

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Cinthia de Carvalho Couto

**OBTENÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA PARA AVALIAÇÃO DE CAFÉS
ARABICA E ROBUSTA EM *BLENDS* DE CAFÉ**

Rio de Janeiro

2017

Cinthia de Carvalho Couto

**OBTENÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA PARA AVALIAÇÃO DE CAFÉS
ARABICA E ROBUSTA EM *BLENDS* DE CAFÉ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientador: Dr. Otniel Freitas Silva
Co-orientadora: Dra. Edna Maria Morais Oliveira

Rio de Janeiro

2017

Couto, Cinthia de Carvalho

Obtenção de material de referência para avaliação de cafés arábica e robusta em *blends* de café / Cinthia de Carvalho Couto – Rio de Janeiro – CCBS/UNIRIO, 2017.

73f. :

Orientador: Otniel Freitas-Silva / Edna Maria Morais Oliveira
Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

1.Material de Referência.2.Coffea arábica.3.Coffea robusta

Cinthia de Carvalho Couto

**OBTENÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA PARA AVALIAÇÃO DE CAFÉS
ARABICA E ROBUSTA EM *BLENDS* DE CAFÉ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Dr. Otniel Freitas Silva

EMBRAPA / Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Dra. Renata Torrezan

EMBRAPA Agroindústria de Alimentos

Dra. Suelen Alvarenga Regis

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

Às três grandes mulheres da minha vida Lisete, Cleide e Bruna.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me sustentar em todo o caminho, por ser minha luz e consolo, pela sua misericórdia e sempre prover tudo o que é necessário na minha vida, Vós sois o meu refúgio, sem Ti nada sou.

Aos meus pais, Cleide e Manoel, pelo amor que sempre me dedicaram, sempre me proporcionando o melhor que podiam, e principalmente me ensinando sempre a optar pelo caminho do bem, por sempre me estimularem a estudar e serem meu alicerce.

A minha avó, Lisete, por ser exemplo, uma mulher guerreira, que me inspira. Pelo amor, cuidado e compreensão, desde sempre, comigo.

A minha irmã Bruna pelo carinho e parceria que construímos ao longo do tempo, por partilharmos as alegrias e tristezas, sempre uma apoiando a outra.

Aos meus familiares, que sempre me aconselham e oram por mim, pelos inúmeros momentos de alegria, em especial Leida, Carlinhos, Sandro, Erika, Tânia e Carlos, Nélia, Maria Aparecida, Fernanda, Juliana, Carla, Camila e Thiago, Gabriel, Caio e Davi.

Aos amigos de longa e recente caminhada, Barbra, Natasha, Patrícia, Suzana, Thereza, Zaene, José Roberto, Derik, Gilvanete, Arlete, Tatiane, Ivanilda, Thiago, Ingrid, Priscila, Michele por me proporcionarem o melhor de uma amizade, com sua escuta, conselho, estímulos, risadas, até mesmo com a mão na massa, paciência, orações, alegria em cada encontro.

As companheiras de mestrado Verônica, Maria Eugênia, Mônica, Caroline, Nayara, Ticiane e Gabriela pela força e estímulo que passamos umas às outras.

Ao meu orientador Dr. Otniel Freitas-Silva pela oportunidade de abrir meus conhecimentos para um novo horizonte, pela parceria e compreensão, pelo estímulo e alegria de cada conquista.

A minha co-orientadora Dra. Edna Maria Morais Oliveira pelo carinho e acolhimento com que sempre me recebe, tornando a caminhada mais leve com seu otimismo e simplicidade.

A Dra. Melícia Galdeano pela receptividade e disponibilidade em contribuir com o desenvolvimento deste trabalho.

A Dra. Alexandra Mamede por sempre buscar melhorar o trabalho contribuindo com seus conhecimentos e pela amizade.

Aos funcionários da EMBRAPA que me ajudaram pelos diferentes laboratórios que realizei as análises, especialmente a Tatiane França, por todo empenho, carinho, torcida e dedicação com que realizou as análises.

A Prof. Dra. Édira Castello Branco de A. Gonçalves pela oportunidade aberta através do Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição e prontidão com que sempre me recebeu.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

A todos que contribuíram direta e indiretamente com este trabalho.

Muito Obrigada, que Jesus Cristo seja sempre a luz na vida de todos vocês!

Louvai o Senhor, porque ele é bom. Porque eterna é a sua misericórdia.

(Salmo 106, 1)

RESUMO

O café é uma das principais bebidas consumidas em todo o mundo, sendo o Brasil o maior produtor e exportador de café. As espécies mais utilizadas são *Coffea arabica* e *C. canephora*, sendo a primeira com maior produção. Essas espécies possuem aromas, composição química e sensorial e valores comerciais distintos. Assim na comercialização, cafés arabica torrados e moídos podem ser misturados com café robusta, muitas vezes para obtenção de uma bebida com característica específica e outras com objetivo de reduzir os custos de produção. A fim de obter padrão de rotulagem, faz-se necessária a elaboração de material de referência (MR) que permita a identificação e ratificação da composição percentual dos *blends* de café, para dar suporte a uma possível legislação. O MR é um material suficientemente homogêneo e estável com propriedades especificadas, para ser utilizado em um processo de medição, como instrumento para garantia, qualidade e autenticidade das proporções das espécies em cafés. O objetivo do estudo foi obter e disponibilizar um MR para caracterizar *blends* de cafés comerciais e diferenciar as espécies *C. arabica* e *C. canephora* (arábica e robusta). Os grãos de café verde foram processados separadamente, utilizando torra média (240 °C por 14 minutos) e moagem (< 600 µm). O MR foi constituído com os seguintes percentuais: 0 e 100, 5 e 95, 25 e 75, 50 e 50, 75 e 25, 95 e 5 e 100 e 0%, de *C. arabica* e *C. canephora*, respectivamente. Foram avaliados a perda de massa durante a torra, a cor instrumental, o tamanho e a distribuição de partículas por difratometria laser. Para a diferenciação e quantificação de DNA das espécies de café nos MR, foram submetidos à extração de DNA e análise por PCR em tempo real. Os resultados obtidos de homogeneidade e o potencial da técnica de PCR para discriminar tais percentuais dos MR permitiram inferir que os MR produzidos apresentaram homogeneidade quanto à perda de massa e tamanho e distribuição de partículas. A análise de cor instrumental indicou maior luminosidade para o *C. canephora*, ou seja, mais claro que o *C. arabica*. Os MR apresentaram uma tendência à tonalidade amarela, de acordo com as coordenada b* e ângulo hue, e vermelha, segundo os valores de a*. A análise por PCR em tempo real usando *primer* sintetizado ARA mostrou-se promissora na detecção das espécies de cafés para o MR, pois o *primer* utilizado apresentou especificidade para *C. arabica*.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, material de referência, mescla, análise de PCR.

ABSTRACT

CANDIDATE COFFEE REFERENCE MATERIAL FOR THE EVALUATION OF BLENDS FROM *COFFEA ARABICA* AND *C. CANEPHORA*.

Coffee is a major beverage consumed worldwide, and Brazil is the great protagonist on its production and exportation. The most commonly coffee species are *Coffea arabica* and *C. canephora*, namely, arabica and robusta, respectively, the first one with the larger production. These species have different chemical composition, however *C. arabica*, has flavor and body higher than *C. canephora*, In this sense, the price of robusta is lower than arabica ones. Roasted and ground coffees marketed as Arabica are commonly mixed with robusta, in many cases to give a characteristic blend in others to reduce production costs. In Brazil, there are no Arabica and Robusta percentiles restrictions in commercial coffee, only for the gourmet and superior coffees. Thus, each brand produces its blend with different percentages of species. However, there is evidence of the need for the blend composition on the label. To identify and ratify composition of commercial blends is necessary to prepare reference material (RM) as an instrument to guarantee authenticity and quality of Arabica and Robusta proportions in coffee blends. In this way the aim of this work was to prepared RM with different proportions of *C. arabica* var. Catuaí and *C. canephora* to be differentiate at specie level by PCR. The green coffee beans from both species was roasted, separately to the level medium at 240°C for 14 minutes; and milling to the < 600 µm granulation. The RM was constituted with Arabica and Robusta coffees according to the following percentages: 0 and 100, 5 and 95, 25 and 75, 50 and 50, 75 and 25, 95 and 5 e 100 and 0%, of arabica and robusta, respectively. The weight loss and the instrumental color analysis were realized before roasting and milling, respectevly. For DNA differentiation and quantification in RM, the extracted DNA was performed by real-time PCR. The data were statically analyzed to verify the homogeneity of RM and the potential of the PCR technique to differentiate such percentages. The results indicate the produced RM presented homogeneity regarding particle size and distribution, and weight loss. The color instrumental analysis showed greater luminosity for the coffee Robusta, lighter than coffee Arabica. The RM presented a tendency to yellow, according to coordinates b* and hue angle, and red, according to values of a*. Real-time PCR using an ARA primer shows a promising technique for the detection of coffee species in MR, since it presented specificity for Arabica ones.

Keywords: *Coffea arabica* , *Coffea canephora*, reference material, blends, PCR analysis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Produção total de grãos de café nos últimos 20 anos.....	22
Figura 2. Torrador de bancada <i>Gene Café</i>	31
Figura 3. Agitador de peneiras	32
Figura 4. Moedor automático em aço escovado	34
Figura 5. Peneiras de aço inox.....	35
Figura 6. Homogeneizador em Y	36
Figura 7. Fluxograma para produção do MR de blends de café, segundo a norma ISO guide 35	36
Figura 8. Nano-espectrofotômetro Genova Nano	40
Figura 9. Termociclador ABI 7500	41
Figura 10. Análise granulométrica de café robusta torrado e moído.....	46
Figura 11. Seleção de grão de café arabica (A) e café robusta (B), à esquerda grãos selecionados e à direita grãos com defeitos.....	52
Figura 12. MR em embalagem laminada com zíper (~25g).....	53
Figura 13. Evolução do processamento de cafés arabica (A) e robusta (B) para obtenção do MR.....	54
Figura 14. Percentual de partícula de cada ponto do MR, segundo cada ponto mensurado	55
Figura 15. Curvas da análise de PCR em tempo real de amostra de café verde.....	57
Figura 16. Curvas da análise de PCR em tempo real de amostra dos MR	59

Todas as fotos presentes no trabalho citadas como FIGURAS fazem parte do arquivo do Laboratório de Diagnóstico Molecular e de Micologia.

Os equipamentos mostrados nas Figuras pertencem a EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, Brasil.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais diferenças entre café arabica e café robusta	20
Tabela 2. Conceituação sobre MR e MRC de acordo com as normas nacional e Internacional	26
Tabela 3. MR elaborados com café para avaliação de diferentes analitos	28
Tabela 4. Produtores de MRC	29
Tabela 5. Composição e codificação do MR segundo o percentual de espécies.....	37
Tabela 6. Condições de reação da análise de PCR em tempo real	41
Tabela 7. Perda de massa após torra de café robusta e café arabica.....	43
Tabela 8. Percentual de retenção de partículas em peneiras, de acordo com diferentes moedores.....	45
Tabela 9. Percentual de retenção de partículas em peneiras, segundo o tempo (minutos) e auxílio de pincel	45
Tabela 10. Percentual de retenção de partículas em peneira segundo as espécies de café.....	47
Tabela 11. Cor instrumental (L^* , a^* e b^*) de cafés arabica e robusta.....	47
Tabela 12. Cor instrumental (L^* , a^* e b^*) dos MR.....	49
Tabela 13. Cor instrumental (C^* e h°) de cafés arabica e robusta	50
Tabela 14. Cor instrumental (C^* e h°) dos MR.....	50
Tabela 15. Proporção de café arabica e robusta para cada MR.....	52
Tabela 16. Média de massa contida em cada embalagem, segundo cada ponto do MR	53
Tabela 17. Distribuição granulométrica dos MR em micrômetros e valores de <i>Span</i> obtidos por difratometria a laser.....	54
Tabela 18. C_t e T_m médios para amostras de café verde	58
Tabela 19. C_t e T_m médios para os MR analisados	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABIC	Associação Brasileira da Indústria do Café
BICC	Bureau de Inteligência Competitiva do Café
CENA/USP	Centro de Energia Nuclear na Agricultura / Universidade de São Paulo
CETEM	Centro de Tecnologia Mineral
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CT	Threshold Cycle / Ciclo Limiar
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide / Brometo de Cetiltrimetilamônio
DNA	Deoxyribonucleic acid
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAPAS	Food Analysis Performance Assessment Scheme
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
IAEA	International Atomic Energy Agency
IARC	International Agency for Research on Cancer
INAA	Instrumental Neutron Activation Analysis
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IPT	Instituto de Pesquisas Tecnológicas
ISO	International Organization for Standardization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LDM-CTAA	Laboratório de Diagnóstico Molecular - Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MR	Material de Referência
MRC	Material de Referência Certificado
OGM	Organismos Geneticamente Modificados
OTA	Ocratoxina A
PCR	Polymerase Chain Reaction
Primers	Oligonucleotídeos iniciadores
PVA	Preto, Verde e Ardido
PVP	Polivinil Pirrolidona
Span	Índice de Polidispersão

TLC	Thin Layer Chromatography
TM	Melting Temperature / Temperatura de Dissociação
UFLA	Universidade Federal de Lavras
USP	US. Pharmacopeial Convention / convenção da farmacopeia americana
VIM	Vocabulário Internacional de Metrologia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 JUSTIFICATIVA.....	18
3 OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4 REVISÃO DE LITERATURA	20
4.1 CAFÉ.....	20
4.1.1 Aspectos gerais do café.....	20
4.1.2 Produção e consumo do café.....	21
4.1.3 Composição química do café	23
4.2 MATERIAL DE REFERÊNCIA	24
4.2.1 Aspectos gerais.....	24
4.2.2 MR para café	28
5 MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 ORIGEM E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	31
5.2 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DO MR.....	31
5.2.1 Determinação do grau de torra	31
5.2.2 Escolha do moedor e determinação da granulometria para o MR.....	32
5.2.3 Análise de cor instrumental dos cafés torrados e moídos.....	33
5.3 PRODUÇÃO DO MR.....	34
5.4 ANÁLISE DE TAMANHO DE PARTÍCULA E DA DISPERSÃO GRANULOMÉTRICA DO MR	37
5.5 ANÁLISE POR PCR EM TEMPO REAL DO MR.....	39
5.5.1 Extração de DNA	39
5.5.2 PCR em tempo real	40
5.6 ANÁLISE DE DADOS.....	42
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1 NÍVEL DE TORRA DOS GRÃOS DE CAFÉ ARABICA E ROBUSTA	43
6.2 ESCOLHA DO MOEDOR	44

6.3 DEFINIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA DO MR.....	45
6.2 ANÁLISE DE COR DOS GRÃOS TORRADOS E MOÍDOS DE CAFÉ ARABICA E ROBUSTA	47
6.5 OBTENÇÃO DOS MR.....	51
6.5.1 Análises físicas dos MRs.....	54
6.5.1.1 <i>Determinação do tamanho e distribuição de partículas</i>	54
6.5.2 Análises moleculares.....	56
7 CONCLUSÃO	61

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café em todo o mundo. Segundo o Informe Estatístico do Café de dezembro de 2016, no último ano o país produziu cerca de 51,4 milhões de sacas de café, mostrando a maior produção de café nos últimos 15 anos (MAPA, 2016). Logo em seguida o Vietnã com a segunda maior produção mundial em 2015/2016, passando de 28,7 milhões de sacas. Na terceira posição do ranking está a Colômbia, depois da queda na produção em 2011/12 (7,7 milhões de sacas), houve um aumento para 14,5 milhões. A produção global de café no ano-safra de 2016/17 é de 151,6 milhões de sacas, similarmente ao volume obtido em 2015/16 (OIC, 2016).

