



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

NATÁLIA FERRAREZI PAGIATTO

**ANÁLISE DE DITERPENOS E CAFEÍNA EM UMA COLEÇÃO  
DA ETIÓPIA DE COFFEA ARABICA**

NATÁLIA FERRAREZI PAGIATTO

**ANÁLISE DE DITERPENOS E CAFEÍNA EM UMA COLEÇÃO  
DA ETIÓPIA DE COFFEA ARABICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira.

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

P136a Pagiatto, Natália Ferrarezi.

Análise de diterpenos e cafeína em uma coleção da Etiópia de *Coffea Arábica* / Natália Ferrarezi Pagiatto. – Londrina, 2013.  
78 f. : il.

Orientador: Luiz Filipe Protasio.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Agroindustrial) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agroindustrial, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Café – Teses. 2. Caveol – Teses. 3. Cafestol – CLAE – Teses. 4. NIRS – Teses. I. Protasio, Luiz Filipe. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. III. Título.

CDU 663.8/9

NATÁLIA FERRAREZI PAGIATTO

**ANÁLISE DE DITERPENOS E CAFEÍNA EM UMA COLEÇÃO DA  
ETIÓPIA DE *COFFEA ARABICA***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira  
IAPAR – Londrina - PR

---

Dra. Maria Brígida dos Santos Scholz  
IAPAR – Londrina - PR

---

Suzana Lucy Nixdorf  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 25 de julho de 2013.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira, pela sua competência profissional, pela oportunidade de realização do Mestrado no IAPAR.

À Dra. Maria Brígida dos Santos Scholz, por me supervisionar e pelos seus ensinamentos e sua sabedoria.

A Universidade Estadual de Londrina, ao curso de Pós-graduação em Biotecnologia e seus professores pela oportunidade e pelos diferentes canais de aprendizagem oferecidos.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná, pelo acolhimento e estrutura disponibilizada durante a realização deste mestrado.

À Dra. Cíntia Sorane Good Kitzberger, por me ajudar desde o início deste trabalho com seus conhecimentos e também pela sua preocupação com o nosso bem estar.

Ao Dr. Douglas Silva Domingues e ao Pierre Charmetant pela ajuda na realização deste projeto e pelas contribuições recebidas.

Ao Consórcio Pesquisa Café pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus amigos de laboratório, assim como os técnicos, por tornarem os dias difíceis mais alegres.

Aos meus pais, Tania e Mario, e à minha irmã Mariana, pelo carinho e por estarem sempre presentes em minha vida, tornando a conclusão deste trabalho possível.

E, acima de tudo, a Deus, por ter colocado ao meu lado todas essas pessoas, ter-me permitido a conclusão desta etapa de minha vida e sempre me abençoando e me guiando para o melhor.

PAGIATTO, Natália Ferrarezi. **Análise de diterpenos e cafeína em uma coleção da etiópia de *Coffea arabica***. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2013.

## RESUMO

O café é um dos produtos agrícolas de maior importância na economia mundial, onde se destaca o *Coffea arabica*, que apresenta uma bebida de melhor qualidade e sabores diversificados. O *C. arabica*, nativo de uma região restrita localizada no sudoeste da Etiópia, é a espécie mais bem estudada em relação a fatores genéticos. Entretanto, apresenta uma base genética estreita, sendo importante a caracterização de genótipos do centro de origem visando explorar uma maior diversidade genética e fenotípica. São vários componentes químicos que podem funcionar como indicadores ou discriminadores para uma avaliação fenotípica. Os diterpenos caveol e cafestol apresentam interesse para a saúde pela ação hipercolesterolêmica, mas também pelas atividades anticarcinogênica e antioxidante. A cafeína apresenta um efeito estimulante sobre o sistema nervoso central, melhoras no estado de alerta e capacidade de aprendizado. Algumas técnicas têm sido descritas para estimar o teor de componentes químicos, onde vem se destacando a Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIRS), que é uma alternativa rápida de análise e de baixo custo, além de não ser destrutiva. Neste trabalho foi feita a fenotipagem para estes compostos em 125 acessos de café de uma coleção de *C. arabica* da Etiópia e de 4 amostras de cafés comerciais. A metodologia para determinação dos diterpenos utilizou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando fase reversa, eluição isocrática (acetonitrila: água 55:45) e detecção feita a 220 e 290 nm para cafestol e caveol, respectivamente. Para a determinação de cafeína utilizou-se a espectrofotometria UV/VIS, com detecção feita em 272 nm. Empregou-se a correlação de Pearson e a Análise de Agrupamento Hierárquico (AAH) para os dados. Pode-se observar grande variabilidade na composição de diterpenos, onde a concentração de cafestol variou de 267,90 a 1308,97 mg/100 g e para o caveol de 182,70 a 1400,49 mg/ 100 g de café. Verificou-se que a maioria dos acessos apresentou maiores teores de cafestol que caveol. O conteúdo de cafeína também revelou uma ampla variabilidade, com teor mínimo de 0,70% (m/m) e máximo de 1,48% (m/m), onde a maioria esteve na faixa de 0,9 a 1,3% (m/m). Através da correlação de Pearson, observou-se a tendência de que acessos com alto teor de cafestol e baixo de caveol apresentam menor teor de cafeína, ocorrendo o inverso para maiores teores de caveol e baixos de cafestol, encontrando o valor de 0,39 para a correlação entre caveol e cafeína. A AAH também mostrou essa tendência, a partir da formação de 3 grupos com esses comportamentos. Com os dados gerados, também foi realizada a otimização de análises por NIRS através da calibração dos modelos de predição. As calibrações para os componentes obtiveram um  $r^2$ , a partir da validação externa, de 0,864, 0,643 e 0,846 e SEP de 0,068, 136,409 e 95,472 para cafeína, caveol e cafestol respectivamente. Os valores de RPD foram de 2,74, 1,79 e 2,52, onde somente os modelos para cafeína e cafestol foram considerados adequados, já que o modelo para caveol apresentou uma relação baixa. A fenotipagem e a validação da técnica de NIRS representam uma etapa fundamental para futuros estudos de mapeamento por genética de associação da coleção da Etiópia.

**Palavras-chave:** Café. Caveol. Cafestol. CLAE. NIRS

PAGIATTO, Natália Ferrarezi. Analysis of diterpenes and caffeine in a collection of Ethiopia's *Coffea arabica*. Londrina, 2013. 78 p. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina.

## ABSTRACT

Coffee is one of the most important agricultural products worldwide. *Coffea arabica* which is native of a restricted region located in south-west Ethiopia is recognized in the market by presenting a better quality drink and varied flavors. Among the perennial crops, *C. arabica* is one of best species studied in relation to genetic factors, however presents a narrow genetic base. Therefore, it is important to characterize genotypes of the center of origin in order to explore further genetic and phenotypic diversity. The literature identifies several chemical components, which can serve as indicators or discriminators for a phenotypic evaluation. The diterpenes cafestol and kahweol are important due their effects on health by hypercholesterolemic action, as well as their antioxidant and anticarcinogenic activity. Caffeine has a stimulating effect on the central nervous system, improving alertness and learning capacity. In this work we phenotyped a collection of 125 accesses of Ethiopia's *C. arabica* coffee and 4 commercial samples for diterpenes and caffeine. Diterpenes were quantified by HPLC using reversed-phase, isocratic elution (acetonitrile:water 55:45) and detection at 220 and 290 nm for cafestol and kahweol, respectively. For the determination of caffeine a spectrophotometry UV / VIS with detection at 272 nm was used. We also used the Pearson correlation and AAH to analysis the data of caffeine, cafestol and kahweol. A large variability in the composition of diterpenes was observed. The concentration ranged from 267,90 to 1308,97 mg/100 g for cafestol and from 182,70 to 1400.49 mg/100 g coffee for kahweol. It was also found that the majority of accesses had higher levels of cafestol and lower levels of kahweol. The caffeine content also showed a wide variation, with a minimum content of 0.70% (w/w) and a maximum of 1.48% (w/w). Most of the samples where into the range of 0.9 to 1.3% (w/w). By Pearson correlation, there is a tendency that accesses with high levels of cafestol and low kahweol have lower levels of caffeine, while the opposite occurred for higher levels of kahweol and low cafestol, with value of 0.39 for the correlation kahweol and caffeine. The AAH also showed this trend, from the formation of three groups with these behaviors. The calibrations of the regression models for NIRS were made with the data obtained for caffeine, cafestol and kahweol. With the external validation, the NIRS calibrations obtained an  $r^2$  of 0.864, 0.643 and 0.846, and SEP of 0.068, 95.472 and 136.409 to caffeine, cafestol and kahweol respectively. The RPD values were 2.74, 1.79 and 2.52, demonstrating that the models for cafestol and caffeine were considered suitable for analysis with NIRS. Phenotyping and optimization of the technique NIRS are fundamental steps in future studies of association mapping of the Ethiopia's collection.

**Keywords:** Coffee. Kahweol. Cafestol. HPLC. NIRS.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Fórmulas estruturais dos diterpenos cafestol e caveol .....	22
<b>Figura 2 -</b>	Espectro (190 a 800 nm) de caveol (A) e cafestol (B) obtidos de padrões comerciais .....	22
<b>Figura 3 -</b>	Estruturas de compostos de degradação para caveol e cafestol em café torrado.....	23
<b>Figura 4 -</b>	Estrutura química da cafeína do café.....	24
<b>Figura 5 -</b>	Metodologia utilizada para as extrações de cafestol e caveol em grão de café verde .....	37
<b>Figura 6 -</b>	Cromatograma típico de café arábica. Detecção a (a) 220 nm para cafestol e (b) 290 nm para caveol. Picos de caveol (1) e cafestol (2). .....	42
<b>Figura 7 -</b>	Histogramas das frequências dos acessos de café com relação as faixas de concentração dos diterpenos: a) cafestol, b) caveol c) caf + cav e d) cav/caf.....	43
<b>Figura 8 -</b>	Histograma da frequência de acessos com relação às faixas de concentração de cafeína.....	47
<b>Figura 9 -</b>	Distribuição de frequência do teor de cafeína das amostras analisadas por NIRS. ....	53
<b>Figura 10 -</b>	Distribuição de frequência do teor de cafestol das amostras analisadas por NIRS. ....	53
<b>Figura 11 -</b>	Distribuição de frequência do teor de caveol das amostras analisadas por NIRS .....	54
<b>Figura 12 -</b>	Projeção tridimensional dos espectros.....	54
<b>Figura 13 -</b>	Projeção de todos os espectros do grupo de amostras de café.....	55
<b>Figura 14 -</b>	Projeção dos espectros médios das amostras de café após tratamento .....	55
<b>Figura 15 -</b>	Relação entre os valores de cafeína preditos pelo modelo (x) e os obtidos em laboratório (y) para o conjunto de amostras .....	58

**Figura 16 -** Relação entre os valores de caveol preditos pelo modelo (x) e os obtidos em laboratório (y) para o conjunto de amostras .....58

**Figura 17 -** Relação entre os valores de cafestol preditos pelo modelo (x) e os obtidos em laboratório (y) para o conjunto de amostras .....59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Atribuição das regiões espectrais às possíveis transições vibracionais .....	29
<b>Tabela 2</b> – Matriz de correlação de pearson para as variáveis cafestol, caveol e cafeína. ....	49
<b>Tabela 3</b> – Grupos formados pela análise de agrupamento hierárquico em termos de composição de cafeína, caveol e cafestol dos acessos de café da coleção da etiópia.....	50
<b>Tabela 4</b> – Acesso central e concentrações de caveol, cafestol e cafeína para cada grupo formado pela aah. ....	51
<b>Tabela 5</b> – Valores de calibração com validação cruzada .....	56
<b>Tabela 6</b> – Valores de calibração.....	57
<b>Tabela 7</b> – Valores da validação externa .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AAH</b>	Análise de Agrupamento Hierárquico
<b>ACP</b>	Análise de Componentes Principais
<b>caf</b>	Cafestol
<b>cav</b>	Caveol
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography – HPLC</i> )
<b>NIRS</b>	Espectroscopia no Infravermelho Próximo (do inglês, <i>Near Infrared Spectroscopy</i> )
<b>PLS</b>	Mínimos Quadrados Parciais (do inglês, <i>Partial Least Squares</i> )
<b>r<sup>2</sup></b>	Coeficiente de Determinação
<b>RPD</b>	Relação do Desempenho do Desvio (do inglês <i>Ratio Performance Deviation</i> )
<b>SEC</b>	Erro padrão de Calibração (do inglês, <i>Standard Error of Calibration</i> )
<b>SECV</b>	Erro padrão de Validação Cruzada (do inglês, <i>Standard Error of Cross Validation</i> )
<b>SEP</b>	Erro padrão de Predição (do inglês, <i>Standard Error of Prediction</i> )
<b>SD</b>	Desvio Padrão (do inglês, <i>Standard Deviation</i> )
<b>SNV</b>	Transformação Padrão Normal de Variação (do inglês, <i>Standard Normal Variate</i> )
<b>T</b>	Termos
<b>UV/VIS</b>	Região do Espectro Ultravioleta e Visível

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1	HISTÓRICO .....	15
2.2	PRODUÇÃO E CONSUMO DO CAFÉ .....	16
2.3	AVALIAÇÃO FENOTÍPICA.....	18
2.4	<i>COFFEA ARABICA</i> .....	19
2.5	CAFÉ E SEUS COMPONENTES.....	21
2.5.1	Diterpenos: Caveol e Cafestol .....	21
2.5.2	Cafeína.....	23
2.5.3	Quantificação dos Componentes .....	25
2.6	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS) .....	27
2.6.1	NIRS e Aplicações.....	29
2.6.2	Quimiometria .....	31
2.6.3	Calibração - Mínimos Quadrados Parciais (PLS) .....	32
2.6.4	Validação do Modelo de Calibração .....	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
4.1	MATERIAL.....	36
4.1.1	Amostras de Café.....	36
4.2	MÉTODOS .....	36
4.2.1	Métodos de Referências.....	36
4.2.1.1	Determinação de cafestol e caveol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	36
4.2.1.2	Determinação de cafeína por espectrofotometria UV/VIS .....	38
4.2.1.3	Umidade .....	38
4.2.2	Espectroscopia no Infravermelho Próximo .....	39

4.2.2.1	Organização das amostras.....	39
4.2.2.2	Coleta dos espectros.....	39
4.2.2.3	Pré tratamento dos espectros .....	39
4.2.2.4	Análise de componentes principais .....	40
4.2.2.5	Calibração .....	40
4.2.2.6	Validação cruzada e validação externa da calibração.....	40
4.2.3	Análise Estatística .....	41
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
5.1	DITERPENOS .....	42
5.2	CAFEÍNA.....	47
5.3	AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE CAFEÍNA, CAFESTOL E CAVEOL .....	48
5.4	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO – NIRS.....	52
5.4.1	Características das Amostras de Café .....	52
5.4.2	Análise da Qualidade dos Espectros.....	54
5.4.3	Calibração e Validação.....	56
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>71</b>
	Anexo A - Conteúdo de cafestol e caveol, cafestol + caveol (mg/100g em base seca), coeficiente de variação e relação caveol e cafestol (cav/caf) dos acessos de café da coleção Etiópia .....	72
	Anexo B - Conteúdo de cafeína (% , m/m) e coeficiente de variação dos acessos de café da coleção Etiópia .....	77

## 1 INTRODUÇÃO

O café é uma cultura perene, adaptada a zona tropical e subtropical, sendo cultivado em países em desenvolvimento da África, Ásia e América Latina. A bebida é consumida basicamente em países desenvolvidos, com exceção do Brasil, e é conhecida pelo sabor e aromas característicos (NISHIJIMA; SAES; POSTALI, 2012). É um dos produtos agrícolas mais importantes no comércio mundial. Está estimado que, globalmente, entre 20 e 25 milhões de pessoas dependem do café para a subsistência. (BRASIL, 2013).

*Coffea arabica* é nativa de uma região restrita, marginal às demais espécies, localizada no sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia (FAZUOLI, 2006). O café arábica é reconhecido no mercado por apresentar uma bebida de melhor qualidade, com aroma agradável e sabores diversificados, alcançando os maiores preços no mercado e pela pequena quantidade de cafeína (1,2% a 1,3% m/m). (NISHIJIMA; SAES; POSTALI, 2012). O *C. canephora*, por possuir características sensoriais próprias, produz bebida classificada como de “sabor único”, considerada tecnicamente de qualidade inferior ao arábica por provadores treinados e também teor mais elevado de cafeína (2,2% a 2,5% m/m). É utilizado muitas vezes para a fabricação de cafés solúveis por possuir elevado teor de sólidos solúveis. O *C. canephora*, de menor valor comercial, é adicionado ao arábica, em *blends* comerciais, para padronização de sabor e diminuição dos custos do produto final. (CARVALHO et al., 2001; MORAIS et al., 2009).

Dentre as plantas perenes, o cafeeiro *C. arabica* é com certeza a espécie mais bem estudada no que se refere à herança e relação de dominância de fatores genéticos. (FAZUOLI, 2006). As pesquisas sobre herança das principais características das variedades de *C. arabica* têm-se mostrado importantes na obtenção de novas cultivares, através de recombinações genéticas, com o intuito de estudar fatores que afetam características da planta para obter um potencial de maturação mais uniforme e diferenciado, resistência a moléstias, pragas e nematóides; tolerância às condições adversas do ambiente (seca, calor, presença de alumínio); qualidade da bebida e componentes químicos (cafeína, ácidos clorogênicos, sólidos solúveis, lipídios, açúcares, trigonelina) (FAZUOLI, 2004). Entretanto, *C. arabica* apresenta uma base genética estreita, sendo importante a

caracterização de genótipos do centro de origem visando encontrar e explorar uma maior diversidade genética e fenotípica.

Novas linhas de investigação têm dado importância a compostos químicos presentes no café sugerindo potenciais efeitos benéficos e protetores em nível da saúde dos consumidores desta bebida. Estima-se que o grão de café possua mais de 2000 compostos químicos, alguns destes com atividades biológicas conhecidas, benéficas ou não, sendo os efeitos do consumo de café dependentes da qualidade e da quantidade ingerida (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009).

A bebida do café se caracteriza pelo efeito estimulante sobre o sistema nervoso central, atribuído à cafeína, a qual também está associada a melhoras no estado de alerta, na capacidade de aprendizado e na realização de atividades físicas, afastando a sonolência e a sensação de cansaço (LIMA et al., 2007). Há também estudos relacionando a ingestão do café à ação protetora contra toxinas, incidência de doenças coronarianas, propriedades anticarcinogênicas, antiinflamatórias e prevenção da oxidação do DNA à outros componentes, como os diterpenos caveol e cafestol. (CAVIN et al., 2002; LEE; CHOI; JEONG, 2007; RICKETTS et al., 2007).

Um grande número de trabalhos tem se concentrado na determinação de componentes químicos, como alguns compostos hidrossolúveis como a cafeína, trigonelina, ácido nicotínico, ácidos clorogênicos e compostos lipossolúveis, como os diterpenos caveol e cafestol, os quais possam funcionar como indicadores ou discriminadores, de forma isolada ou em conjunto para uma avaliação fenotípica em *C. arabica*. (CAMPANHA, 2008; DIAS, 2005; CASAL et al., 2000).

Técnicas cromatográficas, que permitem a quantificação simultânea de vários compostos, com destaque para a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), são as mais utilizadas por serem técnicas rápidas e práticas, que permitem a análise dos componentes lipídicos sem derivatização da amostra, evitando a degradação térmica (DIAS et al., 2010).

Algumas outras abordagens também têm sido descritas para estimar o teor de componentes químicos, como a técnica de espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIRS), que é uma alternativa rápida e de baixo custo, além da possibilidade de não ser destrutiva. É baseada na espectroscopia vibracional que monitora as mudanças nas vibrações diretamente associadas com diferentes

estruturas moleculares. Esse método tem sido utilizado para análise de alimentos desde 1938, baseando-se em espectros que são medidos pela técnica de reflexão e absorção. (HUCK; GUGGENBICHLER; BONN, 2005; ITO et al., 2008).

No entanto, a tecnologia NIRS é um método secundário, sempre vai ser dependente dos métodos convencionais de análises (métodos primários), pois o pré-requisito da aplicação, com um propósito quantitativo, é a construção de um modelo de calibração confiável, uma vez que a resposta instrumental não fornece diretamente a informação desejada. Normalmente a propriedade ou composto de interesse é determinada por meio de um método de referência. (MORGANO et al., 2007). Considerando que esses valores de referência são precisos e, concluído o estágio de calibração, o sucesso desse método de análise fica muitas vezes garantido.

