UNIVERSIDADE FEDERAL DOS RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO CAFÉ POR MEIO DE ANÁLISE MOLECULAR USANDO PCR EM TEMPO REAL.

THIAGO FERREIRA DOS SANTOS

RIO DE JANEIRO

2019

MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO CAFÉ POR MEIO DE ANÁLISE MOLECULAR USANDO PCR EM TEMPO REAL.

Thiago Ferreira dos Santos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição (PPGN), do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor em Ciências Nutricionais.

Orientadores: Profª. Dr. ªAdriana Farah de Miranda Pereira

Drª. Edna Maria Morais Oliveira

MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO CAFÉ POR MEIO DE ANÁLISE MOLECULAR USANDO PCR EM TEMPO REAL.

Thiago Ferreira dos Santos

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO DO INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS NUTRICIONAIS.

Examinada por:

_____

Profª. Drª. Adriana Farah de Miranda Pereira, Dr.Sc.

_____

Profª. Drª. Edna Maria Moraes Oliveira, Dr.Sc.

_____

Profª Drª. Eliane Lopes Rosado, Dr.Sc.

_____

Profª. Drª. Silvia Regina Magalhães Couto Garcia, Dr.Sc.

_____

Profª Drª. Janaina Japiassu de Vasconcelos Cavalcante, Dr.Sc

_____

Drª. Anna Beatriz Robottom Ferreira, Dr.Sc.

_____

Profª. Drª. Bianca Cruz Neves, Ph.D.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

FEVEREIRO DE 2019

Santos, Thiago Ferreira dos

Monitoramento da qualidade do café por meio de análise molecularusando PCR em tempo real/Thiago Ferreira dos Santos. –Rio de Janeiro: UFRJ/INJC, 2019.

XX, 140 p.:67 il.; 29,7 cm.

Orientador: Adriana Farah de Miranda Pereira. Edna Maria Morais Oliveira.

Tese – UFRJ/INJC/Programa de Pós-graduação em Nutrição,2019.

Referências Bibliográficas: p. 89-95.

1. Autenticidade e qualidade do café. 2. PCR em tempo real. 3. Desenvolvimento de método. I. Pereira, Adriana Farah de Miranda *et al*. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, INJC, Programa de Pós-graduação em Nutrição Clínica. III. Monitoramento da qualidade do café por meio de análise molecular usando PCR em tempo real.

Dedico esse trabalho à minha heroína, minha mãe Jorgina Santos (*inmemoriam*)

† 16 de Janeiro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu melhor amigo e salvador, o Senhor Jesus Cristo. Obrigado por transformar minhas lágrimas em combustível, dor em alegria e medo em coragem, Tu és o motivo e a razão de tudo. A minha digníssima esposa Jéssica Santos, por ser simplesmente a melhor esposa que um doutorando poderia ter. A minha família por ter tido bastante paciência quando eu não podia estar junto a eles por causa da tese. As minhas queridas orientadoras Drª Profª. Adriana Farah e Drª. Edna M. M. Oliveira. Deus permitiu que a minha mãe fosse levada, porém, Ele deixou duas mães científicas maravilhosas. Vocês duas marcaram a minha vida para sempre. A equipe do Lab. do Diagnóstico Molecular, o que dizer? Vocês também são a minha família também! Em especial gostaria de reconhecer a amizade e o esforço de duas pessoas muito especiais, e minhas madrinhas de casamento Ivanilda Lima e Tatiane França, com a ajuda de vocês posso dizer que tenho seis braços. A Juliana de Paula, por compartilhar das aflições e alegrias da Pós-graduação. Agradeço também aos colegas do NUPECAFÉ, obrigado por terem paciência comigo!

Resumo da tese apresentada ao PPGN/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de doutor em Ciências Nutricionais.

MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO CAFÉ POR MEIO DE ANÁLISE MOLECULAR USANDO PCR EM TEMPO REAL.

Thiago Ferreira dos Santos

Março/2019

Orientadores:Profª Drª. Adriana Farah de Miranda Pereira; Drª. Edna Maria Morais Oliveira

RESUMO.

O café é uma das principais bebidas comercializadas em todo o mundo. Durante o seu processamento, este produto pode ser intencionalmente adulterado com materiais de baixo custo, principalmente cereais, como também espécies de café com menor valor de mercado (ex. *Coffea canephora*). Além disso, a não conformidade com os padrões de produção, produz defeitos intrínsecos como o café brocado. Os métodos existentes apresentam baixa sensibilidade e especificidade ou dependem de equipamentos sofisticados e de alto custo. Técnicas de Biologia Molecular possuem eficácia e são uma alternativa promissora para determinar a autenticidade de café torrado e moído. O objetivo do presente trabalho de tese foi desenvolver sistemas de detecção (primers e sondas) para a identificação de adulterantes, diferenciar entre as principais espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*), e detectar a presença de broca de café (*Hypothenumushampei*). Utilizando as ferramentas de bioinformática foi possível identificar e selecionar três sequências (NM_001049010.2, AB016121.1 e NM_001112418.1, para arroz, cevada e milho, respectivamente. Os Limites de detecção e quantificação para arroz, cevada e milho foram de 4,0 x 10^{-2}ng/µL e 1,31 x 10^{-1}ng/µL; 4,0 x 10^{-4}ng/µL e 9,76 x 10-4 ng/µL; 4,0x10^{-4}e 3,25x10^{-2}ng/µL, respectivamente. Com relação a diferenciação das espécies de café, o primer Ara foi capaz de diferenciar a espécie *C. arabica* de *C. canephora*. Através de análises de seletividade e especificidade *in silico* e *in vitro* foi possível desenvolver um sistema de detecção espécie específica para a broca do café *H. hampei*.

MONITORING COFFEE QUALITY USING MOLECULAR ANALYSIS, qPCR.

Thiago Ferreira dos Santos

February/2019

Advisors: Profª Drª. Adriana Farah de Miranda Pereira

Drª. Edna Maria Morais Oliveira

ABSTRACT.

It is well known that coffee is one of the main food products commercialized in the world. During processing, coffee can be intentionally adulterated with cheaper materials, including grains and cereals, such as barley, corn and rice, as well other coffee species with lower value market (eg.*Coffea canephora*). In addition, the non-compliance with production standards may lead to intrinsic defects such as bored coffee.Many techniques have been developed in order to establish suitable parameters and markers to assess coffee authenticity and quality. However, these methods may present low sensitivity and specificity. Molecular Biology Techniques have efficacy and are a promising alternative to determine the authenticity of roasted and ground coffee.The goal of the present thesis was the development system of detection (primers and probes) to identify coffee adulteration, to discriminate the main coffee species and the methods to detect and estimate the concentrations of contaminants commonly found in commercial Brazilian coffees, using qPCR technique. Using bioinformatics tools, it was possible to identify and select three sequences (NM_001049010.2, AB016121.1, and NM_001112418.1, for rice, barley, and corn, respectively. The detection and quantification limits for rice, barley and maize were 4.0 x 10-2ng / µL and 1.31 x 10-1 ng / µL; 4.0 x 10-4 ng / µL and 9.76 x 10-4 ng / µL; 4.0x10-4 and 3.25x10-2ng / µL, respectively. Regarding the differentiation between the coffee species, the Ara primer was able to differentiate *C. arabica* from *C. canephora*. It was possible to develop a specific species detection system for coffee borer (*H. hampei*) by using selectivity and specificity analysis - *in silico* and *in vitro*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
2.1 ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DO CAFÉ
2.2 A PRODUÇÃO DO CAFÉ
2.2.1 A COLHEITA
2.2.2 BENEFICIAMENTO DO CAFÉ
2.3 PRODUÇÃO DO MERCADO DO CAFEEIRO E O SEU CONSUMO
2.4 A ADULTERAÇÃO
2.4.1 DADOS HISTÓRICOS SOBRE ADULTERAÇÃO DE CAFÉ
2.4.2 LEGISLAÇÃO
2.4.3 ABORDAGENS HISTÓRICAS APLICADAS À DETECÇÃO DE ADULTERANTES DE CAFÉ - OS PRIMEIROS MÉTODOS QUÍMICOS E FÍSICOS
2.4.4 MÉTODOS ATUAIS UTILIZADOS PARA DISCRIMINAÇÃO ENTRE CAFÉ E OUTROS ALIMENTOS E ENTRE SEMENTES DE CAFÉ E OUTRAS PARTES DA PLANTA
2.4.4.1 MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS: MICROSCOPIA
2.4.4.2 MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS: ESPECTROSCOPIA
2.4.4.3 MÉTODOS DE CROMATOGRAFIA
2.4.4.4 MÉTODOS BASEADOS EM DNA
2.5 PCR EM TEMPO REAL
2.5.1 SISTEMAS DE DETECÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL
2.6 BIOINFORMÁTICA
3. JUSTIFICATIVA
4. OBJETIVOS
4.1 OBJETIVO GERAL
4.2 OS OBJETIVOS ESPECÍFICOS
CAPÍTULO 1 – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DETECÇÃO PARA OS PRINCIPAIS POSSÍVEIS ADULTERANTES (ARROZ, CEVADA E MILHO) DO CAFÉ.
CAPÍTULO 2 - DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES *C. ARABICA* E *C. CANEPHORA.*
CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETECÇÃO DA BROCA DO CAFÉ.
CAPÍTULO 4: CONSIDERAÇÕES FINAIS
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LISTA DE FIGURAS

1 Classificação botânica do café de acordo com Anthony et al. (2010) e do Serviço de Conservação de Recursos Naturais dos Estados Unidos (USDA, 2016). 22

2 Distribuição endêmicas das espécies na classificação atual do gênero *Coffea* L. Área de cor cinza: distribuição do subgênero *Coffea* no continente africano (DAVIS, 2011). 24

3 Origem e disseminação para o mundo da espécie de café *C. arabica* L. 26

4 Corte transversal de uma fruta de café. 27

5 Produção de safra por ano. Figura adaptada do ICO 2019. 32

6 Com base nos dados da Organização Internacional do Café, este gráfico representa a evolução do consumo de café nos 10 principais países e regiões importadores de café durante o período 2015-2017 (EUROPEAN COFFEE REPORT, 2018). 33

7 Principais países consumidores per capita de café do mundo. Imagem adaptada do relatório da EuropeanCoffee Federation (2018). 33

8 Esquematização de um gráfico de PCR em Tempo Real. 52

9 Esquema A: absorção e emissão do fluoróforos SYBR Green ligado superficialmente à molécula de DNA. Esquema B: hibridização da sonda com o alvo e hidrólise do fluoróforo *repoter* (VALASEK; REPA, 2005). 53

10 Gráfico da curva de dissociação demonstrando o DNA dupla-fita submetido ao aumento de temperatura, gerando a Tm. 54

11 Esquematização da função 5' exonucleásica da Taq polimerase. (Adaptado de Yuan et al, 2000). 55

12 Fluxograma das etapas das análises. 62

13 Análise de seletividade da sequência de DNA de cevada (AB016121.1) através do programa BLAST-TN. 63

14 Análise de seletividade da sequência de DNA de milho (NM_001112418.1) através do programa BLAST-TN. 64

15 Análise de seletividade entre as sequências de DNA de cevada e as sequências da tribo Coffeeae através do programa BLAST-TN. 64

16 Análise de seletividade entre a sequência de DNA de milho (NM_001112418.1) e as sequências da tribo de café Coffeeae. 65

17 Análise de especificidade com o programa Blast do CGH com a sequência de DNA de cevada (AB016121.1). 65

18 Análise de seletividade da sequência de DNA de milho (NM_001112418.1) com o Blast do CGH com. 66

19 Análise de seletividade da sequência de DNA de arroz (NM_001049010.2) através do programa BLAST, modalidade MEGABLAST. 67

20 Análise de mascaramento da sequência de DNA de arroz (NM_001049010.2) através do programa online ReaptMasker. 68

21 Análise de seletividade da sequência de DNA de arroz (NM_001049010.2) através do programa BLAST, modalidade MEGABLAST. 69

22 Análise de seletividade com o programa BLAST na modalidade MEGABLASTentre a sequências de DNA de arroz (NM_001049010.2) e as sequências da tribo de café Coffeeae. 70

23 Análise de seletividade da sequência de DNA de arroz (NM_001049010.2) no programa Blast do CGH. 70
.

24 Curva padrão de arroz utilizado para determinação de LD/LQ.Slope: -3,796. 72

25 Curva padrão de cevada utilizado para determinação de LD/LQ.Slope: -3,5441. 74

26 Curva padrão de milho utilizado para determinação de LD/LQ.Slope: -3,4697. 75

27 Configuração do BLAST para diferenciação entres as espécies de café, *C. arabica* e *C. canephora*. 79

28 Apresentação do fluxograma das análises de bioinformática para discriminar as espécies de café *C. arabica* e *C. canephora* através das ferramentas de análises de similaridade do NCBI. 80

29 Sequência de DNA *C. arabica*, isoflavone (FJ972201.1), selecionada através de análises de bioinformática de café da espécie *C. arabica.* 82

30 Sequência de DNA *C. arabica*, constitutive (KF975699.1), selecionada através de análises de bioinformática de café da espécie *C. arabica.* 82

31 Sequência de DNA *C. canephora* OLE-4 (AY841274.1), selecionada através de análises de bioinformática para café da espécie *C. canephora.* 83

32 Sequência de DNA *C. canephora* Galactomannangalactosyl (EU716313.1), selecionada através de análises de bioinformática para café da espécie *C. canephora.* 83

33 Curva de melting do primer Ole-4 (A) com DNA de café da espécie *C. canephora* e primer Isoflavone (B) com DNA de café da espécie *C. arabica*. 85

34 A - curva de melting do primer Isoflavone com DNA de café da espécie *C. arabica*. 86

35 A - curva de melting do primer Ole-4 com DNA de café da espécie *C. canephora*. 86

36 Análise de similaridade no *Coffee Genome Hub*, utilizando a sequência de café *C. arabica* GW4412751. 87

37 Alinhamentos utilizando o programa MUSCLE – *Multiple Sequence Alignment* foram realizados com o produto de PCR do primer Ara, mais os primers Ara (*forward* e *reverse*) e as sequências de café *C. arabica* e *C. canephora.* [ ] região de especificidade do primer Ara. 88

38 Curva de amplificaçãodo primer Ara com DNA de café *C. arabica* e *C. canephora*. Linhas laranjas e vermelhas: primer Ara com DNA de café *C. arabica***.** 89

39 Curva de dissociação e amplificação com as amostras de DNA de café verde *C. arabica* e *C. canephora* nas seguintes proporções 0, 25, 50 75, 100 % de DNA de café C. *canephora*. 90

40 Curva de dissociação do primer Ara, do material de referência de café torado e moído contendo 0, 25, 50, 75 e 100% de *C. arabica* (n = 5 para cada ponto da mistura). 91

41 Análise de seletividade da sequência de DNA CBB mannase (GQ375156.1), através do BLAST-TN. 96

42 Análise de seletividade da sequência de DNA cytochrome 2-P450 (JN416120), através do BLAST-TN. 97

43 Análise de seletividade da sequência de DNA GABA-gatedchloride (AF037324.1), através do BLAST-TN. 97

44 Análise de seletividade da sequência de DNA CBB mannase (GQ375156.1), através do BLAST-TN. 98

45 Reação de seletividade dos primers para broca CBB mannase, 2-P450 e GABA-gated com DNA de Broca e com o controle negativo água ultrapura. com os primers**.** 99

46 Sequência de DNA de broca >scaffold1 61.4 utilizada para o desenvolvimento dos sistemas de detecção de broca. 100

47 Análise de seletividade da sequência de DNA de broca >scaffold1 61.4 através da ferramenta Blast do banco de genomas de café onde está depositado o genoma completo de café da espécie *C. canephora.* 101

48 Análise de seletividade da sequência de DNA de broca >scaffold1 61.4 através da ferramenta BLAST-TN do NCBI. 102

49 Análise de seletividade da sequência de DNA de broca >scaffold1 61.4 e a tribo Coffeeae, através da ferramenta BLAST-TN do NCBI. 103

50 Análise de seletividade dos primers Hham 1 (A), 2 (B) e 3 (C) com DNA genômico de broca (n =3). 104

51 Curva de dissociação dos primers Hham 1 (A), 2 (B) e 3 (C), com DNA genômico de broca (n=3). 105

52 Curva de amplificaçãoe dissociação com o primer Hham1com DNA de *C. arabica* var. Mundo Novo. 106

53 Curva de amplificação e dissociação com o primer Hham1 com DNA de *C. arabica* var. Mundo Novo. 107

54 Curva de amplificação e dissociação com o primer Hham2 com DNA de *C. arabica* var. Mundo Novo. 108

55 Curva de amplificação e dissociação com o primer Hham2 com DNA de *C. canephora* var. Robusta, Conilon e BRS. 109

56 Curva de amplificação e dissociação com o primer Hham3 com DNA de Café *C. arabica* **A** (var. Mundo Novo) e *C. canephora I***B** (var. Robusta, Conilon e BRS). 110

57 Curva de amplificação e dissociação com o primer Hham2 e DNA de café *C.arabica* (Mundo Novo, Catuaí Açu, Bourbon Amarelo, Icatu Amarelo, e Iapar 59). 111

58 Curva de amplificação e dissociação com o primer Hham2 e DNA de café *C. canephora* (Robusta, Conilon e BRS). 112

59 Curva de amplificação e dissociação dos primers Hham2 e Café1. 114

60 Curva de amplificação e dissociação do primer Hham2 e DNA de café *C. canephora* (n=10). 115

61 Curva de amplificação e dissociação do primer Hham2 e DNA de arroz, orégano, chicória, soja, açaí, cevada e milho (n=3). 117

62 Curva de amplificação e dissociação do primer Hham2 com DNA de broca **A**, centeio **B**, aveia **C** e trigo **D** (n=3). 118

63 Curva de amplificação e dissociação do primer Hham2 e DNA de aranha, formiga, formiga, barata e mosca (n=3). 119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Primers e sonda para detecção e DNA de arroz.

Tabela 2: Primers e sondas para detecção de cevada e milho.

Tabela 3: Análise de especificidade com o sistema TaqMan para detecção de arroz.

Tabela 4: Análise de especificidade com o sistema TaqMan para detecção de cevada e milho.

