

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE FARMÁCIA**

ÁZULA NARAYAMA MALACCO FERREIRA

**CAPACIDADE REDUTORA DE BEBIDAS
DE CAFÉ PREPARADAS COM AMOSTRAS
COMERCIALIZADAS EM BELO
HORIZONTE-MG**

Belo Horizonte, MG
2013

ÁZULA NARAYAMA MALACCO FERREIRA

**CAPACIDADE REDUTORA DE BEBIDAS DE CAFÉ PREPARADAS COM
AMOSTRAS COMERCIALIZADAS EM BELO HORIZONTE-MG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

Orientador: Renata Adriana Labanca

Co-Orientador: Scheilla Vitorino Carvalho de Souza

Belo Horizonte, MG
2013

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Dissertação intitulada “*Capacidade redutora de bebidas de café preparadas com amostras comercializadas em Belo Horizonte-MG*”

de autoria da mestranda Ázula Narayama Malacco Ferreira, aprovada pela banca examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dra. Renata Adriana Labanca – FAFAR/UFMG -
Orientador

Prof. Dra. Scheilla Vitorino Carvalho de Souza – FAFAR/UFMG

Prof. Dra. Tânia Maria Leite da Silveira – UNI-BH

Prof. Dra. Adriana Silva França

Belo Horizonte,

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar a Deus, por me guiar sempre, desamparar jamais e iluminar cada passo. A decisão em percorrer este caminho foi minha, mas a luz veio do alto e me trouxe até aqui.

Em segundo lugar, devo mais esta vitória aos meus queridos pais, sempre por perto, apoiando e vibrando em cada conquista. Se cheguei até aqui é porque eles me suportaram e me direcionaram da mais bela forma, guiados pelo amor e compreensão eternos.

Em meio a esta empreitada Deus me presenteou com um lindo e belo amor, que me apoiou em cada batalha, em cada noite às claras e em cada dificuldade encontrada ao longo desta jornada. Obrigada, meu amado esposo, pelo apoio e carinho de sempre!

A todos os amigos não acadêmicos, que compreenderam esta fase que me distanciou das raízes. Mantive todos vocês em meu coração e vibro pela liberdade de curti-los novamente. Ufa!

Aos amigos da academia, que me auxiliaram ao longo da empreitada, regando-a de conselhos, longas horas de estudo (não é, Mariana Mirelle?), sorrisos, gargalhadas, discussões engrandecedoras e de longas e saudáveis coletas (Nádia Reis, Mariana Mirelle, Adalberto e Nátalie que o digam).

A todos os colegas da Bromatologia, que me acolheram com carinho e prontidão.

A todos os professores e técnicos administrativos do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, destacando o auxílio e paciência da Úrsula e Marilene.

À Dra. Scheilla Vitorino, que esteve presente em momentos cruciais e me auxiliou nos momentos mais delicados e decisivos. Sua dedicação me trouxe grandes ensinamentos e me fez continuar firme, mesmo em momentos em que o desânimo me acometia.

Ao Dr. Leandro Oliveira, amante e grande pesquisador do café e de seus produtos. Suas palavras me fizeram admirar ainda mais as pesquisas desta bebida tão curiosa e suas aulas e ensinamentos me responderam diversas questões até então obscuras.

Por último, mas não menos importante, agradeço à minha orientadora, Renata Labanca, por acreditar em minha capacidade e confiar no árduo trabalho ao longo destes dois anos.

RESUMO

Uma das bebidas mais consumidas mundialmente e presente à mesa dos brasileiros, o café é conhecido por seus benefícios à saúde, no que se refere, principalmente, ao seu conteúdo de compostos antioxidantes. Devido à falta de padronização de métodos analíticos para avaliar estes compostos em café, a denominação de produtos comercializados, assim como a influência da forma de preparo da bebida no teor de antioxidantes, objetivou-se avaliar a capacidade redutora de bebidas preparadas a partir de amostras de café torrado e moído comercializadas em Belo Horizonte – MG, bem como a influência da forma de preparo, empregando o método espectrofotométrico Folin Ciocalteu. A partir do método otimizado e validado, avaliou-se a capacidade redutora das bebidas de cafés comerciais, assim como a influência de diferentes formas de preparo, incluindo técnicas de infusão e decocção. As análises colorimétricas foram realizadas e avaliou-se a correlação existente entre parâmetros de cor e a capacidade redutora das amostras. Por fim, análises no infravermelho foram procedidas com o intuito de se encontrar correlação entre os resultados de capacidade redutora e os espectros médios obtidos. As amostras de bebida de café apresentaram diferentes valores de capacidade redutora. A partir da análise colorimétrica, pôde-se observar ausência de correlação dos parâmetros colorimétricos e da capacidade redutora das amostras comerciais. Em contraposição, ao analisar amostras de café 100% arábica torradas em condições específicas, encontrou-se correlação entre os valores colorimétricos, grau de torra e capacidade redutora. Pode-se concluir, neste contexto, a respeito da falta de padronização dos processos de torração dos cafés comerciais, assim como a influência da composição dos *blends* na resposta ao processo de torração, resultando na ausência de correlação dos parâmetros colorimétricos e de capacidade redutora. Considerando as amostras de café 100% arábica torradas em laboratório, a elevação do grau de torra foi acompanhada pelo aumento da capacidade redutora dos cafés, provavelmente devido à maior formação de compostos redutores ao longo do processo de torração. Tal tendência não foi encontrada para os cafés comerciais. Por fim, a partir das análises no infravermelho, encontrou-se correlação qualitativa entre os valores de capacidade redutora e os espectros médios normalizados e nos cortes 2300 e 1800 cm^{-1} e 1800 e 1640 cm^{-1} obtidos para as amostras de café 100% arábica torradas sob condições específicas. A grande variabilidade de resultados de capacidade redutora e colorimetria obtidos para os cafés comerciais pode ser explicada pela variedade de espécies utilizadas na produção dos *blends*, assim como pelas diferentes técnicas de torração de cada denominação. Além disso, a técnica de preparo da bebida influencia a capacidade redutora final, necessitando mais estudos de diferentes técnicas de preparo, maior conhecimento do hábito e preferência dos consumidores, assim como instiga o desenvolvimento de pesquisas sensoriais e de aceitação de bebidas preparadas de diferentes formas.

Palavras-chave: café, Folin-Ciocalteu, capacidade redutora

ABSTRACT

Coffee is one of the most consumed beverages worldwide and commonly present on Brazilian tables. It is known for its benefits for health, mainly because of its antioxidant compounds. Because of a lack of standardized analytical methods to evaluate these compounds in coffee, the variety of products sold, as well as the influence of the form of preparation of the beverage upon the content of the antioxidants, this work is intended to evaluate the reducing capacity of beverages prepared with samples of roasted and ground coffee sold in Belo Horizonte – MG, as well as the influence of the preparation, employing the Folin Ciocalteu spectrophotometric method. After the optimization and validation of the method, the reducing capacity in commercial coffee beverages was evaluated as well as the influence of different ways of preparation, including infusion and decoction. The colorimetric analyses were made and the correlation between color parameters and reducing capacity in the samples was evaluated. Then, infrared analyses were done with the aim of finding the correlation between the reducing capacity results and the medium spectra obtained. The coffee samples presented different values in the reducing capacity. From the colorimetric analysis, the absence of colorimetric parameters correlation and the reducing capacity in commercial samples is seen. In contrast, when analyzing samples of 100% Arabica coffee roasted in specific conditions, a correlation was found among the colorimetric values, degree of roasting and reducing capacity. In this context, it can be concluded that the lack of standardization in the roasting processes of commercial coffee, as well as the influence of the composition of the *blends* in response to the roasting process, result in the absence of correlation between the colorimetric parameter and reducing capacity. Considering the 100% Arabica coffee samples roasted in the laboratory, the increase of the roasting degree was followed by an increase in the reducing capacity of the coffee probably because of a major formation of the reducing compounds during the roasting process. This trend was not found in commercial coffee. Finally, in the infrared analyses a qualitative correlation was found between the reducing capacity values and the normalized medium spectra and in bands between 2300 and 1800 cm^{-1} and 1800 and 1640 cm^{-1} obtained from the 100% Arabica coffee samples roasted under specific conditions. The great variability of the results in the reducing capacity and colorimetry obtained in the commercial coffee can be explained by the variety of coffee used in the *blends* production, the same was with the different roasting techniques of each variety. Besides, the preparation technique influences the final reducing capacity necessitating more studies of different preparation techniques, and more knowledge about consumer habits and preferences.

Key-words: coffee, Folin-Ciocalteu, reducing capacity

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1 O café.....	13
3.2 Comercialização do café.....	14
3.3 Composição do café.....	16
3.4 Compostos fenólicos.....	17
3.5 Compostos fenólicos em café	18
3.6 Análise de compostos fenólicos.....	22
3.7 Procedimentos de extração de compostos fenólicos do café.....	22
3.8 Técnicas de quantificação de compostos fenólicos do café.....	23
3.9 Validação	31
3.10. Análise colorimétrica.....	34
3.11. Espectroscopia no infravermelho.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Delineamento experimental	39
4.2 Materiais e reagentes	42
4.3 Amostras	44
4.4 Otimização.....	46
4.5 Procedimento analítico.....	47
4.6 Validação do método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu	48
4.7 Determinação da capacidade redutora das bebidas preparadas a partir de amostras de café torrado e moído comercializadas em Belo Horizonte – MG.....	52

4.8 Avaliação da influência do preparo da bebida, por infusão e decocção, na capacidade redutora	53
4.9 Análise Colorimétrica	53
4.10 Sondagem da região do espectro obtido pela análise no infravermelho médio..	54
5 Resultados e Discussão.....	55
5.1 Otimização	55
5.2 Validação	58
5.3 Determinação da capacidade redutora das bebidas preparadas a partir de amostras de café torrado e moído comercializadas em Belo Horizonte – MG.....	66
5.4 Avaliação da capacidade redutora da bebida de café preparada de diferentes formas	73
5.5 Análise Colorimétrica	76
5.6 Sondagem da região do espectro obtido pela análise no infravermelho correlacionada com os resultados espectrofotométricos.....	82
6 Conclusões.....	87
7 Perspectivas	89
8 Referências Bibliográficas.....	90
8 Apêndices	100

1 INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, sendo um valioso produto no mercado internacional. Devido a esta importância mundial, o café tem sido objeto de várias investigações científicas com o intuito de atribuir propriedades, benéficas ou não, à saúde humana (YANAGIMOTO *et al.*, 2004).

O consumo interno brasileiro de café cresce ano a ano. Entre as razões que justificam o aumento deste consumo, destacam-se a melhora da qualidade da produção brasileira e a percepção do público com relação aos benefícios do café para a saúde humana (ABIC, 2013), com destaque para compostos com atividades funcionais antioxidantes (FARAH & DONANGELO, 2006).

Diversos compostos presentes no café têm sido estudados pelo seu potencial antioxidante, podendo-se citar as melanoidinas, formadas no processo de torrefação; a cafeína e os compostos fenólicos (BORRELLI *et al.*, 2002; LIMA, PEREIRA & ABRAHÃO, 2010). Devido à presença destas substâncias e seus efeitos positivos na saúde humana, o café vem se revelando com propriedades funcionais (ENCARNAÇÃO & LIMA, 2003; ABREU, 2009).

As substâncias fenólicas constituem-se nos compostos ativos mais comumente encontrados em frutas e hortaliças, sendo conhecidas como potentes antioxidantes e antagonistas naturais de patógenos. Encontram-se nos vegetais na forma livre ou ligada a açúcares e proteínas, formando ésteres ou, mais frequentemente, heterosídeos (SHAHIDI & NACZK, 1995).

Os compostos fenólicos podem inibir os processos da oxidação em sistemas biológicos, devido à estrutura química e às propriedades redutoras destes compostos, o que leva à neutralização de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (SHAHIDI & NACZK, 1995; ABRAHAO *et al.*, 2010; DAMODARAN & PARKIN, 2010).

O café é uma fonte importante de antioxidantes e pode contribuir marcadamente na ingestão de compostos fenólicos. Outros alimentos também fornecem compostos fenólicos, como o chocolate e chás, entretanto, o café apresenta uma maior concentração de alguns destes em comparação a outras fontes, ressaltando-se o

conteúdo de ácidos clorogênicos, ácido caféico e ácido cumárico (MANACH *et al.*, 2004; ITO *et al.*, 2005; CROZIER, JAGANATH & CLIFFORD, 2009).

Diferentes técnicas de preparação influenciam, significativamente, a composição, sabor e aroma da bebida preparada, devido às diferenças na proporção de água e café, temperatura e tempo de filtração do pó de café, dentre outras variáveis. A composição final da bebida, incluindo o conteúdo de compostos funcionais, é diretamente influenciada por cada um desses fatores (NISETEO *et al.*, 2012).

Ressalta-se, no entanto, a falta de padronização, na literatura, dos métodos de determinação destes compostos em café, com a utilização de diferentes reagentes, padrões, solventes e variáveis como tempo e temperatura na etapa de extração por parte de diversos autores. Portanto, há necessidade de uma investigação sistemática nos processos de extração e quantificação de compostos fenólicos (CLARKE & MACRAE, 1985; ANGELO & JORGE, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade redutora de bebidas preparadas a partir de amostras de café torrado e moído comercializadas em Belo Horizonte – MG, bem como a influência da forma de preparo, empregando o método espectrofotométrico Folin Ciocalteu.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições de extração e de quantificação espectrofotométrica de compostos redutores na bebida de café.
- Validar o método espectrofotométrico, adotando as condições otimizadas para quantificação de compostos redutores na bebida de café.
- Determinar a capacidade redutora de bebidas preparadas a partir de amostras de café torrado e moído comercializadas em Belo Horizonte – MG.
- Avaliar a influência do preparo da bebida, por infusão e decocção, na capacidade redutora.
- Caracterizar as amostras comerciais de café torrado e moído em relação a parâmetros de cor, por análise colorimétrica.
- Avaliar a correlação existente entre a capacidade redutora de bebidas e a análise colorimétrica de suas respectivas amostras de café torrado e moído.
- Identificar correlação entre os valores obtidos pelo método espectrofotométrico e os espectros gerados pela análise no infravermelho em amostras de café.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O café

O café foi descoberto nas montanhas da província de Kefta, atual Etiópia, no século VI e levado para a Arábia, conseqüentemente, à Europa, por volta de 1500. No período entre 1740 e 1805, o café alcançou um pico de produção na América Central e do Sul. Mudanças de café chegaram ao Brasil em 1727. Atualmente, o café tornou-se uma das bebidas mais populares do mundo, sendo as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (robusta) as de maior importância comercial (CLARKE & MACRAE, 1985; YANAGIMOTO *et al.* 2004).

Bebidas providas do pó de café são apreciadas ao redor do mundo pelo seu sabor e aroma agradáveis e também devido à suas propriedades fisiológicas e psicoativas, atribuídas a diversos compostos, como a cafeína, pertencente ao grupo das metilxantinas (QUINLAN, LANE & ASPINALL, 1997). Diferentes formas de preparo, incluindo técnicas de extração e filtração, proporcionam formação de compostos voláteis distintos, caracterizando uma grande variedade de bebidas à base de café (DORÉA & COSTA, 2005).

A infusão do café geralmente é consumida como parte de refeições e lanches. Em países ocidentais, deve obrigatoriamente fazer parte do café da manhã, como forma de melhorar a disposição para as atividades diárias (DORÉA & COSTA, 2005). Alguns estudos já comprovaram o efeito estimulante do café na melhoria do humor, na capacidade cognitiva no desenvolvimento de sessões de teste no período da manhã, melhor desempenho no trabalho e melhora do estado de alerta após a refeição matinal contendo a bebida (SMITH, CLARK & GALLAGHER, 1999; REYNER & HOME, 2000).

Além dos efeitos estimulantes do café, devidos à cafeína, ressalta-se sua riqueza em compostos antioxidantes, incluindo as substâncias fenólicas. Estes componentes proporcionam ao café um caráter de funcionalidade, visto que são relacionados às melhorias nas condições de saúde e prevenção de doenças. Frente a isto, o café é considerado um alimento com propriedades funcionais para alguns pesquisadores (ENCARNAÇÃO & LIMA, 2003; DORÉA & COSTA 2005), enquanto outros estudos

contradizem esta característica funcional por mostrarem efeitos negativos relacionados ao consumo da bebida, citando-se a insônia e problemas cardíacos (JAMES, 2004; ZAMPELAS *et al.*, 2004). Entretanto, estudos que apresentam a segunda abordagem associaram estes efeitos a um consumo relativamente excessivo da bebida, sendo um mínimo de seis xícaras diárias (JAMES, 2004; ZAMPELAS *et al.*, 2004).

Vale ressaltar que os tipos de extração e preparo da bebida também influenciam a composição final da mesma, variando-se os efeitos em relação à saúde cardiovascular. A fração lipídica dos grãos do café está relacionada ao desenvolvimento da hipercolesterolemia (VAN DUSSELDORP *et al.*, 1991; WEUSTEN-VAN DER WOUW *et al.*, 1994; NYSTAD *et al.*, 2010). WEUSTEN-VAN DER WOUW *et al.* (1994) destacaram o efeito do diterpeno cafestol no desenvolvimento da hipercolesterolemia a partir do consumo da bebida de café. Entretanto, a retenção de grande parte da fração lipídica ocorre no processo de filtração por meio de filtro de papel antes do consumo. VAN DUSSELDORP *et al.* (1991) evidenciaram um conteúdo de lipídeos de $1,00 \pm 0,15$ g/L no café fervido comparado a $0,02 \pm 0,01$ g/L no café fervido e filtrado. Portanto, deve-se considerar a forma de preparo da bebida nos estudos relacionados, podendo assim fazer uma comparação das substâncias presentes.

Segundo DORÉA & COSTA (2005), considerando o uso do café em ambientes sociais, seu papel facilitador no aprendizado e melhoria do desempenho profissional, em adição a gama de estudos epidemiológicos e experimentais evidenciando-se os efeitos positivos à saúde em consequência do consumo regular da bebida; é possível contextualizar o café como um alimento com propriedades funcionais.

3.2 Comercialização do café

No Brasil, o café constitui um importante produto de exportação, sendo o país o maior produtor mundial, com projeção de produção para a safra 2012/2013 de 55 milhões de sacas de café. Em seguida, posiciona-se o Vietnã, com 25 milhões de sacas, a Indonésia com 9,7 milhões e Colômbia com 7,5 milhões (USDA, 2013).

No Brasil, quatro estados são destacados como produtores: Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Paraná. A região Nordeste possui plantações na Bahia e na

região Norte destaca-se Rondônia. A espécie robusta é encontrada principalmente no Espírito Santo e Rondônia (ABIC, 2013b).

A região brasileira que mais produz café atualmente é o sul de Minas Gerais, contribuindo com cerca de 30% da produção brasileira, que é de aproximadamente 38 milhões de sacas, predominantemente a espécie arábica (ABIC, 2013b).

O consumo interno brasileiro vem crescendo a cada ano. No período compreendido entre Novembro/2011 e Outubro/2012, a ABIC registrou o consumo de 20,33 milhões de sacas, isto representando um acréscimo de 3,09% em relação ao período anterior correspondente (ABIC, 2013a).

Já o consumo per capita foi de 6,23 kg de café em grão cru ou 4,98 kg de café torrado, quase 83 litros para cada brasileiro por ano, registrando uma evolução de 2,1% em relação ao período anterior. Os brasileiros estão consumindo mais xícaras de café por dia e diversificando as formas da bebida durante o dia, adicionando ao café filtrado consumido nos lares, também os cafés expressos, cappuccinos e outras combinações com leite (ABIC, 2013a).

A grande oferta do produto brasileiro no mercado nacional e internacional explica a profissionalização, produção e comercialização eficazes e com qualidade encontrada no país. O primeiro fator que deve ser levado em consideração para a definição da qualidade do café é a sua espécie, já que existem diferenças entre as espécies arábica e robusta. O arábica é um café mais fino, resultando em uma bebida de qualidade superior, com mais aroma e sabor. E o robusta é utilizado nos *blends* juntamente ao arábica conferindo mais corpo à bebida e diminuição da acidez do arábica. Além disso, oferece um menor custo ao produto e ajusta a bebida à preferência ou ao costume de determinada classe de consumidores (ABIC, 2013a).

Usualmente são empregadas misturas de cafés de diferentes qualidade e espécies (*blends*) para formulação de produtos comerciais. São descritos para cafés torrados e moídos três categorias: Tradicional, Superior (podem ser *blends* com conilon) e *Gourmet* (somente arábica). Enquanto as designações Tradicional, Superior e *Gourmet* dizem respeito à qualidade, os termos clara, média e escura são empregados para indicar o grau de torra (BRASIL, 2010; ABIC, 2013a).

O consumo doméstico, predominantemente de cafés do tipo Tradicional, tanto quanto o consumo fora do lar, onde predominam os cafés Superiores e *Gourmet*, apresentam taxas de crescimento positivas. Mensalmente, novas marcas comerciais de

café são lançadas, fazendo com que o mercado se diversifique em produtos de alta qualidade para os consumidores brasileiros (ABIC, 2013a).

3.3 Composição do café

Em ordem de abundância, os valores dos constituintes presentes no café são: polímeros fenólicos 8%, polissacarídeos 6%, ácidos clorogênicos 4%, minerais 3%, cafeína 1%, ácidos orgânicos 0,5%, açúcares 0,3% e lipídeos 0,2%. Os ácidos clorogênicos constituem os principais compostos fenólicos do café, os quais são altamente significativos para o sabor e aroma da bebida (CLARKE & MACRAE, 1985). Um grande número de componentes do café tem sido identificado como sendo potencialmente responsável pela sua quimioproteção e efeito antioxidante. Entre outros, têm sido considerados como bons candidatos, a cafeína e polifenóis, incluindo os ácidos clorogênicos e seus produtos de degradação (BORRELLI *et al.*, 2002; CAVIN *et al.*, 2002; ANDRADE, HENARES & MORALES, 2005).

O café contribui para a ingestão de alguns minerais, compondo 4% da base seca do café torrado, destacando-se o teor de potássio, que chega a 40% do conteúdo total de minerais. Cálcio e magnésio estão presentes em menores quantidades, de maneira similar aos elementos não metálicos, fósforo e enxofre. Elementos traços também já foram detectados em níveis de mg/kg e vários elementos não são detectados ou são apresentados em níveis muito baixos, a partir do uso de técnicas analíticas modernas como a absorção atômica (ou emissão) espectrométrica (CLARKE & MACRAE, 1985; ENCARNAÇÃO & LIMA, 2003).

A espécie arábica apresenta melhor qualidade sensorial, além de concentrações mais elevadas de carboidratos, lipídeos e trigonelina, podendo-se justificar seu maior volume de produção e comercialização. Já os cafés da espécie robusta possuem maiores teores de cafeína e compostos fenólicos (CLARKE & MACRAE, 1985; ILLY & VIANI 1995). Em contraposição, Martín *et al.* (1998) encontraram maiores teores de cafeína na variedade arábica, comparada à variedade robusta.

Diferenças na composição entre os grãos verdes e torrados, bem como nos procedimentos de extração para preparo da bebida, resultam numa grande diversidade da composição química do produto final, representado pela soma dos compostos naturalmente presentes com aqueles induzidos pelo processamento (DAGLIA *et al.*,

2000; BORRELLI *et al.*, 2002; MALTA *et al.*, 2002). Apresentam-se na Tabela 1 alguns dos principais compostos presentes nos grãos de café robusta e arábica, crus e torrados.

Tabela 1 – Composição aproximada dos grãos de café crus e torrados, das espécies robusta e arábica (% em base seca)

Componentes	Robusta		Arábica	
	Cru	Torrado	Cru	Torrado
Minerais	4,0-4,5	4,6-5,0	3,0-4,2	3,5-4,5
Cafeína	1,6-2,4	~2,0	0,9-1,2	~1,0
Trigonelina	0,6-0,75	0,3-0,6	0,5-1,0	0,5-1,0
Lipídeos	9,0-13,0	11,0-16,0	14,5-20,0	14,5-20,0
Ácidos Clorogênicos	7,0-10,0	3,9-4,6	5,5-8,0	1,2-2,3
Ácidos Alifáticos	1,5-2,0	1,0-1,5	1,5-2,0	1,0-1,5
Oligossacarídeos	5,0-7,0	0-3,5	6-8,0	0-3,5
Polissacarídeos totais	37,0-47,0	-	50,0-55,0	24,0-39,0
Aminoácidos	2,0	0	0	0
Proteínas	11,0-13,0	13,0-15,0	13,0-15,0	13,0-15,0

Fonte: Clarke & Macrae, 1985

3.4 Compostos fenólicos

A intensa pesquisa sobre as propriedades antioxidantes de produtos naturais dos últimos anos tem enfatizado as substâncias fenólicas como potentes antioxidantes, estando presentes em abundância na dieta (MIZUBUTI, 2006).

As substâncias fenólicas ou polifenóis são um dos mais importantes grupos de substâncias que ocorrem nas plantas e que contribuem para as propriedades antioxidantes e sensoriais (cor, aroma, adstringência) de frutas, mel, bebidas e vegetais. Essas substâncias são formadas no metabolismo secundário de plantas, envolvendo-se, portanto, na adaptação a condições de estresse ambiental (MOURE *et al.*, 2001; NACZK & SHAHIDI, 2004).

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, que os confere o poder

antioxidante. Dentre eles, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, taninos e tocoferóis (ANGELO & JORGE, 2007).

Esses compostos não possuem atividade antioxidante enzimática, sendo incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, e, portanto, eficientes na prevenção da auto-oxidação (SHAHIDI, JANITHA & WANASUNDARA, 1992).

A determinação do teor de compostos fenólicos tem sido abordada enfaticamente na literatura, acompanhada da avaliação da capacidade antioxidante destes compostos (PINTO *et al.*, 2001, FERNANDES *et al.*, 2001, JÚNIOR, 2003; SIQUEIRA & ABREU 2006; ARAÚJO, 2007; VIGNOLI, 2009; ABRAHÃO, PEREIRA & ABRAHÃO, 2010; LIMA, PEREIRA & ABRAHÃO, 2010).

