



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

MERY YOVANA RENDÓN MAMANI

**OXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS E PROTEÍNAS NO CAFÉ CRU DURANTE O
ARMAZENAMENTO E SUA RELAÇÃO COM A PERDA DA QUALIDADE DA
BEBIDA**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP - PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIA DE
ALIMENTOS.**

**NEURA BRAGAGNOLO
Orientador**

Este exemplar corresponde à versão final da tese de doutorado defendida por Mery Yovana Rendón Mamani, aprovada pela comissão julgadora em ___/___/___ e orientada pela Profa. Dra. Neura Bragagnolo.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE
DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

R292o Rendón Mamani, Mery Yovana,
Oxidação de lipídios e proteínas no café cru durante o armazenamento e sua relação com a perda da qualidade da bebida / Mery Yovana Rendón Mamani. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Neura Bragagnolo.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Café - Secagem. 2. Espécies reativas de oxigênio.
3. *Coffea arabica*. 4. Ácidos graxos. I. Bragagnolo, Neura. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Oxidation of lipids and proteins in green coffee during storage and loss of beverage quality

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Coffee - Drying

Reactive oxygen species

Coffea arabica

Fatty acids

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Neura Bragagnolo [Orientador]

Maria Brígida dos Santos Scholz

Marta de Toledo Benassi

Paulo Mazzafera

Terezinha de Jesus Garcia Salva

Data da defesa: 19/03/2012

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Neura Bragagnolo (Orientadora)
FEA-UNICAMP

Dra. Maria Brígida dos Santos Sholz
IAPAR

Prof^a. Dra. Marta de Toledo Benassi
TAM-UEL

Prof. Dr. Paulo Mazzafera
IB-UNICAMP

Dra. Terezinha de Jesús Garcia Salva
IAC

Prof. Dr. Flávio Luis Schmidt
FEA-UNICAMP

Prof^a. Dra. Helena Maria André Bolini
FEA-UNICAMP

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado
FEA-UNICAMP

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que cruzaram minha vida no Brasil e contribuíram para meu aprendizado científico e pessoal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sua presença em todos os momentos, inclusive nos instantes em que a minha fé não se fazia mais presente.

A meu pai (Marcelino) e irmã (Nicolasa), que além do amor e apoio incondicional em todas as etapas da minha vida se esforçaram para garantir a melhor educação possível.

À professora Neura Bragagnolo, pela confiança, paciência, amizade e orientação dedicada ao desenvolvimento da minha tese de doutorado.

À pesquisadora Dra. Terezinha de Jesus Salva, pelas orientações, ajuda e amizade durante os anos de doutorado.

À Pesquisadora Maria Brígida dos Santos Scholz, pelo apoio técnico nos primeiros teste enzimáticos e ao laboratório de sementes do IAPAR, pela ajuda nos testes de viabilidade.

Ao professor Paulo Mazzafera, Ricardo Antunes de Azevedo e Priscila Gratão pela sugestão e colaboração no trabalho das enzimas.

Ao Eng. Nilton Fukushima pelo apoio ao desenvolvimento do trabalho com a doação das amostras IPR 98.

Aos provadores de café Roberto Scotton, Pedro Almeida, Tuneo Kague, Carlos Amaral, Rafael Amaral, Sergio Zambrini, Geraldo Fernandez, Giovanni Mantovani, Luis Ribeiro, Victor Matsubara, André Pereira, Francisco Cabral, Daniel Andrade, Fabiano Odebrecht e Marcos Bacceti pela colaboração e amizade.

Aos meus amigos Gretel Choque, Poliana Gurak, Renan Chisté, Fernanda Mandelli, Ana Augusta Xavier, Eliseu Rodrigues, Naira Rodrigues, Bruno Chacon,

Aline Medina, Walkíria Ribeiro, Marcella Marques, Elisângela Madalozzo, Elaine Ceresino, Hugo Souza, Adria Bentes, Gislaine Nogueira, Lilian Mariutti, Pedro Freitas, Lisiane Vissotto, Rosemar dos Santos e Silvia Vitorino. Todos de uma forma ou de outra me apoiaram e acompanharam durante esses 4 anos ficando gravados para sempre na minha memória.

As professoras Mary Anne Heidi Dolder e Sandra Maria Carmello do Instituto de Biologia da UNICAMP pelas orientações iniciais para desenvolvimento da parte de microscopia.

Aos membros titulares e suplentes, da banca da minha tese de doutorado pelas valiosas contribuições, críticas e sugestões científicas que certamente elevaram a qualidade do trabalho.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP e ao Departamento de Ciência de Alimentos que, juntamente com o programa de pós-graduação em Ciência de Alimentos, forneceram suporte estrutural para o desenvolvimento da minha tese.

E finalmente, mas não menos importante, a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo importante auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto de pesquisa e a CAPES pela bolsa de doutorado.

Muito Obrigada!

ÍNDICE GERAL

| | |
|------------------------|------|
| RESUMO GERAL | xiii |
| SUMMARY | xv |
| INTRODUÇÃO GERAL | 1 |

CAPÍTULO I

Revisão de literatura

| | |
|---|----|
| 1. O café e sua composição..... | 6 |
| 1.2.Processamento e secagem do grão..... | 9 |
| 1.2.1. Processamento de café por via seca..... | 9 |
| 1.2.2. Processamento do café por via úmida..... | 9 |
| 1.2.3. Secagem do café..... | 10 |
| 2. Envelhecimento do café cru..... | 12 |
| 3. Avaliação sensorial da bebida de café..... | 14 |
| 3.1. Avaliação de qualidade..... | 16 |
| 3.2. Avaliação da intensidade de atributos..... | 17 |
| 4. Referências bibliográficas..... | 19 |

CAPÍTULO II

Atividade de enzimas antioxidantes durante a secagem do café arábica

| | |
|---|----|
| Resumo..... | 26 |
| 1. Introdução..... | 27 |
| 2. Material e métodos..... | 28 |
| 2.1. Descrição e preparo das amostras..... | 28 |
| 2.2. Determinação de umidade..... | 29 |
| 2.3. Extração e quantificação de proteínas..... | 29 |
| 2.4. Atividades enzimáticas..... | 29 |

| | |
|---|----|
| 2.5. Quantificação de peróxido de hidrogênio..... | 30 |
| 3. Análise estatística..... | 30 |
| 4. Resultados e discussão..... | 30 |
| Referências bibliográficas..... | 35 |

CAPÍTULO III

Alterações no sabor e na qualidade da bebida de café durante a estocagem do grão cru

| | |
|--|----|
| Resumo..... | 38 |
| 1. Introdução..... | 39 |
| 2. Material e métodos..... | 41 |
| 2.1. Preparo das amostras..... | 41 |
| 2.2. Avaliação sensorial..... | 42 |
| 2.2.1. Avaliação da intensidade do sabor café descansado..... | 42 |
| 2.2.1.1. Recrutamento e pré-seleção de provadores..... | 43 |
| 2.2.1.2. Treinamento e avaliação do desempenho da equipe de análise sensorial..... | 43 |
| 2.2.1.3. Avaliação da intensidade do sabor café descansado nas amostras durante a estocagem..... | 44 |
| 2.2.2. Avaliação da qualidade da bebida das amostras durante a estocagem..... | 45 |
| 2.3. Análise estatística..... | 46 |
| 3. Resultados e Discussão..... | 46 |
| 3.1. Treinamento e desempenho da equipe na intensidade do sabor de café descansado..... | 46 |
| 3.2. Avaliação sensorial da bebida café..... | 48 |
| 4. Conclusões..... | 52 |
| Referências bibliográficas | 53 |

CAPÍTULO IV

Impacto das mudanças químicas nas características sensoriais durante a estocagem do café cru.

| | |
|---|----|
| Resumo..... | 58 |
| 1. Introdução..... | 59 |
| 2. Material e métodos..... | 61 |
| 2.1. Descrição e preparo das amostras..... | 61 |
| 2.2. Determinação de umidade..... | 62 |
| 2.3. Quantificação dos ácidos graxos e ácidos graxos livres no óleo de café..... | 62 |
| 2.4. Quantificação das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS)..... | 63 |
| 2.5. Quantificação de grupos carbonila..... | 64 |
| 2.6. Ácido 5-cafeoilquínico..... | 64 |
| 2.7. Parâmetros de cor..... | 65 |
| 2.8. Teste de viabilidade da semente..... | 65 |
| 2.9. Avaliação da intensidade do sabor café descansado..... | 66 |
| 2.10. Análise de microscopia eletrônica de transmissão..... | 66 |
| 2.11. Análise estatística..... | 67 |
| 3. Resultados e discussão..... | 67 |
| 3.1. Umidade..... | 67 |
| 3.2. Composição de ácidos graxos no óleo de café..... | 68 |
| 3.3. Ácidos graxos livres no óleo de café..... | 69 |
| 3.4. Quantificação das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) | 70 |
| 3.5. Quantificação de grupos carbonila | 71 |
| 3.6. Ácido 5-cafeoilquínico..... | 73 |
| 3.7. Viabilidade da semente..... | 74 |
| 3.8. Parâmetros de cor..... | 75 |
| 3.9. Sabor café descansado na bebida..... | 77 |
| 3.10. Microscopia eletrônica de transmissão..... | 78 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 3.11. Correlação das variáveis..... | 80 |
| 4. Conclusão..... | 81 |
| Referências bibliográficas | 82 |

| | |
|-------------------------------|-----------|
| CONCLUSÕES GERAIS..... | 87 |
|-------------------------------|-----------|

RESUMO GERAL

Mudanças na bebida e na cor dos grãos durante o armazenamento do café cru levam à perda do valor no mercado devido, provavelmente, a processos oxidativos nos lipídios. Durante a oxidação dos lipídios há formação de compostos muito reativos, os quais podem reagir com proteínas, ácidos clorogênicos e outros compostos presentes no grão cru. O objetivo do presente trabalho foi avaliar em café natural (CN) e café cereja descascado (CD) da cultivar IPR 98 as alterações nos lipídios, proteínas, ácido 5-cafeoilquínico, viabilidade da semente e na estrutura celular do grão, além das mudanças sensoriais na bebida e na cor do grão, verificando se a perda da qualidade sensorial durante a estocagem por 15 meses está relacionada com processos oxidativos. As modificações nos lipídios foram avaliadas pelo acompanhamento do processo oxidativo mediante análises de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) e no teor de ácidos graxos livres. A fração de ácidos graxos livres foi analisada por cromatografia gasosa após a extração com éter metil-t-butílico e fracionamento por cromatografia de permeação em gel. A oxidação de proteínas foi medida pelo método espectrofotométrico empregando dinitrofenilidrazina para a formação de osazonas. O teor do ácido 5-cafeoilquínico foi medido utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos. A avaliação da viabilidade da semente foi realizada mediante imersão em sal de tetrazólio, e a análise da estrutura celular foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão. As mudanças sensoriais avaliadas foram a qualidade global da bebida, a intensidade do sabor café descansado na bebida e a medida da cor nos grãos. No final da estocagem foi observado nos cafés CN e CD aumento do teor de ácidos graxos livres, do valor de TBARS e do número de grupos carbonilas nas proteínas, assim como diminuição do teor de ácido 5-cafeoilquínico e perda total da viabilidade da semente. A qualidade global da bebida aumentou até o nono mês da estocagem para o café CD e diminuiu nos meses seguintes, enquanto que para o café CN aumentou, mantendo-se até o final da estocagem. A intensidade do sabor café descansado aumentou durante todo o tempo da estocagem. Essas mudanças foram acompanhadas pelo branqueamento dos grãos de café. A microscopia revelou mudanças na estrutura celular durante a estocagem. A

presença de grupos carbonilas e os valores de TBARS encontrados no início da estocagem, além de trabalhos na literatura que relatam o desenvolvimento de estresse oxidativo durante a secagem, levaram a realizar um novo estudo analisando o comportamento de algumas enzimas antioxidantes durante a secagem de outra amostra de café (cultivar Mundo Novo), processado como café natural e café cereja descascado. Nestas amostras foram quantificadas as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), guaiacol-peroxidase (GOPX) e glutathione redutase (GR), além da quantificação simultânea de peróxido de hidrogênio. Durante a secagem foi observada maior atividade enzimática no café cereja descascado em comparação com o natural, e maior concentração de peróxido de hidrogênio no café natural do que no café cereja descascado. Considerando os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que as mudanças sensoriais observadas durante a estocagem são em parte decorrentes de processos oxidativos não enzimáticos, os quais podem ter sido iniciados durante a secagem do grão.

SUMMARY

Changes in beverage and coffee beans color during storage lead to loss of commercial value probably due to the oxidative processes in lipids. Oxidation of lipids lead to formation of reactive compounds which can react with proteins, chlorogenic acids and other compounds present in raw coffee beans. The present study was initiated to determine the relationship between changes in lipids, proteins, 5-cafeoylquinic acid and sensory characteristics; in addition it was evaluated the viability of the beans and the cell structure of the coffee beans processed as natural coffee and pulped natural coffee during the storage for 15 months. Lipid oxidation was evaluated as thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) and free fatty acids. Lipids were extracted with tertiary butyl methyl ether, fractionated by gel permeation chromatography and the fraction of free fatty acids analysed by gas chromatography. The protein carbonyl groups were quantified by following the dinitrophenylhydrazine coupling method. The 5-cafeoylquinic acid content was performed using high performance liquid chromatography. The viability of coffee beans was estimated by tetrazolium chloride test and the cellular structure was examined by transmission electron microscopy. The cup quality and rested coffee flavor using an intensity scale were used for the coffee beverage evaluation. The color was expressed in L^* , a^* and b^* . After 15 months of storage the free fatty acids content, the TBARS values and the number of carbonyl groups increased, while the 5-cafeoylquinic acid content decreased and the coffee bean viability was lost. The cup quality increased until the ninth month of storage and declined in subsequent months to pulped natural coffee while the cup quality to natural coffee not declined during the storage. The rested coffee flavor increased during storage, these changes were accompanied by bleaching of the coffee beans. The transmission electron microscopy revealed changes in the cell structure during the storage. The number of carbonyl groups and TBARS values at the beginning of the storage and the literature reporting the possibility of oxidation stress during the drying of the coffee beans led to a new study aiming to analyze the behavior of some antioxidant enzymes in other coffee sample processed as natural coffee and pulped natural coffee during the drying. The activity of superoxide dismutase (SOD), guaiacol-peroxidase (GOPX) and glutathione

reductase (GR) as well as hydrogen peroxide content were evaluated. Pulped natural coffee showed more enzyme activities and lower hydrogen peroxide concentration than natural coffee. The results suggested that the sensory changes occurrence during the coffee storage are at least partly due to non enzymatic oxidative process initiated during drying of coffee bean.

INTRODUÇÃO GERAL

As duas espécies do gênero *Coffea* com maior importância econômica são *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (BRANDO, 2004), conhecidas também no setor cafeeiro como café arábica e café robusta, respectivamente (CCI, 2002).

O Brasil é o maior produtor mundial de café, sendo a média da estimativa da produção de café beneficiado em 2012 de 50,61 milhões de sacas de 60 kg, das quais 25,48% devem corresponder ao café robusta e 74,50% ao café arábica (CONAB, 2012).

Diferenças sensoriais são percebidas entre o café robusta e o café arábica. O café robusta é amargo, encorpado e pouco ácido enquanto que o café arábica é mais aromático, apresenta mais acidez, menor corpo (WINTGENS, 2004) e maiores preços no mercado (ICO, 2012).

Após a introdução da espécie arábica no Brasil, em 1727, as mutações naturais e, principalmente, o melhoramento genético orientado foram responsáveis pelo grande desenvolvimento da cafeicultura nacional. Assim, hoje o país dispõe de cultivares com alta produtividade, qualidade, longevidade e resistentes à ferrugem, aptas para o cultivo nas diferentes regiões cafeeiras. Alguns melhoramentos genéticos resultaram nas cultivares, IAPAR 59, IPR 98, Catuaí e Mundo Novo (ITO et al., 2008; PIMENTA, 2003)

No Brasil, o café pode ser processado como café natural (café seco com casca), café cereja descascado (café seco sem casca) e café despulpado/lavado (café seco após a remoção da mucilagem dos frutos descascados) (PIMENTA, 2003).

Hoje é do conhecimento que se a secagem não for realizada de forma adequada pode levar a danos na membrana celular do grão, comprometendo a qualidade da bebida. Além disso, durante a secagem, o grão ainda vivo, apresenta marcadores de estresse e de germinação (BORÉM et al., 2008; KRAMER et al., 2010).

Durante o armazenamento o café perde a sua qualidade original, ocorrendo mudanças na bebida e na cor dos grãos que levam a perda do valor no mercado (ROJAS, 2004). Estas alterações ocorrem em todos os cafés, independentemente da forma de processamento.

A hidrólise enzimática dos triacilglicerídios tem sido considerada como a causa inicial da perda da qualidade do café no armazenamento, desde que ela aumenta a quantidade dos ácidos graxos livres (KURZROCK et al., 2004), favorecendo a oxidação dos mesmos (WARAHO et al., 2011).

Pesquisas com derivados de carne e de soja demonstraram que a interação de produtos da oxidação de lipídios com proteínas pode gerar mudanças sensoriais e que da oxidação de proteínas pode resultar compostos de cor marrom (ESTÉVEZ et al., 2007; LIANG, 1999; GARDNER, 1979). Neste sentido, não se pode descartar a oxidação das proteínas como uma das causas da perda da qualidade sensorial do café durante o armazenamento.

Considerando a composição do café arábica, com cerca de 12% de proteína e 14% de lipídios e os efeitos deletérios potenciais dos radicais resultantes dos lipídios oxidados, o presente trabalho teve como principal objetivo avaliar em café cereja natural (CN) e café cereja descascado (CD) da cultivar IPR 98 as alterações nos lipídios, proteínas, ácido 5-cafeoilquínico, viabilidade da semente e na estrutura celular do grão, além das mudanças sensoriais na bebida e na cor do grão, verificando se a perda da qualidade sensorial durante a estocagem por 15 meses está relacionada com processos oxidativos, apresentados nos capítulos 2 e 3. Além disso, de acordo com os primeiros resultados da estocagem foi avaliada em outra amostra de café (cultivar Mundo Novo) a atividade enzimática de algumas enzimas antioxidantes e o teor de peróxido de hidrogênio durante a secagem, apresentado no capítulo 1, com o objetivo de avaliar a possibilidade da geração de um estresse que possa explicar a origem das mudanças sensoriais durante a estocagem.

Referências bibliográficas

BRANDO, Carlos. Harvesting and green coffee processing. In: WINTGENS J.N. **Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production**, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004. p. 604-715.

BORÉM, F. M.; MARQUES, E. R.; ALVES, E. Ultrastructural analysis of drying damage in parchment Arabica coffee endosperm cells. **Biosystems Engineering**, v.99, n.1, 62-66, 2008.

CCI. Centro de Comercio Internacional. Calidad del café In: CCI-UNCTAD/OMC. **Café guia del exportador**. Ginebra: Centro de Comercio Internacional UNCTAD/OMC. 2002. p. 270-321.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. 1º Estimativa café-safra/2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 9/1/2012.

ESTÉVEZ, M.; VENTANAS, S.; CAVA, R. Oxidation of lipids and proteins in frankfurters with different fatty acid compositions and tocopherol and phenolic content. **Food Chemistry**, v.100, n.1, 55-63, 2007.

GARDNER, H. W. Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: A review. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.27, n.2, 220-228, 1979.

ICO – International coffee Organization. ICO indicator prices. Disponível em: www.ico.org Acesso em: 02/02/2012.

ITO, D. S.; SERA, T.; SERA, G. H.; DEL GROSSI, L. K.; KANAYAMA, F. S. Resistance to bacterial blight in arabica coffee cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.8, n.2, 99-103, 2008.

KRAMER, D.; BREITENSTEIN, B.; KLEINWÄCHTER, M.; SELMAR, D. Stress metabolism in green coffee beans (*Coffea arabica* L.): expression of dehydrins and accumulation of GABA during drying. **Plant and Cell Physiology**, v.51, n.4, 546-553, 2010.

KURZROCK, T.; KÖLLING-SPEER, I.; SPEER, K. Effect of controlled storage on the lipid fraction of green arabica coffee beans. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE 20th (ASIC), **Proceeding...** Bangalore, 2004, cdroom.

LIANG, H. Fluorescence due to interactions of oxidizing soybean oil and soy PROTEINS. **Food Chemistry**, v.66, n.1, 103-108, 1999.

PIMENTA, Carlos. Preparo, secagem e qualidade. In: PIMENTA, C.J. **Qualidade de café**. Lavras: UFLA, 2003. p. 73-97.

ROJAS Jesus. Green coffee storage. In: WINTGENS J.N. **Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH &Co. KGaA, 2004. p. 733-750.

WARAHO, T.; MCCLEMENTS, D.; DECKER, E. A. Impact of free fatty acid concentration and structure on lipid oxidation in oil-in-water emulsions. **Food Chemistry** , v.129, n.3, 854-859, 2011.

WINTGENS Jean. Factor influencing the quality of green coffee. In: WINTGENS J.N. **Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH &Co. KGaA, 2004. p. 789-808.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1. O café e sua composição

O café é definido como o grão e a cereja do cafeeiro seja em pergaminho, grão cru ou torrado, das espécies do gênero *Coffea* (BRASIL, 2010).

O café comercial pertence principalmente a duas espécies: *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, as quais apresentam diferentes características. O café arábica (*Coffea arabica*), geralmente cresce em maiores altitudes e apresenta bebidas pouco encorpadas, ácidas e aromáticas. O café canephora, (*Coffea canephora*) principalmente representado pela variedade Robusta, é um café produzido em regiões de menor altitude, apresentando bebida mais encorpada, amarga, menos aromática e menos ácida do que o café arábica (BRANDO, 2004).

Na revisão de literatura, que trata das mudanças citológicas, bioquímicas e moleculares durante o desenvolvimento do fruto do café, De Castro e Marracini (2006) apresentaram as partes do fruto (Figura 1), onde se observa, a polpa (mesocarpo), o perisperma, o embrião e o endosperma, o qual é chamado comercialmente de grão de café.

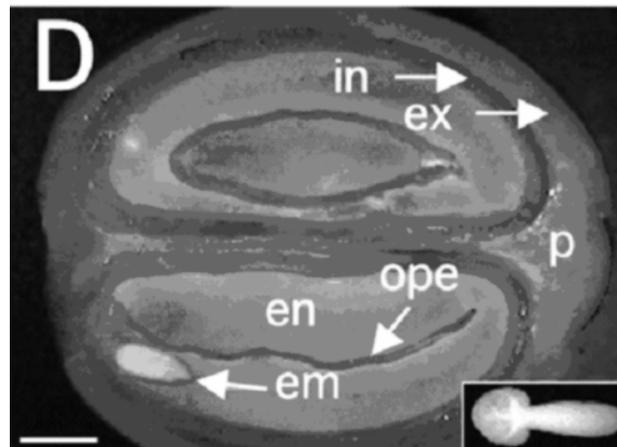


Figura 1- Seção longitudinal do fruto de café: in (parte interna do mesocarpo), ex (parte externa do mesocarpo), p (pericarpo), ope (perisperma), en (endosperma), em (embrião).

Dentan (1985) estudando a estrutura do endosperma de café por microscopia de luz, microscopia de transmissão eletrônica e microscopia eletrônica de varredura observou que a maior parte dele é constituída por células parenquimáticas de reserva.

