

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

Investigação sobre um Método de Detecção de Adulterantes em
Café por CLUE-EM-EM

Víctor de Carvalho Martins

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**INVESTIGAÇÃO SOBRE UM MÉTODO DE DETECÇÃO
DE ADULTERANTES EM CAFÉ POR CLUE-EM-EM**

VÍCTOR DE CARVALHO MARTINS

Sob a Orientação do Professor Doutor
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy

e Co-orientação da Doutora
Ana Cristina Miranda Senna Gouvêa

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M379i Martins, Víctor de Carvalho, 1991-
Investigação sobre um método de detecção de
adulterantes em café por CLUE-EM-EM / Víctor de
Carvalho Martins. - 2017.
100 f.

Orientador: Ronoel Luiz de Oliveira Godoy.
Coorientadora: Ana Cristina Miranda Senna Gouvêa.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2017.

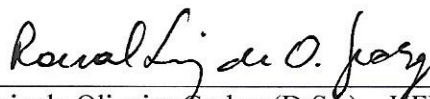
1. Ciência de Alimentos. 2. Métodos Analíticos. 3.
Fraudes em Alimentos. 4. Café. I. Godoy, Ronoel Luiz
de Oliveira, 1951-, orient. II. Gouvêa, Ana Cristina
Miranda Senna, 1960-, coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. IV.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

VÍCTOR DE CARVALHO MARTINS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 14 /02/2017



Ronoel Luiz de Oliveira Godoy (D.Sc.) – UFRRJ/Embrapa
(Orientador)



Edwin Elard Garcia Rojas (D.Sc.) – UFRRJ/UFF



Claudia Moraes de Rezende (D.Sc.) – UFRJ

DEDICATÓRIA

Primeiramente, a Deus por conceder sabedoria, perseverança, força, paciência e amparo em todas as situações. Por estar do nosso lado mesmo quando ocorrem momentos que não somos capazes de compreender.

À minha família, em especial aos meus pais Nádia e Luiz Otávio e ao meu irmão Vinicius por toda paciência e apoio durante os momentos de cansaço e estresse nesse período, sobretudo ao escrever esta dissertação.

À minha avó Conceição, que, mesmo em um período de constante esquecimento, não esquece o quanto o seu neto a ama.

À minha namorada, Nátali, pelo nosso amor e sua paciência e compreensão pelos momentos em que não pude estar com ela.

A todos aqueles que Deus me proporcionou conhecer na estrada desta vida e que torceram e oraram para que esta dissertação fosse finalizada com sucesso.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador D.Sc. Ronoel Luiz de O. Godoy, o qual chamo de “Professor” pelo respeito à profissão de quem se dedica a compartilhar seus conhecimentos construídos para o desenvolvimento dos demais indivíduos. Obrigado por todos os incentivos ao meu sucesso profissional e pessoal desde o estágio da graduação.

À minha co-orientadora oficial D.Sc. Ana Cristina M. S. Gouvêa e à minha co-orientadora extraoficial D.Sc. Manuela Cristina P. de A. Santiago, por todo auxílio e paciência durante o desenvolvimento da dissertação.

Aos demais componentes da equipe do Laboratório de Cromatografia Líquida, D.Sc. Renata Borguini, D.Sc. Sidney Pacheco e M.Sc. Luzimar Nascimento, pelo excelente convívio, auxílio, paciência e todos os momentos alegres ao longo desses quase quatro anos.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e à Embrapa Agroindústria de Alimentos, pela realização do curso de mestrado e a execução do procedimento experimental.

À Professora D.Sc. Maria Ivone Martins, coordenadora do PPGCTA, por todo auxílio e cordialidade durante estes dois anos.

À D.Sc. Edna Oliveira, ao D.Sc. Otniel Freitas e aos pós-graduandos Cinthia Couto e Thiago Ferreira, pela parceria com as amostras e os desafios do café.

À doutoranda Carolina Passos por ter orientado e compartilhado o conhecimento das técnicas empregadas e realizado em parceria a etapa inicial do projeto.

Às pós-graduandas Elaine Braga e Karen Elbert, por compartilhar de todos os momentos de luta, esforço, cansaço, paciência, esperança e de muitos sucessos.

Às doutorandas Monalisa Coelho e Fernanda Peixoto, por dividir suas experiências no âmbito acadêmico e profissional.

À turma de mestrado 2015.1, incluindo a doutoranda Yineth Ruíz, pelo excelente convívio durante o período de aulas e os congressos.

E, evidentemente, a todos os “Embrapianos”, que passaram ou ainda estão no laboratório, pelos momentos de auxílio e diversão, nos quais incluo Camila Menezes, Carol Motta, Diego Gonçalves, Yasmim Ferreira, Gleisa Mota, Raquel Lima, Lorena Cymas, Jéssica Rocha, Amanda Martins e Natália Tinoco.

RESUMO

MARTINS, Vítor de Carvalho. **Investigação sobre um Método de Detecção de Adulterantes em Café por CLUE-EM-EM**. 2017. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

O café consiste em uma das bebidas mais apreciadas em todo o mundo, devido a suas características sensoriais e funcionais. Atualmente como principal produtor e exportador no mundo, estima-se que no Brasil haja crescimento no mercado interno para os próximos anos, em que se predomina o café torrado e moído. Este tipo de produto é prejudicado principalmente pela prática de adulteração com outras matérias-primas vegetais. A implementação de métodos de maior sensibilidade e seletividade é necessária para a garantia de produtos de maior qualidade. O objetivo desta dissertação foi desenvolver um método de detecção de adulterantes (arroz, cevada, milho e soja) em amostras comerciais de café, através do perfil de oligossacarídeos e das técnicas de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial (CLUE-EM-EM). A partir de soluções padrão de cinco possíveis marcadores químicos (maltose, rafinose, estaquiase, 1-kestose e nistose) em solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% e acetonitrila (1:1) e em água grau Milli-Q, foram testados os parâmetros operacionais do espectrômetro de massas e as condições cromatográficas. O método cromatográfico adotado consistiu no uso da cromatografia por interação hidrofílica e eluição em gradiente de acetonitrila e solução aquosa de ácido fórmico, com as condições de temperatura do injetor de 20°C; volume de injeção de 1,0 µL; fluxo de 0,5 mL/min; temperatura da coluna de 35°C; e tempo de corrida de 10 min. Para o método espectrométrico, empregou-se a ionização por eletrospray em modo positivo, com voltagem no capilar, nos cones de amostragem e de extração de, respectivamente, 3,0 kV, 50 V, 2,0 V; temperatura da amostra de 80°C; fluxo do gás do cone de 40 L/h; temperatura e fluxo do gás de dessolvatação de 300°C e 500 L/h; e energias de colisão de, no mínimo, 15,0 V. Os resultados indicaram uma boa repetitividade entre as análises das soluções padrão, com a seletividade sendo garantida pelo monitoramento em tempo real dos espectros de massas sequencial. Extratos das amostras previamente torradas dos adulterantes foram analisados, sendo confirmado o efeito da temperatura como um fator interferente para a detecção dos oligossacarídeos. Apenas a soja apresentou como potenciais marcadores químicos rafinose e estaquiase. Para os grãos de arroz, cevada e milho, foi observado outro íon precursor de mesma relação massa/carga (m/z) da rafinose e da 1-kestose. Este foi identificado como a maltotriose, em que a diferenciação isomérica pode ser garantida pelos diferentes perfis de fragmentação. O estudo dos espectros de massas ainda ratificou estes resultados pela observação de uma maior facilidade da ruptura das ligações α,β (1 \leftrightarrow 2) e de formação de íons fragmentos de cadeia cíclica saturada. Porém, através do emprego da metodologia, não foram detectados os marcadores químicos nas amostras comerciais de café analisadas, mesmo com as amostras previamente reprovadas pela presença de cevada. A otimização do método de extração ou a inclusão de solventes sodiados podem ser necessários e, por tal razão, novos experimentos ainda devem ser realizados, garantindo a aplicabilidade do método por CLUE-EM-EM.

Palavras-chave: oligossacarídeos, fragmentação, adulteração.

ABSTRACT

MARTINS, Vítor de Carvalho. **Investigation about Method of Adulterants Detection in Coffee by UPLC-MS-MS**. 2017. 100 p. Dissertation (Master Science in Food Science and Technology, Food Science). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Coffee is one of the most appreciated beverages in the world, due to its sensorial and functional characteristics. Currently, as the main producer and exporter in the world, it is estimated that in Brazil there will be growth in the domestic market in the coming years, in which roasted and ground coffee predominates. This type of product is impaired mainly by adulteration with other plant materials. The implementation of more sensitive and selective methods is necessary to ensure higher quality products. The objective of this dissertation was to develop a method to detect adulterants (rice, barley, corn and soybeans) in commercial samples of coffee, through the oligosaccharides profile and the techniques of Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS-MS). From standard solutions of five possible chemical markers (maltose, raffinose, stachyose, 1-kestose and nystose) in aqueous solution of 0.1% formic acid and acetonitrile (1: 1) and in Milli-Q grade water, the operational parameters of the mass spectrometer and the chromatographic conditions were tested. The adopted chromatographic method consisted of chromatography by hydrophilic interaction and gradient elution of acetonitrile and aqueous solution of formic acid 0.1%, with injector temperature 20°C; injection volume 1.0 µL; flow rate 0.5 mL/min; column temperature 35°C; and run time 10 min. For the spectrometric method, electrospray ionization was used in positive mode, with capillary, sampling and extraction cones voltages of, respectively, 3.0 kV, 50 V, 2.0 V; sample temperature 80°C; cone gas flow 40 L/h; temperature and flow of desolvation gas 300°C and 500 L/h; and collision energies of at least 15.0 V. The results indicated a good repeatability among analysis of standard solution, with selectivity by the real-time monitoring of the sequential mass spectra. Extracts from the previously roasted samples of adulterants were analyzed. It was confirmed the effect of temperature as an interfering factor for the detection of oligosaccharides. Only soybean presented as potential chemical markers raffinose and stachyose. For the grains of rice, barley and corn, another precursor ion of the same mass/charge ratio (m/z) of raffinose and 1-kestose was observed. It has been identified as maltotriose, in which isomeric differentiation can be ensured by different fragmentation profiles. The study of the mass spectra still ratified these results by the observation of a greater susceptibility of the rupture of α , β (1 \leftrightarrow 2) bonds and the formation of ions fragments with saturated cyclic chain. However, through the use of the methodology, the chemical markers were not detected in the commercial samples of coffee, even with the samples previously disapproved for the presence of barley. The optimization of the extraction method or the inclusion of sodiated solvents may be necessary and, therefore, new experiments should still be performed, ensuring the applicability of the method by UPLC-MS-MS.

Key-words: oligosaccharides, fragmentation, adulteration.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação taxonômica dos cafeeiros (ITIS, 2016).	5
Tabela 2. Condições climáticas relatadas para as espécies arábica e robusta.	7
Tabela 3. Pâmetros do processo de torrefação na literatura.	8
Tabela 4. Composição qualitativa dos grãos de café verde (MURKOVIC & DERLER, 2006; REDGWELL & FISCHER, 2006; PARRAS et al., 2007; BELITZ et al., 2009; ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012).	9
Tabela 5. Teores dos principais constituintes químicos do café verde e torrado em grau médio, em % (m/m de base seca) (BELITZ et al., 2009; ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012).....	10
Tabela 6. Dados de produção e exportação de café, em milhões de sacas de 60 kilogramas (kg), para os principais países produtores nas safras de 2013/2014 e 2014/2015, (ICO, 2016b).	14
Tabela 7. Dados de exportação brasileira de café desde a década de 60, em milhões de sacas de 60 kg de café (ABIC, 2015a).	14
Tabela 8. Principais classificações utilizadas quanto às técnicas cromatográficas (ETTRE, 1993; LANÇAS, 2009b).....	20
Tabela 9. Resumo da evolução cronológica das fases estacionárias para cromatografia líquida, nos últimos 70 anos (MALDANER & JARDIM, 2009; PACHECO et al., 2015).	21
Tabela 10. Principais métodos desenvolvidos para determinação de adulteração em café.....	28
Tabela 11. Diferentes soluções padrão preparadas para cada carboidrato e analisadas em infusão direta no espectrômetro de massas.....	38
Tabela 12. Diluições, em solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% e acetonitrila (1:1), a partir da solução A.1.	39
Tabela 13. Diferentes soluções padrão analisadas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência.....	39
Tabela 14. Diluições aquosas a partir da solução F para posterior construção da curva analítica.....	40
Tabela 15. Massas monoisotópicas dos elementos químicos de maior abundância (IUPAC, 1991).....	41
Tabela 16. Parâmetros operacionais para calibração do espectrômetro de massas.	41

Tabela 17. Parâmetros operacionais do espectrômetro de massas.	42
Tabela 18. Valores de energia de colisão, em V, no <i>trap</i> e no <i>transfer</i> definidos para cada molécula analisada.....	42
Tabela 19. Composição da fase móvel do método com fase reversa: acetonitrila (A) e solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (B).....	43
Tabela 20. Composição da fase móvel do método por CIH: acetonitrila (A) e solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (B).....	43
Tabela 21. Método programado no software MassLynx [®] para detecção por espectrometria de massas.....	45
Tabela 22. Massas exatas calculadas, a partir do relatório da IUPAC (1991), para os prováveis íons formados a partir dos oligossacarídeos.	46
Tabela 23. Parâmetros operacionais iniciais do espectrômetro de massas em modo positivo.	47
Tabela 24. Resumo dos resultados obtidos, em modo positivo, por EM-EM para os diferentes analitos.....	52
Tabela 25. Teste de otimização dos parâmetros do gás de dessolvatação, com destaque em negrito para as melhores condições.	59
Tabela 26. Teste de otimização das voltagens aplicadas na fonte de ionização, com f_R para as moléculas sodiadas e destaque em negrito para condição adotada.	59
Tabela 27. Comparação entre as resoluções calculadas para os diferentes perfis cromatográficos.	61
Tabela 28. Comparação entre as resoluções calculadas para os diferentes tipos de cromatografia empregados.	63
Tabela 29. Detecção dos analitos, por CLUE-EM-EM, nas matrizes <i>in natura</i> e torrada.	65
Tabela 30. Dados obtidos para a construção da curva analítica utilizada para etapa de purificação. ¹	84
Tabela 31. Taxas médias de recuperação para a etapa de purificação adotada.	85
Tabela 32. Condições de processamento térmico de cada adulterante.....	99
Tabela 33. Detecção por PCR em tempo real de adulterantes em amostras comerciais de café.	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração do pastor etíope Kaldi e suas ovelhas (ABIC, 2010).	3
Figura 2. Casas de café na Turquia (A) e em Constantinopla (B) (ABIC, 2010).....	4
Figura 3. Frutos do cafeeiro em diferentes estádios de maturação (KEW, 2016).....	5
Figura 4. Esquema do fruto maduro de café e suas subdivisões, adaptado de Esquivel & Jiménez (2012).	6
Figura 5. O cinturão do café, sendo representados, do verde mais claro ao escuro, países que predominam o café arábica (por exemplo, Brasil), café robusta (ex. Índia) e produção dividida (ex. Indonésia), adaptado de Paterson et al. (2014).....	7
Figura 6. Fórmula estrutural da cafeína.....	11
Figura 7. Reação de esterificação e formação de um ácido clorogênico.....	11
Figura 8. Esquema de conversão dos carboidratos a novos produtos durante o processo de torrefação, adaptado de Oosterveld et al. (2003).....	12
Figura 9. Fórmula estrutural do 2-furfuriltiol (UEKANE et al., 2013).....	13
Figura 10. Participação na safra 2015 de grãos totais, de café arábica e de café robusta (IBGE, 2016).....	14
Figura 11. Dados de café verde brasileiro exportado, em milhões de sacas de 60 kg, no período de janeiro a dezembro de 2013 e de 2014 (ABIC, 2015a).	15
Figura 12. Evolução do consumo interno de café durante os últimos 25 anos, em milhões de sacas de 60 kg (ABIC, 2015a).....	15
Figura 13. Selo de pureza incorporado nas embalagens de cafés com 100% de pureza.	17
Figura 14. Detecção em café de (A) cascas e pedaços do pedúnculo do café, (B) milho, (C) cevada, (D) caramelo, (E) trigoilho e (F) soja (FUNED, 2012).....	18
Figura 15. Esquema simplificado sobre o processo cromatográfico com a separação das substâncias por diferentes propriedades como, por exemplo, polaridade e solubilidade.	19
Figura 16. Ilustração de um sistema cromatográfico do tipo modular (LANÇAS, 2009a).....	21
Figura 17. Diagrama de blocos sobre a instrumentação de um espectrômetro de massas.	23
Figura 18. Esquema dos mecanismos prováveis de IES: (A) por Iribarne e Tomson; e (B) por Dole (LANÇAS, 2009a).....	25

Figura 19. Configuração do espectrômetro de massas de alta resolução Synapt [®] , com tecnologia Triwave [™] (WATERS, 2008).	26
Figura 20. Fórmulas estruturais da α -D-glicopiranosose, segundo (A) a Projeção de Fischer e (B) a Projeção de Haworth, com destaque para (C) a conformação em cadeira.	30
Figura 21. Esquema da nomenclatura sistemática para fragmentos de glicoconjugados e oligossacarídeos (DOMON & COSTELLO, 1988).	32
Figura 22. Fórmula estrutural da maltose.	33
Figura 23. Fórmula estrutural da (A) rafinose e (B) estaquiiose.	33
Figura 24. Fórmula estrutural da (A) 1-kestose e (B) nistose.	34
Figura 25. Sistema Acquity UPLC [®] acoplado ao espectrômetro de massas Synapt [®] modelo G1 com analisadores QTDV (SCHULZ, 2014).	36
Figura 26. Amostra de grão de café torrado, antes e após a moagem.	44
Figura 27. Diagrama de blocos dos dois métodos de extração adaptados e empregados para as matrizes de trabalho.	44
Figura 28. Etapa de purificação dos extratos de café comercial.	45
Figura 29. Espectro de massas de íons totais da solução de ácido fosfórico (solução 3.3.2.), com destaque para a estrutura química desta substância.	47
Figura 30. Espectro de massas, por EM, de íons totais da solução padrão de maltose a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (B.1), com presença dos íons de m/z 365 e 707.	48
Figura 31. Comparação entre os espectros de massas de íons totais para cada analito nas concentrações de (A) 1000 $\mu\text{g/mL}$ e (B) 10 $\mu\text{g/mL}$	49
Figura 32. Espectro de massas, por EM-EM, da maltose, com aplicação de energias de colisão de 15,0 V.	50
Figura 33. Espectro de massas, por EM-EM, da rafinose, com aplicação de energias de colisão de 20,0 V.	50
Figura 34. Espectro de massas, por EM-EM, da 1-kestose, com aplicação de energias de colisão de 20,0 V.	51
Figura 35. Espectro de massas, por EM-EM, da estaquiiose, com aplicação de energias de colisão de 25,0 V.	51
Figura 36. Espectro de massas, por EM-EM, da nistose, com aplicação de energias de colisão de 25,0 V.	51

Figura 37. Espectro de massas de íons totais da estaquiiose, com destaque aos íons de m/z 665 e 1331, com aplicação de energias de colisão de 15,0 V.....	53
Figura 38. Espectro de massas, por EM-EM em modo negativo, da maltose, com aplicação de energias de colisão de 3,0 V.	53
Figura 39. Espectro de massas, por EM-EM em modo negativo, da rafinose, com aplicação de energias de colisão de 10,0 V.	54
Figura 40. Espectro de massas, por EM-EM em modo negativo, da 1-kestose, com aplicação de energias de colisão de 15,0 V.	54
Figura 41. Espectro de massas, por EM-EM em modo negativo, da estaquiiose, com aplicação de energias de colisão de 15,0 V.	54
Figura 42. Espectro de massas, por EM-EM em modo negativo, da nistose, com aplicação de energias de colisão de 15,0 V.	55
Figura 43. Espectros de massas em tempo real do solvente acetonitrila das marcas A, B, C e D, destacando o número de íons base para cada espectro.	56
Figura 44. Espectros de massas em tempo real do solvente metanol das marcas A e B, destacando o número de íons base para cada espectro.	57
Figura 45. Espectros de massas em tempo real da água da marca A e B, obtida por ultrapurificação, destacando o número de íons base para cada espectro.	58
Figura 46. Cromatograma do pico base, por CLUE-EM, da solução padrão a 400 $\mu\text{g/mL}$ de cada oligossacarídeo (solução D), com detecção da (A) maltose, (B) estaquiiose, (C) rafinose, (D) 1-kestose e (E) nistose.....	61
Figura 47. Cromatograma do pico base, por CLUE-EM, da solução padrão E, com a perda de resolução cromatográfica e possível co-eluição de 1-kestose e nistose, em 2,58 min.	61
Figura 48. Cromatograma do pico base, por CLUE-EM, da solução padrão a 5,0 $\mu\text{g/mL}$, com detecção da (A) maltose, (B) 1-kestose, (C) rafinose, (D) nistose e (E) estaquiiose.....	63
Figura 49. Cromatograma do pico base, por CLUE-EM, da solução padrão a 10,0 $\mu\text{g/mL}$ contendo 10% (v/v) do extrato de café, com detecção da (A) maltose, (B) 1-kestose, (C) rafinose, (D) nistose e (E) estaquiiose.	64
Figura 50. Comparação entre os adulterantes <i>in natura</i> e torrado, com destaque as condições de processamento (temperatura e tempo) empregada para (A) arroz, (B) cevada, (C) milho e (D) soja.	65
Figura 51. Espectros de massas, por EM-EM, da rafinose (m/z 527) e estaquiiose (m/z 689), obtidos nas amostras de soja <i>in natura</i> e torrada.....	66

Figura 52. Espectros de massas, por EM-EM, dos íons precursores desconhecidos de m/z 527 e 689, obtidos nas amostras torradas de arroz, cevada e milho.	67
Figura 53. Fórmula estrutural da (A) maltotriose e (B) maltotetraose.	68
Figura 54. Espectro de massas, por EM-EM, da maltotriose, com aplicação de energias de colisão de 20,0 V.	68
Figura 55. Fórmula estrutural da sacarose.	69
Figura 56. Espectro de massas, por EM-EM, da sacarose, com aplicação de energias de colisão de 15,0 V.	69
Figura 57. Mecanismo de fragmentação da maltose, através de reação de migração de β -hidrogênio, com predominância do fragmento Y_1	70
Figura 58. Mecanismos de fragmentação (rotas A e B) da maltotriose, através da primeira reação de migração de β -hidrogênio.	71
Figura 59. Continuação do mecanismo de fragmentação da maltotriose (rota A), através de segunda reação de migração de β -hidrogênio.	71
Figura 60. Continuação do mecanismo de fragmentação da maltotriose (rota B), através de segunda reação de migração de β -hidrogênio.	72
Figura 61. Mecanismo de fragmentação da sacarose, através de reação de migração de β -hidrogênio.	73
Figura 62. Mecanismo de fragmentação (rota A e B) da rafinose, através da eliminação do anel furânico (β -frutose).	74
Figura 63. Continuação do mecanismo de fragmentação da rafinose (rota A), através da segunda reação de migração de β -hidrogênio.	74
Figura 64. Continuação do mecanismo de fragmentação da rafinose (rota B), através da segunda reação de migração de β -hidrogênio.	75
Figura 65. Mecanismo de fragmentação (rota A e B) da estaquiose, através da eliminação do anel furânico (β -frutose).	75
Figura 66. Continuação do mecanismo de fragmentação da estaquiose (rota A), através da segunda reação de migração de β -hidrogênio.	76
Figura 67. Continuação do mecanismo de fragmentação da estaquiose (rota A.1), através da terceira reação de migração de β -hidrogênio.	76

Figura 68. Continuação do mecanismo de fragmentação da estaquiose (rota A.2), através da terceira reação de migração de β -hidrogênio.....	77
Figura 69. Continuação do mecanismo de fragmentação da estaquiose (rota B), através da terceira reação de migração de β -hidrogênio.....	77
Figura 70. Continuação do mecanismo de fragmentação da estaquiose (rota B.1), através da terceira reação de migração de β -hidrogênio.....	78
Figura 71. Continuação do mecanismo de fragmentação da estaquiose (rota B.2), através da terceira reação de migração de β -hidrogênio.....	78
Figura 72. Mecanismo de fragmentação pela eliminação inicial de anel furânico da 1-kestose, formando apenas íon fragmento de cadeia saturada (m/z 365).....	79
Figura 73. Mecanismo de fragmentação da 1-kestose, através da eliminação inicial do anel pirânico.	80
Figura 74. Continuação do mecanismo de fragmentação da 1-kestose (rota C e D), através da segunda reação de migração de β -hidrogênio.....	80
Figura 75. Mecanismo de fragmentação da nistose, através da eliminação inicial do anel pirânico.	81
Figura 76. Continuação do mecanismo de fragmentação da nistose (rota A), através da segunda reação de migração de β -hidrogênio.....	81
Figura 77. Continuação do mecanismo de fragmentação da nistose (rotas A.1 e A.2), através da terceira reação de migração de β -hidrogênio.....	82
Figura 78. Continuação do mecanismo de fragmentação da nistose (rotas B.1 e B.2), através da terceira reação de migração de β -hidrogênio.....	82
Figura 79. Cromatograma, por CLAE-IR, de uma solução padrão dos oligossacarídeos inicialmente investigados: (A) maltose – 10,5 min; (B) 1-kestose – 13,6 min; (C) rafinose – 15,2 min; (D) nistose – 18,6 min; (E) estaquiose – 25,9 min.....	83
Figura 80. Espectro de massas, por EM-EM, do íon de m/z 689,6 obtido nos extratos das amostras 1 e 2 e com distinto perfil de fragmentação.	85
Figura 81. Espectros de massas, por EM-EM, obtidos no extrato da amostra de café solúvel 5: (A) íon m/z 365 (t_R = 1,00 min); (B) íon m/z 527 (t_R = 3,57 min); (C) íon m/z 689,6 (t_R = 5,00 min); e (D) íon m/z 689 (t_R = 7,60 min).	86

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo de erro de identificação por EM em mDa.	27
Equação 2. Cálculo de erro de identificação por EM em ppm.	27
Equação 3. Cálculo de resolução em porcentagem.	60
Equação 4. Cálculo de resolução à largura da base.	60
Equação 5. Cálculo de resolução à largura em meia altura da base.	60
Equação 6. Cálculo de G para Teste de Grubbs.	84
Equação 7. Cálculo de C para Teste de Cochran.	84

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

Å	Ångström (unidade de medida de comprimento)
β -hidrogênio	Átomo de hidrogênio ligado ao carbono β
°C	graus de temperatura na escala Celsius
α (1→4)	Ligação glicosídica entre o carbono 1 da α -glicose e o carbono 4 de outra α -glicose
α (1→6)	Ligação glicosídica entre o carbono 1 da α -galactose e o carbono 6 da α -glicose
α,β (1↔2)	Ligação glicosídica entre o carbono 1 da α -glicose e o carbono 2 da β -frutose
β (2→1)	Ligação glicosídica entre o carbono 2 da β -frutose e o carbono 1 de outra β -frutose
$\mu\text{g/mL}$	micrograma por mililitro
μL	microlitro
$\mu\text{L/min}$	microlitro por minuto
μm	micrometro
%	por cento
$\sum_{i=1}^k s_i^2$	Somatório das variâncias
ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café
ACS	Grau de pureza de solventes de acordo com a especificação da <i>American Chemical Society</i>
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
APPI	<i>Atmospheric Pressure Photoionization</i>
C_{calc}	Valor calculado de C (Teste de Cochran)
CG	Cromatografia Gasosa
CID	<i>Collision-Induced Dissociation</i>
CIH	Cromatografia por Interação Hidrofílica
CL	Cromatografia Líquida
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-IR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Índice de Refração
CLUAE	Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CLUE-CIH	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência por Interação Hidrofílica
cm	centímetro
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
C_8	Fase estacionária de sílica quimicamente modificada com inserção de grupamento com 8 átomos de carbono
C_{18}	Fase estacionária de sílica quimicamente modificada com inserção de grupamento com 18 átomos de carbono
C_{30}	Fase estacionária de sílica quimicamente modificada com inserção de grupamento com 30 átomos de carbono
Da	Dalton
d.C.	Depois de Cristo
DIC	Detector de Ionização em Chama
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPA	Detector por Pulso Amperométrico
ECD	<i>Electron Capture Dissociation</i>

EM	Espectrometria de Massas
EM-EM	Espectrometria de Massas Sequencial
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
ETD	<i>Electron Transfer Dissociation</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FE	Fase estacionária
FIPA	Fotoionização à Pressão Atmosférica
FLR	Fluorescência
FM	Fase móvel
f_R	Fator de resposta
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
g	grama
G_1, G_2, G_3	Valor calculado de G (Teste de Grubbs) para determinado n
GP	grau de pureza
H_x	Altura do pico x
H_{vx}	Altura do vale do pico x
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Chromatography</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
$[(H_3PO_4)_n + xH]^{x+}$	Agregados iônicos positivos do ácido fosfórico
$[(H_3PO_4)_n - xH]^{x-}$	Agregados iônicos negativos do ácido fosfórico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICO	<i>International Coffee Organization</i>
IE	Ionização por impacto de elétrons
IES	Ionização por eletrospray
IES+	Ionização por eletrospray em modo positivo
IES-	Ionização por eletrospray em modo negativo
IR	Índice de Refração
IQPA	Ionização Química à Pressão Atmosférica
IT	Analizador de massas do tipo <i>Íon-Trap</i>
IUPAC	<i>International Union for Pure and Applied Chemistry</i>
J.O.C.E.	Jornal Oficial das Comunidades Europeias
kcal/mol	quilocaloria por mol
kg	quilograma
kV	quilovolts
LC-MS	<i>Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>
L/h	litro por hora
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption/ionization</i> (dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz)
mDa	miliDalton
mesh	Unidade utilizada para medição de porosidade
mg	miligrama
mg/mL	miligrama por mililitro
min	minuto
mL	milímetro
mL/min	mililitro por minuto
mm	milímetro
mm/ μ m	milímetro por micrometro
mM	milimolar
m/m	massa/massa

MPa	megaPascal
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MS-MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
MS ⁿ	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
<i>m/z</i>	<i>mass/charge</i> ou relação massa/carga do íon
M ⁺	Íon molecular formado pela perda de 1 elétron
M ⁻	Íon molecular formado pelo ganho de 1 elétron
[M + Cl] ⁻	Aduto com átomo de cloro
[M + H] ⁺	Molécula protonada
[M - H] ⁻	Molécula desprotonada
[M + K] ⁺	Aduto com átomo de potássio
[M + Na] ⁺	Aduto com átomo de sódio
[M + Na - 180] ⁺	Molécula sodiada formada a partir da perda de 180 Da
[2M + H] ⁻	Dímero da molécula protonada
[2M - H] ⁻	Dímero da molécula desprotonada
[2M + Na] ⁺	Dímero coordenado com átomo de sódio
[3M + H] ⁺	Trímero da molécula protonada
<i>n_e</i>	Número de íons base nos cromatogramas de íons específicos para as moléculas sodiadas
nm	nanômetro
<i>n_t</i>	Número de íons base nos cromatogramas de íons totais
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
ppm	partes por milhão
ppt	partes por trilhão
PTFE	Politetrafluoretileno
psi	<i>pound force per square inch</i> ou libra-força por polegada quadrada (unidade de pressão)
PVDF	<i>polyvinylidene fluoride</i> ou fluoreto de polivinilideno
Q	Analizador de massas do tipo Quadrupolo
QTDV	Analísadores em sequência do tipo Quadrupolo e Tempo de Voo
QTOF	Analísadores em sequência do tipo Quadrupolo e Tempo de Voo
<i>R_s</i>	Resolução cromatográfica
<i>s</i>	Desvio padrão amostral
<i>s²</i>	Variância
<i>s_{max}²</i>	Variância máxima em grupo de n
SPE	<i>Solid-Phase Extraction</i>
TDV	Analizador de massas do tipo Tempo de Voo
TOF	<i>Time of Flight</i> ou Analizador de massas do tipo Tempo de Voo
<i>t_R</i>	Tempo de retenção
<i>u</i>	unidade de massa atômica unificada
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Região do ultravioleta no espectro da luz
UV/Vis	Região do ultravioleta/visível no espectro da luz
V	volts
v/v	volume/volume
<i>w_{bx}</i>	Largura da base do pico x
<i>w_{hx}</i>	Largura à meia altura da base do pico x
\bar{Y}, \bar{X}	Média dos valores de y ou x
<i>Y_i</i>	Valor de y para determinado x

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1.	Café: Do Plantio ao Consumidor.....	3
2.1.1.	Contexto histórico sobre o café.....	3
2.1.2.	Caracterização botânica.....	4
2.1.3.	Tecnologia cafeeira.....	6
2.1.4.	Composição química e propriedades funcionais.....	9
2.1.5.	Importância econômica.....	13
2.1.6.	Qualidade e legislação.....	16
2.2.	Investigação de Fraudes em Café.....	17
2.2.1.	Técnicas analíticas empregadas.....	17
2.2.2.	Cromatografia.....	19
2.2.2.1.	Cromatografia líquida.....	20
2.2.2.2.	Detecção por espectrometria de massas.....	23
2.2.2.3.	Métodos cromatográficos empregados para determinação de adulteração em café ..	27
2.2.3.	Carboidratos: definição e análise por espectrometria de massas.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1.	Execução do Procedimento Experimental.....	35
3.2.	Material.....	35
3.2.1.	Vidrarias, equipamentos e insumos.....	35
3.2.2.	Padrões analíticos.....	35
3.2.3.	Solventes.....	36
3.2.4.	Instrumentação.....	36
3.2.5.	Amostras.....	37
3.3.	Preparo de Soluções.....	37
3.3.1.	Solução qualitativa aquosa de ácido fosfórico a 0,1% (v/v).....	37
3.3.2.	Solução qualitativa aquosa de ácido fosfórico a 0,1% e acetonitrila (1:1).....	37
3.3.3.	Solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (v/v).....	37
3.3.4.	Solução qualitativa aquosa de ácido fórmico a 0,1% e acetonitrila (1:1).....	38
3.3.5.	Solução de ácido fórmico a 0,1% (v/v) em acetonitrila.....	38
3.3.6.	Solução aquosa de formiato de amônio a 10 mM.....	38

3.3.7.	Soluções padrão de cada analito (maltose, rafinose, estaquiase, 1-kestose e nistose)	38
3.3.8.	Soluções padrão contendo mistura de maltose, rafinose, estaquiase, 1-kestose e nistose	39
3.3.9.	Soluções padrão de outros carboidratos (sacarose e maltotriose)	39
3.3.10.	Solução padrão contendo maltose e sacarose	39
3.3.11.	Solução padrão contendo rafinose, 1-kestose e maltotriose	40
3.3.12.	Solução aquosa de etanol a 80,0% (v/v)	40
3.3.13.	Soluções padrão para curva analítica por CLAE-IR	40
3.3.14.	Solução aquosa de acetonitrila a 70,0% (v/v)	40
3.3.15.	Solução aquosa de acetonitrila a 75,0% (v/v)	40
3.3.16.	Solução aquosa de acetonitrila a 90,0% (v/v)	40
3.3.17.	Solução aquosa de acetonitrila a 20,0% (v/v)	41
3.4.	Determinação do Método Espectrométrico	41
3.4.1.	Cálculo das massas monoisotópicas de cada analito	41
3.4.2.	Calibração do detector	41
3.4.3.	Definição dos parâmetros espectrométricos	41
3.5.	Determinação do Método Cromatográfico	42
3.5.1.	Cromatografia líquida de ultra eficiência em fase reversa	42
3.5.2.	Cromatografia líquida de ultra eficiência por interação hidrofílica	43
3.6.	Aplicação da Metodologia Analítica	43
3.6.1.	Moagem dos grãos de café e dos adulterantes	43
3.6.2.	Extração dos carboidratos solúveis das amostras torradas e moídas	44
3.6.3.	Extração de carboidratos solúveis de amostras comerciais de café	44
3.6.4.	Injeção dos Extratos por CLUE-EM-EM	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1.	Desenvolvimento do Método Espectrométrico	46
4.1.1.	Etapas preliminares	46
4.1.2.	Detecção de oligossacarídeos por espectrometria de massas em modo positivo	47
4.1.3.	Detecção de oligossacarídeos por espectrometria de massas em modo negativo	52
4.1.4.	Análise dos solventes utilizados	55
4.1.5.	Otimização do método espectrométrico	58
4.2.	Desenvolvimento dos Métodos Cromatográficos	59
4.2.1.	Cromatografia com fase reversa	60

4.2.2.	Cromatografia por interação hidrofílica - CIH.....	62
4.3.	Confirmação dos Marcadores Químicos para Cada Adulterante	64
4.3.1.	Análise de diferentes grãos por CLUE-EM-EM	64
4.3.2.	Pesquisa de novos potenciais marcadores químicos	66
4.3.3.	Proposta de mecanismos de fragmentação para diferenciação entre isômeros	69
4.3.3.1.	Maltose e maltotriose	70
4.3.3.2.	Sacarose	72
4.3.3.3.	Rafinose e estaquiase	73
4.3.3.4.	1-kestose e nistose	79
4.4.	Aplicação da Metodologia em Amostras Comerciais de Café.....	83
4.4.1.	Testes prévios de purificação (<i>clean up</i>) por CLAE-IR.....	83
4.4.2.	Análise dos extratos de amostras comerciais de café por CLUE-EM-EM	85
5	CONCLUSÕES	87
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
	ANEXOS	98
	ANEXO A – RESULTADOS DO PROCESSO DE TORREFAÇÃO DOS GRÃOS.....	99
	ANEXO B – RESULTADOS DA ANÁLISE POR PCR EM TEMPO REAL DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE CAFÉ	100

1 INTRODUÇÃO

Os frutos do cafeeiro, pertencente à família Rubiaceae e com destaque as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, são responsáveis por prover uma das bebidas mais apreciadas em todo o mundo. Diferentes tecnologias pós-colheitas, que incluem sobretudo o beneficiamento e ainda a torrefação e a moagem, possibilitam a obtenção de inúmeros produtos na indústria cafeeira, como os grãos verdes, o café torrado e moído, os produtos descafeinados, os cafés solúveis e, atualmente, as cápsulas de café.

Sua composição química inclui basicamente elevados teores de carboidratos, principalmente polissacarídeos. O tratamento térmico implica em diferenças significativas entre o grão verde e o grão torrado, como a redução dos teores de cafeína e de ácidos clorogênicos, responsáveis por inúmeras atividades biológicas. Porém, destaca-se a formação das melanoidinas e de substâncias volatilizáveis, resultantes das reações de Maillard, de pirólise e de caramelização e que conferem características sensoriais e funcionais distintas à bebida preparada.

Estas características positivas influenciaram o aumento do consumo nacional e mundial de café nas últimas décadas. Do ponto de vista econômico em um período de crise, a cafeicultura apresenta-se como uma atividade agrícola importante para o nosso país, atrás apenas de outras culturas como de soja, cana-de-açúcar e milho. Além disso, o Brasil é o atual líder de produção e de exportação de grãos de café, sendo responsável por mais de 30% do mercado mundial de café. Estima-se ainda um crescimento tanto na exportação quanto no consumo interno para os próximos anos.

A subsistência da indústria cafeeira brasileira só será conquistada através da garantia da qualidade do produto comercializado. Este aspecto pode ser influenciado por diferentes fatores, como a espécie botânica empregada, o grau de torrefação e a ocorrência de fraudes. A adição de matérias-primas de menor custo financeiro em café já é uma ocorrência relatada desde meados do século XIX no continente europeu enquanto no Brasil apenas na década de 60 do século passado. O aspecto oleoso, o tamanho de partícula e a coloração do produto final tende a facilitar a adulteração do café na forma torrada e moída, principal forma de consumo nas residências brasileiras.

Órgãos nacionais e internacionais tem atuado na garantia da qualidade do café, como a Associação Brasileira da Indústria do Café (ABIC), *International Coffee Organization* (ICO), entre outras. No Brasil, a legislação era regida pela Instrução Normativa de nº 16 de 24 de maio de 2010, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que reprovava cafés torrados e moídos quando estes apresentavam teor de impurezas, sedimentos e matérias estranhas igual ou superior a 1,0%. Esta se encontrava em vigor até o início de 2013 e existe uma forte tendência para que seja admitida uma legislação mais rígida.

Tradicionalmente, a microscopia é a técnica mais empregada para a detecção de adulteração em cafés, porém esta depende de um maior tempo de análise e do recrutamento de profissionais capacitados e experientes para a identificação botânica. Outras técnicas analíticas já foram utilizadas na literatura para determinação da presença de adulterantes como, por exemplo, milho, soja, cevada, casca de café e sementes de açaí.

Uma alternativa atual é o emprego da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial (EM-EM), que pode conferir, por exemplo, eficiência de separação, alta sensibilidade e seletividade, através da diferenciação isomérica pelo perfil de fragmentação de oligossacarídeos presentes em matrizes vegetais. Esta abordagem pelo perfil de carboidratos é uma tendência utilizada nos métodos cromatográficos para detecção de adulterantes em café desde os primeiros artigos no ano de 1958 até os dias de hoje. A partir deste mesmo período, a detecção de carboidratos por Espectrometria de Massas também começou a ser amplamente investigada.

Esta dissertação teve como objetivo geral:

- ✓ Desenvolver um método de detecção de adulterantes, através do perfil de oligossacarídeos, em amostras comerciais de café por CLUE-EM-EM.

Foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Estabelecer os parâmetros de operação do espectrômetro de massas através de infusão direta das soluções padrão de diferentes oligossacarídeos, possíveis marcadores químicos de adulteração;
- ✓ Determinar os perfis de diferenciação, através das reações de fragmentação, para cada analito estudado;
- ✓ Estabelecer o método cromatográfico pelo emprego de uma solução padrão contendo todos os analitos estudados;
- ✓ Aplicar a metodologia investigada em amostras de café isentas de adulteração e em amostras dos adulterantes;
- ✓ Aplicar a metodologia investigada em amostras adquiridas no comércio interno brasileiro, sobretudo para os cafés torrados e moídos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Café: Do Plantio ao Consumidor

2.1.1. Contexto histórico sobre o café

Ao longo da história da humanidade, o café alcançou mundialmente grande destaque devido à valorização de suas características sensoriais e nutricionais. Convém ressaltar que historicamente não existem evidências precisas sobre a descoberta do potencial dos grãos de café. Amamo (2014) relata que povos nômades das montanhas etíopes, ainda no século X, foram os primeiros a reconhecer o efeito estimulante através do consumo direto dos grãos. Entre tantas lendas relatadas, a mais aceita e amplamente divulgada consiste na descoberta por um pastor de ovelhas etíope Kaldi (Figura 1), há cerca de 1000 anos atrás (ABIC, 2010; ICO, 2016a).



Figura 1. Ilustração do pastor etíope Kaldi e suas ovelhas (ABIC, 2010).

De acordo com o artigo publicado em um periódico colombiano pelo célebre médico daquele país, Fernando Serpa Flórez (1964), esta história foi relatada pelo religioso Fauto Narvone em Roma, no ano de 1671. Este descreveu que, em uma noite, um humilde pastor saiu para apascentar suas ovelhas e camelos e observou um comportamento anormal em seus animais, estando estes muitos inquietos, agitados, alegres e sem sono. Um monge local ajudou o pastor a correlacionar esta situação com a ingestão dos frutos de coloração avermelhada presentes naquela região. Ainda segundo o relato, o mesmo monge ingeriu os frutos e observou os efeitos estimulantes, sendo o principal responsável inicial pela divulgação do café. Segundo informações da ABIC (2010), o consumo dos frutos na forma de infusão, o que ajudava este religioso a resistir ao sono durante as suas orações ou ainda as longas horas de leitura do breviário, rapidamente se espalhou entre os mosteiros, criando uma demanda pela bebida.

A solução foi o cultivo regular dos frutos de café, realizado pela primeira vez nos mosteiros islâmicos no Iêmen. Entretanto, foram os árabes os responsáveis pela alta valorização do café, tendo dominado o cultivo dos grãos e desenvolvido o processo de torrefação, empregado para a obtenção da bebida mundialmente apreciada (ABIC, 2010). É neste contexto que se encontra a controvérsia do termo “café”, em que muitos pesquisadores atribuem à província de Kaffa, região etíope onde originalmente foram encontrados os grãos, enquanto outros relacionam a palavra árabe *qahwa* (na tradução, vinho), no qual foi como “vinho da Arábia” que a bebida ficou conhecida na Europa, após a sua inserção pelos viajantes (SERPA FLÓREZ, 1964; ABIC, 2010; AMAMO, 2014).

No contexto histórico sobre o café, duas situações curiosas foram relatadas na literatura. Diante de tamanha valorização do café, uma lei árabe permitia a mulher o divórcio caso o seu marido fosse incapaz de lhe prover certa quantidade diária da bebida (ABIC,

2010). Outro acontecimento está relacionado ao consumo da bebida pelos cristãos na Europa Ocidental. Como forma de encerrar a discussão sobre a permissão do consumo de uma bebida originalmente produzida pelos islâmicos no Oriente, o que a caracterizava como demoníaca, o Papa Clemente VIII provou a bebida e, após este ato, decidiu que o batismo do café seria a melhor forma de libertá-lo do diabo (SERPA FLÓREZ, 1964).

De fato, foram necessários muitos esforços dos povos europeus para conseguir desvincular a bebida dos povos árabes, visto que estes exportavam apenas a semente do cafeeiro, parte infértil dos frutos e inviável a cultivos em outras regiões do planeta (ICO, 2016a). Em 1616, os holandeses venceram essa disputa e iniciaram a cultura do café em outras regiões, seguido dos franceses. A partir daí, ocorreu um amplo cultivo na África e na América Central e do Sul (ABIC, 2010).

Toda esta valorização também incentivou a criação das casas de café ou cafeterias (Figura 2), locais em que, além do consumo de café, eram realizadas também atividades de descontração, transações comerciais e até planejamentos de estratégias políticas e revolucionárias. As primeiras casas de café foram abertas ainda em Meca, na Arábia Saudita, conhecidas como *kaveh kanes*, porém outras casas também se destacaram como o famoso café Procópio localizado em Paris, na França, e aberto desde 1686 até os dias de hoje, e a Bolsa de Valores de Nova Iorque e o Banco de Nova Iorque, nos Estados Unidos, que começaram como casas de café (SERPA FLÓREZ, 1964; ICO, 2016a).

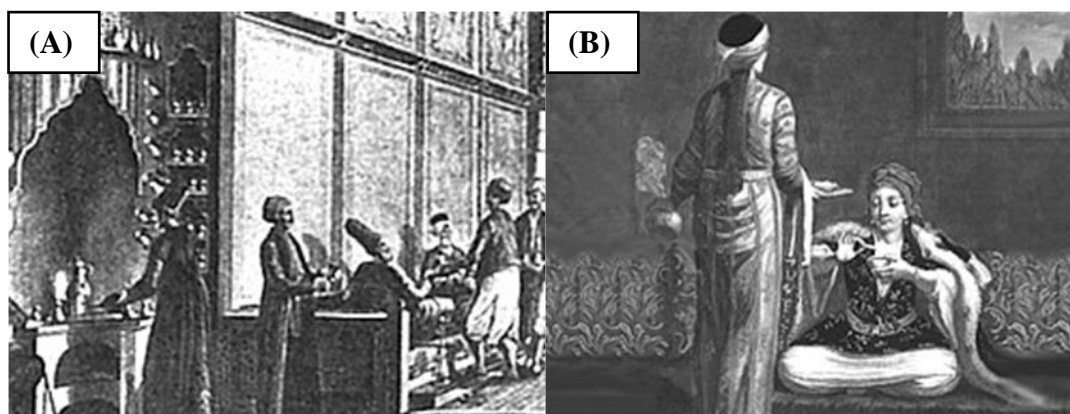


Figura 2. Casas de café na Turquia (A) e em Constantinopla (B) (ABIC, 2010).

No Brasil, os primeiros cafezais foram cultivados na região norte do país, principalmente no estado do Pará, sendo introduzidos através das colônias europeias nas Guianas. Após o período inicial, outros estados iniciaram seus cultivos, como Maranhão, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Minas Gerais. O café ganhou rapidamente uma posição de destaque na economia brasileira, sendo a grande riqueza brasileira por quase um século e propiciando uma aceleração do crescimento do país. A cafeicultura tornou-se rentável devido às condições climáticas favoráveis e também à fácil adaptação dos cafeeiros (ABIC, 2010; ICO, 2016a).