A capacidade antioxidante do composto fenólico está principalmente relacionada ao número e a posição das hidroxilas no anel fenólico. Compostos mais hidroxilados têm maior atividade antioxidante graças à maior disponibilidade de hidrogênio ou elétrons por estes grupamentos (MARINOVA & YANISHILIEVA, 2003; ZHENG & WANG, 2003; SOBRATTEE *et al.*, 2005).

Muitos estudos têm relacionado potencial benéfico dos compostos fenólicos, destacando os ácidos fenólicos e flavonóides, em doenças que apresentam o estresse oxidativo como importante agente etiológico (MIZUBUTI, 2006).

3.5 Compostos fenólicos em café

O café é uma rica fonte de fenólicos, principalmente ácidos clorogênicos, destacando-se o isômero ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) e seus produtos de degradação (ácidos caféico, ferúlico e cumárico). A atividade antioxidante do café tem sido correlacionada tanto à presença de compostos fenólicos como do ácido clorogênico, quanto a vários outros compostos nitrogenados como trigonelina, cafeína e melanoidinas. No entanto, variações na composição dos grãos utilizados e processamento afetam essa característica (HIGDON & FREI, 2006; PARRAS *et al.*, 2007; VIGNOLI, BASSOLI & BENASSI, 2011).

O teor de compostos fenólicos no café bebida pode variar de 100 a 200 mg por xícara (aproximadamente 200 mL) (LAKENBRINK, 2000). Já no pó de café arábica, a

variação encontrada de acordo com alguns estudos foi de 4,55 a 8,85% (FERNANDES *et al.*, 2001; PINTO *et al.*, 2001; JÚNIOR, 2003; SIQUEIRA & ABREU, 2006).

Os ácidos clorogênicos constituem os principais e mais abundantes compostos fenólicos com propriedades antioxidantes no café (CLIFFORD, 2000; MONTEIRO & TRUGO, 2005) e são de grande interesse econômico devido a sua degradação, durante a torrefação, em compostos responsáveis pelo sabor e aroma da bebida. Eles compreendem uma família de compostos formados pela esterificação do ácido quínico com um ou mais derivados do ácido cinâmico, como o ácido caféico, ácido ferúlico e ácido-cumárico (CLIFFORD, 2000). Nos grãos crus estima-se um teor de 6 a 10% de ácidos clorogênicos em base seca. Durante a torrefação, há uma redução de 8 a 10% do conteúdo inicial para cada 1% de perda de massa devido à secagem dos grãos. Entretanto, uma quantidade substancial dos ácidos clorogênicos resiste à extração e permanece nos grãos torrados destinados ao consumo como bebida. O conteúdo de ácidos clorogênicos pode variar de 20 a 675 mg em uma xícara de café (200 mL), dependente do grau de torra e da espécie. Estima-se que uma xícara (200 mL) de café arábica contenha 70 a 200 mg de ácidos clorogênicos e de robusta 70 a 300 mg (CLIFFORD, 1999).

Durante a torração ocorre a degradação dos compostos fenólicos e outros componentes termolábeis (FARAH *et al.*, 2005). Apesar do decréscimo do teor de polifenóis, recentemente, tem sido mostrado que ácido quínico e caféico, componentes dos ácidos clorogênicos, são quimicamente incorporados às melanoidinas durante este processo (BEKEDAM *et al.*, 2008).

Além dos ácidos clorogênicos, a presença de ácido gálico, ácido quínico, taninos, lignanas e antocianinas no café já foi reportada na literatura, mas em teores menores (CLIFFORD, 2003; FARAH & DONANGELO, 2006) (Figuras 1 e 2).

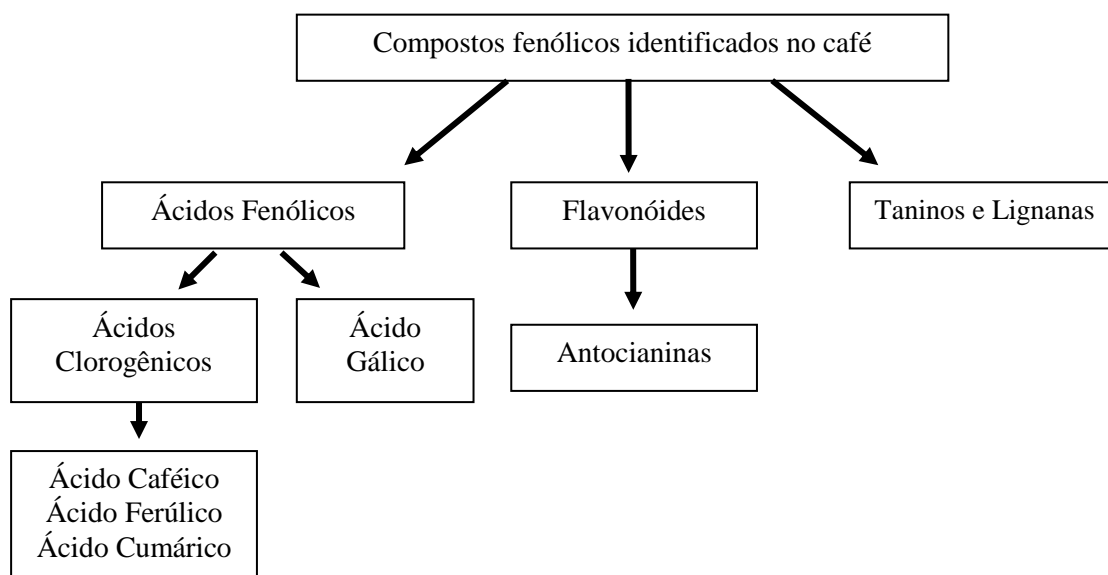


Figura 1 – Compostos fenólicos identificados no café.

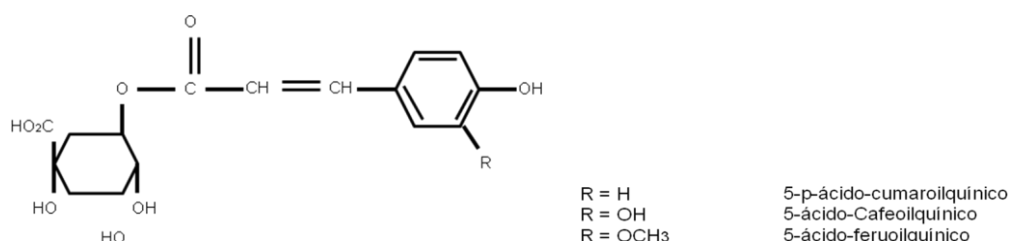


Figura 2 – Estrutura química de alguns dos ácidos clorogênicos encontrados no café.

O processo de torrefação do café permite que altas temperaturas destruam alguns dos compostos fenólicos e favoreçam o desenvolvimento de outras substâncias antioxidantes (ARAÚJO, 2007). Segundo NATELLA *et al.* (2002), em um estudo com humanos, o café torrado e preparado na forma de infusão, ainda assim demonstrou capacidade de aumentar a atividade antioxidante plasmática devida aos compostos fenólicos. O desenvolvimento de substâncias antioxidantes durante a torrefação se dá principalmente por meio dos produtos da reação de Maillard, como os compostos heterocíclicos e as melanoidinas (DAGLIA *et al.*, 2000; ITO *et al.*, 2005).

Portanto, a capacidade antioxidante da bebida de café é atribuída pelos antioxidantes originalmente presentes nos grãos de café, como os compostos fenólicos,

e também pelos antioxidantes formados no processo de torrefação, como as melanoidinas e outros produtos da Reação de Maillard (BORRELLI, *et al.*, 2002; CROZIER, JAGANATH & CLIFFORD, 2009).

O processo inerente ao preparo da bebida de café influencia a composição de antioxidantes e as propriedades benéficas à saúde. O contato da água com os grãos de café torrados é um ponto crucial para a extração de compostos presentes no café. A origem dos grãos, variedade, mistura dos *blends*, grau de torração e moagem também são fatores que influenciam na composição final da bebida. Dentre as diversas técnicas de preparo da bebida, a infusão é a mais praticada pelos consumidores, enquanto o café espresso, produzido por um método de pressão, é o mais apreciado (LUDWIG *et al.*, 2012), sendo o mais consumido na Itália (NISETEO *et al.*, 2011). Além destes, a decocção também tem sido um dos métodos de extração abordados na literatura. Cada um desses três métodos citados acima, infusão, decocção e método de pressão, relaciona-se com a granulação dos grãos de café, proporção de água / café, tempo e temperatura do preparo, levando a alterações no perfil de compostos da bebida extraída (NISETEO *et al.*, 2011).

No processo de infusão, a água a 92-96°C passa pelo café moído posicionado no filtro e o filtrado é acondicionado em um recipiente adequado. A turbulência iniciada pelo despejo da água no pó de café garante que a mesma não sature e consiga filtrar o máximo de compostos possíveis (LINGLE, 1996, LUDWIG *et al.*, 2012). Diversos compostos químicos identificados nos grãos de café, incluindo os antioxidantes, apresentam diferentes taxas de extração que podem ser influenciadas pela escolha da técnica de preparo da bebida (PETERS, 1991; PETRACCO, 2001).

O preparo do café espresso demanda o uso de alta pressão da água, o que acelera a extração de compostos antioxidantes na primeira porção extraída da bebida de café. Já no preparo por infusão, a turbulência das partículas de café em contato com a água em adição ao longo tempo de contato de ambos, são fatores que otimizam a extração de compostos antioxidantes, principalmente aqueles menos polares. Entretanto, a técnica de preparo deve ser escolhida considerando-se cada tipo de café, pois sua estrutura celular e granulometria também pode influenciar o processo de extração de compostos (LUDWIG *et al.*, 2012).

3.6 Análise de compostos fenólicos

A separação, identificação e quantificação dos compostos fenólicos em alimentos vêm sendo discutidas extensamente na literatura e colide com muitos problemas metodológicos, devido à existência de uma gama de substâncias, com grande polaridade, muito reativas e susceptíveis à ação de enzimas, na maioria das vezes. A quantificação desses compostos é influenciada pelo procedimento de extração empregado, condições e tempo de armazenamento, padrão selecionado, e presença de substâncias interferentes como ceras, gorduras, terpenos e clorofila (SHAHIDI & NACZK, 1995).

Os compostos fenólicos também podem estar complexados com carboidratos e proteínas, formando complexos quase insolúveis. Portanto, extratos de compostos fenólicos provindos de plantas são caracterizados por uma diferente mistura de classes de polifenóis solúveis no sistema de solvente utilizado (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Principalmente devido a esses fatores, ainda não se desenvolveu um método satisfatório para a extração de todos ou de uma classe específica de fenólicos em alimentos. Os solventes mais utilizados para a extração destes compostos são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações. Consequentemente, não há um procedimento normalizado de preparo da amostra e extração, evidenciando-se a importância do desenvolvimento e divulgação dos métodos por órgãos oficiais (ANGELO & JORGE, 2007).

3.7 Procedimentos de extração de compostos fenólicos do café

O procedimento de extração de GOLDSTEIN & SWAIN (1963) é citado em diversos estudos que avaliaram o teor de compostos fenólicos em café (PINTO *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2001; JÚNIOR, 2003; SIQUEIRA & ABREU, 2006). Esses autores utilizam o metanol como extrator em diferentes concentrações, como 50, 70 e 80%.

Outros procedimentos de extração de compostos fenólicos em café são abordados na literatura, como a extração sequencial – éter etílico, álcool etílico, água

destilada (ARAÚJO, 2007); a extração aquosa (VIGNOLI, 2009; ABRAHÃO *et al.*, 2010; LIMA, PEREIRA & ABRAHÃO, 2010); e a extração com duas etapas, utilizando a água como extrator (VIGNOLI, 2009), evidenciando-se diferentes razões amostra/solvente nos diversos estudos. O metanol e a água têm sido empregados com maior frequência, diferindo em relação à concentração utilizada (FERNANDES *et al.*, 2001; PINTO *et al.*, 2001; JÚNIOR, 2003; SIQUEIRA & ABREU, 2006; VIGNOLI, 2009; ABRAHÃO *et al.*, 2010; LIMA, PEREIRA & ABRAHÃO, 2010). Ressalta-se que a razão amostra/solvente influencia na capacidade de extração dos polifenóis (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Considerando a gama de fatores que influenciam o desempenho dos diferentes procedimentos de extração, faz-se necessário a otimização desta etapa, garantindo uma maior quantidade de compostos fenólicos extraídos.

A otimização da etapa de extração de polifenóis em café visa à obtenção destes compostos ativos em maior concentração, podendo ser utilizados na indústria de alimentos, assim como para a fabricação de nutracêuticos, considerando-se a ação antioxidante destes compostos. Além disso, o estudo de diferentes variáveis para a extração aquosa do café, característica da infusão da bebida, permite encontrar uma maneira mais eficiente de “coar” a bebida, garantindo um maior teor de polifenóis por xícara de café.

3.8 Técnicas de quantificação de compostos fenólicos do café

Diversas técnicas de quantificação de fenólicos totais têm sido citados pela comunidade acadêmica, como o eletroquímico, cromatográfico e espectrofotométrico, sendo evidente a dificuldade de se encontrar um padrão específico e conveniente, devido à complexidade das substâncias fenólicas presentes nos alimentos (ANGELO & JORGE, 2007).

As técnicas espectrofotométricas, por serem simples e relativamente econômicas, são amplamente utilizadas para a quantificação de fenólicos totais, determinação de fenólicos específicos e de classes de fenólicos. Os métodos de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu não são seletivos, pois determinam todos os fenólicos presentes, inclusive proteínas extraíveis (NACZK & SHAHIDI, 2004). Ambos baseiam-

se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, produzindo um complexo de coloração azul que absorve entre 620 e 740nm com uma absorção máxima em 725nm. O carbonato de sódio é adicionado à solução de extrato da amostra para mantê-la alcalina, favorecendo a formação de fenolato, a partir do grupo fenólico, o que permite que os ânions molibdo e tungstofosfato produzam a oxidação (SWAIN & HILLIS, 1959; SHAHIDI & NACZK, 1995; ANGELO & JORGE, 2007).

O reagente Folin-Ciocalteu é mais sensível à redução pelos fenóis e possui menor tendência à precipitação quando comparado ao Folin-Denis (BRUNE, HALLBERG & SKANBERG, 1991; ANGELO & JORGE, 2007).

A escolha do reagente Folin-Ciocalteu é pertinente, visto a sensibilidade, simplicidade de preparo e precisão do mesmo (VIGNOLI, 2009), assim como a indicação do seu uso por vários autores em publicações recentes (ARAÚJO, 2007; VIGNOLI, 2009; LIMA, PEREIRA & ABRAHÃO, 2010).

A escolha do melhor método espectrofotométrico para a quantificação de compostos fenólicos em matérias vegetais vai depender, portanto, das características da natureza química dos compostos, do procedimento de extração empregado, tempo de armazenamento e condições, bem como da presença de substâncias interferentes (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Esta diversidade de fatores que interferem as técnicas espectrofotométricas pode explicar o uso de diferentes extratores, reagentes e padrões por diversos autores, na tentativa de se alcançar as condições analíticas mais apropriadas para extração e determinação dos teores de polifenóis totais. Diferentes tipos de padrões são empregados na determinação espectrofotométrica, podendo citar o ácido gálico (VIGNOLI, 2009; ABRAHÃO *et al.*, 2010), tânico (LIMA, PEREIRA & ABRAHÃO, 2010) e catequinas (ARAÚJO, 2007).

O ácido gálico tem sido apontado como padrão em métodos espectrofotométricos para determinação de compostos fenólicos em café (FERNANDES *et al.*, 2001; PINTO *et al.*, 2001; JUNIOR, 2003; DUARTE *et al.*, 2005; SIQUEIRA & ABREU, 2006; VIGNOLI, 2009; ABRAHÃO *et al.*, 2010), sendo também referenciado no manual da AOAC (AOAC, 1990).

Portanto, observa-se uma ampla gama de publicações relacionadas aos compostos fenólicos presentes no café, utilizando diferentes técnicas de extração e quantificação dos mesmos, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Estudos sobre a determinação do teor de fenólicos totais em café, utilizando diferentes procedimentos de extração e quantificação.

Referência bibliográfica	Objetivo	Delineamento experimental / estatística	Número de replicatas	Variedade	Matriz	Quantidade (g)	Extração	Determinação do teor de Fenólicos Totais					Parâmetros de validação
								Reagente	Padrão	Comprimento de onda (nm)	Descrição método	Teores	
Lakenbrink et al., 2000	Determinar o teor de flavonóides e outros polifenóis contidos no chá e café bebidas de acordo com condições de preparo praticadas	não descrito	Seis replicatas para cada tipo de café	não descrito	Amostras comerciais (torra clara, média e escura)	não descrito	Extração percolada: 20g de café por litro de água	Folin Ciocalteu	segundo Singleton e Rossi (1965)	segundo Singleton e Rossi (1965)	segundo Singleton e Rossi (1965)	0,96-1,06 g/L	Ausente
Fernandes et al., 2001	Caracterizar as diferenças existentes na composição química dos polifenóis, ácido clorogênico, cafeína e proteína bruta em padrões de bebidas e blends do café arábica torrado	Delineamento Inteiramente Casualizado, fatorial 2 x 5 x 4 (cooperativas, classes de bebidas e repetições), comparação das médias pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade	Quatro repetições por tratamento	<i>Coffea arabica</i> , L.	Bebida dura e blend (dura + riada)	não descrito	Metanol 50% (v/v) – Goldstein e Swain (1963)	Folin-Denis	Ácido Gálico (AOAC 1990)	não descrito	Segundo AOAC (1990) - não descrito	5,4-5,55%	Ausente
Continua ...													

Referência bibliográfica	Objetivo	Delineamento experimental / estatística	Número de replicatas	Variedade	Matriz	Quantidade (g)	Extração	Determinação do teor de Fenólicos Totais					Parâmetros de validação
								Reagente	Padrão	Comprimento de onda (nm)	Descrição método	Teores	
Pinto et al., 2001	Analisar teores de fenólicos totais, açúcares redutores e não redutores em bebidas do café	Delineamento inteiramente Casualizado, comparação das médias pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade	Quatro repetições por tratamento	<i>Coffea arabica</i> , L.	Café torrado tipo espresso: (torra média e clara)	não descrito	Metanol 50% (v/v) – Goldstein e Swain (1963)	Folin-Denis	Ácido Gálico (AOAC 1990)	não descrito	Segundo AOAC (1990) - não descrito	4,73-5,52%	Ausente
Junior, 2003	Influência de 6 sistemas de colheita na composição química de três tipos de café: cereja verde e bóia, café composto por mistura de frutos	Fatorial inteiramente casualizado Fatorial 6x3 (6 sistemas de colheita, 3 tipos de café e 3 repetições). Comparação das médias pelo Teste de Student-Newman-Keuls	Três repetições por tratamento	<i>Coffea arabica</i> , L.	Café mistura, bóia e verde/cereja	não descrito	Metanol 80% (v/v) – Goldstein e Swain (1963)	Folin-Denis	Ácido Gálico (AOAC 1990)	não descrito	Segundo AOAC (1990) - não descrito	4,55-6,53%	Ausente
Duarte et al. 2005	Avaliar o efeito do processamento e torração sobre a atividade antioxidante de café bebida preparado com técnicas usuais brasileiras	Comparação das médias pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade	Cinco repetições por tratamento	<i>Coffea arabica</i> , L.	Café Torrado (3 graus de torra)	10g% do café bebida (preparação da bebida: 10g em 100mL de água deionizada a 90°C, filtro Whatman n. 3)	Metanol 50%	Folin-Denis	Ácido Tânico	não descrito	não descrito	3,11-3,42 g eq. ac. tânico/100 g da amostra	Ausente

Continua...

Referência bibliográfica	Objetivo	Delineamento experimental / estatística	Número de replicatas	Variedade	Matriz	Quantidade (g)	Extração	Determinação do teor de Fenólicos Totais					Parâmetros de validação
								Reagente	Padrão	Comprimento de onda (nm)	Descrição método	Teores	
Siqueira & Abreu, 2006	Analisar os tipos de processamento, a irrigação e os tipos de torração com relação à qualidade e as alterações na composição físico-química, química e sensorial do café	Inteiramente casualizado. Fatorial 3x3. Comparação das médias pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade	Quatro repetições por tratamento	<i>Coffea arabica</i> , L.	Café cru e torrado (Torra clara e média)	não descrito	Método de Goldstein e Swain (1963)	Folin-Denis	Ácido Gálico (AOAC 1990)	não descrito	Segundo AOAC (1990) - não descrito	6,26-8,86%	Ausente
Araújo, 2007	Caracterizar a composição e avaliar a atividade antioxidante de café submetido a diferentes condições de torrefação	Análise de variância (ANOVA), Comparações de médias de Tukey com 5% de probabilidade	Três repetições por tratamento	<i>Coffea arabica</i> , L.	Café cru e torrado (diferentes graus de torra)	5g	Extração seqüencia l (ordem crescente de polaridad e): éter etílico, álcool etílico, água destilada	Folin Ciocalteu	Catequina	725	Volume amostras de 60-500 µL + 0,5mL de metanol + 7mL água destilada + 0,5mL do Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, adição de 1mL de solução saturada de carbonato de sódio. Tubos agitados e, após 1 hora, a leitura foi efetuado em espectrofotômetro	0,24-2,68 mg de fenólicos/g de amostra	Ausente

Continua...

Referência bibliográfica	Objetivo	Delineamento experimental / estatística	Número de replicatas	Variedade	Matriz	Quantidade (g)	Extração	Determinação do teor de Fenólicos Totais					Parâmetros de validação
								Reagente	Padrão	Comprimento de onda (nm)	Descrição método	Teores	
Vignoli 2009	Avaliação da capacidade antioxidante, a partir do teor de compostos fenólicos ao longo do processo de torrefação	Análise de componentes principais pelo procedimento "Multivariate Exploratory Techniques" - "Principal components and classification analysis". (Programa estatística 7.1)	não descrito	<i>Coffea canephora</i> (Robusta) e arábica	Café torrado (diferentes graus de torra)	Amostra preparada a 3mg/mL e retirada de alíquota de 100µL de amostra	Extrato Aquoso: 50mL de água a 95°C, agitação por 5' (filtro de papel Whatman n. 4)	Folin-Ciocalteu	Ácido Gálico	765	100µL de amostra + 7,5mL de água destilada + 300µL de Folin-Ciocalteu 0,9N. Após agitação e mistura, acréscimo de 1 mL de solução de carbonato de sódio 20% + 1,1 mL de água destilada, misturando-se com auxílio de agitador. Reação mantida por 1 hora a temperatura ambiente levada para leitura no espectrofotômetro.	Arábica – 0,71-0,89 Robusta – 0,88-1,09 (resultados expressos em: mMol/L ácido gálico / 0,1 mg de amostra de café)	Linearidade, precisão e faixa de trabalho
Lima et al, 2010	Avaliar o efeito da descafeinação sobre a atividade antioxidante <i>in vitro</i> do café bebida	Comparação das médias pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.	Três repetições por tratamento	<i>Coffea arábica</i> , L.	Cru e Torrado a 180°C	10g	Extrato Aquoso: 10g de pó (verde ou torrado) + 100mL de água destilada a 90°C (filtro de papel Whatman n. 3)	Folin-Ciocalteu	Ácido Tânico	740	0,1mL da bebida + 0,5mL de Folin-Ciocalteu (diluído em água: 1:10). Após 8 minutos, adição de 4mL de carbonato de sódio a 4% (m/v). Tubos mantidos no escuro por 2 horas à temp. ambiente antes da análise da absorbância	4,13-5,30 g eq. ac. tânico/100 g	Ausente

Continua...

Referência bibliográfica	Objetivo	Delineamento experimental / estatística	Número de replicatas	Variedade	Matriz	Quantidade (g)	Extração	Determinação do teor de Fenólicos Totais					Parâmetros de validação
								Reagente	Padrão	Comprimento de onda (nm)	Descrição método	Teores	
Abraham et al, 2010	Quantificar alguns dos compostos bioativos e analisar a atividade antioxidante <i>in vitro</i> de cafés de qualidade diferenciada	Inteiramente casualizado com parcelas subdivididas. Dados submetidos à análise de variância (ANOVA). Comparação de médias pelo Teste de Tukey, 5% probabilidade. Teste de normalidade Shapiro-Wilk (resíduos considerados normais a 5%)	Seis repetições por tratamento	<i>Coffea arabica</i> , L.	Café cru bebida rio, café torrado bebida rio, café cru bebida mole, café torrado bebida mole	0,1mL da bebida preparada	Extrato Aquoso: 10g de pó em 100mL de água destilada a 90°C (filtro papel n. 3)	Folin-Denis	Ácido Gálico (AOAC 1990)	760	0,1mL café bebida + 8,5mL de água destilada + 0,5mL de Folin-Denis + 1mL da solução de carbonato de sódio 4% (m/v). Tubos agitados e mantidos à temp. ambiente por 30 minutos	4,51-5,77 g equivalente de ácido gálico / 100g de amostra	Ausente

A falta de padronização de métodos na literatura dificulta a comparação de resultados, assim como reduz a fidedignidade dos teores já estabelecidos, sendo uma potencial barreira para a definição de qual método usar para extração e determinação do teor de compostos fenólicos totais em estudos posteriores.

O método espectrofotométrico com o reagente Folin-Denis foi citado por alguns autores, sendo que estes citaram o manual AOAC (1990) como a fonte de referência para o delineamento experimental (FERNANDES *et al.*, 2001; PINTO *et al.*, 2001; JÚNIOR, 2003; SIQUEIRA & ABREU, 2006; ABRAHÃO *et al.*, 2010). Entretanto, atualmente esta fonte não tem sido citada por outros autores, que inclusive têm utilizado o reagente Folin-Ciocalteu para a quantificação dos compostos fenólicos em café (ARAÚJO, 2007; VIGNOLI, 2009; LIMA, PEREIRA & ABRAHÃO, 2010).