Os compostos lipídios, excluindo terpenos e ceras, foram encontrados em forma de gotas cobertas com uma camada fina de proteínas, distribuídos homogeneamente em todo o endosperma, apresentando entre eles pequenas quantidades de ácidos clorogênicos. As proteínas encontraram-se em pequena quantidade nas paredes celulares e em maiores quantidades no citoplasma como corpos proteicos, podendo estar associado com lipídios e vacúolos contendo ácidos clorogênicos. Os polissacarídeos foram localizados, principalmente, nas paredes celulares (celulose e hemicelulose) e outros carboidratos foram também encontrados no citoplasma, dentro de estruturas tipo vacúolos. A cafeína e os ácidos clorogênicos também foram encontrados no citoplasma assim como os sais de minerais, entre eles oxalato de cálcio dihidratado, fosfato de cálcio e sais de potássio (DENTAN,1985).

A composição do grão de café apresenta variações, Mori et al. (2003) avaliando a composição de 80 amostras de café arábica cru de diversas regiões do Brasil encontraram umidades na faixa de 8,1 a 12,7%, açúcares totais entre 4,5 e 11,2%, cafeína entre 0,8 e 1,3%, trigonelina entre 0,7 e 1,2% , fibra bruta entre 9,8 e 15,7%, proteína (N x 6,25) entre 9,8 e 15,9% e diversos minerais (potássio, cálcio, fósforo, magnésio, ferro, cobalto, cobre).

Ludwing et al. (1995) encontraram na fração protéica (solúvel) do café arábica proveniente da Colombia 89% de proteína (N x 6,25), 4% de cinzas, 6% de água, 0,04% de carboidratos e fenóis complexados com íon ferro. As proteínas encontradas foram albuminas e globulinas correspondendo aproximadamente a 15% e 85%, respectivamente. Os N-terminais dos aminoácidos eram compostos, principalmente, por glicina (36%), glutamina (15%), asparagina (10%) e os componentes minoritários eram leucina, arginina, ácido aspártico, glutamina,

histidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina e valina.

Segundo Rogers et al. (1999), uma parte das proteínas do café se encontra como proteína de reserva. Essas proteínas pertencem ao grupo 11S, as quais também são encontradas em leguminosas. Esses autores estimaram que as proteínas de reserva representam, aproximadamente, 45% da proteína total do grão de café.

A fração lipídica do café arábica cru representa em torno de 15% do grão, e apresenta uma composição de triacilglicerídios similar à dos óleos comestíveis (SPEER, KÖLLING-SPEER, 2006). Nikolova-Damyanova et al. (1998), trabalhando com lipídios de café da variedade Catuaí Vermelho colhido no Brasil, encontraram triacilglicerídios (75%), ésteres de terpenos (14%), acilglicerídios (5%), ácidos graxos livres (1%), esteróis livres (1,5%), ésteres de esteróis (1%) e lipídios polares (menos de 1%). Entre os ácidos graxos, o mirístico, o palmítico, o palmitoléico, o oleico, o linoleico, o α -linolênico, o esteárico, o araquidônico e o behênico foram identificados.

Outros compostos importantes no endosperma do café são os compostos fenólicos, os quais são metabólitos secundários de plantas envolvidos na adaptação a condições de estresse ambiental. Os ácidos clorogênicos e compostos relacionados são os principais componentes da fração fenólica, alcançando teores de até 14% em base seca. Em geral, os valores descritos na literatura para o total de ácidos clorogênicos, em base seca, estão entre 4 a 8,4% para *Coffea arabica* (FARAH, DONANGELO, 2006). Os ácidos clorogênicos constituem 5 grupos principais classificados como ácido cafeoilquínico (ACQ) com 3 isômeros (3-, 4- e 5-ACQ); ácido dicafeoilquínico (diACQ) com 3 isômeros (3,4-diACQ; 3,5-diACQ; 4,5-diACQ); ácido feruloilquínico (AFQ) com 3 isômeros (3-, 4- e 5-AFQ); ácido *p*-coumaroilquínico (*A_pCoQ*) com 3 isômeros (3-, 4- e 5-*A_pCoQ*) e 6 diéster do ácido cafeoil-feruloil-quínico (ACFQ). Em ordem de abundância nos grãos de café cru o ácido 5-cafeoilquínico representa entre 56 a 62% do total dos ácidos clorogênicos (FARAH, DONANGELO, 2006).

Propriedades antioxidantes dos polifenóis presentes no grão cru foram observadas por Budryn et al. (2011) ao verificarem a diminuição da velocidade do processo oxidativo do óleo de girassol em presença de extrato de café cru, durante a estocagem por 12 semanas.

1.2. Processamento e secagem do grão

Após a colheita do café, procede-se ao processamento dos frutos, que pode ser no Brasil realizado por via seca e via úmida.

1.2.1. Processamento do café por via seca

A primeira operação é a lavagem e separação do café em duas frações diferentes, o café-bóia (café que perdeu umidade na árvore) com menor densidade e os cafés maduros (cereja) e imaturos (verde), que são mais pesados, e devem ser separados também das impurezas. Nesse caso, a secagem desses lotes, separadamente, permite a obtenção de um produto mais uniforme. No caso de não haver lavador, o café colhido é encaminhado para a secagem em terreiro ou secador, sendo que uma pré-secagem no terreiro é necessária antes do uso do secador (PIMENTA, 2003). Por esse processo se obtém o café natural ou cereja natural.

1.2.2. Processamento do café por via úmida

De acordo com Pimenta (2003) o preparo por via úmida fornece cafés cereja descascados e despulpados/lavados.

O preparo do café despulpado/lavado consiste na retirada da casca do fruto maduro por meio de um descascador mecânico, e posterior fermentação da mucilagem e lavagem dos grãos. A fermentação leva à solubilização e digestão da mucilagem por microrganismos presentes no ambiente.

Diferentemente do café despulpado, o café cereja descascado não é submetido à fermentação. Nesse processo, somente é retirada a casca do fruto utilizando uma máquina descascadora, para então ser seco em terreiro e/ou secador.

1.2.3. Secagem do café

Uma parte importante do processamento do café é a secagem do grão, etapa fundamental para manter a qualidade do produto. Temperaturas muito elevadas na secagem danificam a estrutura interna do grão (BORÉM et al., 2008), facilitando o contato entre enzimas, substratos e pro-oxidantes.

Borém et al. (2008) avaliaram as alterações na estrutura do endosperma de grãos de café submetidos a diferentes temperaturas de secagem (40, 50 e 60 °C). A partir dos estudos histoquímicos observaram que nos grãos secos a 40 °C a integridade celular foi mantida. Em contraste, no endosperma de grãos secos a 60°C observaram a fusão dos corpos lipídicos, com formação de grandes gotas no espaço intercelular, indicando a ruptura de corpos lipídicos e membrana celular.

O endosperma do café durante o processamento apresenta um metabolismo ativo, o qual foi verificado através do consumo de glicose e frutose, e pelo aumento de aminoácidos livres durante a secagem (KLIENWÄCHTER, SELMAR, 2010; KNOPP et al., 2006; SELMAR et al., 2001).

Durante o processamento de café natural e despulpado Selmar et al. (2006) avaliaram a expressão do gene que codifica a enzima chave do ciclo do glioxalato, a isocitrato liase, para determinar a transição do estado da embriogênese para o estado de germinação. Adicionalmente, estes pesquisadores avaliaram a presença de β -tubulina, como marcador da ativação da divisão celular. Os resultados mostraram que durante o processamento do café inicia-se a germinação.

A possibilidade do desenvolvimento de um estresse, além do desenvolvimento da germinação, durante o processamento levaram Kramer et al. (2010) a estudar o acúmulo do ácido δ -aminobutírico, o aumento da expressão do gene de desidrinas e da expressão do gene da enzima isocitrato liase. Os resultados obtidos por estes autores revelaram a ocorrência da germinação e estresse por secagem durante o processamento do café despulpado.

Ácidos graxos livres podem atuar como agente desestabilizante das membranas celulares e sua presença em cafés recém colhidos foi reportado na literatura por Dussert et al. (2006). Esses autores também encontraram perdas significativas de glutatationa reduzida (GSH) e de ascorbato (L-AA), que são marcadores de estresse oxidativo durante a secagem.

Nas células vegetais, organelas tais como, cloroplastos, mitocôndrias ou peroxissomas são as maiores fontes de espécies reativas de oxigênio (ROS) devido à atividade metabólica altamente oxidativa que nelas se desenvolve. Na luz, os cloroplastos e peroxissomas são as principais fontes de ROS e no escuro, são as mitocôndrias. O estresse pode levar ao incremento de ROS causando dano celular. Estima-se que 1 a 2% do oxigênio consumido leva à formação de ROS, o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pode levar a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxilas ($\bullet OH$), e outras ROS altamente reativas causando dano em proteínas, lipídios, carboidratos e DNA, resultando em morte celular (GILL, TUTEJA, 2010).

Para a detoxificação de ROS as plantas possuem um sistema de defesa não enzimático formado por ascorbato, glutatationa, flavonóides, alcalóides, compostos fenólicos, aminoácidos não protéicos, tocoferol e carotenóides. Conta também com um sistema enzimático antioxidante que atua em sincronia, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a guaiacol peroxidase (GOPX), a ascorbato peroxidase (APX) e a glutatationa redutase (GR) (GRATÃO et al., 2005; FRANÇA et al., 2007).

A ação de enzimas antioxidantes em café foram estudadas em relação à resistência a *Hemileia vastatrix* nas plantas, em culturas de células contaminadas com $CdCl_2$ e o efeito da aplicação de peróxido de hidrogênio na abertura e fechamento de estômatos de mudas de cafeeiro. Em todos esses estudos foram encontrados aumento na atividade de enzimas antioxidantes (GUERRA-GUIMARÃES et al., 2008; GOMES-JUNIOR et al., 2006; DEUNER et al., 2008).

2. Envelhecimento do café cru

Em trabalhos feitos com grãos de café beneficiados e armazenados, tem-se verificado mudanças no sabor da bebida e na cor dos grãos em extensão variada (GODINHO et al., 2000; CORADI et al., 2008; RIBEIRO et al., 2011). A mudança da cor do grão (branqueamento) e o aparecimento do sabor amadeirado na bebida são características de um café velho e está relacionado com o tempo e as condições de armazenamento do grão cru (ROJAS, 2004; CCI, 2002).

Leite et al. (1998), estudando as diferenças entre os cafés processados por via seca (café natural) e por via úmida (cereja descascado) verificaram que nesse último a mudança de sabor era mais rápida do que no café natural, além de nele ocorrer a perda da cor mais rapidamente, com tendência ao branqueamento.

Coradi et al. (2008) avaliaram a cor do grão, a qualidade da bebida e a acidez do óleo de café natural e café despulpado, após diferentes tipos de secagem e armazenamento. Esses pesquisadores verificaram que a acidez do óleo aumentou ao longo do tempo de armazenamento, tanto quanto a 60 e 80% de umidade relativa, sendo que a perda da cor e a qualidade da bebida do café foram maiores quando armazenado a 80% de umidade relativa.

Selmar et al. (2008), estudando as mudanças dos precursores do aroma durante a estocagem do grão de café, sugerem que a perda da qualidade da bebida está relacionada com a perda da viabilidade e não com a mudança na composição de açúcares e aminoácidos. Begnami (1998) observou que a perda da viabilidade leva ao surgimento de alterações estruturais durante a estocagem da semente de café.

Alterações na fração lipídica têm sido apontados como responsáveis pelo envelhecimento do café cru. A atividade de lipase durante a estocagem foi confirmada por Kurzrock et al. (2004), que observaram aumento de ácidos graxos livres e de diterpenos livres em cafés estocados a 12, 25 e 40 °C e umidades relativas de 6,2, 11,8 e 13,5% durante 18 meses.

Com a oxidação dos lipídios formam-se radicais que são altamente reativos e podem alterar outros compostos presentes no alimento como

pigmentos, proteínas e vitaminas, tal como acontece em produtos derivados de carne (ESTÉVEZ et al., 2007) e de soja (LIANG, 1999). A oxidação de proteínas causada pelos radicais hidroperóxidos de lipídios pode gerar radicais de proteína, quebra da proteína, complexos de proteínas por meio de ligações cruzadas e complexos de lipídios-proteínas. (GARDNER, 1979).

Corpos lipídicos presentes no endosperma do café estão rodeados por uma película proteica chamada oleosina (SIMKIM et al., 2006) e esta associação de proteínas e lipídios pode facilitar os processos oxidativos.

Os agregados ou complexos resultantes da oxidação de proteínas foram confirmados por Huang et al. (2006) em farinha de soja. Esses autores observaram que a ação enzimática da lipoxigenase facilitou a oxidação do ácido linoléico, gerando radicais livres muito reativos. Esses radicais hidroperóxidos alteraram a estrutura protéica, causando a oxidação de proteínas e o aumento da hidrofobicidade.

Especies reativas de oxigênio (ROS) também podem causar a oxidação de proteínas, provocando a hidroxilação de grupos aromáticos e alifáticos, a nitração de grupos aromáticos, a nitrosilação de grupos sulfidrílicos e a conversão de alguns aminoácidos laterais da cadeia de proteína a derivados carbonila (STADMAN, LEVINE, 2003).

Saath (2010), estudando a possibilidade de um estresse e a mudança na qualidade da bebida durante a estocagem, encontrou diminuição na atividade de enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e peroxidase) e mudanças no perfil eletroforético da proteína relacionada à tolerância a dessecação (LEA-late embryogenesis) além, da perda da qualidade da bebida.

Outra possível consequência da oxidação dos lipídios é a mudança da cor do produto. Na degradação dos hidroperóxidos, formam-se produtos secundários, tais como, malonaldeído e diversos aldeídos, os quais reagem com os grupos amino formando bases de Schiff, que participam da formação de compostos de cor marrom (GARDNER, 1979).

Liang (1999) estudando o composto resultante da interação de proteínas e lipídios, em soja, observou que este apresentava o espectro de fluorescência similar às das estruturas das bases de Schiff.

Pokorny et al. (1975) apontaram a reação de Maillard como a responsável pela mudança na cor dos grãos de café durante a estocagem, uma vez que encontraram diminuições de aminoácidos livres, variações de açúcares redutores e produção de pigmento marrom na estocagem de café a 60°C e 51% de umidade relativa. Esses autores também propuseram tres causas para a mudança da cor, a primeira resultante da reação de açúcares redutores com aminoácidos livres, a segunda devido à interação de derivados de aminoácidos com quinonas resultantes da oxidação de ácidos clorogênicos ou outros compostos fenólicos e a terceira proveniente da reação de derivados de aminoácidos com produto da oxidação de lipídios.

Embora ainda não estejam definidas as causas das mudanças sensoriais no café cru, o interesse por retardá-las levam a propor formas alternativas de embalagem. Ribeiro et al. (2011) testaram uma embalagem de atmosfera modificada com injeção de CO₂, conseguindo após 1 ano de estocagem melhor qualidade sensorial no café em comparação com o café embalado em sacas de juta e estocado nas mesmas condições.

3. Avaliação sensorial da bebida de café

As características sensoriais da bebida de café percebidas na xícara são consequência de vários fatores, tais como, a variedade, os fatores edafoclimáticos, tratos culturais, processamento, torração e preparo da bebida (WINTGENS, 2004; SCAA, 2011).

O número de características sensoriais avaliadas na bebida de café é variável. Segundo Mori (2001), na bebida do café pode-se avaliar, o aroma, a acidez, o amargor, o sabor, o corpo, o sabor residual, a adstringência e a fragrância do pó de café torrado. Por outro lado, para Puerta (1996) as características que definem a qualidade da bebida são o aroma, a acidez, o

amargor, o corpo, a impressão global e a intensidade da fragrância do pó de café torrado. Desta forma, observa-se que o número de atributos avaliados na bebida de café varia de acordo com o critério estabelecido pelos pesquisadores.

A Instrução Normativa N° 16 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento que será obrigatória a partir do 22 de fevereiro de 2013 descreve as seguintes características sensoriais a ser avaliadas no café torrado:

- a) acidez; a percepção causada por substâncias como ácido clorogênico, cítrico, málico e tartárico que produzem gosto ácido;
- b) adstringência: sensação de secura na boca deixada após a ingestão da bebida;
- c) amargor: a percepção de gosto causado por substâncias como cafeína, trigonelina, ácido caféico e quínico e outros compostos fenólicos que produzem o gosto amargo;
- d) aroma da bebida: a percepção olfativa causada pelos gases liberados do café torrado e moído, após a preparação da bebida, conforme os compostos aromáticos que são inalados pelo nariz;
- e) corpo: a percepção tátil de oleosidade e viscosidade na boca;
- f) fragrância do pó: a percepção olfativa causada pelos gases liberados do café torrado e moído, conforme os composto aromáticos que são inalados pelo nariz;
- g) influência dos grãos defeituosos: as sensações percebidas na degustação da bebida produzidas pela presença de impurezas e grãos defeituosos do café;
- h) sabor: a sensação causada pelos compostos químicos da bebida quando introduzida na boca; e
- i) sabor residual: a persistência da sensação de sabor após a ingestão da bebida de café (BRASIL, 2010)

3.1. Avaliação de qualidade

A qualidade, geralmente definida como o conjunto de características de um bem ou serviço que satisfaz ao consumidor, deve ser acompanhada de uma consistência de qualidade, ou seja, oferecer sempre o produto ou serviço com as mesmas características (MUÑOZ et al., 1992). Dalí a importância da aplicação de testes sensoriais para o controle de qualidade.

Esses testes envolvem a classificação dos atributos de qualidade estabelecidos para um produto determinado, podendo avaliar características específicas do produto ou a qualidade global. Para o teste de qualidade os provadores devem ser treinados com amostras de referência ou níveis de qualidade. Desta forma, os avaliadores devem conhecer bem as características e o critério de qualidade do produto. Esse tipo de teste não é recomendado quando o critério de qualidade não está bem entendido pela equipe de avaliação desde que, pode-se medir a preferência pessoal de cada participante e não a qualidade do atributo (MUÑOZ et al., 1992).

Para a comercialização do café cru empregam-se provadores especialistas na avaliação da qualidade da bebida de café, os quais são formados por meio da experiência de anos de treinamento. No trabalho diário esses provadores podem experimentar até mais de 200 amostras, cujas bebidas são classificadas em diferentes categorias e com base em suas avaliações são comercializadas grandes quantidades de café (FERIA, 2002; TOMINAGA et al., 2002).

Uma forma de avaliar o café no Brasil com fins comerciais é por meio da prova da xícara, em que a bebida é classificada em 7 categorias (rio zona, rio, riado, dura, apenas mole, mole, estritamente mole). O café torrado e moído é colocado numa xícara na proporção de 8 - 10 g de amostra para 100 mL de água filtrada quente. Os primeiros vapores saídos da xícara são avaliados pelo provador para obter um julgamento preliminar da qualidade das amostras, e quando a temperatura da bebida diminuir realiza-se a degustação utilizando uma colher de prova, a qual se deve limpar com água entre as avaliações das amostras. Neste

momento, realiza-se uma forte sucção, para que o líquido penetre na boca, atingindo toda a cavidade bucal, conservando-a apenas o tempo suficiente para sentir o sabor e os aromas, devolvendo a quantidade sorvida à cuspeira (BRASIL, 2003).

Outra forma de avaliar o café com fins comerciais é pela metodologia da Associação Americana de Cafés Especiais (SCAA, 2011), cujo questionário da prova que avalia a qualidade da bebida, utiliza escalas estruturadas, tanto para quantificar os defeitos na bebida, como para determinar a qualidade dos atributos, fragrância, corpo, aroma, sabor e sabor residual.

Utilizando a metodologia da SCAA Ribeiro et al. (2011) avaliaram a qualidade da bebida durante a estocagem de café em uma embalagem de atmosfera modificada com injeção de CO₂, sendo avaliado a cada 3 meses durante 1 ano, não encontrando variações significativas nas avaliações sensoriais.

3.2. Avaliação da intensidade de atributos

Técnicas de análise descritiva tem sido utilizados na avaliação sensorial de café com fins de pesquisa (KITZBERGER et al., 2010; LIDINGER et al., 2009). Na análise descritiva, o provador descreve qualitativamente e quantitativamente, atributos sensoriais presentes no alimento (DUTCOSKY, 2011).

No treinamento é preciso utilizar amostras padrões de intensidade para cada atributo sensorial. Portanto, os provadores devem ser treinados a usarem escalas de forma consistente com relação à equipe sensorial, com relação às amostras e durante todo o período de avaliação (DUTCOSKY, 2011; MEILGAARD et al., 1999).

A intensidade ou o aspecto quantitativo da análise descritiva expressa o grau no qual cada atributo está presente, sendo expresso como um valor numa escala de medida (MEILGAARD et al., 1999). Entre as vantagens têm-se o conhecimento da intensidade da sensação e a direção das diferenças entre as amostras. Através das escalas é possível descobrir o quanto as amostras diferem entre si e qual a amostra que apresenta maior intensidade do atributo sensorial

que está sendo medido. Entre as desvantagens têm-se a necessidade de maior treinamento e a habilidade do provador (DUTCOSKY, 2011).

Na análise descritiva pode ser usada uma escala não estruturada que consiste numa linha inteira ancorada nos extremos, por termos que indicam a intensidade do atributo. O provador marca um traço no ponto da escala que melhor represente a intensidade de sua sensação, o dado é obtido medindo-se a distância, em cm, marcada na linha a partir do extremo esquerdo da escala. Outras escalas, como a escala estruturada e a escala de magnitude também podem ser utilizadas (MEILGAARD et al., 1999).

No trabalho de monitoramento da qualidade do café torrado, Mori et al. (2003) utilizaram uma equipe de provadores treinados para o uso de uma escala estruturada de 10 cm, avaliando a intensidade dos atributos, acidez, adstringência, doçura, amargor e corpo entre outras. Esta avaliação é diferente da avaliação sensorial descrita na normativa do MAPA de 2010 (BRASIL, 2010).

Aino e Motoyoshi (2001) propuseram uma escala estruturada para medir a intensidade da acidez na bebida de café preparada com diferentes graus de torra. Para isto, utilizaram 12 soluções de ácido tartárico em diferentes concentrações: 0,00848; 0,01041; 0,01277; 0,01567; 0,01922; 0,02358; 0,02893; 0,03549; 0,04354; 0,05341; 0,06553; 0,08039% (p/v). Cada concentração correspondia a um ponto da escala de intensidade de acidez (1; 1,3; 1,6; 2,0; 2,5; 3,2; 4,0; 5,0; 6,3; 7,9; 10 e 13).

O perfil livre é uma técnica de análise sensorial descritiva, é chamada “livre” porque desde o princípio, até o fim da avaliação o julgador tem a liberdade de usar os termos descritivos que desejar, na quantidade que desejar. Cada julgador desenvolve sua própria terminologia e, portanto, sua própria ficha de análise quantitativa e deve usar os termos de forma consistente durante a avaliação das amostras (DUTCOSKY, 2011). Esta metodologia foi empregada por Kitzberger et al. (2010) para descrever as características sensoriais da bebida de café correspondente a diferentes cultivares de café arábica produzidos nas mesmas condições edafoclimáticas, utilizando uma escala híbrida de 10 cm

ancorada nos extremos com expressões de intensidade para cada atributo estudado.

