 7% (v/v) por 20 min. Logo em seguida o agar era colocado em uma solução de ácido acético a 7% (v/v), até remover o excesso do corante. Depois de colocar a placa de agar sobre

papel celofane esticado, deixava-se secar à temperatura ambiente.

Assim foram obtidas placas permanentes com a disposição das proteínas demarcadas pelo corante.

As 40 amostras foram analisadas com 2 repetições. Mediu-se a distância percorrida pelas proteínas e dava-se o valor + ou - quando as mesmas haviam se dirigido para o polo positivo ou negativo, respectivamente. Se em uma amostra havia proteínas se dirigindo para os dois lados, mediam-se os dois tipos de proteínas, dando-lhes os sinais respectivos, e o sinal final era igual ao da proteína que percorria a maior distância.

2.3. Provas de xícara e análise estatística

As 40 amostras previamente selecionadas foram submetidas a uma nova prova de xícara com um delineamento estatístico em blocos ao acaso.

Os três degustadores profissionais do I.B.C. SERAC S.P.1 do Curso de Classificação e Degustação de Café de São Paulo não tiveram contacto prévio com as amostras do café e desconheciam a natureza do ensaio.

A torração das amostras para a prova de xícara foi feita por uma única pessoa, especializada neste mister.

Durante a realização das provas, os degustadores não mantiveram contacto entre si.

Foram realizados 10 ensaios em blocos ao acaso. Cada ensaio era constituído de 4 tratamentos. As repetições foram em número de oito.

Cada mesa de prova (bloco) era constituída de 18 xícaras, das quais 12 do ensaio (pertencentes aos 4 tratamentos) e 6 de café de rotina (não pertencentes ao ensaio). A ordem de colocação das amostras na mesa obedeceu a um sorteio.

Foram provadas as amostras de 8 mesas por dia, sendo 3 no período da manhã, 3 após o almoço e 2 no final da tarde. Desta maneira foi provado um ensaio por dia. Não foram realizadas provas na segunda-feira.

Os referidos ensaios tiveram seu início em 19/10/1971 e o seu término em 5/11/71. As análises químicas foram feitas mais ou menos na mesma época.

Estudos estatísticos sobre a classificação do café, quanto à qualidade da bebida, evidenciaram que os provadores não distinguem entre café Mole e Estritamente Mole e têm a tendência de classificar o Apenas Mole como Mole - (BARBOSA et al. (1962a e 1962b). Ainda os mesmos autores observaram que os provadores diferenciam o Duro dos demais, assim como o Riado e o Rio, embora haja uma pequena tendência de classificar o Riado como Rio, mas raramente o Rio como Riado.

Para efeito da análise estatística, foi resolvido juntar os cafés classificados como Estritamente Mole, Mole e Apenas Mole em uma só categoria, o Duro em outra, o Riado em outra e o Rio em outra. Por outro lado, das 40 amostras analisadas, não seria possível juntar um número suficiente de amostras Estritamente Mole ou Apenas Mole para comparar com as análises químicas.

A análise estatística para a prova de xícara foi realizada com a finalidade de selecionar as amostras que fossem classificadas em um determinado padrão de bebida com significância estatística.

Foi feita análise de variância transformando a porcentagem do número de acontecimentos em $\arcsin \sqrt{x}$. O número de acontecimentos foi considerado o número total de vezes que um degustador provou uma amostra (8 vezes), e quantas vezes ele apontou essa mesma amostra nos diferentes padrões.

O delineamento utilizado foi o seguinte:(Tabela 2-3)

TABELA 2-3. Delineamento utilizado para a análise estatística da prova de xícara.

Causa da Variação	G.L.
Tratamentos	3
Resíduo	8
TOTAL	11

Se o teste F desse significativo pelo menos a 5%, era feito o teste de TUCKEY a 5% e 1% para posterior comparação entre as médias.

2.4. Análises químicas e análise estatística

Os estudos da variância e regressões foram feitos com computador eletrônico IBM - 1130, situado no Departamento de Matemática e Estatística da ESALQ, U.S.P.

Das 40 amostras, somente 24 foram aproveitadas para a análise estatística, sendo que 6 amostras de Café Mole, 6 de Duro, 6 de Riado e 6 de Rio. As análises químicas de cada composto foram grupadas segundo a qualidade da bebida e consideradas como um tratamento.

Toda a análise estatística foi feita considerando as porcentagens diretamente e convertendo-as em $\text{arc sem} \sqrt{x}$.

2.4.1. Análise de variância das análises químicas em porcentagem da matéria seca.

Para as análises dos carboidratos livres totais, açúcares redutores, ácido clorogênico total, proteínas solúveis em tampão fosfato, proteínas solúveis em NaCl e nitrôgênio total, foram feitas 3 repetições para cada amostra, tendo-se 6 amostras para cada padrão de bebida, e quatro padrões de bebida (Mole, Duro, Riado e Rio); a análise de variância fica do seguinte modo: (Tabela 2-4):

TABELA 2-4. Delineamento utilizado para a análise estatística dos teores de carboidratos solúveis totais, açúcares redutores, ácido clorogênico total, proteínas solúveis e nitrogênio total.

Causa de Variação	G.L.
Tratamentos	3
Resíduo	68
TOTAL	71

As análises de fenóis totais solúveis em água e em metanol a 80%, assim como a eletroforese de proteínas, foram feitas com duas repetições; daí, a análise de variância ficar: (Tabela 2-5):

TABELA 2-5. Delineamento utilizado para a análise estatística dos teores de fenóis totais solúveis em água, em metanol a 80% e dos ensaios com eletroforese de proteínas.

Causa de Variação	G.L.
Tratamento	3
Resíduo	44
TOTAL	47

Foram calculados os coeficientes de variação dentro de cada padrão de bebida, assim como o geral. O erro da média, o teste de F e a diferença mínima significativa (d.m.s.) ao nível de 5% também foram calculados.

2.4.2. Análise de variância das análises químicas em gramas do composto por grama de nitrogênio.

Utilizaram-se a média da análise química dos compostos e a média do teor de N total, e desta maneira encontrou-se a relação composto/N.

Tendo-se 6 amostras para cada padrão de bebida e 4 padrões de bebida, a análise de variância foi a seguinte (Tabela 2-6):

TABELA 2-6. Delineamento utilizado para a análise estatística dos compostos em relação ao N total.

Causa de Variação	G.L.
Tratamentos	3
Resíduo	20
TOTAL	23

Do mesmo modo como as análises anteriores, as médias dos tratamentos (padrões de bebida), coeficientes de variação, d.m.s. a 5%, teste F e erro da média foram calculados.

2.4.3. Análise de variância das análises químicas em relação com a matéria seca, incluindo os polissacarídeos e os isômeros do ácido clorogênico.

Como já foi dito, algumas das determinações químicas demandam muito tempo e um gasto muito grande de material; por estas razões resolveu-se tomar apenas os 3 melhores e os 3 piores cafés para estas análises.

Para a análise dos polissacarídeos, a análise de

variância fica como mostra a Tabela 2-7.

TABELA 2-7. Delineamento para a análise estatística do teor de polissacarídeos solúveis do grão de café verde.

Causa de Variação	G.L.
Tratamentos	1
Resíduo	10
TOTAL	11

Para a análise dos ácidos isoclorogênicos (+ ácido cafêico) e ácido neoclorogênico, devido ao fato de se terem 3 repetições, a análise de variância fica como mostra a Tabela 2-8.

Para todas essas análises foram calculados o coeficiente de variação dentro dos padrões de bebida isoladamente, e o geral, o erro da média, o teste F e a d.m.s.

TABELA 2-8. Delineamento para a análise estatística do teor de ácido clorogênico, ácidos isoclorogênicos e ácido neoclorogênico.

Causa de Variação	G.L.
Tratamentos	1
Resíduo	16
TOTAL	17

2.4.4. Correlações entre os compostos químicos analisados.

Correlações dos teores dos compostos analisados das 24 amostras foram feitas, tentando-se relacionar os-

teores de um composto com outro. Para tal utilizaram-se as porcentagens diretamente, assim como os dados transformados em $\text{arc sen } \sqrt{\%}$.

Sendo 8 o número de compostos determinados, 28 análises de regressão foram necessárias para analisar um composto contra todos. Foram calculados o valor de r e o teste F de significância para cada análise de regressão feita.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Adaptação de métodos

3.1.1. Ácidos fenólicos

Um dos únicos métodos encontrados na literatura, que permitia a determinação do ácido clorogênico e seus isômeros, e que era acessível à aparelhagem disponível, foi o desenvolvimento por GNAGY (1961 e 1962). HAUSERMANN e BRANDENBERGER (1961), citados por SMITH (1963), desenvolveram um método semelhante na mesma época. GNAGY (1961 e 1962) usou cromatografia de papel de filtro monodimensional, para a separação dos ácidos e após a eluição das manchas a solução era lida a 328 nm. O solvente usado foi n-butanol/ácido acético/água na proporção de 4:1:5 (v/v/v).

A extração era feita com álcool isopropílico a 70% durante 3 horas em um agitador, e repouso durante a noite. Depois era centrifugada e 150 μ l do sobrenadante eram aplicados no papel cromatográfico.

O tempo necessário para fazer uma análise totalizava 3 dias, e envolvia muita manipulação.

No presente trabalho, foi iniciado primeiramente um estudo para a extração do ácido clorogênico com metanol a 80% à quente (50-60°C).

O metanol a 80% foi escolhido por duas principais

razões: a) o seu ponto de ebulição é baixo sendo assim mais fácil reduzir o volume para a cromatografia. b) extrai menos compostos interferentes.

Utilizando 2,0000g de café moído, este era imediatamente jogado em 100 ml de metanol a 80% em ebulição com refluxo e extraído por diversos intervalos de tempo.

Foram necessárias 3 extrações de duas horas cada, para a remoção total (ou quase) dos ácidos clorogênicos. Na primeira extração, mais de 90% dos ácidos clorogênicos eram removidos.

O solvente era evaporado a vácuo a uma temperatura não superior a 50°C. Temperaturas mais altas oxidam e polimerizam os ácidos clorogênicos.

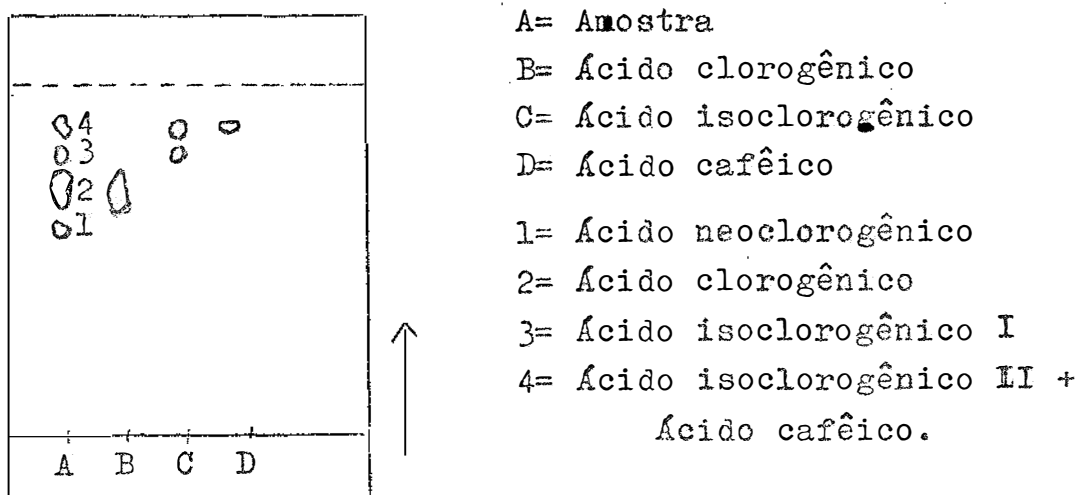
O extrato pode ser armazenado na geladeira (0-5°C) sob atmosfera de nitrogênio por uma semana. O desejável, porém, é fazer o cromatograma logo em seguida à redução do volume. Extratos ou padrões de ácido clorogênico com mais de um mês de estocagem chegavam a reduzir suas concentrações em mais de 50% quando cromatografados.

Foram testados 24 solventes e misturas (SEIKEL (1964) e o que melhor separação ofereceu foi o largamente usado n-butanol/ácido acético/água, na proporção 4:1:2,2 (v/v/v). Cada solvente ou mistura foi testado com dez repetições.

Tentou-se lavar os papéis com álcool etílico, Na_2HPO_4 0,1 M e ácido acético; embora as manchas tivessem ficado mais visíveis, as lavagens não trouxeram nenhuma melhora na separação dos ácidos clorogênicos.

A Figura 3-2 mostra um cromatograma que foi desenvolvido nas condições acima discutidas.

FIGURA 3-2. Esquema do cromatograma monodimensional do extrato do grão de café verde.



Solvente: n-butanol/ác. acético/água 4/1/2,2 (v/v/v)

Embora os resultados obtidos concordem em parte com a literatura, principalmente com os trabalhos de LENTNER e DEATHERAGE (1958) e PICTET e BRANDENBERGER (1960), foi tentada a identificação das manchas encontradas no cromatograma e, para tal os seguintes métodos foram utilizados:

a) comparação de Rf. com padrões repurificados cromatograficamente de ácido clorogênico, cafêico e isoclorogênico (Sigma); não foi possível conseguir ácido neoclorogênico;

b) uso de indicador para substâncias fenólicas; usou-se cloreto férrico + ferricianeto de potássio na concentração de 1,5%. (BARTON et al. (1952);

c) vapores de NH_4OH ; os ácidos clorogênicos tornam-se de coloração amarela;

d) ácido acético a 10% + NaNO_2 ; pulverização do cromatograma torna as manchas dos ácidos clorogênicos amarelas.

relas e a do ácido cafêico, vermelha; mediante posterior p ulveriza  o com NaOH dilu ido, os ácidos clorogênicos tornaram-se vermelhos;

e) espectrometria no ultra violeta (380 a 220 nm); foi usado um Beckman DB com registrador.

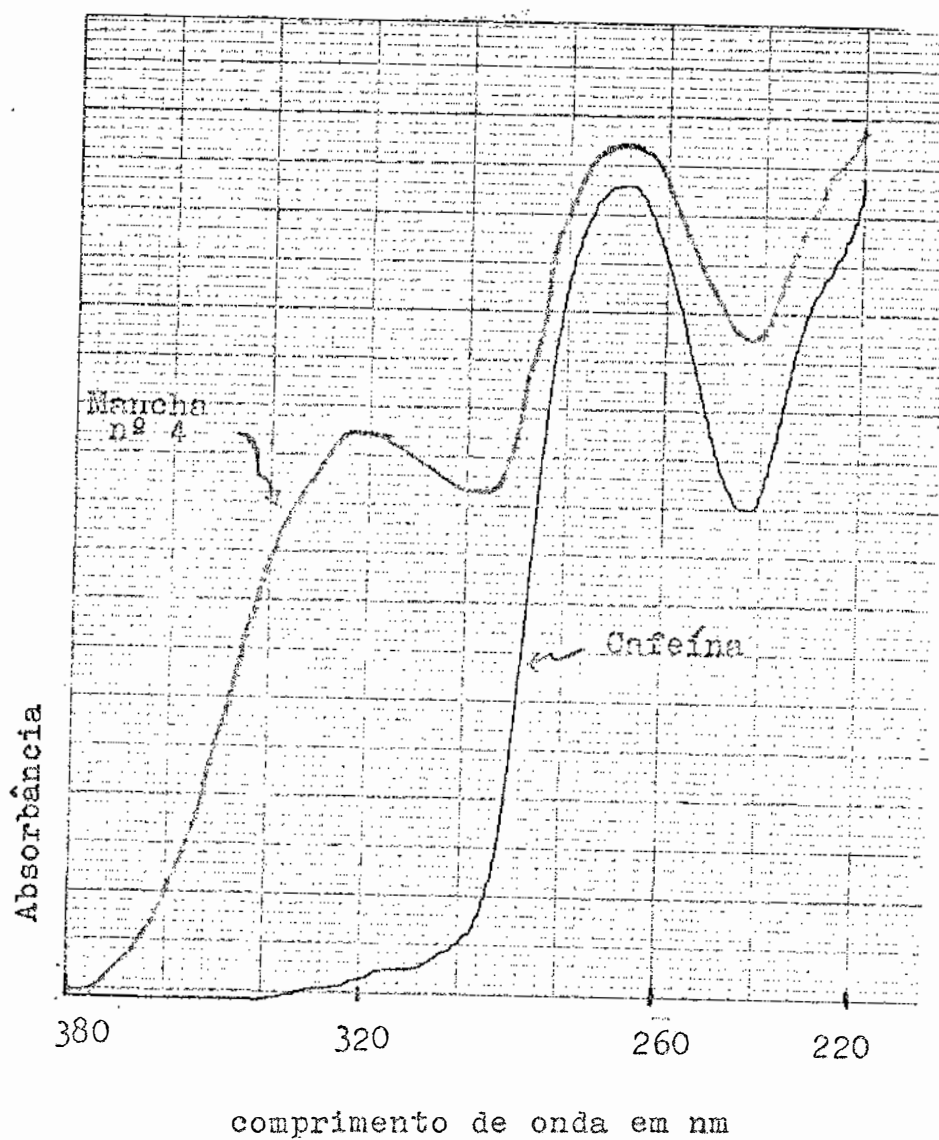
O  cido clorogênico e o isoclorogênico I apresentaram-se idênticos aos padrões purificados. O  cido neoclorog nico apresentou-se bem semelhante ao clorogênico e isoclorogênico. O espectro do ácido caf ico + isoclorogênico II diferiu do padrão, apresentando além de seu pico máximo ao redor de 320 nm um outro pico ao redor de 270 nm. Este último pico é devido à cafeína, que não se conseguiu separar completamente. Pelo espectro dos dois compostos pode-se verificar que a cafeína não absorve a 324 nm (Figura 3-3).

Utilizando cromatografia monodimensional e como solvente n-butanol, ácido acético e água, na propor o de 4:1:2,2, foi possível separar os ácidos fenólicos do café, com excess o do caf ico, e medi-los quantitativamente após elui o do cromatograma com uma soluço alcoólica e leitura em espectrofotômetro a 324 nm.

O  cido criptoclorog nico (4-cafeoilquínico ou "Banda 510") não pôde ser separado dos ácidos clorogênicos e neoclorog nicos quando se usou papel de 35 cm de comprimento. Se o papel for maior, o tempo para correr o cromatograma pode chegar a 64 horas; desta maneira consegue-se separar o criptoclorog nico. Entretanto o ácido clorogênico sofre oxida o, devido ao longo tempo em exposi o. Para outros isômeros não foi feita a investiga o. FELDMAN et al. (1969) mostraram que o ácido clorogênico é um dos mais degradados na torra o.

As manchas devem ser eluídas após ligeira secagem do papel (não esperar mais de 15 min.) para evitar oxida o. Os  cidos clorogênicos oxidados absorvem muito pouco na região dos 324 nm.

FIGURA 3-3. Espectro no ultra violeta da cafeína e da mancha nº 4. (ácido isoclorogênico II + ácido cafeico + cafeína).



Depois da tentativa de adaptação do método cromatográfico, foi feito um estudo comparativo entre este (GNAGY (1961 e 1962), o método original de MOORES et al. (1948) e o modificado por WEISS (1957) e que é atualmente aceito pela A.O.A.C. (1970).

Seis tipos diferentes de café foram tomados, sendo feitas nove determinações, seguindo-se cada um dos métodos acima citados. O quadro abaixo mostra os coeficientes de variação (o maior e o menor encontrados nas seis amostras) e os limites máximos e mínimos de cada série de determinações das respectivas amostras.

TABELA 3-9. Resultados da análise estatística dos três métodos de determinação do ácido clorogênico em grãos de café.

(VIDE ERRATA)

	MOORES et al. (1948)	WEISS (1957) A.O.A.C.(1970)	GNAGY(1961 e 1962)
Coef.var.máx.	10,03%	7,21%	6,86%
Coef.var.min.	6,46%	5,19%	6,04%
Valores máx. e mínimos em %, nas amostras	5,24-5,94 6,65-6,69	5,92-6,54 6,42-6,47	5,99-6,80 6,67-6,72

No trabalho de WEISS (1957), aceito pela A.O.A.C. (1970), o coeficiente de variação encontrado foi de 4,77 e os limites máximos e mínimos foram de 8,88% e 7,47%, respectivamente. Pelo que se pode observar, não diferem muito das análises feitas neste trabalho usando-se tanto o método da A.O.A.C. (1970) como também o de MOORES (1948).

A média das análises feitas com os três métodos foi a seguinte: MOORES 6,53; A.O.A.C. 6,34; Cromatográfico 6,74. O teste de Tukey não revelou significância entre MOORES e A.O.A.C., mas ambos foram diferentes do cromatográfico.

Segundo DICK (1972), a Associação Oficial dos Químicos Analíticos recomendou em sua última reunião que se continuassem os estudos sobre a determinação do ácido clorogênico em café, pois o atual método aceito não é definitivo.

Devido aos resultados obtidos e à literatura consultada, achou-se razoável e válido se utilizar o método de MOORES (1948) para a determinação do ácido clorogênico total em grãos de café verde. Seria bom lembrar que o método da A.O.A.C. (1970) é bem mais moroso.

3.1.2. Carboidratos

Dois eram os objetivos das análises dos carboidratos. Um deles, detectar quais os açúcares livres no café, e o outro, medi-los quantitativamente.

Primeiramente tentou-se usar o método de extração utilizado por VALENCIA e ARZOLLA (1967) para folhas de café. Todavia a extração revelou-se insuficiente, sendo necessário, portanto, um outro tipo de extração.

Utilizando-se 40 ml de etanol a 80% por grama de café moído, extraíndo-se diversas vezes com intervalos de tempo diferentes e analisando-se os carboidratos totais pelo método de DUBOIS et al. (1956), obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 3-10.

Pelos resultados obtidos, foi decidido utilizar o tempo de 5 minutos para cada extração, fazendo-se um total de 3 extrações.

A A.O.A.C. (1970) também aconselha extração a quente em solução alcoólica.

Logo em seguida o extrato etanólico, depois de filtrado (porcelana porosa), era passado por uma coluna AG-50W-X4 forma H⁺(100-200 mesh). Depois de reduzido o volume a vácuo a temperatura não superior a 50°C, o extra

to era cromatografado. Utilizaram-se a técnica, os solventes (fenol/amônia/água e butanol/ácido acético/água) e os reagentes aconselhados por FONSECA e ARZOLLA (1965) e através de cromatografia bidimensional separaram-se e identificaram-se sacarose, glicose e frutose.