A maioria dos autores que utilizam o reagente de Folin-Ciocalteu referenciam a metodologia desenvolvida por SINGLETON & ROSSI (1965), com relação às adaptações desta para determinação dos compostos fenólicos em café (MARTÍN, PABLOS & GONZALES, 1998; LAKENBRINK *et al.*, 2000; NAIDU *et al.*, 2008; SACCHETTI *et al.*, 2009; VIGNOLI, BASSOLI & BENASSI, 2011). Uma nota da *American Society for Enology and Viticulture* em 1985 retrata um número de citações destes autores sendo maior que 145 vezes, evidenciando inclusive a possibilidade desta metodologia ser incluída no *Official Methods of Analysis* (AOAC) para análise de compostos fenólicos em vinhos e outras bebidas alcóolicas destiladas. Este método foi desenvolvido inicialmente para análise de vinhos e afins e os autores afirmam a flexibilidade em medir o conteúdo de polifenóis de outros alimentos, por estimar o número de grupos hidroxilas oxidáveis, independente da matriz analisada (SINGLETON & ROSSI, 1985).

O manual da AOAC do ano de 2007 não faz referência a nenhum método de quantificação de compostos fenólicos totais em café, somente para compostos fenólicos em produtos desinfetantes (AOAC, 2007). Pelo fato de não ter sido encontrado nenhum método normalizado emitido por organismos de normalização e/ou organizações reconhecidas na área para determinação de compostos fenólicos em café, dá-se a importância de se validar um método espectrofotométrico para a quantificação de compostos fenólicos em café.

Dentre os autores supracitados (Tabela 2), a carência de evidências quanto a parâmetros de validação aponta uma falha em relação às metodologias utilizadas, visto a

necessidade de se garantir mais confiabilidade aos resultados obtidos. O único estudo que apresentou avaliação de parâmetros de desempenho não abrangeu todos os parâmetros necessários a uma validação de métodos quantitativos, com a justificativa de o café ser uma amostra complexa e não um composto isolado (VIGNOLI, 2009).

Além disso, discute-se sobre o uso da abordagem “compostos fenólicos”, pois os reagentes utilizados na análise espectrofotométrica reagem com as hidroxilas reativas de compostos presentes na matriz. No caso específico do café, existem inúmeros compostos com esta característica, que também reagem com o Folin-Ciocalteu ou Denis, formando a coloração azul. Portanto, fazer a inferência à medida da capacidade redutora, ao invés de “compostos fenólicos totais”, é plausível do ponto de vista químico (HUANG, OU & PRIOR, 2005).

3.9 Validação

Na área de alimentos, onde aspectos de segurança e econômicos estão envolvidos, processos de validação aprofundados e que garantam a confiabilidade dos resultados são exigidos. Segundo RIBANI *et al.* (2004), “um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado”.

Validação é o processo que determina se um método analítico é aceitável para seu propósito pretendido (FAJGELJ & AMBRUS, 2000) e deve ser realizada no desenvolvimento de novos métodos, para métodos não normalizados, para métodos normalizados revisados, quando o controle de qualidade interno indicar alterações de um método com o tempo, para métodos normalizados utilizados em diferentes laboratórios, por diferentes analistas ou equipamentos, e para demonstrar equivalência entre dois métodos (EURACHEM, 1998; ABNT, 2005). Além disso, a implantação da validação de métodos analíticos assegura o laboratório quanto à qualidade dos dados por ele fornecidos (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

Dentre as formas de validação de um método incluem a calibração com uso de padrões ou materiais de referência e comparações com métodos normalizados, desde que o laboratório tenha condições de operar tais métodos (ABNT, 2005).

Antecedente à execução do processo de validação é necessário: definir a aplicação, objetivo e escopo do método, os parâmetros de validação e critérios de aceitação, verificar as características de desempenho dos equipamentos a serem utilizados, qualificar padrões e reagentes dentre outros materiais, planejar os experimentos de validação, assim como o tratamento estatístico (INMETRO, 2010).

O protocolo internacional normalizado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC *International*), *International Standards Organization* (ISO) e *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) preconiza o estudos dos seguintes parâmetros de validação: seletividade, linearidade, efeito matriz, veracidade (recuperação), precisão (repetitividade e reprodutibilidade), faixa de trabalho, limite de detecção e quantificação, sensibilidade, robustez e medida da incerteza (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

A seletividade consiste na capacidade do método de quantificar o analito de maneira eficiente, mesmo na presença de interferentes, devendo ser avaliada quando estes estiverem presentes na amostra em análise (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002). Os interferentes influenciam o desempenho da medição e a magnitude desse efeito pode depender da concentração dos mesmos na amostra (INMETRO, 2010).

Os possíveis efeitos relativos à matriz devem ser avaliados no processo de validação. Assim, estudos de efeitos de matriz podem ser conduzidos pelo método de adição do analito. A adição do analito deve estar de acordo com os valores definidos na curva de calibração dos estudos de linearidade (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

A linearidade define a habilidade do método em obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Pode ser avaliada por meio da regressão linear simples e análise do gráfico de resíduos correspondente à concentração do analito. Entretanto, antes do cálculo da regressão linear é necessário verificar a presença de valores discrepantes (*outliers*) em cada nível de concentração e a homocedasticidade dos dados (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002; INMETRO, 2010). A realização do teste de Jacknife para identificação e remoção dos *outliers* e do teste de Levene ou Brown-Forsythe para verificar a homogeneidade da variância dos resíduos, além da avaliação das premissas de normalidade, independência e adequação ao modelo são recomendados por SOUZA & JUNQUEIRA (2005).

Para se avaliar a veracidade é necessário que os ensaios sejam feitos com materiais de referência certificados, materiais de referência, amostras brancas ou amostras adicionadas (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002). Entretanto, o custo elevado dos materiais de referência para alimentos e a falta de representatividade dos mesmos podem dificultar a avaliação da veracidade de um método (EURACHEM, 1998). Com isto, na ausência de material de referência, pode-se avaliá-la utilizando amostras da matriz de interesse adicionadas de quantidades conhecidas de analito na forma de material puro (THOMPSON & WOOD, 1995). Embora amostras adicionadas não tenham declaração de incerteza, estudos de recuperação aparente com tais materiais permitem avaliar tendências devidas a efeitos relacionados ao analito adicionado (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

A precisão está relacionada à variabilidade do método, podendo ser avaliada e expressa sob condições de repetitividade e reprodutibilidade. A repetitividade refere-se à variabilidade entre as diversas medições obtidas pela análise de uma amostra idêntica sob as mesmas condições. Pode-se expressar a repetitividade pelo desvio padrão dos resultados obtidos sob tais condições. A reprodutibilidade relaciona-se à variabilidade expressa na análise de amostras idênticas, mas sob diferentes condições, como o uso de diferentes instrumentos, equipamentos, analistas e dias. A variabilidade dos resultados obtidos pode ser descrito pelo desvio padrão, nomeado desvio padrão de reprodutibilidade (ABNT, 2001).

Para qualquer método quantitativo existe uma faixa de concentrações do analito ou valores de propriedade no qual o método pode ser aplicado. A faixa de trabalho deve abranger a faixa de aplicação a ser utilizada pelo ensaio e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho (INMETRO, 2010).

O limite de detecção refere-se à menor concentração que pode ser detectada do analito de uma amostra, mas não necessariamente quantificada (NATA, 1997). Define-se também como sendo a concentração de analito correspondente ao valor médio obtido para a amostra branca mais cinco, seis ou dez desvios-padrão das medidas (EURACHEM, 1998). Após a determinação deste limite é necessário testá-lo com amostras independentes para averiguar se a tendência e precisão estabelecidas são satisfatórias. A maneira mais realista de se determinar o limite de detecção é a

experimental. Já o limite de quantificação corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração, excluindo o branco (INMETRO, 2010).

3.10. Análise colorimétrica

Na prática, a cor dos grãos de café pode ser utilizada como indicador do grau de torra. Dessa forma, pode-se utilizar medidas de colorimetria para avaliar o ponto de término do processo de torrefação, visto que a intensidade da cor formada é diretamente correlacionada à temperatura final da torra: quanto maior a temperatura, mais escuro será o café (PIZARRO *et al.*, 2007).

Pode-se observar, na literatura, o uso da análise de cor como estimativa do grau de torração de amostras de café, com base nos valores de luminosidade, medidos na análise colorimétrica (SUMMA *et al.*, 2007; SOMPORN *et al.*, 2011).

A luminosidade (L^*) define a escala cinza entre o branco e o preto. Assume valor 0 para o preto absoluto e 100 para o branco total (MORI *et al.*, 2004). Quanto maior a L^* , mais branda é a torração e mais clara é a amostra, e quanto menor, mais forte é a torração e mais escura é a amostra.

A partir dos parâmetros a^* e b^* é possível calcular os valores de saturação (c^*) e tonalidade (h^*), sendo h^* expressa pelas cores primárias vermelho, verde, amarelo e azul, representada em forma de um círculo cortado por duas retas perpendiculares (horizontal e vertical) passando pelo centro. A h^* é o ângulo do círculo, derivado dos valores de a^* e b^* , variando de 0 a 60 (unidimensional). Já a c^* é o desvio a partir do ponto correspondente ao cinza no eixo L^* (MORI *et al.*, 2004).

3.11. Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho é certamente uma das técnicas analíticas mais importantes para o químico moderno. Sua área de aplicação envolve o estudo de polímeros, identificação de compostos inorgânicos e orgânicos, análise de misturas complexas como gasolina e poluentes atmosféricos, controle de qualidade de produtos diversos, estudo de semicondutores, transporte de moléculas bioativas em tecidos vivos, mecanismo de catálise e outros (BARBOSA, 2008).

O espectro no infravermelho apresenta grande número de bandas e a interpretação desses espectros não requer a atribuição de todas as bandas, mas apenas de algumas mais características, considerando a amostra em análise (BARBOSA, 2008). Cada grupo funcional ou vínculo específico entre os átomos de uma molécula apresenta uma única frequência vibracional, que pode então ser utilizada para determinar quais grupos funcionais estão presentes em uma amostra (FRANCA & OLIVEIRA, 2010). Por ser uma técnica ágil e que exige pouca preparação da amostra, ela vem sendo utilizada por diversos estudiosos, com o intuito de identificar compostos específicos em amostras diversas e correlacionar os espectros obtidos com outras técnicas de medições de compostos orgânicos (LYMAN *et al.*, 2003; PIZARRO *et al.*, 2007; ANDREA *et al.*, 2010; RIBEIRO, FERREIRA & SALVA, 2011; WANG & LIM, 2012).

A energia denominada infravermelho corresponde à região do espectro eletromagnético situada na faixa de número de ondas entre 14290 e 200 cm^{-1} , sendo a faixa $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ a mais utilizada pelos químicos orgânicos, sendo denominada infravermelho médio (BARBOSA, 2008).

A radiação de comprimento de onda na região do ultravioleta (UV) possui energia capaz de causar transições eletrônicas em moléculas orgânicas. A ordem de grandeza da energia das radiações UV é comparável à de energia de ligações covalentes. Assim, muitos compostos orgânicos, quando irradiados com radiação UV, decompõem-se. Por outro lado, a radiação na região do infravermelho (IV) (situada entre as regiões do visível e das micro-ondas) possui maior comprimento de onda e, conseqüentemente, apresenta menor energia. Dessa forma, esse tipo de radiação, quando interage com moléculas orgânicas, é suficiente apenas para causar alterações em modos vibracionais e rotacionais das moléculas (Figura 3) (BARBOSA, 2008). O espectro na região de 4000 a 400 cm^{-1} , que é a região mais importante do ponto de vista da caracterização de compostos orgânicos, normalmente apresenta bandas de absorção em vez de linhas, isso porque, para cada mudança de nível vibracional, está associada uma série de transições rotacionais (SILVERSTEIN & WEBSTER, 1998).

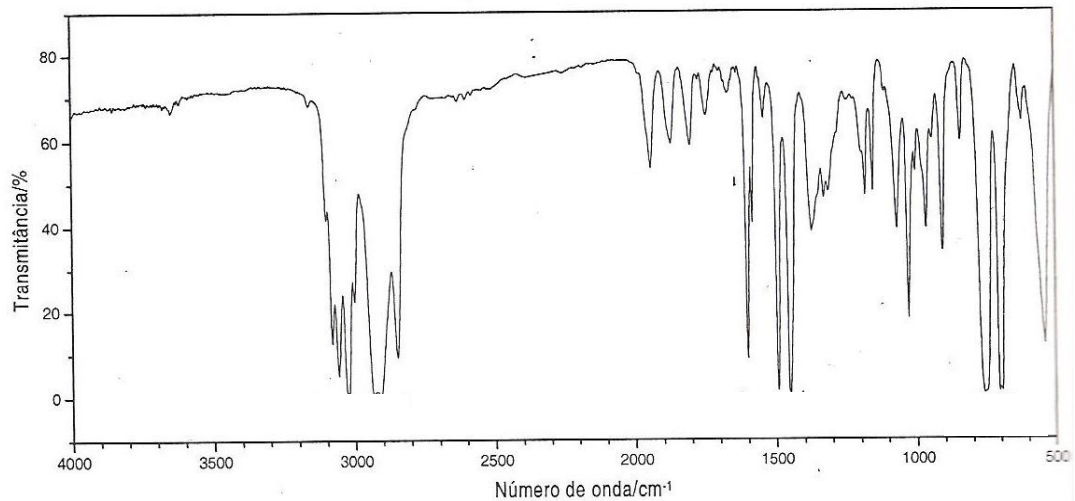


Figura 3 – Espectro no infravermelho de um filme de poliestireno.

Fonte: BARBOSA, 2008

O espectro é um gráfico em que, na ordenada, é geralmente apresentada a porcentagem de transmitância (de 0 a 100%). Muitas vezes se representam na ordenada os valores de absorbância. Na abscissa, a posição no ponto de mínima transmitância (ou de máxima absorbância) da banda é apresentada em número de onda (representado pelo símbolo ν em unidade cm^{-1}), que é o inverso do comprimento de onda em cm (BARBOSA, 2008).

Cada grupo funcional ou vínculo específico entre os átomos de uma molécula apresenta uma única frequência vibracional, que pode então ser utilizada para determinar quais grupos funcionais estão presentes em uma amostra. Quando os efeitos de todos os diferentes grupos funcionais são tomados em conjunto, o resultado é uma única "impressão digital" molecular que pode ser usada para confirmar a identidade de uma amostra. Portanto, duas estruturas moleculares diferentes não produzem o mesmo espectro no infravermelho, tornando esta técnica muito útil para uma ampla variedade de análises (FRANCA & OLIVEIRA, 2010).

A espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR – do inglês, Fourier Transform Infrared Spectroscopy) utiliza um interferômetro, o que permite a medição de todas as frequências simultaneamente (LUYKR & VAN RUTH, 2008). O interferograma resultante é então submetido à transformada de Fourier, a fim de ser transformado em um espectro (MADDAMS, 2001; HENDRA & BIREMBAUT, 2002).

Os equipamentos modernos de infravermelho sempre têm à disposição uma série de acessórios para a obtenção de espectros por reflectância total atenuada (ATR), reflexão especular e reflectância difusa, sendo técnicas que exigem pouco preparo e são úteis tanto para análises qualitativas quanto quantitativas (BARBOSA, 2008).

Alguns autores têm abordado o uso da espectroscopia no infravermelho para análise de diversos compostos funcionais em amostras distintas. Enfatizando o seu uso para análises em café, evidencia-se na literatura estudos que utilizam os espectros gerados para correlacionarem os mesmos com resultados obtidos por outras técnicas de avaliação de compostos funcionais das amostras. Por ser um método ágil e não invasivo a espectroscopia vem sendo alvo deste tipo de estudo, como forma de se obter métodos mais rápidos e que possam identificar compostos funcionais específicos em diferentes amostras e avaliar parâmetros de qualidade e sensoriais (PIZARRO *et al*, 2007).

LYMAN *et al.* (2003) utilizaram a técnica de espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR) usando reflexão total atenuada (ATR) para caracterizar uma mistura de compostos voláteis e não voláteis que constituem o *flavour* da bebida de café. Eles ressaltam o uso de técnicas mais complexas, como a cromatografia gasosa, utilizada por outros autores, para analisar os mesmos compostos, e evidenciam o interesse em avaliarem se a técnica por FTIR-ATR seria capaz de identifica-los também. A região 1800-1680cm⁻¹ foi alvo de interesse dos autores por ser a região de absorção de grupos carbonilas, que contribuem significativamente para os diferentes “flavors” da bebida. Após calcular a derivada secundária, observou-se a presença de 26 compostos carbonílicos distintos e em três diferentes intensidades de torra do café foram encontrados os mesmos tipos de compostos, porém em quantidades diferentes, considerando a área sob a curva dos espectros. Vários picos e bandas do espectro foram correlacionados com compostos específicos, conforme já evidenciado na literatura.

PIZARRO *et al.* (2007) avaliaram se a espectroscopia em combinação com técnicas de calibração multivariadas poderia ser eficientemente utilizada como uma ferramenta rápida e acurada para monitorar a cor da torra e o conteúdo de cafeína, importantes parâmetros de qualidade do café torrado. Definiram-se modelos de calibração confiáveis e simples indicados para uso em escala industrial, por reduzirem o tempo e o custo analítico.

RIBEIRO, FERREIRA & SALVA (2011) também utilizaram a técnica de FTIR e desenvolveram modelos matemáticos preditivos a fim de se estabelecer uma relação

entre atributos sensoriais da bebida de café e componentes químicos dos grãos de café correspondentes. Atributos sensoriais como acidez, amargor, *flavour* e qualidade global foram avaliados. Cada um desses atributos foi correlacionado com compostos químicos específicos, os quais foram analisados por espectroscopia. O espectro obtido apresentou bandas relacionadas às ligações correspondentes aos compostos químicos específicos, e, a partir dos modelos de regressão utilizados, pôde-se constatar correlação entre os espectros formados e os compostos relacionados aos atributos sensoriais.

Considerando estudos com outras matrizes, CERRETANI *et al.* (2010) desenvolveram um método associando a espectroscopia por transformada de Fourier usando ATR e a regressão dos mínimos quadrados parciais como ferramenta rápida e barata para determinar importantes parâmetros relacionados com a qualidade do óleo de oliva, considerando o conteúdo de água, de fenólicos e a atividade antioxidante. Os compostos fenólicos foram analisados pelo método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, a atividade antioxidante pelo método ABTS e o conteúdo de água pelo método de Karl-Fischer. Os resultados de ambos os métodos foram utilizados para correlacionar com os espectros obtidos pela espectroscopia no infravermelho. A partir da construção do modelo PLS, a correlação foi significativa para todas as análises feitas, destacando, portanto, que o método espectroscópico é uma alternativa altamente conveniente em relação ao tempo e uso de solvente, por economizar ambos.

Portanto, dentre os estudos de café encontrados na literatura que correlacionaram o método infravermelho com outros métodos analíticos, não se encontrou referência ao método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu. Dentro deste contexto, seria interessante avaliar se existe correlação entre espectros gerados pela análise no infravermelho e os dados obtidos pelo método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, como forma de ganhar agilidade e facilidade nas análises.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

O presente trabalho baseou-se na otimização da etapa de extração de compostos redutores em bebida de café, a partir de um delineamento fatorial, e posterior validação do método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu empregando a condição de extração otimizada (Figura 4).

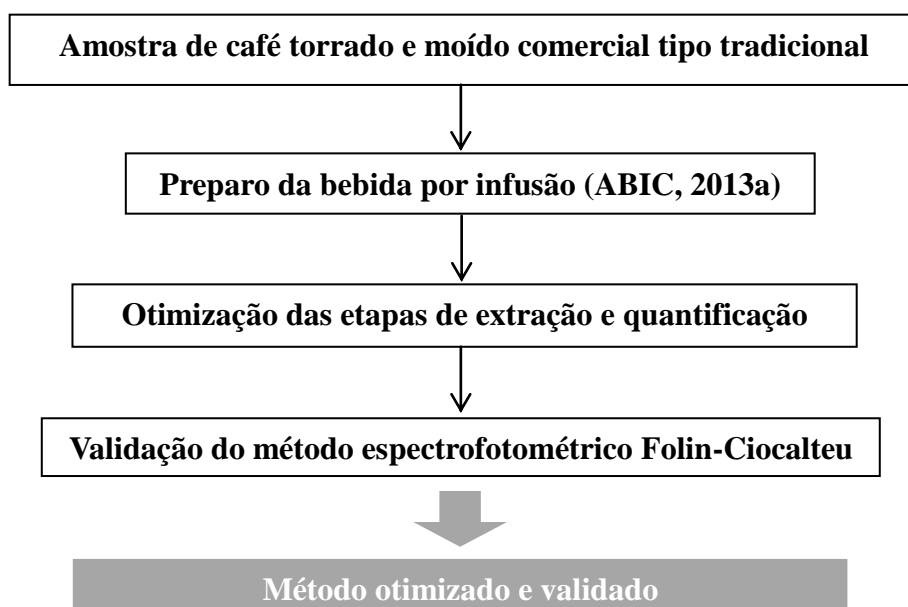


Figura 4 – Representação esquemática das etapas de otimização e validação do método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu.

As bebidas preparadas com 38 amostras de café torrado e moído comercializadas em Belo Horizonte - MG foram submetidas às análises de compostos redutores, a partir do método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu previamente validado. Avaliou-se, também, a influência da forma de preparo na capacidade redutora da bebida, tomando-se uma das amostras de café para preparo das bebidas em quatro formas distintas: infusão com água a 90 °C, infusão com água fervente, decocção com água a 90 °C e decocção com água fervente (Figura 5). A infusão consistiu em verter a água sobre o pó

de café posicionado no papel filtro, sob o coador. A decocção consistiu em misturar o pó de café na água, na temperatura desejada, seguida de uma leve agitação para homogeneizar a mistura e, por fim, verteu-se a solução no papel filtro, sob o coador. O tempo de filtração para ambas as situações foi de 4 a 6 min e o volume de filtrado variou de 16,5 a 20mL.

A escolha em testar diferentes formas de preparo a partir da infusão e decocção é devido à preferência dos consumidores mineiros em prepararem a bebida coada com filtro de papel (ABIC, 2013). O teste de diferentes temperaturas foi feito com o intuito de avaliar possíveis variações no preparo em domicílios e em estabelecimentos comerciais. A recomendação da ABIC é de que o preparo da bebida seja feito com água quente não fervente, despejando-a sobre o pó de café acondicionado no filtro de papel / coador, com um tempo de filtração não excedendo 4 a 6 minutos (ABIC, 2013). O uso de água quente não fervente pode gerar várias variáveis de temperatura no preparo por diferentes indivíduos, visto que a avaliação do “ponto” correto para coar é subjetiva. Neste contexto, a avaliação de diferentes formas de preparo, alterando-se a temperatura, faz sentido e ganha importância do ponto de vista do hábito do consumidor e do conhecimento do perfil antioxidante da bebida final preparada com pequenas variações possíveis de ocorrerem.

A análise colorimétrica foi realizada nas 38 amostras de café a fim de se estimar o grau de torração das mesmas e avaliar se haveria alguma correlação entre o grau de torração e a capacidade redutora (Figura 5).

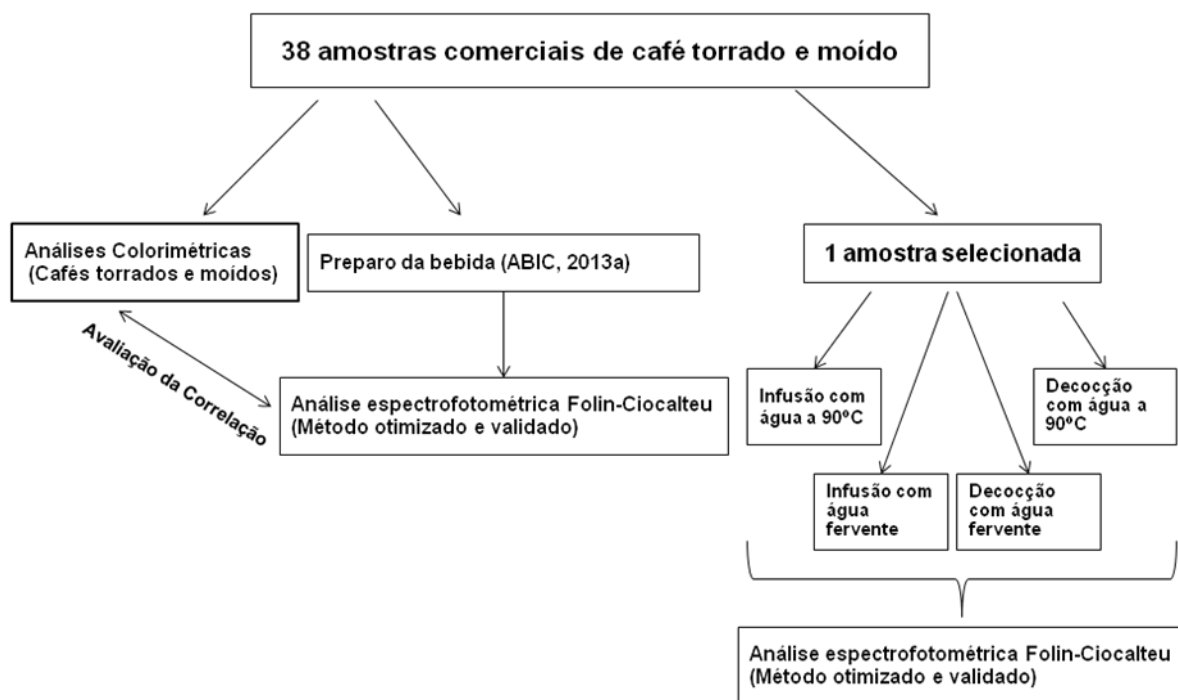


Figura 5– Representação esquemática da análise da capacidade redutora das bebidas de café, preparadas por infusão, pelo método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu otimizado e validado, das análises colorimétricas, bem como o estudo do impacto das formas de preparo da bebida na capacidade redutora.