Bucheli et al. (1998) estudando a influência da forma da estocagem do café robusta cru na bebida avaliaram a intensidade do aroma, sabor, corpo amargor, frutado, sabor amadeirado e sabor químico, utilizando uma escala de 6 pontos (nenhum, baixo, baixo meio, médio, médio alto e alto). Nesta escala o ponto "0" (nenhum) correspondia a um café sem estocagem o qual foi congelado e comparado com as amostras do estudo a cada mês durante os 8 meses de avaliação.

Desta forma, o uso de escalas de intensidade na avaliação sensorial de café permite avaliar melhor as características específicas da bebida de café em função do objetivo da pesquisa.

4 Referências bibliográficas

AINO, K.; MOTOYOSHI, M. Application of a ratio scale to coffee evaluation. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE 19th (ASIC), **Proceeding**... Trieste, 2001, cdroom,

BEGNAMI, Cristiana. **Alterações estruturais, ultraestruturais e bioquímicas durante a perda da viabilidade em sementes de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho**. 1998. 118p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

BORÉM, F.M.; MARQUES, E.R.; ALVES, E. Ultrastructural analysis of drying damage in parchment Arabica coffee endosperm cells. **Biosystems Engineering**, v.99, n.1, 62-66, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2003). Regulamento técnico de identidade e qualidade para a classificação do café beneficiado grão cru. Instrução normativa nº8 de 11 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2010). Regulamento técnico para o café torrado em grão e para o café torrado e moído. Instrução normativa nº16 de 24 de maio de 2010.

BRANDO, Carlos. Harvesting and green coffee processing. In: WINTGENS J.N. **Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production**, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004. p. 604-715.

BUCHELI, P.; MEYER, I.; PITTET, A.; VUATAZ, G.; VIANI, R. Industrial storage of green Robusta coffee under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.11, 4507-4511, 1998.

BUDRYN, G.; NEBESNY, E.; ZYZELEWICZ, D. Oxidative stability of lard and sunflower oil supplemented with coffee extracts under storage conditions. **Grasas y aceites**, v.62, n.2, 155-161, 2011.

CCI. Centro de Comercio Internacional. Calidad del café In: CCI-UNCTAD/OMC. **Café guía del exportador**. Ginebra: Centro de Comercio Internacional UNCTAD/OMC. 2002. p. 270-321.

CORADI, P.C.; BORÉM, F.M.; OLIVEIRA, J.A. Qualidade do café natural e despulpado aos diferentes tipos de secagem e armazenamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.12, n.2, 181-188, 2008.

DENTAN, Eliane. The microscopic structure of the coffee bean. In: CLIFFORD M.N.; WILLSON K.C. **Coffee Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage**. Westport: AVI Publishing Company, 1985. p.284-304.

DEUNER, S.; ALVES, J. D.; FRIES, D.; ZANANDREA, I.; LIMA, A.; HENRIQUE, P.; GOULART, P. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. **Ceres**, v.55, n.2, 135-140, 2008.

DUSSERT, S.; DAVEY, M.W.; LAFFARGUE, A.; DOULBEAU, S.; SWENNEN, R.; ETIENNE, H. Oxidative stress, phospholipid loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds. **Physiologia Plantarum**, v.127, n.2, 192-204, 2006.

DUTCOSKY, S. **Análise Sensorial de Alimentos**. 2Ed. Curitiba, Editorial Champagnat, 2011. 426p.

DE CASTRO, R.; MARRACINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.18, n.1, 175-199, 2006.

ESTÉVEZ, M.; VENTANAS, S.; CAVA, R. Oxidation of lipids and proteins in frankfurters with different fatty acid compositions and tocopherol and phenolic content. **Food Chemistry**, v.100, n.1, 55-63, 2007.

FARAH, A.; DONANGELO, M.C. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.18, n.1, 23-26, 2006.

FERIA, A. M. Examining the case of green coffee to illustrate the limitations of grading systems/expert tasters in sensory evaluation for quality control. **Food Quality and Preference**, v.13, n.6, 355-367, 2002.

FRANÇA, M.B.; PANEK, A.D.; ELEUTHERIO, E.C.A. Oxidative stress and its effects during dehydration. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Parte A v.146, n.4, 621-631, 2007.

GARDNER, H. W. Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: A review. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.27, n.2, 220-228, 1979.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, n.12, 909-930, 2010.

GODINHO, R. P.; VILELA E. R.; OLIVEIRA, G. A.; CHAGAS S. J. R. Variações na cor e na composição química do café (*Coffea arabica* L.) armazenado em coco e beneficiado. **Revista Brasileira de Armazenamento**, especial 1, 38-43, 2000.

GOMES-JUNIOR, R.A.; MOLDES, C.A.; DELITE, F.; POMPEU, G.B.; GRATÃO, P.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.; AZEVEDO, R. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, v.65, n.8, 1330-1337, 2006.

GRATÃO P.L.; POLLE A.; LEA P.J.; AZEVEDO R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v.32, n.6, 481-494, 2005.

GUERRA-GUIMARÃES L.; CARDOSO S.; MARTINS I.; LOUREIRO A.; BERNARDES DA SILVA A.; VÁRZEA V.M.P.; SILVA M.D.C. Differential induction of Superóxido Dismutase in *Coffea arabica-Hemileia vastatrix* interactions. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE 22 th (ASIC), **Proceeding...** Campinas, 2008, cdroom.

HUANG, Y.; HUA, Y.; QIU, A. Soybean protein aggregation induced by lipoxygenase catalyzed linoleic acid oxidation. **Food Research International**, v.39, n.2, 240-249, 2006.

KITZBERGER, C.S.G.; SCHOLZ, M.B.S.; SILVA, J.B.G.D.; BENASSI, M.T. Caracterização sensorial de cafés arábica de diferentes cultivares produzidos nas mesmas condições edafoclimáticas. **Brazilian Journal of Food Technology**, DOI:10.4260/BJFT201114E0001051, 39-48, 2010.

KLEINWÄCHTER, M.; SELMAR, D. Influence of drying on the content of sugar in the wet processed green Arabica coffees. **Food Chemistry**, v.119, n.2, 500-504, 2010.

KNOPP, S-E.; BYTOF, G.; SELMAR, D. Influence of processing on the content of sugar in green Arabica coffee beans. **European Food Research and Technology**, v.223, n.2, 195-201, 2006.

KRAMER, D.; BREITENSTEIN, B.; KLEINWÄCHTER, M.; SELMAR, D. Stress metabolism in green coffee beans (*Coffea arabica* L.): expression of dehydrins and accumulation of GABA during drying. **Plant and Cell Physiology**, v.51, n.4, 546-553, 2010.

KURZROCK, T.; KÖLLING-SPEER, I.; SPEER, K. Effect of controlled storage on the lipid fraction of green Arabica coffee beans. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE 20th (ASIC), **Proceeding...** Bangalore, 2004, cdroom.

LEITE, R.A. CORRÊA P.C.; OLIVEIRA M.G.; REIS F.P.; DE OLIVEIRA T.T. Qualidade tecnológica do café (*Coffea arabica* L.) pré processado por via seca e via úmida. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.2, n.3, 308-3011, 1998.

LIANG, H. Fluorescence due to interactions of oxidizing soybean oil and soy proteins. **Food Chemistry**, v.66, n.1, 103-108, 1999.

LINDINGER, C.; POLLIEN, P.; DE VOS, R.; TIKUNOV, Y.; HAGEMAN, J. A.; LAMBOT, C.; FUMEAUX, R.; VOIROL-BALIGUET, E.; BLANK, I. Identification of ethyl formate as a quality marker of the fermented off-note in coffee by a nontargeted chemometric approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.57, n.21, 9972-9978, 2009.

LUDWING, E.; RACZEK, N.; KURZROCK T. Contribution to composition and reactivity of coffee protein. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE 16th (ASIC), **Proceeding...**Kyoto, 1995, p.359-365.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory Evaluation Techniques**. 3ed. London: Editorial CRC Press, 1999. 387p.

MORI, E.E.M.; BRAGAGNOLO, N.; MORGANO, M.A.; ANJOS, V.D.A.; YOTSUYANAGI, K.; FARIA, E.V.; IYOMASA, J.M. Brazil coffee growing regions and quality of natural, pulped natural and washed coffees. **Foods & Food Ingredients Journal of Japan**, v.208, n.6, 416-424, 2003.

MORI, E.E.M. Qualidade como ciência. **Jornal do Café**, v.10, n.113, 10-12, 2001.

- MUÑOZ, A.; CIVILLE, G.; CARR, T. **Sensory Evaluation in Quality Control**. 2ed. New York :Van Nostrand Reinhold, 1992. 240p.
- NIKOLOVA-DAMYANOVA, B.; VELIKOVA, R.; JHAM, G.N. Lipid classes, fatty acid composition and triacylglycerol molecular species in crude coffee beans harvested in Brazil. **Food Research International**, v.31, n.6, 479-486, 1998.
- PIMENTA, Carlos. Preparo, secagem e qualidade. In: PIMENTA, C.J. **Qualidade de café**. Lavras: UFLA, 2003. p. 73-97.
- POKORNY, J.; CÔN, N.; SMIDRKALOVÁ, E.; JANICEK, G. Nonenzymic browning. XII Maillard reactions in green coffee beans on storage. **Zeitschrift für lebensmitteluntersuchung und forschung**, v.158, n.2, 87-92, 1975.
- PUERTA, G. I. Escala para la evaluación de la calidad de la bebida de café verde *Coffea arabica*, procesado por via húmeda. **Cenicafé**, v.47, n.4, 231-234, 1996.
- RIBEIRO, F.C.; BORÉM, F.M.; GIOMO, G.S.; DE LIMA, R.R.; MALTA, R.M.; FIGUEREDO, L.P. Storage of green coffee in hermetic packaging injected with CO₂. **Journal of Storage Products Research**, v.47, n.4, 341-348, 2011.
- ROGERS, J.W.; BEZARD, G.; DESHAYES, A.; MEYER, I.; PÉTIARD, V.; MARRACCINI, P. Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. **Plant Physiology Biochemistry**, v.37, n.4, 261-272, 1999.
- ROJAS, Jesus. Green coffee storage. In: WINTGENS J.N. **Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004. p. 733-750.
- SAATH, Reni. **Qualidade do café natural e despulpado em diferentes condições de secagem e tempos de armazenamento**. 2010. 246p. Tese (Doutorado em Ciências Agrônomicas) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Botucatu, 2010.
- SCAA. Specialty Coffee Association. Resources: Article by Ric Rinhehart. What is specialty coffee? Disponível em:<<http://scaa.org/?page=RicArtp1>>. Acesso em: 19 dezembro, 2011.
- SELMAR, D.; BYTOF, G.; KNOPP, S-E. The storage of green coffee (*Coffea arabica*): decrease of viability and changes of potential aroma precursors. **Annals of Botany**, v.101, n.1, 31-38, 2008.
- SELMAR, D; BYTOF, G.; KNOPP, S-E; BREITENSTEIN, B. Germination of coffee seeds and its significance for coffee quality. **Plant Biology**, v.8, n.2, 260-264, 2006.

SELMAR, D.; BYTOF, G.; KNOPP, S-E. New aspects of coffee processing: In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE 19th (ASIC), **Proceeding**... Trieste, 2001, cdroom.

SIMKIN, A.; QIAN, T.; CAILLET, V.; MICHOUX, F.; BEM-AMOR, M.; LIN, CH.; TANKSLEY, S.; MCCARTHY, J. Oleosin gene family of *Coffea canephora*: quantitative expression analysis of five oleosin genes in developing and germinating coffee grain. **Journal of Plant Physiology**, v.163, n.7, 691-708, 2006.

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

STADMAN, E.R.; LEVINE, R.L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, v.25, n.3, 207-218, 2003.

TOMINAGA, O.; ITO, F.; HANAI, T.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Sensory modeling of coffee with a fuzzy neural network. **Journal of Food Science**, v.67, n.1, 363-368, 2002.

WINTGENS, Jean. Factor influencing the quality of green coffee. In: WINTGENS J.N. **Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004. p. 789-808.

CAPITULO II

Atividade de enzimas antioxidantes durante a secagem do café arábica

Mery Yovana Rendón, Priscila Gratão, Terezinha de Jesus Salva, Ricardo Azevedo, Neura Bragagnolo

**Manuscrito em preparação a ser submetido para publicação no periódico
*European Food Research and Technology***

Atividade de enzimas antioxidantes durante a secagem do café arábica

M. Y. Rendón¹, P.L. Gratão³, T. J. G. Salva², R. Azevedo³, N. Bragagnolo¹

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 13083-862, Brasil.

²Instituto Agronômico de Campinas, Centro de Café, P.O. Box 28, 13001-970, Campinas, SP, Brasil.

³Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 13418-900, Piracicaba SP, Brasil.

Resumo

O desenvolvimento do processo de germinação e estresse por desidratação durante a secagem de café pode induzir a geração de espécies reativas de oxigênio, as quais podem ser neutralizadas através de mecanismos químicos e enzimáticos. Estudos relacionados com enzimas antioxidantes durante a secagem de café não foram encontrados na literatura. Dada sua importância como mecanismo de defesa, no presente trabalho avaliou-se as atividades das enzimas superóxido dismutase, guaiacol-peroxidase e glutathione redutase, além da quantificação simultânea de peróxido de hidrogênio durante a secagem do endosperma de café da variedade Mundo Novo, processado como café natural e café cereja descascado. Durante a secagem foram observadas maiores mudanças na atividade enzimática no café cereja descascado em comparação com o café natural, além de maiores concentrações de peróxido de hidrogênio no café cereja natural do que no café cereja descascado.

Key words: *Coffea arabica*, café natural, café cereja descascado, peróxido de hidrogênio, espécies reativas de oxigênio.

Introdução

A secagem dos frutos é uma parte importante do processamento para a obtenção de um café de qualidade, uma vez que os cuidados na lavoura, colheita e processamento dos frutos podem ser perdidos se esta etapa não for realizada da forma adequada (CCI, 2002; Borém et al., 2008).

Quando os frutos maduros são colhidos, o endosperma apresenta umidade em torno de 49-58%, sendo a umidade após a secagem aproximadamente 12% (Eira et al., 2006; Dussert et al., 2006).

O tempo necessário para a secagem vai depender do clima, forma de secagem e tipo de processamento. Os frutos de café podem ser processados como café natural (seco com casca), café cereja descascado (seco sem casca) ou café despulpado (seco após a remoção da mucilagem dos frutos descascados), necessitando diferentes tempos de secagem.

Trabalhos realizados durante o processamento de café despulpado e café natural verificaram nesta etapa o início da germinação e estresse por perda de umidade (Kramer et al., 2010; Selmar et al., 2006; Bytof et al., 2007). O processo de respiração pode facilitar a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), o oxigênio singleto (1O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), compostos que podem facilitar as reações oxidativas no grão.

Para a detoxificação das ROS as plantas possuem tanto um sistema de defesa não enzimática, formado por ascorbato, glutatona, flavonóides, alcalóides, compostos fenólicos, aminoácidos não protéicos, tocoferóis e carotenóides (Gratão et al., 2005), quanto um sistema enzimático que atua em sincronia, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GOPX), ascorbato peroxidase (APX) e a glutatona redutase (GR) (Gratão et al., 2005; França et al., 2007).

Devido à importância da secagem do endosperma de café, vários trabalhos foram realizados considerando o conteúdo de glutatona, ascorbato, ácidos graxos livres, açúcares, ácido δ -aminobutírico e a integridade da

membrana e da parede celular (Bytof et al., 2005; Dussert et al., 2006; Knopp et al., 2006; Borém et al., 2008; Kleinwächter e Selmar, 2010). No entanto, trabalhos que avaliam a ação das enzimas antioxidantes durante a secagem do endosperma de café não são encontrados na literatura.

Considerando a possibilidade de ocorrência de estresse oxidativo durante a secagem do endosperma de café, o presente estudo teve como objetivo avaliar o comportamento de algumas enzimas antioxidantes durante a secagem, pois a perda da atividade favoreceria o acúmulo de ROS, podendo facilitar os processos oxidativos no grão. Para isto, foram colhidos frutos de café no ponto cereja da cultivar Mundo Novo da espécie *Coffea arabica* os quais foram processados como café natural (CN) e café cereja descascado (CD). Após a colheita dos frutos e durante a secagem foram avaliadas as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (GPOX) e glutathione redutase (GR), além da quantificação simultânea do peróxido de hidrogênio.

Material e métodos

Descrição e preparo das amostras

Para realizar o presente trabalho foram colhidos e selecionados 5 kg de frutos maduros de *Coffea arabica*, cultivar Mundo Novo (Bourbon 50 % x Typica 50 %), em 2010, no Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, São Paulo. A metade dos frutos foi processada como café natural e a outra metade, como café cereja descascado. Os cafés processados foram secos sob sol até alcançar umidade próxima de 12 %. Durante o período da secagem sob sol as temperaturas oscilaram entre 20,7 e 38,6 °C e a umidade do ambiente entre 21 e 62 %.

As avaliações da atividade enzimática da superóxido dismutase, guaiacol-peroxidase e glutathione redutase e a quantificação do peróxido de hidrogênio foram realizadas no endosperma dos frutos recém-colhidos (início da secagem) e em 4 umidades diferentes (41, 25, 15,5 e 11,7 %) para o café cereja natural correspondendo as amostras CN40, CN30, CN20 e CN10 e em 4 umidades

diferentes (42,4; 29,5; 16,4 e 11,3 %) para o café cereja descascado correspondendo as amostras CD40, CD30, CD20 e CD10.

Determinação de umidade

A umidade foi determinada segundo Brasil (2009), com 5 g de grãos inteiros, colocados na estufa a 105 °C até peso constante.

Extração e quantificação de proteínas

Aproximadamente 50 g de amostra coletada em cada nível de umidade, foram congelados com nitrogênio líquido e mantidos em freezer a -80 °C até o momento da extração de proteínas.

A extração das proteínas foi realizada a 4 °C, empregando 2 g de amostra, 0,3 g de polivinilpirrolidona (PVPP) e 10 mL de tampão fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹ (pH 7,5) contendo ácido etileno diamino-tetracético 10 mmol L⁻¹, ditietritol 3 mmol L⁻¹ e 1% de ácido ascórbico. O extrato protéico foi eluído em coluna PD 10 e mantido em tubos eppendorf a -80 °C (Gomes-Junior et al., 2007; Mazzafera e Robinson, 2000). O teor de proteína de cada extrato foi determinado segundo a metodologia de Bradford (1976), empregando solução de albumina de soro bovina (BSA) como padrão.

Atividades enzimáticas

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada em gel nativo como descrito por Azevedo et al. (1998). Utilizou-se gel de acrilamida 12% (p/v) e aplicou-se um volume de extrato protéico correspondente a 50 µg de proteína. Como controle positivo da atividade SOD utilizou-se SOD bovina (Sigma-Aldrich, Alemanha).

A atividade da guaiacol peroxidase (GOPX) foi determinada segundo Matsuno e Uritani. (1972), utilizando 50 µL do extrato protéico. Os resultados foram expressos em µmol/min/mg proteína.

A atividade da glutathiona redutase (GR) foi determinado segundo Azevedo et al. (1998), utilizando 50 μL de extrato protéico. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína.

Quantificação de peróxido de hidrogênio

Para a quantificação de peróxido de hidrogênio 1 g de amostra foi triturado em almofariz com nitrogênio líquido, extraída com 6 mL de ácido tricloroacético 1% e 0,2 g de PVPP. Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 10,000g por 15 min a 4 °C e do sobrenadante foram retirados 200 mL aos quais foram adicionados 800 mL da solução de iodeto de potássio 1 mol L^{-1} e 200 mL de tampão fosfato de potássio 100 mmol L^{-1} (pH 7,5). A quantificação foi realizada através da leitura de absorbância a 390 nm segundo Alexieva et al. (2001) e os resultados expressos como mg por 100g base seca.

Análise estatística

Todas as avaliações foram realizadas em triplicata e os resultados das análises químicas e enzimáticas para cada café (CN e CD) foram submetidos à análise de variância (causa de variação a perda da umidade) e teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o programa Statistica (Statsoft Inc, 2011).

Resultados e discussão

O endosperma dos frutos recém-colhidos de café apresentou umidade de 50,6 % (base úmida) e no final da secagem os teores de umidade foram de 11,7 e 11,3 % (base úmida) nos cafés CN e CD, respectivamente, valores que se encontram na faixa usada na comercialização do café (Rojas, 2004).

Trabalhos encontrados na literatura reportam o desenvolvimento da germinação e estresse por secagem durante o processamento dos frutos de café (Selmar et al., 2006; Bytof et al., 2007; Kramer et al., 2010). Esse fato representa um grau de metabolismo e a possibilidade da geração de ROS, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual foi quantificado no presente estudo. Foram

observadas maiores concentrações de H_2O_2 durante a secagem do café CN em comparação com o café CD (Fig.1). No final da secagem a quantidade de H_2O_2 foi menor do que no início para os cafés CN e CD. Esta diminuição pode estar associada com uma proteção antioxidante tanto química como enzimática (França et al., 2007).

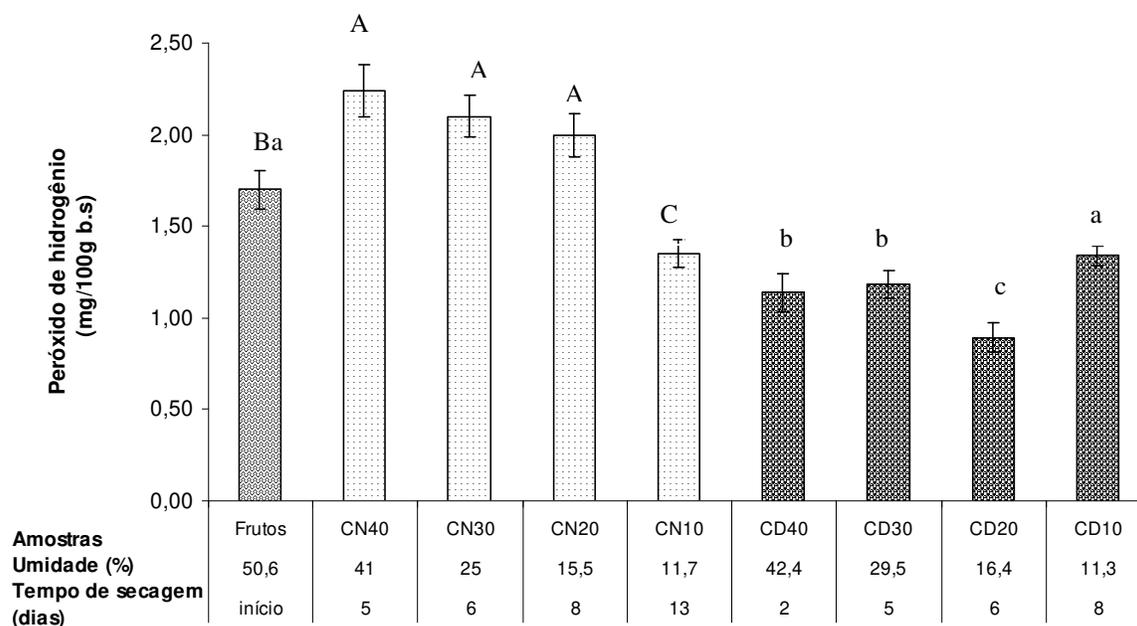


Fig. 1 Teores de peróxido de hidrogênio (mg/100g, base seca) no endosperma de café natural (CN) e descascado (CD) durante a secagem. Letra diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey para café CN (letra maiúscula) e café CD (letra minúscula)

Para verificar a existência de enzimas que possam neutralizar espécies reativas de oxigênio foram avaliadas as atividades das enzimas SOD, GOPX e GR.