O principal café produzido e exportado no mundo é da espécie *Coffea arabica*, responsável por cerca de 70% da produção, enquanto a espécie *C. canephora* (robusta) responde pelos 25%, e 5% corresponde às demais espécies. De uma forma geral, a espécie arabica tem aroma e sabor superiores ao café robusta, sendo mais valorizada comercialmente (ALVES, CASAL, OLIVEIRA, 2009). Entretanto, a demanda por café robusta tem crescido. Essa espécie é mais produtiva e resistente, e custos com a produção são menores, despertando interesse de indústrias para este de tipo de grão não só para compor *blends* (UFLA, 2015) como também para produção de cafés especiais.

Com o crescimento do mercado de café no mundo inteiro e a demanda por maior qualidade, devido à alta competitividade, é necessária a participação de fontes de informação de inovação para empresas, tais como órgãos de pesquisa, algumas indústrias e entidades fiscalizadoras, públicas ou não para produção (ALVES, CASAL, OLIVEIRA, 2009; CÉSAR, MORI, BATALHA, 2010). Sobre a qualidade do café, é importante considerar todos os aspectos da cadeia produtiva desde o plantio até o mercado. A uniformidade do grau de maturação dos frutos na colheita, a secagem, o armazenamento dos grãos crus, a torrefação e o armazenamento do café torrado são etapas críticas de produção nas quais cuidados especiais devem ser tomados para garantir a qualidade final do produto (ABRAHÃO et al., 2010; MENDONÇA et al., 2007).

Os cafés torrado e moídos comercializados possuem diferentes teores das espécies arabica e robusta, sendo que cada marca produz o seu *blend*, com as características adequadas para o mercado consumidor (ABRAHÃO et al., 2010). Os cafés considerados Superior ou Premium devem ser constituídos por café arabica “blendados” ou não com café robusta, contendo no máximo 15% em volume físico no *blend*, de bebida dura ou mole. E o *gourmet*

constituído por grãos de café 100% arábica, de origem única ou “blendados”, de bebida suave, preferencialmente apenas mole ou mole ou estritamente mole (SAA, 2007a, 2007b). No momento, a legislação brasileira sobre as características e composição de cafés comerciais não restringe a proporção do *blend* nem a rotulagem de café torrado e moído Tradicional. Fazer link com a importância do MR (café robusta é adicionado intencionalmente a fim de reduzir os custos da produção).

Para a cafeicultura de arábica, o café robusta representa um substituto aos grãos de baixa qualidade. Sabe-se que o “consumidor padrão” de café não consegue distinguir *blends* com baixa e alta porcentagem de robusta. Diante dessas circunstâncias, uma estratégia de longo prazo para a cafeicultura de arábica continua sendo o investimento em qualidade, produtividade certificação, com um controle preciso dos custos (UFLA, 2015).

Há um indício de que a composição do *blend* será necessária na rotulagem. Sendo assim, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) vai requerer a avaliação desses produtos para identificação e ratificação desses percentuais. Para isto, é necessário o desenvolvimento de material de referência (MR) de café arábica e robusta e sua caracterização como instrumento para garantia da qualidade e autenticidade das proporções das espécies em cafés. Desta forma auxiliar na análise de proporções das espécies de café que compõe os *blends* comerciais.

O material de referência consiste em um “material suficientemente homogêneo e estável em relação a propriedades específicas, preparado para se adequar a uma utilização pretendida numa medição ou num exame de propriedades qualitativas” (INMETRO, 2012).

O serviço de certificação de MR, disponibilizado pelo Inmetro à sociedade, contribui decisivamente para o aumento da confiança das medições, com objetivo de prover rastreabilidade aos laboratórios com material de referência certificado (MRC) usados para calibrar instrumentos, atribuir valor às propriedades físicas/químicas de materiais, validar métodos de medição e garantir a qualidade de processos, fundamentais para assegurar a confiabilidade metrológica.

Para a elaboração de um MR é essencial que haja um adequado sistema de qualidade implantado, que assegure a confiabilidade desses materiais, além oferecer ao cliente e usuário valores atribuídos às propriedades de interesse com evidência clara da confiabilidade (SIU et al., 2005; ULRICH, 2011).

Comumente, laboratórios de análises químicas necessitam de padrões cujas propriedades devem apresentar valores próximos ao esperado. A produção do MR deve ser precedida de um planejamento experimental detalhado, pois a qualidade dos materiais de

referência tem impacto direto na qualidade dos resultados analíticos obtidos pelos laboratórios (CARDOSO et al., 2010; SIU et al., 2005).

A tecnologia do DNA (deoxyribonucleic acid) recombinante tem sido utilizada para a determinação da autenticidade de alimentos processados (ARLOTIO et al., 2007; CASTELLÁ, CABAÑES, 2011; COSTA, MAFRA, OLIVEIRA, 2012; GERMINI et al., 2004; LAUBE et al., 2010; PAFUNDO, GULLÌ, MARMIROLI, 2009). A PCR (polymerase chain reaction) em tempo real vem sendo amplamente utilizada para a análise da presença de sequências específicas de DNA em diferentes matrizes alimentares para detecção de patógenos e detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados (OGM). Além disso, já existem análises por PCR em tempo real para a detecção de glúten em alimentos destinados aos portadores de doença celíaca (OLEXOVÁ et al., 2006; PIKNOVÁ; BREZNÁ; KUČHTA, 2008). No entanto, esta abordagem analítica apesar de já ter sido reportada no trabalho de Tornincasa *et al.* (2010), ainda não é conclusiva para detecção em uma mesma amostra de sequência de café arabica e robusta, necessitando de ajustes adicionais metodológicos para o uso para este fim. O desenvolvimento de métodos utilizando PCR com marcadores de qualidade para diferenciação intra-específica é uma ferramenta que tende a se tornar cada vez mais usual, devido à especificidade, sensibilidade, rapidez, praticidade e baixo custo. A disponibilidade de métodos analíticos mais específicos e sensíveis para a análise da qualidade do café torrado e moído poderá dar suporte aos laboratórios de análise de alimentos e às agências regulamentadoras no que se refere ao cumprimento da legislação. Além disso, o MRC café poderá contribuir para a caracterização do produto (rotulagem), aumentando a credibilidade de cafés certificados.

2 JUSTIFICATIVA

O café é a bebida mais consumida em todo o mundo, representando grande importância econômica dentre as indústrias de alimentos. Os grãos de café verde podem ser diferenciados quanto a sua espécie, arábica e robusta, pelo seu tamanho e forma. Durante o processo de torra é produzido o aroma, cor e sabor característicos do café, sendo o café arábica responsável pelo aroma e sabor agradáveis, enquanto o café robusta confere corpo a bebida. Entretanto após o processo de torra e moagem a diferenciação das espécies é eliminada. Além disso, por apresentar um alto valor comercial, o café alvo de ações fraudulentas. Assim, aumenta a possibilidade do uso indiscriminado das espécies, provavelmente priorizando a de menor custo, robusta, sendo necessária a realização de análises para diferenciar essas duas espécies. (CIZKOVA, 2007; Martin, 2001).

No Brasil, a fiscalização de adulteração do café é realizada por microscopia óptica, que permite a visualização histológica característica de outros vegetais, permitindo a avaliação do grau de pureza do café.

Atualmente não existe uma legislação que determine o percentual das duas principais espécies no café torrado e moído. A falta de padronização da quantidade de cada espécie no café altera sua qualidade, o que pode causar prejuízos de ordem econômica ao consumidor. No entanto, há um indício de que o MAPA pode requerer a avaliação desses percentuais na rotulagem para identificação e ratificação desses percentuais.

O uso de métodos analíticos (químico, físico ou biológico) para detecção de espécies de café requer um material com características conhecidas e padronizado, permitindo maior precisão e exatidão em seus resultados. Para isso faz-se necessário o desenvolvimento de um MR de café compostos pelas espécies arábica e robusta, o qual contribuirá para a qualidade e autenticidade das proporções das espécies em café comerciais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Preparar material de referência para caracterizar *blends* de cafés comerciais e diferenciar as espécies de café arábica e robusta.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Obter material de referência composto por *C. arabica* e *C. canephora* em diferentes proporções.
- ❖ Diferenciar proporções de *blends* de *C. arabica* e *C. canephora* usando a técnica PCR em tempo real.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 CAFÉ

4.1.1 Aspectos gerais do café

O cafeeiro provém da família *Rubiaceae* e pertence ao gênero *Coffea*, sendo este o mais importante economicamente. O café possui um aroma único e efeitos estimulantes, sendo uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo, e por isso tem despertado o interesse da comunidade científica (ALVES, CASAL, OLIVEIRA, 2009). As espécies *Coffea arabica* (*C. arabica*) e *C. canephora* (robusta) destacam-se pela sua alta utilização comercial (FARAH, SANTOS, 2015; MONAKHOVA et al., 2015). A tabela 1 mostra algumas diferenças em relação a essas duas espécies (EMBRAPA, 2004a).

Tabela 1. Principais diferenças entre café arabica e café robusta

Café arabica	Café robusta
Menos resistente aos ataques de pragas	Mais resistente aos ataques de pragas
Maior valor comercial	Menor valor comercial
Tetraplóide (44 cromossomos)	Diplóide (22 cromossomos)
Menor teor de sólidos solúveis	Maior teor sólidos solúveis
Menor teor de cafeína	Maior teor de cafeína
Menor rendimento após torrefação	Maior rendimento após torrefação

Adaptado de: EMBRAPA, 2004a

Os grãos de café verde das espécies arabica e robusta podem ser distinguidos pelo seu tamanho e forma. Após a torrefação e a moagem, não se pode distinguir as espécies por esses critérios macroscópicos (ČÍŽKOVÁ et al., 2007). Comparando o café arabica com o robusta, o primeiro possui um sabor e aroma preferível ao segundo, e por isso possui maior valor comercial (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009; MONAKHOVA et al., 2015). Além disso, o café robusta é mais resistente aos ataques de pragas durante o cultivo, aumenta o corpo e a espuma de algumas bebidas, é utilizado para produção de café solúvel (com grânulos dissolvidos em água quente), devido ao maior teor de sólidos solúveis (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009; MENDONÇA et al., 2007). Por apresentarem essas características, cafés

comerciais rotulados como “Arabica” podem ser misturados com “Robusta”, diminuindo o custo do produtor, lesando as organizações de importação de café e, por fim o consumidor (MONAKHOVA et al., 2015).

4.1.2 Produção e consumo do café

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café com preço médio de exportação estimado em US\$ 159,46 em 2016. O primeiro levantamento de safra de café de 2017 feito pela CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) indica que a produção brasileira estará entre 43,65 a 47,51 milhões de sacas de 60 kg (CONAB, 2017a). Segundo dados do Informe estatístico do café, da produção total de 2016 cerca de 43,4 milhões de sacas de 60 kg correspondem ao café arabica e restante (8,0 milhões de sacas) ao café robusta. Assim observa-se uma possível queda na produção de 15 a 7,5% , quando comparado com a produção do ciclo anterior, que chegou a 51,4 milhões de sacas (CONAB, 2017b; MAPA, 2016). Segundo este informe, o consumo interno de café em 2016 foi em torno de 21 milhões de sacas.

De acordo com o Sistema de Inteligência Estratégica da EMBRAPA, o Agropensa, a produção total de grãos de café apresentou uma variação de produção ao longo dos últimos 20 anos. Neste período, entre os anos de 2000 e 2003 apresentou uma queda brusca de 1813 mil toneladas (EMBRAPA, 2017). Em 2015 a produção foi de 2645 mil toneladas, como mostra a Figura 1.

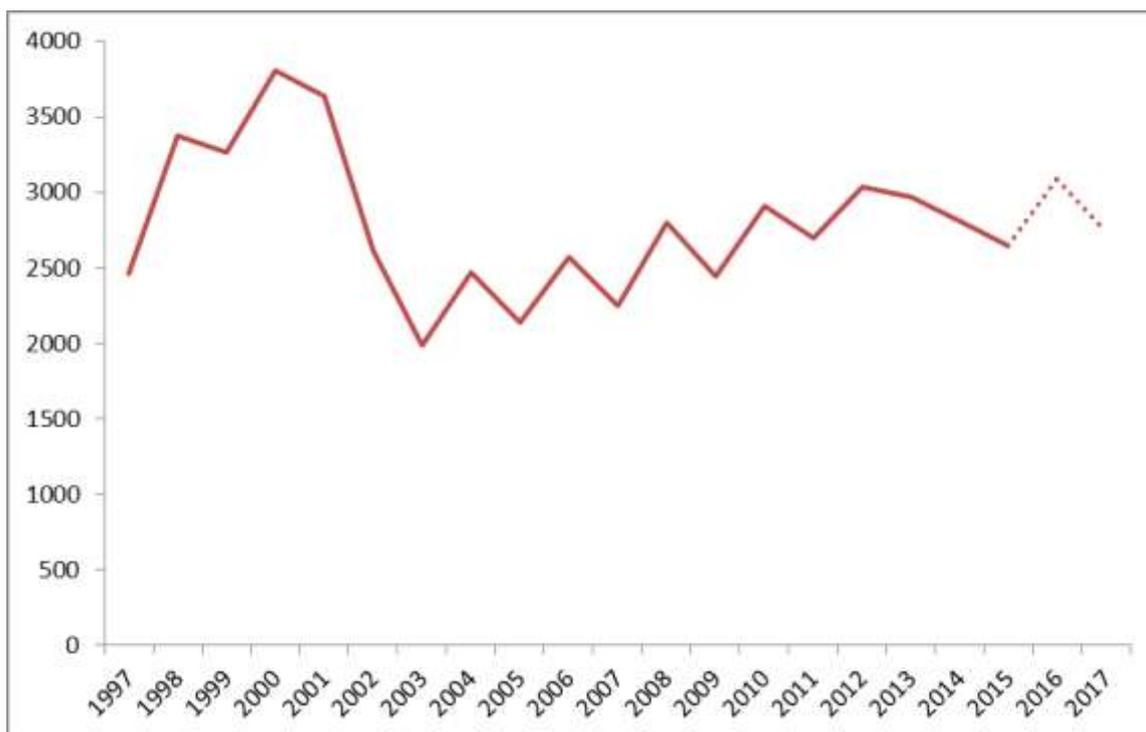


Figura 1. Produção total de grãos de café nos últimos 20 anos

- * — Dados provenientes do Embrapa Agropensa, referentes aos anos de 1997 a 2015 (EMBRAPA, 2017)
- * Dados provenientes do Informe Estatístico do Café (MAPA), referentes aos anos de 2016 e estimativa de 2017

Ao analisar a produção de grãos por espécies, verifica-se que o café robusta apresentou maior produção em 2014, com 791,9 mil toneladas, e a menor em 2015 com 651,7 mil toneladas. Já o café arábica obteve maior produção em 2013, com uma produção de 2320 mil toneladas, reduzindo para 1993 mil toneladas em 2015 (EMBRAPA, 2017).

De acordo com o Bureau de Inteligência Competitiva do Café (BICC, 2017) o consumo de café solúvel aumentou na Ásia e no Leste Europeu no último ano. Atualmente, o mercado de café solúvel é avaliado em US\$ 28 bilhões, com previsão de crescimento de US\$ 8,3 bilhões até 2020. O aumento do consumo deste tipo de café se deve ao fato ao modo rápido e fácil de preparo, bem como também pela sua associação ao estilo de vida ocidental. A expectativa para 2020 é de que juntos, os mercados asiáticos do Pacífico, Oriente Médio e África ultrapassem o consumo do Leste Europeu. No entanto, o consumo de café solúvel tem apresentado queda no consumo. Neste mesmo relatório há um destaque para o aumento de produção da cafeicultura chinesa e inserção no mercado internacional, com um rápido crescimento no mercado externo, enquanto o mercado interno é suprido pelas importações. A China visa aumentar também a exportação de cafés industrializados.