Amostras de café 100% arábica, obtidas do município de Araponga e torradas sob condições específicas (240°C por 10 minutos (torração clara), 240°C por 11 minutos (torração média) e 240°C por 12 minutos (torração escura)), também foram analisadas pelo método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu e submetidas à análise colorimétrica, a fim de se correlacionar os resultados obtidos com os valores de capacidade redutora.

Por fim, essas amostras foram submetidas a análises por espectroscopia no infravermelho, com o intuito de se encontrar alguma banda dos espectros que se correlacionasse com a tendência de valores de capacidade redutora (Figura 6).

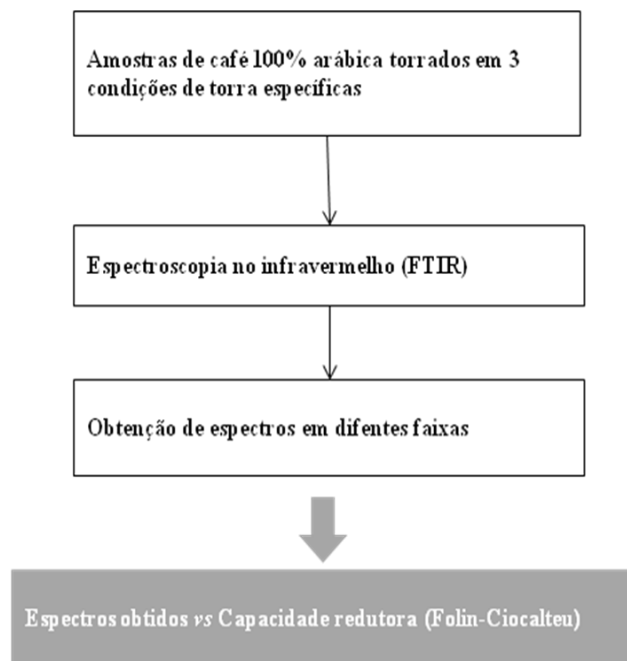


Figura 6 – Representação esquemática da seleção de amostras e as análises por Espectroscopia no Infravermelho (FTIR).

4.2 Materiais e reagentes

4.2.1 Vidrarias

- Balão volumétrico calibrado de 50, 100, 500 e 1000 mL.
- Tubo plástico tipo Falcon de 50 mL com tampa.
- Funil de 15 mL de plástico, diâmetro interno 51mm, cone raiado, haste curta.
- Ponteira de 10 mL.
- Tubo plástico tipo Falcon de 10 mL com tampa.
- Grade para tubos Falcon.
- Cubeta de vidro.
- Tubos Ependorf 2,5mL

- Béquer de 50 e 100 mL.
- Bastão de vidro.
- Coador de café tamanho pequeno.
- Filtro de papel Melitta.

4.2.2 Padrões

- Ácido gálico monohidratado (Sigma).

4.2.3 Reagentes

- Água deionizada.
- Carbonato de sódio anidro grau para análise (p.a.).
- Metanol (p.a.).
- Reagente Folin-Ciocalteu 2 mol/L (preparado) (p.a.).

4.2.4 Equipamentos

- Agitador de tubos.
- Balança analítica calibrada.
- Centrífuga Sigma 2K15.
- Colorímetro Tristimulus (HunterLab Colorflex 45/0 Spectrophotomer, Hunter Laboratories, VA, EUA).
- Equipamento de osmose reversa.
- Equipamento IRAffinity-1 (Shimadzu, Japão), com um detector DLATGS (Deuterated Triglycine Sulfate Doped with L-Alanine).
- Espectrofotômetro Micronal AJX-1900 calibrado.
- Pipeta volumétrica Finnpiquette F3 (n° série – EH82360) calibrada (100-1000 μL).

- Pipeta volumétrica Labmate soft LM 10000 (nº série - 048190457) calibrada (1-10 mL).
- Refrigerador (4-10 °C).

4.3 Amostras

Para a caracterização em relação à capacidade redutora e cor, amostras de café torrado e moído foram adquiridas em supermercados da cidade de Belo Horizonte - MG, no ano de 2012, dentro do prazo de validade e adequadamente armazenadas. Adquiriu-se 38 amostras comerciais no total, sendo 14 marcas com diferentes denominações e graus de torração, conforme descrito na Tabela 3.

Para as etapas de otimização e validação do método selecionou-se uma das amostras comerciais, aleatoriamente.

Para investigação posterior da correlação entre colorimetria, capacidade redutora e espectros no infravermelho médio, amostras de café cru 100% arábica, em grãos, foram obtidas no município de Araponga – MG. As amostras de café cru foram posteriormente torradas sob condições específicas: torração leve 240°C, 10 min; torração média 240°C, 11 min; torração escura 240°C, 12 min.

Todas as amostras foram mantidas em suas embalagens originais e armazenadas sob refrigeração, entre 4 e 10 °C, até o momento das análises.

Tabela 3 – Identificação das marcas das amostras comerciais e suas respectivas denominações e graus de torração.

Marca	Denominações	Grau de torração informado
1	Gourmet	Média
	Tradicional	Média
	Extra Forte	Média
	Orgânico	Média
	Descafeinado	Média
	Solúvel	N.I.
2	Tradicional	N.I.
	Extra Forte	N.I.
	Mais Forte	N.I.
	Estrada Real	N.I.
3	Sabor e Leveza	Média
	Café Forte do Brasil	Forte
	Intenso	Forte
	Orgânico	Acentuada
	Reserva especial	Forte
	Solúvel	Acentuada
4	Tradicional	Clássica
	Forte	Escura
	Extra Forte	Muito escura
	Descafeinado	Média
	Solúvel	N.I.
5	Tradicional	Escura
6	Tradicional	N.I.
	Extra Forte	N.I.
7	Tradicional	N.I.
	Extra Forte	N.I.
	Forte Demais	N.I.
8	Tradicional	N.I.
9	Tradicional	Média
	Extra Forte	Mais profunda
10	Tradicional	Média
	Extra Forte	Média
11	Tradicional	N.I.
12	Tradicional	N.I.
	Extra Forte	N.I.
13	Tradicional	N.I.
	Extra Forte	N.I.
14	Tradicional	N.I.

N.I. – não informado

4.4 Otimização

4.4.1 Condições de quantificação espectrofotométrica

Apesar da indicação de SINGLETON, ORTHOFER & LAMUELA-RAVENTO (1999) de análise espectrofotométrica a 760 nm para análise de compostos fenólicos em vinhos, foi realizada uma varredura entre 640 e 800 nm, visando selecionar o melhor comprimento de onda para a determinação de tais compostos na bebida de café. Para tal, extratos da bebida de café (250 μ L retomados para 1mL com água deionizada), extratos da bebida café adicionados de solução padrão de ácido gálico (250 μ L de extrato da bebida adicionada: sendo 200 μ L de solução de ácido gálico 2000 μ g/mL adicionado em 500 μ L de bebida, retomados para 1mL com água deionizada) e soluções padrão de ácido gálico (30 μ g/mL) foram preparados em triplicata e analisados.

O ácido gálico foi o composto selecionado como padrão para a construção da curva de calibração, visto que o mesmo tem sido apontado como padrão em métodos espectrofotométricos para determinação de compostos fenólicos em café (FERNANDES *et al.*, 2001; PINTO *et al.*, 2001; JUNIOR, 2003; DUARTE *et al.*, 2005; SIQUEIRA & ABREU, 2006; VIGNOLI, 2009; ABRAHÃO *et al.*, 2010), sendo também referenciado no manual da AOAC do ano de 1990 (AOAC, 1990).

Já as análises feitas com extratos de bebida café e com estes adicionados de solução padrão de ácido gálico foram devidas à necessidade de se testar prováveis interferências de componentes da matriz nas respostas espectrofotométricas, com testes utilizando-se a matriz adicionada ao analito padrão.

Os resultados de absorvância foram submetidos à análise de variância e teste de médias pelo Teste de Tukey com significância de $\alpha = 0,05$, sendo selecionado o comprimento de onda correspondente à maior resposta.

4.4.2 Condições de extração

A otimização do processo de extração da bebida de café foi feita por meio de um delineamento fatorial 3 x 3 x 2 completo, em triplicata, no qual foram avaliados os seguintes fatores: tipo de solvente (água deionizada, metanol:água deionizada (1+1, v/v), metanol:água deionizada (4+1, v/v)), tempo de repouso (20, 40 e 60 min) e

número de extrações (1 ou 2) (Figura 7). Tomou-se 250 μL dos extratos para 1 mL com água deionizada, sendo submetidos à análise espectrofotométrica a 760 nm, conforme definição da etapa anterior, em ordem aleatória.

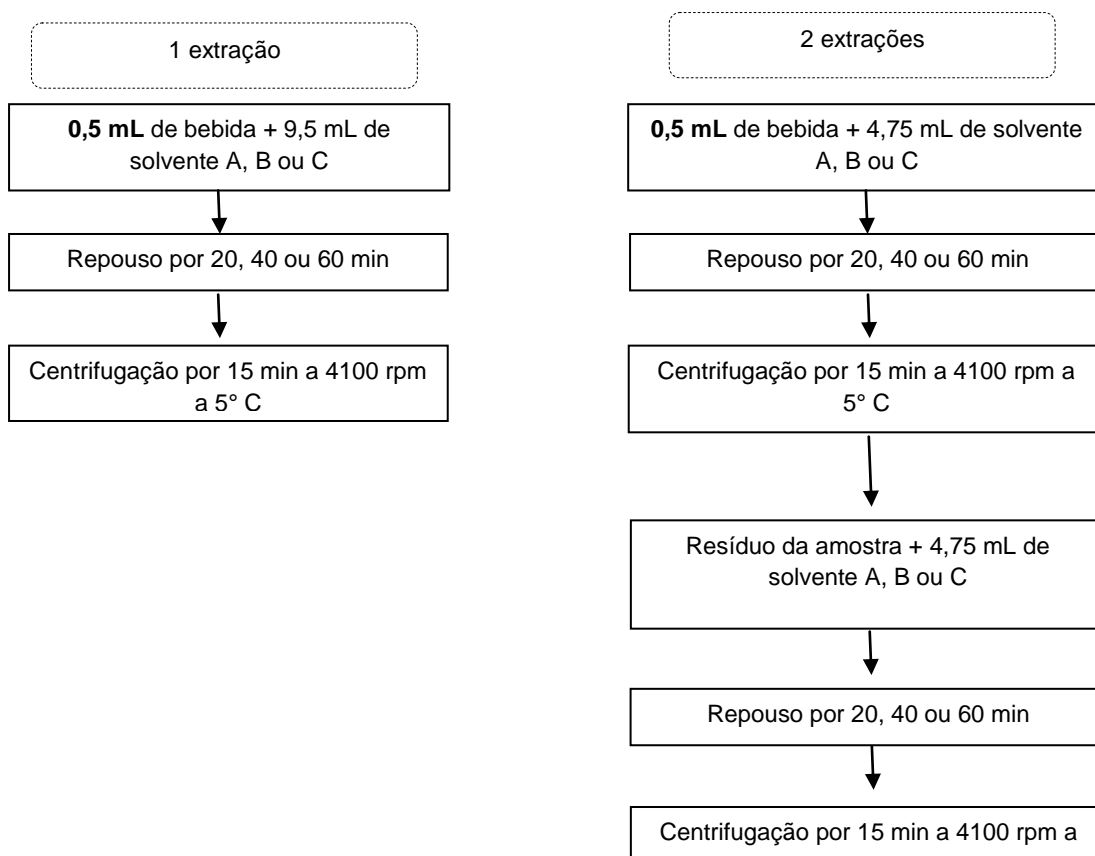


Figura 7 – Representação esquemática da otimização do procedimento de extração, considerando os fatores e respectivos níveis estudados no delineamento fatorial.

Solventes - A: Água, B: Metanol:água deionizada 1+1, v/v, C: Metanol:água 4+1, v/v

Os resultados de absorvância foram submetidos à análise de variância e teste de médias pelo Teste de Tukey com significância de $\alpha = 0,05$. A melhor extração foi aquela que apresentou o maior valor de absorvância.

4.5 Procedimento analítico

Uma alíquota de 500 μL da bebida foi diluída com 9,5 mL de água deionizada em tubo tipo Falcon, por esta ter sido a melhor extração avaliada na etapa anterior. A

solução foi agitada e, posteriormente, 250 μL foram transferidos para outro tubo tipo Falcon, adicionando-se 750 μL de água deionizada. Adicionou-se 5 mL do reagente Folin-Ciocalteu a 10 %, procedeu-se a agitação dos tubos em vórtex e, após 3-8 min, adicionou-se 4 mL de carbonato de sódio a 7,5 %. Agitou-se novamente e as amostras foram colocadas em repouso por duas horas, ao abrigo da luz, sob temperatura de 16-18,5°C, aproximadamente. A leitura espectrofotométrica foi feita a 760 nm, em cubeta de vidro (Figura 8).

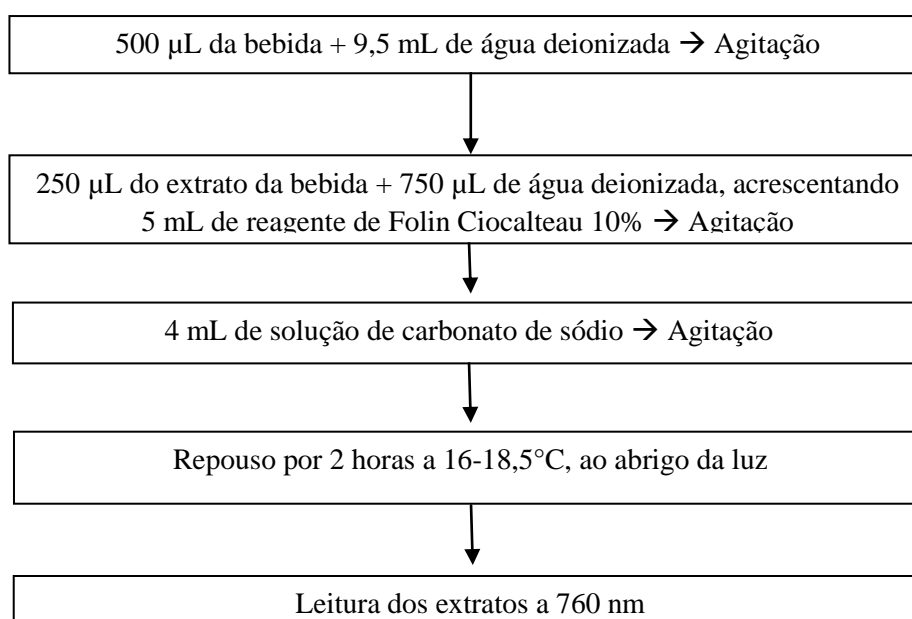


Figura 8 – Representação esquemática do procedimento analítico para determinação da capacidade redutora da bebida de café

A curva matrizada externa foi construída com o ácido gálico (20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0 $\mu\text{g/mL}$). A equação da reta foi utilizada para o cálculo da capacidade redutora de cada amostra, expressando os valores como mg equivalentes de ácido gálico / 100 mL de bebida.

4.6 Validação do método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu

A matriz em questão foi a bebida de café, preparada segundo as recomendações da ABIC (2013a). Utilizou-se 3 g de pó de café, pesados diretamente no coador com

papel filtro. Aqueceu-se 30 mL de água deionizada até atingir $90\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ e procedeu-se a infusão da bebida, com tempo de filtração de 5 min. Após atingir a temperatura entre 17 e 19 $^{\circ}\text{C}$, iniciou-se cada etapa da validação, conforme os parâmetros avaliados.

Os parâmetros de validação avaliados foram: linearidade, efeito de matriz, precisão e seletividade.

4.6.1 Linearidade

A linearidade foi testada na faixa de 20,0 a 60,0 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico, diluído em água deionizada (20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0 $\mu\text{g/mL}$). Cada nível foi analisado em triplicata (Figura 9). Esta faixa foi selecionada após a análise de alíquotas de 500 μL de 3 amostras aleatórias, diluídas 10 vezes, tomando-se 250 μL de cada solução. O valor médio encontrado apresentou absorbância similar a absorbância gerada pelo ponto médio da faixa escolhida, ou seja, entre os níveis 2 e 3.



Figura 9 – Representação esquemática da avaliação da linearidade do método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu para análise de amostras de bebida de café
R – replicata.

A linearidade foi verificada por regressão linear simples ou método dos mínimos quadrados ordinários. O diagnóstico de valores discrepantes (outliers) foi feito pelo teste do resíduo Jackknife e as premissas de normalidade (teste de Ryan-Joiner), homocedasticidade ou homogeneidade das variâncias (teste de Levene), independência (Teste de Durbin-Watson) foram verificadas, além da avaliação da significância da

regressão e ajuste ao modelo linear (teste de F) (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; INMETRO, 2010).

4.6.2 Efeitos de matriz

A avaliação dos efeitos de matriz foi realizada com a bebida de café pela aplicação do método de adição do padrão. Para tanto, construíram-se duas curvas de calibração, sendo cinco níveis de concentração de ácido gálico, mais o branco, em triplicata. Uma curva foi preparada com o ácido gálico diluído em água deionizada (curva usual) e a outra com a adição dos níveis de ácido gálico em extratos obtidos da bebida café (curva matrizada). Procedeu-se a avaliação da linearidade, como descrito no item 4.6.1. A avaliação da interferência da matriz foi feita pela comparação das inclinações das curvas (coeficiente angular), pelo teste de t (SOUZA, 2007).

Como forma de se obter uma avaliação de efeito de matriz representativa 14 amostras foram selecionadas, aleatoriamente, para este experimento.

4.6.3 Interferentes

Para estudo da interferência de agentes externos, utilizou-se o açúcar cristal, por ser um interferente em potencial. Adicionou-se açúcar na concentração de 10 % na água deionizada a 90 °C, antes desta ser vertida sobre o pó, para finalizar o preparo da bebida. Procedeu-se a análise espectrofotométrica da bebida de café com açúcar e sem açúcar. As análises foram realizadas com sete replicatas para cada situação. Compararam-se os valores encontrados em ambas as situações, conforme recomendado por THOMPSON, ELLISON & WOOD (2002).

4.6.4 Precisão

A precisão foi avaliada sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial, para o nível 0 (amostra sem adição de padrão de ácido gálico) e nível 1 de adição do padrão de ácido gálico (500 µL da bebida café + 200 µL da solução padrão de ácido gálico em concentração necessária para se obter uma adição correspondente ao aumento de um nível de concentração na faixa linear). Para isto, 12 replicatas

independentes de cada nível foram preparadas, sendo analisadas em quatro baterias analíticas, com três replicatas de cada nível por bateria. As análises foram conduzidas por dois analistas sendo: bateria 1/analista 1, bateria 2/analista 2, bateria 3/analista 1, bateria 4/analista 2. Em cada bateria as análises foram realizadas em ordem aleatória, juntamente com a curva de calibração matrizada (SOUZA, 2007) (Figura 10).

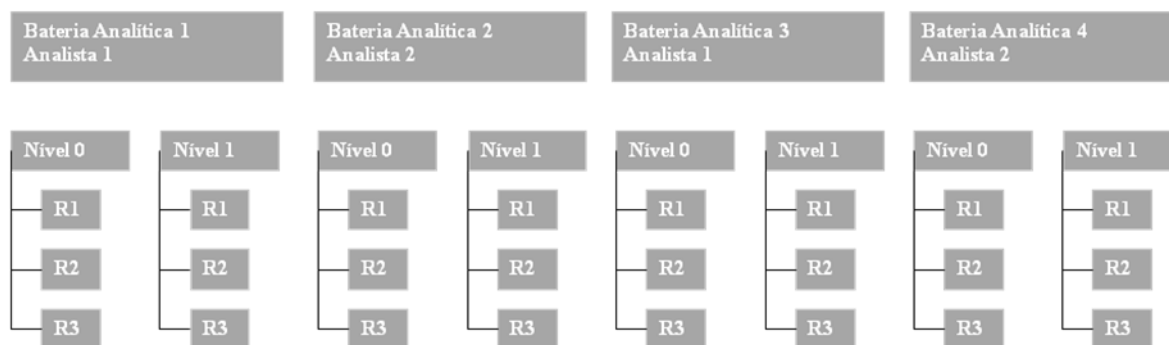


Figura 10 – Representação esquemática da avaliação da precisão do método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu para análise de amostras de bebida de café

R – replicata.

A partir de análises prévias ao estudo de reprodutibilidade e repetitividade constatou-se uma instabilidade da bebida de café, quando armazenada sob refrigeração (4-10°C) por 24 horas. A análise em dias consecutivos foi realizada, pelo mesmo analista e equipamentos, e os resultados do 2º dia eram significativamente menores, observando-se uma possível degradação ou alteração química dos compostos redutores na bebida de café preparada. Portanto, todas as etapas foram realizadas no mesmo dia, divididas em 4 baterias analíticas independentes, visto que a bebida de café armazenada por 24 h não mostrou-se estável. Entre uma etapa e outra a bebida foi acondicionada sob refrigeração (4-10°C).

A presença de outliers foi investigada pelo teste de Grubbs nas condições de reprodutibilidade. O teste de normalidade dos resíduos foi conduzido como descrito por Ryan & Joiner e a homocedasticidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado, pela análise de variância (SOUZA, 2007). A precisão foi expressa em termos de desvio padrão relativo (DPR) sob condições de repetitividade

e reprodutibilidade parcial, e os valores obtidos foram comparados com os valores críticos, segundo a equação de HORWITZ (1982).

A precisão foi avaliada em três cafés de marcas distintas, que apresentavam capacidade redutora em três diferentes níveis da curva de calibração. Isto foi feito com o intuito de avaliar a precisão em diferentes pontos do intervalo linear da curva.

4.6.5 Recuperação

Na ausência de material de referência certificado (MRC) para o escopo analítico em questão, fez-se necessário avaliar a recuperação das amostras adicionadas.

Desta forma, a porcentagem de recuperação foi estimada para as amostras preparadas para o estudo de precisão com adição de ácido gálico na bebida de café. Após tratamento de outliers pelo teste de Grubbs, calculou-se a recuperação média e procedeu-se a comparação com o valor crítico (EC, 2002).

4.7 Determinação da capacidade redutora das bebidas preparadas a partir de amostras de café torrado e moído comercializadas em Belo Horizonte – MG

A bebida de café foi preparada seguindo a recomendação da Associação Brasileira de Indústrias de Café (ABIC, 2013a). Pesou-se 3 g do pó de café diretamente no filtro de papel posicionado no coador. Aqueceu-se 30 mL de água deionizada até atingir a temperatura de $90\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, a qual foi vertida lentamente sobre o pó. O tempo de filtração foi de aproximadamente 5 min. Após a bebida atingir a temperatura compreendida entre 17 e $19\text{ }^{\circ}\text{C}$, procedeu-se a análise espectrofotométrica em ambiente com temperatura controlada entre 16,0 e $18,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, conforme o procedimento analítico descrito anteriormente (Figura 8).

A diferença entre as amostras foi analisada por ANOVA, com nível de significância 0,05. As diferentes marcas foram agrupadas e avaliou-se a diferença entre as denominações (tradicional, extra forte, forte, dentre outras) avaliadas dentro de cada marca.

4.8 Avaliação da influência do preparo da bebida, por infusão e decocção, na capacidade redutora

Para esta avaliação selecionou-se uma amostra aleatória e todos os preparos foram testados com esta mesma amostra. A quantidade de pó utilizado foi 3 g para 30 mL de água, mantendo o percentual de 10 %, conforme recomendado pela ABIC (2013a).

O preparo da bebida foi feito de 2 diferentes maneiras: infusão e decocção com variação da temperatura da água a 90°C e com água fervente (aproximadamente 96-97 °C). O preparo foi feito conforme as recomendações da ABIC (2013), com modificações em relação à temperatura e o tempo de contato do pó com a água. A análise espectrofotométrica foi procedida conforme descrito na Figura 8.

As análises foram realizadas em triplicata e a diferença entre as diversas formas de preparo foi analisada pelo teste de t, com nível de significância de 0,05.

4.9 Análise Colorimétrica

Para a realização das análises colorimétricas as amostras de cafés comerciais foram colocadas em um recipiente de vidro próprio para a análise. O pó de café foi bem compactado no recipiente, a fim de evitar a passagem de luz por entre as partículas. O recipiente foi posicionado no colorímetro e coberto por um recipiente cilíndrico de cor preta, que teve a finalidade de isolar a amostra da luminosidade do ambiente. Foram analisadas 38 amostras em triplicatas. A partir dos resultados obtidos, definiu-se três faixas de valores de L*, a fim de agrupar as amostras entre elas. Além disso, uma única amostra de café cru, 100% arábica, colhidos na região de Araponga – MG, foi torrada em três condições diferentes a fim de se obter valores colorimétricos situados nas três faixas determinadas, utilizados como padrão de torração para cada faixa (clara, média, escura). Totalizou-se, portanto, 41 amostras analisadas.

Os dados (L*, a*, b*) foram utilizados para o cálculo da saturação (c*) e tonalidade (h*), conforme as seguintes equações (BORGES *et al.*, 2002):

$$c^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$
$$h^* = \tan^{-1} (b^*/a^*)$$

A fim de se correlacionar a cor com a capacidade redutora das amostras, calculou-se o índice de correlação (r) entre os valores de L^* e os valores obtidos na análise espectrofotométrica de Folin Ciocalteu, com nível de significância $p < 0,05$. Esta correlação foi calculada para todas as amostras, assim como para cada marca de café analisada, representadas como grupos amostrais.