2.1.2. Caracterização botânica

Os cafeeiros consistem em pequenas árvores, de altura entre 2 m a 8 m, cujos frutos são empregados para a obtenção dos grãos de café (KEW, 2016). Seus dados taxonômicos incluem a família Rubiaceae e o gênero *Coffea*, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Classificação taxonômica dos cafeeiros (ITIS, 2016).

Classificação	Dados
Reino	Plantae
Divisão	Tracheophyta/Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Superordem	Asteranae
Ordem	Gentianales/Rubiales
Família	Rubiaceae
Gênero	<i>Coffea</i> L. <i>Coffea arabica</i> L.,
Espécies	<i>Coffea canephora</i> Pierre ex A. Froehner, <i>Coffea liberica</i> W. Bull ex Hiern, entre outras.

Entre as 125 espécies pertencentes ao gênero *Coffea*, destacam-se as espécies *C. arabica* e *C. canephora*, conhecidos respectivamente como café arábica e café robusta ou conilon, as mais empregadas na cafeicultura mundial (MURKOVIC & DERLER, 2006; PARRAS et al., 2007). As duas espécies apresentam diferenças quanto às características botânicas e composição química dos seus frutos e a qualidade sensorial do produto final obtido através da utilização de seus grãos (BARBIN et al., 2014). Outra espécie empregada, porém com ainda pouca representatividade, é a espécie *Coffea liberica*, responsável por 2% da produção mundial de café (PATAY et al., 2016).

O fruto do café (Figura 3) consiste em uma drupa oval com tamanho de aproximadamente 10 mm, superfície lisa, brilhante e geralmente de coloração avermelhada quando atingido o estágio de maturação “cereja” (NARITA & INOUE, 2014).



Figura 3. Frutos do cafeeiro em diferentes estádios de maturação (KEW, 2016).

Segundo Esquivel & Jiménez (2012) e Bresciani et al. (2014), os frutos podem ser subdivididos em seis partes (Figura 4):

- O epicarpo ou a casca (*skin*), cuja coloração varia desde o verde ao vermelho escuro;
- O mesocarpo externo ou a polpa amarelada e fibrosa (*pulp*);
- A camada de mucilagem ou a pectina (*mucilage*), de característica translúcida, fina e altamente viscosa e hidratada;
- O endocarpo ou o pergaminho (*parchment*), uma camada fina e amarelada;

- e. O perisperma, a película prateada ou a testa (*silverskin*), responsável por cobrir o grão de café;
- f. O endosperma, a semente ou o grão de café (*bean*).

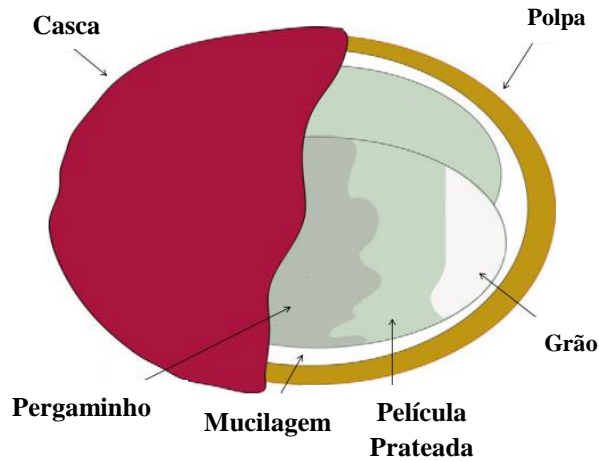


Figura 4. Esquema do fruto maduro de café e suas subdivisões, adaptado de Esquivel & Jiménez (2012).

As principais matérias-primas de interesse para a indústria cafeeira são as sementes, em que os processos tecnológicos empregados contribuirão para a obtenção da bebida à base de café pelos consumidores.

2.1.3. Tecnologia cafeeira

A tecnologia tradicional cafeeira compreende as etapas para a obtenção dos principais produtos cafeeiros, que incluem principalmente o cultivo e a colheita dos frutos de café, o beneficiamento e obtenção das sementes do café, o processo de torrefação e a posterior moagem dos grãos torrados. No mercado internacional, o café é basicamente comercializado na forma dos grãos verdes, com o processamento térmico a ser realizado apenas no país em que ocorrerá o preparo da bebida (ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012). É importante destacar que é de conhecimento geral que, no Brasil, os grãos de melhor qualidade tendem a ser destinados à exportação enquanto o produto em pó consumido internamente constitui-se de uma mistura de cafés de diferentes procedências e graus de qualidade (MENEZES JÚNIOR, 1953).

A cafeicultura, etapa inicial para obtenção dos frutos, está basicamente situada em áreas que abrangem latitudes de 25° ao norte e sul da Linha do Equador (NARITA & INOUE, 2014). A Figura 5 destaca esta região do planeta, conhecida como “cinturão do café”. Quanto às condições climáticas ideais para as espécies produtoras, diferentes informações estão disponíveis na literatura e, portanto, estão dispostas na Tabela 2.

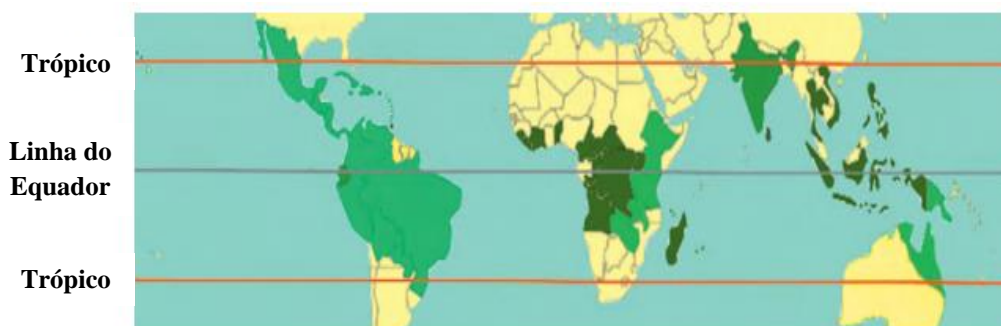


Figura 5. O cinturão do café, sendo representados, do verde mais claro ao escuro, países que predominam o café arábica (por exemplo, Brasil), café robusta (ex. Índia) e produção dividida (ex. Indonésia), adaptado de Paterson et al. (2014).

Tabela 2. Condições climáticas relacionadas para as espécies arábica e robusta.

	<i>International Coffee Organization (ICO, 2006)</i>	<i>CODEX ALIMENTARIUS (2009)</i>	<i>Paterson et al. (2014)</i>
Café Arábica	Altitudes de 600 m a 1600 m	Altitudes de 600 m a 2000 m com temperaturas entre 18°C e 22,5°C	Regiões subtropicais (latitudes de 16° a 24° e altitudes de 550 m a 1100 m), como no Brasil e Jamaica Regiões equatoriais (latitudes menores que 10° e altitudes de 1100 m a 1900 m), como Colômbia e Etiópia
Café Robusta	Frequentemente em regiões tropicais úmidas ou ainda ao nível do mar	Altitudes abaixo de 600 m com temperaturas de 22°C a 26°C	Regiões com latitudes de 10° e altitudes de 900 m (nível do mar)

A colheita dos frutos, realizada geralmente após 5 anos da plantação dos cafeeiros, ocorre por derriça (retirada) manual no pano ou mecanizada, seguida de uma pré-limpeza, lavagem e consequente flotação dos frutos em água para classificação e separação dos frutos maduros (MUSSATTO et al., 2011; FUNED, 2012). Após as fases iniciais do tratamento pós-colheita, dois processamentos podem ser empregados para beneficiamento dos grãos maduros. A metodologia mais simples é o processo à seco, mundialmente utilizado para o café robusta, em que se expõe os grãos a secagem ao sol e procede-se o descascamento mecânico para remoção da pele, polpa, mucilagem e pergaminho (GONZALEZ-RIOS et al., 2007b; ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012).

A segunda metodologia, conhecida como processo úmido, é empregada preferencialmente para o café arábica e consiste na utilização de grandes volumes de água nas seguintes etapas (GONZALEZ-RIOS et al., 2007a; GONZALEZ-RIOS et al., 2007b; ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012):

- a. Remoção mecânica da casca e da polpa dos frutos ainda fresco por pressionamento em água;
- b. Retirada da mucilagem através de fermentação controlada por 12 a 48 horas, ocorrendo a produção de compostos voláteis e metabólitos microbianos, precursores das substâncias responsáveis pelo sabor do café torrado, ou ainda por fricção mecânica, que permite a redução do gasto de água e a recuperação da mucilagem;

- c. Secagem e descasque dos grãos, retirando o pergaminho;
- d. Remoção opcional da película prateada, sendo feita através de polimento e garantindo um café tipo *premium*.

Gonzalez-Rios et al. (2007b) citam ainda que o processamento pós-colheita pode apresentar variações significativas, especificados para cada região de produção, como a retirada de mucilagem dos grãos de café em condições de ausência de água no México. Esquivel & Jiménez (2012) enfatizam que a escolha do método de obtenção do café verde exerce influência nas características sensoriais da bebida preparada a partir do café.

Além disso, a recuperação de subprodutos dependerá do tipo de processamento. Através do método à seco, é recolhido uma fração única contendo pele, polpa, mucilagem e pergaminho. Diferentemente, o processo úmido permite a obtenção de frações contendo pele e polpa (43,2% massa/massa – m/m do fruto); mucilagem e açúcares solúveis (11,8% m/m), quando não fermentados; e pergaminho (6,1% m/m) (ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012).

Como mencionado anteriormente, a tecnologia cafeeira também engloba o processo de torrefação, tratamento térmico que provoca nos grãos de café profundas modificações em sua composição química, atividade biológica e propriedades sensoriais (GONZALEZ-RIOS et al., 2007a; PARRAS et al., 2007). Nos grãos destinados à exportação, esta etapa apenas será realizada no país em que será preparada a bebida à base de café, possibilitando manter as qualidades sensoriais do produto. A faixa de temperatura e o tempo de processo variam significativamente de acordo com diferentes artigos presentes na literatura, sendo relacionados na Tabela 3.

Tabela 3. Pârametros do processo de torrefação na literatura.

	Murkovic & Derler (2006)	Gonzalez-Rios et al. (2007a)	Bagdonaite et al. (2008)	Bicho et al. (2012)
Temperatura (°C)	240 ^a ou 270 ^b	170 a 240	240 a 300	180 a 190 ^a ou 220 a 230 ^b
Tempo (min)	3 ^b ou 6 ^a	máximo de 15	-	12 ^b ou 15 ^a

Os trabalhos de França, Mendonça, et al. (2005) e Gonzalez-Rios et al. (2007a) dividem o processo em 3 fases: o início corresponde a secagem, em que ocorre a liberação de vapor de água e substâncias volatilizáveis; em seguida, é realizada a torrefação, sendo obtidos uma variedade de substâncias e compostos poliméricos responsáveis diretamente pelo gosto, aroma e cor do café; e encerra-se com o arrefecimento imediato, evitando o escurecimento e a perda de aroma do produto final. Bicho et al. (2012) relacionam os diferentes fenômenos que acontecem no grão durante a torrefação com o aumento de temperatura:

- a. A 50°C, ocorrem as primeiras mudanças estruturais do grão de café;
- b. Em temperaturas superiores a 50°C, a desnaturação proteica e, principalmente, a evaporação da água e outros gases favorecem um aumento de volume (inchaço do grão);
- c. As reações de Maillard e de pirólise favorecem a formação de substâncias orgânicas volatilizáveis, compostos sulfurados e melanoidinas, em temperaturas próximas a 100°C;
- d. Com o aumento até 200°C, é favorecido a ruptura do endosperma, a liberação de aroma e o desenvolvimento da caramelização;
- e. Por último o resfriamento rápido, interrompendo as reações químicas.

O produto torrado tende a apresentar perda de peso de até 14 a 23%, relacionado à perda de água e substâncias volatilizáveis; aumento do volume, devido ao inchaço celular e a

destruição de polímeros como celulose e lignina; coloração mais escura e aroma de notas olfativas torradas até queimadas (PARRAS et al., 2007; BAGDONAITE et al., 2008). A etapa final consiste na diminuição do tamanho dos grãos e homogeneização do material através do processo de moagem.

Para a obtenção de outras formas de comercialização do café, são empregados ainda processos adicionais de extração e concentração, como na produção das formulações de café solúvel/instantâneo e café descafeinado e os produtos em cápsulas, que surgem como uma nova tendência para o mercado.

Existem também cafés considerados exóticos devido à peculiaridade do processo de obtenção, entre os quais, destacam-se aqueles que são obtidos a partir de excreções de diferentes animais como o café Jacu (aves jacu – *Penelope superciliares*) e o café civeta ou *Kopi Luwak* (mamíferos civeta – *Paradoxurus hermaphroditus*). O trato gastrointestinal destes animais provoca mudanças na composição química dos grãos de café quando ingeridos, conferindo as bebidas preparadas à base destes grãos aspectos sensoriais muito apreciados. Esta observação pode ser exemplificada pelo alto preço praticado no comércio para o café civeta (DE CONTI et al., 2013; JUMHAWAN et al., 2015).

2.1.4. Composição química e propriedades funcionais

Diferentes fatores vão influenciar a composição química e, conseqüentemente, as propriedades funcionais e sensoriais do café comercializado, como a espécie utilizada, as condições de cultivo, o grau de maturação dos grãos no momento da colheita e o método de processamento, já destacado anteriormente (ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012).

O café verde apresenta elevado teor de carboidratos, principalmente polissacarídeos, como galactomananas, arabinogalactanas e celulose, que representam em torno de 50% da massa do grão (REDGWELL & FISCHER, 2006; ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012). Além destes, carboidratos solúveis, lipídeos, minerais, proteínas e aminoácidos alcaloides, compostos fenólicos e outras classes de substâncias também estão presentes no grão verde, conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Composição qualitativa dos grãos de café verde (MURKOVIC & DERLER, 2006; REDGWELL & FISCHER, 2006; PARRAS et al., 2007; BELITZ et al., 2009; ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012).

Classes	Substâncias
Carboidratos	Polissacarídeos (Galactomananas, Arabinogalactanas, Celulose, Hemicelulose), Oligossacarídeos (Sacarose, Rafinose e Estaquiose) e Monossacarídeos (Glicose, Galactose, Arabinose, Frutose, Manose, Manitol, Xilose e Ribose)
Lipídeos	Triglicerídeos, Esteróis (Estigmasterol, Sitosterol), Ácidos Graxos (Ácido Palmítico, Linoleico, Linolênico, Oleico, Esteárico, Araquidônico, Lignocérico e Beénico)
Aminoácidos	Alanina, Asparagina, Fenilalanina, Ácido Glutâmico, Ácido Aspártico, Valina, Treonina, Isoleucina, Serina, Arginina, Glicina, Leucina, Prolina, Lisina, Tirosina, Glutamina, Histidina, Metionina
Metais	Potássio, Magnésio, Cálcio, Fósforo, Chumbo, Cromo, Zinco, Cobre, Níquel e Ferro

Tabela 4. Continuação.

Classes	Substâncias
Terpenos	Diterpenos Álcoois (Metilcafestol, Cafestol e Caveol), Diterpenos e Triterpenos Esterificados
Tocoferóis	α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol, α -tocotrienol, β -tocotrienol, γ -tocotrienol
Ácidos Alifáticos	Ácidos Volatilizáveis (Ácido Acético, Propanoico, Butanoico, Isovalérico, Hexanoico e Decanoico) e Não-Voláteis (Ácido Cítrico, Málico e Quínico)
Compostos Fenólicos	Ácidos Fenólicos (Ácido Cafeico, Ferúlico, <i>p</i> -cumárico e Nicotínico), Ácidos Clorogênicos (Ácido Cafeoilquínico, Feruloilquínico, Dicafeoilquínico, <i>p</i> -cumaroilquínico e outros derivados) Antocianinas, Proantocianidinas, Isoflavonas, Lignananas e Taninos
Alcaloides	Cafeína, Trigonelina, Teobromina e Teofilina

A utilização de altas temperaturas no processo de torrefação dos grãos favorece a ocorrência de sucessivas reações químicas, como a hidrólise de polissacarídeos em moléculas de baixa massa molecular, a degradação de substâncias termolábeis e a formação de diversos compostos através das reações de Maillard e de pirólise (FRANCA, MENDONÇA, et al., 2005; GONZALEZ-RIOS et al., 2007a; PARRAS et al., 2007; BICHO et al., 2012; ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012). Conforme Tabela 5, os grãos de café de ambas as espécies produtoras tendem a apresentar diferenças qualitativas e quantitativas em sua composição química antes e após a torrefação.

Tabela 5. Teores dos principais constituintes químicos do café verde e torrado em grau médio, em % (m/m de base seca) (BELITZ et al., 2009; ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012).

	Café Verde		Café Torrado	
	<i>C. arabica</i>	<i>C. canephora</i>	<i>C. arabica</i>	<i>C. canephora</i>
Carboidratos	55 a 66	40 a 56	38	41
Lipídeos	15 a 18	8 a 12	17	11
Proteínas e Aminoácidos	8,7 a 12,8		10	
Minerais	3,0 a 5,4		4,5	4,7
Cafeína	0,8 a 1,4	1,7 a 4,0	1,3	2,4
Ácidos Clorogênicos	6,7 a 9,2	7,1 a 12,1	2,7	3,1
Melanoidinas	-		23	
Ácidos Alifáticos Volatilizáveis	0,1		2,4	2,5

Dentre os compostos que apresentam redução em seus teores, destacam-se a cafeína, a subclasse dos ácidos clorogênicos e os carboidratos. A cafeína (1,3,7-trimetilpurina-2,6-diona ou 1,3,7-trimetilxantina), cuja estrutura química está ilustrado na Figura 6, é o alcaloide mais abundante nos grãos de café, sendo responsável por conferir o sabor amargo à bebida preparada à base de café (RODRIGUES & BRAGAGNOLO, 2013). O processo de torrefação implica na diminuição do teor de cafeína, principalmente para os cafés robusta, que apresentam maiores concentrações deste metabólito. Segundo França, Mendonça, et al.

(2005), durante este tratamento, estima-se uma tendência de redução em cerca de 30%, resultado possivelmente do arraste da cafeína pelo vapor de água liberado.

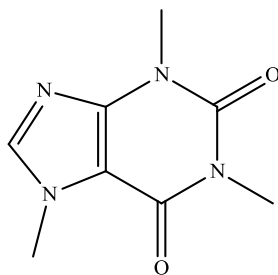


Figura 6. Fórmula estrutural da cafeína.

Entretanto, o maior destaque à cafeína ocorre pelas suas diferentes atividades biológicas. Por exemplo, a ingestão de doses baixas a moderadas de cafeína (entre 50 a 300 miligramas - mg) já implica em melhoras significativas na performance cognitiva e psicomotora do consumidor. Outras propriedades incluem aumento da circulação sanguínea e respiração, redução do peso corporal, efeitos potenciais anti-inflamatório e imunossupressor, diminuição do risco de desenvolvimento de doença de Parkinson, Alzheimer e diabetes tipo II, potencial de atividade antioxidante, entre outros (ALVES, CASAL & OLIVEIRA, 2009; ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012; HALL et al., 2015).

Outro constituinte importante do café são os ácidos clorogênicos, classe de compostos formados a partir da reação de esterificação entre ácidos hidroxicinâmicos, como os ácidos cafeico, ferúlico e *p*-cumárico, com o ácido quínico (Figura 7) (RODRIGUES & BRAGAGNOLO, 2013).

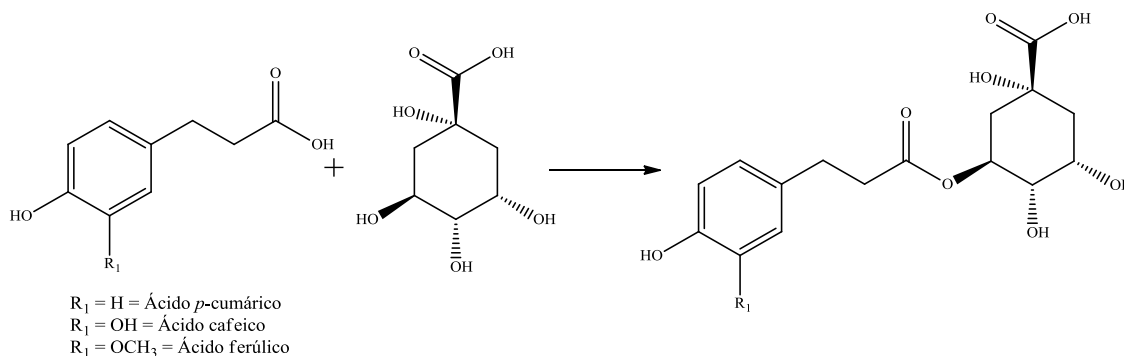


Figura 7. Reação de esterificação e formação de um ácido clorogênico.

De acordo com Hall et al. (2015), os ácidos clorogênicos tem apresentado inúmeros efeitos biológicos, que incluem propriedades antimutagênica, antiviral, anticarcinogênico, anti-inflamatório, antioxidante, neuroprotetor e neurotróficas. A ingestão de produtos à base de café é a principal fonte de ácido clorogênico na dieta humana, ainda que estes, à temperatura de torrefação, apresentem redução em seus teores, devido à formação de ácidos clorogênicos lactônicos, a partir da perda de uma molécula de água, e até de melanoidinas (ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012; RODRIGUES & BRAGAGNOLO, 2013).

O processo de formação de novos compostos durante a torrefação dependerá basicamente da constituição, no grão de café verde, de aminoácidos e carboidratos, cujo elevado teor apresenta papel importante no desenvolvimento do café torrado (MURKOVIC & DERLER, 2006). Os polissacarídeos são os principais carboidratos presentes nos grãos verdes de café, porém, entre os carboidratos de baixa massa molecular, destaca-se ainda a sacarose, com um teor aproximadamente entre 5% a 12% (m/m) em base seca (REDGWELL

& FISCHER, 2006). Knopp et al. (2005) relatam também a presença de outras substâncias, porém em concentrações até 100 vezes inferior que a sacarose, como frutose (0,4 %), glicose (0,2%), rafinose (0,06%) e estaquiose (0,04%).

O tratamento térmico altera a composição qualitativa e quantitativa de carboidratos, através da clivagem da cadeia central e das cadeias laterais dos polissacarídeos, como as arabinogalactanas, que apresentam maior susceptibilidade à degradação térmica; da degradação dos oligossacarídeos à monossacarídeos; e da rápida conversão à produtos da reação de Maillard e de pirólise pelos monossacarídeos presentes no café verde (REDGWELL & FISCHER, 2006). A Figura 8 representa um esquema sobre as principais transformações químicas submetidas nos grãos de café através do processo de torrefação.

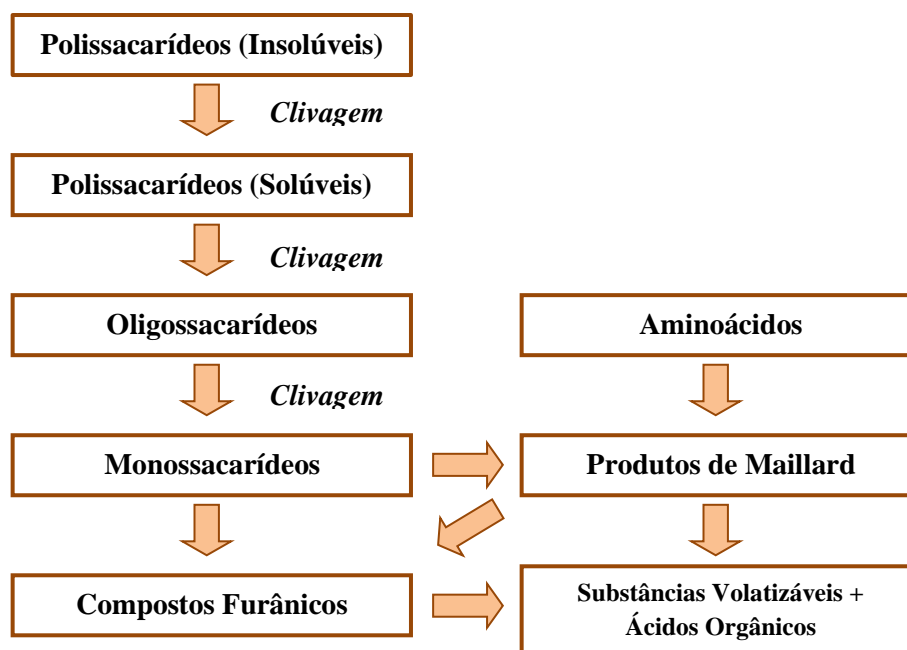


Figura 8. Esquema de conversão dos carboidratos a novos produtos durante o processo de torrefação, adaptado de Oosterveld et al. (2003).

Entre os principais produtos, as melanoidinas compõe a classe de maior abundância nos grãos de café torrado. Estas são caracterizadas como compostos de alta massa molecular e de estruturas químicas desconhecidas, devido à complexidade de suas moléculas (ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012). As melanoidinas ainda conferem importante contribuição sensorial para o café torrado, além de estarem relacionadas ao aumento da atividade antioxidante dos cafés torrados, quando comparados aos grãos verdes, e propriedade antimicrobiana, sinergicamente a atuação da cafeína e dos ácidos clorogênicos. É importante ressaltar que graus médios de torrefação resultarão em uma maior atividade antioxidante, proveniente do equilíbrio entre a degradação de compostos fenólicos e a formação de novas substâncias (ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012; SUNARHARUM et al., 2014).

Substâncias carcinogênicas também são formadas nesta etapa da produção, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Porém, entre os trabalhos científicos, existe um maior destaque para a presença de acrilamida, por ser o café a principal fonte de ingestão diária desta substância em diversos países como Noruega, Suécia, Suíça e Dinamarca (MURKOVIC & DERLER, 2006; BAGDONAITE et al., 2008; ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012).

A formação de acrilamida durante a torrefação depende do tempo e temperatura de processo, da espécie de grão utilizada e principalmente do teor inicial de asparagina, segundo aminoácido mais abundante em grãos de café verde e limitante para a reação de síntese

(MURKOVIC & DERLER, 2006; BAGDONAITE et al., 2008). O trabalho de Bagdonaitė et al. (2008) relata que, nos primeiros minutos de torrefação, são encontrados os maiores teores de acrilamida, sobretudo para o café robusta, e que existe a tendência da degradação desta substância durante o processo (redução de até 82%) e a estocagem do produto final.

O sabor do produto depende tanto destes compostos não voláteis quanto das substâncias volatilizáveis. Mais de 1000 substâncias diferentes já foram identificadas em concentração de parte por milhão (ppm) ou parte por trilhão (ppt), sendo em torno de 40 que contribuem diretamente para o aroma do café. Em resumo, considera-se de maior significância para o sabor do café quantitativamente a classe dos furanos e das pirazinas enquanto qualitativamente a classe dos compostos sulfurados junto as pirazinas (ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012; SUNARHARUM et al., 2014). Entre todas estas substâncias mencionadas, o 2-furfuriltiol (Figura 9) é destacado como aquele de maior contribuição para o aroma do café (BELITZ et al., 2009; UEKANE et al., 2013).

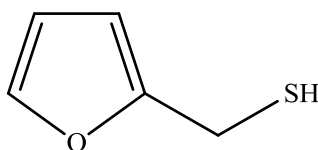


Figura 9. Fórmula estrutural do 2-furfuriltiol (UEKANE et al., 2013).

Diferenças na composição química também estão relacionadas ao tipo de espécie empregada, como maiores teores de aminoácidos e de cafeína em café robusta que em café arábica (MURKOVIC & DERLER, 2006; BELITZ et al., 2009); ao tipo de produto a ser comercializado, tais quais menores concentrações de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em café solúvel que o convencional (RODRIGUES & BRAGAGNOLO, 2013); e o modo de preparo, que exerce influência, por exemplo, no teor de isoflavonas totais presentes na bebida (ALVES et al., 2010).

2.1.5. Importância econômica

Atualmente, o café consiste na segunda maior *commodity* dentro do comércio internacional, atrás apenas do petróleo bruto (PARRAS et al., 2007; DOMINGUES et al., 2014). Esta importância econômica vem sendo conquistada pelo aumento do consumo de bebidas à base do grão de café, cujo índice foi quase duplicado nos últimos 40 anos (PATERSON et al., 2014). Segundo Barbin et al. (2014), é possível afirmar que o café, depois da água, é a bebida mais popular do mundo.

Mais de 60 países tropicais e subtropicais, localizados sobretudo no “cinturão do café”, são responsáveis pelo fornecimento de grãos de café verde para suprir o consumo em todo mundo (ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012; NARITA & INOUE, 2014). Segundo a ICO (2016b), os maiores produtores são o Brasil, o Vietnã, a Colômbia, a Indonésia e a Etiópia, representando mais de 70% da produção mundial de café (Tabela 6).

A cafeicultura brasileira destaca-se por abranger o cultivo tanto da espécie arábica quanto da espécie robusta. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2016), em agosto de 2016, foram obtidos mais de 2,8 milhões de toneladas de grãos, com o café arábica representando 83% (mais de 2,3 milhões de toneladas) e o café robusta 17% (481 mil toneladas). Os principais estados brasileiros produtores de café são Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, São Paulo e Rondônia (Figura 10). Destaca-se ainda a disparidade em relação às espécies cultivadas, mesmo para estados vizinhos como Minas Gerais e Espírito Santo.

Tabela 6. Dados de produção e exportação de café, em milhões de sacas de 60 kilogramas (kg), para os principais países produtores nas safras de 2013/2014 e 2014/2015, (ICO, 2016b).

	Produção Total			Exportação		
	2013/2014	2014/2015	%	2013/2014	2014/2015	%
Brasil	49,2	45,6	-7,3	32,7	36,9	12,8
Vietnã	27,5	26,5	-3,6	24,9	21,3	-14,4
Colômbia	12,1	13,3	9,9	10,8	12,3	13,9
Indonésia	11,4	10,4	-8,8	10,0	6,6	-44,0
Etiópia	6,5	6,6	1,5	3,0	2,9	-3,3
Escala Mundial	146,6	141,4	-3,5	115,1	112,1	-2,6

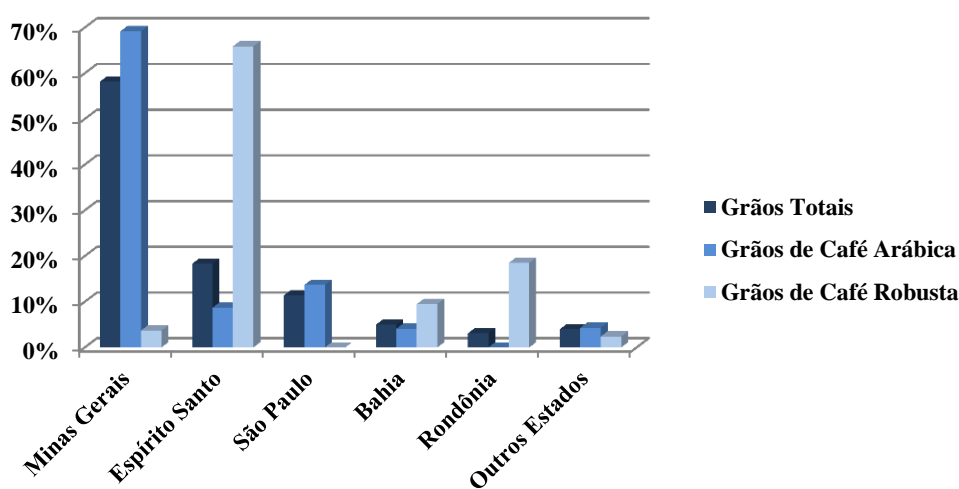


Figura 10. Participação na safra 2015 de grãos totais, de café arábica e de café robusta (IBGE, 2016).

A extensiva produção brasileira de café visa a exportação para os países desenvolvidos e o abastecimento do consumo interno do país. Conforme dados dispostos na Tabela 6, o Brasil é o principal país exportador de café no mundo, o que favorece que a cafeicultura represente a quarta maior receita bruta brasileira em relação aos produtos agrícolas, ficando atrás apenas da soja, cana-de-açúcar e milho (CONAB, 2015). Segundo a ABIC (2015a), houve um crescimento progressivo nos números de exportação do Brasil durante as últimas décadas (Tabela 7) e os países que mais importam o café brasileiro atualmente são os Estados Unidos, a Alemanha, a Bélgica, a Itália e o Japão (Figura 11).

Tabela 7. Dados de exportação brasileira de café desde a década de 60, em milhões de sacas de 60 kg de café (ABIC, 2015a).

	Média de Exportação	Crescimento (%)
1961-1970	17,1	-
1971-1980	15,1	-12,0
1981-1990	17,0	12,9
1991-2000	18,1	6,3
2001-2010	27,9	54,1
2011-2015	33,5	20,1

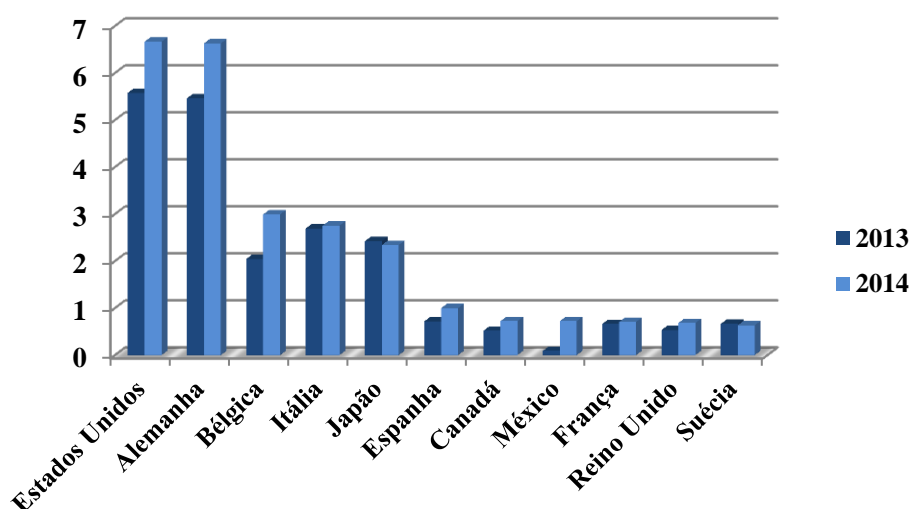


Figura 11. Dados de café verde brasileiro exportado, em milhões de sacas de 60 kg, no período de janeiro a dezembro de 2013 e de 2014 (ABIC, 2015a).

Além da exportação, o mercado interno apresenta grande representatividade diante da produção cafeeira, com crescente evolução do consumo de café pelos brasileiros. Ainda de acordo com a ABIC (2015a), o número de sacas destinadas à comercialização interna aumentou 2,5 vezes nos últimos 25 anos, superando a marca de 20,5 milhões de sacas de 60 kg em 2015, mesmo diante da crise econômica brasileira (Figura 12). Além disso, o próprio consumo per capita brasileiro foi quase duplicado neste período, alcançando o número de 4,9 kg café torrado/habitante/ano.

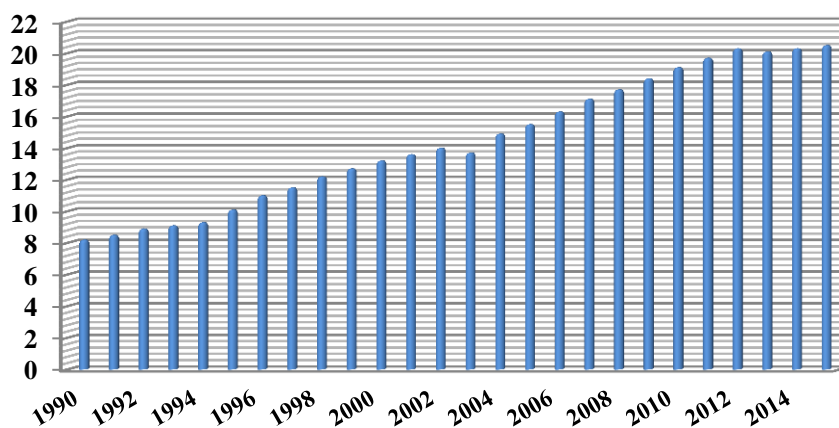


Figura 12. Evolução do consumo interno de café durante os últimos 25 anos, em milhões de sacas de 60 kg (ABIC, 2015a).

Outras pesquisas da própria associação indicaram que, em 2015, 80% das residências investigadas possuíam o produto, comprovando uma vez mais a cultura do consumo de café pelos próprios brasileiros. A principal forma de comercialização continua sendo o café torrado e moído, representando 81% do volume total consumido pelas famílias brasileiras em suas residências. Projeções ainda indicam a possibilidade de o mercado interno alcançar 24 milhões de sacas já no ano de 2019 (ABIC, 2015a). Para tal resultado esperado, a qualidade do café comercializado passou a ser objeto de avaliação científica nos últimos anos, conferindo ao consumidor brasileiro o acesso a um produto de qualidade garantida.

2.1.6. Qualidade e legislação

O mercado global tem sido influenciado principalmente pelo surgimento de consumidores preocupados com a qualidade, a segurança e até a origem geográfica dos produtos que estes consomem (DI STEFANO et al., 2012). A qualidade é um dos aspectos mais importantes para a indústria cafeeira, sendo relacionada principalmente à composição química dos grãos de café e ao processo de torrefação (FRANCA, MENDONÇA, et al., 2005; BARBIN et al., 2014).

Por exemplo, as espécies botânicas empregadas, as quais diferem em sua constituição química, originam bebidas sensorialmente distintas. Enquanto o mercado considera o produto à base de café arábica como detentor de um sabor fino e pronunciado, o que eleva os preços das sacas em até 10 vezes, o café robusta é menos apreciado e utilizado especialmente na forma de *blends* ou para aumentar a viscosidade de alguns tipos de bebidas oriundas de café (ALVES, CASAL, ALVES, et al., 2009; BARBIN et al., 2014).

Diferentes critérios são empregados para a avaliação da qualidade dos grãos de café, destacando-se a presença de defeitos e o sabor. O termo “defeito” está relacionado diretamente aos grãos de café e pode revelar operações de colheita e processamento de baixa eficiência. Entre os principais defeitos, estão os grãos pretos, oriundos de grãos mortos dentro dos frutos de café ou de grãos caídos naturalmente no solo por ação de chuva ou excesso de amadurecimento; os grãos ácidos, resultantes de fermentação prolongada; os grãos verdes de frutos imaturos; e ainda os grãos pretos imaturos, resultantes dos frutos que caem no chão ainda imaturo e ao contato com solo estão susceptíveis à fermentação (FRANCA, MENDONÇA, et al., 2005; FRANCA, OLIVEIRA, et al., 2005).

Quanto ao critério de sabor, os cafés brasileiros, por exemplo, são classificados em diferentes categorias, desde as bebidas de maior qualidade, com baixa acidez e gosto doce suave, até os de menor qualidade, que incluem aqueles de elevada adstringência e baixo gosto doce, e aqueles que apresentam sabor intolerável (FRANCA, OLIVEIRA, et al., 2005; FARAH et al., 2006).

Uma prática comum que prejudica a qualidade do café é a adulteração através da mistura intencional ou não de matérias-primas de menor custo financeiro (OLIVEIRA et al., 2015; CAI et al., 2016). Em 1851, o jornal britânico *The Lancet* já destacava o uso de chicória, milho, feijão e batata como adulterantes no café. Dois anos mais tarde, o mesmo jornal relatava o uso de misturas de café com chicória, que ainda eram toleradas em concentrações de no máximo 50% (m/m) na Europa, porém não era informado adequadamente aos consumidores de acordo com a legislação vigente (LANCET, 1851; OLIVEIRA et al., 2015).

No Brasil, Menezes Júnior (1953) foi o pioneiro na divulgação científica sobre as possíveis fraudes encontradas nos cafés torrados e moídos comercializados internamente. O autor já mencionava que o aspecto granuloso e oleoso e a cor do café propiciavam o mascaramento dos materiais adulterantes através da adsorção do óleo e a aderência das partículas mais finais do pó de café à sua superfície. Destaca-se, portanto, que o principal tipo de produto que será alvo de adulteração tende a ser o tradicional café torrado e moído, o que prejudica fortemente o consumidor brasileiro devido a sua grande representatividade no mercado interno.

Na década de 60, a adulteração consistia basicamente no imediato aproveitamento das cascas de café, que apresentavam alta disponibilidade e o preço relativamente baixo e “compensador” (MENEZES JÚNIOR, 1953). Nos últimos anos, outros adulterantes como milho, casca de semente de cacau, cevada, arroz, feijão, caramelo, sacarose e soja e, mais recentemente, trigo, triticale e sementes de açaí foram encontrados em cafés brasileiros, adicionados provavelmente antes ou durante o processo de torrefação. Estas adulterações

podem alcançar concentrações de até 40% (m/m) (TAVARES et al., 2012; AQUINO et al., 2014; DOMINGUES et al., 2014; PAULI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

Devido às dimensões alcançadas, a adulteração é considerada uma grave ameaça ao desenvolvimento sustentável da indústria cafeeira. Em escala mundial, diferentes organizações tem atuado na garantia da qualidade do café mundial, como *Institute for Scientific Information on Coffee*, *Coopération Internationale em Recherche Agronomique pour le Développement*, ICO, *Food and Agriculture Organization* (FAO) e *Food Safety and Inspection Service of the United States Department of Agriculture*. As principais normas utilizadas envolvem o *Codex Alimentarius*, realizada pela FAO, e o *CODEX STAN 1-1985* (Rev, 1-1991), produzido pela *World Health Organization*, além dos regulamentos internos de cada país (OLIVEIRA et al., 2015; CAI et al., 2016).

No Brasil, a ABIC é responsável desde 1989 pela implementação e execução do Programa Permanente de Controle da Pureza do Café (Figura 13), cuja função do programa é identificar os produtos que apresentam 100% de café e, assim, possibilitar o resgate da credibilidade junto aos consumidores em geral (ABIC, 2015b). A legislação era regida pela Instrução Normativa de nº 16, de 24 de maio de 2010, do MAPA (BRASIL, 2010). Esta se encontrava em vigor até o início do ano de 2013 e estabelecia, para comercialização, um percentual máximo de 1% para o conjunto de impurezas, sedimentos e matérias estranhas em café torrado em grãos ou moído.



Figura 13. Selo de pureza incorporado nas embalagens de cafés com 100% de pureza.

Todos estes esforços ainda são insuficientes para a garantia da qualidade do café comercial brasileiro, sendo possivelmente, nos próximos anos, implementada uma legislação mais rígida, considerando apenas a detecção do adulterante como forma de reprovação do produto, e o emprego de técnicas analíticas de maior sensibilidade e seletividade.

2.2. Investigação de Fraudes em Café

2.2.1. Técnicas analíticas empregadas

A detecção da adição de adulterantes no café dependerá do auxílio de métodos analíticos adequados, visando a identificação de matérias estranhas que possam apresentar até o mesmo grau de torrefação do café e pequenos tamanhos de partículas. Segundo Tavares et al. (2012), os laboratórios credenciados pela ABIC utilizam métodos microscópicos para detecção e quantificação das impurezas presentes no café, através de comparação de extrato aquoso de café puro e da amostra.

A Fundação Ezequiel Dias (FUNED, 2012), em parceria com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, produziu um documento nomeado como “Atlas de Microscopia – Café Torrado e Moído (*Coffea* sp)” para consulta e apoio técnico-científico para laboratórios de controle de qualidade em café. O material aborda os principais

adulterantes e características botânicas, que servem como ferramenta de identificação de possíveis adulterações (Figura 14).

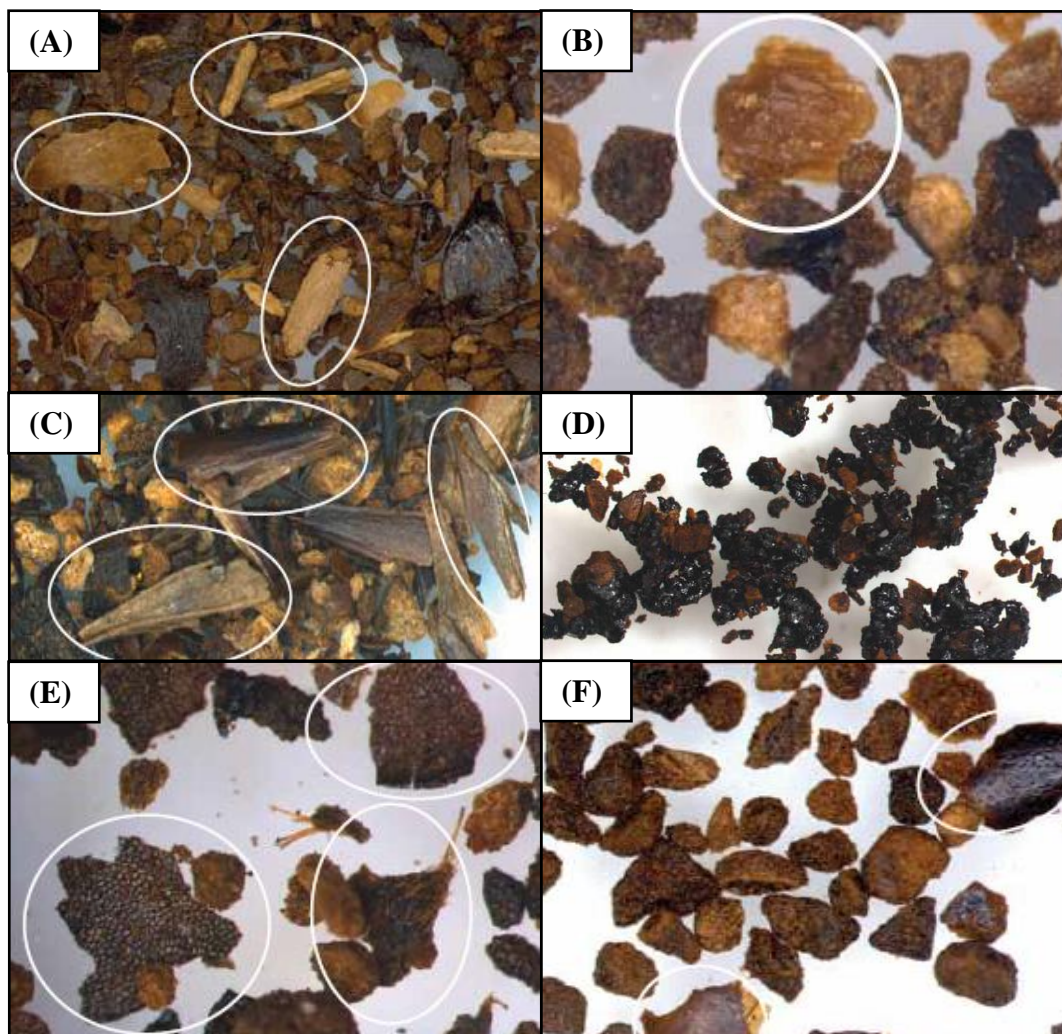


Figura 14. Detecção em café de (A) cascas e pedaços do pedúnculo do café, (B) milho, (C) cevada, (D) caramelo, (E) trigoilho e (F) soja (FUNED, 2012).

De acordo com Oliveira et al. (2015), os primeiros métodos desenvolvidos empregavam a remoção da fração lipídica com solventes orgânicos e a posterior visualização e comparação das amostras com possíveis adulterantes. É possível afirmar que estes serviram de base para os métodos subsequentes, com a utilização de microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e análise por imagens (AMBONI et al., 1999; ASSAD et al., 2002; SANO et al., 2003).

Embora estas técnicas apresentem eficiência na detecção de adulterantes, algumas desvantagens são observadas como o maior tempo de análise, a subjetividade da interpretação e a consequente necessidade de profissionais experientes. Além disso, fatores externos, como o uso de altas temperaturas, podem favorecer alterações nos tecidos vegetais (MENEZES JÚNIOR, 1953). Dentre as demais técnicas analíticas que já foram relatadas na literatura, destacam-se a espectroscopia na região do infravermelho, as reações do tipo cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR) e a cromatografia.

A espectroscopia na região do infravermelho próximo e médio ao visível é empregada tanto para a determinação de constituintes de alimentos quanto para o controle de qualidade de alimentos. O trabalho de Tavares et al. (2012) diferenciou amostras de café puro e

adulterado com casca de café, a partir da intensidade de bandas espectrais em determinados comprimentos de ondas e da análise dos principais componentes, com diminuição de tempo de análise e maior confiabilidade.

Métodos baseados em replicação das moléculas de DNA também apresentam boas vantagens quando comparados aos convencionais, como alta especificidade e sensibilidade e estabilidade das moléculas de DNA frente às condições de processamento. A utilização da técnica de PCR em tempo real, através da utilização de reagentes fluorescentes, também permite quantificação do DNA inicial (OLIVEIRA et al., 2015). Ferreira et al. (2016) desenvolveram uma metodologia com base nesta técnica para detecção de cevada, milho e arroz em cafés torrado e moído e café solúvel usando uma sequência específica de ácidos nucleicos, tendo sido aplicado com sucesso para amostras de diferentes países.

