

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Hilary Castle de Menezes e aprovada pela Comissão Julgadora em 18.06.90.
Campinas, 18 de junho de 1990.

Morris W. Montgomery

MENEZES

VARIAÇÃO DOS MONOISÔMEROS E DIISÔMEROS DO ÁCIDO
CAFEOILQUÍNICO COM MATURAÇÃO DE CAFÉ

HILARY CASTLE DE MENEZES

Bacharel em Ciências de Alimentos

Mestre em Ciências de Alimentos

11/90

PROF. DR. MORRIS W. MONTGOMERY

- Orientador -

Trabalho de tese apresentado à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Morris W. Montgomery

Prof. Dr. Morris William Montgomery
(Orientador)

Délia R. Amaya

Prof.^a Dr.^a Délia Rodrigues Amaya
(membro)

Eldionar Angelucci

Prof. Dr. Eldionar Angelucci
(membro)

Prof. Dr. Nelson Horacio Pezoa García
(membro)

João Shojiro Tango

Prof. Dr. João Shojiro Tango
(membro)

Suplente

Prof. Dr. Olavo Rusig
(membro)

Suplente

Prof. Dr. Yong Kun Park
(membro)

Campinas, 18 de *junho* de 1990.

Ao Tobias

Henrique

Angela

Alexandre

com profunda gratidão e amor

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Morris William Montgomery pela orientação segura e precisa, apoio e incentivo.

Ao Professor Reinaldo Charnet pela valiosa colaboração no trabalho estatístico.

Aos Professores Délia Rodriguez Amaya, Eidiomar Angelucci, Nelson Horacio Pezoa Garcia, João Shojiro Tango, Olavo Rusig e Yong Kun Park pelas sugestões na redação final deste trabalho.

Ao Instituto Brasileiro do Café/Fundação do Café, Campinas - S.P., pelo fornecimento da matéria-prima usada neste trabalho.

Aos colegas Ângela M. Gazineu de Azevedo e José Guilherme Cortez pelo apoio e colaboração.

Ao colega José Luis R. Ascheri pela valiosa colaboração no trabalho computacional.

Às colegas Ana Enpien Koon, Cristina A.P. de Souza Sartoretto e Natalina J. Guadagnini pela colaboração nos ensaios laboratoriais.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos pelas facilidades oferecidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela ajuda econômica facultada.

À FAPESP pela ajuda econômica facultada.

Ao Conselho Britânico pela ajuda econômica facultada.

À Associação Brasileira da Indústria de Alimentos (ABIA) pelo auxílio financeiro para a impressão deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da FEA pelo apoio e compreensão.

A todos que, de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

	Pág.
Lista de tabelas	VII
Lista de figuras	IX
Lista de Anexos	XI
Resumo	XII
Summary	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. Importância no Brasil	6
2.1.1. História	6
2.1.2. Importância no desbravamento do país	6
2.1.3. Papel na imigração para o Brasil	7
2.1.4. Café como produto para exportação	7
2.1.5. Crises na exportação	8
2.1.6. Papel na economia brasileira	8
2.1.7. Mercados externos e internos	9
2.2. Colheita	10
2.3. Preparo do café cru	11
2.3.1. Via seca	12
2.3.2. Via úmida	13
2.4. Beneficiamento	17

	Pág.
2.5. Café Arábica. Fatores que afetam a qualidade	18
2.5.1. Aspectos gerais	18
2.5.2. Definição de qualidade	19
2.5.3. Atividade de água	20
2.5.4. Cafeína	20
2.5.5. Aminoácidos e proteínas	20
2.5.6. Enzimas	21
2.5.7. Carboidratos	22
2.5.8. Lipídeos	23
2.5.9. Pigmentos	23
2.5.10. Aroma e sabor	24
2.5.11. Corpo da bebida	27
2.6. Polifenoloxidase	28
2.7. Ácidos clorogênicos	29
2.7.1. Estrutura	29
2.7.2. Localização e ocorrência	33
2.7.3. Efeito da torração	34
2.7.4. Influência na bebida	36
2.7.5. Efeito na saúde	37
2.7.6. Variação com a maturação	37
2.7.7. Efeitos organolépticos	38
2.7.8. Função na planta	39
2.7.9. Extração e análise quantitativa	40

	Pág.
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1. Matéria-prima	44
3.2. Preparação do café	45
3.2.1. Via seca	45
3.2.2. Via úmida	45
3.3. Beneficiamento	46
3.4. Extração dos ácidos clorogênicos	46
3.5. Determinação de ácido clorogênico total	46
3.6. Análise dos isômeros do ácido clorogênico	47
por cromatografia líquida de alta performance	47
3.7. Determinação de umidade	58
3.8. Extração de polifenoloxidase	58
3.9. Determinação da atividade de polifenoloxidase	59
3.10. Determinação de proteína nos extratos de	
polifenoloxidase	59
3.11. Avaliação de ACQ e ADCQ como substrato da	
polifenoloxidase do café	60
3.12. Classificação da bebida do café	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1. Ensaios preliminares	63
4.2. Variação da % de ácido clorogênico total	
com a maturação	64

	Pág.
4.3. Variação da % de monoisômero de ácido clorogênico com maturação	70
4.4. Variação da % de diisômero de ácido clorogênico com a maturação	74
4.5. Variação da soma da % de monoisômero mais % de diisômero com a maturação	78
4.6. Variação da relação da % de monoisômero: % de diisômero com a maturação	83
4.7. Análise Estatística da variação da relação de % de monoisômero: % de diisômero com a maturação pelas duas vias	93
4.8. Análise de uma mistura típica colhida por derrigagem	97
4.9. Classificação do café	98
4.10. Variação da atividade de polifenoloxidase com a maturação nas amostras beneficiadas	99
4.11. Isômeros do ácido clorogênico como substratos da polifenoloxidase do café.	101
5. CONCLUSÕES	103
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

LISTA DE TABELAS

Tabela Nº		Pág.
1	Classificação das cerejas pela cor	44
2	Classificação da bebida do café	62
3	Variação da % de ácido clorogênico total com maturação - via seca	67
4	Variação da % de ácido clorogênico total com a maturação - via úmida	67
5	Variação da % de monoisômero com a maturação - via seca	71
6	Variação da % de monoisômero com a maturação - via úmida	71
7	Variação da % de diisômero com a maturação - via seca	76
8	Variação da % de diisômero com a maturação - via úmida	78
9	Variação da soma das % de monoisômero mais diisômero (HPLC) - via seca	80
10	Variação da soma das % de monoisômero mais diisômero (HPLC) - via úmida	80
11	Variação da relação das % de monoisômero: diisômero com a maturação - via seca	85
12	Variação da relação das % de monoisômero: % diisômero com a maturação - via úmida	85
13	Resultados da análise de variância	94
14	Resultados do teste de comparação de médias com o fator de maturação (Teste de Duncan)	95

Tabela Nº		Pág.
15	Resultados do teste de comparação de médias com o fator "vias de preparo" (Teste de Duncan)	96
16	Proporção típica de grãos de diferentes graus de maturação na colheita por derrigagem	97
17	Teores de ACQ e ADCQ encontrados em amostras mistas de café	98
18	Variação da atividade de polifenoloxidase com o grau de maturação	100
19	Variação da atividade específica da polifenoloxidase com a maturação	100

LISTA DE FIGURAS

Fig. N°		Pág.
1	Corte transversal de cereja de café	12
2	Estrutura do ácido quínico	30
3	Ácidos cinâmicos que ocorrem em ácidos clorogênicos	31
4	Dois isômeros do ácido clorogênico	31-2
5	Cromatograma típico dos isômeros do ácido cafeoil- quínico	51
6	Variação da relação % ACQ/% ADCQ com a maturação - amostras de 1985	65
7	Variação da % de ácido clorogênico total com a maturação - via seca	68
8	Variação da % de ácido clorogênico total com a maturação - via úmida	69
9	Variação da % de monoisômero com maturação- via seca	72
10	Variação da % de monoisômero com a maturação - via úmida	73
11	Variação da % de diisômero com a maturação- via seca	77
12	Variação da % de diisômero com a maturação- via úmida	79
13	Variação da soma (% monoisômero + % diisômero) com a maturação - via seca	81
14	Variação da soma (% monoisômero + % diisômero) com a maturação - via úmida	82
15	Variação da relação % monoisômero: % diisômero com a maturação - via seca	86
16	Variação da relação % monoisômero: % diisômero com a maturação - via úmida	87

17	Variação da relação % monoisômero: % diisômero com a maturação pelas duas vias	89
18	Atividade da polifenoloxidase do café com os monoisômeros e diisômeros do ácido clorogênico.	102

LISTA DE ANEXOS

Anexo N°		Pág.
1	Classificação e teor de sólidos das amostras	129
2	Curva padrão de ácido 5-cafeoilquínico	137
3	Cálculo da % de ácido clorogênico das amostras	138
4	Porcentagem de ácido clorogênico total	140
5	Porcentagem dos diferentes isômeros	142
6	Análise estatística da relação ACQ/ADCQ, modelo completo com os dados	150
7	Variação da % de monoisômero por grupos de maturação (valores médios das repetições) - via seca	159
8	Variação da % de monoisômero por grupo de maturação (valores médios das repetições) - via úmida	161
9	Variação da % de diisômero por grupo de maturação (valores médios das repetições) - via seca	163
10	Variação da % de diisômero por grupo de maturação (valores médios das repetições) - via úmida	165
11	Curva padrão de albumina de sôro de boi	167
12	Teor de proteína nos extratos enzimicos (base peso seco)	168
13	Atividade de polifenoloxidase nos extratos enzimicos (base peso seco)	170

RESUMO

O objetivo principal desta pesquisa foi verificar a existência ou não de uma variação da relação entre os monoisômeros e os diisômeros do ácido dicafeoilquínico durante a maturação de café, uma vez que uma variação deste tipo poderia afetar diretamente a qualidade da bebida. As análises foram feitas em cafés arábicas cv Catuai vermelho preparados tanto por via úmida como por via seca.

Foi demonstrado uma alta significância entre a relação % monoisômero: % diisômero com a maturação desde o estágio verde à grão passa. Os resultados indicam que a inclusão de grãos parcialmente verdes prejudicaria o sabor da bebida por estes grãos apresentarem relações inferiores aos demais. Os altos teores nos grãos verdes, estágio em que a qualidade é comprovadamente baixa, indicam que neste estágio, outros fatores estão em maior relevância. Foi demonstrado também que as vias de preparo influenciaram significativamente na relação e a via úmida sempre apresentou valores superiores.

Finalmente, concluiu-se que não há relação significativa entre o grau de maturação e os seguintes parâmetros: % ácido clorogênico total, % monoisômero total, % diisômero total, a soma de % monoisômero + % diisômero, a atividade da polifenoloxidase (PPO) e a atividade específica da PPO. Foi demonstrado que a PPO extraída do café atuou tanto nos monoisômeros extraídos do mesmo café como nos diisômeros, embora a velocidade da reação seja um pouco maior com os monoisômeros como substrato.

SUMMARY

The main objective of this research was to ascertain whether or not a variation in the ratio %monoisomer:% diisomer of coffee caffeoilquinic acid occurred during maturation, since such a variation could directly affect cup quality.

The analyses were carried out in samples of *Coffea arabica* cv Catuai vermelho, prepared both by the dry and wet processing methods.

A high level of significance was found between the ratio % monoisomer: % diisomer and maturity, from the partially green to the overripe stages. The results indicated that the inclusion of partially green berries could negatively affect beverage flavour, since the beans from these berries showed lower ratios than the remainder. The high ratios found in the beans from totally green berries, a stage known to produce a low quality beverage, indicated that in this stage other factors were more relevant. It was also shown that the processing methods significantly affected the ratio, the wet method always presenting higher values than the dry method.

Finally it was concluded that there was no significant relation between the maturity level and the following parameters: % total chlorogenic acid, % total monoisomer, % total diisomer, the sum of % monoisomer + % diisomer, and the activity and specific activity of the coffee polyphenoloxidase (PPO). It was shown that the PPO extrated from the coffee attacked both the monoisomers and the diisomers extracted from the same coffee, although the reaction velocity was slightly higher with the monoisomers as substrate.

1. INTRODUÇÃO

A utilização do café como bebida é tão velha quanto as montanhas e as referências mais antigas sobre o café aparentemente ocorrem no Velho Testamento da Bíblia. (SMITH, R.F.1985).

Existem numerosas lendas sobre a introdução da bebida de café, mas a mais conhecida é a historia de Kaldi, um jovem que tomava conta de cabritos nas colinas em volta de um monastério nas bordas do Mar Vermelho. Ele observou que os cabritos, após mastigar as cerejas dos cafeeiros selvagens que lá cresciam, ficavam excitados. Um monge, observando isto, pegou algumas das cerejas, as secou e torrou e preparou uma bebida a qual serviu aos demais monges para que eles permanecessem mais acordados durante as orações noturnas (SMITH, R.F. 1985).

A palavra "café" tem sua origem na palavra arábica "quahweh" que afirmam ser uma palavra poética para o vinho. Os muçulmanos usavam esta mesma palavra para a bebida do café uma vez que eram proibidos de beber vinho. A palavra equivalente na Turquia era "kahweh" que se tornou "café" (Francês, Português), "caffé" (Italiano), "kaffee" (Alemão), "Kaffie" (Holandês) e "coffee" (Inglês), além do nome latino do genero "Coffea". (SMITH, R.F.1985). O cafeeiro selvagem *Coffea arabica* é nativo da Etiópia onde foi descoberto em torno de 850 D.C. e cultivado na colônia árabe Harar. O cultivo espalhou-se até a Meca de onde foi levado para casa pelos peregrinos de outras regiões islâmicas (SMITH, R.F. 1985; GRAAF, 1986).

Posteriormente, duas outras espécies foram descobertas na

Africa, a *Coffea liberica* e a *Coffea canefora* (robusta), esta última sendo um cruzamento entre *C. arabica* e *C. liberica*. A *C. arabusta*, desenvolvida na Costa do Marfim, é um cruzamento mais recente (arábica- robusta). Existem outros cafés selvagens com diferentes características mas que não tem importância comercial.

O café é um produto tropical produzido quase que exclusivamente em países em desenvolvimento e ,por enquanto, não enfrenta nenhuma ameaça séria de substitutos produzidos nos países desenvolvidos.

Atualmente o mercado internacional do café é controlado pelo "International Coffee Agreement"(Acordo Internacional de Café), que controla tanto os preços como as quotas que podem ser vendidas pelos países produtores. Esta organização classifica 4 tipos principais de café.

- Arábica não lavados (Brasil, Etiópia)
- Suaves colombianos (Colômbia, Quênia, Tanzânia)
- Outros suaves (América Central, Índia)
- Robusta (Costa do Marfim, Indonésia, Uganda, Filipinas e

Camarões

A espécie arábica de café representa, dentro do mercado internacional do produto, mais de 75% do total do volume comercializado, principalmente graças às suas características organolépticas mais favoráveis ao consumo. Neste mesmo mercado, porém, os cafés arábica são divididos em dois grupos: os denominados "bebida suave", produzidos na Colômbia, Quênia e diversos países da América Central e caracterizados por sabor e aroma agradáveis; e os classificados como "arábica, não lavados" de cotação inferior e frequentemente descritos como apresentando

um gosto "adstringente, metálico e amargo".

Esta diferença de qualidade é atribuída, principalmente, às condições climáticas de cada região de produção e que determinam, por sua vez, um sistema de colheita e processamento estreitamente relacionados com a qualidade da bebida resultante. Assim, nas regiões produtoras de "cafés finos", as condições de temperatura e precipitação pluviométrica são extremamente favoráveis para uma produção quase contínua de grãos durante o ano e, também, para o surgimento de processos fermentativos prejudiciais para a qualidade da bebida, exigindo que a colheita seja feita "a dedo" e que o café seja processado o mais rapidamente possível. Estes cuidados contra a deterioração sugerem, portanto, que nestes tipos seja explorado todo o potencial da espécie arábica quanto ao gosto e ao aroma do produto.

Entretanto, as condições climáticas nas regiões produtoras dos cafés descritos como "arábica não lavados" determinam etapas mais ou menos fixas da fenologia do cafeeiro (como florescimento, frutificação e maturação dos frutos) e permitem, graças ao clima seco e frio na época da colheita, que o café seja "derriçado no chão" e colhido alguns dias após. Este processo favorece, conseqüentemente, a ação de agentes fermentativos consistindo de um material mais heterogêneo, pois a fase final de maturação é relativamente curta e nem sempre facilmente perceptível.

A qualidade da bebida é função, portanto, das condições climáticas das zonas de produção e dos sistemas de colheita e processamento do café, decorrentes do clima. Outros fatores, porém, podem interferir na avaliação organoléptica da bebida, como é o caso do balanço de nutrientes fornecidos à planta (AMORIM et

alii, 1967, 1973c; AMORIM, 1970; NORTHMORE, 1985) ou pela quantidade de grãos imperfeitos. Especialmente nos cafés brasileiros, onde o grau de seleção é menor e a distinção entre grãos maduros e imaturos nem sempre é perceptível, a ação de um fator (ou a somatória deles) é que pode estar ligada às descrições de "bebida adstringente, metálica, amarga" que caracterizam a qualidade do café brasileiro.

Quimicamente, não se notam diferenças significativas no âmbito dos principais compostos do café, em função da qualidade da bebida. Relações entre a atividade enzimica da polifenoloxidase (PPO) e a qualidade do café foram estabelecidas anteriormente (AMORIM e SILVA, 1968; OHIOKPHAI et alii, 1982). Mais recentemente, pesquisas realizadas na Inglaterra tem indicado que durante a maturação dos grãos, a proporção molar entre o ácido cafeoilquínico (ACQ) e o ácido dicafeoilquínico (ADCQ) inicialmente diminui, para depois aumentar significativamente nos últimos dias de maturação. Neste caso, a relação ACQ:ADCQ é sensivelmente maior nos grãos completamente maduros que naqueles em fase final de maturação, e conseqüentemente, menor naqueles grãos facilmente caracterizados como imperfeitos.

Ainda sobre este assunto e utilizando o teste triangular de degustação do café (OHIOKPEHAI et alii, 1982), foi demonstrado que a adição de ADCQ à bebida confere à esta um gosto desagradável e bastante semelhante à descrição dos cafés brasileiros. Também foi demonstrado que o ACQ diminui o efeito "ácido" do ADCQ. Assim, esta relação poderá estar associada ao sistema de colheita e processamento do café, explicando uma das alterações da bebida considerada "suave", ou fundamentando a alteração da tabela de

classificação do café brasileiro, ressaltando a importância da qualidade de grãos imaturos em uma saca de café e permitindo, com isso, a diminuição do deságio de cafo brasileiro.

O objetivo desta pesquisa foi acompanhar as modificações na relação entre o ADCQ e ACQ durante a maturação, desde o grão verde até o grão passa, para poder constatar qualquer correlação entre mudanças nesta relação e o grau de maturação e/ou com a via de preparo. Também foi analisada a atividade de PPO nas mesmas amostras a fim de se verificar se é o ADCQ ou o ACQ ou ainda ambos os compostos, que servem de substrato para o PPO, uma vez que existem evidências que esta enzima utiliza o ACQ mas não o ADCQ.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. IMPORTÂNCIA DO CAFÉ NO BRASIL.

2.1.1. HISTÓRIA.

A primeira muda de café chegou ao Brasil em 1727, quando um oficial brasileiro visitando a Guiana Francesa, recebeu a muda escondida num "bouquet" de flores que ele recebeu da esposa do Governador. Isto iniciou o império brasileiro de café. Henrique Santos-Dumont, pai de Alberto Santos-Dumont, fez parte desta história. Ele foi conhecido como o rei do café, uma vez que possuía um cafezal com 5 milhões de pés plantados em suas propriedades (SMITH, R.F. 1985). Desde então a produção do café tem ocupado uma posição de destaque na economia brasileira.

Na era colonial, as administrações governamentais consideravam o café um produto excelente para exportação e, em muitos casos, aumentavam a sua produção após ter ocorrido a queda nas vendas no mercado mundial de algum outro produto, como o fumo por exemplo (GRAAFF, 1986).

2.1.2. IMPORTÂNCIA NO DESBRAVAMENTO DO PAÍS.

No Brasil, o café foi inicialmente cultivado nas áreas próximas do litoral por razões de conveniência (transporte, portos) mas logo percebeu-se que nestas altitudes baixas, a temperatura era demasiadamente elevada para os cafeeiros, que cresciam melhor a pelo menos 1000 metros de altitude, onde as temperaturas eram mais baixas (17-20°C). Por este motivo os

produtores se mudaram para o interior, construindo rodovias e estradas de ferro para poder transportar o café até os portos. Assim a produção do café foi fator importante no desbravamento do interior do País (GRAAFF, 1986).

2.13. PAPEL NA IMIGRAÇÃO PARA O BRASIL.

No fim do século 19 a abolição da escravidão causou serias dificuldades com a mão de obra na produção de café, fazendo com que os barões do café formassem companhias para trazer agricultores italianos para resolver o problema. Assim o cultivo do café foi um fator importante na imigração de italianos para o Brasil (GRAAFF, 1986).

2.14. CAFÉ COMO PRODUTO PARA EXPORTAÇÃO.

Desde 1810, o Brasil tem sido o maior produtor mundial desta rubiaceae e até 1940 produzia mais que a metade da produção mundial.

Nos séculos 16 e 17 o açúcar era o principal produto de exportação do Brasil e no século 18 a borracha e o ouro assumiram importância . Contudo no século 19 o café tornou-se o principal produto de exportação, e isto continuou até 1981, quando foi ultrapassado pela soja, que em 1983 representou 12% do total dos produtos de exportação, enquanto que o café representou apenas 10%. Inicialmente, a quantia exportada aumentou rapidamente de 18.000 toneladas no período 1820-29 para 300.000 toneladas no período de 1881-1920 e 700.000 toneladas em 1899-1902, quando

chegou a representar 70% da produção mundial de café.

2.15. CRISES NA EXPORTAÇÃO

A comercialização do café no Brasil tem passado por varias crises, normalmente provocadas por excessos de produção que resultaram em quedas no preço do produto no mercado internacional. A primeira crise ocorreu no começo do século 20 e foi a responsável pelo primeiro acordo entre países produtores deste produto (Brasil, Colombia, Cuba). Este acordo foi assinado em 1902 fixando preços e estratégias de venda. A segunda crise começou em 1929 e continuou durante os anos 30, resultando na destruição de 78 milhões de sacas de café. Depois da Segunda Guerra Mundial a situação melhorou novamente, mas no fim dos anos 50 ocorreu a terceira crise, que resultou num programa de destruição de pés de café, organizado pelo Instituto Brasileiro do Café (I.B.C.) que reduziu o número total de 4300 milhões em 1960 para aproximadamente 2300 milhões em 1967 (GRAAF, 1986).

2.16. PAPEL NA ECONOMIA BRASILEIRA.

No Brasil o café representa 1% do Produto Interno Bruto, 2% do total de empregos e 10% dos produtos exportados. O cultivo do café ocupa 3.200.000 hectares, representando 4% da área total cultivada, distribuida entre 300.000 fazendas, que contratam 5% da mão de obra rural. Já que o Brasil tem uma densidade de população baixa ($15/\text{Km}^2$), não é necessario o cultivo intenso, aceitando-se um rendimento mais baixo, mas que utiliza menos mão-de-obra. Para

cada tonelada de café crú utiliza-se em média 1,7 hectares de terra e 150 dias-homem (0,5 equivalentes homens). Isto pode ser comparado com um país como Ruanda, que tem uma densidade populacional alta ($220/\text{Km}^2$) e que pela mesma tonelada de café crú utiliza 1,4 hectares de terra e 570 dias homens (1,9 equivalentes homem). Isto é uma vantagem para o Brasil devido ao elevado custo de mão-de-obra (GRAAFF, 1986).

2.17. MERCADOS EXTERNOS E INTERNOS.

Os Estados Unidos ainda é o maior comprador de café brasileiro, mas a Europa também compra uma quantidade significativa, especialmente de café solúvel. Entre os países produtores de café, o Brasil é o único que produz café solúvel em quantidades significativas. No período 1978-83 o café solúvel representou 15% do total exportado. Existem 11 fábricas de café solúvel no Brasil, das quais 3 produzem café liofilizado e as demais apenas café atomizado, utilizando aproximadamente 20% do tipo robusta e 80% do tipo arábica, que resulta em um café solúvel de alta qualidade.

O mercado interno de café consome em torno de um terço da produção total do País, sendo então o Brasil o segundo maior consumidor mundial, sendo o primeiro os Estados Unidos. Este consumo está diminuindo, tendo sido 8 Kg/percapita/ano em 1970 e reduzido para 4 Kg/percapita/ano em 1980 (GRAAFF, 1986).

2.2. COLHEITA

A colheita de café é uma etapa fundamental na produção do café torrado e moido. Existem basicamente dois sistemas de colheita, as quais são determinadas principalmente pelas condições climáticas na região de produção. Nas regiões produtoras de "café finos", as condições são favoráveis a uma produção quase contínua de frutos maduros durante o ano, exigindo então que a colheita seja feita a dedo, colhendo apenas os frutos maduros (vermelhos), uma vez que são encontrados frutos de todas as fases de maturação, em cada pé de café e em qualquer época (CLARKE, 1985).

Contudo, no Brasil, nos Estados de São Paulo e Paraná, o longo período de seca normalmente coincide com o período de colheita, com etapas mais ou menos fixas da fenologia do cafeeiro, possibilitando que o café seja derriçado no chão e colhido alguns dias depois (CLARKE, 1985). Neste caso não há escolha dos frutos maduros, ocorrendo uma colheita global onde a maioria dos frutos estão maduros.

A colheita é normalmente manual, utilizando mão-de-obra temporária e o pagamento sendo feito na base do peso do café colhido. É necessário verificar que a proporção de frutos imaturos seja mantida ao mínimo e a danificação dos pés de café também (WILLSON, 1985).

Até o presente não há muito incentivo para colheita mecânica no Brasil, mas com o aumento dos custos de mão-de-obra, sem dúvida este interesse aumentará. WILLSON, (1985) se refere a experiências feitas no Havaí com máquinas que agitavam os pés da planta para deslocar os frutos maduros, e WATSON (1980) descreveu

duas máquinas desenvolvidas no Brasil, com dedos vibratórios montados em cilindros verticais rotatórios, que pelo ajuste da amplitude e frequência da vibração colhiam apenas os frutos maduros.

O *Manual de recomendações do I.B.C.* (1985) cita que a colheita mecânica é indicada principalmente onde existe falta de mão-de--obra e onde a topografia é plana ou apenas levemente ondulada. Este manual descreve a diferença entre as duas máquinas citadas por WATSON (1980). A mais complexa que chama de colhedeira automotriz possui dois cilindros de hastes vibratórias fabricadas de fibra de vidro, que atuam em ambos os lados da planta diretamente nos galhos com frutos. A máquina colhe os frutos caídos com recolhedores deslizantes (conjunto de lâminas retráteis), que fecham os espaços sob a saia do cafeeiro. A outra máquina, chamada de derriçadeira mecânica, possui apenas uma haste vibratória e atua apenas em um lado da planta, derriçando o café no chão, uma vez que não possui recolhedor. Este mesmo manual cita que já existe derriçadeira com dois cilindros de hastes que atuam em ambos os lados da planta.

2.3. PREPARO DO CAFÉ CRÚ.

Existem duas vias de preparo do café crú, a via seca que não usa água, e a via úmida que a usa. Ambos visam remover a casca (exocarpo), polpa mais mucilagem ou goma (mesocarpo), pergaminho, (endocarpo) e película prateada (perisperma), deixando a amêndoa (gérmen mais endosperma) que é o próprio grão de café. A figura 1 mostra estas camadas.

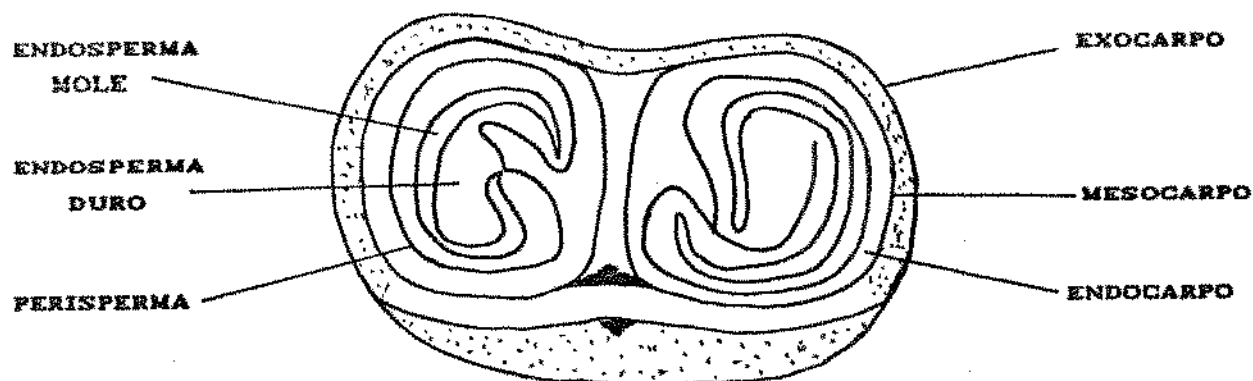


Figura 1 - Corte transversal de cereja de café (CLARKE, 1985)

23.1 VIA SECA.

CLARKE (1985) cita que a via seca é o processo mais antigo e mais simples para separar o grão de café das suas camadas protetoras, sendo que é a mais usada no Brasil. Na via seca a cereja inteira é posta para secar até 11-13% de umidade e posteriormente as camadas externas secas são removidas.

A polpa representa em torno de 29% do peso da cereja de café na base seca e quando fresco contém em torno de 77% de umidade.

O mesmo autor acrescenta que antes da secagem dever-se-á classificar as cerejas, separando as indesejáveis, o que freqüentemente não é feito, em seguida podem ser secas ao sol ou em secadores. A separação dos grãos indesejáveis pode ser feita por flutuação, que tem a vantagem de remover sujeira e corpos estranhos. As cerejas escolhidas são levadas aos terreiros de secagem pelas correntes de água. Os terreiros são de concreto e recomenda-se cargas de 20 Kg/m², revirando o café varias vezes por

dia (CLARKE, 1985). A umidade inicial que é de 65-70%, deve alcançar 11-13% após a secagem, que demora de 8-10 dias ao sol quando o tempo estiver bom, embora possa levar semanas se tiver chuva (CLARKE, 1985). Este processo permite o crescimento de microorganismos indesejáveis que podem diminuir a qualidade do café (CLARKE, 1985). No entanto o tempo necessário pode ser reduzido para três dias usando-se uma secadora com temperatura de ar constante e abaixo de 30°C. Acima desta temperatura aumenta a incidência de defeitos, inclusive de grãos pretos. Este processo produz o café em côco que deve ser beneficiado para remover as camadas externas.

2.3.2. VIA ÚMIDA.

A via úmida é um processo mais sofisticado e que normalmente produz um café de melhor qualidade considerando que todas as outras variáveis sejam iguais. É utilizada na Colômbia e em outros países produtores de cafés arábicas suaves. Neste processo remove-se a polpa e a mucilagem antes da secagem obtendo-se o café pergaminho, isto é, o grão com a membrana prateada e o pergaminho (CLIFFORD, 1985b).

O processo descrito por CLARKE, (1985) é o seguinte: a polpa deve ser removida mecânicamente dentro de 12 a 24 horas. Os despulpadores somente conseguem despulpar cerejas maduras (vermelhas) e, portanto, é importante que todas estejam maduras. O café despulpado passa em seguida por uma peneira vibratória para remover pedaços de polpa e grãos semi-despulpados, sendo posteriormente lavado com água e transportado até os tanques de

fermentação, onde a camada mucilagínosa é hidrolisada por um processo natural de fermentação. Esta camada, que é de 0,5-2 mm de espessura, além de conter uma série de enzimas que degradam a pectina, apresenta a seguinte composição (CLARKE, 1985):

- água-----	84,2%
- proteína -----	8,9%
- açúcar -----	4,1%
- ácido pécico ---	0,9%
- cinza -----	0,7%

A fermentação pode ser "seca" ou "submersa". A fermentação seca, que é a mais usada, demora de 6 a 80 horas para se completar, dependendo da temperatura, mas em média leva 24 horas (CLARKE, 1985). Neste caso acrescenta-se pouca água e o café permanece numa massa gomosa com mais ou menos um metro de profundidade, no máximo. O término do processo se reconhece pelo tato, esfregando-se um punhado de grãos na mão. Quando os grãos não escorregam mais, dando a sensação de aspereza entre eles, a degomagem está completa (*Manual de recomendações do IBC, 1985*). Em seguida o café é batido e lavado muito bem em água corrente para a remoção da mucilagem hidrolisada contendo açúcares, compostos fenólicos e os microorganismos fermentadores. O pH inicial que é de 6,8-6,7 cai para 4,2-4,5 durante a fermentação.

No processo submerso, acrescenta-se mais água para que o café permaneça completamente submerso em água. WOOTTON, (1965, 1967a,b, 1971) que estudou os dois processos de preparo por via úmida verificou a formação de vários ácidos alifáticos durante os

processos, principalmente dos ácidos acético e láctico no início e dos ácidos butírico e propiónico nos estágios finais do processo. Quanto mais longo o processo, maior a produção de ácidos, abaixando eventualmente o pH até o ponto de inibir a ação das enzimas pécticas. O aparecimento do defeito "gosto de cebola" está intimamente relacionado com a produção de ácido propiónico que portanto, deve ser evitado. No entanto, a utilização do processo por via úmida submerso acentua este problema.

O processo de fermentação melhora a cor do grão final, deixando-o com cor verde azulada, enquanto que os demais processos tornam os grãos mais amarelados. É possível também remover a mucilagem com hidróxido de sódio porém não é recomendado, (CLARKE, 1985) ou por atrito que é mais utilizado, (CLARKE, 1985). WOOTTON (1967 a) recomenda a submersão em água durante 24 horas após o uso de atrito para melhorar a cor. CHASSEVANT et alii (1969), comparando os diferentes processos por via úmida e seca, concluiu que a via úmida é sempre superior que a seca e que os níveis de ácido clorogênico atingem valores mais baixos utilizando a via seca. Também concluíram estes autores que a submersão em água após a via úmida sem fermentação empregando-se NaOH, enzimas, ou atrito, melhora a cor e que não houve aparecimento dos defeitos pimenta, podridão ou fermentado pela via úmida, como também não houve perda em cafeína, trigonelina ou ácido clorogênico, sugerindo que o pergaminho minimiza essas perdas. WOOTTON (1971) também investigou estas perdas, analisando amostras preparadas em 48 horas por via úmida tipo seca. Verificou-se perdas de aproximadamente 1% do peso seco, 50% do qual foram açúcares, principalmente açúcares redutores. As perdas eram semelhantes

quando foi utilizada a via úmida sem fermentação seguida por submersão por 24 horas.

VINCENT et alii (1977) deixou grãos crus submersos em água com e sem a membrana prateada e demonstrou perdas relativamente rápidas de cafeína e ácido clorogênico até 48 horas nos dois casos.

Seja qual for a via úmida utilizada, o café com pergaminho deve ser seco, ao sol ou na estufa ou ainda por uma combinação dos dois (CLARKE, 1985). Ao sol o café é espalhado nos terreiros inicialmente em camadas de 2-3 cm e posteriormente em camadas de 5-10 cm (CLARKE, 1985) revirando-a com frequência. O processo demora de 8-10 dias ao sol alcançando umidade de 11-13%. Nas secadoras, normalmente do tipo tambor rotativo utiliza-se umas das seguintes combinações de tempo/temperatura (CLARKE, 1985):

40°C/ 1-2 dias

50°C/ algumas horas

60°C/menos que 1 hora

80°C/ menos que 5 minutos

As temperaturas mais elevadas aumentam a possibilidade de danificar o café. Deve-se evitar o aparecimento de rachaduras no pergaminho durante a secagem, uma vez que o pergaminho protege o grão.

Freqüentemente utiliza-se uma combinação dos dois métodos de secagem, secando-se até 44% de umidade ao sol, e em seguida completa-se a secagem até 11-13% de umidade na secadora rotatória (CLARKE, 1985).

A vantagem da utilização da via úmida é que o despulpamento antes da secagem remove a mucilagem que, por ser açucarada, se

constitue num meio favorável à ação de microrganismos, possíveis causadores de bebida de qualidade inferior na bebida (*Manual de recomendações do IBC, 1985*).

2.4. BENEFICIAMENTO

Seja qual for o método de preparo, o café seco, com 11-13% de umidade, deve ser beneficiado, consistindo o processo na remoção das camadas externas secas permanecendo apenas o grão. No caso do café em côco (via seca) estas camadas são constituídas pela casca, a mucilagem, o pergaminho e a membrana prateada, e no caso do café pergaminho (via úmida) restam apenas o pergaminho e a membrana prateada.