4.10 Sondagem da região do espectro obtido pela análise no infravermelho médio

Foram selecionadas amostras de café 100% arábica torradas sob condições específicas: 240°C por 10 minutos (torração clara), 240°C por 11 minutos (torração média) e 240°C por 12 minutos (torração escura), representadas pelas amostras de número 42, 43 e 44, respectivamente.

Estas amostras foram analisadas por espectroscopia no infravermelho (FTIR), a fim de se encontrar uma faixa nos espectros obtidos que se correlacionasse, de maneira qualitativa, com os valores espectrofotométricos obtidos e avaliar possível discriminação dos espectros em relação aos diferentes graus de torração.

A análise de FTIR foi conduzida utilizando-se o acessório fornecido pela Shimadzu para análise por ATR (8200H/8200HA), equipado com um prisma côncavo de ZnSe. O espaço delimitado pelo prisma foi preenchido com gotas do extrato aquoso, sendo o volume suficiente para preencher o compartimento de leitura. O branco foi efetuado com água destilada. Todos os espectros foram obtidos na faixa de 3080-680 cm^{-1} , com resolução nominal de 4 cm^{-1} , 20 *scans* e apodização *Happ-Genzel*.

As amostras de café em pó foram preparadas seguindo a metodologia proposta por WANG *et al.* (2009), com algumas adaptações segundo estudos prévios no Laboratório de Biocombustíveis da Escola de Engenharia Mecânica da UFMG. Pesou-se 4 g de pó em um béquer, adicionou-se 20mL de água destilada e a solução foi colocada em banho-maria a 90°C por 20 minutos. Em seguida procedeu-se a filtração em filtro de papel da marca Melitta. As amostras foram armazenadas sob refrigeração (4-10°C) até o momento das análises.

Os espectros foram exportados para o Software Microsoft Excel 2010 e normalizados por altura na faixa de 3080-680 cm^{-1} . Foi feita a análise qualitativa dos

mesmos, relacionando algumas bandas com possíveis constituintes das amostras, assim como foi feita uma sondagem de quais regiões do espectro poderiam se correlacionar qualitativamente com os valores de capacidade redutora das diferentes amostras avaliadas.

5 Resultados e Discussão

5.1 Otimização

5.1.1 Condições de quantificação espectrofotométrica

A leitura espectrofotométrica entre 640 e 800 nm foi realizada nas alíquotas de extrato da bebida de café, extrato da bebida adicionada de ácido gálico e somente ácido gálico.

Os resultados da varredura estão representados na figura 12. A resposta de ambas as alíquotas analisadas foi semelhante, com o pico de leitura ocorrendo em aproximadamente 750-770nm. Segundo a análise de variância (ANOVA), não houve diferença entre os valores de absorvância obtidos dentro da faixa ($p > 0,05$), portanto, definiu-se o comprimento de onda pela análise visual das curvas obtidas em cada situação (Figura 11). Estabeleceu-se 760nm para o presente estudo, corroborando com SINGLETON, ORTHOFER & LAMUELA-RAVENTO (1999).

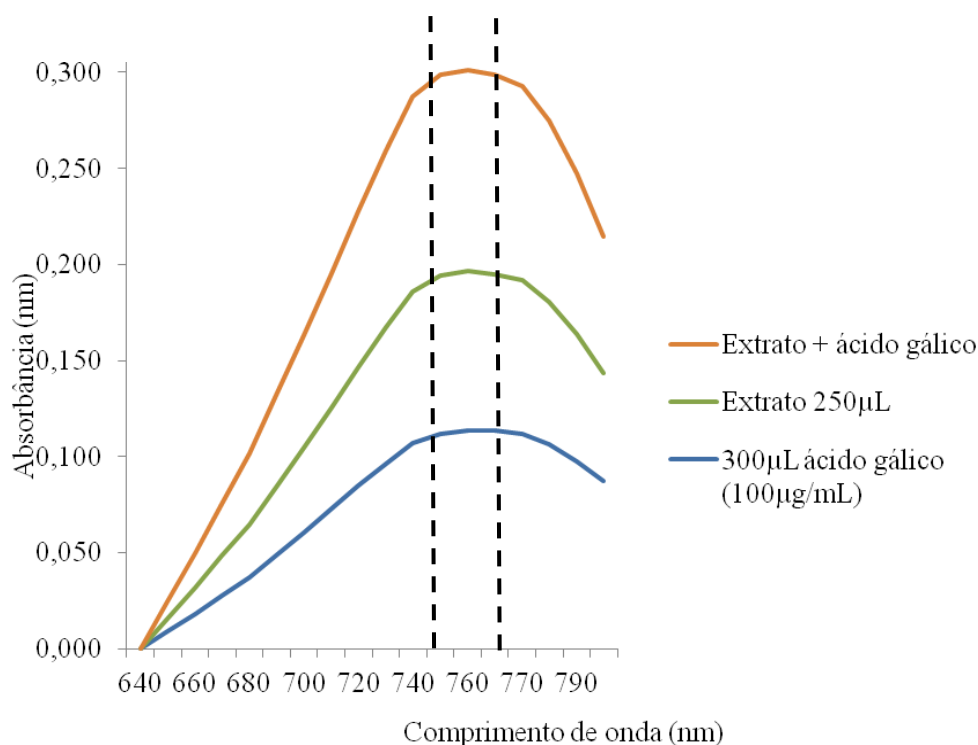


Figura 11 – Varredura espectrofotométrica de 640 a 800 nm do extrato da bebida de café, solução padrão de ácido gálico e extrato da bebida de café adicionado de solução padrão de ácido gálico.

5.1.2 Condições de extração

O planejamento fatorial garante o estudo de diferentes variáveis, como tempo, razão amostra/solvente, temperatura, solvente utilizado, com um número reduzido de experimentos, sem comprometer o trabalho, além de ser uma ferramenta estatística simples, proporcionando economia de tempo e recursos financeiros, e permitindo-se evitar o método da tentativa e erro (RODRIGUES & LEMMA, 2005; SILVA *et al.*, 2008).

De acordo com o delineamento fatorial realizado, não se observou diferença significativa entre os tratamentos avaliados, considerando-se os fatores de extração que foram avaliados nos 18 tratamentos ($p > 0,05$). Os fatores tempo de repouso, solvente e número de extrações não tiveram influência significativa ($p > 0,05$) no processo de extração, segundo a análise de ANOVA e o Teste de Tukey. Concluiu-se então que a

maior parte dos compostos redutores foi extraída durante o preparo da bebida, não sendo necessária uma etapa adicional de extração.

A utilização de água como solvente para extração de compostos fenólicos pode ser observada em alguns estudos. VIGNOLI (2009) utilizou o extrato aquoso para quantificação de compostos fenólicos, sendo o mesmo preparado com 50mL de água a 95°C em contato com 0,15g de pó de café por cinco minutos sob agitação, seguido de filtração com filtro de papel Whatman n.4. LIMA, PEREIRA & ABRAHÃO (2010), assim como ABRAHÃO *et al.* (2010) adicionaram 100mL de água destilada a 90°C a 10g de pó de café torrado, seguido de filtração em filtro de papel (Whatman n.3). Pode-se constatar que em todas estas técnicas citadas, o método de extração foi muito semelhante ao processo de preparo da bebida, como feito no presente estudo.

Em função dos resultados obtidos, avaliou-se a influência da etapa de centrifugação e do tempo de repouso na extração dos compostos com capacidade redutora presentes na bebida de café, visto que esta etapa de centrifugação foi contemplada por SINGLETON & ROSSI (1999). Conforme demonstrado na tabela 4, a etapa de centrifugação precedida de 20 minutos de repouso dos extratos, gerou valores finais de absorvância inferiores à condição pré centrifugação sem repouso (Teste t student, $p < 0,05$). Conclui-se, portanto, que não é necessário centrifugar os extratos, nem deixa-los em repouso, após o preparo da bebida, garantindo-se, portanto, maior agilidade do método.

Tabela 4 – Valores de absorvância da análise espectrofométrica do extrato de bebida de café submetido ou não à centrifugação

	Antes centrifugação	Após centrifugação
Absorvância (nm) Média ± DP	0,330 ± 0,005	0,323 ± 0,003*

*Diferença entre tratamentos, $p < 0,05$ (ANOVA)

Dessa forma, definiu-se que nenhuma etapa de extração seria necessária após o preparo da bebida. Somente uma diluição da bebida pronta foi necessária para se atingir valores de absorvância entre 0,1 e 1,0 nm. Portanto, uma alíquota de 500 µL da bebida

foi pipetada em tubo falcon e adicionou-se 9,5 mL de água deionizada. Desta solução diluída pipetou-se a alíquota para ser utilizada na análise espectrofotométrica.

5.2 Validação

5.2.1 Linearidade

A faixa linear foi de 20,0 e 60,0 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico em solução aquosa (20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 12).

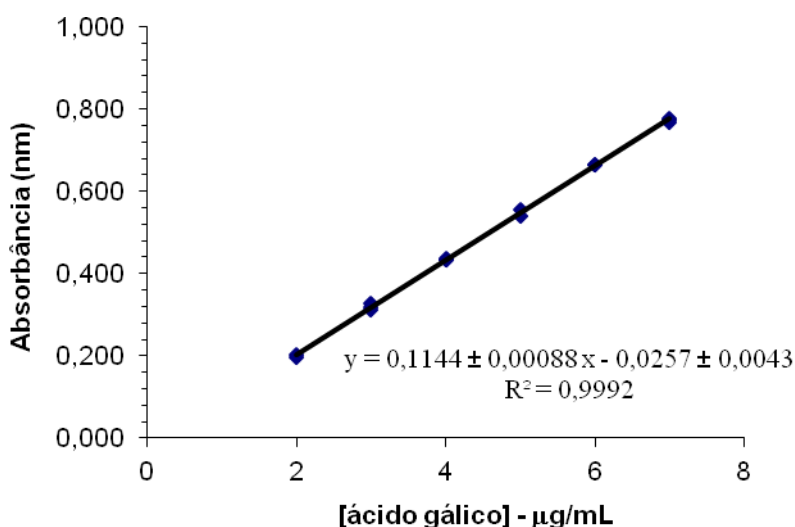


Figura 12 – Curva de calibração de ácido gálico para análise espectrofotométrica a 760nm

Foram retirados três outliers da curva padrão, segundo o teste do resíduo Jacknife e todas as premissas da regressão linear foram confirmadas, de forma que os resíduos seguiram a normal, não apresentaram auto correlação e foram homocedásticos. Por fim, a regressão foi significativa e não houve desvio da linearidade. Estes resultados comprovaram, portanto, a linearidade (Tabela 5).

Tabela 5 - Avaliação da linearidade para ácido gálico

Estatística	Premissa
<i>Normalidade</i>	
<i>R</i>	0,9846
<i>p</i>	p>0,10
<i>Homoscedasticidade</i>	
<i>t_L</i>	0,58
<i>p</i>	0,57
<i>Independência</i>	
<i>d</i>	1,79
<i>p</i>	p<0,05
<i>Regressão</i>	
<i>F</i>	16892,70
<i>p</i>	p<0,05
<i>Desvio da linearidade</i>	
<i>F</i>	1,016
<i>p</i>	p>0,05

R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, *p* = significância, *t_L* = estatística *t* de Levene, *d* = estatística de Durbin-Watson, *F* = razão entre variâncias.

No estudo de Vignoli (2009), a linearidade do método de Folin-Ciocalteu foi estudada na faixa de 0,5 a 7,0 mMol de ácido gálico, considerando-a linear por apresentar valores de $R \geq 0,99$ para $p \leq 0,01$. As premissas da linearidade não foram testadas no estudo em questão.

5.2.2 Efeito de Matriz

A bebida de café apresentou efeito de matriz ($p < 0,05$), com base na comparação das inclinações das curvas (SOUZA, 2007) (Tabela 6).

Pressupondo que a água como solvente poderia ter sido a responsável pela extração de compostos interferentes, testou-se o efeito de matriz utilizando o metanol como solvente, com o intuito de avaliar se não haveria efeito de matriz. Entretanto, a interferência permaneceu ($p < 0,05$), concluindo que a matriz possui interferentes, os quais foram extraídos com ambos os solventes (Tabela 6).

Tabela 6 – Avaliação dos efeitos de matriz pela comparação das inclinações das curvas usual e matrizada, tendo água deionizada e metanol como solventes

Solvente	Inclinação das curvas e respectivos erros padrão		<i>t</i>
Água	$0,1158 \pm 0,0012$	$0,0998 \pm 0,0014$	8,54
Metanol	$0,1218 \pm 0,0007$	$0,1121 \pm 0,0011$	7,38

t = estatística t para contrastes entre inclinações, nível de significância $p < 0,05$

Em vista disto, os demais parâmetros da validação foram avaliados usando-se curvas matrizadas.

Considerando que a análise espectrofotométrica foi realizada em várias amostras comerciais de café, testou-se o efeito de matriz em amostras adicionais, selecionadas aleatoriamente, para se comprovar a necessidade de se usar a curva matrizada nas análises da capacidade redutora de todas as amostras (Tabela 7). Como pode-se observar na Figura 13, o efeito de matriz foi confirmado para todas as amostras selecionadas.

Tabela 7 – Inclinação das curvas usual e matrizada preparadas com diferentes bebidas de café

Amostra (n° identificação)	Inclinação das curvas e respectivos erros padrão		t
4	0,1204 ± 0,0009	0,1020 ± 0,0016	6,36
16	0,1204 ± 0,0009	0,1040 ± 0,0011	11,17
18	0,1204 ± 0,0009	0,1046 ± 0,0011	10,80
24	0,1204 ± 0,0009	0,1026 ± 0,0012	11,99
25	0,1204 ± 0,0009	0,1044 ± 0,0009	12,34
26	0,1204 ± 0,0009	0,1045 ± 0,0006	14,71
27	0,1190 ± 0,0005	0,1086 ± 0,0005	17,69
31	0,1204 ± 0,0009	0,0942 ± 0,0063	4,13
32	0,1204 ± 0,0009	0,1091 ± 0,0001	7,56
33	0,1204 ± 0,0009	0,1078 ± 0,0007	10,73
39	0,1190 ± 0,0005	0,1068 ± 0,0011	9,71
40	0,1190 ± 0,0005	0,1040 ± 0,0012	11,54
41	0,1190 ± 0,0005	0,1123 ± 0,0005	8,98

t = estatística t para contrastes entre inclinações, nível de significância $p < 0,05$

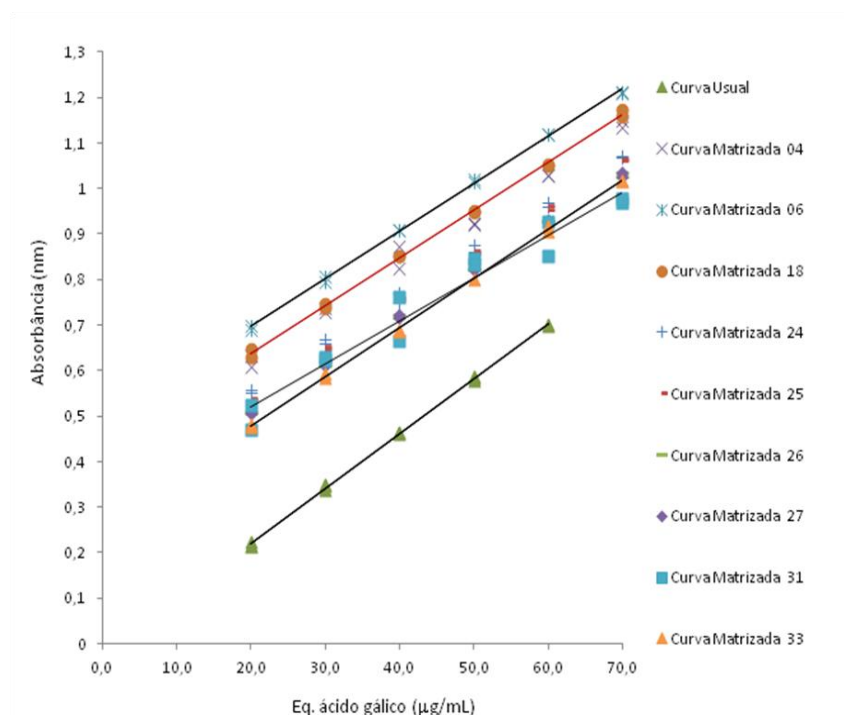


Figura 13 – Representação das curvas usual e matrizada preparadas com diferentes bebidas de café.

Não foram encontrados estudos que avaliaram o efeito de matriz para a metodologia de Folin-Ciocalteu em café. Vignoli (2009) pontuou que a ausência do estudo do efeito de matriz para a matriz café deveu-se ao fato de a atividade antioxidante ter sido avaliada em uma matriz complexa e não em um composto isolado.

5.2.3 Precisão

Avaliando a precisão sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial, a partir do cálculo dos respectivos desvios-padrão (DPR_r e DPR_R) e considerando os limites críticos calculados pela equação de HORWITZ (1982), somente o nível 0 apresentou precisão dentro dos limites aceitáveis.

A avaliação da precisão no nível 0 (sem adição de ácido gálico) foi feita para três cafés de marcas distintas (1, 23 e 29), os quais apresentavam valores de capacidade redutora em três níveis distintos da curva de calibração, correspondendo aos níveis 3, 4 e 5. Para a amostra 1, o valor crítico calculado pela equação de Horwitz foi de 12,34 para DPR_R e 8,22 para DPR_r . Os valores de DPR_R e DPR_r obtidos foram 5,52 e 1,86. Para a amostra 23, o valor crítico foi de 13,58 para DPR_R e 9,05 para DPR_r . Os valores de DPR_R e DPR_r obtidos foram 7,49 e 2,01. Para a amostra 29, o valor crítico calculado pela equação de Horwitz foi de 18,37 para DPR_R e 12,24 para DPR_r . Os valores de DPR_R e DPR_r obtidos foram 2,58 e 1,90 (Tabela 8).

Tabela 8 – Desvios-padrão de repetitividade (DPR_r) e reprodutibilidade parcial (DPR_R) obtidos na avaliação da precisão do nível 0, sem adição, de três amostras comerciais

Amostras	Nível	DPR_R (%)		DPR_r (%)	
		Valor crítico (Horwitz, 1982)	Valor obtido	Valor crítico (Horwitz, 1982)	Valor obtido
1	3	12,34	5,52	8,22	1,86
23	4	13,58	7,49	9,05	2,01
29	5	18,37	2,58	12,24	1,9

Para o nível 1 de adição, testado somente para a amostra 1, os desvios-padrão de repetitividade e reprodutibilidade parcial encontraram-se acima dos limites

estabelecidos. O valor crítico calculado pela equação de Horwitz foi de 2,88 para DPR_R e 1,92 para DPR_r . Os valores de DPR_R e DPR_r obtidos foram 26,83 e 26,31.

Considerando a discrepância dos valores obtidos para o nível 1, testes adicionais foram realizados, reduzindo a temperatura ambiente para 17°C como forma de avaliar se a discrepância dos valores reduziria. Após proceder toda a bateria analítica em ambiente refrigerado (aproximadamente 17°C) os DPR_R e DPR_r obtidos para o nível 1 ainda apresentaram-se acima dos limites calculados. O valor crítico calculado pela equação de Horwitz foi de 3,69 para DPR_R e 2,46 para DPR_r . Os valores de DPR_R e DPR_r obtidos foram 25,27 e 15,18 (tabela 9).

Tabela 9 – Desvios-padrão de repetitividade (DPR_r) e reprodutibilidade parcial (DPR_R) obtidos na avaliação da precisão do nível 1 de adição da amostra 1, em temperatura ambiente (aprox. 24°C) e ambiente refrigerado (aprox. 17°C)

Temperatura	DPR_R		DPR_r	
	Valor crítico (HORWITZ, 1982)	Valor obtido	Valor crítico (HORWITZ, 1982)	Valor obtido
Ambiente	2,88	26,83	1,92	26,31
Aprox. 17°C	3,69	25,27	2,46	15,18

Esta discrepância de valores pode ser explicada por uma possível sinergia do ácido gálico com a matriz, que ocorre de maneira diferente entre as amostras, de acordo com a composição específica de cada uma. Esta reação provavelmente é influenciada pelo tempo, temperatura e agitação, dentre outros fatores desconhecidos. A influência destas variáveis não foi testada separadamente, visto a gama de fatores possivelmente responsáveis pelo antagonismo ou agonismo em relação à reação com o reagente Folin-Ciocalteu.

O uso de um outro padrão pode ser sugerido com o intuito de se encontrar menos disparidade de valores, caso seja um padrão menos reativo aos componentes da amostra, entretanto, tais testes não foram realizados no presente estudo.

A precisão intermediária também foi avaliada no estudo de Vignoli (2009) a partir da análise inter-dias, com análises feitas em dias diferentes com diferentes

analistas. A avaliação da precisão foi realizada de acordo com a ISO 5725 de 1994 e NBR 14597 (2000), realizando-se 5 repetições (preparações independentes) em três concentrações diferentes para o café torrado (2,0; 3,0 e 5,0 mMol/L ác.gálico / mg.mL⁻¹), durante 5 dias consecutivos. O coeficiente de variação médio obtido foi 2,89%, sendo, portanto, adequado segundo a Resolução 899 , de 23 de Maio de 2003, da Anvisa.

5.2.4 Recuperação

A recuperação média do Nível 1 foi de $123,03 \pm 32,28\%$, apresentando-se acima dos valores aceitáveis (entre 80 e 110%) (EC, 2002).

Vários testes adicionais foram realizados com o intuito de melhorar os valores obtidos, alcançando a faixa de recuperação ideal. A primeira suposição para os valores discrepantes foi em relação à reatividade do ácido gálico com a bebida de café. Especulou-se que a redução da temperatura reduziria esta reatividade e geraria valores adequados.

Para testar o efeito da temperatura no ensaio de recuperação, as análises foram todas feitas em ambiente refrigerado (aproximadamente 17°C) e obteve-se $73,25 \pm 17,40$. O valor médio da recuperação apresentou-se relativamente menor ($123,03 \pm 32,28\%$ vs $73,25 \pm 17,40$), e apresentou-se abaixo da faixa recomendada (Tabela 10).

Tabela 10 – Avaliação da recuperação de análises espectrofotométricas Folin-Ciocalteu realizadas à temperatura ambiente e em ambiente refrigerado

	Temperatura ambiente (aprox. 25°C)	Ambiente refrigerado (aprox. 17°C)
Recuperação Média	123,03%	73,25%

Observa-se uma tendência de redução da recuperação com o decaimento da temperatura. Entretanto, os desvio-padrão sob condições de repetitividade e

reprodutibilidade de todas as análises apresentaram-se acima dos valores críticos, o que indica uma não conformidade da interação ácido gálico – matriz com a redução sequencial da temperatura.

Alguns fatores podem ser responsáveis por esta divergência de resultados: 1) o reagente Folin-Ciocalteu sofre uma reação de redução quando em contato com hidroxilas reativas da matriz em questão. A bebida de café contém diversos compostos reativos, por possuírem grupos –OH livres, citando-se os compostos fenólicos, melanoidinas, cafeína, trigonelina e açúcares redutores. O ácido gálico também é reativo ao Folin-Ciocalteu, mas também pode interagir com a matriz café de maneira não avaliada no presente estudo. Desta forma, a reação dos compostos redutores do café, assim como do ácido gálico, com o reagente fica prejudicada, o que gera resultados discrepantes. 2) A complexidade do café, e de sua bebida, pode também ser responsável pela divergência de resultados, visto que a interação dos compostos presentes no café pode influenciar a reatividade destes com o ácido gálico. 3) Parâmetros analíticos como tempo, temperatura, diluições e agitação podem influenciar de maneira distinta cada replicata da análise, visto que pequenas diferenças podem ocorrer nestes parâmetros ao longo da bateria analítica, mas que podem influenciar de forma intensa a reação em cada alíquota de amostra, gerando resultados discrepantes. 4) O ácido gálico é um fenólico pouco presente na matriz café. A utilização de um fenólico de presença predominante poderia gerar resultados mais satisfatórios, visto que a reatividade do mesmo poderia ser menor quando comparada ao ácido gálico. Entretanto, não testou-se tal fato no presente estudo, sendo necessário estudar a recuperação utilizando-se outros padrões analíticos.

Não foram encontrados estudos que avaliaram o parâmetro recuperação para amostras de café analisadas pelo método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu.

5.2.5 Interferência do açúcar

Não houve diferença da absorbância medida na bebida preparada com e sem açúcar, sob as mesmas condições de temperatura e concentração (Tabela 11). Para a bebida sem açúcar, a média dos valores de absorbância foi de $0,449 \pm 0,006$ nm e para a bebida com açúcar $0,454 \pm 0,007$ nm (Teste t student; $p > 0,05$).

Tabela 11 – Resultados de absorvância da análise espectrofotométrica Folin-Ciocalteu do café bebida com e sem açúcar

Presença do interferente açúcar na bebida de café	Média (nm)	DP
Sim	0,454	0,007
Não	0,449	0,006

Teste t student; p<0,05

5.3 Determinação da capacidade redutora das bebidas preparadas a partir de amostras de café torrado e moído comercializadas em Belo Horizonte – MG.

Ao comparar os valores de capacidade redutora de todas as amostras de café comerciais observou-se que as amostras apresentaram diferenças entre si ($p<0,05$).

Os valores de capacidade redutora encontrados para as 38 amostras comerciais analisadas variaram de 217,09 a 459,51 mg equivalentes de ácido gálico / 100mL de bebida. Não foi observada nenhuma tendência de valores que explicasse alguma similaridade entre as denominações de cada marca analisada. Tal fato pode ser explicado pela grande variedade de *blends* obtidos pelos fabricantes, assim como condições diversificadas de torração, com variáveis de tempo e temperatura desconhecidas. SOUZA *et al.* (2010) analisaram alguns compostos bioativos em cafés comerciais de mercado com diferentes denominações. Observou-se, apesar da pequena variação da torração, grande diversidade na composição, indicando prováveis diferenças nas matérias primas e espécies de café utilizadas nos *blends*. É provável que esta heterogeneidade na composição acarrete, também, diversidade na atividade antioxidante, expressa no presente estudo pela capacidade redutora.