A avaliação qualitativa da atividade da SOD utilizando um gel de poliacrilamida apresenta-se na Fig. 2. Observa-se que no início da secagem (frutos) a banda IV não está definida e somente durante a secagem ela se faz evidente, sendo a maior de todas. O número de bandas (4) encontrado para a enzima SOD no presente estudo coincide com o número de bandas encontrado no final da secagem de café por Saath (2010).

De acordo com os resultados da análise eletroforética realizada, a atividade da SOD mostrou um comportamento oscilatório durante a secagem, conforme se observa pelas intensidades da banda IV da Fig. 2. Além disso, a enzima se apresentou menos ativa no início da secagem e nos cafés naturais enquanto que foi mais ativa nos cafés cerejeira descascados.

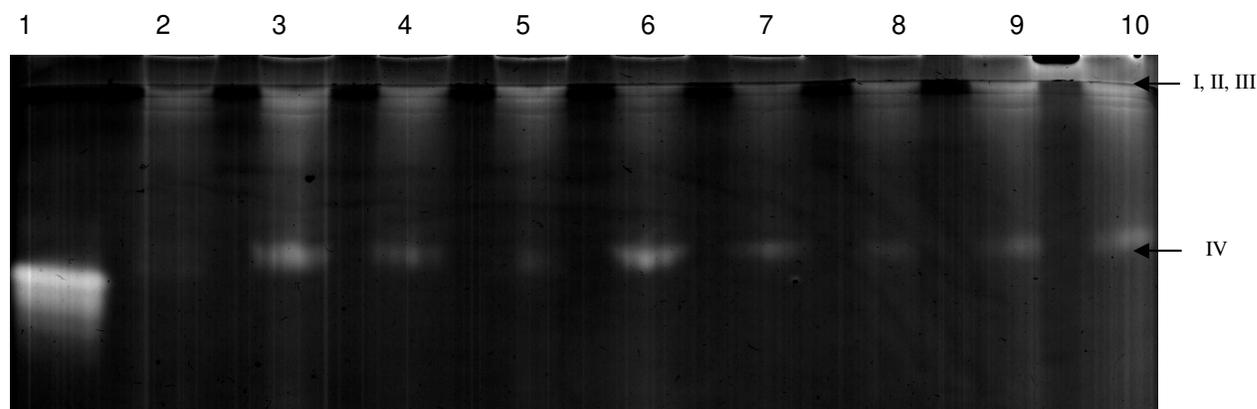


Fig. 2 Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) no endosperma de café processados como cerejeira natural (CN) e cerejeira descascado (CD) durante a secagem. 1, padrão de SOD bovina; 2, início da secagem (frutos); 3, café descascado com 2 dias de secagem (CD40); 4, café descascado com 5 dias de secagem (CD30); 5, café descascado com 6 dias de secagem (CD20); 6, café descascado com 8 dias de secagem (CD10); 7, café natural com 5 dias de secagem (CN40), 8, café natural com 6 dias de secagem (CN30); 9, café natural com 8 dias de secagem (CN20); 10, café natural com 13 dias de secagem (CN10).

O café natural apresentou atividade enzimática GR e GOPX durante toda a secagem (Fig.3), não tendo-se verificado diferença significativa de atividade da GOPX durante o processo, em comparação com a amostra com 50,6% de umidade. Na atividade enzimática da GR não se observou aumento significativo ($p < 0,05$) durante o processo e sim diminuições significativas ($p < 0,05$) quando as amostras apresentaram as umidades 41% e 11,7% em comparação com o início da secagem.

Diferentemente do café natural, o café cerejeira descascado apresentou durante a secagem (para umidades de 42,4 e 29,5%) aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade enzimática da GR e da GOPX em comparação com o início da secagem, sendo mais evidente para a enzima GOPX (Fig 4).

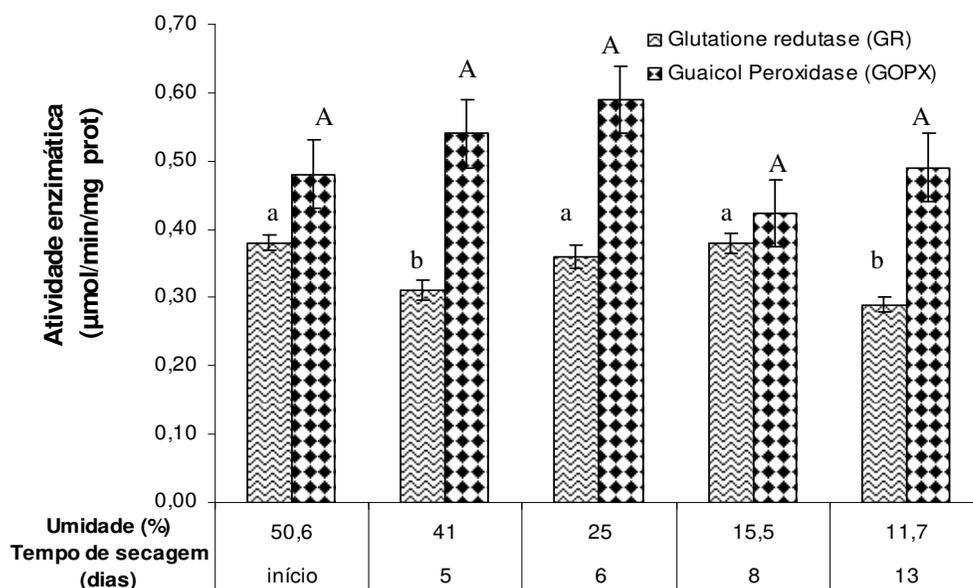


Fig. 3. Atividade enzimática da glutathione reductase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) e guaiacol peroxidase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) no endosperma de café natural durante a secagem.

Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

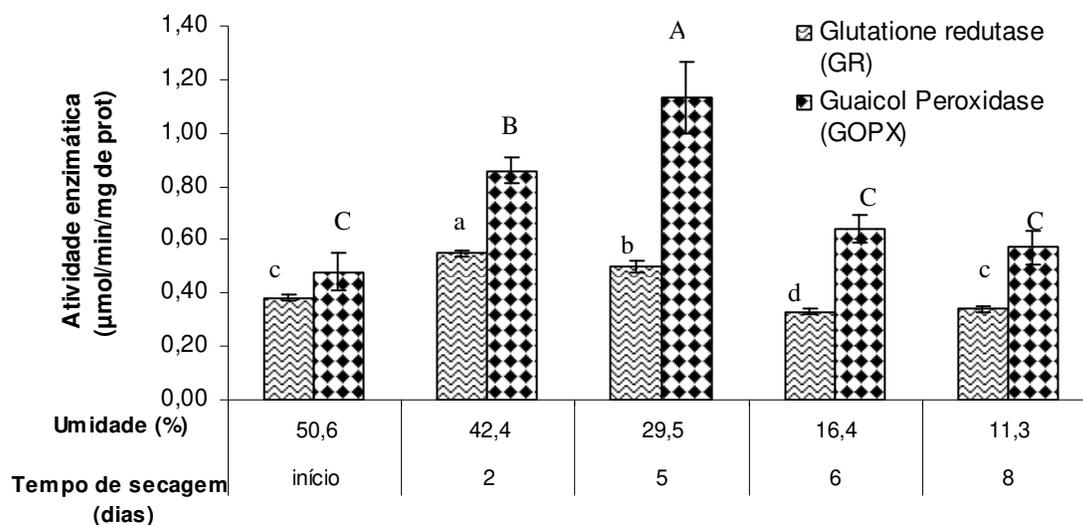


Fig. 4. Atividade enzimática da glutathione reductase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) e guaiacol peroxidase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) no endosperma de café cereja descascado durante a secagem.

Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

O comportamento diferenciado na atividade da GOPX e GR para os cafés CN e CD pode ser consequência da ausência da casca no café CD favorecendo o efeito do sol no endosperma durante a secagem, contrariamente ao ocorrido no café CN. Alexieva et al. (2001), avaliando o efeito da iluminação com UV e desidratação em folhas de plantas de ervilha e trigo, encontraram maiores aumentos na atividade das enzimas antioxidantes causados pela iluminação do que pela desidratação.

O café natural apresenta na polpa diversos compostos como enzimas, açúcares, compostos fenólicos e água (Eira et al., 2006; Patui et al., 2006; Ramirez-Martinez, 1988). Somado a isto, com a presença da casca, é provável a existência de um estímulo diferente no endosperma durante a secagem, provocando diferenças nos comportamentos enzimáticos.

A diminuição das atividades enzimáticas (GOPX e GR) no final da secagem dos cafés estudados pode estar relacionada ao efeito da baixa umidade nos grãos. Também a perda de umidade pode provocar a desidratação das proteínas com mudanças conformacionais, o que pode levar à perda da função enzimática (França et al., 2007).

As menores concentrações de H_2O_2 durante a secagem do café CD podem ser decorrentes das maiores atividades enzimáticas (GOPX e GR) encontradas. Para o café CN, a diminuição da concentração de H_2O_2 no final da secagem pode ser justificada pela presença da enzima catalase, pois Montavón e Bortlik (2004) encontraram catalases ativas após a secagem em grãos de café robusta. Outra alternativa, para este comportamento poderia ser a formação do radical hidroxila a partir de peróxido de hidrogênio, considerando a presença de ferro e a possibilidade da formação do ânion superóxido durante a respiração no endosperma de café.

O comportamento da atividade enzimática para o café CD e as altas concentrações de H_2O_2 no café CN sugerem a possibilidade de um estresse durante a secagem. Marcadores da situação de estresse tais como o ácido δ -aminobutírico, máxima expressão do gene da desidrina e a perda de glutatona e

ascorbato durante a secagem de café foram reportados na literatura (Bytof et al., 2005; Dussert et al., 2006; Kramer et al., 2010).

Agradecimentos: Os autores agradecem à Fapesp, Capes e CNPq pelo apoio financeiro.

Referências bibliográficas

Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E (2001) *Plant Cell Environ*, 24: 1337-1344.

Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ (1998) *Physiol Plantarum* 104: 280-292.

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento-MAPA (2009) Regras para análise de sementes Brasília.

Bradford, J M (1976) *Anal Biochem* 72: 248-254.

Bytof G, Knopp S-E, Schieberle P, Teutsch I, Selmar D (2005) *Eur Food Res Technol* 220:245-250.

Bytof G, Knopp SE, Kramer D, Breitenstein B, Bergervoet J, Grrot S, Selmar D (2007) *Ann Bot-London*, 100:61-66.

Borém FM, Marques ER, Alves E (2008) *Biosyst Eng*, 99: 62,66.

CCI. Centro de Comercio Internacional (2002). *Calidad del café In: Café guia del exportador.* (pp 270-321). Ginebra: Centro de Comercio Internacional UNCTAD/OMC

Dussert S, Davey MW, Laffargue A, Doulebeau S, Swennen R, Etienne H (2006) *Physiol Plantarum* 127: 192-204.

Eira TS, Amaral Da Silva EA, De Castro RD, Dussert S, Walters CJ, Bewley D, Hilhorst (2006) *HWM. Braz J Plant Physiol* 18: 149-163.

França MB, Panek AD, Eleutherio ECA (2007) *Comp. Biochem Phys A* 146: 621-631.

Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA (2005) *Funct Plant Biol* 32: 481-494.

Gomes-Junior RA, Gratão PL, Gaziola SA, Mazzafera P, Lea PJ, Azevedo RA (2007) *Funct Plant Biol* 34: 449-456.

Kleinwächter M, Selmar D (2010) *Food Chem* 119: 500-504

Knopp S-E, Bytof G, Selmar D (2006) *Eur Food Res. Technology* 223:195-201

Kramer D, Breitenstein B, Kleinwächter M, Selmar D (2010) *Plant Cell Physiol* 51: 546-553.

Matsuno H, Uritani I (1972) *Plant Cell Physiol* 13: 1091-1101.

Mazzafera P, Robinson SP (2000) *Phytochemistry* 55:285-296.

Montavon P, Bortlik K (2004) *J. Agric. Food Chem.*, 52: 3590-3594.

Patui S, Braidot E, Peresson C, Tubaro F, Colussi A, Macri F, Vianello A (2006) Lipoxigenase activity and hydroperoxide formation in coffee (*Coffea arabica L.*) cherries cultivated by different agronomic techniques. ASIC, Montpellier: Proc. 21th International Scientific Colloquium on Coffee, CDroom.

Ramirez-Martinez J (1988) *J.Sci Food Agric* 43: 135-144.

Rojas J (2004) Green coffee storage. In: Wintgens JN, ed. *Coffee: growing, processing, sustainable production*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH &Co. KGaA, 733-750.

Saath, R (2010) Qualidade do café natural e despulpado em diferentes condições de secagem e tempos de armazenamento. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de ciências agrônômicas, Botucatu, Tese de Doutorado,

Selmar D, Bytof G, Knopp S-E, Breitenstein B (2006) *Plant Biology* 8: 260-264.

Statistica (2011) *Statistica*. Versão 10. Statsoft, Inc.

CAPITULO III

Alterações no sabor e na qualidade da bebida de café durante a estocagem do grão cru

Mery Yovana Rendón, Terezinha de Jesus Salva, Neura Bragagnolo

**Manuscrito em preparação a ser submetido para publicação no periódico
*Food Quality and Preference***

Alterações no sabor e na qualidade da bebida de café durante a estocagem do grão cru

M. Y. Rendón¹, T. J. G. Salva, N². Bragagnolo¹

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 13083-862, Campinas, São Paulo, Brasil.

²Instituto Agronômico de Campinas, Centro de Café, P.O. Box 28, 13001-970, Campinas, São Paulo, Brasil.

Resumo

Na comercialização de café cru sabe-se que durante a estocagem acontecem mudanças no sabor da bebida. Assim, uma bebida preparada com café logo após o término da secagem, apresenta um sabor de erva (“verde”) mas se a estocagem continuar aparecerá um sabor “amadeirado” na bebida de café. Bebidas de café com sabor amadeirado são chamados comercialmente como café velho. Os sabores “amadeirado” e “verde” são considerados defeitos na bebida dependendo do critério do comprador. Trabalhos que estudam as mudanças no sabor e qualidade da bebida durante a estocagem são poucos referenciados na literatura. Considerando a importância do sabor da bebida para a comercialização do café cru, o presente estudo avaliou, durante 15 meses de estocagem em amostras de café natural (CN) e café cereja descascado (CD) da cultivar IPR 98, a alteração no sabor utilizando uma escala de intensidade para avaliar o sabor café descansado e a qualidade da bebida do café. Durante a estocagem foi observado aumento na intensidade do sabor café descansado para os cafés CN e CD. A qualidade global da bebida aumentou durante os 6 primeiros meses da estocagem mantendo-se constante para o café CN enquanto que para o café CD houve diminuição no final da estocagem.

Palavras chaves: *Coffea arabica*, armazenamento, envelhecimento, café descansado, IPR 98.

1. Introdução

A demanda constante e a produção anual do café criam a necessidade de manter um estoque para abastecer o mercado. Por outro lado, o café também é armazenado à espera de preços lucrativos para produtores, exportadores e importadores ou para cumprir contratos de operações futuras (Rojas, 2004).

O Brasil, além de ser o maior produtor mundial de café, é um dos poucos países produtores que consegue estocar café, sendo o estoque (arábica e robusta) público e privado para março de 2011 de 2.107.200 e 9.238.135 sacas de 60 kg, respectivamente (CONAB, 2012).

O preço do café está baseado no valor sensorial, sendo o desafio do armazenamento manter as características do grão, o maior tempo possível, o que é difícil, pois o grão é sensível a contaminação por substâncias do meio ambiente, podendo ganhar o odor da embalagem, dependendo do tempo e das condições da estocagem (Rojas, 2004).

Para a comercialização de café cru são conhecidas diferentes metodologias sensoriais entre elas a metodologia americana para avaliação de cafés especiais, praticada em diferentes países, e que avalia a fragrância, aroma, uniformidade, defeitos, doçura, sabor, acidez, corpo, sabor residual, equilíbrio e avaliação global. Nesta metodologia os cafés pontuados a partir de 80 pontos, numa escala de 100 pontos, são considerados especiais (SCAA, 2011).

No Brasil a comercialização de café em grão cru utiliza principalmente a classificação de bebidas definidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA (Brasil, 2003) que reconhece as seguintes bebidas de café: estritamente mole, mole, apenas mole, duro, riado, rio e rio zona. Já para a comercialização de café torrado em grão ou café torrado e moído, além das bebidas antes mencionadas a Instrução Normativa de 2010 considera a avaliação na bebida do aroma, acidez, amargor, sabor, sabor residual, influência dos grãos defeituosos, adstringência, corpo e qualidade global, assim como, a fragrância do pó (Brasil, 2010).

Para a comercialização do café cru, empregam-se provadores especialistas na avaliação da qualidade da bebida, os quais são formados por meio da experiência adquirida durante anos de treinamento e que muitas vezes podem provar mais de 200 amostras diariamente (Feria-Morales, 2002; Tominaga, Hanai, Ito, Honda, & Kobayashi, 2002). Com base em avaliações sensoriais de qualidade o Brasil comercializou em 2011 27.426.204 sacas de café arábica de 60 kg (ICO, 2012).

Embora existam diversas opiniões referentes à definição de qualidade para o café cru, pode-se dizer que a qualidade é conseqüência da combinação da variedade, situação topográfica, clima, cuidados na lavoura, colheita, estocagem, preparo para exportação e transporte. Sendo a qualidade um termo subjetivo, existe a necessidade de uma descrição, que normalmente é definida pelo comprador (CCI, 2002).

Na comercialização do café cru as bebidas são preferencialmente torradas no grau de torra clara para notar os defeitos na bebida. Alguns defeitos na bebida tais como o sabor de erva-“verde” e “amadeirado” são considerados defeitos menos graves dependendo da avaliação do comprador (CCI, 2002).

Nos cafés recém processados encontra-se um sabor de erva-“verde” que tende a mascarar os aspectos mais finos da bebida como o sabor e aroma de café (CCI, 2002), sendo recomendável deixar armazenado para o chamado período de “descanso” antes do benefício (SCAA, 2011a). A melhoria da qualidade global da bebida após do período de “descanso” foi reportado por Rendón, Salva, Braghini & Bragagnolo (2010). No entanto quando a estocagem continua, mesmo sob boas condições, a bebida de café apresenta um sabor que lembra a madeira (Rojas, 2004; CCI, 2002), fato que tem sido relacionado com oxidação de lipídios por alguns autores (Bonnländer, Colomban & Lonzarich, 2006; Kurzrock, Kölling-Speer, & Speer, 2004).

Aplicação de escalas sensoriais específicas tem sido descritas para avaliar características da bebida de café. Puerta (1996) elaborou uma escala de qualidade de 9 categorias, descrevendo as características positivas e negativas na

bebida e foi usada para avaliar a influência da altitude na qualidade da bebida (Buenaventura & Castaño, 2002) e para conhecer a qualidade de diferentes regiões produtoras Colombianas (Puerta, 2000). De outro lado, Mori et al., (2003) realizaram uma análise descritiva quantitativa utilizando escalas estruturadas de intensidade para avaliar as características sensoriais da bebida de café de diferentes regiões produtoras do Brasil.

Estudos foram realizados com a finalidade de relacionar variáveis químicas com a qualidade da bebida durante a estocagem do café, considerando características típicas da bebida de café como sabor, doçura e acidez (Corrêa, Afonso-Junior, Silva & Ribeiro, 2003; Godinho, Vilela, Oliveira & Chagas, 2000; Silva, Vilela, Pereira & Borém, 2001; Arêdes, Faroni, Corrêa, Queiroz, Cecon & Goneli, 2002; Selmar, Bytof & Knopp, 2008). No entanto, na literatura consultada apenas um trabalho foi encontrado sobre mudanças na intensidade do sabor da bebida de café e sua relação com a qualidade da bebida durante a estocagem (Bucheli, Meyer, Pittet, Vuataz & Viani, 1998).

Considerando a importância do sabor da bebida para a comercialização de café, o presente estudo avaliou na cultivar IPR 98, processada como café natural e cereja descascado, as mudanças no sabor da bebida durante a estocagem de 15 meses. Para avaliar o sabor da bebida de café durante a estocagem foi definido o termo sabor café descansado, elaborada uma escala não estruturada, treinada uma equipe para o uso da escala e simultaneamente foi avaliada a qualidade global da bebida numa escala de 8 pontos. As avaliações sensoriais foram realizadas no início do período de descanso (10 dias após do término da secagem) e a cada 3 meses até completar 15 meses de estocagem.

2. Material e métodos

2.1. Preparo das amostras

Para o presente estudo foram colhidos 50 kg de café arábica (cultivar IPR 98 - um cruzamento de Híbrido de Timor com Villa Sarchi) no estagio cereja, em 2009 na fazenda Palmeiras, localizada em Apucarana (23° 31' 42"S e 51° 28'

27°W, 734 m) (Paraná, Brasil). Os frutos foram divididos em dois lotes e processados como café natural (CN) e café cereja descascado (CD). Após 10 dias do término da secagem uma parte do café CN e do CD foram beneficiadas (remoção da casca para CN e pergaminho para o CD), retirados os grãos defeituosos e peneirados, sendo utilizado os grãos retidos em peneira 15 (0,6 cm) para a avaliação sensorial inicial. O restante do café CN e CD (sem beneficiar) foram estocados em temperatura ambiente para o chamado período de descanso. Após 3 meses de descanso os cafés foram beneficiados e as amostras foram uniformizadas por meio da retirada dos grãos defeituosos. Além disso, os grãos foram separados em peneiras, sendo utilizados os que foram retidos em peneira 15 (0,6 cm). A seguir, os cafés CN e CD beneficiados foram colocados em saquinhos de juta (250 g) e a estocagem continuou em dessecadores contendo solução saturada de NH_4NO_3 (64 %UR) por 12 meses a 22 °C. As amostras foram analisadas no início da estocagem (início do período de descanso) e a cada três meses até completar 15 meses de estocagem.

2.2. Avaliação sensorial

2.2.1 Avaliação da intensidade do sabor café descansado

A avaliação sensorial foi realizada com a participação de duas equipes. A primeira equipe (E1), formada por 3 provadores especialistas na prova da xícara, vinculados a empresas de comercialização de café na cidade de Londrina (Paraná, Brasil), foi responsável pela seleção das amostras utilizadas para o treinamento e para a avaliação da segunda equipe sensorial, e, além disso também foi responsável pela avaliação da qualidade da bebida. A segunda equipe (E2), formada por 12 provadores especialistas na prova da xícara vinculados as mesmas empresas de comercialização de café na cidade de Londrina, foi responsável pela avaliação da intensidade do sabor café descansado durante a estocagem.

Para a avaliação da intensidade do sabor café descansado foram consideradas as seguintes etapas: recrutamento e pré-seleção de provadores,

treinamento da equipe sensorial, avaliação do treinamento da equipe e avaliação das amostras do estudo.