Visando aumentar o conhecimento sobre a genética de cafeeiros arábica, o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), juntamente com a Embrapa Café e o Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agrônômica para o Desenvolvimento (CIRAD), iniciou um programa de caracterização fenotípica e genotípica de plantas de uma coleção de genótipos de *C. arabica* da Etiópia disponível nesta Instituição. Dentre as atividades deste programa, neste trabalho foi realizada a análise de diterpenos e de cafeína dos acessos disponíveis e também a padronização das análises destes compostos pela técnica de NIRS.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 HISTÓRICO

Não há evidência real sobre a descoberta do café, já que as lendas se misturam com a história. No entanto, a versão mais difundida é a de que um pastor chamado Kaldi, que viveu na Absínia (hoje Etiópia) há cerca de mil anos, reconhece as qualidades do fruto como fonte de vigor e ânimo observando suas cabras, que sempre quando mastigavam os frutos de coloração amarelo-avermelhado dos arbustos (pés de café) ficavam alegres e com muita energia. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2013).

Kaldi transmitiu a história sobre o comportamento dos animais a um monge da região, que decidiu experimentar o poder dos frutos, utilizando-os na forma de infusão, percebendo que a bebida o ajudava a manter-se alerta e a resistir ao sono enquanto orava ou em suas longas horas de leitura. Rapidamente, o monge compartilhou esta descoberta com os outros monges do monastério, onde o conhecimento dos efeitos do grão se espalhou, criando uma demanda pela bebida. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2013).

O nome café não é originário do seu local de origem, Kaffa, e sim da palavra árabe qahwa, que significa vinho. Por esse motivo, o café era conhecido como "vinho da Arábia" quando chegou à Europa no século XIV. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2013).

A Arábia foi a responsável pela propagação da cultura do café. Os árabes foram os primeiros a cultivar o café e também a começar o seu comércio. No século XV, o café começou a ser cultivado no distrito de Iêmen, na Arábia, e ficou conhecido por volta do século XVI na Pérsia, Egito, Síria e Turquia. A sua popularidade foi devida, talvez em parte, ao fato de que os muçulmanos, proibidos de consumir álcool, encontraram propriedades energéticas no café que mostraram que este seria um substituto aceitável (NATIONAL COFFEE ASSOCIATION, 2013).

O café chegou ao Brasil em 1727, em Belém, no Pará, onde naquela época já possuía grande valor comercial. O cultivo do grão se espalhou rapidamente, com produção voltada para o mercado doméstico, devido às condições climáticas. Num espaço de tempo relativamente curto, o café passou de uma posição secundária para a de produto-base da economia brasileira. Desenvolveu-se

apenas com recursos nacionais, sendo a primeira iniciativa brasileira que visou à produção de riquezas. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2013).

O café manteve-se como a primeira fonte de riqueza brasileira por quase um século, e as divisas geradas pela economia cafeeira aceleraram o desenvolvimento do Brasil e o inseriram nas relações internacionais de comércio. A cultura do café possibilitou o surgimento de cidades e a melhoria de importantes centros urbanos; e ferrovias foram construídas para permitir o escoamento da produção, substituindo o transporte animal e impulsionando o comércio inter-regional de outras mercadorias. O café também proporcionou a vinda de imigrantes, consolidou a expansão da classe média, a diversificação de investimentos e até incentivou movimentos culturais. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2013).

## 2.2 PRODUÇÃO E CONSUMO DO CAFÉ

A importância da cafeicultura brasileira pode ser visualizada pelo volume de produção, pelo consumo interno, pela sua participação na pauta de exportação e pela capacidade de geração de emprego e renda na economia. (NICOLAU-SOUZA, 2009). Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de café, sendo responsável por 30% do mercado internacional, volume equivalente à soma da produção dos outros três maiores países produtores (Vietnã, Colômbia e Indonésia com 19%, 7% e 6,4%, respectivamente). (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2013; INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, 2013).

A área total brasileira cultivada com café é estimada em 2 milhões de hectares, onde o país registrou uma produção de 50 milhões de sacas no período de Novembro de 2011 a Outubro de 2012. A produção do café arábica representa 75,2% da produção do País, e tem como maior produtor o estado de Minas Gerais, com 69,4% de café beneficiado. O café conilon (*Coffea canephora*) participa da produção nacional com 24,8% de café beneficiado e o estado do Espírito Santo se destaca como o maior produtor com 77,5% (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2013; COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2012; BRASIL, 2013).

Além de maior produtor, o país é o maior exportador e o segundo maior consumidor de café. O crescimento do consumo interno pode ser atribuído a fatores como a melhoria da qualidade do café e a percepção dos efeitos benéficos na saúde humana. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2013). As diferentes espécies e variedades de café produzidas, associadas à diversidade na ocupação geográfica das plantações do produto brasileiro (fatores edafo-climáticos) e nos processos empregados, possibilitam à indústria nacional a elaboração de um grande número de misturas de grãos (*blends*) para atender aos consumidores. (NICOLAU-SOUZA, 2009).

A ABIC estima que este segmento de cafés diferenciados ou especiais, embora represente a menor parte do consumo, vão ganhar preferência popular nos próximos anos. Esse crescimento anual do consumo no país também está ligado à melhoria da qualidade do produto e às novas categorias de produtos definidas pelo Programa de Qualidade do Café (PQC), que passaram a ser identificadas por categorias a partir de níveis de qualidade: Tradicional, Superior e Gourmet. Alguns objetivos do Programa são: agregar valor e ampliar o consumo a partir da melhoria contínua dos cafés; diferenciar os produtos em qualidade e preço; e ofertar cafés certificados e garantidos no quesito Segurança Alimentar. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2013).

O consumo doméstico, predominantemente de cafés do tipo Tradicional, tanto quanto o consumo fora do lar, onde predominam os cafés Superiores e Gourmet, vêm apresentando taxas de crescimento positivas de 2%, 1% e 3,6%, respectivamente, no período de dezembro de 2012 a janeiro de 2013. Maiores investimentos em produtos e no marketing interno do café impulsionaram as vendas das marcas mais conhecidas. Mensalmente, novas marcas de cafés especiais são lançadas, fazendo com que o mercado apresente uma oferta muito significativa de produtos de alta qualidade para os consumidores brasileiros. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2013).

O interesse pelo café e o aumento de seu consumo também estão associados com a discussão e divulgação dos efeitos na saúde humana, atribuídos à bebida. A bebida do café apresenta sabor e aromas característicos, e conta na composição com substâncias que proporcionam ação estimulante sobre o sistema nervoso, auxiliando na concentração e atenção para realização de atividades intelectuais, devido à presença de cafeína. (LIMA et al., 2007).

A ingestão da bebida é correlacionada ao efeito preventivo contra oxidação do DNA, incidência e redução do risco de desenvolvimento de doenças coronarianas, diabetes, Parkinson, Alzheimer e cânceres de rins e outros. As propriedades antioxidantes e antiinflamatórias do café contribuem, ainda, significativamente para a proteção do fígado contra o desenvolvimento de doenças como injúrias hepáticas e cirrose. (CHU et al., 2011; ESQUIVEL; JIMENÉZ, 2011; LEE et al., 2007).

A influência dos compostos da bebida na saúde também tem sido estudada devido à possibilidade do café aumentar o risco de doenças do coração, assim como, elevar a taxa de colesterol e a pressão sanguínea. No entanto, Freedman et al. (2012) realizaram um estudo com mais de 500 mil pessoas e observaram que a quantidade de bebida ingerida não estava ligada à causa da morte como doenças cardíacas e respiratórias, diabetes, infecções, lesões e acidentes. Houve uma correlação positiva para homens que morreram de câncer, onde a maioria bebia mais de seis xícaras por dia. Em relação às pessoas que não bebem café, homens que beberam seis ou mais xícaras de café por dia tiveram um risco 10% menor de morte, enquanto mulheres nesta categoria de consumo tiveram um risco de 15% menor. Entre os componentes pesquisados, que refletem na saúde humana, estão a cafeína, os ácidos clorogênicos e os diterpenos caveol e cafestol. (SOUZA et al., 2010).

### 2.3 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA

O grão do café é obtido do cafeeiro, uma pequena árvore de folhas verdes, tipo arbusto, de origem tropical. Esta planta provém do gênero *Coffea*, família *Rubiaceae* que inclui mais de 500 gêneros e cerca de 6000 espécies. Das 124 espécies conhecidas do gênero *Coffea*, somente 10 são cultivadas em todo mundo. (BEKELE, 2005; DAVIS et al., 2011). Duas delas são consideradas as mais importantes, destacando-se pelo maior interesse econômico e por corresponder a mais de 90% da produção mundial: *Coffea arabica* (arábica) e *Coffea canephora* (conilon), que apresentam distinções quanto ao preço, qualidade e aceitabilidade, produzindo bebidas com características diferentes. (ALVES et al., 2006; CARVALHO et al., 2001; DIAS, 2005).

Os cafés arábica e conilon podem ser caracterizados pelo conteúdo de alguns compostos hidrossolúveis, como cafeína, trigonelina, ácido nicotínico, ácidos clorogênicos, e lipossolúveis, como os diterpenos caveol e cafestol, e foram relatados como potenciais ferramentas de identificação de espécies pelo fato de estarem presentes em diferentes teores. (CAMPANHA, 2008; CASAL et al., 2000; DIAS, 2005).

Esses compostos têm sido estudados tanto para discriminação das espécies quanto para qualidade e propriedades funcionais do café. (ALVES et al., 2006). Casal et al. (2000) avaliaram a eficiência de ácido nicotínico, trigonelina e cafeína como discriminadores para espécie e origem geográfica.

Um grande número de trabalhos tem se concentrado na determinação de componentes químicos que possam funcionar como indicadores ou discriminadores, de forma isolada ou em conjunto para uma avaliação fenotípica em *C. arabica*. (CAMPANHA, 2008; CASAL et al., 2000; KURZROCK; SPEER, 2001; MARTÍN; PABLOS; GONZÁLEZ, 1998).

#### 2.4 COFFEA ARABICA

Todas as espécies cultivadas de café têm sua origem na África. O *C. arabica* é geograficamente isolado e geneticamente distinto do resto das espécies gênero *Coffea*. Está nas florestas nas montanhas nos lados oeste e leste do Vale do Rift, no sul da Etiópia, enquanto a distribuição de outras espécies de café predominam outros lugares, como nas partes central e ocidental da África. (GOLE et al., 2002).

O café arábica é comercialmente uma das culturas mais importantes e, ao mesmo tempo, uma das mais negligenciada, no que diz respeito à conservação genética (GOLE et al., 2002). É difícil conservar bancos de germoplasma fora do seu local de origem, uma vez que suas sementes não permanecem viáveis por um longo período de tempo. O *C. arabica* é a única espécie do gênero que ocorre na Etiópia que é considerado o centro da diversidade genética desta espécie. (BEKELE, 2005; SILVAROLLA; MAZZAFERA; LIMA, 2000).

No começo do século XVIII, progênies de uma única planta da Indonésia, cultivadas na Europa, foram espalhadas pela América do Sul e acabaram

por ser a base genética das principais variedades do Brasil e de outros países. (SILVESTRINI et al., 2007).

Em razão desta baixa diversidade e devido à necessidade de conservação dos recursos genéticos do cafeeiro, a FAO (do inglês, *Food and Agriculture Organization*) organizou em 1964-65 uma missão para exploração e coleta de plantas de café arábica do sudoeste da Etiópia, onde obteve-se 621 amostras de sementes de diferentes locais, que foram distribuídos a centros de pesquisa na Índia, Tanzânia, Etiópia, Costa Rica, Peru e Portugal para mais pesquisas. (LASHERMES et al., 1996; SILVESTRINI et al., 2007). O Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) teve acesso a esta coleção através do CATIE (do espanhol, *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza*), Costa Rica, e parte desta coleção foi repassada para o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR).

Existem muitas variedades de *C. arabica* e mais de 40 mutantes já descritos. As características dos cafeeiros oriundos da Etiópia e desses mutantes são muito variáveis, como por exemplo, crescimento e forma de planta, tipo de ramificação, forma e coloração das folhas, tipo de flor e florescimento, forma e coloração dos frutos, tamanho das sementes, resistência a moléstias, pragas e nematóides, tolerância à seca, componentes químicos dos grãos e características sensoriais (FAZUOLI, 2004).

O café arábica produz uma bebida de melhor qualidade, mais fina, com aroma intenso e sabores diversificados e inúmeras variações de corpo e acidez, alcançando os maiores preços no mercado. (CAMPANHA, 2008). O fruto de café arábica apresenta maiores concentrações de carboidratos, proteínas e de lipídios comparado ao conilon, que exhibe valores mais elevados de compostos fenólicos e de cafeína. (MOREIRA; TRUGO; DE MARIA, 2000). No café arábica, a soma das quantidades de cafeína, trigonelina, ácidos clorogênicos totais (ACGs) e sacarose representa 16% em média de matéria seca. Também apresenta teores significativamente mais altos de diterpenos que o conilon, e caracteriza-se pelo alto teor de cafeol. (DIAS; CAMPANHA; BENASSI, 2007).

## 2.5 CAFÉ E SEUS COMPONENTES

### 2.5.1 Diterpenos: Caveol e Cafestol

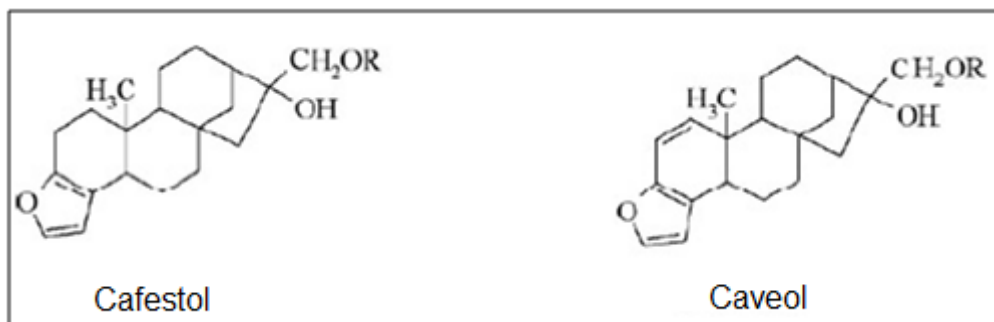
A fração lipídica do café é composta principalmente de triacilgliceróis, esteróis e tocoferóis, componentes típicos encontrados em todo óleo vegetal comestível comum. Adicionalmente, o chamado óleo de café contém diterpenos em proporção de até 20 % dos lipídios totais. (ESQUIVEL; JIMENÉZ, 2011; KURZROCK; SPEER, 2001; SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006).

Os diterpenos, caveol e cafestol, contribuem para a ação protetora contra toxinas, propriedades anticarcinogênicas, antioxidantes e antiinflamatórias, além do efeito hepatoprotetor aos consumidores da bebida café. No entanto, para os diterpenos, principalmente o cafestol, também foram relacionados como causadores de efeitos indesejáveis no organismo humano como a elevação da taxa de colesterol sanguíneo (ação hipercolesterolêmica). (CAVIN et al., 2002; ESQUIVEL; JIMENÉZ, 2011; LEE; CHOI; JEONG, 2007; ROOS et al., 1997).

O teor de diterpenos na bebida é dependente do preparo. A bebida preparada no estilo escandinavo e turco contém os maiores teores de caveol e cafestol, enquanto que café espresso contém quantidades intermediárias e, café filtrado, valores desprezíveis. (CAMPANHA, 2008; RICKETTS et al., 2007; URGERT; KATAN, 1997).

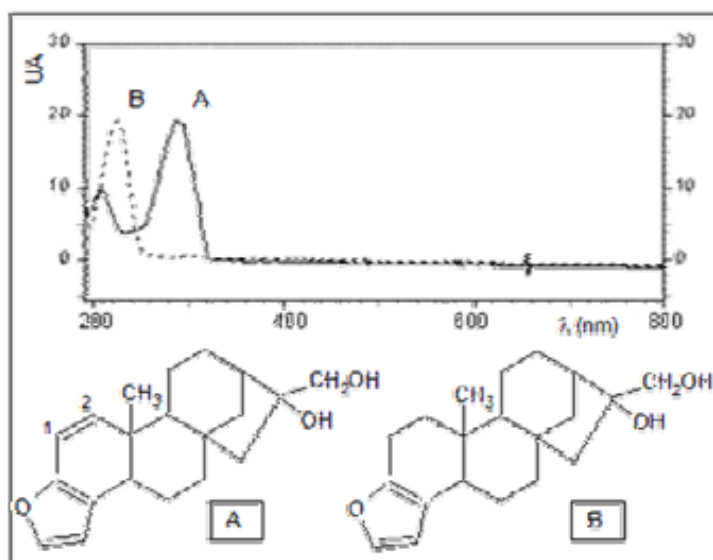
O caveol ( $C_{20}H_{26}O_3$ ) e cafestol ( $C_{20}H_{28}O_3$ ) são classificados como álcoois de diterpeno pentacíclico baseados na fusão de unidades de isopreno (C5) para formar o esqueleto de caurano de 20 carbonos (Figura 1). A estrutura dos dois diterpenos é diferenciada apenas por uma dupla ligação, e esta variação resulta em um espectro com pico de absorção em diferente comprimento de onda, 220 nm para cafestol e 290 nm para caveol (Figura 2). (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006).

**Figura 1** - Fórmulas estruturais dos diterpenos cafestol e caveol.



Fonte: Speer e Kölling-Speer (2006).

**Figura 2** - Espectro (190 a 800 nm) de caveol (A) e cafestol (B) obtidos de padrões comerciais.

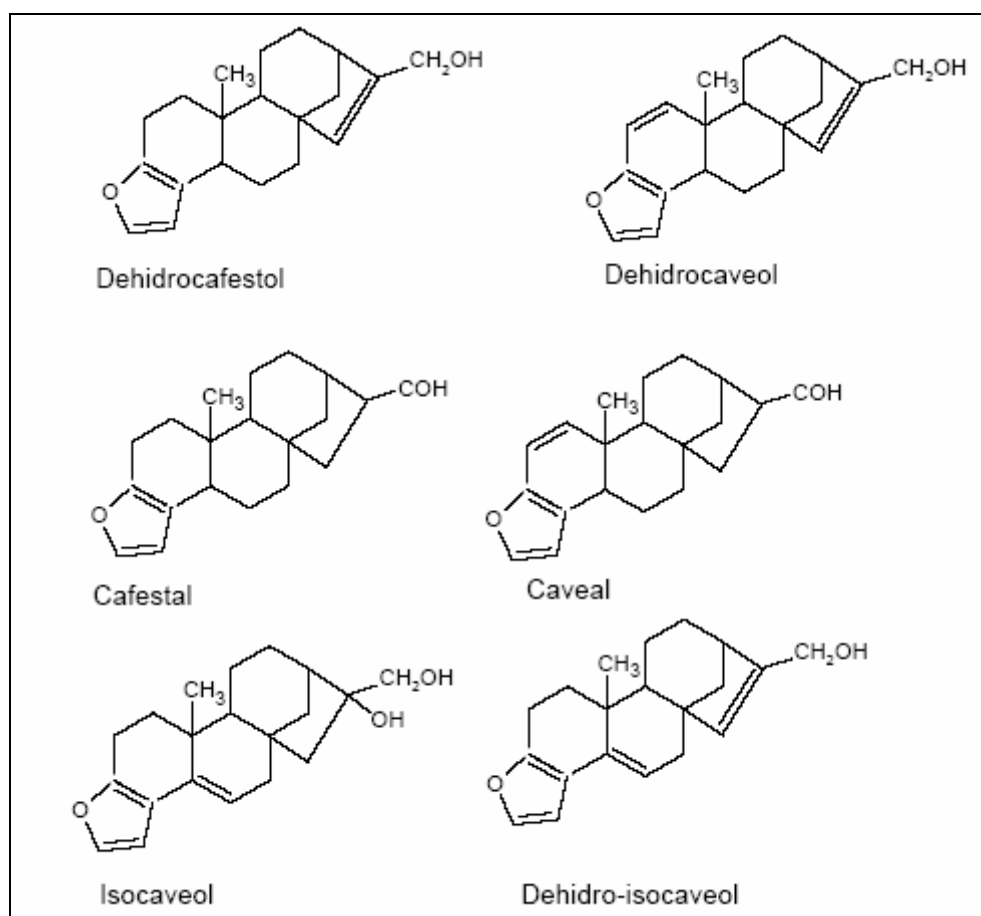


Fonte: Dias (2009).

Uma pequena parte dos diterpenos está presente, no café, na forma livre ou como monoésteres de ácidos graxos, enquanto que a maior ocorrência é na forma esterificada. Podem existir no grão de café até 14 diferentes ésteres de ácidos graxos derivados do cafestol, 12 derivados do caveol e 12 do 16-O metilcafestol. O cafestol e o caveol podem sofrer desidratação durante o processo de torra, formando pequenas quantidades de dehidrocafestol e dehidrocaveol (Figura 3). (KURZROCK, SPEER, 2001; LAGO, 2001; SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006).

Foram também detectados isômeros de função para os produtos de degradação denominados cafestal, caveal, isocaveol e dehidroisocaveol (Figura 3). No entanto, esses compostos estariam presentes em quantidades muito baixas em café torrado. (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006).

**Figura 3** - Estruturas de compostos de degradação para caveol e cafestol em café torrado.



Fonte: Speer e Kölling-Speer (2006).

