

RELAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO POLIFENOLOXIDASE, PEROXIDASE
E CATALASE DOS GRÃOS DE CAFÉ E A QUALIDADE DA BEBIDA.

João Carlos de Oliveira
Engenheiro Agrônomo

Engenheiro Agrônomo do Centro de Pesquisa
do Café de Caratinga Minas Gerais

INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ

Prof. Darcy Martins da Silva
Orientador

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz" da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor.

PIRACICABA - SÃO PAULO
BRASIL - 1972

A meus pais, e

esposa

Dedico

A G R A D E C I M E N T O S

No andamento do presente trabalho, inestimáveis esforços de colaboração foram aplicados por diversas pessoas. Agradecimentos especiais ao Prof. DARCY MARTINS DA SILVA, pela orientação e estímulo nos momentos difíceis e decisivos da pesquisa e a quem devo minha formação científica.

Particularmente agradeço aos colegas e funcionários

Prof. Henrique Vianna de Amorim
Engº Agrº Aldir Alves Teixeira
Prof. Décio Barbin
Prof. Frederico Pimentel Gomes
Prof. Roland Venkovisky
Prof. Ruy de Araújo Caldas
Engº Agrº Alcides Carvalho
Engº Agrº Dorival C. Monaco
Engº Agrº José Maria Jorge Sebastião
Engº Agrº Anselmo Bonifácio
Engº Agrº Joaquim Eure Pereira
Rui Araujo
Ayrton Negreiros Coelho
Claudio Bereta
Salvador Ferrari
Claudio Colombi
Aurea Michelotto
Heloisa Helena Rossini

e as seguintes entidades

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Instituto Brasileiro do Café
Instituto Agronômico de Campinas

Í N D I C E

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. A prova de xícara como método para avaliar as qualidades organolépticas do café	4
2.2. Fatores extrínsecos que podem alterar as propriedades organolépticas do café	6
2.3. Compostos orgânicos encontrados no grão de café com prováveis relações com a qualidade da bebida	9
2.4. Qualidade da bebida do café e defensivos agrícolas.	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Materiais	15
3.1.1. Amostras de café de bebida mole, apenas mole, dura, riada e rio, para análise das atividades enzimáticas	15
3.1.2. Amostragem de grãos de café de locais onde ocorrem com frequência bebidas típicas	21
3.1.3. Coleta de amostra de <u>C. canephora</u> var. <u>bukobensis</u> , <u>C. dewevrei</u> , <u>C. liberica</u> e <u>C. arabica</u>	22
3.1.4. Amostras de grãos de café degomados com solução alcalina e degomados naturalmente	25
3.1.5. Amostras de grãos de café de cafeeiros tratados com inseticidas	25
3.1.6. Armazenamento das amostras	26
3.1.6.1. Armazenamento das amostras padrão de bebidas	26
3.1.6.2. Armazenamento das demais amostras	27
3.2. Métodos	27
3.2.1. Moagem do grão de café	27

3.2.2.	Extração e determinação da atividade do poli fenoloxidase (PFO	27
3.2.3.	Extração e determinação da atividade do cata lase	28
3.2.4.	Extração e determinação da atividade do pero xidase	29
3.2.5.	Determinação de nitrogênio total no extrato do grão de café	29
4.	RESULTADOS	30
4.1.	Seleção de condições para os testes com PFO, Catala se e Peroxidase	30
4.2.	Resultados das atividades enzimáticas de grãos de café de bebida mole, apenas mole, dura, riada e rio	30
4.2.1.	Atividade do polifenoloxidase e qualidade da bebida	30
4.2.2.	Atividade do Peroxidase e qualida da bebida.	35
4.2.3.	Atividade do Catalase e qualidade da bebida.	37
4.3.	Influência de locais, de variedades, de épocas após colheita sobre a atividade do PFO e qualidade da be bida (grãos degomados com solução alcalina)	38
4.3.1.	Testes com "prova de xícara"	38
4.3.2.	Atividade do polifenoloxidase de grãos de ca fé com 1, 2 e 3 meses após a colheita . . .	41
4.3.2.1.	Atividade do PFO após 1 mês de co lheita	41
4.3.2.2.	Atividade do PFO após 2 meses de co lheita	42
4.3.2.3.	Atividade do PFO após 3 meses de co lheita	43
4.3.2.4.	Resultados da atividade do PFO das variedades - Mundo Novo e Bourbon Amarelo, de diversos locais, com amostras degomadas com alcali e 1, 2 e 3 meses após a colheita	44
4.4.	Resultados do PFO de grãos de café cereja natural - mente degomados de quatro espécie de café e de grãos imaturos da espécie arábica em 1, 2 e 3 meses após a colheita	45

	Página
4.4.1. Resultados obtidos com 1 mês após a colheita	45
4.4.2. Resultados obtidos com 2 meses após a colheita	46
4.4.3. Resultados obtidos com 3 meses após a colheita	48
4.4.4. Resultados obtidos com 1, 2 e 3 meses após a colheita	49
4.5. Influência da degomagem natural e da degomagem com solução alcalina de grãos de café sobre a atividade do PFO	52
4.6. Influência de inseticidas para o controle da broca do café, sobre a qualidade da bebida e a atividade enzimática do PFO	53
4.6.1. Influência dos inseticidas sobre a atividade enzimática	53
4.6.2. Influência dos inseticidas sobre a qualidade da bebida	54
5. DISCUSSÃO	56
5.1. Estudo das atividades enzimáticas do Polifenoloxidase, Catalase e Peroxidase, em amostra de café de bebida mole, apenas mole, dura, riada e rio	56
5.1.1. Escolha do intervalo ótimo para análise dos resultados e metodologia de determinação da atividade enzimática	56
5.1.2. Escolha da concentração do extrato enzimático e a faixa de leitura ótima para o estudo da atividade enzimática	57
5.1.3. Comparações da atividade do PFO de amostras de bebida mole, apenas mole, dura, riada e rio	57
5.1.4. Comparações da atividade do peroxidase de amostras de bebida mole, apenas mole, dura, riada e rio	58
5.1.5. Comparações da atividade do catalase de grãos de amostras de bebida mole, apenas mole, dura, riada e rio	59

	Página
5.2. Influência de locais, de variedades, de épocas após colheita sobre a atividade do PFO e a qualidade da bebida (grãos degomados com solução alcalina) . . .	59
5.3. Atividade do PFO de grãos de café de quatro espécies de café, degomados naturalmente e de grãos imaturos da espécie arábica, em 1, 2 e 3 meses após a colheita	60
5.4. Efeito da degomagem alcalina e natural na atividade do PFO	61
5.5. Influência de inseticidas aplicados no cafeeiro na fase de grãos em desenvolvimento sobre a atividade do PFO e a qualidade da bebida	62
6. CONCLUSÕES	64
7. RESUMO	66
8. SUMMARY	69
9. BIBLIOGRAFIA CITADA	72

* * *

1. INTRODUÇÃO

Vários problemas se apresentam na conjuntura cafeeira e um deles, a de melhoria da qualidade, é de grande importância.

É notória a inferioridade do café brasileiro em relação a de outros países produtores de café arábica das Américas o que lhe dá baixa cotação no mercado. É somente superior aos cafés africanos. A melhoria da qualidade do produto é necessário para fazer face à concorrência de outros países e manter hegemonia no mercado.

Há certas regiões do país (Zona da Mata e Vale do Rio Doce em Minas Gerais, Vale do Paraíba em São Paulo, Estado do Espírito Santo, Estado do Rio de Janeiro) que produzem cafés de qualidade inferior, em geral "bebida rio". Trabalhos experimentais mostraram que mesmo nessas regiões é possível melhorar, a bebida, tendo certos cuidados na colheita preparo e beneficiamento do produto.

A prática com despulpamento, mesmo em regiões com predomínio da bebida rio, pode melhorar a qualidade do café, me -

lhorando o aroma e o gosto.

Trabalhos experimentais mostraram que grãos parciais ou totalmente deteriorados, poderão ocasionar desvalorização na qualidade da bebida, além do natural rebaixamento do tipo.

Há muitos anos o café é a fonte principal de divisas para o Brasil, influenciando na vida econômica do país. Da sua maior ou menor exportação e dos preços dos mercados depende em grande parte o equilíbrio da nossa balança de pagamentos. É interessante destacar que o Brasil vem perdendo gradativamente sua hegemonia no mercado e as cotações são sempre menores que a de seus congêneres americanos.

No quadriênio 1901-1904 o Brasil era responsável por 75 - 84% da produção mundial, em 1948-1952 era de 53% e entre 1965-1967 de apenas 34%, mostrando claramente que a participação no mercado externo vem diminuindo em relação a demanda total (BEGAZZO, 1970). Mas é ainda o Brasil o maior produtor mundial de café, contribuindo com cerca de 30% da produção mundial.

É também o maior exportador com cerca de 15 a 20 milhões de sacas anuais. O nosso consumo interno é cerca de 8 a 9 milhões de sacas de café beneficiado. Por outro lado, o café ocupa o segundo lugar, depois do petróleo, no comércio mundial.

Na opinião de TEIXEIRA (1971), o preço da venda do café depende de dois fatores: qualidade e tipo. A qualidade depende do aspecto, cor e tamanho da fava, bebida, etc. A qualidade da bebida é o fator mais importante na classificação por qualidade, e esta é avaliada por provadores oficiais especificamente treinados para diferenciar os cafés quanto às suas propriedades organolépticas. Basicamente são adotadas as classificações de: Mole, Dura e Rio. O café mole apresenta gosto suave, adocicado, ou com acidez suave e agradável ao paladar. Dura - gosto acentuadamente áspero e adstringente. Rio - gosto forte, característico, lembrando iodo fórmio ou ácido fênico.

Há ainda as classes intermediárias que são: Apenas Mole, entre dura e mole; Estritamente mole, melhor que a mole; Rio dividida em quatro: levemente riada ou dura com fundo rio, Riado, e Rio macaco ou Rio Zona da Mata.

O tipo de café é dado pelo número de defeitos isto é, a presença quantitativa de grãos pretos, pedra, pau, grãos brocados, etc. A cada defeito se atribui um número de pontos, que depois de somados determinam uma certa classificação.

Devido a importância da qualidade da bebida do café vem sendo desenvolvida uma técnica na determinação dessa qualidade através de medida de atividade enzimática. Assim pois, os objetivos da presente tese foram:

- a) . estudar as atividades enzimáticas do polifenoloxidase, peroxidase e catalase relacionando com as bebidas padrões;
- b) . em virtude, dos resultados obtidos com o polifenoloxidase, passamos a estudar mais pormenorizadamente alguns fatores que podiam afetar a atividade enzimática do polifenoloxidase e a qualidade da bebida.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A prova de xícara como método para avaliar as qualidades organolépticas do café

Segundo citações de TEIXEIRA (1972a), a prova de xícara surgiu no Brasil no início do século XX e foi adotada pela Bolsa Oficial do Café e Mercadorias de Santos, a partir de 1917, - pouco depois de sua instalação em 1914. No entanto, não se estabeleceu um critério uniforme para a sua realização, por que o critério varia de organização para organização.

O fator mais importante na determinação da qualidade do café é sem dúvida a bebida. Pois, defeitos físicos como - grãos brocados, imaturos, ardidos, paus, pedras, atualmente com as modernas máquinas de beneficiamento e rebeneficiamento podem ser prontamente eliminados. A qualidade da bebida é uma propriedade - que depende de numerosos fatores que atuam durante a obtenção do produto e que poucas vezes pode ser melhorada.

A avaliação da bebida é feita por degustadores, em função, principalmente, do sentido do gosto, do olfato e do tacto.

A combinação do aroma e do gosto, confere o sabor.

Os técnicos selecionados, devem num ensaio preliminar distinguir ao menos um café Rio de um Mole.

Em linhas gerais a prova é feita da seguinte forma: O grão de café, após ter sido torrado e moído em granulações apropriada, é colocado em xícaras. A experiência recomendada a proporção de 10 gramas de pó para 100 ml d'água, a qual é colocada sobre o pó quando em ponto de primeira fervura. A infusão é agitada com uma concha. Nessa oportunidade, o classificador já deve cheirar a infusão, a fim de obter um julgamento preliminar dos vapores desprendidos. Assim o degustador poderá ter indicações de certa importância na qualificação da bebida.

O exame final é feito depois que o pó depositou no fundo do pirex e a infusão estiver morna. Com auxílio de uma concha sorve-se cuidadosamente algumas porções da infusão, com a finalidade de julgar o gosto daquela bebida. Nesta operação, o degustador conserva o gole de café na boca, apenas o tempo suficiente para avaliar o seu sabor, expelindo-o, a seguir, numa cuspidreira.

ANTUNES FILHO (1955), afirma que através da prova sensorial, tanto a classificação de vinhos como da qualidade da bebida do café, tem sido satisfatória para fins de comercialização.

CALLE (1956), falando sobre a subjetividade da prova de xícara, afirma ser ela limitada pela aptidão do provador, que pode ser deformada e que não é possível ser medida.

MÔNACO (1958), reconhece que, embora a determinação da qualidade da bebida esteja a erros devido a discrepância do paladar, não se encontrou ainda outra solução, em vista da complexidade dos vários fatores que afetam.

CARVALHO (1959), focalizando a qualidade da bebida, afirma ser um dos aspectos mais importantes na indústria do café, sendo inclusive considerada no mercado internacional, como característica de maior relevância que o próprio aspecto físico do produto.

FAIRBANKS BARBOSA, citado por TEIXEIRA (1972b) afirma ser a prova de xícara a operação mais importante na determinação da qualidade do café.

FAIRBANKS BARBOSA et al. (1962), verificando resultados discordante em amostras provadas por diferentes degustadores, realizaram estudos com bases estatísticas visando determinar a validade da prova de xícara. Os resultados mostraram que, com técnicas adequadas e degustadores capacitados, a prova de xícara é perfeitamente válida dentro de certos limites.

TEIXEIRA (1972b), com bases em testes de degustações estabeleceu em forma precisa a técnica experimental para ensaios de degustação de café.

2.2. Fatores extrínsecos que podem alterar as propriedades organolépticas do café

Segundo BITTENCOURT (1956 e 1957), a qualidade do café está relacionada, principalmente, com fermentações e deteriorações, assinalando que as condições e características da região tem também muita importância. O mesmo autor (1957) tendo em vista os resultados de trabalho anterior, obteve resultados satisfatório com pulverizações de calda bordaleza a 1%, em cafeeiros com frutos. Este tratamento pode melhorar a bebida, especialmente em que as condições de tempo são favoráveis à deterioração do café, tanto durante a secagem nos terreiros, como nos próprios cafeeiros, no momento da maturação e da seca dos frutos.

KRUG (1940a, 1940b e 1941), estudando a origem dos cafés de bebida inferior, concluiu que os cafés secos no chão apresentavam-se mais atacados por microorganismo (*Fusarium* sp), ficando com gosto pior. No café cereja não foram encontrados fungos que pudessem alterar a bebida. O mesmo autor concluiu que, havendo ataque mais intenso de microorganismo, obtém-se bebida pior.

FERRAZ e VEIGA (1954-1959), estudando o efeito da temperatura de secagem do café na qualidade da bebida, verificaram

que em certas temperaturas o café produzido era de boa qualidade e em outras, não. Lançaram algumas hipóteses sobre a influência das enzimas que poderiam afetar a qualidade, assim como relacionaram - os melhores cafés com os de maior poder germinativo.

LAZZARINI e MORAES (1958), estudaram a possibilidade de os grãos de café, parcial ou totalmente deteriorados, existentes normalmente no café beneficiado, poderem ocasionar desvalorização na qualidade da bebida, além do natural rebaixamento do tipo. Cafés de bebida dura em que se encontrava elevada quantidade de grãos defeituosos, quando limpos, ou seja, isentos desses defeitos foram classificados como bebida estritamente mole e mole. Com menores proporções de grãos deteriorados eram obtidas bebidas de classificação intermediária. Para os cafés de padrão rio não houve variação na classificação e as amostras com ou sem grãos deteriorados, apresentavam-se sempre com a mesma bebida.

CARVALHO et al. (1970), estudando a ocorrência dos principais defeitos do café em várias fases de maturação do fruto concluíram: o defeito "grão imaturo", em várias tonalidades, foi encontrado com maior frequência nas frações de fruto imaturo e em ordem decrescente, nas frações secadas anormalmente, meio maduro, maduro, passa, seco normal e sêco no chão. Os dados mostram que os chamados grãos imaturos não provêm exclusivamente de grãos imaturos, pois ocorrem com frequência em todas as frações estudadas. Os grãos ardidos tiveram frequência mais elevada na fração sêca no chão e decresceram nas frações sêco normal, secado anormalmente - imaturo, meio imaturo, maduro e passa; essa ocorrência, em todas as frações estudadas indica que tal defeito deve resultar de várias causas, e não apenas de fermentações anormais, como geralmente é considerado. O defeito "grão preto" apareceu com maior frequência no café sêco no chão e, em ordem decrescente, nos frutos secos normal e sêco anormal, não ocorrendo nas demais frações.

TEIXEIRA et al. (1971a), estudando grãos defeituosos em café colhido imaturo notou uma elevada porcentagem de grãos normais quanto a coloração, e também a ocorrência de grãos dos tipos "ardidos" e "pretos", no café não maduro. Com a remoção da película prateada verificou-se uma redução na porcentagem de grãos

"imaturos" e um acentuado aumento na porcentagem de grãos "ardidos", e um aumento menor na porcentagem de grãos "normais" e "pretos". Estas observações indicam que os grãos normalmente classificados - no comércio como "imaturado" devem esta característica à côr anormal da película, e que os grãos ardidos tem, como uma de suas origens, a colheita de frutos imaturos.