ALMEIDA & BENASSI (2011) analisaram cafés torrados e moídos comerciais através das metodologias de ABTS e Folin-Ciocalteu com o intuito de se relacionar as diferenças na composição das amostras com a atividade antioxidante das mesmas. Observou-se grande variabilidade dos valores encontrados para ambas as metodologias e ausência de relação direta entre a presença de melanoidinas e as denominações tradicional, forte ou extra-forte. SOUZA *et al.* (2010) também não relatou correlação

entre a denominação comercial indicativa de torração com a degradação de compostos termolábeis, incluindo o ácido clorogênico 5-cafeoilquínico.

Visto esta grande variabilidade e ausência de relação direta entre a capacidade redutora e as denominações empregadas para os cafés (tradicional, forte, extra forte, gourmet, etc), cada marca foi analisada separadamente, como forma de encontrar alguma variação semelhante dentro de cada grupo. Mesmo assim, vale ressaltar que, para cada marca, o *blend* correspondente pode ser variável, até mesmo comparando denominações distintas dentro de uma mesma marca, visto que a informação do fabricante não enfatiza o percentual de cada variedade de café na composição final do produto.

Para a marca 1, duas de suas 6 denominações de cafés, apresentaram os maiores valores, quando comparadas às demais amostras, de outras marcas. A denominação gourmet e extra forte apresentaram os maiores valores do grupo, seguidas da denominação descafeinado, orgânico e tradicional, em ordem decrescente de capacidade redutora. De acordo com a embalagem, todas as denominações desta marca foram submetidas à torração média (Figura 14).

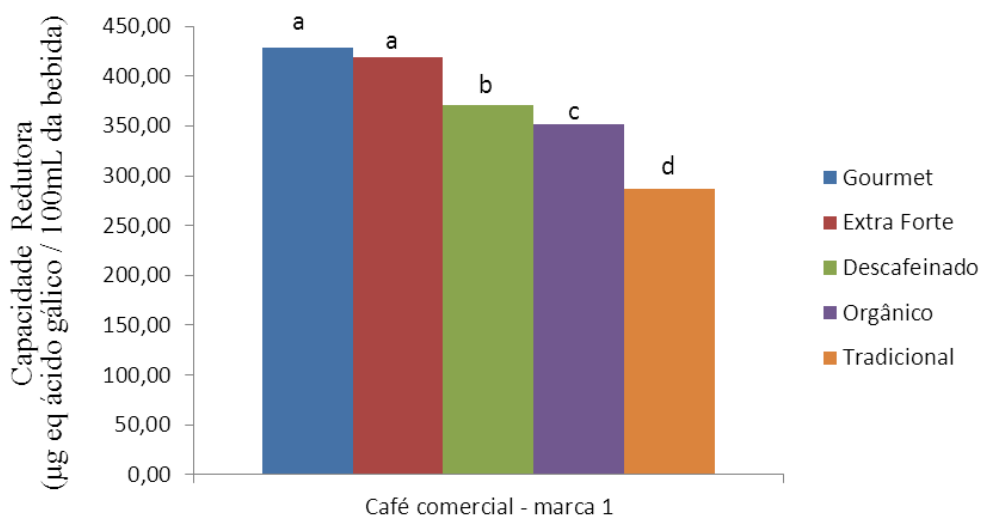


Figura 14 – Capacidade redutora de amostras de café comercial da marca 1 ($p < 0,05$). Letras iguais indicam ausência de diferença pelo teste de ANOVA a 5% de probabilidade.

A denominação comercial de torra informada pelo fabricante para os cafés Gourmet e orgânico é a mesma. Devido a esta similaridade do grau de torra informado,

esperava-se valores mais convergentes destas duas denominações, visto que ambos são compostos pela variedade de café arábica, segundo o fabricante. Entretanto, a denominação gourmet apresentou o maior valor da amostragem em questão, enquanto a denominação orgânica apresentou valores inferiores. Tal fato deve-se dar pela diferença no cultivo de ambas as denominações, visto que a gourmet vem de um cultivo convencional e a orgânica de um cultivo orgânico. Sugere-se, na literatura, que o cultivo orgânico resulta em alimentos com teores maiores de polifenóis, podendo ser explicado pela maior exposição da planta a situações de estresse, devido a ausência da proteção pelos pesticidas sintéticos, levando ao aumento da produção de substâncias naturais defensoras, como os compostos fenólicos (WINTER & DAVIS, 2006). Entretanto, relação inversa foi encontrada no presente estudo, visto que a denominação Gourmet apresentou valores maiores de capacidade redutora quando comparada à orgânica.

CARVALHO *et al.* (2011) reportaram um maior teor de ácidos clorogênicos, analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, no café arábica orgânico quando comparado ao convencional, cultivados no mesmo solo e clima, variando apenas o adubo. Por outro lado, estudos revelam poucas ou inconsistentes diferenças na composição nutricional de produtos alimentares orgânicos e convencionais (BOURN & PRESCOTT, 2002). FALLER & FIALHO (2010) avaliaram a diferença no teor de polifenóis entre frutas orgânicas e convencionais, como banana, laranja, maçã, mamão, manga e tangerina, e não encontraram diferenças significativas na fruta como um todo. Entretanto, as cascas das frutas orgânicas demonstraram maior teor de polifenóis, quando comparadas às suas correspondentes convencionais. Sugere-se, portanto, um aumento da produção de substâncias protetoras somente nas camadas mais externas, ressaltando-se que esta resposta não foi semelhante a todas as frutas, sugerindo efeitos específicos a determinados alimentos. Portanto, considerando a diferença entre a denominação *Gourmet* e orgânica 100% arábica da marca 1, avaliada no presente estudo, pode ou não ser devido à diferença na forma de cultivo. De acordo com os resultados obtidos, o cultivo orgânico gerou menores valores de capacidade redutora para o café analisado. Entretanto, diferenças no solo, clima e até mesmo nas condições de torração comercial podem ter sido responsáveis por esta diferença, ao invés da forma de cultivo, por si só.

A espécie de café Robusta é conhecida por seu maior conteúdo de ácidos clorogênicos comparado à espécie Arábica (7-10% *versus* 5-7,5% nos grãos crus)

(CLARKE & MACRAE, 1985; VIGNOLI, 2009) e esses compostos contribuem para a capacidade redutora das amostras. As denominações extra forte, descafeinada e tradicional são compostas por *blends* de café, provavelmente arábica e robusta, visto o não fornecimento desta informação por parte do fabricante. Devido ao maior teor de ácidos clorogênicos do café robusta, esperava-se uma ordem diferente dos valores encontrados para as amostras da marca 1, sendo que a denominação *Gourmet*, que não possui café robusta em sua composição, não deveria apresentar os maiores valores de capacidade redutora. Pressupõe-se que houve alguma diferença no processo de torrefação, uma proporção de café arábica e robusta divergente entre as amostras ou até mesmo diferenças no processo de envase e armazenamento que possa ter preservado o conteúdo de compostos redutores da denominação *Gourmet*. Outra explicação para esta divergência seria as transformações que ocorrem no processo de torrefação, que levam à degradação dos ácidos clorogênicos em seus derivados ou sua incorporação a melanoidinas, alterando o perfil redutor final de cada amostra (CLIFFORD, 2000; MONTEIRO & TRUGO, 2005; FARAH *et al.*, 2005).

Para a marca 2, a denominação tradicional apresentou o maior valor, seguida das denominações estrada real, mais forte e extra forte. Na embalagem dos cafés desta marca, não havia informações sobre o grau de torração (Figura 15).

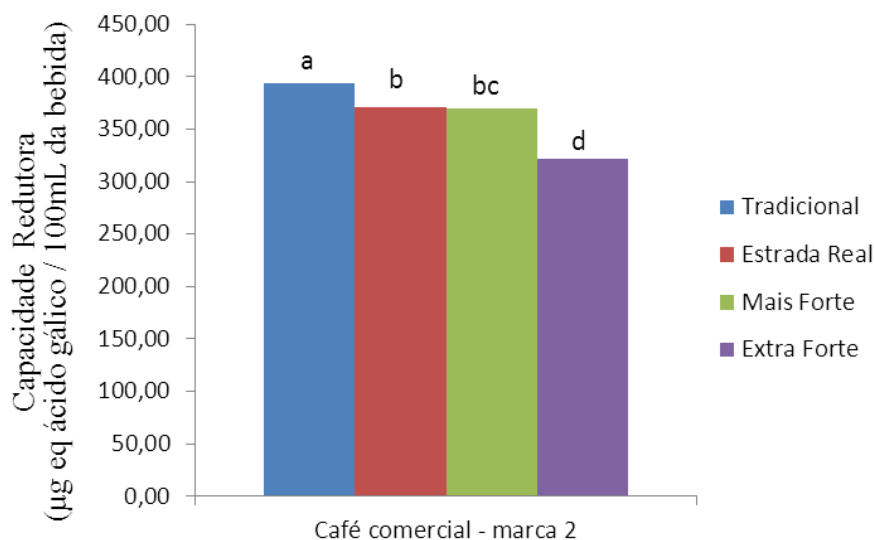


Figura 15 – Capacidade redutora de amostras de café comercial da marca 2 ($p < 0,05$). Letras iguais indicam ausência de diferença pelo teste de ANOVA a 5% de probabilidade.

Segundo a análise colorimétrica, considerando os valores de luminosidade (L) das amostras, a denominação tradicional apresentou o maior valor de L ($20,87 \pm 0,12$), sendo considerada, portanto, a amostra com grau de torração menor. Lembrando que há um consenso na literatura de que o valor de luminosidade é inversamente proporcional ao grau de torração, ou seja, quanto maior o grau de torração, menor é a luminosidade e vice-versa (ALMEIDA *et al.*, 2006; SOMPORN *et al.*, 2011; REIS, 2012).

Pressupõe-se que, para esta marca, a redução do grau de torração levou ao aumento da capacidade redutora, se levar-se em consideração que a denominação tradicional apresentou o maior valor de capacidade redutora. Entretanto, estudos anteriores encontraram relação inversa da encontrada para estas amostras da marca 2. Especula-se que haja formação de compostos fenólicos ao longo da torração, a partir de compostos que não sejam fenólicos (BEKEDAM *et al.*, 2006), assim como a alta temperatura do processo de torrefação do café leva à destruição de alguns compostos fenólicos e favorece o desenvolvimento de outras substâncias antioxidantes (ARAÚJO, 2007), ressaltando as melanoidinas (DAGLIA *et al.*, 2000; ITO *et al.*, 2005). Contrapondo os autores supracitados, Almeida et al (2011) afirmam que torras muito acentuadas podem levar à degradação de compostos bioativos, os quais podem contribuir para a redução da capacidade redutora final. Levando-se em conta esta divergência entre os estudos, especula-se que, para a marca 2, os valores menores de capacidade redutora encontrados para as denominações estrada real, mais forte e extra forte, com luminosidade menor que a tradicional ($L = 20,15 \pm 0,19$; $18,45 \pm 0,21$ e $20,15 \pm 0,11$, respectivamente) se dá pela divergência do processo comercial de torração entre as mesmas, levando a degradação de alguns compostos, assim como a formação de outros com potencial redutor. Como não se avaliou o perfil de compostos redutores no presente estudo, e sim a capacidade redutora final, não se pode discutir em relação à formação e/ou degradação de compostos específicos.

Para a marca 3, a denominação sabor e leveza apresentou os maiores valores de capacidade redutora, seguida das denominações intenso e solúvel e depois reserva especial, orgânico e café forte do Brasil, sendo que este último apresentou valor menor que a maioria dos cafés comerciais. Segundo a embalagem, a denominação “sabor e leveza” sofreu torração média, as denominações intenso e café forte do Brasil – torração

forte, a solúvel - torração acentuada, reserva especial – forte e orgânico – acentuada (Figura 16).

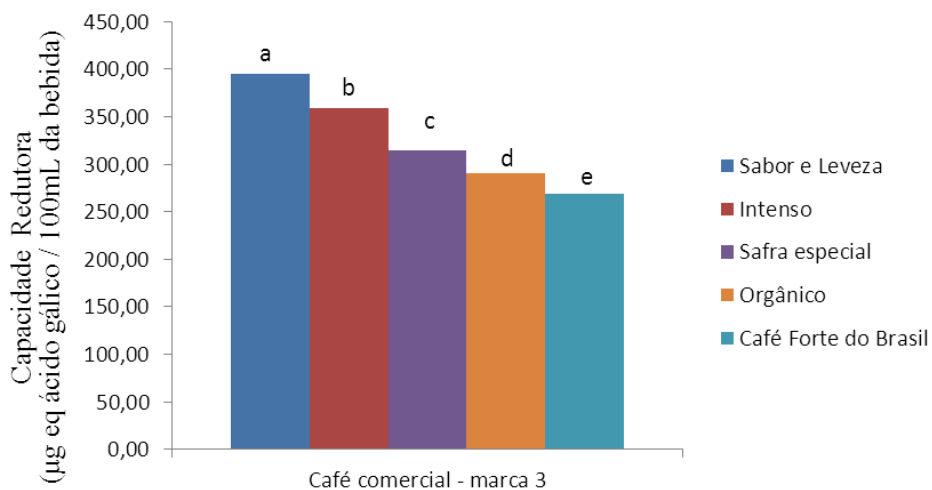


Figura 16 – Capacidade redutora de amostras de café comercial da marca 3 ($p < 0,05$). Letras iguais indicam ausência de diferença pelo teste de ANOVA a 5% de probabilidade.

O maior valor encontrado para a denominação “sabor e leveza” pode também ser explicado pelo grau de torração, indicado como médio pelo fabricante, sendo, portanto, menos intenso que o das outras denominações. O valor de L^* também apresentou como o maior da marca 3 ($21,01 \pm 0,13$), constatando o grau de torração mais leve em comparação com as demais denominações.

E, por fim, para a marca 4, a denominação solúvel apresentou o maior valor, seguida do tradicional, descafeinado, forte e extra forte, sendo que esta última denominação apresentou valor menor que a maioria dos cafés comerciais. De acordo com a embalagem, todas as denominações desta marca foram submetidas à torração média (Figura 17).

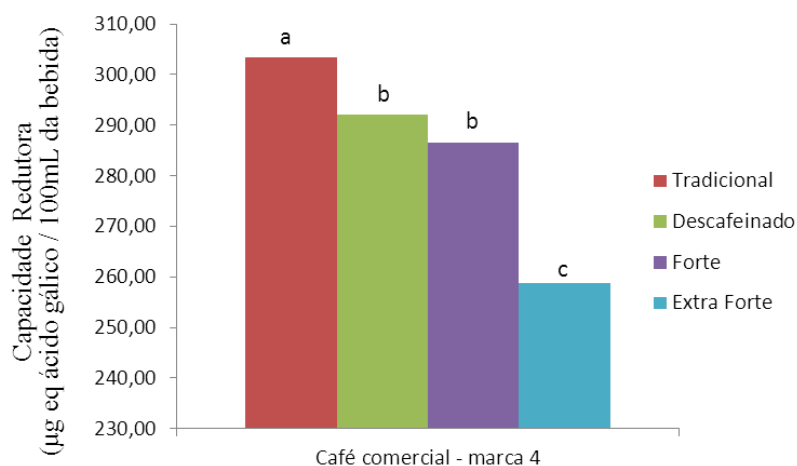


Figura 17 – Capacidade redutora de amostras de café comercial da marca 4 ($p < 0,05$). Letras iguais indicam ausência de diferença pelo teste de ANOVA a 5% de probabilidade.

Em relação à luminosidade, observa-se uma correlação positiva em relação à capacidade redutora ($r^2 = 0,90$, $p < 0,05$). Do café tradicional ao extra forte houve redução da capacidade redutora, assim como da luminosidade. O valor de L da denominação tradicional foi $19,74 \pm 0,10$; descafeinado $19,72 \pm 0,23$; forte $19,52 \pm 0,11$ e extra forte $19,44 \pm 0,18$, especulando-se que o aumento do grau de torração levou à redução da capacidade redutora, uma medida da capacidade antioxidante, o que corrobora com RICHELLE, TAVAZZI & OFFORD, 2001; BAGGENSTOSS *et al.*, 2008; SOMPORN *et al.*, 2011.

Observa-se, contudo, uma ausência de relação entre a capacidade redutora e as denominações de grau de torração dos cafés segundo os fabricantes, mesmo quando analisadas em cada marca, separadamente. Ao considerar os valores de luminosidade em algumas marcas pode-se ver uma semelhança do grau de torração informado e os valores de L^* obtidos, mas esta observação não é extensiva a todas as marcas.

Provavelmente, esta falta de relação pode ser explicada pela ausência de padronização das denominações dos cafés, por parte dos fabricantes, referentes ao grau de torração. Outra explicação seria a grande variabilidade das matérias primas e espécies de café utilizadas nos *blends*. É provável que essa heterogeneidade na composição leve também a diversidade na capacidade antioxidante (SOUZA *et al.*, 2010), independente do grau de torração.

Considerando as amostras de café 100% arábica torradas em 3 condições diferentes - 10 minutos a 240°C (torração clara); 11 minutos a 240°C (torração média); 12 minutos a 240°C (torração escura) - as torras leve e média apresentaram capacidade redutora menor que a escura, portanto, quanto mais intensa foi a torração, maior a capacidade redutora dos mesmos.

A alta temperatura do processo de torrefação do café leva à destruição de alguns compostos fenólicos e favorece o desenvolvimento de outras substâncias antioxidantes (ARAÚJO, 2007), ressaltando as melanoidinas (DAGLIA *et al.*, 2000; ITO *et al.*, 2005). Além disso, evidencia-se também a formação de lactonas durante o processo de torrefação, sendo que essas, assim como os ácidos clorogênicos, podem se incorporar às melanoidinas formadas (BEKEDAM *et al.*, 2008). Estas substâncias formadas também possuem propriedades redutoras, sendo também mensuradas pelo método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu. Especula-se que haja formação de compostos fenólicos ao longo da torração, a partir de compostos que não sejam fenólicos (BEKEDAM *et al.*, 2006). Com isso, o aumento do grau de torração pode ter levado à maior formação de compostos redutores nas amostras de café arábica em questão, refletindo no aumento da capacidade redutora avaliada.

5.4 Avaliação da capacidade redutora da bebida de café preparada de diferentes formas

Os resultados obtidos para cada forma de preparo encontram-se expressos na Figura 18. Os maiores valores de capacidade redutora foram obtidos pela decocção com água fervente, seguida da decocção a 90°C, infusão a 90°C e infusão com água fervente.

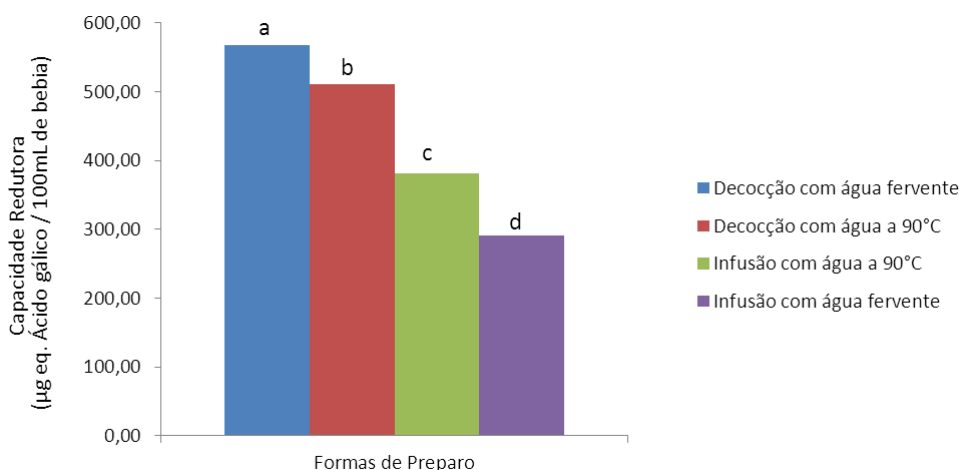


Figura 18 – Capacidade redutora da bebida de café da marca 1 tradicional preparada de diferentes formas ($p < 0,05$). Letras iguais indicam ausência de diferença pelo teste de ANOVA a 5% de probabilidade.

Dentre as diversas técnicas de preparo da bebida de café, a filtração é a técnica de infusão mais utilizada, enquanto o café espresso, produzido sob pressão, é o mais apreciado. Na filtração, a passagem da água entre 92 e 96°C no pó de café acomodado no filtro causa agitação das partículas do pó, prevenindo a saturação da água (LINGLE, 1996). Pode-se explicar, portanto, que na decocção, o maior contato das partículas de pó com a água levou à menor saturação da água, facilitando ainda mais o processo de extração, o que resultou em maior extração dos compostos redutores quando comparado com o método de infusão.

A decocção com água fervente propiciou valores ainda maiores, provavelmente devido ao aumento da turbulência da água, devido às forças de convecção aumentadas provocadas pela ebulição, possibilitando ainda mais contato do pó com a água e menor saturação desta. Outra explicação para a obtenção de valores maiores na condição de decocção seria o maior tempo de contato do pó com a água na decocção quando comparada com a infusão, pois o pó foi misturado à água e somente depois de aproximadamente cinco segundos deu-se continuidade do preparo da bebida, com a etapa de filtração. O longo tempo de contato do café com a água deve, portanto, ser considerado em ordem de aumentar a eficiência da extração (LUDWIG *et al*, 2012).

PÉREZ-MARTÍNEZ *et al.* (2010) compararam a capacidade antioxidante, medida por técnicas colorimétricas e espectroscopia de ressonância elétron spin, da

bebida de café preparada com diferentes máquinas (filtração, prensagem, mocha e espresso). O café filtrado foi preparado com 24g de café torrado e moído para um volume de 400mL de água, utilizando a máquina de café filtrado. A extração levou 7 minutos a 90°C. A técnica de preparação que extraiu maior conteúdo de antioxidantes foi a da máquina de espresso, seguida do café filtrado, mocha e a bebida preparada pela máquina de pistões, considerando os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu. A pressão aplicada na preparação do café espresso pode ser uma das explicações para a maior extração de compostos antioxidantes e, em relação ao café filtrado, o tempo de contato da água quente com o pó de café provavelmente facilitou a extração de compostos, segundo os autores.

Outras técnicas de preparo também já foram estudadas na literatura, como por exemplo, o café turco e instantâneo. NISETEO *et al.* (2012) determinaram o conteúdo de compostos derivados dos ácidos clorogênicos da bebida de café preparada de diferentes formas (espresso, turco, cappuccino instantâneo e filtrado). De maneira a simular a técnica de preparação da bebida padrão, 7g de café torrado e moído foi utilizado para a preparação das bebidas, utilizando-se 50mL de água destilada a 95-97°C. Para o café filtrado, o conteúdo encontrado de fenólicos totais foi de 2967mg/L equivalentes de ácido gálico, menor valor encontrado dentre as preparações estudadas. O café instantâneo apresentou os maiores valores, explicado pela concentração dos componentes solúveis em água no processo de desidratação do produto. Os valores menores encontrados para o café filtrado pode ser explicado pela utilização do filtro de papel, que retém parte das substâncias bioativas.

Portanto, pode-se pressupor que o café filtrado, por ser um dos mais consumidos, apresenta um teor de compostos redutores intermediário entre as técnicas testadas pelos autores acima. Por mais que outras formas de preparo sejam mais eficientes na extração de compostos antioxidantes, elas não são largamente consumidas, o que torna importante a avaliação de outras maneiras de extração, dentro da técnica de filtração. O presente estudo traz esta novidade para a literatura, visto que ao avaliar diferentes formas de se filtrar o café, com variações na temperatura e contato do pó com água, evidenciou-se a decocção como a melhor alternativa no que diz respeito à extração otimizada de compostos redutores. Entretanto, faz-se necessário estudar a aceitação do consumidor em relação à bebida produzida por decocção, assim como a tendência de preparo por parte dos mesmos.

5.5 Análise Colorimétrica

Os valores de L^* e também os valores referentes à saturação e tonalidade (c^* e h_{ab}^*) obtidos para as amostras comerciais encontram-se expressos na Tabela 12. Segundo a análise de variância (ANOVA), houve diferença significativa entre os cafés em geral ($p < 0,05$) e os valores de L^* apresentaram-se entre 15,46 - 26,34.

Vale ressaltar que a luminosidade (L^*) define a escala cinza entre o branco e o preto (MORI *et al.*, 2004). Quanto maior a L^* , mais branda é a torração e mais clara é a amostra, e quanto menor, mais forte é a torração e mais escura é a amostra (GONÇALEZ *et al.*, 2001).

Foram estabelecidas três faixas de luminosidade de acordo com os valores de L^* , correspondendo as mesmas à torração clara, média e escura, respectivamente: 21,6 a 26,4; 19,6 a 21,5 e 15,5 a 19,5 (Tabela 13). Entretanto, não houve correlação entre estes valores de luminosidade com o grau de torração comercial informado pelos fabricantes ($p > 0,05$).