Antes do beneficiamento o café passa por uma superfície vibratória para remover matérias estranhas como pedras. Em seguida uma rosca sem fim leva o café até um espaço confinado onde as camadas externas são quebradas por atrito e removidas por corrente de ar. O que varia é o ajuste da rosca, que deve ser maior no caso de café côco. Neste caso também as partes móveis são equipadas com projeções que ajudam a rasgar as cascas. Os grãos podem ser posteriormente polidos para a remoção dos restos de película prateada (SMITH, A.W., 1985).

CLARKE (1985) relata que existem máquinas que podem ser utilizadas para remover grãos descoloridos. Estas máquinas funcionam pelo princípio da luz refletida que ativa um mecanismo para ejeção dos grãos com cor indesejável. Existem também máquinas que funcionam pelo princípio bicromático com reconhecimento do padrão, que utilizam um programa computadorizado. Deve se alertar

que nem todos os defeitos do café são refletidos pela cor do grão.

2.5. CAFÉ ARÁBICA. FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE.

2.5.1. ASPECTOS GERAIS.

O café arábica, nativo da Etiópia, possui a seguinte classificação botânica:

Família:	Rubiaceae
Sub-família	Cinchonoidea
Gênero	Coffea
Sub-gênero	Coffea (Eucoffea)
Sub-seção	Erythrocoffea
Espécie	Coffea arabica.

A variedade de *Coffea arabica* usada nesta pesquisa foi *catuai vermelho*, uma variedade frequentemente encontrada na América do Sul e na América Central, e conhecida pelo seu rápido crescimento e alto rendimento (SMITH, A.W., 1985).

O café crú não possui nem o aroma e nem o sabor típico da bebida de café. Estas características típicas são resultados, principalmente, dos compostos produzidos durante a torração do café. Contudo, é aparente que os compostos produzidos durante a torração dependem dos compostos presentes no café crú, então um dos fatores que controla a qualidade da bebida é a composição química do café crú. Outros fatores que influem na qualidade da bebida se prende ao processo de torração e as condições de estocagem do café torrado, fatores fora do assunto desta tese.

A composição química do café crú depende, além de fatores genéticos, de aspectos que envolvem o campo e condições de estocagem antes da torração.

2.5.2. DEFINIÇÃO DE QUALIDADE.

Antes de se discutir os diferentes parâmetros responsáveis pela qualidade do café, é importante definir o que é qualidade.

De acordo com CAPLAN (1978), qualidade é o grau de adequação para um determinado fim. BLANCHFIELD (1980), apresenta uma definição mais completa: "é uma medida multicomponente do grau com que as unidades de um produto que um vendedor está disposto e capaz de oferecer por um determinado preço, constantemente preenche as necessidades e expectativas do grupo de compradores dispostos a comprar aquele produto por aquele preço". É aparente que o custo e a manutenção de desempenho do produto são muito importantes ao consumidor e, portanto, ao fabricante, que freqüentemente tem que sacrificar um pouco o desempenho para manter o custo ou vice-versa.

Do ponto de vista de um químico, CLIFFORD (1985b) sugere que com respeito à qualidade, há três perguntas que deveriam ser passíveis de se responder :

1. - Quais substâncias determinam na bebida:
 - a) Aceitação e preferência do consumidor
 - b) Rejeição

2. - Quais são os precursores e as reações que resultam nessas substâncias desejáveis ou não, no grão crú ?

3. - Quais métodos que podem ser utilizados para monitorar a qualidade do café crú, a qualidade dos produtos intermediários do produto e a qualidade do produto final ?

Apesar de 100 anos de estudos sobre o café, em escala sempre crescente, ainda não se conseguiu responder nenhuma destas questões conclusivamente, embora tenham sido feitos muitos progressos.

2.5.3. ATIVIDADE DE ÁGUA

De acordo com DIAZ et alii(1973), HAYAKAWA et alii (1978) e STIRLING (1980) os grãos crus possuem 1% de água fortemente ligada, 4% de água fracamente ligada e 5% de água com baixa mobilidade. Assim, a atividade de água dos grãos crus tem valores de 0,5-0,6 que permite a estocagem por até um ano se a temperatura se mantiver abaixo de 25°C . Portanto, as condições de estocagem do café são muito importantes.

2.5.4. CAFEÍNA

A cafeína é a principal purina na composição do café e se encontra na polpa, no citoplasma do grão e ligada à parede celular. Sem dúvida, tem papel importante como estimulante, mas há relativamente pouco efeito no amargor da bebida (CLIFFORD, 1985b).

2.5.5. AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS

HASSAN (1970) mostrou que o perfil de aminoácidos do café crú

influe na produção de certos compostos voláteis durante a torração, e portanto, estes possuem influência na qualidade da bebida.

AMORIM et alii (1974 c) demonstraram diferenças quantitativas entre as globulinas e glutelinas, que podiam estar relacionadas à qualidade do café. AMORIM e JOSEPHSON (1975) verificaram, por sua vez, que os cafés brasileiros de qualidade inferior possuíam teores maiores de proteínas na faixa de 20.000-26.000 daltons e ao redor de 9.000 daltons. Utilizando eletroforese em gel a pH 7 , AMORIM et alii (1975b) demonstraram que as proteínas extraídas de cafés de qualidade superior tinham cargas negativas , enquanto que aquelas extraídas de cafés de qualidade inferior tinham cargas positivas. Uma possível explicação seria a de que nos cafés de qualidade superior existem maiores quantidades de polifenoloxidase (PPO) e, portanto, durante a extração das proteínas, uma grande quantidade de ácido clorogênico seria oxidado produzindo quinonas, que se ligariam às proteínas e aminoácidos aumentando, assim, sua carga negativa. Nos cafés de qualidade inferior, o menor teor de PPO e portanto o menor teor de quinonas, fariam com que as proteínas e os aminoácidos permanecessem com cargas positivas. A presença de PPO em café será tratado no item 2.6.

2.5.6. ENZIMAS DO CAFÉ.

Os grãos de café contém inúmeras enzimas, mas as únicas que tem sido estudadas com mais detalhes são PPO (tirosinase, catecol oxidase), α -galactosidase, desidrogenase málica, fosfatase ácida,

lacase/p-difenoloxidase e peroxidase. Três destas tem sido apontadas como indicadoras de qualidade- lacase/p-difenoloxidase (EC1.10.3.2.) por ROTENBERG e IACHAN (1972), peroxidase (EC 1.11.1.7.) por AMORIM et alii (1977) e PPO (tirosinase, catecol oxidase (EC 1.14.18.1.) por AMORIM e SILVA (1968), SANINT e VALENCIA (1970) e AMORIM et alii (1974c,1976). Muitas outras enzimas, que podem muito bem estar ativas durante o processamento e a estocagem do café crú produzindo mudanças que poderiam afetar a qualidade, não tem sido estudadas em detalhes, por exemplo β -glicosidases, proteases e lipases. Por ser assunto da presente pesquisa, o PPO será tratada separadamente no item 2.6.

2.5.7. CARBOIDRATOS

A sacarose é o principal açúcar do café crú e os monossacarídeos provavelmente são formados enzimicamente durante o armazenamento ou no processo de obtenção de extrato para análise. AMORIM (1974a e 1975b) concluiu que não havia nenhuma relação direta entre os açúcares e a qualidade da bebida, enquanto POKORNY (1975) observou perdas de açúcares redutores durante o armazenamento em temperaturas elevadas e concluiu que estes compostos estão relacionados com mudanças desfavoráveis da cor e com as perdas da qualidade da bebida. HASSAM (1970) e TRESSL et alii (1982) mostraram que o perfil de compostos voláteis do café torrado em parte dependia da relação açúcares:aminoácidos no café crú.

A fração de polissacarídeo do café é o principal agente que retém os aromas e também contribui na viscosidade. O principal

polissacarídeo de reserva no café é a β -manana que ocorre na forma de uma galactomanana cristalina e insolúvel envolvendo o complexo da parede celular (CLIFFORD, 1985b).

2.5.8. LIPÍDEOS

Nos lipídeos do café se incluem a graxa cuticular que contém as hidroxitriptamidas C-5-HT que possuem atividade antioxidante. Portanto os processos de polimento, desengraxamento e descafeinização podem provocar queda da qualidade durante a estocagem devido à remoção desta fração (CLIFFORD, 1985b).

2.5.9. PIGMENTOS

A cor dos grãos de café crú é certamente um fator de qualidade que influe no preço do produto. As cores preferidas são azul ou verde-azulada, que são as cores típicas de café arábica preparados por via úmida. A cor amarela, típica do café robusto e arábica preparados por via seca, é menos apreciada, embora não seja considerada um defeito. Grãos pretos ou marrons são considerados defeituosos.

A origem dos pigmentos ainda não é bem clara. PIERPONT (1982) demonstrou a produção de pigmentos azuis e amarelos com estruturas parecidas com alagocromos pela interação do ácido clorogênico-quinona com o grupo ϵ -amino da lisina, e GARRICK e HABERMANN (1982) têm demonstrado que as folhas de *C. arabica* são capazes de produzir um alagocromo. É possível então, que a PPO e o ácido clorogênico (ACG) sejam precursores dos pigmentos do

endosperma, sendo os azuis e os amarelos análogos àqueles relatados por PIERPONT (1982) e os verdes uma mistura dos dois. A variação de pigmentos entre os cafés arábicas e robusta poderia ser atribuída às diferenças em atividade do PPO/espectro das isoenzimas e/ou das diferenças na relação entre o ácido cafeoilquínico e o ácido dicafeoilquínico, (CLIFFORD, 1985b). Estes últimos (ácidos clorogênicos) por serem assunto principal deste trabalho, serão tratados separadamente no item 2.7. Os pigmentos marrons e pretos poderiam ser resultados de uma atividade em PPO devido a possíveis danos nas células. Desta forma a PPO atacaria ACQ e produziria pigmentos marrons insolúveis (OHIOKPEHAI, 1982).

Dever-se-ia considerar também a possibilidade de que o C-5-HT e/ou a presença de diterpenos poderiam ter alguma função na coloração do café, ou ainda aventar a possibilidade de que os pigmentos marrons sejam formados pela interação dos açúcares com aminoácidos durante a estocagem (POKORNY, 1974).

2.5.10. AROMA E SABOR

Há uma vasta literatura sobre aroma de café torrado tendo sido até hoje identificado mais do que 1000 compostos voláteis, incluindo compostos alifáticos, alicíclicos, aromáticos, furanos, tiofenos, pirrois, pirazinas, piradinas, tiazóis e oxazóis (CLIFFORD, 1985b). Por não ser assunto maior deste trabalho, esses compostos não serão tratados com maiores detalhes.

Com respeito ao sabor é importante diferenciar entre os

sabores ácido e azedo. A acidez é desejável e associada com proteínas e doadores de prótons, enquanto o sabor azedo é indesejável, característica de um processamento mal conduzido (NORTHMORE, 1969) e associado a uma mistura de ácidos, álcoois e ésteres produzidos por fermentação microbiana. MAIER (1983) considera que o ácido fosfórico seja o principal responsável pela acidez da bebida, uma vez que os ácidos orgânicos são mais fracos. O melhor pH para a bebida está na faixa de 4,9-5,2 (SIVETZ, 1972; LENTNER e DEATHERAGE, 1959), e a acidez da bebida, além dos fatores genéticos pode ser influenciada pelo método e severidade na torração, ou ainda pelo método do seu preparo, considerando-se aqui também a alcalinidade da água usada (SIVETZ, 1973; PICTET e VANTAZ, 1977; MOLL e PICTET, 1980; VOILLEY et alii, 1981; PANGBORN, 1982).

Dois outros sabores que freqüentemente se confundem são o amargo e o adstringente. Um bom café deve caracterizar-se por alguma sensação de amargor, embora isto não deve ser exagerado, como no caso de torrações muito escuras ou extrações demasiadamente altas. O sabor adstringente, por outro lado, é sempre indesejável.

O amargo é um sabor primário com receptores específicos na língua. Qualquer composto com pelo menos um grupo polar eletrofilico ou nucleofilico e mais um grupo ou região hidrofóbica, certamente provocará uma resposta amarga (BELITZ et alii, 1983). Tais compostos são relativamente comuns. Antigamente atribuía-se à cafeína o amargor do café, mas atualmente sabe-se que esta nunca contribui com mais que 10% do sabor amargo (PANGBORN, 1982; BELITZ, 1975; VOILLEY et alii, 1977), o café

descafeinado mantém-se o amargor do café original. BELITZ (1975) afirma que a trigonelina também não é importante no amargor e sugere que compostos heterocíclicos podem ser os responsáveis. O amargor pode ser mascarado por viscosidades elevadas e por substâncias adstringentes (PANGBORN et alii, 1978; LEA e ARNOLD, 1978).

A adstringência não é um sabor primário e tem sido pouco estudada. Muitas moléculas são ao mesmo tempo amargas e adstringentes, o que conduz à confusão entre elas. Além da análise sensorial, a adstringência pode ser avaliada por métodos objetivos de precipitação de proteína (CLIFFORD e OHIOKPEHAI, 1983). É provável que a característica principal de um composto adstringente seja a capacidade de precipitar as proteínas e glicoproteínas da saliva, eliminando assim sua ação lubrificante. A maioria de compostos adstringentes contém pelo menos dois resíduos 1,2 dihidroxifenol e quanto maior o teor destes resíduos maior o efeito adstringente. A precipitação por estes compostos pode ser impedida, e o efeito adstringente diminuído, por qualquer outro composto que se liga ao complexo formado pelo fenol adstringente e a proteína salivar, aumentando a carga líquida do complexo. Sabe-se que o ACQ tem esta propriedade e talvez o ácido cafêico também (OHIOKPEHAI et alii, 1982; WHITING e COGGINS, 1975; LEA e ARNOLD, 1978) acreditam que esta formação de complexos com proteína não seja específica, sofrendo apenas das influências de pH e pI podendo, portanto, ocorrer na língua e no paladar, bloqueando receptores de sabores primários. Este mecanismo pode explicar a redução do amargor de compostos amargos por compostos adstringentes. Vários autores acreditam que os ácidos

dicafeoilquínicos sejam os principais compostos adstringentes da bebida de café (OHIOKPEHAI et alii, 1982; CLIFFORD e OHIOKPEHAI, 1983) . Na bebida estes compostos apresentam um nível mínimo de percepção na concentração de 0,05-0,1 mg/ml, e com 1 mg/ml e na presença de 0,45 mg/ml de ACQ, provocam um sabor amargo metálico que permanece na boca. Outros estudos relacionam a produção da bebida adstringente com uso de grãos com maiores teores de ADCQ ou relações de ADCQ:ACQ como no caso de grãos imaturos, grãos com defeitos de cor e torrações mais escuras (FERREIRA, et alii, 1971; AMORIM et alii, 1974b; OHIOKPEHAI et alii, 1982; PICTET e REHACEK, 1982; CLIFFORD e OHIOKPEHAI, 1983) (ver item 2.7.).

2.5.11. CORPO DA BEBIDA

O "corpo" da bebida é uma qualidade de difícil descrição. Está ligado à sensação característica dentro da boca e à viscosidade. SMITH (1983) alega que não existe nenhuma relação simples entre a viscosidade, que é determinada por aparelho e o "corpo", que é avaliado subjetivamente. Uma vez que a bebida é uma solução muito diluída, a viscosidade deve estar associada a macromoléculas. O "corpo" de vinhos e cidras tem sido associado com baixos níveis de compostos fenólicos adstringentes (LEA e ARNOLD, 1978; ARNOLD e NOBLE, 1978), sendo possível então que uma interação dentro da boca entre ACQ, ADCQ e as proteínas salivares possa contribuir ao corpo sem relação com a viscosidade medida instrumentalmente.

2.6. POLIFENOLOXIDASE

"In vivo" a polifenoloxidase (PPO) do café encontra-se ligada às membranas e é ativada quando for liberada das mesmas. A polifenoloxidase se encontra na polpa das cerejas, nas camadas externas e na região central do grão. AMORIM e SILVA (1968) e AMORIM et alii (1976) tem demonstrado que o café de melhor qualidade contém maior atividade de PPO que os de qualidade inferior e sugerem a seguinte sequência para explicar esta diferença : primeiro, ocorrem danos nas membranas, liberando e portanto ativando a PPO, que por sua vez oxida os ácidos clorogênicos a quinonas. A PPO é inibida pelas quinonas formadas, diminuindo assim sua atividade. Esta sequência implica que, na verdade, a qualidade inferior está relacionada com os danos às membranas, sendo então a diminuição da atividade da PPO uma consequência disto.

AMORIM et alii (1974 c) também sugerem que nas fermentações indesejáveis, como aquelas que ocorrem com o café Rio, as glicosidases dos microrganismos atacam os glicosídeos do café, liberando compostos fenólicos que, como foi explicado acima, são atacados pela PPO produzindo quinonas que inativam a PPO além de insolubilizar muitas proteínas. Verificaram, também, que havia menores teores de proteínas solúveis em NaCl 10% e NaOH 1% nos cafés Rio de que nos cafés duros e moles.

SANINT e VALENCIA (1970), OLIVEIRA et alii (1977) e ROTENBERG e IACHAN (1971) também chegaram à conclusão que a atividade de PPO seria um bom indicador da qualidade da bebida.

Diferentes autores tem associado diversos fatores, como tipo

de cultura, processamento e tempo e condições de armazenamento, com a diminuição da atividade da PPO (SANINT e VALENCIA, 1970; VALENCIA, 1972 ; OLIVEIRA et alii, 1976, 1979a; MELO et alii, 1980). Contudo alguns outros fatores, como por exemplo o uso de inseticidas, podem diminuir a qualidade da bebida, sem reduzir a atividade da PPO (OLIVEIRA et alii, 1979b).

Numa investigação *in vitro* , OHIOKPEHAI (1982), demonstrou que a PPO comercial (tirosinase de cogumelos EC 1.14.18.1) oxida o ácido cafeoilquínico (ACQ) mas não o ácido dicafeoilquínico (ADCQ). Ainda não se sabe se a PPO do café possui a mesma especificidade, mas se tiver, isto seria mais uma razão para que a atividade de PPO contribua para redução da qualidade do café, uma vez que diminuirá a relação ACQ:ADCQ (ver item 2.7)

Na extração da PPO, a maioria dos autores citados acima usaram uma metodologia simples de extração com tampão em baixa temperatura mas, uma vez que a enzima é inibida pelas quinonas formadas por ela a partir dos compostos fenólicos, é muito importante complexar estes compostos antes de se efetuar a extração de PPO. DRAETTA e LIMA (1970) resolveram este problema complexando os compostos fenólicos com polietileno glicol (PEG) ou com polivinilpirrolidona (PVP), obtendo os melhores resultados com PVP na proporção de 0,5 g de PVP para 2 g de café.

2.7. ÁCIDOS CLOROGÊNICOS

2.7.1. ESTRUTURA

Os ácidos clorogênicos constituem os principais compostos

fenólicos do café, e são ésteres do ácido quínico com resíduos cinâmicos. O ácido clorogênico também se encontra livre em níveis de 0,4 a 0,7 % em cafés crus de boa qualidade, podendo atingir 1,5 % em grãos crus descorados (OHIOKPEHAI, 1982).

De acordo com SONDHEIMER (1958), o primeiro relato sobre ácido clorogênico foi descrito por ROBIQUET e BOUTRON em 1837 e, desde então, vários autores têm pesquisado o assunto e publicado seus resultados, dando origem a uma nomenclatura muito confusa. Os nomes aplicados aos vários isômeros incluem: ácido clorogênico, ácido criptoclorogênico, cinarina, substância de Hauschild, ácido isoclorogênico e ácido pseudoclorogênico (CLIFFORD, 1985b). Atualmente o ácido quínico e seus ésteres são tratados como ciclitois (IUPAC, 1976) e o nome "ácido clorogênico" é a forma geral usada para descrever o grupo de ésteres do ácido quínico com um ou mais resíduos de ácido cinâmico.

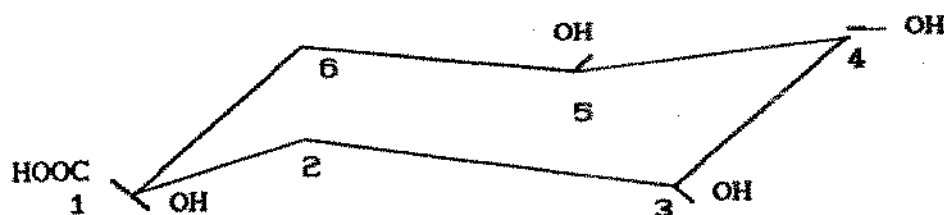


Figura 2. Estrutura do ácido quínico.

O isômero do ácido quínico que ocorre naturalmente é o ácido 1L-1(OH),3,4,5-tetrahidroxíciclohexano carboxílico (fig. 2). Na sua configuração preferida, o grupo carboxila e os grupos hidroxila 4 e 5 estão na posição equatorial e os grupos hidroxila

1 e 3 estão na posição axial.

Os ácidos clorogênicos podem ser sub-divididos em grupos de isômeros, normalmente com três em cada grupo, baseado no número e na identidade dos seus componentes. Assim, tem-se os ácidos cafeoilquínico (ACQ), os ácidos dicafeoilquínico (ADCQ), os ácidos feruloilquínico (AFQ) e os ácidos p-cumaroilquínico, além de vários ácidos cafeoilferuloilquínico.

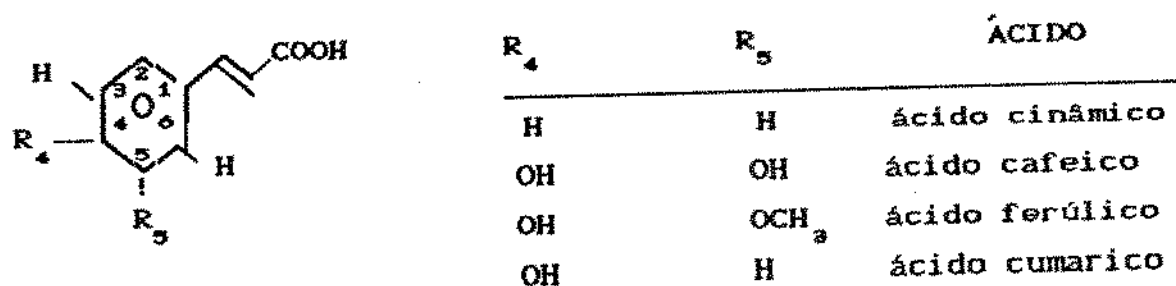
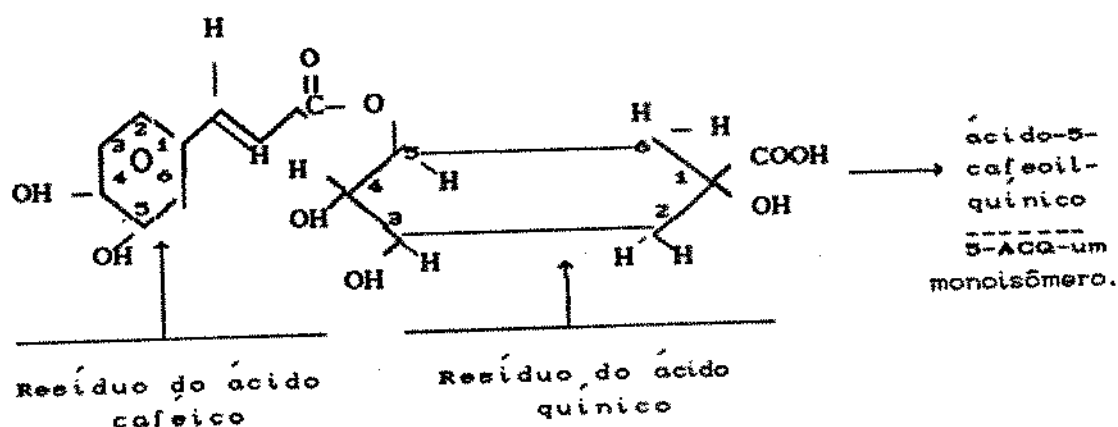


Figura 3. Ácidos cinâmicos que ocorrem em ácidos clorogênicos (CLIFFORD, 1985a).

Estes resíduos de ácido cinâmico esterificam um ou mais grupos hidroxila do ácido quínico, dando origem aos diferentes isômeros e disômeros de ácido clorogênico (figura 4).



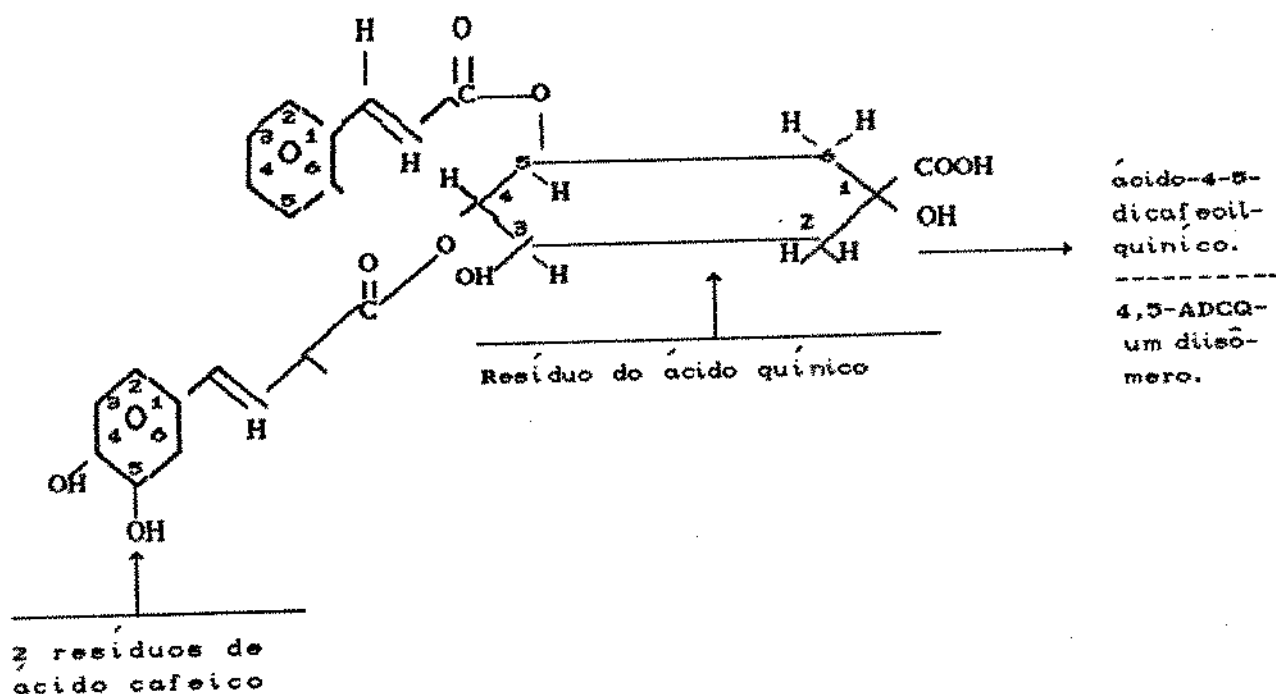


figura 4. Dois isômeros do ácido clorogênico (CLIFFORD, 1985a).

É quase impossível a formação de triisômeros devido à obstrução pela configuração espacial. No café crú não ocorrem ésteres de ácido quínico esterificados na posição C_1 , embora tais compostos existam na natureza.

Além dos ácidos clorogênicos identificados, o café crú contém alguns compostos desconhecidos, que constituem 5% do teor de ácido clorogênico total em cafés arábica e 1% em café robusta (VAN DER STEGAN e VAN DUIJN, 1980; OHIOKPEHAI, 1982). Estes compostos podem incluir glicosídeos fenólicos (AMORIM, 1974b; MOLL e PICTET, 1980) e ésteres de glicose em lugar do ácido quínico (CLIFFORD e

GRIFFITHS, 1982).

2.7.2. LOCALIZAÇÃO E OCORRÊNCIA

De acordo com DENTAN (1985), os ácidos clorogênicos ocorrem na superfície do grão associados com a graxa cuticular e também no citoplasma, ao lado da parede celular do endosperma no parênquima. Ainda não se sabe se a composição varia de acordo com a posição no grão. Na parede celular os ácidos clorogênicos podem se associar com a cafeína num complexo molar da ordem de 1:1 ou 2:1, que foi estudado por HORMAN E VIANI (1971). Os ácidos clorogênicos podem ocorrer em formas polimerizadas ou complexadas, possivelmente com proteína, tanto na polpa (com massa perto de 1000 daltons) como no grão (com massa perto de 5000 daltons). Estas substâncias são consideradas inibidoras da enzima indol-ácido acético oxidase e não têm sido bem caracterizadas.

A biossíntese dos ácidos clorogênicos no café não é completamente conhecida, embora as enzimas responsáveis pela última etapa na síntese da trans-5-ACQ, trans-5-AFQ e trans-5-ACoQ têm sido isolados de várias plantas, inclusive de células de café em cultura de tecidos (CROSS, 1981).

No café crú os monoisômeros 5 são dominantes (70-85% dos ACQ e 80-85% dos AFQ) e os monoisômeros 4 ocorrem em teores iguais ou superiores aos monoisômeros 3. Com respeito aos diisômeros no café arábica, o 3,5 ADCQ ocorre em quantidade maior, seguido pelo 4,5 ADCQ e depois pelo 3,4 ADCQ. No café robusta, o diisômero 4,5 ADCQ é dominante (VAN DER STEGAN e VAN DUIJN, 1980; KONIG E STURM, 1982).

É possível que os monoisômeros 3 e 4 se formem a partir do monoisômero 5 através da migração acil sendo então artefatos, embora isto não possa ocorrer no caso dos diisômeros (CLIFFORD, 1985b).

O café robusta contém de 7 -10% de ácido clorogênico e o café arábica de 5-7,5 % . Grãos velhos e descorados contém menores quantidades de ácido clorogênico extraível e uma relação menor de ACQ:ADCQ, além de menor atividade em polifenoloxidase (OHIOKPEHAI et alii, 1982), que está de acordo com a hipótese de que a polifenoloxidase ataca o ACQ e não o ADCQ *in vitro*. NORTHMORE (1975) sugere que os pigmentos do endosperma podem ser produtos da oxidação do ácido clorogênico. Nos grãos de café novos, AMORIM et alii (1973b;1974 b) relatam que os melhores cafés tem teores de ácido clorogênico significativamente inferiores. Sugerem que o teor de ácido clorogênico mais elevado em cafés de qualidade mais baixa pode ser resultado do ataque do *Fusarium sp*, uma vez que se admite que os danos mecânicos e químicos causados por microorganismos podem induzir à produção de maiores quantidades de compostos fenólicos.

2.7.3. EFEITO DA TORRAÇÃO

Durante a torração do café os ácidos clorogênicos extraíveis são destruídos progressivamente de uma forma ou outra, podendo perder até 9 g/100 g em café robusta e 6 g/100 g em arábicas, com torrações escuras. OHIOKPEHAI (1982) relata taxas relativas de destruição de ACQ, ADCQ e AFQ de 1,0; 0,56; 0,09 respectivamente em café arábica da Tanzânia. PICTET e REHACEK (1982), obtiveram os

mesmos valores. MAIER (1982), considera que dos ácidos clorogênicos contendo resíduos de ácido caféico, o 3- ACQ é o mais estável durante a torração e o 3,5-ADCQ o menos estável. De modo geral os isômeros esterificados no C₃ e/ou C₄ são mais estáveis que os esterificados no C₅. Há uma série de trabalhos que corroboram esta idéia. (CORSE et alii, 1970; CLIFFORD, 1972; VAN DER STEGAN e VAN DUIJN, 1980; KONIG e STURN, 1982; TRUGO e MACRAE, 1984b).

Ao contrario do ácido clorogênico, a cafeína é relativamente estável durante a torração, sendo então possível monitorar a severidade da torração através da relação entre o teor de cafeína (constante) e o teor de ácido clorogênico (progressivamente menor) (PICTET e REHACEK, 1982).

O destino do ácido clorogênico destruído na torração tem sido parcialmente esclarecido. Até 50% da quantidade perdida tem sido encontrado nos pigmentos marrons ou em forma de fenóis livres ou em ácido quínico livre. Da outra metade, uma parte pode ser perdida nos gases que escapam do torrador, mas ainda não foi determinado em qual proporção e nem o destino do restante (CLIFFORD, 1972; TRESSL et alii, 1976; 1978 a; 1978 b; 1982). Certamente o ácido quínico é um dos produtos de degradação do ácido clorogênico durante a torração (OHIOKPEHAI, 1982; NAKABAYASHI e KOJIMA, 1980; BLANC, 1977) e este pode, por sua vez, ser modificado ou degradado, epimerizando ou lactonizando, por exemplo. No caso de esterificação da hidroxila no C₄ a epimerização seria favorecida nas condições do torrador. Pelo menos uma lactona do ácido quínico e uma lactona do ácido clorogênico tem sido detectados em extratos de café torrado (KONIG e STURN, 1982; WOLINSKY et alii, 1964; CORSE

e LUNDIN, 1970; ANDERSON, 1972). Estes estudos sugerem que os principais produtos do ácido quínico são catecol (que também poderia ser proveniente do ácido caféico), quinol, pirogalol e 1,2,4,-trihidroxibenzeno. Da degradação do ácido caféico os produtos principais são 4-metil-, 4-etil- e 4-vinil- catecol e 3,4-dihidroxicinamaldéido. Os demais ácidos cinâmicos produziriam os produtos correspondentes, com benzaldeído no lugar do cinamaldéido. As quantidades encontradas no café torrado refletem os níveis relativos dos seus precursores no grão cru (CLIFFORD, 1972; PYPKEN e BROWER, 1969; TRESSL et alii, 1976; 1978 a; 1978 b; 1982).

2.7.4. INFLUÊNCIA NA BEBIDA

A acidez da bebida é maior para cafés arábicas torrados do que para cafés robustos torradas, maior para café preparado por via úmida do que por via seca, maior na torração média do que na torração forte, e maior nos torradores com pressão do que nos torradores comuns (SIVETZ, 1972). A menor acidez da bebida de uma torração forte tem sido atribuída à destruição de ácidos clorogênicos (LENTNER e DEATHERAGE, 1959; KING et alii, 1967; FELDMAN et alii, 1969) e mais recentemente à ligação dos ácidos à matriz do grão (NAKABAYASHI, 1978). SIVETZ (1973) considera que a bebida proveniente de torradores com pressão tem maior acidez devido à maior retenção de ácidos voláteis.

Os dados da literatura indicam que além de ácido clorogênico, grãos crus sadios de café contém 0,5% de ácido cítrico, 0,5% de ácido málico, 0,2 % de ácido oxálico e 0,4% de ácido tartárico.

NORTHMORE (1969) relata que os grãos podres contêm um teor elevado de ácido acético.

Com respeito ao efeito dos demais compostos fenólicos na qualidade da bebida, AMORIM et alii (1973b) concluíram que o teor de ácido clorogênico total influe negativamente na qualidade da bebida, os teores de compostos fenólicos solúveis em água e em cloreto de sódio positivamente, o teor de compostos fenólicos solúveis em tampão fosfato negativamente e o teor de fenólicos solúveis em metanol influe positivamente.

2.7.5. EFEITO NA SAÚDE

Ao longo dos anos o café tem recebido muitas críticas por supostos efeitos negativos à saúde, a maioria das quais não tem nenhum fundamento. É interessante notar então, que em vários estudos com cinarina, doses de 500-1500 mg diárias têm provocado reduções no teor de colesterol total no soro, sendo que em um destes estudos a dosagem foi de apenas 60 mg diária. Uma vez que uma xícara de café pode conter de 20-675 mg de ácido clorogênico, ou no caso de café instantâneo de 70-220 mg, é possível que haja benefícios em se produzir cafés com altos teores de ácido clorogênico para combater o efeito hiperlipêmico, embora isto requeira ainda muito mais estudos (CLIFFORD e WALKER, 1987).

2.7.6. VARIAÇÃO COM A MATURAÇÃO

Alguns estudos têm sido feitos com a produção de ácido clorogênico durante a maturação do café. CLIFFORD et alii (1987),

trabalhando com quatro variedades de café verificaram um aumento sigmoidal em ACQ durante a maturação representando um esforço significativo de fotossíntese. Uma vez que não se encontrou aumentos equivalentes com os demais isômeros estudados, concluíram que isto devia influir na relação de ACQ:ADCQ.