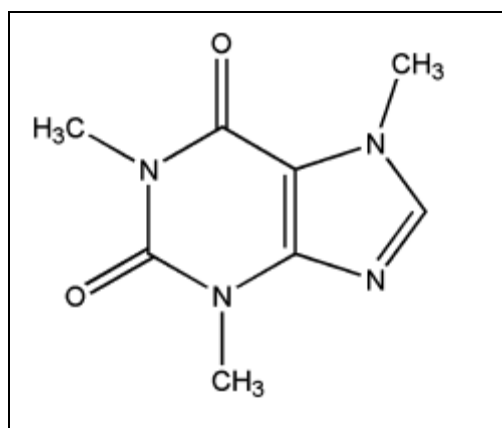
Kurzrock e Speer (2001) destacaram em seus trabalhos a importância da caracterização dos diterpenos em café por estes compostos mostrarem-se possíveis causadores do aumento do nível de colesterol humano após ingestão da bebida, e, por outro lado, induzir a degradação de substâncias tóxicas e proporcionar ação protetora contra aflatoxina.

### 2.5.2 Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um alcalóide presente em um número não muito grande de espécies, totalizando um pouco mais de sessenta. É um dos componentes mais estudados no café devido as suas propriedades estimulantes, sensoriais e também por atuar como um pesticida. (GLADE, 2010; SOUZA et al., 2010; MAZZAFERA; YAMAOKA-YANO; VITORIA, 1996). A estrutura

química da cafeína é apresentada na Figura 4. Caracteriza-se como o composto da fração hidrossolúvel do grão menos afetado pela degradação. Observa-se que apresenta estabilidade a torra mesmo com o emprego de altas temperaturas (200 - 230 °C). (MOREIRA; TRUGO; DE MARIA, 2000).

**Figura 4** - Estrutura química da cafeína do café.



Fonte: Higdon e Frei (2006).

A cafeína é o principal alcalóide presente no café em uma quantidade de 1 a 4% em peso seco, com variação entre as espécies e cultivares, e é conhecida pelas propriedades estimulantes sobre o sistema nervoso central. O interesse pela cafeína é variável. Ela tem um efeito neuroprotetor com a redução do risco de desenvolvimento da doença de Parkinson e está associada a melhoras no estado de alerta, na capacidade de aprendizado e na realização de atividades físicas. (ESQUIVEL; JIMENÉZ, 2011; GLADE, 2010; HIGDON; FREI, 2006).

Em contrapartida, ela pode afetar negativamente o controle motor e a qualidade do sono, causar irritabilidade e quadros de depressão. Seu consumo regular pode elevar a pressão arterial de forma persistente e, desta forma, indivíduos com hipertensão arterial, doença coronariana e arritmia cardíaca deveriam ser encorajados a reduzir níveis de ingestão de cafeína. (DE MARIA; MOREIRA, 2007; HIGDON; FREI, 2006; MACHADO, 2010).

Higdon e Frei (2006) recomendaram mais estudos sobre o efeito do consumo de cafeína em pessoas com hipertensão arterial, crianças, adolescentes e idosos, por serem mais vulneráveis aos efeitos adversos da cafeína e sugeriram que gestantes limitem a ingestão da bebida café, em até 300 mg/dia, um consumo moderado, para evitar aborto ou prejudicar o crescimento fetal.

Devido a esses efeitos negativos, a procura pelo café descafeinado tem aumentado consideravelmente, sendo até recomendado por médicos em determinadas situações. (TEIXEIRA, 2011). O processo de descafeinação é realizado nos grãos crus inteiros, antes do processo de torrefação, com o uso de solventes químicos para a extração da cafeína. Esse procedimento leva à perda de outros componentes, depreciando a qualidade de bebida do café.

Silvarolla, Mazzafera e Fazuoli (2004) encontraram entre 300 acessos de *C. arabica* da Etiópia, três plantas com baixos teores de cafeína, cujos teores foram da ordem de 0,07% (m/m), sendo quase totalmente livres de cafeína. Esses acessos ainda precisam ser investigados sobre a produtividade e a qualidade da bebida; no entanto, como o *C. arabica* tem uma diversidade genética estreita e variedades antigas possuem produtos de alta qualidade, é provável que estes acessos também produzam boa bebida. Desse modo, a identificação de plantas com boa produção de grãos e baixos teores de cafeína aceleraria muito os programas de melhoramento do cafeeiro, pois permitiria obter cafés descafeinados com boa qualidade de bebida. (ABRAHÃO et al., 2008; TEIXEIRA, 2011).

### 2.5.3 Quantificação dos Componentes

A determinação de lipídios em alimentos é feita usualmente pela extração com solventes orgânicos, onde ocorre a transferência de constituintes solúveis (óleo) de um material inerte (matriz graxa) para o solvente com o qual a matriz está em contato. Na extração espera-se que ocorra um processo meramente físico, pois o óleo transferido para o solvente é recuperado sem nenhuma reação química (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D'ARCE, 2009).

O método clássico e oficial para determinação de lipídios da Association of Analytical Communities (1990) utiliza aparelho tipo Soxhlet, onde ocorre passagem de um solvente pela amostra (extração contínua), por refluxo aquecido, seguida da remoção por evaporação ou destilação do solvente. No entanto, o refluxo do solvente aquecido por muitas horas favorece as reações de peroxidação e hidrólise, o que poderia comprometer resultados analíticos posteriores. (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D'ARCE, 2009; DIAS, 2009).

Para a análise dos diterpenos do café, são relatados tanto trabalhos com saponificação direta quanto a realização da extração dos lipídios para posterior

saponificação, sendo descritos procedimentos a frio (Saponificação Direta a Frio, SDF) e a quente (Saponificação Direta a Quente, SDQ). (ROOS et al., 1997; URGERT et al., 1995).

Metodologias foram desenvolvidas, para quantificação de compostos do café, como o método espectrofotométrico, onde para quantificação de diterpenos em cafés, foi padronizada a extração do caveol e condições das reações colorimétricas. Foram realizadas extrações a quente, utilizando terc-butil metil éter, já que os diterpenos são relativamente polares, e posterior limpeza com água. (ALVES, 2004).

Diferentes metodologias têm sido desenvolvidas para a quantificação de caveol e cafestol em café, com objetivos diversos, como o estudo da produção desses compostos na planta, diferenciação de espécies em produto torrado e efeitos do consumo da bebida. Entre as principais metodologias estão as técnicas cromatográficas como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou do inglês, *High Performance Liquid Chromatography – HPLC*). (ARAÚJO; SANDI, 2006; DIAS et al., 2010; FARAH et al., 2006; KITZBERGER et al., 2010).

A CLAE é uma técnica de separação de compostos e baseia-se nas diferentes interações de substâncias entre uma fase estacionária e uma fase móvel. Esta técnica vem se destacando na química analítica pela capacidade de realizar análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos. (RIBANI et al., 2004). A amostra é conduzida pela fase estacionária por um eluente (fase móvel), que está em estado líquido. Após eluição e separação das espécies de interesse, ocorre a detecção, registro dos picos, identificação e quantificação. Dias (2009) desenvolveu e validou uma metodologia por CLAE de fase reversa aplicada às amostras de café para identificação e quantificação de caveol e cafestol, avaliando-se a eficiência dos diterpenos para a discriminação de espécies.

Para a determinação de cafeína, vários métodos têm sido desenvolvidos. A maioria dos processos de extração utiliza solventes, como diclorometano, clorofórmio, metanol, acetona, água e outros. (TEIXEIRA, 2011). Para extração de cafeína dos grãos de café, geralmente, utiliza-se o método clássico da AOAC, o qual emprega o uso de ácido sulfúrico e óxido de magnésio, e clorofórmio como solvente orgânico. (MORAIS et al., 2007).

Para quantificação, vêm sendo utilizado vários métodos, incluindo a eletroforese capilar; a espectrofotometria, que se baseia na absorção de radiação eletromagnética na região do ultravioleta (UV), onde a cafeína apresenta um limite máximo de absorção no UV entre os comprimentos de onda de 271 e 275 nm; e a cromatografia, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). (ALVES et al., 2006; AQUINO et al., 2004; CAMARGO; TOLEDO, 1998; CASAL, et al., 2000; SILVAROLLA; MAZZAFERA; LIMA, 2000).

No entanto, esses métodos mencionados anteriormente são demorados. Algumas outras abordagens também têm sido descritas para estimar o teor de componentes químicos, como a Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIRS), que é uma técnica rápida, precisa e não destrutiva que pode ser empregada como um substituto do método químico para análise de propriedades químicas e físicas em composições complexas, como produtos agrícolas, hortícolas e alimentos. (BERTRAND et al., 2006; CHEN et al., 2006; PIZARRO et al., 2007). A metodologia consiste na medição da intensidade da absorção/reflexão de luz infravermelha próxima (em uma faixa de 800 a 2.500 nm), em relação ao comprimento de onda incidida na amostra. (SINIJA; MISHRA, 2009; TEIXEIRA, 2011).

Esse método tem sido utilizado para análise de alimentos desde 1938, baseando-se em espectros que são medidos pela técnica de reflexão e absorção. (HUCK; GUGGENBICHLER; BONN, 2005; ITO et al., 2008). A NIRS provou ser uma poderosa ferramenta analítica para analisar quantitativamente o conteúdo de cafeína no café. (CHEN et al., 2006).

## 2.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS)

O Infravermelho Próximo (NIR, do inglês, *Near Infrared*) é a denominação dada à região do espectro eletromagnético logo após a região visível, abrangendo a radiação com comprimento de onda de 780 a 2.500 nm (números de onda de 13.300 a 4.000  $\text{cm}^{-1}$ ). (PASQUINI, 2003). Quando a radiação no infravermelho próximo incide em uma molécula, faz seus átomos vibrarem com maior amplitude. Os espectros NIR contêm informações relacionadas com a diferença entre as forças de ligações químicas, espécies químicas presentes e eletronegatividade, onde somente vibrações que resultam uma mudança no

momento de dipolo da molécula podem absorver radiação no NIR. (ARAUJO, 2007; DE BEER et al., 2011).

Os sinais observados para a região do NIR são devidos principalmente a sobretons (do inglês, *overtones*) e bandas fundamentais de ligações O-H, N-H, C-H e S-H, e bandas de ligações como C=O, C-C e C-Cl que são muito mais fracas ou até mesmo ausentes. (BLANCO, VILLARROYA, 2002).

Os sobretons são transições entre estados vibracionais não consecutivas, apresentando intensidades mais fracas do que a transição entre o estado fundamental e o primeiro estado excitado da molécula. Bandas de combinação surgem quando uma molécula poliatômica possui dois ou mais modos vibracionais que podem interagir entre si. Em consequência disso, a banda de combinação resultante é dada pela soma de cada uma das frequências dos módulos vibracionais envolvidos na interação. (PANERO, 2007).

As vibrações são divididas em duas categorias, a primeira é a vibração de estiramento, que envolve uma variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos, podendo acontecer de forma simétrica ou assimétrica. (MILAGRES, 2009). A segunda é a vibração de deformação angular, que é caracterizada pela variação do ângulo entre duas ligações, podendo acontecer no plano ou fora do plano da molécula. Em moléculas poliatômicas (constituídas por mais de dois átomos), os elétrons sofrem influência de átomos ou grupos vizinhos e isso afeta o estiramento, o comprimento da ligação, o ângulo da ligação e conseqüentemente a frequência de vibração das ligações químicas, proporcionando espectro característico para cada substância. (MILAGRES, 2009; PANERO, 2007).

A Tabela 1 ilustra as principais regiões espectrais do NIR e a natureza da transição vibracional associada a elas.

**Tabela 1** - Atribuição das regiões espectrais às possíveis transições vibracionais.

Região espectral (nm)	Natureza da transição vibracional
2200 – 2450	Combinação de estiramento C-H
2000 – 2200	Combinação de estiramento N-H, O-H
1650 – 1800	Primeiro sobretom do estiramento C-H
1400 – 1500	Primeiro sobretom de combinações N-H, O-H
1100 – 1225	Primeiro sobretom do estiramento C-H
950 – 1100	Segundo sobretom de combinações N-H, O-H
850 – 950	Terceiro sobretom do estiramento C-H
775 – 850	Terceiro sobretom de combinações N-H, O-H

**Fonte:** Milagres (2009).

Em aplicações da Espectroscopia são usualmente utilizados dois princípios, descritos como absorção e reflexão, e de acordo com a maioria dos autores, três métodos de reflexão (reflexão especular, reflexão difusa e reflexão interna) têm apresentado aplicações práticas na aquisição de espectros que contenham informações químicas de uma matriz. (WILSON; TAPP, 1999).

Pode-se observar a reflexão difusa quando uma luz incide em uma matriz descontínua, penetra na amostra (amostra em pó, papel) e reflete contendo informações espectrais. O caminho percorrido pela luz no interior da matriz pode ser considerado aleatório devido a múltiplas reflexões, algumas das quais após percorrer o interior de algumas partículas da amostra. Desta forma, a luz refletida pode ser atenuada por absorção. (FERRÃO et al., 2004). A radiação que retorna de forma difusa da amostra geralmente apresenta menor intensidade que a radiação incidente, e em função disso, a maior parte dos acessórios de reflexão difusa apresentam esquemas óticos para concentrar a radiação, para posteriormente a mesma ser focada sobre o sistema de detecção dos instrumentos.

### 2.6.1 NIRS e Aplicações

O primeiro relato desta técnica foi descrito no início do século 20, porém apenas durante a década de 60 ocorreu uma aplicação realmente prática, com o grupo de pesquisadores de Karl Norris. Esta pesquisa foi a primeira a realizar uma determinação quantitativa, utilizando simultaneamente medidas em mais de um

comprimento de onda (análise multivariada), contrapondo a utilização clássica de apenas um comprimento de onda através da Lei de Lambert e Beer. (PASQUINI, 2003).

Após os trabalhos de Karl Norris, a espectroscopia no NIR foi fortemente impulsionada nas décadas de 80 e 90 pelo avanço da instrumentação relacionada à técnica e desenvolvimento dos microcomputadores, participando do nascimento da Quimiometria, área voltada para análise multivariada. (CARNEIRO, 2008).

Em café, a NIRS tem sido empregada, em combinação com a análise multivariada, na discriminação entre as espécies arábica e conilon, verificação de amostras puras e misturas de café, na definição do grau de torrefação dos grãos, para avaliar propriedades sensoriais do café espresso, e para quantificar características químicas, por exemplo, teobromina, ácido clorogênico, trigonelina, lipídios, açúcar e cafeína total, em base nos modelos de calibração. (CHAILLOU, 2007, et al.).

Atualmente, a espectroscopia no NIR tem sido frequentemente aplicada como um método analítico que fornece resultados eficientes para determinação de moléculas orgânicas e variáveis qualitativas. Esta técnica está presente em praticamente todas as áreas, devido ao nível de desenvolvimento que esta tecnologia atingiu nos últimos anos. Os setores de utilização da técnica incluem áreas como agrícola, médica, têxtil, cosméticos, polímeros, tintas, ambiental, petroquímica, farmacêutica e florestal. (BLANCO, VILLARROYA, 2002; HEIN et al., 2012; PASQUINI, 2003).

Uma desvantagem da espectroscopia no NIR é a sensibilidade relativamente baixa que restringe sua aplicação a análises de constituintes em concentrações superiores a 0,1%. Além disso, como determinações quantitativas somente são possíveis através de prévia correlação entre os valores do parâmetro de interesse para um determinado grupo de amostras e os espectros obtidos, a técnica é dependente de metodologias analíticas bem estabelecidas para a determinação desse parâmetro durante a etapa de calibração. (ARAUJO, 2007; MORGANO et al., 2007).

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), como qualquer outro método de regressão, vem sendo usada para estabelecer uma relação

matemática (modelo de calibração) entre os valores químicos de referência e os dados espectrais para um determinado parâmetro medido (MORGANO et al., 2007).

Por outro lado, a espectroscopia no NIR apresenta uma série de vantagens como, por exemplo: determinações diretas (sem pré-tratamento) na amostra; obtenção rápida de resultados, aparelhos com módulos portáteis podem ser transportados a longas distâncias, visando seu uso em operações de fiscalização, de verificação da autenticidade de amostras existentes nas mais diversas formas; pastas, líquidas e sólidas, cujas espécies de interesse estejam presentes nos mais diversos teores; quantificação de forma segura, rápida, com simplicidade e confiabilidade metrológica e realiza análises não-destrutivas; análises “*on-line*” ou em tempo real. (CONESA et al., 2007; PASQUINI, 2003).

### 2.6.2 Quimiometria

A interpretação dos resultados deve refletir a estrutura dos dados contidos nos diversos espectros obtidos e torna-se mais consistente quando observada através da aplicação de métodos de quimiometria. A quimiometria pode ser definida como a pesquisa e utilização de métodos matemáticos e estatísticos para o tratamento de dados químicos de forma a extrair uma maior quantidade de informações e melhores resultados analíticos. (FERREIRA et al., 1999; PASQUINI, 2003).

A aplicação de métodos quimiométricos tem se difundido nas mais diversas áreas da química e ciências afins. Os desenvolvimentos de novos instrumentais aplicados aos laboratórios de pesquisas passaram a fornecer uma grande quantidade de informações, o que criou a necessidade do desenvolvimento de uma ferramenta estatística sofisticada que pudesse ser aplicada a análise desses dados. (CARNEIRO, 2008).

Para que o tratamento quimiométrico possa ser aplicado, é necessário que os dados do sistema analisado estejam organizados em matrizes. Os espectros individuais das amostras são dispostos em uma matriz X, na qual as linhas correspondem às amostras e as colunas são valores de medidas de intensidade em cada número de onda, denominadas de variáveis independentes. Os valores dos parâmetros de interesse a serem estimados são dispostos em uma matriz Y, cujas variáveis são denominadas dependentes. (FERREIRA et al., 1999).

Outra etapa prévia importante no tratamento de dados é a etapa do pré-tratamento. Muitas vezes os dados são expressos em grandezas diferentes, ou apresentam muitos ruídos, e dependendo do tipo de informação que se deseja extrair, isto poderá ou não comprometer a análise. Este fato pode ocasionar dificuldade na análise dos dados, interferindo na extração de informações relevantes, bem como na sua interpretação. (FERREIRA et al., 1999).

Os problemas mais típicos, durante as etapas de aquisição e manipulação dos dados que levam ao aparecimento de amostras anômalas, são o espalhamento de luz na amostra, instabilidade do analito, erro nos dados de referência e problemas nos dados instrumentais. Deste modo, há a necessidade de tratar os dados a serem analisados por meio dos pré-tratamentos, os quais muitas vezes resolvem este tipo de problema, como normalização, correção da linha de base, cálculo da derivada, escalonamento, entre outros. (PASQUINI, 2003).

### 2.6.3 Calibração - Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

O processo geral de calibração consiste em duas etapas: a modelagem, que estabelece uma relação matemática entre as matrizes X e Y no conjunto de calibração, citadas anteriormente, e a validação, que busca o melhor ajuste, no sentido de uma melhor descrição dos analitos de interesse. (FERREIRA et al., 1999).

Entre os diversos modelos para calibração, o modelo PLS inclui todas as variáveis relevantes realizando a calibração eficientemente mesmo na presença de interferentes. É baseado no método da Análise de Componentes Principais, que consiste na manipulação da matriz de dados com objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis, através de um número menor de “fatores”, “variáveis latentes” ou “termos” para representar as amostras, no qual a natureza dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões. (FERREIRA et al., 1999; PASQUINI, 2003).

A regressão através do método PLS pode solucionar problemas de colinearidade, com satisfatória habilidade de previsão. Por este motivo esta técnica é adequadamente aplicada em dados espectrais. As informações das variáveis são comprimidas, tornando-se mais robustas e como consequência, os modelos são

mais fáceis de serem interpretados e os ruídos espectrais podem ser mantidos fora do modelo, na forma de resíduos. (CARNEIRO, 2008).

A regressão baseada em PLS segue as etapas de calibração (na qual são utilizados os espectros de absorção das amostras do conjunto de calibração para a construção de um modelo matemático que melhor ajuste os dados espectrais aos valores de referência do parâmetro desejado); a validação interna (que avalia o erro de previsão de amostras que pertencem ao conjunto de calibração, também conhecida como validação cruzada); e validação externa (na qual se avalia o poder de previsão do modelo construído utilizando amostras externas ao conjunto ou que não participaram da etapa de calibração). Esse último conjunto de amostras é conhecido também como conjunto de validação. (CARNEIRO, 2008).

A etapa de validação é extremamente importante, pois os resultados dessa etapa indicarão se o modelo construído é adequado ou não para efetuar a determinação do parâmetro desejado.

#### 2.6.4 Validação do Modelo de Calibração

A validação do modelo é indispensável após a calibração de um parâmetro qualquer de um dado material analisado por espectroscopia. As amostras de validação devem apresentar valores que compreendam o intervalo de dados de calibração e apresentem desempenho muito semelhante em todos os parâmetros estatísticos de avaliação dos modelos de calibração. A validação do modelo pode ser realizada por dois métodos, a validação cruzada e a validação externa. (MILAGRES, 2009).