TEIXEIRA et al. (1968a, 1969a, 1969b) quantificou o efeito desses componentes isoladamente. Assim, determinou que com o aumento de grãos imaturos, ardidos e pretos em ligas com grãos de bebida mole, prejudicava sensivelmente a qualidade da bebida em uma progressão aritmética, decrescente com o aumento do teor desses grãos.

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

GARRUTTI et al. (1961), estudando a influência do processo da colheita e preparo do café, na região do Vale do Paraíba, sobre a qualidade da bebida do café, concluíram que o produto dos frutos cerejas despulpados não diferiu estatisticamente, de bebida mole. Entretanto o café derrichado e preparado por via sêca alcançou as piores médias: duro e riado. O produto dos frutos cerejas não despulpados se mostrou equivalente ao padrão mole em 1958, mas foi inferior em 1959.

GARRUTTI e GOMES (1961), em trabalho realizado no Vale do Paraíba, concluíram que o produto dos frutos cerejas despulpados alcançou sempre a melhor bebida, mas não diferiu do produto provenientes dos frutos cerejas não despulpados e de bebida padrão mole.

BEGAZZO (1970), em ensaios visando conhecer relações entre degomagem e qualidade da bebida, degomagem-armazenamento e bebida em café despulpado, degomados com fermentação natural, comum e prolongada, soda cáustica, fermento Fleischman e Mucilax, não verificou os efeitos dos processos de degomagem sobre a qualidade da bebida, que foi predominantemente de padrão duro. E, não houve modificações da bebida, em relação ao armazenamento do café durante um ano. Houve diferenças no rendimento, de acordo com a degomagem, pois quanto maior o tempo de degomagem, tanto maior a quebra no rendimento. Em relação ao tratamento com soda cáustica, as quebras no rendimento foram de 1,7% e 7,4%, respectivamente, para os tratamentos de fermentação natural, com 18 e 36 horas.

2.3. Compostos orgânicos encontrados no grão de café com prováveis relações com a qualidade da bebida

CALLE (1955 e 1963) na Colômbia tentou desenvolver alguns testes qualitativos para a determinação da qualidade da bebida do café, mas até hoje não tem sido utilizados na prática devido a sua alta variabilidade.

GARRUTTI et al. (1962), analisando o teor de sólidos solúveis em amostras de diferentes bebidas, não encontraram diferenças significativas.

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

MENCHU (1966) encontrou correlação entre extrato etéreo e quantidade de fibra crua com a qualidade da bebida. Quanto maior a quantidade de extrato etéreo e menor a quantidade de fibra crua, melhor era o café. Posteriormente o mesmo autor (MENCHU e IBARRA, 1967) analisando cafés de várias regiões, não encontraram essa mesma relação. A correlação da qualidade da bebida com a composição química (extrato etéreo, nitrogênio, cafeína, trigonelina

e fibra crua) variava dependendo da região considerada.

WURZIGER e DICKHAUT (1967), isolaram vários compostos fenólicos da cêra que envolve o grão de café e verificaram que estes fenóis tinham um alto poder antioxidante. Observaram também, que, dependendo da procedência, a qualidade desse composto varia - va. Em 1969 WURZIGER e HARMS, isolaram e determinaram a estrutura e a quantidade de três desses componentes, que são 5- hidroxitriptamida do ácido aráquico, do ácido lignocérico e do ácido behênico. Analisando para estes compostos várias amostras de café arábica de Quênia, as quais diferiam quanto a qualidade da bebida, encontraram uma correlação interessante: quanto pior o café menor a quantidade de 5 hidroxitriptamida e mais amarelada ou marrom a cor do grão, se apresentava.

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

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

ILLY e RUZZIER (1967) através da cromatografia de gás, procuraram correlacionar os defeitos dos cafés com a qualidade da bebida e a forma das curvas no cromatograma. Encontraram relação entre a intensidade de alguns picos e "ombros" e o gosto amargo, mas em nenhum caso tentaram identificar os compostos responsáveis pelo sabor ou aroma.

Utilizando também o cromatografia de gás, BIGGERS et al. (1969) compararam a forma dos picos e a qualidade da bebida por uma avaliação programada em um computador eletrônico. Puderam desta maneira diferenciar café robusta de arábica como também de determinar a porcentagem de robusta e arábica em uma liga de dois cafés.

Em estudos de componentes voláteis do café cru submetidos a diferentes processos de desmucilagem, a composição química e a prova de xícara não apresentaram diferenças sensíveis, mas quando RODRIGUES et al. (1969) submeteram o café a 5 e 7 dias de fermentação, a qualidade do café piorou bastante e a quantidade do aldeído acético detectado dobrou, e paralelamente, os teores de di metil sulfeto, acetona e aldeído isobutírico decresceram.

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

CENTI-GROSSI et al. (1969) tentaram correlacionar os teores de albuminas removidas de quatro diferentes cafés arábicas (Colombia - Armênia, Costa Rica - S. Rosa, Brasil - Santos, Venezuela - Perla) e de dois robusta (canefora Indiano e do Congo), separando-as por eletroforese em gel de poliacrilamida. Os resultados obtidos não mostraram diferenças entre os cafés estudados.

Um estudo detalhado foi conduzido pelos pesquisadores da General Foods Co., (FELDMAN et al., 1969), que estudaram as proteínas, amino ácidos, carboidratos e ácidos fenólicos do café cru e sua variação durante a torração, chegaram a conclusão de que com os métodos utilizados era praticamente impossível correlacionar qualidade de bebida com a composição química.

AMORIM e SILVA (1968a e 1968b) encontraram uma correlação positiva entre a qualidade da bebida do café brasileiro e a atividade enzimática da polifenoloxidase. Os autores acham que os melhores cafés possuem uma atividade relativamente maior devido ao fato de que os piores cafés passaram por condições de injúrias (que pode ser de causa patológica) e assim a quantidade de fenóis oxidados (enzimaticamente ou não) aumentou inativando desta maneira o enzimo polifenoloxidase. O mecanismo da inativação do polifenoloxidase pelas quinonas formadas já é conhecida na literatura (FORSYTH, 1964).

Posteriormente, ROTEMBERG e IACHAN (1970), confirmaram êsses resultados. Os mesmos autores no ano seguinte propuseram um método químico automático para diferenciação de café-bebida.

Induzindo em café despulpado diferentes qualidades de bebida por meio de diversos tempos de fermentação, SANINT e VALÊNCIA (1970), na Colômbia, observaram que também para cafés despolpados a atividade do polifenoloxidase era maior nos melhores cafés.

PEREIRA (1962) estudando a atividade enzimática de clorogênico-oxidase em grãos de café originados de E.R. do Ganda, E.R. do Congo, E.R. do Amboim, concluiu que a atividade enzimática dos grãos decai com a idade. A amostra do E.R. do Congo apresentava atividade enzimática sensivelmente melhor.

SHADAKSHARASWAMI e RAMACHANDRA (1968), estudando a atividade do α galactosidase em grãos de café arábica e robusta encontrou que a atividade da enzima era elevada em grãos em repouso e aumentou de 50-75% durante o umedecimento e mais 25-55% durante a germinação. Os aumentos foram mais elevados nas sementes de C. arábica do que nas de C. robusta.

CORTE DOS SANTOS et al. (1971) estudando o efeito da umidade do ambiente na qualidade da bebida e na atividade de alguns enzimas observaram que somente quando a umidade relativa do ar era de 50% havia um aumento na atividade da lipase. Com relação a enzimas proteolíticas não encontraram diferenças significativas, e para ribonuclease não conseguiram adaptar um método.

AMORIM (1972a) encontrou as seguintes relações com alguns compostos do grão: o teor de ácido clorogênico em café de bebida mole foi menor e significativo ao nível de 5% com relação aos cafés de bebida rio, riada e dura. Os ácidos isoclorogênico e neoclorogênico não apresentaram diferenças significativas. Os teores de fenóis totais solúveis em água e metanol a 80% não apresentaram diferenças significativas. Quanto ao teor de carboidratos livres e açúcares redutores, embora se apresentassem um pouco dife

rente não diferiram estatisticamente. Os teores de proteínas solúveis em NaCl a 10% foram maiores no café duro e menores no rio (significativo a 5%). A eletroforese em gel-agar mostrou diferenças significativas ao nível de 1% entre os cafés estudados. Excluindo o café "duro", houve uma tendência linear quanto ao caminharmento das proteínas dos outros cafés em relação à bebida, e, quanto maior o caminharmento para o polo negativo pior a bebida.

2.4. A qualidade da bebida do café e defensivos agrícolas

É sabido, que grãos de café, armazenado podem absorver cheiro de produtos colocados próximo ao armazenamento.

Assim, o uso indiscriminado desses produtos podem influenciar na qualidade da bebida sem alterar outras qualidades.

SEIXAS (1948) não encontrou diferenças na qualidade da bebida do café, tratando cafeeiros frutificados com BHC a 2%, DDT a 5% e Rhodiatox a 0,25% para o controle da broca do café.

Segundo PEIXOTO (1970) é prática corrente a desinfecção periódica dos cafés armazenados do IBC, e mesmo em vagões, silos, navios de transporte, etc. Os produtos usados são: Brometo de Metila com cloropicrina (35 g/m³), produtos a base de fosfina 1,5 g/m³ e Malathion em pulverização ou atomização sobre pisos, paredes, sacarias vazias e café empilhado.

BITTENCOURT (1957), tratando frutos de cafeeiros em desenvolvimento com calda bordaleza a 1%, concluiu que o tratamento pode melhorar a qualidade da bebida.

TEIXEIRA et al. (1971b), relacionando efeito de diversos fungicidas, utilizados no controle da ferrugem do cafeeiro, e a bebida do café, não encontraram influência dos mesmos sobre a qualidade da bebida.

ORLANDO et al. (1968) em estudos sobre o emprêgo de lindane (Isômero Gama) na forma de "fumetas", contra as infesta -

ções do caruncho do café, concluiu que não havia alteração da qualidade da bebida do café utilizando-se quatros tratamentos de BHC, na concentração de 50 g com 18% de princípio ativo/150 m³.

Em trabalhos com tubérculos de batatas SCIVITTARO et al. (1963) constataram que tratamento da folhagem com BHC e Lindane, pode transmitir gosto ao tubérculo, e a alteração era proporcional a concentração do inseticida usado.

Em recente revisão sobre o assunto GIANNOTTI et al. (1972) afirmam que apenas BHC e Lindane, dos produtos recomendados, foram capazes de alterar o gosto de certos vegetais como batatinha, amendoim, laranjas e outras frutas assim como hortaliças em geral. Com relação a batatinha tem sido verificado alteração de gosto mesmo quando seu cultivo se processa em áreas anteriormente utilizadas para lavoura que receberam aplicações com BHC e Lindane. No café embora sua aplicação se processe já há alguns anos, não foram observados alterações que possam prejudicá-lo na comercialização - dêsse produto. Com outros inseticidas não foram observados fenômenos semelhantes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Amostras de café de bebida mole, apenas mole, dura, riada e rio, para análise das atividades enzimáticas

Para o presente ensaio foram coletadas, durante os meses de maio a setembro de 1969, aproximadamente 125 amostras de café da safra 68/69, provenientes de regiões cafeicultoras do Estado de São Paulo e Zona da Mata de Minas Gerais. E, para se ter certeza de que as amostras de café de diferentes procedências ou de diferentes qualidades não fossem misturadas, prejudicando o ensaio, foram coletadas diretamente nas fazendas e armazens de cooperativas.

A obtenção dessas amostras foi planejada levando-se em conta o zoneamento do Estado de São Paulo realizados por TEIXEIRA et al. (1968b) e informações obtidas no IBC.

As amostras foram inicialmente provadas pela equipe de degustadores especializados, instrutores do Curso de Classifi-

cação e Degustação de Café do SERAC - SP 1 IBC - São Paulo; selecionadas em número de 50, sendo 10 amostras de bebida "mole", 10 amostras de bebida "apenas mole", 10 amostras de bebida "dura", 10 amostras de bebida "riada" e 10 amostras de bebida "rio".

Baseados nesse número de amostras, foram feitos então 10 ensaios em blocos incompletos equilibrados com delineamento $t = 5$; $K = 3$; $r = 6$; $\lambda = 3$, onde t é o número de amostras no ensaio; K o número de amostras que participam do bloco; r é o número de repetições; λ é o número de vezes que duas amostras apareceram juntas nos blocos.

Cada experimento contou, pois, com 30 parcelas cada uma das quais constituídas por 3 (três) xícaras padrão de degustação e provadas por 3 (três) degustadores. Para cada parcela houve, portanto, 18 (dezoito) resultados experimentais (6 xícaras x 3 degustadores).

Cada mesa de prova constitui um bloco e constou com 15 (quinze xícaras) das quais 9 (nove) do ensaio (pertencentes a três tratamentos) e 6 de café de rotina (as amostras chamadas "de rotina" são as que estão fora do ensaio de modo a evitar que o classificador possa descobrir detalhes do trabalho).

A torração, tipo americana, das amostras foi feita por uma mesma pessoa, especializada neste trabalho. Após a torração o café foi moído em moinho especial, obtendo-se uma granulação apropriada (granulação média), sendo a moagem efetuada, também por uma única pessoa, visando-se com isso a obter a maior uniformidade possível na operação; tomando-se o cuidado de, a cada passagem da amostra, fazer-se a limpeza do moinho.

A ordem de colocação das amostras na mesa de degustação obedeceu a um sorteio. Durante a realização das provas, os degustadores não tiveram contato entre si e com as amostras.

Os degustadores foram solicitados a identificar as amostras de acordo com a classificação oficial, ou seja, Estritamente mole, Mole, Apenas Mole, Duro, Riado e Rio.

Das 50 amostras inicialmente classificadas, foram selecionadas 35, sendo 7 amostras de padrão mole, 7 amostras do padrão apenas mole, 7 amostras do padrão duro, 7 amostras do padrão Riado e 7 amostras do padrão Rio. (Quadro 1)

Os resultados da degustação de cada xícara foram reduzidos a valores numéricos segundo a seguinte Tabela de Equivalência, proposta inicialmente por GARRUTTI e CONAGIN (1961) e, posteriormente adotada por FAIRBANKS BARBOSA et al. (1962):

ESTRITAMENTE MOLE	5
MOLE	4
APENAS MOLE	3
DURA	2
RIADA	1
RIO	0

Observação: Na coleta destas amostras, visou-se apenas amostras características para bebida, e não foram levados em conta fatores como tipo de colheita, preparação, secagem, armazenamento, etc.

A análise estatística foi realizada segundo esquema abaixo (PIMENTAL GOMES, 1966), Quadro 2.

QUADRO 2 - Delineamento utilizado para análise estatística da atividade de polifenoloxidase, catalase e peroxidase.

Causas de variação	GL
Tratamentos	4
Blocos	6
Resíduo	24
Total	34

QUADRO 1 - Relação das amostras de café - bebida - safra 1968/1969

Amostra nº	Proprietário	Fazenda	Município	Variedade	Colheita	Preparo	Tipo
<u>MOLE</u>							
4	Carmen A. Costa	São Vicente	Água da Prata	M. Novo	Derricha	V. Seca	6
8	Dr. José G.V. Figueiredo	Casa Verde	Batatais	M. Novo	"	"	5
42	Jacinto de A. Pinto	Santa Melena	Amparo	M. Novo Caturra	Pano	"	5/6
43	Morácio Poltronicri	São Pedro	Amparo	M. Novo	Derricha	"	6/7
61	Pedro de Pauli	Capoeira do Boi Araraquara	Araraquara	M. Novo	"	"	5
68	Dr. Décio M. Campos	Santa Maria	São Carlos	"	"	"	5/6
75	Dr. Paulo de Mesquita	Santa Cândida	São Carlos	"	Pano	V. Seca	5
<u>APENAS MOLE</u>							
15	Estelio Zen	Progresso	Jau	B. Vermelho	Derricha	V. Seca	5/6
16	Espolio Pedro Pedrozo	Santa Sofia	Jau	M. Novo	"	"	5/6
25	João L. Carvalhaes	Santa Cruz	Piraju	B. Vermelho	"	"	6
26	Esp. Luiz Assumpção Filho	Santa Maria	Ourinhos	"	"	"	5/6
48	João Pagan S. Irmão	Santa Rosa	Amparo	"	"	"	6/7
49	Dr. Alexandro Markowicz	Santa Helena	Brag. Paulista	M. Novo Caturra	Despolp.	V. Úmida	3
52	Plinio M. de Oliveira	N.S. Conceição	Amparo	M. Novo	Despolp.	V. Úmida	5

Cont.