Tabela 5: Primers específicos desenhados para café da espécie *C. arabica* e *C. canephora*.

Tabela 6: Parâmetros e características do primer Ara.

Tabela 7: Valores deCt e Tm médios para amostras de café *C. arabica* verde adicionada de café *C. canephora*.

Tabela 8: Primers específicos desenhados para a broca do café *H. hampei*.

Tabela 9: Primers desenhados para a broca do café *H. hampei* através da sequência >scaffold1 61.4.

Tabela 3: Primers específicos desenhados para a broca do café *H. hampei*.

Tabela 4: Primers específicos desenhados para a broca do café *H. hampei* através da sequência >scaffold1 61.4.

Tabela 5. Condições de reação da análise de PCR em tempo real para análises de identificação de café *C. canephora* em *C. arabica*.

Tabela 6: Primers específicos desenhados para café da espécie *C. arabica* e *C. canephora*.

Tabela 7: Parâmetros e características do primer Ara

Tabela 8:Ct e Tm médios para amostras de café *C. arabica* verde adicionada de café *C. canephora*.

Tabela 9: Condições da reação para a especificidade dos primers.

Tabela 10. Condições de reação da análise de PCR em tempo real.

Tabela 11: Primers e sonda para detecção e DNA de arroz.

Tabela 12: Primers e sondas para detecção de cevada e milho.

Tabela 13: Análise de especificidade com o sistema TaqMan para detecção de arroz.

Tabela 14: Análise de especificidade com o sistema TaqMan para detecção de cevada e milho.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABIC - Associação Brasileira do Café.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

ATR - Attenuated total reflection.

ANN - Artificial Neural Networks.

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento.

CODEX - Codex Alimentarius.

CFS - Center for Food Safety.

CCD - Charge Coupled Device.

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

CE-MS / MS - Eletroforese Capilar - Espectrometria de Massa em Tandem.

CIRAD - Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement.

CTAB - Cetyltrimethylammoniumbromide / Brometo de Cetiltrimetilamônio

DNA Deoxyribonucleic

DNA - Ácido desoxirribonucleico.

DRIFT - DiffuseReflectanceInfrared Fourier Transform.

DSC - Calorimetria de Varredura Diferencial.

DDBJ - DNA Data Bank ofJapan.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EMBL - European Molecular Biology Laboratory.

EBI- EuropeanBioinformaticsInstitute.

ESI-MS - Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray.

EFSA - European Food Safety Authority.

ELT - Espectrometria de Lentes Térmicas.

FAO - Food and Agriculture Organization.

FDA - Food and Drug Administration.

FSA - Food Standards Agency.

FSSAI - Food Safety and Standards Authority of India.

GMA - GroceryManufacturersAssociation.

GA - Algoritmo Genético.

GC - Cromatografia Gasosa.

HPAEC - High-performance Anion Exchange Chromatography.

HPAEC-PAD - High Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection.

HRMS - High Resolution Mass Spectrometers

HSL - Hue, Saturation, Lightness.

ICO - InternationalCoffeeOrganization.

ICA - Instituto Colombiano Agropecuario.

LIBS - Espectroscopia de Quebra Induzida por Laser.

LOD - Limite de Detecção.

LOQ - Limite de Quantificação.

LDA - Linear DiscriminantAnalysis.

MAPA - Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

MEV - Microscópio Eletrônico de Varredura.

MVA - Análise de dados Multivariada

NIR - Near-infraredspectroscopy.

NIH - National Institutes of Health.

NCBI - National Center for BiotechnologyInformation.

PVA - Preto, Verde e Ardido.

PCA - Principal Component Analysis.

PLS - Partial Least Squares regression.

PCR- Polymerase Chain Reaction

PAD - Pulsed Amperometric Detection.

PVP - Polivinil Pirrolidona

qPCR - QuantitaivePolymerase Chain Reaction.

RMSE - Raiz do Erro Quadrático Médio.

RMSEC - Root Mean Square Erros Calibration.

RMSEP - Root Mean Square Erros Validation.

RMN - RessonânciaMagnética Nuclear.

RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism.

SPA-LDA - Successive Projections Algorithm–Linear Discriminant Analysis.

SIMCA - Soft Independent Modeling by Class Analogy.

SPME - Micro-Extração em fase sólida.

Tm – Temperatura de *melting*.

UV – Ultravioleta.

USDA - United States Department of Agriculture.

UPLC - Ultra Performance Liquid Chromatography.

WHO - World Health Organization.

1 INTRODUÇÃO

Cultivado em cerca de 80 países, o café é responsável por um importante negócio financeiro em todo o mundo (ICO, 2019). É uma das bebidas mais populares do mundo, sendo o produto alimentício mais consumido após a água e a segunda maior commodity, superada apenas pelo petróleo (MURTHY; NAIDU, 2012). O Brasil é o principal produtor e exportador, sendo também responsável por mais de um terço de toda a produção mundial, três vezes mais do que o segundo maior exportador (CONAB, 2019). A espécie *Coffea arabica* (café Arabica), conhecido também como café Arabica, é a mais comercializada e consumida no mundo, sendo responsável por cerca de 65% da produção, enquanto a espécie *Coffea canephora*, conhecida no Brasil como Conilon e internacionalmente como Robusta, responde pelos outros 35% (ICO, 2019). De uma forma geral, a espécie Arabica tem aroma e sabor superiores ao café Conilon/Robusta. Por isso, seu preço no mercado é superior (SPANIOLAS et al, 2008; PACETTI et al, 2012).

Com o crescimento do mercado cafeeiro no mundo inteiro e demanda por maior qualidade devido à alta competitividade, a qualidade do café produzido no país vem sendo o foco de grandes esforços por parte da indústria e do governo, sendo importante considerar todos os aspectos da cadeia produtiva, desde o plantio até o mercado (PACETTI et al, 2012). A não conformidade com os padrões de qualidade durante este processamento se traduz em defeitos classificados como intrínsecos e extrínsecos, classificados segundo o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2003). Entre os defeitos intrínsecos, os considerados capitais por prejudicarem mais fortemente a qualidade sensorial da bebida são o preto, o verde, o ardido e o brocado. Por isso, a mistura de grãos defeituosos é conhecida como preto, verde e ardido (PVA), embora contenha também outros defeitos que podem prejudicar a qualidade da bebida. Cerca de 20-40% da produção de grãos crus de café brasileiro corresponde a PVA (COOXUPÉ, 2013). Geralmente, grãos de boa qualidade são exportados enquanto a maior parte dos defeitos são aproveitados no mercado interno brasileiro como forma de diminuir o preço do produto. Assim, a realidade do mercado interno é que existem blends comerciais com até 70% de PVA (TOCI; FARAH, 2008), embora a Associação Brasileira do Café (ABIC) recomende a inclusão de no máximo 20% (ABIC, 2019). Além da inclusão de defeitos intrínsecos no café, a prática de adulteração pela adição de outros alimentos de menor valor de mercado é tradicionalmente observada no mercado cafeeiro do Brasil (MENEZES JÚNIOR; BICUDO, 1958; JHAM et al, 2007; NOGUEIRA; LAGO, 2009).

Apesar de muitas vezes não causar prejuízo ao valor nutricional, a adulteração, que geralmente é praticada durante a etapa de torrefação, leva à concorrência desleal, e à ilusão do consumidor, sendo crime previsto em lei nacional (NOGUEIRA; LAGO, 2009).

Atualmente, no Brasil, os métodos existentes para controlar as adulterações em café com outros alimentos não possuem grande eficácia e especificidade ou dependem de equipamentos de última geração e alto custo. As técnicas empregadas pela Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC), que concedem selo de pureza a indústrias de café do Brasil, são microscopia e macroscopia, de acordo como a Resolução da ANVISA (RDC nº 175, de 08 de julho de 2003, sendo republicada no D.O.U de 10/07/2003). A inspeção visual também é tradicionalmente usada para detectar a adição de substitutos baratos para o café verde (BLANC et al, 1989; DAVIS et al, 1990; BRASIL, 2010).

Estes métodos convencionais de identificação de adulterantes utilizando técnicas de reconhecimento de padrões de cores e imagens características são subjetivos e, consequentemente, dependentes da experiência do analista e sujeito a erro humano (WINKLER-MOSER et al, 2015). Atualmente no Brasil não há tecnicas oficiais para determinação da adição de PVA ou de Café Conilon.

Técnicas químicas, físicas e físico-químicas têm sido desenvolvidas ao longo do tempo para substituir a análise visual de adulterantes. Embora elas tenham alcançado resultados significativos, na maioria das vezes estas apresnetam efeito de matriz além de serem dispendiosas e demoradas (SPEER; MONTAG, 1989; SPEER; TEWIS; MONTAG, 1991; PIZARRO; ESTEBAN-DÌEZ; GONZALEZ-SAIZ, 2007; REIS; FRANCA; OLIVEIRA, 2012; PACETTI et al, 2012).

O uso de tecnologia do DNA tem sido também utilizado para análise da autenticidade de alimentos processados e geneticamente modificados (BARROS; OLIVEIRA; MARIN, 2008; MAFRA; FERREIRA; OLIVEIRA, 2008). Recentemente, métodos baseados em DNA têm fornecido ferramentas viáveis para detectar alérgenos em uma ampla gama de alimentos (MAFRA; FERREIRA; OLIVEIRA, 2008; PAFUNDO; GULLÌ; MARMIROLI, 2009; FUCHS; CICHNA-MARKL; HOCHEGGER, 2012), devido à sua alta sensibilidade e especificidade. Em 2016, Ferreira et al. publicou um estrudo utilizando PCR em tempo com o objetivo de detectar cevada, milho e arroz. O estudo provou que é possível obter extratos de DNA de amostras processadas suficientemente puras para a análise de PCR em tempo real.

Atualmente, a técnica mais utilizada para a detecção de DNA é a *QuantitaivePolymerase Chain Reaction* (qPCR) (MAFRA; FERREIRA; OLIVEIRA, 2008). Esta técnica baseia-se nos princípios da replicação do DNA fita dupla, o mecanismo responsável pela transmissão da

informação genética nas células. Esta técnica permite o monitoramento da reação de amplificação em tempo real (ciclo a ciclo), em sistema fechado, sem interferências externas no progresso da reação. Um sinal fluorescente é detectado em proporção ao aumento da quantidade do produto de amplificação (DNA dupla-fita) (BARROS; OLIVEIRA; MARIN, 2008).

Neste trabalho de tese buscamos desenvolver métodos baseados em qPCR para analisar a autenticidade e qualidade do café.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DO CAFÉ

A bebida do café, apreciada por milhões de pessoas em todo o mundo, é o resultado da torra das sementes do cafeeiro, pertencentes à família botânica Rubiaceae, gênero *Coffea*. Atualmente, mais de 120 espécies dentro do gênero *Coffea* foram catalogadas (DAVIS et al, 2006; DAVIS, 2010; DAVIS et al, 2011). A descoberta do gênero *Coffea*, ocorreu no continente Africano e, desde então, este foi disseminado para países em todo o mundo. Ao longo desta jornada, novas cultivares mais produtivas, resistentes a doenças e qualidade superior foram criadas a partir de variedades selvagens para atender à demanda mundial por café (FERREIRA et al, 2019).

Desde a sua descoberta, o café atraiu a atenção de exploradores e botânicos em todo o mundo, especialmente na segunda metade do século XIX, quando muitas novas espécies foram descobertas (FERREIRA et al, 2019). Devido à grande variação nos tipos de plantas e sementes de café, botânicos tiveram dificuldade para classificar algumas plantas como membros verdadeiros do gênero *Coffea* (FARAH; FERREIRA, 2015).

O conhecimento do cafeeiro e suas características é fundamental para compreender tópicos práticos sobre o cultivo do café, bem como questões relacionadas à interação com o meio ambiente e suas reações a fatores bióticos e abióticos do ambiente (FERREIRA et al, 2019). O café faz parte do sub-reino de plantas conhecidas cientificamente como Angiosperma, plantas produtoras de sementes (DAVIS et al, 2006; KRISHNAN et al, 2015). Este pertence à família botânica Rubiaceae, que tem cerca de 500 gêneros e mais de 6000 espécies, subfamília Ixoroideae. A classificação atual do gênero *Coffea* resulta de fusões recentes de vários subgêneros e gêneros (KRISHNAN et al, 2015). De acordo com Leroy (1967) e Bridson (1982), dois gêneros existiam nesta subfamília, *Coffea* L. e *Psilanthus*Hook.f. (um gênero da Australásia), com o gênero *Coffea* dividido em dois subgêneros, *Coffea* e *Baracoffea*. Após estudos morfológicos e moleculares de Davis, Brisdom e Rakotonasolo (2005) e Maurin et al. (2007) foi concluído que uma relação filogenética entre ambos era improvável. Posteriormente, o subgênero *Coffea* e gênero *Psilanthus* foram fundidos de acordo com análise filogenética (através de ferramentas moleculares e análises morfológicas), levando ao atual gênero *Coffea*, que é o membro mais importante economicamente da família Rubiaceae (ANTHONY et al, 2010; DAVIS et al, 2011; MURTHY; NAIDU, 2012). A classificação botânica do café está apresentada na Figura 1.

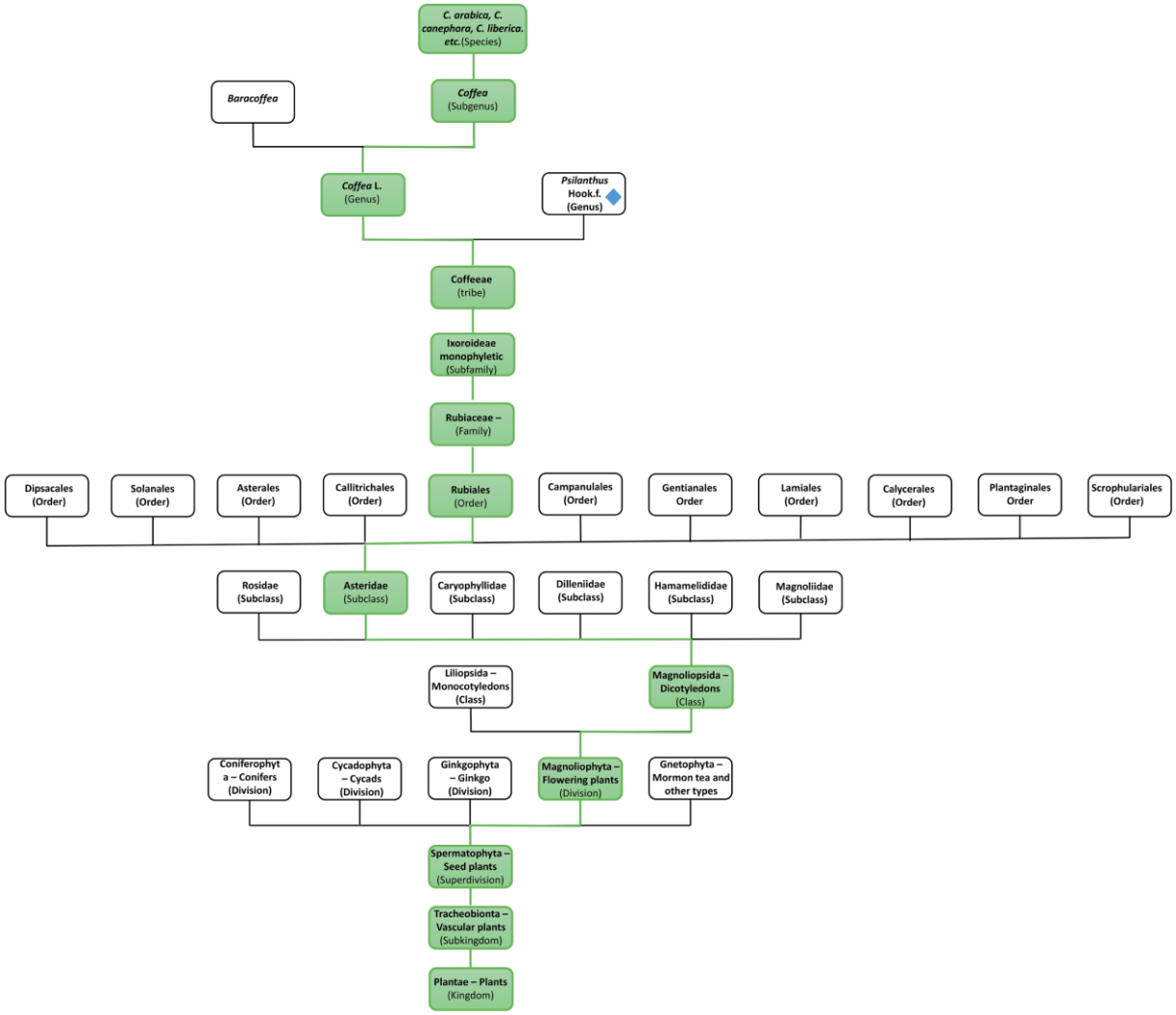


Figura 1: Classificação botânica do café de acordo com Anthony et al. (2010) e do Serviço de Conservação de Recursos Naturais dos Estados Unidos (USDA, 2016).

A maior parte das espécies do subgênero *Coffea* estão presentes no continente Africano, embora sejam endemicamente encontradas nas zonas tropicais do globo terrestre (FERREIRA et al, 2019). No total, existem 41 espécies provenientes da África (de Guiné a Tanzânia e da Etiópia a Moçambique), 59 de Madagáscar e 4 de ilhas próximas (1 do Grande Comore e 3 de Ilhas Maurício e Reunião) (DAVIS, 2006; DAVIS, 2010; ANTHONY et al, 2010). Atualmente, existem pelo menos 125 espécies do gênero *Coffea*. considerando a fusão entre subgênero *Coffea* e gênero *Psilanthus*, localizado na Ásia e na Australásia (DAVIS, 2006; KRISHNAN et al, 2015; DAVIS; RAKOTONASOLO, 2005).