A validação cruzada é uma metodologia utilizada para a escolha do número de variáveis latentes ou termos, que serão empregadas na modelagem, baseada na avaliação da magnitude dos erros de previsão de um dado modelo de calibração. Uma ou mais amostras são removidas das amostras do modelo de calibração e utilizadas como um conjunto de predição. (FERREIRA et al., 1999). As amostras de predição retornam ao conjunto de calibração e novas amostras são removidas como amostras de predição. Esse processo é repetido até que todas as amostras do conjunto de calibração tenham passado pelo conjunto de predição. (PASQUINI, 2003).

Na validação externa, um número de amostras é extraído aleatoriamente do conjunto de calibração, e formará o conjunto de validação, para se verificar a eficácia da predição dos constituintes. Com o restante das amostras faz-se a calibração e obtêm-se as equações de regressão (modelos) para predizer as amostras de validação. A calibração é, então, usada para estimar o valor dos parâmetros das amostras de validação a partir dos seus espectros. Dessa forma é possível comparar os valores estimados com os valores determinados em laboratório.

Sugere-se que a validação cruzada seja usada apenas quando o número de amostras for limitado ou em casos que o custo das análises de laboratório é elevado. Recomenda-se utilizar a validação externa sempre que possível, pois os modelos obtidos usualmente fornecem melhores resultados.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Análise de diterpenos e cafeína da coleção da Etiópia de *Coffea arabica* no intuito de realizar uma avaliação fenotípica visando explorar uma maior diversidade genética desta espécie.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificação de cafeol e cafestol da coleção da Etiópia de *Coffea arabica* do IAPAR por CLAE.
- Quantificação de cafeína da coleção da Etiópia de *Coffea arabica* do IAPAR por espectrofotometria UV/VIS.
- Calibração e validação das análises de cafeína e de diterpenos por Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIRS).
- Avaliação da correlação entre os compostos utilizando a correlação de Pearson e Análise de Agrupamento Hierárquico.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Amostras de Café

Foram coletadas amostras de 125 acessos de café de uma coleção de *C. arabica*, proveniente do centro de origem, chamada de coleção da Etiópia. Os cafés foram cultivados na Estação Experimental de Londrina – PR. Também foram coletadas 4 amostras de cafés comerciais, utilizadas como cultivares de referência Catuaí Vermelho, Mundo Novo, Typica e Bourbon. Todos os cafés foram coletados da safra de 2011 e cultivados nas mesmas condições.

Os cafés foram coletados, secos naturalmente e, para as análises físico-químicas, os grãos de café verde foram congelados com nitrogênio líquido (-196°C), moídos em moinho de disco PERTEN 3600, passados em peneiras com malha 0,5 mm.

Os materiais obtidos após a moagem foram armazenados em freezer a -20 °C até o momento de extração dos diterpenos e cafeína, e na coleta dos espectros para a construção do modelo de predição, utilizando equipamento de espectroscopia no infravermelho próximo.

### 4.2 MÉTODOS

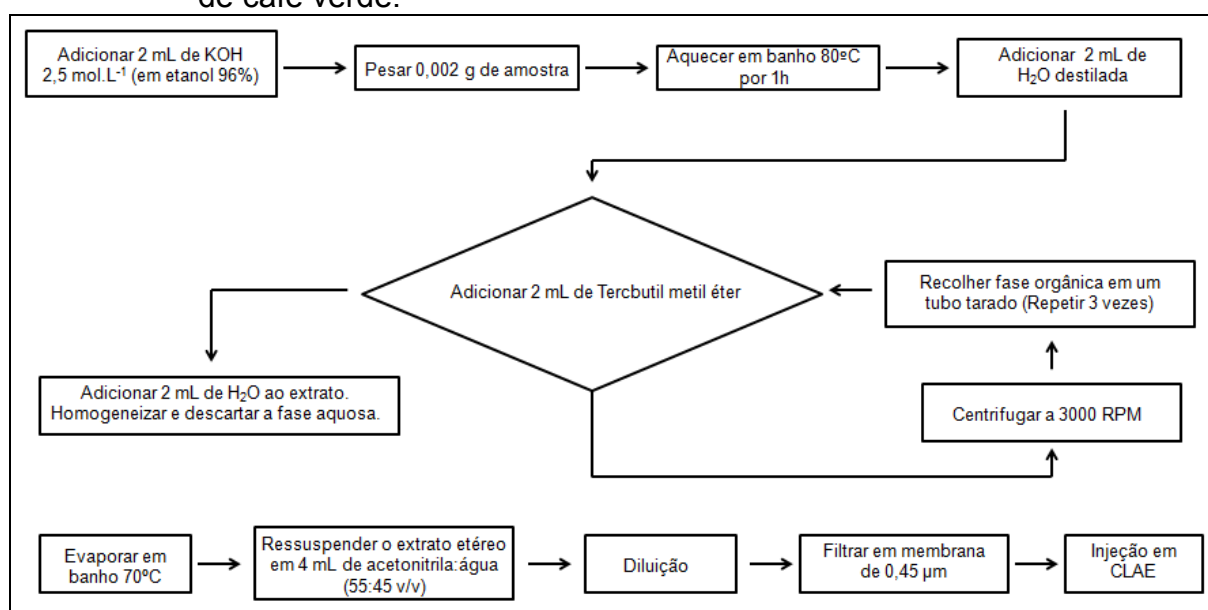
#### 4.2.1 Métodos de Referências

##### 4.2.1.1 Determinação de cafestol e caveol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A extração dos diterpenos, cafestol e caveol, foi feita conforme descrito por Dias et al. (2010), em duplicata, utilizando-se 0,2000 g de café por saponificação a 80°C durante 1 h com 2,0 mL de hidróxido de potássio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) 2,5 mol.L<sup>-1</sup> em etanol 96%. Adicionou-se 2,0 mL de água e 2,0 mL de terc-butil-metil éter (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) seguido de centrifugação a 3000 rpm para retirada da fase orgânica. Este procedimento foi repetido três vezes

e, em seguida, a limpeza do extrato foi feita com 2 mL de água destilada, com a fase aquosa sendo descartada. O extrato etéreo foi evaporado em banho-maria até seca (70°C) e ressuspendido em 4 mL na fase móvel (acetonitrila-água, 55:45, v/v – grau HPLC, J. T. Baker, Xalostoc, México), seguido de filtração em membrana de nylon 0,45 µm e injeção no cromatógrafo conforme a Figura 5.

**Figura 5** - Metodologia utilizada para as extrações de cafestol e caveol em grão de café verde.



Fonte: Dias et al. (2010).

A quantificação simultânea de cafestol e caveol foi realizada de acordo com a metodologia de CLAE com fase reversa também desenvolvido por Dias et al. (2010). As análises cromatográficas foram realizadas em um Cromatógrafo à Líquido de Alta Eficiência Surveyor Plus (Thermo Scientific, San Jose, USA) que consiste em bomba com gerenciador para gradiente (Surveyor LC PLUS), um amostrador automático com controle de temperatura Peltier para rack de amostras e forno de colunas integrado (Surveyor PLUS), detector com arranjo de diodos (Surveyor PDA PLUS), cela Lightpipe de 10 µL e caminho óptico de 50 mm, sistema de dados para cromatografia ChromQuest 5.0 e interface SS420.

Utilizando-se coluna de fase reversa Spherisorb ODS 1 (250 mm x 4.6 mm i.d. 5 µm, Waters), fase móvel com eluição isocrática de acetonitrila/água (55:45, v/v) na vazão de 0,9 mL.min<sup>-1</sup> e a detecção foi feita a 220 e 290 nm, para

cafestol e caveol, respectivamente, com temperatura do forno de 25°C, e tempo de corrida de 20 minutos.

A quantificação foi realizada por padronização externa, construindo-se curvas de calibração para os compostos a serem estudados, com 6 diferentes concentrações de padrões (em triplicata), nas faixas de concentração mais adequadas de caveol e cafestol (50 a 1000 mg/100 g de café).

#### 4.2.1.2 Determinação de cafeína por espectrofotometria UV/VIS

Para a extração de cafeína foi utilizado o método descrito em Instituto Adolfo Lutz (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008) com modificações, onde 0,2 g de amostra de café moído foram acrescidas de 30 mL de água em ebulição, 0,2 g de óxido de magnésio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e permaneceu em banho-maria (80-90°C) por 30 minutos. Essa mistura foi transferida, após completamente fria, para um balão volumétrico de 50 mL, tendo seu volume completado com água e filtrada em papel filtro Whatman 1 (3 µm).

Acrescentou-se 0,2 mL de ácido sulfúrico 10% (v/v) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e 4 mL de clorofórmio (Quimex, São Paulo, Brasil) em 2 mL do filtrado. Após agitação, em placa agitadora, por 10 minutos, 2 mL da fase clorofórmica foi separada e evaporada em banho-maria. Quando completamente seco, dissolveu-se o resíduo em 10 mL de água a 90-94°C e fez-se a leitura de absorvância em 272 nm após completo resfriamento. As análises foram realizadas em duplicata.

Para a obtenção da concentração de cafeína, construiu-se uma curva padrão com nove pontos e duas repetições, com concentração de cafeína variando de 10 µg.mL<sup>-1</sup> a 90 µg.mL<sup>-1</sup>.

#### 4.2.1.3 Umidade

Os dados obtidos foram expressos em base seca a partir da determinação da umidade dos acessos de café em estufa aquecida a 105 °C durante 3 horas (INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION, 2003).

## 4.2.2 Espectroscopia no Infravermelho Próximo

### 4.2.2.1 Organização das amostras

Para a construção dos modelos de predição foram utilizados os valores médios da concentração de cafeína, cafestol e caveol obtidos pelos métodos de referência.

Para a calibração de cafeína e diterpenos foram utilizadas 130 e 128 amostras de café, respectivamente. Na validação externa do modelo, as amostras foram divididas em dois grupos, calibração e validação. Para cafeína usaram-se 100 amostras selecionadas aleatoriamente para construção da curva de calibração e 30 amostras para a validação desta curva. Para a validação do caveol e cafestol utilizaram-se 98 amostras para a construção da curva de calibração e 30 amostras para a validação.

### 4.2.2.2 Coleta dos espectros

Os espectros no infravermelho próximo foram coletados em um espectrofotômetro NIRSystem 6500, com reflectância difusa e região espectral de 400 a 2500 nm. Foram realizadas varreduras entre 1108 e 2492 nm em intervalos de 2 nm, utilizando-se uma cubeta retangular contendo 6 g de café moídos e em temperatura ambiente. O software utilizado foi WinISI 4.5, pertencentes ao equipamento onde se emprega o método de regressão por mínimos quadrados parciais modificado (mPLS).

### 4.2.2.3 Pré tratamento dos espectros

Os ruídos ou alguma outra interferência nos espectros causados pelo espalhamento de luz foram corrigidos matematicamente, aplicando-se a transformação Padrão Normal de Variação (SNV) e Detrend, permitindo o aumento das suas resoluções. Aplicou-se também a segunda derivada para eliminar desvios lineares de linha de base e problemas de sobreposição, no entanto este pré-tratamento traz o inconveniente de diminuir a relação sinal/ruído, a qual é compensada pelo uso do alisamento Savitzky-Golay. (MAZUR, 2012).

#### 4.2.2.4 Análise de componentes principais

Antecedendo a calibração, foi empregada a Análise de Componentes Principais (ACP) para detectar as amostras anômalas nos espectros. A ACP é um modelo matemático usado para maximizar as informações que podem ser extraídas de um conjunto de dados e assim, reduzir o número de variáveis da matriz original dos dados envolvidos no modelamento. Este procedimento simplifica a série de dados e reduz a dimensão de dados e gerar novas variáveis que não são correlacionadas.

#### 4.2.2.5 Calibração

Os espectros obtidos foram relacionados com os dados de laboratoriais de interesse e foi desenvolvido o modelo de calibração usando o método de regressão multivariada PLS do software WinISI 4.5.

#### 4.2.2.6 Validação cruzada e validação externa da calibração

Na etapa de calibração foram incluídos os seguintes parâmetros estatísticos para avaliar a eficiência do modelo: desvio padrão da população de amostra (SD), o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), a relação de desempenho do desvio (RPD), erro padrão de calibração (SEC), erro padrão de validação cruzada (SECV) e erro padrão de predição (SEP).

A validação cruzada foi utilizada para selecionar o número ótimo de variáveis latentes ou termos, isto é, o número que resulta no menor erro para o grupo de calibração e determinação do modelo ideal. O cálculo do SECV foi automaticamente desenvolvido no software WinISI.

Além do coeficiente de determinação ( $r^2$ ), foi utilizado também RPD para indicar a eficiência de predição do modelo. O RPD é um índice usado para avaliar a robustez do modelo e valores altos indicam que o modelo tem grande poder para prever a composição química. A RPD é relação entre o SD dos valores de referência no grupo de amostras de validação e o SEP ( $SD/SEP$ ).

Na validação externa, o conjunto total de dados foi dividido em dois subconjuntos, um para calibração e outro para validação. As amostras do

subconjunto de calibração foram utilizadas para construção do modelo e este foi validado utilizando as amostras do outro subconjunto.

O SEP, que corresponde ao desvio padrão dos resíduos devido às diferenças entre valores de laboratório e valores previstos, foi estimado prevendo os valores no grupo de amostras da validação com o modelo desenvolvido no subconjunto de calibração. Na etapa de validação entre os valores de laboratoriais químicos e os valores preditos, desenvolvido pelo modelo, também foi avaliada pelo RPD<sub>p</sub>, onde  $RPD_p = SD_{val} / SEP$  ( $SD_{val}$  foi o desvio padrão das amostras de validação) e pelo coeficiente de determinação  $r^2$ .

#### 4.2.3 Análise Estatística

Empregou-se a correlação de Pearson e a Análise de Agrupamento Hierárquico (AAH) para os dados de cafeína, cafestol e caveol por meio do pacote estatístico XL Stat (ADDINSOFT, 2007).

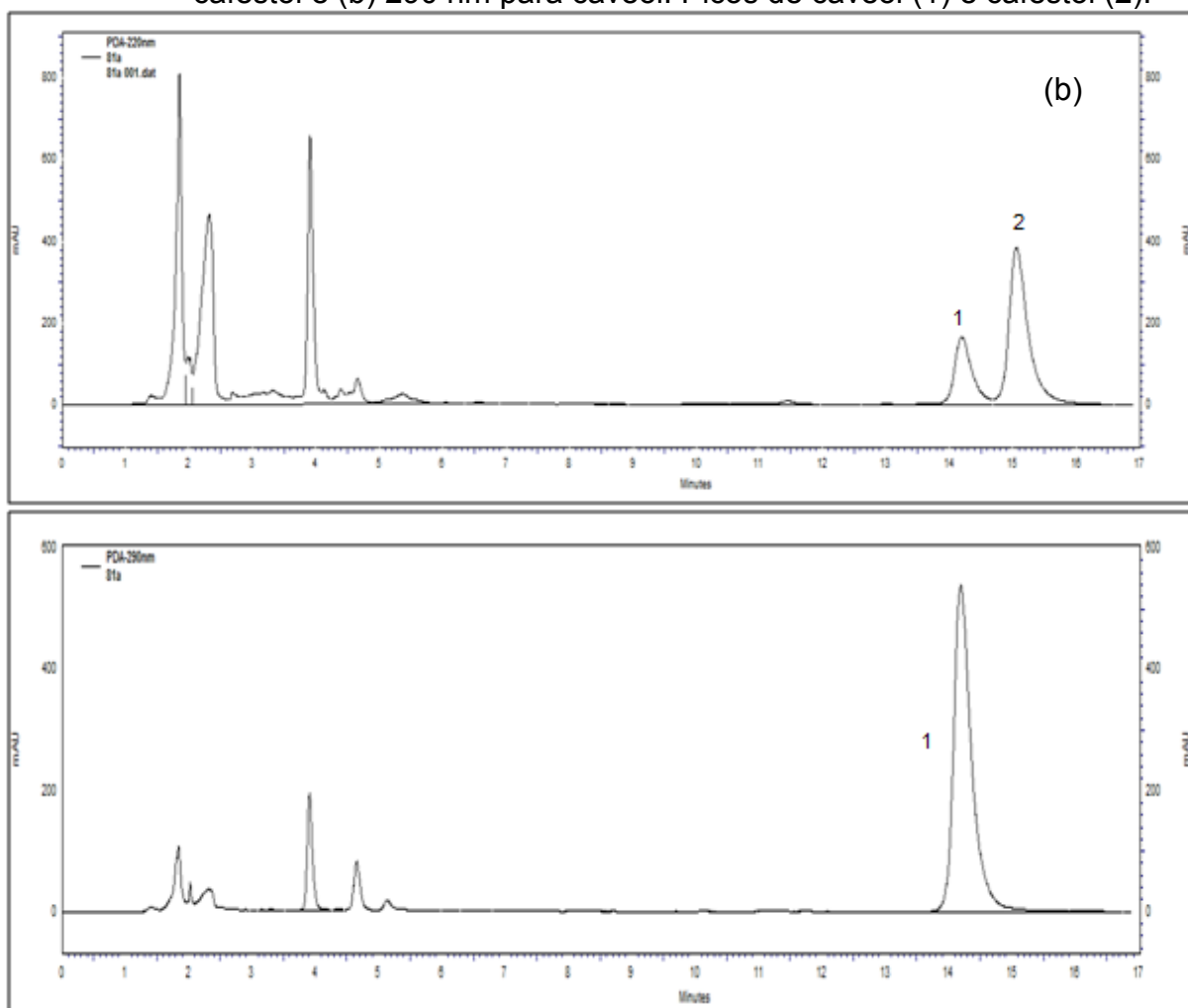
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DITERPENOS

Visando verificar o teor de diterpenos na coleção da Etiópia, foram avaliados os conteúdos dos diterpenos cafestol e caveol em 124 acessos de café da coleção e quatro cultivares comerciais por CLAE.

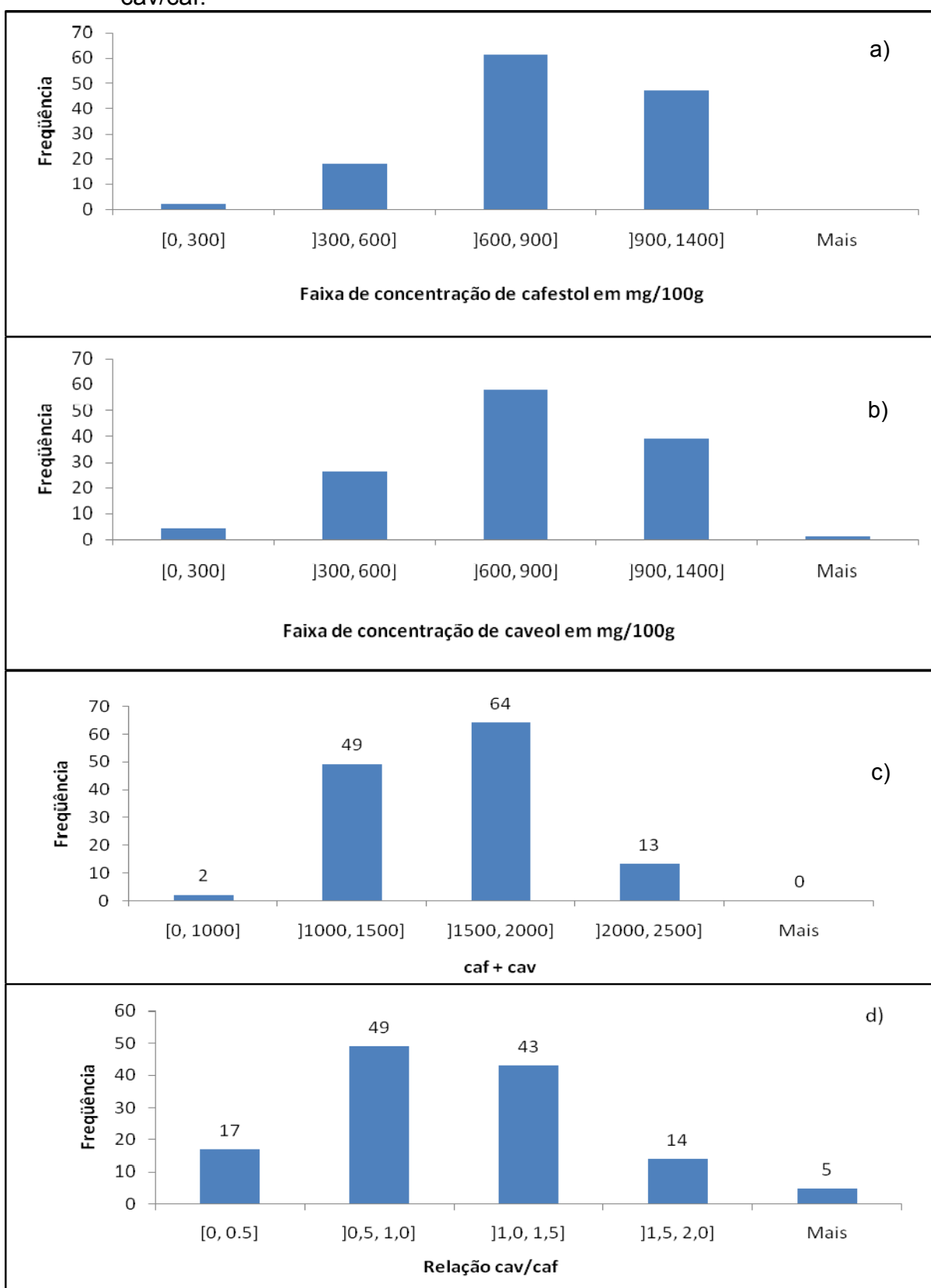
A Figura 6 apresenta cromatogramas típicos destes diterpenos obtidos por CLAE, onde a detecção de cafestol é feita a 220 nm e a de caveol a 290 nm.