Com emprego nas mais diferentes áreas, a cromatografia é atualmente uma das técnicas analíticas mais utilizadas devido a sua versatilidade. Substâncias orgânicas de diferentes polaridades e massas moleculares e em concentrações até o nível traço podem ser detectadas e quantificadas mediante a combinação de colunas, fases móveis e detectores.

2.2.2. Cromatografia

Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC* (1997), a cromatografia é definida como “um método físico de separação em que os componentes que serão separados estão distribuídos entre duas fases, uma que é estacionária (fase estacionária) enquanto a outra se move em direção definida (fase móvel)”. A interação entre as substâncias inicialmente presentes em uma mistura e as duas fases distintas e imiscíveis contribuirá para a ocorrência dos fenômenos de retenção e eluição, responsáveis pela migração diferencial e a consequente separação das substâncias (Figura 15).

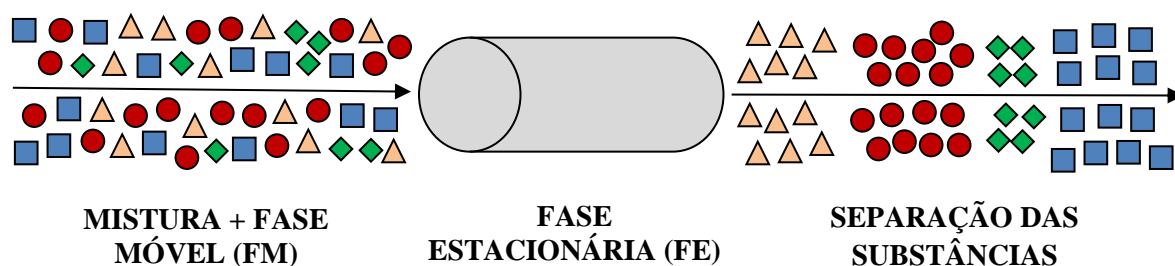


Figura 15. Esquema simplificado sobre o processo cromatográfico com a separação das substâncias por diferentes propriedades como, por exemplo, polaridade e solubilidade.

A invenção da cromatografia é atribuída principalmente ao botânico russo Mikhael S. Tswett (1872-1919), que publicou inicialmente em 1903 um relatório sobre seus extensivos experimentos sobre um novo fenômeno de adsorção e sua potencial aplicação na separação de pigmentos de folhas de plantas. Até então, Tswett ainda nomeava o processo como filtração. Somente em 1906 com a publicação de dois artigos científicos, o termo cromatografia foi adotado e descrito pelo botânico russo. Duas interpretações são plausíveis como justificativa para o nome da técnica: a primeira consiste nas palavras gregas *chroma* (cor) e *graphein* (escrever), significando “a escrita da cor”; ou ainda que o nome Tswett escrito em russo significa “cor” e, portanto, seria “a escrita de Tswett” (LANÇAS, 2009b; PACHECO et al., 2015).

Embora Tswett tenha sido o primeiro a compreender e interpretar o processo cromatográfico, existem muitos registros de fenômenos similares à cromatografia em períodos anteriores ao século XX. Segundo Pacheco et al. (2015), o possível relato mais antigo, no ano

77 (depois de Cristo – d.C.), consiste na publicação de uma grande obra chamada de *Naturalis Historia*, do militar romano Caio Plínio Segundo (23-79), conhecido como Plínio, o Velho. A descrição de um método para verificação da autenticidade de *verdigris*, um sal utilizado como fungicida e pigmento verde, envolvia a aplicação do produto em folhas de papiro embebidas com um extrato vegetal e o surgimento de coloração negra excluía a possibilidade da comum fraude com adição de pó de mármore verde.

A partir da década de 50 do século passado, foi observado um grande desenvolvimento da cromatografia e o surgimento de diversas vertentes da técnica clássica. Atualmente, diferentes critérios são empregados para a classificação das técnicas cromatográficas (Tabela 8).

Tabela 8. Principais classificações utilizadas quanto às técnicas cromatográficas (ETTRE, 1993; LANÇAS, 2009b).

Crítérios	Tipos	Exemplos
Tipo de Leito Cromatográfico	Em Coluna	Colunas de Vidro ou Metal
	Planar	Camada Delgada com Sílica
Por Estado Físico da Fase Móvel	Líquido	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
	Gasoso	Cromatografia Gasosa
	Fluido no Estado Supercrítico	Cromatografia com Fluido Supercrítico
Por Mecanismo de Separação	Adsorção	Camada Delgada com Sílica
	Partição	Cromatografia em Filtro de Papel com Adição de Solvente
	Troca Iônica	Resinas Poliméricas Iônicas Neutralizadas com Contra-Íons
	Exclusão Molecular	Utilização de Gel Polimérico como FE
Por Polaridade das Fases	(Bio)Afinidade	Interação específica entre analito e ligante presente na FE
	Fase Normal	FE Polar e FM Apolar
	Fase Reversa	FE Apolar e FM Polar
Por Finalidade	Analítica	Quantificação de teores de Vitamina C em alimentos
	Preparativa	Isolamento de Metabólitos Secundários

2.2.2.1. Cromatografia líquida

Entre as técnicas desenvolvidas, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) apresenta grande destaque, sendo frequentemente empregada para a separação de misturas complexas de substâncias de baixo a alta massa molecular e diferentes polaridades e propriedades ácido-base (NÚÑEZ et al., 2012).

Este sistema cromatográfico (Figura 16) funciona de forma integrada, iniciando-se a partir do funcionamento de uma bomba de alta pressão, responsável por impulsionar a fase móvel do reservatório pelos canais do equipamento. Uma válvula de injeção introduz a amostra no fluxo da fase móvel em direção à coluna cromatográfica, contendo a fase estacionária. O efluente da coluna é direcionado ao detector, responsável por gerar sinais de resposta relacionados à presença dos analitos separados. Este sinal, após amplificação no

detector, é captado por um software e disposto graficamente na forma de um cromatograma, sendo as variáveis independente e dependente, respectivamente, o tempo de análise e o sinal do detector (LANÇAS, 2009b; SANTIAGO, 2014).

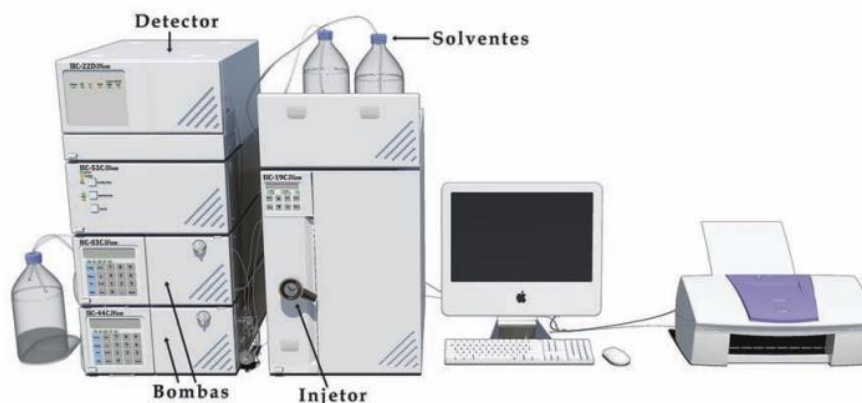


Figura 16. Ilustração de um sistema cromatográfico do tipo modular (LANÇAS, 2009a).

Atualmente, a cromatografia líquida apresenta um nível satisfatório de sensibilidade, seletividade, resolução e tempo de análise, devido principalmente aos avanços conquistados em instrumentação e informática ao longo das décadas passadas. Uma das principais melhorias consiste na evolução quanto à forma e ao tamanho das partículas da fase estacionária. O desenvolvimento de novos tipos de partículas e com menores diâmetros, desde a década de 50 do século passado, favoreceu diretamente a diminuição do tempo de análise e o aumento de eficiência cromatográfica (Tabela 9).

Tabela 9. Resumo da evolução cronológica das fases estacionárias para cromatografia líquida, nos últimos 70 anos (MALDANER & JARDIM, 2009; PACHECO et al., 2015).

Período	Eventos	Eficiência (pratos teóricos/15 cm)
Até 1950	Colunas recheadas com partículas irregulares de diâmetro de 100 a 200 micrômetros (μm)	200
Década de 60	Partículas peliculares de 40 a 50 μm (núcleo sólido revestido com camada de 1 μm de sílica porosa), com resistência mecânica, porém baixa área superficial	1000
Década de 70	Partículas porosas de 10 μm	6000
Década de 80	Partículas esféricas de 5 μm	12000
Década de 90	Partículas esféricas de 3 a 3,5 μm	22000
Ano de 1996	Partículas esféricas não-porosas de 1,5 μm , com menor resistência a transferência de massa mas baixa área superficial	30000
Século XXI	Partículas esféricas porosas de 2,5 μm	22000
	Após, surgimento das partículas com diâmetro de 1,7 μm	30000

Nos últimos anos, observa-se o emprego de diferentes preenchimentos para a coluna cromatográfica que vão incluir desde as fases estacionárias quimicamente ligadas, como as C₈, C₁₈ e C₃₀, obtidas através de inserção de grupamentos apolares em moléculas de silanol; as partículas tipo *coreshell*, baseadas nas peliculares dos anos 60, apresentando um núcleo fundido e uma fina camada superficial porosa; as partículas monolíticas, cuja composição básica consiste em sílicas porosas, no formato de bastão ou haste; e ainda as partículas porosas com diâmetro inferior a 2 µm (MALDANER & JARDIM, 2009; PACHECO et al., 2015). Este último tipo de conceito possibilitou o surgimento da Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (CLUAE) e a posterior Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE).

Na primeira vertente, os principais trabalhos utilizavam altas pressões (acima de 410 MPa ou 60000 psi) e partículas ainda não-porosas porém de diâmetro inferior a 2 µm em colunas de grandes comprimentos. A dificuldade de adaptar um sistema de injeção a alta pressão e o potencial de separação desta técnica impulsionou o desenvolvimento da CLUE, através da aplicação de partículas de sílica porosas de diâmetro igual ou inferior a 2 µm em colunas analíticas de CLAE (MALDANER & JARDIM, 2009).

O conseqüente aumento das pressões de trabalho e maior desgaste dos selos dos pistões e das bombas e a inadequação dos sistemas de detecção utilizados comprometeram o desempenho dos sistemas de CLAE. No início da última década, a companhia americana Waters lançou o equipamento *Acquity® Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC™), o primeiro cromatógrafo a líquido de ultra eficiência comercial, capaz de operar em pressões de até 15000 psi (PACHECO et al., 2015). Este equipamento apresenta diversas vantagens em relação aos sistemas tradicionais de cromatografia líquida, como maior resolução e detectabilidade e menor tempo de análise e quantidade de fase móvel e amostra necessários (MALDANER & JARDIM, 2009).

As principais diferenças físicas da instrumentação incluem colunas de menor comprimento e diâmetro interno, alta resistência mecânica e preenchidas com partículas de menor diâmetro e maior grau de empacotamento; sistema binário de solventes com duas bombas individuais em série propiciando gradientes a altas pressões; sistema de injeção de amostra com faixa de volume de 0,1 µL a 50 µL e ciclo rápido; e detectores com aumento da detectabilidade, como diminuição do volume de cela e maior caminho óptico em equipamentos ópticos (MALDANER & JARDIM, 2009).

Outro grande desafio enfrentado pelos analistas nos laboratórios instrumentais e superado ao longo dos anos era a separação por cromatografia líquida de substâncias de alta polaridade com uma boa resolução cromatográfica. Estas substâncias tendem a apresentar fraca retenção em colunas de fase reversa, como C₈, C₁₈ e C₃₀, enquanto, em fase normal, observa-se uma maior dificuldade na eluição com solventes de baixa polaridade (NÚÑEZ et al., 2012).

Em 1990, Andrew Alpert propôs uma nova técnica cromatográfica denominada Cromatografia por Interação Hidrofílica (CIH) ou *Hydrophilic-Interaction Chromatography* (HILIC), que baseia-se na utilização de fases estacionárias polares, como sílicas puras, sílicas quimicamente modificadas com grupos diol, ciano, amino e amida e até compostos com caráter zwitteriônico, combinados com fases móveis contendo uma pequena concentração aquosa em solvente de baixa polaridade, sendo geralmente utilizada a acetoneitrila (LANÇAS, 2010; NÚÑEZ et al., 2012; ITO et al., 2014).

Conceitualmente, pode-se dizer que a CIH consiste no emprego de elementos da fase normal (fase estacionária polar) e da fase reversa (especialmente a fase móvel). Segundo Núñez et al. (2012), concentrações aquosas superiores a 1% na fase móvel favorecem a formação de uma camada de moléculas de água adsorvidas na fase estacionária polar e, portanto, a separação cromatográfica ocorre preferencialmente pelo mecanismo de partição

líquido-líquido. A retenção na coluna será proporcional à polaridade do soluto e inversamente proporcional à polaridade da fase móvel (LANÇAS, 2010). As principais aplicações incluem desde carboidratos, proteínas até metabólitos secundários polares oriundos de extratos vegetais (LANÇAS, 2010; ITO et al., 2014).

2.2.2.2. Detecção por espectrometria de massas

Um dos maiores progressos conquistados para a cromatografia líquida foi o acoplamento com a técnica de espectrometria de massas (EM) como um sistema de detecção, reunindo as vantagens da cromatografia, como, por exemplo, alta seletividade e eficiência de separação, e as vantagens da EM, como obtenção da massa molecular e de possíveis informações estruturais e aumento adicional de seletividade e sensibilidade (CHIARADIA et al., 2008; MILMAN, 2015). Sua utilização envolve uma larga faixa de aplicação, sobretudo para a identificação e a quantificação de moléculas orgânicas de diferentes massas moleculares e em concentrações até o nível traço, como as substâncias bioativas, os pesticidas, as toxinas e outros resíduos.

A Espectrometria de Massas ou *Mass Spectrometry* (MS) consiste em uma técnica de detecção de íons, sob vácuo, através de suas relações massa/carga (*mass/charge* - m/z). O Professor John B. Fenn, ganhador do Prêmio Nobel em Química no ano de 2002 pelo trabalho pioneiro no uso da ionização por eletrospray para espectrometria de massas, descreve a técnica como:

“é a arte de medir átomos e moléculas para determinar suas massas moleculares. Tal informação sobre a massa ou peso é muitas vezes suficiente, frequentemente necessária, e sempre útil na determinação da identidade de uma espécie. Para praticar esta arte, colocamos carga nas moléculas de interesse, isto é, os analitos, e então medimos como as trajetórias dos íons resultantes respondem, sob vácuo, a várias combinações de campos elétricos e magnéticos. Claramente, a condição “sine qua non” deste método é a conversão de moléculas neutras de um analito em íons” (LANÇAS, 2009a).

Duas etapas são importantes na EM: a ionização de moléculas neutras, realizada através da utilização de uma fonte de ionização, e o processo de separação dos íons por um analisador de massas (Figura 17). A última questão citada pelo Professor Fenn incluía, por exemplo, a dificuldade no acoplamento com a cromatografia líquida, devido à necessidade de evaporação do solvente ainda sob pressão atmosférica, o que não ocorre com a cromatografia gasosa e cuja combinação já é usualmente empregada há algumas décadas. A solução foi o desenvolvimento de fontes de ionização à pressão atmosférica, que apresentaram melhor desempenho que as fontes à vácuo, facilitando a transferência do analito que sai na coluna para a fase gasosa e a sua posterior ionização (LANÇAS, 2009a).



Figura 17. Diagrama de blocos sobre a instrumentação de um espectrômetro de massas.

A instrumentação inicia-se a partir do *inlet*, dispositivo responsável pela introdução da amostra por infusão direta ou do efluente que sai da coluna, sendo possível a detecção de cada

analito previamente separado. Três tipos de fontes de ionização são mais empregadas na interface CL-EM:

- ✓ Ionização por eletrospray (IES) ou *electrospray ionization* (ESI), em que uma diferença de potencial elétrico sobre o capilar de entrada da amostra e o cone de amostragem da fonte, posicionado de forma oposta ao capilar, favorece o espalhamento do líquido em forma de spray, evaporação do solvente e a ionização dos analitos. Este tipo de fonte é usualmente empregada para detecção de moléculas polares, iônicas ou ionizáveis, possibilitando a formação de radicais, denominados íons moleculares (M^+ ou M^-), através de reações de oxirredução; de moléculas protonadas ou desprotonadas ($[M + H]^+$ ou $[M - H]^-$), por reações do tipo ácido/base; e de moléculas cationizadas ou ânionizadas (por exemplo, $[M + Na]^+$, $[M + K]^+$, $[M + Cl]^-$), através de coordenação com outros átomos, principalmente os representantes da família 1A da Tabela Periódica;
- ✓ Ionização química à pressão atmosférica (IQPA) ou *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI), cuja aplicação é recomendada para compostos apolares. Uma descarga parcial oriunda de um eletrodo tipo corona provoca a ionização da fase móvel, que irá reagir com os analitos para a consequente formação de cátions $[M + H]^+$ ou ânions $[M - H]^-$;
- ✓ Fotoionização à pressão atmosférica (FIPA) ou *atmospheric pressure photoionization* (APPI), similar à fonte anterior, porém com o uso de uma lâmpada ultravioleta. A absorção de fótons pelo analito resultará na formação de um cátion radicalar do tipo M^+ , pela perda de um elétron, quando a energia do fóton for maior que o potencial de ionização da molécula. A detecção mais comum corresponde a espécie $[M + H]^+$, pela abstração de um átomo de hidrogênio do solvente (CHIARADIA et al., 2008; LANÇAS, 2009a; DI STEFANO et al., 2012).

Quanto à ionização por IES, desenvolvida pelo Professor Fenn, destaca-se o fenômeno conhecido como “explosão coulômbica” para a formação dos íons na fonte. A diminuição do tamanho das gotas, mediante a evaporação do solvente, e a maior repulsão eletrostática entre as cargas nas superfícies das gotas resulta na formação de gotas menores (CROTTI et al., 2006). Segundo Lanças (2009a), o mecanismo completo de formação dos íons ainda é alvo de discussão, sendo mais aceitos os propostos por Dole, em 1968, e por Iribarne e Tomson, em 1976, conforme a Figura 18.

A supressão iônica consiste em outro fenômeno observado nas técnicas de ionização. Substâncias de menor volatilidade presentes na solução injetada influenciam a evaporação do solvente e, conseqüentemente, diminuem a eficiência de ionização e a intensidade dos sinais dos analitos detectados. Moléculas de baixa massa molecular e maior polaridade apresentam maior susceptibilidade à supressão iônica. Etapas de purificação (*clean up*) no preparo da amostra, mudança nas condições cromatográficas, adição de modificadores ou de padrões internos tendem a minimizar estes impactos negativos (ANNESLEY, 2003).

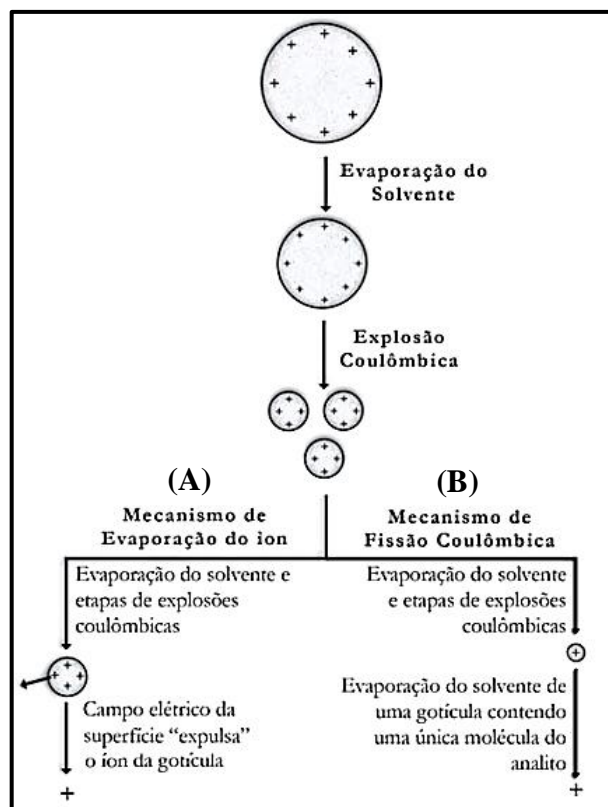


Figura 18. Esquema dos mecanismos prováveis de IES: (A) por Iribarne e Tomson; e (B) por Dole (LANÇAS, 2009a).

Para a separação do conjunto de íons formados na fonte de ionização, diferentes analisadores de massas podem ser empregados, entre os quais destacam-se:

- ✓ Quadrupolo (Q), o tipo de equipamento mais simples, que consiste em um instrumento constituído de 4 hastes, onde pares opostos estão eletricamente conectados. A aplicação de voltagens específicas favorece a passagem de íons de determinada m/z por uma trajetória estável. Este analisador apresenta um excelente desempenho para quantificações e custo relativamente baixo (CHIARADIA et al., 2008; DI STEFANO et al., 2012);
- ✓ Analisadores do tipo *Ion-trap* (IT), considerados uma variação do Quadrupolo, porém com disposição tridimensional. O princípio de operação consiste na captura de todos os íons introduzidos e na liberação de íons de determinadas m/z mediante a aplicação de radiofrequência (CHIARADIA et al., 2008; LANÇAS, 2009a). Suas vantagens incluem uma maior sensibilidade que os analisadores do tipo Quadrupolo e um custo relativamente baixo, porém, assim como o anterior, este apresenta uma baixa resolução de massas (DI STEFANO et al., 2012);
- ✓ Analisadores do tipo Tempo de Voo (TDV) ou *Time of Flight* (TOF), empregados quando é necessário um alto poder de resolução. Estes equipamentos baseiam-se no fato de que íons gerados na mesma fonte de ionização apresentam energias cinéticas iguais e, portanto, as velocidades nas trajetórias até o detector serão diferenciadas apenas pelas relações m/z de cada íon (CHIARADIA et al., 2008). Em comparação com o Quadrupolo, os analisadores do tipo Tempo de Voo apresentam maior poder de resolução, exatidão de massas e faixa de detecção (DI STEFANO et al., 2012; HOLČAPEK et al., 2012).

Uma estratégia adotada visando o aumento de seletividade durante as análises espectrométricas é a utilização de equipamentos que possuem dois ou mais analisadores de massas em série. Esta vertente da técnica é denominada Espectrometria de Massas sequencial ou *Tandem Mass Spectrometry* (EM-EM, MS-MS ou MSⁿ) e contribui com a detecção de íons provenientes de reações de fragmentação do íon formado a partir de um analito. Portanto, este sistema fornece um maior número de informações estruturais, possibilitando uma identificação mais exata de cada substância (CHIARADIA et al., 2008; DI STEFANO et al., 2012).

O aumento de seletividade é alcançado também pelo uso de diferentes métodos de ativação, que irão favorecer a fragmentação de íons precursores, ou seja, aqueles que formam os íons produtos da reação. Destacam-se, entre outras, a dissociação induzida por colisão (*collision-induced dissociation* - CID), a dissociação por captura de elétrons (*electron capture dissociation* – ECD) e a dissociação por transferência de elétrons (*electron transfer dissociation* – ETD). Como a ionização por eletrospray é considerada branda e geralmente não possibilita as fragmentações dos íons, o uso destes métodos, principalmente por CID, é extremamente necessário para viabilizar a clivagem das ligações moleculares dos analitos e a formação de íons fragmentos (VESSECCHI et al., 2011; DEMARQUE et al., 2016).

Uma das possíveis configurações consiste na combinação dos analisadores do tipo Quadrupolo e Tempo de Voo (QTDV ou QTOF). Espectrômetros que apresentam esta configuração possuem geralmente dois Quadrupolos posicionados em série e um Tempo de Voo disposto ortogonalmente. Usualmente, o primeiro instrumento é responsável por isolar o íon de interesse enquanto o segundo funcionará como célula de colisão, favorecendo a dissociação induzida em novos íons por colisão com um gás de arraste inerte. A obtenção dos espectros de massa dependerá da separação pelo analisador do tipo Tempo de Voo dos íons formados, permitindo a identificação de compostos com maior resolução, quando comparado ao espectro obtido de íons totais, e a consequente maior confiabilidade (CHIARADIA et al., 2008). Os espectrômetros de massa de alta resolução Synapt[®], da Waters[®] (EUA), são um dos equipamentos comerciais disponíveis no mercado e apresentam em sua configuração a tecnologia Triwave[™] (Figura 19), que consiste na presença de duas células de colisão denominadas *trap* e *transfer*, substituindo o segundo quadrupolo (WATERS, 2008).

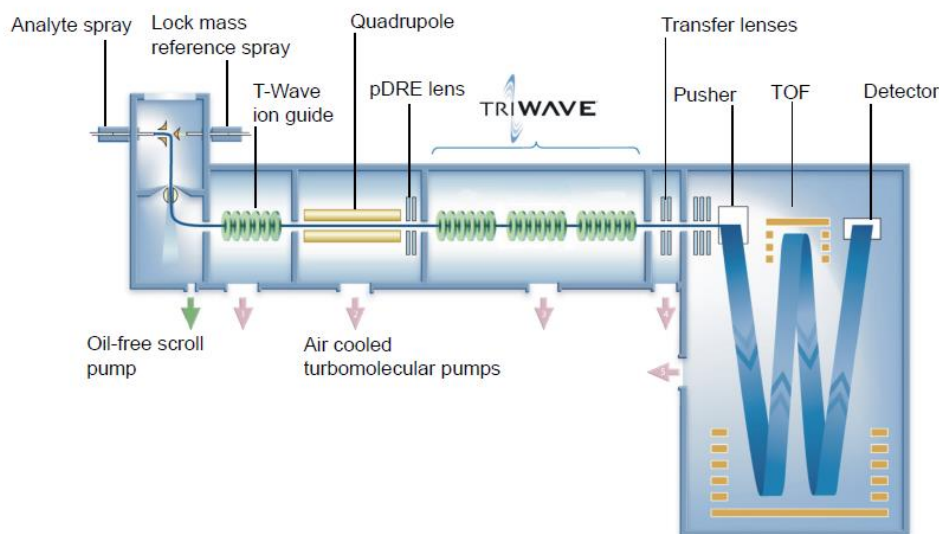


Figura 19. Configuração do espectrômetro de massas de alta resolução Synapt[®], com tecnologia Triwave[™] (WATERS, 2008).

Segundo Milman (2015), este tipo de equipamento, combinado com a ionização por eletrospray, apresenta faixa de detecção de até mil unidades de m/z e acurácia de massas

menor que 5 ppm para resoluções de até 10000, sendo geralmente empregado para detecções por Espectrometria de Massas de Alta Resolução (*High Resolution Mass Spectrometry* – HRMS).

As principais respostas obtidas pelo emprego destas técnicas são a relação m/z de cada íon obtido e o perfil de fragmentação de cada íon precursor. Para determinação mais exata das relações m/z , são utilizadas as massas monoisotópicas (isótopo mais abundante) de cada elemento químico, segundo os relatórios atualizados da IUPAC publicados periodicamente sobre massa atômica, e a prévia calibração do equipamento com uma solução de relação m/z conhecida (IUPAC, 1991; MEIJA et al., 2016). Além da comparação com padrões certificados e bibliotecas de espectros de massas, a identificação dos analitos nas análises de alta resolução também pode ser realizada pela comparação com os dados referenciais teóricos, calculadas a partir dos dados sobre massas monoisotópicas. Neste caso, determina-se o erro de massa, ou seja, a diferença entre a massa exata observada e a calculada, podendo ser expressa, segundo a Equação 1, em miliDalton (mDa) ou, segundo a Equação 2, em ppm. Para uma determinação segura da identidade da espécie em análise, este erro de massa deve representar baixos valores, tolerando valores de até 5 ppm (HOLČAPEK et al., 2012; MILMAN, 2015).

$$\text{Erro (mDa)} = (\text{massa}_{\text{calculada}} - \text{massa}_{\text{acurada}}) * 10^3$$

Equação 1. Cálculo de erro de identificação por EM em mDa.

$$\text{Erro (ppm)} = \frac{(\text{massa}_{\text{calculada}} - \text{massa}_{\text{acurada}})}{\text{massa calculada}} * 10^6$$

Equação 2. Cálculo de erro de identificação por EM em ppm.

Os perfis de fragmentação contribuem com informações sobre a estrutura química dos analitos, indicando indiretamente, através das relações m/z dos íons produtos, os grupamentos eliminados das moléculas e, possivelmente, os tipos de ligações clivadas durante a etapa de fragmentação. Por exemplo, após a colisão com o gás de arraste nas células de colisão, o aumento da energia interna favorecerá a decomposição dos íons, que, de acordo com os tipos de ligações e funções químicas presentes, podem sofrer diferentes tipos de reações, envolvendo ou não a carga eletrônica (DEMARQUE et al., 2016). O estudo de cada mecanismo de fragmentação pode resultar na elucidação de possíveis fórmulas estruturais de cada analito e/ou na diferenciação entre moléculas orgânicas que apresentam isomeria entre si.

2.2.2.3. Métodos cromatográficos empregados para determinação de adulteração em café

Diferentes metodologias já foram desenvolvidas para avaliar a qualidade do café comercializado nas últimas décadas desde o trabalho de Skarka & Radej (1958), em que foi aplicado a cromatografia em papel para diferenciar café e chicória através dos teores de açúcares livres. A Tabela 10 relaciona os principais métodos encontrados na literatura para determinar adulteração em amostras de café. Diversas vertentes da cromatografia foram empregadas como CLAE com diferentes tipos de separação (fase normal, fase reversa e troca iônica) e detectores (por absorção na região do Ultravioleta/Visível – UV/Vis; por fluorescência - FLR; por pulso amperométrico - DPA; por índice de refração – IR); CG em coluna capilar e detector de ionização em chama (DIC) ou por EM; e, recentemente, CLUE-CIH também acoplado a detecção por EM.

Tabela 10. Principais métodos desenvolvidos para determinação de adulteração em café.

Referências Bibliográficas	Tipo	Deteccção	Analito	Adulterante
Skarka & Radej (1958)	Cromatografia em Papel	-	Açúcares Redutores Livres	Raiz de Chicória
Smith (1981)	CLAE em fase normal, com sílica gel (FE) e 5% isopropanol em diclorometano (FM)	UV	5-Hidroximetilfurfural e Cafeína	Raiz de Chicória
Clifford et al. (1987)	CLAE em fase reversa, preenchida com fase C ₁₈ (FE) e eluição em gradiente de 0,5% ácido fórmico e acetonitrila	UV	5-Hidroximetilfurfural	Raiz de Chicória e Outros Materiais
Blanc et al. (1989)	CLAE em fase normal, com sílica gel (FE) e acetonitrila e solução de fosfato de sódio (80:20) como FM, e posterior derivatização	UV/Vis	Arabinose, Frutose, Galactose, Glicose, Manose, Xilose	Cascas de Café
Bernal et al. (1996)	CLAE por troca iônica (resina CarboPac™ PA1 - aniônica) e eluição em gradiente de água e solução de hidróxido de sódio a 0,2 M	DPA	Arabinose, Fucose, Frutose, Galactose, Glicose, Manitol, Manose, Ramnose, Sacarose	Cereais e Raiz de Chicória
Jham et al. (2007)	CLAE em fase normal, com coluna de sílica e fase móvel hexano e 2-propanol (99,5:0,5)	FLR	α -, β -, γ -, δ -tocoferol	Milho
Jham et al. (2008)	CG em coluna capilar de sílica fundida e gás de arraste hélio (He)	DIC	Ácido Palmítico, Esteárico, Oleico, Linoleico, Linolênico e Eicosanóico	Milho
Garcia et al. (2009)	CLAE por troca iônica (resina CarboPac™ PA1 - aniônica) e fase móvel solução de hidróxido de sódio a 0,0014 M	DPA	Manitol, Arabinose, Galactose, Glicose, Xilose, Manose, Frutose	Cascas de Café e Milho

Tabela 10. Continuação.

Referências Bibliográficas	Tipo	Deteccção	Analito	Adulterante
Oliveira et al. (2009)	CG em coluna capilar contendo 5% difenil e 95% dimetil polissiloxano e gás de arraste He	EM	Substâncias Voláteis e Semi-voláteis	Cevada
Santiago et al. (2012)	CLAE por fase reversa, com coluna Agilent® Zorbax Carbohydrate e eluição isocrática de acetonitrila e água (75:25)	IR	Maltose, Rafinose, Estaquiose, 1-kestose, Nistose, 1- β -frutofuranosilnístose	Milho, Soja, Cevada e Triguilho
Pauli et al. (2014)	CLAE por troca iônica (resina CarboPac™ PA1 - aniônica) e fase móvel solução de hidróxido de sódio a 0,0014 M	DPA	Arabinose, Frutose, Galactose, Glicose, Manose, Xilose	Soja e Trigo
Domingues et al. (2014)	CLAE por troca iônica: (A) resina CarboPac™ PA1 - aniônica e fase móvel solução de hidróxido de sódio a 0,0014 M; e (B) Aminex HPX-87P e fase móvel água	(A) DPA e (B) UV/Vis	Arabinose, Galactose, Glicose, Mannose, Xilose	Triticale e Sementes de Açai
Cai et al. (2016)	CLUE-CIH*	EM de alta resolução	Oligossacarídeos	Soja e Arroz
Tavares et al. (2016)	CLAE em fase normal, com coluna de sílica e eluição isocrática de n-hexano e 1,4-dioxano (98:2)	FLR	α -, β -, γ -, δ -tocoferol	Cascas de Café e Milho

* O trabalho consiste em uma nota técnica e não apresenta detalhes da metodologia empregada.

Até o final dos anos 90, as metodologias cromatográficas investigavam basicamente a presença de raiz de chicória, que, conforme foi mencionado anteriormente, foi um dos primeiros casos relatados de adulteração no mundo. Observa-se que, após esse período, com o aumento da produção e do consumo brasileiro, houve uma ênfase no desenvolvimento de metodologias que contemplassem fraudes nos cafés torrados e moídos pela adição de outras matérias-primas, devido à baixa produção de chicória na América Latina (MENEZES JÚNIOR, 1953). É importante ressaltar que a versatilidade das técnicas cromatográficas

permitiu também o emprego para diferenciação entre as espécies arábica e robusta, determinação de autenticidade geográfica e detecção de grãos defeituosos.

Dentre as referências bibliográficas mencionadas na Tabela 10 desde o ano de 1958, a investigação pelo perfil e concentração de monossacarídeos e oligossacarídeos presentes nas amostras continuou sendo a principal ferramenta para detecção de adulteração em café com outras fontes vegetais.

2.2.3. Carboidratos: definição e análise por espectrometria de massas

Segundo recomendação da IUPAC (MCNAUGHT, 1996), o termo genérico “monossacarídeos” refere-se a moléculas de 3 ou mais átomos de carbono ligados que apresentem as funções aldeídos ou cetonas na estrutura química, além de hidroxilas como ramificação para os demais átomos de carbono. As fórmulas estruturais mais aceitas consistem na Projeção de Fischer e na Projeção de Haworth (forma cíclica), conforme Figura 20.

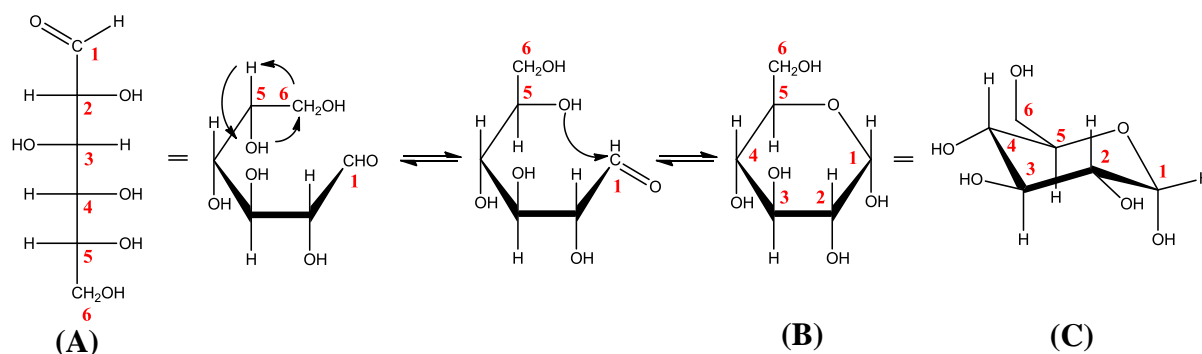


Figura 20. Fórmulas estruturais da α -D-glicopirranose, segundo (A) a Projeção de Fischer e (B) a Projeção de Haworth, com destaque para (C) a conformação em cadeira.

Já o termo “oligossacarídeos” é utilizado para compostos resultantes de ligações glicosídicas entre monossacarídeos, podendo ser chamados de dissacarídeos, trissacarídeos, tetrassacarídeos, entre outros, de acordo com o número de unidades de monossacarídeos. Por fim, os polissacarídeos consistem em macromoléculas que apresentam um vasto número de monossacarídeos ligados (MCNAUGHT, 1996).

Em uma metodologia analítica, a detecção dos carboidratos pode ser dificultada pelos diferentes compostos que estão incluídos nesta classe e suas variações na estrutura química (presença de mais de um carbono assimétrico ou quiral, isomeria, ramificações na estrutura central) ou ainda devido aos sistemas de detecção empregados como, por exemplo, a baixa seletividade dos detectores por IR ou a necessidade de derivatização para os detectores por UV/Vis (IKEGAMI et al., 2008; PENNA et al., 2009).

Portanto, destaca-se a utilização da Espectrometria de Massas para análise de carboidratos. Segundo Settineri & Burlingame (1995), esta é empregada desde a década de 60 do século passado, inicialmente por CG e ionização por impacto de elétrons (IE) para obtenção de informações sobre a estrutura química dos carboidratos. Somente a partir do final da década de 80, as pesquisas científicas direcionaram a aplicação das técnicas de IES e também de desorção/ionização a laser auxiliada por matriz (*matrix assisted laser desorption/ionization* – MALDI). Aplicações incluem a quantificação de açúcares no plasma humano (ROGATSKY et al., 2005; BIBI & JU, 2016); e a detecção e/ou quantificação de diferentes monossacarídeos e oligossacarídeos em matrizes alimentícias como pera, maçã, tâmaras, milho, soja, cevada, malte, cerveja, flor de trigo (TINKE et al., 1993; IKEGAMI et

al., 2008; FABRIK et al., 2012; PARK et al., 2012; GHFAR et al., 2015; LIU & ROCHFORT, 2015).

Em relação aos produtos da ionização, os monossacarídeos e os oligossacarídeos formam, em modo positivo, preferencialmente moléculas cationizadas com elementos da família 1A, apresentando com menor intensidade a espécie $[M + H]^+$. Íons como Li^+ e Na^+ , devido ao menor raio iônico, apresentam alta afinidade de coordenação com os oligossacarídeos (ROGATSKY et al., 2005). A presença de sódio na composição das vidrarias de laboratório condiciona este elemento como um contaminante oriundo do preparo de amostra (ZHOU et al., 2014). Além disso, de acordo com Zaia (2004), a utilização de altas voltagens no cone favorece o aumento da concentração de $[M + Na]^+$, possivelmente devido ao efeito da dissociação induzida na fonte de ionização (*in-source fragmentation*). Por tais motivos, durante as últimas décadas, artigos científicos tem se baseado na detecção de açúcares a partir das moléculas sodiadas (TINKE et al., 1993; TAORMINA et al., 2007; PENNA et al., 2009; BIBI & JU, 2016).

Outros cátions também já foram estudados, porém como aditivos da fase móvel. Rogatsky et al. (2005) desenvolveram um método para quantificação de glicerol, glicose e sorbitol em plasma humano utilizando fase móvel contendo acetato de cézio ($CsC_2H_3O_2$) a 40 mM. O cátion Cs^+ apresenta menor afinidade aos monossacarídeos que o cátion Na^+ e, portanto, a seletividade do método foi garantida pela detecção do próprio cátion como íon produto. Já Wan & Yu (2006) empregaram acetato de amônio ($NH_4C_2H_3O_2$) na fase móvel, possibilitando a detecção de até trissacarídeos da fração orgânica do ar atmosférico.

Quanto ao modo negativo, os carboidratos tendem a formar moléculas desprotonadas, podendo gerar também moléculas anionizadas com íons de F^- e Cl^- (ZAIA, 2004; ROGATSKY et al., 2007; HAMMAD et al., 2009). Esta versatilidade foi testada no artigo de Jiang & Cole (2005), em que foi observado que a adição de ânions flúor e acetato favoreceram o aumento do número de $[M - H]^-$. As espécies $[M + Cl]^-$ ainda apresentaram maior estabilidade que as moléculas desprotonadas.

Em relação à fragmentação, sobretudo, dos oligossacarídeos, três possíveis vias podem ocorrer: pela quebra da ligação glicosídica entre monossacarídeos; pela ruptura do anel cíclico; ou ainda a perda do cátion ou do ânion ligado à molécula. Em energias mais baixas, a primeira via tende a ser favorecida para as espécies normalmente formadas, como $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$ e $[M - H]^-$ (ZAIA, 2004). Segundo Domon & Costello (1988) e Demarque et al. (2016), para a eliminação de glicosídeos, destaca-se a migração de hidrogênio ou eliminação 1,2 (β) intramolecular de hidrogênio como principal mecanismo de reação, resultando na quebra da ligação glicosídica.

Como resultado da fragmentação dos oligossacarídeos, diferentes íons produtos podem ser observados nos espectros de massas, possibilitando a compreensão das estruturas químicas e das ligações glicosídicas presentes. Domon & Costello (1988) foram os primeiros a elaborar uma nomenclatura sistemática para fragmentos de glicoconjugados e oligossacarídeos, sendo esta utilizada nos trabalhos realizados por diferentes pesquisadores ao longo dos anos. Esta nomenclatura encontra-se esquematizada na Figura 21.

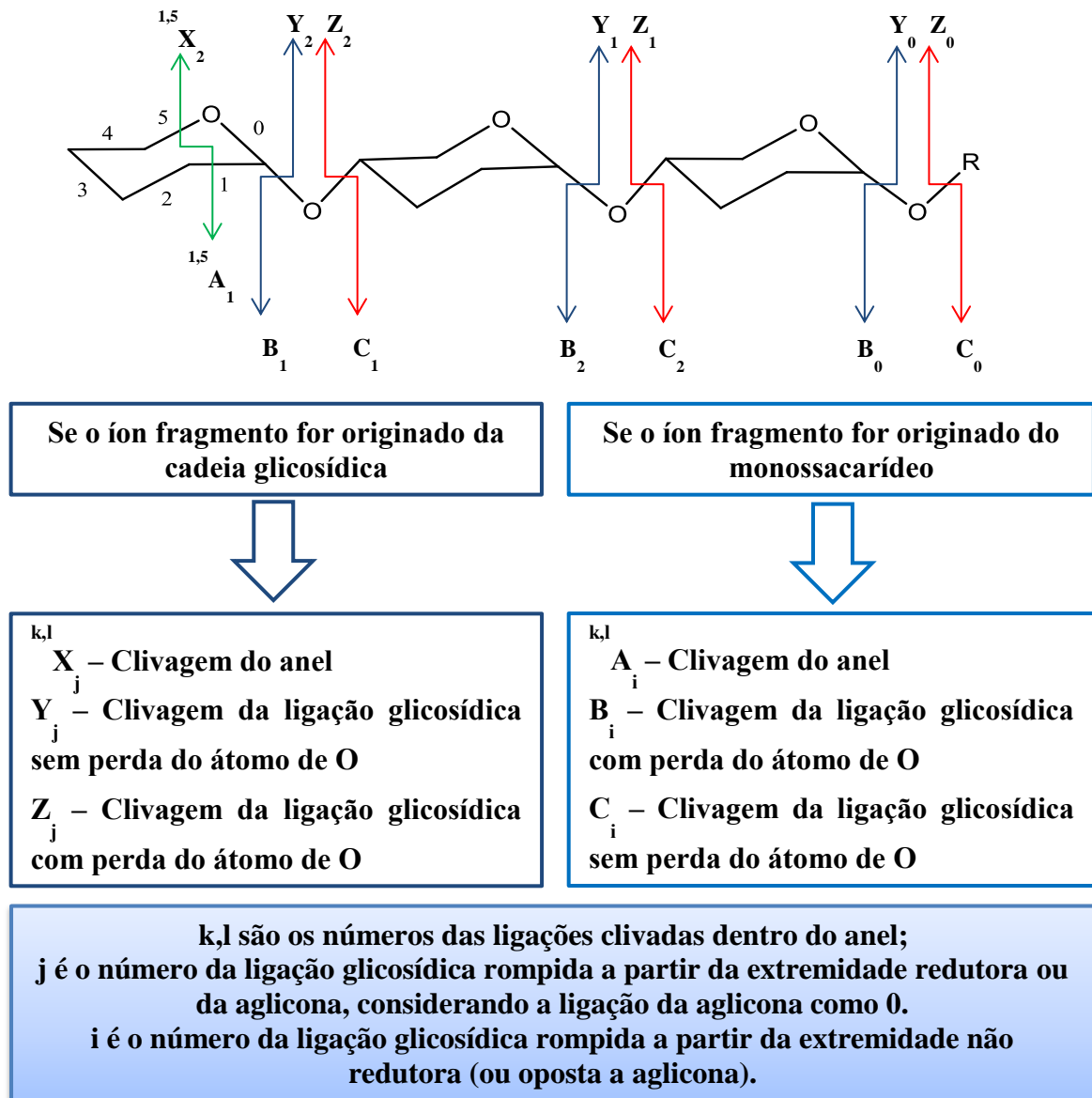


Figura 21. Esquema da nomenclatura sistemática para fragmentos de glicoconjugados e oligossacarídeos (DOMON & COSTELLO, 1988).

As informações relatadas colaboram para a tentativa de diferenciar por Espectrometria de Massas o café e seus adulterantes pelo perfil de carboidratos, que varia de acordo com a classificação taxonômica de cada matriz vegetal. O trabalho de Santiago et al. (2012) indica oligossacarídeos específicos que podem favorecer a rastreabilidade da ocorrência de adulteração, como:

- ✓ **Maltose** [α -D-glicopiranosil-(1→4)- α -D-glicopiranosose] (Figura 22):
 A maltose é um possível indicador de adição de grãos de **milho** (*Zea mays* L.), devido a este dissacarídeo ser oriundo da hidrólise das cadeias de amido, cujo milho apresenta teor em torno de 72% (m/m) em base seca (PAES, 2006);

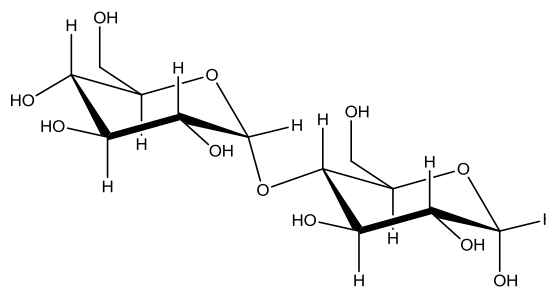


Figura 22. Fórmula estrutural da maltose.

- ✓ **Rafinose** [α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-glicopiranosil-(1 \leftrightarrow 2)- β -D-frutofuranose] e **Estaquiose** [α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-glicopiranosil-(1 \leftrightarrow 2)- β -D-frutofuranose] (Figura 23):
 Estes oligossacarídeos, oriundos da ligação α (1 \rightarrow 6) entre sacarose e resíduos de galactose, podem sugerir a adição de **soja** (*Glycine max* (L.) Merr.), outro adulterante comum. Alguns cultivares brasileiros apresentaram em torno de 0,4% a 1,2% e de 2,4% a 4,4%, respectivamente, de rafinose e estaquiose, diferentemente do café verde, com apenas 0,04% e 0,06% (JORGE et al.; KNOPP et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2010);

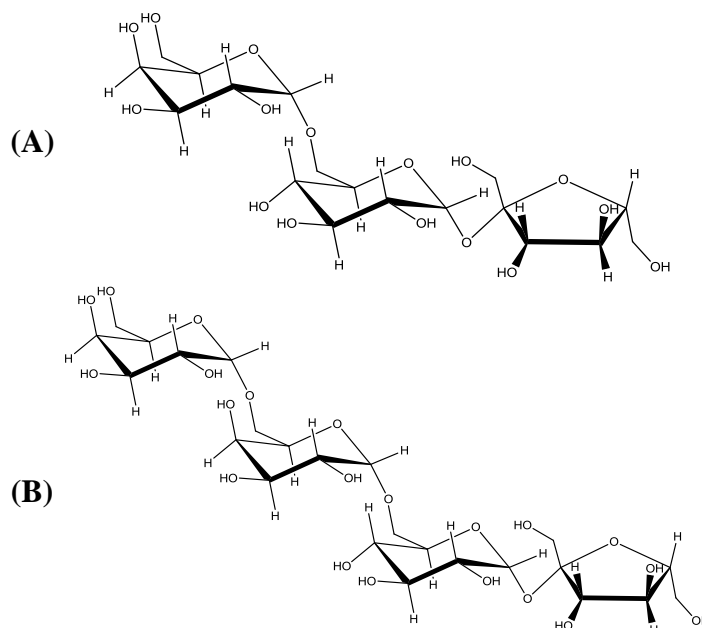


Figura 23. Fórmula estrutural da (A) rafinose e (B) estaquiose.