De todas as espécies catalogadas do gênero *Coffea*, apenas três possuem importância econômica: *C.arabica*, *C.canephora* e, em menor escala, *C.liberica*, sendo a primeira a espécie mais cultivada (ICO, 2019). *C.arabica* é uma espécie tetraplóide (2n = 4x = 44) originada da

hibridação natural entre as espécies *C. canephora* e *C. eugenioides* ou ecótipos relacionados com estas duas espécies diploides (2n = 2x = 22) (DAVIS, 2006; MAURIN et al, 2007). Esta última, é a espécie com maior qualidade em comparação com outras espécies conhecidas. Entretanto, é menos resistente aos fatores bióticos e abióticos (GUERREIRO-FILHO; MALUF, 2019). Apesar da qualidade inferior, *C. canephora* é mais resistente por manter a sua heterozigosidade através da polinização cruzada, ao contrário da espécie *C.arabica* (DAVIS, 2006; MAURIN et al, 2007). *C. liberica* é uma espécie diploide, menos cultivada, principalmente devido à sua sensibilidade a doenças, especialmente a provocada pelo fungo *Fusariumxyloriodes* (N'DIAYE et al, 2005).

Devido à quantidade de espécies e variedades de café, alguns erros de nomenclatura são encontrados na literatura. Por exemplo, "*Coffea canephora*" foi descrito como "*Coffea robusta*", quando "robusta" é na verdade a variedade ou subvariedade da espécie *Coffea canephora*. Da mesma forma, a palavra "robusta" tem sido utilizada popularmente para fins comerciais. Outro sinônimo como o “Kouilouensis” (também denominado “Kouillon” ou “Conilon”), é uma variedade diferente de *Coffea canephora*, que é amplamente cultivada no Brasil com diferentes características químicas e sensoriais (FARAH; FERREIRA, 2015).

As espécies do subgênero *Coffea* colonizaram muitos tipos de florestas ao longo de uma ampla distribuição e elevação no continente africano. Até 70% das espécies do subgênero *Coffea* estão presentes em florestas úmidas e perenes, e pelo menos 13% são adaptadas à seca sazonal. As outras 17% são adaptadas a vários outros tipos de floresta, incluindo florestas úmidas, florestas de galeria, florestas sazonalmente secas (perenifólia e caducifólias), bosques de savana e matagal (ANTHONY et al, 2010; ANTHONY et al, 2011).

Os cafeeiros são naturalmente encontrados desde o nível do mar até 2.500 metros (m) de altitude, embora nenhuma espécie seja capaz de se adaptar em todos os níveis. A maior número de espécies endêmicas da África colonizam regiões entre 200 e 1000 m acima do nível do mar, incluindo *C. canephora* e *C. liberica* sub sp *Dewevrei* (NOIROT et al, 2015). Essa magnitude é alcançada principalmente por variações na latitude. Por exemplo, em Uganda, um país equatorial onde as temperaturas mínimas são quentes e relativamente estáveis, *C. canephora* cresce acima de 1000 m. O intervalo de altitude para o crescimento ótimo da espécie *C. arabica* é entre 1200 a 1950 m, com crescimento médio ocorrendo a 1575 m (ANTHONY et al, 2011; NOIROT et al, 2015).

Com relação a sua origem, a história evolutiva do café provavelmente ocorreu entre 150 mil e 350 mil anos atrás no continente africano (ANTHONY et al, 2011). Análises Biogeográficas indicam que o centro de origem do subgênero *Coffea* ocorreu no Quênia

(ANTHONY et al, 2011). No entanto, novas análises de DNA e registros botânicos sugerem Guiné no oeste da África equatorial como o centro da origem e especiação do subgênero *Coffea*(ANTHONY et al, 2011). Esta região provavelmente desempenhou um papel de refúgio para os cafeeiros durante o último período árido (18.000 anos atrás) e em outros períodos de escassez. Na África Central, uma cadeia de pequenos refúgios foi localizada perto do Oceano Atlântico: no oeste e no sul dos Camarões, nas montanhas Cristal e Chaillu, no Gabão, e nas Montanhas Mayombe, no Congo. Estas áreas são ricas em espécies de café e, por isso, são conhecidas por serem "*hotspots"* (área de relevância ecológica) da biodiversidade do café (DAVIS, 2006; NOWAK; DAVIS; YODER, 2012; ANTHONY et al, 2010). A Figura 2 mostra a distribuição original do gênero *Coffea*, incluindo o subgênero *Coffea* na África e o *Psilanthus* na Australasia.

Figura 2: Distribuição endêmicas das espécies na classificação atual do gênero *Coffea* L. (extraído de FERREIRA et al, 2019). Área de cor cinza: distribuição do subgênero *Coffea* no continente africano (DAVIS, 2011). A área de cor verde escura: distribuição atual do gênero *Coffea*, após a inclusão do subgênero *Psilanthus* spp., no gênero *Coffea*, na Ásia e Australásia (DAVIS, 2011). Círculo vermelho: provável local de origem do subgênero *Coffea* na África Centro-Ocidental (Guiné) antes da Pangea. É considerado um *hotspot* da biodiversidade do gênero *Coffea*.

A espécie *C. arabica* teve a sua origem no sudoeste das terras altas da Etiópia (em altitudes entre 1000 e 2000 metros), no Planalto Boma do Sudão e no Monte Marsabit do Quênia (ANTHONY et al, 2002; ANTHONY et al, 1987). Sua localização estrita se deu devido ao seu processo de especiação, como explicado anteriormente. Por outro lado, *C. canephora* colonizou várias regiões da África Central, que se estendem desde a África Ocidental através dos Camarões, República Central da África, Congo, República Democrática do Congo, Uganda e norte da Tanzânia até o norte da Angola. A origem e distribuição das espécies *C. liberica* e *C. canephora* é a mesma.

A história do cultivo do café é incompleta e a sua domesticação e dispersão da África para o mundo não é bem documentada.De acordo com Welman (1961), o cultivo de variedades de *C. arabica* começou quando mudas selvagens foram levadas da Etiópia para o Iêmen, em 575 antes de Cristo (A.C), embora outros autores tenham relatado um possível cultivo antes disso (SMITH, 1985). No entanto, tais dados foram baseados em mitos e lendas, não em textos científicos. Com base em dados históricos e científicos, o café da espécie *C. arabica* divergiu de duas bases genéticas, que foram descritas como duas variedades botânicas distintas, são elas *Coffea arabica* var. arábica (geralmente chamada de *Coffea arabica* var. TypicaCramer) e *Coffea arabica* var. Bourbon (B.Rodr.) (CHARRIER; BERTHAUD, 1985). A partir destas duas variedades originaram-se a maioria dos cultivares comerciais de *C. arabica* no mundo (ANTHONY et al, 2002).

Dados históricos indicam que a variedade Typica originou-se de uma única planta que foi levada do Iêmen para a Índia (WILLIAN; UKERS, 1922; VAN DER VOSSEN; BERTRAND; CHARRIER, 2015). Gerações subsequentes desta planta foram levadas para as ilhas de Java em 1690 e, em seguida, para Amsterdam, em 1706 ou 1710, onde as plantas eram cultivadas nos jardins botânicos (ANTHONY et al, 2002; LÉCOLIER et al, 2009). De Amsterdam, o café foi introduzido nas Américas quando as mudas foram levadas ao Suriname em 1718. Neste mesmo período, o café foi introduzido nas Índias Ocidentais (Martinica) em 1720 ou 1723. Em 1727, as sementes foram levadas para o estado do Pará, no norte do Brasil, aparentemente da Guiana Francesa (Figura 3). As sementes de cafeeiros do Suriname também se tornaram as progenitoras de numerosos espécimes que foram disseminadas nas Américas (Jamaica, Porto Rico, Haiti, Cuba, América Central, as Guianas, etc).

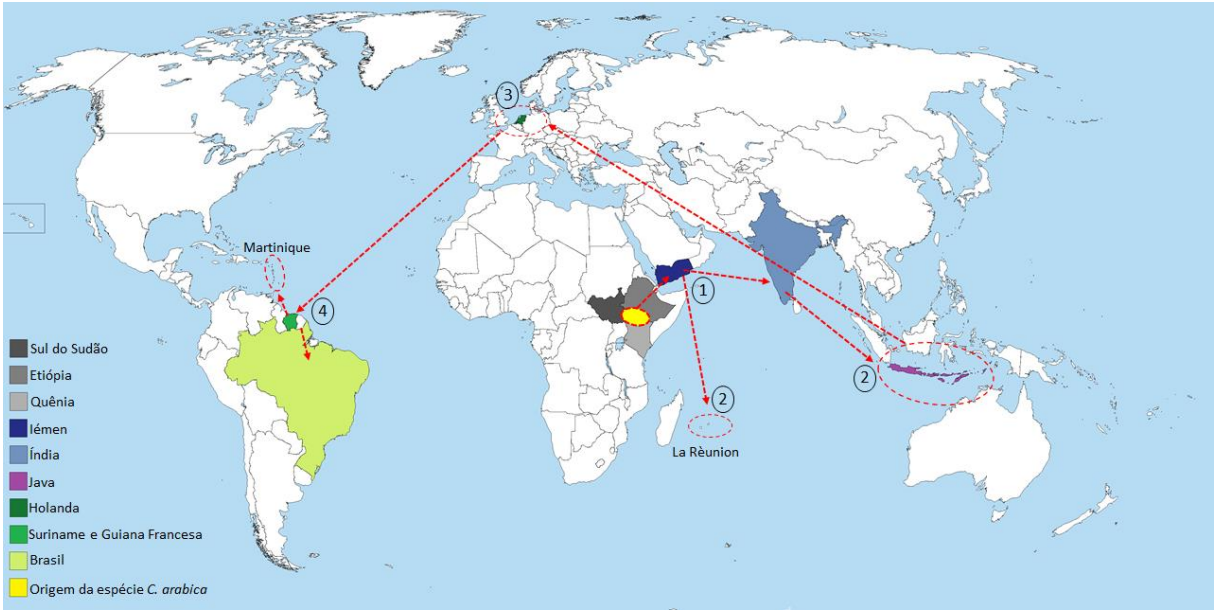


Figura 3: Origem e disseminação para o mundo da espécie de café *C. arabica* L (círculo amarelo) (extraído de FERREIRA et al, 2019): origem da espécie *C. arabica* L. (Entre o sudoeste da Etiópia, sul do Sudão e norte do Quênia). 1: introdução da espécie *C. arabica* no Iêmen, já em 575 (depois de Cristo) (ANTHONY et al, 2002). 2: Dispersão do café para as ilhas La Rèunion e a Índia. Da Índia para Java (Indonésia) (VAN DER VOSSEN; BERTRAND; CHARRIER, 2015). 3: de Java, o café foi introduzido na Europa (Amsterdã) em 1710 (ANTHONY et al, 2002; LÉCOLIER et al, 2009). 4: do continente Europeu, o café foi levado para a América do Sul (Suriname) em 1718. De lá, foi introduzido na ilha Martinica (1720 ou 1723) e Brasil via Guiana francesa (1727) (LÉCOLIER et al, 2009). Da América do Sul, o café foi espalhado pelo mundo. As cores indicam apenas os países e não regiões específicas de cultivo de café nos países.

A propagação da espécie *C. canephora* da África Central para o mundo é mais recente. Por ser naturalmente resistente, esta foi inicialmente levada para a Indonésia no século XX como uma solução para a ferrugem do café que atacava as plantações de café da espécie *C. arabica* (ANZUETO et al, 2005). Existem muitas variedades de *C. Canephora* na África. No entanto, apenas duas foram comercialmente disseminadas para o mundo: *C. canephora*kowillon, da Guiné, e *C. canephora* robusta, do Congo (CUBRY et al, 2013). Cultivares de *C. canephora*, como Laurenti (originadas do Congo Belga), Apoã e Guarani (produzidas pelo Instituto Agronômico Campinas, IAC) são menos importantes economicamente (CUBRY et al, 2013a; CUBRY et al, 2013b).

Todos os lugares onde o café da espécie *C. canephora* é cultivado relatam a sua introdução devido à presença de ferrugem e a necessidade de programas de reprodução. Além

disso, *C. canephora* prospera em ambientes mais quentes onde as variedades de *C. arabica* não são bem adaptadas (CUBRY et al, 2013a; CUBRY et al, 2013b).

Atualmente, o café é cultivado no mundo inteiro entre os dois trópicos, sendo amplamente encontrado nas regiões tropicais da América do Sul (Brasil e Colômbia), Ásia, Oceania, África, América Central e México.

2.2 A PRODUÇÃO DO CAFÉ

O café é uma planta de dia curto e, portanto, a iniciação floral ocorre em condições de 8-11 h de luz do dia. Tecnicamente, as flores se formam nos galhos a partir de 1 ano de idade. A polinização ocorre dentro de 6 horas após a floração. O processo de fertilização é concluído dentro de 24-48 horas após a polinização. Depois da polinização, a fruta se desenvolve na forma de uma cereja de 10 a 15 mm de comprimento, contendo duas sementes (os grãos de café) (MURTHY; NAIDU, 2012; FAO, 2014). A semente é formada pela casca (epicarpo ou exocarpo), a polpa (mesocarpo) que compreende uma polpa carnuda em frutos maduros, o pergaminho (endocarpo), que é um revestimento fino de polissacarídeo, a película prateada ou *silverskin*, que é o revestimento das sementes e a semente (endosperma) Figura 4 (FARAH; FERREIRA, 2015; MURTHY; NAIDU, 2012; FAO, 2014).

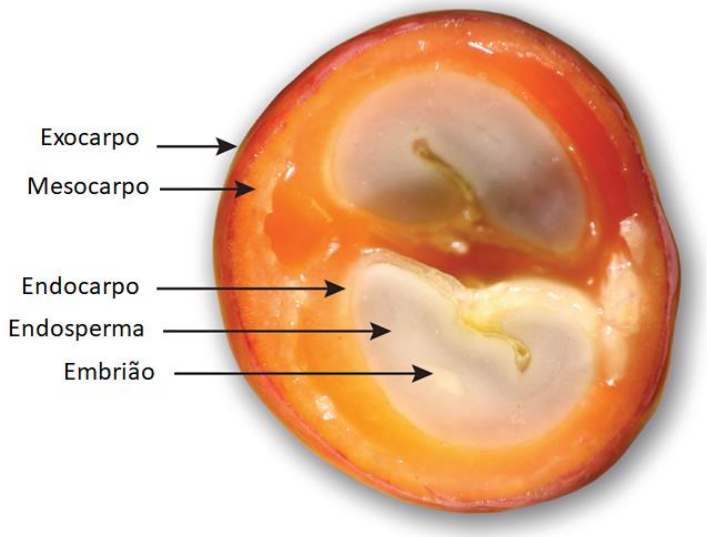


Figura 4: Corte transversal de uma fruta de café. O café é considerado uma drupa (um tipo de fruto carnoso contendo apenas uma semente), que possui um exocarpo, mesocarpo e endocarpo claramente definido (FERREIRA et al, 2019).

2.2.1 A COLHEITA

A colheita é uma etapa importante para produzir café de boa qualidade. O grau de maturação dos frutos é crítico. Enquanto os frutos de café cereja tendem a produzir uma bebida de melhor qualidade, já os frutos imaturos e os grãos defeituosos diminuem a sua qualidade (TOCI; FARAH, 2008). Como os frutos de café geralmente não atingem a maturação ao mesmo tempo, a colheita começa quando a maioria das frutas estão maduras. Esse processo pode ocorrer manualmente ou mecanicamente (FARAH et al, 2006).

A colheita manual pode ser realizada colhendo os frutos cerejas um a um ou derriçando (desnudando) os galhos e coletando todos os frutos, incluindo os maduros e os imaturos. A colheita mecânica é feita por por movimentos abruptos das árvores, associados a pentes flexíveis rotatórios com coletores automáticos dos frutos (FARAH, 2009).

Comparado com os demais métodos de colheita, a colheita a dedo, “fruto a fruto”, pode ser demorada e custosa em locais onde a mão de obra necessária não está prontamente disponível. Contudo, tende a produzir um café de melhor qualidade em comparação aos demais métodos, que podem gerar uma série de defeitos extrínsecos e intrínsecos derivados de frutos de diferentes graus de maturação, bem como fermentados ou oxidados (TOCI; FARAH, 2008; FARAH, 2009).

De acordo com Saldaña, Mazzafera e Mohamed (1997) e Toci e Farah (2008) os defeitos extrínsecos são: pedras, paus, cascas, galhos, etc., que podem ser incorporados aos frutos na colheita. Já os defeitos intrínsecos, considerados relevantes para a qualidade da bebida, são:

- Defeito Verde: é originado de fruto imaturo e confere grande adstringência à bebida e notas de folhas verdes desagradáveis.
- Defeito ardido: pode ser gerado por problemas de irrigação durante o plantio, ou por problemas na condução do processo de beneficiamento, que ocasionam fermentação indesejável nos grãos maduros e verdes.
- Defeito Preto: é mais comumente originado por frutos passados do ponto de maturação, e pode ocorrer por amadurecimento excessivo natural no cafeeiro, pela ação de chuvas ou por quedas dos frutos no chão durante a colheita. O contato do fruto com o solo favorece a ocorrência de fermentação microbiana indesejável. Os grãos pretos podem também ser originados por deficiência de carboidratos no cafeeiro ou por fermentações microbianas no processo de beneficiamento. Estes grãos produzem notas de fumo queimado.

- Defeito Preto-Verde: o grão preto-verde é originado do grão verde pela ação de altas temperaturas, decorrente de processos inadequados de secagem ou possivelmente, por fermentação do grão ardido.
- Defeito *Stinker*: é aparentemente normal a olho nu. Porém, é proveniente de processos inadequados de despolpamento via úmida e que compromete seriamente a qualidade da bebida, podendo ser identificado por fluorimetria. Alguns classificadores consideram o grão stinker e o preto-verde os mesmos defeitos.
- Defeito Mal-Granado& Concha: O grão elefante é um grão de grande tamanho. Porém com má formação. O Mal-Granado ou concha é parte de um grão elefante, geralmente separado pelo processo de descascamento ou despolpamento.
- Defeito Coco: Este tipo de grão é formado por um processo incorreto de descascamento, permitindo que frutos secos inteiros passem pela peneira de separação.
- Defeito Chocho: O grão chocho é enrugado por problemas genéticos ou fisiológicos, por deficiência nutricional, ou estresse do cafeeiro.
- Defeito Brocado: O grão brocado é aquele atacado na lavoura ou no beneficiamento pelo inseto da espécie *Hypothenemushampei*, conhecido como broca do café.
- Defeito Casca: Pedaços de cascas oriundos do processo de descascamento que não foram separados adequadamente.