TABELA 3-10. Efeito do tempo e número de extrações na remoção de carboidratos solúveis em etanol a 80% de grãos de café (resultados em mg carboidrato/g. café, média de duas repetições).

	Tempo de cada extração		
	5 min.	10 min.	15 min.
1ª extração	75,0	77,5	73,5
2ª extração	7,2	8,5	7,8
3ª extração	1,2	1,2	1,2
4ª extração	1,2	0,7	0,4
5ª extração	0,4	0,4	0,3
TOTAL	85,0	88,3	83,3

Pela intensidade das manchas, a glicose e frutose pareciam estar em concentração bem mais alta do que as encontradas na literatura.

Sabendo-se que a sacarose e outros carboidratos que possuem a ligação frutofuranosídica são facilmente hidrolisados (McCREADY (1970), usaram-se diversas colunas e mediu-se o pH do extrato etanólico depois de passado pela coluna, assim como depois da eluição com água destilada.

A Tabela 3-11 mostra os resultados obtidos.

O extrato etanólico, antes de passar pela coluna, tinha o pH 5.3 (todos os dados são médias de duas repe-

tições).

TABELA 3-11. pH dos eluídos de extratos etanólicos de café, passados por diferentes colunas de resina de troca iônica.

Tipo da Coluna	Forma	pH dos eluídos	
		extrato etanólico	extrato + água de lavagem
A) DOWEX 50W-X8 (100-200 mesh)	H ⁺	3,7	3,4
B) AG 50W - X4 (100-200 mesh)	H ⁺	3,7	3,5
C) AG 1 - X8 (200-400 mesh)	Cl ⁻	4,5	3,8
D) AG 1 - X8 (100-200 mesh)	COO ⁻	6,7	5,5
E) AMBERLITE CG-120 (100-200 mesh)		7,2	6,6

Posteriormente os volumes dos eluídos foram reduzidos e cromatografados em n-butanol/ácido acético/água na proporção de 4:1:0,5(v/v/v) (FONSECA e ARZOLLA (1965)).

A Tabela 3-12 mostra os resultados dos cromatogramas, assim como a análise de carboidratos totais nos eluídos; a intensidade das manchas detectadas é proporcional ao número de sinais para glicose e frutose.

Não se conseguiu, a olho nú, diferenciar as manchas para sacarose em relação à quantidade; entretanto, pelos resultados quantitativos da determinação dos açúcares totais eluídos (método de DUBOIS et al. (1956), pode-se observar que não houve retenção de açúcares na coluna.

mas somente degradação da sacarose. O extrato original, sem passar pela coluna, mostrou uma concentração de 92,4 mg de carboidrato/g de café.

Diversas retas, utilizando-se o método fenol-sulfúrico, foram feitas, usando-se amido, glicose, frutose, sacarose, manose e galactose como padrões. A análise estatística revelou que os coeficientes de extinção para glicose, frutose, manose e amido não diferiram entre si, sendo diferentes dos correspondentes à sacarose e à galactose, que também diferiram significativamente entre si. Esses resultados são bem concordantes com os de DUBOIS et al. (1956).

Devido ao fato de que a sacarose encontra-se em porcentagem bem mais elevada que os outros açúcares livres no grão do café, decidiu-se utilizar em todas as análises a sacarose como padrão.

TABELA 3-12. Detecção dos carboidratos dos eluídos das diferentes colunas e a quantidade total de carboidratos encontrados nos eluídos.

Coluna	Sacarose	Glicose	Frutose	mg Carb/g café
A	+++++	++	+	84,8
B	+++++	++	+	82,2
C	+++++			84,4
D	+++++			85,3
E	+++++	+		86,5

Este resultado vem confirmar as observações de BARNETT e TAWAB (1957), de que o método fenol-sulfúrico é bem específico para carboidratos e seus derivados, pois na determinação da lactose em leite e queijo a caseína,-

amino ácidos, ácido láctico e ácido cítrico não interferiram, assim como a gordura da manteiga.

Com base nestes dados resolveu-se determinar os carboidratos livres totais solúveis em etanol a 80% sem uma posterior clarificação do extrato. Desta maneira foram obtidos os dados do presente trabalho em relação aos carboidratos livres.

Em posterior investigação sobre a metodologia empregada, notou-se que a média das análises estava um pouco acima da média encontrada na literatura para a sacarose.

Resolveu-se então determinar se o ácido clorogênico poderia interferir na reação. A alíquota de 2 ml do extrato para determinação de carboidratos contém, aproximadamente, 80 µg de ácido clorogênico total. Tomando isso como base, montou-se um ensaio no qual diferentes quantidades de ácido clorogênico foram adicionados e a reação com fenol e ácido sulfúrico revelou os resultados que vão na Tabela 3-13.

TABELA 3-13. Efeito do ácido clorogênico na determinação de carboidratos pelo método fenol-sulfúrico.

Nº tubo	µg ác.clorog/2 ml	Leituras		
		1ª rep.	2ª rep.	\bar{m} menos branco
1	1600	69,0	72,5	25,65
2	1280	61,0	65,0	17,90
3	800	58,0	54,0	10,90
4	480	51,0	51,2	6,00
5	160	50,5	45,2	2,75
6	80*	47,0	47,0	1,90
7	50	47,0	47,0	1,90
8	0	45,0	45,2	0,00

* Quantidade encontrada na alíquota.

Como se pode verificar, existe uma pequena influência do ácido clorogênico na reação do método fenol-sulfúrico para carboidratos.

Tentou-se precipitar o ácido clorogênico (e outros possíveis interferentes) com subacetato de chumbo saturado (O.I.C.C. (1962) - 7b - E/1960) e eliminar o excesso de subacetado com carbonato de sódio.

Conseguiu-se eliminar todo o ácido clorogênico, mas o acetato não precipitado interferia no método. A adição de carbonato de sódio diminuiu bem a interferência, mas até agora não foi possível estabilizar a cor e, assim sendo, a variação é bem grande. Este processo parece promissor, e espera-se que em futuro próximo resultados mais positivos sejam alcançados.

Tentou-se verificar se o etanol a 80% a quente também extraía açúcar fosforilado e utilizando-se a técnica cromatográfica empregada por HANES e ISHERWOOD (1949) detectou-se uma mancha que reagiu como tal. O Rf, no entanto, não pôde ser comparado com nenhum dos açúcares fosforilados que estavam à disposição (glucose 1-P, glucose 6-P, frutose 1-6 di-P). Tal composto poderá ser talvez um fosfolípídeo.

Foi difícil encontrar um solvente que separasse ao mesmo tempo a sacarose, o composto fosforilado desconhecido e os ácidos clorogênicos, para o estudo da contribuição de cada um dos interferentes na coloração final do método fenol-sulfúrico.

A acetona pura conseguiu separar bem os 3 compostos sendo que os Rf foram: fosforilado desconhecido 0,15; sacarose 0,50 e ácido clorogênico 0,80.

Feito o cromatograma e eluídas as manchas e os brancos respectivos, foram feitas as análises para carboidratos totais pelo método fenol-sulfúrico.

O composto fosforilado desconhecido deu uma leitura de 1/20 em comparação com a sacarose, portanto deve contribuir com 5% para a coloração final do referido método.

Por outro lado, utilizando-se diferentes quantidades de glicose-6-fosfato, verificou-se que, fazendo-se a reação do método fenol-sulfúrico, obtinham-se leituras proporcionais às quantidades de açúcar fosforilado presente: obedecia à lei de Beer pelo menos no intervalo de 10 a 90 µg. É interessante notar que no trabalho original de DUBOIS et al. (1956) os autores não mencionam açúcar fosforilado; além disso, também não foi encontrada nenhuma referência sobre determinação de açúcares fosforilados pelo referido método.

Devido ao fato de o método ser sensível para micro quantidades, ser rápido, fácil de fazer e sobretudo barato, seria interessante um estudo mais detalhado para a utilização do método fenol-sulfúrico para açúcares fosforilados.

A Tabela 3-14 mostra os resultados conseguidos.

TABELA 3-14. Utilização do método fenol sulfúrico para determinação de açúcares fosforilados.

Nº tubo	µg G-6-P	Leituras		
		1ª rep.	2ª rep.	média/leituras menos o branco
1	13,5	53,0	54,0	12,25
2	22,5	56,0	58,5	16,00
3	31,5	63,5	64,2	22,60
4	45,0	76,0	75,0	34,25
5	67,5	86,5	86,5	45,25
6	90,0	99,8	100,6	58,95
7	0,0	40,0	42,5	0,00

A determinação dos açúcares redutores, que mais corretamente deveriam ser chamados de "poder redutor", foi feita logo em seguida à extração, para evitar hidrólise da sacarose. Os resultados obtidos coincidem com as médias encontradas na maioria dos trabalhos mais recentes da literatura; entretanto TERRIER (1952) e ROSENTHALER (1923), citados por NAVELLIER (1970), afirmam que o ácido clorogênico tem um fraco poder redutor e interfere em reações desse tipo.

Com o bojetivo de verificar se o ácido clorogênico, na concentração em que se encontra na amostra em que foram determinados açúcares redutores (cerca de 400 ug/ml de ác. clorogênico), interfere na reação para os mesmos, montou-se um ensaio seguindo o método de HODGE e HOFFREITER (1962), utilizando-se o reativo de Somogy e Nelson. Os resultados apresentam-se na Tabela 3-15.

TABELA 3-15. Efeito do ácido clorogênico na determinação dos açúcares redutores com o reativo de Somogy e Nelson.

Nº tubo	ug ác. clorog.	Leituras		
		1ª rep.	2ª rep.	média das leit. menos o branco
1	1000	18,0	19,1	0,05
2	800	18,0	18,1	- 0,04
3	600	21,0	18,0	1,00
4	400 *	18,1	18,2	- 0,35
5	200	16,0	18,0	- 1,50
6	100	17,5	19,0	- 0,25
7	0	18,0	19,0	0,00

* Quantidade encontrada na alíquota tomada para a determinação de açúcares redutores.

Pela Tabela 3-15 pode-se observar que não houve efeito algum do ácido clorogênico no poder redutor do extrato.

O desconhecido composto fosforilado isolado por cromatografia foi eluído e testado com o reativo de Somogy e Nelson (HODGE e HOFREITER (1962), verificando-se que não reduziu o cobre. Portanto o composto desconhecido não interferiu na determinação de açúcares redutores.

3.1.3. Proteínas solúveis

O método oficial de determinação de proteínas totais e solúveis no café e na maioria dos alimentos é baseado na determinação do nitrogênio orgânico (A.O.A.C. (1970), NAVELLIER (1970), LILLEVIK (1970a), O.I.C.C. - (1962) e HART e FISHER (1971). Entretanto métodos mais rápidos e mais acurados são sempre desejados, principalmente no controle de qualidade em indústrias alimentícias.

Para o caso especial do café, não foram encontrados na literatura outros métodos que não fossem os oficiais acima citados; indústrias de café também os têm usado porque não se conseguiu adaptar um método mais rápido e que desse a mesma reprodutibilidade (R.J.OLSON (1971) General Foods Co. - Comunicação pessoal).

Pensou-se que seria válida uma tentativa de adaptar um dos métodos largamente usados em bioquímica e que conseguem medir micro quantidades com bastante precisão e rapidez. Entre os principais, escolheram-se o método do ultra violeta (U.V.) (LAYNE (1957), o do biureto (ITZ-HAKI e GILL (1964) e o de Folin (LOWRY et al. (1951).

3.1.3.1. Método do U.V.

Seguiu-se o método descrito por LAYNE (1957) que se baseia na relação da absorção das proteínas a 280 nm-

e 260 nm e uma série de fatores de correção para a determinação quantitativa de polipeptídeos em solução.

Este método é muito indicado para proteínas semi purificadas porque a solução não apresenta turbidez. Para o caso do café, a solução aquosa do mesmo é turva e, para a remoção desta turbidez, utilizou-se éter etílico para a eliminação das substâncias graxas.

Um grama do pó desengordurado foi extraído com 15 ml de tampão fosfato pH 7,0 0,01 M durante duas horas, com agitação mecânica.

Depois de coado em pano de malha fina, o extrato foi centrifugado, e o sobrenadante precipitado com um volume de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Depois de um repouso na geladeira (● - 5°C) de 12 horas, foi centrifugado a 2000 rpm durante 15 min., e o sobrenadante decantado.

O precipitado protéico foi dissolvido em 20 ml de solução tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0. Não se conseguiu dissolução completa, nem com um leve aquecimento.

Esta solução foi centrifugada, e o precipitado lavado com água destilada e submetido ao tratamento pelo reativo de Molish para carboidratos e o de Millon para proteínas. Ambos deram resultados positivos.

Tentou-se solubilizar as proteínas precipitadas com TCA a 10% por meio de NaOH 0,1 N. Conseguiu-se uma solubilização total, mas a solução adquiriu uma leve coloração amarelada e uma pequena turbidez.

Já é fato sabido que a turbidez e pigmentação interferem na determinação de proteínas pelo método do U.V. (LAYNE (1957)).

3.1.3.2. Método do micro-biureto

Seguiu-se o método adaptado por ITZHAKI e GILL -

(1964) que é seis vezes mais sensível que o do biureto anteriormente conhecido (GORNALL et al.(1947)).

Este método é baseado na absorção no ultra violeta do complexo formado entre a proteína e o cobre quando estes estão em uma forte solução alcalina de sulfato de cobre.

Preparou-se uma reta padrão com albumina de sêrum de boi (BSA)(Sigma), utilizando-se 100 a 2000 µg de proteína.

A extração e precipitação das proteínas foram feitas do mesmo modo descrito para o método do U.V. - (ítem 3.1.3.1.).

Não se teve dificuldades para dissolver as proteínas precipitadas pelo TCA, pois foi utilizado K_2CO_3 a 5,6% (CALDAS (1970)).

Após adição do reagente de biureto (sulfato de cobre), observou-se uma turbidez na solução, e após 45-50 min. uma suspensão de cor marrom e de consistência gelatinosa foi observada. Não foi possível obter leitura.

Tentou-se lavar o precipitado do TCA com acetona gelada (-10°C) por 3 vezes. A turbidez praticamente desapareceu, mas o precipitado marrom continuou aparecendo. Fato semelhante foi observado por POTTY (1969) quando testava o método do biureto para determinar proteínas em vesículas de laranja. Por outro lado, o autor não mencionou se esse efeito era devido a substâncias fenólicas ou pécnicas.

De acordo com H. SOMMER (1971). (Comunicação pessoal), encontrou a mesma dificuldade quando tentava adaptar o método do biureto para a determinação quantitativa de proteínas em culturas de tecido vegetal. O autor é de pensamento que esses precipitados são polissacarídeos precipitados pelo

cobre do reagente do biureto. Tal hipótese pode ser verdadeira, pois no precipitado com TCA foram detectados carboidratos (item 3.1.3.1.), quando se tentava dissolver o precipitado do TCA para a leitura no U.V.

3.1.3.3. Método de Folin-Lowry

Este é um dos métodos mais utilizados em bioquímica por causa de sua alta sensibilidade e rapidez.

Neste trabalho foi seguida a adaptação feita por LOWRY et al. (1951).

O fundamento deste método baseia-se na reação do cobre com a proteína em meio alcalino com posterior redução do reagente de fosfomolibdato e fosfotungstato pela tirosina e triptofano da proteína tratada com cobre (LOWRY et al. (1951) e LILLEVIK (1970b)).

Primeiramente fez-se uma extração com • foi descrita para o método do U.V. (item 3.1.3.1.) e as proteínas foram precipitadas com um volume de TCA a 10%. Depois da centrifugação e descarte do pigmentado sobrenadante, o precipitado foi dissolvido a 40 ml com K_2CO_3 a 3%.

Utilizando-se o mesmo método de extração e precipitação com TCA a 10%, determinou-se o teor de nitrogênio no precipitado pelo método do micro-Kjeldahl adaptado por MALAVOLTA (1957).

Os resultados dos dois métodos de proteínas em relação à matéria verde podem ser observados na Tabela 3-16.

É evidente que a pigmentação ou outro interferente qualquer do extrato está influenciando na determinação pelo método de Folin-Lowry.

TABELA 3-16. Determinação de proteína solúvel do café pelo método de Folin-Lowry e pelo N x 6,25.

Método	% Proteína	
	1ª rep.	2ª rep.
N x 6,25	2,73	2,98
Folin-Lowry	5,74	5,90

Devido à coloração marrom do extrato, pensou-se em extrair as proteínas com ácido ascórbico a fim de evitar a oxidação dos fenóis. Adicionaram-se 15 mg de ácido ascórbico (15 ml) na solução tampão fosfato pH 7,0 0,01 M. Os resultados são encontrados na Tabela 3-17.

Pela Tabela 3-17 ficou evidenciado que o ácido ascórbico afetou a extração de proteínas porque abaixou o teor das mesmas pelo método de N x 6,25. O pH da solução extratora baixou para 4,3 e isto deve ter sido a causa principal da menor extração.

Não se tentou usar outros redutores como 2-mercaptoetanol, ditiotreitol (Clealand's reagent) e bis-sulfito de sódio porque interferem com o reativo de Folin (AMORIM (1970b)).

TABELA 3-17. Efeito do ácido ascórbico na determinação de proteínas solúveis do café pelo método de Folin-Lowry e pelo N x 6,25.

Método	Tratamento	% Proteína	
		1ª rep.	2ª rep.
N x 6,25		3,24	3,06
N x 6,25	c/ác.ascórbico	1,88	1,71
Folin-Lowry		5,93	5,54
Folin-Lowry	c/ác.ascórbico	4,60	4,86

Com vistas a eliminar interferentes, uma série de ensaios foi planejada, sempre se comparando os resultados obtidos pelo método de Folin-Lowry com os do N x 6,25.

Primeiramente tentou-se verificar se a lavagem do café moído com éter tinha algum efeito no teor de proteína medido pelos dois métodos. A Tabela 3-18 mostra esse efeito.

TABELA 3-18. Efeito do desengorduramento com éter etílico do grão de café verde moído na determinação de proteínas pelo método de Folin-Lowry e N x 6,25.

Tratamento do pó	Método			
	Folin - Lowry		N x 6,25	
	1ª rep.	2ª rep.	1ª rep.	2ª rep.
com éter etílico	7,74	7,60	4,07	4,01
	7,10	7,06	4,09	4,01
sem éter etílico	8,15	7,90	4,44	4,75
	8,00	7,85	4,74	4,94

Pela Tabela 3-18 pode-se notar claramente que a lavagem do pó com éter etílico remove um ou mais compostos nitrogenados e que reagem com Folin e são precipitados ou carregados juntamente com as proteínas quando estas são precipitadas com TCA a 10%.

Vários fatores podem contribuir para que ambos os resultados diminuíssem com o tratamento com o éter. Para o caso do Folin, é sabido que hidroperóxidos de ácidos graxos, no caso linoleato, reagem com o reativo de Folin (MATSUSHITA (1969)). Talvez esse tipo de composto tenha se formado devido à agitação por duas horas

para extrair as proteínas e posteriormente precipitado por arrastamento quando da adição do TCA.

Por outro lado, substâncias fenólicas podem se ligar às proteínas por pontes de hidrogênio (LOOMIS e BATAILLE (1966) e desta maneira contribuírem para a coloração final pelo teste de Folin. A lavagem com o éter pode extrair substâncias fenólicas do grão do café (AMORIM e GUERCIO - não publicado).

A razão da diminuição do teor de proteínas solúveis medidas pelo N x 6,25, quando se lava o pó com éter, poderia residir no fato de que algum composto nitrogenado que é arrastado ou precipitado junto com as proteínas fosse solúvel no éter e removido em parte.

Além das hipóteses apresentadas para explicar o achado experimental, uma outra explicação pode ser dada: uma real extração de proteínas pelo éter poderia estar ocorrendo. SIVETZ e FOOTE (1963) mencionam que o grão do café, quando sofre extração com éter de petróleo ou hexano, perde óleos e ácidos graxos além de uma quantidade significativa de fosfoproteínas. Teste de Millon para proteínas no extrato etéreo deu positivo.

Com base nestes resultados iniciais, resolveu-se não mais tratar o pó com éter, mas tentar lavar o precipitado protéico com diversos solventes com a finalidade de extrair os interferentes.

Baseado nos trabalhos de KHANNA et al. (1959) e POTTY (1969), tentou-se remover os compostos interferentes com etanol a 80% (duas lavagens). Os resultados podem ser observados na Tabela 3-19.

Pelos resultados pode-se notar que, além dos interferentes, o etanol a 80% deve solubilizar proteínas também, como por exemplo as prolaminas (YOUNG(1963), porque na análise pelo N x 6,25 a quantidade encontrada

depois do tratamento foi bastante reduzida.

TABELA 3-19. Efeito da lavagem do precipitado proteico com etanol a 80% na determinação de proteínas solúveis pelo método de Folin-Lowry e N x 6,25.

Tratamento	Método	
	Folin-Lowry	N x 6,25
Sem tratamento	4,10	2,21
	4,60	2,61
Com etanol a 80%	2,04	1,81
	2,30	1,42

Outros tratamentos foram testados utilizando-se acetona gelada (-10°C) (LAM e SHAW (1970), etanol absoluto e TCA a 10%. Os resultados se encontram na Tabela 3-20.

Pelos resultados obtidos pode-se perceber que o etanol foi o que menores valores apresentou em relação aos dois métodos estudados. Depois, em uma posição intermediária, vem o TCA a 10% e, finalmente, a acetona gelada.

Devido ao fato de o teor de proteínas do tratamento com acetona dar os valores mais próximos aos do N x 6,25 em relação ao controle (sem tratamentos) e também valores significativamente mais baixos pelo Folin-Lowry, foi escolhido o tratamento com acetona gelada (-10°C) para continuação dos ensaios.

Dois ensaios foram montados, um com café Riado e outro café Mole. A mesma proporção de 1,0000 g de pó para cada 15 ml de tampão fosfato foi usada. Foram feitas dez repetições tanto para o método de Folin-Lowry como para o do N x 6,25, assim como para os cafés tra -

tados e não tratados com acetona. A Tabela 3-21 mostra os resultados.

TABELA 3-20. Efeito de diversos tratamentos do precipitado protéico na determinação de proteínas solúveis pelo método de Folin-Lowry e N x 6,25.