O consumo da bebida de café vem aumentando em todo o mundo, principalmente dos cafés especiais. É importante ressaltar que as principais tendências para as torrefadoras no Brasil, na Europa e nos EUA, são os cafés especiais e as monodoses. O segmento de doses únicas, por exemplo, tem apresentado constante crescimento, pois oferece diversas possibilidades para preparar diferentes tipos de bebidas, tanto em cafeterias como em casa. Para atender esse mercado as empresas investem em grãos de melhor qualidade, tecnologia e novos produtos para atrair o consumidor. Entretanto, os consumidores mostram preocupação com a sustentabilidade do produto, que se insere no caso das cápsulas, pois estas representam uma fonte geradora de resíduos. Assim, as indústrias se mantêm empenhadas em encontrar alternativas que diminuam os impactos ambientais, tais como, o recolhimento do material utilizado e a oferta de suporte para o descarte correto das cápsulas (BICC, 2017)

4.1.3 Composição química do café

A composição química do café verde pode variar de acordo com a composição do solo e sua fertilização, altitude, tempo de plantio, cultivo, métodos de colheita (descafeinização) e de secagem (via seca, úmida ou mista), processamento armazenamento, torrefação e moagem, que podem afetar diretamente a qualidade da bebida do café. Além disso, os diferentes *blends* também estão relacionados a qualidade da bebida (ALVES, CASAL, OLIVEIRA, 2009; CONTI et al., 2013; FARAH, SANTOS, 2015; MENDONÇA et al., 2007).

O grau de maturação também influencia a qualidade do café. Os grãos maduros ou “cereja” produzem uma bebida de melhor qualidade, enquanto que os frutos imaturos são de baixa qualidade. Entretanto, os frutos não amadurecem ao mesmo tempo. Desta forma, normalmente, a colheita acontece quando a maioria dos grãos já amadureceram. A colheita pode ser manual, com os frutos colhidos um a um ou por derriça, ou ainda mecânica com auxílio de uma colheitadeira ou por derriça mecanizada, através da agitação das árvores ou corte dos galhos. Durante a colheita deve-se evitar o contato do fruto com solo, ou a colheita de varrição, devido à presença de fungos produtores de micotoxinas (EMBRAPA, 2004b; FARAH, SANTOS, 2015; FRANCA, MENDONÇA, OLIVEIRA, 2005).

O café verde é caracterizado por conter substâncias potencialmente bioativas tais como, ácidos clorogênicos, trigonelina, cafeína, entre outras. Outros componentes presentes são os polissacarídeos, proteínas e lipídeos (WEI, TANOKURA, 2015a). Com relação aos

minerais, o café verde é rico em potássio, além de conter quantidade considerável de manganês (CLARKE, MACRAE, 1988).

Durante o processo de torrefação do café ocorrem diversas modificações na composição química e na atividade biológica do café, como a degradação da proteína, que reage com outros compostos, como o açúcar redutor, gerando compostos derivados da reação de Maillard (ALVES, CASAL, OLIVEIRA, 2009; WEI, TANOKURA, 2015b). A torrefação também promove alterações que conferem o sabor agradável e o aroma do café, que tem como precursores os açúcares e a trigonelina (FRANCA, MENDONÇA, OLIVEIRA, 2005). Após o processo de torrefação, os ácidos clorogênicos tem como produto do processo de torrefação os ácidos cinâmicos, que participarão de reações subsequentes envolvidas na formação do *flavor* (WEI; TANOKURA, 2015b). Os ácidos cinâmicos (substância fenólicas) e a cafeína irão contribuir para o gosto amargo da bebida (CONTI et al., 2013; FRANCA, MENDONÇA, OLIVEIRA, 2005). Os lipídeos têm importante papel na retenção do *flavour* do café torrado, pois atuam como peneira seletiva na retenção das substâncias aromáticas do grão, melhorando a qualidade do produto (CONTI et al., 2013).

4.2 MATERIAL DE REFERÊNCIA

4.2.1 Aspectos gerais

A experimentação científica geralmente requer algum tipo de medição, a qual deve ter credibilidade através de resultados rastreáveis, confiáveis e com todas as incertezas declaradas, a uma referência confiável. Esses resultados proporcionam comparabilidade e equivalência em nível mundial (KATO, 2014).

Frequentemente, laboratórios de ensaio e calibração, incluindo laboratórios químicos analíticas, são solicitados a fornecer evidências sobre a qualidade de suas operações. Quando limites legislativos estão envolvidos isso é obrigatório, por exemplo, no caso de comércio internacional de alimentos, análise ambiental, química clínica, entre outros (IAEA, 2003). Desse modo, faz-se necessário a comparação do(s) analito(s) em questão com um MR.

O material de referência pode ser uma substância pura ou uma mistura na forma de gás, líquido ou sólido. Eles são divididos em duas classes: material de referência (MR) e material de referência certificado (MRC) (IAEA, 2003).

O vocabulário internacional de metrologia (VIM) (INMETRO, 2012) define MR como um “Material, suficientemente homogêneo e estável em relação a propriedades específicas, preparado para se adequar a uma utilização pretendida numa medição ou num exame de propriedades qualitativas”. Enquanto o MRC consiste no “material de referência acompanhado de uma documentação emitida por uma entidade reconhecida, a qual fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas e as rastreabilidades associadas, utilizando procedimentos válidos”. Alguns outros órgãos e entidades formularam diferentes conceitos sobre MR e MRC, conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Conceituação sobre MR e MRC de acordo com as normas nacional e Internacional

MR	MRC	Organização	Referência bibliográfica
Material, suficientemente homogêneo e estável com uma ou mais propriedades especificadas, que foi estabelecido para ser apto para a sua utilização prevista, em um processo de medição	Caracterizado por um procedimento metrologicamente válido para uma ou mais propriedades especificadas, acompanhados de um certificado MR que fornece o valor da propriedade especificada, sua incerteza associada, e uma declaração de rastreabilidade metrológica”.	ISO GUIDE 30	(ISO, 2015a)
Material ou substância que tem uma ou mais propriedades suficientemente homogêneas e bem estabelecidas para serem usados na calibração de um aparelho, na avaliação de um método de medição, ou atribuição de valores a materiais	MR acompanhado por um certificado, com um ou mais valores de propriedades, e certificados por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual os valores da propriedade são expressos, e cada valor certificado é acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido	IAEA (International Atomic Energy Agency)	(IAEA, 2003)
nd	Materiais suficientemente homogêneos e estáveis com respeito a uma ou mais propriedades especificadas, que foram caracterizados por uma rede de laboratórios qualificados, usando uma variedade de métodos com exatidão demonstrável.	CETEM (Centro de Tecnologia Mineral)	(CETEM, de 2016)
Substâncias ou artefatos com uma ou mais propriedades suficientemente bem determinadas, e que podem ser utilizados na calibração de equipamentos, no acompanhamento e na avaliação de operadores, no controle e atribuição de valores a outros materiais e para o desenvolvimento de metodologias	nd	IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas)	(IPT, 2017)

*nd-não disponibilizado

De acordo com a norma ISO Guide 33 (ISO, 2015b), os MRC são aplicados para a calibração de um aparelho, validação do método, avaliação do método e desempenho do instrumento, estabelecendo a rastreabilidade dos resultados de medição e determinação da incerteza dos resultados.

A elaboração de um MRC requer, antes do início de qualquer atividade, um planejamento experimental detalhado, para o qual deve ser prevista uma quantidade suficiente de material a ser utilizado para execução de todos os estudos de caracterização (ISO, 2006). De acordo com a ISO 35 (ISO, 2006) as principais etapas de produção de um MR consistem basicamente em: definição das propriedades a serem certificadas e seus respectivos níveis de incerteza; elaboração de procedimentos de amostragem, de preparação de amostras e caracterização de amostras; preparo do material; seleção de métodos adequados para testes de homogeneidade, estabilidade e caracterização; aplicação dos testes de homogeneidade e estabilidade; e certificação dos dados obtidos (ISO, 2006).

Os materiais, que serão utilizados no MR, devem ser processados de diferentes maneiras para se adequarem ao uso como MRC. Os processos de produção podem abranger secagem, trituração, moagem, peneiração, mistura combinação de materiais, entre outros. No caso de MRC, deve-se pensar no tipo de frasco a ser utilizado, pois irá contribuir para integridade do material e de seus valores certificados por longo período de tempo, durante todo o período despendido no transporte e armazenamento (CARDOSO et al., 2010; ULRICH, 2011).

A garantia da manutenção das propriedades físico-químicas do MR é determinada pelos testes de homogeneidade e estabilidade. O termo “homogeneidade”, de acordo com a norma ISO Guide 30, é definido como “uniformidade de um valor de propriedade especificado ao longo de um segmento definido de um material de referência” (ISO, 2015a). Sendo assim, é necessário número de recipientes representativo em relação ao quantitativo final. Além disso, devem-se considerar as variabilidades da amostra dentro do recipiente, bem como entre os recipientes que contêm os materiais que contêm o mesmo lote, previamente envasados. Para minimizar a variabilidade dos resultados, o teste de homogeneidade deve ser executado em condições de estrita repetitividade (mesmo laboratório, mesmo analista e desempenho dos testes no mesmo dia) (CARDOSO et al., 2010).

Já a estabilidade, segundo a norma ISO Guide 30, é definida como “característica de um material de referência, quando armazenados sob condições específicas, para manter um valor de propriedade especificado dentro dos limites especificados para um determinado período de tempo” (ISO, 2015a). O estudo da estabilidade é essencial na produção MR, pois o

mesmo pode sofrer degradação com o tempo através de alguns fatores, tais como: temperatura, luz, oxigênio, umidade, atividade microbiológica, etc (CARDOSO et al., 2010).

A certificação do MR representa a melhor estimativa do valor verdadeiro da propriedade estudada, que servirá para conferir a rastreabilidade a medições geradas em processos metrológicos. Durante o processo de medição ocorrem efeitos causais e sistemáticos, além da variabilidade entre as amostras (homogeneidade) e o tempo de validade do material (estabilidade) que devem ser considerados na incerteza declarada no valor certificado da propriedade (CARDOSO et al., 2010; SIU et al., 2005).

4.2.2 MR para café

Para o café os parâmetros mais importantes a serem considerados na elaboração do MR são secagem, moagem, peneiração, mistura, além da embalagem que é importante para a retenção dos aromas do café. Atualmente, poucos materiais de referência com café foram desenvolvidos.

Algumas instituições produzem MRC, no Reino Unido, uma das mais conceituadas, a FAPAS (*Food Analysis Performance Assessment Scheme*) produz e comercializa materiais de referência incluindo de café para diferentes analitos (Tabela 2).

A Tabela 3 mostra uma lista de materiais de referência elaborados com café para avaliação de diferentes analitos.

Tabela 3. MR elaborados com café para avaliação de diferentes analitos

Matriz	Analitos	Método*	Referência**
Café	Acrilamida	-	FAPAS
Café	Furano	-	FAPAS
Café (moído)	Cafeína	-	FAPAS
Café solúvel	Ocratoxina A	-	FAPAS
Café torrado	Ocratoxina A	-	FAPAS
Café verde	Trigonelina	HPTLC	MUFLIAH BUCHARI, 2013
Café torrado	Ocratoxina A	HPLC-MS/MS	KOCH et al., 2011
Café verde orgânico	Minerais (Br, Ca, Co,Cs, Fe, K, Na, Rb, Sc, Zn)	k ₀ -INAA	TAGLIAFERRO, FERNANDES, BACCHI, 2006
Café verde	Ocratoxina A	HPLC e TLC	MAPA, 2006

*HPTLC - *high performance thin layer chromatography*; HPLC-MS - *liquid chromatography-mass spectrometry*; TLC- *thin-layer chromatography*; INAA - *instrumental neutron activation analysis*;

**FAPAS - *Food Analysis Performance Assessment Scheme*

Algumas instituições também produzem MRC para alimentos, sendo 2 brasileiras e 9 internacionais, conforme Tabela 4. No entanto, apenas duas instituições produziram MRC para café, a FAPAS e USP, a primeira já disponibiliza o MRC para comercialização, enquanto a segunda ainda está desenvolvendo o MRC para extrato seco de café.

Tabela 4. Produtores de MRC

Produtor Nacional	Produtor Internacional	MRC para alimento	MRC para café
INMETRO	-	Sim	Não
IPT	-	Não	Não
CETEM	-	Não	Não
INCQS	-	Não	Não
IAL	-	Sim	Não
SENAI CETEPO	-	Não	Não
-	LMARSA	Sim	Não
-	R-BIOPHARM	Sim	Não
-	SGS	Não	Não
-	USP	Sim	Sim
-	FAPAS	Sim	Sim
-	NIST	Sim	Não
-	LGC STANDARDS	Sim	Não
-	ERM	Sim	Não
-	IAEA	Sim	Não
-	ACCUSTANDARDS	Sim	Não

O Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP) desenvolveu um MRC para café para determinação do conteúdo de elementos inorgânicos. Para a elaboração deste material utilizou-se a metodologia descrita na norma ISO Guide 34 e 35 (TAGLIAFERRO et al., 2003).

Como parte de um estudo desenvolvido pela FAO e MAPA em 2005, foi produzido um MR com amostras de café verde contaminadas artificialmente com ocratoxina A (OTA). Além de seu desenvolvimento, neste estudo, houve um teste de avaliação do MR com a adesão voluntária 10 diferentes laboratórios, nacionais e internacionais para a determinação de OTA em café verde (MAPA, 2006). No resultado de avaliação deste MR com OTA, três

laboratórios apresentaram relatos acima de 80% dos resultados satisfatórios, e os demais laboratórios em torno de 50%.

Atualmente, os MR disponíveis para comercialização visam identificar a presença de contaminantes que podem colocar em risco a saúde humana. Com o café não é diferente, os MR comercializados para essa matriz alimentar tem como principais analitos a OTA, cafeína e acrilamida (Czichos, 2011).

A acrilamida, substância formada durante a torra de alimentos ricos em carboidratos, representa um risco a saúde humana por ser neurotóxica e carcinogênica (ABRAHÃO et al., 2012).

A OTA, um metabólito comumente produzido pelos fungos *Penicillium* e *Aspergillus* comum tanto em café verde quanto em torrado, é classificada como substância do grupo 2B pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), pois é conhecida por estar relacionada à carcinogênese em humanos (CAMPOS et al., 2009).

A cafeína é conhecida por ser o principal componente psicoativo do café, cujos efeitos são diversificados, desde melhora na performance cognitiva e psicomotora do consumidor, quando ingerida em doses baixas a moderadas, até efeitos adversos (taquicardia, insônia, ansiedade, tremores etc) em altas quantidades (Alves, Casal, Oliveira, 2009). Atualmente, estudos tem analisado também a relação da cafeína com a perda de peso (ONAKPOYA; TERRY; ERNST, 2011).

Recentemente, a USP (*US. Pharmacopeial Convention*) vem desenvolvendo um MR de extrato de café classificado no grupo de suplementos alimentares. Esta inovação tem se tornado uma necessidade devido à expansão da utilização do extrato seco de café verde como suplemento para emagrecer. Segundo Onakpoya, 2011 e Samidi (2015) há indícios de que o consumo de extrato de café verde promova a perda de peso. No entanto, esse efeito é considerado pequeno e sua relevância clínica ainda é incerta, sendo necessária a realização de ensaios mais rigorosos e por um período de tempo maior (ONAKPOYA; TERRY; ERNST, 2011; SAMADI; MOHAMMADSHAHI; HAIDARI, 2015).

Apesar de existirem materiais de referências de café disponibilizados em instituições de pesquisa e para comercialização, como apresentados na Tabela 2, ainda não existe nenhum MR para verificação da autenticidade em cafés torrado e moído quanto aos teores de cafés arábica e robusta na mistura.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ORIGEM E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os grãos de café utilizados para análise foram: *Coffea arabica*, variedade Catuaí e *C. canephora*. As amostras foram adquiridas de regiões produtoras dos estados do Rio de Janeiro (*C. arabica*) e do Espírito Santo (*C. canephora*), nos municípios de Machado e Castelo, respectivamente. O local de armazenamento das amostras foi nos laboratórios de Diagnóstico Molecular e Micologia da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos.