Os defeitos intrínsecos (considerados os mais relevantes) afetam diretamente a qualidade do café na xícara. Embora não seja possível detectar a presença dos defeitos preto verde e ardido por técnicas baseadas em DNA, é possível detectar a presença da broca.

Não somente o grau de maturação do café é importante, mas também é necessário evitar a contaminação indesejável de microorganismos, especialmente mofo, durante a colheita, secagem e armazenamento das sementes. Tal contaminação pode ser prejudicial não somente para a qualidade sensorial da bebida final, mas também a produção de micotoxinas pode afetar a saúde humana. Consequentemente, quando o café é colhido do chão (varrido) também produz um café de baixa qualidade e de menor valor de mercado devido à contaminação e o crescimento de microorganismos (CODEX, 2010; FARAH, 2009).

2.2.2 BENEFICIAMENTO DO CAFÉ

Após a colheita, os frutos precisam ser processados com o objetivo de separar as sementes do resto da fruta, a partir desta etapa, eles são classificados de acordo com o número e tipos de defeitos, tamanho, etc. Os métodos mais comuns para esta finalidade são conhecidos como

métodos seco e úmido (CODEX, 2010). Há muitas variações de ambos os métodos, dependendo do país e do produtor, mas, em geral, no método seco (o mais conhecido), as sementes colhidas são secas pela exposição ao sol em grandes terreiros (que pode levar de 1 a 2 semanas) e / ou por secadores de ar, até que o teor de umidade chegue a 10 - 12% , para evitar o crescimento de microorganismos (FARAH, 2009; FARAH; FERREIRA, 2015).

Alternativamente, as sementes podem ser lavadas e aquelas que ultrapassaram o estágio de maturação (*overripe*) são separadas em tanques de flutuação. Após a secagem, os frutos são limpos e o pericarpo é mecanicamente removido, deixando a mucilagem. O produto obtido após o processo primário é o café verde "natural". O método seco é comumente utilizado no Brasil e na África, onde o sol e o espaço são abundantes (FARAH, 2009; FARAH; FERREIRA, 2015).

O processamento úmido é mais sofisticado e tende a gerar uma bebida de melhor qualidade. Há muitas diferentes e variações deste método, mas, em geral, apenas os frutos maduros são usados. Eles podem ser escolhidos seletivamente e separados mecanicamente ou em tanques de flutuação. Em seguida, ocorre o processo de despolpamento mecânico por imersão em tanques de fermentação por um período de 12 a 36h (FLAMENT, 2002; FARAH, 2009; KNOPP; BYTOF; SELMAR, 2006).

Durante a fermentação, que pode ocorrer naturalmente ou com a adição de microorganismos ou enzimas, o restante da polpa e a película prateada são removidos, e a acidez é aumentada levando a um pH em torno de 4,5. Os grãos (endosperma) são então extensivamente lavados em tanques de água limpa ou em máquinas de lavar específicas. Depois disso, estes são secos em pátios ou mesas suspensas e ventiladas, e às vezes em combinação com secagem por ar quente (KNOPP; BYTOF; SELMAR, 2006; FARAH, 2009).

Após a secagem, qualquer resquício restante no grão é removido mecanicamente. O processamento úmido é frequentemente usado em locais onde o café é colhido manualmente, como na Colômbia, na Ásia e na América Central (KNOPP; BYTOF; SELMAR, 2006; FARAH, 2009).

A principal diferença entre os dois processos é que no úmido a maioria dos tecidos que envolvem a semente são removidos antes da secagem. No Brasil, foi desenvolvido um método intermediário conhecido como o semi-seco (ou semi-úmido) que combina ambos os métodos. Este método consiste em lavar, selecionar e despolpar as sementes em tanques de flotação como no processo úmido, excluindo o passo de fermentação (BEE et al, 2005; KNOPP; BYTOF; SELMAR, 2006; TOCI; FARAH, 2008).

Depois que os grãos são processados, eles são armazenados ou mecânica, manual e/ ou eletronicamente dimensionados e classificados para separar e contar os grãos defeituosos. Esse

processo pode ser seguido por uma classificação adicional, utilizando excitação ultravioleta para detectar defeitos que poderiam ser produzidos durante o processamento (CODEX, 2009; BEE et al, 2005; KNOPP; BYTOF; SELMAR, 2006). Após a sua comercialização, o café verde, comumente comercializado em sacas de 60kg, está pronto para ser torrado. Pode também ser descafeinado, tratado com vapor para diminuir a acidez ou armazenado antes da torrefação. É no processo de torrefação que podem ser adicionados sementes e grãos de menor valor de mercado com o objetivo de aumentar a produção assim como o lucro financeiro (BEE et al, 2005; KNOPP; BYTOF; SELMAR, 2006).

2.3 PRODUÇÃO DO MERCADO CAFEEIRO E O SEU CONSUMO

De acordo com o USDA, a previsão para a produção mundial de café entre 2018/2019 é de 10,4 milhões de toneladas, um aumento de 8,9%em comparação com o mesmo período do ano anterior (USDA, 2019). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o Brasil, o maior produtor mundial, produziu um total de 3,7 milhões de toneladas de café beneficiado (35,3% da produção mundial) (CONAB, 2019). Esse resultado representa um aumento de 37,1% na produção brasileira, quando comparado à temporada passada. A produção de café brasileira é duas vezes maior que o segundo maior produtor (o Vietnã), representando um volume 4 vezes maior que o terceiro maior produtor mundial, a Colômbia (ICO, 2019) (Figura 5). O Brasil também é responsável por 29.5% de todo café consumido na Europa (EuropeanCoffeeReport 2017/2018).

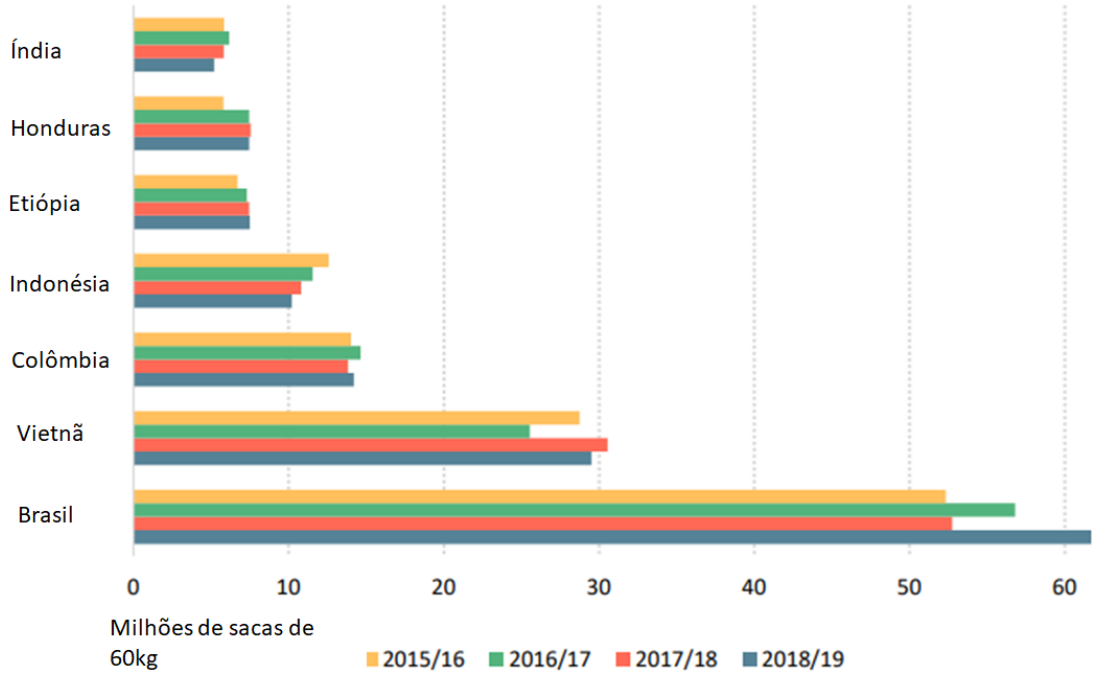


Figura 5: Produção anual de café nos principais países produtores. Figura adaptada do ICO 2019.

O consumo mundial estimado para 2018/19 é de 9,9 milhões de toneladas, um aumento de 2,1% quando comparado com 2017/18. Também, estima-se que o consumo interno nos principais países exportadores (Brasil, Vietnã, Colômbia, etc.) aumente cerca de 1,4%. Com relação aos países importadores, um aumento de 2,5% é previsto. Além disso, a demanda de países importadores não tradicionais continua a crescer, representando cerca de 18% em 2018 (ICO, 2019).Entre 10 dos maiores importadores de café do mundo, destacam-se a Europa, Estados Unidos e o Japão (Figura 6).

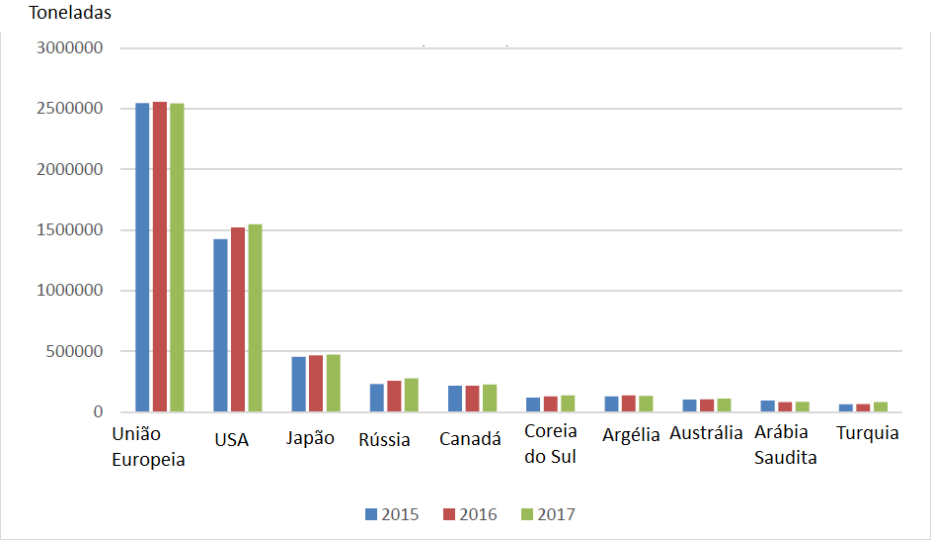


Figura 6: Evolução do consumo de café nos 10 principais países e regiões importadores de café durante o período 2015-2017, com base nos dados da Organização Internacional do Café (EUROPEAN COFFEE REPORT, 2018).

Este valor pode aumentar ainda mais devido ao aumento no consumo de 4,1% tanto na África quanto na Ásia e na Oceania. Considerando que o consumo de café na Ásia e África não é tradicional, a demanda global pelo café pode aumentar ainda mais (ICO, 2019). Os Estados Unidos são o país que mais consome café no mundo, seguido pelo Brasil (ABIC, 2019,). Porém, quando é considerado o consumo *per capita*, dois países da Europa se destacam (Figura 7), a Suíça e a Noruega (EUROPEAN COFFEE REPORT, 2018).

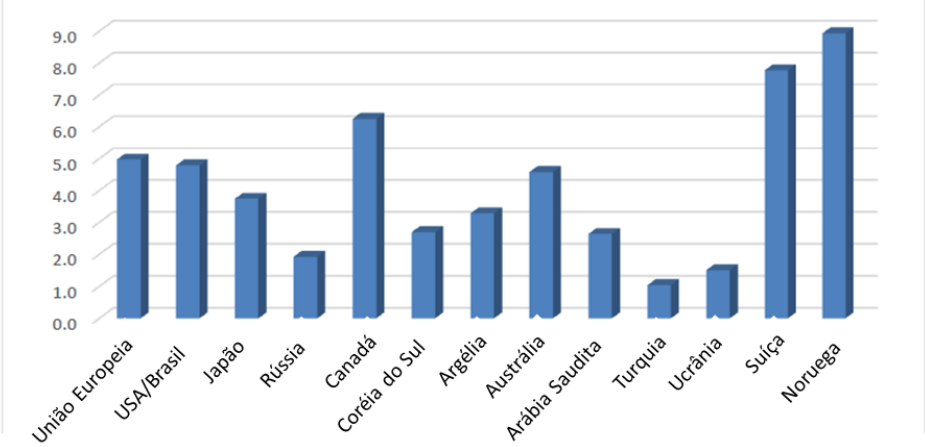


Figura. 7: Principais países consumidores *per capita* de café do mundo. Imagem adaptada do relatório da EuropeanCoffee Federation(2018).

2.4 A ADULTERAÇÃO

Desde o início da comercialização na história da humanidade, esta foi acompanhada por fraudes e as suas evidências são relatadas desde o Império Romano (SPINK; MOYER, 2011). A autenticidade alimentar está relacionada com a identidade do alimento em relação às informações da embalagem (FSA, 2018), caracterizando o produto de acordo com leis nacionais e internacionais (EUROPEAN COMMISSION, 2018). Já o termo "fraude alimentar" é uma expressão usada para caracterizar a substituição intencional, a adulteração ou deturpação do alimento, ou os ingredientes alimentícios, ou ainda embalagens de alimentos com declarações falsas ou enganosas feitas sobre um produto com o objetivo de ganho econômico (SPINK; MOYER, 2011).

As principais características da fraude em alimentos são o não cumprimento da legislação e / ou induzir ao erro o consumidor, isto é feito intencionalmente e por razões de ganho financeiro (FLCP, 2017).

De acordo com a Grocery Manufacturers Association - GMA, (2014), o custo total da fraude para a indústria global de alimentos é estimado em 49 bilhões de dólares anualmente, afetando aproximadamente 10% de todos os produtos alimentícios comercializados.

Como uma subcategoria de fraude, a adulteração alimentar economicamente motivada é definida pela Food and Drug Administration, (FDA), como a substituição ou adição intencional e fraudulenta de uma substância em um produto com a finalidade de aumentar o valor aparente do produto ou reduzir o custo de sua produção. (CRS, 2014; FDA, 2018). Esta prática é realizada, por exemplo, para tentar melhorar a qualidade percebida dos produtos, imitar uma marca estabelecida e reduzir os custos da fabricação (CRS, 2014; MANNING; SOON, 2014).

Além disso, na sociedade atual, a fraude vai além da adulteração motivada pela economia. Os consumidores estão mais informados e preocupados não apenas com a segurança com também com a qualidade do produto (DEFRA, 2013; WOOLFE; GURUNG; WALKER, 2013). Nichos específicos do mercado exigem também especificidade de espécies (e às vezes variedades ou cultivares), e a origem de determinados alimentos. Considerando todas as questões acima, sua rastreabilidade é uma questão de importância primordial na sociedade moderna (WOOLFE; GURUNG; WALKER, 2013).

No decorrer da história, vários métodos foram desenvolvidos para detectar as diversas variedades de fraudes. E estes métodos evoluíram conforme o aumento da demanda, e novas tecnologias foram criadas.

Até 2005, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não contemplava análises relativas à identificação de adulterantes em café. Já em 2010, O MAPA, na Instrução normativa nº 16 de maio de 2010 publicou as seguintes resoluções:

Do anexo I, Capítulo II, sobre as tolerâncias do café comercializado.

Art. 9º O percentual máximo em conjunto de impurezas, sedimentos e matérias estranhas permitido no café torrado em grão e no café torrado e moído será de 1,0% (um por cento).

O Art. 5º prevê a desclassificação e proibição comercial, quando o café torrado em grão e o café torrado e moído apresentar uma ou mais das situações indicadas a seguir:

II - percentual de impurezas, sedimentos e matérias estranhas iguais ou superiores a 1,3% (14a).

Mais recentemente, a ANVISA revogou a Instrução Normativa nº 16, de 24 de maio de 2010 (Instrução normativa Nº 7, de 22 de Fevereiro, 2013) equiparando a legislação brasileira com a legislação internacional, segundo a Coopération Internationaleen Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), International Coffee Organization (IOC) e Food and AgricultureOrganization (FAO).

2.4.1 DADOS HISTÓRICOS SOBRE ADULTERAÇÃO DE CAFÉ

Desde a sua introdução na sociedade, o café tem sido um dos produtos alimentícios mais importantes do mundo, adotando diferentes papéis em momentos históricos da economia, da política e na religião (UKERS, 1922; SMITH, 2001). De acordo com o Parlamento Europeu, o café é atualmente um dos alimentos mais adulterados, juntamente com o azeite, peixe/carne, mel, alimentos orgânicos, e entre outros (SPINK; MOYER, 2011; EPRS, 2014). Relatos de adulteração foram publicados sobre o café, mencionando a existência da prática desde o início do século XVIII. (ACCUM, 1820; HASSAL, 1855; SIMMONDS, 1864; UKERS, 1922; SMITH, 2001). Em um determinado momento, tal prática passou a ser uma regra e não uma exceção, especialmente em marcas de baixo valor comercial (HASSALL, 1855).

De acordo com Accum, (1820), ao longo da história, nenhum item da dieta humana foi tão adulterado ou manipulado como o café. As adulterações eram primariamente ligadas à aparência, não imitando o seu sabor (UKERS, 1922). A espécie mais adulterada foi a espécie *C. arabica*, devido à sua oferta limitada e alto valor comercial (WALSH, 1894).

Além da redução do custo de produção, há relatos de adulteração por imitação de cafés considerados superiores naquela época, mascarando danos causados aos grãos pela água do mar durante o transporte (uma vez que os canais marítimos eram uma das principais rotas comercias) (DRAPER, 1869; USDA, 1892; WALSH, 1894).