Amostra nº	Proprietário	Fazenda	Município	Variedade	Colheita	Preparo	Tipo
<u>DURA</u>							
12	Julio de P. Brandão	Sítio Bandeirantes	Tupi Paulista	B. Vermelho	Derricha	V. Seca	7
13	Julio de P. Brandão	S. Francisco	Oswaldo Cruz	M. Novo	"	"	7
20	Ismael F. Coimbra	Coração de Jesus	Oswaldo Cruz	B. Vermelho	"	"	7/8
17	Jarwin Bellucci	Jacutinga	Adamantina	M. Novo	"	"	6/7
22	Paride E. Rizzato	Guariroba	Adamantina	"	"	"	6/7
44	Roberto Levy e Irmão	São Bento	Amparo	"	"	"	5
45	Dr. Alexandre Markowicz	Santa Helena	Bragança Paulista	M. Novo e Caturra	Despolp.	V. Úmida	5
<u>RIADA</u>							
28	Irmãos Maia	Santo Antonio	Cândido Mota	B. Vermelho	Derricha	V. Seca	6/7
29	Dr. Roberto Bitencourt	Boa Vista	Palmital	"	"	"	6
35	Antônio Pipolo	Santa Rosa e Santa Tereza	Cândido Mota	"	"	"	5
59	Oswaldo A. Telles	São José	Caçapava	M. Novo	"	"	7
60	Hélio Marcondes	São João	Taubaté	"	"	"	7
58	Erwin Loew	Jaboticabal	Atibaia	"	"	"	5
91	Dr. Nicanor C. Neves	São Rafael	Paraibuna	Típica	Derricha	V. Seca	7

Cont.

Amostra nº	Proprietário	Fazenda	Município	Variedade	Colheita	Preparo	Tipo
86	Francisco G. Vasconcelos	Santana	Guaratingueta	B. Amarelo	Derricha	V. Seca	7
100	Oswaldo S. Fernandes	Lage	Caratinga MG	B. Vermelho	"	"	6/7
101	Diversos	Diversos	Caratinga MG	Tipica	"	"	7
103	José F. Jamelhei	Córrego Lage	Caratinga MG	Tipica	"	"	6
106	Onofre B. Faria	Colonias	Teófilo Otoni	M. Novo	"	"	7/8
116	Diversos	Diversos	Caratinga MG	Tipica	"	"	7
121	João Duarte	Boa Sorte	Inhapim MG	Tipica	Derricha	V. Seca	7/8

RIO

3.1.2. Amostragem de grãos de café de locais onde ocorrem com frequência bebidas típicas

Com finalidade de se estudar a influência da região produtora sobre a atividade enzimática e qualidade da bebida foram coletados nas Estações Experimentais do IAC de Pindamonhangaba, Ribeirão Preto e Campinas, e da Secção de Agricultura da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" amostras de café Bourbon Amarelo e Mundo Novo, sendo três amostras de cada variedade e de cada região.

Os locais de coleta foram os de regiões que frequentemente apresentam tipos de bebidas típicas (TEIXEIRA, 1968b). As colheitas foram feitas em 8/6/72 - Pindamonhangaba; 12/6/72 - Ribeirão Preto; 14/6/72 - Piracicaba e em 29/6/72 - Campinas.

As análises estatísticas foram realizadas segundo - esquemas dos Quadros 3, 4 e 5.

QUADRO 3 - Delineamento utilizado para análise estatística de atividade de polifenoloxidase com 1, 2 e 3 meses após a colheita.

Causas de variação	GL
Bourbon amarelo - Ribeirão Preto vs Fatorial	1
Variedades (V)	1
Locais (L)	2
Interação VXL	2

Tratamentos	6
Resíduo	14
Total	20

QUADRO 4 - Delineamento utilizado para análise estatística de atividade de PFO de grãos de café de 1, 2 e 3 meses após a colheita.

Causas de variação	GL.
Épocas (E)	2
Tratamentos (T)	6
Interação (E x T)	12
Resíduo	42

QUADRO 5 - Delineamento utilizado para análise estatística de "prova de xícara" (PIMENTEL GOMES, 1966; COCHRAN & COX, 1967).

Causas de variação	GL.
Blocos não ajustados	17
Tratamentos ajustados	8
Resíduo	46
Total	71

As amostras colhidas no estágio de cereja foram no mesmo dia despulpadas, processando-se logo após a retirada da mucilagem com auxílio de solução de hidróxido de sódio 0,5% durante 15 minutos e agitação constante (REGITANO et al., 1965). Rigosamente lavadas em água corrente e postas a secar inicialmente em peneiras individuais em casa de vegetação.

3.1.3. Coleta de amostras de C. canephora var. bukobensis, C. dewevrei, C. liberica e C. arabica.

Recomendadas pela Seção de Genética e Melhoramento do I.A.C., foram coletados na Fazenda Santa Eliza - Campinas amostras dos campos de manutenção de genótipos de C. canephora, C. liberica, C. dewevrei e C. arabica.

Das espécies arábica foram coletadas grãos das variedades Mundo Novo, Bourbon Amarelo e Catuai Amarelo. De cada espécie foram coletadas 3 amostras de grãos cerejas, sendo que da espécie arábica foram coletados também frutos imaturos.

As amostras cerejas foram despulpadas, degomadas naturalmente com lavagens periódicas. Finalmente depois de 24 horas foram lavadas e postas a secar em peneiras individuais.

As amostras de frutos imaturos foram preparadas pelo processo de via seca, ou seja, foram postas a secar ao sol até teor de umidade com cerca de 18%.

Na escolha dessas espécies levamos em consideração as espécies não arábicas resistente a ferrugem alaranjada do café uma vez que trabalhos de melhoramento de cafeeiros visam a passagem de gens de resistência à doença e outras características às variedades produtivas e produtoras de cafés suaves de melhor cotação no mercado consumidor (CARVALHO e MONACO, 1971).

Devido a diferentes épocas de maturação dos frutos, as colheitas foram em 25/4/72 para as variedades Mundo Novo, B. Amarelo, e Catuai Amarelo; em 9/5/72 para C. liberica e C. dewevrei e 6/6/72 para C. canephora.

A análise estatística foi realizada segundo esquema do Quadro 6.

QUADRO 6 - Delineamento utilizado para análise estatística de poli fenoxidase - amostras de café C. arábica, C. canephora, C. liberica e C. dewevrei com 1, 2 e 3 meses após a colheita.

Causas de variação	GL.
Arábica vs Demais	1
Arábica cereja vs Arábica imaturo	1
(Catuai+Bourbon) Cereja vs Mundo Novo Cereja	1
Catuai Cereja vs Bourbon Amarelo Cereja . . .	1
(Bourbon+Mundo Novo) imatura vs Catuai Amarele imaturo	1
Bourbon imaturo vs Mundo Novo imaturo	1
(<u>C. canephora</u> + <u>C. dewevrei</u>) vs <u>C. liberica</u> . .	1
<u>C. canephora</u> vs <u>C. dewevrei</u>	1

Tratamentos	8
Resíduo	18
Total	26

vs = versus

QUADRO 7 - Delineamento utilizado para análise estatística de poli fenoxidase, com 1, 2 e 3 meses após a colheita.

Causas de variação	GL.
Épocas (E)	2
Tratamentos (T)	8
Interação (E x T)	16
Resíduo	54
Total	80

3.1.4. Amostras de grãos de café degomados com solução alcalina e degomadas naturalmente.

Além das amostras anteriormente descritas, foram colhidas diversas outras amostras, sendo que uma parte foi degomada com solução alcalina e outra parte naturalmente, conforme descrição do item 3.1.2.

Um mês após a coleta foi determinada a atividade enzimática de cada amostra. Os resultados obtidos foram analisados conforme o delineamento do Quadro 8.

QUADRO 8 - Delineamento utilizado para análise estatística do polifenoloxidase de grãos de café degomados naturalmente e com solução de álcali.

Causas de variação	GL.
Tratamentos	1
Resíduo	28
Total	29

Paralelamente foram feitas "prova de xícara", a fim de avaliar a qualidade da bebida.

3.1.5. Amostras de grãos de café de cafeeiros tratados com inseticidas.

Amostras de café cereja, foram coletadas em ensaio de controle de broca, coordenado pelo Centro de Pesquisa do Café, na Fazenda do Sr. Nicolau Brandão em Abre Campo (M.G).

As amostras foram despulpadas e degomadas diariamente (20 a 25 de maio de 1972) com auxílio de solução de soda, lavadas rigorosamente e postas a secar em tabuleiros individuais a pleno sol e recolhidas ao abrigo durante a noite, dias encobertos e

chuvosos até que atingisse teor de umidade ideal de 12 a 15%, teores esses determinados pelo aparelhos de determinação Steinlite.

Os inseticidas usados foram: BHC 15%, via oleosa 2 l/ha, Dieldrex 6 l/ha em água e Sumithion 2 l/ha, as aplicações foram feitas em 27/11/71 e 14/1/72, datas essas em que o índice de ataque de broca era de aproximadamente 5%. O estágio dos frutos - variava de chumbinho a grãos imaturos desenvolvidos. O ensaio foi montado em blocos ao acaso com seis repetições.

A determinação da qualidade da bebida foi feita em blocos completos ao acaso, ou seja, quatro amostras do ensaio em cada bloco com os cuidados já descritos em 3.1.1. O cafezal escolhido está instalado em nível, variedade Mundo Novo - 379-19 - com oito anos de idade, espaçamento 4 x 2 metros, 2 pés por cova, e com excelente produção.

Análises estatísticas da qualidade de bebida e da atividade do PFO foram realizadas segundo esquema do Quadro 9.

QUADRO 9 - Delineamento estatístico utilizado para análise do poli fenoloxidase em amostras de cafeeiros tratados com inseticidas.

Causas de variação	GL.
Tratamentos	3
Blocos	5
Resíduo	15
Total	23

3.1.6. Armazenamento das amostras

3.1.6.1. Armazenamento das amostras padrão de bebida

Após a coleta completa das 125 amostras, todo material foi beneficiado e armazenado em latas de alumínio com capaci-

dade de 400g. E só abertas no momento de se realizar os ensaios.

3.1.6.2. Armazenamentos das demais amostras

As demais amostras foram armazenadas em sacos de papel poroso, e postas em prateleiras à temperatura ambiente.

Nos dias, dos ensaios, foram então beneficiadas e selecionadas manualmente, a fim de eliminar os grãos excessivamente brocados, deformados, imaturo, ardidos, palhas, tanto na prova de xícara, como na determinação enzimática.

Durante o armazenamento do material evitou-se a contaminação dos mesmos com produtos voláteis que pudessem prejudicar o aroma e o sabor das amostras de café, a fim de que pudessemos detectar o gosto ou o aroma induzidos pelo tratamento.

3.2. Métodos

3.2.1. Moagem do grão de café

Amostras de 30 gramas de café foram pulverizados à temperatura ambiente em moinho de faca de alta rotação, durante dois minutos, e em seguida utilizado como fonte de enzimas. Do resultante da moagem apenas a fração fina, que passou pela peneira de 20 "meshes" foi aproveitada e o restante foi descartado.

3.2.2. Extração e determinação da atividade do polifenoloxidase (PFO)

Do material acima descrito, duas gramas foram colocados em almofariz contendo areia fina (30-40 "meshes") e 10 ml de solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. Todo material usado era mantido gelado. O pó era então macerado por 2 minutos, filtrado em pano de malha grosseira e centrifugado por vinte minutos a 12.000 rpm, a temperatura de 0-4°C.

Após a centrifugação tínhamos três fases:

- a) . material sedimentado, constituído de restos de tecidos, parede celular e areia;
- b) . sobrenadante, extrato de coloração amarelada;
- c) . material menos denso na parte superior, de coloração branco leitoso. Aparentemente de natureza lipídica.

O sobrenadante assim obtido (b) foi diluído e usado como fonte enzimática. A diluição do extrato final usado como fonte enzimática foi feita segundo análises prévias de atividade do material usado, assim de acordo com a conveniência esse extrato - foi diluído na proporção de 1:25, 1:50 e 1:100.

A mistura reativa era constituída de 5 ml de solução de L-Dopa, na concentração de 8 mg/10 ml (3,4 dihidroxifenilalanina da Nutritional Biochemical Corporation) segundo FERREIRA e AMORIM (1970) e em solução tampão de fosfato de sódio pH 7,0 a 0,1 M e 1 ml do extrato diluído. A determinação da absorbância foi feita em colorímetro Klett-Summerson, filtro 42, de dois em dois minutos. A mistura reativa foi mantida à temperatura de 36°C durante a reação enzimática. Como controle foram colocados dois tubos, sendo um com apenas solução de DOPA e o outro com o respectivo extrato em solução tampão.

3.2.3. Extração e determinação da atividade do catalase

O extrato enzimático foi obtido de maneira semelhante a do PFO pH 7,0, tampão fosfato de sódio M/15 segundo o processo descrito por LUCK (1963) cujas etapas podem ser resumidas da seguinte forma:

Em um becker de 200 ml em banho de gelo-água foram colocados 40 ml de tampão fosfato M/15, pH 7,0, 50,0 ml de solução de água oxigenada 2% (Perydrol Merck) e 10 ml de extrato enzimático 1:10 (1 g de pó para 10 ml de tampão). Nos tempos de 0,5; 1,0;

2,0; 4,0; 7,0 e 10 minutos foram retiradas da mistura reativa aliquotas de 10 ml e recebidas em tubos de centrifuga contendo 2 ml - de solução ácida (40g TCA + 100 ml H_2SO_4). Em seguida centrifugadas a 3.000 rpm, durante 5 minutos. Do sobrenadante foi retirado, 6 ml e transferido para erlenmeyer contendo 2 ml de iodeto de potássio - 10%. O erlenmeyer era então fechado e colocado em ambiente refrigerado e escuro por vinte minutos, titulado com tiosulfato - de sódio 0,05 N, até coloração amarelada. Posteriormente foram adicionadas 2 gotas de solução de amido (1 g amido + 5 mg $HgCl_2$ em 500 ml água) e completada a titulação até o desaparecimento da coloração azul.

Os volumes de tiosulfato de sódio gastos eram, então anotados para cálculos posteriores.

3.2.4. Extração e determinação da atividade do peroxidase

O extrato foi obtido em tampão fosfato de sódio pH 6,1, 0,1 M à maneira usada na extração do PFO.

A mistura reativa se constituia de: 0,5 ml de água oxigenada 0,1 M; 1,0 ml de pirogalol 0,02 M; 1,0 ml de extrato - 1:50, o volume completado a 6,0 ml com tampão. Com a adição de água oxigenada era iniciada a contagem do tempo acompanhando-se a variação da absorbância no colorímetro Klett-Summerson, filtro 47, de 15 em 15 segundos até 3 minutos. Como controle substituiu-se a água oxigenada por solução tampão de fosfato. A reação foi processada à temperatura ambiente (25°C) e a determinação foi feita segundo FERREMAN e DIAMOND (1967) com algumas alterações.

3.2.5. Determinação de nitrogênio total no extrato do grão de café

Em aliquotas de 1 ml do extrato concentrado foram determinados os valores de nitrogênio pelo método de Kjeldahl com adaptações (MALAVOLTA, 1957).

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente trabalho serão apresentados a seguir.

4.1. Seleção de condições para os testes com PFO, Catalase e Peroxidase

Os Gráficos I, II, III, IV e V obtidos nos testes preliminares foram utilizados para seleção do tempo e a concentração ótima do extrato do grão de café, como fonte enzimática para as determinações posteriores de PFO, Peroxidase e Catalase.

4.2. Resultados das atividades enzimáticas de grãos de café de bebidas mole, apenas mole, dura, riada e rio

4.2.1. Atividade do polifenoloxidase e qualidade da bebida

O Quadro 10, apresenta os valores obtidos nas determinações da atividade do PFO, enquanto o Quadro 11 contém os valo-

POLIFENOLOXIDASE

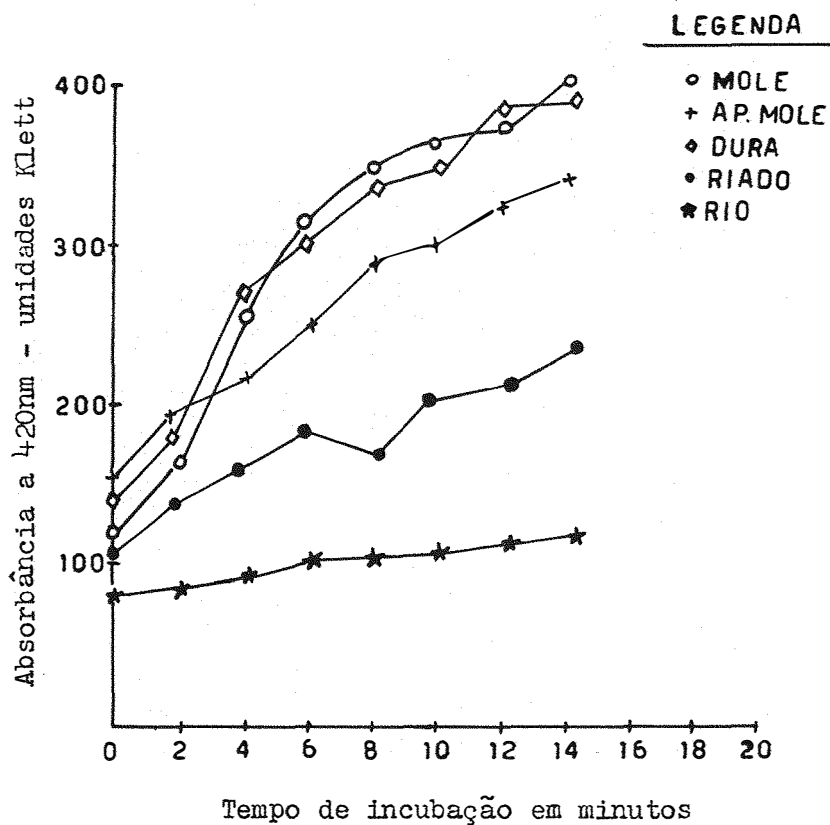


GRÁFICO I - Cinética da reação enzimática do PFO dos grãos de café das várias qualidades de bebidas sobre 3,4 dihidroxifenilalanina. Escolha do intervalo ótimo de determinação da atividade.