5.2 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DO MR

5.2.1 Determinação do grau de torra

Inicialmente, amostras teste foram torradas em seis replicatas para as duas espécies de café em torrador de bancada (*Gene Café*, modelo CBF-101, Kyungki-Do, Korea), Figura 2, a fim de se determinar a perda de massa e o rendimento após a torrefação. O nível de torra da produção do MR foi padronizado para torra média na condição de temperatura a 240°C por 14 minutos. Esta avaliação também foi feita após a seleção dos grãos para composição do MR.



Figura 2. Torrador de bancada *Gene Café*

5.2.2 Escolha do moedor e determinação da granulometria para o MR

As amostras teste foram moídas em diferentes moedores para escolha do tipo de moedor. As marcas dos moedores testadas foram PROBAT LEOGAP Gourmet (M50), IKA (A11) e Cuisinart (DBM8). Para a escolha do moedor e verificação da granulometria ideal para compor o MR, as amostras torradas e moídas foram submetidas aos testes de agitação de peneiras em agitador de peneiras ROTAP (modelo RX-29, EUA), Figura 3, onde foram verificados diferentes tempos (10 e 20 minutos) de agitação e a necessidade ou não do uso de pincel para auxiliar a peneiragem. Foram testadas peneiras de abertura 0,850; 0,710; 0,600; 0,500; 0,425; 0,300; 0,250; 0,212 mm a fim de caracterizar o material quanto à granulometria. Tal procedimento está de acordo com a classificação baseada na retenção em peneiras granulométricas n. 1,68; 1,19; 0,850; 0,595 mm e fundo das Normas de Qualidade Recomendável ABIC/PQC (ABIC, 2012).



Figura 3. Agitador de peneiras

5.2.3 Análise de cor instrumental dos cafés torrados e moídos

A análise instrumental de cor foi realizada por reflectância no aparelho Color Quest XE, escala CIELab E CIELCh, com abertura de 25 mm de diâmetro, com iluminante D65/10. Foram analisadas as amostras teste de café arábica e robusta antes da produção do MR e todos os percentuais dos MR obtidos.

Foram avaliados os seguintes parâmetros de cor:

- ✓ **L*** = luminosidade, variando de 0 (preto) a 100 (branco)
- ✓ **a*** = coordenada cromática, variando de -80 até zero (verde), do zero ao +100 (vermelho)
- ✓ **b*** = coordenada cromática, variando de -100 até zero (azul), do zero ao +70 (amarelo)
- ✓ **C*** = chroma, define a intensidade ou saturação de cor, sendo definido pela distância do ângulo hue no centro do diagrama tridimensional. Valores próximos a zero são indicativos de cores neutras (branco e/ou cinza) e valores ao redor de 60 indicam cores vívidas e/ou intensas (FERNANDES et al., 2010).
- ✓ **h°** = ângulo hue, mostra a localização da cor em um diagrama tridimensional, onde o ângulo 0° representa o vermelho puro, o 90° representa o amarelo puro, o de 180° o verde puro e o 270° o azul (MCGUIRE, 1992).

O cálculo do valor de croma (C*) e ângulo hue (h°) são dados pelas fórmulas a e b, respectivamente:

$$(a) C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

$$(b) h^\circ = \arctan (b^*/a^*)$$

As amostras de café foram dispostas em cubeta de Quartzo de 10 mm para a realização do teste. Foram realizadas 4 repetições para cada amostra.

As análises estatísticas foram realizadas através do programa Excel (Microsoft Office, 2007) Statística (versão 8.0). As médias referentes aos parâmetros L*, a*, b*, C* e h°, quando significativas foram comparadas através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.3 PRODUÇÃO DO MR

Com as condições preestabelecidas deu-se início a produção do MR. As amostras foram preparadas de acordo com a norma ISO 43 (ISO, 1997) e IUPAC (IUPAC, 1993, 1995). Para tanto, os grãos de café das duas espécies foram selecionados, descartando-se grãos malformados e/ou defeituosos.

O nível de torra do MR foi padronizado para torra média, na condição de temperatura a 240°C por 14 minutos. Essa condição foi escolhida por assemelhar ao utilizado em cafés comerciais. A torrefação dos grãos selecionados foi realizada individualmente em um torrador de bancada.

Após a torrefação, os grãos de café passaram pelo processo de moagem em moedor automático em aço escovado Cuisinart (DBM8), Figura 4, na moagem mais fina, sendo um para cada espécie de café.



Figura 4. Moedor automático em aço escovado

Para a padronização da granulometria as amostras moídas foram submetidas ao processo de agitação em peneiras por 20 minutos contendo cerca de 150 g de amostra por batelada. Para a peneiragem foram utilizados dois conjuntos de peneiras (Bertel, São Paulo, Brasil), Figura 5, de granulometria 0,850, 0,600, 0,500 mm e fundo, um para cada espécie de café para evitar contaminação cruzada. As amostras foram peneiradas no agitador de peneiras

ROTAP. Foram utilizadas 3 esferas de porcelana para auxiliar na passagem de partículas. Para a composição do MR foi utilizado o material retido na granulometria $< 600 \mu\text{m}$.



Figura 5. Peneiras de aço inox

As amostras torradas, moídas e peneiradas das duas espécies de café foram homogeneizadas em homogeneizador do tipo Y (TECNAL, TE 201/05), Figura 6, nas seguintes proporções: 100:0; 95:5; 75:25; 50:50, 25:75, 5:95 e 0:100, de café arabica e robusta, respectivamente. O processo de homogeneização foi realizado por 6 horas ininterruptas a 30 ± 2 rpm. O tempo de homogeneização foi adaptado de MR de café verde contaminado artificialmente com OTA (VARGAS et al., 2005). Após cada homogeneização o MR foi armazenado em embalagens laminadas com zíper, separadamente. As amostras de MR foram pesadas e armazenadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ em embalagens laminadas.



Figura 6. Homogeneizador em Y

A produção de um MR foi realizada segundo a ISO Guide 35, conforme apresentado na Figura 7.

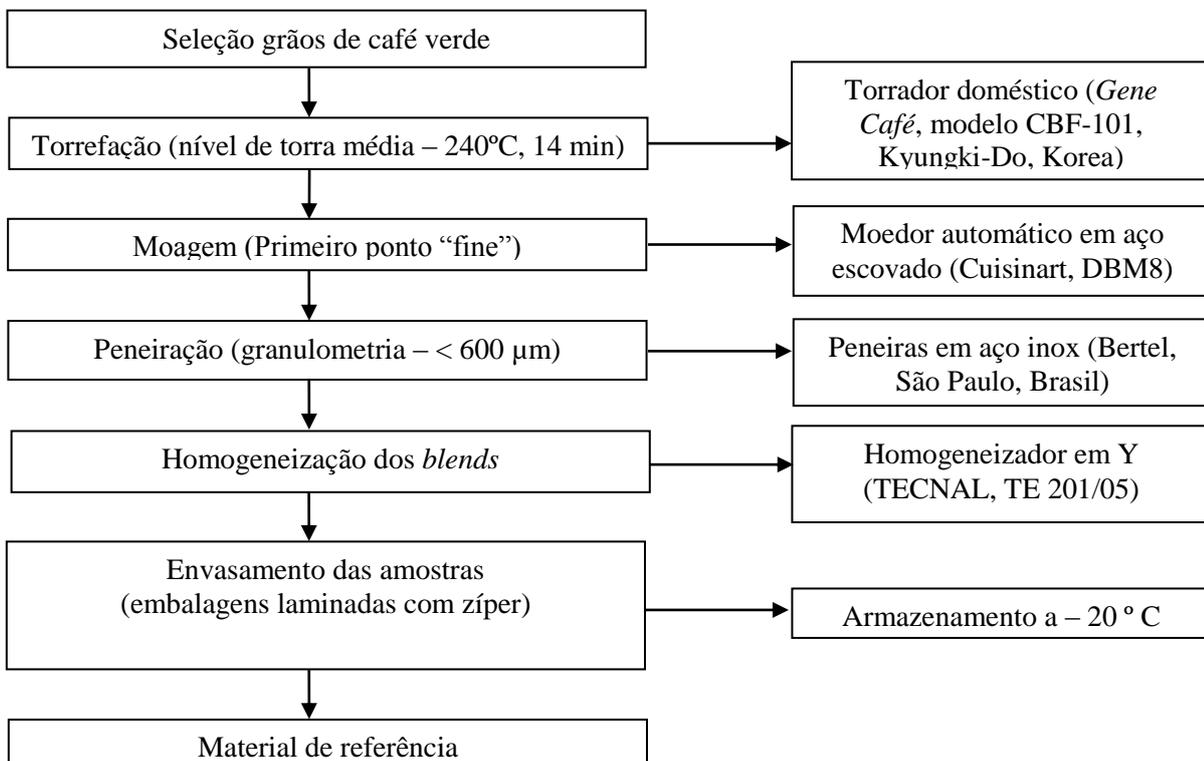


Figura 7. Fluxograma para produção do MR de blends de café, segundo a norma ISO guide 35

As amostras foram codificadas conforme o percentual das espécies no MR, seguido pelo número cardinal, conforme mostra a Tabela 5.

Tabela 5. Composição e codificação do MR segundo o percentual de espécies

Composição da amostra	Código	Numeração
PONTO 1 (100% ARABICA E 0% ROBUSTA)	P1.100A	1-24
PONTO 2 (95% ARABICA E 5% ROBUSTA)	P2.95A	1-24
PONTO 3 (75% ARABICA E 25% ROBUSTA)	P3.75A	1-24
PONTO 4 (50% ARABICA E 50% ROBUSTA)	P4.50A	1-24
PONTO 5 (25% ARABICA E 75% ROBUSTA)	P5.25A	1-24
PONTO 6 (5% ARABICA E 95% ROBUSTA)	P6.5A	1-24
PONTO 7 (0% ARABICA E 100% ROBUSTA)	P7.0A	1-24

Para verificar da homogeneidade do MR foram realizadas coletas uma amostra de 25 g aleatoriamente de cada material e analisada em triplicata para determinação do tamanho de partícula dos cafés torrados.

5.4 ANÁLISE DE TAMANHO DE PARTÍCULA E DA DISPERSÃO GRANULOMÉTRICA DO MR

A determinação do tamanho das partículas foi avaliada pela técnica de difratometria a laser através do analisador, MICROTRAC S3500 (Microtrac Inc., Montgomery Ville, USA), pelo princípio da técnica do espalhamento de luz, que consiste na medição dos ângulos de difração de raio laser e a relação com o diâmetro da partícula, de acordo com a norma ISO 13320-1 *Particle Size Analysis – laser diffraction methods*. A análise foi realizada no Laboratório de Análises Físicas da Planta Piloto 4 de Cereais da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, RJ.

A análise foi conduzida em triplicata e em três ciclos de leitura (totalizando 9 leituras), utilizando álcool isopropílico P.A. como dispersante/fluido carreador (índice de refração de 1,37 a 20°C), segundo metodologia proposta por GUEVARA-BARRETO; CASTAÑO-CASTRILLÓN, 2004. Para o tamanho de partícula analisado foi adotado o índice de refração de 1,50.

Entre as réplicas da mesma amostra, o álcool isopropílico foi drenado e o equipamento foi preenchido com novo meio dispersante. Entre cada amostra, além da drenagem do álcool, o circuito foi lavado (4 ciclos) com água deionizada e novamente preenchido com o dispersante (álcool isopropílico). As análises foram feitas nas seguintes amostras: MR P1.100A 14, MR P2.95A 9, MR P3.75A 14, MR P4.50A 25, MR P5.25A 22, MR P6.5A 3, MR P7.0A 24.

Os resultados foram obtidos dentro da faixa de leitura de 0,02 a 2800 μm e coletados do *software* do próprio equipamento. Os dados de difração a laser foram avaliados utilizando o valor $D-[4,3]$, que representa o diâmetro médio baseado no volume da partícula e, ainda, os valores de 10, 50 e 90% da distribuição (D10, D50 e D90, respectivamente) que indicam a percentagem de partículas possuindo diâmetro igual ou inferior ao valor determinado (SANTOS et al., 2012). O valor do *Span* (índice de polidispersão) foi empregado como a medida de dispersão granulométrica, cuja fórmula relaciona os valores encontrados de diâmetro das partículas correspondentes a D10, D50 e D90 da distribuição acumulada para a amostra (DOMINGUES et al., 2008). Ou seja, esta medida avalia a variação do volume de distribuição das partículas em relação ao diâmetro médio volumétrico (D50) (CHEN; DAVIS, 2002; CUNHA et al., 2004). A fórmula matemática para cálculo do valor do *Span* está descrita a seguir:

$$\text{Span} = \frac{\text{D90} - \text{D10}}{\text{D50}}$$

Onde:

D10 – 10% do volume da amostra possuem partículas com diâmetro abaixo desse valor.

D50 – 50% do volume da amostra possuem partículas com diâmetro abaixo desse valor – medida conhecida como diâmetro médio volumétrico.

D90 – 90% do volume da amostra possuem partículas com diâmetro abaixo (ou 10% acima) desse valor.

O tratamento dos dados foi feito através do programa Excel (Microsoft Office, 2007) e Statística (versão 8.0, EUA).

As médias referentes aos diâmetros de partículas (D-[4,3]; D10; D50; D90) foram comparadas através do teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.5 ANÁLISE POR PCR EM TEMPO REAL DO MR

5.5.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Molecular da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

Preparo de amostras

Para a obtenção de soluções de DNA para serem utilizadas na análise de PCR em tempo real, foram realizadas a extração e quantificação de DNA das seguintes amostras: MR P1.100A 14; MR P4.50A 25; MR P7.100A 24.

A pesagem foi feita em triplicata em balança analítica (Bioprecisa, modelo FA-2104N, Brasil), para ser submetida ao processo de extração de DNA.

Extração e quantificação de DNA

A extração do DNA foi feita através do protocolo CTAB (Anexo I), que possibilita a lise celular, precipitação e a purificação do DNA.

Algumas adaptações foram aplicadas ao protocolo convencional do método CTAB, cujo objetivo foi melhorar o rendimento e qualidade do DNA final obtido a partir de café torrado e moído, são elas: a) pesagem de 150 mg de amostra; b) adição de 1% de β -mercaptoetanol e 4% PVP (Polivinilpirrolidona – PVP-K 30) ao tampão de lise CTAB c) eluição do DNA para um volume final de 100 μ L.

A concentração de DNA dos extratos foi determinada através de leitura da absorbância a 260 nm no nano-espectrofotômetro Genova Nano (JENWAY – Stffordshire, UK), Figura 8. Adicionalmente, foram determinadas as razões das leituras de absorbâncias a 260 e 280 nm para presença de proteínas; e a 260 e 230 nm para compostos fenólicos, que são parâmetros para análise da qualidade do DNA isolado.



Figura 8. Nano-espectrofotômetro Genova Nano

5.5.2 PCR em tempo real

Para construção da curva padrão foram utilizadas soluções de DNA extraídas de diferentes cultivares de café verde das espécies arábica e robusta. Diferentes percentuais de DNA de café arábica foram obtidos após diluição em solução de DNA de café robusta (0%, 25%, 50% 75% e 100%). Posteriormente, as reações (PCR em tempo real) foram conduzidas usando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) ARA_R e ARA_F (selecionados previamente pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Diagnóstico Molecular da Embrapa) e o corante/intercalante de DNA SYBR Green como repórter. As análises foram realizadas usando 12 réplicas de cada percentual.

As reações de amplificação foram preparadas em câmara de fluxo laminar. Os reagentes utilizados na PCR em tempo real foram: SYBR Green PCR Kits (Qiagen, QuantiTect), os *primers* ARA_F [240 nM] e ARA_R [240 nM] e DNA (50 ng). Como controle negativo da reação foi utilizada a água Milli-Q. O volume final da reação foi de 25 μL quando utilizou-se DNA de café verde como molde enquanto que, para o DNA obtido a partir de café torrado e moído, o volume final foi de 50 μL .