**Figura 6** - Cromatograma típico de café arábica. Detecção a (a) 220 nm para cafestol e (b) 290 nm para caveol. Picos de caveol (1) e cafestol (2).



Fonte: Da autora.

**Figura 7** - Histogramas das frequências dos acessos de café com relação as faixas de concentração dos diterpenos: a) cafestol, b) caveol c) caf + cav e d) cav/caf.



\* [x,y]: intervalo fechado; ]x,y]: intervalo fechado à direita.

Fonte: Da autora.

Pode-se observar uma grande variabilidade na composição de diterpenos nos acessos de café da coleção da Etiópia, onde a concentração de cafestol variou de 267,90 a 1308,97 mg/100 g e a concentração de caveol variou de 182,70 a 1400,49 mg/ 100 g de café (Anexo 1) (Figura 7).

Em relação aos conteúdos de cafestol e caveol, observou-se que houve acessos de café que apresentaram maiores teores de caveol e menores teores de cafestol, acessos de café apresentando maiores teores de cafestol e menores de caveol, e também acessos de café com teores aproximados entre os dois diterpenos.

Roos et al. (1997) reportaram valores contrastantes no conteúdo de cafestol e caveol em cafés de diferentes espécies selvagens cultivadas na África em uma mesma região. As espécies *Coffea stenophylla*, *C. congensis*, *C. salvatrix*, *C. sessiflora* e *C. pseudozanguebariae* apresentaram teores de cafestol mais baixos que de caveol, na faixa de 292 a 394 mg/100g para cafestol e de 700 a 1065 mg/100g para caveol. Já as espécies *C. canephora*, *C. liberica* var. *dewevrei* e *C. liberica* var. *liberica* apresentaram teores de cafestol maiores que de caveol, na faixa de 239 a 616 mg/100g e teores de caveol de 5 a 154 mg/100g. A espécie *C. racemosa* apresentou teores semelhantes para os diterpenos, de 436 e 505 mg/100g para cafestol e caveol, respectivamente.

Nos cafés arábicas brasileiros também foi observada essa variabilidade. Kitzberger (2012) e Kitzberger et al. (2013) verificaram que cafés originários de cruzamentos desenvolvidos pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), apresentaram altos teores de caveol (644 a 986 mg/100g) e baixos de cafestol (221 a 490 mg/100g). Os cafés que apresentaram este comportamento foram Iapar 59, IPR 98, 99, 100, 103 e 106. Cafés de genética apenas arábica (Bourbon e Catuaí) ou com pequena participação de *C. canephora* em seu cruzamento (Icatu) apresentaram um comportamento inverso, ou seja, com altos teores de cafestol (476 a 604 mg/100g) e menores teores de caveol (313 a 433 mg/100g). O IPR 102 foi o único cultivar que apresentou teores semelhantes de cafestol e caveol (480 e 539 mg/100g, respectivamente).

Observando a soma dos diterpenos, caveol e cafestol, (Figura 7-c) a maioria dos acessos de café se encontram na faixa de concentração de 1500-2000 mg/100g, valores estes mais altos daqueles relatados por Roos et al. (1997), onde a

faixa obtida foi de 244 a 1409 mg/100g, mas similares àqueles encontrados por Kitzberger et al. (2013), onde a faixa obtida foi de 1097-1453 mg/100g.

A relação caveol/cafestol apresentou variação de 0,14 a 3,44 (Anexo 1) (Figura 7-d). A relação caveol/cafestol foi considerada em estudos anteriores como uma ferramenta importante para a discriminação das cultivares. Em cruzamentos que tiveram a participação da introgressão de genes de resistência oriundos do *C. canephora* esta relação foi superior a 1,0 e em cafés de genética puramente arábica essa relação foi abaixo de 1,0 (KITZBERGER et al., 2013). Apesar deste trabalho se concentrar na análise de *C. arabica*, a diversidade e a origem selvagem dos mesmos podem explicar esses resultados, onde alguns dos genótipos poderiam apresentar uma maior expressão gênica do sub-genoma do ancestral *C. canephora*, (VIDAL et al., 2010) de uma forma similar ao observado nos cultivares com introgressão recente. Neste trabalho não pode ser aplicado este critério de classificação, pois os cafés estudados foram puramente arábica e apresentaram relação caveol/cafestol bastante diversificada e maiores que 1,0.

Também verificamos que a maioria dos acessos de café apresentou maiores teores de cafestol e menores teores de caveol, comportamento este verificado por Kitzberger (2012) que trabalhou com arábicas puros como Bourbon, Catuaí e Icatu que apresentaram teores de cafestol de 376, 604 e 501 mg/100g, respectivamente, e teores de caveol de 313, 371 e 433 mg/100g.

Sridevi, Giridhar e Ravishankar (2010) relatam que no gênero *Coffea*, o teor de diterpenos pode ser influenciado por fatores como genética dos cafés, condições de cultivo e origem geográfica. Por este motivo talvez haja um perfil de diterpenos diferenciados se esses acessos de café fossem cultivados em outras localidades ou em outras condições de clima e solo.

Analisando os cafés da coleção da Etiópia juntamente com outras espécies como no trabalho apresentado por Roos et al. (1997) podemos verificar uma maior relação com estas outras espécies, principalmente nos teores elevados tanto de cafestol quanto de caveol encontrados nestes acessos. IAPAR 59 originada de cruzamento entre Híbrido de Timor e Villa Sarchi (Sarchimor), foi a cultivar que apresentou os maiores teores de caveol 898 mg/100g, porém nos acessos de café da Etiópia foi freqüente a ocorrência de teores não somente de caveol como de cafestol elevados. (KITZBERGER, 2012).

Van Cruchten et al. (2010), reportaram que o cafestol está associado a elevação do colesterol em pessoas que possuem o hábito de consumir a bebida. Vários outros estudos tratam da ação benéfica dos diterpenos na saúde como efeitos contra câncer, diabetes, indução da degradação de substâncias tóxicas e proteção contra aflatoxina B1 e ação antiinflamatória, antioxidante e hepatoprotetora. (CAVIN et al., 2002; CHU et al., 2011; LEE; CHOI; JEONG, 2007; MURIEL; ARAUZ, 2010).

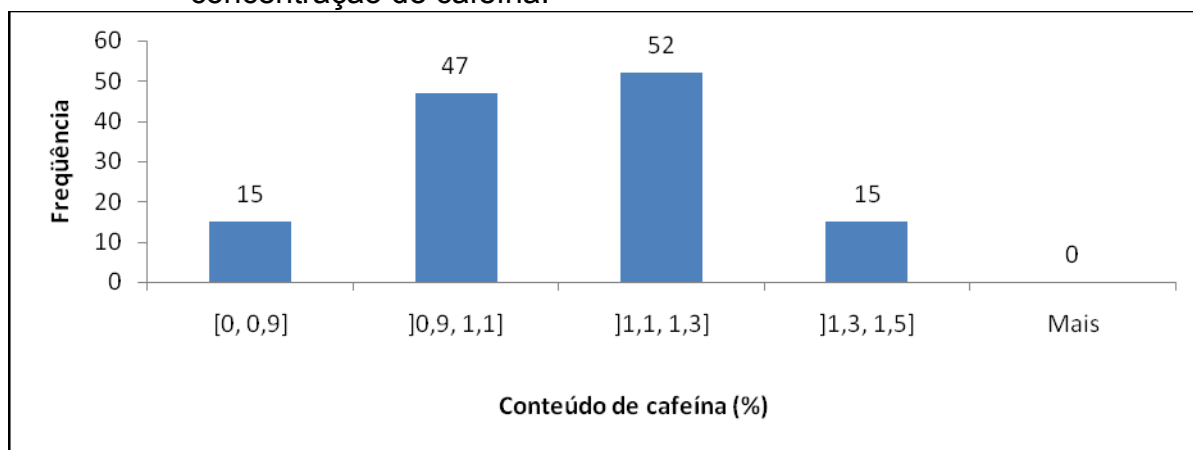
Quando analisamos estes aspectos verificamos que os cultivares que apresentaram altos teores de caveol (Anexo 1) seriam os mais indicados para o consumo como bebida. Sob o ponto de vista do melhoramento genético e da biotecnologia estes cafés podem ser interessantes para participarem de novos cruzamentos a fim de se obter cultivares com teor aumentado de caveol e reduzido de cafestol. Como por exemplo, os acessos: E017/419 que possui 378 e 1158 mg/100g de cafestol e caveol, respectivamente (3,07 de relação caveol/cafestol), E159/180 com 300 mg/100g de cafestol e 926 mg/100g de caveol (3,09 de relação caveol/cafestol). Verificamos também que cafés com altos teores de caveol também apresentaram altos teores de cafestol como, por exemplo, os acessos: E080/584 com 873 e 1400 mg/100g de cafestol e caveol, respectivamente, com relação de 1,60 e E41/079 com 854 e 1261 mg/100g de cafestol e caveol, respectivamente, e relação de 1,48. Observamos ainda que alguns acessos apresentaram valores extremamente elevados de cafestol como o acesso E552/323 com teor de 1217 mg/100g, E81/041 com teor de 1127 mg/100g, valores estes não relatados em literatura.

Analisando ainda o número de acessos de café com diferentes teores de diterpenos podemos propor uma indicação de materiais com potencial emprego em futuros cruzamentos direcionados com o intuito de se obter características diferenciadas nos teores destes compostos. Estes acessos poderiam também ser indicados para investigações sobre mapeamento de genes e identificação de marcadores moleculares.

## 5.2 CAFEÍNA

Os cafés da coleção da Etiópia também foram analisados quanto ao seu conteúdo de cafeína. O Anexo 2 apresenta esses conteúdos nos cafés estudados.

**Figura 8** - Histograma da frequência de acessos com relação às faixas de concentração de cafeína.



\* [x,y]: intervalo fechado; ]x,y]: intervalo fechado à direita.

Fonte: Da autora.

O conteúdo de cafeína dos acessos de café da coleção da Etiópia revelou uma ampla variabilidade com teor mínimo de 0,70% (m/m) e máximo de 1,48% (m/m). A maioria desses acessos (99 acessos) pertence à faixa que abrange os teores de 0,9 a 1,3% (m/m), como pode ser visualizada pela figura 8. Belay et al. (2008), avaliando quatro cafés arábica coletadas de diferentes regiões do sul da Etiópia (Gediyo yergachefe, Tepi, Benchi maji e Godere) encontraram concentrações de cafeína de 1,01 a 1,19% (m/m), comparáveis aos dados aqui apresentados.

Mazzafera e Carvalho (1992) analisaram várias espécies de café com teores de cafeína na faixa de 0,40 a 2,36% (m/m), onde o menor valor foi encontrado para *C. eugenioides* e o maior para *Coffea canephora*. Em *C. arabica*, o teor de cafeína foi encontrado na faixa de 0,62 a 1,21% (m/m), dentre as cultivares representantes desta espécie destaca-se a Mundo Novo com 1,11% (m/m) e a Catuaí Vermelho com 1,21% (m/m). Estes valores foram similares aos encontrados no presente trabalho com 1,09 e 1,18% (m/m) para Mundo Novo e Catuaí, respectivamente.

No estudo de Silvarolla, Mazzafera e Lima (2000) foram analisadas plantas de 99 acessos de café originalmente coletadas de várias regiões da Etiópia e cultivadas em Costa Rica e posteriormente transferidas para o banco de germoplasma do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Os autores relatam alta variabilidade no conteúdo de cafeína encontrando teores de 0,46 a 2,82% (m/m) em cafés da região de Kaffa e para Illubabor observaram plantas com teores de 0,42 a 2,90% (m/m). Os autores relatam a existência de variabilidade entre e dentro desses acessos, de acordo com a sua região de origem.

Podemos verificar que a faixa descrita acima para os cafés do presente estudo foram comparáveis aos valores encontrados para as regiões de Gojjam, Eritrea, Geisha, Harar and Shoa com valores mínimos de 0,62 a 1,99% (m/m) (SILVAROLLA; MAZZAFERA; LIMA, 2000).

Os menores teores de cafeína foram encontrados em 15 acessos (de 0,70 a 0,9% (m/m)) da coleção aqui estudada. Nesta faixa de concentração destacamos os acessos de café E430/056 com 0,70% (m/m), E270/044 com 0,75% (m/m) e E265/101 e E428/108 com 0,78% (m/m) que apresentaram os menores teores. Estes cafés podem ser investigados e posteriormente empregados para a obtenção de cruzamentos com teor reduzido de cafeína.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE CAFEÍNA, CAFESTOL E CAVEOL

Analisando os valores de composição em termos de cafeína, cafestol e caveol verifica-se uma tendência no comportamento destes compostos.

Através da correlação de Pearson (Tabela 2) pode-se observar que existe uma correlação positiva e significativa (0,39) entre caveol e cafeína, indicando que quando o teor de caveol aumenta o de cafeína também aumenta. Também foi possível se observar uma correlação inversa (-0,29) entre caveol e cafestol, indicando que quando o teor de caveol aumenta, o de cafestol diminui e vice-versa. Não se notou correlação significativa entre os componentes cafestol e cafeína.

**Tabela 2 -** Matriz de correlação de Pearson para as variáveis cafestol, caveol e cafeína.

Variáveis	Cafestol	Caveol	Cafeína
Cafestol	<b>1</b>	<b>-0,29</b>	-0,11
Caveol	<b>-0,29</b>	<b>1</b>	<b>0,39</b>
Cafeína	-0,11	<b>0,39</b>	<b>1</b>

Os valores em negrito são significativamente diferentes de 0 com um nível de significância  $\alpha=0,05$   
**Fonte:** Da autora.

A análise dos valores de composição em termos de cafeína, cafestol e caveol também foram avaliadas através da Análise de Agrupamento Hierárquico (AAH), apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Grupos formados pela Análise de Agrupamento Hierárquico em termos de composição de cafeína, caveol e cafestol dos acessos de café da coleção da Etiópia.

Grupos	1	2	3
Objetos	38	59	31
	Catuai verm	Bourbon	CA.Typica/pl1
	E012/226	E007/087	Mundo Novo
	E016/298	E018/494.1	E055/595
	E017/046	E021/011	E151/574
	E017/419	E030/075	E174/164
	E025/308	E061/126	E208/752
	E037/676	E115/099	E218/580+581
	E039/434	E118/213	E220/127
	E041/079	E123a/231	E220/262
	E044/122	E123b/121	E221/214
	E046/021	E124/243	E228/051
	E047/267	E126/359	E272/143
	E055/006	E130/169	E272/174
	E057/497	E139/054	E279/618
	E068/014	E148/254	E302/083
	E071/258	E152/017	E308/049
	E080/584	E199/091	E315/081
	E081/041	E201/134	E327/032+033
	E085/085	E209/031	E331/280
	E087/194	E213/211	E335/219
	E088/034	E238/022	E340/179
	E114/447	E254/284-285	E364/059
	E116/061	E265/101	E383/192
	E131/018	E267/090	E386/131
	E146/012	E268/067	E439/094
	E146/117	E270/044	E466/710
	E159/180	E270/263	E481/238
	E183/138	E283/096	E490/516
	E189/119	E287/029	E494/173
	E237/071	E298/382	E511/157
	E261/052	E301/111	SEL/105+106
	E326/124	E320/145	
	E428/108	E324/093	
	E454/107	E325/522	
	E458/097	E332/023	
	E467/045	E368/600	
	E478/408	E370/196	
	E520/004	E389/133	
		E404/135	
		E405/058	

continua...

...continuação

E408/001  
E409/114  
E419/098

E430/056  
 E450/235  
 E456/062  
 E457/073  
 E464/113  
 E486/189  
 E514/129  
 E516/069  
 E546/118  
 E552/323  
 E565/009  
 E565/009+010  
 E571/230  
 E621/139  
 M7846/064  
 GEISHA/076

---

**Fonte:** Da autora.

A AAH permitiu a formação de três grupos como verificado pela Tabela 3. O grupo 1 foi formado por acessos que contêm teores de caveol alto e cafestol baixo com média do teor de cafeína de 1,18% (m/m) e o grupo 2 por acessos que contêm teores de caveol baixo e cafestol alto, com média de cafeína de 1,05% (m/m). O grupo 3 foi formado, na maioria, por acessos com teores similares de cafestol e caveol e teores de cafeína variando de 0,85 a 1,43% (m/m).

Os exemplos dos acessos de café que representam os grupos formados pela AAH podem ser visualizados na Tabela 4.

**Tabela 4** - Acesso central e concentrações de caveol, cafestol e cafeína para cada grupo formado pela AAH.

Grupo	Acesso central	Cav (mg/100g)	Caf (mg/100g)	Cafeína (%)
1	E044/122	1100,87	769,68	1,14
2	E408/001	620,18	956,49	1,1
3	E228/051	730,62	603,07	1,0

---

**Fonte:** Da autora.

Para futuros cruzamentos empregando esses cultivares, sugere-se que os acessos que tenham maiores teores de caveol sejam preferidos àqueles que contem menores teores de cafeína. O teor de cafeína é influenciado pela adubação

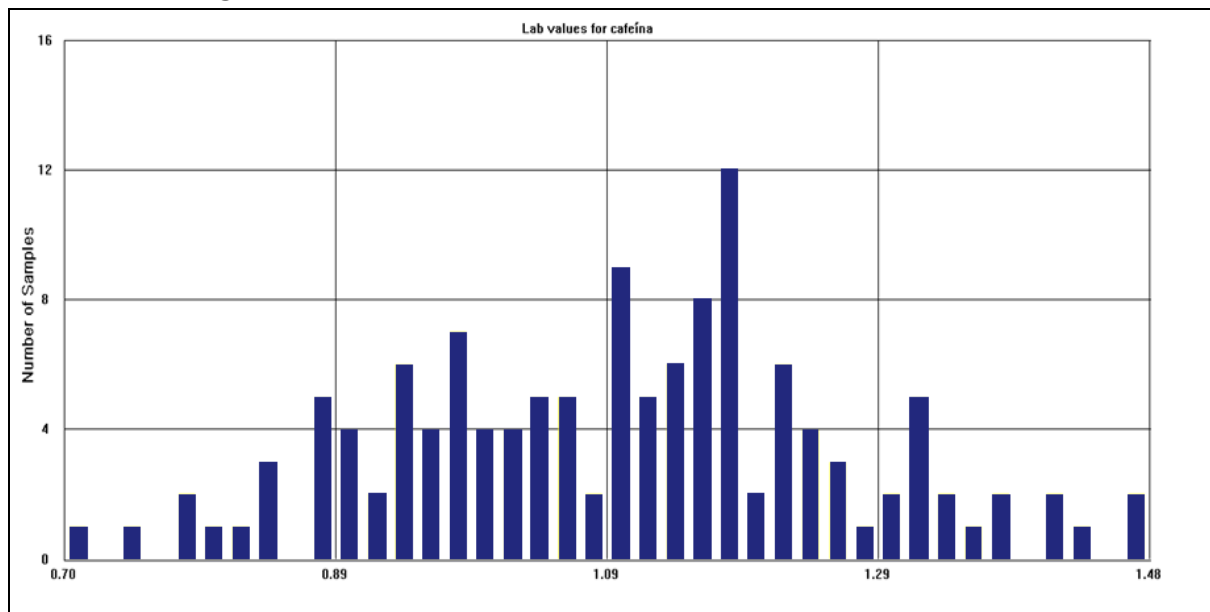
nitrogenada, e existem relatos de que ocorre um aumento significativo desse composto ao aumentar os níveis de nitrogênio na adubação. (VINECKY et al., 2011). Por outro lado, o teor de cafeol parece ser influenciado pela genética dos acessos. Isto pode ser reforçado pelo fato de que acessos com alto teor de cafeol tiveram menores teores de cafeína, ou seja, teria que se escolher qual benefício se deseja: um café com menores teores de cafeína ou um café com teores de cafeol elevados que possuem reflexos positivos na saúde.