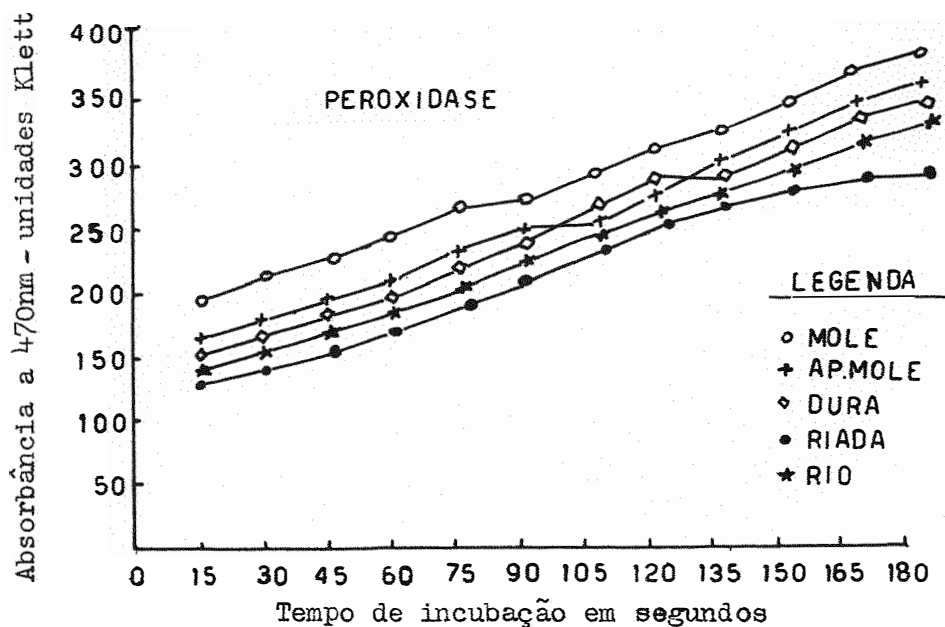


GRÁFICO II - Cinética da reação do Peroxidase dos grãos de café das várias qualidades de bebida sobre o Pirogalol e água oxigenada.

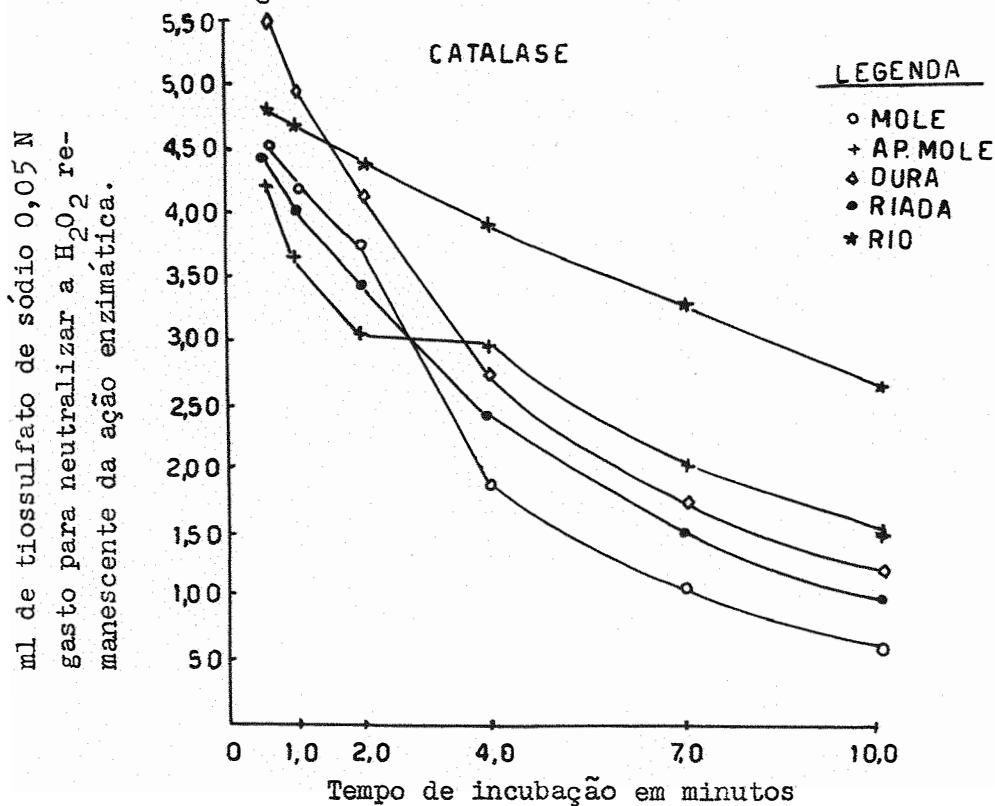


GRÁFICO III - Cinética da reação do Catalase de grãos de café das várias qualidades de bebida sobre a água oxigenada.

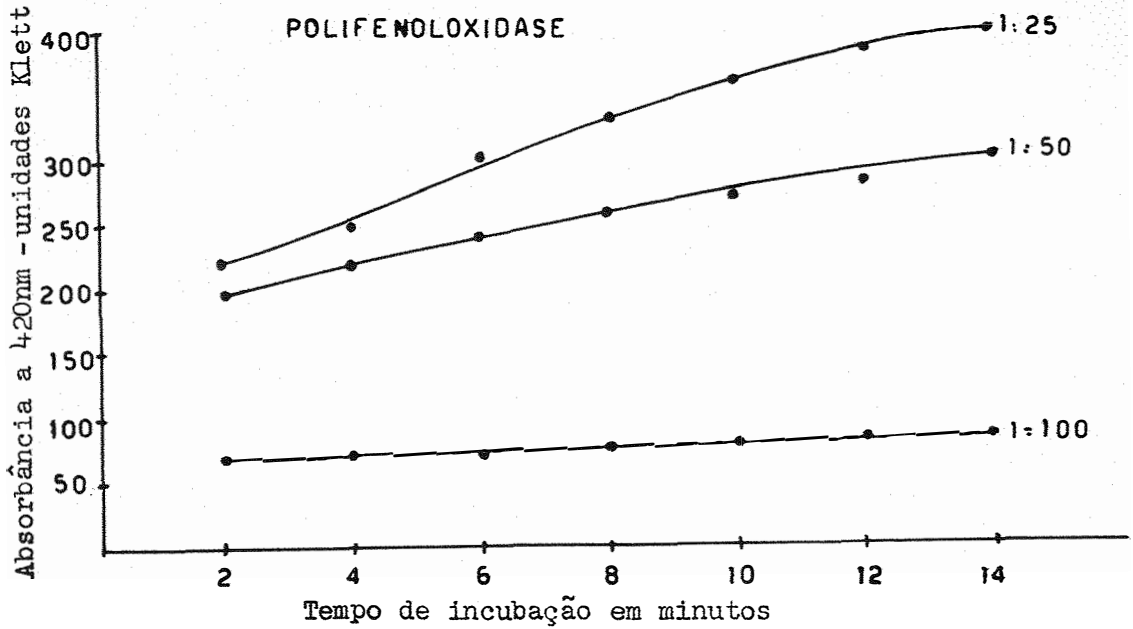


GRÁFICO IV - Cinética da reação enzimática do PFO de grãos de café sobre 3,4 dihidroxifenilalanina. Escolha da concentração do extrato.

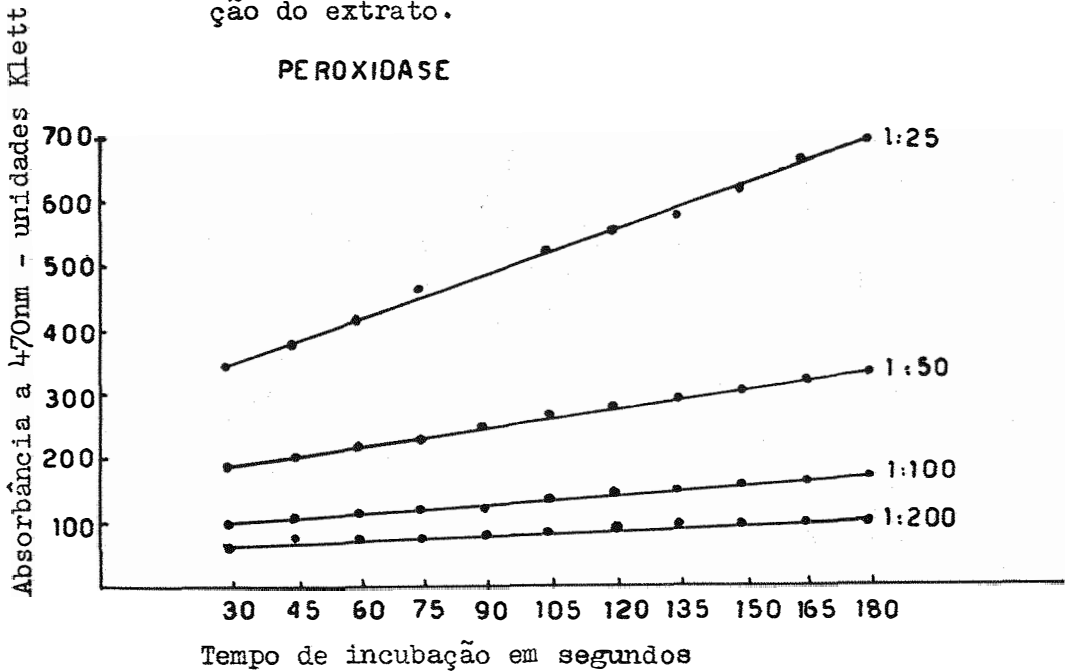


GRÁFICO V - Cinética da reação enzimática do Peroxidase de grãos de café sobre o Pirogalol e água oxigenada. Escolha da concentração do extrato enzimático.

res da análise da variância para bebidas e DMS ao nível de 5% segundo análise de Tukey.

QUADRO 10 - Atividade específica do polifenoloxidase em amostras - de grãos de bebidas padrões. Os valores correspondem a diferença de absorvância em unidades Klett, entre 0 e 6 minutos por minuto, por mg de nitrogênio proveniente do extrato adicionado a solução de DOPA.

Qualidade das bebidas	Blocos								Médias
Mole	27,6	85,1	54,1	88,8	97,5	82,2	78,0	73,33	
Apenas mole	51,9	39,0	91,5	39,2	90,8	50,5	69,6	61,79	
Dura	65,4	25,5	42,5	39,7	40,1	20,1	81,0	44,84	
Riada	45,1	41,9	55,5	25,2	70,0	32,4	41,9	44,57	
Rio	22,0	13,1	61,0	32,4	12,9	22,9	61,8	32,30	

QUADRO 11 - Análise de variância do Quadro 10

Causas de variação	GL	QM	F
Bebidas	4	1.825,52	4,63**
Blocos	6	633,77	1,60
Resíduo	24	394,64	

** - Significativo ao nível de 1%.

C.V. 38,7%

Desvio mínimo significativo (D.M.S.) ao nível de 5% = 31,31

A análise da variância nos indica que houve diferenças significativas ao nível de 1% entre os tratamentos (bebida mole, apenas mole, dura, riada e rio). Já o teste de médias (Tukey) nos indica que apenas os tratamentos mole e rio são significativamente diferentes.

Com os valores observados, juntamente com as médias

das provas de xícara foram feitos estudos de regressão e correlação conforme análise (Quadro 13).

QUADRO 12 - Valores médios obtidos pelas amostras classificadas como mole, apenas mole, dura, riada e rio. As notas foram atribuídas segundo escalas de valores proposta por GARRUTTI e CONAGIN (1961). Os valores correspondem à média de três degustadores em 6 provas efetuadas

Bebidas	Blocos							Médias
Mole	3,87	3,78	3,67	3,33	3,28	3,61	3,44	3,57
Apenas Mole	3,33	3,11	2,72	2,55	3,00	2,83	2,67	2,89
Dura	1,89	2,22	2,22	2,05	2,11	2,28	1,67	2,06
Riada	1,00	1,50	0,89	1,44	0,89	1,67	1,00	1,20
Rio	0,39	0,50	0,61	0,44	0,50	0,55	0,50	0,47

O valor de correlação (r) encontrado entre a atividade do PFO e os valores médios das notas atribuídas à qualidade da bebida para cada amostra foi de $r = 0,488^*$. A análise de variância mostra que há correlação entre os valores das notas atribuídas às várias bebidas padrões e a atividade do PFO.

QUADRO 13 - Análise da variância para testar o valor de "r"

Causas de variação	GL	QM	F
Regressão linear	1	4.893,68	10,30**
Desvio de regressão	33	475,02	
Total	34		

** - Significativo ao nível de 1%.

Os valores médios da atividade do polifenoloxidase e das notas de qualidade da bebida dos grãos de café estão distribuídas segundo uma reta, dada pela equação de regressão:

* - Significativo ao nível de 1%.

$$y = 25,85 + 12,51 x$$

onde: y = corresponde a atividade específica do PFO e
 x = corresponde a nota atribuída a qualidade da bebida.

O Gráfico VI correspondente à reta de regressão obtida com os valores médios da atividade do PFO e as médias da qualidade da bebida.

4.2.2. Atividade do Peroxidase e qualidade da bebida

Os resultados e os valores médios da atividade do enzima peroxidase estão no Quadro 14.

QUADRO 14 - Atividade específica do Peroxidase em amostras de grãos de café de bebidas padrões. Os valores correspondem a diferença de absorvância em unidades Klett entre 0,25 e 1,25 minutos por minuto e por mg de nitrogênio na mistura reativa.

Bebidas	Blocos								Médias
Mole	211,89	368,13	216,10	218,48	204,55	184,67	284,92	241,25	
Ap. Mole	268,96	354,46	240,93	235,89	227,60	214,12	240,21	254,59	
Dura	236,72	425,99	241,23	208,08	302,25	172,94	289,62	268,11	
Riada	352,26	277,09	191,10	222,54	215,07	212,12	252,75	246,13	
Rio	301,58	93,08	175,50	127,85	174,54	125,16	246,30	177,72	

QUADRO 15 - Análise de variância da atividade do Peroxidase

Causas de variação	GL	QM	F
Bebidas	4	8.566,17	2,86**
Blocos	6	9.552,95	3,19**
Resíduo	24	2.995,42	

** - Significativo ao nível de 5%.

C.V. 23,03 %
 D.M.S. a 5% - 86,25

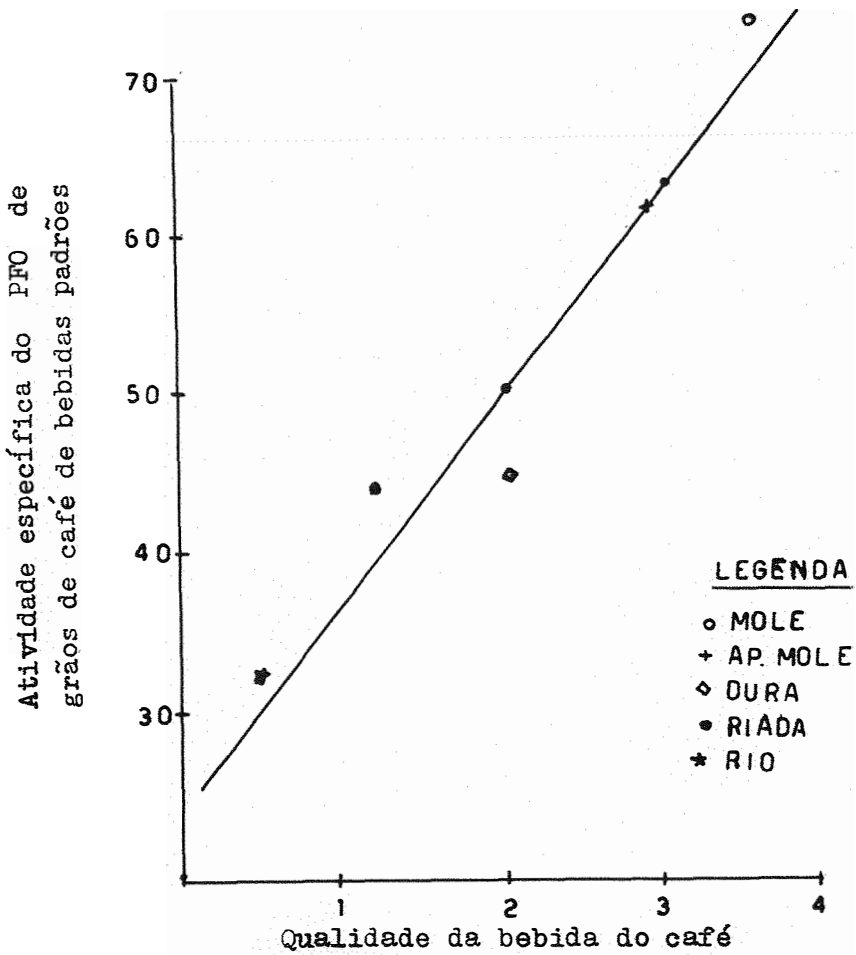


GRÁFICO VI - Representação da equação de regressão obtida com a média da atividade do PFO dos grãos de café das diversas bebidas e com as notas médias das qualidades dessas mesmas bebidas.

A análise da variância, mostrou diferença significativa ao nível de 5% entre os tratamentos (bebidas) e o teste de médias (teste de Tukey) mostrou diferença entre as médias das bebidas dura e rio.

4.2.3. Atividade do catalase e qualidade da bebida

O Quadro 16, apresenta os valores obtidos com as amostras de cafés de bebidas padrões e as médias das atividades. O Quadro 17 apresenta os valores de análise da variância e análises das médias.