2.2.1.1 Recrutamento e pré-seleção de provadores

Doze candidatos a provadores foram recrutados dentre os provadores especialistas, vinculados a empresas de comercialização de café da cidade de Londrina, com disponibilidade de tempo e interesse em participar. Os provadores participaram em testes de reconhecimento de gostos e odores básicos e de ordenação (Meilgaard, Civille & Carr, 1999). Para o teste de ordenação foram usadas bebidas de café com diferentes intensidades de sabor “café descansado”. Todos os provadores obtiveram 100% de acerto nos testes.

2.2.1.2 Treinamento e avaliação do desempenho da equipe de análise sensorial

Bebidas de café preparadas com cafés logo após do término da secagem apresentam características típicas da bebida de café mascaradas pelo sabor de erva-“verde” (CCI, 2002). Durante a estocagem prolongada o sabor da bebida de café muda apresentando um sabor que lembra a madeira, recebendo o nome comercial de café velho (Rojas, 2004; Wintgens, 2004; CCI, 2002). O sabor de erva-“verde” será referenciado como sabor de chá verde no presente estudo.

O termo sabor café descansado no presente estudo foi definido como o sabor decorrente do tempo e condições da estocagem do grão cru que apresenta as características típicas da bebida de café, variando desde fraca intensidade onde se verifica o sabor de chá verde junto de intensas características típicas da bebida até forte intensidade onde se observa sabor amadeirado junto de fracas características típicas da bebida de café

O sabor que lembra a chá verde e o sabor amadeirado na bebida foram usados como âncoras para limitar a mudança na intensidade do sabor café descansado na bebida de café durante a estocagem. Desta forma foi estabelecido para o treinamento uma escala não estruturada de 10 cm com âncoras de 2 cm nos extremos (Rendón, 2007). A amostra de referência para a âncora de 2 cm (fraco sabor café descansado) correspondeu a um café natural, com 20 dias de

estocagem após o término da secagem e que apresentava na bebida intensas características típicas da bebida de café e um sabor de chá verde. A referência para âncora com 8 cm (intenso sabor café descansado) correspondeu a um café natural com 5 anos de estocagem que apresentava fraca intensidade nas características típicas da bebida de café e um sabor amadeirado. As amostras de referência foram indicadas pela equipe E1.

Durante o treinamento, foi observado que a equipe já tinha experiência no uso da escala não estruturada e do conhecimento do sabor café descansado facilitando o treinamento, o qual foi realizado durante 25 sessões de 20 min.

Após o treinamento foram realizados testes para avaliar o desempenho da equipe e selecionar os provadores capazes de discriminar amostras, repetir suas avaliações e cujos resultados fossem concordantes com a equipe. Para isto três amostras foram escolhidas pela equipe E1 de acordo a seguinte descrição: amostra “A”, uma bebida de café de sabor intenso e com a presença de sabor de chá verde, a amostra “B”, um café com sabor de café descansado o qual se caracterizava por não apresentar nenhuma lembrança de chá verde ou sabor amadeirado e a bebida da amostra “C”, uma bebida de café de sabor pouco intenso e com a presença do sabor amadeirado. As amostras foram avaliadas conforme delineamento em blocos completos balanceados com três repetições.

Com relação ao poder de discriminação, foram selecionados os provadores que apresentaram valores de F_{amostras} com nível de significância $p < 0,50$. Para o critério repetibilidade, foram selecionados provadores com valores de $F_{\text{repetições}}$ com nível de significância $p \geq 0,05$. Para a avaliação da concordância de cada provador com a equipe, foram comparadas as ordens das médias de intensidade fornecidas pela equipe com as ordens das médias de intensidade fornecidas por cada provador (Damásio & Costell, 1991).

2.2.1.3 Avaliação da intensidade do sabor café descansado nas amostras durante a estocagem

Para a avaliação da intensidade do sabor café descansado as amostras (80 g) foram torradas num torrador para pequenas amostras (Rod-Bel, Brasil, SP)

com tempo de torra entre 12 a 14 min e a temperatura no centro do torrador entre 210 a 220 °C. As amostras torradas e moídas apresentaram luminosidade (L^*) de $26 \pm 0,9$ e tonalidade cromática (H^*) de $51,8 \pm 1,3$.

O ponto de torra utilizado foi sugerido por provadores especialistas na prova da xícara em testes preliminares, pois em pontos de torra mais escuras o sabor amargo poderia interferir na avaliação do sabor de café descansado na bebida.

As bebidas de café (CN, CD) foram preparadas com café torrado e moído num tamanho de partícula fina (0,6 mm). A proporção de pó de café para água filtrada fervente (95 – 97 °C) foi de 80gL^{-1} , e a bebida foi filtrada em papel de filtro (Mellita) após 1 minuto de extração (Rendón, 2007). O café foi avaliado na faixa de temperatura de 60-65 °C, sem adição de açúcar, e em copos de plástico descartáveis (50 mL) codificados com três dígitos. A ordem de apresentação das amostras foi balanceada e os provadores foram orientados a tomar água entre as provas. As avaliações foram realizadas no início e a cada três meses até completar 15 meses de estocagem.

2.2.2 Avaliação da qualidade da bebida das amostras durante a estocagem

A equipe E1 avaliou a qualidade global da bebida utilizando uma escala estruturada de 8 pontos (1 qualidade baixa e 8 qualidade excelente). Em sessões prévias foram estabelecidos os critérios para avaliar a qualidade da bebida com fins comerciais colocando como pontos negativos o sabor de café imaturo (sabor “verde”), adstringência, sabor amadeirado e como ponto positivo, nuances de caramelo, chocolate e frutas, considerando o fator mais importante o equilíbrio entre acidez, amargor e doçura na bebida. Com a finalidade de conhecer o efeito do sabor na qualidade global da bebida foi solicitado aos provadores que indicassem o defeito encontrado no sabor da bebida.

As amostras para a avaliação da qualidade da bebida foram torradas utilizando um torrador (Rod-Bel, Brasil, SP), durante 9 a 10 min, sendo que a temperatura média dentro do torrador oscilou entre 190 a 200 °C. Os grãos

torrados e moídos apresentaram luminosidade (L^*) de $29 \pm 1,2$ e tonalidade cromática (H^*) de $53,4 \pm 1,5$.

Para a avaliação da qualidade global da bebidas o café foi moído na regulagem média, na qual 70% das partículas têm tamanho superior a 0,6 mm. Foi colocado 8 g de cada amostra e 150 mL de água quente (95°C) numa xícara de prova, a infusão foi mexida com uma colher de prova para obter um julgamento preliminar da amostra a partir dos vapores desprendidos da bebida. Foi realizada a degustação utilizando uma colher de prova, a qual foi limpa com água quente entre as avaliações das amostras. As bebidas foram succionadas, conservando-a apenas o tempo suficiente para sentir o sabor e os aromas, devolvendo a quantidade sorvida à cuspideira (Brasil, 2003). Para avaliar a qualidade global as amostras foram balanceadas e avaliadas no início da estocagem e a cada três meses durante 15 meses.

2.3 Análise estatística

Os resultados da avaliação da equipe foram analisados usando o programa estatístico SAS (SAS Institute Inc., 2008).

Os resultados das avaliações durante a estocagem foram analisadas independentemente para o café CN e CD, através da análise de variância, sendo a causa da variação o tempo de estocagem. As médias foram comparadas aplicando-se o teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o programa Statistica (Statsoft Inc, 2011).

3 Resultados e Discussão

3.1 Treinamento e desempenho da equipe na intensidade do sabor de café descansado

Participaram do treinamento para avaliação de intensidade do sabor de café descansado 12 candidatos.

Após o treinamento avaliou-se o desempenho da equipe, demonstrando que todos os provadores possuíam bom poder de discriminação das amostras e

boa repetibilidade das avaliações, além de alta concordância entre cada membro e a equipe.

Os resultados dos níveis de significância ($p_{amostra}$) em função da discriminação das amostras ($F_{amostra}$), para cada provador em relação a cada atributo, estão apresentados na Tabela 1. Observou-se que todos os provadores apresentaram valores de “ p ” menores que os pré-estabelecidos de 0,50 no atributo estudado, demonstrando a capacidade para discriminar a intensidade do sabor café descansado em amostras de café.

Na mesma Tabela 1 observam-se os resultados dos níveis de significância ($p_{repetição}$) em função da repetibilidade ($F_{repetição}$) para cada provador, sendo que todos os provadores demonstraram repetibilidade de suas avaliações ($p \geq 0,05$).

Tabela 1

Níveis de significância ($p_{amostra}$) para provadores em função da discriminação das amostras ($F_{amostra}$) e níveis de significância ($p_{repetição}$) para provadores em função da repetibilidade ($F_{repetição}$)

| Provador | Níveis de significância ($p_{amostra}$) para provadores em função da discriminação das amostras ($F_{amostra}$) | Níveis de significância ($p_{repetição}$) para provadores em função da repetibilidade ($F_{repetição}$) |
|----------|---|---|
| 1 | 0,0003 | 0,694 |
| 2 | 0,0001 | 0,640 |
| 3 | 0,0001 | 0,444 |
| 4 | 0,0001 | 0,691 |
| 5 | 0,0001 | 0,444 |
| 6 | 0,0004 | 0,790 |
| 7 | 0,0001 | 0,444 |
| 8 | 0,0001 | 0,250 |
| 9 | 0,0003 | 0,321 |
| 10 | 0,0003 | 0,694 |
| 11 | 0,0001 | 0,444 |
| 12 | 0,0006 | 0,444 |

Media de três repetições, $p \leq 0,50$: provador com bom poder de discriminação entre amostras; $p \geq 0,05$: provador com boa repetibilidade de avaliação.

A concordância de cada provador com a equipe foi adequada como se observa na Tabela 2. Observa-se que as bebidas de café apresentaram diferentes intensidades de sabor café descansado: o café “A” se caracterizou por apresentar fraca intensidade de sabor café descansado, onde se percebe um sabor de chá verde; a amostra “B”, um café com intensidade intermediária de sabor café descansado e a amostra “C” correspondeu a um café com intenso sabor café descansado, onde o sabor amadeirado sobressai.

Tabela 2

Valores médios da equipe 2 e de cada provador para a intensidade do sabor café descansado avaliado na bebida das amostras de café A, B e C

| | Provador | | | | | | | | | | | | Média da equipe |
|----------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| Amostras | | | | | | | | | | | | | |
| A | 2,0 | 2,1 | 2,3 | 2,3 | 2,5 | 2,3 | 2,0 | 1,8 | 2,5 | 2,3 | 2,1 | 2,0 | 2,2 ^b |
| B | 4,6 | 5,0 | 5,0 | 5,3 | 5,0 | 5,3 | 5,6 | 5,6 | 5,5 | 5,3 | 5,0 | 5,0 | 5,1 ^c |
| C | 8,6 | 8,3 | 8,0 | 8,8 | 8,0 | 8,8 | 9,0 | 8,0 | 8,6 | 9,0 | 9,0 | 8,0 | 8,5 ^a |

Médias com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas entre si ($p \leq 0,05$).

Amostra A: Café natural após 15 dias do término da secagem.

Amostra B: Café descascado com 1 ano de estocagem.

Amostra C: Café natural com 5 anos de estocagem.

3.2. Avaliação sensorial da bebida de café

A avaliação da qualidade global da bebida de café considera a percepção do conjunto de diferentes características da bebida entre elas aroma, sabor e corpo, além do equilíbrio (Mori, 2001) baseado neste fato, foi solicitado aos provadores mencionar os defeitos encontrados no sabor da bebida dos cafés CN e CD.

Na avaliação da qualidade global da bebida no início da estocagem para o café CN os provadores apontaram presença de sabor chá verde e na avaliação do terceiro mês de estocagem assinalaram “fundo” de sabor chá verde” (sabor fraco de chá verde).

A qualidade global da bebida para o café CN no ponto inicial foi 3,3 devido provavelmente, a presença de sabor chá verde que muitas vezes pode mascarar as características da bebida (CCI, 2002). Esta observação coincide com a fraca intensidade de sabor café descansado (2,1) o qual se caracteriza pela presença do sabor de chá verde neste ponto inicial do armazenamento (Fig. 1).

A presença de sabor chá verde (“verde”) foi encontrada em bebidas de café avaliadas por Kitzberger, Scholz, Silva & Benassi. (2010), sendo este um dos sabores usados para discriminar cultivares de café CN e segundo esses autores estaria associado a grãos imaturos.

A qualidade global da bebida para o café CN aumentou durante a estocagem, não existindo diferença significativa após do sexto mês de estocagem apesar do aumento contínuo do sabor café descansado (Fig. 1), alcançando a maior nota (7) no nono mês. O aumento da intensidade do sabor café descansado significa uma perda do sabor “chá verde” na bebida, permitindo a melhor percepção das características presentes na bebida, o que refletiu em melhores notas na avaliação da qualidade da bebida. Scheiding, Czerny & Schieberle, (2007) encontraram em café após três semanas do término da secagem a presença de odor que lembrava a “green” e “grassy”, os quais diminuíram após 9 meses da estocagem.

Houve uma diminuição não significativa da qualidade global da bebida do café CN no final da estocagem (15 meses), provavelmente, devido ao fundo amadeirado observado pelos provadores não afetando a qualidade global da bebida.

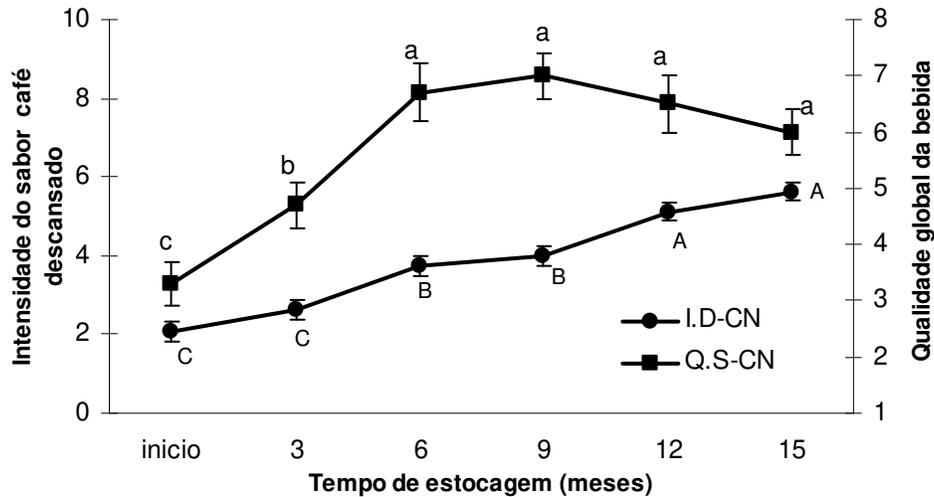


Fig. 1. Intensidade de sabor de café descansado e a qualidade global da bebida de café de café natural (CN) durante 15 meses de estocagem
 I.D-CN Intensidade do sabor de café descansado do café natural.
 Q.S-CN Qualidade global da bebida do café natural.
 Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A Fig. 2 apresenta a mudança sensorial do café CD durante a estocagem. Observa-se que no início da estocagem, a bebida do café CD apresentou uma intensidade de sabor de café descansado de 3,3, superior aquela identificada, na amostra de referência (fraco sabor café descansado) usada para o treinamento. Isto coincide com as observações dos provadores da equipe E1 que encontraram um fundo de sabor chá verde na bebida, o que refletiu na nota 4,0 de qualidade global da bebida (Fig. 2).

Observou-se um aumento significativo da qualidade global no terceiro mês de estocagem. Melhores notas na qualidade global da bebida após os três primeiros meses de estocagem também foram observadas por Rendón et al. (2010) quando avaliaram o período de descanso no café CD das cultivares Catuaí Vermelho e Obatã Amarelo.

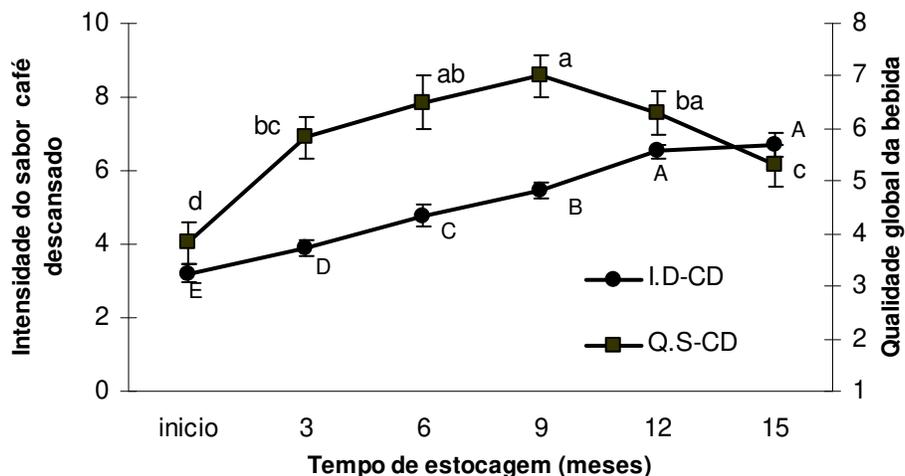


Fig. 2. Intensidade de sabor de café descansado e a qualidade global da bebida de café descascado (CD) durante 15 meses de estocagem
 I.D-CD Intensidade do sabor de café descansado do café descascado.
 Q.S-CD Qualidade da bebida do café descascado.
 Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A partir do mês 6 a qualidade se manteve constante até o mês 12, com maior nota de avaliação (7) no nono mês. No final do armazenamento (mês 15) o café CD apresentou diminuição da qualidade global da bebida, provavelmente, devido a presença de “fundo amadeirado” observado pelos provadores (E1) nos meses 12 e 15 de estocagem. A perda da qualidade da bebida após 12 meses de estocagem e a presença do sabor amadeirado também foram verificadas por Selmar et al. (2008) durante o estudo de armazenamento de café natural, café descascado e café despulpado.

Comparando-se o comportamento dos cafés CN e CD durante a estocagem (Figs. 1 e 2) observa-se aumento da intensidade do sabor café descansado do início ao final do armazenamento. Para a qualidade global da bebida do café CD verificou-se um aumento até o sexto mês. A partir deste ponto a qualidade se manteve até o mês 12, diminuindo no mês 15. Esse comportamento sugere que a intensidade do sabor café descansado influencia positivamente a qualidade global da bebida no café CD, até uma determinada intensidade atingida no mês 12, após a qual este sabor teria um efeito negativo

nesta qualidade. Já para o café CN não foi observada diminuição na qualidade da bebida, provavelmente, porque seria necessário maior tempo de estocagem.

O aumento da intensidade do sabor de café descansado e o comportamento da qualidade da bebida sugere que durante a estocagem pode estar sendo gerados outros compostos resultantes da degradação química do café que podem contribuir à redução de atributos sensoriais (Borém, Isquierdo, Fernandes & Fernandes 2008). Scheiding et al. (2007) reportaram maiores intensidades de aromas “grassy”, “green”, “peasy”, “earthy”, “bell pepper-like” e “fatty”, na composição dos voláteis do grão cru no início da estocagem e após 9 meses foi verificado a diminuição na intensidade destes compostos e pronunciado aumento no aroma de “smoky” e “clove-like” seguido de “fruity”, “sweaty”, “spicy” e “baked apple-like”.

4. Conclusões

As bebidas preparadas com café logo após o término da secagem apresentam sabor de chá verde que é perdido durante a estocagem.

Durante os 3 primeiros meses de estocagem, chamado período de descanso, acontecem melhoras na qualidade da bebida para o café CN e CD.

Nas mesmas condições de armazenamento (64 %UR e 23 °C) foi observado aumento da intensidade de sabor café descansado nos cafés CN e CD mas a perda da qualidade da bebida no final da estocagem só foi evidente para o café CD.

Agradecimentos

Ao Eng. Nilton Fukushima pela doação das amostras. Aos provadores Roberto Scotton, Pedro Almeida, Tuneo Kague, Carlos Amaral, Rafael Amaral, Sergio Zambrini, Geraldo Fernandez, Giovanni Mantovani, Luis Ribeiro, Victor Matsubara, André Pereira, Francisco Cabral, Daniel Andrade, Fabiano Odebrecht, Marcos Bacceti. A Fapesp, Capes e CNPQ pelo financiamento do projeto.

Referências bibliográficas

Arêdes, E. M., Faroni, L. R. D., Corrêa, P. C., Queiroz, M. E. L., Cecon P. R. & Goneli, A. L. D. (2002). Avaliação das perdas de matéria seca e de qualidade do café (*Coffea arabica* L.) beneficiado e armazenado em importantes municípios produtores da Zona da Mata Mineira e em Alegre-ES. *Revista Brasileira de Armazenamento*, especial 5, 44-54.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2003). Regulamento técnico de identidade e qualidade para a classificação do café beneficiado grão cru. Instrução normativa nº 8 de 11 de junho de 2003 .

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2010). Regulamento técnico para o café torrado em grão e para o café torrado e moído. Instrução normativa nº 16 de 24 de maio de 2010.

Bonnländer, B., Colombam, S. & Lonzarich, V. (2006). Lipidomics and the influence on quality of coffee. *Artigo apresentado no ASIC International Scientific Colloquium on Coffee Proceedings*, Montpellier, França.

Borém, F. M., Isquierdo, P. E., Fernandes S. M., & Fernandes, M. (2008) Armazenamento de café. In: Borém F.M. (Ed.), Pós Colhieta do café (349-388). Lavras: Editora UFLA.

Bucheli, P., Meyer, I., Pittet, A., Vuataz, G. & Viani, R. (1998) Industrial storage of green robusta coffee under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 4507-4511.

Buenaventura, C. E. & Castaño, J. J. (2002). Influencia de la altitud en la calidad de la bebida de muestras de café procedente del ecotopo 206B en Colombia. *Cenicafe*, 53, 119-131.

CCI. Centro de Comercio Internacional (2002) Calidad del café In: CCI-UNCTAD/OMC (Ed.) Café guia del exportador. (pp 270-321). Ginebra: Centro de Comercio Internacional UNCTAD/OMC.

Corrêa, P. C., Afonso-Junior, P. C., Silva F. S. & Ribeiro, D. M. (2003). Qualidade dos grãos de café (*Coffea arabica* L.) durante o armazenamento em condições diversas. *Revista Brasileira de Armazenamento*, especial 7, 136-147.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Levantamento de estoques privados-café-mar/2011 Disponível em: <www.conab.gov.br> Acesso em: 31/1/2012.

Damásio, M. H. & Costell, E. (1991). Análisis sensorial descriptivo: generación de descriptores y selección de catadores. *Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 31, 165-178.

Feria-Morales, A. M. (2002). Examining the case of green coffee to illustrate the limitations of grading systems/expert tasters in sensory evaluation for quality control. *Food Quality and Preference*. 13, 355-367.

Godinho, R. P., Vilela E. R., Oliveira, G. A. & Chagas S. J. R. (2000). Variações na cor e na composição química do café (*Coffea arabica* L.) armazenado em coco e beneficiado. *Revista Brasileira de Armazenamento*, especial 1, 38-43.

ICO – International coffee Organization. ICO indicator prices. Disponível em: <www.ico.org> Acesso em: 10/02/2012.