A chicória, seguida do milho e outros cereais, era um dos principais adulterantes usados, porém, o número de outros alimentos manipulados para imitar o café incluía uma lista longa, entre eles os cereais (trigo, centeio, aveia, trigo sarraceno, arroz, como também farelo de aveia, malte, com ou sem impregnação com açúcar caramelizado, melaço ou amido), as leguminosas (soja, ervilhas, tremoços, grão de bico, cássia, alfarroba, feno-grego), as raízes (chicória, beterraba, dente de leão, batata doce, batata, nabo, cenoura), outras sementes (semente de girassol, semente de algodão, sementes de uva), nozes (amêndoas, amendoim, castanhas, nozes de cola, castanhas-da-índia) e frutas (figos, ameixas secas, bagas de zimbro, bananas, pêras secas, cascas de frutas cítricas, cascas de cacau, frutos da palmeira). Além de substâncias não comestíveis como pedras e serragens (STEVENSON, 1830; SIMMONDS, 1864; DRAPER, 1869; WALSH, 1894; UKERS, 1922) e substâncias prejudicias a saúde tais como corantes de chumbo e zinco, azul da Prússia, óxido férrico, arsenito de cobre, alcatrão de carvão, e carvão vegetal (THURBER, 1881; USDA, 1892; UKERS, 1922).

Com o objetivo de esconder os grãos de caféinferiores e/ou os danificados, eram utilizados manteiga, parafina, óleo vegetal, margarina, etc., para dar brilho e polimento aos grãos verdes e torrados (WALSH, 1894).

Outros procedimentos eram realizados com o café danificado ou inferior, por exemplo, polimento por rotação em cilindros com pedra sabão, ou descoloração com água de cal, lavado, seco e colorido por uma ligeira torrefação ou com corantes artificias. Até mesmo grãos de café artificiais, moldados na forma da semente de café verdadeiro e aromatizados com uma solução de caramelo ou chocolate, também eram realizados (WALSH, 1894). Estas práticas duraram até serem restringidas por leis em diferentes países.

O uso de raíz de chicória torrada como substituto ou adulterante do café originou-se na Holanda em 1750 (UKERS, 1922). O seu uso permaneceu em segredo até 1801 e devido às guerras napoleônicas (1799-1815), esta prática foi introduzida na França como um substituto de produtos coloniais caros e para superar o bloqueio inglês dos portos (SIMMONDS, 1864; DAHLGREN, 1938). A chicória se popularizou na Europa, devido tanto à preferência do consumidor quanto as práticas fraudulentas (CRAWFORD, 1852; SIMMONDS, 1864). O consumo de chicória assumiu proporções colossais - somente na França, 6.000 toneladas foram consumidas anualmente (WANKLYN, 1874) - até um ponto em que a própria chicória passou a ser amplamente adulterada (WALSH, 1894).

A prática de misturar café com adulterantes não era proibida no Reino Unido (1853), desde que esta estivesse informada no rótulo. No entanto, apenas 10% das marcas vendidas no mercado eram genuinamente puras. A quantidade de adulterantes variou muito, chegando a

cerca de 50% e, às vezes, quase 100%, e essa qauntidade não era relatada regularmente no rótulo, ou, em caso afirmativo, era pequeno ou de difícil leitura, portanto, estas informações não eram facilmente acessíveis (HASSALL, 1855; SIMMONS, 1864). Este cenário foi também relatado que nos Estados Unidos, durante os anos de 1860 a 1870, muitas marcas apresentavam apenas cerca de 10% de café (THURBER, 1881). Os consumidores foram aconselhados preferencialmente a comparem o café em grão para reduzir o risco de serem enganados pelos comerciantes, embora diferentes sementes também pudessem ser torradas e confundidas com café (BOWER, 1895).

Dezenas de misturas foram realizadas de varias formas e nomes específicos eram utilizados com o objetivo de enobrecer os cafés adulterados, por exemplo, "café francês" e "café egípcio", embora as embalagens raramente indicassem os ingredientes (USDA, 1892) e, portanto, também eram considerados adulterantes.

A Revolução Industrial, a expansão da industrialização de alimentos e as demandas da urbanização ajudaram a estimular muitas leis para regular a indústria alimentícia.Na segunda metade do século XIX e nas primeiras décadas do século XX, as práticas de padronização, as organizações normativas e a legislação que visa controlar mais rigidamente a composição dos alimentos foram impulsionadas em todo o mundo (LASZTITY, PETRO-TURZA & FOLDESI, 2004). Considerando que o café sempre foi altamente sujeito a adulteração, foram criadas leis específicas para manter sua integridade e qualidade.

2.4.2 LEGISLAÇÃO

A primeira lei que restringia especificamente a adulteração do café era a Lei Britânica da Adulteração do Café, aprovada em 1718. Esta tornou ilegal adulterar ou manipular o café e estabeleceu punições monetárias aos infratores. Grãos de café queimados, assim como a adição de ervilhas, feijões, outros grãos, substâncias vegetais ou qualquer outra substância, eram usadas para imitar ou substituir o café, entretanto, eram proibidos. Atos legislativos sucessivos em 1725 e 1803 foram realizados para reforçar a lei de 1718 (ACCUM, 1820).

Os oficiais do governo tinham autoridade para procurar adulterações e, durante muitos anos, a torração de café em Londres só era permitida em casas de torrefação públicas, sob a inspeção dos oficiais (NICOL, 1831).

Devido aos interesses pessoais dos parlamentares ingleses, em 1822, no entanto, a legislatura permitiu o uso de milho, ervilha, feijão e nabos, desde que seus nomes estivessem informados no rótulo do produto. Em 1840, a venda de café misturado com chicória (e

identificado como tal) foi permitida, o que indiretamente estimulou a adulteração ilegal. Isso aumentou ainda mais o interesse na investigação científica da adulteração do café.

Os estudos realizados com o objetivo de identificar adulteração no café foram fundamentais para o surgimento da cultura da legislação alimentar. Principalmente usando métodos microscópicos (às vezes complementados por testes químicos), em 1850 o médico londrino Arthur Hassall (1817-1894) realizou um ensaio com diversasamostras de café adulterado que estavam comercialmente disponíveis em suas respectivas mercearias, o que atraiu a atenção do dono doThe Lancet, Thomas Wankley (1795-1862).

Wankley (1874), publicou um estudo sobre adulteração e mais tarde organizou uma comissão (Lancet AnalyticalSanitaryCommission), para investigar todos os tipos de adulteração em alimentos. Liderados por Hassall (1855), inúmeras análises, predominantes relacionadas ao café, foram publicadas na revista entre os anos de 1851 e 1854. Este mesmo pesquisador, publicou um livro, o clássico “Food and its Adulterations”. O resultado causou preocupação pública, resultando, em 1855, na atribuição da primeira comissão parlamentar para investigar a autenticidade dos alimentos. Seu trabalho levou à Lei Britânica de Adulteração de Alimentos e Bebidas, em 1860, que inspirou iniciativas mais rígidas e específicas sobre regras contra a adulteração de alimentos em vários outros países.

No final do século XIX, o reconhecido químico Harvey Wiley (1844-1930), chefe da Divisão de Química do USDA (U.S. Department of Agriculture), supervisionou a preparação do marco “Boletim USDA nº 13: Alimentos e adulterantes de alimentos” (publicado em 10 partes entre 1887 e 1901), que definiram a natureza e a extensão da adulteração de todas as classes de produtos alimentícios e seus métodos de análise, incluindo aqueles para o café.

Como resultado, em 1906, a Lei de Alimentos e Drogas Puras entrou em vigor, banindo os alimentos adulterados do comércio interestadual e tornando obrigatório rotular todos os cafés corretamente. A lei deu ao USDA a tarefa de detectar violações e preparar casos para os tribunais; A Divisão de Química imediatamente desenvolveu padrões para o café (SAYRE, 1906).

A Lei Federal, norte Americana, de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos de 1938 melhorou os critérios de padrão de identidade e classificação, e exigiu que todos os alimentos não padronizados que incluíssem dois ou mais ingredientes que tivessem seus ingredientes declarados no rótulo. Sob esta Lei, o comércio internacional também foi englobado, e importar café de baixa qualidade tornou-se ilegal (LASZTITY, PETRO-TURZA & FOLDESI, 2004; ATKINS, 2013).

Desde então, muitas organizações de segurança alimentar e de alimentos foram criadas em todo o mundo para pesquisar a qualidade dos alimentos. Um exemplo é a comissão do Codex Alimentarius (CODEX), criada em 1963 por duas organizações das Nações Unidas, a Food andAgricultureOrganization (FAO) e a World Health Organization (OMS). O Codex é a principal organização internacional de definição de padrões para proteger os interesses econômicos e de saúde dos consumidores e incentivar o comércio internacional de alimentos mais justo (CODEX, 2019). O CODEX procura assegurar que o suprimento mundial de alimentos seja robusto, saudável, livre de adulteração e corretamente rotulado (CODEX, 2015).

Exemplos de outras agências reguladoras ao redor do mundo que regulam a qualidade do café são a European Food Safety Authority (EFSA), Food Standards Agency (FSA - UK), Food and Drug Administration (FDA - EUA), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA - Brasil) , Instituto Colombiano Agropecuario (ICA - Colômbia), Center for Food Safety (CFS - Hong Kong) e a Food Safety and Standards Authority of India (FSSAI). Apenas em alguns países produtores e / ou consumidores, como o Brasil e os EUA, tenham regras e regulamentos específicos para o comércio de café.

2.4.3 ABORDAGENS HISTÓRICAS APLICADAS À DETECÇÃO DE ADULTERANTES DE CAFÉ - OS PRIMEIROS MÉTODOS QUÍMICOS E FÍSICOS

No século XIX, os primeiros métodos utilizados para a análise da autenticidade do café, foram baseados em análises da composição química característica do grão de café, especialmente em relação a cafeína (determinada pela fervura em água, precipitação com acetato básico de chumbo, extraída com clorofórmio e secagem); gordura (extraída com éter e medida num aparelho Soxhlet); nitrogênio albuminoide (com utilização de potassa cáustica, lavagem com uma solução de ácido acético e pesagem do resíduo seco); cinzas solúveis e insolúveis como também a sua umidade (USDA, 1892; MCGILL, 1918). Ácido caféico ou tânico foi menos utilizado (USDA, 1892).

O conteúdo mineral das cinzas - como o fosfato e o manganês, analisado em um refratômetro, não produziu resultados substancialmente úteis (MCGILL, 1918), provavelmente devido a inacurácia dos métodos. Alguns dos protocolos químicos foram desenvolvidos e eram oficiais, porém a maioria dos outros métodos não eram (USDA, 1892). Uma questão relevante, porém, foi que as numerosas variedades de café exibiam importantes diferenças químicas entre elas (MCGILL, 1918), um obstáculo não resolvido por muito tempo. Ainda assim, vários métodos químicos para a detecção de chicória já haviam sido desenvolvidos utilizando o branqueamento com soda clorada (USDA, 1892).

Para a detecção de cereais, as primeiras análises foram conduzidas com o objetivo de detectar amido utilizando iodo. A média de cinzas também era um bom indicador, já que nos cereais as cinzas eram consideravelmente menor do que no café, e também, como muitos dos adulterantes produziam extratos de sacarina, a presença de açúcares redutores detectados pelo teste da redução de cobre foi considerada útil (USDA, 1892; WALSH, 1894). Outros testes com o objetivo de identificar conteúdos metálicos ou semi-metálicos (como ferro, chumbo, cromo, cobre, estanho e arsênico) foram usados para detectar o uso de pigmentos artificiais que existiam naquela época. Os níveis poderiam ser examinados com bases em precipitados alcoólicos aquosos ou nas cinzas, das quais cor e composição eram examinados (USDA, 1892; UKERS, 1922).

Embora longe de ser considerado sofisticado em comparação com as análises atuais de adulterantes de café, vários métodos visuais considerados relativamente fáceis existiam (WALSH, 1894). A microscopia foi considerada o método mais rápido para detectar adulterações. Mesmo a torrefação não podia destruir algumas peculiaridades distintas do tecido celular do café (WALSH, 1894; UKERS, 1922; SMITH, 2001). A chicória pode ser facilmente identificada através de suas numerosas células parenquimatosas de paredes finas e vasos lactíferos (HASSALL, 1855). Os cereais, os feijões e as raízes eram distinguíveis através de peculiaridades no tamanho e carácterística dos grânulos de amido de cada um, bem como por suas células de forma arredondada, microfibrilas celulósicas e outras marcas fibrosas em suas superfícies (HASSALL, 1855; SIMMONDS, 1864; USDA, 1892; DRAPER, 1867).

Análises macroscópicas e/ou físicas também eram disponíveis. Os grãos de café artificiais podem ser reconhecidos pela sua forma exata (UKERS, 1922). Além disso, a cor das infusões produzidas sob condições padrão denunciavam o uso de adulterantes (USDA, 1922). A gravimetria específica de um extrato de café feita sob condições padronizada, poderia ser comparada com a de um extrato de café com suspeita de adição de chicória, por exemplo. Embora a presença de cereais, gordura ou outras matérias estranhas pudessem tornar o teste pouco confiável (USDA, 1892). Outra alternativa era colocar o produto na água faria onde os fragmentos de café iram flutuar devido ao seu teor de gordura e os fragmentos de chicória, legumes e cereais afundariam, a não ser que,alguma substância gordurosa fosse utilizada durante a torrefação do adulterante (SIMMONDS, 1864; THURBER, 1881; USDA, 1892).

2.4.4 MÉTODOS ATUAIS UTILIZADOS PARA DISCRIMINAÇÃO ENTRE CAFÉ E OUTROS ALIMENTOS E ENTRE SEMENTES DE CAFÉ E OUTRAS PARTES DA PLANTA

Em geral, os métodos encontrados na literatura sobre a detecção de fraudes em café nos séculos XX e XXI incluem métodos espectroscópicos, seguidos de métodos cromatográficos. Os métodos baseados em DNA estão entre os mais recentes, junto com aqueles que combinam abordagens de metabolômica e quimiometria.

Os métodos que utilizam técnicas como cromatografia líquida ou gasosa associada a detector UV, fluorescente ou de massa geralmente buscam marcadores específicos ou usam padrões de imagem ou impressão digital associados a procedimentos estatísticos, já os métodos baseados em DNA, consideram os perfis genômicos ou genes endógenos para o café e para os adulterantes específicos de alimentos.

2.4.4.1 MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS: MICROSCOPIA

Em meados do século XIX, na Inglaterra, os trabalhos desenvolvidos por Hassal (1849), usando microscopia desempenharam um papel importante na legislação de pureza de alimentos, incluindo café (GRAY, 1983; SMITH, 2001).

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é a evolução do microscópio visual. Essa técnica usa um feixe de elétrons para criar uma imagem do espécime. As vantagens das técnicas histológicas baseadas em microscopia eletrônica combinadas com a análise digital de imagens permitiram sua aplicação na avaliação do conteúdo celular e na detecção de alterações morfológicas em alimentos processados, onde uma simples inspeção visual não é evidente (RSC, 2018).

Geralmente, a análise microscópica compreende três etapas, o desengorduramento com clorofórmio, a filtração usando papéis de filtros para remover partículas finas e o processamento das imagens.

Considerando esses aspectos, Amboni et al. (1999) propuseram a aplicação do (MEV) para detectar fraudes em café torrado e moído, utilizando centeio, cevada, milho e trigo como adulterantes, após serem torrados e moídos para alcançar a mesma granulometria do café. Comparando o método de microscopia ótica coma a microscopia eletrônica, nenhuma porcentagem dos adulterantes foi detectado pelo método de microscopia óptica. Por outro lado, foi possível detectar facilmente 2,5% dos grânulos de amido, o principal componente em todos os cereais. Em 2002, Sano et al., propuseram um método de microscopia visual acoplado a um computador suportado por um software de processamento de imagem. Seu modelo de estudo

foi capaz de detectar 2,5% de milho, casca e palha de café. A sensibilidade diminuiu de 2,5% para 5-10% quando os adulterantes foram analisados de forma binária.

2.4.4.2 MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS: ESPECTROSCOPIA

Os métodos espectroscópicos baseiam-se na interação entre a amostra e a radiação eletromagnética, como por exemplo, a refletância, a transmitância, a absorbância, a fosforescência, a fluorescência e decaimento radioativo. Nas últimas décadas, a utilização de técnicas espectroscópicas em alimentos tem aumentado consideravelmente (ZHANG, 2011; CUBERON, 2014; BARNIN, 2014). Em geral, as técnicas espectroscópicas são consideradas rápidas, com pouca ou nenhuma preparação das amostras, e com capacidade para analisar múltiplos atributos de uma amostra simultaneamente (BLANCO &VILLARROYA, 2002).

Métodos preliminares baseados em espectrofotometria (KAZI, 1979) e fotocústica (chamada Espectrometria de Lentes Térmicas - ELT) (CEZAR, et al, 1984), foram utilizados para detectar níveis de açúcares de cetose, milho e pergaminho. Os métdos foram testados em amostras controladas com alta concetração de adulterantes (48 – 85%) além disso, apresentaram inespecificidade quando analisados em diferentes condições de torra e qauntidade de adulterantes.

Outras estudos foram propostos utilizando ELT (FONTES et al, 2001; FONTES et al, 2006). Embora os methodos foram capazes discriminar milho de café em 4%, os metodos não foram capazes de quantificar o adulterante.

O café solúvel e/ou instantâneo é mais suscetível à adulteração do que o café torrado e moído. Baseado no fato de que a detecção de adulteração de café instantâneo não é viável por meios microscópicos ou outros meios físicos tradicionalmente usados para identificar impurezas em grãos verdes ou torrados até então, Briandet et al. Publicou uma série de estudos pioneiros utilizando espectroscopia de infravermelho e quimiometria para avaliar a autenticidade de café instantâneo como uma alternativa mais barata e rápida aos métodos existentes. Em um desses estudos, Briandet et al., (1996) exploraram dois métodos de espectroscopia no infravermelho de acordo com o tipo de amostra. Para amostras sólidas foi utilizado o método de refletância difusa (Diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy - DRIFT) e para as amostras líquidas foi utilizada a refletância total atenuada (Attenuated total reflection – ATR).

Abordagens quimiométricas foram crucias para o desenvolvimento do método. Utilizando amostras da Europa os autores assumiram que o desenho do estudo é suficientemente

robusto e representativo, mesmo considerando as variações composicionais das espécies e também de suas origens e condições de crescimento.

Utilizando um Espectrorradiômetro, Assad et al. (2002) propuseram um método para detecção e quantificação de paus, cascas e milho em café torrado. O método foi capaz de detectar 5% de milho com R^2 = 0,95, ~ 2% de cascas e paus (R^2= 0,93).