#### 5.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO – NIRS

##### 5.4.1 Características das Amostras de Café

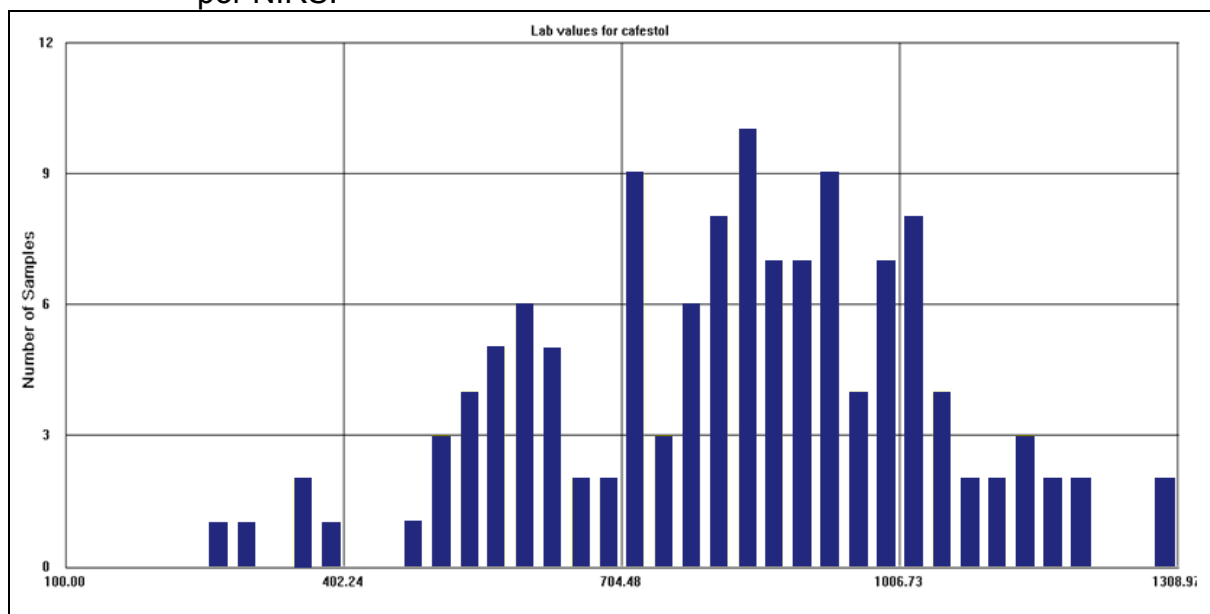
Para a construção do modelo de calibração, o grupo de amostras deve abranger a faixa de valores possíveis de serem encontrados para cada parâmetro avaliado. Na distribuição das amostras encontraram-se valores de cafeína entre 0,7 e 1,48 % (m/m), para cafeol os valores foram de 267,90 a 1308,97 mg/100 g e para cafeol de 182,70 a 1400,49 mg/ 100 g de café (Figuras 9 a 11) e observa-se uma distribuição normal.

**Figura 9** - Distribuição de frequência do teor de cafeína das amostras analisadas por NIRS.



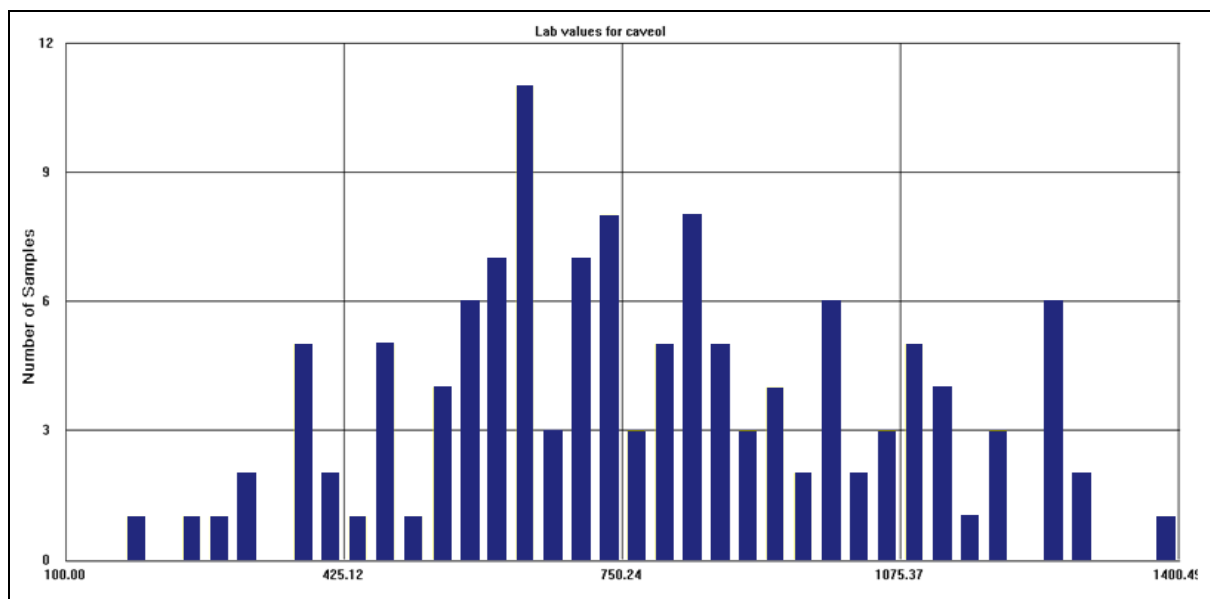
Fonte: Da autora.

**Figura 10** - Distribuição de frequência do teor de cafestol das amostras analisadas por NIRS.



Fonte: Da autora.

**Figura 11** - Distribuição de frequência do teor de caveol das amostras analisadas por NIRS.

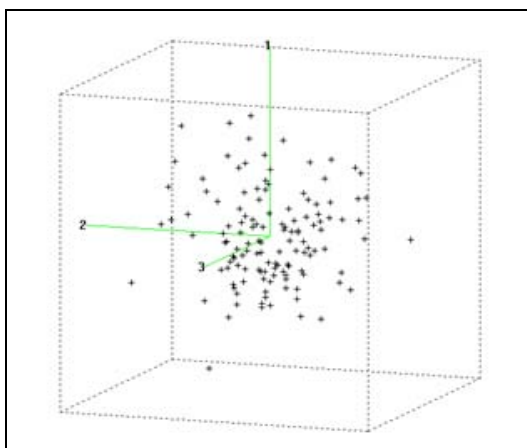


**Fonte:** Da autora.

#### 5.4.2 Análise da Qualidade dos Espectros

A figura 12 corresponde ao grupo de amostras para determinação de cafeína, cafestol e caveol, onde pode-se observar que existe uma distribuição uniforme, sem a presença de amostras anômalas, tanto para comparação de comprimento de onda, como no gráfico resultante da Análise de Componente Principal nas amostras.

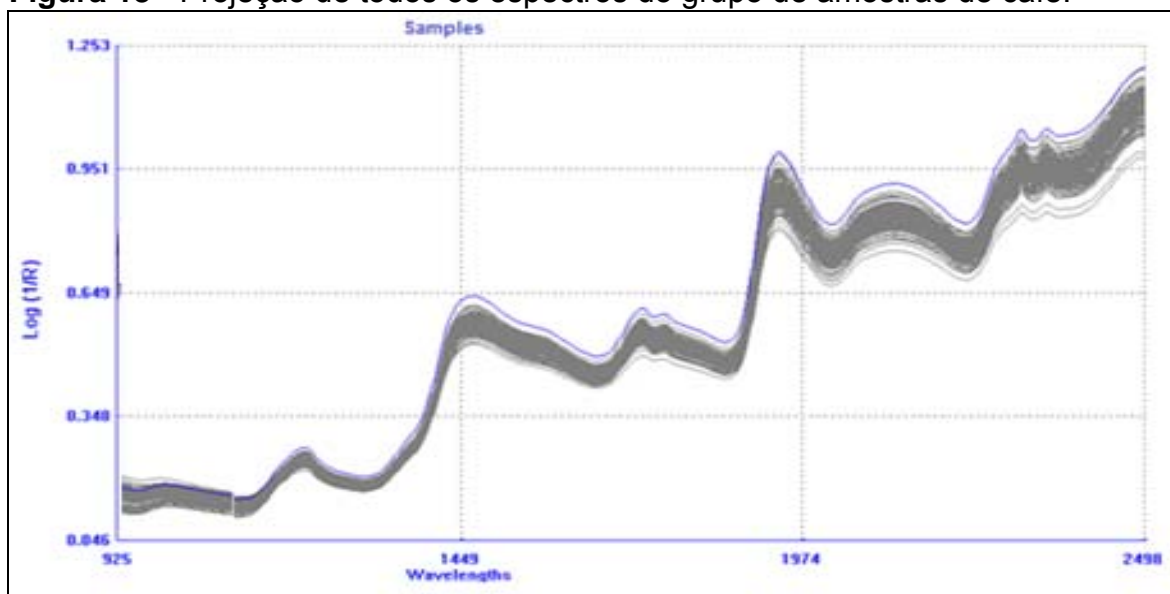
**Figura 12** - Projeção tridimensional dos espectros.



**Fonte:** Da autora

A identificação da presença de amostras anômalas também pode ser visualizada na projeção de todos os espectros, a qual neste conjunto de amostras não ocorre (Figura 13).

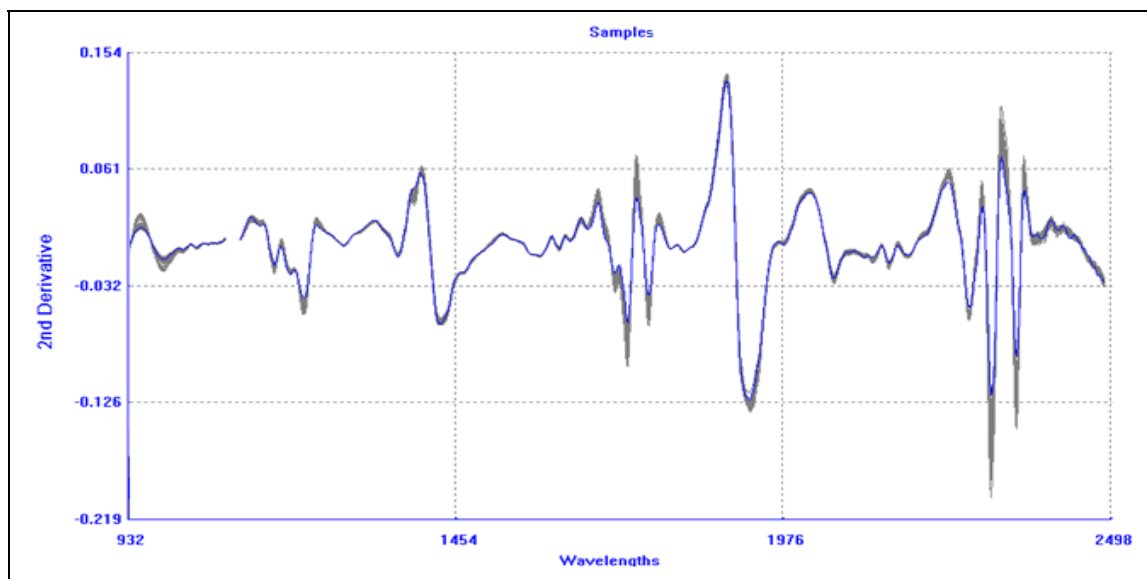
**Figura 13** - Projeção de todos os espectros do grupo de amostras de café.



Fonte: Da autora

A variabilidade descrita nas Figuras 12 e 13 foi evidenciada nos espectros das amostras após o pré-tratamentos desses espectros, utilizando a segunda derivada, SNV e Detrend e alisamento Savitzky-Golay (Figura 14).

**Figura 14** - Projeção dos espectros médios das amostras de café após tratamento.



Fonte: Da autora

### 5.4.3 Calibração e Validação

Para obter as curvas de calibração para cafeína foi usado um conjunto de 130 amostras de café da coleção da Etiópia e um conjunto de 128 amostras para a construção das curvas de calibração de caveol e cafestol. A Figura 13 mostra os espectros obtidos das amostras de café.

Após o pré-tratamento dos espectros (Figura 14) foi realizada a regressão por mínimos quadrados parciais (PSL) associando parâmetros estatísticos (SEC, SECV,  $r^2$ ) que definem a proximidade dos valores dos métodos de referência com os valores previstos pelo PLS, devendo conter pontos de dados distribuídos uniformemente sobre a linha e dentro do limite de confiança estabelecidos pelo modelo.

Os resultados de calibração e validação cruzada para cafeína, caveol e cafestol estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5** - Valores de calibração com validação cruzada.

	Calibração					Validação cruzada
	T	X	SD	SEC	$r^2$	SECV
Cafeína	7	1,095	0,158	0,05	0,898	0,067
Caveol	4	768,982	254,764	129,141	0,743	152,492
Cafestol	7	822,209	206,385	65,987	0,898	93,24

T: termos X: média; SD: desvio padrão; SEC: erro padrão de calibração;  $r^2$ : coeficiente de determinação; SECV: erro padrão de validação cruzada.

**Fonte:** Da autora.

O coeficiente de determinação para cafeína, caveol e cafestol apresentaram valores de 0,898, 0,743 e 0,898, respectivamente, com o número de termos obtido de 7, 4 e 7. Para ser considerado um modelo eficiente e confiável, os valores de SEC e SECV devem ser próximos. Isto ocorre quando existe uma distribuição normal dos valores no grupo de amostras. Os modelos que mais se aproximaram desse tipo de avaliação foi o modelo para a cafeína com valores de SEC de 0,05 e de SECV de 0,067, e para caveol, com valores de SEC de 129,141 e de SECV de 152,492.

No entanto, quando se dispõe de número suficiente de amostras, a validação externa de um modelo é sempre mais indicada e de maior confiabilidade. Portanto, o modelo desenvolvido na validação interna foi com grupos de amostras diferentes daquelas empregadas para a sua construção.

Os resultados obtidos da calibração e validação externa para esses constituintes estão apresentados nas Tabelas 6 e 7.

**Tabela 6** - Valores de calibração.

	T	X	SD	SEC	$r^2$
Cafeína	6	1,104	0,147	0,049	0,888
Caveol	6	781,061	268,010	104,591	0,848
Cafestol	6	804,483	183,531	56,694	0,905

T: termos; X: média; SD: desvio padrão; SEC: erro padrão de calibração;  $r^2$ : coeficiente de determinação.

**Fonte:** Da autora.

**Tabela 7** - Valores da validação externa.

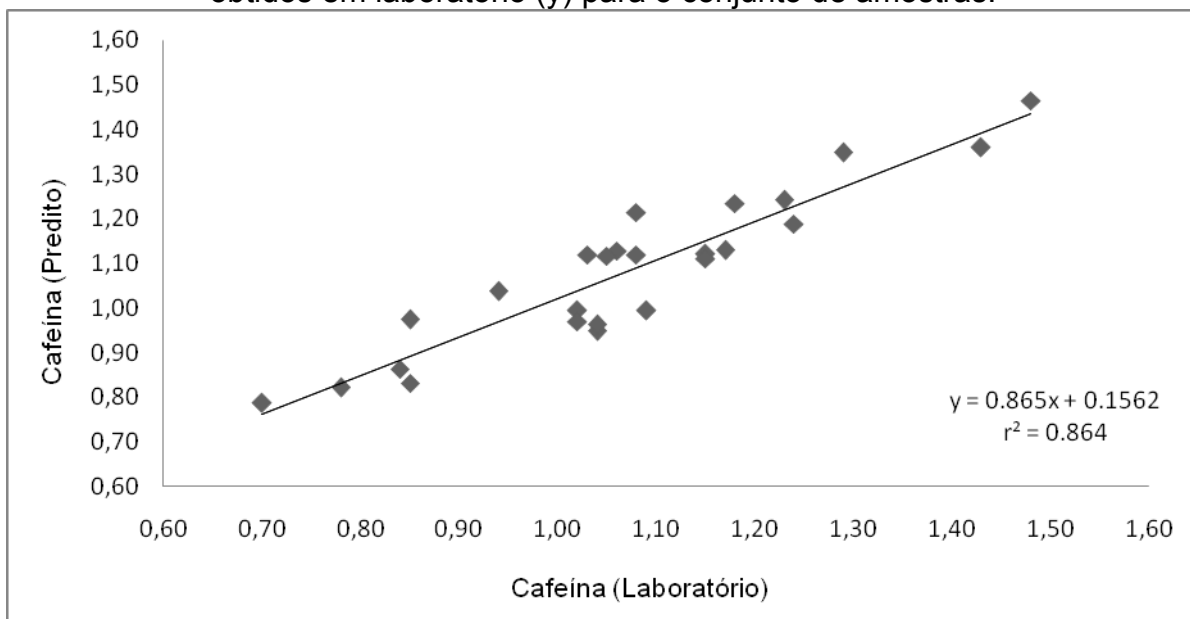
	X	SD	SEP	$r^2$	RPD
Cafeína	1,072	0,186	0,068	0,864	2,74
Caveol	739,114	216,790	136,409	0,643	1,59
Cafestol	847,161	240,649	95,472	0,846	2,52

X: média; SD: desvio padrão; SEP: erro padrão de predição;  $r^2$ : coeficiente de determinação; RPD: relação do desempenho do desvio.

**Fonte:** Da autora.

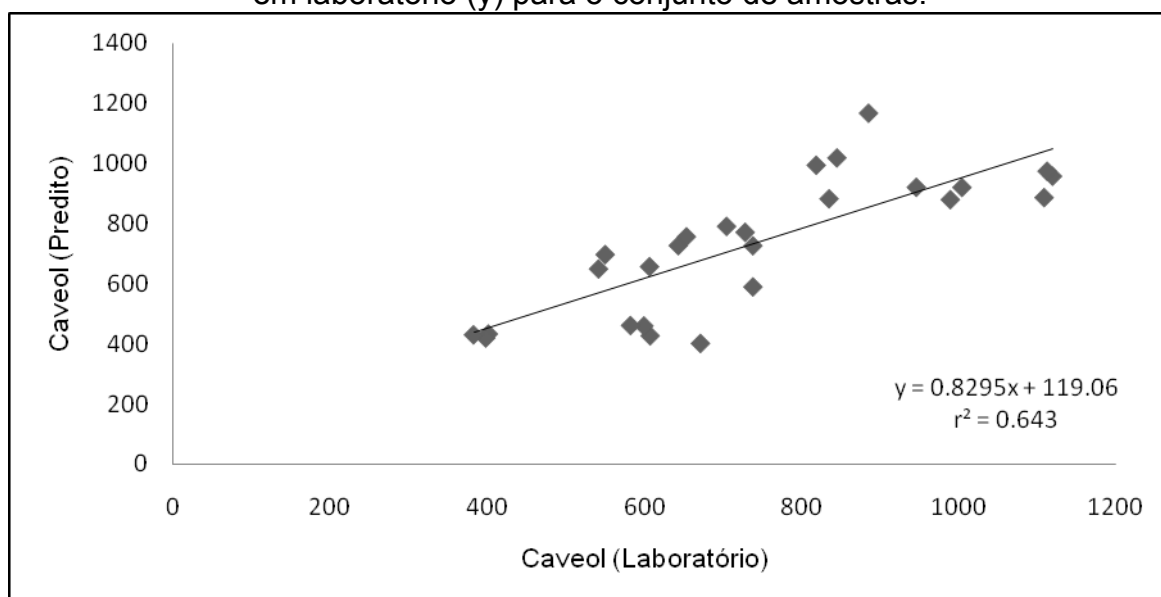
As figuras 15 a 17 mostram a correlação dos valores de cafeína, caveol e cafestol preditos pelo modelo (curva de calibração) versus os valores determinados pelo método de referência.

**Figura 15** - Relação entre os valores de cafeína preditos pelo modelo (x) e os obtidos em laboratório (y) para o conjunto de amostras.



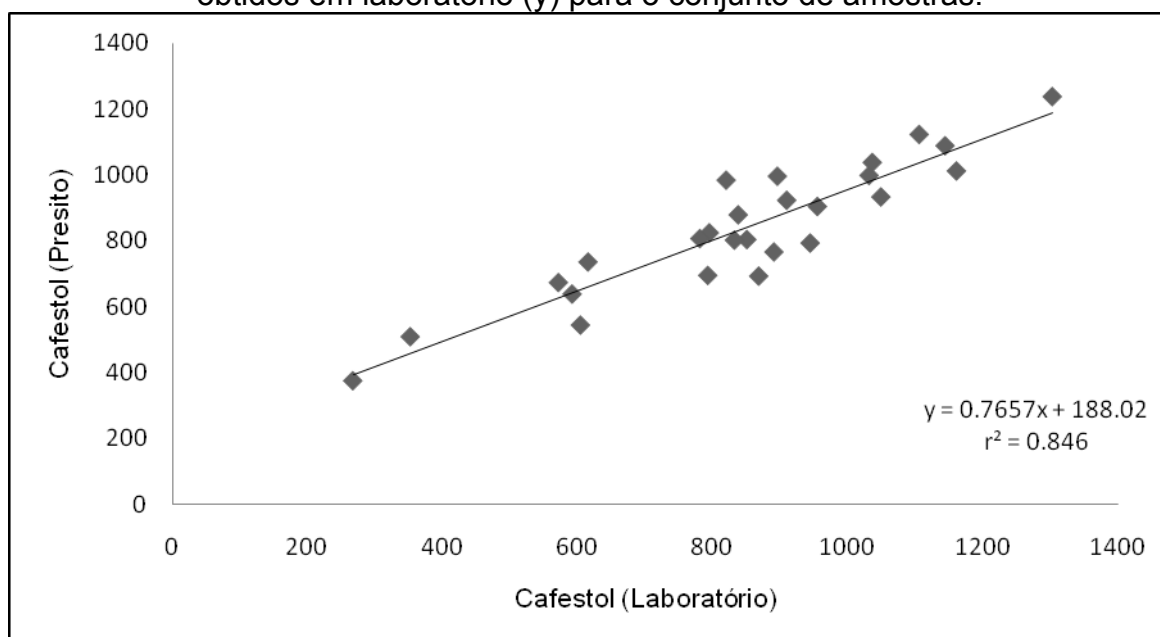
Fonte: Da autora.