Tratamento	M é t o d o	
	Folin-Lowry	N x 6,25
Sem tratamento	5,06	3,57
	5,16	4,04
Etanol Absoluto	3,54	3,15
	3,40	3,16
TCA a 10%	3,90	3,41
	4,10	3,39
Acetona	4,20	3,62
	4,34	3,61

TABELA 3-21. Análises de proteínas solúveis precipitadas com TCA tratadas e não tratadas com acetona, e estimadas pelos métodos de Folin-Lowry e N x 6,25. (cada número representa uma média de dez repetições).

Tratamento	Café	M é t o d o s	
		Folin-Lowry	N x 6,25
Sem tratamento	Riado	3,77	3,84
Com acetona	Riado	3,53	3,62
Sem tratamento	Mole	5,19	5,04
Com acetona	Mole	4,54	4,83

Análise de variância e o teste de Tukey foram feitos para se avaliar a significância estatística das diferenças encontradas. Tanto para o café Riado como para o Mole houve dignificância estatística ao nível de 1% entre tratamentos.

Para o café Riado, o tratamento com acetona diminuiu o teor de proteína tanto para o método de Folin Lowry como para o N x 6,25. Comparando os dois métodos analíticos, não houve diferença significativa entre ambos, seja considerando o tratado ou não tratado com a acetona.

Para o café Mole, o mesmo ocorreu; o tratamen - to com acetona diminuiu o teor de proteína tanto para o método de Folin-Lowry como para o N x 6,25. Os con - trastes foram bem maiores. Por outro lado, houve dife - rença significativa quando se compararam os dois méto - dos dentro dos cafés tratados com acetona; não houve significância quando comparados sem o referido trata - mento.

A não significância estatística entre o método de Folin-Lowry e N x 6,25, exceção feita ao café Mole tratado com acetona, se por um lado é interessante , pois o ideal é obter a mesma quantidade de proteínas pelos dois métodos, por outro lado, não concorda com os resultados obtidos até agora (Ver Tabelas 3-16; 3-17; 3-18 e 3-19).

Estes resultados servem para evidenciar a ur - gência da necessidade de adaptação de um método para a determinação de proteínas em café.

A grande variação no teor de proteínas solúveis extraídas de um mesmo café tem sido observada em outros laboratórios (R.J. OLSON (1970), General Foods Corpora - tion - Comunicação Pessoal) e depende do método utili - zado. É fato sabido no laboratório do autor que amos -

tras de café muito manipuladas tornam-se esbranquiçadas e a atividade da polifenol oxidase decresce bastante. O branqueamento dos grãos de café foi bem estudado por BACCHI (1962 a e b), que elegantemente provou que a causa do branqueamento era devida à injúria mecânica e acelerado pela crescente umidade relativa do ar. Não se sabe ao certo quais os compostos químicos que sofrem transformações; devem estar relacionados direta ou indiretamente com compostos fenólicos ou inibidores da polifenol oxidase.

O café Mole que foi usado tem sido manipulado com certa frequência para a remoção de amostras para as análises químicas.

O extrato cetônico correspondente à lavagem do precipitado de TCA foi analisado cromatograficamente em papel de filtro (n-butanol-ácido acético-água; 4/1/2,2; v/v/v) e constatou-se a presença de grande quantidade de óleos, assim como de ácido clorogênico, isoclorogênico, cafeína e quatro aminoácidos (Rfs: 0,28; 0,33; 0,36; 0,49). Para o método de N x 6,25, os aminoácidos e a cafeína são interferentes e, para o método de Folin-Lowry, os ácidos clorogênicos, talvez os aminoácidos e os óleos, o são. Portanto a lavagem com acetona é vantajosa para qualquer um dos dois métodos utilizados.

A determinação de proteínas solúveis do café exige precipitação do extrato aquoso por um agente precipitante e lavagem do precipitado. Determinações de nitrogênio total no extrato aquoso antes da precipitação com TCA revelaram valores de 8 a 9% de proteínas, o que deve corresponder a um artifício. (J.C. OLIVEIRA (1972) comunicação pessoal).

Embora o TCA precipite a grande maioria das proteínas, existe a possibilidade de proteínas formarem complexos com polissacarídeos e tornarem-se solú-

veis em TCA (WOODSIDE et al (1965).

Por outro lado, como já foi mencionado, no precipitado do TCA foi detectado carboidrato que, pela sua insolubilidade em acetona, provavelmente seja polisacarídeo. Fato idêntico ocorreu com CLEMENTS e DEATHERAGE (1957). WOLFROM et al (1960), analisando polisacarídeos do café, observaram que suas preparações davam reações positivas com ninhidrina e mais tarde WOLFROM e PATIN (1955) determinaram 0,17% de N nas arabinogalactanas.

SHADAKSHARASWAMY e RAMACHANDRA (1967) encontraram 3,3% de N (predominantemente não amínico) em polisacarídeos de café arábica e 2,6% de N em polissacarídeos de robusta.

Amínico ou não amínico, esse nitrogênio de polissacarídeo entra na determinação do N total. Não existe possibilidade de separar esse polissacarídeo das proteínas por um processo rápido, constituindo este interferente para o método de N x 6,25 mais um problema a ser resolvido, o que não se mostra muito provável de ser feito em futuro próximo, com as atuais técnicas.

3.1.4. Eletroforese de proteínas solúveis

Com base nas revisões feitas por MORRIS e MORRIS (1963) e MICHL (1967), tentou-se verificar se existia alguma diferença entre as proteínas solúveis (albuminas) em tampão fosfato 0,05 M de diferentes cafés quanto ao seu caminamento eletroforético no agar.

Primeiramente vários ensaios foram feitos para escolher a melhor porcentagem de agar. Entre 0,5, 1,0 e 1,5%, a que melhor resultado forneceu foi a concentração de 1,0%. Meio por cento ficava muito mole e dificultava demais a manipulação. Não deu melhor separação que 1,0%. Um e meio por cento também não deu-

melhor separação que 1,0%; além disso, o gel quebra - va-se facilmente e as proteínas caminhavam pouco.

Tomando-se café da melhor e pior qualidade quanto à prova de xícara, montou-se um ensaio com o objetivo de se estudar o melhor pH para remoção das proteínas e o melhor pH para correr, no sentido de per_{mitir} maior diferenciação.

O pH do gel-agar era sempre o pH das soluções tampões para o desenvolvimento da eletroforese.

Correram-se as proteínas no gel-agar em pH 6,0, 7,0 e 8,0 com proteínas extraídas em pH 6,0, 7,0 e 8,0. Portanto proteínas extraídas em pH 6,0 eram cor_{ridas} em pH 6,0, 7,0 e 8,0 e assim por diante.

As maiores diferenças entre caminamento de proteínas e qualidade da bebida verificaram-se quando se extraíam as proteínas com tampão fosfato no pH 7,0 e corriam-se também no pH 7,0. Geralmente as proteínas dos piores cafés corriam muito pouco em direção ao polo positivo ou na maioria dos cafés se dirigiam para o polo negativo. As proteínas dos melhores geralmente se dirigiam para o polo positivo e caminhavam mais do que os dos cafés de péssima qualidade.

Devido a estes resultados resolveu-se utilizar o pH 7,0 para extração e desenvolvimento das 24 amostras.

3.2. Dados experimentais

3.2.1. Análise química e qualidade da bebida

3.2.1.1. Carboidratos

Os carboidratos livres totais solúveis em etanol a 80%, os açúcares redutores e os polissacarídeos solúveis em oxalato de amônio a 0,5% parecem não ter relação com as qualidades das bebidas produzidas por-

uma mesma variedade de café. Pelo menos é o que mostram os resultados obtidos no presente trabalho.

Na Tabela 3-22 pode-se observar as médias dos 6 cafés de cada qualidade analisados para carboidratos livres totais, com os respectivos valores limites dentro de cada qualidade. A análise de variância e d.m.s. a 5% também são apresentadas.

TABELA 3-22. Carboidratos livres totais solúveis em etanol a 80% do grão de café verde expressos em porcentagem em relação ao material seco, segundo a qualidade de bebida (cada valor numérico é a média de 18 determinações de 6 amostras diferentes com a mesma qualidade de bebida).

Qualidade de bebida	Carboidratos livres totais %	Valores limites %
Mole	10,96	9,86 - 12,66
Duro	10,51	9,96 - 10,84
Riado	10,81	8,20 - 13,04
Rio	10,06	8,85 - 11,11

d.m.s. 5% = 1,08

Como pode ser visto na discussão sobre a metodologia da análise dos carboidratos, o carboidrato que está em maior quantidade nas porcentagens mostradas na Tabela 3-22 é a sacarose (superior a 50%). Os dados da literatura mostram variações bem grandes, de 1,9 a 10%. FELDMAN et al (1969) dá para o café "Santos" uma "média" de 5,47% e para o Colombiano, 4,59% de sacarose. O mesmo autor fornece também uma média-

geral para sacarose, que se presume incluir cafés ro-
busta também, de 7,3%.

WOLFROM et al. (1960) fornecem para sacarose um valor para o café "Santos" de 5,5%, bem parecido com os resultados de FELDMAN et al (1969).

Por outro lado, LUCKHART (1957) dá valores que vão de 5 a 10% de sacarose e 0 a 5% de açúcares redutores. NAVELLIER (1970) aponta em média, entre sacarose mais açúcares redutores, 8%.

Os resultados encontrados neste trabalho não estão muito fora dos encontrados na literatura, pois os carboidratos livres totais englobam a sacarose, açúcares redutores e provavelmente alguma pectina, amido ou outro polissacarídeo que foram extraídos por arrasto.

Em relação à qualidade da bebida, nada foi encontrado na literatura que relacionasse carboidratos com a mesma. Existe um autor que acha até mesmo que os carboidratos não interferem na qualidade do café e nem fazem parte de precursores do aroma (NAVELLIER (1970)).

A Tabela 3-23 mostra os resultados em relação aos açúcares redutores. Os resultados apresentados neste trabalho coincidem com os dados mais recentes encontrados na literatura.

FELDMAN et al. (1969) dá uma média de 0,7% em açúcares redutores enquanto que KROPLIEN (1971) observou teores variando de 0,02 a 0,4%. NAVELLIER (1970) e SIVETZ e FOOTE (1963) dão valores ao redor de 1%. Nenhum dado da literatura consultada faz relação dos teores em açúcar redutor com a qualidade da bebida.

Os resultados apresentados neste trabalho evidenciam que a qualidade do café parece não estar relada

cionada com a porcentagem de açúcares redutores, apesar do Café Duro apresentar valor mais alto e quase no limite de significância a 5%.

TABELA 3-23. Açúcares redutores do grão de café verde, expressos em porcentagem em relação ao material seco, segundo a qualidade de bebida (cada valor numérico é a média de 18 determinações de 6 amostras diferentes com a mesma qualidade de bebida).

Qualidade de bebida	Açúcares redutores %	Valores limites %
Mole	0,82	0,70 - 1,04
Duro	0,96	0,81 - 1,48
Riado	0,85	0,76 - 1,08
Rio	0,83	0,77 - 0,96

d.m.s. 5% = 0,15

A análise de polissacarídeos foi feita somente para os 3 melhores cafés (Mole) e os 3 piores (Rio). Os resultados encontram-se na Tabela 3-24.

A diferença entre os dois cafés estudados não alcançou significância estatística; portanto pelo menos os polissacarídeos totais solúveis em oxalato de amônio a 0,5% parecem não guardar relação com a qualidade da bebida.

SHADAKSHARASWAMY e RAMACHANDRA (1968) encontraram em C. arabica cerca de 0,9% de um polissacarídeo extraído com ácido clorídrico 2 N, e 1,5% em C. robusta.

Por outro lado, COURTOIS et al. (1963), em C.

Canephora, encontraram 2,52% de polissacarídeos solúveis em água fria e 4,305% solúveis em água em ebulição.

TABELA 3-24. Polissacarídeos solúveis em oxalato de amônio a 0,5% do grão de café verde, expressos em porcentagem em relação ao material seco (cada valor numérico representa a média de 6 determinações de 3 amostras diferentes com a mesma qualidade de bebida).

Qualidade de bebida	Polissacarídeos %	Valores limites %
Mole	1,48	1,44 - 1,56
Rio	1,42	1,21 - 1,58

d.m.s. 5% = 0,20

WOLFROM et al. (1960) encontraram 3,5% de polissacarídeos solúveis em água, precipitado com etanol a 70% e sem lavagem do precipitado. O autor aponta ainda que junto com esse precipitado de polissacarídeos encontrava-se uma quantidade desconhecida de proteínas. No atual trabalho não se fez hidrólise do polissacarídeo para verificar sua composição; portanto não se pode comparar com os dados da literatura em termos qualitativos.

Os carboidratos, de um modo geral, se contribuem para o gosto e aroma do café, o fazem de uma maneira uniforme, não influenciando em suas variações dentro da classificação por qualidade da bebida adotada no Brasil. Isso é o que demonstram os presentes dados e os da literatura.

3.2.1.2. Compostos fenólicos

Os resultados deste trabalho mostram uma diferença significativa no teor de ácido clorogênico total entre os cafés estudados. Pode-se observar esta diferença na Tabela 3-25.

O teste F mostrou uma diferença significativa ao nível de 1%. Pelo teste de Tukey, não houve diferença entre os cafés Duro, Riado e Rio, mas os três foram diferentes do Mole.

TABELA 3-25. Ácido clorogênico total do grão de café verde, expresso em porcentagem em relação ao material seco, segundo a qualidade da bebida (cada valor numérico representa a média de 18 determinações de 6 amostras diferentes com a mesma qualidade de bebida).

Qualidade de bebida	Ácido clorogênico %	Valores limites %
Mole	6,94	6,12 - 7,63
Duro	7,59	6,95 - 8,33
Riado	7,38	7,01 - 7,91
Rio	7,42	6,97 - 7,66

d.m.s. 5% = 0,37

A Tabela 3-26 mostra os teores dos ácidos iso-clorogênicos, neoclorogênico nos três melhores e nos três piores cafés.

O teste F não revelou significância estatística para nenhum dos ácidos fenólicos apresentados na Tabela 3-26.

TABELA 3-26. Ácidos isoclorogênicos, ácido neoclorogênico do grão de café verde, expressos em porcentagem em relação ao material seco segundo a qualidade de bebida. (cada valor numérico é a média de 9 determinações de 3 amostras diferentes da mesma qualidade de bebida).

(VIDE ERRATA)

Composto fenólico	Qualidade de bebida	%	Valores limites %	d.m.s. 5%
Ácido iso-clorogênicoII + ác.cafêico	Mole	0,73	0,61 - 0,79	0,13
	Rio	0,86	0,73 - 0,84	
Ácido isoclo-gênico I	Mole	1,04	0,94 - 1,01	0,12
	Rio	0,95	0,81 - 0,95	
Ácido neoclo-gênico	Mole	0,83	0,69 - 0,81	0,16
	Rio	0,83	0,61 - 0,95	

Dos compostos fenólicos encontrados no grão do café, o ácido clorogênico é o que se apresenta em maior quantidade. Além disso, na torração do café, uma boa parte do ácido clorogênico é decomposta (LENTNER e DEATHERAGE (1959) e FELDMAN et al. (1969), e alguns compostos formados pela sua decomposição já foram identificados no aroma do café (SMITH (1963)).

A simples detecção de compostos provenientes do ácido clorogênico no aroma do café não implica que este ácido seja importante para o gosto e aroma do mesmo, mas a probabilidade de ser pelo menos um pequeno contribuinte é grande.

A interessante observação feita por SMITH (1963) no Primeiro Colóquio Internacional sobre Química de Café mostra claramente que a relação entre clorogenato de cafeína e potássio, e clorogenato de potássio é bem maior nos cafés robusta que nos arábica. Sabe-se, por outro lado, que o café arábica tem melhor mercado e é mais apreciado pelo seu aroma que o robusta.

NORTHMORE (1967), alguns anos mais tarde, observou que a coloração verde azulada, que é característica dos bons cafés de Quênia, estava relacionada com o teor de clorogenato de magnésio. Quanto maior o teor, melhor era o café. NORTHMORE (1967) não calculou as relações que SMITH (1963) calculou; por esta razão, não se podem comparar os dois trabalhos.

GIBSON (1971a e 1971b) recentemente isolou Kahweol e seus ésteres e os responsabilizou pela coloração verde azulada dos cafés de Quênia. Provavelmente a coloração do grão do café não seja dada somente por uma classe de compostos.

Já é fato bem conhecido que o café robusta possui um teor mais alto de ácido clorogênico do que os arábicas (SMITH (1963), VILLAR e FERREIRA (1971), mas este alto teor até hoje não pôde ser correlacionado de uma maneira consistente com uma bebida de qualidade inferior. Entretanto, FELDMAN et al. (1969), sem especificar se é uma média de várias amostras ou uma simples análise de uma amostra, encontraram para o café tipo "Santos" 5,56% de ácido clorogênico (3-cafeoilquinico) e para o Colombiano 3,77%. Sabe-se que o café Colombiano é mais suave por ser despulpado, e alcança preços mais elevados no mercado.

VILLAR e FERREIRA (1971), analisando apenas uma amostra de cada padrão de bebida de cafés brasilei

ros encontraram as seguintes quantidades de ácido clorogênico total: Mole 7,60%; Apenas Mole 7,51%; Duro 7,91%; Riado 8,09% e Rio 7,64%.

Os valores do Mole e Apenas Mole são mais baixos que o do Duro e Riado, mas não diferem do Rio. Até certo ponto os dados são concordantes com os do presente trabalho; há discordância para o café Rio.

O único trabalho, feito com o objetivo de se estudarem as variações do ácido clorogênico total em relação ao processamento do café (via úmida e seca) encontrado na literatura, foi o do grupo CHASSEVENT et al. (1969) que trabalharam com café robusta e não encontraram diferença significativa no teor de ácido clorogênico nos cafés tratados pelos dois processos, embora o café processado por via seca tenha dado pior bebida (significante estatisticamente).

KRUG (1940a,b e c) correlacionou infestação de fungos e bactérias com a bebida Dura, Riada e Rio. Quanto maior a porcentagem de microorganismos, principalmente Fusarium sp., pior era a bebida. Sabe-se, por outro lado, que injúrias mecânicas e químicas causadas por microorganismos afetam o metabolismo das plantas, fazendo com que as mesmas produzam uma quantidade maior de substâncias fenólicas (URITANI (1961) e KUC (1964). No caso do café, onde o ácido clorogênico é o fenol mais abundante, seria de se esperar que o teor de ácido clorogênico fosse elevado pelo ataque de microorganismos; os resultados deste trabalho parecem confirmar esta hipótese (AMORIM et al.(1967) e AMORIM, 1970.

Como se pode observar pela literatura, os dados são bastante conflitantes; se fossem tomados somente os dados relativos ao café arábica, parece haver uma certa concordância entre os trabalhos de FELDMAN-

et al. (1969); VILAR e FERREIRA (1971) em parte, e os resultados deste trabalho. Um menor teor de ácido clorogênico tem sido encontrado nos melhores cafés.

Os fenóis totais solúveis em metanol a 80% encontram-se na Tabela 3-27.

TABELA 3-27. Compostos fenólicos totais (em % de ácido clorogênico), solúveis em metanol a 80%, do grão de café verde, expressos em relação ao material seco segundo a qualidade de bebida. (cada valor numérico representa a média de 12 determinações de 6 amostras diferentes de um mesmo padrão de bebida).

Qualidade de bebida	Fenóis totais em metanol %	Valores limites %
Mole	7,95	7,20 - 8,63
Duro	8,26	7,31 - 9,04
Riado	8,02	7,23 - 8,83
Rio	8,07	7,31 - 8,97

d.m.s. 5% = 0,72

O teste F da análise de variância não revelou significância para a análise dos fenóis totais solúveis em metanol como também para os fenóis totais solúveis em água. Tabela 3-28.

Os resultados obtidos por GOLDSTEIN e SWAIN (1963) sobre a relação entre a polimerização de substâncias fenólicas com o amadurecimento de diversos frutos parecem não se adaptar ao presente caso. As investigações de BHATIA e ULLAH (1965) em chá e FORSYTH et al. (1958) em cacau, que observaram uma diminuição em fenóis solúveis com o tempo de fermentação,

também não podem ser comparadas ao presente caso, embora o café Duro, Riado e Rio sejam provenientes de fermentações indesejáveis (KRUG (1940 a, b, c 1947)).

TABELA 3-28. Compostos fenólicos totais (em % ácido clorogênico) solúveis em água do grão do café verde, expressos em relação ao material seco segundo a qualidade de bebida. (cada valor numérico representa a média de 12 determinações de 6 amostras diferentes de um mesmo padrão de bebida).

Qualidade de bebida	Fenóis totais em água %	Valores limites %
Mole	8,06	6,90 - 9,09
Duro	7,92	7,30 - 8,69
Riado	7,93	7,30 - 9,24
Rio	8,08	7,26 - 8,76

d.m.s. 5% = 0,81

A não concordância com a hipótese lançada na introdução desse trabalho, e que foi baseada nos trabalhos acima citados, pode ser devida ao fato de os fenóis do café não serem os mesmos da folha do chá e da semente do cacau; portanto, ou os fenóis do café não se polimerizam com a fermentação, ou se polimerizam e os produtos formados têm uma solubilidade diferente daqueles. A última sugestão parece ser mais correta, pois os trabalhos de PIERPOINT (1969a e 1969b) sugerem que o ácido clorogênico e cafêico, além de formarem polímeros quando oxidados enzimaticamente, reagem com aminoácidos livres e com aminoácidos ligados a proteínas.

Investigações dos compostos fenólicos do café solúveis em água e álcool e posteriormente hidrolisados talvez lancem alguma luz sobre o assunto.

3.2.1.3. Nitrogênio e proteínas solúveis.

O teor de nitrogênio total encontra-se na Tabela 3-29.

O Teste F da análise de variância não revelou significância para o teor de nitrogênio total em relação à qualidade da bebida.

TABELA 3-29. Nitrogênio total do grão de café verde, expresso em relação ao material seco, segundo a qualidade de bebida. (cada valor numérico representa a média de 18 determinações de 6 amostras diferentes de cada padrão de bebida).

Qualidade de bebida	Nitrogênio total %	Valores limites %
Mole	2,55	2,24 - 2,77
Duro	2,66	2,40 - 2,82
Riado	2,62	2,32 - 2,73
Rio	2,55	2,31 - 2,78

d.m.s. 5% = 0,15

As quantidades de proteínas solúveis extraíveis com tampão fosfato pH 7,0 0,01 M encontram-se na Tabela 3-30.

O teste F da análise de variância também não revelou significância, embora o café Rio tenha revelado um valor inferior aos outros estudados.