Near-infraredspectroscopy–NIR e técnicas quimiométricas foram utilizadas por Ebrahimi-Najafabadi et al. (2012). A granulometria e as condições de torra da análise foram controladas e o método foi capaz de discriminar café de cevada em proporções 2% a 20%.

Além de NIR, a associação de espectroscopia de infravermelho médio e quimiometria também foi aplicada no café com o objetivo de detectar a adição de casca de café em café torrado. O grau de torra, granulometria foram observados. Contudo o método apresentou limitações com relação a as misturas de café e casca de café no qual, não apresentaram diferenças visuais (no gráfico espectral).

A partir de então, diversos métodos foram desenvolvidos utilizando espectroscopia e ferramentas quimiométricas. Os autores exploraram modelos de estudo (café da espécie *C. arabica*) com limite de detecção de 1% (REIS et al, 2013a; REIS et al, 2013b; REIS et al, 2013c; SOUTO et al. 2015; WINKLER-MOSER et al, 2015), e também tentaram quantificar adulteração com múltiplos adulterantes (REIS et al, 2013b; REIS et al, 2013c), ao mesmo tempo. Contudo, os métodos não foram suficientemente robustos quando aplicados em amostras com grau de torra escura e com mais de um adulterante (com concentração de adulterante a partir de 10%). Além disso, algumas amostras de café puro foram erroneamente classificadas como adulteradas, sugerindo efeito de matriz (SOUTO et al, 2015).

A técnica de Espectrometria de Massas com Ionização por *Eletrospray* (ESI-MS) associada com análises quimiométricas (PCA) foi aplicada por Aquino et al (2014) para detectar casca de café no nível de 10% (p / p) em três cultivares de *C. arabica*: Acaiá, Catuaí, Topázio, e em *C. canephora* (conilon) com igual granulometria. Os ácidos quinico e cítrico, ácido cafeoilquínico, ácido feruloilquínico e alguns outros ácidos foram os grupos mais importantes de compostos para discriminação dos três grupos, apresentando a maior influência nos dados de PCA. Os dados da PCA também foram capazes de agrupar as diferentes cultivares de café. Contudo, as análises tenham sido realizadas com torra clara que não representam a realidade do mercado cafeeiro que utiliza grau de torra média-escura ou escura. No entanto, algumas amostras de café puro foram erroneamente classificadas como adulteradas, sugerindo efeito de matriz.

A espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis), combinado com técnicas quimiométricas propostas por Souto et al. 2015, para identificar casca e paus de café em café. Através das ferramentas quimiométricas foi possível discriminar as amostras de café do adulterante. Os autores destacaram a necessidade de um teste com maior amostragem e mais variada, para outros adulterantes com o objetivo de ampliar o alcance do modelo matemático.

Reis et al. (2016) desenvolveram um método de espectroscopia (ATR-FTIR), associado a quimiometria para detectar e quantificar cascas de café, café, cevada e milho em café torrado e moído (*C. arabica*) em diferentes graus de torrefação (claro, médio e escuro). Após a remoção dos *outliers* (no modelo final), o modelo apresentou considerável exatidão combaixos valores de calibração (*Root MeanSquare Erros Calibration* - RMSEC) e validação (*Root MeanSquare Erros Validation* - RMSEP) 0,69 e 2,00, respectivamente, com coeficientes de correlação de 0,99 para ambos.

Ribeiro et al (2017) propuseram o uso de spectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^{1}H) para identificação e quantificação de casca de cevada, milho, soja (misturas binárias) em café torrado e moído (*C. arabica*) com grau de torra média (concentração mínima de 30%). Os dados dos espectros de café e casca de café mostraram ser bastante semelhantes. Por outro lado, o perfil de adulterantes e café puro foi significativamente diferente.

A Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) e FTIR-ATR combinados com análise quimiométrica foram propostos por Brondi et al. (2017) para detectar milho (torra escura) em café torrado e moído (*C. arabica*), sob mesma granulometria concentração mínima de 0,5%. Os dados do DSC mostraram que havia poucas diferenças entre os perfis do grau de torrefação. Isso significa que o grau de torrefação não afetaria a detecção do milho. No entanto, os dados de PCA nas misturas com grau médio de torrefação foram espaçados no gráfico. Além disso, os dados de PCA da abordagem FTIR-ATR não foram robustos o suficiente para identificar baixas concentrações de milho.

Mais recentemente, três técnicas pioneiras foram utilizadas para avaliar o café devido à sua relativa simplicidade e baixo consumo de tempo, por exemplo: Eletroforese Capilar-Espectrometria de Massa em Tandem-CE-MS / MS e análises quimimétricas (Daniel, et al. 2018), técnica MicroNIR (Correia , et al. 2018) e Espectroscopia de Quebra Induzida por Laser - LIBS (Sezer, et al. 2018).

Daniel et al. avaliaram o perfil de monossacarídeos obtidos após a hidrólise ácida das amostras. O objetivo foi detectar soja e milho com concentração mínima de 2,5% e grau de torra média. A fucose foi encontrada apenas em amostras de soja, mas em baixa concentração

(0,28%). Esta poderia ser usada como marcador específico para adulteração de café por soja. No entanto, em misturas com baixa concentração de soja (5%) ela não foi detectada.

Correia et al. propuseram o uso de um novo equipamento (portátil) chamado MicroNIR, que utiliza a região do infravermelho próximo e análises quimiométricas. Neste estudo os autores utilizaram *blends* de café das duas principais espécies (*C. arabica* e *C. canephora*) com mistura mínima de 1% de milho e cascas de café (torra clara). Além disso, dezesseis amostras comerciais foram utilizadas para verificar a aplicabilidade do método. Os modelos quimiométricos apresentaram um limite detecção e quantificação satisfatório para milho (LOD = 2,6 e LOQ = 8,7% em peso) e cascas de café (LOD = 1,6 e LOQ = 5,2% em peso) com R^2 de 0,8589 e 0,9788, respectivamente. No entanto, os valores de desvio relativo para misturas contendo cascas e milho, foram bastante elevados. O método não foi robusto o suficiente para quantificar os adulterantes nas amostras comerciais. Os autores destacaram que, isso ocorreu devido às diferenças de matriz encontradas entre as amostras comerciais e as amostras utilizadas no estudo.

Sezer et al. avaliaram o potencial de LIBS combinado com ferramentas quimiométricas para discriminar amostras de *C. arabica* (de 21 países) de trigo, milho e grão de bico (o grau de torrefação não foi mencionado) com concentração mínima de 2,5%. De acordo com a sua composição elementar, todas as amostras foram discriminadas em mistura binária de café-trigo, café-milho ou café-grão de bico por análise de PCA.

Em geral, técnicas espectroscópicas possuem aplicação potencial na indústria do café para inspeção simples de produtos. Há uma evolução nas tecnologias baseadas em técnicas espectroscópicas. No entanto, as técnicas de impressão digital e de perfil não fornecem informações óbvias sobre analitos específicos em uma mistura e também são suscetíveis à distorção óptica e aos efeitos de matriz. Para usar esses métodos rápidos, mas não específicos, é necessário avaliar os conjuntos de dados usando procedimentos matemáticos complexos como a análise de dados multivariada (MVA). Assim, a aplicabilidade dessas técnicas exigirá extensa investigação, devido à complexidade química do café.

2.4.4.3 MÉTODOS DE CROMATOGRAFIA

Técnicas cromatográficas são amplamente empregadas na autenticidade de alimentos e na análise da sua qualidade (J. PRODOLLIET; C. HISCHENHUBER, 1998). Os equipamentos de CLAE e Cromatografia Gasosa (GC) consistem em uma fonte de fase móvel, bomba de alta pressão, injetor, coluna analítica (temperatura controlada) e um detector. Com relação à CLAE, os diferentes componentes da mistura passam pela coluna em taxas diferentes devido a

diferenças em seu comportamento de particionamento entre a fase líquida móvel e a fase estacionária (material da coluna). Considerando GC, a amostra é volatilizada em uma na porta de entrada aquecida (injetor) e particionada entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária. Os gases mais utilizados como fases móveis são nitrogênio, hélio e hidrogênio (FRITZ PRAGST, 2008; ZHANG, 2011).

A primeira análise de carboidratos em café foi realizada no final do século XX (STREULI, 1970). Mas somente em 1974, os estudos realizados por Kröplien, (1979), utilizando cromatografia em camada delgada e quantificação densitométrica, confiáveis o suficiente para avaliar o perfil de monossacarídeos em amostras de café instantâneo e torrado.

Utilizando uma tecnologia mais moderna, naquela época, Blanc et al, 1989, propuseram um método de CLAE com derivatização pós-coluna, baseado no perfil de carboidratos (após hidrólise ácida) presente em amostras de café instantâneo. O objetivo do estudo foi caracterizar o conteúdo de monossacarídeos (açúcares livre e total) em cafés instantâneos para discriminar café instantâneo puro de amostras adulteradas com casca de café e pergaminho. Soluções padrões de açúcares foram utilizadas como referência externa para a quantificação. Amostras comerciais da Austrália, Brasil, Canadá, Equador, Alemanha, Hungria, Japão, México, Suíça, Reino Unido e Estados Unidos foram avaliadas. A presença de casca de café e pergaminho foi correlacionada com o aumento da quantidade de xilose. De longe, a xilose parece ser o monossacarídeo mais estável, que não é influenciado pela torrefação. Independentemente das condições de extração, os resultados mostraram que o café solúvel puro, contém níveis máximos de monossacarídeos a 0,3% do total de xilose e sacarose, sem maltose e cerca de 2% de glicose total.

Em 1990, Davis et al. propuseram um método de CG para detectar e quantificar álcoois poliídricos (manitol e inositol) e perfis de carboidratos (arabinose; xilose; frutose; manose + galactose; glicose; glicose + galactose, sacarose e maltose). Padrões de manitol e inositole amostras de café foram analisados, após a reação de derivatização. Foram analisados cafés instantâneos comerciais do Brasil, Canadá, Colômbia, Equador, El Salvador, Alemanha, Japão, México, Paraguai, Suíça, Reino Unido e Estados Unidos.

O manitol permaneceu estável com baixa perda de recuperação. A presença de manitol em amostras de café instantâneo em níveis acima de 0,30% indica adulteração. Os resultados mostraram que a quantidade de inositol não é um bom parâmetro para a adulteração de café. A maltose não foi detectada em amostras padrão usando esta metodologia. A xilose foi detectada em concentrações de cerca de 0,20%. Estes resultados estão de acordo com os dados reportados por Blanc et. al.

Bernal et al., 1996, propuseram o uso de um método de cromatografia de troca aniônica acoplada à detecção amperométrica pulsada (PulsedAmperometricDetection - PAD) para determinar o perfil de carboidratos do vinho e de café solúvel. Essa abordagem é relativamente mais simples porque não requer derivatização pós-coluna nem a adição de cromóforos.

O limite de detecção e o tempo de retenção foram estabelecidos para manitol, fucose, arabinose, ramnose, galactose, glicose, sacarose, manose, frutose, xilose e ribose utilizando soluções padrão. Amostras comerciais de café instantâneo da Colômbia, Brasil, Equador e Espanha foram analisadas. Para verificar a aplicabilidade do método, duas amostras comerciais classificadas como puras foram misturadas com 5% de extratos de chicória e mistura de cereais. O perfil dos carboidratos das amostras de vinho e café instantâneo foi caracterizado com sucesso com boa separação e resolução.

Os teores de glicose, sacarose e frutose foram elevados nas amostras intencionalmente adulteradas com chicória e com cereais. A xilose não foi detectada em nenhuma das amostras de café analisadas. Galactose e manose foram detectadas em amostras comerciais.

Em 1998, Prodolliet e Hischenhuber, publicaram uma revisão bibliográfica sobre autenticação de alimentos por cromatografia. Os autores resumiram vários estudos desenvolvidos para detectar e quantificar a adulteração em alimentos, incluindo o café instantâneo. Em relação ao café instantâneo, alguns estudos foram validados utilizando amostras de uma ampla variedade de produtos comerciais. Embora diversos métodos analíticos tenham sido aplicados para avaliar o conteúdo de carboidratos no café instantâneo, os autores observaram que a técnica*High Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection* (HPAEC-PAD) é mais simples, precisa e sensível que a CLAE-UV e permite uma separação completa de todos os principais carboidratos em uma única corrida.

Em um estudo preliminar, Stober et. al. (2001), propuseram o uso da técnica de HPAEC para detecção de leguminosas em cafés instantâneos de acordo com a análise do oligossacarídeo e o perfil protéico, com pH elevado. Amostras de café instantâneo (padrão) e misturas de diferentes fabricantes foram avaliadas. A identificação da estaquiose foi realizada com a purificação da fração de oligossacarídeo usandocromatografia líquida de alta performance de fase reversa, seguida de metilação e análise por GC-MS. O método proporcionou sensibilidade variando entre cerca de 0,1 e 0,2 g / 100 g. Picos de estaquiose não foram observados nos cromatogramas para os cafés instantâneos padrão. Os autores concluíram que a presença de estaquiose e a incomum análise do perfil oligossacarídeo / proteína é uma nova abordagem promissora para detecção de leguminosas em cafés instantâneos.

Em 2007, um método de perfil do tocoferol foi proposto para a avaliação da autenticidade do café. Jham et al. desenvolveu um método de CLAE para detectar milho em cafés torrados e moídos. Foram adquiridas seis amostras brasileiras de *C. arabica* (Catuaí, Catuca, Burbourn, Mundo Novo, Rubí e Topázio) e café comercial. Uma amostra comercial identificada como pura foi adulterada com milho torrado em proporções de 5, 10 e 20% de milho, para desenvolver o modelo do estudo. Além disso, amostras comerciais foram adquiridas para verificar a sua aplicabilidade. O grau de torrefação não foi mencionado.

Para estimar a quantidade de milho adicionada nas amostras comerciais, foi realizada análise de regressão linear de α, β e γ-tocoferol. O perfil de tocoferol das variedades de *C. arabica* obteve concentrações de 29,0, 61,7, 3,3 e 6,0% para α, β, γ e δ-tocoferol, respectivamente. As amostras de milho forneceram um perfil diferente de tocoferol nas porcentagens de 3,6, 91,3 e 5,1 para α, γ e δ-tocoferol. Os autores destacaram os vários fatores como, variedade, origem da amostra, armazenamento, processamento, etc., poderiam afetar os tocoferóis, devem ser examinados em detalhes. Uma limitação observada pelos autores é a baixa sensibilidade da análise dos tocoferóis.

No ano seguinte, o mesmo grupo de pesquisa (JHAM et al, 2008) avaliou o uso do perfil de ácidos graxos como um marcador potencial para a autenticidade do café através de GC. O mesmo conjunto de amostras e processamento realizado em seu estudo anterior (JHAM et al, 2007). Embora, a metodologia proposta foi tenha sido adequada para avaliar a qualidade do café pela composição de seus ácidos graxos. Esta não foi capaz de diferenciar adulteração com milho em cafés comerciais.

Em 2009, os perfis de carboidratos de café torrado e moído (*C. arabica*) foram analisados por Garcia et al. (2009), através do método HPAEC-PAD para detecção de cascas de café e milho. Até agora, esta técnica só tinha sido foi aplicada em amostras de café instantâneo. Para identificação e quantificação, foram realizadas soluções padrão de manitol, arabinose, galactose, glicose, xilose, manose e frutose. A construção da curva de adulteração foi organizada através de um delineamento simplex-centroide. Todos os modelos lineares foram ajustados para um nível de confiança de 95%. Para todos os oligossacarídeos, as curvas padrão obtiveram coeficientes de correlação próximos de 1 com limite de detecção adequado. Em relação ao grau de torrefação, o teor total de carboidratos das amostras diminuiu de acordo com o aumento dograu de torrefação (torra escura). As amostras de café puro obtiveram maiores concentrações de galactose e manose com níveis de 8,25% e 9,65% (p / p), respectivamente.

No entanto, nas cascas puras, os principais carboidratos foram manitol (com nível de 0,64%), arabinose (com 4,24%) e xilose (com 3,40%). A glicose foi o principal oligossacarídeo

relacionada com o milho (52,53%), p / p. Os resultados sugerem que as amostras de café torrado e moído obtiveram perfil oligossacarídico similar a aqueles encontrado em cafés instantâneos.

Considerando as técnicas supracitadas, incapazes de identificar constituintes individuais ou constituintes em misturas de vários adulterantes, Oliveira et al. (2009) propuseram um método de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS) com Micro-Extração em fase sólida (SPME) e análises quimiométricas (PCA), para detectar a cevada em café. Foram preparadas misturas de 1%, 5% e 50% de cevada torrada em café torrado. O café puro e os adulterantes foram submetidos a três graus de torrefação (clara, média e escura). Uma limitação do método foi a incapacidade de detectar a cevada em baixa concentração (1%) na torra escura.

Em 2011, Pauli et al. validaram um método CLAE-UV-Vis com sistema de derivatização pós-coluna para a determinação de carboidratos totais em café instantâneo, com o objetivo de detectar a adição de adulterantes. Ambas as espécies de café (*C. arabica e C. canephora*) foram utilizadas na análise.

A metodologia foi validada com sucesso, uma vez que os resultados indicaram linearidade (R^2> 0,999), especificidade, seletividade, precisão e exatidão. Também, apresentou limites de detecção de 2,6 a 13,8 µg / mL-1 e quantificação de 87,6 a 481,2 µg / mL-1, respectivamente. A especificidade foi realizada considerando o tempo de retenção para cada padrão.As amostras intencionalmente adulteradas com casca de café e produtos de amido foram detectadas com sucesso. As amostras com casca de café apresentaram alta concentração de xilose (6,08% p / p), enquanto as amostras com amido obtiveram altos níveis de glicose (19,90% p / p).

Domingues et al. (2014), aplicou dois métodos cromatográficos, HPAEC-PAD e derivatização pós-coluna CLASE-UV-Vis, com objetivo de avaliar o desempenho e a correlação entre eles, considerando que, na maioria dos laboratórios, a CLAE é acoplada à detecção UV-Vis. A análise do PCA foi realizada para classificar as amostras adulteradas de cada método. As amostras de café arábica, triticale e açaí foram torradas e moídas para obter um grau de torra média. Amostras de café foram misturadas com adulterantes usando um delineamento experimental simplex-centróide. Os autores concluíram que a determinação dos carboidratos pelo método HPLC-UV-Vis foi mais rápida e fácil de se realizar, e poderia ser usada na maioria dos laboratórios, embora com menor resolução cromatográfica, sensibilidade quando comparado ao método HPAEC-PAD.