- ✓ **1-kestose** [β -D-frutofuranosil-(2 \rightarrow 1)- β -D-frutofuranosil-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-glicopiranosil] e **Nistose** [β -D-frutofuranosil-(2 \rightarrow 1)- β -D-frutofuranosil-(2 \rightarrow 1)- β -D-frutofuranosil-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-glicopiranosil] (Figura 24):
 Estes oligossacarídeos provenientes da adição de β -D-frutose a molécula de sacarose através de ligação β (2 \rightarrow 1), fazem parte da classe dos frutanos e estão presentes especificamente nas sementes de gramíneas. Podem indicar, portanto, a adição de **cevada** (*Hordeum vulgare* L.), que apresenta predominantemente frutanos de 3 ou 4 cadeias e teores de em média 1,0 % (VERSPREET et al., 2015).

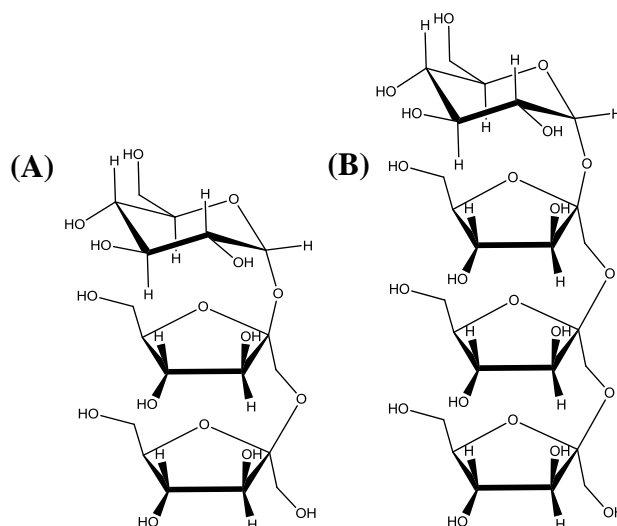


Figura 24. Fórmula estrutural da (A) 1-kestose e (B) nistose.

Outros grãos também podem ser detectados pelo perfil de carboidratos, como o arroz (*Oryza sativa* L.), que apresenta elevada concentração de amido, sendo relatados na literatura teores de 72% a 82% em arroz integral de diferentes cultivares (WALTER et al., 2008).

Estes dados qualitativos e quantitativos ainda podem ser modificados, quando os materiais vegetais citados forem submetidos ao processo de torrefação. Logo, existe a necessidade de um método cromatográfico que apresente baixos limites de detecção para que ocorra a proibição de consumo de produtos que tenham sofrido adulteração com qualquer grão mencionado. O emprego da EM como sistema de detecção pode garantir alta sensibilidade e, por tal razão, é recomendado pelo Jornal Oficial das Comunidades Europeias (J.O.C.E., 2002) como sistema de detecção para métodos de confirmação de resíduos e contaminantes orgânicos em controle de qualidade. Além disso, o sistema CLUE-EM-EM favorece também a diferenciação isomérica, através das reações de fragmentação, conferindo alta seletividade para o método qualitativo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Execução do Procedimento Experimental

Esta dissertação corresponde à execução do plano de ação “Desenvolvimento de método qualitativo baseado em LC-MS para detecção de adulterantes em café”, referente a um projeto do Consórcio Pesquisa Café, sob título “Desenvolvimento de métodos para detecção de adulterantes e grãos de baixo valor de mercado em *blends* de café torrado e moído”. Por esta razão, todo o procedimento experimental foi realizado no Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, situado no bairro de Guaratiba no município do Rio de Janeiro – RJ.

3.2. Material

3.2.1. Vidrarias, equipamentos e insumos

- ✓ Embalagens metalizadas com zíper e dimensões de 12 cm e 19 cm, respectivamente, de largura e altura;
- ✓ Béqueres com capacidade de 100 mL, 600 mL e 1000 mL;
- ✓ Provetas de 50 mL, 250 mL e 500 mL;
- ✓ Balões volumétricos de 2 mL, 5 mL, 10 mL, 250 mL e 500 mL;
- ✓ Espátulas metálicas;
- ✓ Placas de petri;
- ✓ Tubos de centrífuga de 40 mL com tampa;
- ✓ Ponteiras para pipetador automático de capacidade de 10 µL a 100 µL e 100 µL a 1000 µL;
- ✓ Papel de filtro qualitativo;
- ✓ Seringas de vidro intercambiável de 10 mL;
- ✓ Filtros de fluoreto de polivinilideno (*polyvinylidene fluoride* – PVDF) com diâmetro dos poros de 0,22 µm;
- ✓ Colunas para extração em fase sólida Sep-Pak[®] C₁₈ (Waters[®], EUA);
- ✓ Tubos de vidro tipo *vial* com tampa com septo de politetrafluoretileno (PTFE) e silicone de capacidade de 1,8 mL;
- ✓ Tubos de vidro tipo *vial shell* com tampa de polietileno de capacidade de 1 mL;
- ✓ Microseringas Hamilton[®] (EUA) de capacidade de 100 µL e 250 µL;
- ✓ Frascos de vidro borossilicato de 20 mL e 40 mL com tampa;
- ✓ Frascos de vidro borossilicato para reservatório de fase móvel com capacidade de 250 mL e 500 mL.

3.2.2. Padrões analíticos

- ✓ Maltose, grau de pureza (GP) ≥ 99%;
- ✓ Rafinose, GP ≥ 98%;
- ✓ Estaquiase, GP = 98%;
- ✓ 1-kestose, GP ≥ 98%;
- ✓ Nistose, GP ≥ 98%;
- ✓ Maltotriose, GP ≥ 90%;
- ✓ Sacarose, grau ACS.

Todos os padrões utilizados foram da marca Sigma-Aldrich[®] (Alemanha).

3.2.3. Solventes

- ✓ Acetonitrila, grau LC-MS, da marca Merck[®] (Alemanha);
- ✓ Acetonitrila, grau LC-MS, da marca Fluka Analytical[®] (EUA);
- ✓ Acetonitrila, grau LC-MS, da marca Scharlau[®] (Espanha);
- ✓ Acetonitrila, grau HPLC, da marca Tedia[®] (EUA);
- ✓ Metanol, grau LC-MS, da marca Merck[®] (Alemanha);
- ✓ Metanol, grau HPLC, da marca Sigma-Aldrich[®] (EUA);
- ✓ Água, grau LC-MS, da marca Fluka Analytical[®] (EUA);
- ✓ Água ultrapurificada grau Milli-Q;
- ✓ Ácido fórmico, GP = 98% a 100%, da marca Merck[®] (Alemanha);
- ✓ Ácido fosfórico (H₃PO₄), GP = 85%, da marca Spectrum[®] (EUA);
- ✓ Etanol, GP = 99,5%, da marca Tedia[®] (EUA);
- ✓ Formiato de amônio, GP ≥ 99%, da marca Fluka Analytical[®] (EUA).

3.2.4. Instrumentação

- ✓ Cromatógrafo a líquido de ultra eficiência Acquity UPLC[®] acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução Synapt[®] modelo G1 com ionização por eletrospray (IES) e analisadores do tipo quadrupolo e tempo de voo (QTDV), conforme Figura 25, e operação do equipamento através do software MassLynx[®] (Waters[®], EUA);



Figura 25. Sistema Acquity UPLC[®] acoplado ao espectrômetro de massas Synapt[®] modelo G1 com analisadores QTDV (SCHULZ, 2014).

- ✓ Coluna Acquity UPLC[®] BEH do tipo C₁₈ 130 Å (150 mm x 2,1 mm, 1,7 µm), da marca Waters[®] (EUA);
- ✓ Coluna Kinetex[®] HILIC 100 Å (50 mm x 2,1 mm, 1,7 µm), da marca Phenomenex[®] (EUA);

- ✓ Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters[®] (EUA) composto por bomba 600, injetor automático 717 plus, controlador de temperatura da coluna 231M, detector de índice de refração modelo 2414, e software Empower[®];
- ✓ Coluna Zorbax[®] Carbohydrate Agilent (EUA) (250 mm x 4,6 mm, 5,0 µm);
- ✓ Balança analítica Marte Shimadzu (Japão) modelo AY 220;
- ✓ Agitador tipo vórtex Scientific Industries[®] (EUA) modelo Genie 2;
- ✓ Banho ultrassom Branson[®] (EUA) modelo 2210;
- ✓ Centrífuga Hettich[®] (Alemanha) modelo EBA 12;
- ✓ Pipetadores automáticos Brand[®] (Alemanha) de capacidade de 10 µL a 100 µL e 100 µL a 1000 µL;
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q[®] Gradient 10A Millipore[®] e Elix[®]/RiOs[™] 5 (EUA);
- ✓ Moinho analítico IKA[®] A11;
- ✓ Peneiras inox para análise gravimétrica Bertel (Brasil), com porosidade de 106 mm/µm (150 mesh) e 250 mm/µm (60 mesh).

3.2.5. Amostras

- ✓ Grãos de café torrado;
- ✓ Grãos de milho *in natura* e torrado;
- ✓ Grãos de soja *in natura* e torrado;
- ✓ Grãos de cevada *in natura* e torrado;
- ✓ Grãos de arroz integral *in natura* e torrado;
- ✓ 2 amostras comerciais de café torrado e moído;
- ✓ 6 amostras comerciais de café solúvel.

Todas as amostras foram adquiridas no comércio varejista do município do Rio de Janeiro – RJ.

3.3. Preparo de Soluções

3.3.1. Solução qualitativa aquosa de ácido fosfórico a 0,1% (v/v)

Transferiram-se, com auxílio de um pipetador automático, 20 µL de ácido fosfórico para uma proveta contendo 20 mL de água grau Milli-Q.

3.3.2. Solução qualitativa aquosa de ácido fosfórico a 0,1% e acetonitrila (1:1)

Transferiram-se, com auxílio de uma proveta, 20 mL de acetonitrila grau LC-MS para a proveta contendo a solução 3.3.1. Acondicionou-se a solução final em frasco de vidro.

3.3.3. Solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (v/v)

Adicionaram-se 500 µL de ácido fórmico em um balão volumétrico de 500 mL e completou-se o volume com água grau Milli-Q. Acondicionou-se a solução em frasco de vidro para fase móvel.

3.3.4. Solução qualitativa aquosa de ácido fórmico a 0,1% e acetonitrila (1:1)

Transferiram-se, com auxílio de uma proveta, 20 mL da solução 3.3.3 para uma proveta contendo 20 mL de acetonitrila grau LC-MS. Acondicionou-se a solução final em frasco de vidro.

3.3.5. Solução de ácido fórmico a 0,1% (v/v) em acetonitrila

Em balão volumétrico de 250 mL contendo acetonitrila grau LC-MS, adicionaram-se 250 µL de ácido fórmico. Completou-se o volume com acetonitrila grau LC-MS e acondicionou-se a solução final em frasco de vidro para fase móvel.

3.3.6. Solução aquosa de formiato de amônio a 10 mM

Para obtenção de uma solução de formiato de amônio a 10 mM em 500 mL, é necessária a massa de 0,3153 g deste sal orgânico. Portanto, pesou-se 0,3249 g de formiato de amônio e transferiu-se quantitativamente com adição de água grau Milli-Q para balão volumétrico de 500 mL. Completou-se o volume com água grau Milli-Q e acondicionou-se a solução em frasco de vidro para fase móvel.

3.3.7. Soluções padrão de cada analito (maltose, rafinose, estaquiose, 1-kestose e nistose)

Para infusão direta em espectrômetro de massas, foram preparadas inicialmente soluções padrão de cada analito em diferentes solventes e concentrações, conforme Tabela 11.

Tabela 11. Diferentes soluções padrão preparadas para cada carboidrato e analisadas em infusão direta no espectrômetro de massas.

Soluções	Preparo	Solvente	Concentração (µg/mL)
Solução A.1	4 mg de padrão em balão volumétrico de 2 mL	Solução Aquosa de Ácido Fórmico a 0,1% e Acetonitrila (1:1)	2000
Solução A.2	Diluição de 10 µL da solução A.1 em 1000 µL	Solução Aquosa de Ácido Fórmico a 0,1% e Acetonitrila (1:1)	20
Solução B.1	10 mg de padrão em balão volumétrico de 10 mL	Água Grau Milli-Q	1000
Solução B.2	Diluição de 10 µL da solução B.1 em 1000 µL	Água Grau Milli-Q	10
Solução C	1 mg de padrão em balão volumétrico de 2 mL	Solução Aquosa de Formiato de Amônio a 10 mM	500

Posteriormente, foram realizadas ainda novas diluições a partir da solução estoque A.1, conforme Tabela 12.

Tabela 12. Diluições, em solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% e acetonitrila (1:1), a partir da solução A.1.

Soluções	Preparo	Concentração (µg/mL)
Solução A.1	4 mg de padrão em balão volumétrico de 2 mL	2000
Solução A.2	Diluição de 10 µL da solução A.1 em 1000 µL	20
Solução A.3	Diluição de 500 µL da solução A.1 em 1000 µL	1000
Solução A.4	Diluição de 250 µL da solução A.1 em 1000 µL	500
Solução A.5	Diluição de 125 µL da solução A.1 em 1000 µL	250
Solução A.6	Diluição de 50 µL da solução A.1 em 1000 µL	100
Solução A.7	Diluição de 10 µL da solução A.1 em 2000 µL	10

3.3.8. Soluções padrão contendo mistura de maltose, rafinose, estaquiase, 1-kestose e nistose

Para injeção em cromatógrafo a líquido de ultra eficiência, foram preparadas soluções contendo mistura dos padrões analíticos a partir da solução A.1 e também da pesagem de cada analito, em diferentes concentrações, conforme Tabela 13.

Tabela 13. Diferentes soluções padrão analisadas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência.

Soluções	Preparo	Solvente	Conc. (µg/mL)
Solução D	250 µL da solução A.1 de cada padrão, com volume total de 1250 µL	Solução Aquosa de Ácido Fórmico a 0,1% e Acetonitrila (1:1)	400
Solução E.1	1 mg de cada padrão em balão volumétrico de 50 mL	Água Grau Milli-Q	20
Solução E.2	Diluição de 450 µL da solução E.1 em 1800 µL	Água Grau Milli-Q	5

3.3.9. Soluções padrão de outros carboidratos (sacarose e maltotriose)

Pesou-se 5,0 mg de cada analito e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 5 mL. Completou-se o volume com água grau Milli-Q. Foram realizadas ainda duas diluições seguidas das soluções padrão (1:100 e 1:2), resultando em uma solução aquosa de concentração de 5 µg/mL.

3.3.10. Solução padrão contendo maltose e sacarose

A partir de 1000 µL das duas soluções padrão a 10 µg/mL de maltose e sacarose, preparou-se uma solução padrão com concentração de 5 µg/mL de cada isômero.

3.3.11. Solução padrão contendo rafinose, 1-kestose e maltotriose

De modo similar ao item 3.3.10, preparou-se uma solução padrão contendo os isômeros rafinose, 1-kestose e maltotriose, resultando em uma concentração de 3,3 µg/mL.

3.3.12. Solução aquosa de etanol a 80,0% (v/v)

Em balão volumétrico de 500 mL, adicionaram-se 400 mL de etanol, com auxílio de uma proveta. Completou-se o volume com água grau Milli-Q e acondicionou-se a solução em frasco de vidro.

3.3.13. Soluções padrão para curva analítica por CLAE-IR

Em balão volumétrico de 10 mL, pesou-se 10 mg de cada oligossacarídeo inicialmente investigado (maltose, rafinose, estaquiase, 1-kestose e nistose) e completou-se o volume com água grau Milli-Q, totalizando uma solução padrão de concentração de 1,0 mg/mL (Solução F). Para obtenção de uma curva analítica, procedeu-se o preparo de cinco diluições, conforme Tabela 14.

Tabela 14. Diluições aquosas a partir da solução F para posterior construção da curva analítica.

Soluções	Preparo	Concentração (mg/mL)
Solução F.1	Diluição de 100 µL da solução F em 1000 µL	0,1
Solução F.2	Diluição de 300 µL da solução F em 1000 µL	0,3
Solução F.3	Diluição de 500 µL da solução F em 1000 µL	0,5
Solução F.4	Diluição de 700 µL da solução F em 1000 µL	0,7
Solução F.5	Diluição de 900 µL da solução F em 1000 µL	0,9

3.3.14. Solução aquosa de acetonitrila a 70,0% (v/v)

Em balão volumétrico de 100 mL contendo acetonitrila grau LC-MS, adicionaram-se, com auxílio de uma proveta, 30 mL de água grau Milli-Q. Completou-se o volume com acetonitrila grau LC-MS e acondicionou-se a solução final em frasco de vidro.

3.3.15. Solução aquosa de acetonitrila a 75,0% (v/v)

Em balão volumétrico de 100 mL contendo acetonitrila grau LC-MS, adicionaram-se, com auxílio de uma proveta, 25 mL de água grau Milli-Q. Completou-se o volume com acetonitrila grau LC-MS e acondicionou-se a solução final em frasco de vidro.

3.3.16. Solução aquosa de acetonitrila a 90,0% (v/v)

Em balão volumétrico de 250 mL contendo acetonitrila grau LC-MS, adicionaram-se, com auxílio de uma proveta, 25 mL de água grau Milli-Q. Completou-se o volume com acetonitrila grau LC-MS e acondicionou-se a solução final em frasco de vidro.

3.3.17. Solução aquosa de acetonitrila a 20,0% (v/v)

Em balão volumétrico de 50 mL contendo acetonitrila grau LC-MS, adicionaram-se, com auxílio de uma proveta, 10 mL de água grau Milli-Q. Completou-se o volume com acetonitrila grau LC-MS e acondicionou-se a solução final em frasco de vidro.

3.4. Determinação do Método Espectrométrico

3.4.1. Cálculo das massas monoisotópicas de cada analito

A identificação de cada oligossacarídeo foi realizada através da detecção de suas respectivas relações massa/carga (m/z), sendo estas calculadas previamente a partir das massas monoisotópicas de cada elemento químico de acordo com o relatório técnico da IUPAC (1991). Todas as massas atômicas e monoisotópicas de cada elemento atômico estão relacionadas na Tabela 15.

Tabela 15. Massas monoisotópicas dos elementos químicos de maior abundância (IUPAC, 1991).

Elemento Químico	Massa Atômica (Da)	Massa Monoisotópica (Da)
Hidrogênio (H)	1,0079	1,0078
Carbono (C)	12,0110	12,0000
Oxigênio (O)	15,9994	15,9949
Sódio (Na)	22,9898	22,9898
Potássio (K)	39,0983	38,9637
Cloro (Cl)	35,4527	34,9689

3.4.2. Calibração do detector

Previamente a utilização do espectrômetro de massas para detecção dos analitos, foi realizada a calibração do analisador por tempo de voo em periodicidade semanal com a solução 3.3.2 (solução aquosa de ácido fosfórico a 0,1% e acetonitrila, 1:1) nas condições recomendadas pelo fabricante e descritas na Tabela 16.

Tabela 16. Parâmetros operacionais para calibração do espectrômetro de massas.

Polaridade	Positiva	Negativa
Fluxo ($\mu\text{L}/\text{min}$)	5,00	5,00
Capilar (kV)	2,5	2,0
Cone de Amostragem (V)	22	12
Cone de Extração (V)	5,0	4,0
Temperatura da Amostra ($^{\circ}\text{C}$)	80	120
Temperatura de Dessolvatação ($^{\circ}\text{C}$)	150	300
Fluxo do Gás do Cone (L/h)	56	60
Fluxo do Gás de Dessolvatação (L/h)	300	350
Energia de Colisão <i>Trap</i> (V)	6,0	4,0
Energia de Colisão <i>Transfer</i> (V)	4,0	15,0
Analisador	Modo V	Modo V

3.4.3. Definição dos parâmetros espectrométricos

Através da infusão direta das soluções padrão de cada analito (soluções 3.3.7), procedeu-se a determinação dos parâmetros operacionais para ionização em modo positivo e

em modo negativo, a partir dos parâmetros pré-definidos para a operação do equipamento. A Tabela 17 relaciona os valores utilizados para ambos os modos de ionização.

Tabela 17. Parâmetros operacionais do espectrômetro de massas.

Polaridade	Positiva	Negativa
Fluxo ($\mu\text{L}/\text{min}$)	5,00	5,00
Capilar (kV)	3,0	3,0
Cone de Amostragem (V)	50	40
Cone de Extração (V)	2,0	4,0
Temperatura da Amostra ($^{\circ}\text{C}$)	80	80
Temperatura de Dessolvatação ($^{\circ}\text{C}$)	300	150
Fluxo do Gás do Cone (L/h)	40	40
Fluxo do Gás de Dessolvatação (L/h)	500	300
Energia de Colisão <i>Trap</i> (V)	15,0	15,0
Energia de Colisão <i>Transfer</i> (V)	15,0	15,0
Analizador	Modo V	Modo V

Para obtenção da fragmentação por EM-EM, foram utilizadas energias de colisão no *trap* e no *transfer*, em V, específicos para cada carboidrato, conforme Tabela 18.

Tabela 18. Valores de energia de colisão, em V, no *trap* e no *transfer* definidos para cada molécula analisada.

Analitos	IES+	IES-
Maltose	15,0	1,0
Rafinose	20,0	10,0
1-kestose	20,0	15,0
Estaquiiose	25,0	15,0
Nistose	25,0	20,0

A confirmação de cada analito foi realizada através do cálculo do erro de identificação em mDa e ppm, conforme Equação 1 e 2. Realizou-se, por último, a infusão direta de cada solvente empregado, eliminando a possibilidade de interferência na detecção dos oligossacarídeos.

3.5. Determinação do Método Cromatográfico

3.5.1. Cromatografia líquida de ultra eficiência em fase reversa

Para o método cromatográfico com fase reversa, foi utilizada uma coluna Acquity UPLC® BEH do tipo C₁₈ 130 Å (150 mm x 2,1 mm, 1,7 μm), da marca Waters® (EUA), e como fase móvel o solvente acetonitrila e a solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (solução 3.3.3). O método desenvolvido apresentou as seguintes condições cromatográficas: temperatura do injetor de 20°C; volume de injeção de 1 μL ; vazão de fase móvel de 0,2 mL/min; temperatura da coluna de 35°C; e tempo de corrida de 6 min. A Tabela 19 descreve a composição do gradiente de eluição do método com fase reversa adotada.

Tabela 19. Composição da fase móvel do método com fase reversa: acetonitrila (A) e solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (B).

Tempo de Corrida (min)	A	B
0,0	2,0	98,0
2,0	4,0	96,0
4,0	4,0	96,0
6,0	2,0	98,0

3.5.2. Cromatografia líquida de ultra eficiência por interação hidrofílica

Outro método de separação dos carboidratos foi desenvolvido, baseando-se na cromatografia por interação hidrofílica. Empregou-se uma coluna Kinetex[®] HILIC 100Å (50 mm x 2,1 mm, 1,7 µm), da marca Phenomenex[®] (EUA) e solvente acetonitrila e a solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (solução 3.3.3). O método estabelecido e adotado por CIH consistiu no emprego de temperatura do injetor de 20°C, volume de injeção de 1,0 µL, fluxo de 0,5 mL/min, temperatura da coluna de 35°C e tempo de corrida de 10 min, com eluição em gradiente conforme Tabela 20.

Tabela 20. Composição da fase móvel do método por CIH: acetonitrila (A) e solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (B).

Tempo de Corrida (min)	A	B
0,0	92,0	8,0
2,9	92,0	8,0
3,0	90,0	10,0
6,8	90,0	10,0
7,3	60,0	40,0
8,3	60,0	40,0
8,8	92,0	8,0
10,0	92,0	8,0

3.6. Aplicação da Metodologia Analítica

3.6.1. Moagem dos grãos de café e dos adulterantes

Amostras *in natura* e torradas de grãos de milho, soja, cevada e arroz foram trituradas em moinho analítico, procedendo a homogeneização de cada produto em pó obtido, através de classificação em peneiras de 150 mesh e 60 mesh e o armazenamento em embalagens metalizadas com zíper. Estas amostras foram disponibilizadas pelo pesquisador D.Sc. Otniel Freitas e pela aluna Cinthia Couto, mestranda em Alimentos & Nutrição (UNIRIO), ambos da Planta de Pós-Colheita da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Estes procedimentos também foram realizados com grãos de café torrado adquiridos no comércio varejista (Figura 26).

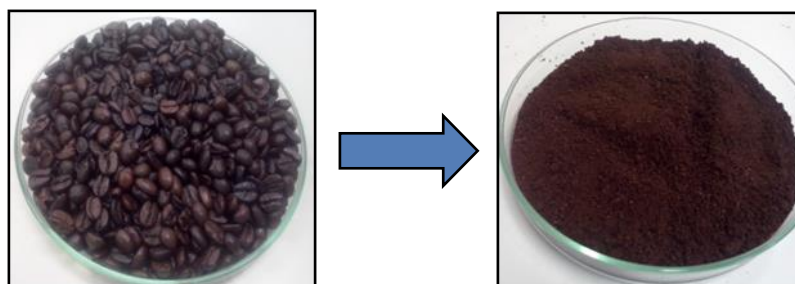


Figura 26. Amostra de grão de café torrado, antes e após a moagem.

3.6.2. Extração dos carboidratos solúveis das amostras torradas e moídas

Procederam-se as extrações, em duplicata, dos carboidratos solúveis das amostras de café torrado e dos adulterantes *in natura* e torrados, segundo o método de Macrae (1998) com adaptações. Para o estudo com soja, excepcionalmente foi empregado o método de Oliveira et al. (2010), também com adaptações. A Figura 27 esquematiza os dois procedimentos experimentais empregados para extração dos carboidratos solúveis.

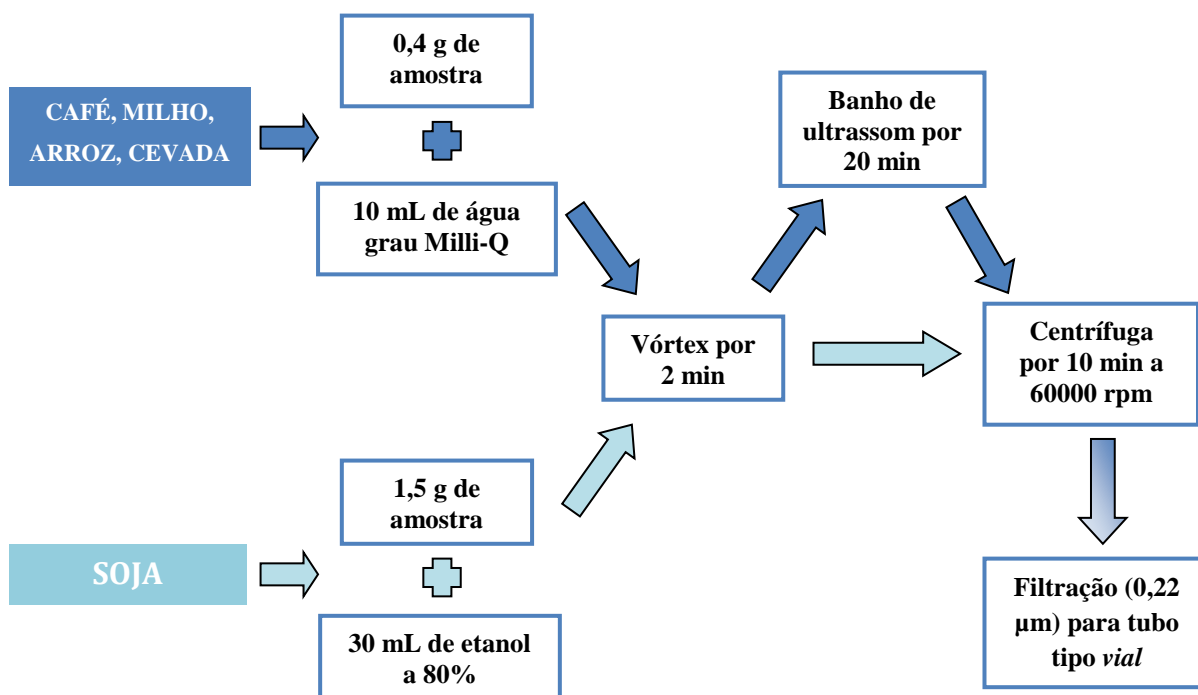


Figura 27. Diagrama de blocos dos dois métodos de extração adaptados e empregados para as matrizes de trabalho.

3.6.3. Extração de carboidratos solúveis de amostras comerciais de café

Realizou-se também, em duplicata, a extração de 4 amostras comerciais, sendo 2 de café torrado e moído e 2 de café solúvel. Estas amostras foram cedidas pela pesquisadora D.Sc. Edna Oliveira e pelo aluno Thiago Ferreira, doutorando em Nutrição (UFRJ), ambos do Laboratório de Diagnóstico Molecular da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Todas estas amostras foram consideradas adulteradas com cevada pela metodologia por PCR em tempo real de Ferreira et al. (2016). Outras 4 amostras de café solúvel também foram investigadas.

Os extratos das amostras comerciais, obtidos segundo o método de Macrae (1998) com adaptações, foram purificados de acordo com a Figura 28, através do uso de coluna de extração em fase sólida Sep-Pak[®] C₁₈ (Waters, EUA).

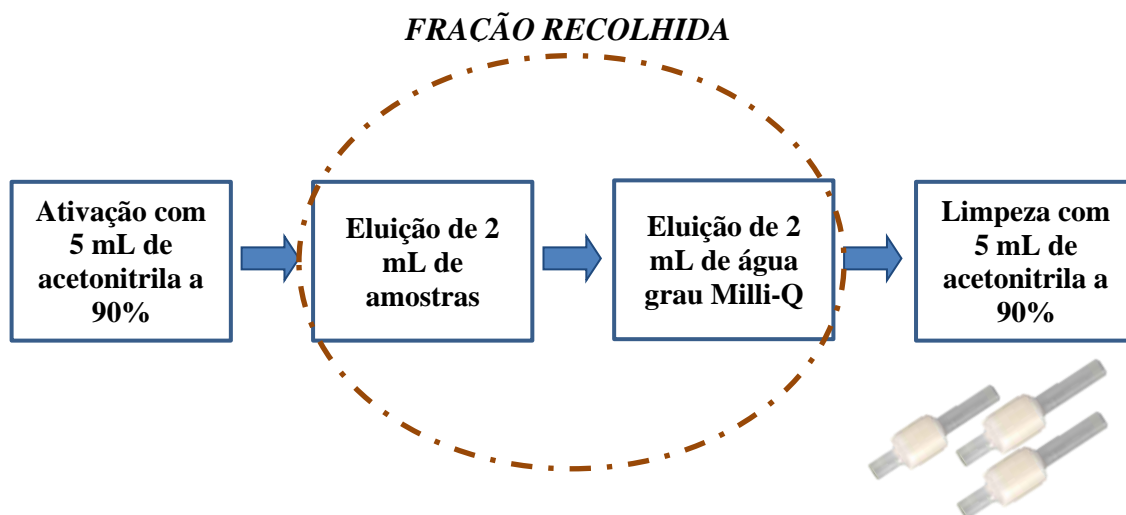


Figura 28. Etapa de purificação dos extratos de café comercial.

Para definição destas condições de purificação, testes de recuperação foram realizados previamente com uma solução padrão contendo 90% do extrato dos grãos de café torrado, totalizando uma concentração dos padrões de 100 µg/mL. As frações obtidas foram analisadas por CLAE-IR, com coluna Zorbax[®] Carbohydrate Agilent (EUA) (250 mm x 4,6 mm, 5,0 µm), modo de eluição isocrático com fase móvel acetonitrila:água (75:25 v/v), fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e tempo de corrida de 20 min. A quantificação dos teores recuperados foi realizado por padronização externa.

3.6.4. Injeção dos Extratos por CLUE-EM-EM

Todos os extratos obtidos foram injetados em sistema integrado com um cromatógrafo a líquido de ultra eficiência com espectrômetro de massas de alta resolução com IES+ e analisadores QTDV, utilizando-se a metodologia previamente desenvolvida por CIH. Foram programados 4 funções simultâneas de detecção no método espectrométrico (Tabela 21), com aumento das energias de colisão no *trap* e no *transfer* para os íons de *m/z* 527 e 689, devido a maior dificuldade de distinção entre os isômeros dos oligossacarídeos.

Tabela 21. Método programado no software MassLynx[®] para detecção por espectrometria de massas.

Funções	Tipo	Íon (<i>m/z</i>)	Intervalo (min)	Energias de Colisão (V)
1	EM	-	0,0 a 10,0	15,0
2	EM-EM	365	0,1 a 2,5	15,0
3	EM-EM	527	1,0 a 5,0	25,0
4	EM-EM	689	3,0 a 10,0	30,0

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento do Método Espectrométrico

4.1.1. Etapas preliminares

A técnica de espectrometria de massas baseia-se na medição das relações massa/carga dos íons inseridos no equipamento, conforme mencionado anteriormente. Foi observado que a IUPAC publica um relatório técnico padrão com os valores de massa atômica de cada elemento químico bem como de seus isótopos a cada dois anos, sendo referente desde o ano de 1967 até 2013 (IUPAC, 1969; MEIJA et al., 2016). Para o desenvolvimento da metodologia, optou-se por utilizar como base o relatório do ano de 1989 (IUPAC, 1991), visto que este era o empregado pelo software do equipamento.

Com base no trabalho de Santiago et al. (2012), foram empregados os analitos maltose; rafinose e estaquiose; e 1-kestose e nistose como possíveis marcadores de adulteração em café, respectivamente, com milho, soja e cevada. As massas moleculares dos oligossacarídeos inicialmente estudados, assim como as relações m/z de suas moléculas na forma protonada ($[M + H]^+$), cationizada com átomo de sódio ($[M + Na]^+$) ou potássio, presente na composição do café ($[M + K]^+$), desprotonada ($[M - H]^-$) e ânionizada com átomo de cloro ($[M + Cl]^-$), espécies de formação mais favorável por IES, estão dispostas na Tabela 22.

Tabela 22. Massas exatas calculadas, a partir do relatório da IUPAC (1991), para os prováveis íons formados a partir dos oligossacarídeos.

Analito	Massa Molar (g/mol)	Massa Exata $[M + H]^+$	Massa Exata $[M + Na]^+$	Massa Exata $[M + K]^+$	Massa Exata $[M - H]^-$	Massa Exata $[M + Cl]^-$
Maltose	342,1155	343,1233	365,1053	381,0792	341,1077	377,0844
Rafinose/ 1-kestose	504,1680	505,1758	527,1578	543,1317	503,1602	539,1369
Estaquiose/ Nistose	666,2205	667,2283	689,2103	705,1842	665,2127	701,1894

Outro aspecto inicial importante foi a realização da calibração do equipamento com solução de ácido fosfórico. Íons inorgânicos e orgânicos são largamente utilizados para tal finalidade devido à facilidade de formarem agregados iônicos (*clusters*) através da infusão direta de solução salina em fonte eletrospray, além de poder compreender uma larga faixa de relação m/z . Como a estrutura química do H_3PO_4 apresenta três grupos doadores de prótons e um receptor de prótons, soluções contendo este ácido tendem a apresentar uma rede intermolecular de ligações de H, seja como agregados iônicos positivos do tipo $[(H_3PO_4)_n + xH]^x+$ ou negativos do tipo $[(H_3PO_4)_n - xH]^x-$ (VILČIAUSKAS et al., 2012; LAVANANT et al., 2014). A Figura 29 exemplifica a formação de *clusters* positivos, através da infusão direta da solução de ácido fosfórico a 0,05% (v/v), na faixa de 50 a 1500 m/z .

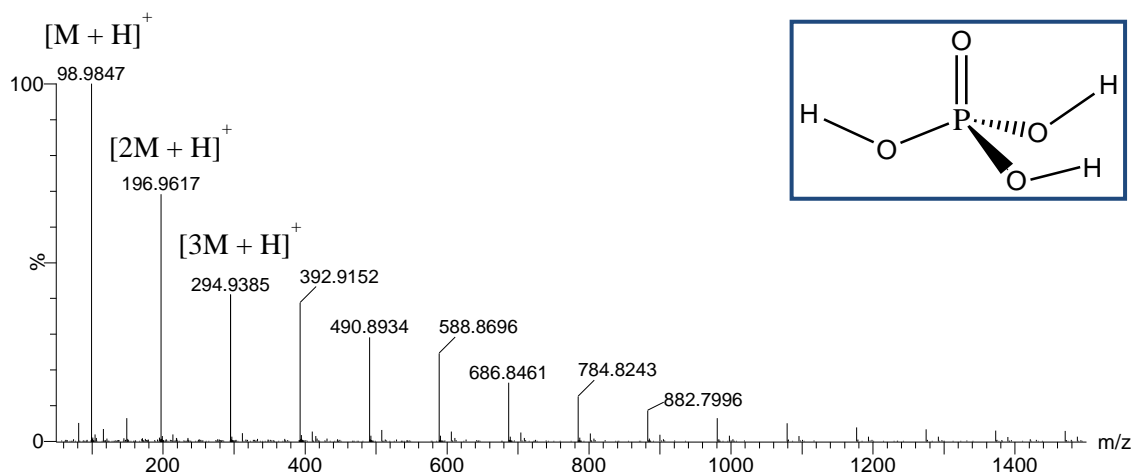


Figura 29. Espectro de massas de íons totais da solução de ácido fosfórico (solução 3.3.2.), com destaque para a estrutura química desta substância.

Testes preliminares de checagem através de cálculos de erro de identificação dos *clusters* observados confirmaram a possibilidade de uso de um mesmo arquivo de calibração no software MassLynx[®] entre dias diferentes de análise, em um período observado máximo de 14 dias. O controle da temperatura, através do isolamento da sala do equipamento, permitiu a ocorrência de mínimas oscilações de temperatura, conferindo maior estabilidade ao analisador de massas do tipo tempo de voo. Para o desenvolvimento da metodologia, adotou-se a calibração do equipamento em período máximo de 1 semana, com checagem diária dos erros de identificação para a solução de ácido fosfórico.

4.1.2. Detecção de oligossacarídeos por espectrometria de massas em modo positivo

Inicialmente, foram realizadas infusões diretas em modo positivo apenas por Espectrometria de Massas (EM) das soluções padrão de cada oligossacarídeo (maltose, rafinose, 1-kestose, estaquiase e nistose) em solvente solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% e acetonitrila (1:1), referentes às soluções A.1 e A.2. Nesta etapa, foram observados os tipos de íons preferencialmente formados a partir dos analitos estudados e definidos os parâmetros iniciais de análise espectrométrica em modo positivo, conforme Tabela 23. Posteriormente, foram realizadas novas infusões, sob estas condições estabelecidas, com as soluções B.1 e B.2, cujo solvente corresponde apenas à água ultrapurificada grau Milli-Q.

Tabela 23. Parâmetros operacionais iniciais do espectrômetro de massas em modo positivo.

Parâmetros	Valores
Fluxo ($\mu\text{L}/\text{min}$)	5,00
Capilar (kV)	3,0
Cone de Amostragem (V)	40
Cone de Extração (V)	4,0
Temperatura da Amostra ($^{\circ}\text{C}$)	80
Temperatura de Dessolvatação ($^{\circ}\text{C}$)	150
Fluxo do Gás do Cone (L/h)	40
Fluxo do Gás de Dessolvatação (L/h)	300
Energia de Colisão <i>Trap</i> (V)	15,0
Energia de Colisão <i>Transfer</i> (V)	15,0
Analisador	Modo V

Para ambas as soluções A e B, foram detectadas majoritariamente, nos espectros de massas de íons totais, íons com 23 unidades de m/z superior as massas moleculares dos oligossacarídeos, não sendo observadas diferenças quanto ao solvente empregado (solvente acidificado ou apenas água). Além disso, foi verificada a presença de íons com o dobro das massas moleculares e com acréscimo de 23 unidades de m/z . Concluiu-se preferencialmente a formação de moléculas sodiadas $[M + Na]^+$ e de dímeros sodiados $[2M + Na]^+$ a partir dos carboidratos investigados, conforme pode ser visualizado no espectro de massas de íons totais para maltose (Figura 30).

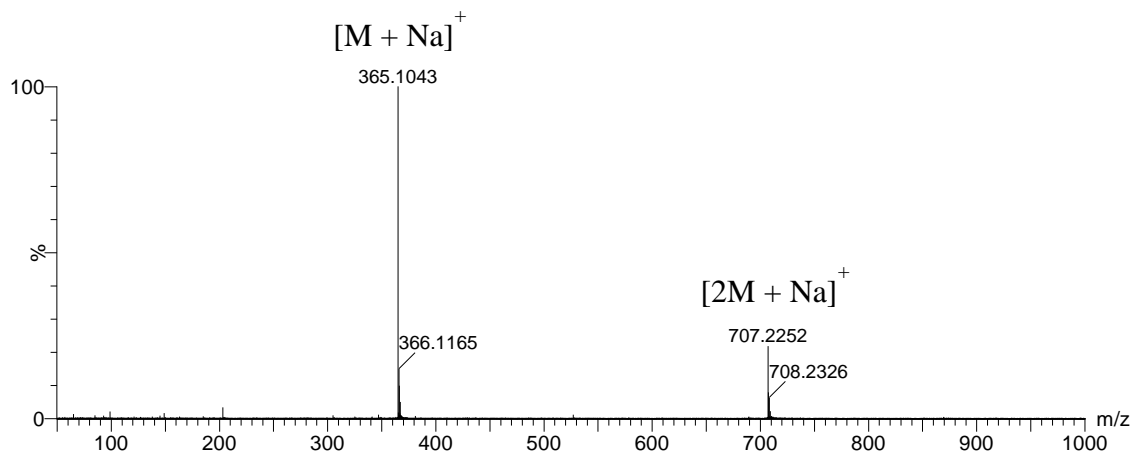


Figura 30. Espectro de massas, por EM, de íons totais da solução padrão de maltose a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (B.1), com presença dos íons de m/z 365 e 707.

Estes resultados em modo positivo coincidem com as informações obtidas na literatura, em que os íons majoritários observados correspondem as moléculas coordenadas com átomos de sódio, impureza procedente das etapas de preparo de amostras. Resultados similares foram encontrados por Taormina et al. (2007), em que, mesmo sem a adição de sódio, ocorreu a detecção de moléculas sodiadas de glicose. Para maltooligossacarídeos como a própria maltose, Penna et al. (2009) anteriormente observaram a mesma formação preferencial para oligossacarídeos com até 7 unidades de glicose.

Em relação à formação de *clusters*, a alta concentração dos analitos nas soluções empregada nas análises pode ter favorecido esta ocorrência. Durante o processo de eliminação do solvente e formação das moléculas sodiadas, a diferença de potencial aplicada entre o capilar e o cone de amostragem pode não ter sido suficiente para promover a ruptura total da elevada quantidade produzida de *clusters*. Uma alternativa para evitar esta ocorrência foi a utilização de soluções com menores concentrações. Através da infusão direta de novas diluições da solução A.1, não foi observada a presença dos dímeros, nos espectros de íons totais, quando analisadas soluções de concentração igual a 10 $\mu\text{g/mL}$, com exceção da maltose (Figura 31). A continuidade do desenvolvimento da metodologia foi realizada preferencialmente com soluções de concentrações na faixa entre 5 $\mu\text{g/mL}$ a 20 $\mu\text{g/mL}$.

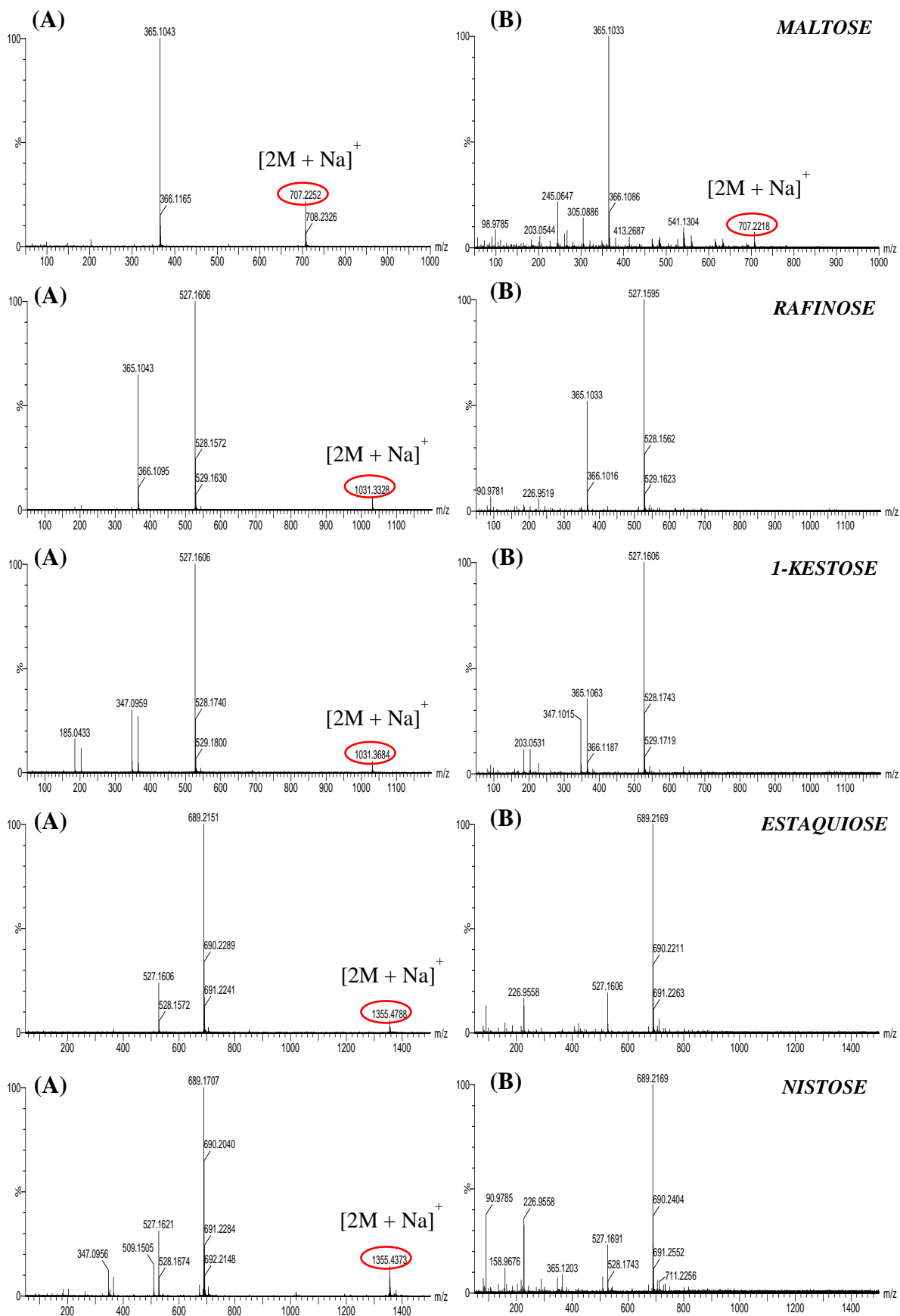


Figura 31. Comparação entre os espectros de massas de íons totais para cada analito nas concentrações de (A) 1000 µg/mL e (B) 10 µg/mL.

Após os resultados iniciais, foram realizadas análises com a solução A.2 por Espectrometria de Massas Sequencial (EM-EM), selecionando as moléculas sodiadas de cada analito e estabelecendo as energias de colisão, em V, necessárias para a fragmentação. Os espectros obtidos (Figuras 32 a 36) apresentaram baixos erros de identificação para as moléculas sodiadas, com valores inferiores a 5 ppm, o que garante uma identificação com maior exatidão e confiabilidade.