**Figura 16** - Relação entre os valores de caveol preditos pelo modelo (x) e os obtidos em laboratório (y) para o conjunto de amostras.



Fonte: Da autora.

**Figura 17** - Relação entre os valores de cafestol preditos pelo modelo (x) e os obtidos em laboratório (y) para o conjunto de amostras.



Fonte: Da autora

Segundo Dowell et al. (2006) valores de  $r^2$  entre 0,70 e 0,90 podem ser utilizados para uma seleção preliminar em programas de melhoramento, valores entre 0,90 e 0,97 podem ser usados para seleção genética e controle de qualidade, e valores acima de 0,97 podem ser utilizados para todas as aplicações.

A validação externa obteve um coeficiente de determinação de 0,864, 0,643 e 0,846 para cafeína, caveol e cafestol, respectivamente, semelhante ao obtido por validação cruzada, exceto para o caveol. Esse cálculo de regressão foi feito utilizando-se 6 termos para todos os modelos, seguindo os valores determinados pela validação cruzada, exceto também para o caveol que resultou em uma calibração com 2 variáveis a mais que o previsto.

Foi utilizado o erro padrão de predição (SEP) como parâmetro para avaliar o erro obtido durante as fases de validação e teste do modelo construído, onde foram encontrados os valores de 0,068, 136,409 e 95,472 para cafeína, caveol e cafestol, respectivamente. Esses valores encontrados foram próximos dos mesmos erros obtidos pela validação cruzada, já relatados anteriormente, com valores de 0,067, 152,492, 93,24, para cafeína, caveol e cafestol, respectivamente. A comparação que mais se distanciou foi para o modelo obtido para o caveol.

Há relatos de construção de modelos em cafés torrados e verdes para umidade, proteína, cafeína e lipídios, no entanto não há calibração feita

somente para os diterpenos caveol e cafestol. (HUCK; GUGGENBICHLER; BONN, 2005; MORGANO et al., 2005, 2008; PIZARRO et al., 2004).

Huck, Guggenbichler e Bonn (2005) obtiveram um modelo para cafeína, utilizando 249 amostras de café, com faixa de concentração entre 0,10-4,13 g/100g. O modelo obtido foi considerado de alta robustez, demonstrado pela similaridade entre os valores dos erros estimado (0,34 g/100g) e predito (0,40 g/100g) semelhantes. O cálculo da equação de regressão resultou em um coeficiente de determinação alto de 0,86, semelhante ao obtido neste trabalho.

Zhang et al. (2013) trabalharam com 72 amostras de café arábica torrado, com cafeína na faixa de concentração de 12,037-15,115 mg/g, aplicando diversos pré-tratamentos dos espectros e também métodos variáveis de calibração. Na utilização da segunda derivada como pré-tratamento e o método mPLS para calibração com 7 termos, obteve-se uma equação com coeficiente de determinação de 0,793 e erro padrão da validação de 0,688 mg/g, sendo considerado insatisfatório para determinação quantitativa de amostras.

Um modelo considerado eficiente deve apresentar baixos valores de SEP, porém ele deve ser interpretado em conjunto com o desvio ou erro padrão do grupo de amostras dos dados laboratoriais empregados na validação. Assim, a relação entre eles resultará no RPD.

A relação RPD das estatísticas de calibração para as propriedades foi utilizada para avaliar a capacidade de predição dos modelos de calibração, onde para um valor de 1 indica uma falta de capacidade do modelo gerado prever, valores acima de 2,5 o modelo é considerado adequado para prever valores para seleção e melhoramento de plantas, enquanto que valores superiores a 5 são apropriados para o controle de qualidade (GONZÁLEZ-MARTIN et al., 2009). Os valores obtidos no presente estudo foram de 2,74 para a calibração da cafeína, de 1,79 para a de caveol e 2,52 para a de cafestol, onde somente os modelos para cafeína e cafestol foram considerados adequados, já que o modelo para caveol apresentou uma relação baixa.

Apesar de Huck, Guggenbichler e Bonn (2005) apresentarem um modelo com alto coeficiente de determinação e erros baixos e semelhantes, o RPD foi de 1,47, sendo considerado um modelo de baixa capacidade de predição de compostos.

Os resultados encontrados neste trabalho revelam que a capacidade de previsão é adequada para a determinação de cafeína e cafestol, mas para cafeol o modelo ainda precisa ser melhorado, coletando amostras adicionais para incluir todas as propriedades da matriz das amostras.

Tem de ser notado que a NIRS é uma técnica analítica que não é plena, mesmo obtendo um primeiro modelo de calibração satisfatório, sendo necessária a inclusão de amostras e revisão da curva periodicamente.

## 6 CONCLUSÃO

Através da análise por CLAE dos acessos de café da coleção de café verde da Etiópia observou-se uma variabilidade grande na composição dos diterpenos, caveol e cafestol na faixa de 182,70 a 1400,49 mg/100g e 267,90 a 1308,97 mg/100g, respectivamente. Revelaram-se três comportamentos distintos onde os acessos possuíam maiores teores de caveol e menores teores de cafestol, menores teores de caveol e maiores teores de cafestol e teores semelhantes destes compostos; sendo a maioria destes acessos incluídos no segundo comportamento, com teores altos de cafestol.

Na análise de cafeína por espectrofotometria UV/VIS, os teores dos acessos de café da Etiópia variaram de 0,70 a 1,48% (m/m), onde a maioria destes (99 acessos) pertence à faixa de 0,9 a 1,3% (m/m), apresentando similaridade aos resultados encontrados na literatura. Em relação ao interesse na produção de uma cultivar com baixo teor de cafeína, os acessos de café sugeridos para uma futura investigação são aqueles com teor de cafeína de 0,70 a 0,90% (m/m) (15 acessos).

Avaliando a correlação entre os teores de cafeína, caveol e cafestol através da correlação de Pearson e da AAH observou-se a formação de três grupos. Na separação destes acessos de café pela composição de caveol e cafestol observou-se uma tendência onde acessos com alto teor de cafestol e baixo teor de caveol possuem baixo teor de cafeína e acessos com baixo teor de cafestol e alto teor de caveol possuem alto teor de cafeína.

As calibrações feitas para os constituintes cafeína e cafestol pela técnica NIRS apresentaram bons resultados, utilizando apenas 6 termos para a construção de ambas e obtendo um alto coeficiente de determinação ( $r^2 = 0,846$ ), sendo adequadas no emprego de predição de amostras. Já o modelo obtido para o caveol apresentou menor capacidade de predição ( $r^2 = 0,643$ ), sendo necessária a inclusão de mais dados.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1799-1804, 2008.
- ADDINSOFT: software for statistical analysis. Paris: ADDINSOFT, 2007.
- ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B. **Benefícios do café na saúde: mito ou realidade?** Química Nova, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2169-2180, 2009.
- ALVES, S. T. **Desenvolvimento de metodologia analítica para diferenciação de café torrado arábica (*C. arabica*) e conilon (*C. canephora*) e misturas**. 2004. 142 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2004.
- ALVES, S. T. et al. Metodologia para análise simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em café torrado por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1164-1168, 2006.
- AQUINO, F. W. B. et al. Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 32-38, 2004.
- ARAÚJO, J. M. A.; SANDI, D. Extration of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 3, p. 1087-1094, 2006.
- ARAUJO, A. M. **Monitoramento de processos em tempo real via espectrofotometria no infravermelho próximo**. 2007. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade de Tiradentes, Aracajú. 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Histórico**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 20 abr. 2013.
- BEKELE, Y. D. **Assessment of cup quality, morphological, biochemical and molecular diversity of *Coffea arabica* L. genotypes of Ethiopia**. 2005. 215 p. Thesis (Plant Sciences - Plant Breeding) - University of the Free State, Bloemfontein. 2005.
- BELAY, A. et al. Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. **Food Chemistry**, London, v.108, n. 1, p. 310-315, 2008.
- BERTRAND, B. et al. Comparison of bean biochemical composition and beverage quality of arabica hybrids involving Sudanese-Ethiopian origins with traditional varieties at various elevations in Central America. **Tree Physiology**, Oxford, v. 26, n. 9, p. 1239-1248, 2006.
- BLANCO, M.; VILLARROYA, I. NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 21, n. 4, p. 240-250, 2002.

- BRASIL. Ministério da Agricultura. **O café**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe>>. Acesso em: 15 mar. 2013.
- BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.
- CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. Teor de cafeína em cafés brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, 1998.
- CAMPANHA, F. G. **Discriminação de espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) pela composição de diterpenos**. 2008. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2008.
- CARNEIRO, M. E. **Classificação de lâminas de madeira de *Pinus spp* por espectroscopia óptica**. 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2008.
- CARVALHO, L. M. et al. Aspectos morfofisiológicos das cultivares de cafeeiro catuaí-vermelho e conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 411-416, 2001.
- CASAL, S. et al. Discriminates analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 8, p. 3420-3424, 2000.
- CAVIN, C. et al. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 1155-1163, 2002.
- CHAILLOU, D. Evaluation d'une méthode analytique de discrimination et d'identification des cafés par spectrophotométrie proche infrarouge. **Spetra Analyse**, Paris, n. 258, p. 31-38, 2007.
- CHEN, Q. et al. Simultaneous determination of total polyphenols and caffeine contents of green tea by near-infrared reflectance spectroscopy. **Microchemical Journal**, New York, v. 83, n. 1, p. 42-27, 2006.
- CHU, Y. et al. Type 2 diabetes-related bioactivities of coffee: Assessment of antioxidant activity, NF- $\kappa$ B inhibition, and stimulation of glucose uptake. **Food Chemistry**, London, v. 124, n. 3, p. 914-920, 2011.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Brasil). **Acompanhamento da safra brasileira de café**: quarta estimativa do café safra 2012. Brasília: CONAB, 2012. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_12\\_20\\_16\\_01\\_51\\_boletim\\_cafe\\_dezembro\\_2012.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_20_16_01_51_boletim_cafe_dezembro_2012.pdf)>. Acesso em: 30 fev. 2013.
- CONESA, A. et al. Near infrared spectroscopy: A novel technique for classifying and characterizing polysulfone membranes. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 300, n. 1-2, p. 122-130, 2007.

- DAVIS, A. P. et al. Growing coffee: psilanthus (rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of coffea. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 167, n. 4, p. 357-377, 2011.
- DE BEER, T. et al. Near infrared and Raman spectroscopy for the in-process monitoring of pharmaceutical production processes. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 417, n. 1-2, p. 32-47, 2011.
- DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 99-105, 2007.
- DIAS, R. C. E. **Diterpenos em café**: desenvolvimento de metodologia para análise, avaliação em cafés torrados e em diferentes tecidos do fruto, e estudo da estabilidade com o processo de torra. 2009. 162 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2009.
- DIAS, R. C. E.; CAMPANHA, F. G.; BENASSI, M. T. Validação de método espectrofotométrico para determinação de cafeol em café torrado e moído. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, 2007.
- DIAS, R. C. E. et al. Evaluation of kahweol and cafestol in coffee tissues and roasted coffee by a new high-performance liquid chromatography methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 1, p. 88-93, 2010.
- DIAS, R. C. E. **Discriminação de espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) em diferentes graus de torra**. 2005. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2005.
- DOWELL, F. E. et al. Predicting wheat quality characteristics and functionality using near-infrared spectroscopy. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 83, n. 5, p. 529-536, 2006.
- ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, Barking, v. 46, n. 2, p. 488-495, 2011.
- ESTEBAN-DIEZ, I.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M.; PIZARRO, C. Prediction of sensory properties of espresso from roasted coffee samples by near-infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 525, n. 2, p. 171-182, 2004.
- FARAH, A et al. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, London, v. 98, n. 2, p. 373-380, 2006.
- FAZUOLI, L. C. Experiências em pré-melhoramento de café. In: LOPES, M. A. et al. (Org.). **Curso internacional de pré-melhoramento de plantas**. Brasília: Embrapa, 2006. p. 75-88.
- FAZUOLI, L. C. Melhoramento genético do cafeeiro. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 10., 2004, Mococa. **Anais...** Mococa, 2004. p. 2-28.

- FERRÃO, M. F. et al. Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 333-340, 2004.
- FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.
- FREEDMAN, N. D. et al. Association of coffee drinking with total and cause-specific mortality. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 366, p. 1891-1904, 2012.
- GLADE, M. J. Caffeine: not just a stimulant. **Nutrition**, Syracuse, v. 26, n. 10, p. 932-938, 2010.
- GOLE, T. W. et al. Human impacts on the *Coffea arabica* genepool in Ethiopia and the need for its *in situ* conservation. In: ENGELS, J. et al. (Ed.). **Managing plant genetic diversity**. New York: IPGRI, 2002. p. 237-247.
- GONZÁLEZ-MARTÍN, I. et al. The application of near infrared spectroscopy technology and a remote reflectance fibre-optic probe for the determination of peptides in cheeses (cow's, ewe's and goat's) with different ripening times. **Food Chemistry**, London, v. 114, n. 4, p. 1564-1569, 2009.
- HEIN, P. R. G. et al. Estimativa do ângulo microfibrilar em madeira de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* por meio da espectroscopia no infravermelho próximo. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 19, n. 2, p.194-199, 2012.
- HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: a review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 46, n. 2, p. 101-123, 2006.
- HUCK, C. Q.; GUGGENBICHLER, W.; BONN, G. K. Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in coffee by near infrared spectroscopy (NIRS) compared to high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 538, n. 1-2, p. 195-203, 2005.
- INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Trade statistics**. Disponível em: <[http://www.ico.org/trade\\_statistics.asp](http://www.ico.org/trade_statistics.asp)> Acesso em: 30 maio 2013.
- INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 6673**: international standard green coffee: determination of loss in mass at 105°C. Genebra, 2003.
- ITO, M. et al. Development of a method for the determination of caffeine anhydrate in various designed intact tablets by near-infrared spectroscopy: A comparison between reflectance and transmittance technique. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 47, n. 4-5, p. 819-827, 2008.
- KITZBERGER, C. S. G. **Caracterização e discriminação de cafés de diferentes espécies e variedades cultivados nas mesmas condições edafoclimáticas**. 2012. 146 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2012.

- KITZBERGER, C. S. G. et al. Analysis of diterpenes in green and roasted coffee of *Coffea arabica* cultivars growing in the same edapho-climatic conditions. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF COFFEE SCIENCE, 23., 2010, Bali. **Anais...** Bali, 2010. p. 110-117.
- KITZBERGER, C. S. G. et al. Diterpenes in green and roasted coffee of *Coffea arabica* cultivars growing in the same edapho-climatic conditions. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.30, n. 1, p. 52-57, 2013.
- KURZROCK, T.; SPEER, K. Diterpenes and diterpenes esters in coffee. **Food Reviews International**, New York, v. 17, n. 4, p. 433-450, 2001.
- LAGO, R. C. A. Lipídios em grãos de café. **Boletim do CEPA**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 319-340, 2001.
- LASHERMES, P. et al. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. **Euphytica**, Wageningen, v. 87, n. 1, p. 59-64, 1996.
- LEE, K. J.; CHOI, J. H.; JEONG, H. G. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 11, p. 2118-2125, 2007.
- LIMA, V. B. et al. Teor de cafeína em introduções e variedades de *Coffea arabica* do banco de germoplasma do instituto agrônomo – IAC. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, 2007.
- MACHADO, L. M. M. **Padrão de consumo de café e monitoramento de riscos associados ao diabetes tipo 2, obesidade e dislipidemias na população adulta do Distrito Federal e entorno**. 2010. 255 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília. 2010.
- MARTÍN, M. J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A. G. **Discrimination between arabica and robusta green coffee varieties according to their chemical composition**. *Talanta*, Oxford, v. 46, n. 6, p. 1259-1264, 1998.
- MAZUR, L. **Aplicação de metodologia por NIR para determinação de metilxantinas presentes na erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2012.
- MAZZAFERA, P.; CARVALHO, A. **Breeding for low seed caffeine content of coffee (*Coffea* L.) by interspecific hybridization**. *Euphytica*, Wageningen, v. 59, n. 1, p. 55-60, 1992.
- MAZZAFERA, P.; YAMAOKA-YANO; VITÓRIA, A.P. Para que serve a cafeína em plantas? **Revista Brasileira de fisiologia Vegetal**, Campinas, v.8, n.1, p. 67-74, 1996.

MILAGRES, F. R. **Avaliação da madeira de híbridos de *Eucalyptus globulus* com *E. grandis* e *E. urophylla*, para produção de celulose, utilizando espectroscopia NIR.** 2009. 142 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2009.

MORAIS, S. A. L. et al. Análise química de café (*Coffea arabica* L.) e grãos pretos, verdes e ardidos (PVA) submetidos diferentes graus de torração. **Coffee Science, Lavras**, v. 2, n. 2, p. 97-111, 2007.

MORAIS, S. A. L. et al. **Compostos bioativos e atividade antioxidante do café conilon submetido a diferentes graus de torra.** Química Nova, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 327-331, 2009.

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; DE MARIA, C. A. B. **Componentes voláteis do café torrado.** Parte II. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. Química Nova, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 195-203, 2000.

MORGANO, M. A. et al. **Determinação de açúcar total em café cru por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais.** Química Nova, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 346-350, 2007.

MORGANO, M. A. et al. Determinação de proteína em café cru por espectroscopia NIR e regressão PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 25-31, 2005.

MORGANO, M. A. et al. Determinação de umidade em café cru usando espectroscopia NIR e regressão multivariada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 12-17, 2008.

MURIEL, P.; ARAUZ, J. Coffee and liver diseases. **Fitoterapia**, Milano, v. 81, n. 5, p. 297-305, 2010.

NATIONAL COFFEE ASSOCIATION. Disponível em: <<http://www.ncausa.org>>. Acesso em: 20 abr. 2013.

NICOLAU-SOUZA, R. M. N. **Caracterização e discriminação de cafés torrados e moídos comerciais pela composição de substâncias bioativas.** 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2009.

NISHIJIMA, M.; SAES, M. S. M.; POSTALI, F. A. S. Análise de concorrência no mercado mundial de café verde. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Brasília, v. 50, n. 1, p. 69-82, 2012.

PANERO, J. S. **Determinação de proteína, óleo e umidade por espectroscopia NIR em grãos de soja do Estado de Roraima.** 2007. 77 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista. 2007.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.

PIZARRO, C. et al. Use of near-infrared spectroscopy and feature selection techniques for predicting the caffeine content and roasting color in roasted coffees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, London, v. 55, n. 18, p. 7477-7488, 2007.

PIZARRO, C. et al. Influence of data pré-processing on the quantitative determination of the ash content and lipids in roasted coffee by near infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 509, n. 2, p. 217-227, 2004.

RIBANI, M. et al. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. Química Nova, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICKETTS, M. L. et al. The cholesterol-raising factor from coffee beans, cafestol, as an agonist ligand for the farnesoid and pregnane x receptors. **Molecular Endocrinology**, Bethesda, v. 21, n. 7, p. 1603-1616, 2007.

ROOS, B. et al. Levels of cafestol, kahweol, an related diterpenoids in wild species of the coffee plant *Coffea*. **Jornal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 8, p. 3065-3069, 1997.

SILVAROLLA, M. B.; MAZZAFERA, P.; FAZUOLI, L. C. **Plant biochemistry**: a naturally decaffeinated arabica coffee. *Nature*, London, v. 429, n. 6994, p. 826, 2004.

SILVAROLLA, M. B.; MAZZAFERA, P.; LIMA, M. M. A. Caffeine content of ethiopian *Coffea arabica* beans. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 1, p. 213-215, 2000.

SILVESTRINI, M. et al. Genetic diversity and structure of ethiopian, yemen and brazilian *Coffea arabica* L. accessions using microsatellites markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 54, n. 6, p. 1367-1379, 2007.

SINIJA, V. R.; MISHRA, H. N. FT-NIR spectroscopy for caffeine estimation in instant green tea powder and granules. **Food Science and Technology**, London, v. 42, n. 5, p. 998-1002, 2009.