TABELA 3-30. Proteínas do grão de café verde, solúveis em tampão fosfato pH 7,0, 0,01 M e precipitadas com TCA, expressas em porcentagem em relação ao material seco, segundo a qualidade de bebida (cada valor numérico representa a média de 18 determinações de 6 amostras diferentes de cada padrão de bebida).

Qualidade de bebida	Proteínas solúveis		Valores limites
	tampão	%	
Mole	3,78		3,25 - 4,38
Duro	3,77		3,16 - 4,22
Riado	3,77		3,08 - 4,12
Rio	3,45		2,96 - 4,30

d.m.s. 5% = 0,42

As proteínas solúveis em NaCl a 10%, pH 6,5, extraídas de café verde, encontram-se na Tabela 3-31.

O teste F da análise de variância indicou uma significância ao nível de 5% para as proteínas solúveis em NaCl a 10%, ou globulinas.

Em relação aos valores médios encontrados, os teores de albuminas e globulinas do presente trabalho não se situam fora dos dois valores encontrados na literatura. UNDERWOOD e DEATHERAGE (1952) encontraram 2,76% e BOMER et al. (1934), citados por CENTI-GROSSI et al. (1969), cerca de 2,5%. O teor médio um pouco mais elevado encontrado neste trabalho pode ter sido devido à extração mais prolongada (2 horas) do que a efetuada por UNDERWOOD e DEATHERAGE (1952), que foi de alguns minutos.

TABELA 3-31. Proteínas do grão do café verde, solúveis em NaCl a 10%, pH 6,5 e precipitadas com TCA, expressas em porcentagem em relação ao material seco, segundo a qualidade de bebida (cada valor numérico representa a média de 18 determinações de 6 amostras diferentes de cada padrão de bebida).

Qualidade de bebida	Proteínas solúveis NaCl %	Valores limites %
Mole	3,51	2,98 - 4,29
Duro	3,76	3,05 - 4,33
Riado	3,51	2,88 - 3,92
Rio	3,24	2,72 - 3,84

d.m.s. 5% = 0,40

O teste F da análise de variância indicou uma significância ao nível de 5% para as proteínas solúveis em NaCl a 10%, pH 6,5 (globulinas). Pelo teste de Tukey houve diferença significativa de 5% entre o café Rio e o Duro. O Mole e o Riado não diferiram nem do Rio e nem do Duro e se situaram entre os dois.

A hipótese de AMORIM e SILVA (1968) sobre a possível inibição da polifenol oxidase por quinonas formadas pela oxidação dos compostos fenólicos do café não tem muita sustentação pelos dados aqui obtidos. A insolubilização de proteínas no café, causada por fermentações ou outros fatores, parece não seguir o mesmo processo do cacau (FORSYTH et al. (1958) e do chá (BHATIA e ULLAH (1965)); os resultados obtidos neste trabalho, em relação aos fenóis solúveis em água e

em metanol, parecem indicar que estes fenóis não são os causadores da insolubilização de proteínas dentro do grão ("in vivo").

Trabalho mais recente sobre fermentação do cacau mostra elegantemente que o ácido acético é o principal agente causador da morte da semente (QUESNEL (1965). Este, por sua vez, poderia ser o agente precipitante das proteínas, juntamente com os compostos fenólicos.

Paralelamente, RODRIGUEZ et al. (1969) observaram um grande aumento na produção de aldeído acético em cafés despulpados de prolongada fermentação, e SANINT e VALÊNCIA (1970) encontraram uma baixa atividade da polifenol oxidase nos cafés despulpados que passaram por uma fermentação superior a 24 horas. É improvável que o aldeído acético tenha sido o agente precipitante de proteínas, pois é bem volátil (ponto de ebulição é de 20°C) e, devido às temperaturas elevadas das fermentações, logo se desprenderia do meio.

É difícil encontrar uma explicação razoável para o achado experimental deste trabalho, baseando-se nos resultados aqui encontrados e os da literatura. A literatura sobre proteínas de café é quase inexistente, e os resultados aqui relatados não revelam um quadro claro do problema.

Devido aos teores altos de proteínas (11 a - 15% da matéria seca) e compostos fenólicos (7 - 10% da matéria seca) encontrados no grão de café, à imensa literatura sobre interação fenol-proteína em plantas (LOOMIS e BATAILLE (1966), à falta de uma prova de que algum fator seja o causador da insolubilização das proteínas no pior café, é de bom senso aguardar futuras investigações para se terem mais dados à mão a fim de se comprovar se são os fenóis os causadores

do menor teor de proteínas solúveis encontrado nos piores cafés.

Os ácidos clorogênicos são solúveis na água e no éter; há, portanto, uma faixa de solubilidade bastante ampla. Por outro lado, é sabido que os fenóis combinam-se reversivelmente com as proteínas por pontes de hidrogênio (LOOMIS e BATTLE (1966); é, portanto, possível que tanto a água como o metanol a 80% removam a maioria dos fenóis ligados ou não às proteínas; é isso o que parecem demonstrar os dados da TABELA 3-27 e 3-28: Os teores de fenóis totais são praticamente os mesmos independente do solvente usado ou da qualidade da bebida do café. A descoberta de um solvente que extraia somente os fenóis livres talvez pudesse esclarecer este ponto obscuro, ou também, o estudo de fenóis hidrolisados pudesse modificar o atual quadro da situação.

3.2.1.4. Eletroforese de Proteínas

Os resultados com a eletroforese em gel-agar das proteínas (principalmente albuminas) mostraram diferenças significativas entre os cafés estudados. A Tabela 3-32 mostra os resultados numéricos, e a Figura 3-4, o comportamento das proteínas no gel-agar.

O teste F revelou significância ao nível de 1% entre o comportamento eletroforético das proteínas, segundo a qualidade da bebida do café.

Pelo teste de Tukey, a diferença mínima ao nível de 5% foi de 9,87; portanto o café Mole foi diferente do Duro e do Rio, não alcançando diferença significativa em relação ao Riado.

Embora a diferença entre o café Mole e Riado não tenha sido significativa, pode-se notar uma tendência linear entre café Mole e Rio, com exclusão do

café Duro.

TABELA 3-32. Distância (mm) percorrida pelas proteínas do café verde, solúveis em solução tampão fosfato pH 7,0, 0,05 M e corridas em gel-agar (mesmo tampão de extração) por 24 horas (20 mA, 60 volts) e tingidas com amido black 10b. O sinal + ou - significa que a somatória das distâncias percorridas pelas proteínas era em direção ao polo positivo ou negativo, respectivamente.

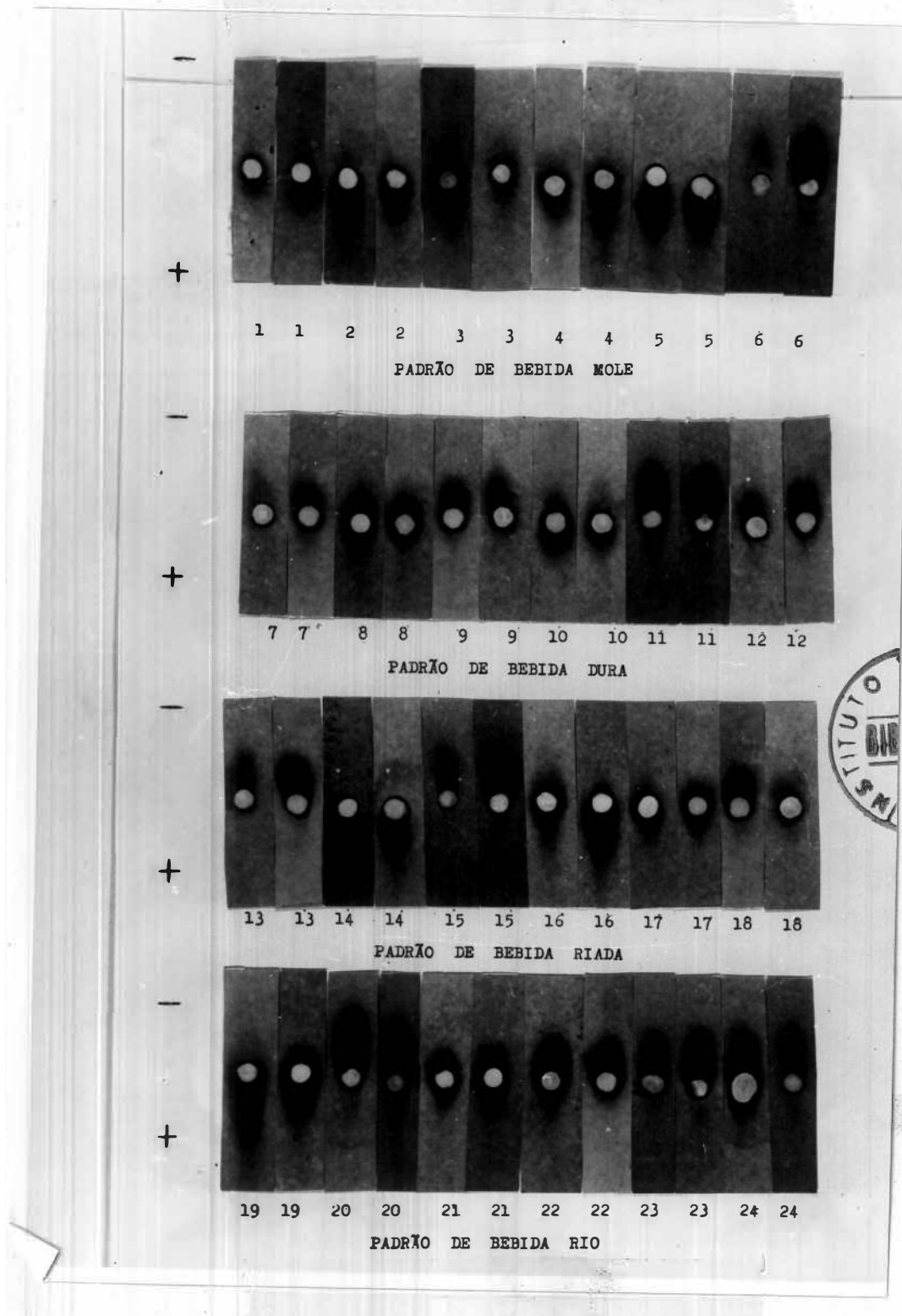
Qualidade de bebida	Distância (mm) percorrida pelas proteínas: (+) polo positivo e (-) polo negativo
Mole	5,50
Duro	- 5,83
Riado	- 1,33
Rio	- 7,16

d.m.s. 5% = 9,87

O café Duro é um problema para os provadores de café, pois este café é caracterizado por uma adstringência não encontrada nos cafés Moles. Existem cafés, no entanto, que não possuem essa adstringência, não possuem a suavidade do Mole e ~~men~~ podem ser classificados como Riado ou Rio porque também não têm cheiro e gosto característico do Rio; neste caso, os provadores classificam este café como Duro, pois na escala de valores é intermediário (A.A. TEIXEIRA, comunicação pessoal).

Este problema pode residir na diversidade de tipos de grãos que podem dar este gosto. Uns admitem o ataque de fungos (KRUG (1940a,b e c), outros os -

FIGURA 3-4. Comportamento eletroforético em gel-agar das proteínas provenientes das 24 amostras segundo a qualidade da bebida.



grãos verdes, ardidos e prêtos (GRANER e GODOY (1959) GARRUTI e GOMES (1961) e TEIXEIRA E PIMENTEL GOMES - (1970), e ainda outros, a temperatura de secagem (FERRAZ e VEIGA (1954).

Baseados nos trabalhos de AMORIM e SILVA (1968b) ROEMBERG e IACHAN (1970) e SANINT e VALENCIA (1970), os quais encontraram uma correlação positiva entre a atividade da polifenol oxidase e a qualidade da bebida do café, alguns ensaios em eletroforese em gel-agar com proteínas foram feitos, com o objetivo de elucidar o diferente comportamento das proteínas dos bons cafés em relação aos que dão uma péssima bebida.

As revisões efetuadas por MASON (1955), BOUCHILLOUX (1962) e CORSE (1964) sobre polifenol oxidase, e mais recentemente a discussão sobre o mecanismo de ação desta enzima feita por MARMSTROM e RYDÉN (1968) mostram claramente a complexidade das reações primárias e secundárias quando em um meio estão presentes as enzimas e os substratos, que são os compostos fenólicos. Todavia, até hoje, o mecanismo de reação da polifenol oxidase não foi esclarecido totalmente e uma série de resultados conflitantes são encontrados na literatura (MALMSTROM e RYDÉN (1968).

Por outro lado, FORSYTH (1964) chama a atenção para a importância da oxidação dos polifenóis do cacau e do chá durante a fermentação e seu efeito na qualidade do produto. A oxidação dos fenóis com posterior polimerização e precipitação das proteínas solúveis é evidente.

Os problemas causados pelos fenóis na extração e purificação de proteínas, principalmente as enzimas, têm sido alvo de numerosos trabalhos nesta última década. (Ver JONES et al. (1965), LOMIS e BAT-

TAILE (1966) e LAM e SHAW (1970).

As proteínas podem se combinar com os fenóis, reversivelmente, por pontes de hidrogênio (LOOMIS e BATAILLE (1966) ou irreversivelmente por oxidação e posteriores condensações covalentes (WOOD e INGRAHAM (1965).

Devido à grande quantidade de substâncias fenólicas encontradas no grão do café, a extração de proteínas e principalmente de enzimas sofre interferências bastante grandes. A oxidação de fenóis na extração aquosas é muito mais intensa nos cafés de boa qualidade (Mole) do que nos de má (Rio); este fato é devido a maior atividade aparente da polifenol oxidase encontrada nos melhores cafés.

A oxidação do ácido clorogênico e cafêico por extratos aquosos de plantas, que geralmente possuem polifenol oxidase, transforma-os em clorogenoquinonas e cafeoquinonas (PIERPOINT (1969a), que reagem facilmente com uma série de aminoácidos. Com exceção da lisina e da cisteína, a maioria dos aminoácidos reage primeiramente com o seu grupo α -amino, reação esta, que compete com a polimerização das quinonas, seguida ainda de outras reações secundárias que consomem oxigênio. A cisteína reage com as quinonas pelo seu grupo tiol (PIERPOINT, (1969a). PIERPOINT (1969b) ainda mostra como estas quinonas reagem com proteínas (serum de albuminas de boi) e alguns fatores que influenciam nestas reações.

Devido ao fato de os melhores cafés apresentarem uma maior atividade da polifenol oxidase (AKORIM e SILVA (1968), ROTENBERG e IACHAN (1970) e SANNINT e VALÈNCIA (1970), uma maior oxidação dos fenóis deve correr na extração de proteínas destes cafés e conseqüentemente um maior número de quinonas deve re-

agir com as proteínas alterando-lhes a carga elétrica. PIERPOINT (1969b) mostra que há um consumo de oxigênio nestas reações; há, portanto, uma maior probabilidade de se formarem compostos de carga negativa, tendo assim (dependendo do pH) um caminhamento para o polo positivo no gel-agar. JONES e LYTTLETON (1972) recentemente observaram que, com a inativação da polifenol oxidase por dietilditilcarbamato de sódio, a fração 1 de proteínas de folhas se separava em duas outras que corriam menos na eletroforese de gel de poliacrilamida. Os autores sugerem que os produtos oxidados pela polifenol oxidase modificam as proteínas da fração 1, aumentando a sua mobilidade eletroforética.

Tomaram-se dois cafés, um Mole e outro Rio, para se estudar o comportamento das proteínas solúveis com diversos tratamentos, com o objetivo de averiguar as interações dos fenóis com as proteínas.

Primeiramente os cafés foram extraídos com tampão fosfato, pH 7,0 e posteriormente foi adicionado ácido ascórbico, redutor universalmente usado e polivinilpirrolidone (PVP) em sua forma solúvel.

Os resultados podem ser vistos na Figura 3-5.

Pelos resultados da Figura 3-5 pode-se observar que o pH da extração não afetou muito a distribuição das proteínas no gel; o ácido ascórbico a 0,25% pH 6,0 não foi suficiente para mudar o caminhamento das proteínas do café Mole, mas o foi para o café Rio. É evidente a mudança de cargas das proteínas que foram tratadas com PVP solúvel (0,5%).

Outros redutores e a forma insolúvel do PVP também foram testados. A Figura 3-6 mostra os resultados.

Pelos resultados da Figura 3-6 vê-se que os

FIGURA 3-5. Comportamento eletroforético em gel-agar de proteínas de café Mole e Rio, utilizando-se diferentes tratamentos do extrato. Corrida no pH 7,0, tampão fosfato 0,05 M. (Controle significa extração em tampão fosfato pH 7,0, portanto sem tratamento).

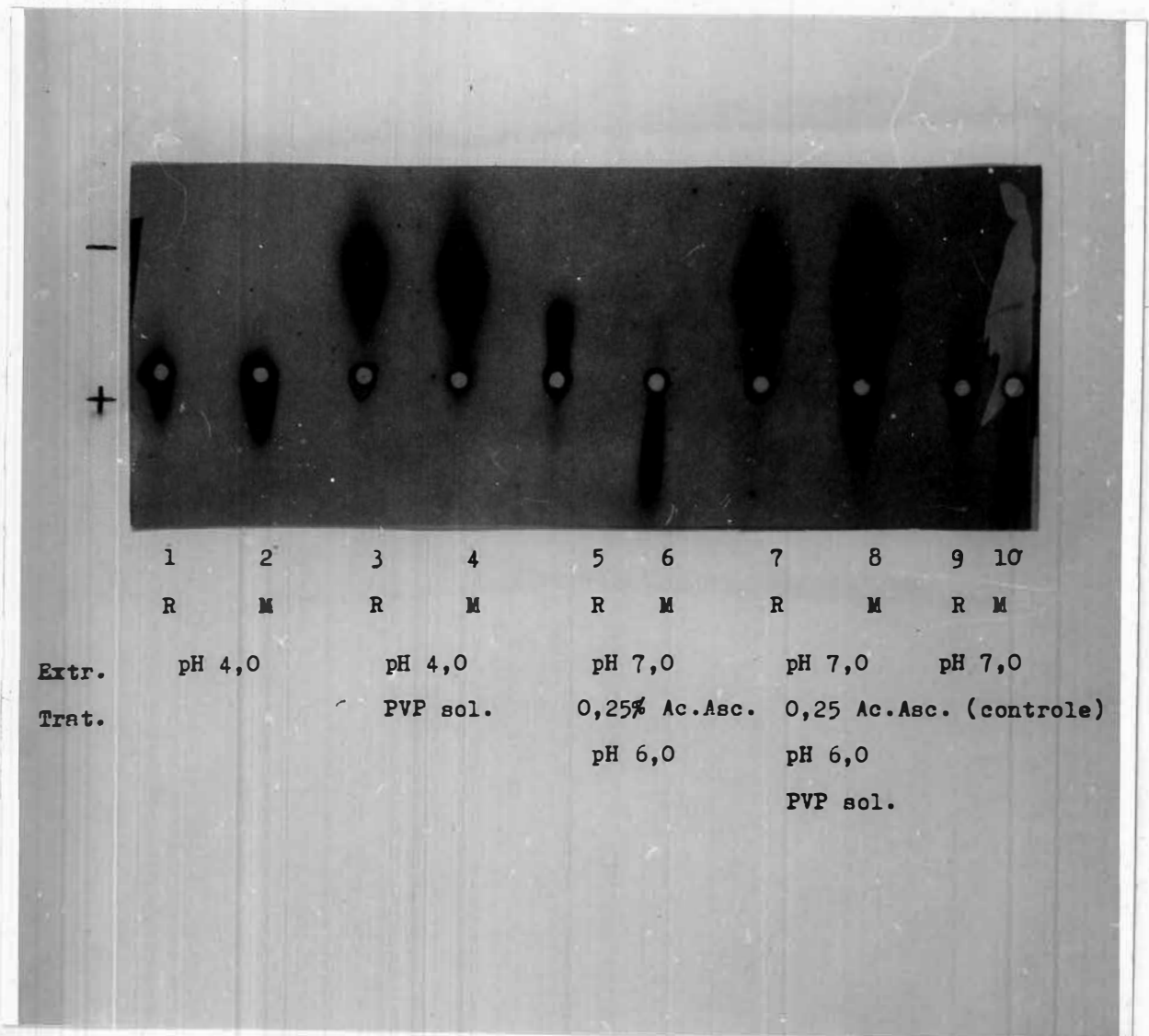
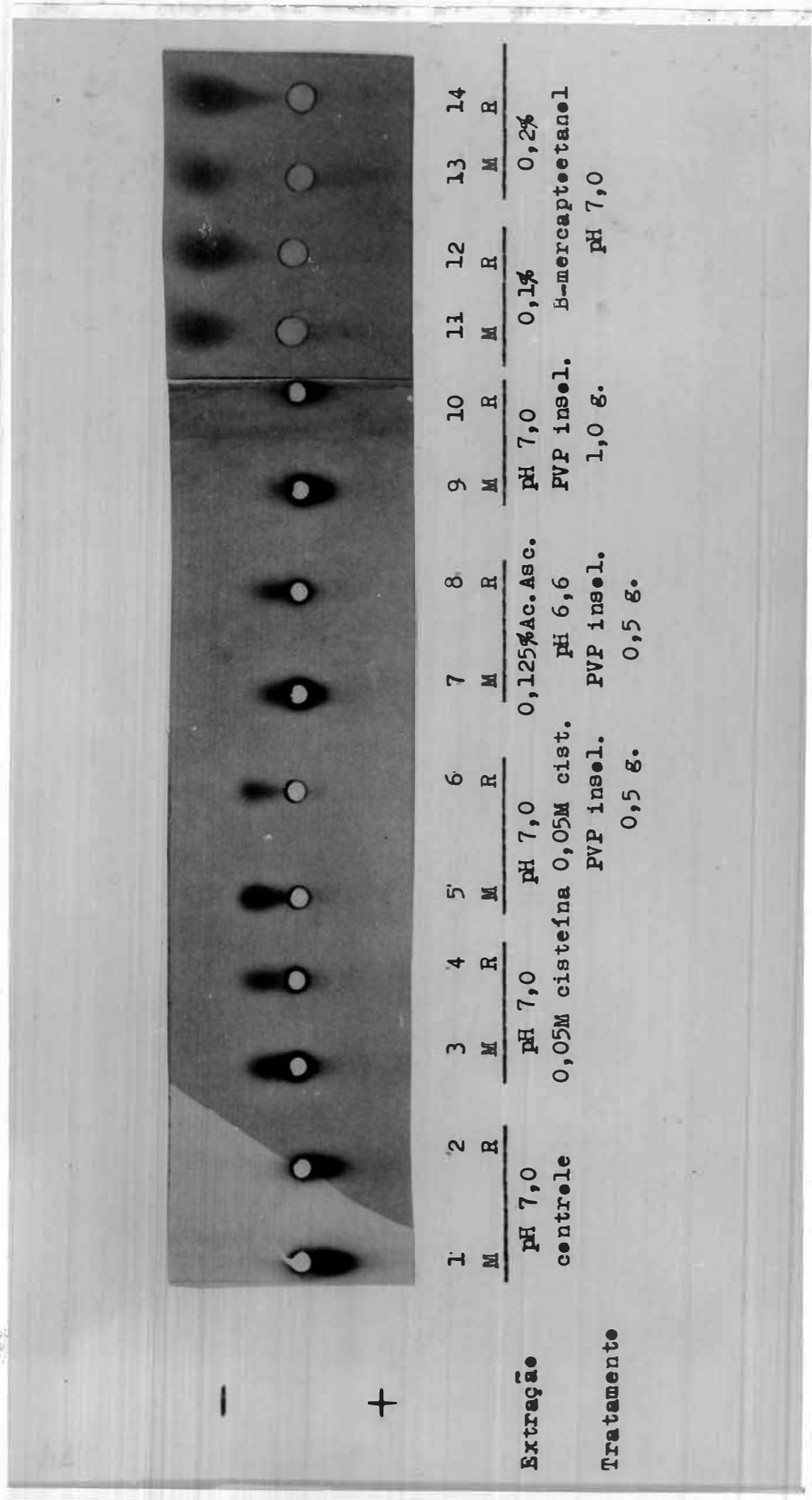


FIGURA 3-6. Comportamento eletroforético em gel-agar de proteínas de café Mole e Rio, utilizando-se diferentes tratamentos do extrato. Corrida no tampão fosfato pH 7,0 0,05 M.