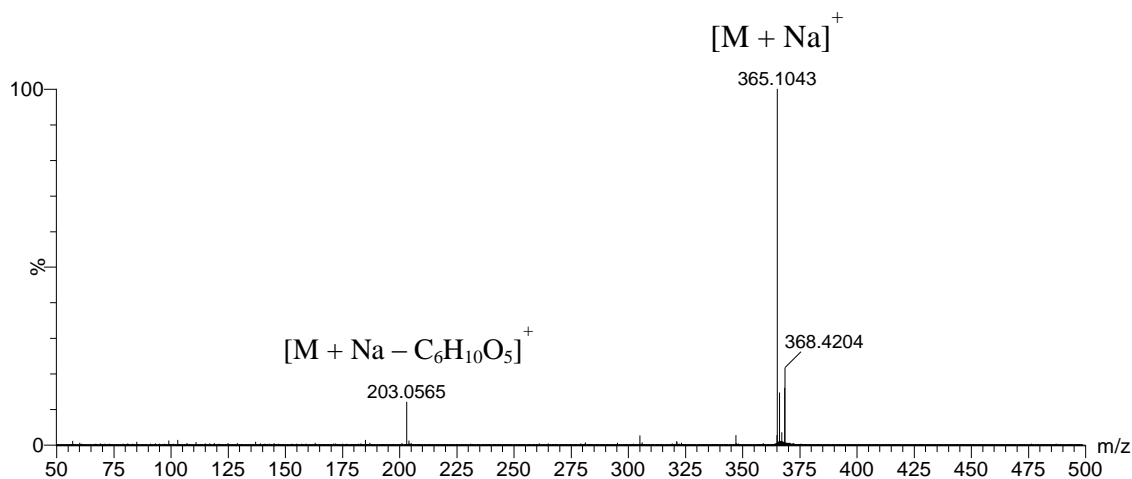


Figura 32. Espectro de massas, por EM-EM, da maltose, com aplicação de energias de colisão de 15,0 V.

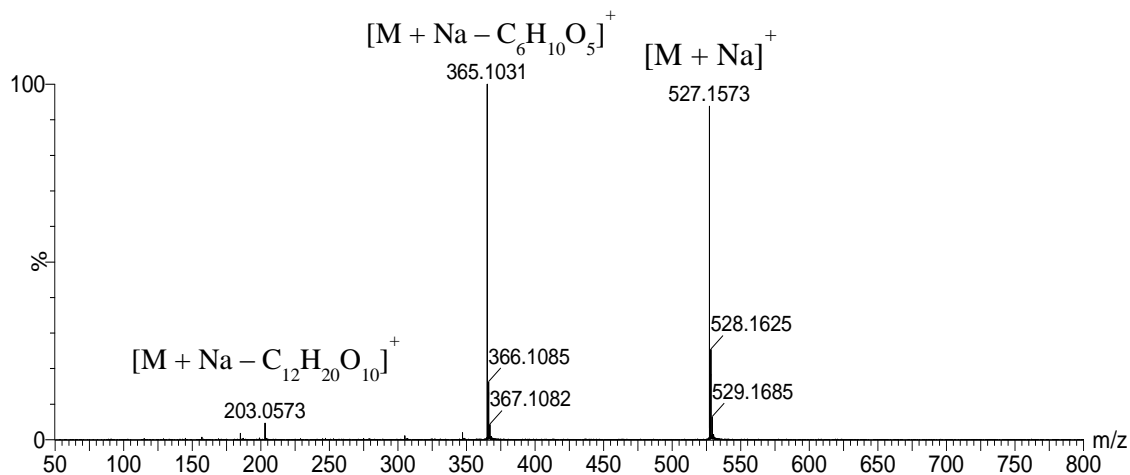


Figura 33. Espectro de massas, por EM-EM, da rafinose, com aplicação de energias de colisão de 20,0 V.

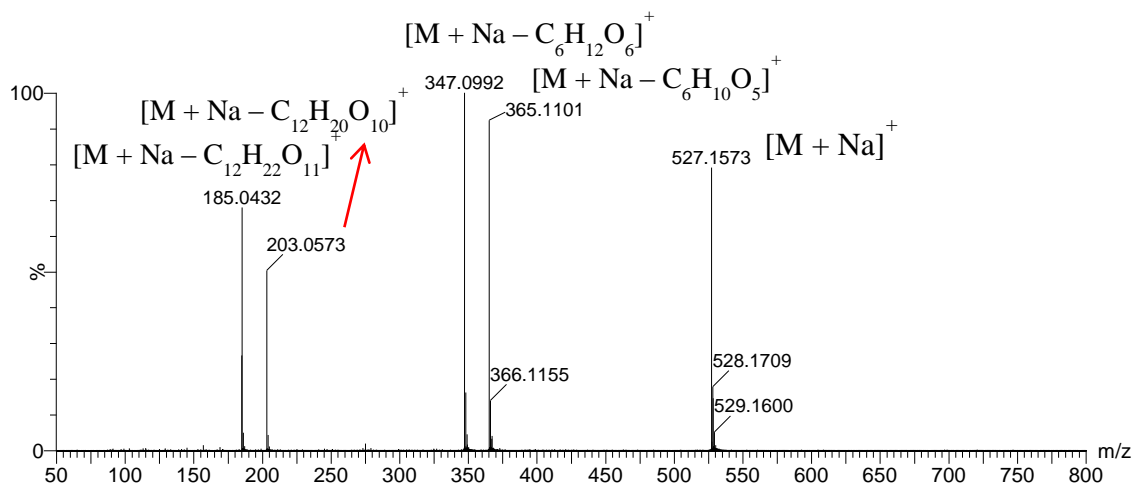


Figura 34. Espectro de massas, por EM-EM, da 1-kestose, com aplicação de energias de colisão de 20,0 V.

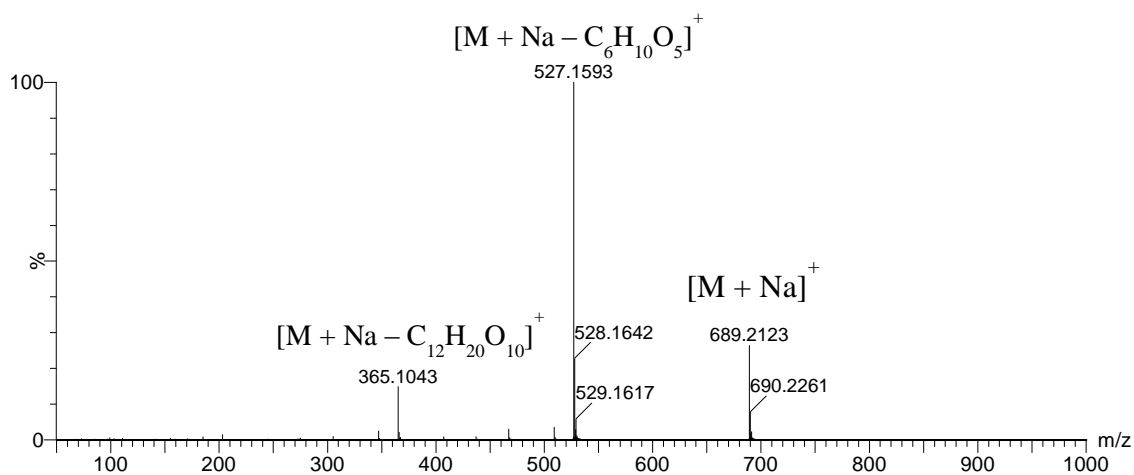


Figura 35. Espectro de massas, por EM-EM, da estaquiose, com aplicação de energias de colisão de 25,0 V.

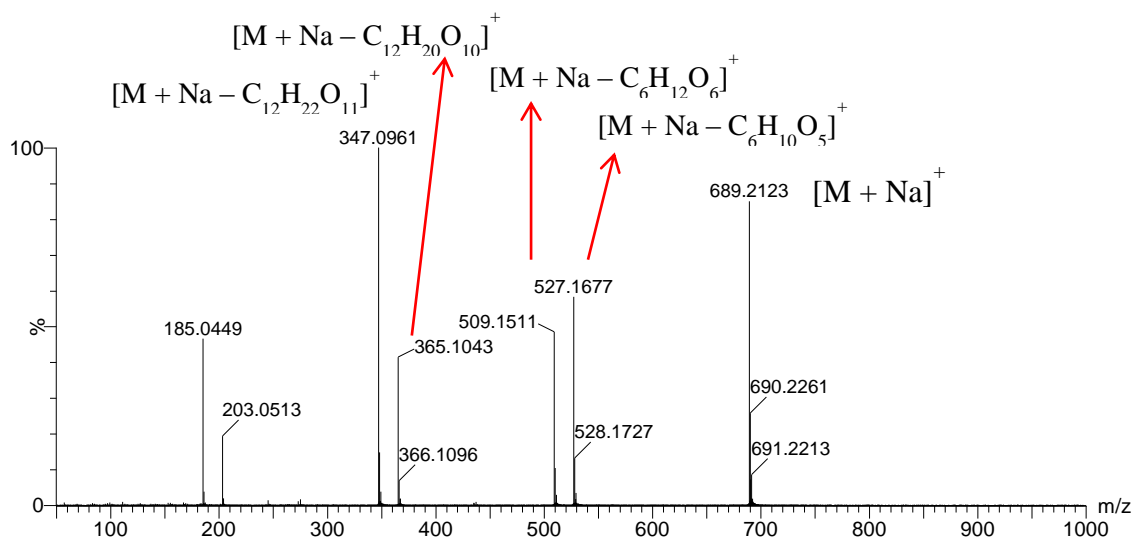


Figura 36. Espectro de massas, por EM-EM, da nistose, com aplicação de energias de colisão de 25,0 V.

Quanto à fragmentação, foram observadas perdas de 162 e 180 unidades de massa atômica unificada (*u*) ou Dalton (Da) e diferenças nas intensidades dos íons sodiados para cada analito, o que permite a diferenciação entre os isômeros. A molécula sodiada de maltose apresentou baixa tendência à fragmentação, mesmo quando submetido à energias de colisão próximas as dos demais oligossacarídeos. Além disso, junto à rafinose (*m/z* 527) e estaquiase (*m/z* 689), foram detectados preferencialmente íons fragmentos a partir da perda de 162 Da enquanto a fragmentação da 1-kestose (*m/z* 527) e nistose (*m/z* 689) originaram também íons fragmentos a partir da perda de 180 Da de intensidade similar.

Esta diferença de perfil de fragmentação entre isômeros também foi observada por Fabrik et al. (2012), em que detectaram-se os íons de *m/z* 347, 365, 509 e 527 para a nistose enquanto apenas os íons 365 e 527 para estaquiase. Estes resultados ainda foram obtidos com fragmentação até a intensidade de sinal de 10% para os íons precursores.

A Tabela 24 relaciona todas as informações obtidas a partir dos fragmentogramas de cada oligossacarídeo obtidos por eletrospray em modo positivo.

Tabela 24. Resumo dos resultados obtidos, em modo positivo, por EM-EM para os diferentes analitos.

Carboidrato	Massa Exata [M + Na]⁺	Massa Acurada [M + Na]⁺	Erro de Identificação (ppm)	Fragmentos por EM-EM
Maltose	365,1053	365,1043	2,74	203
Rafinose	527,1578	527,1573	0,95	365, 203
1-kestose	527,1578	527,1573	0,95	365, 347, 203, 185
Estaquiase	689,2103	689,2123	2,90	527, 365, 203
Nistose	689,2103	689,2123	2,90	527, 509, 365, 347, 203, 185

4.1.3. Detecção de oligossacarídeos por espectrometria de massas em modo negativo

Foram realizadas também infusões diretas em modo negativo, seguindo o mesmo planejamento metodológico: primeiro, apenas as análises por EM das soluções padrão de cada analito em diferentes solventes, observando os tipos de íons preferencialmente formados; e, após, foi realizada a análise por EM-EM para verificação do erro de identificação e dos perfis de fragmentação.

As condições de análise empregadas basearam-se nos parâmetros estabelecidos para infusão direta em modo positivo. Procedeu-se a análise nos solventes solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% e acetonitrila, na proporção 1:1 (A.1 e A.2); água grau Milli-Q (B.1 e B.2); e também em solução aquosa de formiato de amônio a 10 mM (C). Este último solvente foi testado devido a função do formiato de amônio como um tampão volátil para controle de pH e um aditivo que auxilia na separação de cargas na molécula solvatada, facilitando a ionização dos analitos.

Assim como em modo positivo, não foram observadas diferenças qualitativas para ambos os solventes, sendo observados os mesmos tipos de íons e com baixos erros de identificação. Porém, para as infusões em modo negativo, foram detectados íons cuja relação *m/z* indica a formação de moléculas desprotonadas oriundos diretamente dos oligossacarídeos investigados ([M – H]⁻) ou de seus dímeros ([2M – H]⁻) nos espectros de massas de íons totais, ao contrário da presença de adutos, por exemplo, com átomos de cloro ([M + Cl]⁻). Este comportamento quanto à ionização em modo negativo dos carboidratos também coincide com as informações disponíveis na literatura (TINKE et al., 1993; GHFAR et al., 2015). Através

da Figura 37, é possível visualizar a ocorrência dos dois íons mencionados na análise de estaquiiose. A concentração dos analitos nas soluções também deve ter favorecido a formação dos *clusters* na injeção por eletrospray em modo negativo.

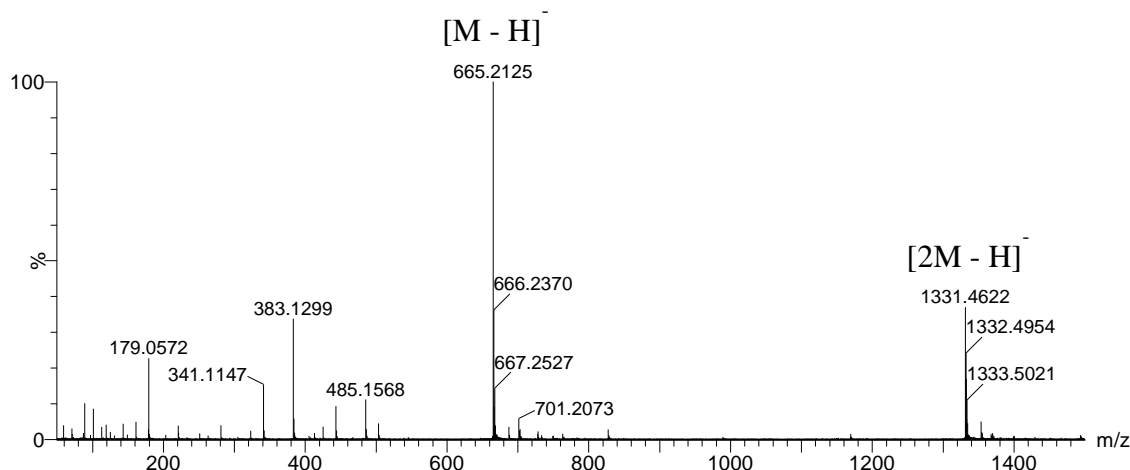


Figura 37. Espectro de massas de íons totais da estaquiiose, com destaque aos íons de m/z 665 e 1331, com aplicação de energias de colisão de 15,0 V.

As infusões, por EM-EM, em modo negativo revelaram alguns resultados diferentes quando comparados com os fragmentogramas em modo positivo. A principal diferença verificada foi a maior tendência à fragmentação dos oligossacarídeos, com alta quantidade de íons produtos formados. Para evitar a degradação total dos íons precursores, sobretudo do íon precursor de maltose, foram empregadas energias de colisão no máximo de 15,0 V, conforme podem ser visualizados nas Figuras 38 a 42.

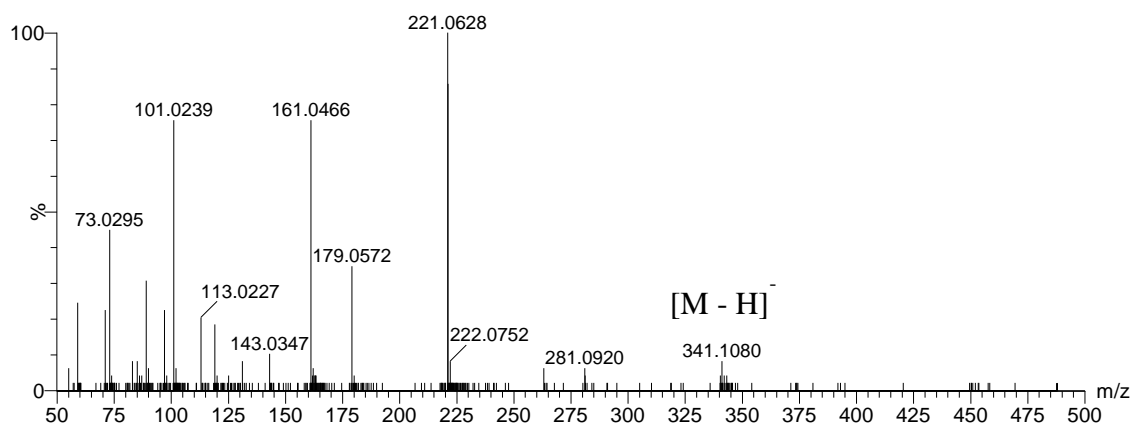


Figura 38. Espectro de massas, por EM-EM em modo negativo, da maltose, com aplicação de energias de colisão de 3,0 V.

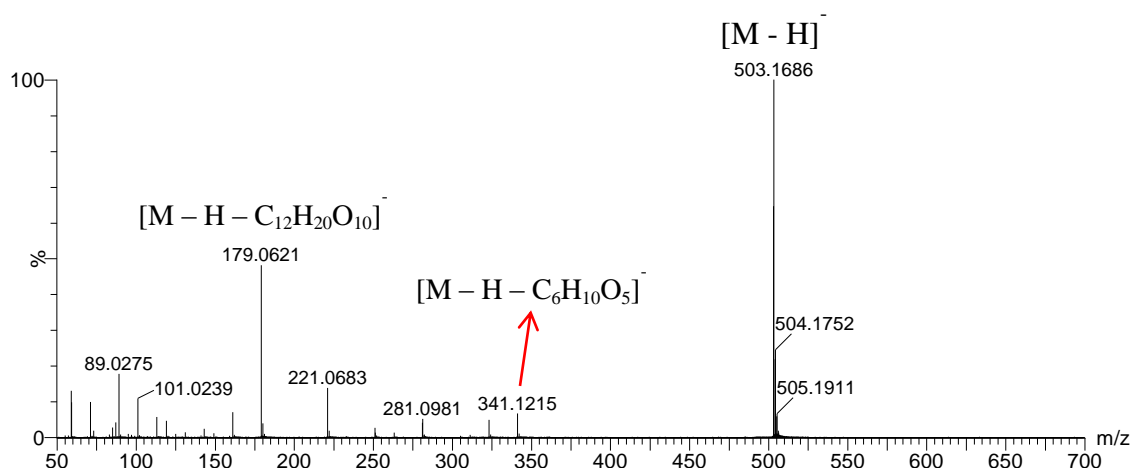


Figura 39. Espectro de massas, por EM-EM em modo negativo, da rafinose, com aplicação de energias de colisão de 10,0 V.

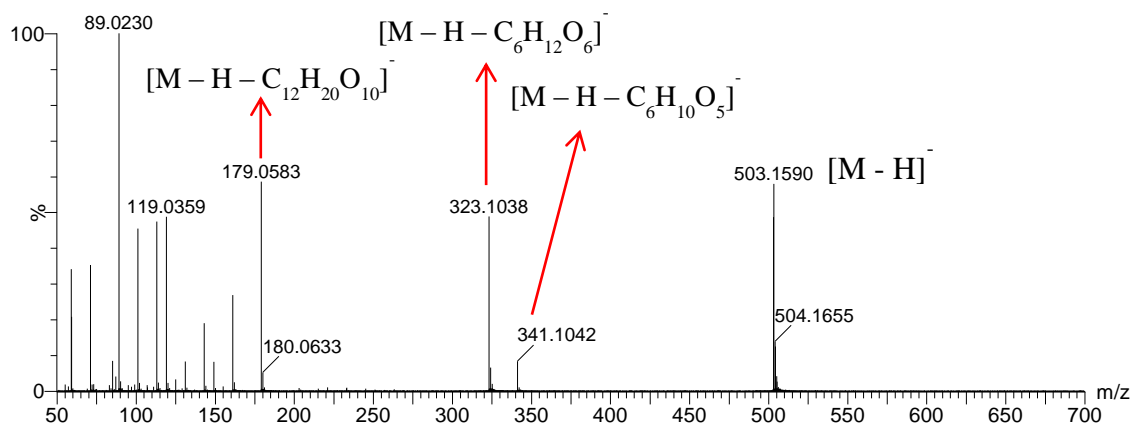


Figura 40. Espectro de massas, por EM-EM em modo negativo, da 1-kestose, com aplicação de energias de colisão de 15,0 V.

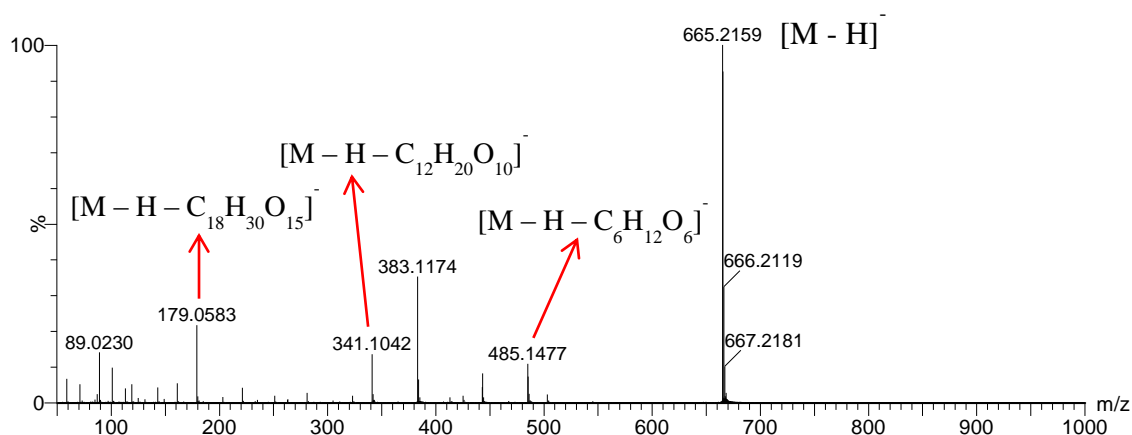


Figura 41. Espectro de massas, por EM-EM em modo negativo, da estaquiose, com aplicação de energias de colisão de 15,0 V.

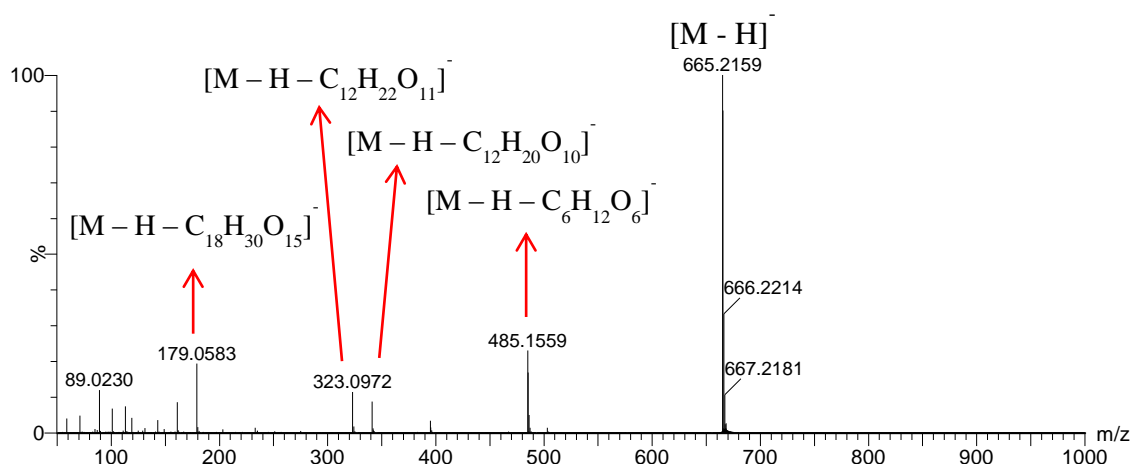


Figura 42. Espectro de massas, por EM-EM em modo negativo, da nistose, com aplicação de energias de colisão de 15,0 V.

Além disso, outra diferença observada entre os modos de infusão foi a fragmentação preferencial pela perda de 180 Da das moléculas desprotonadas dos tetrassacarídeos estaquiose e nistose, gerando íons produtos de m/z 485 e, portanto, diferentes das moléculas desprotonadas dos trissacarídeos rafinose e 1-kestose. Já nos fragmentogramas destes oligossacarídeos, é possível observar a formação dos íons produtos pelas duas rotas características, ou seja, pela perda de 162 Da e 180 Da, resultando, respectivamente, nos íons de m/z 341 e 323. Estes íons podem ser utilizados como parâmetro de distinção entre os isômeros, em que, nas análises dos oligossacarídeos da classe dos frutanos, os íons de m/z 323 apresentaram maior intensidade em energias de colisão iguais ou até com variação de 5,0 V.

Embora estes resultados também permitissem a diferenciação entre os analitos, foi adotada a ionização por eletrospray em modo positivo para o desenvolvimento do método de detecção de fraudes em café comercial. Destaca-se que os pontos positivos foram a maior estabilidade dos íons sodiados e a formação de um menor número de íons fragmentos para cada analito, o que facilita a compreensão e a sugestão de prováveis mecanismos de fragmentação e aumenta a confiabilidade na distinção entre os isômeros marcadores de diferentes adulterantes.

4.1.4. Análise dos solventes utilizados

Todos os resultados obtidos em modo positivo foram confirmados através da injeção do branco da análise, isto é, a análise de cada solvente que poderia ser utilizado no desenvolvimento da metodologia. Esta etapa possibilitou eliminar a suspeita de interferência por outras substâncias presentes nos solventes que pudessem originar íons de m/z igual ao dos analitos.

Para tal finalidade, foram empregados solventes acetonitrila de 4 marcas diferentes (A, B, C e D), metanol de 2 marcas diferentes (A e B) e água de 2 procedências diferentes (A e B), obtida por ultrapurificação grau Milli-Q). É importante ressaltar que os solventes grau HPLC ainda não tinham sido utilizados para preparo de soluções padrão, servindo como um teste para aplicabilidade futura destes solventes. Foram verificados, para cada solvente, os espectros de íons totais obtidos a partir da infusão direta e sob aplicação de energias de colisão no *trap* e no *transfer* de 10,0 V e também de 15,0 V, utilizado na metodologia por EM.

As análises dos solventes orgânicos apresentaram resultados distintos. Todas as acetonitrilas investigadas indicaram ausência de íons de m/z igual aos íons precursores dos

oligossacarídeos (Figura 43). Além disso, foram observados também, no escaneamento a cada segundo, quantidade de íons bases na escala de dezena nos espectros de massas, com exceção da acetonitrila de marca A. Apenas o solvente grau HPLC não foi recomendado para a utilização durante a metodologia, devido ao elevado número de íons formados de alta intensidade na faixa de m/z de 400 a 750, podendo conferir supressão iônica aos isômeros rafinose e 1-kestose (m/z 527) e estaquiose e nistose (m/z 689).

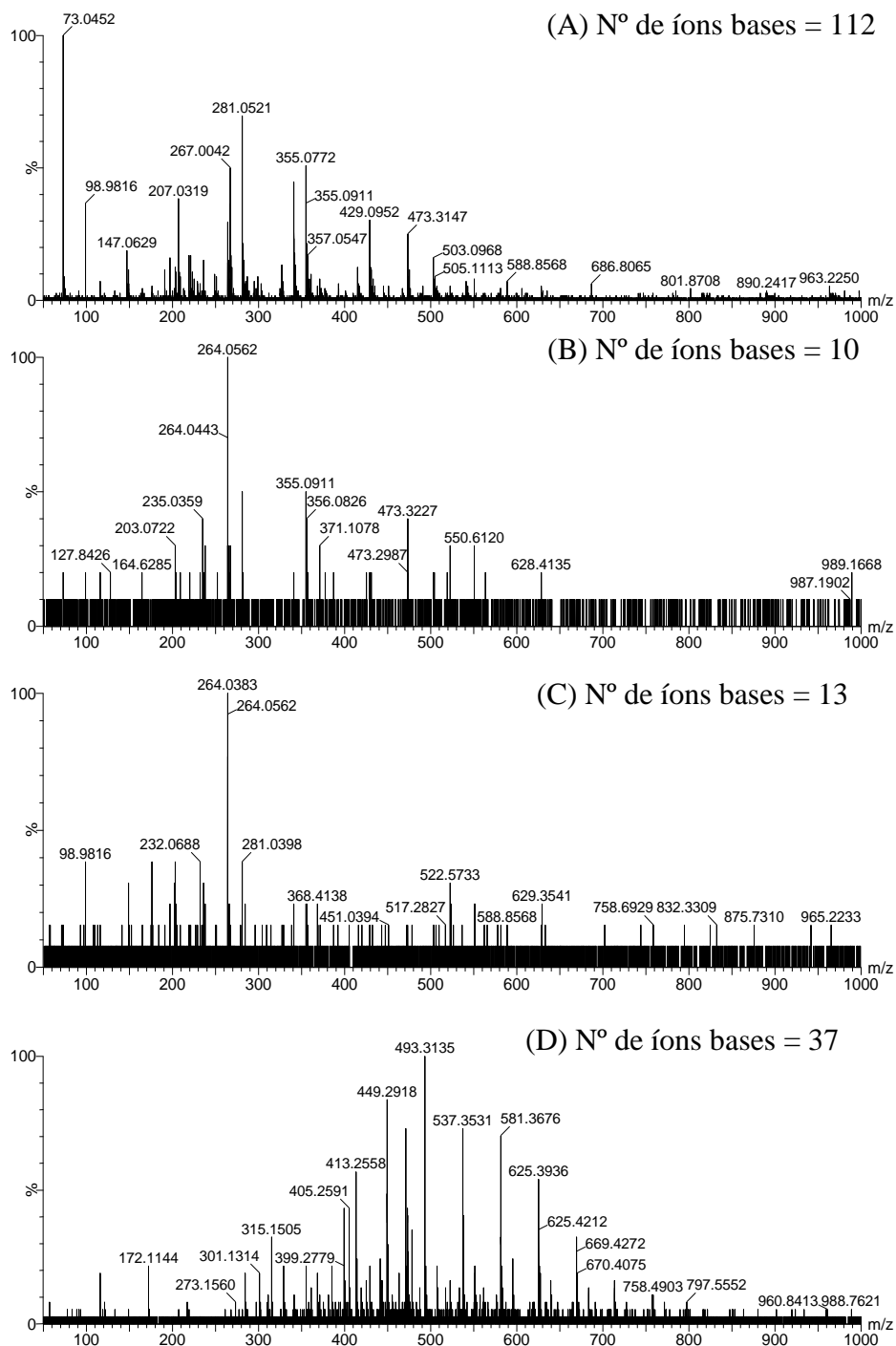


Figura 43. Espectros de massas em tempo real do solvente acetonitrila das marcas A, B, C e D, destacando o número de íons base para cada espectro.

Diferentemente dos resultados para acetonitrila, o espectrômetro de massas detectou íons de m/z 365, 527 e 689 para ambos os solventes metanólicos, em intensidade relativa na

escala de centena para o número de íon base. Através dos resultados ilustrados na Figura 44, é possível concluir que a utilização de metanol de ambas as marcas A e B como solvente pode conferir falsos positivos nas análises com amostras comerciais e, por tal razão, não foram empregados no preparo de soluções e de fase móveis.

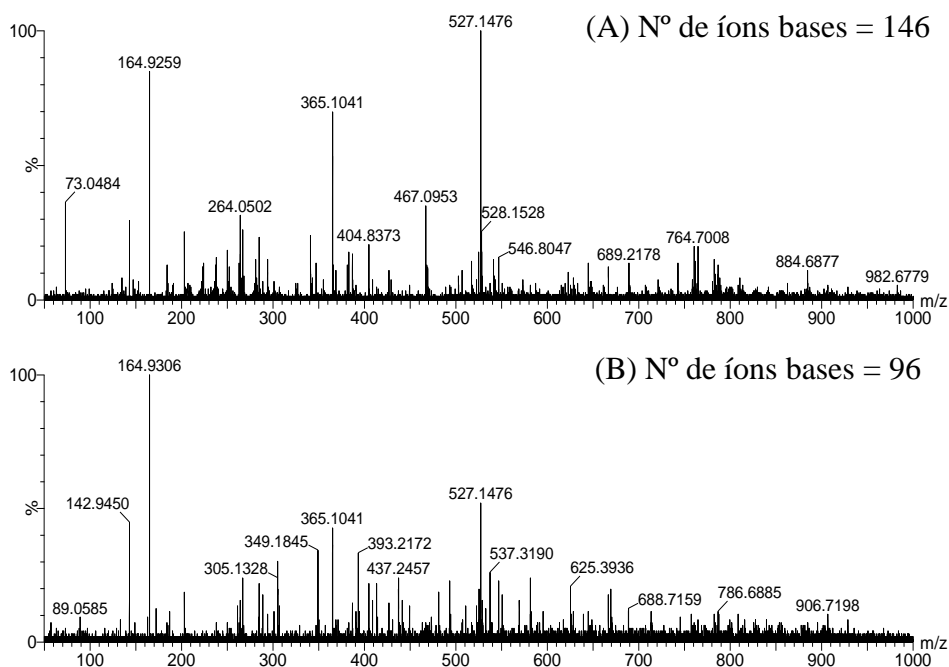


Figura 44. Espectros de massas em tempo real do solvente metanol das marcas A e B, destacando o número de íons base para cada espectro.

Entre os resultados para água, é importante mencionar que foi detectado com maior intensidade, para a água ultrapurificada grau Milli-Q, um íon de m/z 195, correspondente provavelmente aos ftalatos, resíduos dos plastificantes utilizados nas membranas do purificador. Todavia, também não foram encontrados íons de m/z iguais aos íons precursores dos oligossacarídeos para ambos os solventes e os testes ainda demonstraram números de íons base na escala da dezena, o que confere baixa intensidade para os íons formados a partir do solvente e conseqüente baixa interferência nos espectros de massa analisados em tempo real (Figura 45).

Logo, procedeu-se, para o preparo de soluções e fases móveis, a utilização dos solventes água obtida através do sistema de ultrapurificação do próprio laboratório e acetonitrila grau LC-MS.

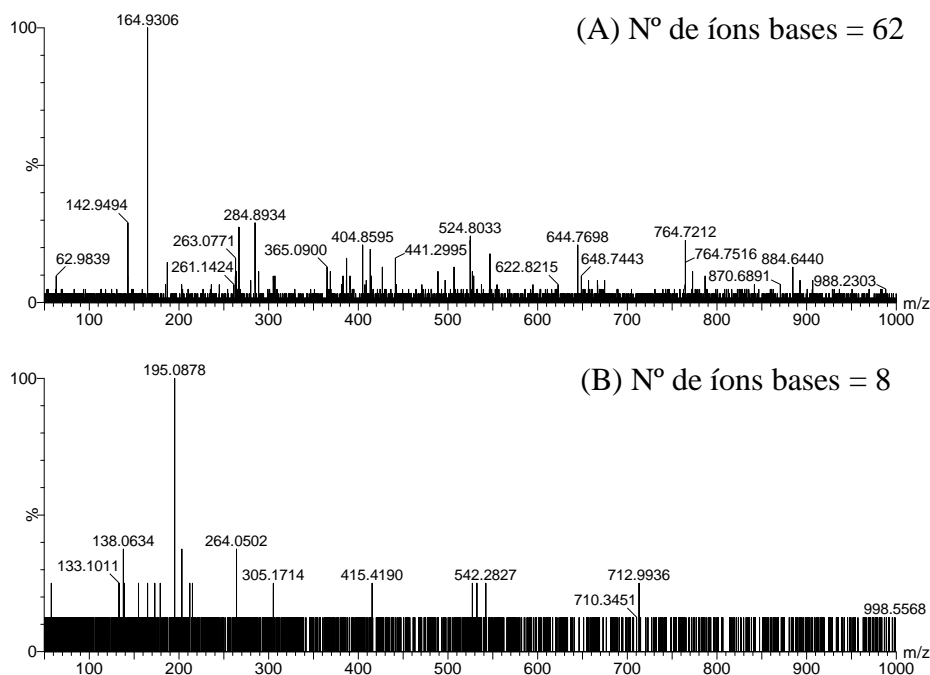


Figura 45. Espectros de massas em tempo real da água da marca A e B, obtida por ultrapurificação, destacando o número de íons base para cada espectro.

4.1.5. Otimização do método espectrométrico

Visando a eficiência do método espectrométrico, foram otimizados os parâmetros que apresentam maior influência na detecção dos íons a partir dos analitos. Dois testes foram realizados através da infusão direta contínua das cinco soluções padrão de cada carboidrato a 500 µg/mL (A.4) em modo positivo.

O primeiro teste consistiu na variação dos parâmetros do gás de dessolvatação, cuja função está relacionada à evaporação do solvente e ao favorecimento à formação dos íons na câmara de ionização. Inicialmente, foram realizados dez ensaios com a solução padrão de maltose, combinando diferentes valores de temperatura e fluxo do gás de dessolvatação, segundo a faixa de trabalho indicada pelo fabricante (WATERS, 2008). Os fatores de resposta (f_R) foram as razões entre o número de íons base nos cromatogramas de íons específicos para as moléculas sodiadas (n_e) e de íons totais (n_t), após 2 minutos de aquisição de dados. Para os demais analitos, empregaram-se as condições que tiveram maiores fatores de resposta com menores fluxos de gás, evitando desgaste da câmara de ionização. A Tabela 25 resume os ensaios realizados no primeiro teste de otimização, enfatizando as condições do ensaio 7 que apresenta maior f_R entre todos os demais (com exceção para a análise de rafinose).

O segundo teste baseou-se no estudo da diferença de potencial entre os cones de amostragem e de extração, que tende a favorecer a dissociação induzida na fonte de ionização (*in-source dissociation*) e, segundo Crotti et al. (2006), alterar a relação entre as moléculas protonadas $[M + H]^+$ e as cationizadas, por exemplo, por coordenação com átomos de sódio $[M + Na]^+$. Procedeu-se este teste como tentativa de evitar o uso das moléculas sodiadas, visto que a formação destas espécies dependerá da composição de sódio das amostras e da contaminação ao contato com as vidrarias utilizadas. Outro fator limitante consiste na baixa sensibilidade obtida para estes adutos quando analisadas matrizes que apresentam baixas concentrações de carboidratos (ROGATSKY et al., 2005).

Para os nove ensaios realizados com as soluções padrão de todos os analitos, foram verificados as razões entre n_e e n_t , após 2 minutos de aquisição de dados, para ambas as moléculas protonadas e sodiadas. Entretanto, os resultados indicaram que as variações da

diferença de potencial entre os cones não alteraram a formação preferencial das moléculas sodiadas. A razão das moléculas sodiadas em relação aos íons totais foi, em média, superior 79 vezes que a razão de moléculas protonadas em relação aos íons totais. Os resultados do segundo teste para as moléculas sodiadas estão dispostos na Tabela 26.

Tabela 25. Teste de otimização dos parâmetros do gás de dessolvatação, com destaque em negrito para as melhores condições.

Ensaio	Temperatura (°C)	Fluxo (L/h)	f _R Maltose (%)	f _R Rafinose (%)	f _R 1-kestose (%)	f _R Estaquiiose (%)	f _R Nistose (%)
1		300	6,33	-	-	-	-
2		500	7,90	-	-	-	-
3	150	750	8,95	4,67	11,09	4,16	5,61
4		900	8,61	6,10	10,52	4,02	5,93
5		1000	8,52	-	-	-	-
6		300	9,69	7,81	12,16	4,59	6,39
7		500	10,20	7,65	13,58	5,53	7,58
8	300	750	9,78	7,52	11,74	4,96	6,70
9		900	9,68	-	-	-	-
10		1000	9,09	-	-	-	-

f_R = fator de resposta.

Tabela 26. Teste de otimização das voltagens aplicadas na fonte de ionização, com f_R para as moléculas sodiadas e destaque em negrito para condição adotada.

Ensaio	Cone de Amostragem (V)	Cone de Extração (V)	f _R Maltose (%)	f _R Rafinose (%)	f _R 1-kestose (%)	f _R Estaquiiose (%)	f _R Nistose (%)
1		2	7,26	7,90	3,73	9,94	5,28
2	25	3	7,86	8,42	4,02	9,68	5,44
3		4	7,61	8,57	3,91	10,46	5,42
4		2	9,84	10,27	5,42	12,35	7,12
5	40	3	10,09	10,08	5,57	12,50	7,07
6		4	9,02	9,95	5,95	12,10	6,75
7		2	10,31	11,67	6,92	14,20	8,35
8	50	3	10,16	10,82	6,80	14,43	8,35
9		4	9,79	11,53	6,89	14,67	8,79

f_R = fator de resposta.

O método espectrométrico foi otimizado, portanto, com as seguintes condições: temperatura e do fluxo do gás de dessolvatação de 300°C e 500 L/h; e voltagens nos cones de amostragem e de extração igual a 50,0 V e 2,0 V, condições ótimas para as moléculas sodiadas.

4.2. Desenvolvimento dos Métodos Cromatográficos

Durante o planejamento do projeto, três tipos de fases estacionárias foram propostos para o método cromatográfico: a fase estacionária C₁₈, de elevado emprego para moléculas orgânicas, embora não seja recomendada para a separação de carboidratos devido à baixa retenção de moléculas polares e oligossacarídeos de baixa massa molecular (HICKS & HOTCHKISS JR, 2002); a fase de sílica pura, ideal para sistemas CL-EM por não possibilitar a eliminação de grupos ligados à coluna e que podem ocasionar interferências nos espectros

de massas (LANÇAS, 2010); e a fase de sílica contendo grupamento amida, que apresenta boa separação de moléculas polares e foi empregado com sucesso por Ghfar et al. (2015) para análise por CLUE-EM de monossacarídeos e oligossacarídeos. Devido à problemas na aquisição das colunas, somente foram possíveis experimentos com as fases C₁₈ e sílica pura.

Para a obtenção de cromatogramas com maior resolução cromatográfica, extraíram-se os cromatogramas do pico base, ou seja, em que a intensidade de todos os picos é relativo ao pico mais intenso. A função *smooth* (suavização) também foi empregada para a mesma finalidade, sendo utilizada o número de 1 suavização a cada scan pelo método das médias. Foram estimadas as resoluções cromatográficas entre os picos em porcentagem, à largura da base e à largura em meia altura da base (50%), conforme as Equações 3, 4 e 5.

$$R_s \text{ entre os picos 1 e 2 (\%)} = \frac{(H_2 - H_{v1})}{H_2} * 100$$

em que: H_{v1} = altura da base do pico 1; H_2 = altura do pico 2.

Equação 3. Cálculo de resolução em porcentagem.

$$R_s \text{ entre os picos 1 e 2} = 2 * \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{(w_{b1} + w_{b2})}$$

em que: t_{r1} = tempo de retenção do pico 1; t_{r2} = tempo de retenção do pico 2;
 w_{b1} = largura da base do pico 1; w_{b2} = largura da base do pico 2.

Equação 4. Cálculo de resolução à largura da base.

$$R_s \text{ entre os picos 1 e 2} = 1,18 * \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{(w_{h1} + w_{h2})}$$

em que: t_{r1} = tempo de retenção do pico 1; t_{r2} = tempo de retenção do pico 2;
 w_{h1} = largura da base do pico 1 à meia altura;
 w_{h2} = largura da base do pico 2 à meia altura.

Equação 5. Cálculo de resolução à largura em meia altura da base.

4.2.1. Cromatografia com fase reversa

Para o método com fase reversa (coluna com fase C₁₈), foram avaliados modos de eluição isocrático e em gradiente, com solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (v/v) e acetonitrila em composição máxima de 25%. Foi observado que teores acima de 5% de acetonitrila não promoviam a separação cromatográfica. Como mencionado anteriormente, esta dificuldade de separação já era prevista para colunas com fase estacionária apolar como a C₁₈ e ainda com pressões de trabalho acima de 5000 psi.

A partir das observações, foi desenvolvido um método com gradiente de eluição com máximo de 4% de acetonitrila, que inicialmente apresentou êxito na separação dos carboidratos em uma corrida cromatográfica de apenas 6,0 min. A Figura 46 consiste no cromatograma da solução padrão contendo os cinco oligossacarídeos estudados, em que os picos cromatográficos referentes aos íons de m/z 365 (tempo de retenção – t_R de 1,94 min), 527 (t_R de 2,33 min e 2,50 min) e 689 (t_R de 2,18 min e 3,60 min) foram detectados. A visualização dos espectros de massa por EM-EM indicou a ordem de eluição como maltose, estaquiose, rafinose, 1-kestose e nistose.

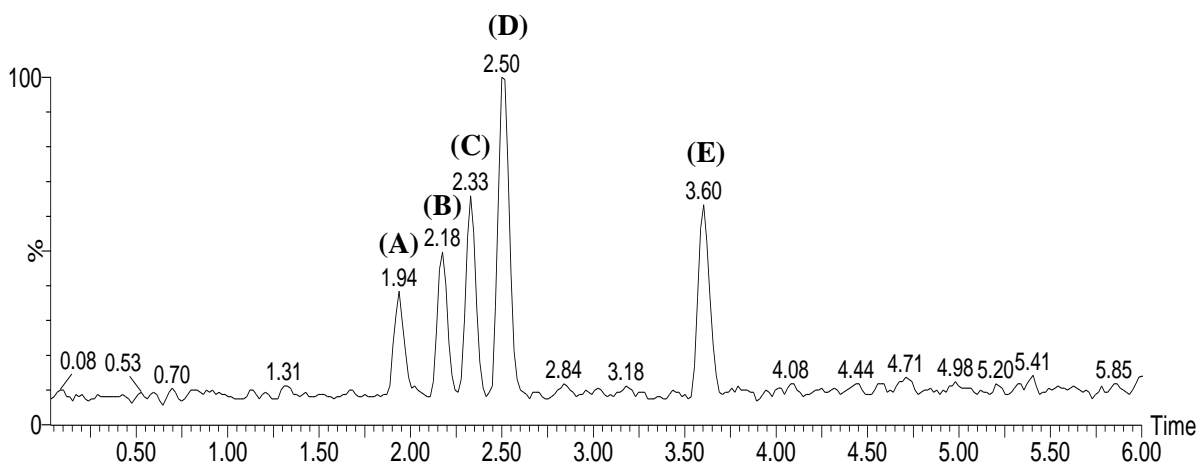


Figura 46. Cromatograma do pico base, por CLUE-EM, da solução padrão a 400 µg/mL de cada oligossacarídeo (solução D), com detecção da (A) maltose, (B) estaquiose, (C) rafinose, (D) 1-kestose e (E) nistose.

A aplicação do método desenvolvido em novas corridas com solução padrão demonstrou alteração no perfil cromatográfico, tanto em relação aos tempos de retenção quanto à resolução cromatográfica principalmente para a separação entre a estaquiose, rafinose e 1-kestose, como pode ser observado na Figura 47 e na Tabela 27.

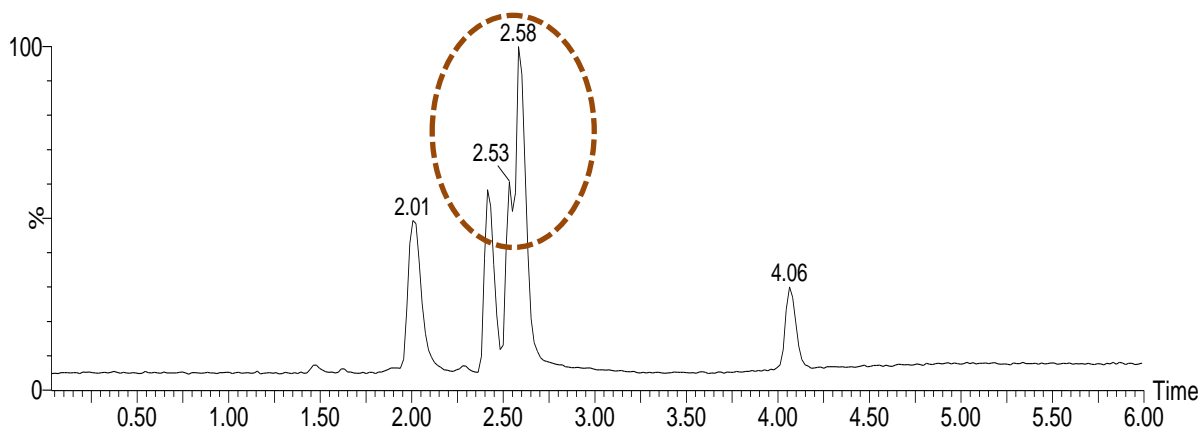


Figura 47. Cromatograma do pico base, por CLUE-EM, da solução padrão E, com a perda de resolução cromatográfica e possível co-eluição de 1-kestose e nistose, em 2,58 min.