Tabela 12 – Valores de luminosidade (L*), saturação (c*) e tonalidade (h*) das amostras comerciais de café obtidos através da análise colorimétrica

n° identificação	Luminosidade (L*)		Saturação (c*)	Tonalidade (h*)
	Média	DP	Média	Média
1	22,78	0,27	14,55	51,07
2	19,54	0,20	15,55	46,84
3	19,03	0,27	14,49	47,64
4	18,38	0,47	14,62	54,74
5	25,99	0,50	25,61	52,90
6	20,87	0,12	17,17	51,92
7	20,15	0,11	16,25	49,79
8	18,45	0,21	13,48	51,97
9	20,15	0,19	15,72	49,94
10	18,82	0,26	14,20	56,50
11	23,34	0,15	20,72	51,95
12	19,83	0,07	13,17	52,98
13	21,04	0,32	17,61	51,73
14	19,29	0,20	16,92	55,75
15	22,64	0,05	19,75	52,33
16	21,01	0,13	16,95	49,65
17	18,99	0,13	14,93	51,93
18	19,98	0,15	15,53	46,64
19	17,92	0,39	14,07	49,75
20	19,43	0,15	15,19	56,73
22	23,81	0,12	22,40	55,51
23	23,05	0,21	18,53	50,54
24	19,74	0,10	14,69	49,39
25	19,52	0,11	14,20	49,87
26	19,44	0,18	14,45	49,32
27	19,72	0,23	16,44	54,02
29	21,08	0,25	17,08	54,34
30	20,16	0,55	15,65	51,87
31	20,04	0,54	16,65	50,15
32	18,58	0,16	15,17	45,52
33	15,55	0,10	9,39	52,73
34	17,75	0,21	12,46	49,01
35	16,97	0,03	11,54	50,17
36	19,71	0,09	13,44	52,42
37	20,94	0,11	15,68	51,61
38	20,08	0,12	19,05	53,80
39	24,22	0,06	21,93	50,66
40	22,99	0,07	19,08	51,70
41	22,51	0,03	19,28	52,15
46	23,81	0,12	18,09	45,97
Valores mínimos	15,46		9,39	45,52
Valores máximos	26,34		25,61	56,73

Tabela 13 – Faixas de luminosidade para a torração clara, média e escura dos cafés comerciais

Grau de Torração	Faixa de Luminosidade (L*)
Clara	21,6 a 26,4
Média	19,6 a 21,5
Escura	15,5 a 19,5

As amostras de café cru 100% arábica foram torradas a fim de se obter condições de torração que originassem valores de L incluídos nas três faixas de torração estabelecidas para as amostras comerciais. Os valores de luminosidade (L*) foram utilizados como parâmetro dos graus de torração das amostras, assim como realizado por ALMEIDA *et al.* (2006), SOMPORN *et al.* (2011) e REIS (2012). Estas amostras foram consideradas como padrões de cada faixa e foram submetidas à análise colorimétrica e os valores de L*, c* e h* estão representados na tabela 14. Os valores de L* apresentaram-se entre 17,63 - 22,37.

Tabela 14 – Valores de luminosidade (L*), saturação (c*) e tonalidade (h*) das amostras de café 100% arábica de torração clara, média e escura

nº identificação	Torra	L*		c*	h°
		Média	DP	Média	Média
42	Clara	22,35	0,02	22,62	50,87
43	Média	20,87	0,03	18,76	48,02
44	Escura	17,66	0,03	16,13	47,42
Valores mínimos		17,63		16,13	47,42
Valores máximos		22,37		22,62	50,87

A partir dos valores de a* e b*, os valores de saturação (c*) e tonalidade (h*) foram calculados. Tanto c* quanto h* apresentaram correlação positiva ($r^2=0,9480$ e $0,8977$, respectivamente) com L* para as amostras torradas, ou seja, a redução da luminosidade foi acompanhada pela redução da saturação e tonalidade. SUMMA *et al.* (2007) também encontraram uma boa correlação dos valores de L* e c* ($r^2=0,9610$).

Pode-se entender, dentro deste contexto, que o aumento da intensidade da torração, leva a um escurecimento dos grãos (redução da luminosidade), redução da saturação (c^*), assim como uma mudança da tonalidade (h^*). Esta tendência é claramente observada para os grãos de café 100% arábica, torrados em condições laboratoriais. Entretanto, não se observou tal tendência para as amostras comerciais, provavelmente devido à composição dos grãos, como possível presença de defeitos, diferentes espécies utilizadas na produção dos *blends*, falta de controle das condições de torração, assim como influências da origem geográfica dos grãos e a possibilidade de haver alguma adulteração nos mesmos.

Segundo ASSAD *et al.* (2002), no Brasil, a adulteração dos cafés pode se dar por meio da contaminação por impurezas ou misturas, sendo encontrados, com maior frequência, cascas e paus, milho, cevada, trigoilho, açúcar mascavo e soja, entre outras. Em um estudo realizado por REIS (2012), a torração do milho e das cascas de café, sob condições laboratoriais semelhantes àsquelas utilizadas para as amostras de grãos de café, gerou valores de L^* similares em ambas as amostras. Entretanto, os valores de tonalidade (h^*) das amostras de café apresentaram-se discretamente menores que as avaliadas para o milho e cascas de café. Considerando isto, a variação de tonalidade observados para as amostras comerciais avaliadas no presente estudo pode ser explicada pela presença de *blends* com cafés de espécies e qualidade diferentes, ou até mesmo pela presença de impurezas oriundas de adulterações nestes produtos, que, ao serem torrados, responderam de maneiras distintas no que diz respeito à alteração da cor para as diferentes amostras.

Avaliou-se a ocorrência de correlação entre os valores de L^* e os valores obtidos na análise espectrofotométrica, representados pela capacidade redutora (CR), tanto para as amostras comerciais quanto para as torradas no laboratório. O coeficiente de correlação calculado para as amostras comerciais foi 0,36, referente à correlação de L^* x CR. Para as amostras torradas no laboratório, o coeficiente de correlação calculado foi -0,95, com $p < 0,05$. Portanto, pode-se observar ausência de correlação destas variáveis para as amostras comerciais, enquanto que para as amostras torradas em condições laboratoriais esta correlação foi inversa, inferindo-se que, quanto maior o grau de torração (que gera valores menores de L^*), maior é a capacidade redutora das amostras.

Após agrupar as amostras comerciais por 4 marcas específicas, em duas delas (4 e 5) pôde-se constatar correlação entre os valores de L^* e CR, enquanto em outras não

se observou tal tendência (Tabela 15). Para o grupo 1, o qual não apresentou correlação, o fabricante pontuou que todas as amostras avaliadas sofreram torração média. Para o grupo 2, o fabricante não forneceu tal informação. Para o grupo amostral 3, o grau de torração segundo o fabricante, para as denominações distintas, foi médio, forte e acentuado. Já para o grupo amostral 4: clássica, escura, muito escura e média.

Tabela 15 – Coeficientes de correlação (r) calculados para diferentes grupos amostrais, representados por diferentes marcas de cafés comerciais

Marca	R	p
1	-0,46	0,08
2	0,14	0,67
3	0,65	0,02
4	0,90	0,0001

SUMMA *et al.* (2007) encontraram correlação positiva ($r=0,9856$) entre os valores de L e capacidade sequestrante de radicais pela ressonância eletro magnética, uma medida de atividade antioxidante, enquanto no presente estudo esta correlação foi negativa. Outros autores corroboram com os achados de SUMMA *et al.* (2007) e DEL CASTILLO, AMES & GORDON (2002) observaram que a atividade antioxidante foi mais elevada em cafés de baixo e médio grau de torração quando comparados ao café de grau de torração elevado, a partir do método ABTS. BORRELLI *et al.* (2002) encontraram redução da capacidade das melanoidinas em sequestrar radicais, a partir do método ABTS, com o aumento do grau de torração. Nos estudos acima, os métodos utilizados são baseados no sequestro de radicais (HUANG, BOXIN & PRIOR, 2005), assim como o método utilizado no presente estudo, entretanto os resultados encontrados são contraditórios. Tal contradição pode ser explicada pela utilização de métodos e condições diferentes para a análise da capacidade antioxidante.

O método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, utilizado no presente estudo, é capaz de avaliar compostos redutores diversos e não somente os compostos fenólicos. Durante o processo de torrefação, estes compostos podem ser degradados e/ou condensados a outras estruturas, como proteínas e açúcares, formando produtos de degradação e/ou melanoidinas e compostos heterocíclicos, que também possuem capacidade redutora (DAGLIA *et al.*, 2000; ITO *et al.*, 2005; ARAÚJO, 2007). Além

disso, ao longo da torrefação, ocorre a incorporação de ácidos clorogênicos nas moléculas de melanoidinas, o que se intensifica com o aumento do grau de torrefação (PERRONE, FARAH & DONANGELO, 2006). Esta incorporação pode gerar compostos também com característica redutora, visto a estrutura dos ácidos clorogênicos. Com isso, ao longo da torrefação, mais compostos redutores são formados, o que gera um efeito somatório na capacidade redutora final, quando comparada àquela avaliada na amostra menos torrada.

Diversos estudos que avaliaram a capacidade antioxidante da bebida de café com diferentes graus de torração, a partir da determinação do conteúdo de compostos fenólicos, apresentam resultados controversos. Alguns deles encontraram um aumento da capacidade antioxidante da bebida com uma torração de grau médio em comparação a menor grau, e uma redução da capacidade antioxidante com a elevação do grau de torração (NICOLI *et al.*, 1997; STEINHART, LUGER & PIOST *et al.*, 2002; DEL CASTILLO, AMES & GORDON, 2002; da SILVEIRA-DUARTE *et al.*, 2005); CAMMERER & KROH, 2006). Outros já relataram uma redução da capacidade antioxidante em grau de torração leve e um aumento em café com grau de torração elevado (DAGLIA *et al.*, 2000; ANESE & NICOLI, 2003; WEN *et al.*, 2005). Assim como alguns autores encontraram um aumento da capacidade antioxidante com o aumento do grau de torração (ANESE *et al.*, 2000; SANCHEZ-GONZALES, JIMENEZ-ESCRIG & SAURA-CALIXTO, 2005) e outros uma redução da capacidade antioxidante com o aumento do grau de torração (RICHELLE, TAVAZZI & OFFORD, 2001; BAGGENSTOSS *et al.*, 2008; SOMPORN *et al.*, 2011). Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo está de acordo com alguns autores, enquanto contradiz o resultado de outros autores.

SOMPORN *et al.* (2011) reportaram uma redução do conteúdo de fenólicos totais, medido pelo método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, com o aumento do grau de torração. Além disso, os autores encontraram correlação entre os valores de luminosidade, obtidos pela análise colorimétrica, e o grau de torração, similar ao presente estudo. O aumento do grau de torração levou ao declínio dos valores de L*. Pode-se constatar, portanto, que o declínio dos valores de L* foi acompanhado pelo aumento do conteúdo de fenólicos totais medido, o que difere-se à situação encontrada no presente estudo, onde a redução de L* correlacionou-se com a redução da capacidade redutora. Isto pode ser explicado pelo fato de o solvente utilizado por SOMPORN *et al.*

(2011), para a extração dos compostos fenólicos, ter sido metanol a 40%. Pode-se inferir que este percentual de metanol acrescido à água levou à extração mais seletiva de determinados compostos fenólicos, enquanto no presente estudo, a utilização da água como solvente pode ter levado à extração de diversos compostos redutores, que foram analisados pelo método espectrofotométrico.

Esta convergência de valores deve-se, provavelmente, a diferenças dos cafés analisados em cada estudo, assim como as condições de torração abordadas e também pelo uso de diferentes condições analíticas, corroborando com PERRONE, FARAH & DONANGELO (2012). Além disso, o processo térmico da torração pode aumentar a ocorrência de compostos antioxidantes ou induzir a formação de novos compostos com propriedades antioxidantes, que aumentam ou mantêm a capacidade antioxidante final (TOMAINO *et al.*, 2005). Portanto, a degradação de compostos fenólicos pelo processo térmico pode resultar na liberação de compostos antioxidantes que têm propriedades químicas e biológicas diferentes (TSAI *et al.*, 2002). Dessa forma, diferentes técnicas analíticas medem diferentes compostos antioxidantes, gerando resultados divergentes na literatura.

5.6 Sondagem da região do espectro obtido pela análise no infravermelho correlacionada com os resultados espectrofotométricos

A figura 19 representa os espectros médios, resultantes de 5 espectros, gerados pela análise no infravermelho, submetidos ao corte ($3080-680\text{cm}^{-1}$) e normalização por altura. Nas figuras 20 e 21 estão ilustrados os espectros médios submetidos aos cortes $1800-1640\text{cm}^{-1}$ e $2300-1800\text{cm}^{-1}$ normalizados pela altura, respectivamente. Pode-se observar que os espectros nestas últimas faixas apresentaram mais discriminação entre as amostras (Figuras 20 e 21), devido à diferença entre as absorbâncias de cada uma delas, refletindo em diferenças na área sob a curva.

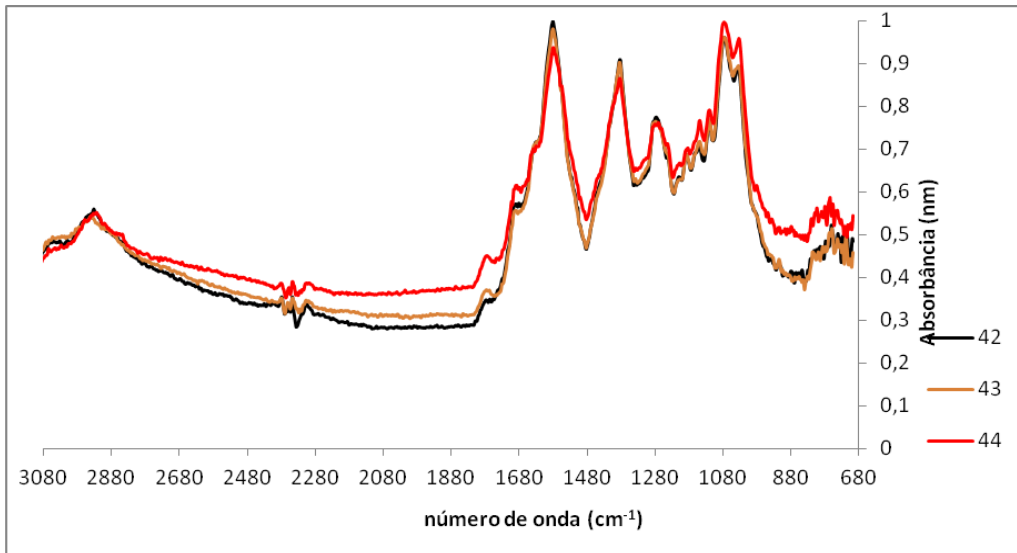


Figura 19 – Espectros médios (3080-680 cm^{-1}) de café 100% arábica de torração clara, média e escura (42, 43 e 44, respectivamente), submetidos a normalização por altura.

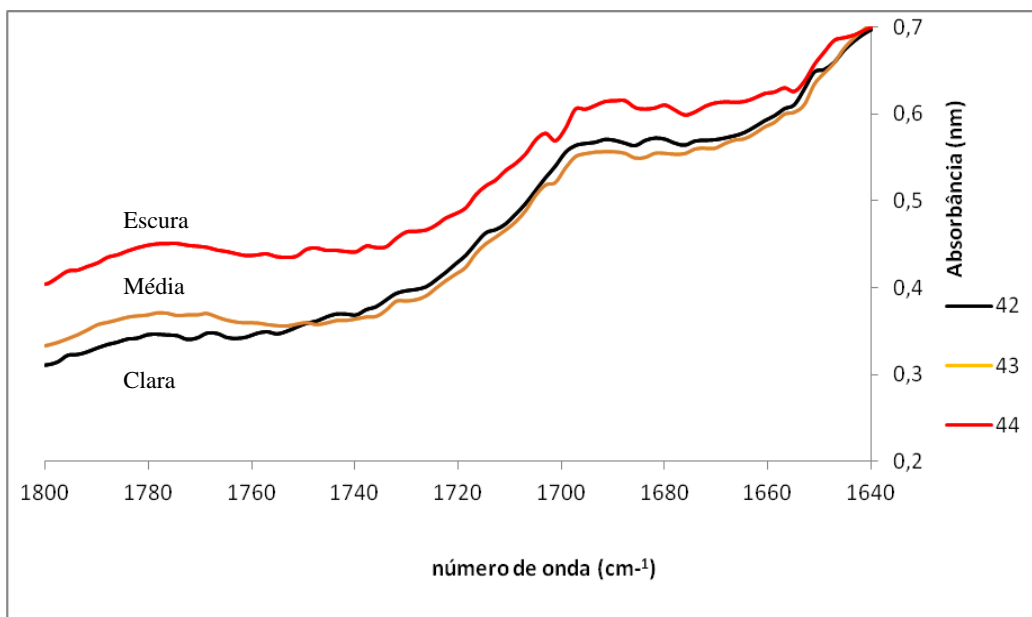


Figura 20 – Espectros médios (1800-1640 cm^{-1}) de café 100% arábica de torração clara, média e escura (42, 43 e 44, respectivamente).

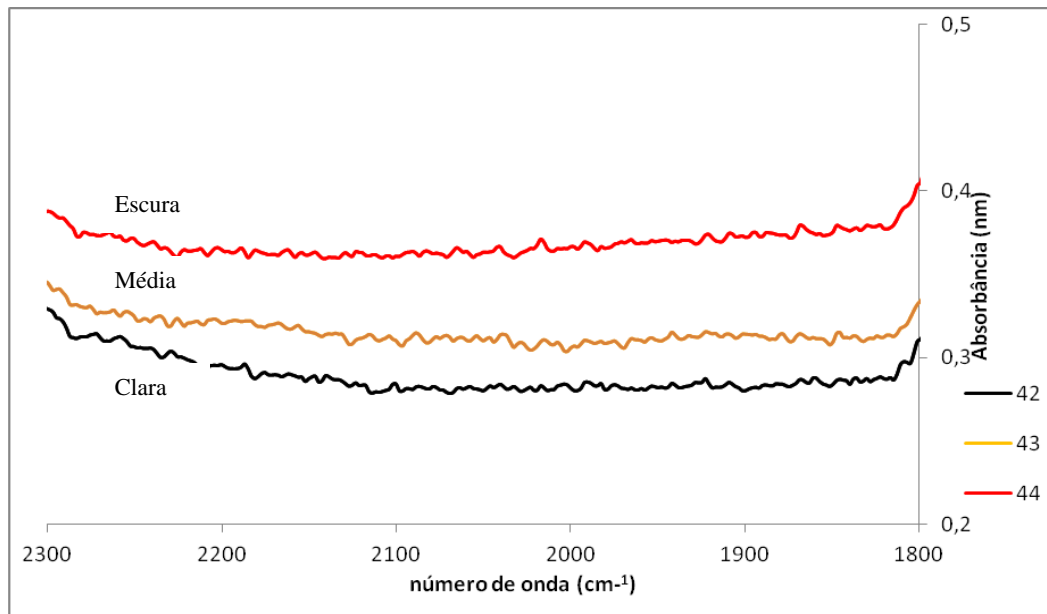


Figura 21 – Espectros médios de café 100% arábica de torração clara, média e escura (42, 43 e 44, respectivamente), submetidos a corte (2300-1800 cm^{-1}) e normalização por altura.

A capacidade redutora, analisada pelo método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, das amostras 42, 43 e 44 foram, respectivamente, 225,74; 230,69; 270,56 mg eq de ácido gálico. Considerando estes valores, as amostras podem ser colocadas em ordem decrescente de capacidade redutora: $44 > 43 > 42$, sendo que a amostra 44 diferiu das demais e as amostras 42 e 43 não foram diferentes entre si ($p < 0,05$).

Considerando os espectros obtidos, a amostra 44 posiciona-se, em todas as faixas em questão, acima das demais, devido à sua maior absorbância. Já as amostras 42 e 43 apresentam-se mais abaixo, sem muita diferença da intensidade de absorbância. Relembrando, a amostra 44 apresentou valores maiores de capacidade redutora, e as amostras 42 e 43 não se diferiram ($p < 0,05$). Desta forma, observa-se que a absorbância de cada amostra representada nos espectros médios seguiu o mesmo padrão decrescente de capacidade redutora do que o padrão apresentado pelos valores resultantes da leitura espectrofotométrica, onde a amostra 44 apresentou os maiores valores, seguida das amostras 42 e 43, não diferentes entre si ($p < 0,05$).

De acordo com LYMAN *et al.* (2003), que avaliaram o efeito da torração sobre a análise FTIR na bebida de café, o espectro referente às amostras mais torradas apresentou maior absorbância que as amostras submetidas à torração leve e média, sem discriminação aparente entre estas duas últimas. A mesma tendência é observada nos

espectros médios do presente estudo, nesta mesma região (Figura 20), onde a amostra submetida à torração escura (44) apresentou maior absorbância que as demais, submetidas à torração leve e média (42 e 43).

A região analisada por LYMAN *et al.* (2003) foi entre 1800-1680 cm^{-1} . Segundo os autores, esta banda indica presença de compostos carbonílicos como lactonas, ésteres, aldeídos, cetonas e compostos ácidos. Dentre estes compostos, sabe-se que as lactonas e alguns compostos ácidos presentes na bebida de café são capazes de reagirem com o reagente Folin-Ciocalteu. Os valores de capacidade redutora foram obtidos a partir da análise de cor avaliada após a reação da amostra com este reagente. Portanto, pode-se explicar a tendência encontrada entre os valores de capacidade redutora e a discriminação apresentada nos espectros obtidos a partir da análise das diferentes bebidas de café obtidas pelas amostras 42, 43 e 44.

Corroborando com a tendência de valores observada por LYMAN *et al.* (2003), WANG & LIM (2012) também encontraram maior absorbância em amostras de café torradas em graus superiores em algumas bandas do espectro do infravermelho. Entretanto, nas bandas 1725-1705 cm^{-1} , 1714-1705 cm^{-1} e 1700-1680 cm^{-1} , estes autores observaram uma redução da absorbância da torração média comparada à clara. No presente estudo uma tendência semelhante foi observada na faixa entre 1749 e 1645 cm^{-1} .

Ao observar a faixa entre 2300-1800 cm^{-1} , esta apresentou tendência semelhante na discriminação das amostras, sendo a amostra 44 localizada acima das demais (42 e 43), devido à maior absorbância, com menor discriminação entre estas duas últimas (Figuras 21). Esta banda está associada à presença dos ácidos orgânicos, incluindo os ácidos clorogênicos. Segundo RIBEIRO, FERREIRA & SALVA (2011), entre 2082-1988 cm^{-1} apresenta-se combinação de bandas obtidas por ligações C=O e O-H, inferindo a presença de ácidos clorogênicos. No presente estudo, nota-se uma discriminação entre as amostras nesta faixa, podendo prever possível diferença na concentração dos ácidos clorogênicos, considerando diferenças aparentes na área sob a curva. Corroborando com esta afirmativa, os valores de capacidade redutora obtidos pelo método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, apresentam mesma tendência obtida nos espectros correspondentes às diferentes amostras. Vale ressaltar que os ácidos clorogênicos também são caracterizados por terem poder redutor, sendo incluídos, portanto, no conteúdo de compostos redutores avaliados pelo método

espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, representado pela capacidade redutora das amostras. Provavelmente, a tendência de valores entre os métodos, nesta faixa específica, dá-se, portanto, pela presença de ácidos clorogênicos.

Em contraposição à tendência encontrada para as amostras de café 100% arábica torradas em condições específicas, as amostras de cafés comerciais não apresentaram nenhuma tendência de resultados dos espectros no infravermelho, quando comparados aos valores de capacidade redutora (Apêndices I, II e III). Esta falta de correlação pode ser explicada pelo fato de as amostras de cafés comerciais constituírem-se de *blends* de diferentes espécies de cafés, originárias de diferentes regiões, além de serem torradas em condições não conhecidas. Portanto, as observações deste estudo em relação à correlação qualitativa encontrada entre os espectros no infravermelho e as análises espectrofotométricas baseiam-se nas análises dos cafés 100% arábica torradas sob condições específicas em laboratório.

6 Conclusões

Ainda não se encontraram na literatura científica estudos espectrofotométricos para análise de café que abordassem todos os parâmetros de validação como os estudados no presente estudo (linearidade, efeito de matriz, precisão, recuperação, interferentes) o que torna este estudo relevante do ponto de vista metodológico. As etapas de otimização e validação do método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu permitiu a obtenção de resultados mais fidedignos, facilitando as análises das amostras de café avaliadas e garantindo maior segurança na análise e discussão dos resultados obtidos. Em adição, otimizar a extração de compostos do café é de grande importância para a produção de alimentos funcionais, visto que estes compostos antioxidantes extraídos podem ser adicionados a produtos industrializados, estendendo a vida de prateleira, assim como elevando a concentração de compostos antioxidantes em produtos diversos.

A partir da análise das bebidas de café preparadas, pode-se constatar a grande variabilidade de compostos redutores presentes em diferentes amostras de café comercializadas em Belo Horizonte - MG, devido a possíveis influências na composição dos *blends*, diferentes técnicas de torração praticadas em beneficiadoras e até mesmo devido a possível utilização de grãos de cafés defeituosos na obtenção dos cafés comerciais. Esta variabilidade também foi encontrada por outros estudos, confirmando a gama de produtos que podem ser encontrados no mercado, com diferenças nas características funcionais. Com isso, torna-se difícil orientar o consumidor no ato da compra, pois a seleção de um café com perfil antioxidante maior não é possível, visto que em uma mesma marca de café comercial obtêm-se produtos com diferente perfil de ação antioxidante.

A técnica de preparo também influenciou a capacidade redutora das bebidas, visto que diferentes formas de preparo resultaram em diferentes valores, sendo a decocção a mais eficiente. Esta informação pode ser valiosa aos consumidores, que podem optar por técnicas de preparo domésticas que resultam em uma bebida de café com melhor teor de compostos antioxidantes.

A partir da sondagem realizada pela análise de algumas amostras no infravermelho, foi evidenciada uma possível tendência entre os valores de capacidade

reduzida obtidos pelo método espectrofotométrico e os espectros médios gerados pela análise no infravermelho por ATR. Esta tendência encontrada pode ser um ponto de partida para mais análises, incluindo mais amostras, o que possibilita análises quantitativas deste tipo de correlação a partir de análises estatísticas e também a identificação de compostos específicos de acordo com os espectros obtidos. Não foi encontrado qualquer estudo que avaliasse a existência de correlação entre o método espectrofotométrico e infravermelho para o café, sendo, portanto, considerável estudar tal correlação.