Para construção da curva padrão foram utilizadas soluções de DNA extraídas de cafés arabica e robusta verde. A diluição da solução de DNA de café arabica em solução de DNA de café robusta foi feita nos seguintes percentuais: 0%, 25%, 50% 75% e 100%. Posteriormente, foi realizada a PCR em tempo real com as soluções de DNA extraídas das amostras MR P1.100A 14; MR P4.50A 25; MR P7.100A 24. Todas as análises foram feitas em quintuplicata.

As reações foram realizadas no termociclador Abi 7500 (Applied Biosystems, USA), Figura 9, nas condições descritas na Tabela 6.

Tabela 6. Condições de reação da análise de PCR em tempo real

	Desnaturação	Anelamento
Temperatura	95 °C	60 °C
Tempo	15 s	60 s
	45 ou 50 ciclos (café verde ou torrado e moído, respectivamente)	



Figura 9. Termociclador ABI 7500

Após o término da reação, foram coletados e analisados os dados gerados pelo software do termociclador Abi 7500 (Applied Biosystems, USA), tais como os gráficos com

as curvas de amplificação e de dissociação (melt curve), além dos CT (*threshold cycle*) e Tm (*melting temperature* / temperatura de dissociação) de cada réplica da reação.

5.6 ANÁLISE DE DADOS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Statistica, versão 8.0 da Stat Soft Inc (EUA, 2007). Após a análise de variância, as médias, quando significativas ($p < 0,05$), foram comparadas utilizando-se teste de Tuckey a 95% de probabilidade.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 NÍVEL DE TORRA DOS GRÃOS DE CAFÉ ARABICA E ROBUSTA

Inicialmente foram feitos testes para padronização das condições de produção do MR. O nível de torra do MR foi estabelecido para a torra média na condição de temperatura a 240°C por 14 minutos. A perda de massa durante a torra não apresentou diferença significativa entre as amostras de café arabica e robusta, mostrando-se em torno de 13%, tanto para o café arabica quanto para o café robusta, conforme descrito na Tabela 7. Este resultado também foi encontrado por (WEI; TANOKURA, 2015b).

Tabela 7. Perda de massa após torra de café robusta e café arabica

Perda de massa (%)	Arabica	Robusta	p valor
Matéria prima	13,38 ± 0,31	13,63 ± 0,80	0,4787
MR	14,01 ± 0,50	13,6 ± 0,54	0,385861

Médias com p valor < 0,05 não diferem entre si, pela ANOVA.

Durante a torra dos grãos selecionados para compor o MR foi verificada a perda de massa para a garantia da homogeneidade da torra. Foi observado que a média do percentual de perda de massa das duas espécies foi semelhante ao encontrado nos testes, permitindo assim uma homogeneidade da torra durante a elaboração do MR. No estudo desenvolvido por FARAH et al., 2006 foi observado uma perda de massa de café em torno de 12,5, 15 e 17% após 6, 7 e 8 minutos, respectivamente. Já Edzuan et al. (2015) encontraram uma perda de massa para café arabica Timor de 28% após 16 minutos de torra. Hernández et al. (2007), relataram uma perda de massa variando de 3 a 12% para café arabica colombiano, dependendo da temperatura empregada. No entanto, a torra convencional varia de 200 a 230 °C, de 12 a 20 minutos, gerando diferentes intensidades de torra: clara, média e escura. Essas variações podem ocorrer devido às características de cada espécie, o tempo e temperatura de torra e torrador utilizado (MENDES et al., 2001).

Para obtenção de uma torra homogênea, os grãos de café foram previamente selecionados a fim descartar aqueles com defeitos. Foi observado que o café robusta apresentou maior quantidade de defeitos que o café arabica.

A qualidade do café é determinada por vários aspectos, dentre eles o tamanho, forma e cor do grão, sabor, métodos de colheita, processamento e armazenamento e presença de defeitos (FRANCA; MENDONÇA; OLIVEIRA, 2005; MENDONÇA; PEREIRA; MENDES, 2005).

Em termos de comercialização do café um dos critérios mais importantes é a presença de defeitos. Na prática comercial entende-se por defeito o grão com características como preto, azedos ou castanhos, imaturos, danificados por insetos ou queimados, quebrados etc, bem como a presença de matérias estranhas, tais como, cascas, pau, pedras (FRANCA; MENDONÇA; OLIVEIRA, 2005).

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria do café (ABIC), os defeitos do café podem ser divididos em extrínsecos e intrínsecos. Os primeiros podem ser incorporados durante a colheita, tais como pedra, cascas, galhos etc. Já os intrínsecos estão relacionados ao grau de maturação dos grãos, sendo conhecidos como PVA (preto, verde e ardido) O defeito preto é caracterizado por frutos que passaram do ponto de maturação e que foram danificados pela chuva ou queda no solo durante a colheita. O defeito verde ocorre devido à presença de frutos imaturos, os quais contribuem com sabor adstringente da bebida. Já o defeito ardido tem origem na fermentação indesejável nas sementes maduras e verdes devido a problemas na irrigação ou no processamento pós-colheita (TOCI; FARAH, 2008; TOLEDO et al., 2016).

Para fins de exportação o café não é comercializado com grãos defeituosos, **pois durante o processo de torra a qualidade da bebida é afetada**. No Brasil, estima-se que 20% da produção total do café correspondem aos grãos defeituosos, os quais são incorporados no mercado interno, produzindo assim um café torrado e moído de baixa qualidade (TOCI; FARAH, 2008; TOLEDO et al., 2016).

6.2 ESCOLHA DO MOEDOR

Dentre os moedores testados, o moedor Probat Leogap Gourmet (M50) apresentou maior percentual de retenção a partir da peneira de abertura 600 μm , seguido pelo IKA e depois Cuisinart, conforme mostra a Tabela 8.

Tabela 8. Percentual de retenção de partículas em peneiras, de acordo com diferentes moedores

Peneira abertura (μm)	Probat Leogap Gourmet (M50) (%)	IKA (A11) (%)	Cuisinart (DBM8) (%)
850	2,73	9,78	10,42
710	6,91	3,77	13,51
600	11,29	25,77	15,60
425	44,43	51,89	48,48
300	14,97	1,28	6,62
250	8,46	6,15	2,26
212	6,75	0,50	1,74
Fundo	4,47	0,86	1,36
Retenção a partir da abertura 600 μm	79,07	60,68	60,46

No entanto, apesar de os moedores Probat Leogap Gourmet (M50) e IKA (A11) apresentarem maior percentual de retenção a partir da peneira de abertura 600 μm , havia apenas uma unidade de cada moedor para realização das análises. Assim, preferencialmente foi escolhido o moedor Cuisinart (DBM8), sendo utilizado um para cada espécie a fim de evitar contaminação cruzada. Além disso, visualmente sua moagem também se assemelhou mais aos cafés comerciais. Em virtude da alta quantidade de amostragem a ser utilizada para compor o MR, o moedor IKA (A11) foi descartado também por suportar uma pequena quantidade de café.

6.3 DEFINIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA DO MR

Foram comparados os tempos de 10 e 20 minutos no agitador de peneiras, com e sem pincel, conforme mostra a Tabela 9.

Tabela 9. Percentual de retenção de partículas em peneiras, segundo o tempo (minutos) e auxílio de pincel

Abertura (μm)	10 com pincel (%)	10 sem pincel (%)	20 sem pincel (%)
850	5,04	5,56	6,12
710	8,94	12,13	10,48
600	15,48	14,84	14,29
425	38,92	32,75	32,03
300	6,49	10,56	10,56
250	4,76	4,12	4,10
212	2,35	4,64	3,32
Fundo	18,03	15,40	19,10
Retenção de partículas < 600 μm	70,54	67,47	69,11

Foi observado que houve maior retenção de partículas na peneira de abertura 425 μm , tanto para café arábica quanto para café robusta, bem como para os diferentes tempos testados. Sendo assim, optou-se por utilizar partículas de granulometria inferior a 600 μm na produção do MR. Além disso, estudos de desenvolvimento de MR de café também padronizam a granulometria, como relatado por Vargas et al. (2005) e Koch et al. (2011), que utilizam uma granulometria inferior 500 μm para café verde, enquanto Tagliaferro et al. (2003) utiliza um tamanho de partícula menor que 80 μm . Outros trabalhos de produção de MR com matrizes alimentares também relatam a padronização de partículas a fim de caracterizar o material em pó, tais como: MR de mexilhão, com granulometria menor que 150 μm ; MR de leite, com granulometria inferior a 177 μm ; MR de peixe da espécie Dourada, com tamanho de partícula na faixa de 90 – 150 μm (MOREIRA, 2010; REGO et al., 2017; ULRICH, 2011).

Não houve diferença na quantidade de partículas retidas nas peneiras na granulometria < 600 μm . Então foi estabelecido o tempo de agitação para 20 minutos sem o auxílio do pincel, sendo utilizado 150 g por batelada.

A Figura 10 apresenta a retenção de café torrado e moído, submetido à análise granulométrica nas diferentes peneiras.

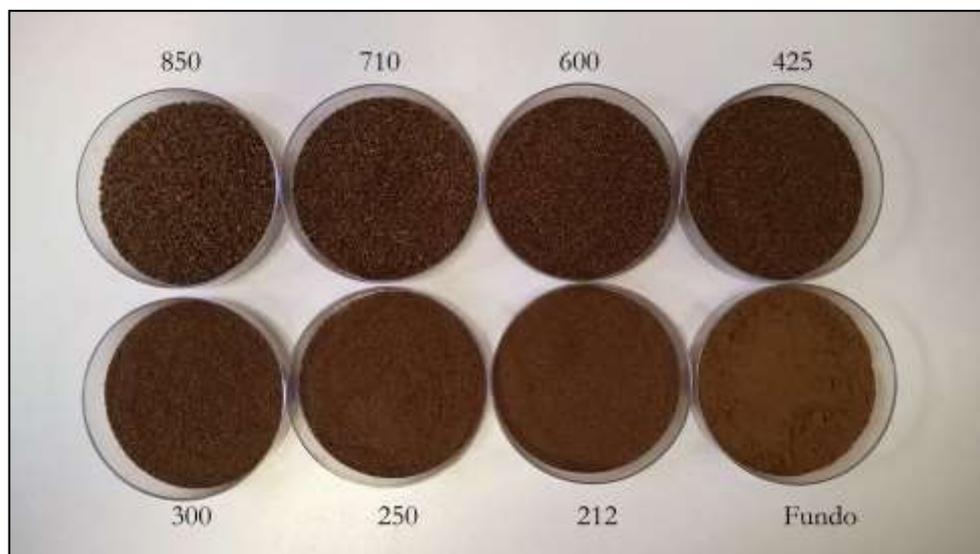


Figura 10. Análise granulométrica de café robusta torrado e moído

A partir da definição do tamanho de abertura das peneiras (< 600 μm), foi verificado o percentual de retenção de partículas em cada uma delas de acordo com cada espécie, conforme mostra a Tabela 10.

Tabela 10. Percentual de retenção de partículas em peneira segundo as espécies de café

Abertura da peneira (μm)	Média de partículas retidas (%)		
	Arabica	Robusta	p valor
850	19,49 \pm 13,38b	34,61 \pm 4,29a	0,046449
600	25,12 \pm 1,61	28,58 \pm 8,82	0,469108
500	10,91 \pm 2,21b	8,19 \pm 0,52a	0,030726
Fundo	44,49 \pm 10,80	28,61 \pm 10,61	0,062400
Retenção a partir da abertura 600 μm	55,40	36,81	-

Médias quando significativas foram submetidas ao teste de Tukey, letras iguais dentro de cada linha não diferem entre si (p valor < 0,05), a ausência de letras indica que não houve significância.

A retenção de partículas por peneira apresentou diferença significativa nas peneiras de abertura 850 e 500 μm . Este resultado mostra que o café arábica apresentou mais partículas finas durante a moagem comparado ao café robusta, retendo mais partículas na peneira de abertura 850 para o café robusta. Desse modo, o rendimento final determinado para uma granulometria inferior a 600 μm é maior para café arábica (55,4%) do que para o robusta (36,81%). O material retido nas demais peneiras foi de 44,60% e 63,19%, para café arábica e café robusta, respectivamente.

O rendimento do MR selecionado, torrado, moído e peneirado foi de aproximadamente 5,4 e 5,7 kg de café robusta e café arábica, respectivamente.

6.2 ANÁLISE DE COR DOS GRÃOS TORRADOS E MOÍDOS DE CAFÉ ARÁBICA E ROBUSTA

Na Tabela 11 estão apresentados os valores médios dos parâmetros colorimétricos CIE L*a*b*. Esses resultados apresentaram diferença significativa (p < 0,05) entre a torra média de café arábica e café robusta.

Tabela 11. Cor instrumental (L*, a* e b*) de cafés arábica e robusta

	Arabica	Robusta	p valor
L*	41,80 \pm 0,78b	47,48 \pm 0,86a	0
a*	4,64 \pm 0,69b	7,52 \pm 0,32a	0,000003
b*	3,74 \pm 0,98b	11,25 \pm 0,91a	0

Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada linha não diferem entre si (p valor < 0,05), pelo teste de Tukey.

O grau de escurecimento do café está relacionado à coordenada que indica a luminosidade (L^*), cuja variação vai de 0 (preto) a 100 (branco), isto é, o valor de L^* e o grau de torra possuem correlação inversa (LIMA et al., 2010). Assim, foi observado maior grau de escurecimento para o café arábica do que para o café robusta. O estudo de Oliveira et al. (2014), ao comparar as duas espécies de café, também encontrou diferença significativa para o parâmetro L^* para diferentes granulometrias. Sacchetti et al. (2009) também encontraram diferenças significativas entre as espécies de café arábica e robusta, no entanto, numericamente os valores encontrados para o parâmetro L^* foi inferior ao encontrado no presente estudo. Contudo foi observado que o café arábica também apresentou menores valores de L^* comparado ao café robusta.

O carboidrato mais abundante nos grãos de café verde é a sacarose, uma das maiores fontes de açúcares redutores livre, os quais participam das reações de Maillard e Strecker e caramelização do açúcar durante a torra dos grãos de café. Além disso, os açúcares redutores interagem com o grupo amino de um aminoácido, peptídeo ou proteína na reação de Maillard, gerando polímeros nitrogenados de coloração marrom chamados melanoidinas (WEI; TANOKURA, 2015b). Alguns estudos que compararam a composição química das duas principais espécies de café, arábica e robusta, também relatam um maior percentual de sacarose em café arábica comparado ao café robusta (KY et al., 2001; ROGERS et al., 1999). Assim, provavelmente a tonalidade mais escura do café arábica se deve ao maior teor de sacarose e de proteína que o café robusta.

Com relação à coordenada cromática a^* , o café arábica mostrou menor valor para este parâmetro, indicando que está relacionado com a tonalidade verde. O café robusta apresentou maior valor de a^* comparado ao café arábica, mostrando uma tendência ao vermelho. Apesar de o café arábica apresentar valor de a^* menor que o café robusta, para um grau de torrefação maior há uma contribuição da tonalidade vermelha para as duas espécies, conforme relatado por (BICHO et al., 2012).

Foi observado que o café robusta apresentou maior valor de b^* em comparação ao café arábica. Isso mostra que a torra média para o café robusta tem uma tendência à tonalidade amarelada. Enquanto o café arábica apresentou valor de b^* significativamente menor que o café robusta, indicando maior escurecimento do café arábica. Essas diferenças para este parâmetro também foram encontradas por Bicho et al. (2012).

Na Tabela 12 estão apresentados os valores médios dos parâmetros colorimétricos CIE $L^*a^*b^*$ para as amostras de MR produzidos. Esses resultados apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os MR.