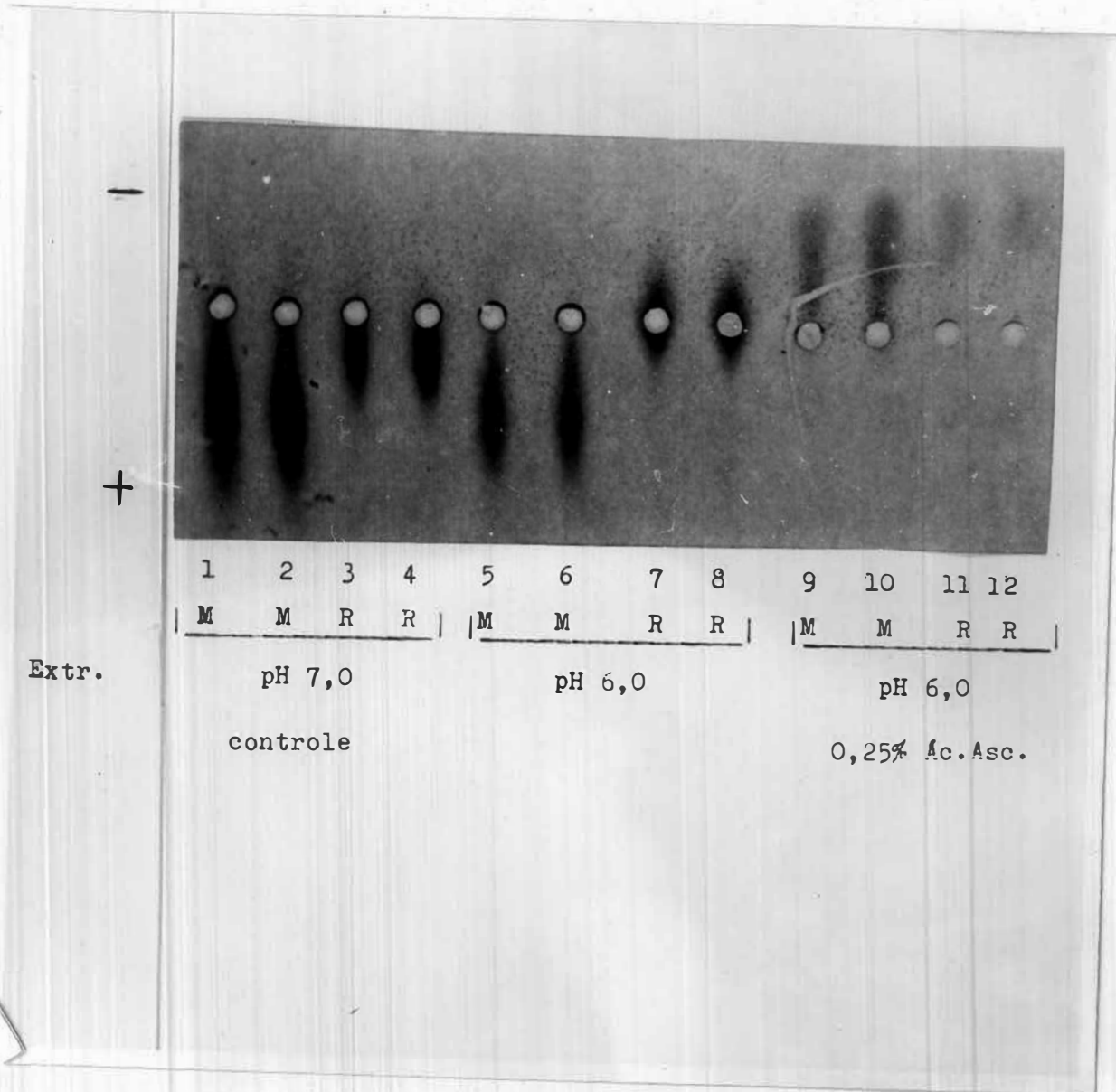
compostos redutores utilizados na extração reduzem as quinonas formadas e parecem inibir os compostos que devem atuar nas proteínas mudando-lhes a carga elétrica.

É interessante notar que o tratamento com PVP insolúvel do sobrenadante do extrato extraído com cisteína removeu os pigmentos amarelados que aparecem quando não se tratou com PVP. A utilização do 2-mercaptoetanol a 0,1 e 0,2% parece reduzir a interação das proteínas com os fenóis e produtos de oxidação. O PVP insolúvel (Policlar AT) parece não exercer efeito algum quando adicionado depois da extração e até mesmo durante a extração. ANDERSEN e SOWERS (1968) demonstraram que o melhor pH para a ligação do ácido caféico (provavelmente do clorogênico também) ao PVP é em redor de 3,5 a 4,0. O presente ensaio foi feito em pH 7,0 para não haver precipitação das proteínas. Os mesmos autores observaram também que, em pH menor que 3,5 e maior que 4,5, o poder de ligação do Policlar AT com o ácido caféico decresce consideravelmente.

A fim de se verificar se era o pH da extração ou o ácido ascórbico que realmente alteravam as proteínas, foi feito um ensaio para esclarecer este ponto. A Figura 3-7 mostra os resultados.

Pelos resultados da Figura 3-7 pode-se observar que o pH tem influência, pois mudou um pouco a distribuição das proteínas do café Rio. Entretanto as proteínas no pH 6,0, na presença de ácido ascórbico, mudaram completamente seu comportamento, tanto as do café Mole como as do Rio. A pequena variação encontrada para o café Rio, quando extraída com pH 6,0, pode ser devida a diferentes proteínas extraídas neste pH.

FIGURA 3-7. Comportamento eletroforético em gel-agar de proteínas de café Mole e Rio, com diferentes tratamentos. Corrida em tampão fosfato pH 7,0 0,05 M.



Segundo LAM e SHAW (1970), resinas de troca iônica usadas na extração de enzimas removem também compostos fenólicos. WALKER e HULME (1965, usando de detergentes, conseguiram melhorar os resultados da atividade da polifenol oxidase.

Baseados nestes trabalhos, foram feitos alguns ensaios para se verificar o comportamento das proteínas com estes tratamentos.

A Figura 3-8 mostra os resultados.

Pelos resultados da Figura 3-8, pode-se concluir que a resina DOWEX - 1 - X8 (Cl^-), além de evitar a complexação dos fenóis com as proteínas, remove uma boa parte destas também. Esses resultados concordam integralmente com os de LAM e SHAW (1970), os quais observaram um decréscimo nas proteínas solúveis assim como nos fenóis quando extraídos com DOWEX 1 - X8 forma Cl^- . O TWEEN 80 na concentração de 4 gotas por extração fez com que aparecessem proteínas no lado negativo, proteínas essas que, embora em pequena quantidade, estavam ausentes no controle.

Tentou-se verificar se o ácido ascórbico, um dos agentes que impedem a formação de um provável complexo fenol-quinona-proteína exercia efeito em proteínas purificadas. A Figura 3-9 mostra os resultados.

Como se pode observar pela Figura 3-9, não houve mudança no caminamento das duas proteínas utilizadas. O que ocorreu foi uma ligeira insolubilização de ambas devido ao pH mais baixo (6,0). Tentou-se utilizar diversas concentrações de ácido ascórbico (até 1,5%), mas os mesmos resultados foram obtidos; o caminamento da caseína não mudou de direção.

Com esses últimos ensaios parece ter ficado evidenciado que as proteínas solúveis extraídas dos

FIGURA 3-8. Comportamento eletroforético em gel-agar de proteínas de café Mole e Rio com diferentes tratamentos. Corrida em tampão fosfato pH 7,0 0,05 M.

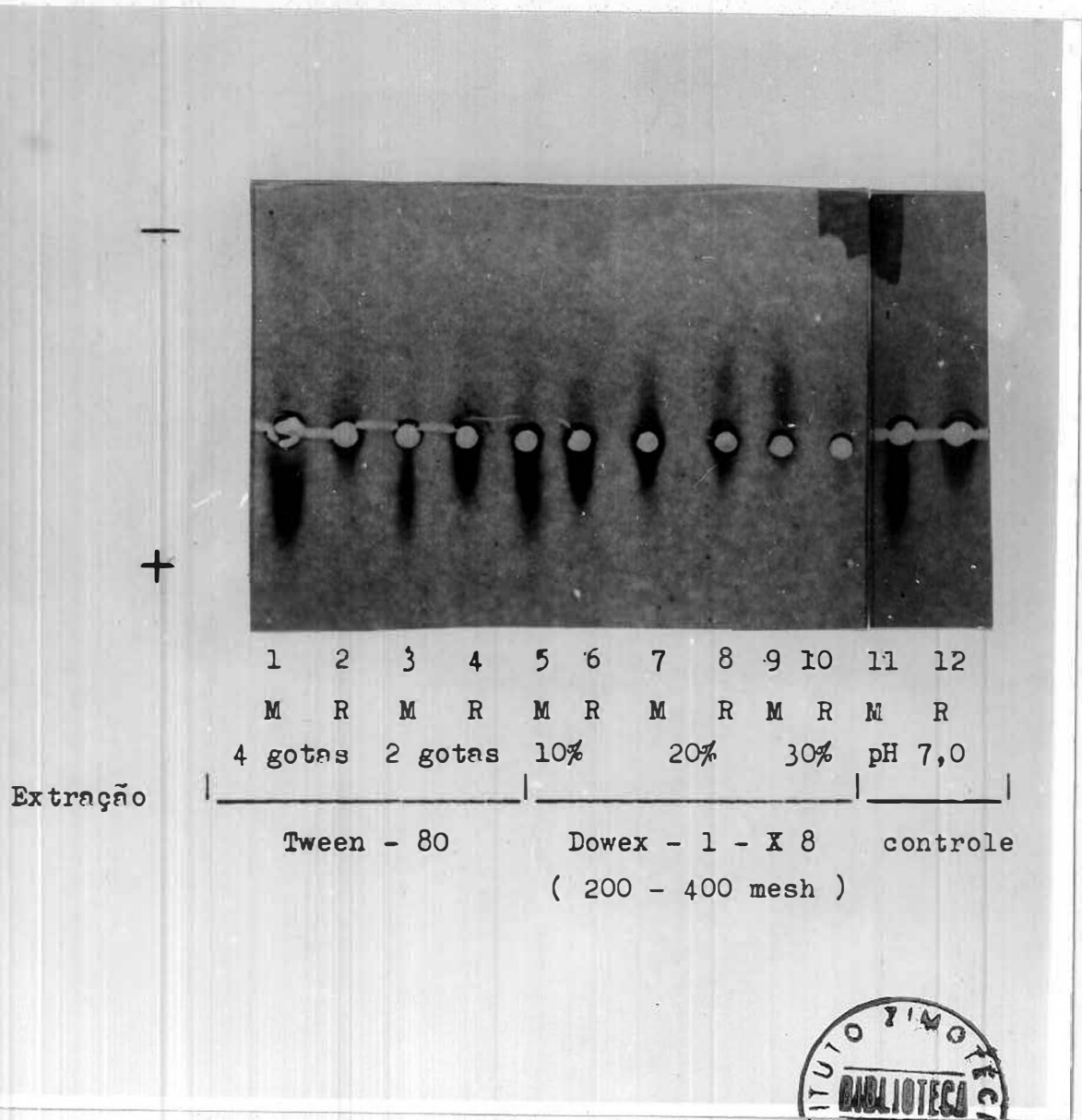
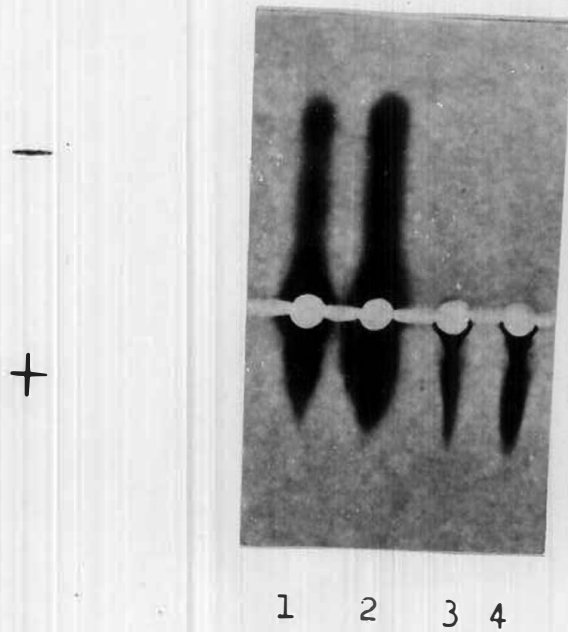


FIGURA 3-9. Comportamento eletroforético de proteínas purificadas tratadas com ácido ascórbico. Corrida em tampão fosfato pH 7,0 e 0,05 M.



1. Albumina de ovo + Ac.Asc. 0,25%
2. Albumina de ovo
3. Caseína + Ac.Asc. 0,25%
4. Caseína



melhores cafés, têm um comportamento diferente por causa da maior atividade enzimática da polifenol oxidase, que oxida os ácidos clorogênicos e cafêico, e as quinonas formadas ou em formação reagem com os aminoácidos das proteínas mudando-lhes as cargas elétricas.

O efeito de redutores como o ácido ascórbico, 2 mercaptoetanol e cisteína, evitando a complexação das proteínas, talvez pudesse ser explicado pelo fato de que as quinonas, ou ainda na forma de radical livre, fossem reduzidas imediatamente pelos redutores acima citados, impedindo a reação com os aminoácidos das proteínas, assim como a polimerização das quinonas formadas.

A resina DOWEX 1-X8 forma Cl^- , além de se ligar eletrostaticamente com os fenóis e quinonas, também se ligou com proteínas precipitando-as, fato esse facilmente comprovado pelos resultados da Figura 3-8.

O mecanismo de ação do PVP é mais difícil de se explicar. A literatura mesmo é conflitante quanto aos efeitos do PVP na extração de proteínas e enzimas. Enquanto ANDERSEN e SOWERS (1968) indicam as condições ótimas para que o PVP se ligue aos fenóis, HULME e JONES (1963), JONES et al. (1965) e FERGUSON (1969) demonstram claramente que, dependendo da fabricação ou do tipo do PVP, os resultados são completamente diferentes quanto a atividades enzimáticas. LAM e SHAW (1970) conseguiram aumentar a atividade específica da polifenol oxidase extraída de Linum usitatissimum L. (planta com alto teor de fenóis) em cerca de 50%, mas WALKER e HULME (1965) observaram que o PVP inibia quase que completamente a atividade da polifenol oxidase; posterior tratamento com detergentes conseguiu anular a inibição pelo PVP e dar altas atividades.

Alguns ensaios complementares foram efetuados a fim de comprovar a interação entre fenóis e proteínas.

Café Mole e Rio, depois de moídos, foram extraídos à temperatura ambiente em solução tampão fosfato pH 7,0 e 0,05 M durante 15 min. por agitação mecânica (com e sem ácido ascórbico). Depois de centrifugados, os extratos foram deixados 1 hora à temperatura ambiente.

Cem µl de cada extrato aquoso foram cromatografados em papel de filtro Whatman nº 1 e postos a correr com n-Butanol, ácido acético e água (4/1/2,2 v/v/v). A quantidade de ácidos clorogênicos detectados era muito superior nos cafés extraídos com ácido ascórbico. Nos cafés onde não foi usado ácido ascórbico, verificou-se que, no caso do Rio, havia ainda uma quantidade razoável de ácido clorogênico; no café Mole, porém, a quantidade era mínima. Estes resultados confirmam as observações dos ensaios com a eletroforese em gel-agar.

Utilizou-se também uma coluna de Sephadex, G-25, fina (20 cm altura x 1,5 cm largura) e colocou-se 1 ml de extrato de um café Mole. Depois de eluído um volume de solvente equivalente ao volume da coluna, as frações coletadas (4 ml por fração) eram analisadas para proteínas (Millon), carboidratos (Molish) e atividade da polifenol oxidase.

Posteriormente, 200 µl de cada fração foram cromatografados em papel de filtro Whatman nº 1 com os mesmos solventes acima citados. As seguintes observações puderam ser feitas:

a) duas faixas esverdeadas se formaram na coluna; a primeira revelou a presença de carboidratos (polisacarídeos, provavelmente), proteínas e atividade da

polifenol oxidase (substrato; L-3-4 dihidroxifenilalanina).

b) o cromatograma das 10 primeiras frações revelou que, com as proteínas e polissacarídeos eluídas nas primeiras, um pouco de ácido isoclorogênico foi detectado assim como traços de ácido clorogênico;

c) na segunda faixa esverdeada foi encontrada um pouco de ácido isoclorogênico, mas uma grande parte de ácido clorogênico (oitava e nona frações). Não foram encontrados carboidratos, proteínas, e a atividade da polifenol oxidase não pôde ser detectada.

Pode-se deduzir que, juntamente com as primeiras frações, o ácido clorogênico e isoclorogênico detectados não foram oxidados pela polifenol oxidase, mas estavam ligados às proteínas por pontes de hidrogênio. Uma outra parte foi oxidada, e não pôde ser detectada.

Nas frações posteriores, principalmente quando a segunda faixa esverdeada foi eluída, a presença primeiramente do ácido isoclorogênico (peso molecular maior) e depois do ácido clorogênico veio confirmar que uma parte dos compostos fenólicos se liga às proteínas enquanto que outra permanece solúvel e não é oxidada.

É difícil, com os dados preliminares apresentados neste trabalho e os encontrados na literatura, formular uma hipótese concreta sobre estas interações de proteínas e fenóis com a qualidade da bebida do café. O assunto é por demais complexo e a falta de dados é grande. Pode-se apenas especular sobre a existência de uma grande probabilidade de realmente existir alguma relação, pois as reações dos aminoácidos em alimentos são bem conhecidas, assim como sua contribuição para o gosto e aroma de vários alimentos

(HODGE (1967)).

A pirólise que ocorre durante a torração do café, conduzindo ao sabor e aroma característicos do mesmo, pode facilmente ser afetada por compostos fenólicos que se ligam a proteínas. Sabe-se que tanto as proteínas como os ácidos clorogênicos são em grande parte degradados na torração; o fato de estarem ligados ou não deve ter algum efeito na qualidade do produto. Café em côco, seco durante 60 minutos a 90° C, apresentou atividade da polifenol oxidase (F.P.MORAES e H.V.AMORIM, não publicado); portanto, na torração do café, as enzimas poderão estar atuando ainda, pelo menos no início.

3.2.2. Análise das correlações entre os compostos analisados.

A análise de regressão linear e o teste T encontram-se na Tabela 3-33. O número de valores para cada composto analisado foi de 24. (médias de cada de terminação).

Como já foi dito na parte referente ao material e métodos, a análise estatística de todos os dados expressos em % foi feita de duas maneiras, uma delas considerando $\arcsin \sqrt{\%}$ e a outra os valores das porcentagens. Para o caso da regressão linear, houve coincidência dos resultados para os dois métodos; entretanto somente a interação entre carboidratos totais livres e fenóis totais em água foi significativa a 5% quando se usou o valor da porcentagem, e não o foi quando se usou $\arcsin \sqrt{\%}$. Portanto a interação entre fenóis totais em água e carboidratos totais livres não deve ser considerada significativa, apesar de o ter sido a 10% quando se usou o valor de $\arcsin \sqrt{\%}$. O coeficiente de variação, quando se considerou $\arcsin \sqrt{\%}$, foi menor; por esta razão deve-se considerar

TABELA 3-33. Correlação entre as médias das análises químicas dos compostos encontrados no grão de café verde de quatro padrões diferentes de bebida (Mole, Duro, Riado e Rio). (r=regressão) t=teste de significância; * 5%, ** 1% e *** 0,1% (probabilidade de não correr).

Interação dos compostos	r	t
N total x Carb. totais	0,30	1,52
N total x Açúcar red.	- 0,23	- 1,13
N total x Ác. clorog.	0,12	0,59
N total x Prot. sol. NaCl	0,76	5,52***
N total x Prot. sol. t. fosf.	0,82	6,77***
N total x Fenóis T. água	- 0,16	- 0,78
N total x Fenóis T. metanol	0,10	0,47
Carb. totais x Açúcar red.	- 0,05	- 0,25
Carb. totais x Ác. clorog.	- 0,18	- 0,87
Carb. totais x Prot. sol. NaCl	0,33	1,66
Carb. totais x Prot. sol. t. fosf.	0,53	2,99**
Carb. totais x Fenóis T. água	- 0,40	- 2,08*
Carb. totais x Fenóis T. metanol	- 0,02	- 0,12
Açúcar red. x Ác. clorog.	0,09	0,42
Açúcar red. x Prot. sol. NaCl	- 0,16	- 0,80
Açúcar red. x Prot. sol. t. fosf.	- 0,26	- 1,28
Açúcar red. x Fenóis T. água	0,13	0,61
Açúcar red. x Fenóis T. metanol	0,27	1,35
Ác. clorog. x Prot. sol. NaCl	0,25	1,23
Ác. clorog. x Prot. sol. t. fosf.	0,01	0,07
Ác. clorog. x Fenóis T. água	0,56	3,22**
Ác. clorog. x Fenóis T. metanol	0,64	3,95***
Prot. sol. NaCl x Prot. sol. t. fosf.	0,84	7,52***
Prot. sol. NaCl x Fenóis T. água	- 0,14	- 0,67
Prot. sol. NaCl x Fenóis T. metanol	0,13	0,61
Prot. sol. t. fosf. x Fenóis T. água	- 0,21	- 1,01
Prot. sol. t. fosf. x Fenóis T. metanol	0,11	0,52
Fenóis T. água x Fenóis T. metanol	0,40	2,09*

os valores calculados desta maneira como os mais prováveis.