Tabela 27. Comparação entre as resoluções calculadas para os diferentes perfis cromatográficos.

Picos	Figura 46			Figura 47		
	%	Largura da Base	À Meia Altura	%	Largura da Base	À Meia Altura
A-B	100	0,60	0,71	100	1,26	1,73
B-C	98	0,50	0,44	88	0,23	0,31
C-D	100	0,43	0,50	51	0,11	0,17
D-E	100	2,44	3,25	91	3,70	4,99

Como tentativa de minimizar estas diferenças obtidas no perfil cromatográfico das análises da solução padrão, foi realizada ainda a limpeza da coluna com um gradiente com até 60% de acetonitrila, favorecendo a eluição de substâncias que pudessem ainda estar retidas na coluna. A obtenção de um perfil com boa separação cromatográfica e repetitividade não foi alcançada, mesmo após a limpeza da coluna. Alternativas como a alteração da composição da

fase móvel e até a troca da coluna cromatográfica por outra de mesma fase estacionária também não surtiram o efeito desejado.

Esta perda de resolução observada pode estar relacionada à interrupção e ao reinício do fluxo de fase móvel altamente aquosa (acima de 90% v/v) em colunas de fase reversa, sobretudo aquelas que possuem poros de diâmetros médios menores que 12 nm (120 Å). Segundo Walter et al. (2005), quando o fluxo é interrompido, a pressão liberada favorece a saída da fase móvel dos poros da fase estacionária apolar, principalmente na saída da coluna, região mais próxima à pressão atmosférica, o que diminui a interação entre fase estacionária e fase móvel. O mesmo artigo realizou um estudo em que a restauração da resolução para colunas C₁₈ com poros de diâmetro médio menor que 10 nm foi alcançada quando ocorreu a prévia estabilização das condições cromatográficas com fase móvel contendo mínimo de 40% de metanol com fluxos de 1 mL/min por 30 min.

Portanto, ainda que inicialmente tenha sido alcançado um método por fase reversa com boa resolução cromatográfica, a necessidade de um maior estudo sobre a estabilidade do sistema cromatográfico nas condições definidas e os possíveis efeitos já esperados da matriz do café resultou no desenvolvimento de um segundo método através do emprego de uma coluna do tipo CIH, recomendada para separação de substâncias de maior polaridade, como os carboidratos.

4.2.2. Cromatografia por interação hidrofílica - CIH

O método cromatográfico por CIH foi estabelecido através do emprego de uma coluna preenchida com sílica e de fases móveis solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (v/v) e acetonitrila. Estas fases móveis também foram utilizadas no método por fase reversa, porém, para CIH, a proporção de acetonitrila deve ser majoritária. Logo, foram avaliados modos de eluição isocráticos e gradientes compostos de 60% até 98%, assim como os parâmetros volume de vazão, em mL/min, e a temperatura da coluna, em °C. Foi testado também o uso da fase móvel acetonitrila com ácido fórmico, porém não foi observada diferença significativa entre os cromatogramas e os espectros de massas obtidos com a fase móvel acetonitrila não acidificada.

Os melhores resultados durante o desenvolvimento do método foram obtidos com eluições isocráticas com 92% e 90% de acetonitrila. A partir destes resultados, foi planejado um gradiente inicial com 92% de acetonitrila, favorecendo a eluição dos analitos maltose, 1-kestose e rafinose; após, a proporção de solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% foi elevada para 10%, o que resulta em menores t_R para nistose e estaquiose; e, por último, a fase aquosa alcança 40% para completa eluição das demais substâncias polares retidas e retorna a condição inicial de análise. A Figura 48 refere-se ao cromatograma obtido da solução padrão a 5,0 µg/mL em água (solução E.2), a partir de um método com fluxo ótimo de 0,5 mL/min, temperatura da coluna de 35°C e tempo de corrida de 10 min.

Comparando ao método anterior, foi observada uma mudança na ordem de eluição, sendo o fenômeno de retenção proporcional ao aumento da massa molecular dos oligossacarídeos. Quanto à resolução cromatográfica, é possível indicar uma melhora satisfatória na separação entre os picos A e B e C e D em relação ao método por fase reversa (Tabela 28), porém todos os analitos apresentaram alargamentos em seus picos cromatográficos.

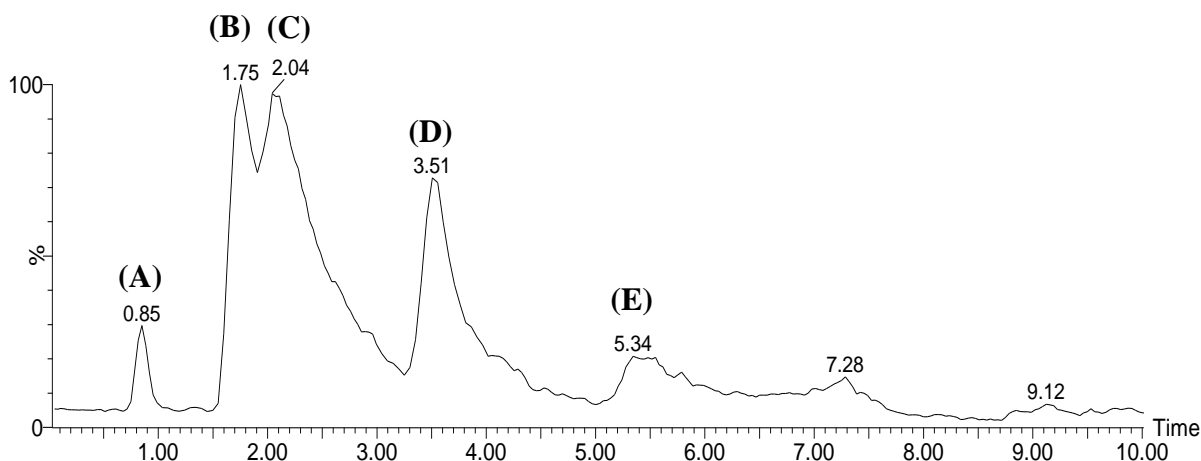


Figura 48. Cromatograma do pico base, por CLUE-EM, da solução padrão a 5,0 µg/mL, com detecção da (A) maltose, (B) 1-kestose, (C) rafinose, (D) nistose e (E) estaquiose.

Tabela 28. Comparação entre as resoluções calculadas para os diferentes tipos de cromatografia empregados.

Picos	Fase Reversa			HILIC		
	%	Largura da Base	À Meia Altura	%	Largura da Base	À Meia Altura
A-B	100	0,60	0,71	100	1,20	1,33
B-C	98	0,50	0,44	26	0,16	0,20
C-D	100	0,43	0,50	89	0,72	1,02
D-E	100	2,44	3,25	63	1,26	1,66

Como principal resultado, destaca-se que a repetição da injeção das soluções padrão entre as corridas cromatográficas e em diferentes dias de análise demonstrou uma maior estabilidade, sugerindo maior repetibilidade e excluindo a necessidade de um amplo estudo sobre as condições cromatográficas ideais de trabalho, como no método por fase reversa. Além disso, a seletividade do método ainda pode ser garantida através do monitoramento em tempo real dos espectros por EM-EM obtidos durante a análise cromatográfica e a comparação com os perfis de fragmentação dos padrões de cada oligossacarídeo.

Por tais razões, foi injetado o extrato, obtido pelo método de Macrae (1998), dos grãos de café torrado adquiridos no comércio e moídos no laboratório de pesquisa. O resultado desta análise mostrou a ausência dos analitos investigados, o que indica a viabilidade do método para detecção dos analitos estudados.

Foi verificado também o possível efeito da matriz do café na detecção dos íons referentes aos oligossacarídeos. Foi diluída uma solução padrão em água com o extrato de café preparado acima, resultando em uma solução padrão contendo 10% (v/v) do extrato do café e concentração de 10,0 µg/mL de cada analito. A análise desta solução por CLUE-EM (Figura 49) demonstrou perfil cromatográfico similar ao obtido para a solução padrão em água.

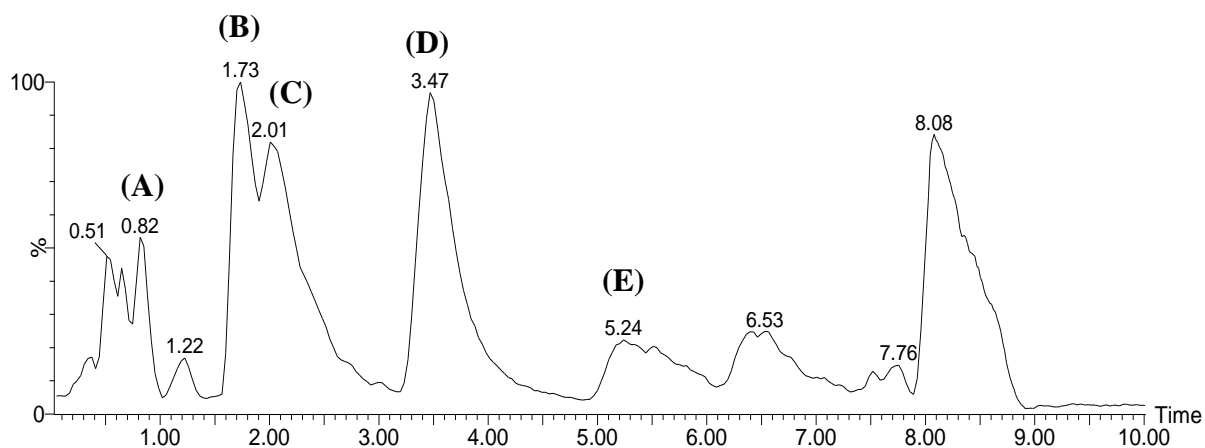


Figura 49. Cromatograma do pico base, por CLUE-EM, da solução padrão a 10,0 µg/mL contendo 10% (v/v) do extrato de café, com detecção da (A) maltose, (B) 1-kestose, (C) rafinose, (D) nistose e (E) estaquiose.

É importante destacar que a interferência da matriz do café pode ser observada, sobretudo no primeiro minuto de corrida cromatográfica. A detecção da maltose pode ser dificultada pelo efeito da supressão iônica por outras substâncias, o que indica a necessidade de um estudo para a metodologia ideal de extração e purificação dos extratos.

As próximas etapas do projeto incluíram a aplicação da metodologia investigada em relação aos adulterantes estudados e também em amostras comerciais de café.

4.3. Confirmação dos Marcadores Químicos para Cada Adulterante

4.3.1. Análise de diferentes grãos por CLUE-EM-EM

Após a investigação de uma metodologia analítica, foi verificada a possibilidade de detecção de cada adulterante por CLUE-EM-EM, através dos oligossacarídeos previamente estabelecidos. Destaca-se que, como a adulteração pode ser caracterizada como um crime contra o consumidor, informações sobre estes procedimentos não são oficialmente disponibilizadas. Portanto, diferentes questões se encontram em aberto como o modo em que são misturados os adulterantes ao café, a quantidade adicionada, a possível torrefação separada dos adulterantes, entre outros.

Para o estudo de confirmação dos marcadores químicos, foram empregadas amostras *in natura* e torrados de grãos de milho, soja e cevada, além do arroz integral, outro grão muito empregado para a adulteração de café e investigado por diferentes metodologias analíticas. Estas amostras foram preparadas previamente em outro plano de ação do projeto do Consórcio Pesquisa Café, conforme ANEXO A. A Figura 50 apresenta os adulterantes antes e após a torrefação e as informações das condições empregadas.

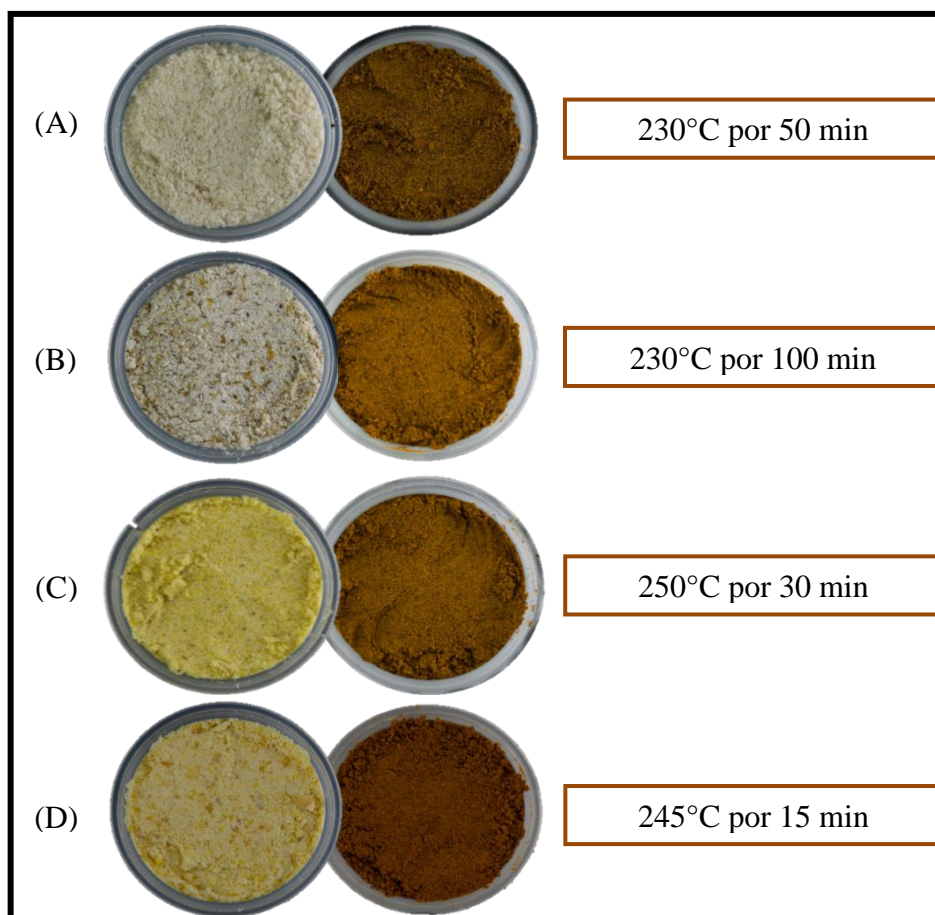


Figura 50. Comparação entre os adulterantes *in natura* e torrado, com destaque as condições de processamento (temperatura e tempo) empregada para (A) arroz, (B) cevada, (C) milho e (D) soja.

A partir dos extratos de cada adulterante, verificou-se a detecção dos oligossacarídeos estudados. A Tabela 29 relaciona todos os resultados obtidos durante as análises por CLUE-EM-EM.

Tabela 29. Detecção dos analitos, por CLUE-EM-EM, nas matrizes *in natura* e torrada.

Matriz	Condições	Íons observados
Arroz	<i>In natura</i>	Presença de rafinose
	Torrado	Ausência de rafinose
Cevada	<i>In natura</i>	Presença de maltose, kestose, rafinose e nistose
	Torrado	Ausência de maltose, kestose, rafinose e nistose
Milho	<i>In natura</i>	Presença de maltose e rafinose
	Torrado	Ausência de maltose e rafinose
Soja	<i>In natura</i>	Presença de rafinose e estaquiose
	Torrado	Presença de rafinose e estaquiose

Entre os adulterantes, a soja apresentou maior facilidade de diferenciação, sendo confirmada a possibilidade de detecção por rafinose e estaquiose (Figura 51). Este resultado foi possível devido à utilização de um método alternativo ao de Macrae (1998) para extração dos carboidratos da soja. O método de Oliveira et al. (2010) emprega como solvente de extração uma solução aquosa a 80% (v/v) de etanol, o que, aliado a centrifugação, favorece a precipitação das proteínas da soja.

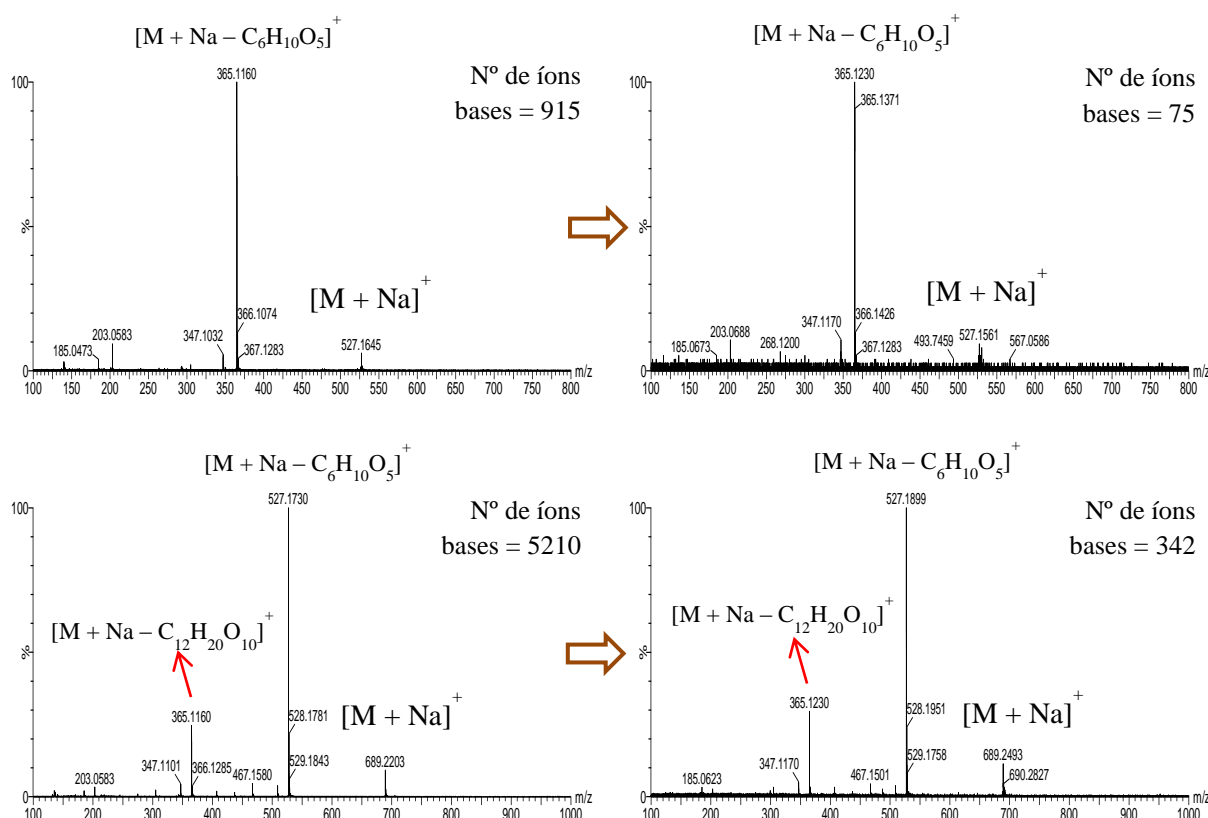


Figura 51. Espectros de massas, por EM-EM, da rafinose (m/z 527) e estaquiose (m/z 689), obtidos nas amostras de soja *in natura* e torrada.

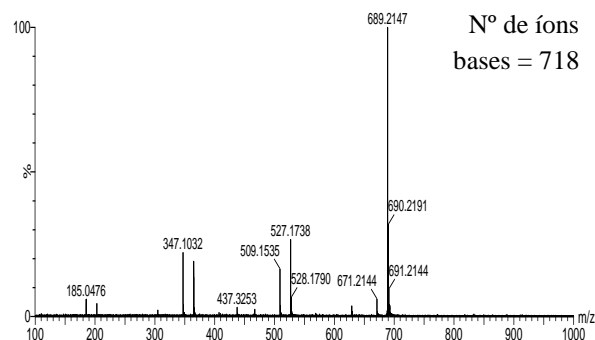
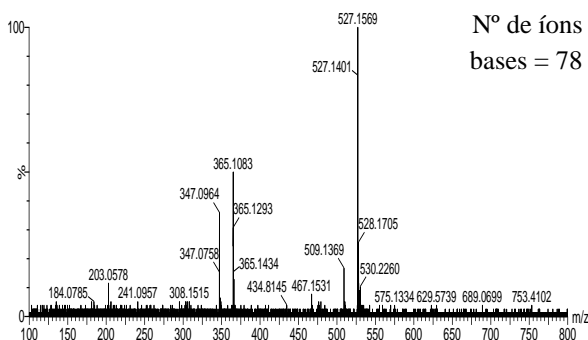
Além disso, o menor tempo de exposição da soja ao processo térmico também pode ter influenciado a obtenção destes resultados. Verifica-se que, para os demais adulterantes, diferentes perfis de oligossacarídeos foram obtidos para as amostras *in natura*. Porém o processamento térmico contribuiu significativamente para a ausência dos oligossacarídeos, dificultando a confirmação dos marcadores químicos para arroz, cevada e milho.

4.3.2. Pesquisa de novos potenciais marcadores químicos

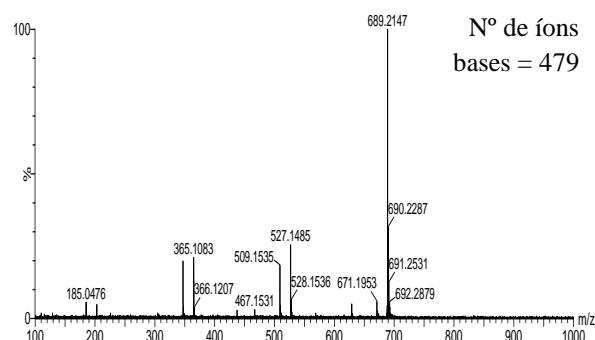
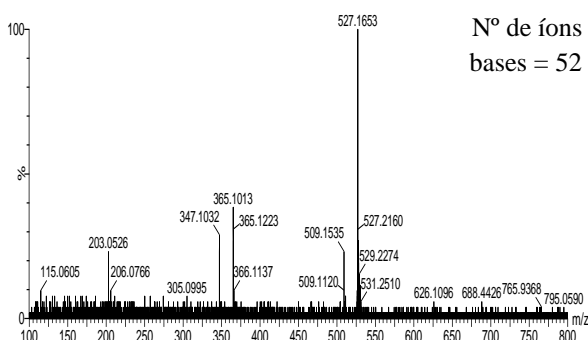
Alguns oligossacarídeos estudados não apresentaram inicialmente potencial para detecção de adulteração após o processamento de torrefação. Como já mencionado anteriormente, esta etapa imprescindível da tecnologia cafeeira favorece a adição de outros materiais pelo mascaramento através da coloração escura. Logo, analitos que apresentem maior estabilidade térmica, como oligossacarídeos de maior massa molecular, são ideais para investigação da ocorrência de fraudes em café.

Para amostras de arroz, milho e cevada tanto na forma *in natura* quanto torrada, foram observados na análise por CLUE-EM-EM dois íons precursores de relação m/z 527 e 689 com perfis de fragmentação diferentes dos apresentados, respectivamente, por rafinose e 1-kestose e por estaquiose e nistose (Figura 52). Estes íons também não foram detectados nas análises dos extratos grãos de café torrado adquiridos no comércio.

ARROZ



CEVADA



MILHO

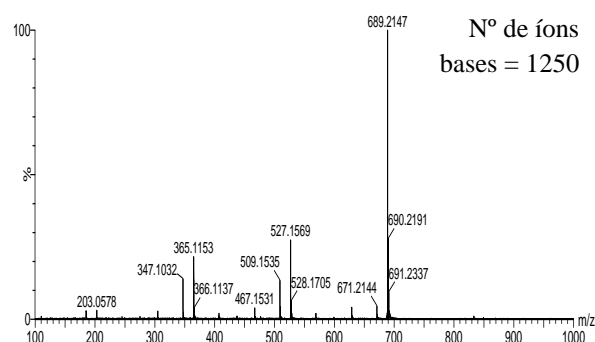
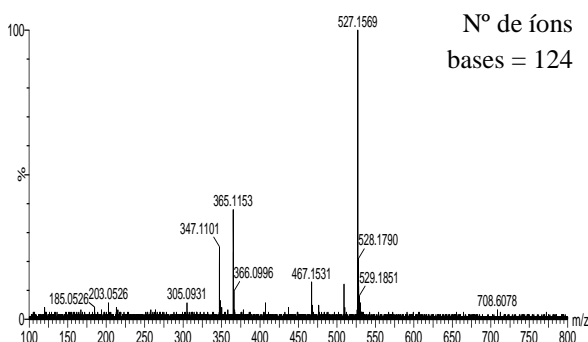


Figura 52. Espectros de massas, por EM-EM, dos íons precursores desconhecidos de m/z 527 e 689, obtidos nas amostras torradas de arroz, cevada e milho.

O perfil de fragmentação destes íons apresenta como íon base (de maior intensidade) os próprios íons precursores, mesmo quando submetidos às voltagens de energia de colisão de 25,0 V e 30,0 V, respectivamente, para os íons de m/z 527 e 689. Isto demonstra uma baixa tendência à fragmentação, comportamento similar ao observado para a molécula sodiada de maltose por IES em modo positivo. Foi sugerido que estes íons sejam correspondentes à maltotriose e a maltotetraose (Figura 53), oligossacarídeos oriundos da ligação α (1 \rightarrow 4) entre moléculas de α -glicose.

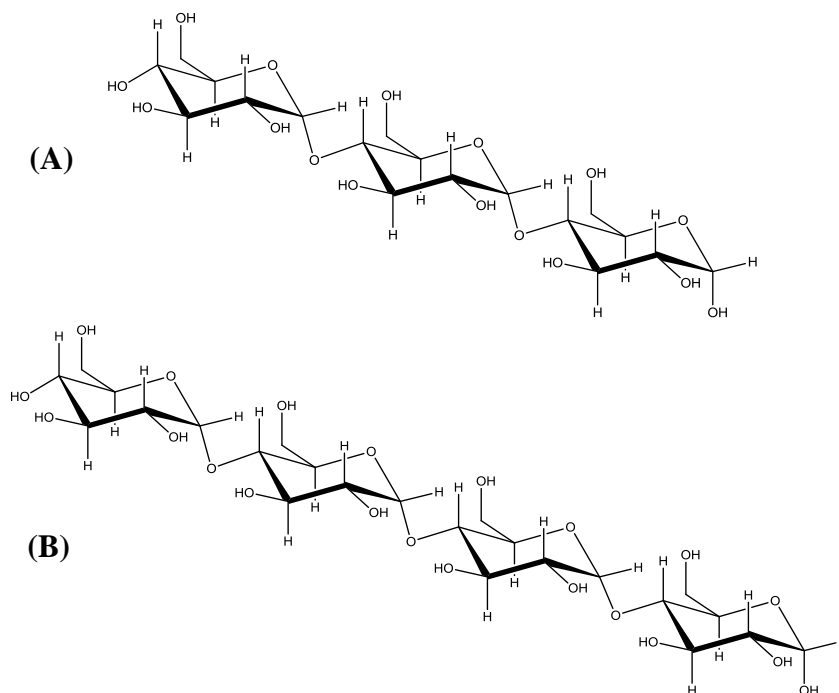


Figura 53. Fórmula estrutural da (A) maltotriose e (B) maltotetraose.

Com a disponibilidade do padrão no laboratório de pesquisa, foi possível realizar a infusão direta no espectrômetro de massas sob as mesmas condições de análise de uma solução aquosa a 5,0 µg/mL de maltotriose. A Figura 54 indica o perfil de fragmentação da maltotriose, o que confirma a identidade do íon de m/z 527.

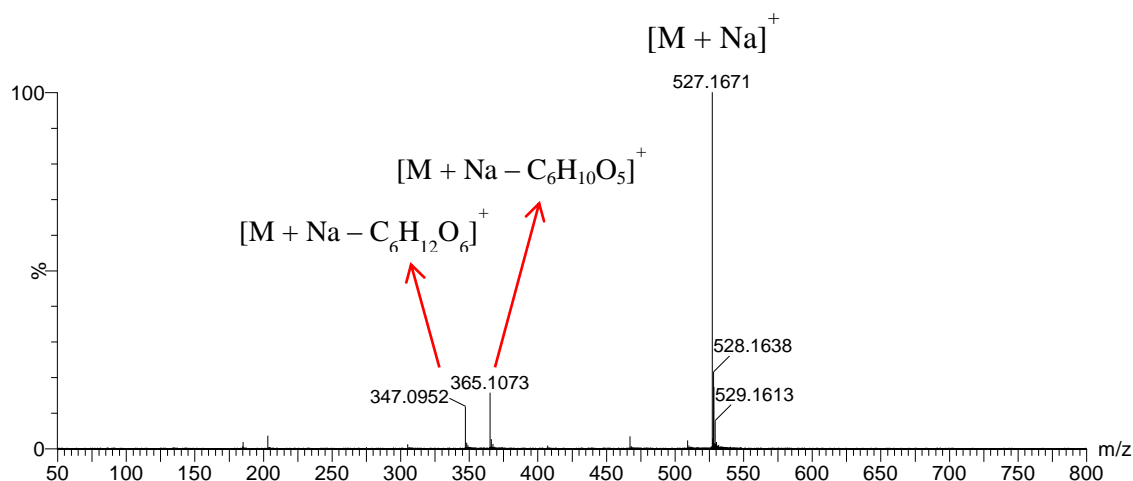


Figura 54. Espectro de massas, por EM-EM, da maltotriose, com aplicação de energias de colisão de 20,0 V.

Para o íon de m/z 689, a confirmação da identidade como maltotetraose não foi possível devido à descontinuidade da comercialização do seu padrão analítico. Quanto à comparação com dados da literatura, foram observados resultados controversos. O trabalho de Fabrik et al. (2012) apresenta um perfil similar para a fragmentação da molécula sodiada da maltotetraose, com a maior intensidade para o íon produto m/z 527. Porém, o espectro apresenta ainda o íon m/z 629, que seria oriundo da ruptura do anel glicosídico. Segundo Penna et al. (2009), este comportamento é característico dos maltooligosacarídeos, que apresentam o íon $[M + Na - C_2H_4O_2]^+$, referente a perda de 60 Da. No seu trabalho, a

fragmentação por Q-IT possibilitou a detecção deste íon tanto para a molécula de maltotriose quanto para a maltotetraose. Possivelmente, as energias de colisão de 20,0 V, por Q-TDV, não foram suficientes para favorecer a presença destes íons com maior intensidade no espectro de massas.

Nas amostras de arroz e cevada, outro íon foi observado, possuindo a relação m/z 365 e apresentando ausência do sinal analítico após a torrefação. Assim como a maltotriose, a confirmação da molécula de sacarose (Figura 55) foi obtida também através da infusão direta em espectrômetro de massas de uma solução padrão a 5,0 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 56).

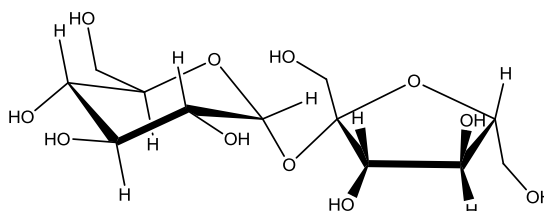


Figura 55. Fórmula estrutural da sacarose.

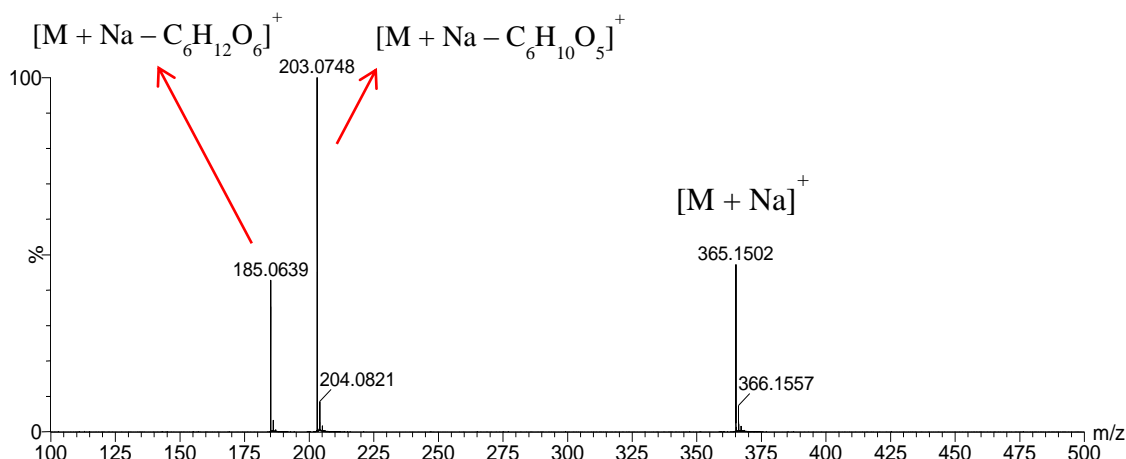


Figura 56. Espectro de massas, por EM-EM, da sacarose, com aplicação de energias de colisão de 15,0 V.

Para ambos os analitos, foi testada a separação cromatográfica com os demais isômeros através do método cromatográfico desenvolvido. Foram preparadas, portanto, duas soluções padrão contendo os isômeros de m/z 365 (maltose e sacarose) e 527 (rafinose, 1-kestose e maltotriose) para posterior análise por CLUE-EM-EM. O resultado indicou a co-eluição dos analitos em ambos os casos, porém destaca-se mais uma vez que foi possível realizar a distinção isomérica pelo perfil de fragmentação observado através do monitoramento dos espectros de massas em tempo real.

4.3.3. Proposta de mecanismos de fragmentação para diferenciação entre isômeros

A partir dos resultados obtidos com os adulterantes, foi estudado e proposto mecanismos de fragmentação para cada oligossacarídeo investigado. Esta etapa foi realizada como forma de ratificar a diferenciação isomérica obtida por EM-EM, sobretudo para os analitos maltotriose, rafinose e estaquiase, que foram detectados após a torrefação.

Os mecanismos propostos foram desenvolvidos segundo informações disponíveis da literatura, que incluem a tendência das moléculas cationizadas de realizar fragmentação distante da carga (ou por retenção de carga) por IES; o mecanismo de reação pela migração de hidrogênio ou eliminação 1,2 (β) intramolecular de hidrogênio para ruptura de ligações

glicosídicas, sob baixas energias de colisão; e o emprego da nomenclatura para fragmentos de oligossacarídeos, elaborada por Domon & Costello (JORGE et al.; DOMON & COSTELLO, 1988; DEMARQUE et al., 2016).

É importante ressaltar que o trabalho de Domon & Costello (1988) não incluiu oligossacarídeos não redutores. Porém, esta nomenclatura é amplamente utilizada em diferentes trabalhos científicos. Logo, para oligossacarídeos não redutores, considerou-se o valor de j como 1 para a ligação glicosídica envolvendo o monossacarídeo inicial da molécula (JORGE et al.).

4.3.3.1. Maltose e maltotriose

Oligossacarídeos cuja constituição possui apenas um tipo de monossacarídeo apresentaram baixa tendência de fragmentação do íon precursor nas energias de colisão aplicadas (15,0 V a 25,0 V). A Figura 57 representa as duas rotas (A e B) de fragmentação para maltose.

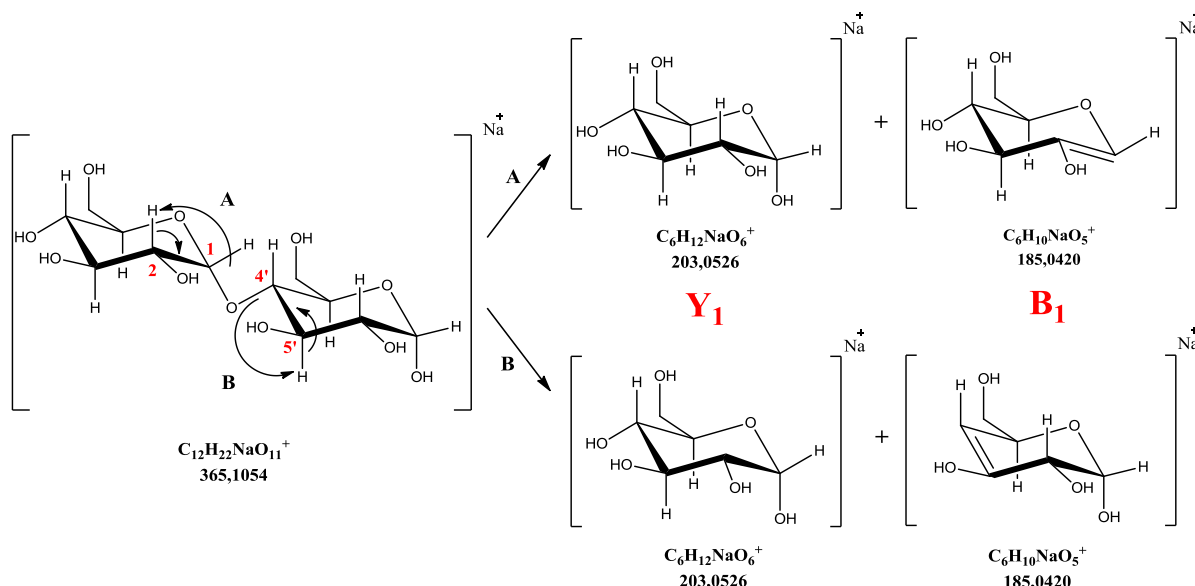


Figura 57. Mecanismo de fragmentação da maltose, através de reação de migração de β -hidrogênio, com predominância do fragmento Y₁.

O fragmento Y₁ consiste no íon fragmento de maior intensidade no espectro de massas por EM-EM da maltose. Na análise da maltotriose, importante marcador de adulteração, também foi observado o mesmo comportamento, com maior intensidade dos íons fragmentos de cadeia saturada em comparação aos de cadeia insaturada de mesmo número de monossacarídeos. Os fragmentos Y e C corresponderam aos íons mais intensos, de acordo com os mecanismos propostos para a fragmentação da maltotriose (Figuras 58 a 60).

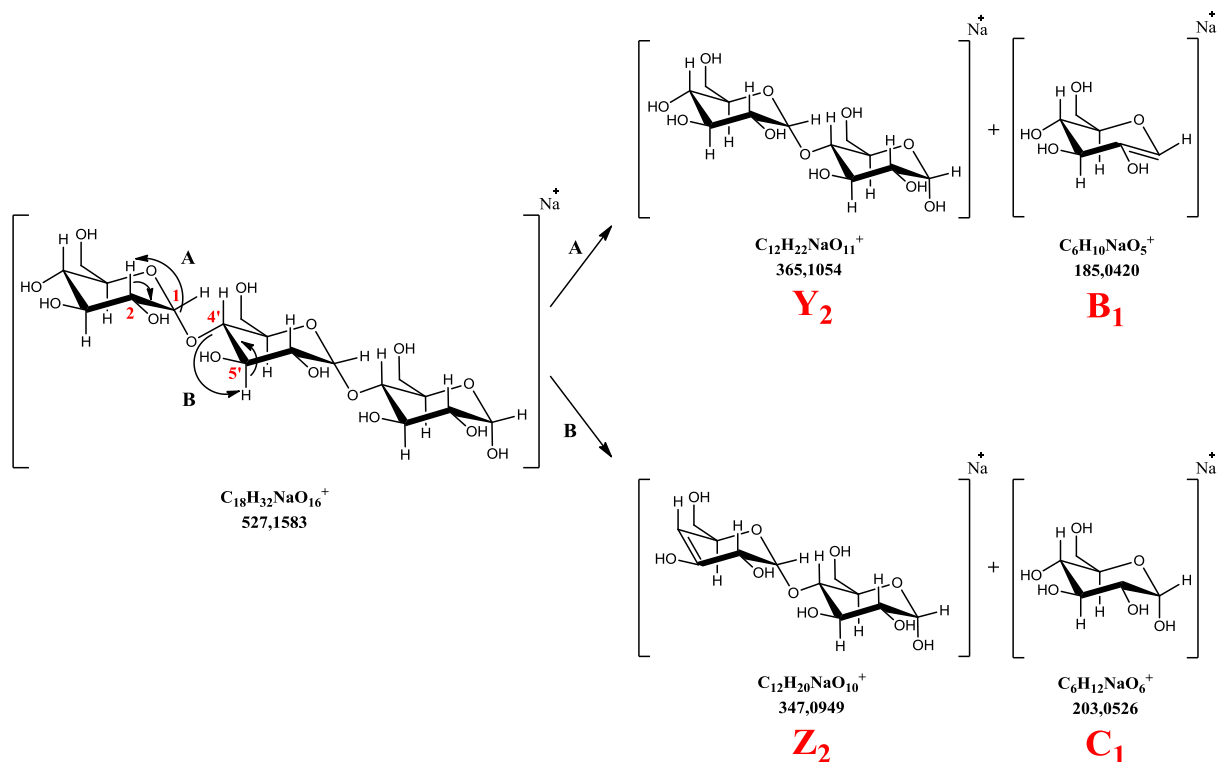


Figura 58. Mecanismos de fragmentação (rotas A e B) da maltotriose, através da primeira reação de migração de β -hidrogênio.

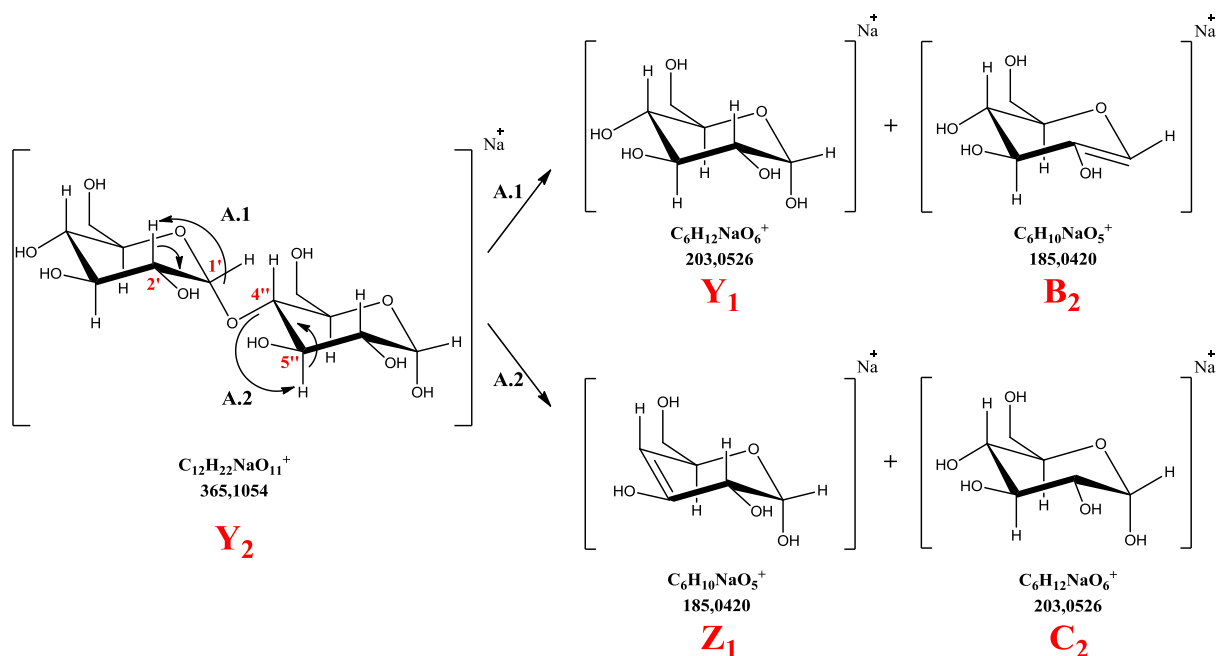


Figura 59. Continuação do mecanismo de fragmentação da maltotriose (rota A), através de segunda reação de migração de β -hidrogênio.

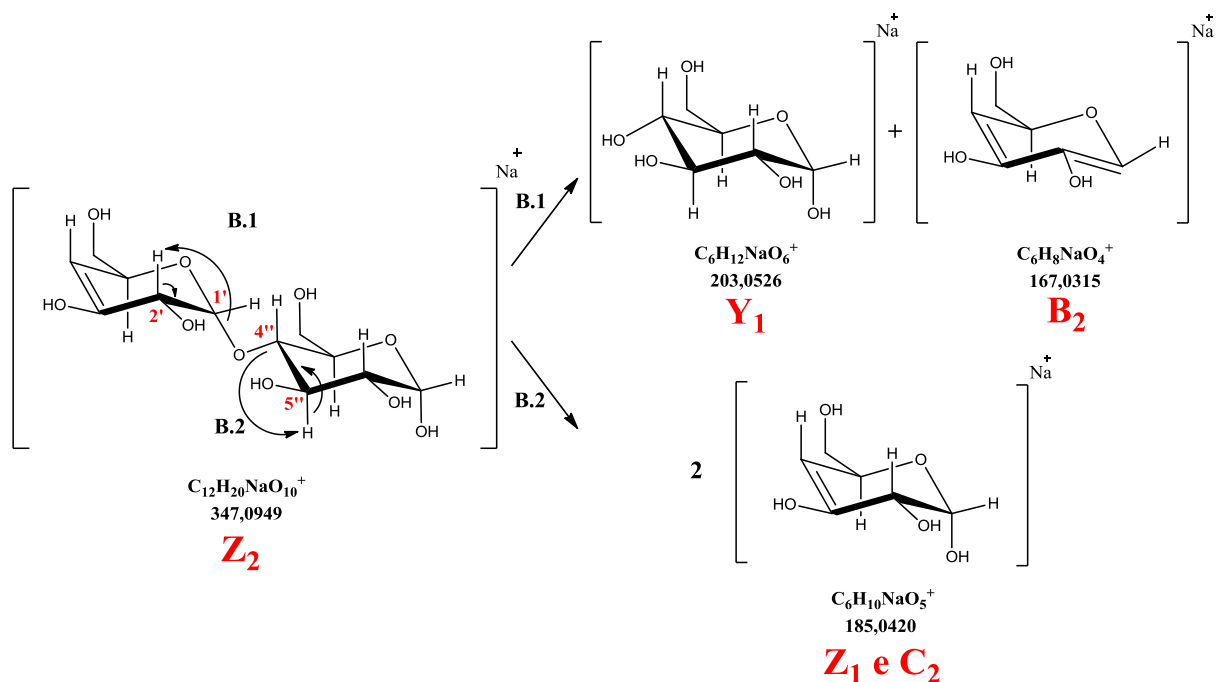


Figura 60. Continuação do mecanismo de fragmentação da maltotriose (rota B), através de segunda reação de migração de β -hidrogênio.

4.3.3.2. Sacarose

Embora os isômeros que possuíam íons precursores m/z 365 não tenham apresentado potencial como marcador de adulteração, o estudo do mecanismo de fragmentação da sacarose, assim como da maltose, forneceu informações importantes para o desenvolvimento dos demais mecanismos propostos. A principal observação encontrada foi a diferença sobre a tendência de fragmentação dos íons precursores de ambos os dissacarídeos, visualizada nos espectros de massas por EM-EM e sob a mesma energia de colisão (15,0 V). Esta diferença está relacionada ao tipo de ligação glicosídica. Para sacarose, a estereoquímica da ligação α,β ($1\leftrightarrow 2$) ocorre entre duas ramificações em posições diferentes no plano, o que pode facilitar o rompimento da ligação do tipo éter. A Figura 61 esquematiza as rotas de fragmentação (A e B) da sacarose, similares aos da maltose, porém com a formação de íons produtos diferentes.

Este resultado contribuiu significativamente para a proposição dos mecanismos de fragmentação para os oligossacarídeos da família da rafinose (rafinose e estaquiose) e dos frutanos (1-kestose e nistose).