2.7.7. EFEITOS ORGANOLEPTICOS

KELLARD et alii (1987), trabalhando com os limites mínimos de detecção sensorial (threshold values) dos ácidos clorogênicos, determinaram que a concentração limite para o sabor amargo de 3 ACQ e 5-ACQ foi de aproximadamente 0,05 mg/ml, enquanto o limite para a sensação metálica foi de 0,5-1,0 mg/ml e para o sabor azedo mais elevado ainda. Este estudo é interessante uma vez que aparentemente contraria o estudo de OHIOKPEHAI et alii (1982) em que o responsável pelo sabor amargo/metálico foi considerado o ADCQ, com os ACQ atuando para diminuir este efeito. CLIFFORD (1985a) e ORDYNSKY (1965) consideram que o 5-ACQ é bem menos ácido que o ácido quínico livre e que, tanto o 5-ACQ como a mistura dos 3 ADCQ de café tem limites de detecção na faixa de 0,05-0,1 mg/ml. Com respeito ao sabor amargo, estudos com ciclitois, feitos por BIRCH e LINDLEY (1973), demonstraram que as "nuances" amargas foram produzidas de acordo com a introdução de pontos deoxi e/ou a acilação dos grupos hidroxilas. O aumento de amargor na sequência: ácido quínico (nada) < 5-ACQ (pouco) < ADCQ, está de acordo com estas observações. Estudos objetivos baseados na precipitação por proteína tem confirmado que o ADCQ é adstringente e o ACQ não (CLIFFORD e OHIOKPEHAI, 1983), o que está de acordo

com a definição estrutural feita por HASLAM (1981) de um composto adstringente. OHIOKPEHAI et alii (1982) propuseram um mecanismo competitivo para explicar a redução da adstringência do ADCQ por ACQ.

Nos valores de pH da boca e da bebida de café os diferentes isômeros de ácido clorogênico seriam extensivamente ionizados, mas numa comunicação pessoal à CLIFFORD (1985a) , Dr. Maier considera que apenas o ácido fosfórico ($pK=1,96$) contribue significativamente à acidez da bebida, mesmo em torrações fracas.

2.7.8. SUA FUNÇÃO NA PLANTA

Em geral, os compostos fenólicos, incluindo os ácidos clorogênicos, são considerados produtos secundários em plantas, tendo como função o controle dos níveis de ácido indol acético, uma função que requer apenas baixos níveis de mono e di-hidroxifenóis. Os mono hidroxifenóis ativam a ácido indol acético oxidase, prevenindo o acúmulo deste ácido e os dihidroxifenóis, por sua vez, inibem competitivamente esta enzima. Os níveis de ácido indol acético aparentemente controlam o estímulo de crescimento com ou sem necrose, a indução ou suspensão da dormência e a biossíntese do etileno (CLIFFORD (1985a)).

No caso do café, contudo, as concentrações de ácido clorogênico são muito maiores do que a maioria das plantas, sugerindo uma função adicional que o simples controle do teor do ácido indol acético. CLIFFORD (1985a) sugere as seguintes possíveis funções adicionais para o ácido clorogênico do café:

- Desencorajar insetos, pássaros e mamíferos predatórios.

- Proteger contra a invasão de micróbios.
- Precursor da camada inicial protetora sintetizada no local de danos físicos sofridas pela planta.
- Precursor na biossíntese da lignina.
- Possível função na formação dos pigmentos verdes do grão cru.

2.7.9. EXTRAÇÃO E ANÁLISE QUANTITATIVA

Com respeito à análise quantitativa dos ácidos clorogênicos, há dois aspectos a serem considerados. Em primeiro lugar deve-se levar em conta a determinação de ácido clorogênico total e em segundo lugar a determinação dos isômeros individualmente. Nos dois casos é necessário extrair os ácidos clorogênicos dos grãos de café. O primeiro passo é moer os grãos, mas no caso de café cru isto é muito difícil. CLIFFORD (1985a) sugere o uso de liofilização ou congelamento em nitrogênio líquido para facilitar este processo. É sempre importante evitar o aquecimento.

Ao longo dos anos têm aparecido referências na literatura para a extração de ácido clorogênico do café usando-se água fria ou quente e acetato de etila. É necessário esclarecer contudo que a água fria não pode ser utilizada se a enzima polifenoloxidase (PPO) ainda estiver ativa e que a água quente facilita a migração do grupo acila. Atualmente os solventes mais usados são : metanol aquoso, etanol e isopropanol, com ou sem refluxo (PICTET e BRANDENBERGER, 1960; CORSE et alii, 1970; MARTINO et alii, 1979; MAIER et alii, 1972; MOLLER e HERRMANN, 1983; TRUGO e MACRAE, 1984a). CLIFFORD (1985a) escolheu isopropanol 70% em água como o

solvente mais satisfatório, extraindo inicialmente à temperatura ambiente durante 5,5 horas e, posteriormente, usando refluxo durante 1,5 horas. Os extratos em isopropanol não requerem clarificação com a solução de Carrez, como no caso dos extratos em água.

Na determinação do ácido clorogênico total no extrato, CLIFFORD (1985a) vem investigando este assunto exaustivamente. Existem cinco métodos espectrofotométricos que podem ser utilizados, dos quais o mais simples é a absorção à 320 - 330 nm. Este método não é específico porque quantifica qualquer outra substância presente que absorve na faixa do ultra-violeta. No caso de café crú isto não é muito problemático, já que não existem muitos compostos deste tipo, mas no caso de café torrado este método torna-se inviável devido à presença de muitos compostos que absorvem nesta faixa. Os procedimentos para a remoção de tais compostos são tão complicados que este método não é recomendado nestas situações. Porém, no caso de extratos de café crú pode ser usado. Se o ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) for utilizado como padrão, os ácidos dicafeoilquínico (ADCQ) serão superestimados em 15% , devendo-se usar um fator de correção.

Existem três métodos espectrofotométricos que determinam os resíduos acilantes. Os reagentes de borato e de molibdato determinam 1,2 dihidroxifenóis (CLIFFORD e SANIFORTH, 1977). São métodos simples e precisos e os autores consideram que o reagente de molibdato seja superior ao de borato, uma vez que sua cor amarela permite uma avaliação visual. Usando 5-ACQ como padrão, os ADCQ são superestimados em 37% e o ácido caféico em 12%, enquanto o ácido cafeoilferulquínico (ACFQ) é subestimado em 33%,

devendo-se usar fatores de correção. Com amostras torradas, serão determinadas também 1,2 dihidroxifenóis produzidos na torração, mas isto representa uma fração muito pequena o que não impede seu uso.

O reagente periodato determina tanto os 1,2-dihidroxifenóis como os ésteres monometila, detectando também o ácido ferúlico, o ácido feruloilquínico (AFQ) e o ACFQ. Uma vez que o ácido ferúlico está presente em quantidades mínimas e subestimado em 50% por este reagente, a diferença entre o valor obtido pelo reagente de molibdato e o valor obtido pelo reagente de periodato, é considerado como sendo o teor de AFQ. Com amostras torradas há alguma interação com produtos de degradação de compostos fenólicos.

O último método espectrofotométrico, que usa como reagente o ácido tiobarbitúrico, determina o resíduo de ácido quínico. É um método complexo com várias etapas e subestima o ADCQ em 31%, quando se usa o 5-ACQ como padrão. Sua única virtude é que sofre pouca interferência, mas o acúmulo de erros através das várias etapas faz com que o método perca sua precisão.

Os pesquisadores concluíram que dos métodos espectrofotométricos, o mais indicado para a análise do ácido clorogênico total em café é aquele em que se usa o reagente periodato.

Com respeito aos métodos que determinam os isômeros individualmente, é indicado o uso de cromatografia líquida de alta performance. A cromatografia gasosa não é muito empregada para esta determinação, porque exige boa purificação da amostra antes de analisá-la, uma vez que nem a sililação e tampouco os métodos

de detecção são específicos para ácido clorogênico. Este método faz uso de uma coluna capilar polar de silicone coberta com borracha. É recomendada a desativação dos capilares de borosilicato com albumina de soro de boi para melhorar a resolução.

A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) é o método mais indicado para a detecção e quantificação dos isômeros individuais. Nas primeiras determinações por cromatografia líquida utilizaram-se sistemas de baixa pressão. Os primeiros pesquisadores a usar HPLC foram COURT (1977) e REES e THEAKER (1977), ambos usando uma coluna de fase reversa pelicular. Atualmente a maioria dos métodos são modificações do método de VAN DER STEGAN e VAN DUIJN (1980) que conseguiram separar doze isômeros do ácido clorogênico mais dois ácidos cinâmicos numa coluna de fase reversa microparticulada, usando um gradiente de metanol a pH 2,5. Variações deste método têm sido publicadas por vários autores (MAIER et alii, 1982; TRUGO e MACRAE, 1984a; MOLLER e HERRMANN, 1982). CLIFFORD et alii (1985) apresentou um sistema rápido e isocrático de fase reversa que serve para trabalhos de rotina e que quantifica nove isômeros do ácido clorogênico, três ácidos cinâmicos e cafeína. Usando a fase reversa, os compostos mais polares são eluídos primeiramente e a detecção dos isômeros nos extratos de café é bastante específica na região de 310-330 nm. Na ausência de todos os padrões, o 5-ACQ pode ser usado como padrão externo, fazendo correções para as absorbâncias molares dos outros isômeros (CLIFFORD, et alii, 1985).

3.0. MATERIAL E MÉTODOS.

3.1 MATÉRIA-PRIMA

O café arábica cv. Catuai vermelho usado neste estudo foi fornecido pelo Instituto Brasileiro do Café / Fundação do Café, Campinas S.P.. Os 200 pés de café aproveitados foram todos cultivados sob as mesmas condições de solo, fertilização, ensolação e irrigação. A colheita foi feita por derriça numa cesta colhendo todas as cerejas do grupo de pés escolhidos, quando a maioria delas estavam maduras. Imediatamente toda a colheita foi classificada em 7 grupos baseados na cor (tabela 1). Para os ensaios finais, cujos resultados estão apresentados nesta tese, a colheita foi feita em seis ocasiões diferentes e os resultados analisados estatisticamente. As colheitas foram feitas em duas safras consecutivas, 1986 e 1987.

Tabela 1. Classificação das Cerejas pela cor

Classificação	Cor
Verde (v)	verde
Meio-verde (mv)	Metade verde/metade rosada
Meio-maduro (mm)	Rosada
Maduro (m)	Vermelho
Bem maduro (bm)	Vermelho escuro
Meia passa (mp)	Quase preta
Passa (p)	Preta

De cada grupo, a metade foi preparada por via seca e a outra metade por via úmida.

3.2. PREPARAÇÃO DO CAFÉ

3.2.1 VIA SECA

As cerejas foram expostas ao sol até atingir aproximadamente 11% de umidade. À noite, e durante períodos de chuva, as cerejas foram recolhidas.

3.2.2. VIA ÚMIDA

As cerejas foram despulpadas a mão, com auxílio de uma faca quando necessário (cerejas verdes). As cerejas despulpadas foram colocadas em bequers acrescentando-se água suficiente até quase cobri-las. As quantidades variavam de acordo com a proporção de cada tipo na mistura. Os bequers foram cobertos e deixados à temperatura ambiente. Uma vez iniciada a fermentação, verificava-se o estágio do processo pelo tato, duas vezes ao dia. Quando os grãos não escorregavam mais um no outro, notando-se uma aspereza entre eles, considerou-se o processo concluído, lavando-os em seguida com água corrente para remover a mucilagem hidrolisada. Em média levava-se 24 horas para completar a fermentação. Os grãos lavados foram expostos ao sol durante o dia até atingir aproximadamente 11 % de umidade. À noite, e durante períodos de chuva, os grãos foram recolhidos.

3.3. BENEFICIAMENTO

As cerejas secas (via seca) e grãos secos (via úmida) foram beneficiados utilizando-se a beneficiadora modelo MBOLA de Manesco e Ranieri Ltda. (Piracicaba).

3.4. EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICOS

As amostras de grãos secos foram moídas num micromoinho modelo TE 345 da Marconi resfriado com água corrente até uma granulometria que permite a passagem em peneiras com abertura de 0,7 mm. Amostras de aproximadamente 1 g, pesadas com exatidão, foram extraídas com refluxo com isopropanol 70 % em água durante 4 horas num aparelho de Soxlet da FANEM Ltda. Após resfriar, os extratos foram completados até 200 ml com isopropanol 70 % num balão volumétrico e depois filtrados. Os extratos filtrados foram guardados no congelador à temperatura aproximada de -12°C até a realização das análises.

3.5. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO TOTAL

O teor de ácido clorogênico total foi determinado usando-se o reagente de metaperiodato ou seja, 0,25 % de metaperiodato de sódio em água (CLIFFORD e WIGHT, 1976). Amostras de 1 ml dos extratos foram misturados com 10 ml de reagente. Após 10 minutos a 27°C , a absorbância foi determinada a 406 nm usando-se um branco preparado da mesma forma com 1 ml de isopropanol 70 % mais 10 ml de reagente. As leituras foram feitas num espectrofotômetro

Coleman modelo 295 E.

O padrão foi preparado usando-se ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ)(Sigma) dissolvido em isopropanol 70 % e uma curva padrão feita entre 0 e 2 μ moles de 5-ACQ. Em cada conjunto de análises determinou-se a absorbância do padrão contendo 1 μ moles/ml de 5-ACQ para se verificar qualquer desvio da curva padrão.

3.6. ANÁLISE DOS ISÔMEROS DO ÁCIDO CLOROGÊNICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE.

Foi utilizado um aparelho de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) da Waters Associates (Massachusetts, E.U.A.) equipado com uma bomba modelo 6000A, injetor modelo U6K, um detetor de absorbância modelo 440 operando a 254 nm e 313 nm (separadamente), registrador modelo Data module. Uma coluna de fase reversa de aço inox de 30 cm x 3.0 mm contendo μ Bondapak C_{18} (Waters) foi utilizada para todas as análises.

3.6.1 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA

Empregou-se basicamente a metodologia de VAN DER STEGAN e VAN DUIJN (1980), mas procedeu-se a uma série de modificações devido à necessidade de se utilizar um sistema isocrático e uma coluna diferente.

Em virtude das limitações impostas pelos fabricantes do equipamento, não foi possível usar solução tampão citrato (pH 2,5) recomendado por VAN DER STEGAN e VAN DUIJN (1980) para baixar o pH do metanol. Assim, nas experiências iniciais foi empregado

metanol a 27 % em água (pH 7,7) como solvente, injetando-se uma solução padrão de 5-ACQ (Sigma) hidrolisado para se ter quantidades aproximadamente iguais de 3-ACQ, 4-ACQ e 5-ACQ. O hidrolisado foi dissolvido no solvente. Nas experiências iniciais usou-se uma absorbância de 254 nm conseguindo-se picos nítidos mas sem uma boa separação dos isômeros apesar de inúmeras tentativas na variação dos parâmetros de fluxo, pressão, largura do pico (peak width), rejeição de ruído e sensibilidade.

Numa tentativa de melhorar a separação, o pH do metanol foi abaixado para 5,5, utilizando-se fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) ao invés de água. Com este solvente foi possível obter uma boa separação dos 3 monoisômeros usando-se as seguintes condições:

- fluxo	- 1,5 ml/min.
- pressão	- approx. 2.500 psi
- largura do pico	- 12
- rejeição de ruído	- 50
- sensibilidade	- 0,2

Para verificar a separação dos diisômeros neste sistema, foi injetado uma solução padrão de 1,3 ADCQ (doador por Dr. M.N. Clifford, University of Surrey, Inglaterra) que foi o único padrão disponível de um diisômero. Este padrão foi injetado juntamente com o padrão dos monoisômeros. Foi verificado que no sistema desenvolvido, este diisômero demorou demasiadamente para ser eluído (mais que 30 minutos), produzindo um pico muito largo e de difícil quantificação. Para resolver este problema substituiu-se o solvente pelo metanol a 30 % com KH_2PO_4 0,1 M após

a eluição dos monoisômeros, usando-se a segunda entrada de solvente do aparelho. Este sistema deu resultados satisfatórios para o diisômero sem prejudicar a eluição dos monoisômeros, embora fosse necessário reequilibrar o aparelho com metanol a 27 % durante 15 minutos, antes de se injetar uma nova amostra.

Experiências com concentrações ainda maiores de metanol (33, 36 %) na segunda etapa, prejudicou o bom andamento do trabalho devido ao tempo excessivo necessário para reequilibrar o aparelho com metanol a 27 %.

Após padronizar a metodologia, iniciaram-se os ensaios com os extratos de café. Uma vez que estes estavam dissolvidos em isopropanol, foi inicialmente necessário eliminar este solvente e redissolver os extratos em metanol a 27 %. Aliquotas de 10 ml foram evaporadas até a secagem e, após resfriar, foram dissolvidas em 10 ml de metanol a 27 % em KH_2PO_4 0,1M usando-se uma seringa de 10 ml e equipamento próprio; cada extrato foi filtrado através de filtros tipo FH de porosidade 0,5 μm (Milipore). Ensaios com Sep-pak não deram resultados satisfatórios, reduzindo o número de picos dos isômeros.

Ensaios com amostras assim preparadas foram efetuados usando a metodologia padronizada e lendo as absorbâncias a 254 nm. Foram obtidos 3 picos de monoisômeros (3-ACQ, 4-ACQ e 5-ACQ), um pico de algum isômero de ferulilquínico e 2 picos de diisômeros (3,4-ADCQ e 3,5-ADCQ). Apareceram alguns picos menores não identificados e também um grande pico de cafeína, eluído um pouco antes dos monoisômeros. Para quantificar os isômeros do ácido clorogênico, foi usado um padrão externo de 5-ACQ, injetando 0,005 μmoles na calibração.

Para eliminar qualquer interferência da cafeína, foi trocado o filtro de 254 nm por um de 313 nm, uma vez que a cafeína absorve pouco neste comprimento de onda, enquanto os ácidos clorogênicos absorvem mais. Nestes ensaios o pico de cafeína diminuiu substancialmente, enquanto os picos dos isômeros do ácido clorogênico aumentaram um pouco. Contudo, a quantificação apresentou os mesmos resultados.

Foi adotada então a seguinte metodologia:

solventes:

(a) Metanol a 27 % em KH_2PO_4 0,1 M até a eluição dos momoisômeros.

(b) Metanol a 30 % em KH_2PO_4 0,1 M até completar a eluição de 3,5-ADCQ.

Filtro: 313 nm

Parâmetro de largura do pico: 12

Rejeição de ruído: 50

Sensibilidade: 0,2

Fluxo: 1,5 ml/min.

Pressão: aproximadamente 2500 psi.

A Figura 5 mostra um cromatograma típico feito nestas condições.

Infelizmente não foi possível controlar perfeitamente a temperatura do ambiente e, portanto, observou-se pequenas variações de pressão e como resultado os tempos de eluição também. Contudo, utilizando-se o padrão de 5-ACQ e recalibrando-se o equipamento cada vez que a pressão modificava, foi possível superar este problema.

FASE MOVEL: (i) Metanol 27% em KH_2PO_4 0,1M
de 0-4 mins.

(ii) Metanol 30% em KH_2PO_4 0,1M
de 4-16 mins.

SUPORT : μ Bondapak C_{18}

FLUXO: 1,5 ml/min.

λ : 0,2

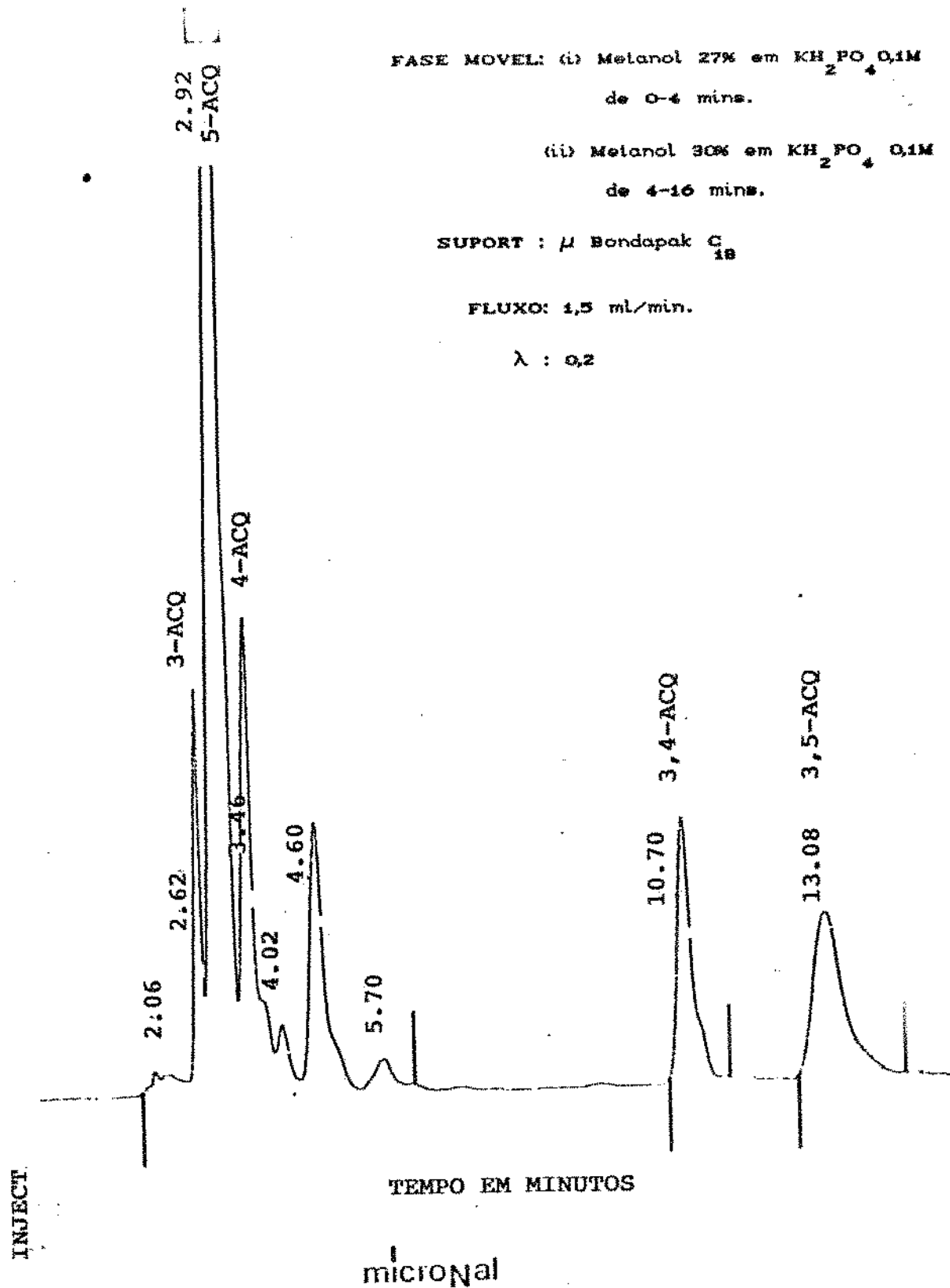


Figura 5 - Cromatograma típico dos isômeros do ácido cafeoilquínico

3.6.2. QUANTIFICAÇÃO DOS DIFERENTES ISÔMEROS

O único padrão disponível foi o de 5-ACQ, e portanto este foi o único isômero que podia ser quantificado diretamente pelo "Data module". Os demais isômeros foram quantificados baseados nas áreas de seus picos e comparando-os com a área do pico de 5-ACQ, usando-se os fatores de correção calculados por CLIFFORD *et alii* (1985), ou seja:

5-ACQ	---	X	1,0
3-ACQ	}	---	X 1,07
4-ACQ	}		
3,4-ADCQ	}	---	X 0,9
3,5-ADCQ	}		

Os resultados foram apresentados na base do peso seco. Para se calcular as porcentagens dos diferentes isômeros em cada amostra, foi usado o seguinte cálculo:

- Peso de amostra extraída = w g.
- Volume total do extrato = 200 ml
- Volume injetado = 20 μ l
- μ moles de isômero encontrado = n μ moles
- Peso molecular do isômero = P
- % de sólidos na amostra = S

Então tem-se:

- n μ moles $\equiv$ 20 μ l de extrato
- n m moles $\equiv$ 20 ml de extrato
- (10 X n) m Moles $\equiv$ 200 ml de extrato

$$= \frac{(10 \times n \times P)}{1000} \text{ g} \equiv 200 \text{ ml de extrato} \equiv w \text{ g amostra}$$

Mas:

$$w \text{ g de amostra} \equiv \frac{(w \times S)}{100} \text{ g de sólidos}$$

$$\text{então: } \frac{(w \times S)}{100} \text{ g de amostra (base peso seco)} \equiv \frac{(10 \times n \times P)}{1000} \text{ g de isômero}$$

$$\% \text{ de isômero} = \frac{(10 \times n \times P)}{1000} + \frac{(w \times S)}{100} \times 100$$

(base peso seco)

$$= \frac{10 \times n \times P \times 100 \times 100}{1000 \times w \times S}, \quad \text{ou:}$$

$$= \frac{(n \times P \times 100)}{w \times S},$$

$$\text{mas } n = \frac{\mu \text{ moles 5-ACQ}}{\text{área 5-ACQ}} \times \text{área isômero} \times \text{fator de correção}$$

$$\text{Então \% isômero} = \frac{\mu \text{ moles 5-ACQ}}{\text{área 5-ACQ}} \times \text{área isômero} \times \text{fator de correção} \times \frac{P \times 100}{w \times S}$$

Uma vez que 100, w e S são constantes para uma determinada amostra, pode-se calcular:

$$C = \frac{100}{w \times S}$$

Substituindo-se C, temos:

$$\% \text{ Isômero} = \frac{\mu \text{ moles de 5-ACQ}}{\text{área 5-ACQ}} \times P \times C \times \text{área isômero} \times \text{fator isômero}$$

Foi usado este sistema de equações para calcular os valores de % de isômeros de 3-ACQ, 4-ACQ, 5-ACQ, 3,4-ADCQ e 3,5 ADCQ de cada amostra examinada, calculando-se os valores das duplicatas separadamente para depois se obter a média dos resultados.

3.6.3. DETERMINAÇÃO DA ORDEM DE ELUIÇÃO DOS ISÔMEROS

O único padrão disponível foi o de 5-ACQ. Pela hidrólise deste padrão (item 3.6.4.) foi possível obter 3-ACQ, 4-ACQ e 5-ACQ em quantidades mais o menos iguais, mas nos cromatogramas não foi possível saber qual pico representava 3-ACQ e qual 4-ACQ, havendo somente certeza da posição do 5-ACQ. Portanto, esta determinação foi feita pelo Dr. M.N. CLIFFORD na Universidade de Surrey, Inglaterra, usando o mesmo equipamento e nas mesmas condições usadas nesta tese. Assim, foi possível determinar a ordem de eluição como sendo:

- 1° 3-ACQ
- 2° 5-ACQ
- 3° 4-ACQ

Da mesma forma o Dr. Clifford determinou que os dois diisômeros eluídos eram:

- 1° 3,4-ADCQ
- 2° 3,5-ADCQ

Nas condições usadas não foi possível detectar 4,5-ADCQ, o outro diisômero presente no café. Este último demorou demasiadamente para ser eluído, necessitando o uso de gradiente para ser quantificado.

Algumas das amostras foram analisadas nas mesmas condições (Cromatografo HPLC Waters, coluna C_{18} , fase móvel metanol e água) no laboratório do Dr. Clifford, Universidade de Surrey, onde padrões dos 5 isômeros eram disponíveis, confirmando os tempos de retenção e a quantificação obtidos na UNICAMP. No laboratório do Dr. Clifford, a natureza e pureza dos padrões e ácidos clorogênicos de café foram confirmados espectrofotometricamente (espectras de absorção na região ultravioleta e de ressonância magnética nuclear).

3.6.4. HIDRÓLISE DO PADRÃO DE 5-ACQ

Uma amostra de 30 mg do padrão de 5-ACQ (Sigma) foi dissolvido em 20 ml de água destilada e seu pH ajustado para 8 com uma solução diluída de hidrólise de amônia. Esta solução foi aquecida em banho maria fervente durante 30 minutos para efetuar a migração acila, resultando num equilíbrio de quantidades aproximadamente iguais de 3-ACQ, 4-ACQ e 5-ACQ. Após esfriar, o pH da solução foi ajustado com ácido clorídrico diluído para permanecer na faixa de pH 2,5-3,0. A esta solução foi acrescentado 12,7 ml de metanol e o volume total completado para 47 ml com água destilada para dar uma concentração de 27 % de metanol na solução. Uma vez que a concentração inicial de 5-ACQ foi de 3 μ moles/ml, a concentração final de cada isômero foi de aproximadamente 1 μ

moles/ml . Esta mistura foi usada apenas para verificar a qualidade da separação dos isômeros e as posições dos picos pela metodologia padronizada, não sendo possível ser utilizado para quantificação.

3.6.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS OBTIDOS

Considerando que o experimento foi repetido em 8 dias diferentes e em cada ocasião a colheita foi separada em 7 grupos de maturação, e cada amostra analisada duas vezes, tem-se 84 amostras preparadas por via úmida, bem como outras 84 amostras obtidas por via seca. Para a análise estatística foram somados os valores de % 3-ACQ, % 4-ACQ e % 5-ACQ, para dar um valor de % ACQ total, uma vez que a hipótese inicial baseou-se na relação entre % ACQ total e % ADCQ total. Da mesma forma foram somados os valores de % 3,4-ADCQ e % 3,5-ADCQ para dar um valor de ADCQ total. Como explicado anteriormente não foi possível quantificar % 4,5 ADCQ. Estes valores de % ACQ e % ADCQ, ambos na base de peso seco, foram analisados estatisticamente, procurando-se determinar os efeitos dos diferentes níveis de maturação dos grãos bem como o efeito das duas vias de preparo (úmida e seca).

Os dados foram analisados usando-se um modelo de Análise de Variância em blocos com dois critérios de classificação, que serão descritos em detalhe a seguir.

Modelo:

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijkl}$$

Tem-se que: y_{ijkl} = relação entre as porcentagens de ACQ e ADCQ, considerando-se nível i de maturação, tipo j de via de preparo, colheita do dia k da amostra l .

$$i = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$$

$$j = 1, 2$$

$$k = 1, 2, 3, 4, 5, 6$$

$$l = 1, 2$$

μ = média geral

α_i = efeito do nível i de maturação

β_j = efeito do tipo j de via de preparação

γ_k = efeito do dia k da colheita (bloco)

$(\alpha\beta)_{ij}$ = efeito de interação entre nível i da maturação e tipo j de via de preparo .

ε_{ijkl} = erro aleatório.

Para vias de preparo será indicado como 1 a via seca e como 2 a via úmida.

Convém salientar, que tendo em vista que as colheitas foram feitas em dias diferentes, esse fator foi considerado como uma restrição à aleatorização do experimento, portanto considerado como bloco.

Em virtude da elevada significância dos testes realizados, foi feita uma análise posterior, comparando-se as médias do quociente entre % ACQ e % ADCQ para cada fator considerado. Para isto foi utilizado o teste de médias de Duncan.

3.7. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

Amostras moídas de aproximadamente 1 g pesadas em balança analítica foram secas a 105°C até peso constante. A primeira pesagem das amostras secas foi feita após 8 horas na estufa (CLIFFORD e STANFORTH, 1977).

3.8. EXTRAÇÃO DE POLIFENOLOXIDASE

O método de extração da polifenoloxidase foi baseado na metodologia de DRAETTA e LIMA (1978) usando polivinilpirrolidona (PVP) para remover os compostos fenólicos presentes e acetona para precipitar a polifenoloxidase.

Foi feita uma série de experiências para determinar a melhor relação entre peso de amostra e peso de PVP, resultando na seguinte metodologia:

As amostras de grãos secos foram moídas num micromoinho modelo TE 345 da Marconi até passar numa peneira de abertura de 0,7 mm. Quantidades de 1 g de pó foram misturados com 1g de PVP em erlenmeyer e acrescentados 100 ml de acetona a 5°C. Os conteúdos foram misturados durante três minutos num banho de gelo e depois centrifugados a (25.000 x g) durante 15 minutos a 5°C numa ultracentrífuga modelo F22 da FANEM. Os sobrenadantes, contendo os fenólicos, foram descartados e aos resíduos foram acrescentados alíquotas de 100 ml de solução tampão fosfato 0,1M pH 7 para solubilizar a polifenoloxidase, misturando em banho de gelo durante 12 minutos. Descartaram-se os resíduos e os filtrados foram novamente centrifugados sob as mesmas condições. Os resíduos

nesta centrifugação foram descartados e os sobrenadantes contendo a polifenoloxidase foram usados para determinação da atividade, sendo sempre mantidos a 5°C.

3.9. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE POLIFENOLOXIDASE

A determinação da atividade de polifenoloxidase foi baseada na metodologia de DRAETTA e LIMA (1976), usando-se pirocatecol como substrato e glicina como ativador.

Aliquotas de 2,8 ml de pirocatecol 0,01M foram misturadas com 1,0 ml de glicina 0,2 M e 0,2 ml de extrato de café. Foi determinada a absorbância imediatamente após a mistura a 400 nm num espectrofômetro Tecnal mod. B29511, usando-se como branco uma mistura contendo 2,8 ml de pirocatecol 0,01M, 1 ml de glicina 0,2 M e 0,2 ml de solução tampão fosfato 0,1 M pH 7. A leitura da absorbância foi repetida de cinco em cinco minutos por 30 minutos.

Uma unidade de atividade de polifenoloxidase foi definida como sendo aquela que causou uma mudança de 1,0 unidade de absorbância por minuto na fase exponencial. Os resultados foram apresentados na base de peso seco.

A atividade específica foi dada pelas unidades de atividade/mg de proteína (ver item 3.10).

3.10. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA NOS EXTRATOS DE POLIFENOLOXIDASE.

Foi utilizada a metodologia de BRADFORD (1976), que se baseia na ligação da proteína ao corante (dye-binding method), eliminando a interferência causada pelos compostos fenólicos presentes.

O reagente foi preparado dissolvendo-se 100 mg de Coomassie azul brilhante G (Sigma) em 50 ml álcool etílico 95%. Após a adição de 100 ml de ácido fosfórico 85% (p/v) o volume foi completado até 1.000 ml com água destilada e filtrado antes do uso.

A mistura reativa foi constituída por 0,08 ml de extrato, 0,02 ml NaCl 0,15 M e 5 ml de reagente. O branco foi constituído por 0,1 ml de NaCl 0,15 M e 5 ml de reagente e o padrão de referência por 0,03 ml de albumina de sêro de boi (Sigma) 1 mg/ml, 0,07 ml de NaCl 0,15 M e 5 ml de reagente. A absorbância foi lida a 595 nm entre 5 e 20 minutos após a mistura (faixa de estabilidade máxima do complexo) em espectrofotômetro Coleman modelo 295 E.

Foi preparada uma curva padrão com albumina de sêro de boi (Sigma) entre 0 e 0,1 mg de albumina, sempre completando o volume até 0,1 ml com NaCl 0,15 M e acrescentando 5 ml de reagente.

Os resultados foram apresentados na base de peso seco.

3.11. AVALIAÇÃO DE ACQ E ADCQ COMO SUBSTRATO DA PPO DO CAFÉ.

Eluentes de ACQ e ADCQ foram colhidos separadamente após sua análise pelo HPLC, usando a saída "collect". Após a remoção do metanol por evaporação, os mesmos foram dissolvidos em solução tampão fosfato 0,1M pH 7.

Estas soluções foram usadas em substituição à solução de pirocatecol (item 3,9) para determinar suas capacidades de serem empregadas como substratos pelos extratos de polifenoloxidase de café. Este ensaio foi realizado apenas qualitativamente.

3.12. CLASSIFICAÇÃO DA BEBIDA DO CAFÉ

A classificação da bebida do café foi feita pela equipe de degustadores do Instituto Brasileiro do Café, São Paulo, seguindo as normas do *Manual de recomendações* (I.B.C. Instituto O padrão da bebida é "mole" quando se traduz num gosto agradável, brando e doce. As demais classificações são dadas em função da bebida "mole" .

É possível também que da mesma bebida básica, possam apresentar nuances de sabor, podendo haver "moles muito incorporados" ou "sem corpo" . Podem estar com leve acidez cítrica (desejável) ou com acidez acética (indesejável) e finalmente podem ocorrer gostos estranhos tais como : de terra, mofo, azedo, chuvado, avinagrado, fermentado, etc.

Tabela 2.- A Classificação da bebidaado Café

Classificação	Características
- Mole	Gosto agradável, brando e doce
- Estritamente mole	Características de mole, porém mais acentuada.
- Apenas mole	Sabor levemente suave, inferior aos anteriores - sem adstringências ou asperezas de paladar
- Duro	Gosto acre, adstringente e áspero, mas sem paladares estranhos.
- Riado	Leve sabor típico de iodoformio
- Rio	Cheiro e gosto acentuado de iodoformio
- Rio Zona	Características de "rio" mas bem mais acentuadas

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ENSAIOS PRELIMINARES

No ano 1985 foram feitas oito colheitas de café por derriçagem em cesta, colhendo a produção de 10 pés por vez. Nesta ocasião foram misturadas as colheitas de *C. arabica* cv Catuai vermelho e de *C. arabica* cv Catuai amarelo, uma vez que se considerou que variariam apenas quanto a cor das suas cerejas. Nos ensaios definitivos (1986 e 1987) foram aproveitados apenas os pés da variedade vermelha para evitar a possível introdução de mais uma variável. Estas colheitas foram agrupadas em lotes levando-se em conta apenas cinco graus de maturação evidenciados pela cor (verde, meio verde, meio madura, maduro e passa). A metade de cada lote foi preparada por via seca e a outra por via úmida, sendo posteriormente beneficiados, como descrito no item 3.3.