QUADRO 16 - Atividade específica do catalase em amostras de grãos de café das bebidas padrões. Os valores correspondem a diferença de tiosulfato de sódio gasto entre 0,50 e 2,00 minutos, utilizados na neutralização do iodo liberado pela ação da água oxigenada remanescente após ação enzimática (atividade $\times 10^{-3}$), por minuto e mg de nitrogênio da mistura reativa.

Bebidas	Blocos								Médias
Mole	246	610	331	161	350	325	311	333	
Apenas Mole	459	665	347	233	197	231	289	346	
Dura	271	335	216	203	268	211	248	250	
Riada	387	305	236	195	232	180	287	260	
Rio	203	111	249	140	140	326	319	213	

QUADRO 17 - Análise da variância

Causas de variação	GL	QM	F
Bebidas	4	0,02276	0,237
Blocos	6	0,02344	0,237
Resíduo	24	0,09594	

C.V. 34,90 %

A análise da variância não mostrou diferenças significativas.

- 4.3. Influência de locais, de variedades, de épocas após colheita sobre a atividade do PFO e qualidade da bebida (grãos - degomados com solução alcalina)

Os resultados de qualidade da bebida, análises enzimática e as análises estatísticas dos dados estão nas Tabelas 9 a 19.

4.3.1. Testes com "prova de xícara"

Como foi dito em material e método as amostras foram coletadas em zonas que frequentemente apresentam bebidas caracterizadas. Nestes testes foram agrupadas as repetições de cada variedades e de cada local.

O teste de degustação foi planejado em blocos Incompletos Equilibrados (COCHRAN & COX, 1957) uma vez que as mesas (blocos) comportam no máximo 4 amostras do material em análise e 2 amostras de café de rotina. Deveríamos utilizar um esquema estatístico que nos desse pelo menos 60 provas, daí a necessidade de introduzirmos mais uma amostra na prova, completando portanto, ao número de 9 amostras. O esquema utilizado foi tratamento igual 9, $k = 4$ (número de amostra por bloco), $r = 3$ (número de vezes que duas amostras aparecem juntas), $b = 18$ (número de blocos), $r = 8$ (número de degustações de cada amostra).

QUADRO 18 - Médias obtidas das opiniões de 3 degustadores para as amostras de grãos de café degomados com álcali de diferentes locais e das variedades Mundo Novo e Bourbon - Amarelo.

Bloco	Médias						
1º	4,33	(1)	4,00	(4)	4,33	(6)	4,00 (7)
2º	4,00	(2)	4,00	(6)	4,33	(8)	4,00 (9)
3º	4,33	(1)	4,00	(3)	4,00	(8)	3,33 (9)
4º	4,00	(1)	4,00	(2)	4,33	(3)	4,00 (4)
5º	4,33	(1)	4,00	(5)	4,00	(7)	4,00 (8)
6º	4,00	(4)	4,33	(5)	4,00	(6)	4,00 (9)
7º	4,33	(2)	4,00	(3)	4,00	(6)	4,00 (7)
8º	4,33	(2)	4,00	(4)	4,33	(5)	4,00 (8)
9º	4,00	(3)	4,33	(5)	4,33	(7)	2,67 (9)
10º	4,00	(1)	4,00	(2)	4,00	(5)	4,00 (7)
11º	4,33	(2)	4,00	(3)	4,00	(5)	3,33 (6)
12º	4,00	(3)	4,33	(4)	4,00	(7)	4,00 (9)
13º	4,00	(1)	4,00	(2)	3,67	(4)	3,67 (9)
14º	4,00	(1)	4,00	(3)	4,00	(6)	4,00 (9)
15º	4,00	(1)	4,00	(3)	4,00	(6)	4,00 (8)
16º	4,33	(4)	4,00	(6)	4,00	(7)	3,67 (8)
17º	4,00	(3)	3,67	(4)	4,00	(5)	4,00 (8)
18º	4,33	(2)	4,00	(7)	4,00	(8)	3,67 (9)

Observação: Os números entre parenteses correspondem ao tratamento constantes do Quadro 19.

QUADRO 19 - Das médias obtidas de opiniões de 3 degustadores para cada infusão, das amostras relacionadas no Quadro 18. Valores ordenados segundo o tratamento.

Tratamentos	Repetições								Media ajustada
1. B.A Pinda.	4,33	4,33	4,00	4,33	4,00	4,00	4,00	4,00	4,148
2. M.N Pinda.	4,00	4,00	4,33	4,33	4,00	4,33	4,00	4,33	4,184
3. B.A Rib.Preto	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,33	4,087
4. M.N Rib.Preto	4,00	4,00	4,00	4,00	4,33	3,67	4,33	3,67	3,964
5. B.A Piracicaba	4,00	4,33	4,33	4,33	4,00	4,00	4,00	4,00	3,866
6. M.N Piracicaba	4,33	4,00	4,00	4,00	3,33	4,00	4,00	4,00	3,914
7. B.A Campinas	4,00	4,00	4,00	4,33	4,00	4,00	4,00	4,00	4,000
8. M.N Campinas	4,00	4,33	4,00	4,00	4,00	3,67	4,00	4,00	3,989
9. Catuai Amarelo	3,33	4,00	4,00	2,67	4,00	3,67	3,67	4,00	3,644

B.A = Bourbon Amarelo; M.N = Mundo Novo; Pinda. = Pindamonhangaba.

Observação: Tratamento nº 9 correspondente ao tratamento adicional

QUADRO 20 - Análise da variância - para provas de xícara

Causas de variação	GL	QM	F
Tratamentos ajustados	8	0,189	3,15**
Blocos não ajustados	17	0,040	0,66
Resíduo	46	0,060	

** - Significativo ao nível de 1%.

C.V. - 6,2 %

D.M.S. ao nível de 5% - 4,070

A análise de variância revelou diferenças significativas ao nível de 1%, ao passo que o teste Tuckey não revelou significância entre as médias. Os valores médios obtidos ajustados ou não, correspondem aos valores atribuídos ao café mole.

4.3.2. Atividade do polifenoloxidase de grãos de café com 1,2 e 3 meses após a colheita

Os dados a seguir correspondem a atividade do PFO - com 1 mes, 2 meses e 3 meses após a colheita e os resultados da - análise estatística, incluindo as variações dentro de épocas.

4.3.2.1. Atividade do PFO após 1 mês de colheita

QUADRO 21 - Valores da atividade específica do PFO. Os resultados correspondem à absorvância em unidades Klett entre 0 e 6 minutos por minuto mg de nitrogênio, proveniente - do extrato adicionado a solução de DOPA.

Variedades e locais	Repetições			Valor médio
Bourbon Amarelo Pindamonhangaba	68,33	67,78	69,09	68,40
Mundo Novo Pindamonhangaba	66,89	67,67	65,17	66,58
Bourbon Amarelo Rib. Preto	65,14	65,14	59,52	63,27
Bourbon Amarelo Piracicaba	66,07	55,95	59,09	60,37
Mundo Novo Piracicaba	54,16	55,55	56,74	55,48
Bourbon Amarelo Campinas	65,48	68,34	65,17	66,33
Mundo Novo Campinas	70,64	77,00	73,85	73,83

QUADRO 22 - Análise da variância

Causa de variação	GL	QM	F
B. Amarelo Rib. Preto vs Fatorial .	1	9,27	1,19
Variedades (V)	1	0,31	0,04
Locais (L)	2	245,84	33,72**
Interação V x L	2	62,43	8,56**

Tratamento	6	104,35	13,46**
Resíduo	14	7,75	

** - Significativo ao nível de 1%.

C.V. 4,29 %

D.M.S. para tratamento ao nível de 5% = 7,77

D.M.S. para locais ao nível de 5% = 4,20

A análise da variância mostrou que as amostras de diferentes locais comportaram-se diferentemente ao nível de 1%. Com o desdobramento da análise, observamos que as diferenças são devidas aos locais e que entre variedades não houve diferenças. Como se pode observar pelos resultados acima diferenças significativas foram encontradas entre Piracicaba e Campinas ou Pindamonhangaba.

4.3.2.2. Atividade do PFO após 2 meses de colheita

QUADRO 23 - Valores da atividade específica do PFO. Os resultados correspondem à absorvância em unidades Klett entre 0 e 6 minutos por mg de nitrogênio proveniente do extrato adicionado a solução de DOPA.

Variedades e Locais	Repetições			Valor médio
Bourbon Amarelo Pindamonhangaba	52,14	52,19	52,60	52,31
Mundo Novo Pindamonhangaba	51,78	51,18	52,82	51,93
Bourbon Amarelo Rib. Preto	56,22	57,72	56,69	56,88
Bourbon Amarelo Piracicaba	64,35	63,29	54,47	60,70
Mundo Novo Piracicaba	58,02	60,33	60,95	59,79
Bourbon Amarelo Campinas	60,94	63,72	63,26	62,64
Mundo Novo Campinas	59,10	57,78	59,28	58,72

QUADRO 24 - Análise da variância

Causas de variação	GL	QM	F
B. Amarelo vs Fatorial	1	1,65	0,03
Variedades (V)	1	13,73	2,32
Locais (L)	2	139,38	23,58**
Interação V x L	2	5,42	0,92

Tratamento	6	50,83	9,87**
Resíduo	14	5,15	

** - Significativo ao nível de 1%.

C.V. - 3,94 %

D.M.S. ao nível de 5% para tratamento 6,33

D.M.S. ao nível de 5% para locais 3,43

Nesta segunda época foi observado uma diferença significativa entre Pindamonhangaba e Campinas ou Piracicaba.

4.3.2.3. Atividade do PFO após 3 meses de colheita

QUADRO 25 - Valores da atividade específica do PFO. Os resultados correspondem à absorvância em unidades Klett entre 0 e 6 minutos por mg de nitrogênio proveniente do extrato adicionado a solução de DOPA.

Variedades e Locais	Repetições			Valor médio
Bourbon Amarelo Pindamonhangaba	51,44	52,89	48,43	50,92
Mundo Novo Pindamonhangaba	52,48	48,43	50,00	50,30
Bourbon Amarelo Rib. Preto	55,48	56,21	56,31	56,00
Bourbon Amarelo Piracicaba	65,07	61,72	55,18	60,66
Mundo Novo Piracicaba	58,39	56,84	52,22	55,82
Bourbon Amarelo Campinas	64,17	64,48	62,23	63,63
Mundo Novo Campinas	58,82	54,17	58,11	57,03

QUADRO 26 - Análise da variância

Causas de variação	GL	QM	F
Bourbon Amarelo R.Preto vs Fatorial	1	0,39	0,05
Variedades (V)	1	1,52	0,18
Locais (L)	2	121,43	15,00**
Interação V x L	2	53,83	6,65**
<hr/>			
Tratamento	6	69,21	9,15**
Resíduo	14	7,56	

** - Significativo ao nível de 1%.

C.V. - 4,88 %

D.M.S. de tratamento ao nível de 5% - 7,67

D.M.S. de locais ao nível de 5% - 4,15

Como nos dois casos anteriores, houve diferenças significativas entre as amostras, e essas diferenças se devem aos locais de coleta e não às variedades. Pelos valores médios de locais Pindamonhangaba difere de Campinas ou de Piracicaba.

4.3.2.4. Resultados da atividade do PFO das variedades - Mundo Novo e Bourbon Amarelo, de diversos locais, com amostras degomadas com álcali e 1, 2 e 3 meses após a colheita

QUADRO 27 - Efeito do local e da idade do grão de café após colheita, das variedades Mundo Novo e Bourbon Amarelo sobre atividade de PFO. Os valores correspondem a absorvância em unidades Klett por minuto por mg de nitrogênio.

Variedades e Locais	Épocas			Médias
	1º	2º	3º	
Bourbon Amarelo Pindamonhangaba	68,40	52,31	48,43	56,38
Mundo Novo Pindamonhangaba	65,58	51,93	50,00	55,84
Bourbon Amarelo Rib. Preto	63,27	56,88	56,31	58,82
Bourbon Amarelo Piracicaba	60,37	60,70	55,18	58,75
Mundo Novo Piracicaba	55,48	59,79	52,22	55,83
Bourbon Amarelo Campinas	66,33	62,64	62,23	63,73
Mundo Novo Campinas	73,83	58,72	58,11	63,55
Valores médios para épocas	64,89	57,56	56,34	

QUADRO 28 - Análise da variância

Causas de variação	GL	QM	F
Épocas (E)	2	449,65	65,93**
Tratamentos (T)	6	88,88	13,03**
Interação E x T	12	67,75	9,93**
Resíduo	42	6,82	

** - Significativo ao nível de 1%.

D.M.S. para épocas ao nível de 5% - 6,79

O teste da variância mostrou uma diferença significativa ao nível de 1% para tratamentos, épocas e interação tratamento x época. A atividade do PFO um mês após a colheita foi significativamente maior do que no segundo e terceiro mês. Não houve diferenças entre o 2º e 3º mês.

4.4. Resultados do PFO de grãos de café cereja naturalmente de-
gomados de quatro espécies de café e de grãos imaturos da
espécie arábica em 1, 2 e 3 meses após a colheita

4.4.1. Resultados obtidos com 1 mês após a colheita

O Quadro 29 mostra os resultados da atividade do PFO dos diversos cafés.

Os frutos das diversas variedades e espécies foram colhidos no estágio cereja e a atividade do PFO nos mesmos grãos foram determinados 1 mês após a colheita. Adicionalmente foram introduzidos grãos de frutos imaturos das variedades de Coffea arabica com idêntica finalidade.

QUADRO 29 - Valores de atividade do PFO, com 1 mês após a colheita. Os resultados correspondem à absorvância em unidade Klett entre 0 e 6 minutos por minuto e por mg de nitrogênio proveniente do extrato adicionado a solução de DOPA

Amostras	Repetições			Médias
<u>C. arabica</u> cereja				
Bourbon Amarelo	14,71	12,46	12,11	13,09
Mundo Novo	17,33	18,80	12,89	16,34
Catuai Amarelo	14,02	15,09	12,89	14,00
<u>C. arabica</u> imaturo				
Bourbon Amarelo	63,14	62,63	57,99	61,25
Mundo Novo	53,12	54,76	56,20	54,69
Catuai Amarelo	68,44	73,75	66,88	69,69
<u>C. canephora</u> - var. Bukobensis	72,86	72,72	73,08	72,88
<u>C. liberica</u>	31,43	28,43	28,70	29,52
<u>C. dewevrei</u>	126,90	139,12	109,81	125,27

QUADRO 30 - Análise da variância

Causas de variação	GL	QM	F
Arábica vs Demais	1	8.534,02	300,49**
Arábica Cereja vs Arábica imaturo .	1	10.110,89	356,01**
(Catuai + B.A) Cereja vs M.N Cereja	1	15,61	0,55
Catuai Cereja vs Bourbon Cereja . .	1	1,24	0,04
(B.A ima.+M.N) ima. vs Catuai ima.	1	274,56	9,66**
B.A. imaturo vs M.N imaturo	1	64,55	2,27
<u>(C. canephora + C. dewevrei) vs C.</u>			
<u>liberica</u>	1	9.676,72	340,72**
<u>C. canephora vs C. dewevrei</u>	1	4.118,12	145,00**

Tratamentos	8	4.099,46	144,34**
Resíduo	18	28,40	

ima. = imaturo; vs = versus; B.A. = Bourbon Amarelo; M.N. = Mundo Novo.

** - Significativo ao nível de 1%.

C.V. - 10,5 %

D.M.S. ao nível de 5% - 15,28

A análise da variância revelou diferenças significativas entre as espécies, entre os grãos imaturos e cerejas da espécie arábica; entre grãos imaturos do Catuai e das variedades Mundo Novo e Bourbon Amarelo.

Entre as espécies observou-se que a atividade do PFO era mais alta no C. dewevrei. Entre as variedades de C. arábica colhidos no estágio cereja não se encontrou diferenças estatísticas. A atividade do PFO dos grãos imaturos apresentou-se com valores mais altos que a do grão colhido no estágio de cereja.

4.4.2. Resultados obtidos com 2 meses após a colheita

Os tratamentos são idênticas ao item 4.4.1., diferindo apenas quanto ao tempo de estocagem.

QUADRO 31 - Valores da atividade do PFO com 2 meses após a colheita. Os resultados correspondem à absorvância em unidades Klett entre 0 e 6 minutos por minuto e por mg de nitrogênio proveniente do extrato adicionado a solução de DOPA.

Amostras	Repetições			Médias
<u>C. arabica</u> cereja				
Bourbon Amarelo	13,97	14,61	13,78	14,09
Mundo Novo	14,04	13,68	13,84	13,85
Catuai Amarelo	13,99	14,98	13,07	14,01
<u>C. arabica</u> imaturo				
Bourbon Amarelo	40,02	43,88	43,83	42,58
Mundo Novo	45,21	42,93	46,25	44,80
Catuai Amarelo	60,33	59,85	56,91	55,03
<u>C. canephora</u> - var. Bukobensis	41,80	45,09	43,99	43,63
<u>C. liberica</u>	19,73	21,63	17,34	19,57
<u>C. dewevrei</u>	80,23	84,50	74,33	79,69

QUADRO 32 - Análise da variância

Causas de variação	GL	QM	F
Arábica vs Demais	1	1.580,15	309,83**
Arábica Cereja vs Arábica imaturo . . .	1	5.451,42	1.068,90**
(Catuai + B.A) cereja vs M.N cereja . .	1	0,09	0,0176
Catuai cereja vs B.A cereja	1	0,01	0,0019
(B.A + M.N) imaturo vs Catuai imaturo .	1	470,84	92,32**
B.A imaturo vs M.N imaturo	1	7,39	1,45
<u>(C. canephora+C. dewevrei) vs C.liberica</u>	1	3.543,13	694,73**
<u>C. canephora vs C. dewevrei</u>	1	1.950,49	382,44**
Tratamentos	8	1.625,44	318,71**
Resíduo	18	5,10	

vs = versus; B.A = Bourbon Amarelo; M.N = Mundo Novo.