7 Perspectivas

Considerando as diferentes interfaces avaliadas no presente estudo, cita-se perspectivas de novos estudos em áreas diversas no contexto da análise de alimentos. O estudo do café tem sido abordado por diversos autores na literatura, com falhas na padronização de métodos de análise de compostos diversos, destacando-se aqueles com perfil antioxidante.

O presente estudo traz uma inovação para a literatura no âmbito da validação de métodos e instiga os demais pesquisadores a manterem esta linha analítica mais segura e fidedigna, pelo fato de que o estudo de parâmetros de validação garante a fidedignidade dos resultados obtidos por um determinado método sob condições analíticas específicas. Esta prática deve ser incentivada no contexto das análises de alimentos, permitindo uma maior padronização de métodos na literatura, facilitando a comparação de estudos realizados por pesquisadores diversos.

A grande variabilidade de resultados encontrados da capacidade redutora de amostras comerciais de café no presente estudo ressalta a necessidade de se estudar uma amostragem maior para constatar esta diversidade de produtos comercializados em regiões diferentes.

Além disso, faz-se necessário conhecer o modo de preparo praticado por consumidores em regiões distintas, visto que diferentes formas de preparo resultaram em bebidas de café com teores de capacidade redutora distintos, no presente estudo. Conhecer este hábito do consumidor será de grande valia para a comunidade científica, no intuito de informar os leigos e orienta-los em relação à influência destas formas de preparo da bebida de café na própria saúde deles.

Por fim, ainda sob a perspectiva analítica, o presente estudo instiga o desenvolvimento de mais estudos que abordem a comparação entre diferentes métodos que avaliem a capacidade antioxidante do café, destacando o espectrofotométrico, com métodos analíticos mais simples, rápidos e sofisticados, como a espectroscopia no infravermelho. O presente estudo indica algumas faixas nas quais encontrou-se uma tendência entre os resultados encontrados pelo método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu e os espectros gerados pelo infravermelho, sendo um ponto de partida para demais estudos.

8 Referências Bibliográficas

- ABIC (*Associação Brasileira da Indústria de Café*) 2013a. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61&inford=2304#2304>>. Acesso em: 08 fev. 2013;
- ABIC (*Associação Brasileira da Indústria de Café*) 2013b. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=48#2098>>. Acesso em: 19 mar. 2013;
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). *ISO (International Standard Organization), ABNT NBR ISO/IEC 5725-2: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2 : Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*, 2001;
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). *ISO (International Standard Organization), ABNT NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para a competência de laboratório de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 31p.;
- ABRAHÃO, S.A. *et al.* Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica L.*). *Ciênc. Agrotec., Lavras*, v. 34, n. 2, p. 414-420, mar./abr., 2010;
- ABREU, R.V., *Efeito promnésico e antioxidante do café no sistema nervoso central de ratos*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2009. 115 p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos);
- ALMEIDA, M. B.; BENASSI, M. T. Atividade antioxidante e estimativa do teor de melanoidinas em cafés torrados comerciais. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina. v. 32, suplemento 1, p. 1893-1900, 2011;
- ANDRADE, C.D., HENARES, J.A.R., MORALES, F.J. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *J. Agric. Food Chem.*, v.53, p.7832-7836, 2005;
- ANDREA, V. *et al.* Prediction of total antioxidant capacity of red wine by Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Control*, v.21, p. 786-789, 2010;
- ANESE, M. *et al.* Oxidative stability of the lipidfraction in roasted coffee. *Italian Journal of Food Science*, v. 12, p. 457-462, 2000;

- ANESE, M.; NICOLI, M. C. Antioxidant properties of ready-to-drink coffee brews. *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, p. 942-946, 2003;
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz*, v.66; n. 1; p. 232-240, 2007;
- AOAC (Association Of Official Analytical Chemists). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Arlington, 1990. 500p.;
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *Official Methods of Analysis of the AOAC*. CUNNIFF, P. Arlington (USA): AOAC, 2007;
- ARAÚJO, F.A. *Café (Coffea arábica, L.) submetido a diferentes graus de torrefação: caracterização química e avaliação da atividade antioxidante e sensorial*. São Paulo 2007. 157p. (Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo);
- BAGGENSTOSS, J. *et al.* Coffee roasting and aroma formation: application of different time-temperature conditions. *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, p. 5836-5846, 2008;
- BARBOSA, L. C. A. *Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos*. Viçosa: Editora UFV, 2008. 189 p.;
- BEKEDAM, E. K. *et al.* High molecular weight melanoidins from coffee brew. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, n. 20, p. 7658-7666, 2006;
- BEKEDAM, E. K. *et al.* Incorporation of chlorogenic acids in coffee brew melanoidins. *J. Agric. Food Chem.*, v.56, n.6, p.2055-2063, 2008;
- BORRELLI, R. C. *et al.* Chemical characterization and antioxidante properties of coffee malanoidins. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (22), p.6527-6533, 2002;
- BORGES, M. L. A. *et al.* Estudo da variação da coloração de café arábica durante a torra em diferentes condições de aquecimento. *R. Bras. Armaz.*, v. 5, p. 3-8, 2002;
- BOURN, D.; PRESCOTT, J. A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety or organically and conventionally produced foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 42, p. 1-34, 2002;
- BRASIL. *Instrução Normativa nº16, de 24 de Maio de 2010, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. “Regulamento técnico para o café torrado em grão e do café torrado e moído.” Diário Oficial [da] união, Brasília, 25 de Maio 2010. Disponível em:

<http://www.abic.com.br/publique/media/CONS_leg_regulamentotecnicoIN16.pdf> Acesso em: 22 fev. 2013;

BRUNE, M.; HALLBERG, L.; SKANBERG, A.B. Determination of ironbinding phenolic groups in foods. *J Food Sci*; v. 56, n. 1, p. 128-130, 1991;

CAMMERER, B.; KROH, W. Antioxidant activity of coffee brews. *European Food Research and Technology*, v. 223, p. 469-474, 2006;

CARVALHO, D. C. *et al.* Organic and conventional *Coffea arabica* L.: A comparative study of the chemical composition and physiological, biochemical and toxicological effects in Wistar rats. *Plant Foods Hum Nutr*, v. 66, p. 114-121, 2011;

CAVIN, C. *et al.* Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food and Chem. Toxicol.*, v. 40, p. 1155-1163, 2002;

CLARKE, R.J.; MACRAE, R. *Coffee: Chemistry*. Cap 1: Chemistry. Vol. 1. Elsevier science publishers LTD, 1985;

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* v. 79, p.362-372, 1999;

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.*, v.80, p.1033-1043, 2000;

CLIFFORD, M.N. Hierarchical Scheme for LC-MS n Identification of Chlorogenic acids. *J. Agric. Food. Chem.* v. 51, p. 2900-2911, 2003;

CROZIER, A.; JAGANATH, I.; CLIFFORD, M. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural product reports*, v. 26(8), p.1001-1043, 2009;

da SILVEIRA-DUARTE, S. M. *et al.* Effect of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Ciência e tecnologia de alimentos*, v. 25, p. 387-393, 2005;

DAGLIA, M. *et al.* In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of Green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.*, v.48, p.1449-1454, 2000;

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L., 1955-; FENNEMA, O. R. *Química de alimentos de Fennema*. 4. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2010. 900 p;

DEL CASTILLO, M. D.; AMES, J. M.; GORDON, M. H. Effect of reasting on the antioxidante activity of coffee brews. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50(13), p. 3698-3703, 2002;

- DORÉA, J.G.; COSTA, T.H.M. Is coffee a functional food? (review). *British Journal of Nutrition*, v.93, p.773-782, 2005;
- DUARTE, S.M.S. *et al.* Effect of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 25, n. 2, p. 387-393. Abr-jun 2005;
- ENCARNAÇÃO, R.O.; LIMA, D.R. *Café e Saúde Humana*. Brasília: Embrapa Café, 2003. 64p. (documentos. n.1);
- EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics*. Teddington: LGC, 1998. 61p.;
- FAJGELJ, A.; AMBRUS, A. Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentrations of organic chemicals. In: Fajgelj A, Ambrus A. (ed.) *Principles and practices of method validation*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, p.179-252, 2000;
- FALLER, A; L;K.; FIALHO, E. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 23, p. 561-568, 2010;
- FARAH A.; *et al.* Effect of roasting on the formation of chlorogenic acids lactones. *J. Agric. Food Chem.*, v.53, n.5, p.1505-1513, 2005;
- FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant. Physiol.*, v.18, n. 1, p. 23-36, 2006;
- FERNANDES, S.M. *et al.* Teores de polifenóis, ácido clorogênico, cafeína e proteína em café torrado. *Rev. Bras. de Agrociência*, v.7, n 3, p.197-199, set-dez 2001;
- FRANCA, A.S., OLIVEIRA, L.S. Potential Uses of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). In: Food Processing and Engineering In: F. Columbus (Ed.) *Advances in Food Engineering*, Nova Publishers, New York, p. 1-47, 2010;
- GOLDSTEIN, J. L.; SWAN, T. Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochemistry*, Oxford, v. 2, p. 371-382, 1963;
- GONÇALEZ, J. C. *et al.* Colorimetria qualitativa: Uma técnica objetiva de determinar a cor da Madeira. *Bras. Florestal*, n. 72, 2001;
- HENDRA, P. J., BIREMBAUT, F. How FTIR works II, The Internet Journal of Vibrational Spectroscopy, 6, 3. Disponível em: <www.ijvs.com>; Acesso em: 20 dez. 2012;

- HIGDON J. V.; FREI, B. Coffee and health: a review of recent human research. *Critical reviews in food science and nutrition*, v.46, n.2, p.101-123, 2006;
- HUANG, D; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 1841-1856, 2005;
- ILLY, A.; VIANI, R. *Expresso coffee: the chemistry of quality*. San Diego: Academic Press, 1995. 398p;
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). *DOQ-CGCRE-008: orientação sobre validação de métodos analíticos*. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010. 20p.;
- ITO, H. *et al.* Polyphenol levels in human urine after intake of six different polyphenol-rich beverages. *Brazilian Journal of Nutrition* v. 94, p.500-9, 2005;
- JAMES, J.E. Critical review of dietary caffeine and blood pressure: a relationship that should be taken more seriously. *Psychosom Med* v. 66, p. 63–71, 2004;
- JUNIOR, C.C. *et al.* Influência de diferentes sistemas de colheita na qualidade do café (*Coffea arabica*, L.). *Ciênc. Agrotec. Lavras*, v. 27, n.5, p.1089-1096, set/out, 2003;
- LAKENBRINK, C. *et al.* Flavonoids and Other Polyphenols in Consumer Brews of Tea and Other Caffeinated Beverages. *J. Agric. Food Chem.* v. 48, p. 2848-2852, 2000;
- LIMA, A.R.; PEREIRA, R.G.; ABRAHÃO, S.A. Compostos bioativos do café: Atividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e depois da descafeinação. *Quim. Nova*, v. 33, n. 1, p. 20-24, 2010;
- LINGLE, T. R. *The coffee brewing handbook*. Long Beach, California: Specialty coffee association, 1996;
- LUDWIG, I. A. *et al.* Extraction of coffee antioxidants: Impact of brewing time and method. *Food research international*, v. 48, p. 57-64, 2012;
- LYMAN, D.J. *et al.* FTIR-ATR analysis os brewed coffee: Effect of roasting conditions. *J. Agric. Food Chem.*, v.51, p.3268-3272, 2003;
- MADDAMS, B. How does FTIR work?. *The Internet Journal of Vibrational Spectroscopy*, Disponível em: www.ijvs.com. Acesso em: 10 jan. 2012;
- MALTA, M.R.; SANTOS, M.L.; SILVA, F.A.M. Qualidade de grãos de diferentes cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *Maringá*, v.24, n.5, p.1385-1390, 2002;

- MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* v. 79, p. 727-47, 2004;
- MARINOVA, E.M.; YANISHILIEVA, N.V. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. *Food Chemistry*, v.81, p.189-197, 2003;
- MARTÍN, M.J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A.G. Discrimination between arabica and robusta green coffee varieties according to their chemical composition. *Talanta* v. 46, p. 1259–1264, 1998;
- MIZUBUTI, Y.G.G. *Efeito do consumo de café sobre o sistema antioxidante e os níveis séricos de lipídeos em camundongos LDLr knockout e C57BL/6.* Belo Horizonte, MG: Faculdade de Farmácia UFMG, 2006 (Dissertação: Mestrado em Ciência de Alimentos);
- MONTEIRO, M.C.; TRUGO, L.C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quim. Nova*, v. 28, p. 637-641, 2005;
- MORI, C. L. S. O *et al.* Influência das características tecnológicas na cor da madeira de eucaliptos. *Cien. Florestal*, v. 14, p. 123-132, 2004;
- MOURE, A. *et al.* Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* v. 72, p. 145-171, 2001;
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, v. 1054, n. 1/2, p. 95-111, 2004;
- NAIDU, M.M. *et al.* Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. *Food Chemistry* v. 107, p. 377–384, 2008;
- NATA (National Association of Testing Authorities – Australia). Technical note 17. *Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods.* Sydney: NATA, 1997. 8 p.;
- NATELLA, F. *et al.* Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p.6211-6216, 2002;
- NEBESNY, E.; BUDRYN, G. Antioxidative activity of green and roasted coffee beans as influenced by convention and microwave roasting methods and content of certain compounds. *European Food Research and Technology*, v.217, n.2, p. 157-163, 2003;
- NICOLI M. C. *et al.* Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. *Cancer letters*, v. 114, p. 71-74, 1997;

- NISETEO, T. *et al.* Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. *Food Chemistry*, v. 134, p. 1870-1877, 2012;
- NYSTAD, T. *et al.* The effect of coffee consumption on serum total cholesterol in the Sami and Norwegian populations. *Public Health Nutrition*. v. 13, n. 11, p. 1818-1825, 2010;
- PARRAS, P. *et al.* Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three diferente procedures. *Food Chemistry*, v.102, n.3, p.582-592, 2007;
- PERRONE, D.; FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. *J. Agric. Food Chem.*, v. 60, p. 4265-4275, 2012;
- PETERS, A. Brewing makes the difference. *Proceedings of the 14th ASIC Colloquium*, San Francisco, USA (pp. 97-106), 1991;
- PETRACCO, M. Techmology IV: Beverage preparation: Brewing trends for the new millennium. Em R.J Clark, O.G. Vitzthum. *Coffee: Recent developments*. Oxford, UK: Blackwell Science, 2001;
- PINTO, N.A.V.D. *et al.* Avaliação dos polifenóis e açúcares em padrões de bebida do café torrado tipo expresso. *Rev. Bras. de Agrociência*, v. 7, n. 3, p.193-195, set/dez 2001;
- PITTIA, P.; NICOLI, C. N.; SACCHETTI, G. Effect of moisture and water activity on textural proprieties of raw and roasted coffee beans. *J. Textures Studies*, v. 38, p.116–134, 2007;
- PIZARRO, C. *et al.* Use of Near-Infrared Spectroscopy and feature selection techniques for predicting the caffeine content and roasting color in roasted coffees. *J. Agric. Food Chem.*, v.55, p. 7477-7488, 2007.
- QUINLAN, P.; LANE, J.; ASPINALL, L. Effects of hot tea, coffee and water ingestion on physiological responses and mood: the role of caffeine, water and beverage type. *Psychopharmacology* v. 134, p. 164–173, 1997;
- REIS, N. *Detecção de adulteração de café torrado e moído com cascas de café e milho por espectroscopia no infravermelho*. Belo Horizonte, MG: Faculdade de Farmácia UFMG, 2012 (Dissertação: Mestrado em Ciência de Alimentos);
- REYNER, L.A.; HOME, J.A. Early morning driver sleepiness: effectiveness of 200 mg caffeine. *Psychophysiology* v. 37, p. 251–256, 2000;

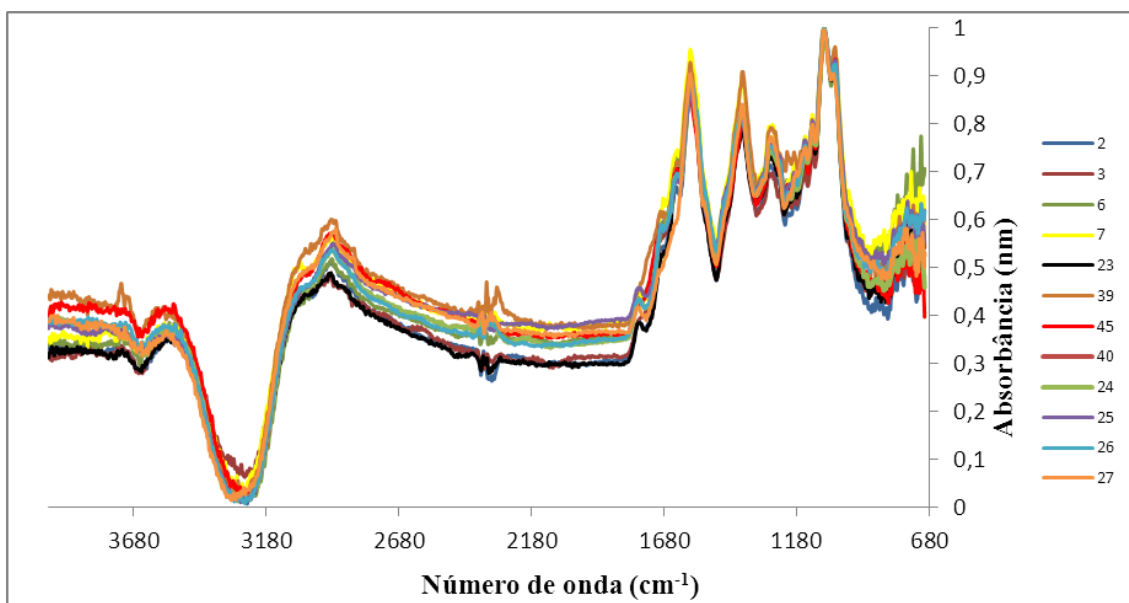
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780. set/out 2004;
- RIBEIRO, J.S.; FERREIRA, M.M.C.; SALVA, T.J.G. Chemometric models for the quantitative descriptive sensory analysis of Arabica coffee beverages using near infrared spectroscopy. *Talanta*, v.83, p. 1352-1358, 2011;
- RICHELE, M.; TAVAZZI, I.; OFFORD, E. Structure-antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa and tea) prepared per cup serving. *J. Agric. Food Chem.*, v. 49, p. 3438-3442, 2001;
- RODRIGUES, M.I.; LEMMA, A.F. *Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos*. 1 ed. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005. 326p.;
- RYAN, T.A.; JOINER, B.L. *Normal probability plots and tests for normality*. The State College: Pennsylvania State University, 1976. 15p.;
- SACCHETTI, G. et al. Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on theradical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. *Journal of Food Engineering* v. 90, p. 74–80, 2009;
- SANCHEZ-GONZALES, I.; JIMENEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidante activity of coffee brewed using diferente procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chemistry*, v. 90, p. 133-139, 2005.
- SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v.32, n.1, p.67-103, 1992;
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. *Food Phenolics*. Basel, Suíça, 1 ed., 1995. 331p;
- SILVA, J.A. et al. Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. *Quim. Nova*, v. 31, n. 5, p. 1077-1077, 2008;
- SILVERSTEIN, M. R.; WEBSTER, F. X.; *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora, 1998. 490 p.;
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* v. 16, p. 144-158, 1965;
- SINGLETON, V.L.; ROSSI, J. A. J. This Week's citation classic: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Society for Enology and Viticulture*, University of California, Dez, v. 2, n. 48, 1985;

- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTO´ S, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. Em: Packer, L. *Methods in Enzymology*, 1999.
- SIQUEIRA, H.H.; ABREU, C.M.P. Composição físico-química e qualidade do café submetido a dois tipos de torração e com diferentes formas de processamento. *Ciênc. Agrotec. Lavras*, v. 30, n.1, p.112-117, jan/fev., 2006;
- SMITH, A.P.; CLARK, R.; GALLAGHER, J. Breakfast cereal and caffeinated coffee: effects on working memory, attention, mood, and cardiovascular function. *Physiol. Behav.* v. 67, p. 9–17, 1999.
- SOMPORN, C. *et al.* Effects of roasting degree on radical scavenging activity, phenolics and volatile compounds of Arabica coffee beans (*Coffea Arabica* L. cv. Catimor). *Int. J. Food Science and Tech.*, v. 46, p. 2287-2296, 2011.
- SOBRATTEE, M.A. *et al.* Phenolics as potencial antioxidants therapeutic agents: Mechanisms and actions. *Mutation Research*, v.579, p.200-213, 2005.
- SOUZA, R. M. N. *et al.* Teores de compostos bioativos em cafés torrados e moídos comerciais. *Química Nova*, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 885-890, 2010.
- SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method *Analytica Chimica Acta*, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, Nov. 2005.
- SOUZA, S.V.C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos*. Belo Horizonte, 2007 (Tese de doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia.
- STEINHART, H.; LUGER, R.; PIOST, J. Antioxidative effect of coffee melanoidins. *Proceedings of the 19th International Scientific Colloquium on Coffee*. Paris: Association Scientifique Internationale du Café, 2002;
- SUMMA, C. A. *et al.* Impact of the roasting degree of coffee on the in vitro radical scavenging capacity and content of acrylamide. *LWT* 40, 1849-1854, 2007.
- SWAIN, T.; HILLIS, W.E. The phenolics constituents of prumus domestica: the quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric*; v. 10, n. 1, p. 63-8, 1959;
- THOMPSON, M.; WOOD, R. Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories. *Pure Appl. Chem.*, v. 67, p. 649-666, 1995;

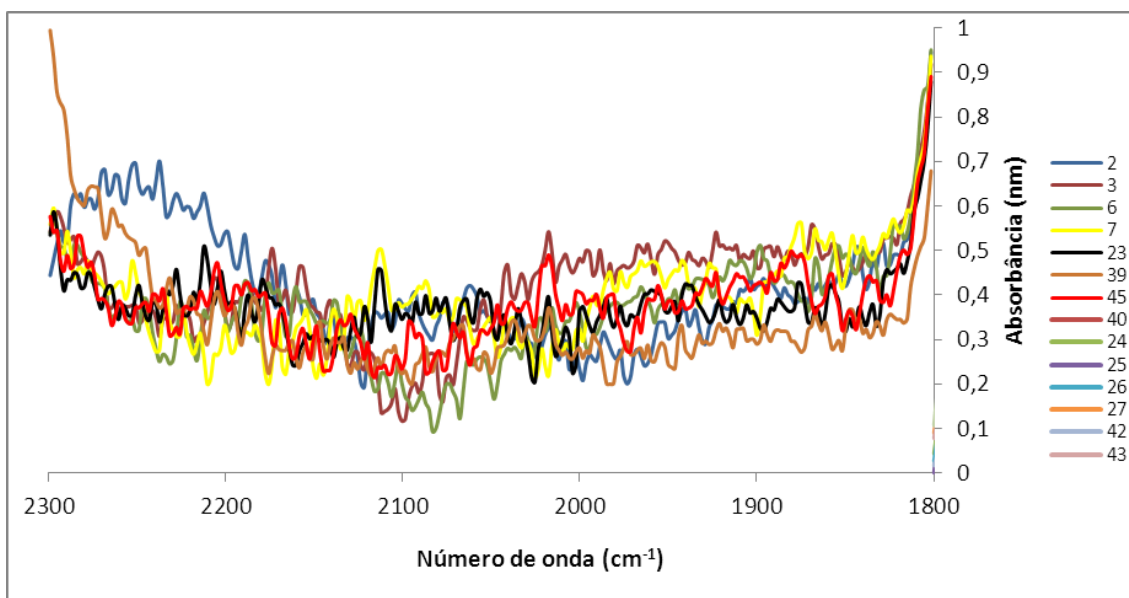
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, v. 74, p.835-855, 2002;
- TOMAINO, F. *et al.* Influence of heating on antioxidante activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry*, v. 89, p. 549-554, 2005;
- TSAI, P. J. *et al.* Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffia* L.) extract. *Food Research International*, v. 35, p. 351-356, 2002.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Production, supply and distribution Online. 2013. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>. Acesso em: 19 mar. 2013;
- VAN DUSSELDORP, M. *et al.* Cholesterol-raising factor from boiled coffee does not pass a paper filter. *Arterioscler. Thromb.*, v.11, p.586-593, 1991;
- VIGNOLI, J. A.; BASSOLI D. G.; BENASSI, M. T. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: the influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, v.124, n.3, p.863-868, 2011.
- VIGNOLI, J.A. *Efeito da material-prima e do processamento nos compostos bioativos e na atividade antioxidante do café*. Londrina, 2009 (Tese de Doutorado. Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Londrina);
- WANG, N.; LIM, L. Fourier Transform Infrared and physicochemical analyses of roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.*, v.60, p. 5446-5453, 2012;
- WEN, X. *et al.* Effect of roasting on properties of the zinc-chelating substance in coffee brews. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 2684-2689, 2005;
- WEUSTEN-VAN DER WOUW, M.P.M.E. *et al.* Identity of the cholesterol-raising factor from boiled coffee and its effects on liver function enzymes. *J. Lipid Res.*, v.35, p.721-733, 1994;
- YANAGIMOTO, K. *et al.* Antioxidant activities of fractions obtained from brewed coffee. *J. Agric. Food Chem.*, v.52, p.592-596, 2004;
- ZAMPELAS, A. *et al.* Associations between coffee consumption and inflammatory markers in healthy persons: the ATTICA study. *Am J Clin Nutr* v. 80, p. 862–867, 2004;
- ZHENG, W.; WANG, S.Y. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J. Agric. Food Chem.*, v.51, p.502-509, 2003.

8 Apêndices

Apêndice I - Espectros médios ($3080-680\text{cm}^{-1}$) dos cafés comerciais, submetidos a normalização por altura.



Apêndice II - Espectros médios dos cafés comerciais, submetidos a corte ($2300-1800\text{cm}^{-1}$) e normalização por altura



Apêndice II - Espectros médios d dos cafés comerciais, submetidos a corte (1800-1640 cm^{-1}) e normalização por altura