A extração dos ácidos clorogênicos foi feita como descrito no item 3.4. com apenas a variação no tempo de refluxo que foi duas horas ao invés de quatro. Ensaios posteriores indicaram quatro horas como o tempo mais adequado, sendo esta técnica adotada nos ensaios definitivos.

O teor de ácido clorogênico total destas amostras não foi determinado, mas os extratos foram analisados por HPLC usando apenas o filtro de 254 nm e algumas pequenas modificações nas condições de uso, que foram também posteriormente aprimoradas.

Foram quantificados os isômeros 3-ACQ, 4-ACQ, 5-ACQ e 3,5-ADCQ para cada amostra em termos de % de ácido, na base de

peso seco. A figura 6 apresenta a variação com a maturação da soma dos 3 isômeros ($\% 3\text{-ACQ} + 4\text{-ACQ} + \% 5\text{-ACQ} = \% \text{ACQ}$) e o $\% 3,5\text{-ADCQ}$ para as amostras preparadas pelas duas vias. Em cada caso, o valor representa a média dos valores das oito amostras de cada grupo (8 colheitas).

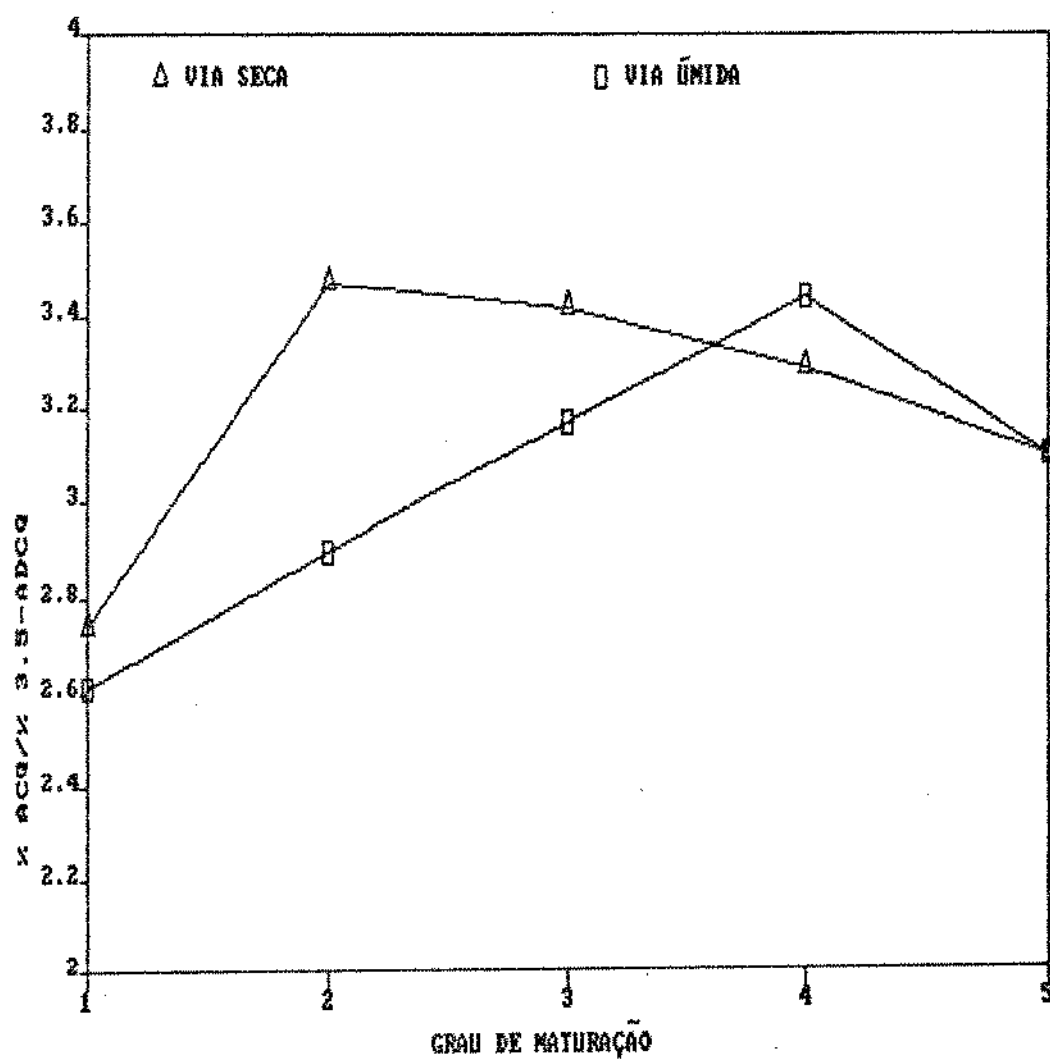
Diante destes resultados, que parecem sustentar a hipótese de que o grau de maturação influencia a relação ACQ/ADCQ, com uma diferença marcante entre as duas vias de preparação, decidiu-se continuar as pesquisas, fazendo apenas algumas modificações nas técnicas usadas para melhor esclarecer tais variações. Os métodos descritos na seção de Material e Métodos são aqueles que resultaram destes aprimoramentos.

4.2. VARIAÇÃO DA % DE ÁCIDO CLOROGÊNICO TOTAL COM A MATURAÇÃO

No ano 1986 foram feitas 4 colheitas de café (dias 1, 2, 3 e 4) e no ano 1987 foram feitas mais duas (dias 5 e 6).

A determinação do ácido clorogênico total pelo método espectrofotométrico (3.5) e a quantificação dos diferentes isômeros por HPLC (3.6) foram efetivadas em todas as amostras, enquanto os ensaios com polifenoloxidase (3.8, 3.9 e 3.10) foram efetuados apenas com amostras do ano de 1987.

As porcentagens de ácido clorogênico total (calculados na base do peso seco do café beneficiado) são apresentadas no anexo 4, juntamente com as médias das repetições de cada grupo. O anexo 1 apresenta a classificação de cada amostra em relação com o grau de maturação, via de preparo e dia de colheita. Apresenta também a porcentagem de sólidos de cada amostra, que é fundamental para



1= Verde, 2= meio verde, 3= meio maduro,
4= maduro, 5= passa.

Figura 6.- Variação da relação % ACQ/ % ADCQ com a maturação. Amostras de 1985.

converter todas as demais determinações com base no peso seco.

A tabela 3 apresenta os valores médios de ácido clorogênico para cada grupo de maturação preparado por via seca, os valores máximos e mínimos encontrados dentro de cada grupo e o valor obtido para o primeiro dia de colheita. Em seguida a figura 7 mostra graficamente a variação do teor médio e do valor do 1.º dia em relação a maturação. Da mesma forma, a tabela 4 e a figura 8 mostram os mesmos dados para as amostras preparadas por via úmida.

As tabelas 3 e 4 mostram claramente que as variações em porcentagens de ácido clorogênico total de um dia de colheita para outro, dentro do mesmo grupo de maturação, são tão grandes, que estes valores nunca poderiam ser utilizados como índices de maturação para nenhuma das vias de preparação.

Como mostra a figura 7 nas amostras preparadas por via seca, as variações do teor médio obedecem uma sequência parecida com aquela de um dia específico, embora não suficientemente para relacionar o teor de ácido clorogênico com a maturação. No caso das amostras preparadas por via úmida, a discrepância entre as duas curvas (fig. 8) é tão grande que certamente não existe relação nenhuma. Uma vez que a única variável entre um dia de colheita e o outro foi o clima, é de se supor que este é o fator responsável pela variação, principalmente o fator chuva. Após a colheita, quando a umidade do ar for elevada haverá também influência no processo de secagem, especialmente no caso da via seca em que as cerejas são secas inteiras. Também poderá influir no teor de ácido clorogênico, o que talvez explicaria porque as amostras preparadas por via úmida normalmente apresentam teores mais elevados de ácido clorogênico (compare os dados para o dia

Tabela 3. Variação da porcentagem de ácido clorogênico total com a maturação - via seca.

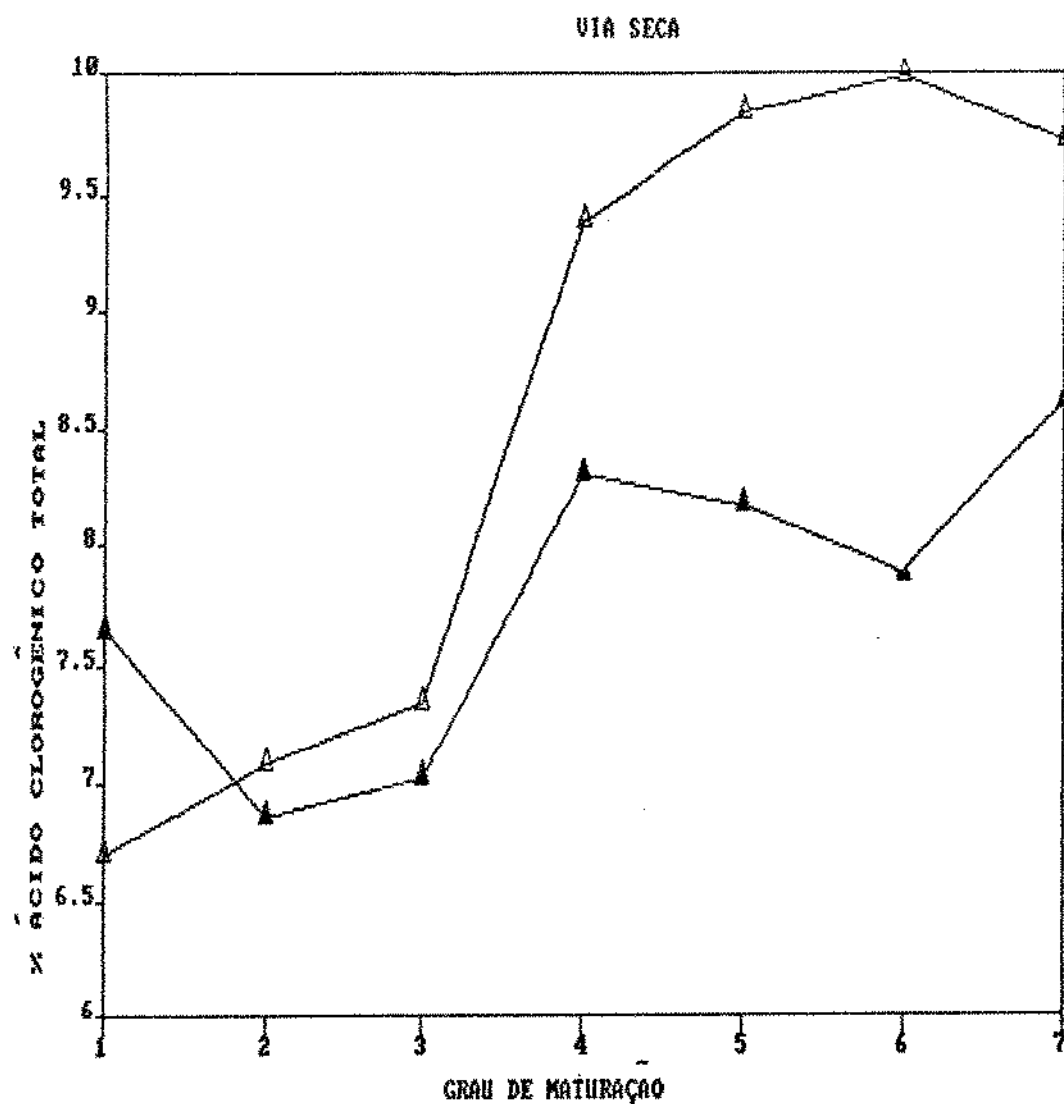
Grau de Maturação	Porcentagem de ácido clorogênico total (peso seco)			
	Valor máximo	média ^a	valor mínimo	dia 1 ^b
Verde	10,39	7,65	6,07	6,70
Meio verde	9,04	6,86	5,11	7,08
Meio maduro	7,68	7,02	6,15	7,34
Maduro	9,39	8,29	7,10	9,39
Bem maduro	9,84	8,17	7,26	9,84
Meio passa	9,99	7,88	7,12	9,99
Passa	10,03	8,61	6,64	9,72

Tabela 4. Variação da porcentagem de ácido clorogênico total com a maturação - via seca.

Grau de Maturação	Porcentagem de ácido clorogênico total (peso seco)			
	Valor máximo	média ^a	valor mínimo	dia 1 ^b
Verde	14,29	10,15	7,26	13,07
Meio verde	14,48	9,31	7,18	14,48
Meio maduro	11,30	9,55	7,59	10,00
Maduro	12,96	10,56	9,64	10,69
Bem maduro	14,88	9,55	6,44	14,88
Meio passa	12,00	8,47	6,05	12,00
Passa	9,67	8,59	7,02	9,11

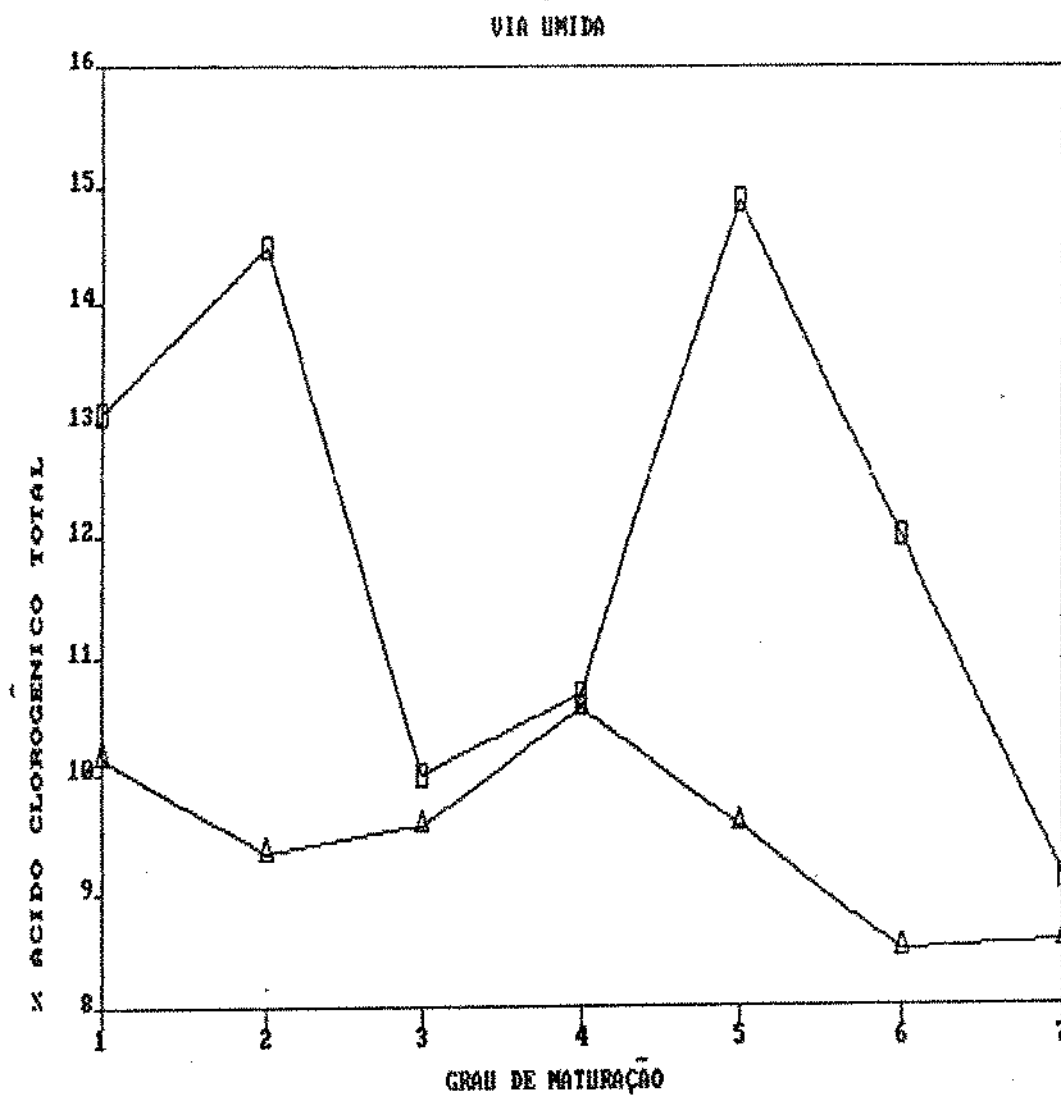
a - Média de 6 amostras colhidas em dias diferentes.

b - Valor obtido para o primeiro dia de colheita.



1= Verde, 2= meio verde, 3= meio maduro,
 4= maduro, 5= bem maduro, 6= meio passa,
 7= passa.

Figura 7.- Variação da porcentagem de ácido clorogênico total com a maturação - via seca: ▲ Média de 6 amostras colhidas em dias diferentes;
 Δ Valor obtido para o primeiro dia de colheita.



1= verde, 2= meio verde, 3= meio maduro,
 4= maduro, 5= bem maduro, 6= meio passa,
 7= passa.

Figura 8.- Variação da porcentagem de ácido clorogênico total com a maturação - via úmida: Δ Média de 6 amostras colhidas em dias diferentes; □ Valor obtido para o primeiro dia de colheita.

13, indicando uma maior perda deste ácido durante a secagem por via seca.

Conclui-se assim que as porcentagens de ácido clorogênico total, determinados pelo método do periodato em amostras de café secas e beneficiadas, não poderiam estar relacionadas com o grau de maturação das cerejas colhidas.

4.3. VARIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE MONOISÔMEROS DE ÁCIDO CLOROGÊNICO COM A MATURAÇÃO

Uma análise dos dados dos anexos 7 e 8 mostra que a proporção de cada monoisômero dentro do total é relativamente constante, ou seja, aproximadamente 75% 5-ACQ, 16% 4-ACQ e 9% 3-ACQ. Portanto, levando-se em conta este fato e considerando que a hipótese original se relacionava com as porcentagens totais de monoisômeros e diisômeros, somaram-se os valores dos três monoisômeros em cada caso para dar os valores da porcentagem total de monoisômero, também apresentados nos anexos 7 e 8.

Como no caso da porcentagem do ácido clorogênico total, aqui estão apresentados os valores médios das porcentagens de monoisômeros, para cada grupo de maturação das amostras preparadas por via seca (tabela 5) e úmida (tabela 6), juntamente com os valores máximos e mínimos e do primeiro dia de colheita em cada caso. As figuras 9 (via seca) e 10 (via úmida) mostram a variação com a maturação do valor médio da porcentagem de monoisômero e do valor do primeiro dia de colheita.

Tabela 5. Variação da porcentagem de monoisômero (3-ACQ + 4-ACQ + 5-ACQ) com a maturação - via seca.

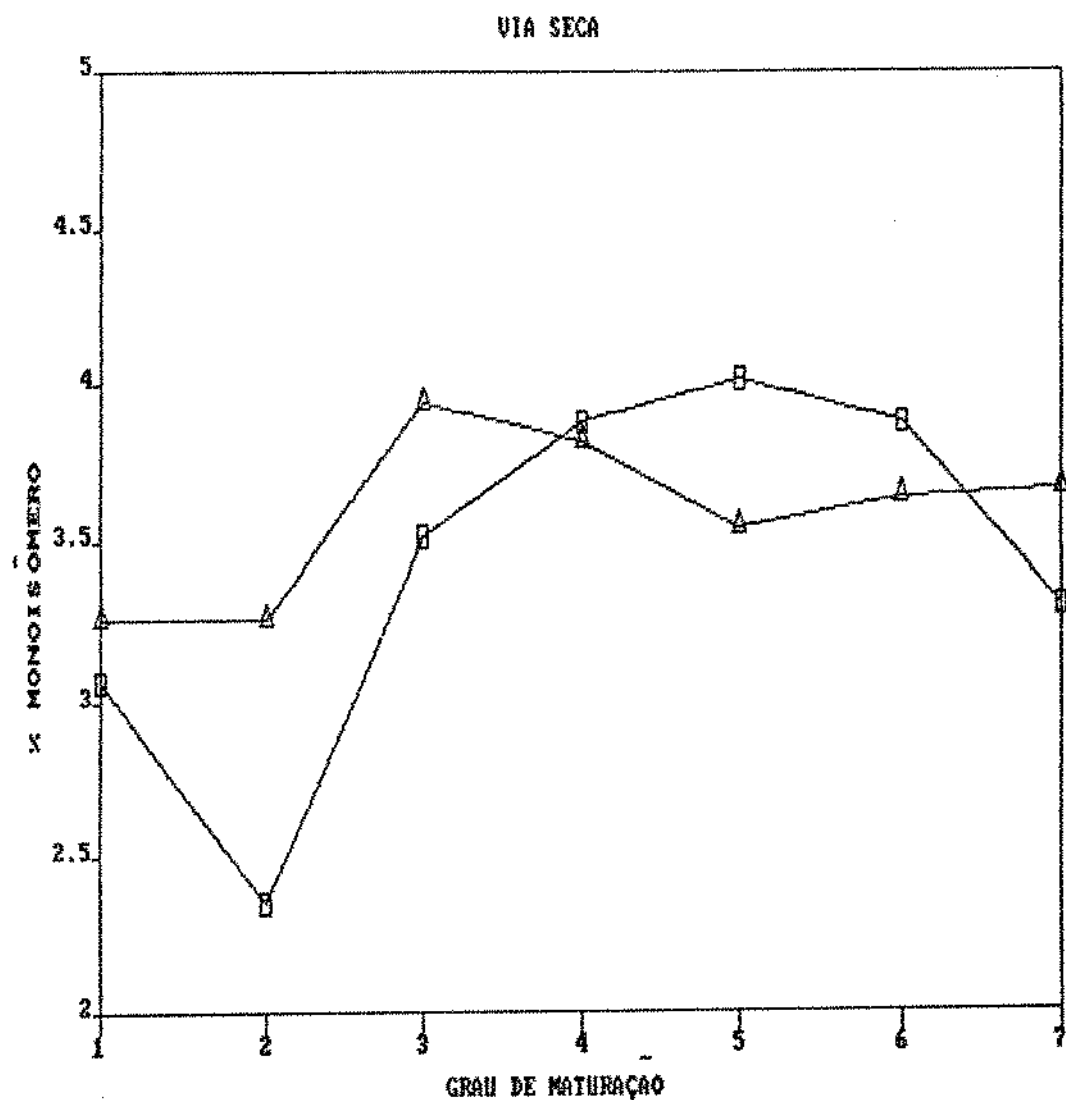
Grau de Maturação	Porcentagem de ácido clorogênico total (peso seco)			
	Valor máximo	média ^a	valor mínimo	dia 1 ^b
Verde	4,10	3,28	1,73	3,07
Meio verde	4,14	3,28	2,35	2,35
Meio maduro	6,31	3,94	2,68	3,52
Maduro	4,06	3,82	3,82	3,88
Bem maduro	4,02	3,54	2,93	4,02
Meio passa	4,50	3,64	2,54	3,88
Passa	4,44	3,67	2,72	3,31

Tabela 6. Variação da porcentagem de monoisômero (3-ACQ + 4-ACQ + 5-ACQ) com a maturação - via seca.

Grau de Maturação	Porcentagem de ácido clorogênico total (peso seco)			
	Valor máximo	média ^a	valor mínimo	dia 1 ^b
Verde	4,55	4,08	3,41	4,55
Meio verde	5,31	4,02	3,15	4,04
Meio maduro	5,04	4,47	3,75	5,04
Maduro	4,52	3,83	2,99	4,21
Bem maduro	5,29	3,77	2,02	5,29
Meio passa	4,06	2,98	1,72	4,06
Passa	5,56	3,78	1,82	3,84

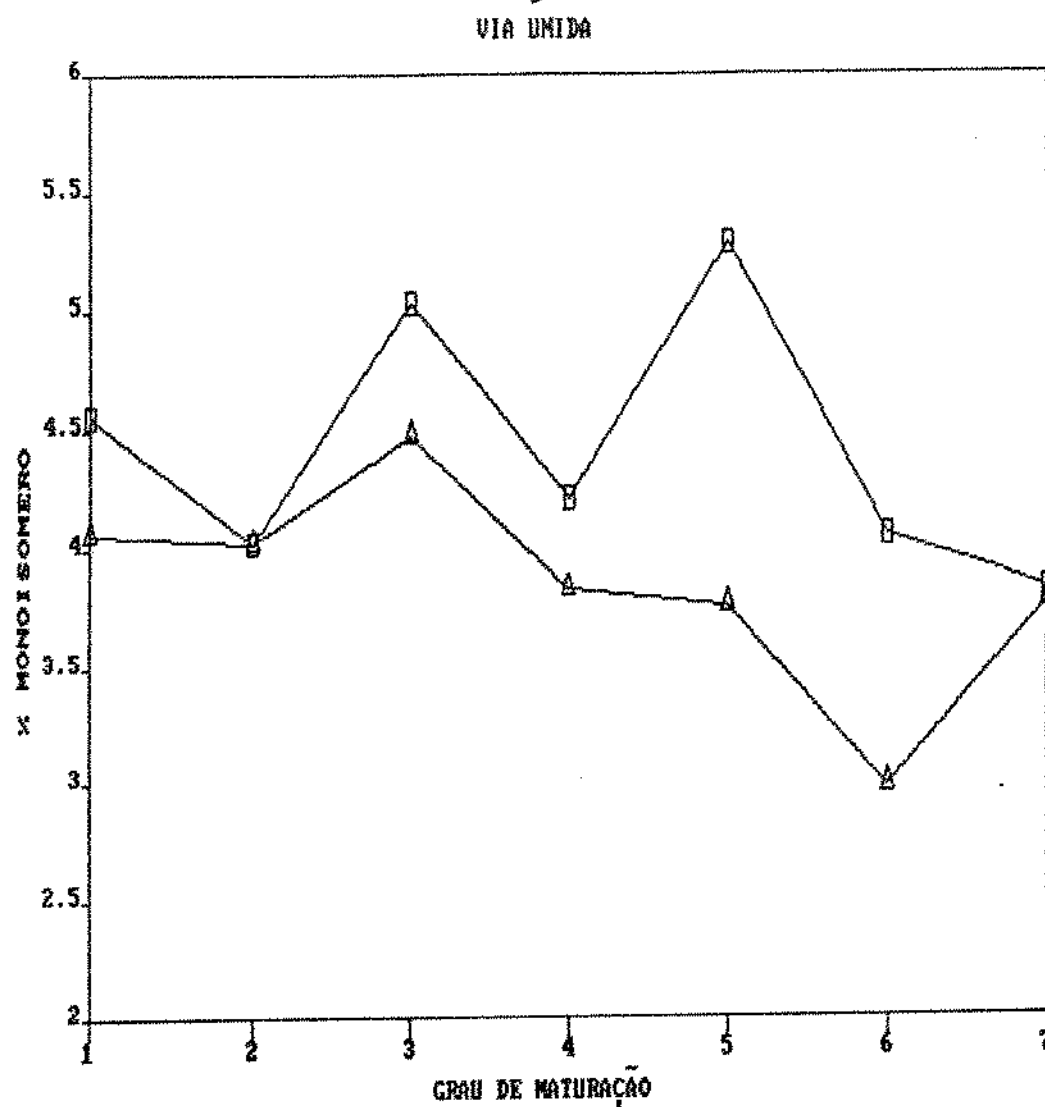
a - Média de 6 amostras colhidas em dias diferentes.

b - Valor obtido para o primeiro dia de colheita



1= Verde, 2= meio verde, 3= meio maduro,
 4= maduro, 5= bem maduro, 6= meio passa,
 7= passa.

Figura 9 - Variação da porcentagem de ácido monoisômero com a maturação - via seca: Δ Média de 6 amostras colhidas em dias diferentes; ◻ Valor obtido para o primeiro dia de colheita.



1= verde, 2= meio verde, 3= meio maduro,
 4= maduro, 5= bem maduro, 6= meio passa,
 7= passa.

Figura 10. - Variação da percentagem de monoisômero com a maturação - via úmida: Δ Média de 6 amostras colhidas em dias diferentes; $\square$ Valor obtido para o primeiro dia de colheita.

Como no caso dos valores das porcentagens de ácido clorogênico total, as tabelas 5 e 6 mostram que existe também uma variação muito grande no percentual de monoisômeros dentro de cada grupo de maturação, o que impede o uso deste parâmetro como índice de maturação.

As figuras 9 e 10 mostram que, para ambas as vias de preparo, não existe uma sequência definida no desenvolvimento da maturação com o teor de monoisômeros e que as variações dos valores médios diferem bastante das variações dos valores de um dia específico. Concluiu-se assim que não existe relação significativa entre a porcentagem de monoisômero de café beneficiado e o grau de maturação do grão.

4.4. VARIACÃO DA PORCENTAGEM DE DIISÔMERO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO COM A MATURAÇÃO

Uma análise dos dados dos anexos 9 (via seca) e 10 (via úmida), onde estão apresentados os valores médios das repetições das porcentagens na base seca de 3,4-ADCQ e 3,5-ADCQ, não mostra nenhuma relação clara entre a proporção dos dois diisômeros e a sua soma.

No caso da via seca, o isômero 3,5-ADCQ está sempre presente em maior teor, representando em geral de 60-65% da soma dos dois, embora alguns dados estejam fora desta faixa.

No caso da via úmida, embora o diisômero 3,5-ADCQ também quase sempre aparece em maior teor que o 3,4-ADCQ, a discrepância entre as proporções foi tão grande, mesmo dentro de um só grupo de maturação, que não foi possível estabelecer nenhuma conclusão.

Como esta discrepância não ocorreu com as mesmas amostras de café preparadas por via seca, concluiu-se que a razão para a discrepância estaria relacionada com o método de preparo. Contudo, apesar desta discrepância, a soma dos dois isômeros, também apresentada nos anexos 9 e 10, obedeceu a mesma ordem dos dados da via seca quando comparados com os dados da porcentagem de monoisômero (item 4.6) e, portanto, aqui serão apresentados apenas a soma dos dois diisômeros.

Nas tabelas 7 e 8 estão os valores médios da soma dos dois diisômeros para cada grupo de maturação das vias seca e úmida respectivamente, bem como os valores máximo e mínimo e os valores do primeiro dia de colheita.

Como no caso das variações das porcentagens de ácido clorogênico total e de monoisômeros, pode-se notar uma grande variação dos valores em cada grupo de maturação, quer por via seca quer por via úmida, concluindo-se assim que estes valores não podem ser usados como índices de maturação.

As figuras 11 (via seca) e 12 (via úmida) mostram as variações dos valores médios das porcentagens de diisômeros e os valores do primeiro dia de colheita com o grau de maturação. Observa-se certa relação entre a porcentagem de diisômero e o grau de maturação, com aumentos desta porcentagem antes do ponto de maturação, para depois cair. O traçado dos valores médios segue que se para paralelamente o traçado do dia 1. Este aumento na porcentagem de ADCQ antes da maturação, para depois diminuir, poderia explicar porque a inclusão de grãos meio maduros, que ocorre quando a colheita é feita por derriça, resulta num café de qualidade inferior, uma vez que os diisômeros são considerados

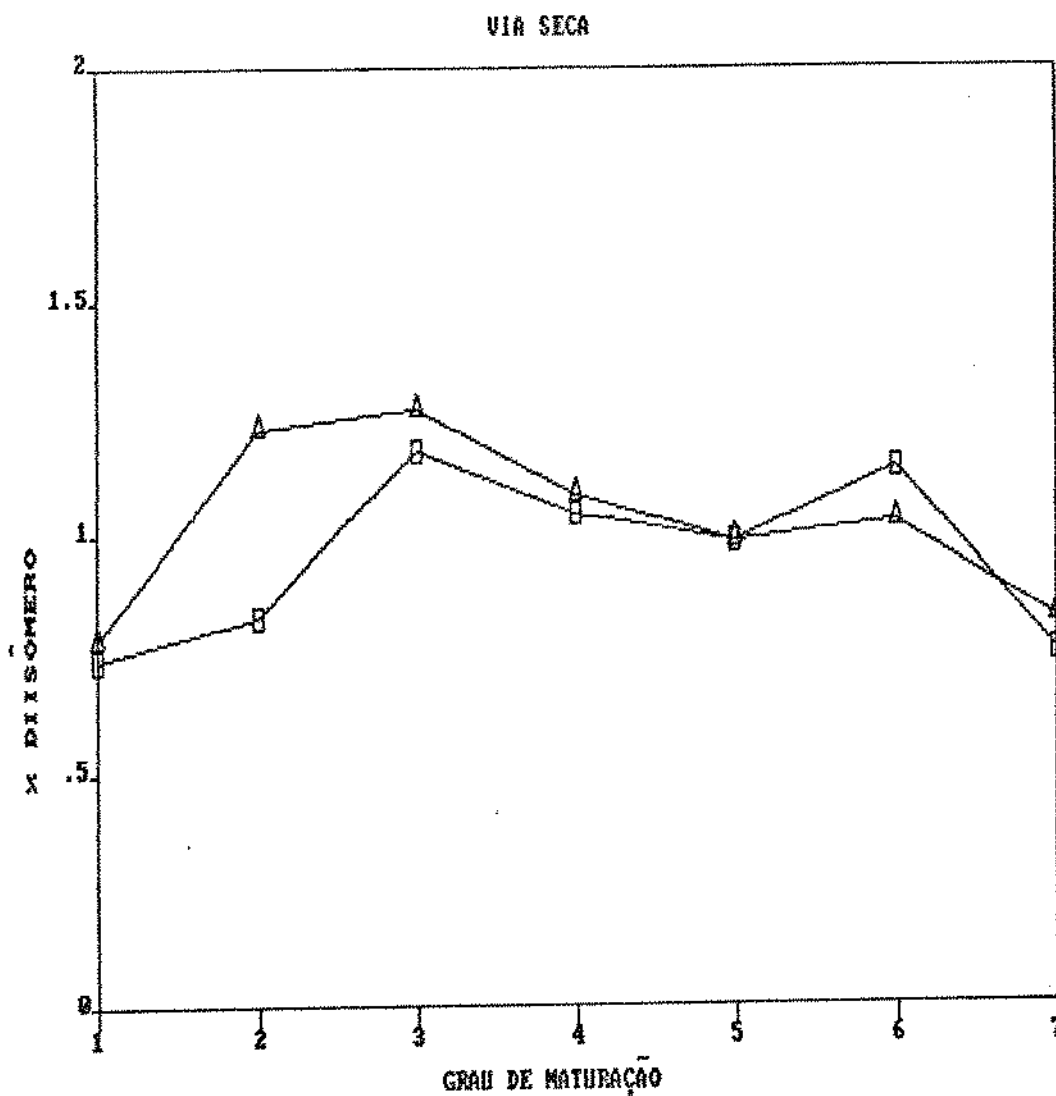
como compostos adstringentes, com gosto parecido com aquele descrito para os cafés arábica de origem brasileira. Contudo devido às variações dos valores em si, seria impossível usar estes valores como um parâmetro de qualidade. A razão pela qual existe esta variação de % diisômero durante a maturação, como também a variação de % monoisômero, deverá ser relacionado com a função ou funções dos mesmos na planta.

Tabela 7. Variação da porcentagem de diisômero (3,4-ADCQ + 3,5-ADCQ) com a maturação - via seca.

Grau de Maturação	Porcentagem de ácido clorogênico total (peso seco)			
	Valor máximo	média ^a	valor mínimo	dia 1 ^b
Verde	1,00	0,78	0,41	0,74
Meio verde	1,53	1,23	0,83	0,83
Meio maduro	2,02	1,27	0,87	1,18
Maduro	1,22	1,09	0,99	1,05
Bem maduro	1,10	0,99	0,79	0,99
Meio passa	1,33	1,03	0,71	1,15
Passa	0,99	0,83	0,60	0,76

a - Média de 8 amostras colhidas em dias diferentes.

b - Valor obtido para o primeiro dia de colheita.



1= Verde, 2= meio verde, 3= meio maduro,
 4= maduro, 5= bem maduro, 6= meio passa,
 7= passa.

Figura 11 - Variação da porcentagem de diisômero com a maturação - via seca: Δ Média e 6 amostras colhidas em dias diferentes; ◻ Valor obtido para o primeiro dia de colheita.

Tabela 8. Variação da porcentagem de diisômero (3,4-ADCQ + 3,5-ADCQ) com a maturação - via seca.