Tabela 12. Cor instrumental (L^* , a^* e b^*) dos MR

	L^*	a^*	b^*
P1100A	39,30 ± 0,19e	2,93 ± 0,08d	1,48 ± 0,15c
P295A	39,78 ± 0,10d	3,32 ± 0,10c	2,00 ± 0,12b
P375A	39,75 ± 0,08cd	3,43 ± 0,05bc	2,23 ± 0,04b
P450A	40,30 ± 0,07ab	3,76 ± 0,07a	2,75 ± 0,09a
P525A	40,08 ± 0,09bc	3,58 ± 0,07ab	2,61 ± 0,09a
P65A	40,31 ± 0,23ab	3,55 ± 0,17ab	2,71 ± 0,24a
P70A	40,48 ± 0,08a	3,55 ± 0,06ab	2,80 ± 0,10a
p valor	0	0	0

Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada coluna não diferem entre si (p valor < 0,05), pelo teste de Tukey.

Foi observado que o MR P1.100A (100% arabica) apresentou-se mais escuro que as demais amostras, indicando assim que a adição de $\geq 5\%$ de café robusta apresenta diferença significativa na coordenada L^* , tendendo a uma maior luminosidade conforme o aumento do percentual de café robusta.

Ao analisar a coordenada cromática a^* , todas as amostras situaram-se na faixa do vermelho. O MR P1.100A também apresentou diferença significativa comparado as demais amostras, apresentando o menor valor para a^* .

Os MR P2.95A e P3.75A apresentaram-se semelhantes entre si, bem como P4.50A, P5.25A, P6.5A e P.70A. Além disso, o MR P3.75A apresentou diferença significativa quando comparado aos MR P4.50A e P1.100A. A presença de mais de 50% de café robusta na amostra de café arabica não apresenta diferença significativa para a coordenada a^* .

Com relação à coordenada cromática b^* , todas as amostras encontraram-se na faixa do amarelo, porém com valores perto de 0, sendo o MR P1.100A o que apresentou o menor valor, com diferença significativa comparado aos demais. A adição de 5% (P2.95A) ou 25% (P3.75A) de café robusta em café arabica não mostra diferença significativa entre as amostras. No entanto, quando se acrescenta 50% ou mais de café robusta há diferença significativa quando estas são comparadas a amostras com maior percentual de café arabica.

Os valores médios dos parâmetros colorimétricos de C^* (Croma) e h° (ângulo Hue) estão descritos na Tabela 13. Estes parâmetros apresentaram diferença significativa (p < 0,01) em relação à diferença entre as espécies de café.

Tabela 13. Cor instrumental (C* e h°) de cafés arabica e robusta

	Arabica	Robusta	p valor
C*	5,97 ± 1,15b	13,54 ± 0,93a	0
h°	38,33 ± 3,26b	56,18 ± 1,05a	0

Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada linha não diferem entre si (p valor < 0,05), pelo teste de Tukey.

Para estes dois parâmetros, o café robusta apresentou-se numericamente superior ao café arabica. Para o valor de C* este resultado indica maior pureza da cor para o café robusta.

O valor do ângulo Hue, um parâmetro da tonalidade da cor, representa o vermelho puro quando o ângulo for 0° e amarelo puro em 90°. Assim, valores maiores de 45° denotam predominância da cor amarela em relação à vermelha. O café arabica mostra uma tendência ao vermelho, enquanto o café robusta ao amarelo. Este resultado é semelhante ao encontrado por Oliveira et al. (2014) para torra moderadamente escura, ao comparar as duas espécies de café também encontrou diferença significativa para o parâmetro h°, além de o café robusta apresentar um ângulo de Hue maior que o café arabica. No entanto, para amostra de café robusta o ângulo de Hue apresentou uma tendência a cor amarela (36,0). Resultados similares também foram encontrados por Sacchetti et al. (2009) somente para o café robusta, ou seja, todas amostras avaliadas, cafés arabica e robusta, apresentaram tendência ao amarelo, provavelmente devido a menor intensidade da torra.

Os valores médios dos parâmetros colorimétricos de C* (Croma) e h° (ângulo Hue) dos MR produzidos estão descritos na Tabela 14. Estes parâmetros apresentaram diferença significativa (p < 0,01) entre os MR.

Tabela 14. Cor instrumental (C* e h°) dos MR

	C*	h°
P1100A	3,29 ± 0,08c	26,72 ± 2,50c
P295A	3,87 ± 0,13b	31,12 ± 1,50b
P375A	4,09 ± 0,06b	32,95 ± 0,44b
P450A	4,66 ± 0,08a	36,22 ± 0,97a
P525A	4,44 ± 0,10a	36,05 ± 0,42a
P65A	4,47 ± 0,27a	37,28 ± 1,26a
P70A	4,52 ± 0,09a	38,32 ± 0,95a
p valor	0	0

Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada coluna não diferem entre si (p valor < 0,05), pelo teste de Tukey.

Ao analisar os parâmetros C^* (Croma) e h° em conjunto, observou-se que com o aumento do percentual de café robusta maior era a intensidade da cor, considerando a coordenada o Croma, neste caso a cor mais intensa corresponde ao amarelo, utilizando como parâmetro o ângulo hue. Quanto maior os valores de C^* e h° , mais vívida e mais amarela é a tonalidade, respectivamente

As amostras apresentaram similaridade de tonalidades em 3 blocos, em ordem crescente, ou seja, quanto maior os valores de C^* e h° , mais vívida e mais amarela é a tonalidade, respectivamente: (1) o MR P1.100A; (2) P2.95A e P3.75A ; (3) P4.50A, P5.25A, P6.5A e P70A.

Para todos os parâmetros de cor analisados, foi observado que houve diferença significativa entre as amostras de café arábica e café robusta, provavelmente devido a variação da composição química de ambas as espécies, também relatado por Agnoletti, 2015.

6.5 OBTENÇÃO DOS MR

De acordo com os parâmetros de processamento do café definidos, foi iniciada a produção dos MR a partir da seleção dos grãos. Foram selecionados cerca de 7 kg de grãos de café verde manualmente de cada espécie a fim de serem descartados aqueles com defeitos, conforme mostra a Figura 11.

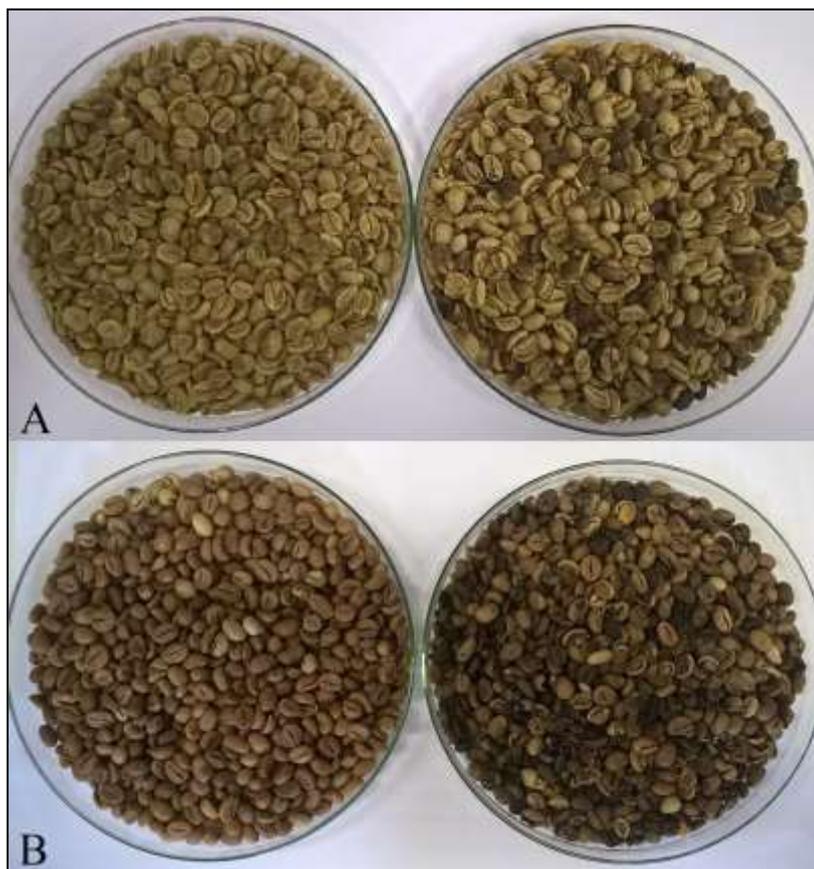


Figura 11. Seleção de grão de café arábica (A) e café robusta (B), à esquerda grãos selecionados e à direita grãos com defeitos.

Após a seleção dos grãos de café, as espécies foram torradas separadamente na condição de 240°C por 14 minutos, contendo cerca de 250g por batelada, quantidade máxima permitida pelo torrador.

Em seguida as amostras foram moídas em diferentes moedores automáticos em aço escovado (Cuisinart) e peneiradas em agitador de peneiras por 20 minutos, sem auxílio de pincel.

Após a peneiragem, as amostras foram submetidas ao processo de homogeneização por 6 horas ininterruptas, contendo um total 800g por batelada nas proporções de *blends* de café arábica e robusta determinadas, conforme mostra a Tabela 15.

Tabela 15. Proporção de café arábica e robusta para cada MR

Proporção do <i>blend</i> (%)	Café arábica (g)	Café robusta (g)
100 e 0	800	0
95 e 5	760	40
75 e 25	600	200
50 e 50	400	400
25 e 75	200	600
5 e 95	40	760
0 e 100	0	800

Após cada homogeneização, o material era recolhido, guardado em embalagens laminadas e codificados para serem armazenados a -20°C , Figura 12.



Figura 12. MR em embalagem laminada com zíper (~25g)

A Tabela 16 mostra a média da quantidade de material contida em cada embalagem de cada ponto do MR, variando de 25,0 (P2.95A) a 25,18 (P3.75A).

Tabela 16. Média de massa contida em cada embalagem, segundo cada ponto do MR

	Média (g)	Mínimo (g)	Máximo (g)	Desvio Padrão
P1.100A	25,06	25,01	25,11	0,03
P2.95A	25,08	25,00	25,16	0,05
P3.75A	25,08	25,01	25,18	0,05
P4.50A	25,06	25,01	25,14	0,03
P5.25A	25,08	25,01	25,17	0,05
P6.5A	25,08	25,02	25,16	0,04
P7.0A	25,07	25,03	25,14	0,03

A Figura 13 mostra a evolução da produção do material, da seleção à finalização da produção.



Figura 13. Evolução do processamento de cafés arabica (A) e robusta (B) para obtenção do MR.

Após a produção e acondicionamento do MR nas embalagens o material foi avaliado quanto ao seu tamanho de partícula, cor e identificação das espécies.

6.5.1 Análises físicas dos MRs

6.5.1.1 Determinação do tamanho e distribuição de partículas

Os resultados do tamanho e da distribuição de partículas dos diâmetros (D [4,3], D10, D50, D90 e o valor de *Span*) do MR analisados pela técnica de difratometria laser estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17. Distribuição granulométrica dos MR em micrômetros e valores de *Span* obtidos por difratometria a laser

	P1.100A	P2.95A	P3.75A	P4.50A	P5.25A	P6.5A	P7.0A	p valor
D [4,3]	408,9	430,1	426	440,4	445,2	392,8	417,1	0,457211
D10	28,37	26,53	28,18	22,93	27,11	31,32	29,83	0,749382
D50	431,7	465,8	441,7	464,4	465,3	391,6	439,7	0,205061
D90	727,9	724,7	738,7	775,3	742,1	746,5	732,4	0,526874
Span	1,62	1,50	1,61	1,62	1,54	1,83	1,60	-

Médias com p valor < 0,05 não diferem entre si, pela ANOVA.

Os diâmetros D10, D50 e D90, utilizados para calcular o valor de *Span*, não apresentaram diferença significativa entre os pontos do MR, o que denota um tamanho de partícula semelhante entre as amostras ou inferior ao mesmo valor.

Os valores de *Span*, que avalia a dispersão granulométrica, de todos os pontos do MR foram relativamente baixos, indicando uma estreita distribuição de tamanho de partícula dos MR, pois quanto mais próximo de zero estiver o valor de *Span*, mais homogênea é a distribuição (ou menor será a faixa de tamanho de partícula) (CUNHA et al., 2004; JUNYAPRASERT; MANWIWATTANAKUL, 2008; SANTOS et al., 2012).

O diâmetro médio de Brouckere (D [4,3]), que reflete o tamanho de partículas que constituem a maior parte do volume da amostra (SANTOS et al., 2012), não apresentou diferença significativa entre as médias dos pontos do MR, indicando que as amostras apresentaram um volume médio similar, variando de 408,9 μm (P1.100A) a 445,2 μm (P5.25A).

O percentual de partícula de cada ponto do MR segundo cada tamanho mensurado pode ser observado na Figura 14. Não houve diferença significativa (p valor $> 0,05$) entre os pontos do MR quanto aos tamanhos de partículas mensurados.

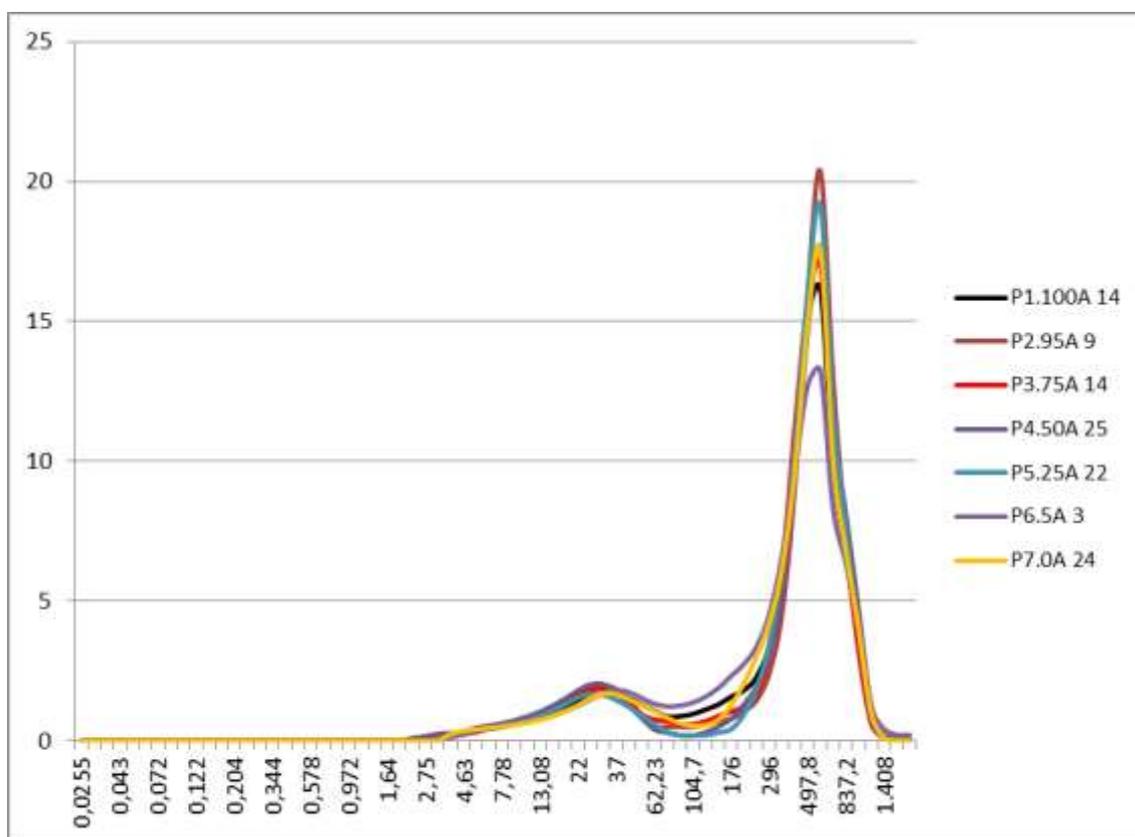


Figura 14. Percentual de partícula de cada ponto do MR, segundo cada ponto mensurado

Foi observado uma concentração de tamanho de partícula entre 418,6 µm e 704 µm, representando em média de 10 a 17% ao avaliar todos os pontos do MR. Além disso, houve predominância de partículas com tamanho em torno de 600 µm (17,3%). Estes resultados reforçam que o MR produzido apresentou homogeneidade quanto ao tamanho e distribuição de partículas para todos os pontos.