Os resultados da Tabela 3-33 mostram que os teores de proteínas solúveis tanto em NaCl a 10% como em tampão fosfato pH 7,0, 0,01 M estão diretamente relacionados com o teor de N total. Este resultado já era esperado, desde que um maior teor de Nitrogênio significa, na maioria dos casos, um teor de proteínas totais maior, portanto um maior teor de proteínas solúveis.

É interessante notar que o teor de carboidratos totais está correlacionado positivamente com o teor de proteínas solúveis em tampão fosfato, mas não com proteínas solúveis em NaCl a 10%. Nenhuma explicação pode ser dada a esta fato experimental.

Pelas correlações entre ácido clorogênico e fenóis solúveis em água e em metanol, pode-se observar que foram significativas e os fenóis extraídos com o metanol se correlacionaram mais com o ácido clorogênico do que os fenóis extraídos com água.

Um resultado que não foi muito esperado foi a pobre correlação entre fenóis solúveis em água e fenóis solúveis em metanol. A significância a 5% foi quase no limite (2,07). Isto mostra que existe uma pequena diferença entre os fenóis solúveis em água e os fenóis solúveis em metanol.

3.2.3. Teor dos compostos analisados em relação ao nitrogênio total

Os teores de todos os compostos analisados baseados no nitrogênio total encontram-se na Tabela 3-34.

TABELA 3-34. Relação entre as quantidades dos compostos analisados do grão de café verde com o nitrogênio total, segundo a qualidade de bebida. (média de seis amostras).

1	2	3	4	5	6	7	8
Mole	4,31	0,32	2,65	3,18	3,14	1,48	1,37
Duro	3,95	0,37	2,85	3,02	3,11	1,41	1,40
Riado	4,12	0,32	2,82	2,99	3,06	1,44	1,34
Rio	3,94	0,33	2,92	3,19	3,16	1,35	1,26
d.m.s. 5%	0,73	0,13	0,40	0,60	0,50	0,15	0,17

LEGENDA: 1= Qualidade de bebida
2= Carboidratos
3= Açúcares redutores
4= Ácido clorogênico
5= Fenól T. água
6= Fenól T. metanol
7= Proteína solúvel tampão
8= Proteína solúvel NaCl.

Como se pode observar pela Tabela 3-34 e pela análise de variância (F não significativo), não houve diferença significativa entre as quantidades dos compostos estudados no grão do café, quando se tomou por base o nitrogênio total.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

4.1. Objetivos do trabalho

A finalidade principal deste trabalho foi tentar correlacionar a composição química do grão do café com a qualidade da bebida proveniente dos mesmos.

Entre os compostos que mais se degradam na torração do café estão a sacarose, ácido clorogênico e proteínas. Por este motivo os carboidratos livres totais (mais de 50% em sacarose), os açúcares redutores, os polissacarídeos, o ácido clorogênico e seus isômeros, os fenóis totais solúveis em água e em metanol a 80%, as proteínas solúveis em tampão fosfato pH 7,0 0,01 M e em NaCl 10%, e o nitrogênio total foram analisados quantitativamente em 24 amostras de café (C.arábica L. var. Mundo Novo), provenientes de várias regiões do Estado de São Paulo e classificações quanto à qualidade da bebida.

Aproveitando os resultados obtidos, tentou-se correlacionar por análise de regressão linear cada composto analisado em relação a todos.

4.2. Metodologia

Devido ao fato de não haver métodos oficiais definitivos para a maioria das determinações feitas, uma série de modificações foram introduzidas nos métodos existentes na literatura para a aplicação ao grão de café verde.

4.2.1. Compostos fenólicos

Três métodos de determinação do ácido clorogênico foram comparados: MOORES et al. (1948), A.O.A.C. (1970) e GNAGY (1961 e 1962).

O método cromatográfico de GNAGY (1961 e 1962),

além de ser moroso (cerca de 2 a 3 dias para cada determinação), apresenta o risco de permitir oxidações e mostra grande variabilidade. Comparando os métodos de MOORES et al. (1948) e o da A.O.A.C. (1970), verificou-se que o primeiro apresentou valores até 5% mais elevados, sendo essa diferença constante e independente do café. Ambos são bons e reprodutíveis. O método da A.O.A.C. (1970) ainda não é definitivo e está sob estudo (DICK (1972)). Optou-se, portanto, pelo de MOORES et al. (1948) que é bem mais rápido.

A determinação dos fenóis totais solúveis tanto em água como em metanol a 80% não apresentou dificuldades quanto à adaptação. A única investigação que se achou necessária fazer foi a relativa ao número e ao tempo de extrações.

4.2.2. Carboidratos

Houve dificuldade na determinação dos carboidratos solúveis em etanol a 80% devido a interferências.

O ácido clorogênico pode contribuir com até 5% da coloração desenvolvida com o método fenol-sulfúrico de DUBOIS et al. (1952) na concentração encontrada no extrato utilizado. Um composto desconhecido (provavelmente um açúcar fosforilado) também interferiu com cerca de 5% para a coloração com o referido método.

A extração dos carboidratos deve ser feita com etanol em ebulição e imediatamente após a moagem do material para evitar hidrólise da sacarose. Vários tipos de coluna de troca iônica também hidrolisam a sacarose, provavelmente devido ao abaixamento do pH.

A determinação do açúcar redutor tem que ser feita logo em seguida à extração ou será necessário neutralizar o extrato para evitar hidrólise da saca -

rose.

O teor de açúcares redutores deve ser tomado como "poder redutor", pois é possível a presença de substâncias redutoras que não são carboidratos nos extratos analisados, embora os dados encontrados situem-se dentro dos limites encontrados na literatura. O ácido clorogênico e o composto desconhecido não interferem na determinação de açúcares redutores pelo método de HODGE e HOFREITER (1962).

A análise dos polissacarídeos não apresentou problemas quando se usou o método de WOLFROM et al. (1960).

4.2.3. Proteínas solúveis

Os métodos encontrados na literatura para proteínas não podem ser aplicados diretamente ao grão do café.

Problemas com insolubilização ou turbidez das proteínas impediram o uso do método do ultra-violeta (280 e 260 nm). O aparecimento de precipitados na determinação de proteínas pelo método do "biureto" impossibilitou o uso deste método.

O método de Folin-Lowry (LOWRY et al. (1951) parece ser o mais indicado para o café, se forem tomadas certas precauções quanto à lavagem do precipitado (TCA) protéico.

Entre os solventes utilizados para a lavagem das proteínas, a acetona mostrou-se superior. Na acetona de lavagem detectaram-se o ácido clorogênico e isoclorogênico, que interferem no método de Folin-Lowry, e quatro aminoácidos e cafeína, que interferem no método do N x 6,25. O método de referência N x 6,25 também sofre interferência pelos motivos acima descritos, como provavelmente também pelos polissaca

rídeos que contêm nitrogênio e que são precipitados juntamente com as proteínas.

Quanto à eletroforese das proteínas solúveis, visando à melhor diferenciação quanto à qualidade da bebida, a melhor solução extratora e de corrida no gel-agar foi o tampão fosfato pH 7,0, 0,05 M.

4.3. Dados e Conclusões

4.3.1. Compostos fenólicos

Os cafés Moles apresentaram valores inferiores de ácido clorogênico em relação ao Duro, Riado e Rio, significativo a 1%. Foram os seguintes os valores encontrados: M=6,94%, D=7,59%, Ry= 7,38% e R=7,42%. Os cafés Duro, Riado e Rio não foram diferentes entre si estatisticamente.

Os ácidos isoclorogênicos e neoclorogênicos não apresentaram diferenças significativas entre os cafés analisados.

Os teores de fenóis totais solúveis em água e em metanol a 80% também não apresentaram diferenças significativas entre as diferentes bebidas. Os teores de fenol total, tanto extraídos com água como metanol a 80%, foram da ordem de 8,00% em relação à matéria seca.

O menor teor de ácido clorogênico no café Mole pode ser um dos fatores que contribuem para uma melhor bebida, estando provavelmente relacionado com outros componentes do grão porque em algumas amostras de café Mole o teor de ácido clorogênico situava-se na faixa de outros cafés.

4.3.2. Carboidratos

Embora o teor de carboidratos livres solúveis

em etanol a 80% tenha sido um pouco mais elevado no café Mole, a análise estatística não revelou significância. A média encontrada para todos os cafés foi de 10,58%, baseados na matéria seca.

O teor de açúcares redutores no café Duro foi um pouco superior aos outros cafés, mas esta diferença também não foi significativa. O teor médio baseado na matéria seca foi de 0,86%.

A porcentagem de polissacarídeos solúveis em oxalato de amônio 0,5% a quente também não varia entre os três melhores e os três piores cafés. Os valores encontrados foram em torno de 1,45%, baseados na matéria seca.

Os carboidratos estudados parecem não influir na qualidade da bebida dentro da variedade de café estudada; entretanto não fica excluída a hipótese de que a interação destes carboidratos com algum outro composto possa ter algum efeito.

4.3.3. Proteínas solúveis

4.3.3.1. Proteínas solúveis precipitadas com TCA

Embora as proteínas solúveis em tampão fosfato pH 7,0 0,01 M tenham apresentado valores menores para o café Rio, estes não diferiram significativamente dos demais. Os teores encontrados, segundo a qualidade de bebida, foram os seguintes: M= 3,78%, D= 3,77%, Ry= 3,77% e R= 3,45% (em relação a matéria seca).

As proteínas solúveis em NaCl a 10% foram quantitativamente diferentes entre o café Rio e Duro. Os resultados encontrados foram: M= 3,51%, D= 3,76%, Ry= 3,51% e R= 3,24% (em relação à matéria seca).

A hipótese apresentada no início deste trabalho de que nos piores cafés os polifenóis tivessem sido os agentes precipitantes das proteínas não tem muito suporte nos resultados obtidos, pois os teores de fenóis totais em água e em metanol a 80% não foram diferentes para o café Rio. Por outro lado, não fica excluída a possibilidade de que os solventes utilizados na extração dos fenóis não tenham sido os melhores para o presente caso.

4.3.3.2. Eletroforese de proteínas solúveis

A eletroforese em gel-agar mostrou diferenças significativas ao nível de 1% entre os cafés estudados. A somatória das distâncias percorridas pelas proteínas em direção ao polo positivo (+) e negativo (-) foi: M=(+) 5,50, D=(-) 5,83, Ry=(-) 1,33 e R= (-) 7,16. Excluindo o café Duro, houve uma tendência linear quanto ao caminhamento dos outros cafés em relação à bebida, e, quanto maior o caminhamento para o polo negativo, pior a bebida.

Os diferentes caminhamentos das proteínas em relação à qualidade de bebida parecem ser devidos à atividade da polifenol oxidase que age sobre os compostos fenólicos durante a extração. Estes compostos fenólicos ligados às proteínas alteram sua carga elétrica. Como nos melhores cafés a atividade desta enzima é mais elevada (AMORIM e SILVA 1968; ROTEMBERG & IACHAN 1970; SANINT & VALÊNCIA 1970), maior será a probabilidade dos compostos fenólicos oxidados formarem complexos com estas proteínas, alterando-lhes a carga elétrica. Tal hipótese foi provada com uma série de experimentos utilizando substâncias redutoras e polímeros que se ligam aos fenóis, impedindo que estes se complexem com as proteínas. Tais experimentos foram completados por ensaios em coluna de Sephadex

G-25 fina e cromatografia em papel.

Embora com os resultados deste trabalho não se possa afirmar que a qualidade da bebida dentro da variedade de café estudada esteja diretamente relacionada com o teor de ácido clorogênico ou com a quantidade de proteínas solúveis, é lícito especular que talvez na interação entre fenóis e proteínas resida um dos fatores que contribuem para a formação dos precursores do gosto e o aroma desejáveis do café.

4.3.4. Compostos analisados em relação ao nitrogênio total

Não houve diferença significativa em nenhum dos compostos estudados em relação ao nitrogênio total com a qualidade da bebida do café.

4.3.5. Correlação entre os compostos analisados

Correlações positivas e altamente significantes foram encontradas entre os teores de nitrogênio total e de proteínas solúveis em tampão fosfato ($r=0,82$) como também em NaCl a 10% ($r=0,76$). Foi também significativa a correlação entre as duas proteínas solúveis, ao nível de 0,1% ($r=0,85$).

O teor de ácido clorogênico total está positivamente correlacionado com os fenóis totais solúveis em água ($r=0,57$) e metanol ($r=0,64$).

A correlação entre teores de fenóis totais solúveis em metanol e solúveis em água foram significativas somente ao nível de 5% ($r=0,40$).

Uma correlação não esperada e que foi significativa a 1% ($r=0,54$) foi a encontrada entre carboidratos solúveis e proteínas solúveis em tampão fosfato. Nenhuma explicação no momento pode ser dada ao

achado experimental.

5. SUMMARY

5.1. Objectives of the work

The aim of this work was to try to correlate some chemical components of the green coffee bean with the quality of the beverage thereof.

Among the compounds which undergo pirolisis at the most extensive rate on roasting, are sucrose, chlorogenic acid, and proteins. Due to this reason, total free carbohydrates (mostly sucrose), reducing sugars, polysaccharides, chlorogenic acid and its isomers, total phenols soluble in water and 80% me - thanol, proteins soluble in phosphate buffer (pH 7,0 0,01 M) and in 10% NaCl, and total nitrogen were estimated in the 24 coffee samples. These samples were collected in several regions of the State of São Paulo and classified by the official tasters of the Brazilian Institute of Coffee (SERAC, SP-1).

It was tried to correlate the content of each compound with the others by linear regresion.

5.2. Methodology

Due to the fact that there is no final action for the official methods for the most of the determi nations carried out, many modifications on the exist- ing methods had to be made in order to apply them to green coffee beans.

5.2.1. Phenolic compounds

Three methods for chlorogenic acid estimati- on were compared: MOORES et al.(1948), A.O.A.C.(1970) and GNAGY (1961 and 1962).

The chromatographic method of GNAGY (1961 and

1962) is too time consuming (2 to 3 days to perform one single estimation) provide conditions to have phenolics oxidized and shows high variability. When comparing the MOORES et al.(1948) and A.O.A.C.(1970) methods, the former gave values up to 5% higher than the latter, but this difference was constant and independent of the coffee sample. Both are good and reproducible. The A.O.A.C. (1970) method is not on the final action and is under study (DICK(1972)). It was decided to use MOORES' method because it is more rapid.

The determination of total phenols soluble in water and in 80% methanol showed no difficulties on adaptation. The only investigation carried out was designed to find out the number of extractions and time required for the complete extraction.

5.2.2. Carbohydrates

The estimation of soluble carbohydrates in 80% ethanol presented some problems with regard to the interfering substances.

Chlorogenic acid may contribute with up to 5% to the color developed by the phenol-sulfuric method of DUBOIS et al. (1952). An unknown compound (probably a phosphorylated sugar) increased by 5% the color with this method.

The extraction procedure of soluble carbohydrates should be made with hot ethanol and immediately after the grinding of the sample to avoid hydrolysis of sucrose. Several kinds of ion exchange resins also hydrolyzes sucrose, probably because it decreases the pH of the eluate.

The estimation of reducing sugars has to be made following the extraction, otherwise the break -

down of sucrose increases the reducing sugars value. It can be avoided by neutralizing the eluate after passing through the resin column.

The reducing sugars should be taken as the "reducing power", because it is possible that reducing substances which are not sugars could be found in the extract, in spite of the fact that the values found in this work are in the range of those found in the literature.

No problem was found on the isolation of polysaccharides and estimation by using the WOLFROM et al. (1960) method.

5.2.3. Soluble proteins

Existing methods as found in the literature for soluble protein determination can not be applied directly to green coffee beans.

The insolubility and /or turbidity of the proteins did not permit the use of ultra-violet (280/260 nm) method. The formation of a flocculent precipitate with the biuret reagent, made it impossible to measure proteins by the biuret method (LAYNE (1957)).

The Folin-Lowry method (LOWRY et al. (1951) seems to be the most suitable for protein estimation if one washes the TCA precipitate.

Among the solvents tested to wash the precipitated proteins, acetone seems to be the best one. In the acetone that washed the TCA precipitate it were found chlorogenic and isochlorogenic acids, which interfere with the Folin-Lowry method and four amino acids and caffeine which interfere with the N x 6,25 method for determination of proteins.

The phosphate buffer (pH 7,0 0,05 M) was

chosen to extract the soluble proteins for electrophoresis separation in gel-agar. Also, this same buffer was the most suitable for protein migration and differentiation among the samples tested.

5.3. Results and conclusions

5.3.1. Phenolic compounds

The chlorogenic acid content of the Soft coffee was lower (significant at 1% level) than the Hard, Rioy and Rio coffees.

The average for the six samples of each standard beverages were S= 6,94%, H= 7,59%, RY=7,38% and R= 7,42%. The Hard, Rioy and Rio coffees were not statistically different.

The contents of isochlorogenic and neochlorogenic acids showed no statistical difference among the coffees.

The contents of total phenols soluble in water and in 80% methanol, also showed no significant difference among the coffees. The total phenols (water and 80% methanol) content was about 8,00% in dry weight basis.

The lower chlorogenic acid content found in the Soft coffee may be one of the factors which contribute to the good beverage, but probably in relationship with other components of the bean, because it was found some values for chlorogenic acid in samples of Soft coffee that was in the range of other coffees.

5.3.2. Carbohydrates

Although the soluble carbohydrates found in Soft coffee was little higher than the others, statistical analysis showed no difference. The average for all samples was 10,58% on dry weight basis.

The reducing sugar content was higher in the Hard coffee, but also, no significant difference was found. The average for all samples was 0,86 in dry weight basis.

The percentage of soluble polysaccharides in hot 0,5% ammonium oxalate showed no difference among the coffee tested. The average for the three best and the three worst coffees was 1,45%.

The carbohydrates content estimated in this work, showed no difference among the coffees which differ on the quality of the beverage. However, the hypothesis by which the interaction of these carbohydrates with other compound may have some correlation with the quality of the beverage, cannot be excluded.

5.3.3. Soluble proteins

5.3.3.1. TGA precipitate of soluble proteins

No statistical difference was found on the phosphate buffer soluble protein among the standards coffee qualities. The soluble protein content of each standard was the following: S= 3,78%, H= 3,77%, Ry= 3,77% and R= 3,45% (dry wt.basis).

The NaCl 10% soluble proteins extracted from the standards coffee quality showed a significant difference, at 5% level. The following results were observed: S= 3,51%, H= 3,76%, Ry= 3,51% and R= 3,24% (dry wt.basis).

The hypothesis that in the Rio coffees the polyphenols had been the precipitating agents for the proteins, has no support with the data presented here, because the content of total phenols soluble in water and in methanol were not different between the Rio coffee and the others. On the other hand, the possibility that the solvents used for extracting the

phenolic compounds were noted proper for the present case, is not excluded.

5.3.3.2. Eletrophoresis of the soluble proteins

The gel-agar eletrophoresis separated significantly (at 1% level) the proteins extracted from different standard coffee types. The following results (in mm) were obtained: S=(+) 5,50, H=(-) 5,83, Ry=(-) 1,33 and R=(-) 7,16. Excluding the Hard coffee, it was observed a linear tendency to increase the distance toward the negative pole from the best coffee to the poorest.

The different protein behavior in relation to the different qualities of the beverage, seems to be associated to the activity of the polyphenol oxidase which act on the phenolic compounds during the extraction procedure. These phenolic compounds when attached to the protein may change its electrical charge.

The higher activity of polyphenol oxidase found in the good coffees (AMORIM & SILVA (1968), ROTEMBERG & IACHAN (1970) and SANINT & VALÊNCIA (1970) brought about more oxidation of the phenolic compounds than the case of poor coffees. Because of this, more proteins migrated toward the positive pole, compared with the poor coffee which shows a lower enzymatic activity.

This hypothesis was checked with a serie of experiments using reducing agents, PVP (polyvinylpyrrolidone) and resins, to avoid phenolics and quinones to complex with proteins. Such experiments were completed by passing extracts through a Sephadex G-25 (fine) column and by using paper chromatography techniques.

5.3.4. Compounds content on total nitrogen basis

No significant difference was observed for the compounds studied in relation to the total nitrogen, if one compares with the quality of the beverage,

5.3.5. Correlation between the estimated compounds

Positive correlations, significant at 0,1 % level, were found between total nitrogen and soluble protein in phosphate buffer ($r=0,82$) and also with soluble protein in NaCl ($r=0,76$). Between the two soluble proteins, the linear regression showed a value for $r= 0,85$ (significant at 0,1% level).

Total chlorogenic acid was positively correlated with both, total phenolics soluble in water ($r=0,57$) and in methanol ($r=0,64$). The statistical significance was found to be at 1% and 0,1% level, respectively.

Total phenol soluble in water were correlated with the total phenols soluble in methanol only at the significant level of 5% ($r=0,40$). This result shows that phenolic compounds extracted with water are not same (at least in part) as those extracted with methanol.

A significant correlation (at 1% level) was found between soluble carbohydrates and soluble proteins in phosphate buffer ($r=0,54$).

No explanation could be found for this result.