Grau de Maturação	Porcentagem de ácido clorogênico total (peso seco)			
	Valor máximo	média ^a	valor mínimo	dia 1 ^b
Verde	1,19	1,06	0,85	1,19
Meio verde	1,76	1,24	0,98	1,31
Meio maduro	1,11	1,01	0,91	1,11
Maduro	0,94	0,81	0,64	0,89
Bem maduro	1,02	0,75	0,39	1,02
Meio passa	0,75	0,53	0,33	0,75
Passa	0,84	0,58	0,31	0,53

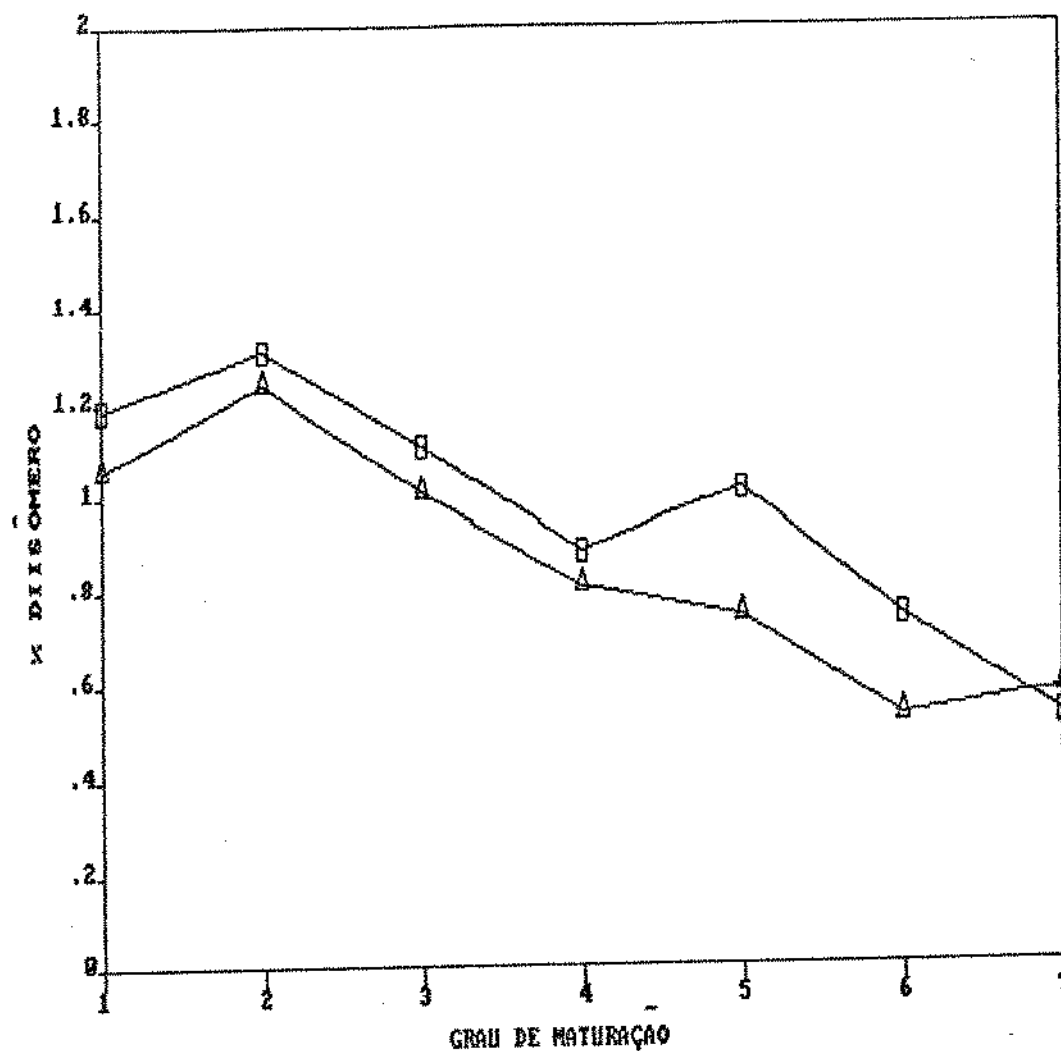
a - Média de 6 amostras colhidas em dias diferentes.

b - Valor obtido para o primeiro dia de colheita.

4.5. VARIAÇÃO DA SOMA DA PORCENTAGEM DE MONOISÔMEROS MAIS A PORCENTAGEM DE DIISÔMEROS COM A MATURAÇÃO.

Aproveitando os dados das tabelas 5 e 7 (via seca) e 6 e 8 (via úmida) foram preparadas as tabelas 9 e 10 (vias seca e úmida respectivamente) mostrando os teores máximos e mínimos da soma das porcentagens de monoisômero mais diisômero, para cada grupo de maturação. São apresentados também os dados do primeiro dia de colheita.

VIA ÚMIDA



1= verde, 2= meio verde, 3= meio maduro,
 4= maduro, 5= bem maduro, 6= meio passa,
 7= passa.

Figura 12 - Variação da porcentagem de diisômero com a maturação - via úmida: △ Média de 6 amostras colhidas em dias diferentes; □ Valor obtido para o primeiro dia de colheita.

Tabela 9. Variação da soma das porcentagens de monoisômero mais diisômero (HPLC) - via seca.

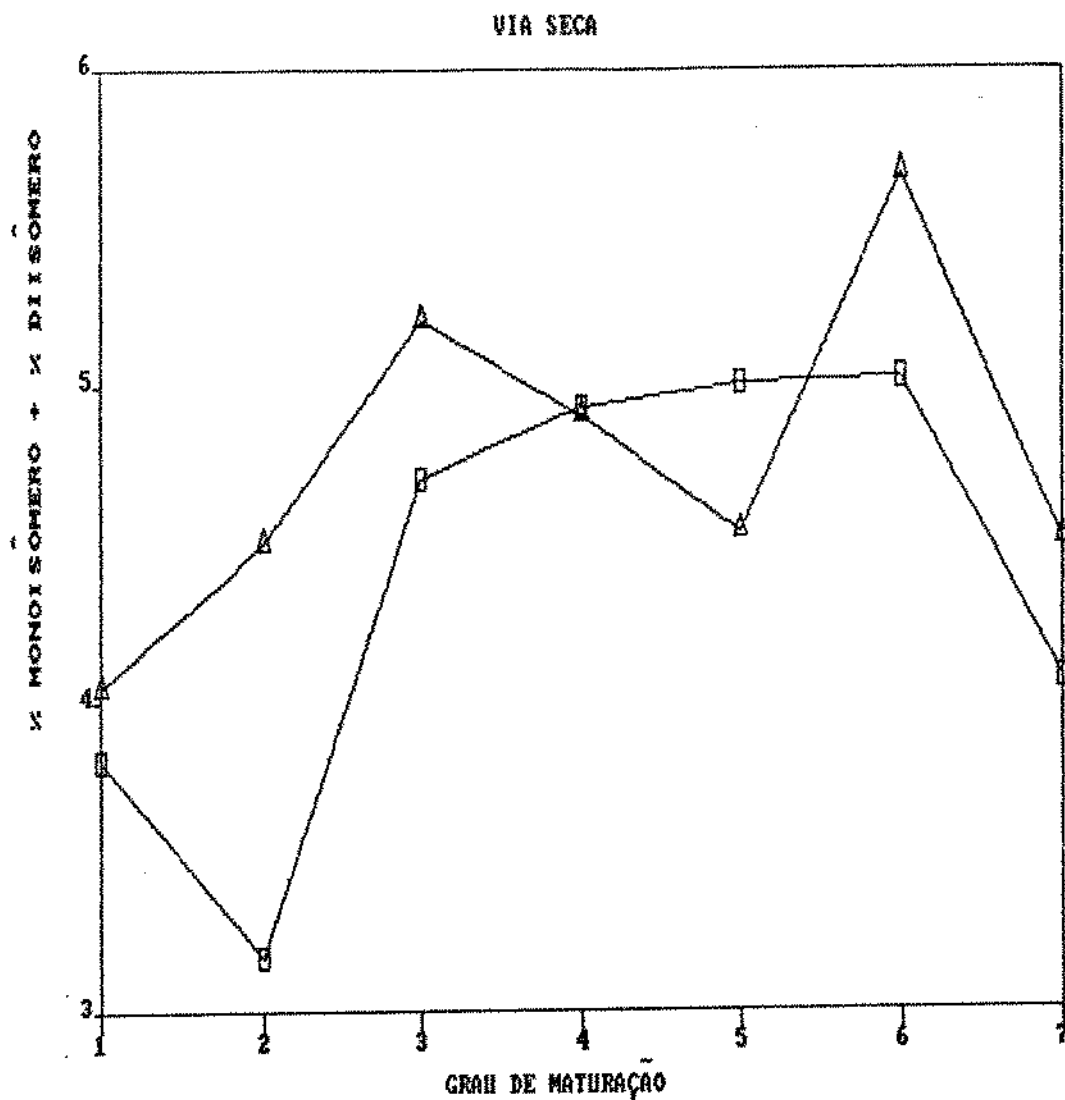
Grau de Maturação	Soma das porcentagens de monoisômero + diisômero			
	Valor máximo	média ^a	valor mínimo	dia 1 ^b
Verde	5,10	4,04	2,15	3,81
Meio verde	5,67	4,49	3,17	3,18
Meio maduro	8,33	5,21	3,55	4,70
Maduro	5,28	4,91	4,27	4,93
Bem maduro	5,01	4,53	3,71	5,01
Meio passa	5,83	4,67	3,21	5,03
Passa	5,42	4,50	3,32	4,07

Tabela 10. Variação da soma das porcentagens de monoisômero mais diisômero (HPLC) - via úmida..

Grau de Maturação	Soma das porcentagens de monoisômero + diisômero			
	Valor máximo	média ^a	valor mínimo	dia 1 ^b
Verde	5,74	5,12	4,27	5,74
Meio verde	7,07	5,25	4,13	5,35
Meio maduro	6,15	5,48	4,66	6,15
Maduro	5,46	4,64	3,63	5,10
Bem maduro	6,32	4,52	2,41	6,31
Meio passa	4,82	3,51	2,05	4,81
Passa	6,39	4,36	2,13	4,37

a - Média de 8 amostras colhidas em dias diferentes.

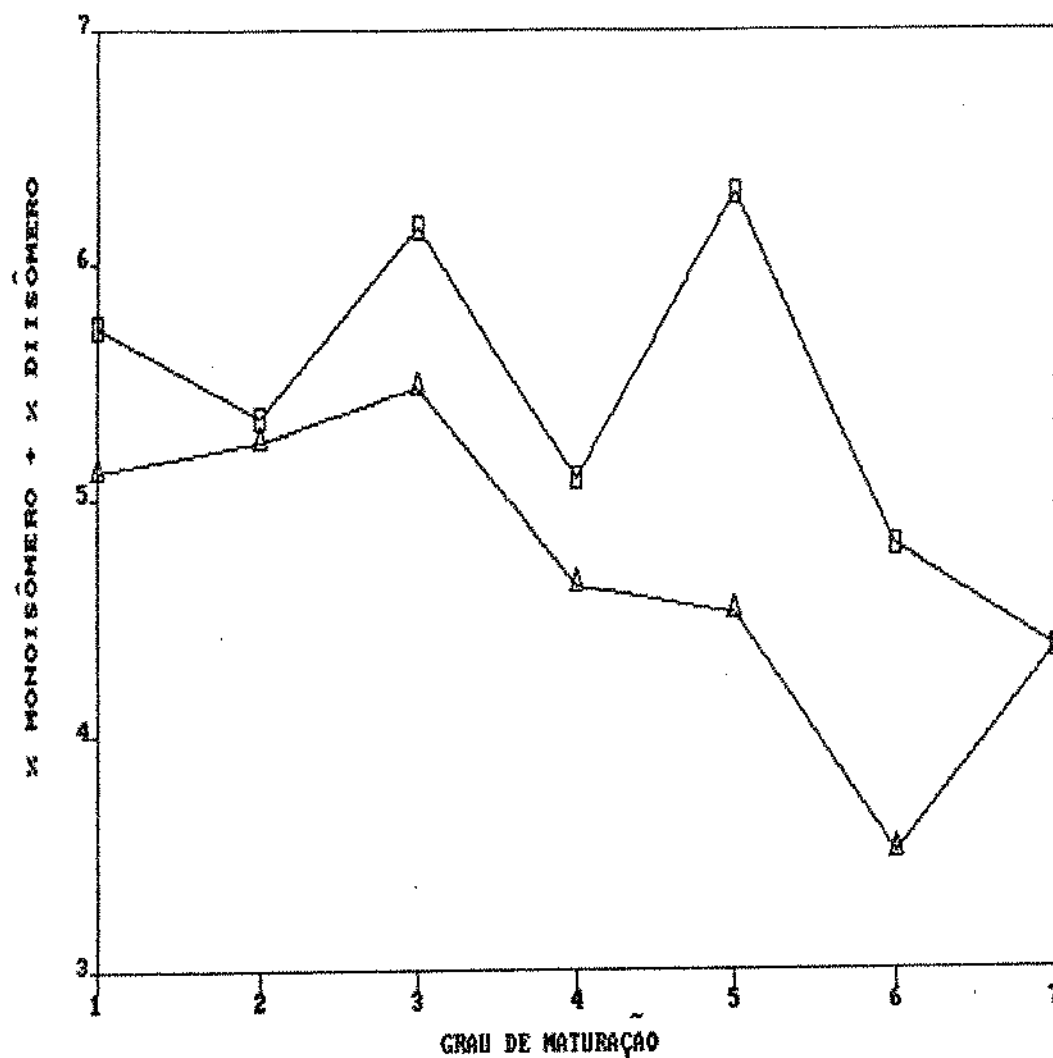
b - Valor obtido para o primeiro dia de colheita.



1= verde, 2= meio verde, 3= meio maduro,
 4= maduro, 5= bem maduro, 6= meio passa,
 7= passa.

Figura 13 - Variação da soma (% monoisômero + % diisômero) com a maturação - via seca: Δ Média de 6 amostras colhidas em dias diferentes; □ Valor obtido para o primeiro dia de colheita.

VIA ÚMIDA



1= verde, 2= meio verde, 3= meio maduro,
 4= maduro, 5= bem maduro, 6= meio passa,
 7= passa.

Figura 14 - Variação da soma (% monoisômero + % diisômero) com a maturação - via úmida: Δ Média de 6 amostras colhidas em dias diferentes; $\square$ Valor obtido para o primeiro dia de colheita.

Como era de se esperar, a variação de valores em cada grupo de maturação pela duas vias, foi demasiadamente grande para possibilitar o uso destes dados como índice de maturação.

As figuras 13 (via seca) e 14 (via úmida) apresentam as variações dos valores médios desta soma e dos valores para o primeiro dia de colheita, com a maturação.

Novamente, como era de se esperar, para ambas as vias não existe relação definida entre a variação da soma daqueles valores com o grau de maturação. Ademais, as variações das médias diferem bastante das variações de um dia específico. De modo geral esses traçados se assemelham com os traçados das porcentagens de monoisômeros, uma vez que estes ocorrem em quantidade bem maior que os dos diisômeros e, portanto, tem maior influência na soma. Estabeleceu-se então que este parâmetro também não poderia ser utilizado como índice de maturação.

4.6. VARIAÇÃO DA RELAÇÃO DE PORCENTAGEM DE MONOISÔMERO : PORCENTAGEM DE DIISÔMERO COM A MATURAÇÃO

A hipótese deste trabalho teve como base a idéia que a relação das porcentagens de monoisômero e diisômero do ácido clorogênico variariam durante a maturação de tal forma que a inclusão de grãos não maduros e/ou passas aos grãos maduros, poderia diminuir a qualidade da bebida devido, pelo menos em parte, à variação desta relação.

As tabelas 11 (via seca) e 12 (via úmida) apresentam os valores destas relações para os diferentes graus de maturação.

É oportuno salientar que, para se chegar aos valores médios

das porcentagens de monoisômero e diisômero para um determinado grau de maturação, foi obtida a média dos valores individuais dos mesmos para cada amostra, e não o valor médio da porcentagem de monoisômero dividido pelo valor médio da porcentagem de diisômero, o que daria valores diferentes. Este procedimento foi utilizado considerando cada amostra como uma unidade separada, e foi também utilizado na análise estatística (4.7).

Tabela 11. - Variação da relação das porcentagens de monoisômero:diisômero com maturação- Via seca

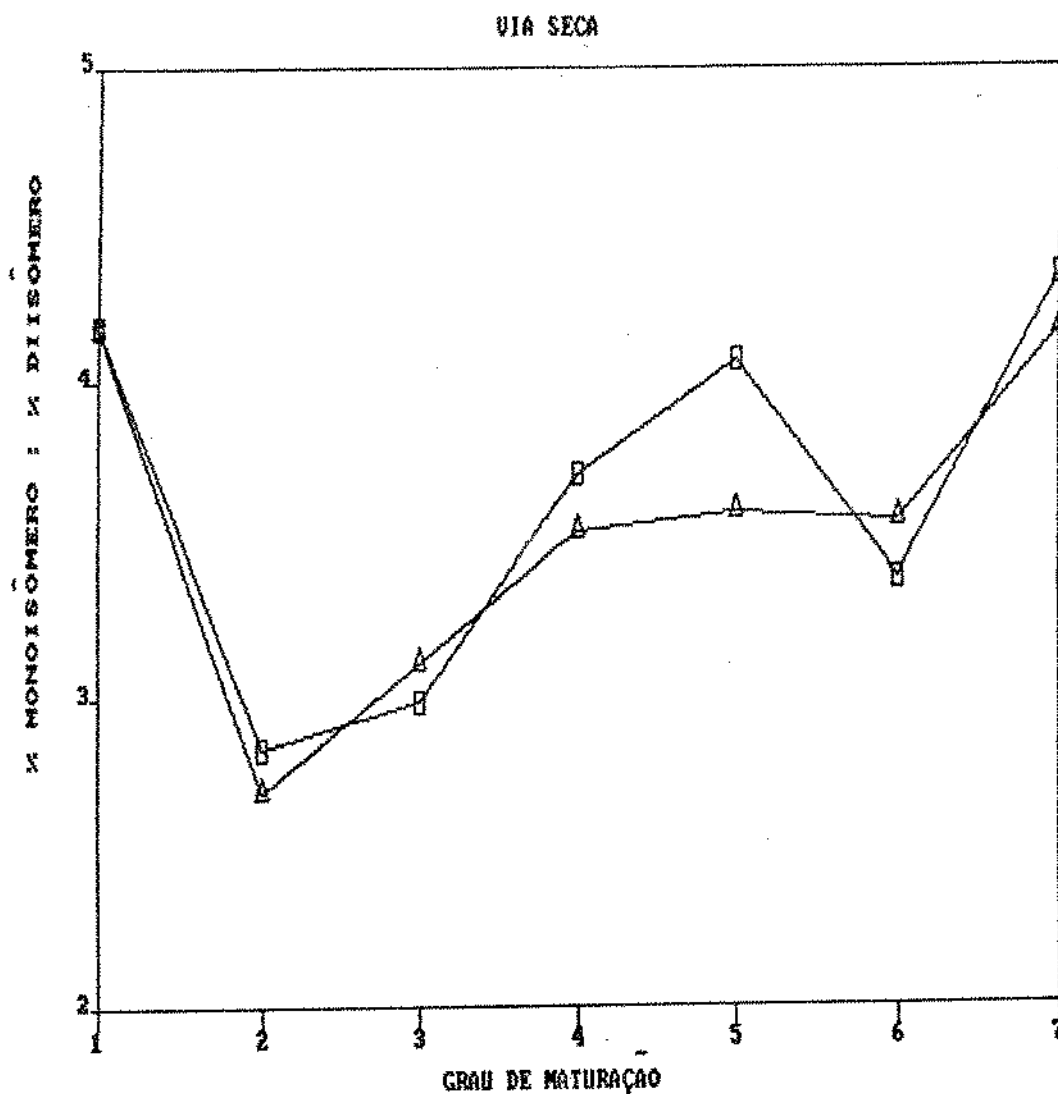
Grau de Maturação	Porcentagens de monoisômero: diisômero			
	valor máximo	média ^a	valor mínimo	dia 1 ^b
Verde	4,20	4,17	4,11	4,18
Meio verde	3,31	2,70	2,14	2,84
Meio maduro	3,21	3,11	2,99	2,99
Maduro	3,85	3,52	3,28	3,70
Bem maduro	4,07	3,58	3,25	4,07
Meio passa	4,01	3,58	3,30	3,38
Passa	4,50	4,17	3,27	4,35

Tabela 12. - Variação da relação das porcentagens de monoisômero:diisômero com a maturação- Via úmida

Grau de Maturação	Porcentagens monoisômero: diisômero			
	valor máximo	média ^a	valor mínimo	dia 1 ^b
Verde	4,11	3,85	3,55	3,83
Meio verde	3,73	3,28	3,01	3,10
Meio maduro	4,57	4,40	4,10	4,54
Maduro	5,01	4,77	4,57	4,71
Bem maduro	5,17	5,01	4,85	5,17
Meio passa	6,27	5,66	5,28	5,38
Passa	7,24	6,49	5,98	7,24

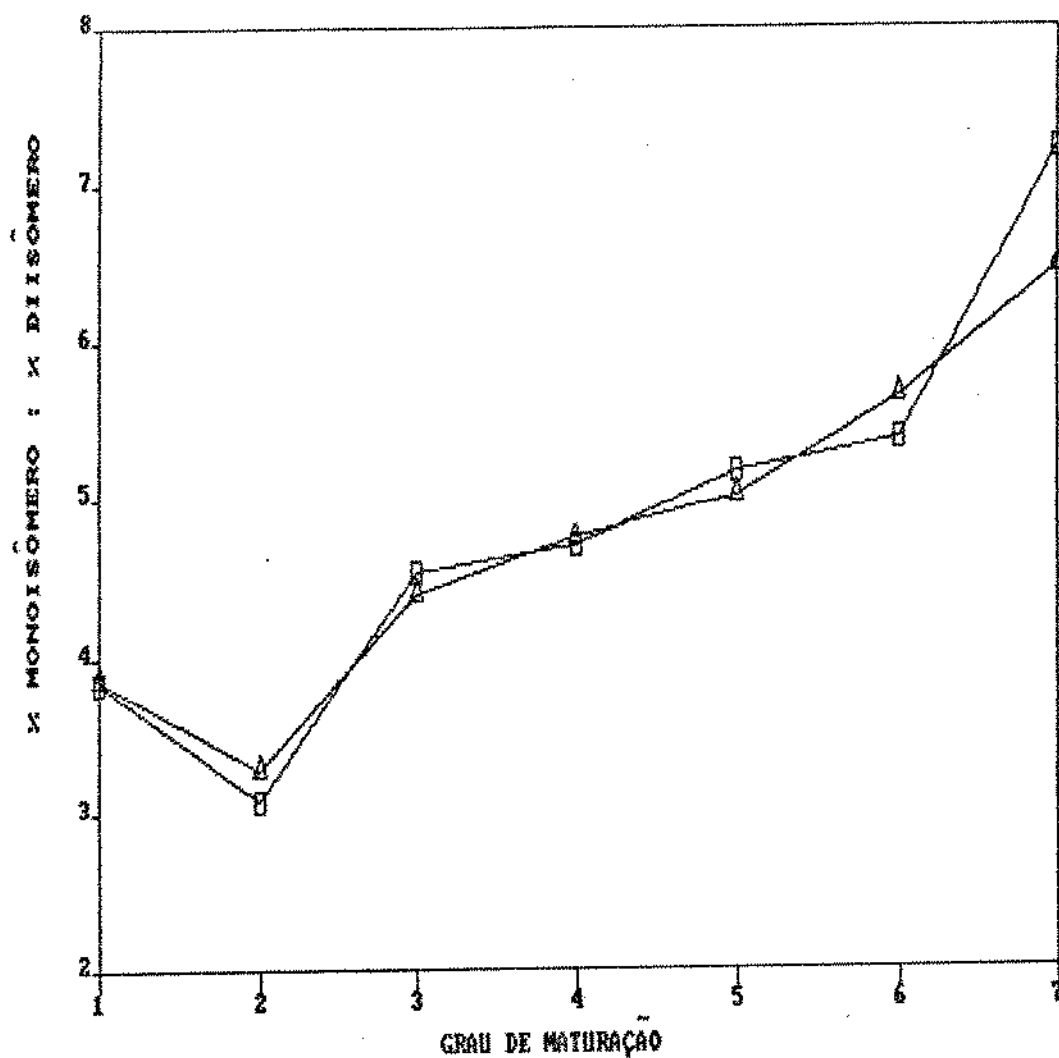
a - Média de 6 amostras colhidas em dias diferentes.

b - Valor obtido para o primeiro dia de colheita.



1= verde, 2= meio verde, 3= meio maduro,
 4= maduro, 5= bem maduro, 6= meio passa,
 7= passa.

Figura 15 - Variação da relação % monoisômero: % diisômero com a maturação - via seca: Δ Média de 6 amostras colhidas em dias diferentes; $\square$ Valor obtido para o primeiro dia de colheita.



1= verde, 2= meio verde, 3= meio maduro,
 4= maduro, 5= bem maduro, 6= meio passa,
 7= passa.

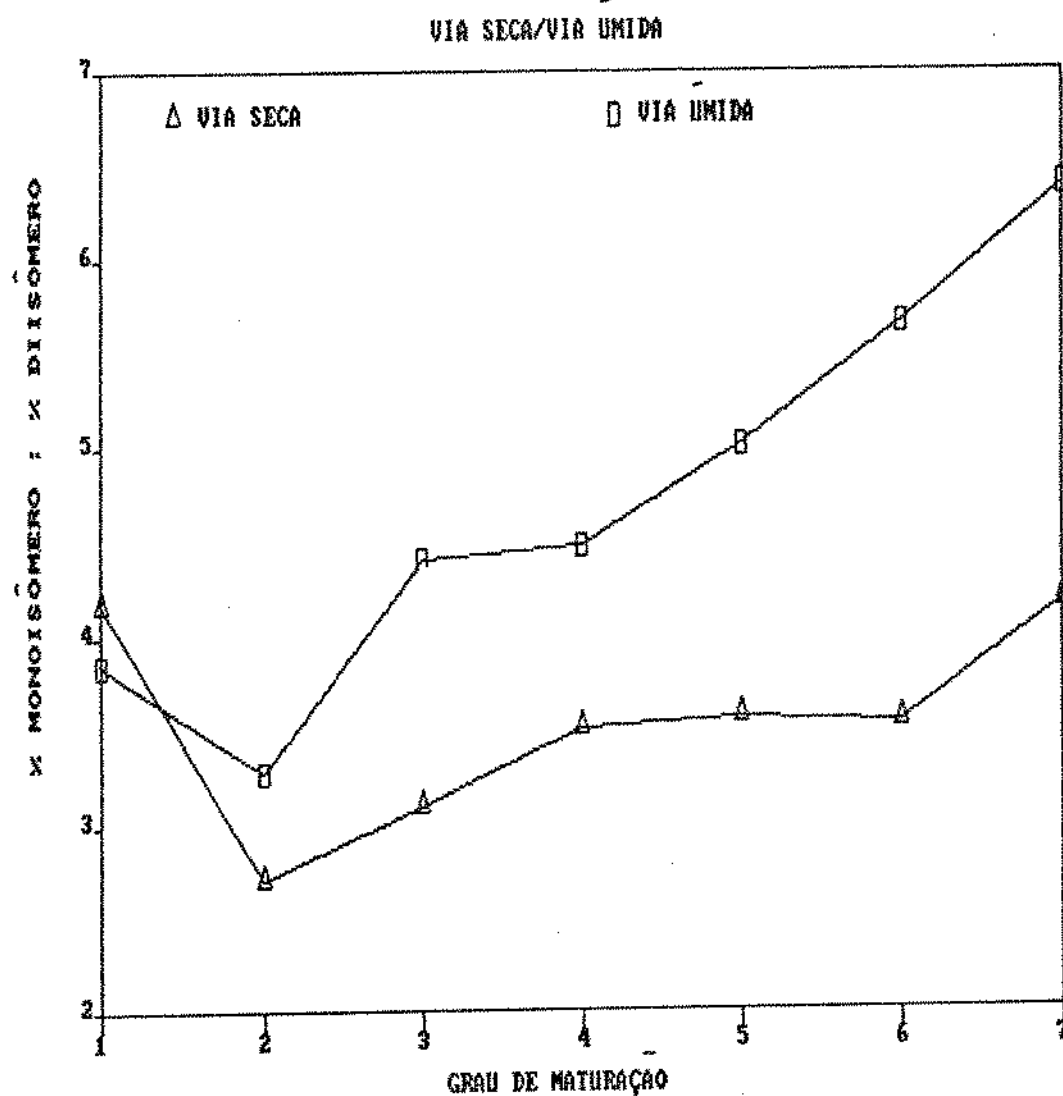
Figura 16 - Variação da relação % monoisômero: % diisômero com a maturação - via úmida: Δ Média de 6 amostras colhidas em dias diferentes; □ Valor obtido para o primeiro dia de colheita.

As tabelas 11 e 12 mostram que a variação da relação foi relativamente pequena dentro de cada grupo de maturação e por isso foi feita uma análise estatística (4.7) com a finalidade de determinar o grau de significância desta relação com a maturação e a via de preparo. Deve-se lembrar que se trata de um material biológico e que, principalmente nas amostras verdes e passas; é de se esperar grandes variações, uma vez que pela cor não foi possível avaliar a separação de cada grão do grupo de maturação mais próximo.

As figuras 15 e 16 mostram as variações dos valores médios da relação e dos valores do primeiro dia de colheita com o grau de maturação. Também mostram que os desvios entre os valores médios e os valores de um dia específico são relativamente pequenos, levando em consideração, como mencionado anteriormente, que se trata de material biológico. Para melhor visualizar estas variações e as diferenças que existem entre as duas vias de preparo construiu-se a figura 17. Esta mostra as variações com a maturação dos valores médios obtidos pelas duas vias dessa relação entre os isômeros.

Ao se analisar a figura 17, deve-se lembrar que, considerando que os diisômeros são adstringentes e os monoisômeros não, e que os monoisômeros podem mascarar o efeito negativo dos diisômeros, quanto maior for a relação das porcentagens de monoisômero:diisômero, melhor a qualidade do café a este respeito (OHIOKPEHAI et alii, 1982).

A mesma figura 17 mostra ainda que em ambos os casos existe uma diminuição da relação do grau de maturação verde para o meio verde (cor meio verde, meio rosado) onde a relação atinge seu



1= verde, 2= meio verde, 3= meio maduro,
 4= maduro, 5= bem maduro, 6= meio passa,
 7= passa.

Figura 17 - Variação da relação % monoisômero: diisômero com a maturação pelas duas vias.

valor mínimo. A partir deste estágio a relação sempre aumenta, ficando relativamente estável em torno do ponto de maturação para depois aumentar consideravelmente no estágio de maturação passa, sendo que os valores da via úmida foram sempre maiores que os da via seca.

Aparentemente os maiores valores da relação são atingidos nos estágios completamente verde e completamente passa, mas estes grãos seriam descartados por outros motivos, em virtude da impossibilidade de serem preparados além de diferenças na composição química. Entre os grãos comumente presentes em amostras colhidas por derriçagem (de meio verde a meio passa), é aparente que os grãos meio verdes teriam o efeito mais negativo com respeito à relação, por representar os valores mínimos da relação dentro de cada via. Independente da via de preparo, a qualidade do café poderia ser melhorada pela remoção de grãos com qualquer porcentagem de verde, o que pode ser feito manualmente ou com equipamento, devido à diferença marcante entre as cores verde e vermelha.

Nota-se também que o preparo por via úmida produz cafés com relações significativamente melhores que por via seca, indicando a utilização da via úmida para melhorar a qualidade da bebida mesmo se o café for colhido por derriçagem.

Ao tentar comparar os resultados obtidos neste trabalho nas análises quantitativas das diferentes frações de ácido clorogênico com trabalhos anteriores efetuados no mesmo campo, é importante lembrar de dois fatos. Em primeiro lugar a nomenclatura usada antigamente para o grupo de compostos que compoem os ácidos clorogênicos era muito confusa (CLIFFORD, 1979). Em segundo lugar

os métodos usados para extrair os ácidos clorogênicos eram bastante variados, a fração extraída variando com o método usado (CLIFFORD et alii, 1985).

Os trabalhos mais antigos se limitaram à determinação do teor de ácido clorogênico total, sem nenhuma definição do grau de maturidade do café. De qualquer forma, devido ao problema de nomenclatura, seria impossível comparar os dados destes trabalhos com os dados atuais. AMORIM et alii (1974) determinaram os teores de ácido clorogênico em café crú, encontrando uma variação entre 6,12% e 8,33%. Aparentemente os cafés mole apresentaram valores menores, mas houve excessões. Os dados aqui apresentados para os teores de ácido clorogênico total mostram uma variação entre 8,05% e 14,88%, a maior variação sendo entre diferentes colheitas e não entre diferentes estágios de maturação, o que inviabiliza a comparação destes dados com os valores encontrados por AMORIM et alii (1974), que não levou em consideração uma possível variação entre colheitas.

Em pesquisas mais recentes, CLIFFORD et alii (1987), e OHIOKPEHAI et alii (1982) tem feito alguns estudos com café arábica crú, analisando os teores de ACQ e ADQ durante a maturação. Contudo, houve diferenças importantes entre as técnicas usadas para obter as amostras. CLIFFORD et alii (1987) estudaram amostras de café arábica cv *maragogipe* cultivadas em estufa, amostras que certamente não podem ser diretamente comparadas com amostras cultivadas no campo. Também as cerejas foram congeladas em N₂ líquido imediatamente após a colheita e posteriormente liofilizadas em vez de ser processadas normalmente. Finalmente a maturação foi medida em termos de semanas após a floração (o que é

possível com plantas cultivadas em estufa) e os teores de ACQ e ADCQ calculados em termos de gramas por 100 grãos e não porcentagem por peso (base peso seco). Por todas estas razões ficou impossível comparar os dados em si, embora as tendências encontradas podem ser mencionadas, sempre lembrando que estas amostras foram cultivadas em estufa. Encontraram aumentos sigmoidiais de ácido clorogênico total e ácido cafeoilquínico de 20 a 25 semanas após a floração (10 a 15 semanas antes da maturação) enquanto o ácido dicafeoilquínico houve um aumento lento mas contínuo durante o período de 16 a 35 semanas após a floração. O ácido clorogênico total aumentou de 0,5 a 2,0 g/100 grãos entre 20 e 25 semanas após a floração e o ácido cafeoilquínico de 0,4 a 1,6 g/100 grãos neste mesmo período. O ácido dicafeoilquínico aumentou de 0 a 0,3 g/100 grãos entre 16 e 35 semanas após a floração.

Os dados aqui apresentados mostram uma variação grande em teores de ACQ e ADCQ entre uma colheita e a outra, o que impossibilita a comparação com os dados de CLIFFORD et alii (1987) em que esta possibilidade não foi levada em consideração. Contudo o aumento grande na relação ACQ:ADCQ encontrado por eles antes da maturação é de acordo com os presentes dados, embora sendo impossível comparar a época deste aumento, por ter usado índices de maturação diferentes.

OHIOKPEHAI et alii (1982) apresentaram alguns dados de % ACQ e % ADCQ na base de peso seco, determinados em amostras de café arábica colhidas durante a maturação. Contudo, as únicas análises mais completas, incluindo cinco estágios de maturação, foram efetuadas em amostras colhidas de plantas cultivadas em estufa.

medindo a maturação em termos de semanas antes da maturação e congelando as cerejas em nitrogênio líquido. Encontraram uma diminuição da relação ACQ:ADCQ de 6,39 onze semanas antes da maturação para 2,90 duas semanas antes da maturação, para novamente subir para 4,88 nos grãos maduros. Estes resultados certamente não contrariam os dados aqui apresentados, embora não é possível fazer uma comparação exata devido às inúmeras diferenças entre as técnicas usadas.

Os outros dados apresentados por OHIOKPEHAI et alii (1982), de amostras "semi-maduras", "imaduras", e "maduras" de cafés arábica provenientes de Colombia e Quênia, deram resultados poucos coerentes e até contraditórios, mas como explicam os autores, houve dúvidas sobre o grau de maturidade das amostras denominadas "semi-maduras", e "imaduras".

Ao conhecimento da autora, não existem trabalhos publicados cujos resultados podem ser diretamente comparados com os resultados deste trabalho. O objetivo deste trabalho foi sempre o de trabalhar com amostras processadas normalmente, para determinar o efeito dos parâmetros analisados nas bebidas provenientes dos grãos estudados.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA VARIAÇÃO DA RELAÇÃO DE PORCENTAGEM DE MONOISÔMERO:PORCENTAGEM DE DIISÔMERO COM A MATURAÇÃO PELAS DUAS VIAS

Os dados originais utilizados para esta análise encontram-se tabelados no anexo 6.