A utilização de isopranoal como meio dispersante propiciou a leitura de maior quantidade de partículas finas de café, pois este fluido umedece as partículas rapidamente, que vão para fundo, o que proporcionou um resultado fidedigno para os MR avaliados (GUEVARA-BARRETO; CASTAÑO-CASTRILLÓN, 2004)

No estudo de Oliveira et al. (2014), no qual foram utilizados dois tipos de torra (média clara e moderadamente escura) para *C. arabica* e *C. canephora*, foi observado que não houve diferença entre os tamanhos de partícula quando comparada as duas espécies, similarmente ao encontrado neste estudo.

6.5.2 Análises moleculares

Para a análise do percentual da espécie arábica dos MR, três *primers* foram previamente definidos e testados no LDM-CTAA. As reações (PCR em tempo real) usando o par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) ARA apresentaram melhores resultados e este par de *primers* foi selecionado para as análises subsequentes de detecção da espécie arábica em café verde e torrado e moído.

Na Figura 15 estão apresentadas as curvas de amplificação e *melting* (usando o par de *primers* ARA e SYBR Green) das amostras de DNA isoladas de café verde (arábica e robusta) nas seguintes proporções: 100% de arábica + 0% de robusta (P1); 75% de arábica + 25% de robusta (P2); 50% de arábica + 50% de robusta (P3); 25% de arábica + 75% de robusta (P4); 0% de arábica + 100 % de robusta (P5).

As amostras de café verde da espécie arábica apresentaram Cts menores, em torno de 22, e mais réplicas amplificaram conforme o percentual de arábica aumentava. Em contrapartida, foi observado que as amostras que continham 0% da espécie arábica não amplificaram. Esses dados confirmaram que o par de *primers* ARA é mais específico para DNA de café arábica.

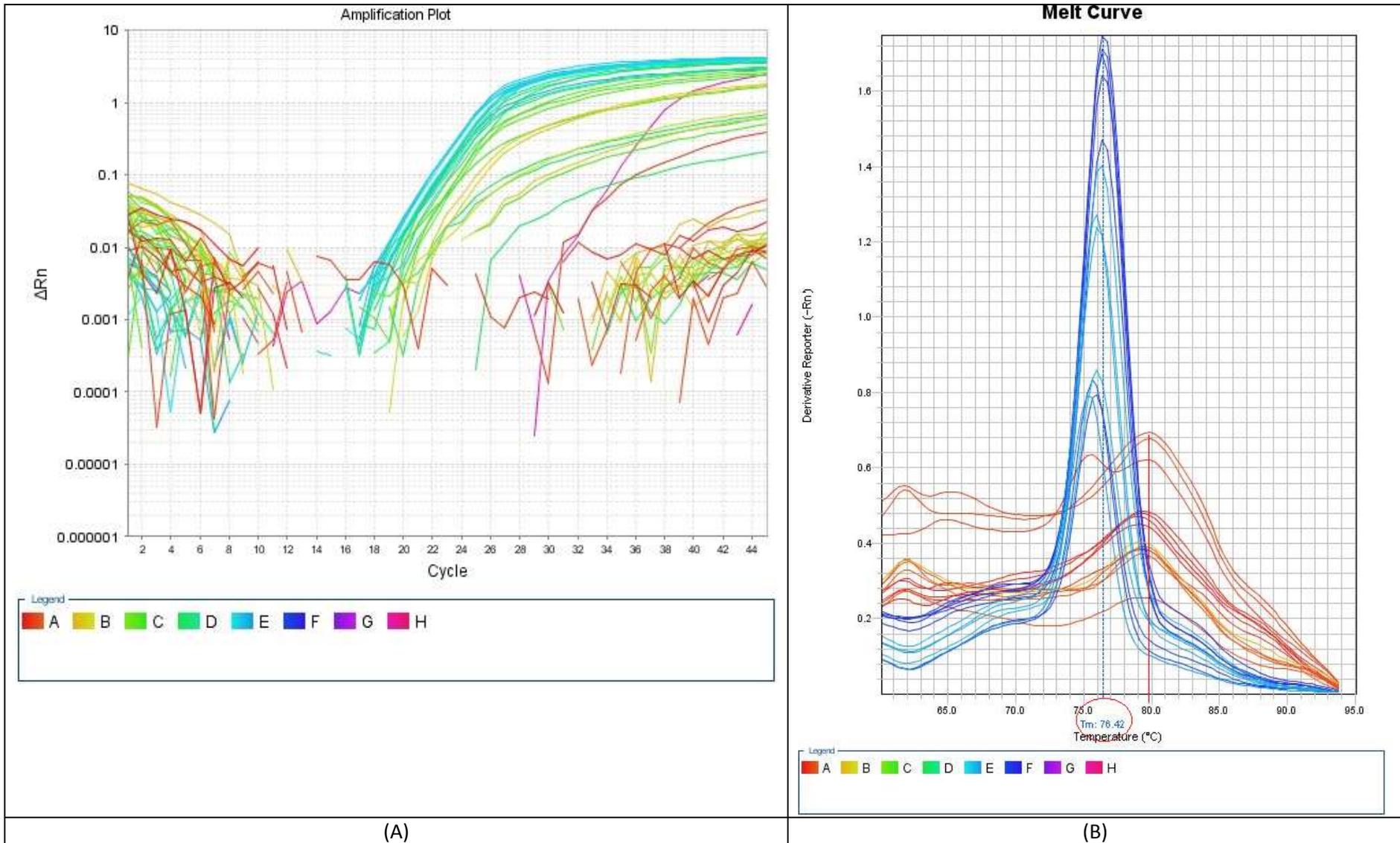


Figura 15. Curvas da análise de PCR em tempo real de amostra de café verde

(A) Curva de amplificação: — café arabica, — café robusta. (B) Curva de dissociação: — café arabica, — café robusta, Tm arabica, — Tm robusta

Na tabela 18 é possível observar a proximidade dos valores médios de Ct e Tm das amostras de café verde.

Tabela 18. Ct e Tm médios para amostras de café verde

Concentração (%)	Ct	Tm (°C)
25	24,30 ± 0,87	75,89 ± 0,11
50	22,45 ± 0,31	76,10 ± 0,11
75	21,73 ± 0,52	76,22 ± 0,25
100	21,11 ± 0,45	76,31 ± 0,60

Analisando a curva de dissociação das amplificações das amostras de café verde, observou-se que a temperatura de *melting* (Tm) para a espécie arabica foi de 76,42 °C e para a espécie robusta foi aproximadamente 80 °C, tabela (Figura 15), mostrando a diferenciação na detecção das espécies.

Posteriormente, as soluções de DNA dos MR, a saber P1.100A (100% arabica), P3.75A (75% arabica), P4.50A (50% arabica), P5.25A (25% arabica) e P7.0A (0% arabica), foram analisadas por PCR em tempo real usando o par de *primers* ARA. Similarmente aos dados obtidos com as amostras de café verde, as soluções de DNA do MR 0% da espécie arabica (P7.0A) também não amplificaram.

Os demais MR apresentaram Cts em torno de 35 (Figura 16), maiores que os apresentados pelo café verde.

Alguns estudos relatam que o processo de torra do café pode inibir a PCR, pois os ácidos nucleicos se decompõem rapidamente em altas temperaturas, ocorrendo a degradação do DNA (MANZANO et al., 2003; MARTELLOSI et al., 2005; MISHRA et al., 2008). Além disso, a produção de compostos, tais como os polifenóis e polissacarídeos que podem inibir a *Taq polimerase*, vários outros metabólitos secundários (alcalóides, flavonóides e fenóis) também apresentam-se como interferentes durante o isolamento do DNA (MANZANO et al., 2003; MARTELLOSI et al., 2005; MISHRA et al., 2008). Outros estudos em café, como o de Sene e Admassu (2013), ressaltam que os mecanismos de inibição da PCR ainda não estão claros, sugerindo algumas hipóteses como modificações do DNA molde ou da enzima PCR.

Em nosso trabalho foi observado que a amplificação de café torrado é mais tardia quando comparada com o café verde. Apesar das amplificações serem tardias, a maior parte das réplicas amplificaram em Cts próximos, indicando que para os MR, desenvolvidos com grau de torra média, é possível detectar a presença de café arabica (Figura 16).

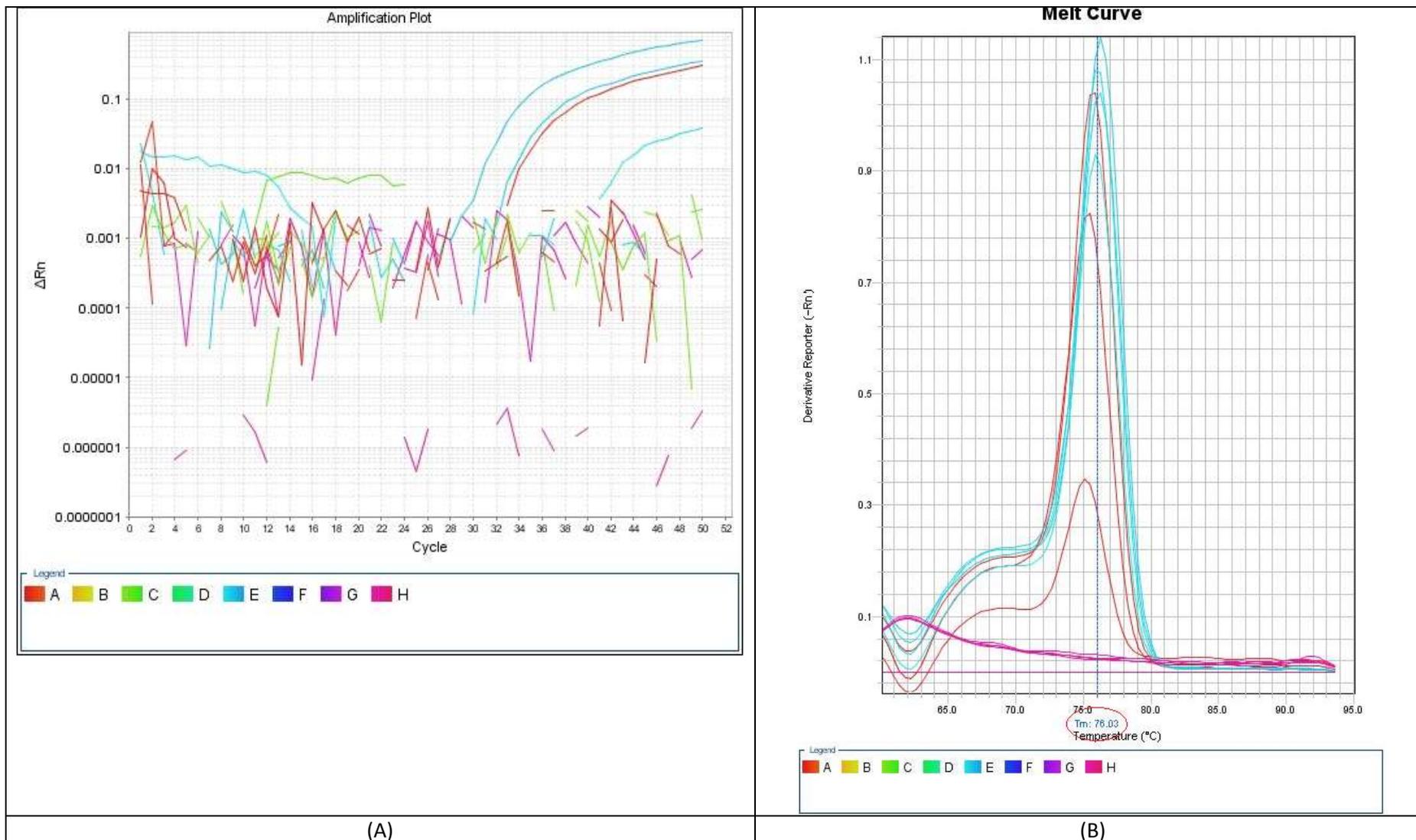


Figura 16. Curvas da análise de PCR em tempo real de amostra dos MR

A) Curva de amplificação: — café arabica, — café robusta. (B) Curva de dissociação: — café arabica, — café robusta, T_m arabica.

Na tabela 19 estão apresentados os valores médios de Ct e Tm correspondente a cada amostra de MR.

Tabela 19. Ct e Tm médios para os MR analisados

Amostra	Ct	Tm (°C)
P5.25A	36,78 ± 4,33	75,65 ± 0,39
P4.50A	35,18 ± 1,18	76,14 ± 0,19
P3.75A	34,95 ± 0,59	76,20 ± 0,13
P1.100A	35,82 ± 0,24	75,85 ± 0,62

Ao analisar a curva de dissociação dos MR, Figura 16, e os dados da tabela 19, a temperatura de *melting* ficou muito próxima da apresentada pelas amostras de café verde, com uma diferença de menos que 1 °C para as amostras MR P1.100A (100% arabica) e MR P4.50A (50% arabica), com temperaturas de 75,97 °C e 76,03. Este resultado indica que a torra e a mistura das duas espécies não impede a detecção do café arabica, confirmando a especificidade do par de *primers* ARA.

Foi relatado por Tornincasa et al. (2010) a diferenciação das espécies arabica e robusta em café por PCR em tempo real - Multiplex, utilizando sonda universal para café, específica para arabica e específica para robusta. Os autores não deixam claro se as amostras são de café verde ou café torrado e moído, bem como não foi apresentada a eficiência das reações. O sistema de detecção (*primers* e sonda) não foi disponibilizado, por se tratar de uma patente.

Um método de detecção de adulterantes (milho, cevada e arroz) em café torrado por PCR mostrou-se eficiente, segundo Ferreira et al. (2016). A mistura de matérias primas mais baratas para reduzir os custos de produção do café merece uma maior atenção das autoridades e provavelmente poderá ser utilizada técnicas moleculares para detecção dos mesmos.

As análises para quantificação do percentual de café arabica em *blends* de café torrado e moído se encontra em desenvolvimento pela equipe do Laboratório de Diagnóstico Molecular da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

7 CONCLUSÃO

A torrefação do café foi similar para as duas espécies quando utilizou-se uma torra média (240 °C por 14 minutos), garantindo uma torra padronizada ao longo do desenvolvimento do MR.

A utilização de dois moedores e de dois conjuntos de peneiras, um para cada espécie de café, garantiu que não houvesse contaminação cruzada, proporcionando a construção de um MR 100% café arábica e outro 100% café robusta, bem como a proporção de cada espécie para os *blends* de café.

Na análise granulométrica dos grãos torrados e moídos foi possível observar que a utilização de um tamanho de partícula inferior a $< 600 \mu\text{m}$ permite a construção de um MR com partículas que se apresentam em sua maioria retidas na peneira de abertura $425 \mu\text{m}$, similar ao produto comercial. Além disso, as amostras de café arábica e robusta apresentaram diferença significativa quanto à retenção de partículas na peneira de abertura $500 \mu\text{m}$, sendo o café arábica com maior percentual de retenção para esta peneira e quando analisado o percentual $< 600 \mu\text{m}$.

Ao avaliar os MR pelo CIELAB, foi observado uma tendência a um maior grau de luminosidade conforme o aumento do percentual de café robusta em café arábica. Os MR das amostras com 50% ou mais de café robusta em café arábica não apresentam diferença significativa entre si.

A cor instrumental na escala CIECh, apresentou uma tonalidade mais intensa para o café robusta, tendendo ao amarelo, quando comparado ao café arábica.

A distribuição granulométrica e o tamanho de partícula analisados por difratometria a laser apresentaram valores de *Span* em torno de 1, apresentou uma estreita distribuição de tamanho de partícula de todos os MR, indicando uma homogeneidade quanto ao tamanho e a distribuição de partículas para todos os pontos.