Kitzberger, C. S. G., Scholz, M. B. S., Silva, J. B. G. D., & Benassi, M. T. (2010). Caracterização sensorial de cafés arábica de diferentes cultivares produzidos nas mesmas condições edafoclimáticas. *Brazilian Journal of Food Technology*, DOI:10.4260/BJFT201114E000105, 39-48.

Kurzrock, T., Kölling-Speer, I. & Speer, K. (2004). Effects of controlled storage on the lipid fraction of green Arabica coffee beans. *Artigo apresentado no ASIC, International Scientific Colloquium on Coffee Proceedings*, Bangalore, India.

Meilgaard, M., Civille, G.V. & Carr, B.T. (1999) *Sensory Evaluation Techniques*. 3ed. London: Editorial CRC Press,. 387p.

Mori, E. E. M., Bragagnolo, N., Morgano, M. A., Anjos, V. D. A., Yotsuyanagi, K., Faria, E. V., & Iyomasa, J. M. (2003). Brazil coffee growing regions and quality of natural, pulped natural and washed coffees. *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, 208, 416-424.

Mori, E. E. M (2001) Qualidade como ciência. *Jornal do café*, 113, 10-12.

Puerta, G. I. (1996). Escala para la evaluación de la calidad de la bebida de café verde *Coffea arabica*, procesado por via húmeda. *Cenicafé*, 47, 231-234.

Puerta, G. I. (2000). Influencia de los granos de café cosechados verdes en la calidad física y organoléptica de la bebida. *Cenicafé*, 51, 136-150.

Rendón M. Y., Salva T. D. J., Braghini M. T. & Bragagnolo, N. (2010). The importance of the resting period in the coffee grain aspect and beverage quality. *Artigo apresentado no ASIC, International Scientific Colloquium on Coffee Proceedings*, Bali, Indonésia.

Rendón, M. Y. (2007). Acidez do café verde e a qualidade da bebida. Dissertação de mestrado em Ciência de alimentos (p.86). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Agosto 2007.

Rojas, J. (2004). Green coffee storage. In: Wintgens JN (Ed.), Coffee: growing, processing, sustainable production (pp 733-750). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

SCAA (2011) Specialty Coffee Association. Cupping Specialty Coffee. Disponível em: <<http://scaa.org/PDF/PR%20CUPPING%20PROTOCOLS%20V.21NOV2009A.pdf>>. Acesso em: 19 dezembro, 2011.

SCAA (2011a) Specialty Coffee Association. Resources: Article by Ric Rinhehart. What is specialty coffee? Disponível em: <<http://scaa.org/?page=RicArtp1>>. Acesso em: 19 dezembro, 2011.

S.A.S. (2008) Statistical Analysis System. Versão 9.2. Cary: The SAS Intitute.

Scheidig, C., Czerny, M. & Schieberle, P. (2007). Changes in key odorants of raw coffee beans during storage under defined conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5768-5775.

Statistica (2011) Statistica. Versão 10. Statsoft, Inc.

Selmar, D., Bytof, G. & Knopp, S-E. (2008). The storage of green coffee (Coffee Arabica): Decrease of viability and changes of potencial aroma precursors. *Annals of Botany*, 101, 31-38.

Silva, R. P., Vilela E. R., Pereira R. G. F. A & Borém F. M. (2001), Qualidade de grãos de café (*Coffea arabica* L.) armazenados em coco com diferentes níveis de umidade. *Revista Brasileira de Armazenamento*, especial 3, 3-10.

Tominaga, O., Ito, F., Hanai, T., Honda, H., & Kobayashi, T. (2002). Sensory modeling of coffee with a fuzzy neural network. *Journal of Food Science*, 67, 363-368.

Wintgens, J.N. (2004). Factor influencing the quality of green coffee. In: Wintgens JN (Ed.), Coffee: growing, processing, sustainable production (pp. 789-808). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

CAPITULO IV

Impacto das mudanças químicas nas características sensoriais durante a estocagem do café cru

Mery Yovana Rendón, Terezinha de Jesus Salva, Neura Bragagnolo

Manuscrito em preparação a ser submetido para publicação no periódico Food Chemistry

Impacto das mudanças químicas nas características sensoriais durante a estocagem do café cru

M. Y. Rendón¹, T. J. G. Salva, N². Bragagnolo¹

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 13083-862, Campinas, São Paulo, Brasil.

²Instituto Agronômico de Campinas, Centro de Café, P.O. Box 28, 13001-970, Campinas, São Paulo, Brasil.

Resumo

As mudanças sensoriais durante o armazenamento de café cru levam à perda do valor comercial. Essas mudanças são atribuídas a compostos reativos gerados durante a oxidação de lipídios mas também poderiam resultar da oxidação de proteínas e de outros compostos presentes no grão. No presente trabalho estudou-se, em café processado como cereja natural e cereja descascado durante 15 meses de armazenamento, os teores de ácidos graxos livres, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), grupos carbonila das proteínas e ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ), a viabilidade, a estrutura celular, a cor (L^* , a^* , b^*) e a intensidade do sabor café descansado na bebida, para verificar se a mudança sensorial esta relacionada com processos oxidativos. Foi verificado que no final da estocagem houve aumento do teor de ácidos graxos livres, TBARS e grupos carbonila, intensidade do sabor café descansado, diminuição da concentração de 5-ACQ, assim como a perda da viabilidade da semente, da cor e da estrutura celular. Os resultados sugerem a ocorrência de um processo oxidativo, tanto de lipídios como de proteínas, que compromete a estrutura celular do grão durante a estocagem causando mudanças sensoriais.

Palavras chave: *Coffea arabica*, TBARS, oxidação de lipídios, grupos carbonila, 5-ACQ, café descansado, bebida de café.

1. Introdução

Das espécies do gênero *Coffea* sobressaem economicamente *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, chamadas de café arábica e robusta, respectivamente. O café arábica apresenta mais aroma, acidez e menos corpo em comparação com o café robusta, além de maiores cotações no mercado (Wintengs, 2004; ICO, 2011).

Após a entrada do café no Brasil, em 1727, diversos trabalhos de melhoramento genético foram realizados nas cultivares, destacando-se por suas características agronômicas, produtividade e resistência à ferrugem as cultivares Iapar 59, IPR 98 e IPR 99 (Bettencourt & Fazuoli, 2008).

Embora o Brasil seja conhecido por processar café pelo método natural, a produção de café cereja descascado (CD) está aumentando nos últimos anos. Entre as razões pode-se citar o maior controle da qualidade do café, na ponta da produção, e as características sensoriais diferenciadas do CD apreciadas na xícara. Estima-se que o país já produza cerca de 5 milhões de sacas de café cereja descascado (P & A Marketing Internacional, 2011). Além disso, apresenta como vantagem a menor quantidade de água necessária para seu processamento em comparação com o café lavado.

Diferenças sensoriais entre as bebidas de café natural e café cereja descascado foram verificadas por Mori et al. (2003) e Selmar, Bytof & Knopp (2008). Além das diferenças sensoriais nas bebidas, têm-se verificado variações no conteúdo de glicose, de aminoácidos livres e de ácidos carboxílicos de cadeia curta, como consequência do processamento e da variedade do café (Salva, 2007).

Logo do término da secagem, o café apresenta grãos verdes e uma bebida com sabor de chá verde (erva-“verde”), além das características típicas da bebida (CCI, 2002). Durante a estocagem prolongada dos grãos, mesmo sob condições ótimas, o sabor da bebida se altera apresentando um sabor descrito como amadeirado, (Kurzrock, Kölling-Speer & Speer, 2004; Selmar et al., 2008). Simultaneamente, a cor verde do grão perde intensidade e vai branqueando,

podendo chegar a uma cor amarela, dependendo do tempo e das condições da estocagem (Rojas, 2004). Essas mudanças acontecem em todos os tipos de café e como a comercialização do café está baseada na avaliação sensorial, mudanças durante a estocagem levam a diminuição no preço.

Trabalhos foram realizados na tentativa de explicar as mudanças que ocorreram no grão de café durante a estocagem, sendo sugerida a oxidação de lipídios por alguns autores que encontraram lipases ativas, hidroperóxidos e ácidos graxos livres (AGL) insaturados em cafés cru (Nikolova-Damyanova, Velikova & Jham, 1998; Kurzrock et al., 2004; Bonnländer, Colombam & Lonzarich, 2006). Por outro lado Selmar, et al. (2008) estudando as mudanças dos precursores do aroma durante a estocagem, apontaram que a perda da qualidade da bebida do café estaria relacionada com a perda da viabilidade e não com a composição de açúcares e de aminoácidos.

Durante a oxidação de lipídios, formam-se radicais livres, compostos altamente reativos, que podem alterar outros compostos presentes no alimento como pigmentos, proteínas e vitaminas, tal como acontece em produtos derivados de carne (Estévez, Ventana & Cava, 2007) e de soja (Liang, 1999).

De outro lado, Budryn, Nebesny & Zyzelewicz (2011) reportaram atividade antioxidante para o café cru, atribuído a seu conteúdo de polifenóis. Farah & Donangelo (2006) assinalam os ácidos clorogênicos como uma parte importante da fração fenólica, que apresenta características antioxidantes, e são representados pelo 5-ACQ que representa entre 56-62% do total de ácidos clorogênicos.

O conteúdo de proteínas no grão de café arábica foi reportado entre 9,8-15,9% por Mori et al. (2003). As proteínas encontram-se formando parte da estrutura das membranas, rodeando os corpos lipídicos (oleosinas) e também, segundo Rogers, Bezard, Deshayes, Meyer, Pétiard, & Marraccini (1999) como proteína de reserva. Essas proteínas pertencem ao grupo 11S, as quais também são encontradas na soja e segundo esses autores representam aproximadamente 45% da proteína total no grão de café.

Huang, Hua & Qiu (2006) estudando a oxidação de proteínas na soja, observaram que a ação da lipoxigenase facilitou a oxidação do ácido linoleico, gerando radicais hidroperóxidos livres muito reativos. Esses radicais alteraram a estrutura protéica, causando a oxidação e o aumento da hidrofobicidade das proteínas.

A associação de lipídios e proteínas pode facilitar um processo oxidativo das proteínas o qual pode estender-se a outros compostos presentes no grão, como acontece em produtos de carne e soja. O objetivo do presente trabalho foi verificar o desenvolvimento do processo oxidativo dos lipídios, a possível oxidação das proteínas e o seu efeito no teor ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ), na viabilidade da semente, estrutura celular e a relação destas variáveis com as mudanças na cor do grão e na bebida de café durante a estocagem.

2 Material e métodos

2.1 Descrição e preparo das amostras

Para o presente estudo foram colhidos cerca de 50 kg de café arábica no estagio cereja da cultivar IPR 98 em 2009 na fazenda Palmeiras, localizada em Apucarana (23°31', 42" S e 51°28' 27" W, 734 m) (Paraná, Brasil). A metade dos frutos foi processada como café natural (CN) e a outra metade como café cereja descascado (CD), e secos na sombra. Após 10 dias do término da secagem uma parte do café CN e CD foram beneficiados (remoção da casca para CN e pergaminho para o CD), além da retirada dos grãos defeituosos os cafés foram peneirados, utilizando os grãos retidos na peneira 15 (0,6cm) para a avaliação sensorial e química inicial. O resto do café CN e CD sem beneficiar foram estocados em temperatura ambiente e UR entre 60-80%, para o chamado período de descanso. Após 3 meses de descanso os cafés foram beneficiados e as amostras foram uniformizadas por meio da retirada dos grãos defeituosos, além disso, os grãos foram separados em peneiras, sendo utilizados os que foram retidos em peneira 15 (0,6 cm).

A seguir os cafés CN e CD beneficiados foram colocadas em saquinhos de juta (250 g) e a estocagem continuou em dessecadores contendo uma solução saturada de NH_4NO_3 (64 % UR) por mais 12 meses a 22 °C.

As análises químicas e sensoriais dos cafés CN e CD foram realizadas no início do período de descanso e a cada 3 meses, até completar 15 meses de estocagem. Para as análises químicas, os café CN e CD previamente congelados com nitrogênio líquido foram moídas em moinho (Perten 3600, Finland) e passadas por peneira de 0,5 mm e mantidas -32 °C até o término das análises. Foram feitas a quantificação da composição de ácidos graxos, de ácidos graxos livres, da umidade, viabilidade de germinação e a avaliação sensorial (em triplicata), a determinação de grupos carbonila, TBARS e 5ACQ (quaduplicata) e a medida da cor (6 vezes). A avaliação por microscopia eletrônica de transmissão foi realizada após 3 meses e no final da estocagem.

2.2 Determinação de umidade

A umidade foi determinada segundo Brasil (2009), com 5 gr de grãos inteiros que foram colocadas na estufa a 105 °C, até a obtenção de peso constante.

2.3 Quantificação dos ácidos graxos e ácidos graxos livres no óleo de café

Os lipídios foram extraídos de acordo com Kölling-Speer, Strohschneider & Speer (1999) onde 5 g de amostra foram misturados com 20 g de sulfato de sódio anidro e extraídos por 8 h com éter metil-t-butílico em soxhlet. A partir do óleo foi determinada a composição de ácidos graxos, segundo a metodologia de Joseph & Ackman (1992) com a variação no tempo de metilação de 30 min para 2 min devido a verificação da diminuição nos picos identificados em testes preliminares. Para a determinação de ácidos graxos livres, o óleo foi fracionado segundo o método de Kölling-Speer et al. (1999) utilizando uma coluna de permeação em gel (Bio Beads S-X3, 25 x 400 mm). Dessa separação, os ácidos graxos livres foram metilados utilizando trifluoreto de boro (BF_3) metanólico (20%) por 1 minuto e analisados por cromatografia gasosa. Foi utilizado um cromatógrafo

gasoso (Shimadzu, GC 2010, Kyoto, Japão) equipado com um injetor split (1/100) a 260 °C, detector de ionização em chama e coluna C P-SIL 88 (100 m x 0,25 mm x 0,20 µm, Chromapack Middleburg, Netherlands). O volume de injeção foi 2 µL através da técnica de “hot needle” por 5 seg. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio com velocidade linear de 20 cm/s e o gás “make up” foi o nitrogênio a 30 mL/min. A temperatura da coluna foi programada iniciando-se a 120 °C, mantendo-se nesta temperatura por 8 min, aumentando para 160 °C, com taxa de 20 °C/min, mantendo-se essa temperatura por 4 min, aumentando novamente 3 °C/min até 195 °C, mantendo-se nesta temperatura por 10 min, aumentando 35 °C/min até 220 °C mantendo-se nesta temperatura por 3 min e finalmente aumentando 20 °C/min até 240 °C e mantendo-se nesta temperatura por 5 min, totalizando 46 min.

A identificação dos ácidos graxos da amostra foi realizada por comparação entre os tempos de retenção dos picos da amostra e os tempos de retenção dos picos dos padrões. A quantificação foi feita por padronização interna utilizando o éster metílico do ácido undecanoico (11:0) e o éster metílico do ácido tridecanoico (13:0). Os resultados foram calculados em mg/g de óleo de acordo com a AOCS (1998).

2.4 Quantificação das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para a análise de TBARS a extração foi realizada empregando 0,2 g de amostra moída e 4 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% (p/v), contendo 0,08 g de polivinilpirrolidone (PVPP) por 30 min, com agitação contínua. Após a perfeita homogeneização a mistura foi centrifugada a 20,000g por 10 min. Foi pipetada uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante e 2 mL de uma solução de ácido tricloroacético 20% (p/v) contendo 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico foram adicionados, aquecidos por 30 min em banho de água a 90 °C e resfriados em banho de gelo. Após o resfriamento a mistura foi centrifugada novamente a 10,000g por 10 min. A quantificação foi realizada segundo Heath & Packer (1968) e as leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro (Agilent, Santa

Clara. CA, USA) a 532 e 600 nm, utilizando o coeficiente de absorvidade de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em nmol/g de amostra seca.

2.5 Quantificação de grupos carbonila

Para a quantificação de grupos carbonila nas proteínas foi utilizado 0,25 g de amostra desengordurada, adicionada de 0,3 g de polivinilpirrolidone (PVPP) e extraídas com 5 mL de tampão fosfato contendo 50 mM de ácido etileno diamino-tetracético (EDTA), 300 mM de cloreto de sódio (NaCl) e 114 mM de ascorbato de sódio, por 1 hora em mesa agitadora (Tecnal, São Paulo, Brasil) a 95 rpm. Após extração, a amostra foi centrifugada por 30 min a 20,000g. O sobrenadante foi precipitado com 1 mL de TCA 20% (p/v) e centrifugado por 5 min a 5,000g. A proteína precipitada foi dissolvida em tampão fosfato, precipitada novamente e redissolvida em tampão fosfato. A quantificação das proteínas foi realizada nesta solução protéica utilizando a metodologia de Bradford (1976).

Para medir os grupos carbonila da solução proteica, 1 mL foi colocado em tubo de ensaio e misturado com 0,5 mL da solução de dinitrifenilhidrazina (DNFH) 10 mM preparado em HCl 2 M e agitado em vortex (Phoenix, São Paulo, Brasil) a cada 10 min durante uma hora. Para a preparação do branco 1 mL do extrato protéico foi misturado com 0,5 mL de HCl 2 M, sendo omitido a DNFH e submetido ao mesmo tratamento que as demais amostras. Após uma hora foi adicionado 1 mL de TCA 20% em todos os tubos, misturados e centrifugados a 10,000g por 5 min. Após a retirada de todo o sobrenadante, o resíduo foi dissolvido em guanidina 6 M, deixado na estufa a 36 °C e agitado em vortex Phoenix (São Paulo, Brasil) a cada 10 min por 40 min. A absorbância foi lida em 367 nm e corrigida pela absorbância do branco. Os cálculos foram realizados usando o coeficiente de absorvidade de $22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Levine, Willians, Stadman & Shacter, 1994) e os resultados expressos em nmol de DNFH incorporados/mg de proteína solúvel.

2.6 Ácido 5-cafeolquínico (5-ACQ)

Na quantificação do 5-ACQ foi utilizado o método de Casal, Oliveira & Ferreira (2000), modificado por Aguiar, Fazuoli, Salva & Favarini (2005). A

extração foi realizada com metanol 70% (v/v) a 60 °C por uma hora com agitação a cada 10 min. O extrato foi centrifugado a 20,000g por 10 min, o sobrenadante foi filtrado (0,20 µm), diluído (15 vezes) e 20 µL foram injetados no cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). Foi utilizado um HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipado com sistema quaternário de bombeamento de solventes (LC 10AD), injetor Rheodyne (SIL 10A), forno para controle de temperatura (CTO 10A), desgaseificador on line (DGU-2A) e detector de arranjo de diodos (SPD-M10A) fixado a 326 nm. A coluna de separação foi uma Shim-Pack CLC-ODS (M) (0,46 x 25 cm x 5 µm) acoplada a uma coluna de guarda Shim-Pack CLC G-ODS (4) (0,4 x 1 cm x 5 µm) mantidas a 23 °C. A eluição foi isocrática com fase móvel composta de metanol:ácido acético:água 30:0,5:69,5 (v/v/v) e vazão de 1 mL/min. A quantificação foi realizada utilizando uma curva analítica construída com concentrações de 5-ACQ variando de 19 a 64 µg/mL e os resultados foram expressos como g por 100g em base seca.

2.7 Parâmetros de cor

Para a medida da cor os grãos de café congelados com nitrogênio líquido foram moídos em moinho (Perten 3600, Finland) e passados por malha de 0,5 mm. Foi utilizado o sistema CIELAB onde os valores de L* (luminosidade), a* (componente vermelho-verde) e b* (componente amarelo-azul) foram obtidos diretamente do equipamento (Color Quest XE-Hunterlab, Reston, Virginia). As leituras foram realizadas sem especular, utilizando como iluminante D65 e um ângulo de observação 10°.

2.8 Teste de viabilidade da semente

A medida da viabilidade foi realizada segundo o teste de Dias & Da Silva (1998), para o qual os grãos de café foram envolvidos em papel de germinação úmido por 16 h e depois cortados, tendo cuidado de não danificar o embrião. As fatias foram incubadas a 35 °C por 16 horas em solução de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio 0,1% (p/v). De cada grão foi extraído o embrião e avaliada a viabilidade. Os embriões viáveis apresentaram-se cor rosa claro a vermelho enquanto os não

viáveis apresentaram cor branca sem brilho ou marrom escuro. Os resultados são apresentados em porcentagens de grãos viáveis.

2.9. Avaliação da intensidade do sabor café descansado

O sabor café descansado é o sabor decorrente do tempo e condições da estocagem do grão cru que apresenta as características típicas da bebida de café, variando desde fraca intensidade onde se verifica o sabor de chá verde junto de intensas características típicas da bebida até forte intensidade onde se observa sabor amadeirado junto de fracas características típicas da bebida de café

Para a avaliação da intensidade do sabor café descansado durante a estocagem foi formada uma equipe com 12 provadores especialistas de bebidas de café, os quais usaram uma escala de intensidade para avaliar este atributo nas amostras. A escala utilizada possuía 10 cm e apresentava âncoras de 2 cm em cada extremidade com os termos fraco sabor café descansado e intenso sabor café descansado.

Para as avaliações da intensidade do sabor café descansado as amostras foram torradas em um torrador para amostras (Rodbell, São Paulo, Brasil), com tempo de torra na faixa de 12 a 14 min e a temperatura no centro do torrador entre 210 a 220 °C. Os cafés torrados e moídos apresentaram valores de luminosidade (L^*) de $26 \pm 0,9$ e tonalidade cromática (H^*) de $51,8 \pm 1,3$.

As bebidas foram preparadas com café torrado e moído com tamanho de partícula fina (0,6 mm). A proporção de pó de café para água filtrada fervente (95 – 97 °C) foi de 80gL^{-1} . A bebida foi filtrada em papel de filtro (Mellita) e avaliada em temperatura entre 60 a 65 °C em copos plásticos de 50 mL, codificados com números de três dígitos (Rendón, 2007). A ordem de apresentação foi balanceada. As amostras foram avaliadas no início da estocagem (10 dias após do término da secagem) e a cada 3 meses até completar 15 meses.

2.10 Análise de microscopia eletrônica de transmissão

As análises de microscopia de transmissão foram realizadas no Instituto de Biociências de Botucatu, Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade

Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Os fragmentos do endosperma foram fixados em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% (v/v) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3). Logo após, os fragmentos foram lavados com tampão fosfato 0,1 M e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3, por 2 horas. Em seguida, os fragmentos foram desidratados em série crescente de soluções de acetona de 50%, 70%, 90% e 100% (v/v), e incluídos em resina epóxi araldite. Os cortes semi-finos foram seccionados com 0.5 μm de espessura utilizando navalha de vidro, e corados com azul de toluidina 1% (p/v). Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila (Watson, 1958) e citrato de chumbo (Reynold, 1963), e observados em microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 100.

2.11 Análise estatística

Os resultados das análises químicas e sensoriais foram analisadas independentemente para cada café (CN e CD) durante a estocagem através da análise de variância, sendo a causa de variação o tempo de estocagem, e as médias comparadas aplicando o teste de Tukey ($p < 0,05$). As médias das avaliações sensoriais e avaliações químicas foram correlacionadas (Person) independentes para cada café (CN e CD). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Statistica (Statsoft Inc., 2011).