Não foi possível obter os dados referentes aos níveis 1 e 7

de maturação, no sexto dia por via 1 (seca), tanto para as porcentagens de ACQ como de ADCQ. O mesmo ocorreu para o nível 1, sexto dia por via 2 (úmida). Estas falhas ocorreram porque as quantidades desses tipos (1=verde, 7= passa) no sexto dia foram tão pequenas que não foi possível efetuar seus preparos e, por isso, esses valores foram considerados como perdidos. Em face dessa ocorrência, o modelo proposto foi ajustado, levando-se esse aspecto em consideração.

Obviamente os valores considerados perdidos, também geraram valores perdidos para o quociente correspondente:

$$Y = (ACQ/ADCQ)$$

Todos os cálculos computacionais para a análise dos dados foram efetuados usando-se o procedimento PROC CLM do pacote estatístico SAS para micro computadores.

Os resultados da tabela de análise de variância (ANOVA) são apresentados na tabela 13.

Tabela 13.- Resultados da análise de variância

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados médios	Valor de F	Prob > F
Maturação	6	78,99462	13,165771	105,72	0,0001
Vias	1	54,438170	54,438170	437,15	0,0001
Dias	5	0,124129	0,024826	0,2000	0,9623
Maturação*Vias	6	21,334287	3,555716	28,550	0,0001

Analisando os resultados da tabela 13 tem-se que:

- (i) Existe uma diferença altamente significativa entre os níveis de maturação.
- (ii) As vias de preparo também influem significativamente no quociente ACQ/ADCQ.
- (iii) A interação entre grau de maturação e vias de preparo é altamente significativa.

Em virtude da elevada significância dos testes realizados, foram comparadas as médias do quociente ACQ/ADCQ para cada fator considerado, utilizando-se o teste de Duncan, que forneceu os resultados apresentados na tabela 14, considerando-se o fator de maturação e na tabela 15, considerando-se o fator vias de preparo.

Tabela 14. - Resultados do teste de comparação de médias com o fator de maturação (Teste de Duncan).

Grau de maturação	Média ^a	Decisão
7 Passa	5,550	A
6 Meia passa	4,540	B
5 Bem maduro	4,180	C
4 Maduro	4,050	D
1 Verde	4,012	D
3 Meio maduro	3,756	E
2 Meio verde	2,978	F

a - Média de um total de 12 amostras provenientes de 6 colheitas feitas em dias diferentes, sendo a metade de cada colheita preparada pela via úmida e metade pela seca.

Na tabela 14, as decisões com a mesma letra indicam a não existência de diferença significativa entre os níveis em questão. Assim sendo tem-se que: (i) O nível 7 de maturação (passa) é o que produz maior média do quociente, seguido, em ordem decrescente, pelos níveis 6 (meio passa), 5 (bem maduro), 4 (maduro), 1 (verde), 3 (meio maduro) e 2 (meio verde). Além disso o nível 7 é diferente significativamente de todos. (ii) Os únicos níveis de maturação que não apresentaram diferenças significativas foram os níveis 4 e 1. (iii) O nível 2 (meio verde) é o que apresenta menor média do quociente.

Tabela 15.- Resultados do teste de comparação de médias com o fator "vias de preparo" (teste de Duncan).

Tipos de vias	Média ^a	Decisão
2 (úmida)	4,726	A
1 (seca)	3,5391	B

a - Média de 42 amostras colhidas em 6 dias diferentes e separadas em 7 grupos de maturação.

Como foi concluído anteriormente, os resultados do teste de Duncan (tabela 15) indicam uma diferença significativa entre os dois tipos de vias de preparo, mostrando também que para a via úmida obtém-se maior média para o quociente entre ACQ/ADCQ.

Esta análise estatística mostra a significância da relação das porcentagens monoisômero:diisômero com respeito ao grau de maturação e via de preparo, que corroboram assim as conclusões feitas no item 4.6.

4.8. ANÁLISE DE UMA MISTURA TÍPICA COLHIDA POR DERRIÇAGEM

Levando-se em consideração a conclusão de que, quer por via úmida quer por via seca, a inclusão de grãos meio verdes tornaria inferior a qualidade da bebida devido à relação % monoisômero: % diisômero ser desfavorável, resolveu-se analisar os cafês colhidos em 1987 (dias 5 e 6) nas formas em que foram colhidos, isto é analisando uma amostra de cada colheita preparada pelas duas vias mas sem separação em grupos de maturação.

Uma colheita de café por derriçagem teve tipicamente as seguintes proporções de cada grupo por nível de maturação, (tabela 16).

Tabela 16. - Proporção típica de grãos de diferentes graus de maturação na colheita por derriçagem.

Grau de Maturação	Porcentagem *
Verde	6,8
Meio verde	10,1
Meio maduro	9,1
Maduro	33,0
Bem maduro	7,7
Meio passa	16,2
Passa	17,1

* Valores referentes aos grãos após preparo, secagem e beneficiamento.

As duas misturas completas dos dias 5 e 6 foram separadas em duas partes, sendo que uma parte foi preparada por via úmida e a

outra por via seca como no caso das outras amostras.

A tabela 17 mostra os valores das porcentagens de ACQ, ADCQ e a relação % ACQ : % ADCQ encontradas nestas amostras.

Tabela 17.- Teores de ACQ e ADCQ encontrados em amostras mistas de café

Amostras	% ACQ (média) ^a	% ADCQ (média) ^a	% ACQ: %ADCQ
Dia 5- Via úmida	4,05	0,96	4,21
Dia 6- Via úmida	3,19	0,74	4,31
Dia 5- Via seca	3,27	1,07	3,06
Dia 6- Via seca	3,11	1,03	3,02

a - Média de duplicatas.

Comparando-se os valores das % ACQ: %ADCQ nestas amostras com os da figura 16, verifica-se que para ambas as vias, a relação encontrada nos dois dias de colheita foi um pouco inferior à relação média encontrada para as amostras com grau de maturação meio maduro. Uma vez que os grãos verdes e passas apresentam valores de relação mais elevados que os dos grãos maduros, deve-se responsabilizar a presença dos grãos meio verdes nas misturas pelo abaixamento da relação confirmando a necessidade de removê-los.

4.9. CLASSIFICAÇÃO DO CAFÉ

Para verificar o efeito dos grãos a partir das amostras utilizadas no item 4.8 e preparadas por via seca, uma parte da amostra do dia 6 foi separada antes da secagem, sendo removidos todos os grãos com qualquer porcentagem de verde. Esta amostra, sem grãos verdes, foi seca separadamente e posteriormente enviada

juntamente com a amostra equivalente integral (do dia 6 preparada por via seca, sem remoção dos grãos verdes) para classificação da bebida (item 3.12.)

Estas duas amostras foram avaliadas por dois provadores do I.B.C., fornecendo os seguintes resultados:

Amostra integral —→ duro

Amostra sem grãos verde —→ duro para melhor.

Assim ficou demonstrado que, embora o café avaliado não fosse dos melhores (café duro), a amostra cujos grãos verdes e meio verdes foram removidos recebeu uma classificação melhor do que a amostra integral.

4.10. VARIAÇÃO DA ATIVIDADE DE POLIFENOLOXIDASE COM A MATURAÇÃO NAS AMOSTRAS BENEFICIADAS

Antes de examinar os resultados da atividade de polifenoloxidase, é importante lembrar que o objetivo de todas as análises feitas neste estudo foi detectar qualquer relação entre o grau de maturação e a concentração de isômeros do ácido clorogênico e/ou a atividade da polifenoloxidase, mas sempre nas amostras já preparadas, secas e beneficiadas.

No caso da atividade de polifenoloxidase, é de se esperar que isto seja maior em cada amostra na hora da colheita, antes do preparo e da secagem dos grãos, porém a análise das amostras nesta fase não foi efetuada, por não ser objetivo do trabalho.

As análises enzimicas foram feitas apenas nas amostras colhidas em 1987 (dias 5 e 6). Baseadas nos dados do anexo 13, as tabelas 17 e 18 apresentam respectivamente a variação com a

maturação da atividade de polifenoloxidase e da sua atividade específica nas amostras preparadas pelas duas vias.

Tabela 18.- Variação da atividade de polifenoloxidase com o grau de maturação.

Grau de Maturação.	Unidades de polifenoloxidase/ g. de café *			
	Via seca		Via umida	
	Dia 5	Dia 6	Dia 5	Dia 6
Verde	328,29	-----	111,89	-----
Meio verde	549,70	541,60	543,45	543,42
Meio maduro	1122,09	868,01	541,83	1081,98
Maduro	551,91	221,22	552,86	543,49
Bem maduro	332,62	542,83	543,57	1087,61
Meio passa	1081,78	215,16	326,83	543,45
Passa	325,65	-----	1090,87	540,98

* base no peso seco.

Tabela 19- Variação da atividade específica da polifenoloxidase com a maturação

Maturação	Atividade específica da polifenoloxidase			
	Via seca		Via umida	
	Dia 5	Dia 6	Dia 5	Dia 6
Verde	15,29	-----	6,33	-----
Meio verde	36,36	32,52	21,93	23,75
Meio maduro	94,12	49,23	26,67	97,69
Maduro	34,19	14,55	23,75	98,09
Bem maduro	23,08	52,71	25,61	125,27
Meio passa	94,59	18,20	21,29	105,26
Passa	21,82	-----	68,88	47,29

Uma análise dos dados das tabelas 18 e 19 permite verificar que não existe nenhuma influência do grau de maturação na atividade enzimática não sendo possível detectar portanto qualquer relação entre um dos fatores (atividade ou atividade específica) e grau de maturação, via de preparo ou dia de colheita. Aparentemente a atividade de polifenoloxidase que permanece nos grãos após o preparo e beneficiamento depende de outros fatores, provavelmente das condições do preparo e/ou secagem.

4.11. ISÔMEROS DE ÁCIDO CLOROGÊNICO COMO SUBSTRATOS DA POLIFENOLOXIDASE DO CAFÉ

Como havia sido explicado no item 3.11 , neste ensaio os monoisômeros (3-ACQ + 4-ACQ + 5 ACQ) e os diisômeros (3,4-ADCQ + 3,5-ADCQ), separados por HPLC, foram avaliados como substratos da polifenoloxidase (PPO) extraído do café. Este ensaio foi feito apenas qualitativamente somente para testar a hipótese de que a PPO atuaria apenas nos monoisômeros e não nos diisômeros (CLIFFORD, 1985b). Foram utilizados extratos bem concentrados dos isômeros para assegurar um excesso de substrato, com a mesma quantidade do mesmo extrato de PPO em cada ensaio.

A figura 18 mostra a atividade enzimática em termos de aumento de absorbância em função do tempo com os dois substratos. Verifica-se, claramente, neste gráfico o ataque enzimático tanto para os monoisômeros como para os diisômeros, embora a velocidade da reação tenha sido um pouco maior no caso dos monoisômeros. Concluiu-se assim que a hipótese não era correta.

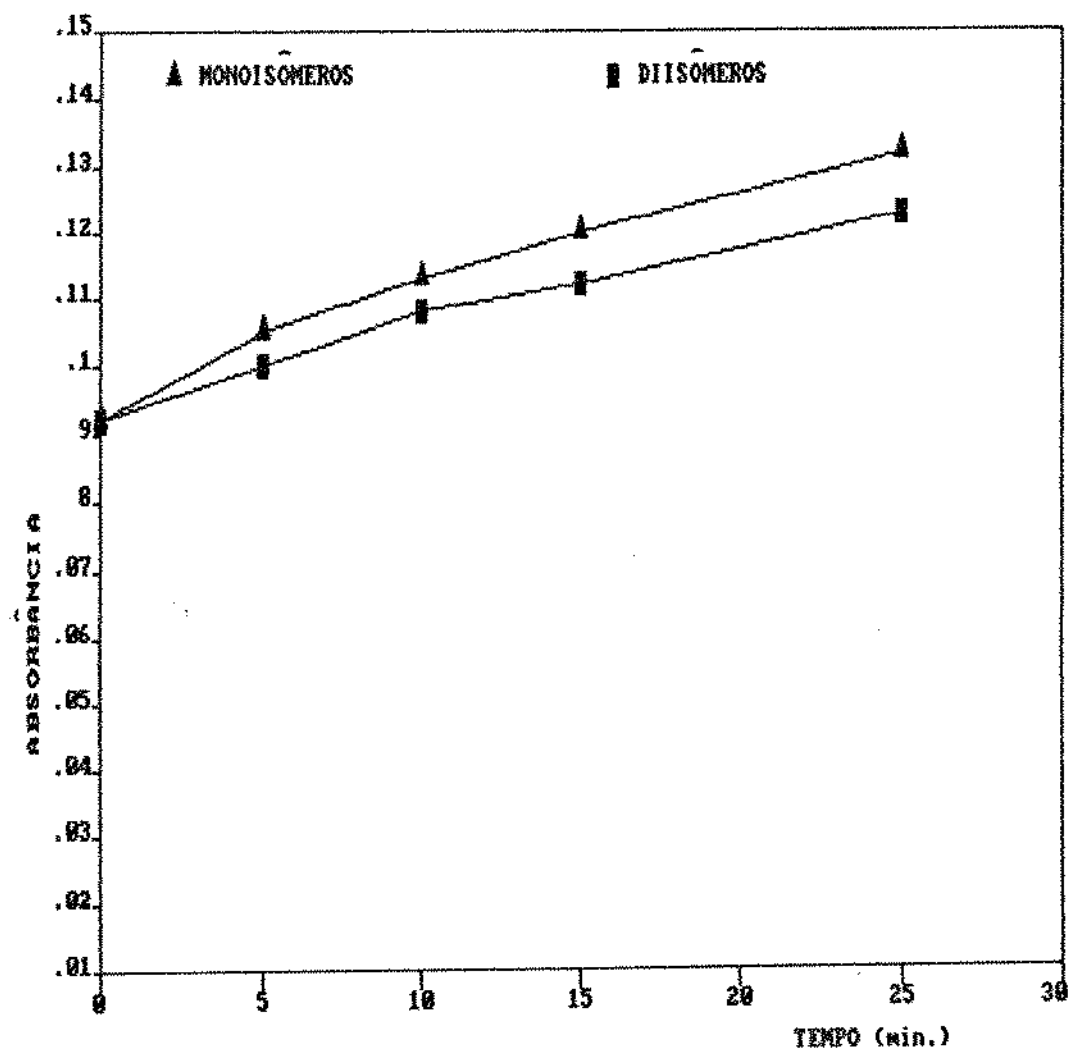


Figura 18 - Atividade da polifenoloxidase do café com os monoisômeros e diisômeros do ácido clorogênico.

5. CONCLUSÕES

1. Não há relação significativa entre o grau de maturação e os seguintes parâmetros:

- % monoisômeros (soma de 3-ACQ + 4-ACQ + 5-ACQ).
- % diisômeros (soma de 3,4-ADCQ + 3,5-ADCQ).
- Soma de % monoisômeros + % diisômeros.
- Atividade de PPO/g café beneficiado.
- Atividade específica de PPO no café beneficiado.

2. Há uma relação altamente significativa entre a relação ACQ:ADCQ e o grau de maturação. Os únicos níveis que não apresentaram diferenças significativas entre si foram os verdes e os maduros.

Mesmo considerando as duas vias de preparo separadamente (fig.17), os resultados indicam que em ambos os casos a inclusão de grãos parcialmente verdes prejudicaria o sabor da bebida por estes grãos apresentarem os valores mais baixos da relação ACQ:ADCQ. Os altos teores nos grãos verdes, estágio em que a qualidade é comprovadamente baixa, indicam que neste estágio, outros fatores estão de maior relevância. Os grãos passos também apresentaram teores altos, mas estes são normalmente descartados por outros motivos incluindo a dificuldade de prepará-los. Entre os demais níveis, de meio-maduro até meio-passa, embora a relação mostrasse uma tendência de aumento com o grau de maturação, as diferenças foram relativamente pequenas, podendo-se concluir que a mistura destes grãos não prejudicaria a qualidade da bebida do ponto de vista da relação de ACQ:ADCQ.

3. As vias de preparo influenciaram significativamente na relação de ACQ:ADCQ, a via úmida sempre apresentando valores superiores. Concluiu-se então que a via úmida é indicada para melhorar esta relação.

4. A polifenoloxidase atua tanto nos monoisômeros como nos diisômeros, embora a velocidade da reação seja um pouco maior com os monoisômeros como substrato.

Recomenda-se então a retirada dos grãos parcialmente verdes antes de preparar o café, preferencialmente por via úmida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER, E. e BERGGREN, B., (1960). *Acta Chem. Scand.*, 14, 529-38.
Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: *Coffee*
Vol. I.: Chemistry. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds.,
Elsevier, London, pp 153-202.
2. ADLER, E.; JUNGHANH, L.; LINDBERG, U.; BERGGREN, B. e
WESTING, G., (1960a)., *Acta Chem. Scand.*, 14, 1261-73. Em
CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: *Coffee*
Vol. I.: Chemistry. CLARKE, R.J. and MACRAE, R.
eds., Elsevier, London, pp 153-202.
3. ADLER, E.; MAGNUSSON, R.; BERGGREN, B. e THOMELIUS, H., (1960b)
Acta Chem. Scand., 14, 515-28. Em CLIFFORD, M.N. (1985).
Chlorogenic acids, In: *Coffee* Vol. I.: Chemistry.
CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds., Elsevier, London, pp
153-202.
4. ADLER, E.; BRASEN, S. e MIYAKE, H., (1971). *Acta Chem. Scand.*,
25, 2055-69. Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic
acids, In: *Coffee* Vol. I.: Chemistry. CLARKE, R.J.
and MACRAE, R. eds., Elsevier, London, pp 153-202.
5. AMORIM, H.V., (1970). Nutritional Status of the coffee plant
and beverage quality. *Indian Coffee*, 34(12):331-335.
6. AMORIM, H.V. e AMORIM, V.L., (1977). Coffee enzymes and coffee
quality In: *Enzymes in Food and Beverage Processing*. ACS
Symposium Series numero 47. Eds. ORY, R.L. e ANGELO,
A.J.St. pp 27-56.

7. AMORIM, H.V.; CRUZ, A.R.; ANGELO, A.J.St.; DIAS, R.M.; MELO, M.; TEIXEIRA, A.A.; GUTIERREZ, L.E. e CRY R.L.,(1977). Biochemical, Physical and Organoleptical changes during raw coffee quality deterioration. In: Eighth International Scientific Colloquium on coffee, Abdijan, ASIC, Paris, pp 183-186.
8. AMORIM, H.V.; CRUZ, V.F.; TEIXEIRA, A.A. e MALAVOLTA, E., (1975a). Chemistry of Brazilian green coffee and the quality of the beverage V. Multiple linear regression analysis. *Turrialba*, 25, 25-8.
9. AMORIM, H.V. GUERCIO, M.A.; CORTEZ, J.G. e MALAVOLTA, E., (1973a). Métodos de análise organico do café I. Comparação entre métodos de determinação do ácido clorogênico. *Anais da E.S.A. "Luiz de Quiroz"*, 30, 281-91.
10. AMORIM, H.V. e JOSEPHSON, R.V.,(1975). Water soluble protein and non-protein components of Brazilian green coffee beans. *J. Food. Sci.* 40, 1179-84.
11. AMORIM, H.V.; LEGENDRE, M.G.; AMORIM V.L.; ANGELO, A.J.St. e ORY, R.L.,(1976). Chemistry of Brazilian green coffee and the quality of the beverage. VII. Total carbonyls, activity of polyphenoloxidase and hydroperoxides. *Turrialba*, 26, 193-5.
12. AMORIM, H.V.; MALAVOLTA, E.; TEIXEIRA, A.A.; CRUZ, V.F.; MELO, M.; GUERCIO, M.A.; FOSSA, E.; BREVIGLIERI, O.; FERRARI, S.E. e SILVA, D.M.(1973) Relationship between some organic compounds of Brazilian Green Coffee with the quality of the Beverage. In: Sixth International Scientific Colloquium on Coffee, Bogotá, ASIC, Paris, pp 113-127.

13. AMORIM, H.V.; SCOTON, L.C.; CASTILHO, A. de, PIMENTEL GOMES, F. e MALAVOLTA, E., (1967). Estudo 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 E.S.A. "Luiz de Queiroz", U.S.P. 24, 215-228.
14. AMORIM, H.V. e SILVA, D.M., (1968). Relationship between the Polyphenol Oxidase Activity of Coffee beans and the quality of the beverage. *Nature*, 219, 5152, 381-382.
15. AMORIM, H.V.; TEIXEIRA, A.A.; BREVIGLIERI, O.; CRUZ V.F. e MALAVOLTA, E., (1974a), Chemistry of Brazilian Green Coffee and the quality of the beverage. I. Carbohydrates. *Turrialba*, 24, 214-6.
16. AMORIM, H.V.; TEIXEIRA, A.A.; GUERCIO, M.A.; CRUZ, V.F. e MALAVOLTA, E., (1974b). Chemistry of Brazilian Green Coffee and the quality of the beverage. II. Phenolic compounds. *Turrialba*, 24(2):217-221.
17. AMORIM, H.V.; TEIXEIRA, A.A.; MELO, M.; CRUZ, V.F. e MALAVOLTA, E., (1974c). Chemistry of Brazilian Green Coffee and the quality of the beverage III. Soluble proteins. *Turrialba*, 24(3):304-308.
18. AMORIM, H.V.; TEIXEIRA, A.A.; MELO, M.; CRUZ, V.F. e MALAVOLTA, E. (1975b). Chemistry of Brazilian Green Coffee and the quality of the beverage. IV. Electrophoresis of proteins in agar-gel and its interaction with choloregenic acids. *Turrialba*, 25(1):18-24.

19. AMORIM, H.V. TEIXEIRA, A.A.; MORAIS, R.S.; REIS, A.J.; PIMENTEL-GOMES, F. e MALAVOLTA, E. (1973c). Estudos sobre a alimentação mineral do cafeeiro, XXVII. Efeito da adubação N, P, K no teor de macro e micronutrientes do fruto e na qualidade da bebida. Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz", US.P. 30, 323-333.
20. ANDERSON, L. (1972). The Cyclitols. In: The Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry. Academic Press, London, PIGMAN, W. e HORTON, D. eds. pp 520-579.
21. ARNOLD, R.A. e NOBLE, A.C. (1978). Bitterness and astringency of grape seed phenolics in a model urine solution. *American Journal of Enology and Viticulture*, 32, 5-13.
22. ARIGA, T. e ASAO, Y. (1981). Isolation, identification and organoleptic astringency of dimeric procinthro cynidins occurring in Azuki beans. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45, 2709-12.
23. BELITZ, H.D. (1975). Geschmacksaktive substanzen in Kaffee. In: Seventh International Scientific Colloquium on Coffee, Hamburg ASIC, Paris, pp243-52.
24. BELITZ, H.D.; CHEN, W.; JUGEL, H.; STEMPFL, H; TRELEANO, R. e WIESER, H. (1983). QSAR of bitter tasting compounds. *Chemistry and Industry*, 23-26.
25. BIRCH, G.G. e LINDLEY, M.G. (1973). Structural functions of taste in the sugar series: Cyclohexane polyols as sweet analogues of the sugars. *J. Food. Sci.* 38, 1178-81.
26. BLANC, M. (1977). Les acides carboxyliques du café mise au point et résultats de différentes déterminations. In: Eighth International Scientific Colloquium on Coffee, Abidjan ASIC,

Paris, pp 73-78.

27. BLANCHFIELD, D.(1980). Philosophy of Food Control. In: Food Control in Action. DENNIS, P.O.; BLANCHFIELD, J.R. e WARD, A.G. (eds.), *Applied Science*, London, pp 1-14.
28. BRADFORD, M.M.,(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
29. CAPLAN, R.H.(1978). A practical approach to Quality Control. 3rd ed. Business books Ltd., London, Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
30. CARELLI, M.L.C.; LOPES, C.R. e MONACO, L.C.;(1974). Chlorogenic acid content in species of *Coffea* and selections of *C. arabica*. *Turrialba*, 24(4):398-401.
31. CHASSEVENT, F.; DALGER, G.; GERWIG, S. e VINCENT, J.C.,(1973). Contribution à l'étude des Mascarocoffea. In: Sixth International Scientific Colloquium on Coffee, Bogotá, ASIC, Paris, pp 147-54.
32. CHASSEVENT, F; VINCENT, J.C.; HAHN, D.; POUGNEAUD, S. e WILBAUX, R.,(1969). Study of the relationships, gustatory and chemical, as a function of the preparation of Robusta coffee as the first stage. In: Fourth International Scientific Colloquium on Coffee, Amsterdam, ASIC, Paris, pp 179-185.

33. CLARKE, R.J.; (1985). Green Coffee Processing. In: Coffee, Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 230-250.
34. CLIFFORD, M.N.,(1972). The Phenolic Compounds of Green and Roasted coffee beans, PhD. Thesis, University of Strathclyde, Glasgow.
35. CLIFFORD, M.N.,(1979). Chlorogenic acids- their complex nature and routine determination in coffee beans. *Food Chem.* 4, 63-71
36. CLIFFORD, M.N.,(1985a). Chlorogenic acids, In: Coffee Vol.I: Chemistry. CLARKE, R.J. and MACRAE, R., eds, Elsevier, London, pp 153-202.
37. CLIFFORD, M.N. (1985b). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
38. CLIFFORD, M.N. e GRIFFITHS, T.I., (1982). The analysis of sugars in immature green coffee beans. (Dados não publicados). Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
39. CLIFFORD, M.N.; KAZI, T. e CRAWFORD, S. (1987). The content and washout kinetics of chlorogenic acid in normal and abnormal green coffee beans. In: Twelfth International Scientific Colloquium on Coffee, Montreux, ASIC, Paris, pp

40. CLIFFORD, M.N. e OHIOKPEHAI, O (1983), Coffee Astringency, *Anal. Proc.* 20, 83-86.
41. CLIFFORD, M.N. OHIOKPEHAI, O. e MENEZES, H.C. (1985). The influence of extraction method and analytical method on the chlorogenic acid content of green coffee beans. In: Eleventh International Scientific Colloquium on Coffee, Lome, ASIC, Paris, pp 252-262.
42. CLIFFORD, M.N.; SHUTLER, R.; THOMAS, G.A. e OHIOKPEHAI, O. (1987). The chlorogenic acids content of coffee substitutes. *Food Chem.*, 24, 99-107.
43. CLIFFORD, M.N. e STANIFORTH, P.S. (1977). A critical comparison of six spectrophotometric methods for measuring chlorogenic acids in green coffee beans. In: Eighth International Scientific Colloquium on Coffee, Abdijan, ASIC, Paris, pp 109-113.
44. CLIFFORD, M.N.; TANG, S.L. e EYO, A.A. (1979). Proc. Torrey Jubilee Conference on Fish Science and Technology, pp 286-90. Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: Coffee Vol. I.: Chemistry. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds., Elsevier, London, pp 153-202.
45. CLIFFORD, M.N. e WALKER, R. (1987). Chlorogenic acids-Confounders of Coffee- Serum cholesterol relationships. *Food Chem.*, 24, pp 77-80.
46. CLIFFORD, M.N. e WIGHT, J. (1976). The measurement of feruloylquinic acids and caffeoylquinic acids in coffee beans. Development of the technique and its preliminary application to green coffee beans. *J. Sci. Food Agric.*, 27,

47. CORSE, J.; LAYTON, L.L. e PATTERSON, D.C. (1970). Isolation of chlorogenic acids from roasted coffee. *J. Sci. Food Agric.*, 21, 164-168.
48. CORSE, J. e LUNDIN, R.E. (1970). Diastereomers of quinic acid, chemical and N.M.R. studies. *J. Org. Chem.*, 35, 1904-1909.
49. COURT, W.A. (1977). *J. Chromatog.* 130, 287-91. Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids. In: *Coffee Vol. I.: Chemistry*. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds., Elsevier, London, pp 153-202.
50. DENTAN, E. (1985). The Microscopic Structure of the Coffee Bean. In: *Coffee, Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C., eds. Croom Helm, London, pp 284-304.
51. DIAZ, J.S.; GOMEZ, G.S.; FELSNER, G. e FRITSCH, G. (1973). Estudio de la señal ancha resonancia magnética nuclear (Resonancia de protones) em muestras de café colombiano preparado en diferentes condiciones. In: *Sixth International Scientific Colloquium on Coffee*, Bogotá, ASIC, Paris, 172-177.
52. DRAETTA, I. dos S. e LIMA, D.C. (1976). Isolamento e caracterização das polifenoloxidasas do café. *Coletânea do ITAL*, 7, 13-28.
53. FELDMAN, J.R.; RYDER, W.S. e KUNG, J.J. (1969). The importance of non-volatile compounds to the flavour of coffee. *J. Ag. Food Chem.*, 17, 733-739.
54. FENNEMA, O.R. (1976). Water and Ice. In: *Principles of Food Science, Part I. Food Chemistry*. FENNEMA, O.R. (ed), Marcel

Dekker, Inc., New York, pp 32.

55. FERREIRA, L.A.B.; VILAR, H.; FRAGOSO, M.A.C.; AGUIAR, M.C.; CRUZ, M.J.R. e GONÇALVES, M.M. (1971). Subsídios para a caracterização do grão de café do híbrido de Timor. In: Fifth International Scientific Colloquium on coffee, Lisbon, ASIC, Paris, pp 128-147.
56. GAL, S.; WINDERMANN, P. e BAUMGARTNER, E. (1976). Untersuchungen über die Vorgänge beim Dämpfen von Kaffeebohnen. *Chimia*, 30, 68-71. Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
57. GARRICK, L.S. e HABERMANN, H.N. (1962). Distribution of allagochrome in vascular plants. *Am. J. Bot.*, 49, 1078-88. Em CLIFFORD (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
58. GIBSON, A. e BUTTY, M. (1975). Overfermented coffee Beans (Stinkers). A method for their detection and elimination. In: Seventh International Scientific Colloquium on coffee, Hamburg, ASIC, Paris, pp 141-152.
59. GRAAFF, J. de (1986). The Economics of Coffee. Pudoc Wageningen, Amsterdam.
60. GROSS, G.G. (1981). Phenolic Acids. In: The Biochemistry of Plants, vol.7, CONN, E.E. (ed), Academic Press, London, pp

61. HANSON, K.R. (1965). Chlorogenic acid biosynthesis. Chemical Synthesis and properties of the mono-o-cinnamoylquinic acids. *Biochemistry* 4, 2719-35.
62. HANSON, K.R. & ZUCKER, M. (1963). *J. Biol. Chem.* 238, 1105-15. Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: *Coffee Vol. I.: Chemistry*. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds., Elsevier, London, pp 153-202.
63. HASLAM, E. (1981). In: *Biochemistry of Plants. A comprehensive Treatise. Vol. 7- Secondary Plant Products*, eds. STUMPF, P.K. and CONN, E.E., Academic Press, London, pp 527-56. Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: *Coffee Vol. I.: Chemistry*. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds., Elsevier, London, pp 153-202.
64. HASLAM, E.; MAKINSON, G.K.; NAUMANN, M.O. & CUNNINGHAM, J. (1964), Synthesis and properties of some hydroxycinnamoyl esters of quinic acid. *J. Chem. Soc.* 2137-46.
65. HASSAN, M.U. (1970). The precursors of Coffee Aroma. Ph.D. Thesis, University of Strathclyde, Glasgow. Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: *Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage*. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
66. HAYAKAWA, K.I.; MATAS, J. & HWANG, M.P. (1978). Moisture sorption isotherms of coffee products. *J. Food Sci.* 43, 1026-7.
67. HORMAN, I. & VIANI, R. (1971). The caffeine-chlorogenate complex of coffee. An NMR study. In: *Fifth International*

Scientific Colloquium on coffee, Lisbon, ASIC, Paris, pp 102-11.

68. HUMPHREY, C.J. e MACRAE, R. (1987). Determination of chlorogenic acid in instant coffee using derivative spectrophotometry and its application to the characterization of instant coffee/ chicory mixtures. Twelfth International Scientific Colloquium on Coffee, Montreux, ASIC, Paris, pp 179-186.
69. I.B.C. INSTITUTO BRASILEIRO DE CAFÉ, (1985). Manual de recomendações do I.B.C., Cultura de café no Brasil, 5.^a ed., Ministério da Indústria e do Comércio, Editado pelo setor de programação visual e gráfica/IBC/GERCA.
70. IUPAC, (1976). Nomenclature of cyclitols. *Biochem. J.* 153, 23-31. Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
71. KELLARD, B.; CLIFFORD, M.N. e BIRCH, G.G. (1987), Progress in the chemical synthesis and organoleptic evaluation of chlorogenic acids. In: Twelfth International Scientific Colloquium on Coffee, Montreux, ASIC,. Paris, pp 254-259.
72. KUNG, J.J. McNAUGHT, R.P. e YERANSIAN, J.A. (1967). Determining volatile acids in coffee beverages by NMR and gas chromatography. *J. Food Sci.* 32, 455-8.
73. KÖNIG, W.A. e STURM, R. (1982). Gas chromatography and mass spectrometry as an aid for the investigation of high boiling coffee constituents. In: Tenth International

Scientific Colloquium on Coffee, Salvador, ASIC, Paris, pp 271-8.

74. KWASNY, H. (1975). Zur Bestimmung von Chlorogensäuren in Kaffee-Extrakt Engebrisse aus DNA-Ringversuehn. In: Seventh International Scientific Colloquium on Coffee, Hamburg, ASIC, Paris, pp 303-10. Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: Coffee Vol. I.: Chemistry. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds., Elsevier, London, pp 153-202.
75. LEHMANN, G. e HAHN, H.C. (1967), Über die Bestimmung der Chlorogensäure und des Trigonellins. In: Third International Scientific Colloquium on Coffee, Trieste, ASIC, Paris, pp 115-20. Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: Coffee Vol. I.: Chemistry. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds., Elsevier, London, pp 153-202.
76. LENTNER, C. e DEATHERAGE, F.E. (1959), Organic acids in coffee in relation to the degree of roast. *Food Research*, 24, 483-92.
77. LEA, A.G.H. e ARNOLD, G.M.; (1978). The Phenolics of ciders. Bitterness and Astringency. *J. Sci. Food Agric.* 29, 478-83.
78. MACRAE, R. (ed) (1982), HPLC in Food Analysis. Academic Press.
79. MAIER, H.G. (1983). Coffee acidity. Comunicação pessoal. Em : CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Groomhelm, London, pp 305-359.

80. MAIER, H.G. e GRIMSEHL, A. (1982). Die Säuren des Kaffees II. Chlorogensäuren im Rohkaffee. Kaffee und Tee Markt, 32(16):3-5. Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: Coffee Vol. I.: Chemistry. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds., Elsevier, London, pp 153-202.
81. MARTINO, V.S.; DEBENDETTI, S.L. e COUSSIO, J.D. (1979). Caffeoilquinic acids from Pterocaulon virgatum and Pluchea sagittalis. Phytochem. 18, 2052.
82. MEISSNER, W. GERA, Z. e WALKOWSKI, A. (1974), Pr. Zakresu Towarozn. Chem. Wyzszasz. Ekon. Poznaniu, 53, 71-80. Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: Coffee Vol. I.: Chemistry. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds., Elsevier, London, pp 153-202.
83. MELO, M.; FAZVOLI, L.C.; TEIXEIRA, A.A. e AMORIM, H.V. (1980). Chemical, physical and organoleptic alterations on storage of coffee beans. Ciência e Cultura (São Paulo), 32, 468-71.
84. MENEZES, H.C. e CLIFFORD, M.N. (1987). The influence of stage of maturity and processing method on the relation between the different isomers of caffeoilquinic acid. In: Twelfth International Scientific Colloquium on Coffee, Montreux, ASIC, Paris, pp 377-381.
85. MESNARD, P. e DEVAUX, G. (1964). Bull. Soc. Chem. Part. I. pp 43-7. Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: Coffee Vol. I.: Chemistry. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds., Elsevier, London, pp 153-202.
86. MOLL, H.R. e PICTET, G.A. (1980). La chromatographie liquide haute performane appliquée à certains constituants spécifiques du café. In: Ninth

International Scientific Colloquium on Coffee, London,
ASIC, Paris, pp 87-98.