SOUZA, R. M. N.; CANUTO, G. A. B.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. T. Teores de compostos bioativos em cafés torrados e moídos comerciais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 885-890, 2010.

SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 201-216, 2006.

SRIDEVI, V.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G. A. Free diterpenes cafestol and kahweol in beans and *in vitro* cultures of *Coffea* species. **Current Science**, Bangalore, v. 99, n. 8, p. 1001-1004, 2010.

TEIXEIRA, A. L. **Quantificação da cafeína e seleção precoce para produção em *Coffea arabica* L.** 2011. 87 f. Tese (Doutorado em Genética e melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2011.

URGERT, R.; KATAN, M. B. The cholesterol-raising factor from coffee beans. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 17, p. 305-323, 1997.

URGERT, R. et al. Levels of the cholesterol-elevating diterpenes cafestol and kahweol in various coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 8, p. 2157-2172, 1995.

VAN CRUCHTEN, S. T. J. et al. The role of epoxidation and electrophile-responsive element-regulated gene transcription in the potentially beneficial and harmful effects of the coffee components cafestol and kahweol. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 21, n. 8, p. 757-763, 2010.

VIDAL, R. et al. A high-throughput data mining of SNPs in *Coffea* spp ESTs suggests differential homeologous gene expression in the allotetraploid *Coffea arabica*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 154, n. 3, p.1053-1066, 2010.

VINECKY, F. et al. Efeito de diferentes níveis de adubação sobre a composição bioquímica em grão de *Coffea arabica* cv. Rubi. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 7., 2011, Araxá. **Anais...** Araxá, 2011.

WILSON, R. H.; TAPP, H. S. Mid-infrared spectroscopy for food analysis recent new applications and relevant developments in sample presentation methods. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 85-93. 1999.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (Coord.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Aldolfo Lutz, 2008. p. 488.

ZHANG, X. et al. Improvement of near infrared spectroscopy (NIRS) analysis of caffeine in roasted arabica coffee by variable selection method of stability competitive adaptive reweighted sampling (SCARS). **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Amsterdam, v. 114, p. 350-356, 2013.

## **ANEXOS**

**Anexo A -** Conteúdo de cafestol e caveol, cafestol + caveol (mg/100g em base seca), coeficiente de variação e relação caveol e cafestol (cav/caf) dos acessos de café da coleção Etiópia.

Acesso	Cafestol*	CV %	Caveol *	CV %	Caf + Cav	cav/caf
Catuaí verm.	570,56 ± 9,60	1,88	1118,58 ± 11,59	1,16	1689,14	1,96
Typica	548,99 ± 42,16	8,69	990,91 ± 11,23	1,26	1539,90	1,80
Bourbon	1303,59 ± 35,74	3,02	582,75 ± 2,45	0,46	1886,33	0,45
Mundo Novo	517,61 ± 15,08	3,26	943,30 ± 37,47	4,45	1460,91	1,82
E016/298	961,74 ± 56,47	6,48	1176,88 ± 20,27	1,90	2138,62	1,22
E071/258	891,49 ± 58,79	7,31	946,01 ± 30,21	3,54	1837,51	1,06
E478/408	770,54 ± 12,15	1,75	1258,18 ± 65,06	5,74	2028,72	1,63
E080/584	872,64 ± 6,56	0,83	1400,49 ± 55,07	4,33	2273,13	1,60
E237/071	794,32 ± 13,14	1,85	1040,87 ± 9,57	1,03	1835,18	1,31
E213/211	996,54 ± 19,99	2,25	683,76 ± 7,22	1,19	1680,30	0,69
E146/117	841,20 ± 32,10	4,23	1244,77 ± 28,74	2,56	2085,96	1,48
E389/133	918,39 ± 37,04	4,45	747,55 ± 7,39	1,09	1665,94	0,81
E055/006	841,41 ± 57,33	7,56	1013,05 ± 68,60	7,51	1854,46	1,20
E007/087	897,49 ± 64,83	8,15	460,92 ± 22,95	5,62	1358,41	0,51
E123b/121	926,14 ± 42,52	5,12	865,13 ± 51,22	6,61	1791,27	0,93
E428/108	882,97 ± 3,58	0,45	993,29 ± 18,40	2,05	1876,26	1,12
E419/098	955,30 ± 19,30	2,24	732,40 ± 4,85	0,73	1687,70	0,77
E123a/231	1161,74 ± 46,16	4,40	383,20 ± 18,10	5,23	1544,94	0,33
E017/419	377,25 ± 7,21	2,13	1157,98 ± 37,85	3,64	1535,23	3,07
E454/107	808,27 ± 1,40	0,19	1265,41 ± 14,15	1,24	2073,67	1,57
E131/018	723,18 ± 7,89	1,21	998,52 ± 15,15	1,69	1721,70	1,38
E146/012	868,95 ± 64,72	8,33	989,27 ± 30,01	3,39	1858,22	1,14
E183/138	1029,89 ± 59,24	6,36	1098,24 ± 76,34	7,69	2128,13	1,07
E516/069	980,63 ± 49,59	5,63	797,60 ± 37,94	5,30	1778,23	0,81
E565/009	1001,00 ± 58,23	6,49	426,89 ± 13,59	3,55	1427,89	0,43
E238/022	1138,12 ± 14,55	1,42	377,29 ± 0,93	0,27	1515,41	0,33

E272/174	604,96 ± 47,41	8,77	885,28 ± 69,84	8,82	1490,24	1,46
E464/113	1019,84 ± 60,19	6,54	629,31 ± 36,31	6,39	1649,15	0,62
E270/263	934,34 ± 47,96	5,72	296,73 ± 4,00	1,50	1231,07	0,32
E565/009+010	1156,44 ± 7,18	0,69	515,55 ± 1,85	0,40	1671,98	0,45
E037/676	698,12 ± 7,77	1,24	1055,29 ± 22,00	2,32	1753,42	1,51
E326/124	710,42 ± 69,33	10,82	1073,08 ± 77,80	8,03	1783,50	1,51
E261/052	524,18 ± 20,62	4,35	1105,13 ± 95,06	9,51	1629,31	2,11
E552/323	1217,20 ± 71,80	6,53	738,37 ± 84,48	12,67	1955,57	0,61
E520/004	1047,55 ± 17,44	1,84	1272,17 ± 16,17	1,40	2319,72	1,21
E012/226	622,55 ± 34,80	6,18	1179,95 ± 46,36	4,34	1802,50	1,90
E017/046	525,62 ± 14,80	3,10	1259,64 ± 10,47	0,92	1785,26	2,40
E018/494,1	1043,69 ± 14,76	10,14	614,13 ± 67,07	12,10	1657,82	0,59
E021/011	793,53 ± 95,50	2,34	671,62 ± 21,17	3,47	1465,15	0,85
E25/308	851,34 ± 16,89	5,05	1112,32 ± 15,12	1,51	1963,66	1,31
E30/075	979,98 ± 30,54	3,45	953,64 ± 20,28	4,68	1933,62	0,97
E39/434	795,84 ± 11,45	1,60	1004,05 ± 22,96	2,54	1799,89	1,26
E41/079	852,93 ± 21,17	2,74	1260,63 ± 10,02	1,67	2113,56	1,48
E44/122	769,68 ± 31,15	4,49	1100,87 ± 48,70	5,01	1870,55	1,43
E46/021	886,82 ± 29,52	3,69	994,16 ± 46,20	5,16	1880,98	1,12
E47/267	838,52 ± 42,73	5,64	1108,40 ± 66,13	6,60	1946,92	1,32
E55/595	723,38 ± 61,74	9,45	646,50 ± 60,55	10,37	1369,88	0,89
E57/497	1009,28 ± 30,72	3,37	1046,85 ± 48,14	5,09	2056,14	1,04
E61/126	853,34 ± 57,46	7,43	651,86 ± 51,03	8,64	1505,20	0,76
E68/014	1049,95 ± 11,81	1,23	1119,10 ± 12,53	1,23	2169,04	1,07
E81/041	1126,55 ± 39,57	3,85	1263,15 ± 53,65	4,66	2389,70	1,12
E85/085	684,09 ± 41,67	6,74	1079,42 ± 28,53	2,93	1763,51	1,58
E87/194	716,36 ± 12,64	1,95	1294,25 ± 55,41	4,72	2010,61	1,81
E88/034	267,90 ± 28,85	11,96	921,05 ± 38,65	4,66	1188,95	3,44
E404/135	991,08 ± 21,00	2,35	646,07 ± 11,08	1,90	1637,16	0,65
M7846/064	945,68 ± 21,54	2,53	807,07 ± 13,40	1,85	1752,75	0,85

SEL/105+106	592,35 ± 14,28	2,68	797,23 ± 4,62	0,65	1389,57	1,35
GEISHA/076	940,00 ± 47,92	5,67	583,58 ± 40,21	7,66	1523,58	0,62
E114/447	874,10 ± 59,27	7,52	1107,50 ± 75,02	7,51	1981,59	1,27
E115/099	925,48 ± 21,33	2,55	744,02 ± 19,81	2,94	1669,50	0,80
E116/061	761,59 ± 7,37	1,07	865,98 ± 0,87	0,11	1627,58	1,14
E118/213	1090,69 ± 10,55	1,07	775,22 ± 13,15	1,88	1865,91	0,71
E124/243	955,85 ± 28,76	3,33	845,11 ± 11,39	1,49	1800,96	0,88
E126/359	1002,49 ± 13,58	1,50	890,06 ± 16,04	1,99	1892,55	0,89
E130/169	1032,26 ± 30,86	3,32	643,54 ± 17,56	3,03	1675,80	0,62
E139/054	1018,38 ± 13,09	1,42	309,54 ± 4,05	1,45	1327,91	0,30
E148/254	757,18 ± 53,04	7,70	480,69 ± 35,55	8,13	1237,87	0,63
E151/574	352,99 ± 14,13	4,42	579,58 ± 36,61	6,97	932,57	1,64
E152/017	884,66 ± 8,37	1,04	650,97 ± 12,78	2,16	1535,63	0,74
E159/180	299,61 ± 21,33	7,90	926,10 ± 2,49	0,30	1225,71	3,09
E174/164	541,93 ± 6,63	1,36	627,26 ± 3,13	0,56	1169,18	1,16
E189/119	782,93 ± 32,22	4,57	938,00 ± 27,14	3,21	1720,93	1,20
E199/091	807,49 ± 21,85	3,04	832,93 ± 2,42	0,33	1640,42	1,03
E201/134	896,56 ± 28,08	3,47	738,41 ± 8,28	1,24	1634,97	0,82
E208/752	711,91 ± 14,08	2,18	552,94 ± 1,89	0,38	1264,85	0,78
E209/031	937,62 ± 16,00	1,89	459,18 ± 2,79	0,67	1396,80	0,49
E270/044	1091,41 ± 49,66	5,05	286,34 ± 5,39	2,09	1377,75	0,26
E218/580+581	702,85 ± 13,89	2,19	641,27 ± 6,33	1,10	1344,12	0,91
E220/127	709,41 ± 25,58	4,01	739,00 ± 27,17	4,08	1448,42	1,04
E220/262	580,34 ± 9,48	1,81	753,54 ± 13,34	1,96	1333,88	1,30
E221/214	600,64 ± 5,06	0,93	703,44 ± 6,88	1,08	1304,08	1,17
E228/051	603,07 ± 22,81	4,21	730,62 ± 23,79	3,62	1333,69	1,21
E254/284-285	879,46 ± 4,94	0,62	560,65 ± 2,01	0,39	1440,10	0,64
E265/101	818,89 ± 4,43	0,60	528,00 ± 3,24	0,68	1346,89	0,64
E267/090	817,91 ± 23,27	3,16	609,14 ± 11,86	2,17	1427,05	0,74
E268/067	1308,97 ± 14,41	1,22	182,70 ± 0,49	0,30	1491,66	0,14

E272/143	705,85 ± 24,64	3,87	756,35 ± 5,19	0,76	1462,20	1,07
E279/618	592,60 ± 33,77	6,29	818,88 ± 44,01	5,93	1411,48	1,38
E283/096	1144,90 ± 44,15	4,25	599,87 ± 9,05	1,66	1744,77	0,52
E287/029	1017,24 ± 17,86	1,94	251,68 ± 3,19	1,40	1268,92	0,25
E298/382	1207,21 ± 5,62	0,51	607,78 ± 3,55	0,64	1814,99	0,50
E301/111	945,22 ± 58,65	6,88	398,84 ± 10,33	2,87	1344,05	0,42
E302/083	752,99 ± 9,69	1,44	632,16 ± 5,22	0,92	1385,15	0,84
E308/049	733,45 ± 12,32	1,85	700,40 ± 11,01	1,73	1433,85	0,95
E315/081	614,12 ± 28,81	5,14	838,29 ± 50,52	6,60	1452,41	1,37
E320/145	910,41 ± 12,99	1,59	606,98 ± 6,56	1,20	1517,39	0,67
E325/522	1106,43 ± 79,89	8,00	402,14 ± 22,04	6,07	1508,57	0,36
E324/093	932,93 ± 5,73	0,68	844,96 ± 4,89	0,64	1777,89	0,91
E327/032+033	616,53 ± 13,28	2,38	557,01 ± 14,87	2,95	1173,54	0,90
E331/280	648,48 ± 41,30	7,07	697,92 ± 40,12	6,38	1346,40	1,08
E332/023	1037,07 ± 34,71	3,72	653,86 ± 23,72	4,04	1690,93	0,63
E335/219	650,79 ± 16,38	2,79	611,97 ± 11,51	2,09	1262,76	0,94
E340/179	636,08 ± 4,27	0,74	869,27 ± 2,25	0,29	1505,35	1,37
E364/059	572,28 ± 16,23	3,13	835,15 ± 5,52	0,73	1407,43	1,46
E368/600	1020,26 ± 28,88	3,13	367,84 ± 5,44	1,63	1388,10	0,36
E370/196	1003,66 ± 44,91	4,95	475,03 ± 5,24	1,22	1478,69	0,47
E383/192	475,15 ± 1,50	0,35	878,28 ± 11,83	1,48	1353,44	1,85
E386/131	371,30 ± 24,99	7,44	636,29 ± 10,05	1,74	1007,59	1,71
E405/058	1007,04 ± 38,10	4,17	704,71 ± 19,51	3,05	1711,75	0,70
E408/001	956,49 ± 40,24	4,66	620,18 ± 19,93	3,56	1576,67	0,65
E409/114	781,85 ± 19,42	2,77	550,58 ± 3,98	0,81	1332,43	0,70
E430/056	832,96 ± 55,61	7,37	704,80 ± 28,41	4,45	1537,76	0,85
E439/094	496,38 ± 27,83	6,18	824,38 ± 30,90	4,13	1320,76	1,66
E450/235	1168,89 ± 15,67	1,47	386,83 ± 9,36	2,66	1555,72	0,33
E456/062	829,82 ± 26,08	3,47	789,66 ± 32,90	4,60	1619,48	0,95
E457/073	915,35 ± 38,78	4,69	817,22 ± 37,60	5,09	1732,57	0,89

E458/097	719,49 ± 20,73	3,18	910,50 ± 12,85	1,56	1629,98	1,27
E466/710	616,19 ± 17,99	3,23	728,48 ± 15,13	2,30	1344,68	1,18
E467/045	830,90 ± 49,47	6,57	1052,81 ± 37,28	3,91	1883,71	1,27
E481/238	574,31 ± 37,19	7,17	710,45 ± 47,05	7,33	1284,76	1,24
E486/189	843,13 ± 9,71	1,28	792,01 ± 8,45	1,18	1635,13	0,94
E490/516	567,95 ± 2,54	0,50	583,45 ± 2,10	0,40	1151,40	1,03
E494/173	494,75 ± 11,61	2,58	479,10 ± 7,96	1,83	973,85	0,97
E511/157	609,51 ± 30,32	5,50	858,10 ± 19,35	2,49	1467,60	1,41
E514/129	886,74 ± 25,34	3,16	686,72 ± 29,98	4,82	1573,45	0,77
E546/118	870,11 ± 58,44	7,38	363,39 ± 12,48	3,77	1233,50	0,42
E571/230	813,51 ± 77,18	10,44	630,46 ± 51,96	9,07	1443,98	0,77
E621/139	820,81 ± 25,34	1,17	542,17 ± 5,21	1,06	1362,97	0,66

\*Valores médios de diterpenos e desvio padrão de duas análises.

## Anexo B

## Conteúdo de cafeína (% m/m) e coeficiente de variação dos acessos de café da coleção Etiópia

Acesso	Cafeína	CV %	Acesso	Cafeína	CV %	Acesso	Cafeína	CV %
Catuai verm.	1,18	1,68	E565/009+010	1,17	0,13	E114/447	1,17	1,97
Typica	1,32	1,78	E037/676	1,27	1,89	E115/099	1,32	0,20
Bourbon	1,41	0,65	E326/124	1,48	1,89	E116/061	1,17	1,91
Mundo Novo	1,09	0,25	E261/052	1,22	2,61	E118/213	0,89	0,86
E016/298	1,09	0,70	E552/323	1,15	4,40	E124/243	1,08	1,62
E071/258	1,48	0,70	E520/004	1,15	3,80	E126/359	1,07	1,65
E478/408	1,05	0,79	E012/226	1,22	0,97	E130/169	1,02	0,30
E080/584	1,41	0,30	E017/046	0,99	1,93	E139/054	0,88	0,56
E237/071	1,15	1,70	E018/494.1	1,03	0,15	E148/254	0,98	1,71
E213/211	1,11	0,21	E021/011	0,88	0,48	E151/574	1,06	0,29
E146/117	1,21	2,87	E25/308	1,03	1,11	E152/017	1,31	0,44
E389/133	1,12	1,60	E30/075	1,24	0,03	E159/180	1,10	4,27
E055/006	1,36	0,51	E39/434	1,38	2,63	E174/164	1,16	1,74
E007/087	1,14	1,03	E41/079	1,33	0,65	E189/119	1,17	0,23
E123b/121	1,04	1,11	E44/122	1,14	1,43	E199/091	0,99	4,99
E428/108	0,78	2,75	E46/021	1,19	1,34	E201/134	1,24	0,49
E419/098	1,18	3,95	E47/267	1,18	0,10	E208/752	1,01	0,82
E123a/231	0,82	0,09	E55/595	1,11	0,24	E209/031	1,10	0,84
E017/419	1,17	0,33	E57/497	1,34	0,65	E270/044	0,75	0,16
E454/107	1,15	1,71	E61/126	1,30	1,21	E218/580+581	0,95	0,90
E131/018	0,99	1,49	E68/014	1,23	0,15	E220/127	1,26	0,15
E146/012	1,15	2,94	E81/041	1,00	1,58	E220/262	1,14	1,11
E183/138	1,21	0,16	E85/085	1,09	0,49	E221/214	1,06	0,18
E516/069	1,16	0,72	E87/194	1,31	1,98	E228/051	1,00	1,01
E565/009	1,18	1,68	E88/034	1,29	1,13	E254/284-285	0,94	0,16
E238/022	1,22	0,06	E404/135	1,13	2,05	E265/101	0,78	1,17
E272/174	1,43	0,08	M7846/064	1,20	1,06	E267/090	0,88	0,87
E464/113	0,92	0,37	SEL/105+106	1,16	0,26	E268/067	1,01	1,67
E270/263	0,95	0,16	GEISHA/076	1,13	0,37	E272/143	0,90	2,30

Acesso	Cafeína	CV %	Acesso	Cafeína	CV %
E279/618	1,08	4,25	E457/073	0,97	1,76
E283/096	0,84	1,13	E458/097	0,98	2,03
E287/029	0,80	0,58	E466/710	0,85	0,27
E298/382	1,09	1,04	E467/045	0,90	0,04
E301/111	1,04	0,15	E481/238	0,98	0,04
E302/083	0,97	0,64	E486/189	0,97	4,61
E308/049	1,38	2,49	E490/516	1,22	0,79
E315/081	1,10	2,45	E494/173	0,94	0,24
E320/145	1,02	1,86	E511/157	1,06	2,24
E325/522	0,85	0,44	E514/129	0,96	0,91
E324/093	1,12	0,95	E621/139	1,17	4,28
E327/032+033	1,07	2,16	E546/118	1,26	2,23
E331/280	1,14	0,24	E571/230	0,91	4,12
E332/023	1,04	0,74			
E335/219	1,18	1,49			
E340/179	0,98	0,75			
E364/059	0,94	0,16			
E368/600	0,92	1,41			
E370/196	1,10	0,85			
E383/192	1,25	2,55			
E386/131	1,05	0,94			
E401/643	0,94	1,51			
E405/058	1,17	2,37			
E408/001	1,10	2,11			
E409/114	1,11	0,75			
E430/056	0,70	0,05			
E439/094	0,89	3,55			
E450/235	0,90	0,00			
E456/062	1,24	1,61			

\*Valores médios de cafeína e coeficiente de variação de duas análises.