3 Resultados e discussão

3.1 Umidade

A umidade dos grãos de café no início da estocagem foi 12,15% (b.u) para o café cereja natural e 11,3% (b.u) para o café cereja descascado. Durante os três primeiros meses de armazenamento (período de descanso) houve um aumento de 1% na umidade para ambos os cafés e uma diminuição nos meses sucessivos resultando no final da estocagem umidades de 11,9 e 12,1% (b.u) para o café cereja descascado e café cereja natural, respectivamente.

3.2 Composição de ácidos graxos no óleo de café

Considerando que os processos oxidativos são facilitados pela presença de ácidos graxos insaturados foi determinada a composição de ácidos graxos no óleo de café. Tanto nos cafés CN como nos cafés CD os ácidos graxos saturados foram predominantes, sendo os majoritários o 18:0 e 16:0 e dentre os insaturados, os majoritários foram os ácidos graxos 18:2n6, 18:3n3, 18:1n9 (Tabela 1).

Tabela 1

Teores de ácidos graxos no óleo de café cru no café cereja natural (CN) e café cereja descascado (CD) no início da estocagem

| Ácidos graxos | Café natural (mg/g de óleo) | Café descascado (mg/g de óleo) |
|---------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| 14:0 | 1,10±0,1 | 1,15±0,07 |
| 15:0 | 0,46±0,0 | 0,48±0,04 |
| 16:0 | 251,85±2,0 | 243,71±5,98 |
| 17:0 | 1,50±0,01 | 1,68±0,16 |
| 18:0 | 46,37±1,2 | 45,70±1,15 |
| 18:1n9 | 54,43±1,3 | 55,12±1,24 |
| 18:1n7 | 3,26±0,1 | 3,12±0,06 |
| 18:2n6 | 300,26±8,1 | 291,74±5,46 |
| 19:0 | 0,25±0,0 | 0,29±0,03 |
| 20:0 | 17,73±0,8 | 16,65±0,45 |
| 20:1n9 | 4,26±0,2 | 4,87±0,50 |
| 18:3n3 | 7,53±0,30 | 7,20±0,09 |
| 21:0 | 1,08±0,1 | 1,18±0,12 |
| 22:0 | 4,39±0,2 | 4,09±0,16 |
| 23:0 | 1,47±0,1 | 1,57±0,2 |
| 24:0 | 3,97±0,2 | 4,27±0,4 |

Média de 3 repetições ± desvio padrão

Nikolova-Damyanova et al. (1998) quantificaram os ácidos graxos no óleo de café, por porcentagem de área, encontrando 38,3%; 7,5%; 37,1% e 1,2% para os ácidos graxos 16:0, 18:1n9, 18:2n6 e 18:3n3 respectivamente. A fim de

comparar com os nossos resultados foi realizada também a quantificação por porcentagem de área cujos resultados foram 35,5%; 7,9%; 44,0% e 1,1% para os ácidos graxos 16:0, 18:1n-9, 18:2n-6 e 18:3n-3, respectivamente.

3.3 Ácidos graxos livres no óleo de café

Os ácidos graxos livres são conhecidos como desestabilizadores da membrana celular e seu acúmulo está associado à perda da viabilidade em sementes de café (Laffargue, De Kochco & Dussert, 2007). A origem dos ácidos graxos livres pode ser enzimática ou através da ação de radicais livres (Dussert, Davey, Laffargue, Dolbeau, Swennen & Etienne, 2006).

Na Fig. 1 observa-se o teor de ácidos graxos livres presente nas amostras no início da estocagem (após a secagem) de 1,89 e 1,37 mg/g de óleo para o café CN e café CD, respectivamente. A presença de ácidos graxos livres em café após a secagem também foi reportada por Dussert et al. (2006) e Kurzrock et al. (2004) os quais encontraram valores de 1,5 a 2,3 mg/g e 1,8 mg/g de óleo, respectivamente.

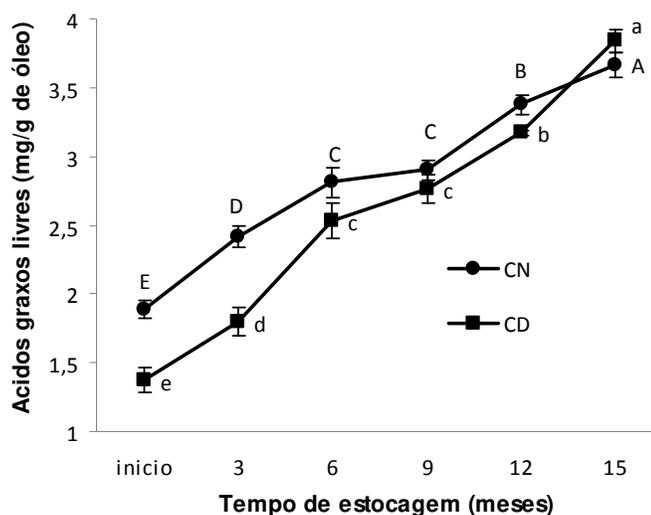


Fig. 1. Teor de ácidos graxos livres (mg/g de óleo) em café natural (CN) e café cereja descascado (CD) durante 15 meses de estocagem. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Durante a estocagem foi observado aumento da concentração de ácidos graxos livres alcançando 3,7 e 3,9 mg/g de óleo para os cafés CN e CD, respectivamente no final de 15 meses. Comportamento similar foi encontrado por Kurzrock et al. (2004) após 18 meses de estocagem em café despulpado da Colombia, que apresentou 3,8 mg/g de óleo. O aumento do teor de ácidos graxos livres observado durante a estocagem pode ser consequência da ação enzimática considerando que a presença de lipase ativa foi verificado por Kurzrock et al. (2004) em cafés produzidos no Brasil após 10 anos de armazenamento. Por outro lado, Dussert et al. (2006) encontraram aumento de ácidos graxos livres durante o armazenamento em sementes de café e consideraram a possibilidade dos ácidos graxos serem gerados por espécies reativas de oxigênio (ROS).

3.4 Quantificação das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O teste de TBARS envolve a reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o malonaldeído (MA), produzido pela decomposição do hidroperóxido proveniente de ácidos graxos com 3 ou mais ligações duplas, durante a fase de terminação da oxidação lipídica. Este método tem a desvantagem de não ser específico para o MA, podendo o TBA reagir com aldeídos provenientes de outras reações e superestimar a extensão da oxidação lipídica. No entanto, a determinação de TBARS é um método utilizado com frequência para a investigação e acompanhamento da oxidação lipídica em café (Gomes-Junior et al., 2006; Queiroz, Alonso, Mares-Guia &, Magalhães, 1998; Oliveira, Alves & Vitória, 2009). Na Fig. 2 observamos os valores de TBARS nos cafés CN (9 nmol/g b.s) e CD (9,4 nmol/g b.s) no início da estocagem, os quais aumentaram rapidamente durante os primeiros 3 meses. Também foram observados pequenos aumentos que foram significativos somente entre o sexto e 15 mês ($p < 0,05$).

Rendón, Salva, Braghini & Bragagnolo (2010) encontraram valores de TBARS entre 7,9 e 11,9 nmol/g (b.s) em cafés das cultivares Mundo Novo, Obatã Amarelo e Catuaí Vermelho no final da secagem. Os valores de TBARS encontrados no início da estocagem podem indicar o desenvolvimento de um processo oxidativo de lipídios, o qual poderia ser iniciado durante a secagem

como consequência de um estresse por perda de água (Dussert et al., 2006; Kramer, Breitenstein, Kleinwächter & Selmar, 2010).

O aumento dos valores de TBARS nas amostras até o terceiro mês pode ser consequência de um nível de respiração nos grãos, o que pode levar a formação de ROS, aumentando a oxidação lipídica (Fig. 2). Já a diminuição não significativa do sexto mês e a estabilidade nos valores de TBARS a partir do nono mês de estocagem pode ser atribuída à reação de produtos secundários da oxidação de lipídios com proteínas ou reações de polimerização (Gardner, 1979). Além disso, à medida que transcorre a estocagem, o grão de café cessa de respirar (Rojas, 2004) diminuindo o risco de oxidação de lipídios por ação de ROS.

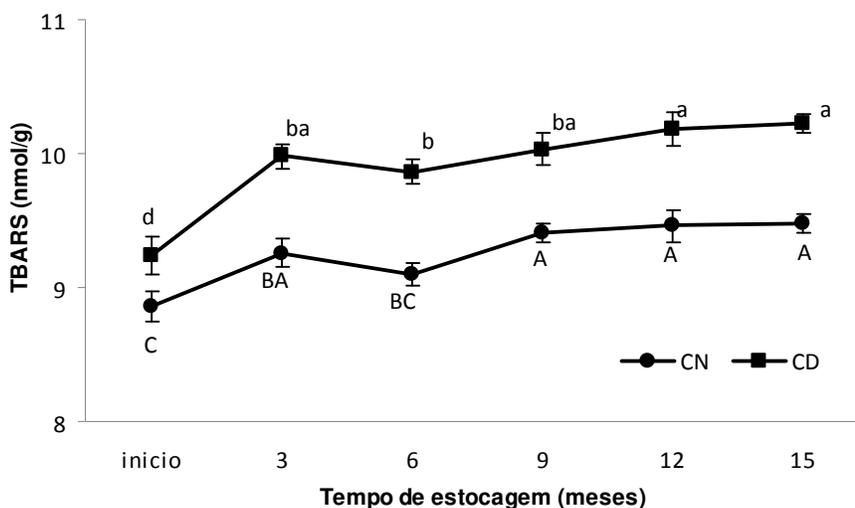


Fig. 2. Valores de TBARS (nmol/g de café, base seca) em café natural (CN) e café cereja descascado (CD) durante 15 meses de estocagem. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

3.5 Quantificação de grupos carbonila

As proteínas nas células encontram-se muito próximas dos lipídios poli-insaturados podendo ser facilmente modificadas quando ocorre a oxidação dos lipídios. Como resultado desse processo oxidativo ocorre a formação de produtos primários e secundários capazes de reagir com proteínas, gerando grupos carbonila (Gardner, 1979). Outra forma para gerar grupos carbonila nas proteínas

é pela reação direta da proteína com ROS, levando a derivados de proteínas ou fragmentos de peptídeos contendo grupos carbonila (Stadman & Levine, 2003).

Considerando que a presença de grupos carbonila nas proteínas reflete dano celular, métodos analíticos foram desenvolvidos para quantificar os grupos carbonila nas proteínas (Stadman et al., 2003).

Os cafés avaliados apresentaram no início da estocagem 2,64 e 2,80 nmol de grupos carbonila/mg de proteína para os cafés CN e CD, respectivamente; valores que foram aumentando durante a estocagem até atingir 3,4 nmol de grupos carbonila/mg de proteína no café CN e 3,5 nmol de grupos carbonila/mg de proteína no café CD (Fig. 3). Os valores obtidos no início da estocagem foram próximos dos valores encontrados para café da cultivar Mundo Novo (1,7 e 2,6 nmol grupos carbonila/mg de proteína) reportado por Rendón et al. (2010). Os grupos carbonila encontrados no início da estocagem podem ser decorrentes da secagem considerando a possibilidade de um estresse mencionado por Kramer et al. (2010). O aumento da concentração desses grupos durante os primeiros meses da estocagem pode ter duas origens; a primeira como consequência do processo oxidativo de lipídios, provavelmente iniciado durante a secagem, e a segunda por ROS geradas na respiração dos grãos.

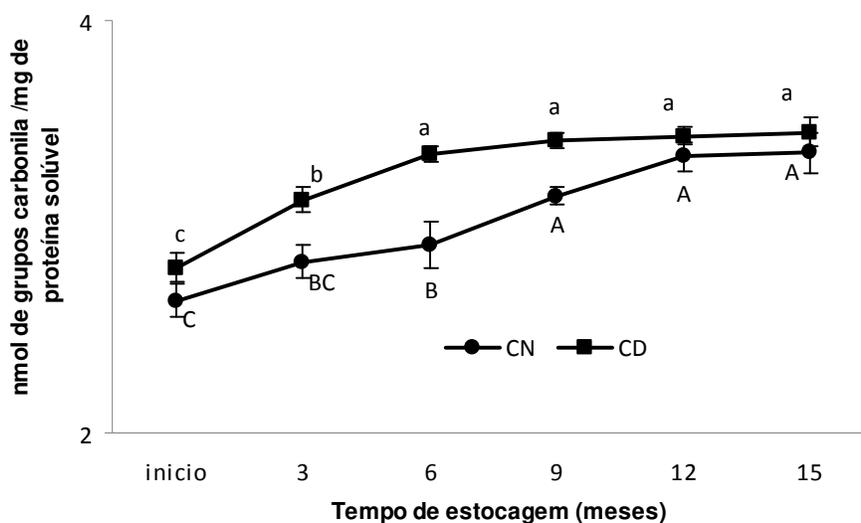


Fig. 3. Concentração de grupos carbonila por mg de proteína solúvel de café natural (CN) e café descascado (CD) durante 15 meses de estocagem. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Observa-se que após o nono e o sexto mês da estocagem o aumento de grupos carbonila não foi significativo ($p < 0,05$) para os cafés CN e CD, respectivamente. Considerando que os grupos carbonila podem ser formados por ROS durante a respiração do grão e por oxidação de lipídios o comportamento observado pode ser explicado pela finalização do processo respiratório, que acontece normalmente durante a estocagem do grão, restando apenas o efeito da oxidação de lipídios, o qual também parece não ter efeito após o sexto mês de estocagem segundo os resultados de TBARS. Outra possível explicação seria a formação de compostos de Schiff que envolveria os grupos carbonila e produtos secundários da oxidação de lipídios (Liang, 1999).

3.6 Ácido 5- cafeoilquínico

Os ácidos clorogênicos são os principais componentes da fração fenólica dos grãos de café cru e são conhecidos por sua capacidade antioxidante, e o 5-ACQ é o composto majoritário (Farah & Donangelo, 2006).

Na Fig. 4 observa-se que a concentração de 5-ACQ no início da estocagem foi de 5,2 e 4,9 % (b.s.) para os cafés CN e CD, respectivamente. Na mesma figura observa-se a diminuição desse composto durante a estocagem (teor final próximo de 4,6 % (b.s)), provavelmente, como consequência da oxidação enzimática e não enzimática, favorecida pela ação de ROS que leva à perda da estrutura celular permitindo o contato de enzimas (lacase, polifenoloxidase) e substratos (ácidos clorogênicos) ou que podem agir diretamente nos ácidos clorogênicos formando quinonas (Clifford, 1985). Também o 5-ACQ pode diminuir devido à reação de oxidação que estaria acontecendo simultaneamente em outros compostos (lipídios), considerando que compostos fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais, agindo na etapa de iniciação, assim como na propagação do processo de oxidação lipídica (Ramalho & Jorge, 2006).

Os valores de 5-ACQ obtidos no presente trabalho no início da estocagem foram maiores do que as concentrações (faixa de 3,0 e 4,8 % b.s) encontradas por Duarte, Pereira & Farah (2010), resultados que variaram em função do cultivar

e da forma do processamento. Considerando que o 5-ACQ corresponde a 56-62% dos ácidos clorogênicos totais, os resultados encontrados estão dentro da faixa (4 a 8,4 % b.s) descrita por Farah et al. (2006).

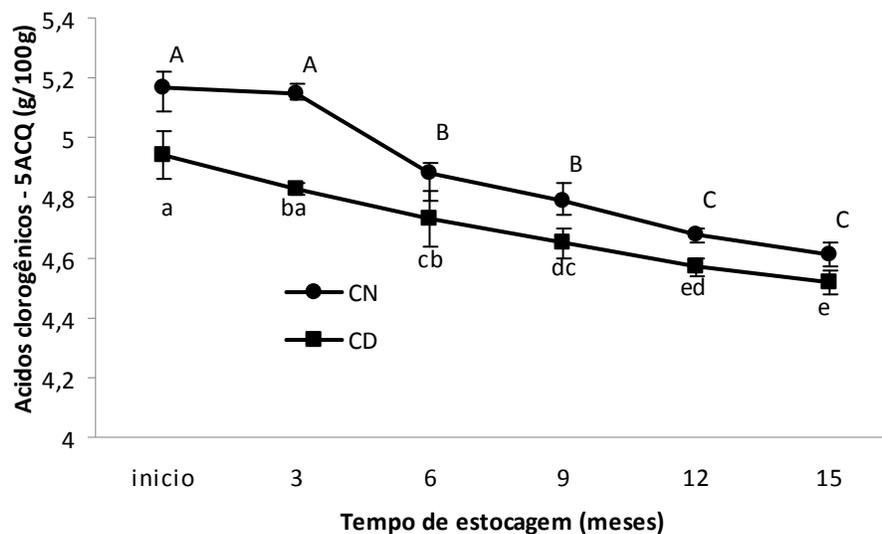


Fig. 4. Concentração de 5ACQ (g/100g, base seca) de café natural (CN) e café descascado (CD) durante 15 meses de estocagem. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

3.7 Viabilidade da semente

O teste do tetrazólio é um método que estima a viabilidade da semente e está baseado na alteração da coloração dos tecidos vivos em presença de uma solução de sal de tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio). A porcentagem de embriões viáveis encontrados nas amostras no início da estocagem foi de 87% para a amostra CN e de 93% para amostra CD (Fig. 5).

Esses resultados se encontram na faixa de 80 a 93% reportados na literatura para diversas cultivares e tipos de processamento de café (Selmar et al., 2008; Rendón et al., 2010). Na mesma figura observa-se que após o beneficiamento das amostras no terceiro mês, a viabilidade cai rapidamente até ser perdida totalmente no nono mês. Um efeito protetor da casca na viabilidade foi reportado por Selmar et al. (2008) que, além disso, encontraram perdas totais da viabilidade em cafés estocados sem casca após 6 meses da estocagem.

Após a retirada da casca e pergaminho, os embriões dos grãos inviáveis apresentaram-se total ou parcialmente de cor marron. Resultados similares foram observados por Da Silva, Toorop, Nijse, Bewley & Hilhorst (2005) ao submergirem o endosperma de café em solução 100 μM de giberelinas, atribuindo a aparência marron do embrião ao estresse oxidativo ou à falta de suficiente poder redutor causado por um excesso de giberelinas, composto cuja produção pode ser induzida pela luz. Desta forma, a casca teria um efeito protetor ao evitar a incidência de luz nos grãos.

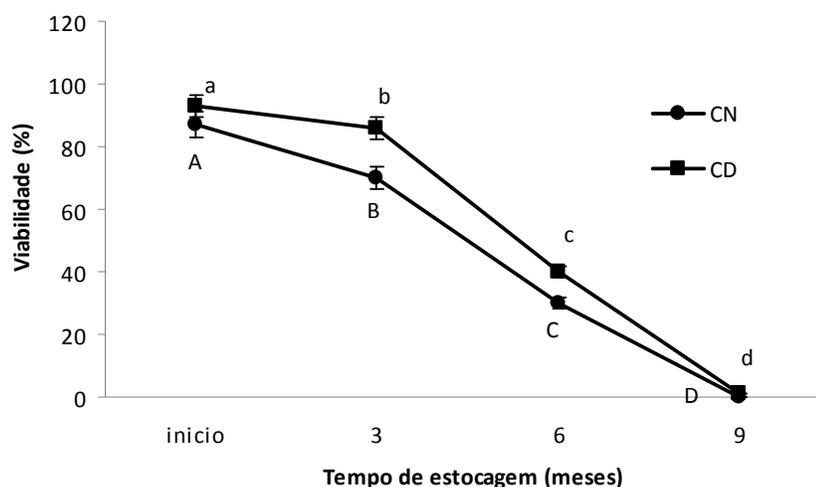


Fig. 5. Porcentagens de grãos viáveis no café natural (CN) e café descascado (CD) durante 15 meses de estocagem. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

3.8 Parâmetros de cor

A cor do grão é um dos fatores que contribui para o valor comercial do café, pois a falta de uniformidade na cor indica problemas na secagem, e consequentemente, problemas na aparência dos grãos torrados. Além disso, a intensidade da cor, descrita como verde-azulado, está relacionada com o tempo e forma da estocagem dos grãos (Rojas, 2004; CCI, 2002).

A descrição da cor no presente estudo foi realizada pelas componentes L^* , a^* e b^* . Na Tabela 2 observam-se maiores valores da componente L^* seguido dos valores das componentes b^* e a^* , respectivamente, para cada café (CN e

CD). Estes resultados estão próximos dos valores encontrados por Cavaco-Bicho, Lindon, Ramalho, Oliveira, Silva & Leitão (2008) em diferentes genótipos de café.

Comparando os cafés no início da estocagem, observa-se menor valor de L^* no café CN em comparação com CD (Tabela 2), significando que o café CD apresenta-se mais claro no final da secagem. Corrêa, Afonso-Júnior, Pinto & Oliveira (2002) avaliando grãos de café cereja natural e cereja descascado com o sistema L, a e b encontraram após a secagem maior luminosidade no café cereja descascado em comparação com o café cereja natural.

Tabela 2.

Parâmetros da cor de café natural (CN) e café descascado (CD) durante 15 meses de estocagem

| Café | Início | 3 meses | 6 meses | 9 meses | 12 meses | 15 meses |
|----------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|
| L^* CN | $55,3 \pm 0,7^c$ | $56,2 \pm 0,7^c$ | $58,2 \pm 0,4^b$ | $60,7 \pm 0,5^a$ | $61,0 \pm 0,5^a$ | $61,3 \pm 0,2^a$ |
| a^* CN | $0,5 \pm 0,0^c$ | $0,5 \pm 0,0^c$ | $0,6 \pm 0,0^b$ | $0,8 \pm 0,0^b$ | $0,9 \pm 0,1^a$ | $0,9 \pm 0,1^a$ |
| b^* CN | $18,6 \pm 0,0^b$ | $18,5 \pm 0,1^b$ | $18,6 \pm 0,1^b$ | $18,8 \pm 0,1^a$ | $20,0 \pm 0,1^a$ | $20,5 \pm 0,1^a$ |
| L^* CD | $57,0 \pm 0,4^d$ | $57,0 \pm 0,5^d$ | $58,0 \pm 0,4^c$ | $60,8 \pm 0,4^b$ | $61,1 \pm 0,4^b$ | $61,8 \pm 0,3^a$ |
| a^* CD | $0,4 \pm 0,0^d$ | $0,4 \pm 0,0^d$ | $0,7 \pm 0,0^c$ | $0,8 \pm 0,1^b$ | $0,9 \pm 0,1^{ba}$ | $0,9 \pm 0,0^a$ |
| b^* CD | $16,7 \pm 0,1^c$ | $17,0 \pm 0,1^c$ | $17,6 \pm 0,2^b$ | $17,6 \pm 0,2^b$ | $18,2 \pm 0,2^a$ | $18,9 \pm 0,2^a$ |

Media de 6 repetições \pm desvio padrão.

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas $p < 0,05$ pelo teste de Tukey.

Após os 3 primeiros meses da estocagem foi retirada a casca das amostras, o que ocasionou as mudanças nas componentes da cor nos meses seguintes, tanto para o café cereja natural como para o cereja descascado (Tabela 2). Assim, Godinho, Vilela, Oliveira & Chagas (2000) encontraram menores mudanças nos cafés estocados com casca em comparação com cafés beneficiados.