87. MÖLLER, B. e HERRMAN, K. (1982). *J. Chromatog.* 241, 371-9, Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
88. MÖLLER, B. e HERRMAN, K. (1983). Quinic acid esters of hydroxycinnamic acids in stone and pome fruit. *Phytochem.* 22, 477-81.
89. MOORES, R.G.; McDERMOTT, D.L. e WOOD, T.R., (1948) *Anal. Chem.*, 20, 620-4, Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: Coffee Vol. I.: Chemistry. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds., Elsevier, London, pp 153-202.
90. NAGELS, L.; VAN DONGEN, W.; BRUCKER, J. de e POOTER, H. de, (1980), *J. Chromatog.* 187, 181-7. Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: Coffee Vol. I.: Chemistry. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds., Elsevier, London, pp 153-202.
91. NAKABAYASHI, T. (1978). Changes of organic acids and pH roast of coffee. *J. Jap. Soc. Food.Sci. Tech.* 25, 142-146. Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
92. NAKABAYASHI, T. e KOJIMA, Y. (1980). Changes in the quinic acid contents of coffee beans during the roasting process. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* , 27, 108-11. Citado em :

93. NORTHMORE, J.M. (1967), Raw bean colours and the quality of Kenya arabica coffee. Third International Scientific Colloquium on coffee, Trieste, ASIC, Paris, pp 405-14.
94. NORTHMORE, J.M. (1969). Overfermented beans and stinkers as defectives of arabica coffee. In: Fourth International Scientific Colloquium on Coffee, Amsterdam, ASIC, Paris, 47-54.
95. NORTHMORE, J.M. (1985), Some factors affecting the quality of Kenya coffee. *Turrialba*, 15(3):184-193.
96. OHIOKPEHAI, O. (1982). Chlorogenic acid content of green coffee beans. Ph.D. Thesis. University of Surrey. Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
97. OHIOKPEHAI, O.; BRUMEN, G. e CLIFFORD, M.N. (1982). The chlorogenic acid content of some peculiar green coffee beans and the implications for beverage quality. In Tenth International Scientific Colloquium on Coffee, Salvador, ASIC, Paris, pp 177-186.
98. OLIVEIRA, J.C.; AMORIM, H.V.; SILVA, D.M. e TEIXEIRA, A.A. (1979a.) Effects of the origin, pulping types and storage of coffee on he polyphenol oxidase activity and beverage quality. *Científica*, 7, 79-84.
99. OLIVEIRA, J.C.; SILVA, D.M.; AMORIM, H.V. e TEIXEIRA, A.A. (1976). Atividade enzimática da polifenoloxidase de grãos de quatro espécies de café durante o armazenamento.

100. OLIVEIRA, J.C.; SILVA, D.M.; TEIXEIRA, A.A. e AMORIM, H.V. (1977). Atividade enzimática da polifenoloxidase, peroxidase e catalase em grãos de *Coffea arabica* L. e relações com a qualidade da bebida, *Turrialba*, 27(1):75-82.
101. OLIVEIRA, J.C.; SILVA, D.M.; TEIXEIRA, A.A. e AMORIM, H.V. (1979b). Effects of the application of insecticides to control coffee and tea borers on the polyphenol oxidase activity and the beverage quality of coffee. *Científica*, 7, 221-224.
102. ORDYNSKY, G. (1965). *Z. Ernährungs Forsch*, 5, 203-206. Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: Coffee Vol. I.: Chemistry. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds., Elsevier, London, pp 153-202.
103. PANGBOURNE, R.M. (1982). Influence of Water Composition, extration procedures, and holding time and temperature on quality of coffee beverages. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 15, 161-8. Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
104. PANGBOURNE, R.M.; GIBBS, Z.M. e TASSAN, C. (1978). Effect of hydrocolloids on apparent viscosity and sensory properties of selected beverages. *J. Text. Studies*, 9, 415-36. Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany

Biochemistry and Production of Beans and Beverage.

CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.

105. PFRUNDER, R; WANNER, H. FRISCHKNECHT, P.M. e BAUMANN, T.W. (1980). An attempt to localise caffeine in the cell by its washout kinetics. In: Ninth International Scientific Colloquium on Coffee, London, ASIC, Paris, pp 169-176.
106. PICTET, G. e BRANDENBERGER, H. (1960), *J. Chromatog.* 4, 396-409. Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: Coffee Vol. I.: Chemistry. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds., Elsevier, London, pp 153-202.
107. PICTET, G. REHACEK, J. (1982). Contrôles analytiques du degré de torrefaction. In: Tenth International Scientific Colloquium on coffee. Salvador, ASIC, Paris, pp 219-34.
108. PICTET, G. e VANTAZ, L. (1977). Étude de techniques d'infusion. In: Eighth International Scientific Colloquium on coffee, Abidjan, ASIC, Paris, pp 261-70.
109. PIERPOINT, W.S. (1982). A class of blue quinone- protein coupling products: The allagochromes. *Phytochemistry*, 21, 91-95. Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
110. POKORNY, T. CON, N.H. e JANICEK, G. (1972). Scientific Papers of the Institute of Chemical Technology, Prague, E.33. Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: Coffee Vol. I.: Chemistry. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds., Elsevier,

London, pp 153-202.

111. PYPKER, J. e BROUWER, H. (1969). Headspace analysis of the less volatile constituents of coffee. In: Fourth International Scientific Colloquium on Coffee, Amsterdam, ASIC, Paris, pp 122-30.
112. RAHN, W.; MEYER, H.W. e KÖNIG, W.A. (1979). Effects of KVV-process on the composition of phenolic components of green and treated coffee. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 169, 346-9. Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
113. REES, D.I. e THEAKER, P.D., (1977). High Pressure liquid chromatography of chlorogenic acid isomers in coffee In: Eighth International Scientific Colloquium on Coffee, Abidjan, ASIC, Paris, pp 79-84.
114. ROTENBERG, B. e IACHAN, A. (1971). Método químico automático para diferenciação de "café-bebida". *Rev. Bras. Tecnol.* 2, 67-70.
115. ROTENBERG, B. e IACHAN, A. (1972). Contribuição ao estudo enzimico do grão de café. I. Tirosinase e lacase. *Rev. Bras. Tecnol.* 3, 155-9.
116. RUBACH, K. (1969). Beitrag zur analytik der hydroxyzimtsäure-ester des kaffees. Dissertain, Technische Universität, Berlin, Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: Coffee Vol. I.: Chemistry. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds., Elsevier, London, pp 153-202.

117. SANINT, B.O. e VALENCIA, A. G. (1970). Actividad enzimática en el grano de café en relación a la calidad de la bebida. I. Duración de la fermentación. CENICAFE, 21(2):59-71.
118. SIVETZ, M. (1972). How acidity affects coffee flavours. *Food Technology*, Champaign, 26, 70-77. Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
119. SIVETZ, M. (1973). Comparison of changes in roasted coffee beans in pressurized oxygen free vs. atmospheric roasters. In: Sixth International Scientific Colloquium on coffee, Bogotá, ASIC, Paris, pp 199-221.
120. SLOMANY K.G. e PANIO, M. (1969). Determination of chlorogenic acid in coffee. *Advances in Automated Analysis. Technicon Int. Congress*, Chicago, 2, pp 83-85. Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: Coffee Vol. I.: Chemistry. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds., Elsevier, London, pp 153-202.
121. SMITH, A. (1983) Sensory aspects of coffee quality. Apresentado na Reunião da Society of Chemical Industry, London, Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
122. SMITH, A.W, (1985). The Coffee plant and Processing at origin. In: Coffee Vol. I. Chemistry- CLARKE, R.J. and

MACRAE, R. (eds), Elsevier Applied Science Publishers, pp 3-23.

123. SMITH, R.F. (1985), A History of coffee. In: Coffee, Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. & WILLSON, K.C. (eds), pp 1-12.
124. SONDHEIMER, E. (1958), On the distribution of caffeic acid and the chlorogenic acid isomers in plants. *Archives of Biochem. & Biophys.* 74, 131-8.
125. STIRLING, H. (1980), Storage research on Kenya arabica coffee. In: Ninth International Scientific Colloquium on Coffee, London, ASIC, Paris, pp 189-200.
126. TRESSL, R.; BAHRI, D. KOPPLER, H. & JENSEN, A. (1978a.), Diphenols and caramel compounds in roasted coffees of different varieties. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 167, 111-114. Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
127. TRESSL, R.; GRÜNEWALD, K.G.; KOPPLER, H. & SILWAR, R.(1978b). Phenols in roasted coffees of different varieties. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 167, 108-10. Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.

128. TRESSL, R.; HOLZER, M. e KAMPERSCHROER, H. (1982). Bildung von Aromastoffen in Rostkaffee in Abhängigkeit vom Gehalt an Aminosäuren und Reduzierenden Zuckern. In: Tenth International Scientific Colloquium on Coffee, Salvador, ASIC, Paris, 279-92. Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
129. TRESSL, R.; KOSSA, T.; RENNER, R. e KOPPLER, H. (1976). Gas chromatographic- mass spectrometric investigations on the formation of phenolic and aromatic hydrocarbons in food. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 162, 123-30. Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
130. TRUGO, L.C. (1984). Ph.D. Thesis, University of Reading. Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: Coffee Vol. I.: Chemistry. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds., Elsevier, London, pp 153-202.
131. TRUGO, L.C. e MACRAE, R. (1984a.), Chlorogenic acid composition of instant coffees. *Analyst*, 109, 263-266.
132. TRUGO, L.C. e MACRAE, R. (1984b), A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chem.* 21, 1-9.

133. VALENCIA, A.G. (1972). Actividad enzimática en el grano de café en relación con la calidad de la bebida de café. *Cenicafé*, 23, 3-18.
134. VAN DER STEGAN, G.H.D. e VAN DUIJN, J. (1980). Analysis of Chlorogenic acids in coffee. Ninth International Scientific Colloquium on Coffee, London, ASIC, Paris, pp 107-112.
135. VINCENT, J.C.; GUENOT, M.C.; PERRIOTT, J.J.; HAHN, H. e GUELE, D. (1977). The influence of different technical treatments on the chemistry and organoleptic characterisations of Robusta and Arabusta coffee. In: Eighth International Scientific Colloquium on Coffee, Abidjan, ASIC, Paris, 271-284.
136. VOILLEY, A.; SAUVAGEOT, F e DURAND, D. (1977). Influence, sur l'amertume d'un café boisson, de quelques paramètres d'extraction. In: Eighth International Scientific Colloquium on Coffee, Abidjan, ASIC, Paris, pp 251-60.
137. VOILLEY, A.; SAUVAGEOT, F.; SIMATOS, D. e WOJCIK, G. (1981). Influence of some processing conditions on the quality of coffee brew. *J. Food Proc. Pres.* 5(3):136-43. Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
138. WATSON, A.G. (1980). The mechanization of coffee production. In: Ninth International Scientific Colloquium on Coffee, London, ASIC, Paris, pp 681-6.

139. WEISS, L.C. (1953). Report on Chlorogenic acid in coffee. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 36, 663-70. Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: Coffee Vol. I.: chemistry. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. eds., Elsevier, London, pp 153-202.
140. WEISS, L.C. (1957). Report on Chlorogenic acid in coffee. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 40, 350-354. Em CLIFFORD, M.N. (1985). Chlorogenic acids, In: Coffee Vol. I.: Chemistry. CLARKE, R.J. and MACRAE, R. ds., Elsevier, London, pp 153-202.
141. WHITING, G.C. e COGGINS, R.A. (1975). Estimation of the monomeric phenolics of ciders. *J. Sci. Food. Agric.* 26, 1833-1838.
142. WILLSON, K.C. (1985). Cultural Methods. In: Coffee, Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage, CLIFFORD, M.N. e WILLSON K.C. (eds.), Croom Helm, London, pp 203-204.
143. WOLINSKY, J.; NOVAK, R. e VASILEFF, R. (1964). A stereoscopic synthesis of (+) quinic acid. *J. Org. Chem.* 29, 3596-8. Em CLIFFORD, (1985). Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Coffee, Botany Biochemistry and Production of Beans and Beverage. CLIFFORD, M.N. and WILLSON, K.C. eds. Croomhelm, London, pp 305-359.
144. WOOTTON, A.E. (1965), The importance of field processing to the quality of East African coffee. In: Second International Scientific Colloquium on Coffee, ASIC, Paris, pp 247-58.

145. WOOTTON, A.E. (1967a). A report by the working group on the wet processing of coffee. Third International Scientific Colloquium on Coffee, Trieste, ASIC, Paris, pp 398-404.
146. WOOTTON, A.E. (1967b). A comparison of the methods of measurement of moisture content in parchment and green coffee. In : Third International Scientific Colloquium on Coffee, Trieste, ASIC, Paris, pp 92-100.
147. WOOTTON, A.E. (1971). The dry matter loss from parchment and green coffee. In: Fifth International Scientific Colloquium on coffee, Lisbon, ASIC, Paris, pp 316-24.
148. ZULUAGA-VASCO, J.; BONILLA, C. e QUIJANO-RICO, M. (1975). Contribución al estudio y utilización de la pulpa de café. In: Seventh International Scientific Colloquium on Coffee, Hamburg, ASIC, Paris, pp 233-42.
149. ZULUAGA-VASCO, J. e TABACCHI, R. (1980). Contribution à l'étude de la composition chimique de la pulpe de café. In: Ninth International Scientific Colloquium on Coffee, London, ASIC, Paris, pp 335-44.

ANEXO 1

CLASSIFICAÇÃO E TEOR DE SÓLIDOS DAS AMOSTRAS

N.º Amostra	Maturação	Via Preparo	Dia de Colheita	Repetição	Sólidos %
1	Verde	Seca	1	1	89,57
2	"	"	1	2	89,79
3	"	"	2	1	90,11
4	"	"	2	2	90,19
5	"	"	3	1	89,37
6	"	"	3	2	89,26
7	"	"	4	1	89,37
8	"	"	4	2	89,38
9	"	"	5	1	91,35
10	"	"	5	2	91,42
11	"	"	6	1	n.e.
12	"	"	6	2	n.e.
13	"	úmida	1	1	92,34
14	"	"	1	2	92,34
15	"	"	2	1	91,65
16	"	"	2	2	91,65
17	"	"	3	1	92,58
18	"	"	3	2	92,68
19	"	"	4	1	92,09
20	"	"	4	2	92,09
21	Verde	úmida	5	1	89,37
22	"	"	5	2	89,38

N.º Amostra	Maturação	Via Preparo	Dia de Colheita	Repetição	Sólidos %
23	Verde	úmida	6	1	n.e.
24	"	"	6	2	n.e.
25	Meio verde	Seca	1	1	91.65
26	"	"	1	2	91.64
27	"	"	2	1	91.46
28	"	"	2	2	91.52
29	"	"	3	1	88.72
30	"	"	3	2	88.64
31	"	"	4	1	92.15
32	"	"	4	2	92.08
33	"	"	5	1	91.09
34	"	"	5	2	90.83
35	"	"	6	1	92.42
36	"	"	6	2	92.22
37	"	úmida	1	1	90.68
38	"	"	1	2	90.85
39	"	"	2	1	92.61
40	"	"	2	2	92.81
41	"	"	3	1	92.69
42	"	"	3	2	92.60
43	"	"	4	1	91.29
44	"	"	4	2	91.13
45	"	"	5	1	92.11
46	"	"	5	2	91.90
47	"	"	6	1	91.91

N.º Amostra	Maturação	Via Preparo	Dia de Colheita	Repetição	Sólidos %
48	Meio verde	úmida	6	2	92.11
49	Meio maduro	seca	1	1	90.53
50	"	"	1	2	90.35
51	Meio maduro	seca	2	1	90.22
52	"	"	2	2	90.07
53	"	"	3	1	90.65
54	"	"	3	2	90.71
55	"	"	4	1	89.07
56	"	"	4	2	87.76
57	"	"	5	1	88.85
58	"	"	5	2	89.39
59	"	"	6	1	92.16
60	"	"	6	2	92.17
61	"	úmida	1	1	90.96
62	"	"	1	2	90.83
63	"	"	2	1	91.10
64	"	"	2	2	90.98
65	"	"	3	1	91.61
66	"	"	3	2	91.33
67	"	"	4	1	89.11
68	"	"	4	2	89.39
69	"	"	5	1	92.11
70	"	"	5	2	92.45
71	"	"	6	1	92.83

N.º Amostra	Maturação	Via Preparo	Dia de Colheita	Repetição	Sólidos %
72	meio maduro	úmida	6	2	92.02
73	maduro	seca	1	1	90.76
74	"	"	1	2	90.59
75	maduro	seca	2	1	90.55
76	"	"	2	2	90.62
77	"	"	3	1	90.25
78	"	"	3	2	90.22
79	maduro	seca	4	1	89.52
80	"	"	4	2	89.44
81	"	"	5	1	90.60
82	"	"	5	2	90.59
83	"	"	6	1	90.66
84	"	"	6	2	90.16
85	"	úmida	1	1	90.12
86	"	"	1	2	89.32
87	"	"	2	1	88.64
88	"	"	2	2	88.53
89	"	"	3	1	91.26
90	"	"	3	2	91.21
91	"	"	4	1	89.24
92	"	"	4	2	89.29
93	"	"	5	1	90.70
94	"	"	5	2	90.18
95	"	"	6	1	91.60

N.º Amostra	Maturação	Via Preparo	Dia de Colheita	Repetição	Sólidos %
96	maduro	úmida	6	2	92.40
97	bem maduro	seca	1	1	89.93
98	"	"	1	2	89.58
99	"	"	2	1	90.55
100	"	"	2	2	90.54
101	"	"	3	1	90.50
102	bem maduro	seca	3	2	90.64
103	"	"	4	1	89.84
104	"	"	4	2	89.89
105	"	"	5	1	89.74
106	"	"	5	2	90.65
107	bem maduro	seca	6	1	92.12
108	"	"	6	2	92.10
109	"	úmida	1	1	91.49
110	"	"	1	2	91.54
111	"	"	2	1	92.80
112	"	"	2	2	92.79
113	"	"	3	1	91.97
114	"	"	3	2	91.95
115	"	"	4	1	91.99
116	"	"	4	2	92.74
117	"	"	5	1	92.01
118	"	"	5	2	91.96

N.º Amostra	Maturação	Via Preparo	Dia de Colheita	Repetição	Sólidos %
119	Bem maduro	úmida	6	1	91.97
120	"	"	6	2	91.92
121	Meia passa	seca	1	1	89.36
122	"	"	1	2	89.40
123	"	"	2	1	88.63
124	"	"	2	2	88.58
125	"	"	3	1	90.09
126	"	"	3	2	90.09
127	"	"	4	1	90.17
128	"	"	4	2	90.22
129	meia passa	seca	5	1	92.51
130	"	"	5	2	92.37
131	"	"	6	1	92.78
132	"	"	6	2	93.13
133	meia passa	úmida	1	1	91.87
134	"	"	1	2	91.79
135	meia passa	úmida	2	1	91.58
136	"	"	2	2	91.67
137	"	"	3	1	92.08
138	"	"	3	2	91.93
139	"	"	4	1	91.56
140	"	"	4	2	91.74
141	"	"	5	1	91.77
142	"	"	5	2	91.81

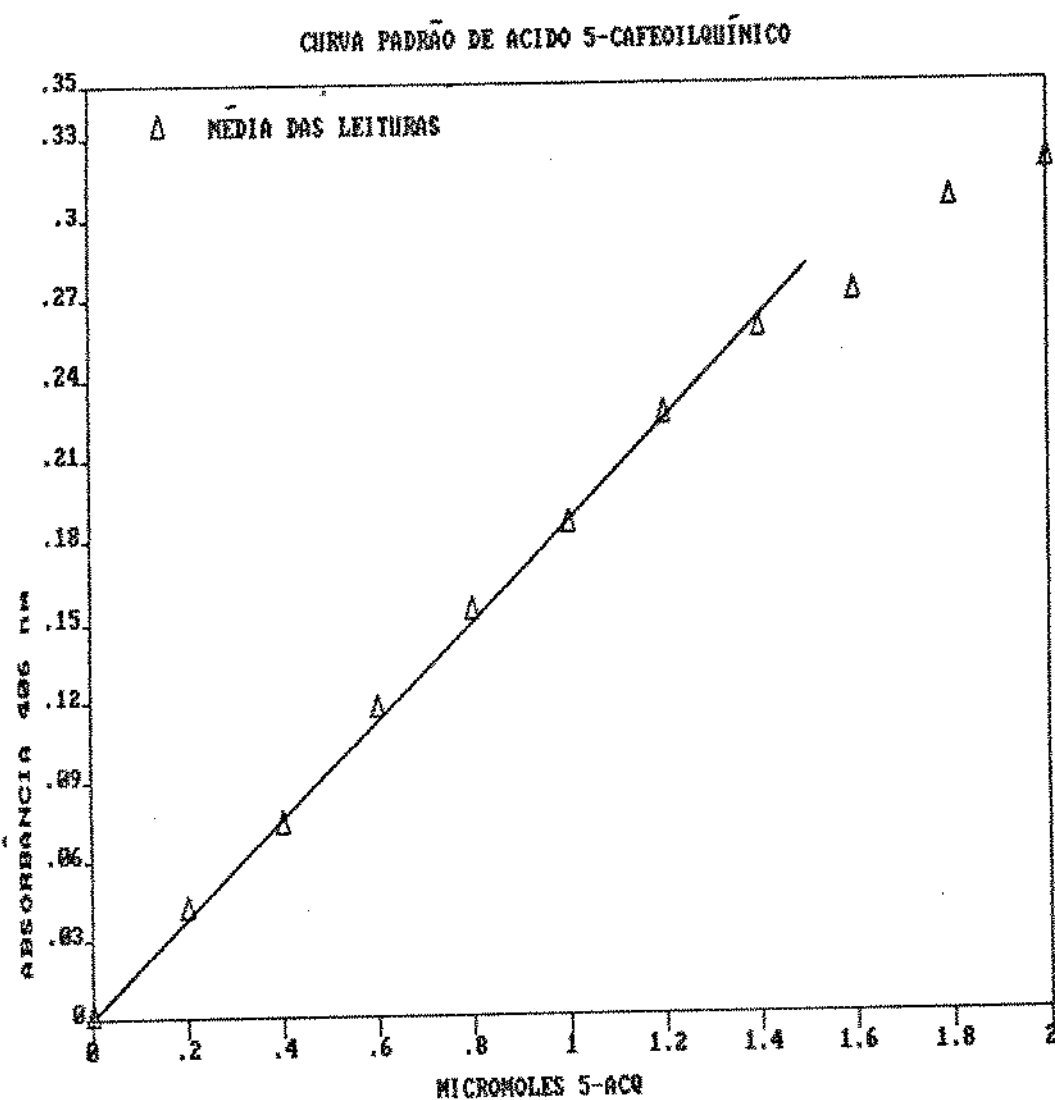
N.º Amostra	Maturação	Via Preparo	Dia de Colheita	Repetição	Sólidos %
143	meia pasa	úmida	6	1	91.90
144	"	"	6	2	92.11
145	Passa	seca	1	1	89.77
146	"	"	1	2	90.05
147	"	"	2	1	90.16
148	"	"	2	2	90.16
149	"	"	3	1	91.90
150	"	"	3	2	92.08
151	"	"	4	1	90.07
152	"	"	4	2	89.99
153	"	"	5	1	92.11
154	"	"	5	2	92.14
155	"	"	6	1	n.e.
156	Passa	seca	6	2	n.e.
157	Passa	úmida	1	1	91.51
158	"	"	1	2	91.70
159	"	"	2	1	92.59
160	"	"	2	2	91.70
161	"	"	3	1	91.36
162	"	"	3	2	91.24
163	Passa	úmida	4	1	92.11
164	"	"	4	2	91.90
165	"	"	5	1	91.72
166	"	"	5	2	91.62

Continuação Anexo 1

N. ^o Amostra	Maturação	Via Preparo	Dia de Colheita	Repetição	Sólidos %
167	Passa	úmida	6	1	92.31
168	"	"	6	2	92.54

Obs. n.e. = amostra insuficiente para análise.

ANEXO 2



ANEXO 3

CALCULO DA % DE ÁCIDO CLOROGÊNICO DAS AMOSTRAS

Peso da amostra extraída = X g.

Volume final do extrato = 200 ml

% de sólidos da amostra = S

valor médio de D.O. do padrão (1 μ moles 5-ACQ) = DP

valor médio de D.O. da amostra = DA

Considerando que existe linearidade até 1,4 μ moles ACQ pelo método usado e que sempre ensaiou-se 1 ml extrato :

$$\mu \text{ moles ACQ} / \text{ml extrato} = \frac{1}{DP} \times DA$$

Considerando que 200 ml de extrato representa X g de amostra:

$$X \text{ g amostra} \equiv \left(\frac{DA}{DP} \times 200 \right) \mu \text{ moles ACQ} .$$

Na base seca :

$$\left(\frac{X \times S}{100} \right) \text{ g amostra} \equiv \left(\frac{DA}{DP} \times 200 \right) \mu \text{ moles de ACQ}$$

Então:

$$100 \text{ g amostra (peso seco)} \equiv \left(\frac{DA}{DP} \times 200 \right) \div \left[\frac{X \times S}{100} \right] \times 100 \mu \text{ mol ACQ} .$$

$$\equiv \left[\frac{DA}{DP} \times 200 \times \frac{100}{X \times S} \times 100 \right] \mu \text{ moles ACQ} .$$

Considerando que o peso molecular do 5-ACQ é de 354 $\Rightarrow$

$$\begin{aligned} 100 \text{ g amostra} &\equiv \left[\frac{DA \times 200 \times 100 \times 100}{DP \times X \times S} \times \frac{345}{1000 \times 100} \right] \text{ g ACQ} \\ (\text{peso seco}) & \\ &\equiv \left[\frac{DA \times 708}{DP \times X \times S} \right] \text{ g ACQ} \end{aligned}$$

Os resultados do anexo 4 foram baseados neste calculo.

ANEXO 4

PORCENTAGEM DE ÁCIDO CLOROGÊNICO TOTAL (BASE PESO SECO)

N ^o Amostra	% ácido Clorogénico	média repetições	N ^o Amostra	% ácido Clorogénico	média repetições
1	6.49	6.70	41	7.68	7.55
2	6.91		42	7.42	
3	7.81		43	10.57	10.52
4	7.81	10.39	44	10.47	
5	10.05		45	6.97	7.16
6	10.72		46	7.39	
7	7.14	7.26	47	7.92	8.42
8	7.38		48	8.92	
9	6.31	6.07	49	7.43	7.34
10	5.83		50	7.25	
11	-----	-----	51	7.55	7.68
12	-----		52	7.81	
13	14.03	13.07	53	7.38	7.38
14	12.11		54	7.38	
15	13.98	14.29	55	6.57	6.60
16	14.60		56	6.63	
17	8.47	8.47	57	6.05	6.15
18	8.47		58	6.25	
19	7.78	7.68	59	6.75	6.99
20	7.58		60	7.23	
21	7.14	7.26	61	9.97	10.00
22	7.38		62	10.02	
23	-----	-----	63	10.17	11.30
24	-----		64	12.43	
25	6.84	7.08	65	10.41	9.88
26	7.32		66	9.35	
27	6.72	6.91	67	10.29	10.70
28	7.10		68	11.11	
29	6.65	6.75	69	7.51	7.59
30	6.85		70	7.67	
31	9.00	9.04	71	7.67	7.83
32	9.08		72	7.99	
33	6.21	6.26	73	9.43	9.39
34	6.31		74	9.35	
35	5.25	5.11	75	7.80	7.85
36	4.97		76	7.90	
37	15.02	14.48	77	7.25	7.34
38	13.94		78	7.43	
39	7.68	7.70	79	7.10	7.10
40	7.72		80	7.10	

Nº Amostra	% ácido Clorogénico	Média Repetições	Nº Amostra	% ácido Clorogénico	média Repetições
81	8.86	8.65	127	7.91	8.23
82	8.43		128	8.54	
83	9.25	9.39	129	7.24	7.12
84	9.53		130	7.00	
85	10.69	10.69	131	7.28	7.16
86	10.69		132	7.04	
87	12.11	12.96	133	12.15	12.00
88	13.81		134	11.85	
89	9.74	9.89	135	9.32	9.92
90	10.04		136	10.52	
91	9.54	9.89	137	5.97	6.05
92	10.24		138	6.12	
93	9.95	10.31	139	6.69	6.93
94	10.66		140	7.17	
95	9.94	9.64	141	7.18	7.39
96	9.34		142	7.60	
97	9.75	9.84	143	8.59	8.53
98	9.93		144	8.47	
99	7.09	7.38	145	10.36	9.72
100	7.67		146	9.08	
101	7.54	7.62	147	9.96	10.03
102	7.70		148	10.10	
103	7.78	7.55	149	6.42	6.64
104	7.32		150	6.86	
105	7.44	7.26	151	6.75	6.88
106	7.08		152	7.01	
107	9.30	9.39	153	9.99	9.18
108	9.47		154	8.45	
109	17.03	14.88	155	-----	-----
110	12.73		156	-----	
111	10.56	10.43	157	9.00	9.11
112	10.30		158	9.22	
113	9.93	10.15	159	9.83	9.67
114	10.37		160	9.51	
115	6.44	6.44	161	8.86	9.05
116	6.44		162	9.24	
117	7.43	7.22	163	8.59	8.53
118	7.00		164	8.47	
119	8.17	8.17	165	8.21	8.11
120	8.17		166	8.01	
121	9.37	9.99	167	6.88	7.02
122	10.60		168	7.16	
123	6.83	7.12			
124	7.40				
125	7.58	7.64			
126	7.70				

ANEXO 5

PORCENTAGEM DOS DIFERENTES ISÔMEROS

N ^o Amostra	% 3-ACQ	% 4-ACQ	% 5-ACQ	% 3,4-ADCQ	% 3,5-ADCQ	% Mono- isômero (3+4+5ACQ)	% Diisô- mero (3,4+3,5 ADCQ)
1	0.2269	0.4810	2.4021	0.3721	0.3537	3.1100	0.7258
2	0.2052	0.4435	2.3823	0.3801	0.3640	3.0310	0.7441
3	0.3903	0.7405	2.7309	0.3501	0.5780	3.8617	0.9281
4	0.3998	0.7318	2.6014	0.3400	0.5457	3.7330	0.8857
5	0.3260	0.5876	2.7158	0.3246	0.5439	3.6294	0.8685
6	0.2801	0.6186	2.6843	0.3142	0.5347	3.5830	0.8489
7	0.3837	0.7707	2.9480	0.3474	0.7083	4.1024	1.0557
8	0.3963	0.7649	2.9440	0.2865	0.6554	4.1052	0.9419
9	0.1549	0.2216	1.0839	0.2549	0.1364	1.4604	0.3913
10	0.2197	0.3090	1.4749	0.2988	0.1364	2.0036	0.4352
11	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
13	0.3500	0.6692	3.5540	0.6579	0.5519	4.5732	1.2098
14	0.3434	0.6629	3.5194	0.6182	0.5198	4.5257	1.1680
15	0.3555	0.6183	2.8749	0.5025	0.5840	3.8487	1.0865
16	0.4117	0.8628	3.1103	0.5030	0.6014	4.3848	1.1044
17	0.3882	0.7309	2.9624	0.6086	0.5122	4.0815	1.1208
18	0.4107	0.7349	2.9853	0.6037	0.5845	4.1309	1.1862
19	0.3279	0.5368	2.4940	0.3763	0.4806	3.3587	0.8569
20	0.3638	0.5612	2.5458	0.3720	0.4806	3.4708	0.8526

N ^o Amostra	% 3-ACQ	% 4-ACQ	% 5-ACQ	% 3,4-ADCQ	% 3, -ADCQ	% Mono- isômero (3+4+5ACQ)	% Diisô- mero (3,4+3,5 ADCQ)
21	0.3837	0.7707	2.9480	0.3474	0.7083	4.1024	1.0557
22	0.3963	0.7649	2.9440	0.2865	0.6554	4.1052	0.9419
23	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
24	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
25	0.2944	0.4010	1.8234	0.3069	0.5420	2.5188	0.8489
26	0.2432	0.3511	1.5820	0.2598	0.5420	2.1763	0.8018
27	0.4152	0.7426	2.8260	0.4888	0.8860	3.9838	1.3748
28	0.4235	0.7593	2.8761	0.5000	0.9082	4.0589	1.4082
29	0.5308	0.9409	2.6560	0.4280	1.0996	4.1277	1.5276
30	0.5273	0.9432	2.6876	0.4255	1.1076	4.1581	1.5331
31	0.3173	0.4077	1.9691	0.4447	0.4228	2.6941	0.8675
32	0.2024	0.4423	1.8288	0.4258	0.4228	2.4735	0.8486
33	0.3906	0.5356	2.2478	0.5795	0.8860	3.1740	1.4655
34	0.3836	0.5539	2.2692	0.6009	0.9107	3.2067	1.5116
35	0.3413	0.5055	2.1504	0.5390	0.7455	2.9972	1.2845
36	0.3495	0.4842	2.1477	0.5029	0.7802	2.9814	1.2831
37	0.3882	0.5892	3.1250	0.6546	0.6576	4.1024	1.3122
38	0.3734	0.5560	3.0548	0.6649	0.6353	3.9842	1.3002
39	0.3849	0.6809	2.8782	0.5460	0.5554	3.9440	1.1014
40	0.4339	0.8270	2.9885	0.5451	0.5528	4.2494	1.0979
41	0.3751	0.6778	2.8495	0.9045	0.1939	3.9024	1.0984
42	0.3711	0.6709	2.8295	0.9152	0.1939	3.8715	1.1101
43	0.5867	1.1035	3.6156	1.3973	0.3586	5.3058	1.7559

Nº Amostra	% 3-ACQ	% 4-ACQ	% 5-ACQ	% 3,4-ADCQ	% 3,5-ADCQ	% Mono- isômero (3+4+5-ACQ)	% Diisô- mero (3,4+3,5 ADCQ)
44	0.5878	1.1082	3.6156	1.4370	0.3365	5.3116	1.7735
45	0.2734	0.4635	2.3641	0.4259	0.5277	3.1010	0.9536
46	0.3061	0.5217	2.6335	0.4417	0.5622	3.4613	1.0039
47	0.3399	0.5873	2.8192	0.4954	0.7084	3.7464	1.2038
48	0.3138	0.5527	2.6374	0.4613	0.6636	3.5039	1.1249
49	0.3340	0.6089	2.6160	0.4448	0.7671	3.5589	1.2119
50	0.3243	0.6010	2.5651	0.3672	0.7799	3.4904	1.1471
51	0.4668	0.8006	3.1058	0.4278	0.9317	4.3732	1.3595
52	0.4740	0.8004	3.1058	0.4352	0.9403	4.3802	1.3755
53	0.3338	0.6347	2.4658	0.3403	0.7049	3.4343	1.0452
54	0.3094	0.5456	2.4033	0.3462	0.7022	3.2583	1.0484
55	0.3970	0.7360	2.2744	0.3195	0.7829	3.4074	1.1024
56	0.4509	0.7382	2.2268	0.3232	0.7770	3.4159	1.1002
57	0.5128	1.0109	4.5584	0.8215	1.1118	6.0821	1.9333
58	0.5214	1.0829	4.9353	0.8787	1.2330	6.5396	2.1117
59	0.2700	0.3884	1.8522	0.4037	0.4886	2.5106	0.8923
60	0.3020	0.4446	2.1019	0.3655	0.4886	2.8435	0.8541
61	0.4491	0.8344	3.7918	0.5428	0.5854	5.0753	1.1282
62	0.4423	0.8305	3.7222	0.5373	0.5639	4.9950	1.0912
63	0.4491	0.8344	3.7092	0.4988	0.6156	4.9927	1.1144
64	0.4423	0.8305	3.7032	0.5083	0.6061	4.9760	1.1144
65	0.3913	0.6150	2.9373	0.3850	0.5161	3.9436	0.9011
66	0.4337	0.6970	2.9717	0.4395	0.5909	4.1024	1.0304

N ^o Amostra	% 3-ACQ	% 4-ACQ	% 5-ACQ	% 3,4-ADCQ	% 3,5-ADCQ	% Momo- isômero (3+4+5-ACQ)	% Diisô- mero (3,4+3,5 ADCQ)
67	0.4086	0.7270	3.1322	0.4123	0.5273	4.2678	0.9396
68	0.4344	0.9142	3.2063	0.4085	0.5814	4.5549	0.9899
69	0.3517	0.6128	2.4922	0.3624	0.5103	3.4567	0.8727
70	0.6395	0.7142	2.6882	0.4021	0.5524	4.0419	0.9545
71	0.4433	0.7747	3.3596	0.9589	0.0802	4.5776	1.0391
72	0.4416	0.7891	3.3978	0.9274	0.0657	4.6285	0.9931
73	0.2978	0.5777	3.0313	0.4528	0.5957	3.9068	1.0485
74	0.3007	0.5662	2.9920	0.4485	0.6028	3.8589	1.0513
75	0.3773	0.6369	2.7692	0.3915	0.6440	3.7834	1.0355
76	0.3728	0.6347	2.7653	0.3860	0.6355	3.7728	1.0215
77	0.4198	0.7109	2.8293	0.3143	0.7072	3.9600	1.0215
78	0.4161	0.7067	2.8214	0.3228	0.7073	7.9442	1.0301
79	0.3114	0.5764	2.4118	0.3783	0.5847	3.2996	0.9630
80	0.2888	0.5730	2.3959	0.3767	0.6440	3.2577	1.0207
81	0.3559	0.6851	2.9771	0.4418	0.8214	4.0181	1.2632
82	0.3448	0.6828	2.9033	0.4730	0.6868	3.9309	1.1598
83	0.3415	0.6721	3.0078	0.4445	0.7623	4.0214	1.2068
84	0.3381	0.6838	3.0665	0.4778	0.7623	4.0884	1.2401
85	0.3984	0.7261	3.0861	0.2963	0.6191	4.2106	0.9154
86	0.3788	0.7431	3.0811	0.2633	0.6066	4.2030	0.8699
87	0.3992	0.6307	2.8926	0.3261	0.5735	3.9225	0.8996
88	0.4185	0.6559	2.9524	0.3029	0.5012	4.0268	0.8041
89	0.4444	0.8492	3.2045	0.4379	0.5023	4.4981	0.9402