6. LITERATURA CITADA

- AMORIM, H.V., L.C.SCOTON, A. de CASTILHO, F.PIMENTEL GOMES e E.MALAVOLTA. 1965. Estudos sobre a alimentação mineral do cafeeiro. XVII. Efeito da adubação N,P,K, na composição química do solo, do fruto e na qualidade da bebida. (Nota Preliminar). Anais ESALQ, 22: 130 - 152.
- AMORIM, H.V., L.C.SCOTON, A. de CASTILHO, F.PIMENTEL GOMES, E.MALAVOLTA. 1967. Estudos sobre a alimentação mineral do cafeeiro. XXI. Efeito da adubação N,P,K, e orgânica na composição mineral do grão e na qualidade da bebida. (2ª nota). Anais da ESALQ, 24: 215 - 227.
- AMORIM, H.V. e D.M.SILVA. 1968a. Relação da atividade da polifenol oxidase do grão de Coffea arabica L. com a qualidade da bebida. Boletim Técnico-Científico nº 31. ESALQ, USP, Piracicaba S.P. Brasil. 16 pp.
- AMORIM, H.V. e D.M.SILVA. 1968b. Relationship between the poliphenol oxidase activity of coffee beans and the quality of the beverage. Nature (London), 219: 381 - 382.
- AMORIM, H.V., 1970a. Nutritional status of the coffee plant and beverage quality. Indian Coffee, 34: 331 - 335.
- AMORIM, H.V., 1970b. The effect of nitrogen and carbohydrate on production of phenols by plant cell cultures. A Thesis (M.S.). The Ohio State University, U.S.A. 55 pp.

- ANDERSEN, R.A. and J.A.SOWERS. 1968. Optimum conditions for bonding of plant phenols to insoluble polyvinylpyrrolidone. *Phytochemistry*, 7: 293-301.
- BACCHI, O. 1962a. O branqueamento dos grãos do café. *Bragantia*, 21: 467 - 484.
- BACCHI, O. 1962b. Café: branqueamento do grão. *Boletim da Superintendência dos Serviços do Café*, 37(423): 17 - 18.
- BARBOSA, L.F., F.PIMENTEL GOMES, P.PARREIRA, H. de CAMPOS, A. de CASTILHO e A.A.TEIXEIRA. 1962. Estudos preliminares sobre a prova de xícara do café. *Boletim da Superintendência da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo*. SFCC -1, 38 pp.
- BARNES, H.M., J.R.FELDMAN and W.V.WHITE. 1950. Isochlorogenic acid. Isolation from coffee and structure studies. *Journal of American Chemical Society*, 72: 4178 - 4182.
- BARNETT, A.J.G., and G.A.TAWAB. 1957. A rapid method for the determination of lactose in milk and cheese. *Journal of Science and Food Agriculture*, 8: 437 - 441.
- BARTON, G.M., R.S.EVANS, and J.A.F.GARDNER. 1952. Paper chromatography of phenolic substances. *Nature (London)*, 170: 249 - 250.
- BHATIA, I.S. and M.R.ULLAH. 1965. Quantitative changes in the polyphenols during the processing of tea leaf and their relations to liquor characters of made tea. *Journal of Science and Food Agriculture*, 16: 408 - 416.

- BIGGERS, R.E., J.J.HILTON e M.A.GIANTURCO. 1969. Differentiation between Coffea Arabica and Coffea Robusta by computer evaluation of gas chromatographic profiles, comparison of numerically derived quality predictions with organoleptic evaluations. Journal of Chromatographic Science, 7: 453 - 483.
- BOUCHILLOUX, S. 1962. Enzymatic browning reactions. Proceedings of a symposium of the plant phenolics group of North America (Plant phenolics and their Industrial Significance). (Oregon State University). pp. 1 - 14. V.C.RUNECKLES Ed.
- CALDAS, R.A. 1971. Purification and characterization of glutamine synthetase from suspension culture of Wild Carrot (Daucus carota L.). PhD. Thesis. Biochemistry. The Ohio State University, U.S.A. 180 pp.
- CALLE, H.V. 1955. Pruebas químicas para determinar la calidad de café. Cenicafé (Colombia), 7(65): 158 - 160.
- CALLE, H.V. 1963. Reacciones cualitativas en la determinación del aroma del café. Cenicafé (Colombia), 14(3): 187 - 194.
- CALZOLARI, C., L.C.LOKAR. 1967. Effect of decaffeination on the coffee components. I. Carbohydrates. A.S.I.C. pp. 241 - 247. Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés. Trieste-juin, 1967.

- CENTI-GROSSI, M., C.TASSI-MICCO and V.SILANO. 1969. Albumin fractionation of green coffee seed varieties by acrylamide gel-electrophoresis. *Phytochemistry*, 8: 1749 - 1751.
- CHASSEVENT, F., J.C.VICENT, D.HAHN, S.POUGNEAUD and R.WILBAUX. 1969. Étude de relations éventuelles gustatives ou chimiques en fonction de la préparation du café robusta au state primaire. pp. 179 - 185. A.S.I.C. Quatrième Colloque International sur la Chimie de Cafés. Amsterdam Juin 1969.
- CLEMENTS, R.L. and F.E.DEATHERAGE. 1957. A chromatography study of some of the compounds in roasted coffee. *Food Research*, 22: 222 - 232.
- COHN, E.J. 1943. The solubility of proteins. "In" Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions. pp. 569 - 585. E.J.Cohn and J. T.Edsall Ed. reprint 1965. Hafner Publishing Company. New York and London.
- CORSE, J. 1964. The enzymatic browning of fruits and vegetables. Proceedings of a symposium of the plant phenolics group of North America. (Phenolics in normal and diseased fruits and vegetables) pp. 41 - 62. V.C.Runeckles Ed.
- CORSE, J., R.E.LUNDIN and A.C.WAISS Jr. 1965. Identification of several components of isochlorogenic acid. *Phytochemistry*, 4: 527 - 529.
- CORTE DOS SANTOS, A., D.HAHN, B.CAHAGNIER, R.DRAFRON, A.GUILBOT, J.LEFEBVRE, J.L.MULTON, J.POISSON, E.TRENTESAUX. 1971. Étude de l'évolution de plusieurs caractéristiques d'un café arabica au cours d'un stockage expérimental effectué à cinq humidités relatives différents. *Café Cacao Thé*, 15: 329 - 340.

- COURTOIS, J.E., F.PERCHERON, et J.Cl.GLOMAUD. 1963. Recherches préliminaires sur les oligosaccharides et les polysaccharides hydrosolubles de la graine du café vert. (Coffea Canephora, var Robusta) pp. 63 - 68. A.S.I.C. Première Colloque International sur la Chimie des Cafés verts Torréfiés et leurs Dérivés. Paris, Mai, 1963.
- DEPLEDT, F. 1967. Choix des épreuves d'appréciation organoleptique. pp. 381 - 386. A.S.I.C. Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leur Dérivés. Trieste, Italie. 2 - 9 juin. 1967.
- DICK, R.H. 1972. Report on coffee and tea. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 55: 256.
- DUBOIS, M., K.A.GILLES, J.K.HAMILTON, P.A.REBERS and F.SMITH. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28: 350 - 356.
- FELDMAN, J.R., W.S.RYDER and J.T.KUNG. 1969. Importance of nonvolatile compounds to the flavor of coffee. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 17: 733 - 739.
- FERGUSON, A.R. 1969. The nitrogen metabolism of Spirodela ologorrhiza II. Control of the enzymes of nitrate assimilation. Planta (Berlin), 88: 353 - 363.
- FERRAZ, M. de B., e A.A.VEIGA. 1954. Secagem racional do café. Boletim da Superintendência dos Serviços do Café, 29(325): 5 - 16.

- FERRAZ, M.B. e A. de A.VEIGA. 1959. Melhor bebida e maior poder germinativo do café. Diretoria de Publicidade Agrícola da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo. nº único. 25 pp.
- FOLIN, O., and V.CIOCALTEU. 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. Journal of Biological Chemistry, 73: 627 - 650.
- FONSECA, H. e J.D.P.ARZOLLA. 1965. Cromatografia de Açúcares. Boletim Didático nº 7. ESALQ, USP. Piracicaba, SP, Brasil. 19 pp.
- FORSYTH, W.G.C., V.C.QUESNELL and J.B.ROBERTS. 1958. The interaction of polyphenols and proteins during cacao curing. Journal of Science and Food Agriculture, 2: 181 - 184.
- FORSYTH, W.G.C. 1964. Physiological aspects of curing plant products. Annual Review of Plant Physiology, 15: 443 - 450.
- FRANCO, C.M. 1939. Sobre compostos fenólicos no café. Jornal de Agronomia, 2: 131 - 139.
- GARRUTI, R.S. e A.G.GOMES. 1961. Influência do estado de maturação sobre a qualidade da bebida do café da região do Vale do Paraíba. Bragantia, 20: 989 - 995.
- GARRUTI, R.S., C.G.TEIXEIRA, O.Z.TOLEDO, J.P.N.JORGE. 1962. Determinações de sólidos solúveis e qualidade da bebida em amostras de café dos portos Brasileiros de exportação. Bragantia, 21: 78 - 82.

- GAUTSCHI, F., M.WINTER, I.FLAMENT, B.WILLHALM e M. STOLL. 1967. The chemistry of coffee aroma, a survey of present knowledge. pp 67 - 76. A.S.I.C. Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés. Trieste, Itália, Juin 1967.
- GIBSON, A. 1971a. Photochemical aspects of drying east African Arabica Coffees: I. The importance of integument pigmentation. A.S.I.C. Cinquième Colloque International sur la Chimie des Cafés. Lisboa, Portugal, Junho de 1971.
- GIBSON, A. 1971b. Photochemical aspects of drying east African Arabica Coffees: II. Raw bean colours produced from kahweol esteres. A.S.I.C. Cinquième Colloque International sur la Chimie des Cafés. Lisboa, Portugal, Junho de 1971.
- GLOMAUD, J.Cl., F.PERCHEON, et J.E.COURTOIS. 1965. Teneurs comparées en oligosaccharides de quel_quer varietés de café vert. Étude preliminaire des polysaccharides extractibles par l'eau. pp. 39 - 43. A.S.I.C., Second Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts Torrefiés er leurs Dérivés. Paris, mai, 1965.
- GNAGY, M.J. 1961. Chlorogenic acid in coffee and coffee substitutes. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 44: 272 - 275.
- GNAGY, M.J. 1962. Chlorogenic acid in coffee and coffee substitutes. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 45: 770 - 774.

- GOLDSTEIN, J.L. and T.SWAIN. 1963. Changes in tannins in ripening fruit. *Phytochemistry*, 2: 371 - 383.
- GORNALL, A.G., C.S.BARDAWILL and M.M.DAVID. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 177: 751 - 766.
- GRANER, E.A. e C.GODOY Jr. 1959. "In" *Culturas da Fazenda Brasileira*. pp. 168 - 210. Edições Melhoramentos, S.P.
- HANES, C.S., F.A.ISHERWOOD. 1949. Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram. *Nature (London)*, 164: 1107 - 1112.
- HART, F.L., H.J.FISHER. 1971. General methods for proximate and mineral analysis. pp. 1 - 27. "In" *Modern Food Analysis*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York.
- HODGE, J.E., and B.T.HOFREITER. 1962. Determination of reducing sugars and carbohydrates. "In" *Methods in Carbohydrate Chemistry*. pp. 380 - 394. R.L.Whistler and M.L.Wolfrom Eds. Vol.I. Academic Press, New York and London.
- HODGE, J.E. 1967. Origin of flavor in foods, nonenzymatic browning reactions. "In" *The Chemistry and Physiology of Flavors*. pp. 465 - 491. H. W.Schultz, E.A. Day and L.M.Libbey Ed. The Avi Publishing Company, Unc., Connecticut, U.S.A.
- HULME, A.C. and J.D.JONES. 1963. Tannin inhibition of plant mitochondria. pp. 97 - 120. "In" *Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*. J.B.Pri - dham Ed. Pergamon Press, Oxford.

- ILLY, E., and L.RUZZIER. 1971. Proposition d'un nouveau système d'évaluation gravimétrique des défauts du café vert. pp. 24 - 45. A.S.I.C., Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés. Trieste. Italie. Juin, 1971.
- ITZHAKI, R.F. and D.M.GILL. A micro biuret method for estimating proteins. Analytical Biochemistry, 2: 401 - 410.
- JONES, J.D., A.C.HULME and L.S.C.WOOLTORTON. 1965. The use of polyvenylpyrrolidone in the isolation of enzymes from apple fruits. Phytochemistry, 4: 659 - 676.
- JONES, W.T. and J.W.LYTTLETON. 1972. The importance of inhibiting polyphenol oxidase in the extraction of fraction 1 leaf protein. Phytochemistry, 11: 1595 - 1596.
- JOSLYN, M.A. 1970. Extraction methods and separation processes. "In" Methods in Food Analysis. M.A. Joslyn Ed. pp. 141 - 200. Academic Press, New York and London.
- KHANNA, S.K., R.L.MATTOO, P.N.VISWANATHAN, C.P.TEWARI, G.G.SANWAL. 1969. Colorimetric determination of protein and orthophosphate in plant tissues rich in phenolics. Indian Journal of Biochemistry, 6: 21 - 25.
- KROPLIEN, U. 1971. Monosaccharide in kaffees und kaffee ersatzstoffen. A.S.I.C., 5th International Colloquium on the Chemistry of Coffee. Lisbon Portugal, June 1971.
- KRUG, H.P. 1940a. Cafés Duros. Revista do Instituto do Café (S.P.), 26(159): 636 - 638.

- KRUG, H.P. 1940b. Cafés duros. II. Um estudo sobre a qualidade dos cafés de varrição. Revista do Instituto do Café (S.P.), 27(163): 1393 - 1396.
- KRUG, H.P. 1940c. Cafés duros. III. Relação entre porcentagem de microorganismos e qualidade do café. Revista do Instituto do Café (S.P.), 27(165): 1827 - 1831.
- KRUG, H.P. 1947. A origem dos cafés duros. Boletim de Agricultura, nº único. Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo.
- KUC, J. 1964. Phenolic compounds and disease resistance in plants. pp. 63 - 77. Proceedings, symposium. Phenolics in normal and diseased fruits and vegetables. V.C.Runckles Ed.
- KUNG, J.T., W.S.RYDER, J.R.FELDMAN. 1967. The separation and determination of mono-and di-caffeoylquinic acids in coffee by gas chromatography of their trimethylsilyl derivatives pp. 223 - 229. A.S.I.C., Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés. Trieste, Juin, 1967.
- LAM, T.H. and M.SHAW. 1970. Removal of phenolics from plant extracts by grinding with anion exchange resin. Biochemical and Biophysical Research Communications, 39: 965 - 968.
- LAYNE, E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. pp 447 - 454. "In" Methods in Enzymology S.P. Colowick and N.O.Kaplan, Ed. Vol.III. Academic Press, N.Y.

- LAZZARINI, W. e F.R.P. de MORAES. 1958. Influência dos grãos deteriorados ("Tipo") sobre a qualidade da "bebida" de café. *Bragantia*, 17: 109 - 118.
- LEHMANN, G., H.G.HAHN. 1957. Über die Bestimmung der chlorogen-säure und des trigonellins. pp. 115-120. A.S.I.C., Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés. Trieste, Juin, 1967.
- LENTNER, C. and F.E.DEATHERAGE. 1958. Phenolic acids in coffee. *Chemistry and Industry*, pp. 1331 - 1332 (October 11).
- LENTNER, C. and F.E.DEATHERAGE. 1959. Organic Acids in Coffee in relation to the degree of roast. *Food Research*, 24: 483 - 492.
- LILLEVIK, H.A. 1970a. The determination of total organic nitrogen. pp 601 -- 616. "In" *Methods in Food Analysis*. M.A. Joslyn Ed. Second Edition. Academic Press, New York and London.
- LILLEVIK, H.A. 1970b. The analytical chemistry of the proteins, peptides and amino acids. pp 617 - 700. "In" *Methods in Food Analysis*. M.A. Joslyn Ed. Second Edition. Academic Press, New York and London.
- LOCKHART, E.E. 1957. *Chemistry of coffee*. The Coffee Brewing Institute, Inc. Publication n° 25 . 20 pp.
- LOOMIS, W.D., and J.BATTAILE. 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry*, 5: 423 - 438.

- LOWRY, O.M., N.J.ROSEBROUGH, A.L.FARR, and R.J.RANDAL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265 - 275.
- MABROUK, A.F., and F.E.DEATHERAGE. 1956. Organic acids in brewed coffee. Food Technology, 10: 194 - 197.
- MALAVOLTA, E. 1957. Práticas de Química Orgânica e Biológica. Centro Acadêmico "Luiz de Queiroz", Piracicaba, São Paulo, Brasil.
- MALMSTRÖM, G. and L.RYDÉN. 1968. The copper - containing-oxidases. pp 415 - 438. "In" Biological Oxidations. T.P.Singer Ed. Interscience Publishers, New York.
- MASON, H.S. 1955. Comparative biochemistry of the phenolase complex. pp 105 - 184. "In" Advances in Enzymology. Interscience Publishers Inc. Vol. XVI. New York.
- MATSUSHITA, S., Y.NITTA, H.MAKINO and M.KOBAYASHI. 1969. A reaction of linoleate hydroperoxides with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. (Japan), 33: 1205 - 1206.
- McCREADY, R.M., 1970. Oligosaccharides. pp 551 - 539. "In" Methods in Food Analysis. 2nd Edition. M.A.Joslyn Ed. Academic Press, New York and London.
- MENCHU, J.F.E. 1966. La determinación de la calidad del café. Boletim nº 8. Asociación Nacional del Café. Guatemala. 51 pp.

- MENCHU, J.F.E., e E.IBARRA. 1967. The chemical composition and the quality of Guatemala coffee. pp. 144 - 154. A.S.I.C. Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts Torrefiés et leurs Derivés. Trieste. Juin, 1967.
- MERRIT, C.Jr., D.H.ROBERTSON, D.J.McADOO. 1969. The relationship of volatile compounds in roasted coffee beans to their precursors. pp.144-148. A.S.I.C. Quatrième Colloque International sur la Chimie des Cafés. Amsterdam, Juin 1969.
- MICHL, H. 1967. Techniques of eletrophoresis. pp 252 - 286. "In" Chromatography. E.Heftmann Ed. 2nd Edition. Reinhold Publishing Corporation, New York.
- MOORES, R.G., D.L.Mc DERMOTT and T.R.WOOD. 1948. Determination of chlorogenic acid in coffee. Analytical Chemistry, 20: 620 - 624.
- MORRIS, C.J.O.R. and P.MORRIS. 1963. Experimental methods of eletrophoresis. pp 664 - 770. "In" Separation Methods in Biochemistry. Sir Isaac Pitman & Sons Ltd. London.
- NAVELLIER, P. 1970. Coffee. pp 373 - 447. "In" Encyclo^{ped}ia of Industrial Chemical Analysis, Vol. 10. John Wiley & Sons, Inc.
- NORTHMORE, J.M. 1965. Some factors affecting the quality of Kenya coffee. Turrialba, 15(3): 184-193.

- NORTHMORE, J.M. 1967. Row bean color and the quality of Kenya Arabica Coffee. pp 405 - 414. A.S.I.C. Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés. Trieste, Juin 1967.
- OFFICE INTERNATIONAL DU CACAO ET DU CHOCOLAT. 1962. Methodes d'Analyse. Verlag Max Glättli, Zürich/Schweiz.
- OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 1965. pp 217. 10th Edition. Washington.
- OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 1970. pp 236. II Edition, W.Horwitz Ed, Washington, U.S.A.
- PICTET, G., H.BRANDENBERGER. 1960. Substances polyphe- nologiques des plantes. II. Separation des aci- des phenoliques du café vert et du café rô- ti. Journal of Chromatography, 4: 396 - 409.
- PICTET, G., A.MOREAU. 1969. Les glucides du café vert leur solubilization a l'eau et leur évalua- tion quantitative. pp 75 - 84. A.S.I.C. Qua- trième Colloque International sur la Chimie des Cafés. Amsterdam 1969.
- PIERPOINT, W.S. 1969a. o-Quinones formed in plant ex- tracts, their reactions with aminoacids and peptides. Biochemical Journal, 112: 609 - 616.
- PIERPOINT, W.S. 1969b. o-Quinones formed in plants ex- tracts, their reaction with bovine serum al- bumin. Biochemical Journal, 112: 619 - 629.

- POTTY, H.V. 1969. Determination of proteins in the presence of phenol and pectins. *Analytical Biochemistry*, 29: 535 - 539.
- QUESNEL, V.C. 1965. Agents inducing the death of cacao seeds during fermentation. *Journal of Science and Food Agriculture*, 16: 441 - 447.
- ROBSON, R.M., D.E.GOLL, M.J.TEMPLE. 1968. Influence of sucrose on protein determination by Lowry procedure. *Analytical Biochemistry*, 24: 337 - 352.
- ROBERTS, E.A.H. 1958. The chemistry of tea manufacture. *Journal of Science and Food Agriculture*, 9: 381 - 390.
- ROBINSON, J.B.D. 1960. Amber beans. *Kenya Coffee*, 25: 91 - 93.
- RODRIGUEZ, D.B., H.A.FRANK e H.Y.YAMAMOTO. 1969. Acetaldehyde as possible indicator of spoilage in green kona (HAWAIIAN) Coffee. *Journal of Science and Food Agriculture*, 20: 15 - 17.
- ROHAN, T.A. and G.NEIRINCKX. 1963. Colorimetric determination of the cocoa pigments. "In" *Analytical methods of the Office International du Cacao et du Chocolat*. pp 11-E/1963. Verlag Max Glatti.
- ROTEMBERG, B. e A.IACHAN. 1970. Método químico automático para diferenciação de "Café Bebida". *Revista Brasileira de Tecnologia*, 2: 67 - 69.

- SANINT, O.B., G.VALENCIA A. 1970. Actividad enzimática en el grano de café en relación con la calidad de la bebida. I. Duración de la fermentación. Cenicafé, (Colombia), 23: 59 - 71.
- SEIKEL, M.K. 1964. Isolation and identification of phenolic compounds in biological materials. pp 33 - 76. "In" Biochemistry of phenolic compounds. J.B.Harborne Ed. Academic Press, London and New York.
- SHADAKSHARASWAMY, M. and G.RAMACHANDRA. 1967. Changes in the oligosaccharides and the ~~α~~-galactosidase content of coffee seeds during soaking and germination. Phytochemistry, 7: 715 - 719.
- SIVETZ, M. e H.E.FOOTE. 1963. Chemical properties of coffee. pp 162 - 186. "In" Coffee processing tecnology. Vol.II. The Avi Publishing Company, Inc. Wesport, Connecticut.
- SMITH, R.F. 1963. Les acides chlorogéniques du café. pp 77 - 84. A.S.I.C., Première Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés e leurs Derivés. Paris, France. Mai 1963.
- SONDHEIMER, E., C.D.SZYMANSKI and J.W.CORSE. 1961. Isolation of chlorogenic acid and its isomers from coffee. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 9: 146 - 149.
- STREULI, H. 1970. Kaffee. pp 25. "In" Alkaloidhaltige genusemittel, gewürze, Kochsalz. J.Schormüller Ed. Spring-Verlag, Berlin.