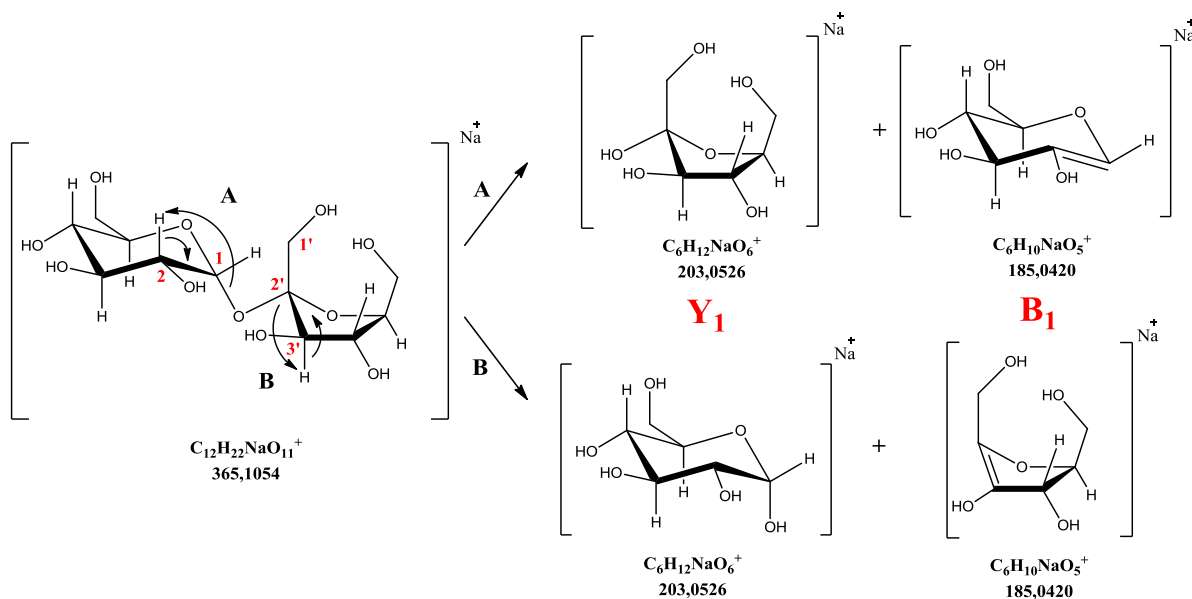


Figura 61. Mecanismo de fragmentação da sacarose, através de reação de migração de β -hidrogênio.

4.3.3.3. Rafinose e estaquiose

De modo geral, os espectros de massas por EM-EM da rafinose e estaquiose apresentaram maior intensidade dos íons fragmentos referentes à perda de 162 Da. Estes resultados foram similares aos encontrados para maltose, maltotriose e sacarose, em que os íons de cadeia saturada (fragmentos Y e C) são mais intensos que os de cadeia insaturada (fragmentos Z e B).

A fragmentação pode ser iniciada pela quebra da ligação α (1 \rightarrow 6) entre as moléculas de galactose adicionadas a glicose ou, ainda, pela quebra da ligação α,β (1 \leftrightarrow 2) da estrutura central de sacarose. Entretanto, tanto para rafinose quanto para estaquiose, o primeiro íon produto apresentou alta intensidade em relação aos demais, o que indica que o aumento da cadeia glicosídica pela adição de galactose não apresenta influência no perfil de fragmentação destes oligossacarídeos. A ruptura da ligação α,β (1 \leftrightarrow 2) parece ser favorecida novamente e, portanto, os mecanismos de fragmentação mais prováveis da rafinose e estaquiose indicam a perda inicial da β -frutose (Figuras 62 a 71). Este resultado proposto coincide com as energias de ligação calculada por Yang et al. (2013) para os dois tipos de ligações glicosídicas presente na rafinose. O cálculo teórico indicou que a ligação α,β (1 \leftrightarrow 2) apresenta menor energia de ligação (84,3 kcal/mol) em relação a ligação α (1 \rightarrow 6) (90,4 kcal/mol) e, portanto, é considerada mais lábil.

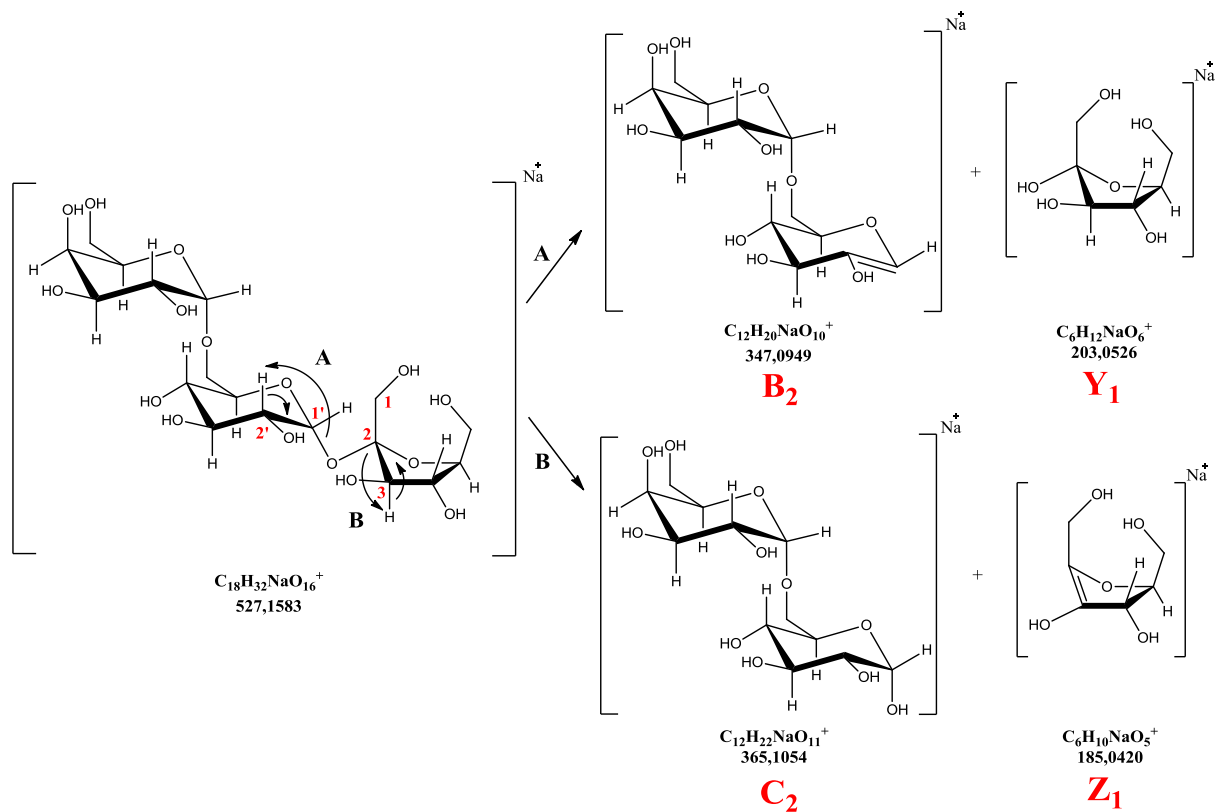


Figura 62. Mecanismo de fragmentação (rota A e B) da rafinose, através da eliminação do anel furânico (β -frutose).

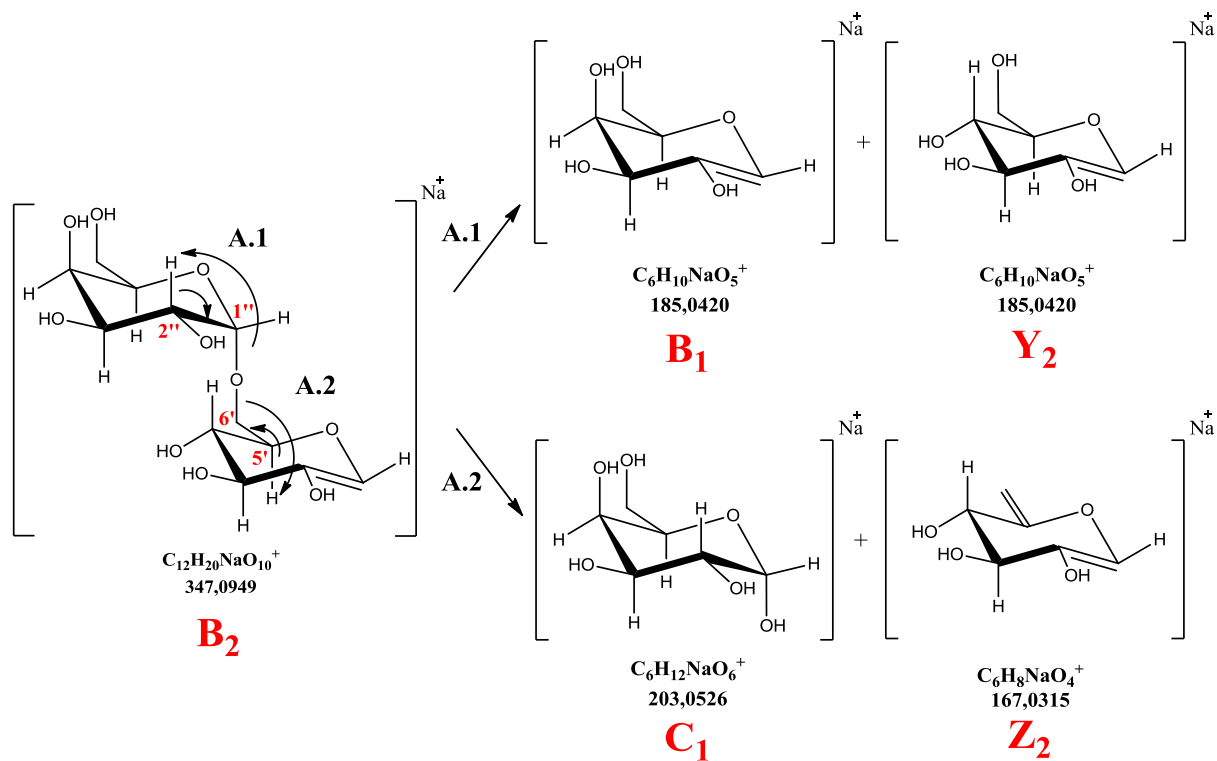


Figura 63. Continuação do mecanismo de fragmentação da rafinose (rota A), através da segunda reação de migração de β -hidrogênio.

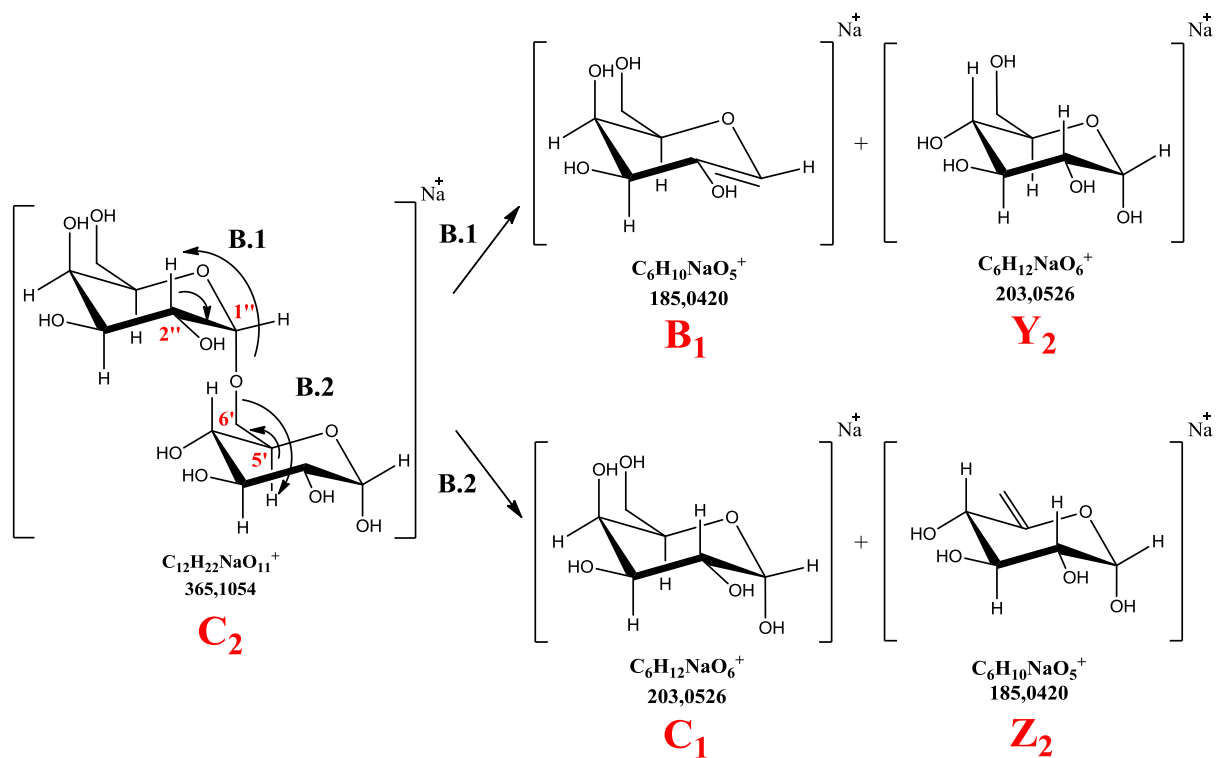


Figura 64. Continuação do mecanismo de fragmentação da rafinose (rota B), através da segunda reação de migração de β -hidrogênio.

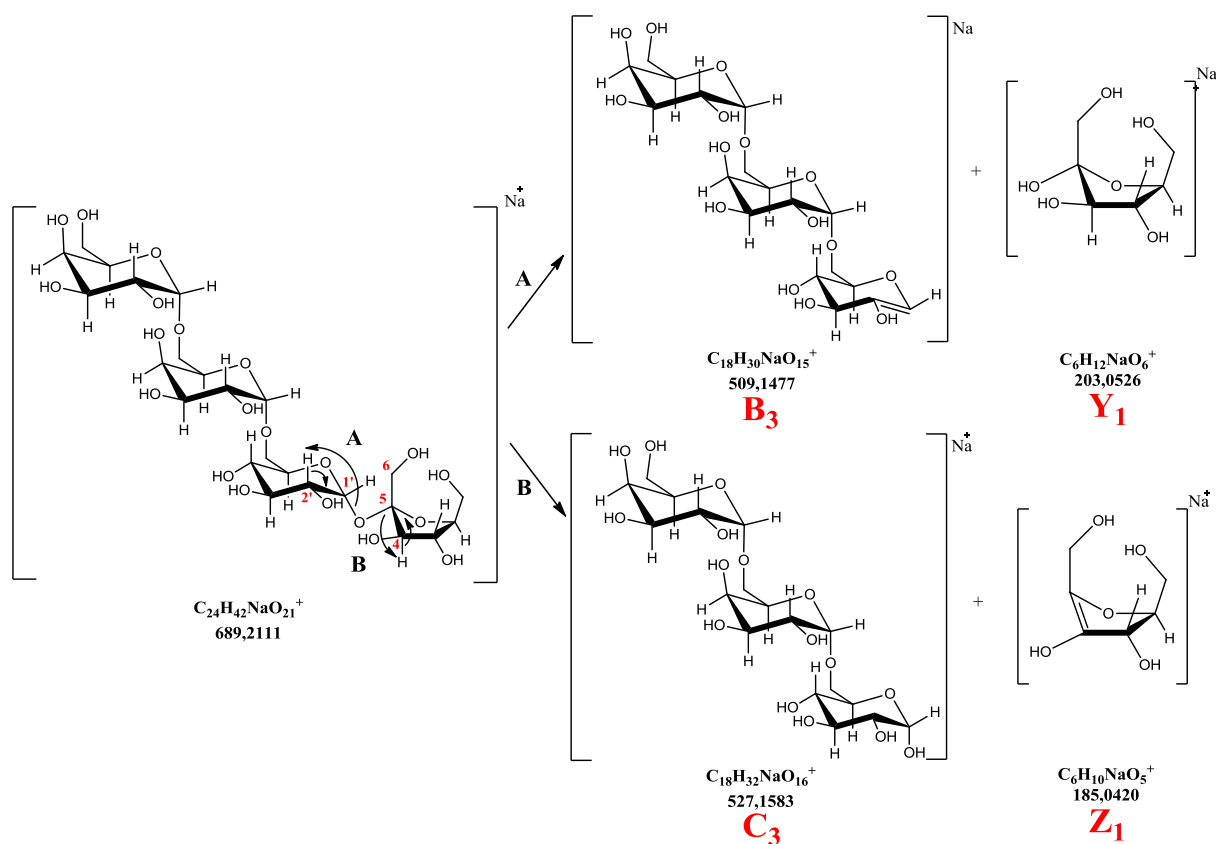


Figura 65. Mecanismo de fragmentação (rota A e B) da estaquiose, através da eliminação do anel furânico (β -frutose).

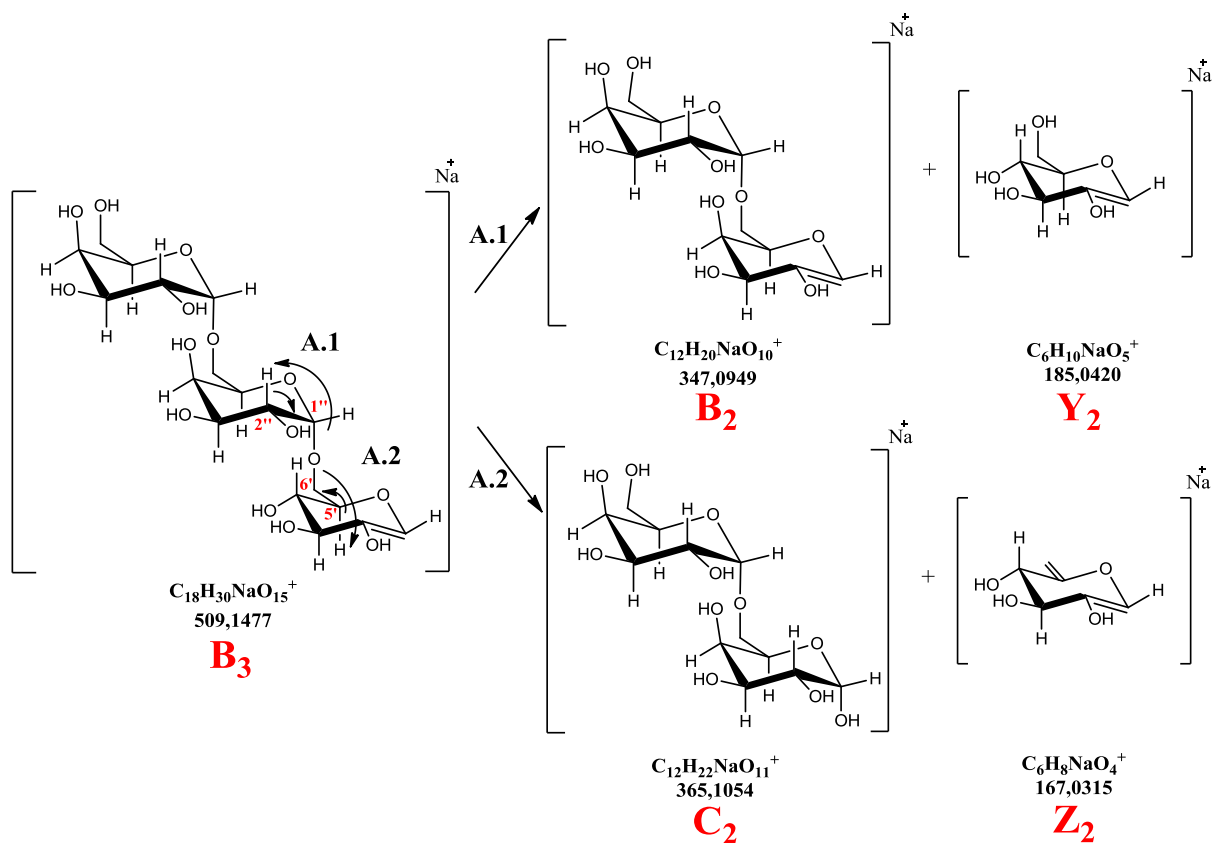


Figura 66. Continuação do mecanismo de fragmentação da estaquiose (rota A), através da segunda reação de migração de β -hidrogênio.

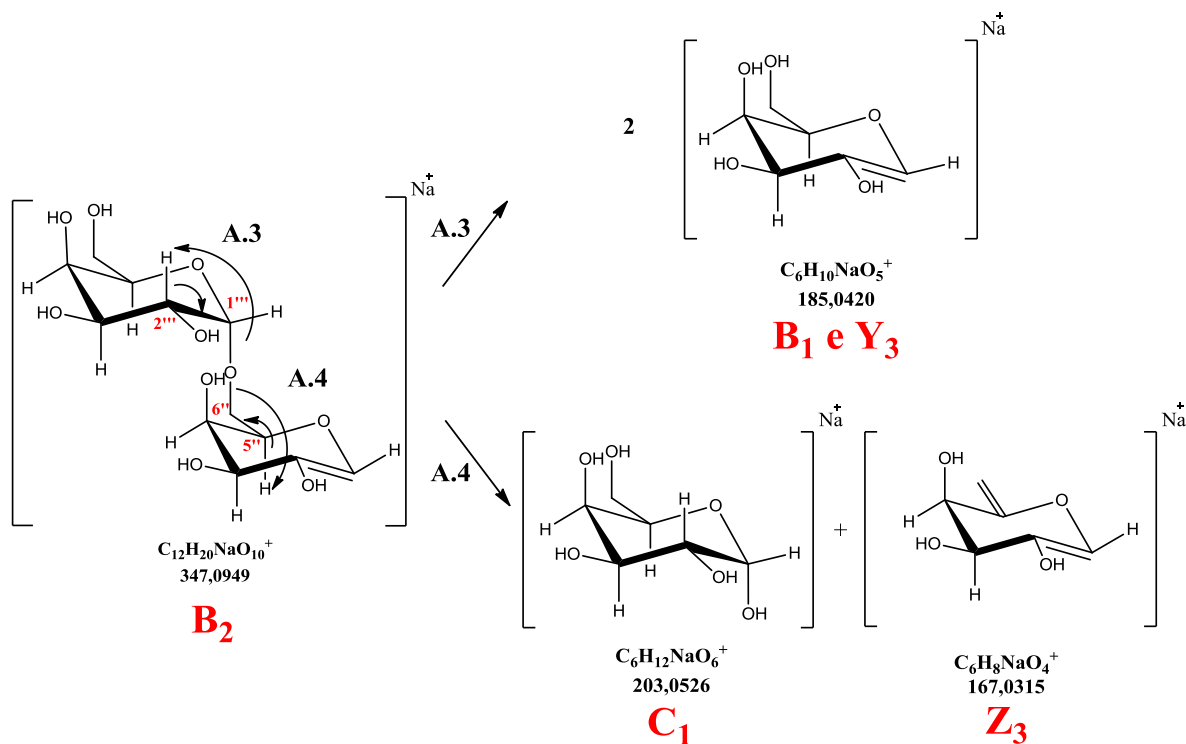


Figura 67. Continuação do mecanismo de fragmentação da estaquiose (rota A.1), através da terceira reação de migração de β -hidrogênio.

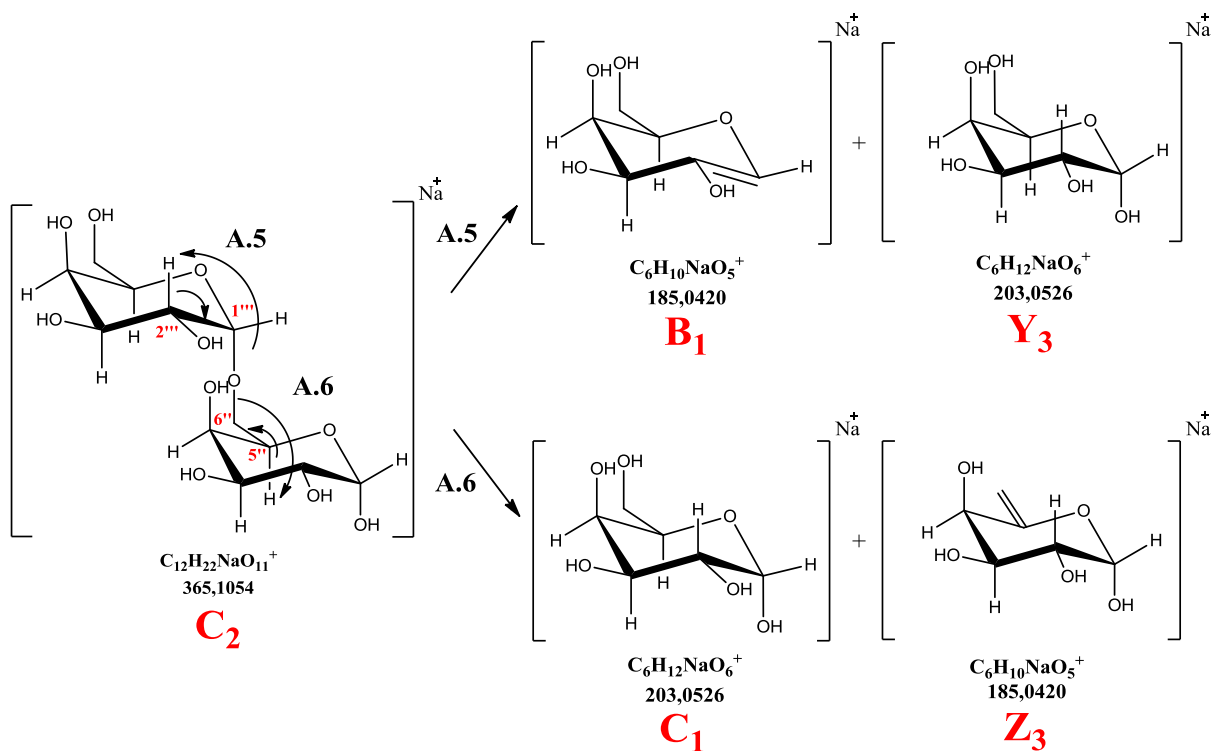


Figura 68. Continuação do mecanismo de fragmentação da estaquiose (rota A.2), através da terceira reação de migração de β -hidrogênio.

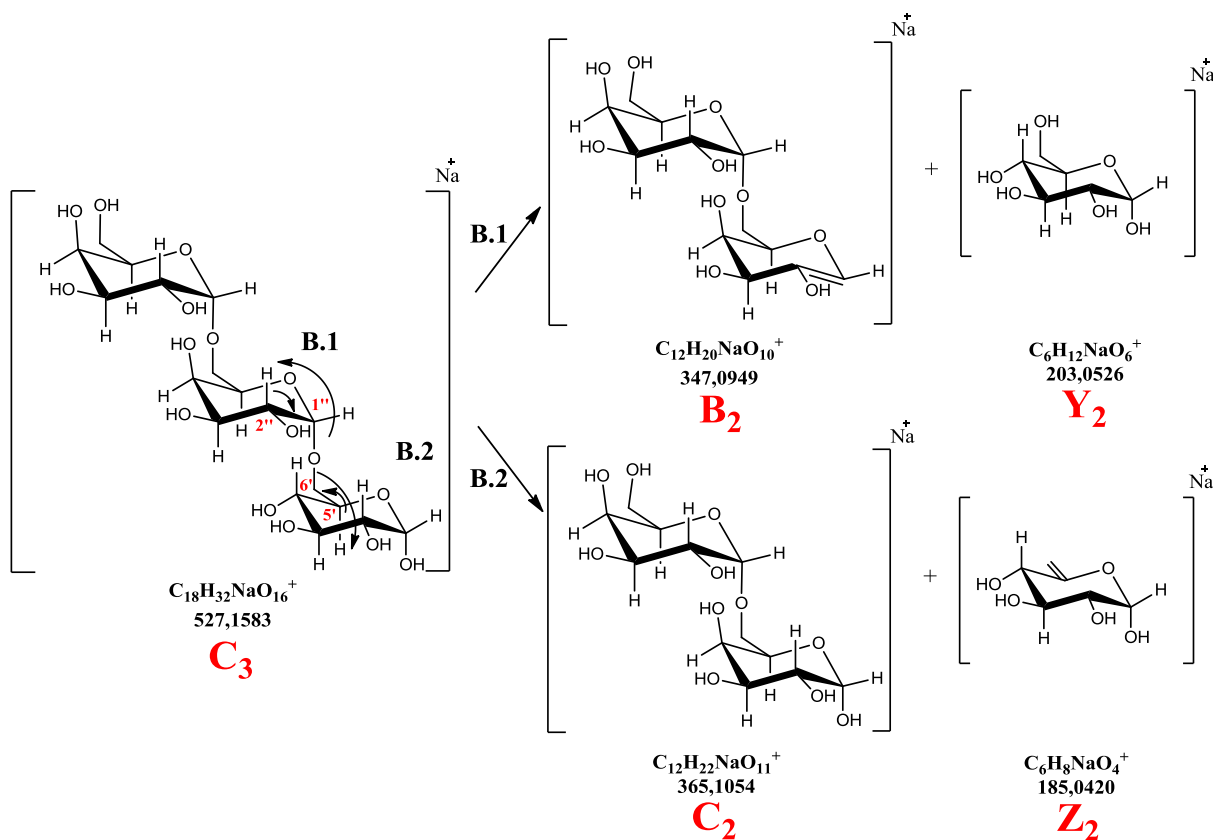


Figura 69. Continuação do mecanismo de fragmentação da estaquiose (rota B), através da terceira reação de migração de β -hidrogênio.

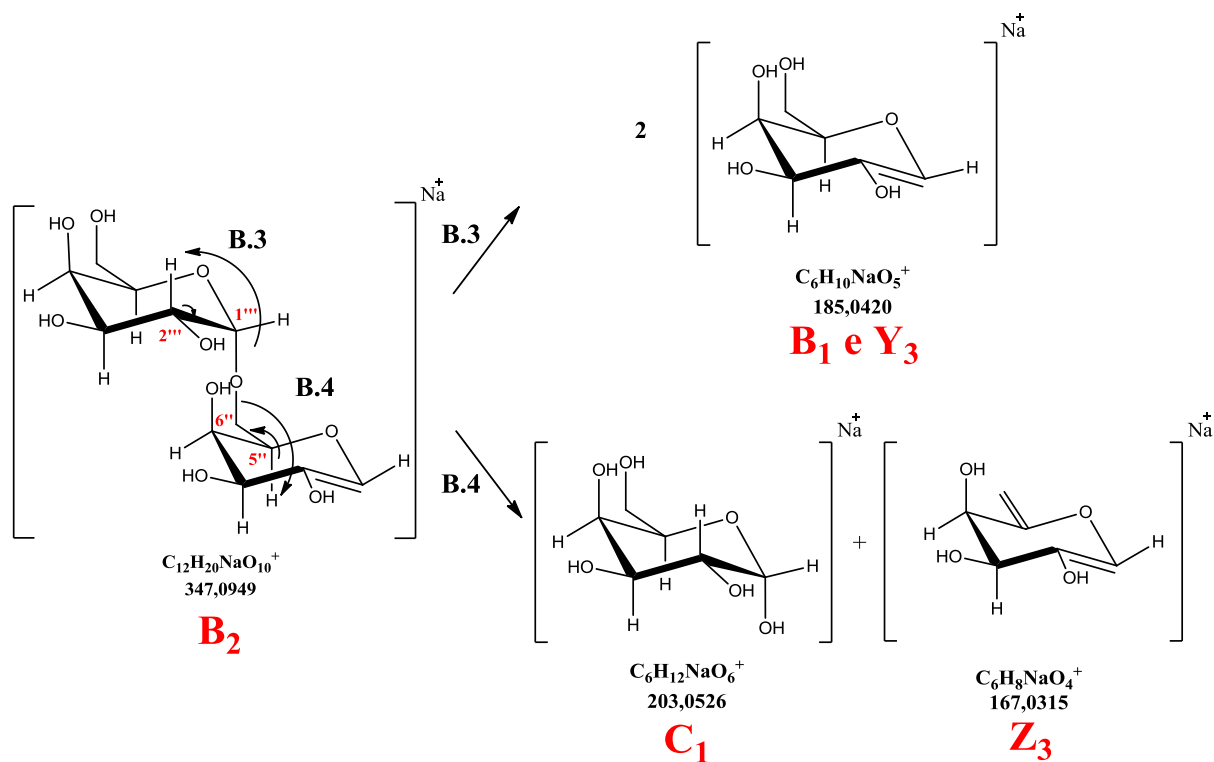


Figura 70. Continuação do mecanismo de fragmentação da estaquiose (rota B.1), através da terceira reação de migração de β -hidrogênio.

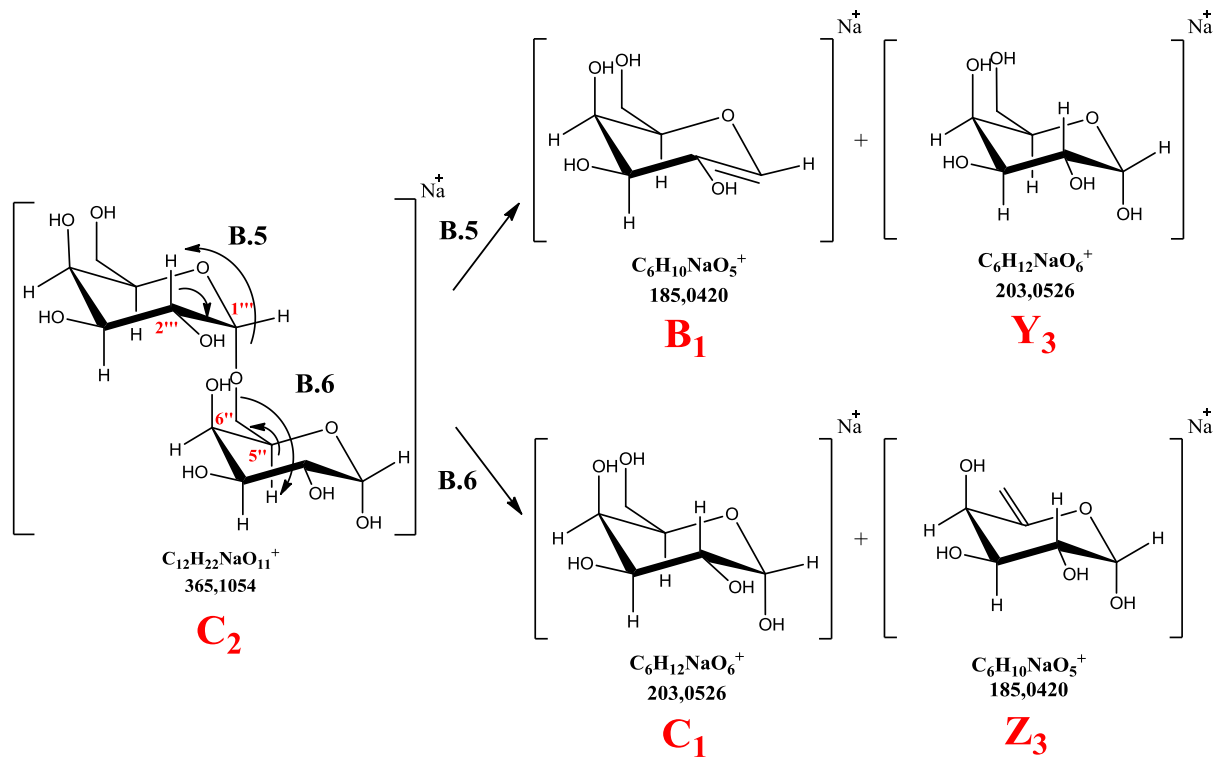


Figura 71. Continuação do mecanismo de fragmentação da estaquiose (rota B.2), através da terceira reação de migração de β -hidrogênio.

4.3.3.4. 1-kestose e nistose

Para a classe dos frutanos, foi observado exclusivamente um maior equilíbrio de intensidade entre íons produtos de cadeia saturada e insaturada, com o mesmo número de monossacarídeos. Seguindo a mesma linha de raciocínio da família da rafinose, o mecanismo de fragmentação pode ser iniciado pela eliminação dos resíduos, neste caso anéis furânicos provenientes da ligação β (2 \rightarrow 1), ou ainda, pela ruptura da ligação α,β (1 \leftrightarrow 2) da estrutura central de sacarose. O primeiro mecanismo não favorece a formação do primeiro íon produto de cadeia insaturada, como pode ser visualizado no caso da 1-kestose (Figura 72).

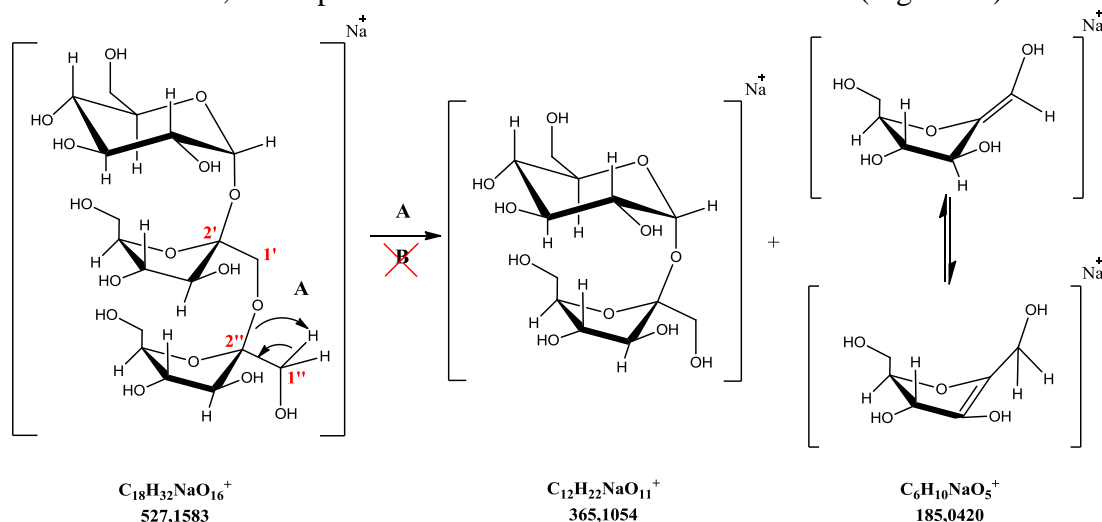


Figura 72. Mecanismo de fragmentação pela eliminação inicial de anel furânico da 1-kestose, formando apenas íon fragmento de cadeia saturada (m/z 365).

A ausência de hidrogênio ligado ao carbono β inviabiliza a fragmentação pela perda de 180 Da $[M + Na - 180]^+$ e a formação do íon de m/z 347 através da eliminação inicial de anel furânico. Logo, o provável mecanismo de fragmentação corresponde novamente a ruptura inicial da ligação glicosídica α,β (1 \leftrightarrow 2) na estrutura central da sacarose. As Figuras 73 e 74 esquematizam esta rota de fragmentação da 1-kestose.

Semelhantemente, a ausência de alguns íons de cadeia insaturada também ocorre para a nistose. Por tal motivo, o mecanismo de fragmentação proposto também envolveu a perda inicial do anel pirânico, em detrimento do anel furânico (Figuras 75 a 78).

A maior intensidade do sinal analítico dos íons m/z 347 em comparação aos íons m/z 365 visualizada nos espectros de massas por EM-EM da nistose pode estar relacionado a estequiometria de fragmentação da rota B, em que são obtidos preferencialmente apenas íons de cadeia insaturada.

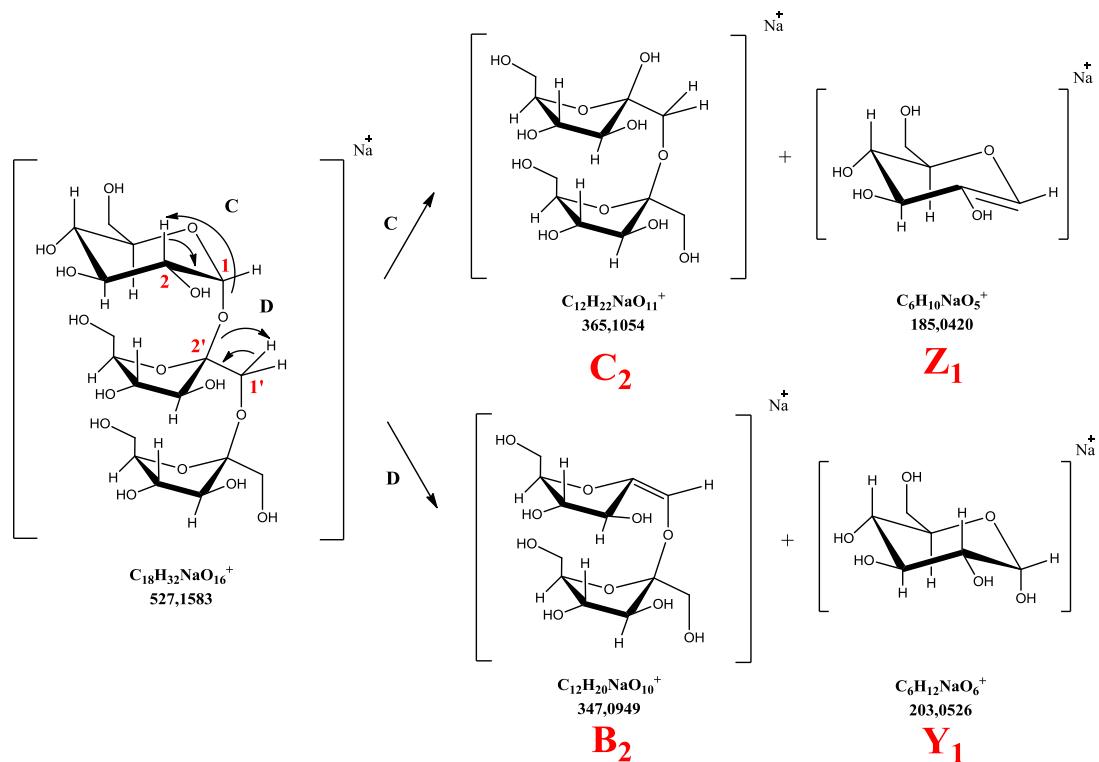


Figura 73. Mecanismo de fragmentação da 1-kestose, através da eliminação inicial do anel pirânico.

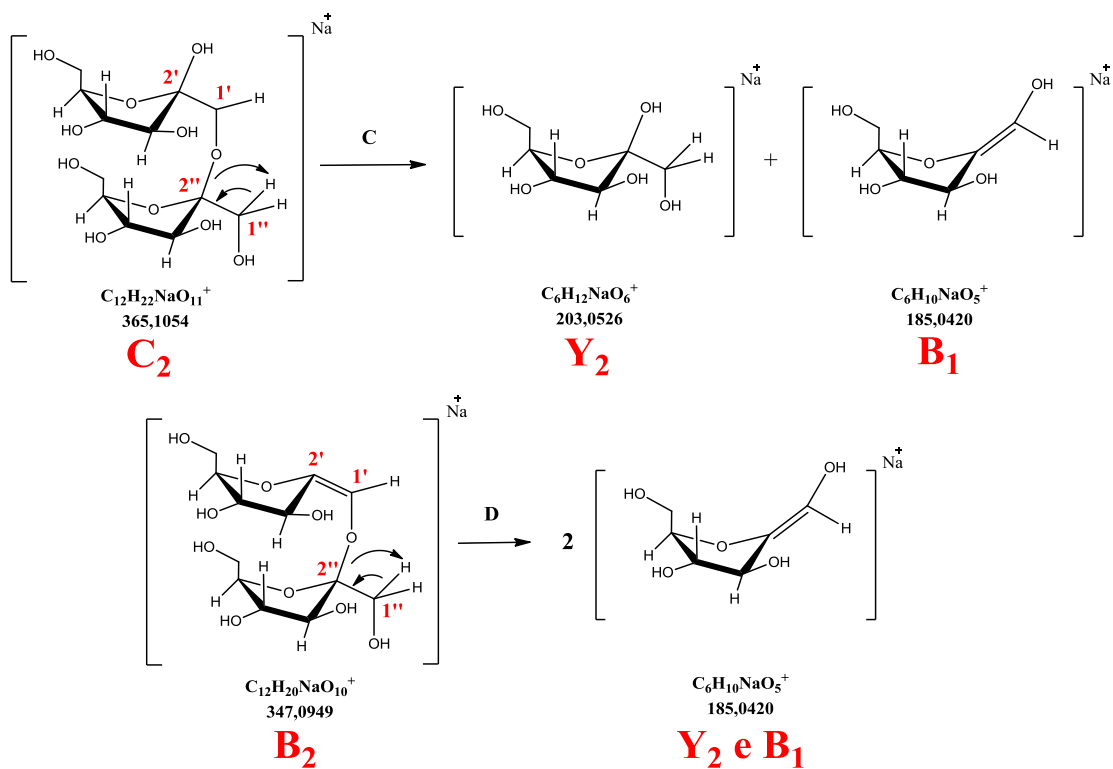


Figura 74. Continuação do mecanismo de fragmentação da 1-kestose (rota C e D), através da segunda reação de migração de β -hidrogênio.

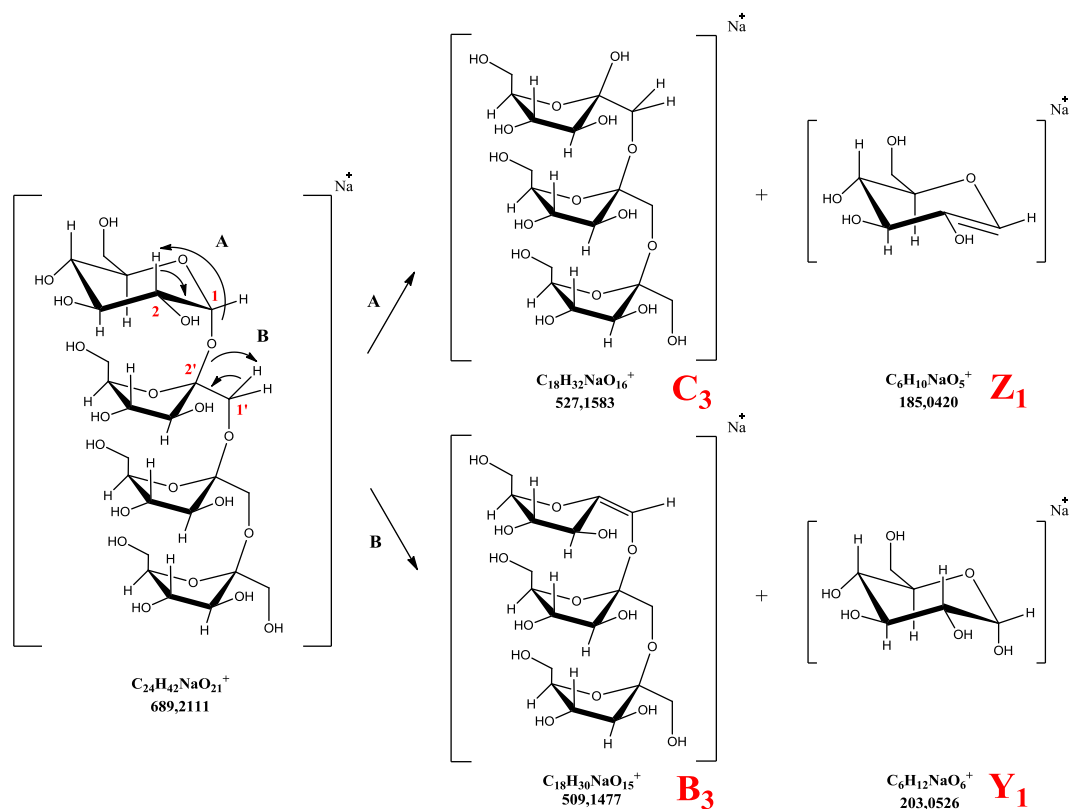


Figura 75. Mecanismo de fragmentação da nistose, através da eliminação inicial do anel pirânico.

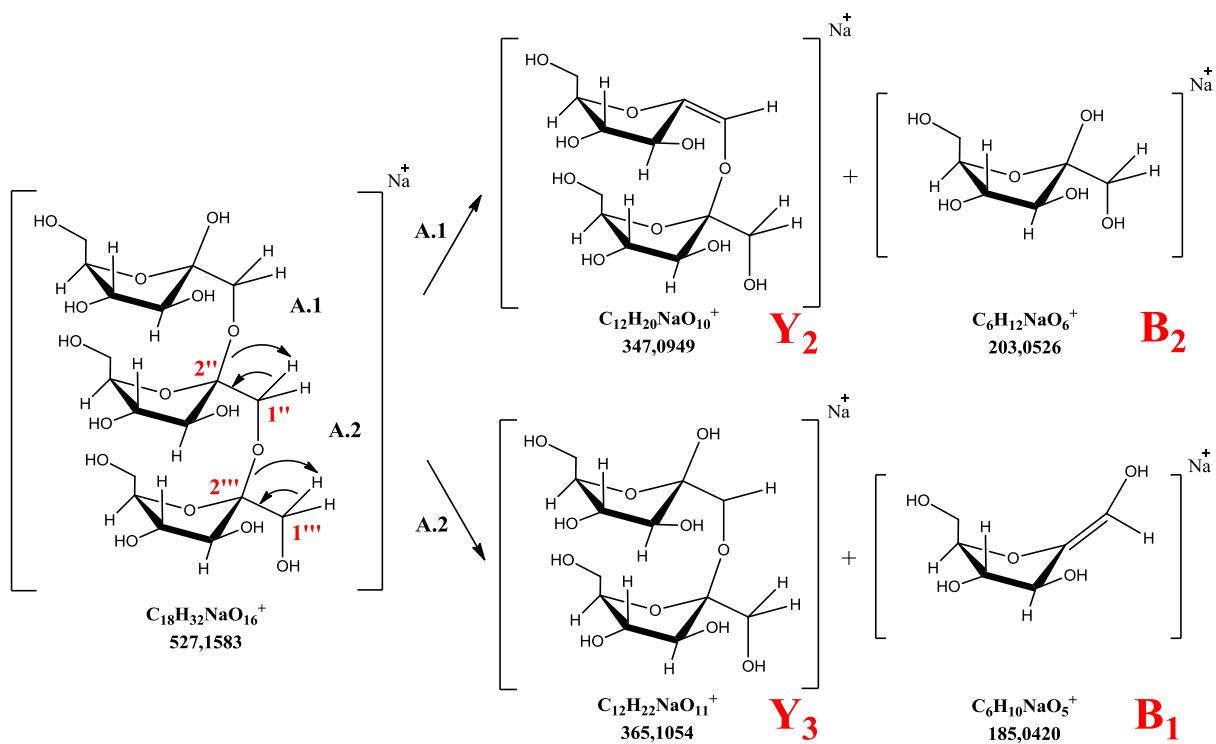


Figura 76. Continuação do mecanismo de fragmentação da nistose (rota A), através da segunda reação de migração de β -hidrogênio.