Nº Amostra	% 3-ACQ	% 4-ACQ	% 5-ACQ	% 3,4-ADCQ	% 3,5-ADCQ	% Mono- isômero (3+4+5ACQ)	% Diisô- mero (3,4+3,5 ADCQ)
90	0.4526	0.8517	3.2390	0.4364	0.4961	4.5433	0.9325
91	0.2779	0.4749	2.2468	0.2212	0.4270	2.9996	0.6482
92	0.2733	0.4910	2.2180	0.2349	0.3954	2.9823	0.6303
93	0.3007	0.6239	2.9121	0.4873	0.3656	3.8367	0.8529
94	0.3434	0.6759	3.1010	0.4770	0.3633	4.1203	0.8403
95	0.3382	0.4765	2.5182	0.4854	0.1800	3.3329	0.6654
96	0.3382	0.4764	2.5182	0.4852	0.1800	3.3328	0.6652
97	0.3940	0.6781	2.9474	0.3503	0.6664	4.0200	1.0167
98	0.3813	0.6970	2.9479	0.3143	0.6474	4.0262	0.9617
99	0.3513	0.6424	2.7010	0.3748	0.7052	3.6947	1.0900
100	0.3513	0.6410	2.6893	0.3917	0.7209	3.6816	1.1126
101	0.2899	0.6120	2.8374	0.4292	0.6140	3.7393	1.0432
102	0.2851	0.5548	2.8218	0.4221	0.6485	3.6617	1.0708
103	0.3864	0.6737	2.7950	0.3422	0.7476	3.8551	1.0898
104	0.3845	0.6769	2.7674	0.3405	0.7255	3.8288	1.0660
105	0.2661	0.5651	2.3111	0.3667	0.5758	3.1423	0.9425
106	0.2207	0.5350	2.2365	0.3590	0.5808	2.9922	0.9398
107	0.2850	0.6266	2.3286	0.6908	0.1733	3.2402	0.8641
108	0.2518	0.3913	1.9712	0.5500	0.1570	2.6143	0.7070
109	0.5215	0.8931	3.8828	0.4350	0.5867	5.2974	1.0217
110	0.4947	0.9477	3.8481	0.4311	0.5969	5.2905	1.0280
111	0.4864	0.9166	2.8289	0.3017	0.5113	4.2319	0.8130
112	0.4873	0.9130	2.8213	0.3092	0.5540	4.2216	0.8632

N ^o Amostra	% 3-ACQ	% 4-ACQ	% 5-ACQ	% 3,4-ADCQ	% 3,5-ADCQ	% Monoisô- mero (3+4+5-ACQ)	% Diisô- mero (3,4+3,5- ADCQ)
113	0.3284	0.5964	2.6899	0.5472	0.2600	3.6147	0.8072
114	0.3588	0.5768	2.9794	0.5739	0.1376	3.9150	0.7115
115	0.3864	0.6330	3.0533	0.5506	0.2754	4.0727	0.8260
116	0.2695	0.5720	2.8850	0.5181	0.2591	3.7265	0.7772
117	0.1983	0.2950	1.6046	0.2956	0.0815	2.0979	0.3771
118	0.1755	0.2970	1.4661	0.3391	0.0695	1.9386	0.4086
119	0.3842	0.5490	2.4165	0.4786	0.1874	3.3497	0.6660
120	0.3944	0.5752	2.4861	0.5125	0.2048	3.4557	0.7173
121	0.3875	0.6545	2.8780	0.4359	0.7667	3.9200	1.2026
122	0.3740	0.6491	2.8131	0.4177	0.6749	3.8362	1.0926
123	0.5356	1.0099	2.9715	0.3748	0.9824	4.5170	1.3572
124	0.5289	1.0057	2.9392	0.3643	0.9464	4.4738	1.3107
125	0.3401	0.7035	2.6214	0.3754	0.7313	3.6650	1.1067
126	0.3476	0.6444	2.6607	0.4086	0.7031	3.6527	1.1117
127	0.4773	0.9553	2.6824	0.2740	0.7556	4.1150	1.0296
128	0.5175	1.0288	2.8762	0.3083	0.7910	4.4225	1.0993
129	0.2007	0.2882	1.5868	0.4687	0.1191	2.0757	0.5878
130	0.2816	0.4650	2.1787	0.6606	0.1617	2.9253	0.8223
131	0.3089	0.4419	2.1627	0.4128	0.4423	2.9135	0.8551
132	0.2865	0.6576	2.2495	0.3543	0.4423	3.1936	0.7966
133	0.3710	0.7109	2.9229	0.2777	0.4641	4.0048	0.7418
134	0.3800	0.7598	2.9805	0.2794	0.4876	4.1203	0.7670
135	0.4074	0.6858	2.8154	0.2529	0.4566	3.9086	0.7095

Nº Amostra	% 3-ACQ	% 4-ACQ	% 5-ACQ	% 3,4-ADCQ	% 3,5-ADCQ	% Monoisô- mero (3+4+5-ACQ)	% Diisô- mero (3,4-3,5 ADCQ)
136	0.4054	0.7236	2.8465	0.2548	0.4566	3.9755	0.7114
137	0.2590	0.6959	1.7709	0.3373	0.1709	2.7258	0.5082
138	0.3853	0.6959	2.6625	0.5726	0.1709	3.7437	0.7435
139	0.1664	0.2462	1.3381	0.2559	0.0714	1.7507	0.3273
140	0.1705	0.2459	1.2873	0.2543	0.0723	1.7037	0.3266
141	0.1771	0.2699	1.4704	0.2764	0.0746	1.9174	0.3510
142	0.1523	0.2380	1.2671	0.2325	0.0668	1.6574	0.2993
143	0.3263	0.4722	2.2735	0.3761	0.1038	3.0720	0.4799
144	0.3329	0.5015	2.3546	0.4017	0.1171	3.1890	0.5188
145	0.3313	0.5655	2.4434	0.2594	0.5126	3.3402	0.7720
146	0.3291	0.5510	2.4000	0.2500	0.4992	3.2801	0.7492
147	0.3998	0.6777	2.9553	0.3326	0.6278	4.0328	0.9604
148	0.3854	0.6601	3.0120	0.3364	0.6237	4.0575	0.9601
149	0.2799	0.6198	3.5913	0.4252	0.5818	4.4910	1.0070
150	0.2674	0.6074	3.5070	0.4128	0.5501	4.3818	0.9629
151	0.3913	0.7226	2.6804	0.3133	0.5615	3.7943	0.8748
152	0.3903	0.7342	2.7284	0.3036	0.5253	3.8529	0.8289
153	0.2963	0.4297	2.2261	0.5350	0.1864	2.9521	0.7214
154	0.2300	0.4157	1.8442	0.3363	0.1445	2.4899	0.4808
155	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
156	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
157	0.3903	0.6200	2.8194	0.4390	0.0951	3.8297	0.5341
158	0.3799	0.7099	2.7527	0.4383	0.0878	3.8425	0.5261

Nº Amostra	% 3-ACQ	% 4-ACQ	% 5-ACQ	% 3,4-ADCQ	% 3,5-ADCQ	% Mono- isômero (3+4+5-ACQ)	% Diisô- mero (3,4+3,5 ADCQ)
159	0.5344	0.9461	3.4115	0.2847	0.4890	4.8920	0.7737
160	0.5304	0.9789	3.4192	0.2790	0.4679	4.9285	0.7469
161	0.8787	1.3283	3.7379	0.7090	0.1750	5.9449	0.8840
162	0.6007	1.0652	3.5041	0.6851	0.1014	5.1700	0.7865
163	0.3263	0.4722	2.2735	0.3761	0.1038	3.0720	0.4799
164	0.3329	0.5015	2.3546	0.4017	0.1171	3.1890	0.5188
165	0.3179	0.5956	2.6960	0.4116	0.1320	3.6095	0.5436
166	0.2948	0.5640	2.3557	0.4009	0.1320	3.2145	0.5329
167	0.2249	0.3244	1.5776	0.3020	0.0425	2.1269	0.3445
168	0.1606	0.2312	1.1309	0.2234	0.0425	1.5227	0.2659

ANEXO 6

ANÁLISE ESTATÍSTICA DA RALAÇÃO ACQ/ADCQ MODELO COMPLETO COM OS DADOS

ESTRUTURA DO TRABALHO

MATURAÇÃO :

- 1 - Verde
- 2 - Meio verde
- 3 - Meio maduro
- 4 - Maduro
- 5 - Bem maduro
- 6 - Meio passa
- 7 - Passa.

VIAS: 1 = Seca
 2 = Úmida

DIAS: de 1 a 6 .

REPETIÇÕES: 1 e 2.

ACQ = % de ácido cafeoilquínico

ADCQ= % de ácido dicafeoilquínico.

R = Relação % de ACQ / % ADCQ .

ANEXO 6

ANÁLISE DA RELAÇÃO ACQ/ADCQ MODELO COMPLETO COM OS DADOS

N Amostra	Matu- ração	Via	Dia	Repe- tição	ACQ	ADCQ	R
1	1	1	1	1	3.1100	0.7258	4.28493
2	1	1	1	2	3.0310	0.7441	4.07338
3	1	1	2	1	3.8617	0.9281	4.16087
4	1	1	2	2	3.7330	0.8857	4.21475
5	1	1	3	1	3.6294	0.8685	4.17893
6	1	1	3	2	3.5830	0.8489	4.22076
7	1	1	4	1	4.1024	1.0557	3.88595
8	1	1	4	2	4.1052	0.9419	4.35842
9	1	1	5	1	1.4604	0.3913	3.73217
10	1	1	5	2	2.0036	0.4352	4.60386
11	1	1	6	1	-----	-----	-----
12	1	1	6	2	-----	-----	-----
13	1	2	1	1	4.5732	1.2098	3.78013
14	1	2	1	2	4.5257	1.1680	3.87474
15	1	2	2	1	3.8487	1.0865	3.54229
16	1	2	2	2	4.3848	1.1044	3.97030
17	1	2	3	1	4.0815	1.1208	3.64160
18	1	2	3	2	4.1309	1.1862	3.47660
19	1	2	4	1	3.3587	0.8569	3.91959
20	1	2	4	2	3.4708	0.8526	4.07084
21	1	2	5	1	4.1024	1.0557	3.88595

Nº Amostra	Matu- ração	Via	Dia	Repe- tição	ACQ	ADCQ	R
22	1	2	5	2	4.1052	0.9419	4.35842
23	1	2	6	1	-----	-----	-----
24	1	2	6	2	-----	-----	-----
25	2	1	1	1	2.5188	0.8489	2.96713
26	2	1	1	2	2.1763	0.8018	2.71427
27	2	1	2	1	3.9838	1.3748	2.89773
28	2	1	2	2	4.0589	1.4082	2.88233
29	2	1	3	1	4.1277	1.5276	2.70208
30	2	1	3	2	4.1581	1.5331	2.71222
31	2	1	4	1	2.6941	0.8675	3.10559
32	2	1	4	2	2.4735	0.8486	2.91480
33	2	1	5	1	3.1740	1.4655	2.16581
34	2	1	5	2	3.2067	1.5116	2.12139
35	2	1	6	1	2.9972	1.2845	2.33336
36	2	1	6	2	2.9814	1.2831	2.32359
37	2	2	1	1	4.1024	1.3122	3.12635
38	2	2	1	2	3.9842	1.3002	3.06430
39	2	2	2	1	3.9440	1.1014	3.58090
40	2	2	2	2	4.2494	1.0979	3.87048
41	2	2	3	1	3.9024	1.0984	3.55280
42	2	2	3	2	3.8715	1.1101	3.48752
43	2	2	4	1	5.3058	1.7559	3.02170
44	2	2	4	2	5.3116	1.7735	2.99498

Nº Amostra	Matu- ração	Via	Dia	Repe- tição	ACQ	ADCQ	R
45	2	2	5	1	3.1010	0.9536	3.25189
46	2	2	5	2	3.4613	1.0039	3.44785
47	2	2	6	1	3.7464	1.2038	3.11214
48	2	2	6	2	3.5039	1.1249	3.11485
49	3	1	1	1	3.5589	1.2119	2.93663
50	3	1	1	2	3.4904	1.1471	3.04280
51	3	1	2	1	4.3732	1.3595	3.21677
52	3	1	2	2	4.3802	1.3755	3.18444
53	3	1	3	1	3.4343	1.0452	3.28578
54	3	1	3	2	3.2583	1.0484	3.10788
55	3	1	4	1	3.4074	1.1024	3.09089
56	3	1	4	2	3.4159	1.1002	3.10480
57	3	1	5	1	6.0821	1.9333	3.14597
58	3	1	5	2	6.5396	2.1117	3.09684
59	3	1	6	1	2.5106	0.8923	2.81363
60	3	1	6	2	2.8485	0.8541	3.33509
61	3	2	1	1	5.0753	1.1282	4.49858
62	3	2	1	2	4.9950	1.0912	4.57753
63	3	2	2	1	4.9927	1.1144	4.48017
64	3	2	2	2	4.9760	1.1144	4.46518
65	3	2	3	1	3.9436	0.9011	4.37643
66	3	2	3	2	4.1024	1.0304	3.98137
67	3	2	4	1	4.2678	0.9396	4.54215

Nº Amostra	Matu- ração	Via	Dia	Repe- tição	ACQ	ADCQ	R
68	3	2	4	2	4.5549	0.9899	4.60137
69	3	2	5	1	3.4567	0.8727	3.96093
70	3	2	5	2	4.0419	0.9545	4.23457
71	3	2	6	1	4.5776	1.0391	4.40535
72	3	2	6	2	4.6285	0.9931	4.66066
73	4	1	1	1	3.9068	1.0485	3.72608
74	4	1	1	2	3.8589	1.0513	3.67060
75	4	1	2	1	3.7834	1.0355	3.65369
76	4	1	2	2	3.7728	1.0215	3.69339
77	4	1	3	1	3.9600	1.0215	3.87665
78	4	1	3	2	3.9442	1.0301	3.82895
79	4	1	4	1	3.2996	0.9630	3.42638
80	4	1	4	2	3.2577	1.0207	3.19163
81	4	1	5	1	4.0181	1.2632	3.18089
82	4	1	5	2	3.9309	1.1598	3.38929
83	4	1	6	1	4.0214	1.2068	3.33228
84	4	1	6	2	4.0884	1.2401	3.29683
85	4	2	1	1	2.2106	0.9154	2.41490
86	4	2	1	2	4.2030	0.8699	4.83159
87	4	2	1	1	3.9225	0.8996	4.36027
88	4	2	2	2	4.0268	0.8041	5.00783
89	4	2	3	1	4.4981	0.9402	4.78419
90	4	2	3	2	4.5433	0.9325	4.87217

Nº Amostra	Matu- ração	Via	Dia	Repe- tição	ACQ	ADCQ	R
91	4	2	4	1	2.9996	0.6482	4.62758
92	4	2	4	2	2.9823	0.6303	4.73156
93	4	2	5	1	3.8367	0.8529	4.49842
94	4	2	5	2	4.1203	0.8403	4.90337
95	4	2	6	1	3.3329	0.6654	5.00887
96	4	2	6	2	3.3328	0.6652	5.01022
97	5	1	1	1	4.0200	1.0167	3.95397
98	5	1	1	2	4.0262	0.9617	4.18654
99	5	1	2	1	3.6947	1.0800	3.42102
100	5	1	2	2	3.6816	1.1126	3.30901
101	5	1	3	1	3.7393	1.0432	3.58445
102	5	1	3	2	3.6617	1.0706	3.42023
103	5	1	4	1	3.8551	1.0898	3.53744
104	5	1	4	2	3.8288	1.0660	3.59174
105	5	1	5	1	3.1423	0.9425	3.33401
106	5	1	5	2	2.9922	0.9398	3.18387
107	5	1	6	1	3.2402	0.8641	3.74980
108	5	1	6	2	2.6143	0.7070	3.69774
109	5	2	1	1	5.2974	1.0217	5.18489
110	5	2	1	2	5.2905	1.0280	5.14640
111	5	2	2	1	4.2319	0.8130	5.20529
112	5	2	2	2	4.2216	0.8632	4.89064
113	5	2	3	1	3.6147	0.8072	4.47807

Nº Amostra	Matu- ração	Via	Dia	Repe- tição	ACQ	ADCQ	R
114	5	2	3	2	3.9150	0.7115	5.50248
115	5	2	4	1	4.0727	0.8260	4.93063
116	5	2	4	2	3.7265	0.7772	4.79478
117	5	2	5	1	2.0985	0.3771	5.56484
118	5	2	5	2	1.9386	0.4086	4.74449
119	5	2	6	1	3.3497	0.6660	5.02958
120	5	2	6	2	3.4557	0.7173	4.81765
121	6	1	1	1	3.9200	1.2026	3.25960
122	6	1	1	2	3.8362	1.0926	3.51107
123	6	1	2	1	4.5170	1.3572	3.32818
124	6	1	2	2	4.4738	1.3107	3.41329
125	6	1	3	1	3.6650	1.1067	3.31165
126	6	1	3	2	3.6527	1.1117	3.28569
127	6	1	4	1	4.1150	1.0296	3.99670
128	6	1	4	2	4.4225	1.0993	4.02301
129	6	1	5	1	2.0757	0.5878	3.53130
130	6	1	5	2	2.9253	0.8223	3.55746
131	6	1	6	1	2.9135	0.8551	3.40720
132	6	1	6	2	3.1936	0.7966	4.00904
133	6	2	1	1	4.0048	0.7418	5.39876
134	6	2	1	2	4.1203	0.7670	5.37197
135	6	2	2	1	3.9086	0.7095	5.50895
136	6	2	2	2	3.9755	0.7114	5.58828

Nº Amostra	Matu- ração	Via	Dia	Repe- tição	ACQ	ADCQ	R
137	6	2	3	1	2.7258	0.5082	5.36364
138	6	2	3	2	3.7437	0.7435	5.03524
139	6	2	4	1	1.7507	0.3273	5.34892
140	6	2	4	2	1.7037	0.3266	5.21647
141	6	2	5	1	1.9147	0.3510	5.46268
142	6	2	5	2	1.6574	0.2993	5.53759
143	6	2	6	1	3.0720	0.4799	6.40133
144	6	2	6	2	3.1890	0.5188	6.14688
145	7	1	1	1	3.3402	0.7720	4.32668
146	7	1	1	2	3.2801	0.7492	4.37814
147	7	1	2	1	4.0328	0.9604	4.19908
148	7	1	2	2	4.0575	0.9601	4.22612
149	7	1	3	1	4.4910	1.0070	4.45978
150	7	1	3	2	4.3818	0.9629	4.55063
151	7	1	4	1	3.7943	0.8748	4.33733
152	7	1	4	2	3.8529	0.8289	4.64821
153	7	1	5	1	2.9521	0.7214	4.09218
154	7	1	5	2	2.4899	0.4808	5.17866
155	7	1	6	1	-----	-----	-----
156	7	1	6	2	-----	-----	-----
157	7	2	1	1	3.8297	0.5341	7.17038
158	7	2	1	2	3.8425	0.5261	7.30374
159	7	2	2	1	4.8920	0.7737	6.32286

Nº Amostra	Matu- ração	Via	Dia	Repe- tição	ACQ	ADCQ	R
160	7	2	2	2	4.9285	0.7469	6.59861
161	7	2	3	1	5.9449	0.8840	6.72500
162	7	2	3	2	5.1700	0.7865	6.57343
163	7	2	4	1	3.0720	0.4799	6.40133
164	7	2	4	2	3.1890	0.5188	6.14688
165	7	2	5	1	3.6095	0.5436	6.63999
166	7	2	5	2	3.2145	0.5329	6.03209
167	7	2	6	1	2.1269	0.3445	6.17388
168	7	2	6	2	1.5227	0.2659	5.72659

ANEXO 7

VARIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE MONOISÔMERO POR GRUPO DE MATURAÇÃO (VALORES MÉDIOS DAS REPETIÇÕES) VIA SECA.

Maturação	Dia da Colheita	% 3-ACQ	% 4-ACQ	% 5-ACQ	% Monoisômero (soma)
Verde	1	0.2161	0.4623	2.3922	3.0706
	2	0.3951	0.7362	2.6662	3.7975
	3	0.3031	0.6031	2.7001	3.6063
	4	0.3900	0.7678	2.9460	4.1038
	5	0.1873	0.2653	1.2794	1.7320
	6	-----	-----	-----	-----
Meio verde	1	0.2688	0.3761	1.7027	2.3476
	2	0.4194	0.7510	2.8511	4.0215
	3	0.5291	0.9421	2.6718	4.1430
	4	0.5197	0.4250	1.8990	2.8437
	5	0.3871	0.5448	2.2585	3.1904
	6	0.3454	0.4949	2.1491	2.9894
Meio maduro	1	0.3282	0.6050	2.5906	3.5248
	2	0.4704	0.8005	3.1058	4.3767
	3	0.3216	0.5902	2.4346	3.3464
	4	0.4240	0.7371	2.2506	3.4117
	5	0.5171	1.0469	4.7469	6.3109
	6	0.2860	0.4165	1.9771	2.6796
Maduro	1	0.2993	0.5720	3.0117	3.8830
	2	0.3751	0.6358	2.7673	3.7782
	3	0.4180	0.7088	2.8254	3.9522

Maturação	Dia de Colheita	% 3-ACQ	% 4-ACQ	% 5-ACQ	% Monoisômero (soma)
Maduro	4	0.3001	0.5747	2.4039	3.2787
	5	0.3504	0.6840	2.9402	3.9746
	6	0.3398	0.6780	3.0372	4.0550
Bem maduro	1	0.3877	0.6876	2.9479	4.0232
	2	0.3513	0.6417	2.6952	3.6882
	3	0.2875	0.5834	2.8296	3.7005
	4	0.3855	0.6753	2.7812	3.8420
	5	0.2434	0.5501	2.2738	3.0673
	6	0.2684	0.5090	2.1499	2.9273
Meio passa	1	0.3808	0.6518	2.8456	3.8782
	2	0.5323	1.0078	2.9554	4.4955
	3	0.3439	0.6740	2.6411	3.6590
	4	0.4974	0.9921	3.7793	4.2688
	5	0.2412	0.3766	1.8828	2.5006
	6	0.2977	0.5498	2.2061	3.0536
Passa	1	0.3302	0.5583	2.4217	3.3102
	2	0.3926	0.6689	2.9837	4.0453
	3	0.2737	0.6136	3.5492	4.4365
	4	0.3908	0.7284	2.7044	3.8236
	5	0.2632	0.4227	2.0352	2.7211
	6	-----	-----	-----	-----

ANEXO 8

VARIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE MONOISÔMERO POR GRUPO DE MATURAÇÃO (VALORES MÉDIOS DAS REPETIÇÕES) VIA ÚMIDA

Maturação	Dia de Colheita	% de 3-ACQ	% 4-ACQ	% 5-ACQ	% Monoisômero
Verde	1	0.3467	0.6661	3.5367	4.5495
	2	0.3836	0.7406	2.9926	4.1168
	3	0.3995	0.7329	2.9739	4.1063
	4	0.3459	0.5490	2.5199	3.4148
	5	0.3900	0.7678	2.9460	4.1038
	6	-----	-----	-----	-----
Meio verde	1	0.3808	0.5726	3.0899	4.0433
	2	0.4094	0.7540	2.9334	4.0968
	3	0.3731	0.6744	2.8395	3.8870
	4	0.5873	1.1059	3.6156	5.3088
	5	0.2898	0.4926	2.3641	3.1465
	6	0.3269	0.5700	2.7283	3.6252
Meio maduro	1	0.4457	0.8325	3.7570	5.0352
	2	0.4457	0.8325	3.7062	4.9844
	3	0.4125	0.6560	2.9545	4.0230
	4	0.4215	0.8206	3.1693	4.4114
	5	0.4956	0.6635	2.5902	3.7493
	6	0.4425	0.7819	3.3787	4.6031
Maduro	1	0.3886	0.7346	3.0836	4.2068
	2	0.4089	0.6433	2.9225	3.9747

Maturação	Dia da Colheita	% 3-ACQ	% 4-ACQ	% 5-ACQ	% Monoisômero (soma)
Maduro	3	0.4485	0.8505	3.2218	4.5208
	4	0.2756	0.4830	2.2324	2.9910
	5	0.3221	0.6499	3.0066	3.9786
	6	0.3382	0.4765	2.5182	3.3329
Bem maduro	1	0.5081	0.9204	3.8655	5.2940
	2	0.4869	0.9148	2.8251	4.2268
	3	0.3436	0.5866	2.8347	3.7649
	4	0.3280	0.6025	2.9692	3.8997
	5	0.1869	0.2960	1.5354	2.0183
	6	0.3893	0.5621	2.4513	3.4027
Meio passa	1	0.3755	0.7354	2.9517	4.0626
	2	0.4064	0.7047	2.8310	3.9421
	3	0.3222	0.6959	2.2167	3.2348
	4	0.1685	0.2461	1.3127	1.7273
	5	0.1647	0.2540	1.3688	1.7875
	6	0.3296	0.4869	2.3141	3.1306
Passa	1	0.3851	0.6650	2.7861	3.8362
	2	0.5324	0.9625	3.4154	4.9103
	3	0.7397	1.1968	3.6210	5.5575
	4	0.3296	0.4869	2.3141	3.1306
	5	0.3064	0.5798	2.5259	3.4121
	6	0.1928	0.2778	1.3543	1.8249

ANEXO 9

VARIACÃO DA PORCENTAGEM DE DIISÔMERO POR GRUPO DE MATURAÇÃO (VALORES MÉDIOS DAS REPETIÇÕES) VIA SECA

Maturação	Dia de Colheita	% 3,4-ADCQ	% 3,5-ADCQ	% Diisômero = (soma)
Verde	1	0.3761	0.3589	0.7350
	2	0.3451	0.5619	0.9070
	3	0.3194	0.5393	0.8587
	4	0.3170	0.6819	0.9989
	5	0.2769	0.1364	0.4133
	6	-----	-----	-----
Meio verde	1	0.2834	0.5420	0.8254
	2	0.4944	0.8971	1.3915
	3	0.4268	1.1036	1.5304
	4	0.4353	0.4228	0.8581
	5	0.5902	0.8984	1.4886
	6	0.5210	0.7629	1.2839
Meio maduro	1	0.4060	0.7735	1.1795
	2	0.4315	0.9360	1.3675
	3	0.3433	0.7036	1.0469
	4	0.3214	0.7800	1.1014
	5	0.8501	1.1724	2.0225
	6	0.3846	0.4886	0.8732
Maduro	1	0.4507	0.5993	1.0500
	2	0.3888	0.6398	1.0286

Maturação	Dia de Colheita	% 3,4-ADCQ	% 3,5- ADCQ	% Diisômero
Maduro	3	0.3186	0.7073	1.0259
	4	0.3775	0.6144	0.9919
	5	0.4574	0.7541	1.2115
	6	0.4612	0.7623	1.2235
Bem maduro	1	0.3323	0.6569	0.9892
	2	0.3833	0.7131	1.0964
	3	0.4257	0.6313	1.0570
	4	0.3414	0.7366	1.0780
	5	0.3629	0.5783	0.9412
	6	0.6204	0.1652	0.7856
Meio passa	1	0.4268	0.7208	1.1476
	2	0.3696	0.9644	1.3340
	3	0.3920	0.7172	1.1092
	4	0.2912	0.7733	1.0645
	5	0.5647	0.1404	0.7051
	6	0.3836	0.4423	0.8259
Passa	1	0.2547	0.5059	0.7606
	2	0.3345	0.6258	0.9603
	3	0.4190	0.5660	0.9850
	4	0.3085	0.5434	0.8519
	5	0.4357	0.1655	0.6012
	6	-----	-----	-----

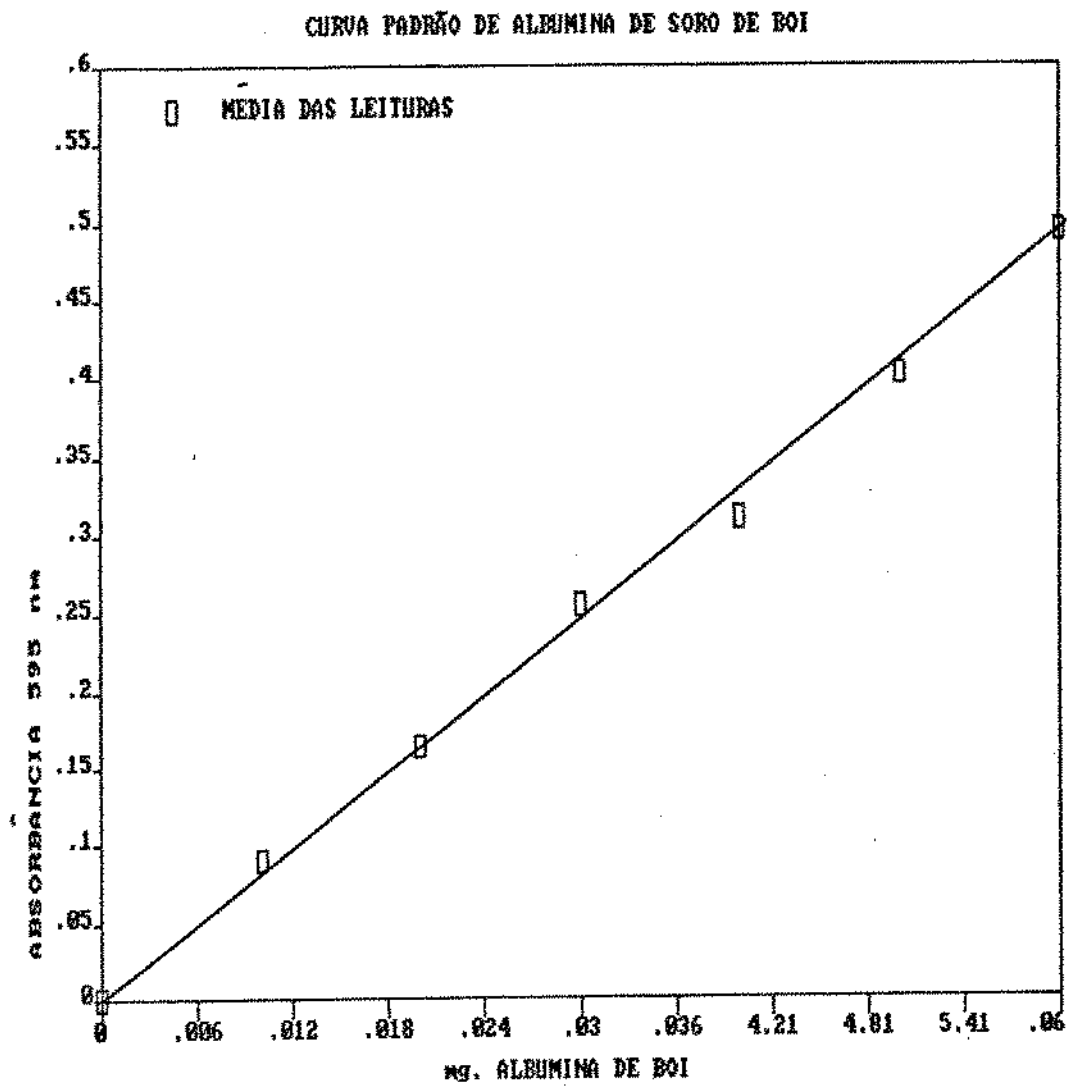
ANEXO 10

VARIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE DIISÔMERO POR GRUPO DE MATURAÇÃO
(VALORES MÉDIOS DAS REPETIÇÕES) VIA ÚMIDA.

Maturação	dia da Colheita	% 3,4-ADCQ	% 3,5-ADCQ	% Diisômero (soma)
Verde	1	0.6531	0.5359	1.1890
	2	0.5028	0.5927	1.0955
	3	0.6062	0.5484	1.1546
	4	0.3742	0.4806	0.8548
	5	0.3170	0.6819	0.9989
	6	-----	-----	-----
Meio verde	1	0.6598	0.6465	1.3063
	2	0.5456	0.5541	1.0997
	3	0.9104	0.1939	1.1043
	4	1.4172	0.3476	1.7648
	5	0.4338	0.5450	0.9788
	6	0.4784	0.6860	1.1644
Meio maduro	1	0.5401	0.5697	1.1098
	2	0.5036	0.6109	1.1145
	3	0.4123	0.5535	0.9658
	4	0.4104	0.5544	0.9648
	5	0.3823	0.5314	0.9137
	6	0.9432	0.0730	1.0162
Maduro	1	0.2798	0.6129	0.8927
	2	0.3145	0.5374	0.8519
	3	0.4372	0.4992	0.9364

Maturação	Dia de Colheita	% 3,4-ADCQ	% 3,5-ADCQ	% Diisômero (soma)
Maduro	4	0.2281	0.4112	0.6393
	5	0.4822	0.3645	0.8467
	6	0.4853	0.1800	0.6653
Bem maduro	1	0.4331	0.5918	1.0249
	2	0.3055	0.5327	0.8382
	3	0.5606	0.1988	0.7594
	4	0.5344	0.2673	0.8017
	5	0.3174	0.0755	0.3929
	6	0.4956	0.1961	0.6917
Meio passa	1	0.2786	0.4759	0.7545
	2	0.2539	0.4566	0.7105
	3	0.3718	0.1709	0.5427
	4	0.2551	0.0719	0.3270
	5	0.2545	0.0707	0.3252
	6	0.3889	0.1105	0.4994
Passa	1	0.4387	0.0915	0.5302
	2	0.2819	0.4785	0.7604
	3	0.6971	0.1382	0.8353
	4	0.3889	0.1105	0.4994
	5	0.4063	0.1320	0.5383
	6	0.2627	0.0425	0.3052

ANEXO 11



N° Amostra	mg proteína/g café	N° Amostra	mg proteína/g café
141	14.166	154	14.923
142	16.747	165	16.763
143	5.169	166	15.008
144	5.157	167	12.323
153	14.928	168	10.671

ANEXO 12

TEOR DE PROTEÍNA NOS EXTRATOS ENZÍMICOS
(BASE PESO SECO)

N° Amostra	mg proteína/g café	N° Amostra	mg proteína/g café
9	21.483	81	16.142
10	21.467	82	16.144
21	17.204	83	15.167
22	18.181	84	15.251
33	15.095	93	23.705
34	15.138	94	22.871
35	16.636	95	5.186
36	16.672	96	5.952
45	25.242	105	14.486
46	24.347	106	14.341
47	23.392	107	10.720
48	22.392	108	9.908
57	11.958	117	23.367
58	11.886	118	19.438
59	17.632	119	8.291
60	17.630	120	9.111
69	20.356	129	12.296
70	20.281	130	10.691
71	10.638	131	11.452
72	11.546	132	12.214

ANEXO 13

ATIVIDADE DE POLIFENOLOXIDASE NOS EXTRATOS ENZÍMICOS (BASE PESO SECO)

Nº Amostra	Unidades PPO/g de café	Atividade específica	Nº Amostra	Unidades PPO/g de café	Atividade específica
9	328.41	15.287	81	551.88	34.189
10	328.16	15.287	82	551.94	34.189
21	111.89	6.504	83	220.60	14.545
22	111.88	6.154	84	221.83	14.545
33	548.91	36.364	93	551.27	23.255
34	550.48	36.364	94	554.45	24.242
35	541.01	32.520	95	545.85	105.255
36	542.18	32.520	96	541.13	90.916
45	542.83	21.505	105	334.30	23.077
46	544.07	22.346	106	330.94	23.076
47	544.01	23.256	107	542.77	50.632
48	542.83	24.242	108	542.89	54.793
57	1125.49	94.120	117	543.42	23.256
58	1118.69	94.118	118	543.71	27.971
59	868.06	49.232	119	1087.31	131.143
60	867.96	49.232	120	1087.90	119.405
69	542.83	26.667	129	1080.96	87.912
70	540.83	26.667	130	1082.60	101.263
71	1077.24	101.263	131	215.56	18.823
72	1086.72	94.121	132	214.75	17.582

Nº Amostra	Unidades PPO/g de café	Atividade Específica	Nº Amostra	Unidades PPO/g de café	Atividade Específica
141	326.90	23.076	154	325.59	21.818
142	326.76	19.512	165	1090.27	65.040
143	544.07	105.256	166	1091.46	72.725
144	542.83	105.261	167	541.65	43.954
153	325.70	21.818	168	540.31	50.633