No mesmo ano, Pauli, et al. (2014). avaliou a autenticidade do café através do método HPAEC-PAD baseado no perfil de carboidratos e seus oligossacarídeos (manitol, arabinose,

galactose, glicose, xilose, manose e frutose). Além disso, ferramentas quimiométricas, como PCA e LDA, foram realizadas com o intuito de construir modelos para discriminação dos adulterantes nas misturas de café. O método de cromatografia e as misturas de café com soja, trigo foram realizadas segundo Domingues et al. (2014). Independentemente do tipo de mistura, se binária ou ternária, o nível mais baixo dos adulterantes adicionados foi de 17%.

Um método de *Ultra Performance Liquid Chromatography* com *High Resolution Mass Spectrometers* (UPLC-HRMS) foi proposto por, Cai. T. et al. (2016). Os grãos de café foram obtidos comercialmente de 7 origens diferentes no mundo (Brasil, Jamaica, Itália, Colômbia, Peru, Cuba e China). As espécies de café não foram identificadas no estudo. Amostras de café foram intencionalmente adulteradas com soja e arroz de 5 a 50%. A mesma granulometria foi utilizada para a extração dos oligossacarídeos de café, soja e arroz.

Os cafés de diferentes origens foram analisados apresentaram perfis de oligossacarídeos altamente similares entre eles. Através das análises quimiométricas foram identificados 17 oligossacarídeos forneceram diferenças significativas entre o café e os adulterantes. Com base nesses marcadores oligossacarídeos, café puro, soja e arroz foram classificados pela análise PCA mesmo em baixas concentrações de adulterantes (5%). O arroz foi detectado (~ 5%) em todas as amostras comerciais. Esses dados preliminares demonstraram que a metodologia proposta é mais confiável e eficiente do que os trabalhos anteriores baseados no perfil de carboidratos.

Em conclusão, as metodologias apresentadas a cima apresentaram sensibilidade para avaliar principalmente cafés solúveis. No entanto, eles também são suscetíveis a efeitos de matriz e baixa especificidade. Portanto, não é possível garantir se a substância encontrada está correlacionada a um tipo específico de adulterante.

2.4.4.4 MÉTODOS BASEADOS EM DNA

A técnica a técnica de PCR (também denominada PCR convencional) baseia-se na reação em cadeia da DNA polimerase, a enzima responsável por polimerizar (sintetizar) o DNA na replicação celular (NAVARRO et al, 2015), o mecanismo responsável pela transmissão da informação genética nas células. Trechos de DNA genômico podem ser amplificados *in vitro,* sob condições específicas, nas quais são adicionados ao meio reacional a DNA polimerase termoestável, deoxinucleotídeos e oligonucleotídeos curtos - primers ou iniciadores, (apresentando sequência de bases complementares ao DNA molde). Os ciclos dessa reação

produzem fragmentos de DNA da sequência-alvo, mesmo a partir de traços de DNA molde (em 3 horas, obtém-se aproximadamente 1.000.000.000 cópias) (YAT; SHAW, 2018).

Poucas metodologias baseadas em biologia molecular foram aplicadas na autenticidade do café, por exemplo, Spaniolas et al. (2006), desenvolveu um método para diferenciar *C. arabica* e *C. canephora* por PCR Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP. No entanto, o método só avaliou sementes de cafés verdes que são mais fáceis de discriminar em comparação com as torradas moídas. Em 2010, um método de PCR convencional foi patenteado (PALLAVICINI et al, 2010) também, com o objetivo de diferenciar as espécies *C. arabica* e *C. canephora*, baseados em polimorfismos de DNA do cloroplasto. Contudo, a PCR convencional se baseia na detecção de através de análises de gel de agarose, o que pode ser pouco sensível além de ser laborioso e demorado.

2.5 PCR EM TEMPO REAL

A PCR em tempo real é uma evolução da PCR convencional que permite o monitoramento da reação de amplificação ciclo a ciclo, em sistema fechado, sem interferências externas no progresso da reação. Isso porque um sinal fluorescente emitido é detectado em proporção ao aumento da quantidade de DNA amplificado. Essa fluorescência é emitida por compostos fluoróforos, que podem estar ligados a sondas tipo TaqMan ou intercalados na dupla fita do DNA amplificado como o SYBR Green (MULLIS et al, 1990; HEID et al, 2011).

Esta técnica tem a capacidade de detectar e quantificar quantidades mínimas de ácidos nucléicos em uma ampla gama de amostras de várias fontes e é considerada eficaz por excelência em diagnósticos moleculares, ciências da vida, agricultura e medicina (KUBISTA et al, 2006; BUSTIN et al, 2009).

A qPCR é considerada prática, juntamente com a sua combinação de velocidade, sensibilidade e especificidade de forma homogênea se tornou referência com relação a quantificação de DNA. Além de seu uso como ferramenta de pesquisa, muitas aplicações de diagnóstico foram desenvolvidas, incluindo quantificação microbiana, determinação da dosagem gênica, identificação de transgenia em organismos geneticamente modificados, avaliação de risco de recorrência do câncer, e aplicações para uso forense (BUSTIN et al, 2009; LUCIUS et al, 20019;NILSEN et al, 2019)

O aumento desse produto nos ciclos iniciais é pouco significativo, mas com o progresso da reação, pode-se observar um aumento exponencial do sinal emitido (fase exponencial ou linear). Nesse momento da reação, a eficiência é máxima, pois os reagentes estão todos em concentrações adequadas que permitem o máximo de rendimento da reação.

Após essa fase, a curva de amplificação começa a perder a linearidade, pois os reagentes já não estão totalmente disponíveis, diminuindo a eficiência e o rendimento da reação (platô). A faixa linear da curva de amplificação, entre a linha de base (*baseline*) e a mudança de curvatura, é usada para a determinação do parâmetro que permitirá a realização dos cálculos para quantificação da sequencia de DNA alvo. É nessa faixa que é traçada a linha limite (*threshold*), e determinado o ciclo da PCR que "cruza" tal linha limite chamado ciclo de *threshold* Ct (Figura: 8) (HEID et al, 2011).

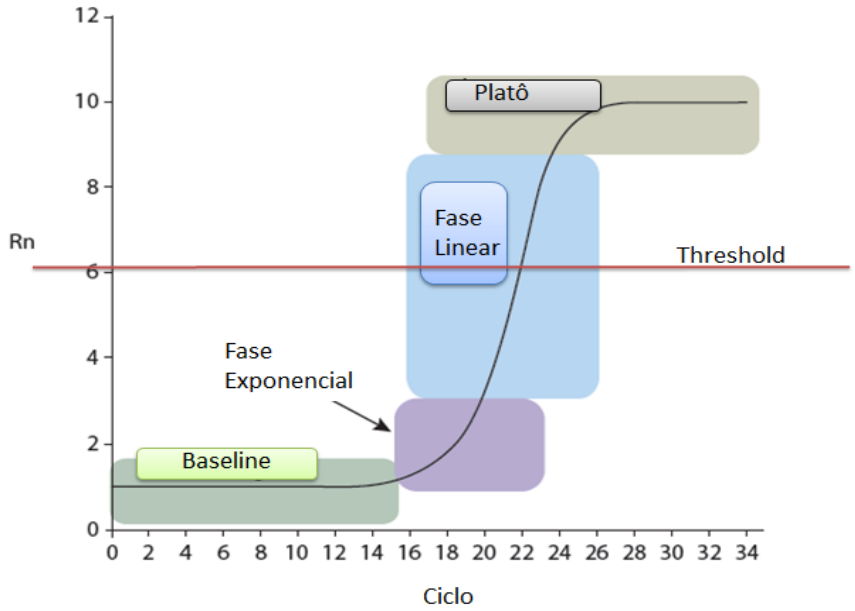


Figura 8: Esquematização de um gráfico de PCR em Tempo Real. Quatro fazes podem ser observadas: *Baseline*: representa os ciclos inicias da reação em que não há produto de PCR suficiente para emitir fluorescência. Fase exponencial: quando o produto da PCR aumenta exponencialmente. Fase linear: a fase linear é caracterizada por um aumento linear no produto de PCR até que os regentes se tornem limitados. Platô: ocorre quando os reagentes são consumidos não há mais aumento no produto de PCR. Treshold: linha limite que determina o ciclo da PCR Ct. (Adaptado de Barros et al, 2008).

A quantificação pode ser realizada por comparação direta dos valores de fluorescência detectada no Ct (método ΔCt), ou por comparação do número de cópias utilizando-se uma curva padrão (método da curva padrão) (HEID et al, 2011).

2.5.1 SISTEMAS DE DETECÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL

A chave para a PCR em tempo real é a capacidade de controlar o progresso da amplificação do DNA, em tempo real. E isto só é possível através de substâncias químicas e

instrumentação. Geralmente, os sistemas de detecção são corantes especiais ou sondas (Figura 9) (MARK A. VALASEK1; JOYCE J. REPA, 2005).

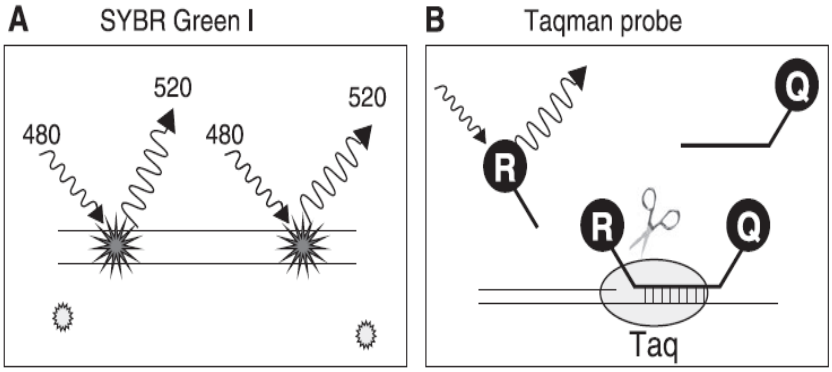


Figura 9: Esquema A: absorção e emissão do fluoróforos SYBR Green ligado superficialmente à molécula de DNA. Esquema B: hibridização da sonda com o alvo e hidrólise do fluoróforo*repoter*(VALASEK; REPA, 2005).

O SYBR Green é um fluoróforo que se liga ao sulco menor da dupla-hélice de DNA emitindo maior fluorescência do que quando está em solução (REISCHL et al, 2002). Portanto, quanto maior a quantidade de DNA-duplafita presente na reação, maior a quantidade de SYBR Green ligado ao DNA e também maior a emissão de fluorescência. Assim, qualquer amplificação de DNA é traduzida em um sinal fluorescente. Por isso, este sistema de detecção é considerado menos específico quando comparado a sistemas de detecção tipo sonda. Para contornar esta limitação, é necessário a adição de uma etapa extra na reação conhecida, como curva de dissociação ou *Melting Curve* (REISCHL et al, 2002).

Após o término da reação de PCR o produto amplificado é submetido a um aumento gradual de temperatura, fazendo com que as moléculas de DNA se desnaturem gradativamente. Como a ligação de hidrogênio entre a guanina e a citosina é mais forte do que a ligação entre a adenina e timina, as regiões do produto (*amplicon*) ricas em guanina e citosina resistem mais tempo ligadas com o aumento da energia térmica. Como parte da molécula ainda está ligada, um sinal fluorescente ainda é emitido, e este sinal luminoso mais fraco é detectado pelo equipamento de qPCR. Então, a diminuição da fluorescência é plotada (como slope negativo) versus à temperatura, o que resulta em um pico acentuado de fusão (*meltingtemperature*, Tm) para cada produto de PCR (Figura 10).

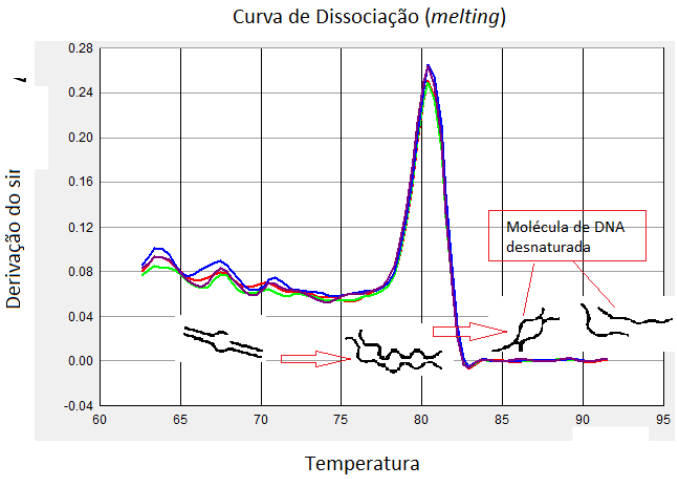


Figura 10: Gráfico da curva de dissociação demonstrando o DNA dupla-fita submetido ao aumento de temperatura, gerando a Tm.

Através da curva de dissociação, é possível descriminar com alta sensibilidade todos os produtos amplificados durante a reação, ou seja, qualquer amplificação inespecífica. Através da curva de dissociação, é possível verificar também a qualidade dos primers, a concentração do DNA molde e a temperatura de anelamento ideais para a condução da reação. (VALASEK; REPA, 2005).

As sondas do tipo TaqMan possuem maior especificidade, pois o seu sinal fluorescente só é emitido quando ela está pareada na parte central da região alvo delimitada pelos primers (Figura 11). As sondas são marcadas quimicamente nas extremidades 5'-3'em uma extremidade a sonda é marcada com um composto com efeito *quenchere* em outra com efeito *repórter* (VALASEK; REPA, 2005). Quando esses compostos estão próximos, ligados na sonda, o *quencher* através da transferência de energia por ressonância, reduz grandemente a emissão fluorescente do *repórter*. Se a sequência alvo está presente, a sonda se hibridiza na região central delimitada pelos primers (Figura 12).

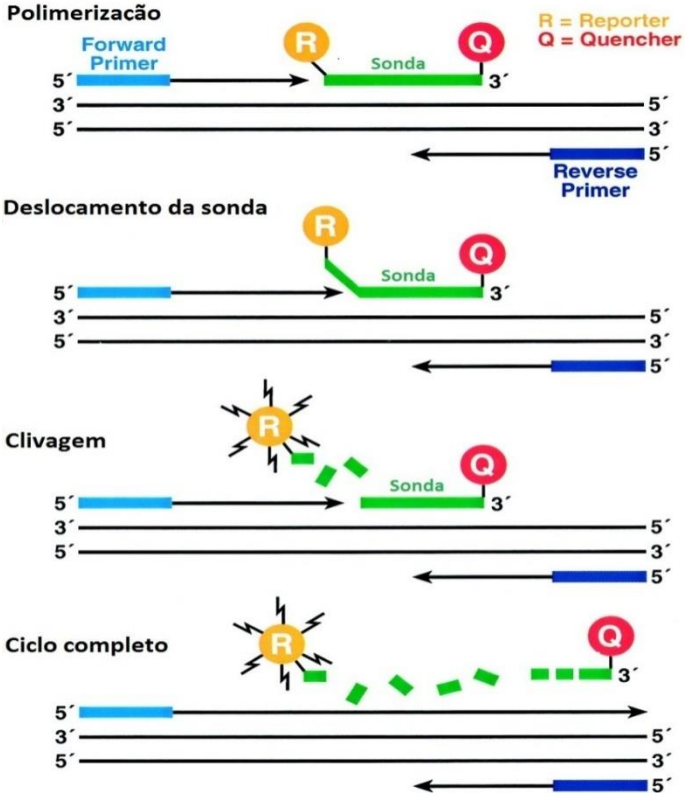


Figura 11: Esquematização da função 5’ exonucleásica da *Taq polimerase*. (Adaptado de Yuan et al 2000).

Ao reconhecer os primers, a DNA polimerase inicia a extensão da molécula, acrescentando os nucleotídeos trifosfatados, mas ao perceber a presença da sonda a sua frente à enzima ativa a sua função 5’ exonucleásica e cliva a sonda separando os corantes *quencher*e *repórter* possibilitando assim o *repoter* emitir a sua fluorescência (BROEDERS ET AL, 2014).

A cada ciclo da reação, as moléculas de corante *reporter* adicionais são clivadas a partir de suas respectivas sondas, o que resulta em um aumento na intensidade de fluorescência proporcional à quantidade de *amplicon* produzido (BROEDERS ET AL, 2014).

2.6. BIOINFORMÁTICA

A bioinformática é uma área multidisciplinar que utiliza abordagens computacionais para responder questões biológicas (BAXEVANIS, 2001). Ela é a combinação de tecnologias de informática, estatística e conhecimento biológico correlacionado ao DNA, RNA e proteínas. Nas últimas três décadas ocorreu uma revolução nas tecnologias de sequenciamento de DNA e RNA permitindo assim, um aumento quase que exponencial, na quantidade de sequências de DNA de inúmeras espécies, que são depositadas em bancos de genomas como o Genebank do

National Center for Biotechnology Information – NCBI (BAXEVANIS, 2001; WASHIETL; HOFACKER, 2010). Como exemplo deste avanço podemos citar o Projeto Genoma Humano, que sequenciou e disponibilizou todos os cromossomos da espécie humana.