** - Significativo ao nível de 1%.

C.V. - 6,13 %

D.M.S. ao nível de 5% - 6,47

Excessão feita para as atividades do PFO das variedades C. arabica e C. liberica, que não foram estatisticamente diferentes os demais resultados desta época foram semelhantes aos do 1º mes.

4.4.3. Resultados obtidos com três meses após a colheita

Os tratamentos são idênticos ao item 4.4.1., diferindo apenas quanto ao tempo de estocagem.

QUADRO 33 - Valores da atividade enzimática do PFO com 3 meses após a colheita. Os resultados correspondem a absorvância em unidades Klett entre 0 e 6 minutos por minuto e por mg de nitrogênio proveniente do extrato adicionado a solução de DOPA.

Amostras	Repetições			Médias
<u>C. arabica</u> - cereja				
Bourbon Amarelo	14,14	14,47	15,22	14,61
Mundo Novo	15,91	13,38	14,14	14,48
Catuai Amarelo	13,43	13,60	13,60	13,54
<u>C. arabica</u> - imaturo				
Bourbon Amarelo	36,85	32,30	36,12	35,09
Mundo Novo	35,01	34,87	34,26	34,71
Catuai Amarelo	47,18	46,52	49,32	47,67
<u>C. canephora</u> - var. bukobensis	43,89	42,05	44,10	43,35
<u>C. liberica</u>	24,93	25,66	25,03	25,21
<u>C. dewevrei</u>	63,72	61,98	62,75	62,82

QUADRO 34 - Análise da variância

Causas de variação	GL	QM	F
Arábica vs Demais	1	1.755,59	1.267,57**
Arábica Cereja vs Arábica imaturo .	1	2.801,01	2.022,39**
(Catuai+B.A) Cereja vs M.N Cereja .	1	0,33	0,24
Catuai cereja vs B.A. Cereja . . .	1	1,71	1,23
(B.A + M.N) imaturo vs Catuai ima.	1	326,24	235,55**
B.A imaturo vs M.N imaturo	1	0,21	0,15
(<u>C. canephora</u> + <u>C. dewevrei</u>) vs <u>C.</u>			
<u>liberica</u>	1	1.554,04	1.122,05**
<u>C. canephora</u> vs <u>C. dewevrei</u>	1	568,62	410,55**

Tratamentos	8	875,97	632,46**
Resíduo	18	1,38	

ima. = imaturo; vs = versus; B.A = Bourbon Amarelo; M.N = Mundo Novo.

** - Significativo ao nível de 1%.

C.V. - 3,61 %

D.M.S. ao nível de 5% - 3,35

Os resultados obtidos nesta época foram idênticos aos do primeiro mês.

4.4.4. Resultados obtidos com 1, 2 e 3 meses após a colheita

No Quadro 35 estão os resultados do polifenoloxidação correspondente ao primeiro, segundo e terceiro mês após a colheita.

A Figura I, mostra a atividade enzimática do PFO das diversas espécies de café com 1, 2 e 3 meses após a colheita.

QUADRO 35 - Valores da atividade de PFO em relação ao tempo de estocagem. Os resultados correspondem a média de 3 repetições e são dados em absorvância em unidades Klett, por minuto e mg de nitrogênio.

Amostras	Épocas		
	1ª	2ª	3ª
<u>C. arabica</u> - cereja			
Bourbon Amarelo	13,09	14,09	14,61
Mundo Novo	16,34	13,85	14,48
Catuai Amarelo	14,00	14,01	13,54
<u>C. arabica</u> - imaturo			
Bourbon Amarelo	61,25	42,58	35,09
Mundo Novo	54,69	44,80	34,71
Catuai Amarelo	69,69	59,03	47,67
<u>C. canephora</u> - var. bukobensis	72,88	43,63	43,35
<u>C. liberica</u>	29,52	19,59	25,21
<u>C. dewevrei</u>	125,27	79,69	62,82
Média	50,75	36,81	32,39

QUADRO 36 - Análise da variância

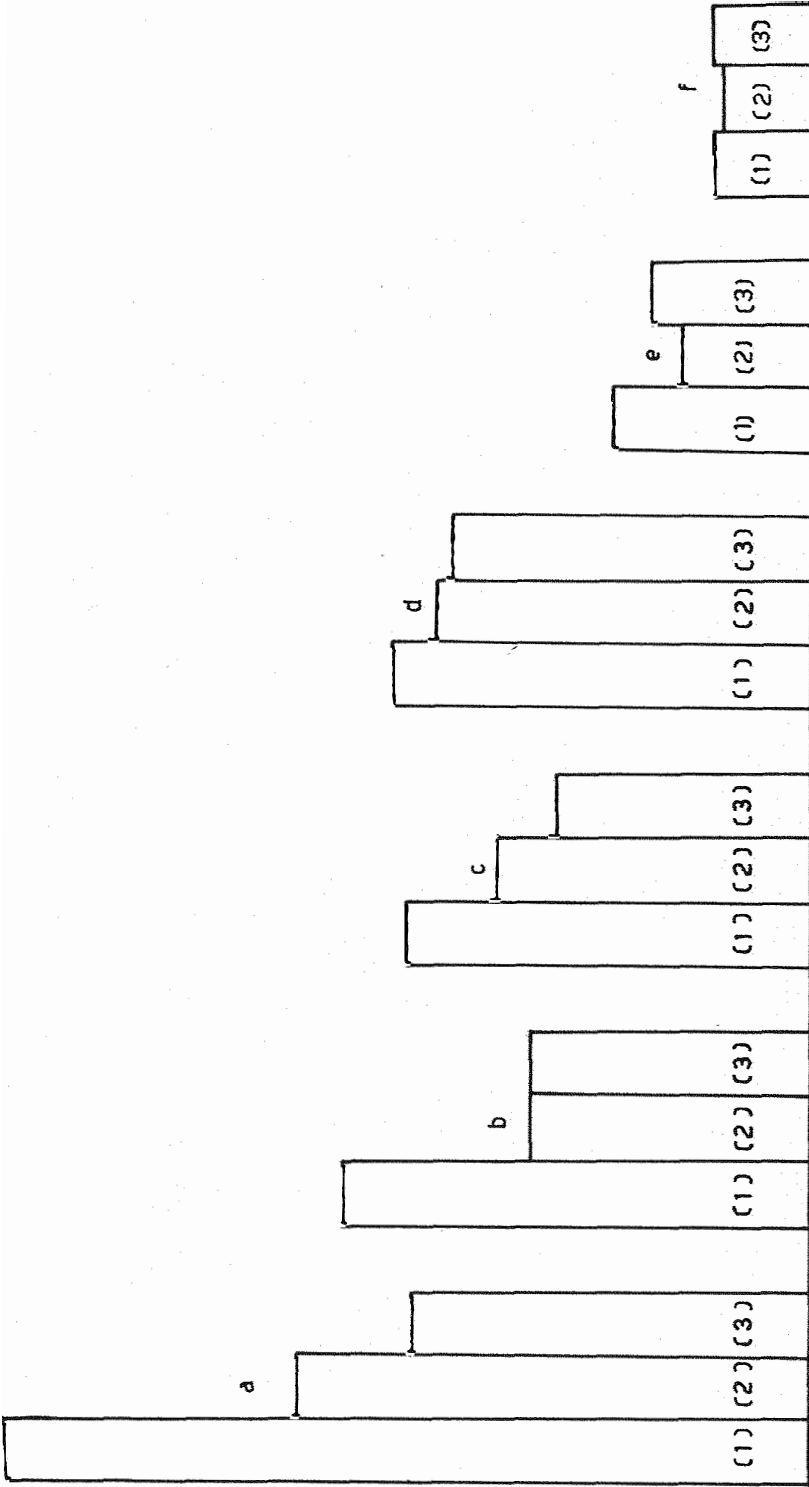
Causas de variação	GL	QM	F
Épocas (E)	2	2.479,51	236,62**
Tratamentos (T)	8	5.899,96	507,74**
Interação E x T	16	350,56	30,17**
Resíduo	54	11,62	

** - Significativo ao nível de 1%.

G.L. ajustado para resíduo - 26

G.L. ajustado para interação - 12

D.M.S. ao nível de 5% entre épocas - 13,60



Amostras e idade dos grãos de café das várias espécies

FIGURA I - Representação esquemática da atividade específica do PFO dos grãos de café de várias espécies com 1, 2 e 3 meses após a colheita. Sendo (1), (2) e (3) - meses após a colheita.

a) C. deweyrei; b) C. canephora; c) C. arabica-imaturo; d) C. arabica-degomado com soda; e) C. liberica; f) C. arabica-degomado naturalmente.

Atividade específica do PFO de grãos de café

A análise da variância mostrou diferenças nas atividades do PFO com o envelhecimento do grão. Entretanto pela análise de Tukey apenas a primeira época difere da segunda e terceira.

4.5. Influência da degomagem natural e da degomagem com solução alcalina de grãos de café sobre a atividade do PFO.

Os valores do Quadro 37, correspondem aos valores encontrados de atividade de PFO de grãos degomados com solução alcalina e degomados naturalmente.

QUADRO 37 - Valores da atividade do PFO. Os resultados correspondem a absorvância em unidades Klett entre 0 e 6 minutos, por minuto e por mg de nitrogênio proveniente do extrato adicionado a solução de DOPA.

Degomagem Natural*	Degomagem com soda*	
14,02	59,52	
15,09	61,11	
12,89	63,33	
17,33	70,64	
18,80	77,00	
12,89	73,85	
14,71	65,48	
12,46	68,34	
12,11	65,17	
23,19	59,44	
20,29	55,00	
18,84	58,33	
29,11	81,83	
28,57	80,39	
28,85	81,37	
Médias	18,61	68,05

* - Para as análises do efeito dos dois tipos de degomagem foram reunidos os valores obtidos com diversas variedades do C. arabica. Todas as amostras foram qualificadas como bebida mole.

QUADRO 38 - Análise da variância

Causas de variação	GL	QM	F
Tratamentos	1	18.334,82	307,22**
Resíduo	28	59,68	

** - Significativo ao nível de 1%.

C.V. 17,82%

A degomagem realizada com solução alcalina mostrou-se estatisticamente diferente da degomagem natural, ao nível de probabilidade maior do que 99,0%.

4.6. Influência de inseticidas para o controle da broca do café, sobre a qualidade da bebida e a atividade enzimática do PFO

Os Quadros 39 e 41 referem-se à influência da aplicação dos inseticidas Dieldrex, BHC e Sumithion no controle a broca do grão de café, sobre a atividade enzimática do polifenoloxidase e qualidade da bebida do café. Os Quadros 40 e 42 correspondem à análise estatística desses mesmos dados.

4.6.1. Influência dos inseticidas sobre a atividade enzimática

QUADRO 39 - Valores da atividade do polifenoloxidase. Os resultados correspondem à absorbância em unidades Klett entre 0 e 6 minutos por minuto e por mg de nitrogênio proveniente do extrato adicionado a solução de DOPA.

Tratamentos	Blocos						Médias
	1	2	3	4	5	6	
Dieldrex	49,68	63,00	81,10	64,56	50,59	54,83	60,63
BHC	37,02	52,15	59,41	65,78	67,69	61,24	57,21
Sumithion	42,56	48,60	50,81	64,58	52,82	53,86	52,20
Testemunha	42,39	47,15	49,28	64,84	62,74	54,13	53,42

QUADRO 40 - Análise da variância

Causas de variação	GL	QM	F
Tratamentos	3	87,72	1,54
Blocos	5	228,08	4,02**
Resíduo	15	56,78	

** - Significativo ao nível de 1%.

C.V. - 13,48 %

O teste de Fischer não revelou diferenças significativas entre os tratamentos, embora os valores médios encontrados sejam ligeiramente diferentes.

4.6.2. Influência dos inseticidas sobre a qualidade da bebida

O Quadro 41 corresponde a prova de xícara com amostras do material tratado com inseticidas.

QUADRO 41 - Valores médios obtidos com cada amostra na prova de xícara. Os valores correspondem as opiniões de 3 degustadores em 5 repetições para cada amostra. (3 x 5 = 15 opiniões).

Tratamentos	Blocos						Médias
Dieldrex	4,20	4,13	4,20	4,27	3,80	4,20	4,13
BHC	3,07	1,40	2,67	3,93	3,53	4,00	3,10
Sumithion	4,13	4,07	4,07	3,07	4,20	3,67	3,87
Testemunha	3,87	4,20	3,93	3,60	4,13	4,13	3,98

QUADRO 42 - Análise da variância

Causas de variação	GL	QM	F
Tratamentos	3	1,27	3,52 **
Blocos	5	0,19	0,052 **
Resíduo	15	0,36	

** - Significativo ao nível de 1%.

C.V. - 15,91%

D.M.S. ao nível de 5% - 1,00

O teste de Fischer revelou diferença significativa ao nível de 5% para tratamentos e 1% para blocos. Pelo teste de Tukey ao nível de 5% os tratamentos com Dioldrex e BHC diferiram.

A aplicação do inseticida BHC-via oleosa influenciou na qualidade da bebida, prejudicando-lhe o paladar. Porém as amostras não apresentaram cheiro ou sabor anormais.

5. DISCUSSÃO

5.1. Estudo das atividades enzimáticas do Polifenoloxidase, Catalase e Peroxidase, em amostra de café de bebida mole, - apenas mole, dura, riada e rio

5.1.1. Escolha do intervalo ótimo para análise dos resultados e metodologia de determinação da atividade enzimática

Embora trabalhos de AMORIM e SILVA (1968), FERREIRA e AMORIM (1970), tivessem determinado a atividade enzimática de 5 em 5 minutos num período de 30 minutos e ROTEMBERG e IACHAN (1970), de 3 em 3 minutos num período de 60 minutos, achamos de interesse fazer algumas modificações de acordo com as nossas condições de trabalho para a atividade do PFO.

Pelos resultados obtidos e pelos Gráficos I, II e III observou-se que os valores iniciais das reações catalisadas pelo PFO, Catalase e Peroxidase seguiam uma cinética de primeira ordem. Levando-se também, em consideração que as atividades são menos afetada no início das reações por diversos fatores como produ-

tos da reação, e desnaturação da enzima achamos conveniente trabalhar com os resultados obtidos nos intervalos de 0,00 e 6,00 minutos para PFO; 0,50 e 2,00 minutos para catalase; e 0,25 e 1,25 minutos para Peroxidase.

5.1.2. Escolha da concentração do extrato enzimático e a faixa de leitura ótima para o estudo da atividade enzimática

A fim de conseguir maior uniformidade dos resultados, antes de se fazer as leituras de várias amostras tivemos o cuidado de realizar testes preliminares para determinar as concentrações do extrato contendo PFO e Peroxidase que produzissem leituras dentro da faixa de 100 a 400 unidades Klett de absorvância.

No caso da determinação da atividade do catalase também se procurou uniformizar os resultados selecionando concentrações do extrato que na titulação da mistura reativa consumia de 2,5 a 7,0 ml de tiosulfato de sódio a 0,05 N.

5.1.3. Comparações da atividade do PFO de amostras de bebida mole, apenas mole, dura, riada e rio

AMORIM e SILVA (1968a e 1968b), posteriormente RO-
TEMBERG e IACHAN (1970a) e SANINT e VALENCIA (1970) já haviam constatado diferenças entre as atividades do PFO das diversas qualidades de bebida.

O estudo da correlação entre qualidade da bebida e atividade enzimática realizado com as nossas amostras vieram confirmar essa expectativa. Diferenças na atividade do PFO nas amostras de bebidas padrões também foram reveladas pelo teste de Fisher ao nível de 1%. Entretanto trabalhando com amostragem de diferentes locais, que provoca maior variabilidade dos resultados, só foi possível detectar diferenças entre as bebidas mole e rio pelo teste Tukey.

Contudo o mecanismo e a relação do PFO com a qualidade da bebida ainda não está esclarecido, embora, uma hipótese sobre sua inativação com fenois formados pela ação das glicosidasas tenha sido aventada. (AMORIM et al., 1972b)

As médias das atividades específicas para cada uma das bebidas padrões de café decresciam de 73,33 para bebida mole a 32,30 para bebida rio.

A correlação para atividade do PFO e dos valores de qualidade da bebida apresentou-se significativo ao nível de 1%.

Considerando os valores médios das cinco bebidas padrões de café encontrou-se uma correlação entre a atividade do PFO e a qualidade da bebida que pode ser expresso pela equação $y = 25,85 + 12,51 x$, onde y corresponde a atividade específica do PFO nas condições do experimento e x ao valor das notas atribuídas à qualidade da bebida segundo GARRUTTI e CONAGIN (1961).

5.1.4. Comparações da atividade do peroxidase de amostras de bebida mole, apenas mole, dura, riada e rio

Na nossa revisão de literatura não encontramos nenhum trabalho referente a atividade de Peroxidase em grãos de café. Tratando-se de uma enzima da classe das óxido-redutase como a polifenoloxidase decidimos incluí-la nos testes preliminares.