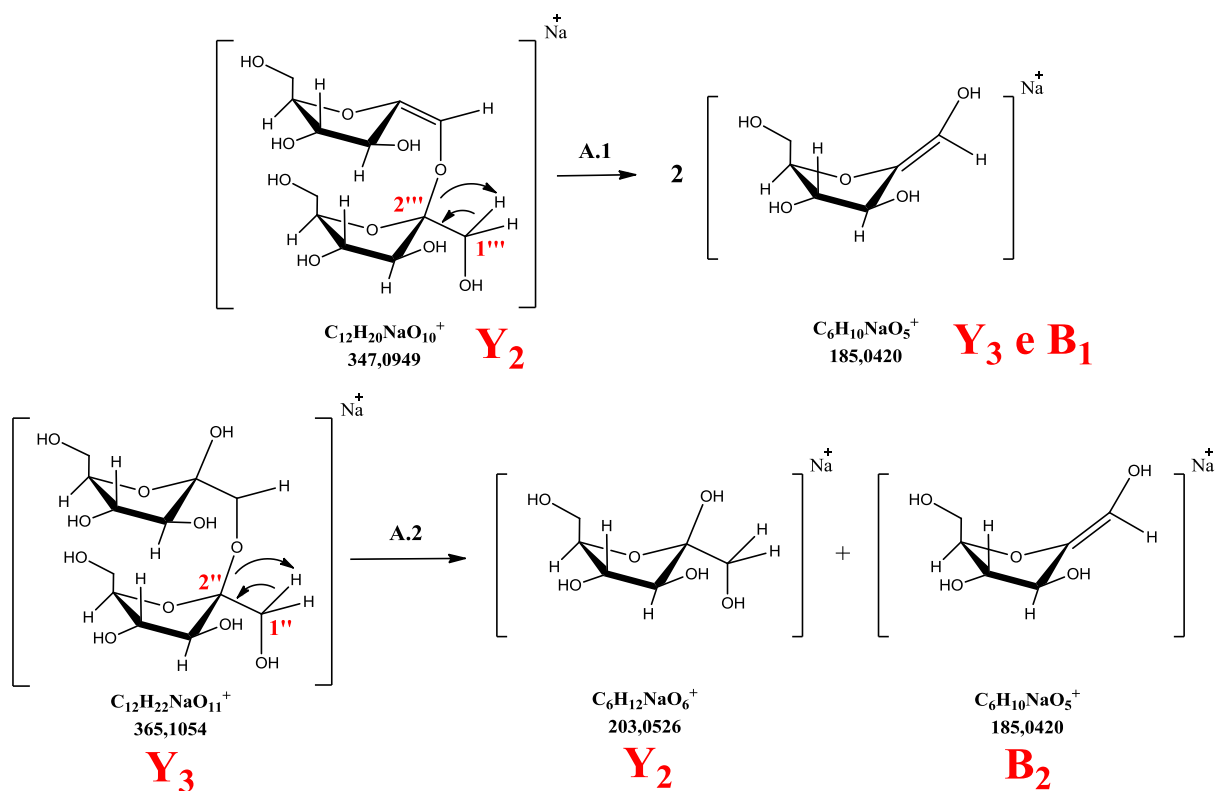


Figura 77. Continuação do mecanismo de fragmentação da nistose (rotas A.1 e A.2), através da terceira reação de migração de β -hidrogênio.

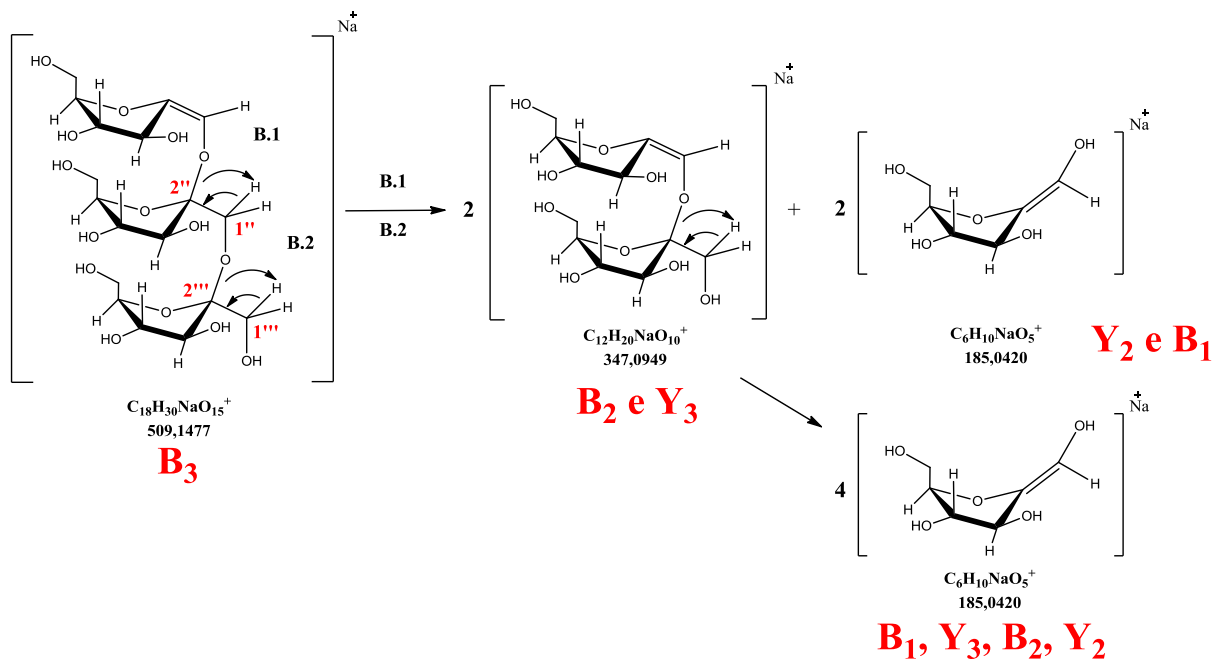


Figura 78. Continuação do mecanismo de fragmentação da nistose (rotas B.1 e B.2), através da terceira reação de migração de β -hidrogênio.

Portanto, foi possível identificar aspectos, como a maior facilidade de ruptura das ligações α, β ($1 \leftrightarrow 2$) e intensidade dos íons produtos de cadeia saturada (fragmentos Y e C)

quando comparado aos de cadeia insaturada, e propor mecanismos de fragmentação que contribuirão para a garantia da diferenciação isomérica entre os oligossacarídeos investigados.

4.4. Aplicação da Metodologia em Amostras Comerciais de Café

4.4.1. Testes prévios de purificação (*clean up*) por CLAE-IR

Com a estratégia de identificação dos marcadores químicos definidas, a pesquisa foi direcionada ao estudo de amostras comerciais de café. Visando diminuir as interferências dos demais constituintes químicos do café torrado (efeito matriz) e a consequente supressão iônica dos analitos na fonte de ionização do espectrômetro de massas, foi testada preliminarmente uma etapa de purificação com o uso de colunas preparativas descartáveis destinadas a extração em fase sólida (*Solid-Phase Extraction – SPE*).

Os testes de recuperação com colunas preenchidas com fase estacionária C₁₈ foram realizados paralelamente a confirmação dos marcadores químicos. Conseqüentemente, foi empregado o extrato aquoso obtido a partir dos grãos torrados de café e adicionados apenas de solução padrão contendo os cinco analitos inicialmente investigados, totalizando concentrações de 100 µg/mL.

Para a quantificação dos oligossacarídeos nas frações, foram elaboradas curvas analíticas de cada analito com cinco pontos a partir das soluções padrão F.1 (0,1 mg/mL), F.2 (0,3 mg/mL), F.3 (0,5 mg/mL), F.4 (0,7 mg/mL) e F.5 (0,9 mg/mL). A Figura 79 consiste em um cromatograma obtido através da injeção da solução padrão dos analitos em sistema CLAE-IR.

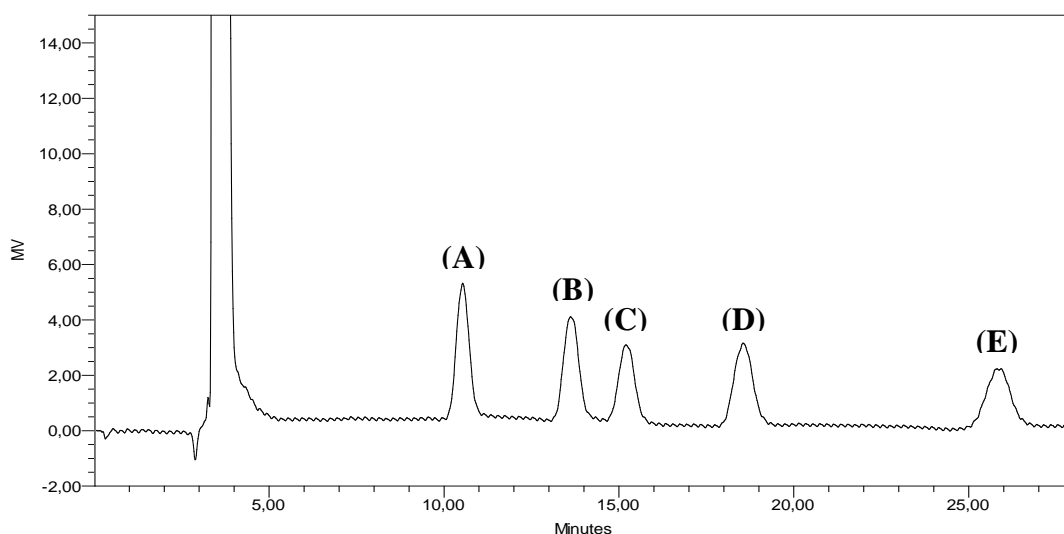


Figura 79. Cromatograma, por CLAE-IR, de uma solução padrão dos oligossacarídeos inicialmente investigados: (A) maltose – 10,5 min; (B) 1-kestose – 13,6 min; (C) rafinose – 15,2 min; (D) nistose – 18,6 min; (E) estaquiase – 25,9 min.

Os resultados, em triplicata, de cada ponto da curva foram submetidos ao teste estatístico de Grubbs, através da Equação 6, que indicou a ausência de valores extremos (*outliers*). Após, foi realizado o teste de Cochran (Equação 7) com o conjunto de valores de y para cada analito, em que foi comprovada uma variância uniforme, ou seja, a homocedasticidade dos dados obtidos. A Tabela 30 relaciona todos os dados utilizados para a construção da curva analítica e os valores calculados nos testes estatísticos.

$$G_i = \frac{|\bar{Y} - Y_i|}{s}$$

em que: \bar{Y} = média; Y_i = valor da alíquota; s = desvio padrão.

Equação 6. Cálculo de G para Teste de Grubbs.

$$C_{calc} = \frac{s_{max}^2}{\sum_{i=1}^k s_i^2}$$

em que: s_{max}^2 = maior variância obtida; $\sum_{i=1}^k s_i^2$ = soma de todas as variâncias.

Equação 7. Cálculo de C para Teste de Cochran.

Tabela 30. Dados obtidos para a construção da curva analítica utilizada para etapa de purificação.¹

	Conc.	Área 1	Área 2	Área 3	\bar{X}	s	G_1	G_2	G_3	s^2	C_{calc}
Maltose	0,115	15470	16320	15915	15902	425	1,02	0,98	0,03	180758	0,44
	0,345	43569	41816	43321	42902	949	0,70	1,145	0,44	899923	
	0,575	69167	70625	71425	70406	1145	1,08	0,19	0,89	1310721	
	0,805	96765	96360	95737	96287	518	0,92	0,14	1,06	268156	
	1,035	124417	123514	123373	123768	566	1,146	0,45	0,70	320871	
1-kestose	0,097	12788	14115	15171	14025	1194	1,04	0,08	0,96	1425792	0,45
	0,291	41224	40089	40457	40590	579	1,09	0,87	0,23	335323	
	0,485	66812	65808	62003	64874	2537	0,76	0,37	1,13	6435420	
	0,679	90916	86261	87623	88267	2393	1,11	0,84	0,27	5727986	
	0,873	113759	113211	114603	113858	701	0,14	0,92	1,06	491717	
Rafinose	0,095	11729	11625	11211	11522	274	0,76	0,38	1,134	75089	0,49
	0,285	31870	30978	33229	32026	1134	0,14	0,92	1,06	1284924	
	0,475	51040	53764	49472	51425	2172	0,18	1,08	0,90	4716677	
	0,665	71954	68783	69534	70090	1657	1,12	0,79	0,34	2745940	
	0,855	90804	91862	90177	90948	852	0,17	1,07	0,90	725286	
Nistose	0,108	13364	12109	16912	14128	2491	0,31	0,81	1,12	6205356	0,39
	0,324	40297	38163	39654	39371	1095	0,85	1,10	0,26	1198414	
	0,54	66740	65958	63426	65375	1732	0,79	0,34	1,12	3000857	
	0,756	90532	88899	87204	88878	1664	0,99	0,01	1,01	2769216	
	0,972	116904	112684	111332	113640	2906	1,12	0,33	0,79	8447248	
Estaquiose	0,106	12835	11866	10198	11633	1334	0,90	0,17	1,08	1779159	0,34
	0,318	37227	34542	34339	35369	1612	1,152	0,51	0,64	2598496	
	0,53	58452	60241	55595	58096	2343	0,15	0,92	1,07	5491381	
	0,742	82154	84531	79495	82060	2519	0,04	0,98	1,02	6346951	
	0,954	105726	106155	103129	105003	1637	0,44	0,70	1,145	2680854	

¹ Os valores tabelados para o Teste de Grubbs e Cochran em nível de significância de 5% foram, respectivamente, 1,153 (n = 3) e 0,6838 (k = 5, n = 3).

Após a construção das curvas analíticas, procederam-se os testes de recuperação com soluções aquosas de diferentes concentrações de acetonitrila (70%, 75% e 90% v/v). Verificou-se, como era esperado, que a fração obtida diretamente da eluição do extrato de café já apresentava grande parte dos analitos adicionados e com menor intensidade da coloração do café, devido a retenção de substâncias apolares na coluna.

As maiores taxas de recuperação foram encontradas nas condições de ativação da coluna com 5 mL de solução aquosa de acetonitrila a 90%, eluição de 2 mL amostra e eluição da mesma proporção de água grau Milli-Q e, após, limpeza com 5 mL de solução aquosa de acetonitrila a 90%. Este experimento foi realizado em triplicata e a soma das frações eluídas foi seca sob fluxo de ar comprimido e solubilizadas em 300 μ L de solução aquosa de acetonitrila a 20%, similar ao solvente dos extratos submetidos ao método de açúcares por CLAE-IR (MACRAE, 1998). Os resultados obtidos a partir das equações da reta de cada analito estão dispostos na Tabela 31.

Tabela 31. Taxas médias de recuperação para a etapa de purificação adotada.

	Equação da Reta	R ²	% Recuperação ($\bar{X} \pm S$)
Maltose	$y = 117008x + 2573,4$	0,9999	$30,23 \pm 1,67$
1-kestose	$y = 127496x + 2487$	0,9996	$159,86 \pm 41,87$
Rafinose	$y = 103640x + 1973$	0,9997	$81,71 \pm 5,49$
Nistose	$y = 115060x + 2146$	0,9997	$90,92 \pm 5,50$
Estaquiouse	$y = 110109x + 74,5$	0,9999	$91,01 \pm 9,85$

Com exceção da maltose e 1-kestose, todos os demais analitos apresentaram porcentagens de recuperação acima de 80%, em especial rafinose e estaquiouse, que são marcadores de adulteração com soja. Por este motivo, adotaram-se estas condições de purificação para os extratos de café.

4.4.2. Análise dos extratos de amostras comerciais de café por CLUE-EM-EM

Com os extratos purificados, foram realizadas análises por CLUE-EM-EM das amostras de café comercial e torrado (amostras 1 e 2) e de café solúvel (amostras 3 e 4). Para as amostras 1 e 2, não foram observados nenhum dos íons investigados. Como a metodologia por PCR em tempo real tinha detectado anteriormente a presença de cevada (ANEXO B), foram realizadas alternativas visando à obtenção de amostras mais concentradas como a menor diluição dos extratos durante a etapa de purificação (sem adição de água grau Milli-Q ou eluição com volumes menores como 0,5 mL e 1,0 mL) ou o preparo de extratos de maior concentração de café (6,7%, 10,0% e 20,0% v/v). Porém, novamente, não foi possível detectar a presença de nenhum íon investigado, sobretudo a maltotriose. A Figura 80 consiste no espectro de massas, por EM-EM, de um extrato da amostra 1, em que foi possível detectar um íon de m/z próximo a maltotriose distribuído em uma faixa de tempo de retenção (3,21 min a 6,72 min), porém de perfil de fragmentação diferente (perda de 252 Da e formação dos íons de m/z 437 e 185).

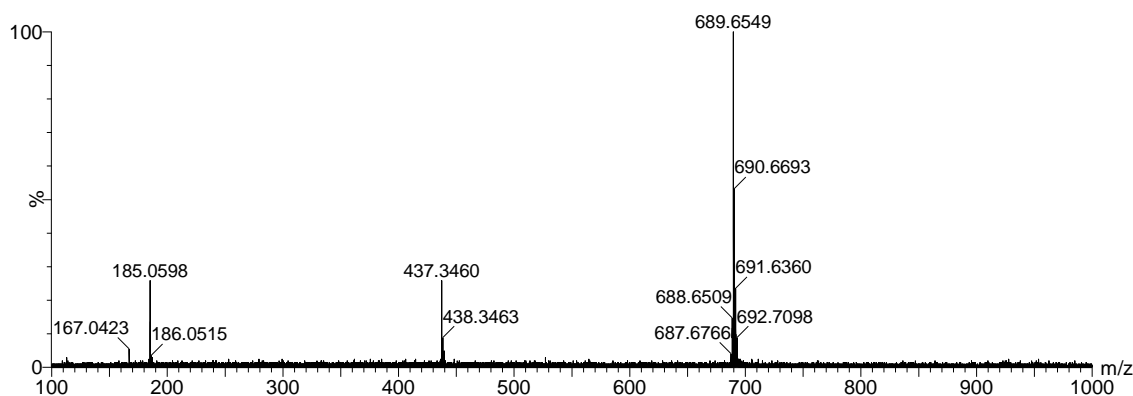


Figura 80. Espectro de massas, por EM-EM, do íon de m/z 689,6 obtido nos extratos das amostras 1 e 2 e com distinto perfil de fragmentação.

Para as amostras de café solúvel (3 e 4), foram observados os espectros de massa sequencial característicos da maltose, maltotriose e do íon de m/z 689 não identificado. Entretanto, tempos de retenção superiores aos registrados para as soluções padrão foram obtidos. Uma das justificativas para tal ocorrência pode ser mais uma vez o efeito da matriz, sendo neste caso o café solúvel, um produto obtido a partir da concentração de extratos de café por processos como evaporação convencional ou osmose reversa. A alternativa testada foi o preparo de soluções com menor concentração do soluto. A partir desta observação, foram preparados extratos a 1% (m/v) de café solúvel e, em substituição a etapa de purificação e possível concentração, realizou-se uma diluição 1:10 (v/v) do extrato cafeeiro.

As análises por CLUE-EM-EM destes extratos também apresentaram as mesmas alterações no tempo de retenção. Novas amostras comerciais de café solúvel (amostras 5 ao 8) foram testadas em duplicata e os perfis cromatográficos repetiram os mesmos resultados, com adição da detecção do íon de m/z 689,6 (Figura 81).

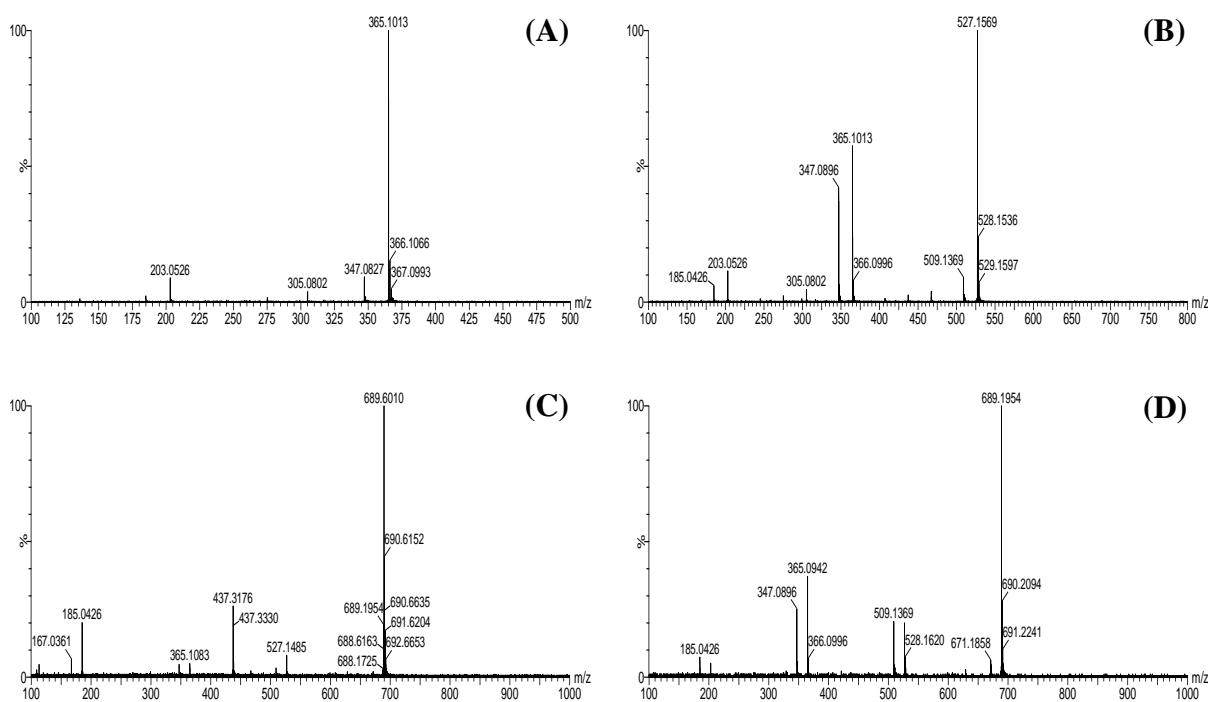


Figura 81. Espectros de massas, por EM-EM, obtidos no extrato da amostra de café solúvel 5: (A) íon m/z 365 ($t_R = 1,00$ min); (B) íon m/z 527 ($t_R = 3,57$ min); (C) íon m/z 689,6 ($t_R = 5,00$ min); e (D) íon m/z 689 ($t_R = 7,60$ min).

Estes resultados obtidos não indicaram a ocorrência de adulteração para as amostras analisadas, o que diverge principalmente daquelas cuja fraude havia sido confirmada pelo método por PCR em tempo real. Uma das possibilidades de otimização da metodologia ainda incluía o método de extração e também a inclusão de um tampão sodiado como fase móvel, aumentando a formação das moléculas cationizadas na fonte de ionização (TINKE et al., 1993; ZAIA, 2004), porém novos experimentos não puderam ser realizados devido a uma falha no injetor do cromatógrafo a líquido de ultra eficiência.

A ausência de recursos financeiros disponíveis e o atraso no conserto do equipamento prejudicaram a continuidade na busca de uma metodologia analítica ideal. Portanto, o potencial método qualitativo desenvolvido por CLUE-EM-EM ainda depende do reparo do equipamento e, em seguida, da otimização da metodologia analítica, o que possibilitará a investigação também de outras amostras comerciais de café e estudos com *blends* de café e adulterantes torrados e moídos.

5 CONCLUSÕES

As técnicas de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial (CLUE-EM-EM) demonstraram grande potencial para o estudo de carboidratos, sobretudo para diferenciação isomérica de oligossacarídeos.

Foi possível distinguir os diferentes analitos principalmente pelos perfis de fragmentação observados para cada oligossacarídeo por ionização por eletrospray em modo positivo. Através dos espectros de massas por EM-EM, a intensidade dos íons formados pode ser relacionada com o tipo de ligação glicosídica apresentada nas estruturas químicas dos analitos, em que se destaca a formação preferencial de cadeias cíclicas saturadas e, sobretudo, a ruptura preferencial de ligações glicosídicas α, β (1 \leftrightarrow 2).

Além disso, os cromatogramas obtidos por CLUE com coluna por interação hidrofílica (CIH) permitiram a separação cromatográfica dos oligossacarídeos investigados e uma boa repetitividade nos estudos com as soluções padrão. A detecção dos analitos é garantida pelo monitoramento em tempo real dos espectros de massas por EM-EM obtidos.

Entretanto, a aplicação para determinação de fraudes em café depende de alguns fatores. Foi verificado que o efeito da temperatura no processo de torrefação aplicado aos grãos de café e possivelmente aos adulterantes pode contribuir para a perda de detecção dos oligossacarídeos. O estudo com os adulterantes possibilitou confirmar inicialmente apenas a detecção de soja por rafinose e estaquiose. A presença dos demais adulterantes estudados (arroz, cevada e milho) pode ser identificada pela presença de maltotriose, um oligossacarídeo até então não relatado na literatura como marcador químico para estes adulterantes.

Os resultados com as amostras comerciais de café não evidenciaram a ocorrência de adulteração. Possivelmente, mesmo em um sistema com alta sensibilidade, a otimização da metodologia de extração ou até a inclusão de solventes sodiados serão necessários para a detecção dos oligossacarídeos mesmo em amostras de café anteriormente reprovadas pela presença de cevada.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido a esta dissertação consistir em um plano de ação de um projeto do Consórcio Pesquisa Café, novos experimentos com amostras comerciais de café devem ser executadas tão logo o cromatógrafo líquido a ultra eficiência esteja novamente em operação.

Como o café apresenta grande importância para a economia brasileira e os estudos com técnicas analíticas mais sensíveis é uma demanda do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, investimentos constantes são feitos para os projetos que visam a qualidade do café. Entretanto, é importante ressaltar a necessidade de que recursos financeiros sejam destinados não somente ao desenvolvimento e implantação das técnicas analíticas, mas também ao suporte aos laboratórios de pesquisa e aos de fiscalização para manutenção destes equipamentos de maior custo financeiro.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ. História. 2010. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38>>. Acesso em: 25 de agosto de 2016.

_____. Indicadores de Desempenho da Cafeicultura Brasileira. 2015a. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=52>>. Acesso em: 16 de setembro de 2015.

_____. Selo de Pureza. 2015b. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=14>>. Acesso em: 7 de outubro de 2015.

ALVES, R. C. et al. Isoflavones in Coffee: Influence of Species, Roast Degree, and Brewing Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 3002-3007, 2010.

ALVES, R. C. et al. Discrimination between arabica and robusta coffee species on the basis of their tocopherol profiles. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 295-299, 2009.

ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade? **Química Nova**, v. 32, p. 2169-2180, 2009.

AMAMO, A. A. Coffee Production and Marketing in Ethiopia. **European Journal of Business and Management**, v. 6, n. 37, p. 109-121, 2014.

AMBONI, R. D. D. M. C.; FRANCISCO, A. D.; TEIXEIRA, E. Utilização de microscopia eletrônica de varredura para detecção de fraudes em café torrado e moído. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 19, p. 311-313, 1999.

ANNESLEY, T. M. Ion Suppression in Mass Spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 1041-1044, 2003.

AQUINO, F. J. T. et al. Direct infusion electrospray ionization mass spectrometry applied to the detection of forgeries: Roasted coffees adulterated with their husks. **Microchemical Journal**, v. 117, p. 127-132, 2014.

ASSAD, E. D. et al. Identificação de impurezas e misturas em pó de café por meio de comportamento espectral e análise de imagens digitais. **Revista de Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 211-216, 2002.

BAGDONAITE, K.; DERLER, K.; MURKOVIC, M. Determination of Acrylamide during Roasting of Coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6081-6086, 2008.

BARBIN, D. F. et al. Application of infrared spectral techniques on quality and compositional attributes of coffee: An overview. **Food Research International**, v. 61, p. 23-32, 2014.

BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Coffee, Tea, Cocoa. In: (Ed.). **Food Chemistry**: Springer, 2009. p.938-970. ISBN 978-3-540-69934-7.

BERNAL, J. L. et al. HPLC Analysis of Carbohydrates in Wines and Instant Coffees Using Anion Exchange Chromatography Coupled to Pulsed Amperometric Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 507-511, 1996.

BIBI, A.; JU, H. Quantum dots assisted laser desorption/ionization mass spectrometric detection of carbohydrates: qualitative and quantitative analysis. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 51, n. 4, p. 291-297, 2016.

BICHO, N. C. et al. Use of colour parameters for roasted coffee assessment. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 32, p. 436-442, 2012.

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

BRASIL, MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Regulamento Técnico para o Café Torrado em Grão e para o Café Torrado e Moído Instrução Normativa nº 16, 24 de maio de 2010.

BRESCIANI, L. et al. Phenolic composition, caffeine content and antioxidant capacity of coffee silverskin. **Food Research International**, v. 61, p. 196-201, 2014.

CAI, T.; TING, H.; JIN-LAN, Z. Novel identification strategy for ground coffee adulteration based on UPLC–HRMS oligosaccharide profiling. **Food Chemistry**, v. 190, p. 1046-1049, 2016.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

CLIFFORD, M. N. et al. The chlorogenic acids content of coffee substitutes. **Food Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 99-107, 1987.

CODEX ALIMENTARIUS. Code of Practice for the Prevention and Reduction of Ochratoxin A Contamination of Coffee. 2009. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/11250/CXP_069e.pdf>. Acesso em: 19 de setembro de 2015.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira - Café. Safra 2015. 2: 1-59 p. 2015.**

CROTTI, A. E. M. et al. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, p. 287-292, 2006.

DE CONTI, M. C. M. D. et al. Características físicas e químicas de cafés torrados e moídos exóticos e convencionais. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos** v. 31, n. 1, p. 161-172, 2013.

DEMARQUE, D. P. et al. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 432-455, 2016.

DI STEFANO, V. et al. Applications of liquid chromatography–mass spectrometry for food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 74-85, 2012.

DOMINGUES, D. S. et al. Detection of roasted and ground coffee adulteration by HPLC by amperometric and by post-column derivatization UV–Vis detection. **Food Chemistry**, v. 146, p. 353-362, 2014.

DOMON, B.; COSTELLO, C. E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. **Glycoconjugate Journal**, v. 5, n. 4, p. 397-409, 1988.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 488-495, 2012.

ETTRE, L. S. Nomenclature for Chromatography (IUPAC Recommendations 1993). **Pure and Applied Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 819-872, 1993.

FABRIK, I.; ČMELÍK, R.; BOBÁĽOVÁ, J. Analysis of free oligosaccharides by negative-ion electrospray ion trap tandem mass spectrometry in the presence of H₂PO₄⁻ anions. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 309, p. 88-96, 2012.

FARAH, A. et al. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, v. 98, n. 2, p. 373-380, 2006.

FERREIRA, T. et al. Using Real-Time PCR as a tool for monitoring the authenticity of commercial coffees. **Food Chemistry**, v. 199, p. 433-438, 2016.

FRANCA, A. S.; MENDONÇA, J. C. F.; OLIVEIRA, S. D. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 7, p. 709-715, 2005.

FRANCA, A. S. et al. Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans. **Food Chemistry**, v. 90, n. 1–2, p. 89-94, 2005.

FUNED - FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. **Atlas de Microscopia - Café Torrado e Moído (Coffea sp)**. 2012. 48 p.

GARCIA, L. M. Z. et al. Chemometric Evaluation of Adulteration Profile in Coffee Due to Corn and Husk by Determining Carbohydrates Using HPAEC-PAD. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, n. 9, p. 825-832, 2009.

GHFAR, A. A. et al. Simultaneous determination of monosaccharides and oligosaccharides in dates using liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 176, p. 487-492, 2015.

GONZALEZ-RIOS, O. et al. Impact of “ecological” post-harvest processing on coffee aroma: II. Roasted coffee. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3–4, p. 297-307, 2007a.

_____. Impact of “ecological” post-harvest processing on the volatile fraction of coffee beans: I. Green coffee. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3–4, p. 289-296, 2007b.

HALL, S. et al. A review of the bioactivity of coffee, caffeine and key coffee constituents on inflammatory responses linked to depression. **Food Research International**, 2015.

HAMMAD, L. A. et al. Multiple-Reaction Monitoring Liquid Chromatography Mass Spectrometry for Monosaccharide Compositional Analysis of Glycoproteins. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, n. 6, p. 1224-1234, 2009.

HICKS, K. B.; HOTCHKISS JR, A. T. Chapter 15 Preparative HPLC of carbohydrates. In: ZIAD EL, R. (Ed.). **Journal of Chromatography Library**: Elsevier, v. 66, 2002. p.505-534. ISBN 0301-4770.

HOLČAPEK, M.; JIRÁSKO, R.; LÍSA, M. Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 3-15, 2012.

IBGE - INSTITUO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE - Estatística da Produção Agrícola - Agosto de 2016**, 2016.

ICO - INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Guidelines for the Prevention of Mould Formation in Coffee. 2006. Disponível em: <<http://dev.ico.org/documents/ed1988e.pdf>>. Acesso em: 19 de setembro de 2015.

_____. A história do café. 2016a. Disponível em: <http://www.ico.org/pt/coffee_storyp.asp>. Acesso em: 25 de agosto de 2016.

_____. Trade Statistic Tables. 2016b. Disponível em: <http://www.ico.org/trade_statistics.asp?section=Statistics>. Acesso em: 29 de agosto de 2016.

IKEGAMI, T. et al. Highly efficient analysis of underivatized carbohydrates using monolithic-silica-based capillary hydrophilic interaction (HILIC) HPLC. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 7, p. 2533, 2008.

ITIS - INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM. *Coffea* L., 2016. Disponível em: <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=35189>. Acesso em: 29 de agosto de 2016.

ITO, J. et al. Analysis of plant nucleotide sugars by hydrophilic interaction liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 448, p. 14-22, 2014.

IUPAC - INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Atomic Weights of Elements 1967. **Pure and Applied Chemistry**, v. 18, p. 569-580, 1969.

_____. Atomic Weights of the Elements 1989 (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 7, p. 975-990, 1991.

_____. **Compendium of Chemical Terminology, 2 ed. (the "Gold Book")**. Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org>>. Acesso em: 29 de agosto de 2016.

J.O.C.E. - JORNAL OFICIAL DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Decisão da Comissão de 12 de agosto de 2002 que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados.

JHAM, G. N. et al. The use of fatty acid profile as a potential marker for Brazilian coffee (*Coffea arabica* L.) for corn adulteration. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 1462-1467, 2008.

JHAM, G. N. et al. γ -Tocopherol as a Marker of Brazilian Coffee (*Coffea arabica* L.) Adulteration by Corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 5995-5999, 2007.

JIANG, Y.; COLE, R. B. Oligosaccharide analysis using anion attachment in negative mode electrospray mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, n. 1, p. 60-70, 2005.

JORGE, T. F. et al. Quantification and structural characterization of raffinose family oligosaccharides in *Casuarina glauca* plant tissues by porous graphitic carbon electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, *in press*.

JUMHAWAN, U. et al. Application of gas chromatography/flame ionization detector-based metabolite fingerprinting for authentication of Asian palm civet coffee (Kopi Luwak). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 5, p. 555-561, 2015.

KEW - ROYAL BOTANICAL GARDENS. *Coffea arabica* (Arabica coffee). 2016. Disponível em: <<http://www.kew.org/science-conservation/plants-fungi/coffea-arabica-arabica-coffee>>. Acesso em: 29 de agosto de 2016.

KNOPP, S.; BYTOF, G.; SELMAR, D. Influence of processing on the content of sugars in green Arabica coffee beans. **European Food Research and Technology**, v. 223, n. 2, p. 195-201, 2005.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009a.

_____. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. Campinas - SP: 2009b. 382 p.

LANÇAS, F. M. Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (HILIC). **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 49-57, 2010.

LAVANANT, H.; TOGNETTI, V.; AFONSO, C. Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry and Ab Initio Calculations of Phosphoric Acid Clusters. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v. 25, n. 4, p. 572-580, 2014.

LIU, Z.; ROCHFORD, S. Identification and quantitative analysis of oligosaccharides in wheat flour using LC-MS. **Journal of Cereal Science**, v. 63, p. 128-133, 2015.

MACRAE, R. **Food science and technology: a series of monographs: HPLC in food analysis**. 2. New York: Academic Press, 1998. 77 p.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, p. 214-222, 2009.

MCNAUGHT, A. D. Nomenclature of Carbohydrates (Recommendations 1996) - International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry and Molecular Biology. **Pure and Applied Chemistry**, v. 68, n. 10, p. 1919-2008, 1996.

- MEIJA, J. et al. Atomic weights of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 265-291, 2016.
- MENEZES JÚNIOR, J. B. F. Fraudes do Café. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 12, n. 1-2, p. 111-144, 1953.
- MILMAN, B. L. General principles of identification by mass spectrometry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 69, p. 24-33, 2015.
- MURKOVIC, M.; DERLER, K. Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 69, n. 1-2, p. 25-32, 2006.
- MUSSATTO, S. I. et al. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 5, p. 661-672, 2011.
- NARITA, Y.; INOUE, K. Review on utilization and composition of coffee silverskin. **Food Research International**, v. 61, p. 16-22, 2014.
- NÚÑEZ, O. et al. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1228, p. 298-323, 2012.
- OLIVEIRA, E. M. M. et al. Chapter 105 - Overview of Currently Applied Techniques for Detection of Adulterants in Coffee and Potential Use of DNA-Based Methods as Promising New Analytical Tools. In: PREEDY, V. R. (Ed.). **Coffee in Health and Disease Prevention**. San Diego: Academic Press, 2015. p.953-961. ISBN 978-0-12-409517-5.
- OLIVEIRA, M. A. et al. Quantificação dos teores de açúcares, oligossacarídeos e amido em genótipos/cultivares de soja (Glycine Max (L) Merrill) especiais utilizados para alimentação humana. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 1, p. 23-29, 2010.
- OLIVEIRA, R. C. S. et al. Evaluation of the potential of SPME-GC-MS and chemometrics to detect adulteration of ground roasted coffee with roasted barley. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 3, p. 257-261, 2009.
- OOSTERVELD, A.; VORAGEN, A. G. J.; SCHOLS, H. A. Effect of roasting on the carbohydrate composition of Coffea arabica beans. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 2, p. 183-192, 2003.
- PACHECO, S. et al. História da Cromatografia Líquida. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1225-1271, 2015.
- PAES, M. C. D. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. **Circular Técnica - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, v. 75, p. 1-6, 2006.
- PARK, E. et al. Analysis of oligosaccharides in beer using MALDI-TOF-MS. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1658-1664, 2012.
- PARRAS, P. et al. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 582-592, 2007.
- PATAY, É. B. et al. Antioxidant potential, tannin and polyphenol contents of seed and pericarp of three Coffea species. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 4, p. 366-371, 2016.

- PATERSON, R. R. M.; LIMA, N.; TANIWAKI, M. H. Coffee, mycotoxins and climate change. **Food Research International**, v. 61, p. 1-15, 2014.
- PAULI, E. D. et al. Detection of ground roasted coffee adulteration with roasted soybean and wheat. **Food Research International**, v. 61, p. 112-119, 2014.
- PENNA, N. et al. Study on the maltooligosaccharide composition of mucilage samples collected along the northern Adriatic coast. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 1, p. 120-126, 2009.
- REDGWELL, R.; FISCHER, M. Coffee carbohydrates. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 165-174, 2006.
- RODRIGUES, N. P.; BRAGAGNOLO, N. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC–DAD–MSn. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 32, n. 2, p. 105-115, 2013.
- ROGATSKY, E. et al. Sensitive LC MS Quantitative Analysis of Carbohydrates by Cs+ Attachment. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, n. 11, p. 1805-1811, 2005.
- ROGATSKY, E.; TOMUTA, V.; STEIN, D. T. LC/MS quantitative study of glucose by iodine attachment. **Analytica Chimica Acta**, v. 591, n. 2, p. 155-160, 2007.
- SANO, E. E. et al. Quantifying Adulteration In Roast Coffee Powders By Digital Image Processing. **Journal of Food Quality**, v. 26, n. 2, p. 123-134, 2003.
- SANTIAGO, M. C. P. A. et al. **Adaptations in HPLC method for fraud determination in coffee**. 7º Encontro Nacional de Cromatografia: Sociedade Portuguesa de Química 2012.
- SANTIAGO, M. C. P. D. A. **Avaliação de Processos para Obtenção de Produtos Ricos em Antocianinas utilizando Suco de Romã (Punica granatum L.)**. 2014. 137 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- SCHULZ, D. F. **Avaliação da utilização da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução como ferramenta para análise de alimentos** 2014. 179 p. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- SERPA FLÓREZ, F. Historia del café. **Boletín Cultural y Bibliográfico**, v. 7, n. 09, p. 4, 1964.
- SETTINERI, C. A.; BURLINGAME, A. L. Chapter 12 Mass Spectrometry of Carbohydrates and Glycoconjugates. In: ZIAD EL, R. (Ed.). **Journal of Chromatography Library**: Elsevier, v. 58, 1995. p.447-514. ISBN 0301-4770.
- SKARKA, B. S.; RADEJ, Z. Proof of adulteration of coffee with substitutes by means of paper chromatography. **Průmysl potravin**, v. 4, 1958.
- SMITH, R. M. Determination of 5-hydroxymethylfurfural and caffeine in coffee and chicory extracts by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 41-45, 1981.

SUNARHARUM, W. B.; WILLIAMS, D. J.; SMYTH, H. E. Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective. **Food Research International**, v. 62, p. 315-325, 2014.

TAORMINA, C. R. et al. Analysis of tear glucose concentration with electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 18, n. 2, p. 332-336, 2007.

TAVARES, K. M. et al. Free tocopherols as chemical markers for Arabica coffee adulteration with maize and coffee by-products. **Food Control**, v. 70, p. 318-324, 2016.

TAVARES, K. M. et al. Espectroscopia no infravermelho médio e análise sensorial aplicada à detecção de adulteração de café torrado por adição de cascas de café. **Química Nova**, v. 35, p. 1164-1168, 2012.

THE LANCET. **Coffee, and its adulterations.** The Lancet. Reino Unido. 57: 21-26 p. 1851.

TINKE, A. P. et al. Electrospray mass spectrometry of neutral and acidic oligosaccharides: Methylated cyclodextrins and identification of unknowns derived from fruit material. **Journal of Chromatography A**, v. 647, n. 2, p. 279-287, 1993.

UEKANE, T. M.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; REZENDE, C. M. Compostos Sulfurados no Aroma do Café: Origem e Degradação. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 5, p. 891-911, 2013.

VERSPREET, J. et al. Cereal grain fructans: Structure, variability and potential health effects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 43, n. 1, p. 32-42, 2015.

VESSECCHI, R. et al. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, v. 34, p. 1875-1887, 2011.

VILČIAUSKAS, L. et al. The mechanism of proton conduction in phosphoric acid. **Nat Chem**, v. 4, n. 6, p. 461-466, 2012.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. D. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1184-1192, 2008.

WALTER, T. H.; IRANETA, P.; CAPPARELLA, M. Mechanism of retention loss when C8 and C18 HPLC columns are used with highly aqueous mobile phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1075, n. 1-2, p. 177-183, 2005.

WAN, E. C. H.; YU, J. Z. Determination of sugar compounds in atmospheric aerosols by liquid chromatography combined with positive electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1107, n. 1-2, p. 175-181, 2006.

WATERS. **Manual de Operação Espectrômetro de Massas Synapt G1**, 2008.

YANG, H. et al. Identification of reducing and nonreducing neutral carbohydrates by laser-enhanced in-source decay (LEISD) MALDI MS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 48, n. 5, p. 539-543, 2013.

ZAIA, J. Mass spectrometry of oligosaccharides. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 23, n. 3, p. 161-227, 2004.

ZHOU, J. et al. Analysis of maltooligosaccharides in honey samples by ultra-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection. **Food Research International**, v. 56, p. 260-265, 2014.

ANEXOS

ANEXO A – RESULTADOS DO PROCESSO DE TORREFAÇÃO DOS GRÃOS

ANEXO B – RESULTADOS DA ANÁLISE POR PCR EM TEMPO REAL DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE CAFÉ

ANEXO A – RESULTADOS DO PROCESSO DE TORREFAÇÃO DOS GRÃOS

Os grãos de milho, soja, cevada e arroz integral, matrizes muito utilizadas como adulterantes, foram submetidos separadamente a tratamento térmico. A Tabela 32 relaciona as condições de processamento (tempo e temperatura) previamente estabelecidas em outro plano de ação do mesmo projeto do Consórcio Pesquisa Café, sob execução do pesquisador D.Sc. Otniel Freitas e pela aluna Cinthia Couto, mestranda em Alimentos & Nutrição (UNIRIO), ambos da Planta de Pós-Colheita da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

Tabela 32. Condições de processamento térmico de cada adulterante.

Amostra	Equipamento (torra)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Arroz cru grão	Forno convencional modelo Milano, da marca Continental (Brasil)	230	50
Cevada crua grão	Forno convencional modelo Milano, da marca Continental (Brasil)	230	100
Milho cru grão	Torrador doméstico de café modelo CBR-101, da marca Gene Café® (Coréia do Sul)	250	30
Soja cru grão	Torrador doméstico de café modelo CBR-101, da marca Gene Café® (Coréia do Sul)	245	15

Foram feitos testes preliminares até a obtenção de uma torra que se assemelhasse visualmente à coloração do café torrado e moído. O milho e a soja foram processados em torrador de bancada por ter tamanho similar ao grão de café possibilitando seu uso neste equipamento, diferentemente dos demais adulterantes, torrados em forno convencional. Além disso, para os grãos de milho, a torrefação em forno convencional apresentou uma coloração mais clara que o café, necessitando de um excessivo tempo de torra, o que degradaria mais sua matriz. Em contrapartida, o arroz e a cevada, mesmo em forno convencional, apresentaram colorações similares ao café torrado e moído nas condições descritas na Tabela 32.

ANEXO B – RESULTADOS DA ANÁLISE POR PCR EM TEMPO REAL DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE CAFÉ

As amostras 1-4 foram disponibilizadas pela pesquisadora D.Sc. Edna Oliveira e pelo aluno Thiago Ferreira, doutorando em Nutrição (UFRJ), ambos do Laboratório de Diagnóstico Molecular da Embrapa Agroindústria de Alimentos. A partir da metodologia por PCR em tempo real, foram analisadas diferentes amostras de café comercial, sendo os resultados publicados na revista *Food Chemistry* (FERREIRA et al., 2016). A Tabela 33 descreve os resultados obtidos para as amostras 1-4, que foram posteriormente analisadas nesta dissertação.

Tabela 33. Detecção por PCR em tempo real de adulterantes em amostras comerciais de café.

Amostras	Média Limiar de Ciclos	Coefficiente de Variação (%)	Detecção (Adulterante)	Quantificação (% Adulterante)
1	33,3 ± 0,1	0,300	Cevada	1,0
2	33,0 ± 0,7	2,121	Cevada	1,2
3	31,8 ± 0,8	2,516	Cevada	2,3
4	30,6 ± 0,3	0,980	Cevada	4,8