Até o final do armazenamento observa-se um aumento nas componentes L^* , a^* e b^* o que significa um clareamento e aumento da cor amarela nos grãos. Este branqueamento das amostras durante a estocagem era esperado, pois acontece no trabalho comercial do café. Comportamento semelhante foi

observado por Corrêa, Afonso-Junior, Da Silva & Ribeiro (2003) e por Ribeiro, Borém, Giomo, Lima, Malta & Figueredo (2011) em café estocado durante 12 meses em sacas de juta.

3.9 Sabor café descansado

Na comercialização de café é bem conhecido que, durante a estocagem do café cru, o sabor da bebida sofre mudanças. Assim, um café recém processado (logo após o término da secagem) apresenta um sabor de chá verde (erva-“verde”) (chá verde) e depois de um tempo de armazenamento ele apresenta uma bebida de sabor amadeirado (CCI, 2002). Na literatura o sabor amadeirado é relacionado com a perda da qualidade na bebida e o café é chamado de “café velho”. (Kurzrock et al., 2004; Bonnländer et al., 2006).

No início da estocagem, os cafés CN e CD apresentaram intensidades de sabor café descansado de 2,1 e 3,2, respectivamente, (Fig. 7), o que significa cafés com pouca intensidade de sabor café descansado, sendo maior a intensidade para o café CD em comparação com o café CN.

Durante a estocagem esses valores foram aumentando gradativamente até atingir 5,6 e 6,7 nos cafés CN e CD, respectivamente, sugerindo mudanças sensoriais na bebida de café. Mudanças nos odores de café cru durante a estocagem foram reportadas por Sheidig, Czerny & Schieberle (2007). Esses autores relataram odores descritos como ervilha, “green” “grassy” no início da estocagem de 9 meses a 40 °C. No final deste período, os mesmos provadores sinalizaram menores intensidades desses odores e o aparecimento de odores descritos como “smoky”, “sweaty”, “spicy” e “fruity”. As maiores intensidades de sabor café descansado para o café CD durante a estocagem em comparação com o café CN indica maiores alterações no sabor da bebida do café CD decorrente da estocagem

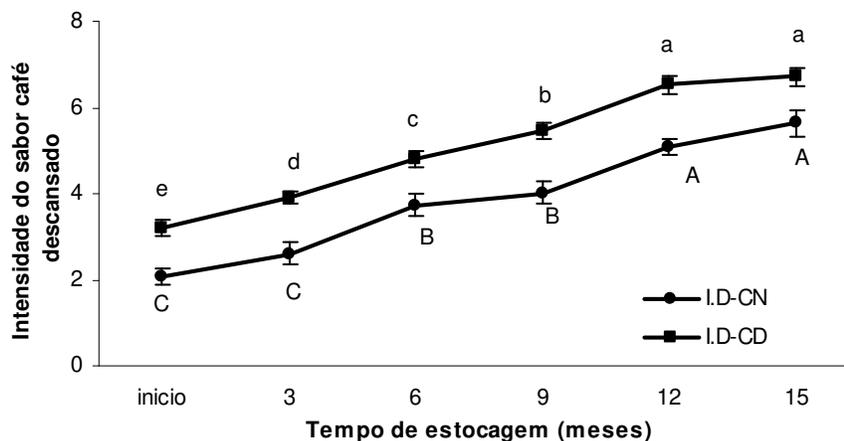


Fig. 7. Intensidade do sabor de café descansado no café natural (CN) e no café e café descascado (CD) durante 15 meses de estocagem. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

3.10 Microscopia eletrônica de transmissão

As avaliações de microscopia realizadas durante a estocagem para a amostra de café natural e café cereja descascado são apresentadas na Fig. 8. Após 3 meses da estocagem foi observado supostos corpos lipídicos definidos e a conservação da membrana celular (8A e 8C). No final da estocagem foi observado na maioria das fotos a aparente perda da membrana celular (M) e a fusão de corpos lipídicos (F) durante a estocagem para os cafés CN (8B) e CD (8D).

Begnami (1998), estudando a correlação entre a perda da viabilidade e as alterações estruturais durante a estocagem de sementes de *Coffea arabica* cv. Catuai Vermelho encontrou a perda da estrutura celular e a perda da viabilidade da semente. Esses resultados são verificados no presente estudo onde após 3 meses da estocagem não são observadas perdas na membrana celular e os grãos de café apresentaram aproximadamente 70% de viabilidade. Já, no final da estocagem, perda da estrutura da membrana celular é observada como também se constatou a perda total da viabilidade a partir do sexto mês.

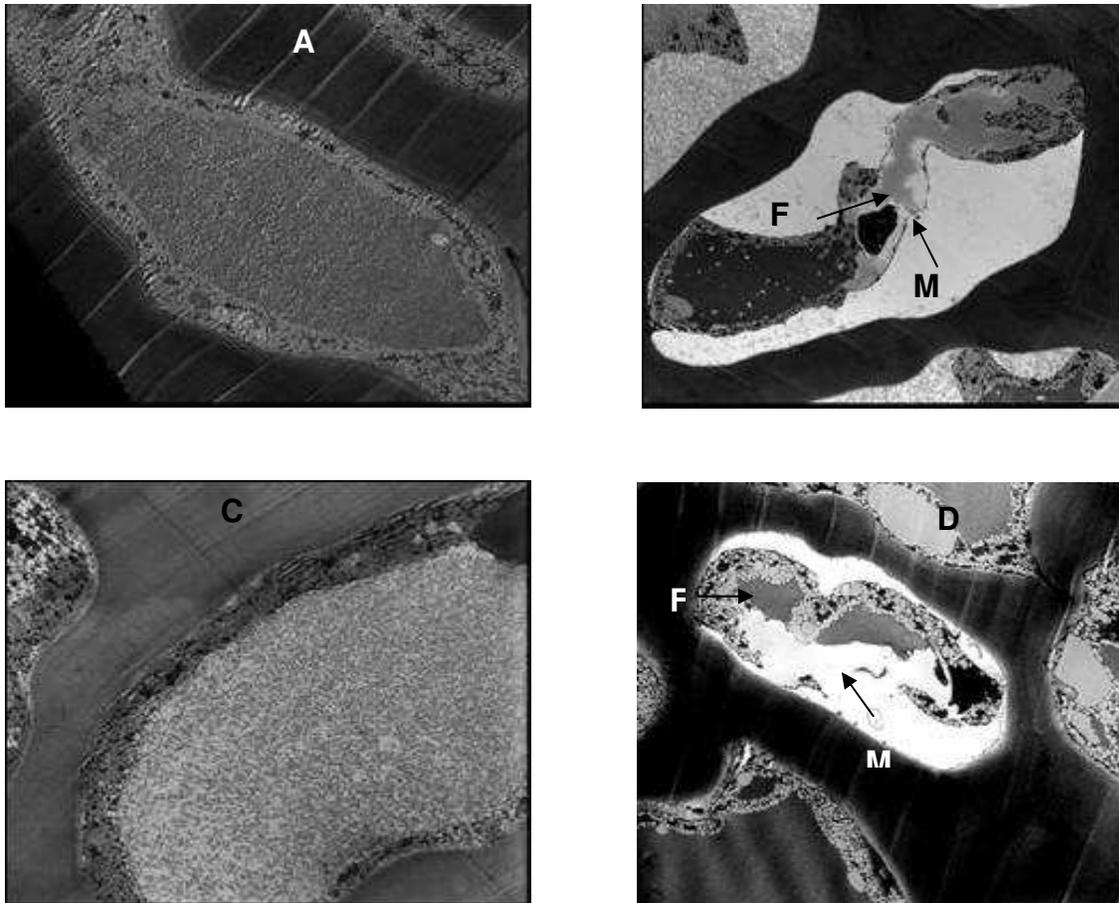


Fig 8. Microscopia de transmissão eletrônica durante a estocagem de café cereja natural e descascado. A, café cereja natural após 3 meses de estocagem (650X); B, café cereja natural após 15 meses de estocagem (490X); C, café cereja descascado após 3 meses de estocagem (650X); D, café cereja descascado após 15 meses de estocagem (870X).

A perda da membrana celular no final da estocagem pode ter sido conseqüência da acumulação de ácidos graxos livres, pois alguns estudos indicam que estes compostos atuam como desestabilizadores da membrana (Dussert, et al., 2006; Laffargue et al., 2007).

Ruptura da membrana celular e a fusão de corpos lipídicos foram observados durante condições extremas de secagem (60 °C) em grãos de café por Borém, Marques & Alves (2008). Esses autores mencionam que a ruptura da membrana expõem os lipídios à oxidação e rancidez, levando a geração de compostos que alteram o aroma e sabor de café.

3.11 Correlação das variáveis

A presença dos ácidos graxos insaturados, ácidos graxos livres, valores de TBARS e grupos carbonila no café no início da estocagem indicam uma pré-disposição para o desenvolvimento de reações oxidativas, as quais podem ter começado ainda durante a secagem. Comparando os resultados dos grupos carbonila e TBARS com a viabilidade, observamos que as maiores mudanças acontecem até os seis meses da estocagem, tempo em que aproximadamente 40% dos grãos ainda estão viáveis. A relação entre os grupos carbonila e a perda de viabilidade foi estudada em sementes de soja por Sun & Leopold (1995), os quais sugerem que os produtos secundários da oxidação de lipídios (aldeídos e grupos cetonas) podem reagir com as proteínas formando bases de Schiff, o que levaria à perda da viabilidade durante a estocagem. Por outro lado, o aumento de ácidos graxos livres se mantém durante a estocagem, mesmo após da perda da viabilidade. Isto pode ser resultado da ação de lípases já que Kurzrock et al. (2004) encontram essas enzimas ativas em cafés do Brasil armazenados por 10 anos. Relação inversa entre a viabilidade e o teor de ácidos graxos livres também foram reportadas na literatura por Dussert et al. (2006) e Laffargue et al. (2007).

A perda da estrutura celular, o aumento do número de grupos carbonila nas proteínas e a diminuição nos teores de 5-ACQ podem ser conseqüências do processo oxidativo enzimático e não enzimático. Durante a estocagem pode ocorrer dano da membrana celular permitindo o contato entre enzimas e substratos. Assim, a oxidação dos ácidos clorogênicos (5-ACQ) levaria a formação de quinonas e a polimerização das mesmas formaria compostos de cor marrom capazes de alterar a cor inicial do grão. Sheidig et al. (2007) estudando a fração de compostos voláteis do café cru durante a estocagem a 25 °C por 18 meses encontraram aumento na quantidade de 2-metoxi-4-vinilfenol, composto que poderia ser formado pela descarboxilação do ácido isoferúlico, resultante da ação enzimática segundo esses autores. Desta forma, as mudanças na avaliação sensorial do café podem ser conseqüências da ação enzimática e não enzimática.

Para verificar a relação entre os comportamentos observados nas variáveis químicas e as mudanças na cor e na bebida foi realizada a análise de correlação (Tabela 3).

Tabela 3

Coeficientes de correlação entre as avaliações químicas e sensoriais durante a estocagem do café natural (CN) e café cereja descascado (CD)

| | AGL | TBARS | GCP | 5ACQ |
|--------------------------|--------|-------|--------|---------|
| Sabor café descansado CN | 0,99** | 0,84 | 0,97** | -0,98** |
| L * CN | 0,93** | 0,86 | 0,97** | -0,98** |
| B * CN | 0,92** | 0,78 | 0,95** | 0,97** |
| A * CN | 0,86 | 0,70 | 0,86 | -0,82 |
| Sabor café descansado CD | 0,98** | 0,83 | 0,90** | -0,99** |
| L * CD | 0,93** | 0,72 | 0,82 | -0,95** |
| B * CD | 0,99** | 0,77 | 0,82 | -0,95** |
| A * CD | 0,96** | 0,74 | 0,90** | -0,97** |

AGL: ácidos graxos livres; TBARS: substâncias reativas com o ácido tiobarbiturico, GCP: grupos carbonila nas proteínas, 5ACQ: ácido 5 cafeolquínico.

Valores com (**) são correlações significativas a $p < 0,01$

Os coeficientes de correlação significativos entre as variáveis sensoriais e químicas indicam que as mudanças na cor dos grãos e na bebida durante a estocagem estão correlacionadas principalmente com o aumento dos valores de ácidos graxos livres e com a diminuição dos teores de 5-ACQ. A menor correlação do TBARS e grupos carbonilas com as mudanças sensoriais pode ser resultado da interação de produtos de oxidação de lipídios e proteínas (composto de Schiff) o que leva a um comportamento diferenciado durante a estocagem.

4 Conclusão

A geração de ácidos graxos livres contribuíram para a perda da estrutura celular, permitindo o contato de enzimas e substratos, o que levaria à degradação de compostos e, conseqüentemente, a mudanças sensoriais.

Os valores de TBARS e de grupos carbonilas, bem como a viabilidade da semente, indicam uma provável participação de ROS no processo oxidativo durante os primeiros meses da estocagem.

O café CN apresentou menor intensidade de sabor café descansado na bebida em comparação com o café CD no final da estocagem por 12 meses a 22 °C e 64 % U.R.

Referências bibliográficas

Aguiar, E., Fazuoli, L., Salva, T. J., & Favarin, J. (2005). Diversidade química de cafeeiros na espécie *Coffea canephora*, *Bragantia*, 64, 577-582.

AOCS (1998). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, (5 th. ed.) Firestone: American Oil chemists' Society Press, Champaign, (Official method Ce 1-62).

Brasil - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2009). Determinação do grau de umidade In: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Ed.), *Regras para análise de sementes* (pp.307-323). Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Bettencourt, A. J., & Fazuoli, L. C. (2008). Melhoramento genético de *Coffea arabica* L: transferência de genes de resistência a *Hemileia vastatrix* do híbrido de timor para a cultivar Villa Sarchí de *Coffea arabica*. Instituto Agronômico de Campinas SP, Brasil, Documento IAC 84.

Begnami, C. (1998). Alterações estruturais, ultraestruturais e bioquímicas durante a perda da viabilidade em sementes de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

Borém, F. M., Marques E. R., & Alves, E. (2008). Ultrastructural analysis of drying damage in parchment Arabica coffee endosperm cells. *Biosystems Engineering*, 99, 62-66.

Bonnländer, B., Colombam, S., & Lonzarich, V. (2006). Lipidomics and the influence on quality of coffee. ASIC, Montpellier: Proc. 21th International Scientific Colloquium on Coffee. CDroom.

Bradford, J. M. A. (1976). Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Budryn, G., Nebesny, E., & Zyzelewicz, D. (2011). Oxidative stability of lard and sunflower oil supplemented with coffee extracts under storage conditions. *Grasas e Aceites*, 62, 155-161.

Cliford, M. N. (1985). Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In: M.N. Clifford & K.C. Willson (Eds.), *Coffee botany, biochemistry and production of beans and beverage* (pp.284-304). Westport: AVI Publishing Company.

Casal, S., Oliveira, B., & Ferreira, M. A. (2000). HPLC/ diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee. *Food Chemistry*, 68, 481-485.

Cavaco-Bicho, N. C., Lindon, F. C. Ramalho J. C., Oliveira J. F., Silva, M. J. & Leitão A. E. (2008). Color and quality of green coffee. ASIC, Campinas: Proc. 22th International Scientific Colloquium on Coffee, cdroom.

CCI. Centro de Comercio Internacional. (2002). Calidad del café In: CCI-UNCTAD/OMC (Ed.), *Café guía del exportador* (pp 270-321). Ginebra: Centro de Comercio Internacional UNCTAD/OMC.

Corrêa, P. C., Afonso-Junior, P. C., Pinto, F., & Oliveira, T. T. (2002). Efeito da temperatura de secagem na cor dos grãos de café pré-processado por “via seca” e “via úmida”. *Revista Brasileira de Armazenamento-Especial Café*, 5, 22-27.

Corrêa, P. C., Afonso-Junior, P. C., Da Silva F. S. & Ribeiro, D. M. (2003). Qualidade dos grãos de café (*Coffea arabica* L.) durante o armazenamento em condições diversas. *Revista Brasileira de Armazenamento-Especial Café*, 7, 136-147.

Da Silva, E. A. A., Toorop, P. E., Nijse, J., Bewley, J. D., & Hilhorst, W. H. (2005). Exogenous gibberellins inhibit coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination and cause cell death in the embryo. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1029-1038.

Dias, M. C. L., & Da Silva, W. R. (1998). *Teste de tetrazólio em sementes de café*. Boletim Técnico ISSN 0100-3054. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná.

Duarte, G. S., Pereira A. A., & Farah, A. (2010). Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. *Food Chemistry*, 118, 851-855.

Dussert, S., Davey, M. W., Laffargue, A., Doulebeau, S., Swennen, R. & Etienne H. (2006). Oxidative stress, phospholipid loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds. *Physiologia Plantarum*, 127, 192-204.

Estévez, M., Ventanas, S., & Cava, R. (2007). Oxidation of lipids and proteins in frankfurters with different fatty acid compositions and tocopherol and phenolic content. *Food Chemistry*, 100, 55-63.

Farah, A., & Donangelo, M. C. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal Plant Physiology*, 18, 23-26.

Gardner, H. W. (1979). Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: A review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 27, 220-228.

Godinho, R., Vilela, E. R., Oliveira, G. A., & Chagas, S. J. R. (2000). Variações na cor e na composição química do café (*Coffea arabica* L.) armazenado em côco e beneficiado. *Revista Brasileira de Armazenamento-Especial* 1, 38-43.

Gomes-Junior, R. A., Moldes, C. A., Delite, F. S., Pompeu, G. B., Gratão, P. L., Mazzafera, P., Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2006). Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere*, 65, 1330-1337.

Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts-Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.

Huang, Y., Hua, Y., & Qiu, A. (2006). Soybean protein aggregation induced by lipoxygenase catalyzed linoleic acid oxidation. *Food Research Internacional*, 39, 240-249.

ICO – International Coffee Organization. ICO indicator prices. Disponível em: <www.ico.org> Acesso em: 2/10/2011.

Joseph, J. D., & Ackman, R.J. (1992). Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75, 488-506.

Kölling-Speer, I., Strohschneider, S., & Speer, K. (1999). Determination of free diterpenes in green and roasted coffees. *Journal of High Resolution Chromatography*, 22, 43-46.

Kramer, D., Breitenstein, B., Kleinwächter, M., & Selmar, D. (2010). Stress metabolism in green coffee beans (*Coffea arabica* L.): expression of dehydrins and accumulation of GABA during drying. *Plant and Cell Physiology*, 51, 546-553.

Kurzrock, T., Kölling-Speer, I. & Speer, K. (2004). Effect of controlled storage on the lipid fraction of green Arabica coffee beans. ASIC, Bangalore: Proc. 20th International Scientific Colloquium on Coffee, cdroom.

Laffargue, A., De Kochko, A., & Dussert, E. (2007). Development of solid-phase extraction and methylation procedures to analyse free fatty acids in lipid-rich seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 250-257.

Levine, R. L., Willians, J. A., Stadman, E., R., & Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233, 346-357.

Liang H. (1999). Fluorescence due to interactions of oxidizing soybean oil and soy proteins. *Food Chemistry*, 66,103-108.

Mori, E. E. M., Bragagnolo, N., Morgano, M. A., Anjos, V. D. A., Yotsuyanagi, K., Faria, E. V., & Iyomasa, J. M. (2003). Brazil coffee growing regions and quality of natural, pulped natural and washed coffees. *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, 208, 416-424.

Nikolova-Damyanova, B., Velikova, R., & Jham, G. N. (1998). Lipid classes, fatty acid composition and triacylglycerol molecular species in crude coffee beans harvested in Brazil. *Food Research International*, 31, 479-486.

Oliveira, J. G., Alves, P. L. C. A. , & Vitória, A. P. (2009). Alterations in chlorophyll a fluorescence, pigment concentrations and lipid peroxidation to chilling temperature in coffee seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, doi:10.1016/j.envexpbot.2009.05.007.

P & A Marketing International < <http://www.peamarketing.com.br>>. Acesso 19/12/11.

Queiroz, C., Alonso, A., Mares-Guia, M., & Magalhães, A. C. (1998). Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabica* L. roots. *Biology Plantarum*, 41, 403-413.

Ramalho, V. C., Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29, 755-760.

Rendón, M. Y., Salva, T. J. G., Braghini, M., & Bragagnolo, N. (2010). Protein and lipid oxidation in just prepared coffee beans. ASIC, Bali: Proc. 23th International Scientific Colloquium on Coffee, cdroom.

Rendón, M. Y. (2007). Acidez do café verde e a qualidade da bebida. Dissertação de mestrado em Ciências de alimentos. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron- opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 17, 208-212.

Ribeiro, F. C., Borém, F. M., Giomo, G. S., Lima, R. R., Malta, R. M., & Figueredo, L. P. (2011). Storage of green coffee in hermetic packaging injected with CO₂. *Journal of Storage Products Research*, 47, 341-348.

Rogers, J. W., Bezard, G., Deshayes, A., Meyer, I., Pétiard, V., & Marraccini, P. (1999). Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. *Plant Physiology Biochemistry*, *37*, 261-272.

Rojas J. (2004). Green coffee storage. In: Wintgens J. N. (Ed.), *Coffee: growing, processing, sustainable production* (pp. 733-750). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Salva, T. J. G. (2007). A composição química dos grãos e a qualidade da bebida de café, em consequência do método de preparo e da cultivar. In Salva T.J.G., Guerreiro O., Thomaziello R.A., Fazuoli L.C. (Eds.), *Cafés de qualidade-Aspectos tecnológicos, científicos e comerciais* (pp. 255-280). Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas.

Scheidig, C., Czerny, M., & Schieberle, P. (2007). Changes in key odorants of raw coffee beans during storage under defined conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 5768-5775.

Selmar, D., Bytof, G., & Knopp S-E. (2008). The storage of green coffee (*Coffea arabica*): decrease of viability and changes of potential aroma precursors. *Annals of Botany*, *101*, 31-38.

Stadman, E. R., & Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, *25*, 207-218.

Sun, W. Q., & Leopold, A. C. (1995). The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. *Physiologia Plantarum*, *94*, 94-104.

Watson, M. L. (1958). Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, *4*, 475-478.

Wintgens, J. N. (2004). Factor influencing the quality of green coffee. In: Wintgens J.N., (Ed). *Coffee: growing, processing, sustainable production* (789-808), Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

CONCLUSÕES GERAIS

Durante a secagem como consequência da perda de água acontecem variações na atividade das enzimas antioxidantes e na geração de peróxido de hidrogênio, podendo-se gerar outras espécies reativas de oxigênio (ROS).

A cor dos grãos não mudou significativamente enquanto a casca estava presente. Porém, após a retirada da mesma, o branqueamento foi aumentando simultaneamente com o aumento da intensidade de sabor de café descansado.

A qualidade da bebida alcançou o valor máximo no nono mês de estocagem para o café CN e CD, diminuindo no final da estocagem somente para o café CD.

Nas condições de estocagem testadas (22 °C e 64% UR) o café CD apresentou maior mudança na intensidade de sabor café descansado em comparação com o café CN.

O uso da escala de intensidade do sabor café descansado possibilitou uma medida sensorial da alteração do sabor da bebida capaz de ser correlacionada com as variáveis químicas durante a estocagem.

Os resultados obtidos na avaliação de ácidos graxos livres, grupos carbonila, TBARS, 5-ACQ, bem como a viabilidade e microscopia de transmissão eletrônica durante a estocagem indicam o desenvolvimento de processos oxidativos, iniciados durante a secagem os quais originam as mudanças sensoriais durante a estocagem de café cru.