Conforme se pode observar nos Quadros 14 e 15 a atividade do peroxidase de grãos de qualidade de bebida diferentes apresentaram uma diferença estatística ao nível de 5%. Pelo teste de Tukey para as médias encontradas obteve-se uma diferenciação do café de bebida dura e rio ao nível de 5%, o que parece uma indicação de que esse método de análise possa ser de interesse para distinguir as duas qualidades de café nas condições em que comumente se obtém essas amostras para análise.

5.1.5. Comparações da atividade do catalase de grãos de amostras de bebida mole, apenas mole, dura, riada e rio

Com relação aos dados obtidos no estudo da atividade do Catalase, Quadros 16 e 17 a análise da variância não mostrou diferenças significativas entre os tipos de bebida, o que veio mostrar ao menos nas condições em que foram realizadas essas determinações, que o processo não se presta ao objetivo proposto na presente tese. Pois a atividade da catalase não deve estar relacionada com a qualidade da bebida do café apesar de pertencer a mesma classe do enzima PFO.

5.2. Influência de locais, de variedades, de épocas após colheita sobre a atividade do PFO e a qualidade da bebida (grãos degomados com solução alcalina)

Em vista dos resultados obtidos, com respeito a atividade do PFO de grãos de café degomados com solução alcalina, podemos dizer que:

- a) . na comparação da atividade enzimática das variedades Mundo Novo e Bourbon Amarelo não se encontrou diferenças estatística em nenhum dos três estágios após a colheita;
- b) . no estudo da atividade do PFO nas três épocas observou-se um decréscimo da atividade enzimática especialmente entre o 1º e o 2º mês após a colheita;
- c) . com relação aos locais de origem das amostras foi encontrada diferenças estatísticas nas três épocas após a colheita.

Assim pois, ao que tudo indica as determinações do PFO podem ser feitas indiferentemente para essas duas variedades de café, quando degomadas com solução alcalina e após 2 meses de estocagem.

O decréscimo da atividade com o envelhecimento dos grãos está de acordo com os resultados de PEREIRA (1962).

As diferenças encontradas entre amostras de diversos locais e que eram mantidas na determinação nos 3 períodos após a colheita sugerem a necessidade de se considerar o fator local nas determinações do PFO.

Contudo a prova de xícara dessas mesmas amostras - Quadro 18 a 20 não revelou diferenças estatísticas entre as médias das mesmas. Em vista da influência do fator local sobre os resultados do PFO e não sobre os da prova de xícara, parece de interesse que estudos mais pormenorizados devam ser feitos, a fim de melhorar a correlação da atividade dessa enzima e as determinações da qualidade da bebida.

5.3. Atividade do PFO de grãos de café de quatro espécies de café, degomados naturalmente e de grãos imaturos da espécie arábica, em 1, 2 e 3 meses após a colheita

As análises dos experimentos com a finalidade de comparar as atividades de grãos de C. arabica no estágio de cereja não revelaram diferença entre as mesmas.

As análises estatísticas da atividade do PFO dos grãos colhidos no estágio de cereja das espécies C. arabica, C. canephora e C. dewevrei revelaram diferenças significativas nas três épocas. As atividades médias do PFO dos grãos decresceram na ordem de C. dewevrei, C. canephora, C. liberica e C. arabica.

A atividade do PFO de grãos imaturos do Catuai Amarelo tem atividade diferente dos grãos imaturos das variedades Mun do Novo e Bourbon Amarelo, exceção feita na primeira época.

Comparando-se as atividades do PFO das variedades arábicas entre grãos colhidos imaturos e cerejas, observou-se nas três épocas uma maior atividade dos primeiros.

As análises estatísticas revelaram que a atividade do PFO dos grãos imaturos de C. arabica diferem em geral das atividades dos grãos colhidos no estágio de cereja das outras espécies, excessão do C. canephora na primeira e segunda épocas após a colheita.

Paralelamente foram retirada parte do material utilizado no experimento deste ítem a fim de determinar a qualidade da bebida dos mesmos. Pela "prova de xícara" os grãos arábicas colhidos no estágio de cereja foram classificados como de qualidade de bebida mole, ao passo que os grãos colhidos imaturos foram qualificados como bebida rio, riado e às vezes dura.

Com relação ao envelhecimento dos grãos, após colheita, foram observadas diferenças significativas mais acentuadas nos grãos das espécies C. dewevrei e C. canephora, assim como nos grãos imaturos da espécie arábica.

5.4. Efeito da degomagem alcalina e natural na atividade do PFO

A análise enzimática do PFO revelou que os grãos tratados quimicamente, tinham atividade enzimática significativamente mais alta.

O presente resultado parece demonstrar que a degomagem natural provocou decréscimo na atividade a um nível que se mantém relativamente estável por um período de pelo menos três meses (Quadro 35).

SANINT e VALÊNCIA (1970), na Colômbia obtiveram idênticos resultados embora esses autores tivessem observado uma pior qualidade da bebida quando a fermentação natural se prolongava até 36 horas.

O tratamento com solução alcalina, provavelmente devido a sua curta duração, apresentava atividades específicas bem mais elevadas do que as dos grãos degomados naturalmente.

As amostras de grãos de café neste ensaio foram classificadas como de qualidade de bebida mole, em ambos os tratamentos.

5.5. Influência de inseticidas aplicados no cafeeiro na fase de grãos em desenvolvimento sobre a atividade do PFO e a qualidade da bebida

A análise da variância para atividade do PFO em grãos de café cujo cafeeiro foi submetido a tratamento com os inseticidas Dieldrex, BHC e Sumithion, não mostrou diferença entre as atividades enzimáticas dos grãos tratados. Em contraposição a análise da variância, para as provas de xícara, revelou diferenças estatísticas entre os tratamentos ao nível de 5%. Pelo teste de Tukey pode-se detectar diferenças entre os tratamentos Dieldrex e BHC.

Dentre os tratamentos estudados o BHC foi o único que apresentou padrão de bebida apenas mole enquanto os demais estariam classificados como padrão de bebida mole na classificação de GARRUTTI e CONAGIN (1951). Aliás a influência do BHC no gosto de alguns produtos agrícolas já foi descrito em revisão bibliográfica por GIANNOTTI et al. (1972).

Contudo este resultado com grãos de café merecem maiores estudos, pois SEIXAS (1948) não conseguiu observar a influência desse inseticida na qualidade da bebida do café.

Em vista dos resultados apresentados nesta discussão, achamos razoável considerar os efeitos dos diversos fatores estudados. A presença de grãos imaturos, grãos de espécies como C. dewevrei, C. canephora - var. bukobensis e C. liberica entre grãos de café e arábica beneficiado poderia contribuir para um aumento da atividade do PFO, prejudicando em contraposição a qualidade da bebida.

Por outro lado, a análise da atividade do PFO de grãos de diferentes tempos de armazenamento poderiam provocar dife

renças significativas com atividades do PFO, tal como aconteceu entre os resultados obtidos no primeiro e segundo mês após a colheita.

Ao mesmo tempo é de se considerar o processo de degomagem, pois como foi observado, os grãos tratados com solução alcalina se constituíram em fonte de PFO com maior atividade do que os degomados naturalmente.

Em suma os resultados encontrados nesta tese, revelaram que a utilização do método de classificação da qualidade pelo PFO como complementação das provas de xícara sem levar em conta os fatores mencionados pode pelo menos em casos críticos, conduzir a resultados completamente contraditórios.

Finalmente quer-nos parecer que através de um estudo sistemático e pela seleção das condições de amostragem poder-se-ia eliminar muitas das fontes de variação da atividade específica e conseqüentemente alcançar uma correlação bem mais segura entre atividade do PFO e qualidade da bebida do café.

6. CONCLUSÕES

Em vista dos resultados obtidos durante a execução desta tese, parece razoável admitir as seguintes conclusões com respeito aos fatores que provocam variações na atividade das enzimas, comprometendo em especial a relação da atividade do PFO e qualidade da bebida:

1. Embora tenha sido obtida uma correlação significativa entre a atividade do PFO e a qualidade da bebida do café, a análise estatística demonstrou que nas condições usadas apenas a atividade do PFO de grãos de bebida mole foi significativamente maior do que de bebida rio. A análise de regressão linear foi significativa à 1% e o valor de "r" foi de 0,488.

2. Enquanto a análise estatística da atividade do Catalase de grãos de café de diversos tipos de bebida de café não apresentou nenhuma diferença, peroxidase revelou diferenças entre a atividade de amostras de bebidas dura e rio.

3. O estudo de alguns fatores que poderiam ter influência sobre a atividade do PFO veio revelar o seguinte:

- a) . a atividade específica do PFO de amostras de diferentes locais submetidas ao mesmo tratamento apresentaram diferenças significativas;
- b) . o período de 1 a 3 meses de armazenamento após a colheita não causou variações da atividade do PFO de grãos de C. arabica degomados naturalmente, mas provocou redução da atividade dos grãos tratados com solução alcalina, grãos colhidos imaturos e das espécies C. dewevrei e C. canephora - var. bukobensis;
- c) . a atividade específica dos grãos naturalmente degomados e das espécies C. liberica, C. canephora var. bukobensis e C. dewevrei no primeiro mês após a colheita era de 2 a 8 vezes maior que as amostras de C. arabica;
- d) . a atividade enzimática específica dos grãos imaturos comparada com a dos grãos colhidos no estágio de cereja foram diferentes nos três períodos estudados;
- e) . a atividade específica dos grãos das variedades Mundo Novo e Bourbon Amarelo degomados naturalmente foram idênticas; o mesmo resultado foi encontrado pela degomagem com solução alcalina;
- f) . a atividade enzimática do PFO dos grãos degomados com solução alcalina foi de 3 a 4 vezes maior que a atividade dos grãos degomados naturalmente. Nos dois processos a bebida produzida era de qualidade mole;
- g) . a atividade específica do PFO de grãos tratados com BHC, Dioldrex e Sumithion não sofreu o efeito desses inseticidas, contudo, nos testes realizados pelos degustadores notou-se uma pequena influência negativa do BHC sobre a qualidade da bebida.

7. RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar as atividades enzimáticas do polifenoloxidase, peroxidase e catalase de grãos de café de bebidas padrões e relacionar as atividades enzimáticas com as bebidas mole, apenas mole, dura, riada e rio.

O enzimo polifenoloxidase mostrou-se mais promissor em relação às demais, bem como apresentou correlação significativa entre a atividade enzimática dos grãos com a qualidade da bebida. Diante dos resultados obtidos, achamos conveniente estudar alguns fatores que pudessem influenciar a atividade do PFO e qualidade da bebida.

1. Em suma esta tese pode ser dividida de um modo sucinto nas seguintes etapas de pesquisa:

- a) . determinação das atividades do Polifenoloxidase PFO, Peroxidase e Catalase de grãos de café de bebida mole, apenas mole, dura, riada e rio;
- b) . determinação do PFO de amostras degomadas com álcali, com 1, 2 e 3 meses de idade após a co-

lheita, das variedades Mundo Novo e Bourbon Amarelo das localidades de Pindamonhangaba, Ribeirão Preto, Piracicaba e Campinas;

- c) . atividade enzimática de PFO de amostras colhidas em Campinas, degomadas naturalmente e com 1, 2 e 3 meses de idade após a colheita das seguintes espécies, C. arabica, C. liberica, C. dewevrei e C. canephora - var. bukobensis. Da espécie arábica foram estudadas as variedades Mundo Novo, Bourbon Amarelo e Catuai Amarelo, foram também analisados grãos colhidos imaturos;
- d) . influência da degomagem alcalina na atividade do PFO de grãos de C. arabica;
- e) . influência da aplicação de inseticida para controle da broca, sobre atividade enzimática e qualidade da bebida de grãos de C. arabica, variedade Mundo Novo.

2. As seguintes conclusões foram tiradas dos resultados obtidos:

- a) . as atividades do PFO de grãos de café arábica de bebida mole difere significativamente de bebida rio. Os valores obtidos com o PFO estão correlacionados com os padrões de bebida. A equação de regressão encontrada foi $y = 25,85 + 12,51 x$, onde y corresponde a atividade específica do PFO e x os valores das notas atribuídas a qualidade da bebida (de 0 a 5);
- b) . a atividade do peroxidase, mostrou diferença entre os padrões de bebida "dura" e "rio", enquanto a do Catalase não mostrou diferença entre a atividade enzimática dos grãos da bebida padrões;
- c) . não houve diferenças na atividade de PFO das variedades Mundo Novo e Bourbon Amarelo;

- d) . foi observado o efeito de locais sobre a atividade do PFO de grãos de café das variedades - Mundo Novo e Bourbon Amarelo;
- e) . a atividade do PFO de grãos degomados com álcali foi no primeiro mês significativamente maior que a dos grãos estocados durante 2 e 3 meses. O mesmo fato foi observado com as espécies C. dewevrei, C. liberica, C. canephora degomados naturalmente, constituindo exceção o C. arabica;
- f) . a atividade enzimática do PFO das espécies C. arabica, C. dewevrei, C. liberica, C. canephora - var. bukobensis, degomados naturalmente diferem estatisticamente entre si;
- g) . a atividade do PFO de grãos imaturos da variedade Catuai Amarelo, apresentaram maior atividade que o PFO das variedades Mundo Novo e Bourbon Amarelo. A atividade enzimática dos grãos imaturos diferiu da atividade dos grãos cerejas das espécies C. dewevrei, C. liberica e C. arabica degomados naturalmente;
- h) . a atividade específica do PFO dos grãos de bebida mole, degomados com álcali foi significativamente maior que os grãos da mesma qualidade de bebida degomados naturalmente;
- i) . a atividade específica do PFO dos grãos tratados com inseticidas durante o desenvolvimento do fruto, não mostrou diferença significativa. Enquanto a média obtida pelas provas de xícara qualificaram as amostras tratadas com BHC como apenas mole. Os tratamentos com Dieldrex, Sumithion e Testemunha foram qualificados como - bebida mole.

8. SUMMARY

This thesis deals with the enzymic activities of polyphenoloxidase, peroxidase, and catalase of standard coffee beans and aims at correlating the enzymic activities with the Brazilian categories of coffee: soft, softish, hard, rioy and rio.

The polyphenoloxidase showed to be more promising as compared to the others, and showed a significant correlation between the enzymic activity of beans and the quality of beverage as well. Due to the results obtained, it was thought convenient to study some factors which might affect the PPO activity and the quality of the beverage.

In short, this thesis can be divided into the following phases:

1. determination of the polyphenoloxidase, peroxidase, and catalase activities of coffee beans of soft, softish, hard, rioy and rio categories.

2. study of PPO activity of bean samples 1, 2 and 3 months after being harvested, of Mundo Novo and Bourbon Amarelo varieties from Pindamonhangaba, Ribeirão Preto, Piracicaba and Campinas.

3. determination of PPO enzymic activities with 1, 2 and 3 months after harvesting of naturally fermented beans of C. arabica, C. liberica, C. dewevrei and C. canephora var. bukobensis. Sample of C. arabica, Mundo Novo, Bourbon Amarelo and Catuai Amarelo varieties immature beans were studied.

4. influence of alkaline treatment on PPO activity of C. arabica beans.

5. influence of insecticide application on enzymic activity and beverage quality of C. arabica beans, var. Mundo Novo.

The following conclusions were drawn from the experimental results:

1. the PPO activity from C. arabica beans qualified as soft was statistically different from rio beverage. The PPO activity data were correlated with the five categories of beverages. The regression equation obtained was $y = 25,85 + 12,51 x$, where y is specific activity to tasting categories.

2. the peroxidase activity of coffee bean showed significant difference between the hard and rio categories.

3. the enzymic activities of PPO of coffee bean, Mundo Novo and Bourbon Amarelo varieties were identical.

4. the PPO activities of coffee beans, var. Mundo Novo and Bourbon Amarelo, were differently influenced by the locals from which they came.

5. the PPO activities of C. arabica, C. dewevrei, C. liberica and C. canephora beans naturally fermented were statistically different.

6. the PPO activities of coffee beans treated with alkaline solution were higher in the first month of aging and presented significant difference from the coffee beans aged during 2 or 3 months. The same enzymic activity behavior was observed for naturally fermented C. dewevrei, C. liberica and C. canephora. The C. arabica was an exception.

7. the PPO activities of immature beans of Catuai Amarelo variety presented higher specific activity than Mundo Novo and Bourbon Amarelo varieties under the same conditions. The enzymic activity of immature and sun dried beans were higher than mature coffee bean activity, naturally fermented.

8. the PPO specific activity of beans qualified as soft submitted to alkaline treatment was significantly higher than the beans of the same beverage quality, naturally fermented.

9. the PPO activity of beans submitted to insecticide treatments during the first stage of the fruit development did not show any difference. But the mean quality scores of tasting test qualified the samples of beans treated with BHC as softish beverage while the treatments with Dieldrex, Sumithion and the control were qualified as soft beverage.

9. BIBLIOGRAFIA CITADA

AMORIM, H.V., L.C. SCOTON, A. de CASTILHO, F. PIMENTEL GOMES e E. MALAVOLTA. 1965. Estudos sobre a alimentação mineral do cafeeiro. XVII. Efeito da adubação N,P,K, na composição química do solo, do fruto e na qualidade da bebida. (Nota Preliminar). Anais ESALQ, 22: 130-152.

AMORIM, H.V., L.C. SCOTON, A. de CASTILHO, F. PIMENTEL GOMES e E. MALAVOLTA. 1967. Estudos sobre a alimentação mineral do cafeeiro. XXI. Efeito da adubação N,P,K, e orgânica na composição mineral do grão e na qualidade da bebida. (2ª Nota). Anais da ESALQ, 24: 215-227.