- SWAIN, T. and W.E.HILLIS. 1959. The phenolic constituents of prunus domestica. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of Science and Food Agriculture*, 10:63 - 68.
- TEIXEIRA, A.A., F.PIMENTEL GOMES, A.CASTILHO, L.S.P. PEREIRA, V.F.CRUIZ. 1968. A influência de grãos prêtos em ligas com cafés de bebida mole. *Boletim do Instituto Brasileiro do Café*. Out. 1968.
- TEIXEIRA, A.A. e F.PIMENTEL GOMES. 1970. O defeito que mais prejudica o café. *Revista da Agricultura*, 45: 3 - 8.
- TEIXEIRA, A.A. 1971. Classificação de Café. "In" Simpósio sobre comercialização do café. Escola de Administração de Empresas de São Paulo da Fundação Getúlio Vargas e Fundação Itaú América. Setembro de 1971. S.P. Brasil.
- TELEDGY-KOVÁTZ, L., M.SZILAS-KELEMEN, D.TORLEY. 1963. Quelques observations sur les caractéristiques organoléptiques et la technologie des cafés Robusta. pp. 93 - 97. A.S.I.C., Première Colloque sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leur Dérivés. Paris, France, Mai 1963.
- THALER, H. 1963. Substances solubles et constituents aromatiques du café torréfié. pp. 72 - 76. A.S.I.C., Première Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts Torréfiés et leurs Dérivés. Paris, France. Mai 1963.

- THALER, H., W. ARNETH. 1967. Hophpolymere kohlenhydrate des rohen und gerösteten kaffees. pp 127-136. A.S.I.C. Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés. Trieste. Juin 1967.
- URITANI, I. 1961. The role of plant phenolic in disease resistance and immunity. pp 98 - 124. Symposium. Biochemistry of plant phenol substances. V.C. Runeckles Ed. (Colorado State University, Fort Collins), USA.
- VILAR, H., L.A. BRANCO FERREIRA. 1971. Como o ácido clorogênico pode contribuir para avaliar o quantitativo de café nos cafés solúveis com sucedaneos. A.S.I.C., Cinquième Colloque International sur la Chimie des Cafés. Lisbonne, June 1971.
- VALÊNCIA, G.A. e J.D.P. ARZOLLA. 1967. Análise cromatográfica quantitativa de açúcares. Boletim Didático, ESALQ, USP, nº 19, 12 pp.
- WALKER, J.R.L. and A.C. HULME. 1965. The inhibition of the phenolase from apple peel by polyvinylpyrrolidone. Phytochemistry, 4: 677 - 685.
- WEISS, L.C. 1957. Report on chlorogenic acid in coffee. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 40: 350 - 354.
- WOLFROM, M.L., R.A. PLUNKETT, and M.L. LAVER. 1960. Carbohydrates of the coffee bean. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 8: 58 - 65.

- WOLFROM, M.L., M.L.LAVER and D.L.PATIN. 1961. Carbohydrates of coffee beans. II. Isolation and characterization of a Mannan. *Journal of Organic Chemistry*, 26: 4533 - 4535.
- WOLFROM, M.L. and D.L.PATIN. 1964. Isolation and characterization of cellulose in the coffee bean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12(4): 376 - 377.
- WOLFROM, M.L. and D.L. PATIN. 1965. Carbohydrates of the coffee bean. IV. An arabinogalactan. *Journal of Organic Chemistry*, 30: 4060 - 4063.
- WOOD, B.J.B. and L.L.INGRAHAM. 1965. Labelled tyrosinase from labelled substrate. *Nature (London)*, 205: 291 - 292.
- WOODSIDE, E.E., C.A.FRICK and W.KOCHOLATY. 1965. Trichloroacetic acid soluble polysaccharide - protein complexes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 119: 327 - 331.
- WOOTON, A.E. 1963. The fermentation of coffee. East African Industrial Research Organization Report. C.R. 12. Sept. 1963.
- WURZIGER, J. 1963. Substances aromatiques volatiles oxydables comme complément d'appréciation du café torréfié et de ses préparations. pp. 85 - 92. A.S.I.C., Première Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés. Paris, France, Mai 1963.

WURZIGER, J., G.DICKHAUT. 1967. Über phenolische
substanzen in kaffeewachs. pp 121 - 126.
A.S.I.C., Troisième Colloque International
sur la Chimie des Cafés. Trieste, Italie.
Juin 1967.

WURZIGER, J., U.HARMS. 1969. Carbonsäure-hydroxy-
tryptamide in rohen und gerösteten kaffee-
bohnen. pp 85 - 91. A.S.I.C., Quatrième Col-
loque International sur la Chimie des Cafés.
Amsterdam, Juin 1969.

YOUNG, E.G. 1963. Occurrence, classification, prepa-
ration and analysis of proteins. pp 1 - 55.
"In" Comprehensive Biochemistry, vol 7.
(Part 1) M. Florkin and E.H.Stetz Ed. Else-
vier Publishing Company. Amsterdam.

TABELA A-35. Ácido clorogênico total, de grãos de café verde, expressos em porcentagens em relação ao material seco e às respectivas qualidades de bebida (cada valor numérico representa a média de três determinações).

Número da Amostra	Qualidade de Bebida	% ácido clorogênico Repetições			Média
		1ª	2ª	3ª	
1	Mole	6,27	6,43	5,67	6,94
2	Mole	7,23	7,28	7,23	
3	Mole	7,19	7,03	6,97	
4	Mole	6,23	6,51	6,56	
5	Mole	7,51	7,68	7,73	
6	Mole	7,10	7,21	7,21	
7	Duro	7,82	7,76	7,92	7,59
8	Duro	8,24	8,35	8,41	
9	Duro	7,01	6,95	6,90	
10	Duro	7,69	7,52	7,52	
11	Duro	7,65	7,60	7,65	
12	Duro	7,32	7,16	7,16	
13	Riado	7,09	7,09	6,98	7,38
14	Riado	7,48	7,80	8,02	
15	Riado	7,53	7,53	7,47	
16	Riado	8,09	7,82	7,82	
17	Riado	7,12	6,96	6,96	
18	Riado	6,89	7,05	7,22	
19	Rio	7,48	7,48	7,43	7,42
20	Rio	7,52	7,36	7,25	
21	Rio	6,89	6,99	7,05	
22	Rio	7,85	7,53	7,63	
23	Rio	7,16	7,60	7,71	
24	Rio	7,74	7,52	7,47	

Análise de Variância

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamentos	3	4,0813	1,3604	7,34**
Resíduo	68	12,5881	0,1851	
Total	71	16,6695		

d.m.s. 5% = 0,37

Erro da Média = 0,1014 Coef. Var. = 5,86%

TABELA A-36. Fenóis totais solúveis em água, de grãos de café verde, expressos em porcentagem em relação ao material seco e às respectivas qualidades de bebida (cada valor numérico representa a média de três determinações).

Número da Amostra	Qualidade de Bebida	% Fenóis totais Sol. em água Repetições		Média
		1ª	2ª	
1	Mole	6,95	6,85	
2	Mole	8,63	9,03	
3	Mole	8,29	8,34	8,06
4	Mole	7,65	7,11	
5	Mole	8,54	7,26	
6	Mole	9,06	9,13	
7	Duro	8,36	7,31	
8	Duro	9,07	8,32	
9	Duro	7,49	7,39	7,92
10	Duro	8,29	8,66	
11	Duro	7,62	8,05	
12	Duro	7,01	7,59	
13	Riado	7,56	7,94	
14	Riado	7,92	6,85	
15	Riado	7,97	8,96	7,93
16	Riado	9,32	9,17	
17	Riado	7,11	7,50	
18	Riado	7,14	7,76	
19	Rio	8,02	8,20	
20	Rio	6,68	7,84	
21	Rio	7,55	7,37	8,08
22	Rio	8,67	8,85	
23	Rio	8,17	8,09	
24	Rio	8,44	9,09	

Análise de Variância

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	3	0,2487	0,0829	0,14
Resíduo	44	24,6845	0,5610	
Total	47	24,9333		

d.m.s. 5%=0,81

Erro da média= 0,2162

Coef. Var.= 9,35%

TABELA A-37. Fenóis totais solúveis em metanol a 80% de grãos de café verde, expressos em porcentagens em relação ao material seco e às respectivas qualidades de bebida (cada valor numérico representa a média de três determinações).

Número da Amostra	Qualidade de Bebida	Fenóis totais sol. Metanol a 80%		Média
		Repetições		
		1ª	2ª	
1	Mole	7,34	7,29	
2	Mole	8,50	8,51	
3	Mole	7,79	8,05	7,95
4	Mole	7,36	7,04	
5	Mole	8,90	7,46	
6	Mole	8,65	8,61	
7	Duro	8,16	8,71	
8	Duro	9,21	8,87	
9	Duro	7,27	7,36	8,26
10	Duro	7,69	8,35	
11	Duro	8,76	8,86	
12	Duro	7,68	8,23	
13	Riado	7,10	7,36	
14	Riado	9,13	7,42	
15	Riado	7,28	8,44	8,02
16	Riado	8,83	8,84	
17	Riado	7,70	7,94	
18	Riado	8,10	8,18	
19	Rio	7,59	7,52	
20	Rio	8,82	9,13	
21	Rio	8,16	7,78	8,07
22	Rio	8,66	9,17	
23	Rio	7,84	7,65	
24	Rio	7,19	7,43	

Análise de Variância

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamento	3	0,6113	0,2037	0,45
Resíduo	44	19,6090	0,4456	
Total	47	20,2204		

d.m.s. 5% = 0,72

Erro da média = 0,19

Coef.Var. = 2,6202

TABELA A-38. Carboidratos livres totais solúveis em etanol a 80%, de grãos de café verde, expressos em porcentagens em relação ao material seco e às respectivas qualidades de bebida (cada valor numérico representa a média de três determinações).

Número da Amostra	Qualidade de Bebida	% carboidratos			Média
		1ª	2ª	3ª	
1	Mole	13,74	12,12	12,12	10,96
2	Mole	11,09	11,09	10,78	
3	Mole	9,70	9,98	9,91	
4	Mole	9,98	9,96	10,14	
5	Mole	11,36	11,51	11,47	
6	Mole	10,39	10,78	11,33	
7	Duro	10,49	10,52	11,53	10,51
8	Duro	10,95	10,33	10,23	
9	Duro	10,77	10,92	10,52	
10	Duro	9,43	9,85	10,61	
11	Duro	10,59	10,80	10,59	
12	Duro	10,18	9,97	10,94	
13	Riado	10,21	10,82	10,60	10,81
14	Riado	14,89	12,75	11,50	
15	Riado	11,57	11,18	11,02	
16	Riado	9,08	9,53	9,01	
17	Riado	8,11	7,69	8,80	
18	Riado	13,86	13,30	10,74	
19	Rio	10,05	10,34	10,26	10,06
20	Rio	9,91	10,54	11,23	
21	Rio	10,63	11,22	11,50	
22	Rio	8,94	9,43	8,53	
23	Rio	10,59	10,80	10,59	
24	Rio	8,80	8,70	9,05	

Análise de Variância

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamentos	3	8,6317	2,8772	1,89
Resíduo	68	103,3947	1,5205	
Total	71	112,0264		

d.m.s. 5% = 1,08

Erro da média = 0,2906

Coef. Var. = 11,64%

TABELA A-39. Açúcares redutores, de grãos de café verde, expressos em porcentagens em relação ao material seco e às respectivas qualidades de bebida (cada valor numérico representa a média de duas determinações).

Número da Amostra	Qualidade de Bebida	Repetições			Média
		1ª	2ª	3ª	
1	Mole	0,75	0,78	0,75	
2	Mole	1,03	1,05	1,05	
3	Mole	0,68	0,65	0,65	0,82
4	Mole	0,65	0,75	0,70	
5	Mole	0,80	0,80	0,83	
6	Mole	0,96	0,90	1,00	
7	Duro	0,85	0,85	0,83	
8	Duro	0,70	0,90	0,85	
9	Duro	0,80	0,85	0,80	0,96
10	Duro	0,88	0,96	1,00	
11	Duro	0,80	0,88	1,03	
12	Duro	1,45	1,47	1,53	
13	Riado	0,83	0,80	0,73	
14	Riado	0,63	0,60	0,60	
15	Riado	0,85	0,83	0,85	0,85
16	Riado	0,98	0,95	1,13	
17	Riado	0,75	0,75	0,78	
18	Riado	1,00	1,05	1,20	
19	Rio	0,76	0,76	0,80	
20	Rio	0,85	0,75	0,86	
21	Rio	0,86	0,78	0,85	0,83
22	Rio	0,85	1,00	1,03	
23	Rio	0,70	1,03	0,78	
24	Rio	0,75	0,78	0,78	

Análise de Variância

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamentos	3	0,0833	0,2500	2,73
Resíduo	68	0,0304	2,0711	
Total	71	2,3211		

d.m.s. 5% = 0,15

Erro da média = 0,0411

Coef.Var. = 20,10%

TABELA A-40. Nitrogênio total, de grãos de café verde, expressos em porcentagens em relação ao material seco e às respectivas qualidades de bebida (cada valor numérico representa uma determinação).

Número da Amostra	Qualidade de Bebida	% Nitrogênio Repetições			Média
		1ª	2ª	3ª	
1	Mole	2,61	2,54	2,69	2,55
2	Mole	2,17	2,28	2,28	
3	Mole	2,56	2,64	2,67	
4	Mole	2,59	2,69	2,59	
5	Mole	2,87	2,56	2,88	
6	Mole	2,43	2,46	2,43	
7	Duro	2,77	2,70	2,77	2,66
8	Duro	2,76	2,63	2,75	
9	Duro	2,86	2,78	2,82	
10	Duro	2,46	2,53	2,45	
11	Duro	2,82	2,98	2,64	
12	Duro	2,32	2,48	2,40	
13	Riado	2,76	2,62	2,69	2,62
14	Riado	2,65	2,50	2,67	
15	Riado	2,79	2,62	2,76	
16	Riado	2,80	2,74	2,65	
17	Riado	2,33	2,29	2,35	
18	Riado	2,69	2,62	2,65	
19	Rio	2,61	2,64	2,46	2,55
20	Rio	2,45	2,52	2,50	
21	Rio	2,78	2,73	2,84	
22	Rio	2,53	2,67	2,75	
23	Rio	2,51	2,47	2,44	
24	Rio	2,36	2,38	2,19	

Análise de Variância

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamentos	3	0,1610	0,0536	1,77
Resíduos	68	2,0581	0,0302	
Total	71	2,2192		

d.m.s. 5% = 0,15

Erro da média = 0,410

Coef.Var. = 6,69%

TABELA A-41. Proteína solúvel em tampão fosfato pH 7,0 0,01 M precipitadas com TCA, de grãos de café verde, expressas em porcentagem em relação ao material seco e às respectivas qualidades de bebida (cada valor numérico representa a média de duas determinações).

Número da Amostra	Qualidade de Bebida	% Proteínas Repetições			Média
		1ª	2ª	3ª	
1	Mole	3,76	4,03	4,38	3,78
2	Mole	2,99	3,35	3,43	
3	Mole	4,06	3,01	4,06	
4	Mole	3,99	3,63	3,37	
5	Mole	4,38	4,38	4,38	
6	Mole	3,70	3,43	3,70	
7	Duro	4,14	4,57	3,96	3,77
8	Duro	4,60	3,62	3,54	
9	Duro	4,23	3,97	3,78	
10	Duro	3,29	3,03	3,38	
11	Duro	4,11	4,02	4,19	
12	Duro	2,79	3,49	3,23	
13	Riado	3,95	4,21	3,59	3,77
14	Riado	4,30	4,30	3,77	
15	Riado	4,13	3,95	3,60	
16	Riado	3,96	3,52	3,61	
17	Riado	3,26	3,35	2,64	
18	Riado	3,60	3,96	4,22	
19	Rio	3,54	3,10	2,93	3,45
20	Rio	3,62	3,18	3,10	
21	Rio	4,31	4,22	4,39	
22	Rio	3,99	3,98	3,18	
23	Rio	3,26	2,91	2,72	
24	Rio	3,07	3,07	3,59	

Análise de Variância

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamento	3	1,4036	0,4678	2,01
Resíduo	68	15,7693	0,2319	
Total	71	17,1730		

d.m.s. 5% = 0,42

Erro da média = 0,1135

Coef.Var. = 13,03%

TABELA A-42. Proteína solúvel em NaCl a 10%, precipitadas com TCA, de grãos de café verde, expressas em porcentagem em relação ao material seco e às respectivas qualidades de bebida (cada valor numérico representa a média de duas determinações).

Número da Amostra	Qualidade de Bebida	% Proteína Repetições			Média
		1ª	2ª	3ª	
1	Mole	3,33	2,97	3,50	3,51
2	Mole	2,81	3,26	2,90	
3	Mole	4,06	3,72	3,89	
4	Mole	3,99	3,06	3,28	
5	Mole	4,47	4,21	4,21	
6	Mole	3,17	3,08	3,43	
7	Duro	4,74	4,74	3,52	3,76
8	Duro	4,33	3,62	3,62	
9	Duro	4,31	3,97	3,35	
10	Duro	3,21	2,84	3,12	
11	Duro	4,11	3,76	4,02	
12	Duro	3,67	3,49	3,32	
13	Riado	3,86	3,69	3,33	3,51
14	Riado	4,04	4,04	3,68	
15	Riado	3,69	3,87	3,51	
16	Riado	3,70	3,34	3,52	
17	Riado	3,00	3,00	2,64	
18	Riado	2,90	3,69	3,78	
19	Rio	3,63	3,10	3,02	3,24
20	Rio	3,44	3,10	2,91	
21	Rio	3,87	3,70	3,96	
22	Rio	3,53	3,36	2,92	
23	Rio	2,72	2,81	2,64	
24	Rio	3,42	3,25	3,02	

Análise de Variância

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamento	3	2,4265	0,8088	3,74 ^x
Resíduo	68	14,6840	0,2159	
Total	71	17,1105		
d.m.s. 5% = 0,40		Erro da média = 0,1095	Coef. Var. 13,23%	

TABELA A-43. Comportamento eletroforético em gel-agar das proteínas provenientes das 24 amostras segundo a qualidade da bebida.

Número da Amostra	Qualidade de Bebida	Repetições		Média	M.Geral
		1ª	2ª		
1	Mole	+ 5	+ 7	+ 6,0	
2	Mole	+10	+12	+11,0	
3	Mole	+ 5	+ 2	+ 3,5	+ 5,5
4	Mole	+12	+ 7	+ 9,5	
5	Mole	+14	+15	+14,5	
6	Mole	-12	-11	-11,5	
7	Duro	- 8	- 4	- 6,0	
8	Duro	- 3	- 3	- 3,0	
9	Duro	- 8	- 6	- 7,0	- 5,8
10	Duro	+ 1	+ 2	+ 1,5	
11	Duro	-16	-12	-14,0	
12	Duro	- 7	- 6	- 6,5	
13	Riado	-10	-11	-10,5	
14	Riado	+11	+15	+13,0	
15	Riado	-14	-12	-13,0	- 1,3
16	Riado	+ 2	+14	+ 8,0	
17	Riado	+ 2	+ 3	+ 2,5	
18	Riado	- 4	-12	- 9,0	
19	Rio	+18	+ 5	+11,5	
20	Rio	-18	-16	-17,0	
21	Rio	- 3	0	- 1,5	
22	Rio	- 8	-10	- 9,0	- 7,1
23	Rio	-14	-14	-14,0	
24	Rio	-15	-11	-13,0	

Análise de Variância

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamentos	3	1174,9166	391,6388	4,75**
Resíduo	44	3625,0000	82,3862	
Total	47	4799,9166		

d.m.s. 5% = 9,87

Erro da média = 2,6202

TABELA A-44. Relação em gramas do composto por grama de nitrogênio total de grãos de café verde, segundo a qualidade de bebida.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Mole	4,85	0,29	2,80	2,64	2,34	1,56	1,25
2	Mole	4,91	0,46	3,79	3,94	3,24	1,46	1,33
3	Mole	3,76	0,25	3,02	3,17	3,69	1,42	1,48
4	Mole	3,82	0,27	2,75	2,82	2,45	1,40	1,31
5	Mole	4,13	0,29	2,95	2,85	2,76	1,58	1,55
6	Mole	4,44	0,39	3,54	3,73	2,44	1,48	1,32
7	Duro	3,87	0,30	3,34	3,21	3,07	1,45	1,42
8	Duro	3,81	0,29	2,59	2,64	2,46	1,41	1,38
9	Duro	4,02	0,38	3,23	3,42	3,06	1,30	1,23
10	Duro	3,79	0,32	3,14	2,79	2,72	1,46	1,41
11	Duro	4,32	0,62	3,31	3,04	3,00	1,32	1,45
12	Duro	3,95	0,31	3,07	2,85	2,85	1,53	1,57
13	Riado	3,92	0,29	2,69	2,88	2,62	1,46	1,35
14	Riado	5,00	0,23	3,17	2,83	2,98	1,58	1,50
15	Riado	4,14	0,31	2,89	3,11	2,76	1,43	1,36
16	Riado	3,37	0,37	3,23	3,38	2,90	1,36	1,29
17	Riado	3,53	0,33	3,37	3,15	3,02	1,33	1,24
18	Riado	4,77	0,41	3,07	2,81	2,66	1,48	1,31
19	Rio	3,98	0,30	2,94	3,16	2,90	1,24	1,26
20	Rio	4,19	0,33	3,56	2,88	2,93	1,31	1,25
21	Rio	4,00	0,30	2,87	2,68	2,51	1,55	1,28
22	Rio	3,38	0,36	3,36	3,31	2,88	1,40	1,23
23	Rio	4,32	0,34	3,13	3,29	3,03	1,20	1,10
24	Rio	3,83	0,33	3,16	3,79	3,28	1,40	1,40
An.var. F.		0,87	0,44	0,11	0,46	1,23	2,00	1,87
Signif.a 5%		N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

LEGENDA:

- 1= Número da Amostra
- 2= Qualidade de Bebida
- 3= Carboidrato
- 4= Açúcar Redutor
- 5= T.Fenol Metanól
- 6= T.Fenol Água
- 7= Ácido Clorogênico
- 8= Proteína Solúvel Tampão
- 9= Proteína Solúvel NaCl.