A análise da curva padrão de DNA de café verde permitiu concluir que o par de *primers* sintetizado ARA foi mais específico para DNA de café arábica, visto que não houve amplificação para as amostras 100% robusta, com temperatura de *melting* que de $76,42 \text{ }^\circ\text{C}$ para o café arábica e cerca de $80 \text{ }^\circ\text{C}$ para o café o robusta.

Foi possível detectar DNA de café arábica nos MR analisados, porém em Cts mais tardios (35) que os da curva padrão (22), provavelmente devido a degradação do DNA e a produção de compostos que podem inibir a reação durante a torra do café.

A detecção de espécies de café por PCR em tempo real se mostrou promissora para o café verde e torrado. Certamente, os estudos desenvolvidos até então irão nortear ensaios adicionais determinantes para a finalização do estabelecimento de metodologia para a separação das de cafés de *C. arabica* e *C. canephora* torrado e moído.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIC. Associação Brasileira da Indústria de Café. Norma de qualidade recomendável e boas práticas de fabricação de cafés torrados em grão e cafés torrados e moídos. Revisão nº 24. . 2012.
- ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 2, p. 414–420, 2010.
- ABRAHÃO, S. A. et al. Atividade antioxidante in vitro e in vivo de café bebida mole. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 127–133, 2012.
- AGNOLETTI, B. Z. Avaliação das propriedades físico-químicas de café arábica (*coffea arabica*) e conilon (*coffea canephora*) classificados quanto à qualidade da bebida. [s.l.] Universidade Federal do Espírito Santo, 2015.
- ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade? **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2169–2180, 2009.
- ARLOTIO, M. et al. Detection of hazelnut (*Corylus* spp.) in processed foods using real-time PCR. **Food Control**, v. 18, p. 140–148, 2007.
- BICC. Relatório Internacional de Tendências do Café. **Lavras: Bureau de Inteligência Competitiva do Café**, v. 5, n. 12, p. 12, 2017.
- BICHO, N. C. et al. Use of colour parameters for roasted coffee assessment. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 3, p. 436–442, 2012.
- CAMPOS, R. S. et al. Fungos micotoxigênicos e ocratoxina A em cafés com permanência prolongada na planta e no solo, colhidos nas regiões do cerrado mineiro e baiano. **Coffee Science**, v. 4, n. 2, p. 136–148, 2009.
- CARDOSO, M. H. W. M. et al. Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: estudo da homogeneidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 439–446, 2010.
- CASTELLÁ, G.; CABANES, F. J. Development of a Real Time PCR system for detection of ochratoxin A-producing strains of the *Aspergillus niger* aggregate. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1367–1372, ago. 2011.
- CÉSAR, A. DA S.; MORI, C. DE; BATALHA, M. O. Inovações tecnológicas de embalagens nas indústrias de alimentos: estudo de caso da adoção de embalagem ativa em empresas de torrefação de café. **Revista Brasileira de Inovação**, v. 9, n. 2, p. 355–378, 2010.
- CETEM. Centro de Tecnologia Mineral. 2016.

CHEN, J.; DAVIS, S. S. The release of diazepam from poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres. **Journal of microencapsulation**, v. 19, n. 2, p. 191–201, 2002.

ČÍŽKOVÁ, H. et al. Differentiation of coffee varieties according to their sterolic profile. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 46, n. 1, p. 28–34, 2007.

CLARKE, R. J.; MACRAE, R. **Coffee: Physiology**. [s.l.: s.n.]. v. 3

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos Café. Primeiro levantamento. **Observatório Agrícola**, v. 4, n. 1, p. 1–98, 2017a.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos Café. Primeiro levantamento. **Observatório Agrícola**, v. 4, n. 1, p. 1–98, 2017b.

CONTI, M. C. M. D. DE et al. Características físicas e químicas de cafés torrados e moídos exóticos e convencionais. **B.CEPPA**, v. 31, n. 1, p. 161–172, 2013.

COSTA, J.; MAFRA, I. M.; OLIVEIRA, B. P. P. High resolution melting analysis as a new approach to detect almond DNA encoding for Pru du 5 allergen in foods. *Food Chemistry*. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1062–1069, 2012.

CUNHA, J. P. A. R. DA et al. Espectro de gotas de bicos de pulverização hidráulicos de jato plano e de jato cônico vazio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 10, p. 977–985, 2004.

DOMINGUES, G. S. et al. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmêutica. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1966–1972, 2008.

EDZUAN, A. M. F.; ALIAH, A. M. N.; BONG, H. L. Physical and Chemical Property Changes of Coffee Beans during Roasting. **American Journal of Chemistry**, v. 5, n. 3A, p. 56–60, 2015.

EMBRAPA. Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia. Embrapa Rondônia. 2004 a, p. 21.

EMBRAPA. Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura do Café Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura do Café. 2004 b, p. 81.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Agropensa Sistema de Inteligência Estratégica. Produção Agrícola Municipal - IBGE. . 2017.

FARAH, A. et al. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 374–381, 2006.

FARAH, A.; FERREIRA DOS SANTOS, T. The Coffee Plant and Beans: An Introduction. In: **Coffee in Health and Disease Prevention**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 5–10.

FERNANDES, A. M. et al. Qualidade físico-química e de fritura de tubérculos de cultivares de batata na safra de inverno. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 299–304, 2010.

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

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

GERMINI, A. et al. Development of a seven-target multiplex PCR for the simultaneous detection of transgenic soybean and maize in feeds and foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3275–3280, 2004.

GUEVARA-BARRETO, R. A.; CASTAÑO-CASTRILLÓN, J. J. Medición del tamaño de partícula de café tostado y molido mediante difracción de rayos laser. **Cenicafé**, v. 55, n. 2, p. 150–160, 2004.

HERNÁNDEZ, J. A. et al. Analysis of the heat and mass transfer during coffee batch roasting. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 4, p. 1141–1148, 2007.

IAEA. International Atomic Energy Agency. Development and use of reference materials and quality control materials. 2003, p. 113.

INMETRO (ED.). **Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012)**. 3. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

IPT. Instituto de Pesquisas Tecnológicas. 2017.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. GUIDE 43-1: Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes. 1997.

ISO. GUIDE 35: Reference materials - General and statistical principles for certification. . 2006, p. 64.

ISO. GUIDE 30: Reference Materials - Selected terms and definitions. 2015 a, p. 8.

ISO. Guide 33: Reference materials - Good practice in using reference materials. 2015 b, p. 31.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. International Protocol for Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories. v. 60, p. 855–864, 1993.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. v. 67, n. 2, p. 331–343, 1995.

JUNYAPRASERT, V. B.; MANWIWATTANAKUL, G. Release profile comparison and stability of diltiazem-resin microcapsules in sustained release suspensions. **International**

- Journal of Pharmaceutics**, v. 352, n. 1–2, p. 81–91, 2008.
- KATO, L. S. **Caracterização química de feijão para produção de material de referência certificado**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2014.
- KOCH, M. et al. Certification of reference materials for ochratoxin A analysis in coffee and wine. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 16, n. 8, p. 429–437, 2011.
- KY, C. et al. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* - kY 2001.pdf. **Food Chemistry**, v. 75, p. 223–230, 2001.
- LAUBE, I. et al. Development of *primer* and probe sets for the detection of plant species in honey. **Food Chemistry**, v. 118, n. 4, p. 979–986, fev. 2010.
- LIMA, A. R. et al. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e após a descafeinação. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 20–24, 2010.
- MANZANO, M. et al. A molecular method to detect *Bacillus cereus* from a coffee concentrate sample used in industrial preparations. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 6, p. 1361–1366, 2003.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proficiency test final report. Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoattinity column clean-up and LC/TLC**. 2006, p. 24.
- MAPA. Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento. **Informe estatístico do café**. Dez. 2016.
- MARTELLOSI, C. et al. DNA extraction and analysis from processed coffee beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 22, p. 8432–8436, 2005.
- MCGUIRE, R. G. Reporting of objective color measurements. **Horticultural Science**, v. 27, n. 12, p. 1254–1255, 1992.
- MENDES, L. C. et al. Optimization of the roasting of robusta coffee (*C. canephora conillon*) using acceptability tests and RSM. **Food Quality and Preference**, v. 12, n. 2, p. 153–162, 2001.
- MENDONÇA, L. M. V. L. et al. Composição química de grãos crus de cultivares de *Coffea arabica* L. suscetíveis e resistente à *Hemileia vastatrix* Berg et Br. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 413–419, 2007.
- MENDONÇA, L. M. V. L.; PEREIRA, R. G. F. A.; MENDES, A. N. G. Parâmetro Bromatológicos de Grãos Crus e Torrados de Cultivares de Café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 239–243, 2005.
- MISHRA, M. K. et al. A simple method of DNA extraction from coffee seeds suitable for PCR analysis. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 409–413, 2008.

MONAKHOVA, Y. B. et al. Rapid approach to identify the presence of Arabica and Robusta species in coffee using ¹H NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 182, p. 178–184, 2015.

MOREIRA, E. G. **Preparo e Caracterização de um Material de Referência de Mexilhão Perna Perna (Linnaeus, 1758)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2010.

MUFLIHAH, Y. M.; BUCHARI, D. Preparation of reference material for trigonelline determination inside of green coffee beans using HPTLC. **ILMU DASAR**, v. 14, n. 1, p. 53–57, 2013.

OIC. Organização Internacional do Café. **Relatório sobre o mercado de café**. Dez. 2016.

OLEXOVÁ, L. et al. Detection of gluten-containing cereals in flours and “gluten-free” bakery products by polymerase chain reaction. **Food Control**, v. 17, n. 3, p. 234–237, mar. 2006.

OLIVEIRA, G. H. H. et al. Caracterização física de café após torrefação e moagem. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 1813–1828, 2014.

ONAKPOYA, I.; TERRY, R.; ERNST, E. The Use of Green Coffee Extract as a Weight Loss Supplement : A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Clinical Trials. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2011, 2011.

PAFUNDO, S.; GULLÌ, M.; MARMIROLI, N. SYBRGreenERTM Real-Time PCR to detect almond in traces in processed food. **Food Chemistry**, v. 116, p. 811–815, 2009.

PIKNOVÁ, L.; BREZNÁ, B.; KUČHTA, T. Detection of gluten-containing cereals in food by 5'-nuclease real-time polymerase chain reaction. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 47, n. 3, p. 114–119, 2008.

REGO, E. C. P. DO et al. Feasibility study for development of candidate reference material for food analysis: Chloramphenicol in milk powder. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, v. 98, p. 300–304, 2017.

ROGERS, W. J. et al. Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. **Plant Science**, v. 149, n. 2, p. 115–123, 1999.

SAA. Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. Resolução SAA - 30, de 22 de junho de 2007. Norma de Padrões Mínimos de Qualidade para Café torrado em Grão e Torrado e Moído. **Diário Oficial** [Poder Executivo]. 2007 a, p. 23/24.

SAA. Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. Resolução SAA - 31, de 22 de junho de 2007. Norma de Padrões Mínimos de Qualidade para Café torrado em Grão e Torrado e Moído. **Diário Oficial** [Poder Executivo]. 2007 b, p. 24/25.

SACCHETTI, G. et al. Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on

the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 1, p. 74–80, 2009.

SAMADI, M.; MOHAMMADSHAHI, M.; HAIDARI, F. Green coffee bean extract as a weight loss supplement. **J Nutr Disorders Ther**, v. 5, n. 4, 2015.

SANTOS, G. S. DOS et al. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas destinadas à aplicação tópica de dapsona. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1388–1394, 2012.

SENE, K. H.; ADMASSU, B. Avoiding PCR inhibition to implement microsatellite markers for characterization of coffee genotypes. **International Journal of Biology and Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 167–177, 2013.

SIU, Q. et al. Estudo de homogeneidade de lote de material silício metálico candidato a material de referência. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 497–501, 2005.

TAGLIAFERRO, F. S. et al. Candidate coffee reference material for element content: Production and certification adopted at CENA/USP. **Congresso Brasileiro de Metrologia**, p. 1–4, 2003.

TAGLIAFERRO, F. S.; FERNANDES, E. A. D. N.; BACCHI, M. A. Quality assessment of organic coffee beans for the preparation of a candidate reference material. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 269, n. 2, p. 371–375, 2006.

TOCI, A. T.; FARAH, A. Volatile compounds as potential defective coffee beans' markers. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1133–1141, 2008.

TOLEDO, P. R. A. B. et al. Relationship Between the Different Aspects Related to Coffee Quality and Their Volatile Compounds. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 4, p. 1–15, 2016.

TORNINCASA, P. et al. Coffee species and varietal identification. **Tools for Identifying Biodiversity: Progress and Problems**, p. 307–313, 2010.

UFLA. Universidade Federal de Lavras. Centro de Inteligência em Mercados. Bureau de Inteligência Competitiva do Café. Relatório Internacional de tendências do café. v. 4, n. 2, p. 13, 2015.

ULRICH, J. C. **Preparação e caracterização de um material de referência de peixe**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

VARGAS, E. A. et al. Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 3, p. 773–779, 2005.

WEI, F.; TANOKURA, M. Organic Compounds in Green Coffee Beans. In: **Coffee in Health and Disease Prevention**. [s.l.] Elsevier, 2015a. p. 149–162.

WEI, F.; TANOKURA, M. Chemical Changes in the Components of Coffee Beans during Roasting. In: **Coffee in Health and Disease Prevention**. [s.l.] Elsevier, 2015b. p. 83–91.

ANEXO I

Protocolo CTAB:

1. Pesar 100 mg de amostra homogênea, em triplicata, em tubo de reação de 1,5 mL esterilizado;
2. Adicionar 1000 μ L de tampão CTAB, misturar com um loop;
3. Adicionar 20 μ L de proteinase K 20 mg/mL;
4. Incubar em banho termostático a 65 °C durante 90 minutos, homogeneizando em vórtex a cada 15 minutos;
5. Adicionar 20 μ L de RNase 10ng/mL, verter para homogeneizar, incubar por 5 minutos a temperatura ambiente e 5 minutos a 65 °C;
6. Centrifugar por 10 minutos a 13000 rpm em centrífuga não refrigerada;
7. Transferir 500 μ L do sobrenadante para um tubo contendo 500 μ L de clorofórmio, misturar por 30 segundos em vórtex;
8. Centrifugar por 10 minutos a 13000 rpm em centrífuga não refrigerada;
9. Transferir 500 μ L do filme superior para outro micro tubo;
10. Adicionar 2 volumes da solução de precipitação de CTAB;
11. Incubar por 90 minutos a temperatura ambiente;
12. Centrifugar por 10 minutos a 13000 rpm em centrífuga não refrigerada;
13. Descartar o sobrenadante;
14. Dissolver o precipitado em 350 μ L de NaCl 1,2 M;
15. Adicionar 350 μ L de clorofórmio e misturar por 30 segundos em vórtex;
16. Centrifugar por 10 minutos a 13000 rpm em centrífuga não refrigerada, ou até ocorrer separação de fases;
17. Transferir o filme superior para um micro tubo novo;
18. Adicionar igual volume de isopropanol gelado;
19. Homogeneizar por inversão e deixar à - 20 °C por uma noite;
20. Homogeneizar por inversão e centrifugar por 10 minutos a 1300 rpm em centrífuga não refrigerada;
21. Descartar o sobrenadante;
22. Secar os pellets, invertendo os tubos em papel absorvente, durante 15 minutos a temperatura ambiente;
23. Adicionar 500 μ L de etanol 70% gelado;
24. Agitar cuidadosamente;

25. Centrifugar por 5 minutos em centrífuga não refrigerada;
27. Descartar o sobrenadante e secar os pellets por 1 e ½ hora;
27. Dissolver em 50 a 100 µL de água MilliQ esterilizada.

A solução de DNA pode ser estocada em um refrigerador por, no máximo, duas semanas, ou no freezer a – 20 °C por máximo seis meses.