AMORIM, H.V. e D.M. SILVA. 1968a. Relação da atividade da polifenol oxidase do grão de Coffea arabica L. com a qualidade da bebida. Boletim Técnico-Científico nº 31. ESALQ-USP, Piracicaba S.P. Brasil. 16 pp.

AMORIM, H.V. e D.M. SILVA. 1968b. Relationship between the poliphenol oxidase activity of coffee beans and the quality of the beverage. Nature (London), 219: 381-382.

- AMORIM, H.V. 1970. Nutritional status of the coffee plant and beverage quality. *Indian Coffee*, 34: 331-335.
- AMORIM, H.V. 1972a. Relação entre alguns compostos orgânicos do grão do café verde com a qualidade da bebida. Tese de Doutorado apresentada a ESALQ, 1972.
- AMORIM, H.V.; E. MALAVOLTA; A.A. TEIXEIRA; V.F. CRUZ; M. MELO; M.A. GUERCIO; E. FOSSA; O. BREVIGLIERI; S.E. FERRARI; D.M. SILVA. 1972b. Relationship between some organic compounds of Brazilian green Coffee with the quality of the beverage. A ser apresentado no VI Coloquio Internacional sobre Química de Café. Bogota, Colombia, junho de 1973.
- ANTUNES FILHO, H. 1955. A Genética e a Qualidade do Café. Suplemento Agrícola de O Estado de São Paulo, 36: 3, S.P.
- BEGAZO, J.C.E. 1970. Ensaios sobre Degomagem e Armazenamento de Café Despulpado. *Revista Ceres*. Volume XVII, nº 92 pags. 139-157.
- BITTENCOURT, A.A. 1956. As fermentações e podridões da cereja do café. *O Biológico*. 22(12): 205-214.
- BITTENCOURT, A.A. 1957. O tratamento das cerejas de café para melhorar a bebida. *O Biológico*, 23(1): 1-12.
- BIGGERS, R.E., J.J. HILTON & M.A. GIANTURCO. 1969. Differentiation between Coffea arabica and Coffea robusta by computer evaluation of gas chromatographic profiles, comparison of numerically devided quality predictions with organoleptic evaluations. *Journal of Chromatographic Science*, 7: 453-483.
- CALLE, H.V. 1955. Pruebas químicas para determinar la calidad de café. *Cenicafé* (Colombia), 7(65): 158-160.
- CALLE, H.V. 1956. Bom ou mau café? *Boletim de Superintendência dos Serviços do Café*, 354: 51-52, São Paulo.

- CALLE, H.V. 1963. Reacciones cualitativas en la determinati
on del aroma del café. Cenicafé (Colombia), 14(3): 187-
194.
- CARVALHO, A. 1959. Prova de xícara. Suplemento Agrícola de
"O Estado de São Paulo", 227: 5. São Paulo
- CARVALHO, A.; R.S. GARRUTTI; A.A. TEIXEIRA; L.C. MONACO. 1970.
Ocorrência dos principais defeitos do café em várias fases
de maturação dos frutos. Bragantia vol. 29 nº 20 pg. 207-
220.
- CARVALHO, A. e L.C. MONACO. 1971. Melhoramento do Cafeeiro
visando a resistência a ferrugem alaranjado. Ciência e
Cultura vol. 23 nº 2. pg. 141-146.
- CENTI-CROSSI, M.; C. TASSI - MICCO and V. SILANO. 1969. Al-
bumin fractionation of green coffee seed varieties by
acrylamide gel - eletrophoresis. Phytochemistry, 8: 1749-
1751.
- CHASSEVENT, F.; J.C. VICENT, D. HAHN; S. POUGNEAUD and R. WILBAUX
1969. Étude de relations éventuelles gustatives ou chimi
ques en fonction de la préparation du café robusta au state
primaire. pp 179-185. A.S.I.C. Quatrième Colloque Interna-
tional sur la Chimie de Cafés. Amsterdam, Juin 1969.
- CORTE DOS SANTOS, A., D. HAHN, B. CAHAGNIER, R. DRAPRON, A.
GUILBOT, J. LEFEBVRE, J.L. MULTON, J. POISSON, E. TRENTÉ-
SAUX. 1971. Étude de l'évolution de plusieurs caracté-
ristiques d'un café arabica au cours d'un stockage expéri-
mental effectué a cinq humidités relatives différents.
Café Cacao Thé, 15: 329-340.
- COCHRAN, W.G. & G.M. COX. 1957. Experimental Designs, 2ª
Edição John Wiley & Sons, Inc., 611 pp., Nova York.
- FAIRBANKS BARBOSA, L.; F. PIMENTEL GOMES; P. PARREIRA; H. de
CAMPOS; A. de CASTILHO e A.A. TEIXEIRA. 1962. Estudos
preliminares sobre a prova de xícara de café - Secretaria
da Agricultura, S.F.C.C.1 - 38 pp. São Paulo.

- FELDMAN, J.R., W.S. RYDER and J.T. KUNG. 1969. Importance of nonvolatile compounds to the flavor of coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17: 733-739.
- FERRAZ, M. de B. e A.A. VEIGA. 1954. Secagem racional do café. *Boletim da Superintendência dos Serviços do Café*, 29 (325): 5-6.
- FERRAZ, M. de B. e A.A. VEIGA. 1959. Melhor bebida e maior poder germinativo do café. *Diretoria de Publicidade Agrícola da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo*. nº único - 25 pp.
- FERRMANN, H. & A.E. DIAMOND. 1967. Peroxidase activity and Phytophthora resistance in different organs of the potato plant. *Phytopatology*. 57: 69-72.
- FERREIRA, W.A. e H.V. AMORIM. 1970. Efeito da concentração do DOPA na atividade da polifenoloxidase em grãos de café. *O Solo*. Ano LXII nº 2. novembro 1970. pag. 13-14. Piracicaba - S.P.
- FORSYTH, W.G.C. 1964. Physiological aspects of curing plant products. *Annual Review of Plant Physiology*, 15: 443-450.
- GARRUTTI, R.S. e A.G. CONAGIN. 1961. Escala de Valores para a avaliação da Qualidade da Bebida do Café. *Bragantia* 20: 557-562. Campinas, S.P.
- GARRUTTI, R.S.; C.G. TEIXEIRA, N.G. SCHMIDT e J.P.N. JORGE. 1961. Influência da colheita e preparo do café sobre a qualidade da bebida. *Bragantia*, 20(25): 653-657.
- GARRUTTI, R.S. & A.G. GOMES. 1961. Influência do estado de maturação sobre a qualidade da bebida do café na região do Vale do Paraíba. *Bragantia*, 20(44): 989-995.
- GARRUTTI, R.S.; C.G. TEIXEIRA, O.Z. TOLEDO, J.P.N. JORGE. 1962. Determinações de sólidos solúveis e qualidade da bebida em amostras de café dos portos brasileiros de exportação. *Bragantia*. 21: 78-82.

- GAUTSCHI, F.; M. WINTER, I. FLAMENT, B. WILLHALM and M. STOLL. 1967. The chemistry of coffee aroma, a survey of present knowledge. pp 67-76. A.S.I.C. Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés. Trieste, Itália, Juin 1967
- GIANNOTTI, O.; A. ORLANDO, D. PUZZI, R.D. CAVALCANTE, E.J.R. MELLO. 1972. Noções básicas sobre praguicidas. Generalidades e recomendações de uso na agricultura do Estado de São Paulo. O Biológico 38(8 e 9): 223-337. São Paulo
- GIBSON, A. 1971a. Photochemical aspects of drying east African Arabica Coffees: I. The importance of integument pigmentation. A.S.I.C. Cinquième Colloque International sur la Chimie des Cafés. Lisboa, Portugal, junho 1971.
- GIBSON, A. 1971b. Photochemical aspects of drying east African Arabica Coffees. II. Raw bean colours produced from kahweol esterés. A.S.I.C. Cinquième Colloque International sur la Chimie des Cafés. Lisboa, Portugal, junho 1971.
- ILLY, E. and L. RUZZIER. 1971. Proposition d'un nouveau système d'évaluation gravimétrique des défauts du café vert. pp. 24-25. A.S.I.C., Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés. Triest - Italie. Juin, 1971.
- KRUG, H.P. 1940a. Cafés duros. Relação entre porcentagem de microorganismos e qualidade do café. Rev. do Inst. do Café 15(165): 1827-1831.
- KRUG, H.P. 1940b. Cafés duros. Um estudo sobre a qualidade dos cafés de varrição. Rev. do Inst. do Café 27(163): 1393-1396.
- KRUP, H.P. 1941. Cafés duros. Relação entre zonas, qualidade do café e porcentagem de microorganismos. Rev. do Inst. do Café. 16(169): 288-295.
- LAZZARINI, W. & F.P.R. MORAES. 1958. Influência dos grãos deteriorados (tipo) sobre a qualidade da "bebida" de café. Bragantia 17(7): 109-118.

- LUCK, H. 1963. Methods of enzymatic analysis. Ed. Bergmeyer Ac. Press Inc. Publishers. New York. p. 885-894.
- MALAVOLTA, E. 1957. Práticas de Química Orgânica e Biológica. Centro Acadêmico "Luiz de Queiroz", Piracicaba, São Paulo, Brasil.
- MENCHU, J.F.E. 1966. La determinación de la calidad del café. Boletín nº 8. Asociación Nacional del Café. Guatemala. 51 pp.
- MENCHU, J.F.E. & E. IBARRA. 1967. The chemical composition and the quality of Guatemala coffee. pp. 144-154. A.S.I.C. Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts Torrefiés et leurs Derivés. Trieste Juin, 1967.
- MERRIT, G. Jr.; D.H. ROBERTSON; D.J. McADOO. 1969. The relationship of volatile compounds in roasted coffee beans to their precursors. pp. 144-148. A.S.I.C. Quatrième Colloque International sur la Chimie des Cafés. Amsterdam, Juin, 1969.
- MONACO, L.C. 1958. Qualidade da bebida. Suplemento Agrícola de "O Estado de São Paulo" 176: 5, São Paulo
- NORTHMORE, J.M. 1965. Some factors affecting the quality of Kenya coffee. Turrialba, 15(3): 184-193.
- NORTHMORE, J.M. 1967. Row bean color and the quality of Kenya Arabica Coffee. pp. 405-414. A.S.I.C. Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés. Trieste, Juin, 1967.
- ORLANDO, A., J. HUSSNI, D. PUZZI. 1968. Ensaio sobre o emprego do Lindane (Isomero gama do BHC) na forma de fumetas contra as infestações do caruncho do café (Araecerus fasciculatus De Geer.) O Biológico vol. XXXIV pag. 110-114.
- PEIXOTO, J.M. 1970. Expurgo e Proteção de café armazenado: Expurgo em armazens, Expurgo em vagões, Expurgos em Navios, Expurgo em Silos. Manuseio Secagem e Armazenamento do Café. Ed. Imprensa Universitária. Universidade de Viçosa, MG Brasil, pag. 269-282.

- PEREIRA, M.J. 1962. Proof of the existence of a chlorogenic oxidase in the coffee bean - change in its activity according to the age of the bean. *Estudos Agronômicos (Lisboa)* 3(4): 151-156.
- PIMENTEL GOMES, F. 1966. *Curso de Estatística Experimental* 3ª Edição. Gráfica Benetti Ltda. São Paulo.
- REGITANO, A.; O.F. de SOUZA, J.F.M. FAVA. 1963. *Processamento do Café. Cultura e Adubação do Cafeeiro*. Ed. Instituto Brasileiro de Potassa. São Paulo, Brasil, pag. 233-277.
- ROBINSON, J.B.D. 1960. Amber beans. *Kenya Coffee*, 25:91-93.
- RODRIGUEZ, D.B., H.A. FRANK and H.Y. YAMAMOTO. 1969. Acetaldehyde as possible indicator of spoilage in green kona (HAWAIIAN) Coffee. *Journal of Science and Food Agriculture*, 20: 15-17.
- ROTENBERG, B.; A. IACHAN. 1970. Caracterização química das variedades de café bebida. *Resumo da XXII Reunião Anual do S.B.P.C.*, 396 Sec. P. 190.
- ROTENBERG, B.; A. IACHAN. 1971. Método químico automático para diferenciação de "Café - bebida". *Revista Brasileira de Tecnologia*, vol. 2, nº 2, pg. 67-69. junho 1971.
- ROTENBERG, B. e A. IACHAN. 1972. Contribuição ao Estudo Enzimático do grão de café. I. Tirosinase e lacase. *Revista Brasileira de Tecnologia*. vol. 3, pag. 155-159.
- SANINT, O.B.; G. VALENCIA. 1970. Actividad enzimática en el grano de café en relación con la calidad de la bebida. I. Duración de la fermentación. *Genicafé (Colômbia)*, 23: 59-71.
- SCIVITTARO, A.; A. FIGATTI; E.J.R. MELLO & A. ORLANDO. 1963. Resíduos tóxicos e alterações do gosto em tubérculos de batatinha, provocadas pelo tratamento da folhagem com BHC e lindane. *Arc. do Instituto Biológico*, vol. 30. pg. 99 a 102.

- SEIXAS, C.A. 1948. Prova de bebida de cafés tratados com inseticidas para combate à broca. *Biológico*, São Paulo, 14 (7): 163-164.
- SHADAKSHARASWAMI, M. & G. RAMACHANDRA. 1968. Alterações nos teores de oligossacaridos e α -galactosidase nas sementes de café durante o seu umedecimento e germinação. Resumo em *Bibliografia do Café*. Ed. Missão de Estudos Agrônômicos de Ultramar. p. 354-356. Lisboa-Portugal.
- SMITH, R.F. 1963. Les acides chlorogéniques du café. pp. 77-84. A.S.I.C., Première Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés e leurs Derivés. Paris, France. Mai, 1963.
- TEIXEIRA, A.A.; L.S.P. de PEREIRA, F. PIMENTEL GOMES, V.F. CRUZ & A. de CASTILHO. 1968a. Influência de grãos pretos em ligas com cafés de bebida mole. *Boletim do Instituto Brasileiro do Café*. outubro 1968. 10 p.
- TEIXEIRA, A.A.; F. PIMENTEL GOMES; R.S. MORAES; H. de CAMPOS. 1968b. Zoneamento do Estado de São Paulo, por qualidade de bebida do café. Ed. MIC-IBC-DAC, São Paulo, novembro de 1968.
- TEIXEIRA, A.A.; F. PIMENTEL GOMES, A. de CASTILHO, L.S. de P. PEREIRA & V.F. CRUZ. 1969a. A influência de grãos ardidos em ligas com café de bebida mole (Resumo) *Ciência e Cultura* 21(2): 356.
- TEIXEIRA, A.A.; F. PIMENTEL GOMES, L.S. de P. PEREIRA, R.S. MORAES & A. de CASTILHO. 1969b. Influência de grãos verdes em ligas com cafés de bebida mole (Resumo) *Ciência e Cultura* 21: 355-356.
- TEIXEIRA, A.A.; A. CARVALHO, L.C. MONACO & L.C. FAZUOLI. 1971a. Grãos defeituosos de café colhido verde. *Bragantia*. vol. 30 nº 8 pg 77-90.
- TEIXEIRA, A.A.; C.S. DUARTE, J.C. de OLIVEIRA e F. PIMENTEL GOMES. 1971b. Influência da aplicação de fungicidas na qualidade da bebida do café. Resumo da XXIII Reunião Anual da S.B.P.C. Sec. Q.P. 399.

- TEIXEIRA, A.A. 1971. Classificação de Café. "In" Simposio sobre comercialização do café. Escola de Administração de Empresas de São Paulo da Fundação Getúlio Vargas e Fundação Itaú América. setembro de 1971. São Paulo, Brasil.
- TEIXEIRA, A.A. 1972a. Classificação Comercial do Café. Curso Intensivo de Cafeicultura. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", agosto de 1972. p 148-170.
- TEIXEIRA, A.A. 1972b. A Técnica Experimental da Degustação do Café. Tese apresentada a E.S.A. "Luiz de Queiroz".
- TELEDGY-KOVATZ, L., M. SZILAS-KELEMEN, D. TORLEY. 1963. Quelques observations sur les caracteristiques organoléptiques et la technologie des cafés robusta. pp. 93-97. A.S.I.C. Première Colloque sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés. Paris, France, Mai, 1963.
- THALER, H. 1963. Substances solubles et constituents aromatiques du café torréfié. pp. 72-76. A.S.I.C., Première Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts Torréfiés et leurs Dérivés. Paris, France. Mai, 1963.
- WOOTON, A.E. 1963. The fermentation of coffee. East African Industrial Research Organization Report. C.R. 12. Sept. 1963.
- WURZIGER, J. 1963. Substances aromatique volatiles oxydables comme complement d'appréciation du café torréfié et de ses préparations. pp. 85-92. A.S.I.C., Première Colloque International sur Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés. Paris, France. Mai, 1963.
- WURZIGER, J.; G. DICKHAUT. 1967. Über phenolische substanzen in kaffeewachs. pp. 121-126. A.S.I.C. Troisième Colloque International sur la Chimie des Café. Trieste, Italie. Juin, 1967.
- WURZIGER, J.; U. HARMS. 1969. Carbonsäure-hydroxy-tryptamide in rohen und gerösteten kaffeebohnen. pp. 85-91. A.S.I.C. Quatrième Colloque International sur la Chimie des Cafés. Amsterdam. Juin, 1969.