Assim como nos estudos experimentais com camundongo onde os modelos animais tentam mimetizar o modelo humano com o objetivo de estudar doenças, caracterizar vias bioquímicas, etc., a bioinformática tem como objetivo geral a comparação de sequencias de DNA, RNA e proteína (WASHIETL; HOFACKER, 2010). A comparação é importante devido aos domínios conservados entre as espécies. Se qualquer sequência de DNA ou proteína é encontrada de maneira conservada em diferentes espécies, isso significa que ela tem importância biológica, seguindo o raciocínio da evolução de Charles Darwin (1809-1882) (He, 2015). Somente após a presença de ferramentas de bioinformática foi possível avançar rapidamente nos estudos de população, filogenia, doenças genéticas, transgenia, clonagens, etc

O GenBank, banco de dados de sequências genéticas do National Institutes of Health (NIH), é uma coleção anotada de todas as sequências de nucleotídeos e proteínas publicamente disponíveis. Os registros dentro do GenBank representam, na maioria dos casos, trechos simples e contíguos de DNA ou RNA com anotações (KARSCH-MIZRACHI; OUELLETTE, 2001). Os arquivos do GenBank são agrupados em divisões; algumas dessas divisões são baseadas em filogenia, enquanto outras são baseadas na abordagem técnica usada para gerar as informações da sequência (KARSCH-MIZRACHI; OUELLETTE, 2001). Este banco de genomas, foi construído pelo NCBI, e faz parte da Colaboração Internacional de Banco de Dados de Sequência de Nucleotídeos, junto com seus dois parceiros, o DNA Data Bank ofJapan (DDBJ, Mishima, Japan), a European Molecular Biology Laboratory (EMBL), e o European Bioinformatics Institute (EBI, Hinxton, UK) (KARSCH-MIZRACHI; OUELLETTE, 2001).

Uma das principais ferramentas de comparação múltipla de sequencias é o Basic Local AlignmentSearch Tool – BLAST que foi desenvolvida em 1997 by S. Altschul (MADDEN, 2013). O BLAST é um software que pode funcionar de forma online ou não, que busca regiões curtas onde ocorra similaridade entre pares de sequências. Ele também identifica sequências que têm alta similaridade em determinadas regiões, mas podem ter pouca similaridade no todo de sua extensão. O BLAST utiliza um modelo matemático heurístico. Este modelo produz resultados rapidamente por estimar previamente quantas sequências correspondem com a sequência molde em uma determinada pontuação ao acaso. Desta maneira ele já exclui as sequências que matematicamente são diferentes (MADDEN, 2013).

Existem várias variações do método Blast, três dos quais são: megablast, discontiguous megablast e blastn. O megablast (para comparação de sequências, intra-espécies) padrão é

melhor para determinadas tarefas, como identificar a consulta de entrada e pesquisar com grandes consulta genômica. O discontiguous megablast é utilizado para comparação entre espécies diferentes, funciona melhor em encontrar sequências relacionadas com outros organismos; enquanto blastn (para pesquisar sequencias mais curtas de DNA, comparação entre espécies) funciona melhor para consultas curtas de entrada e para identificar correspondências curtas, também funciona melhor para buscas entre espécies do que megablast (NCBI, 2019).

Em nosso estudo prévio (Ferreira et al, 2016), identificamos três genes que apresentaram especificidade satisfatória para cevada, milho e arroz. Neste presente tabalho de tese o objetivo foi avaliar estas sequências atravéz das ferramentas de bioinformática e desenvolver sondas do tipo TaqMan. Além disso, buscar sequências de DNA que possam ser utilizadas para a discriminação das espécies de café, *C. arabica* e *C. canephora*, e detecção da principal praga do café, a broca *H. hampei*.

3. JUSTIFICATIVA

Com base na importância do café para a economia brasileira e do cenário atual de irregularidades na indústria cafeeira, incluindo adulterações e falsas alegações em rotulagem, frequentes no mercado nacional, junto à falta de sensibilidade e, principalmente, a especificidade da maioria das técnicas atualmente empregadas para a avaliação da qualidade e autenticidade do café, justifica-se a aplicação de uma ferramenta molecular como a técnica PCR em tempo real para o desenvolvimento de métodos para tal finalidade. Dessa forma, essa abordagem metodológica será mais uma alternativa eficaz para utilização por parte de órgãos de fiscalização da indústria e do governo como ANVISA e a ABIC.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e determinar parâmetros de desempenho de métodos moleculares baseados na técnica de PCR em Tempo Real para a identificação de cereais e broca de cafe, bem como para determinação dos teores das espécies *C. arabica* e *C. canephora* nesses blends.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir os marcadores moleculares (genes endógenos) e desenhar as ferramentas de detecção (primers e sondas do tipo TaqMan) das sequências de DNA específicas dos agentes biológicos usando ferramentas de bioinformática;

- Obter curvas padrão para determinação do Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ), além da linearidade do método de arroz cevada e milho;

Os resultados do presente trabalho serão apresentados na forma de três capítulos:

Capítulo 1 – Desenvolvimento de sistema de detecção por sondas (taqman) para os principais possíveis adulterantes (arroz, cevada e milho) do café.

Capítulo 2 – Diferenciação das espécies *C. arabica* e *C. canephora*.

Capítulo 3 – Desenvolvimento de método de detecção para a broca do café, *Hypothenemus hampei*.

CAPÍTULO 4: CONSIDERAÇÕES FINAIS

CAPÍTULO 1 – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DETECÇÃO PARA OS ADULTERANTES (ARROZ, CEVADA E MILHO) DO CAFÉ.

INTRODUÇÃO.

O café é o produto alimentício mais consumido no mundo, sendo o Brasil o maior produtor desta *comodity*. Além disso, o Brasil também é um grande produtor de cereais como arroz, cevada e milho. Como a demanda por café tem crescido tanto Brasil quanto no mundo este cenário poderia estimular adição destes cereais mais baratos quando comparados ao café, no mercado brasileiro (CONAB, 2019).

Consequentemente a prática de adulteração, muitos métodos utilizando diferentes técnicas, foram desenvolvidos para estabelecer parâmetros e marcadores com o objetivo de identificar adulterantes em café torrado moído e café solúvel (REIS; FRANCA; OLIVEIRA, 2013; ASSAD et al, 2002; NOGUEIRA; LAGO,2009; JHAM et al, 2007). No entanto,esses métodos contam com a experiência do analista e, portanto, são subjetivos e passivos ao erro humano como também, não permitem a identificação de constituintes em misturas de vários adulterantes.

Em estudo prévio, foram desenvolvidos métodos de detecção de adulterantes em café através do sistema Sybr green (FERREIRA et al, 2016). Embora este sistema de detecção seja mais acessível financeiramente, ele é menos específico e demanda mais tempo, por adicionar uma etapa extra à análise (a curva de dissociação) quando comparado com o sistema de detecção por sondas TaqMan.

Neste capítulo será abordado o desenvolvimento de sistemas detecção com sondas TaqMan para arroz, cevada e milho.

MATERIAL E METODOS.

Origem das amostras: Amostras cruas de café *C. arabica* e *C. Canephora* foram obtidas diretamente de produtores dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo. Amostras *in natura* de cevada (*Hordeumvulgare*), milho não geneticamente modificado (*Zea mayz*), arroz agulhinha (*Oryza sativa*), soja (*Glicine max*), trigo (*Triticum aestivum*), centeio (*Secale cereale*) e chicória (*Cichorium intybus*) foram adquiridas no mercado livre de Santa Cruz, Rio de Janeiro. Amostras de açaí (*Euterpe oleracea*) foram cedidas pela EMBRAPA – AMAPÁ.

Extração de DNA: Para o isolamento e purificação do DNA das amostras de café, cevada, milho, arroz e trigo, as mesmas foram acondicionadas em tubo Eppendorf de 1,5 mL (estéril) e pesadas, em duplicata, em balança analítica (Bioprecisa FA-2104N, Brasil) até alcançarem 100mg. Em seguida, foram adicionados 1.000 µL do tampão CTAB (1.4 M NaCl, 20g/L CTAB, 0.1 M Tris-HCl, 20mM Na2EDTA, pH 8.0); e 20 µL de proteinase K (20 mg/mL) (Life Technologies; São Paulo, Brasil), sendo homogeneizados a posteriori e incubados em banho aquecido a 65 ºC por 1:30 h, com agitação para homogeneização a cada 30 min. Após esta etapa, foram adicionados 20 µL de RNAse (10mg/mL) (Life Technologies; São Paulo, Brasil) e incubados em temperatura ambiente por 15 min, seguidos de centrifugação por 10 min a 17,950 x g (EppendorfCentrifuge 5417R, Eppendorf, Alemanha). Um volume de 500 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 500 µL de clorofórmio absoluto, homogeneizado e centrifugado por 10 min a 17,950 x g. Quinhentos microlitros da fase aquosa foram transferidos para um novo tubo de 1,5 mL e foram adicionados 2 volumes do tampão de precipitação CTAB (5g/L CTAB; 0,04M NaCl), sendo incubado por 1:30 h em temperatura ambiente. Logo em seguida, a solução foi centrifugada a 17,950 x g por 10 min e o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido com 350 µL de NaCl 1,2M. Foi adicionado 350 µL de clorofórmio, agitado em vórtex (Vixar KMC -1300V, Brasil) e centrifugado por mais 10 min a 17,950 x g. O filme superior foi transferido para um novo tubo e adicionado igual volume de isopropanol e incubado a -20ºC por 24h. O precipitado foi centrifugado por 10 min 17,950 x g, lavado com etanol 70% e posto para secagem em fluxo laminar. Logo após a secagem, as amostras foram resuspensas em água deionizada tipo Milli-Q. Todas as reações foram realizadas em triplicatas.

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

Análise de bioinformática e desenvolvimeto dos primers: Com objetivo de encontrar sequencias de DNA que possam ser utilizadas para o desenho de primers específicos para cevada e milho, foram feitas buscas no banco de nucleotídeos do Genbank para sequencias de RNAm de cevada (*Hordeum vulgare*) e milho (*Zea mays*), retornando 860892 e 2247055 sequencias, respectivamente. Destas, 430 e 150 sequências, respectivamente foram submetidas a análise

por BLAST (na modalidade MEGABLAST) contra todo o banco de nucleotídeos do Genbank (excluindo sequencias humanas e de camundongo). Sequências que não haviam semelhança com outras espécies além da original foram novamente submetidos ao BLAST na modalidade MORE DISSIMILAR SEQUENCE. Em seguida, sequências que não apresentavam semelhanças na etapa anterior, foram novamente submetidas ao BLAST na modalidade BLAST-TN. Ao final desta análise, foram selecionadas sequencias que apresentavam pouca ou nenhuma semelhança com outras espécies. Estas foram editadas no bloco de notas (Microsoft), para a retirada das pequenas de regiões homologas ou similares a regiões de DNA de outras espécies. Regiões de repetição nas sequências selecionadas foram mascaradas pelo programa ReaptMasker. Por fim, as sequências selecionadas e mascaradas foram comparadas com sequências da tribo de café Coffeeae e também com o genoma completo de C. Canephora no Coffee Genome Hub (CGH).

Em relação ao arroz, a sequencia NM_001049010.2, utilizada em Ferreira et al. (2016) para desenvolver um sistema de detecção de arroz em café por sistema Sybr Green, foi submetida à análise supracitada para confirmar a especificidade da mesma. As sequencias selecionadas para as três espécies foram utilizadas para o subsequente desenho de sistema Taqman.

Desenho dos primers e sondas taqman: Pares de primers (Tabela 1) foram desenhados pelo software online Prime3Plus (ROZEN; SKALETSKY, 2000) para produzir *amplicons* (quantidade de pares de bases) entre 60 a 90 pares de bases (pb), com temperatura de fusão (Tm) entre 60 e 64 ° C, com conteúdo de guanina e citosina em torno de 50%. A análise de PCR *in silico* foi realizada utilizando o iPCR (ARTIMO et al. 2012).

PCR em tempo real: As reações de amplificação foram preparadas em câmara de fluxo laminar. A reação foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 1X Taqman PCR Master Mix (Promega, USA), 50 ng de DNA e 240 nM de cada primer, e 200 nM de sonda. As reações foram realizadas no termociclador Abi 7500 (AppliedBiosystems, USA). As condições térmicas da reação foram: 10 min. a 95 C, 45 ciclos de 15 s a 95 Ce 1 min. na temperatura de anelamento (Tm) de cada par de primers.

Sensibilidade e linearidade: Para a construção da curva padrão, foram feitas diluições seriadas com 8 pontos, com concentrações de DNA de 50 ng diluídos dez vezes em água ultrapura (Milli-Q). Os valores dos Ct's médios foram utilizados para formar a inclinação e o coeficiente de correlação da reta.

A eficiência foi calculada através da equação:

Eficiência = ((10^(-1/slope))-1) * 100

Slope = y da equação de correlação da reta.

Baseado na curva padrão, foram utilizados os últimos pontos das curvas para a definição dos limites de detecção (LD), a concentração do último ponto foi multiplicada por três para determinar o limite de quantificação (LQ) (JOINT RESEARCH CENTRE; 2006; CANKAR et al., 2006).

Os limites de quantificação foram calculados a partir da fórmula CtLOQ = CtLOD – 2 (σCtLOD), onde o CtLOQ e o CtLOD, são os Cts relacionados aos limites de quantificação e detecção respectivamente, e σCtLOD é o desvio padrão referente ao limite de detecção do método.

Para melhor compreensão das etapas das análises observe a Figura 12.

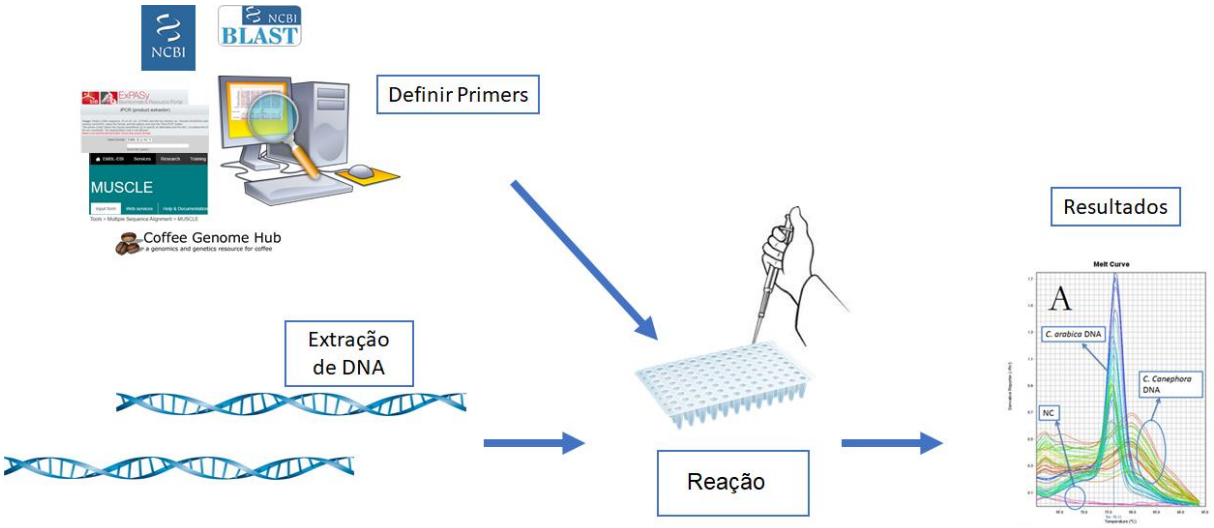


Figura 12: Fluxograma das etapas das análises.

RESULTADOS

Extração e qualidade do DNA: Foi possível extrair e isolar o DNA de todas as mostras, porem as amostras de café obtiveram menor rendimento (24,85 ng/µL ± 3,55 ng/µL) em comparação aos adulterantes (42 ng/µL ± 6,55 ng/µL). Os isolados de DNA, obtiveram valores da razão 260/230 e 260/280 nm de 1,9 ± 2,1 e 1,7 ± 1,3, respectivamente. Estes valores estão dentro dos limites estabelecidos na literatura (WAGNER et al, 1987; ZIRMMERMANN et al, 1998).

Resultados in silico: As 430 e 150 análises realizadas identificaram as sequências AB016121.1 e NM_001112418.1 como sendo seletivas para cevada e milho, respectivamente. A sequência de cevada apresentou seletividade através do BAST-TN como é apresentado na figura 13. Apenas duas pequenas regiões foram similares a outras espécies.

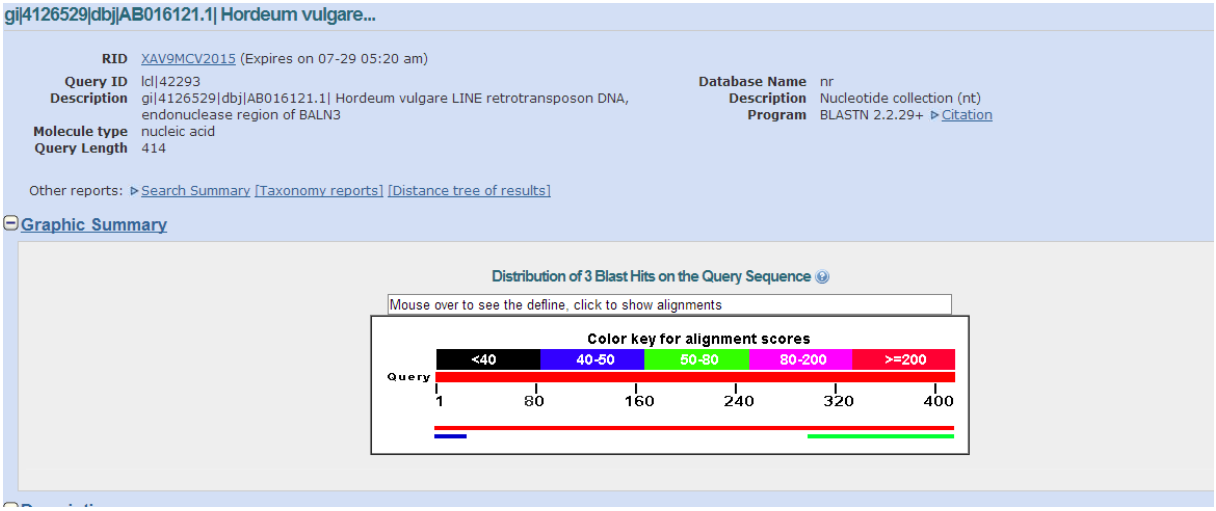


Figura 13: Análise de seletividade da sequência de DNA de cevada (AB016121.1) através do programa BLAST-TN. A sequência apresentou pequenas regiões de similaridade (linhas verde e azul com comprimento de~40 a 80 pb, respectivamente).

Já a sequência de milho, apresentou similaridade com dois organismos: *Acetabularia mediterrânea* e *Neriene emphana* com query cover de 92 e 23%, evalor de identidade de 80 e 92%, respectivamente (Figura 14).

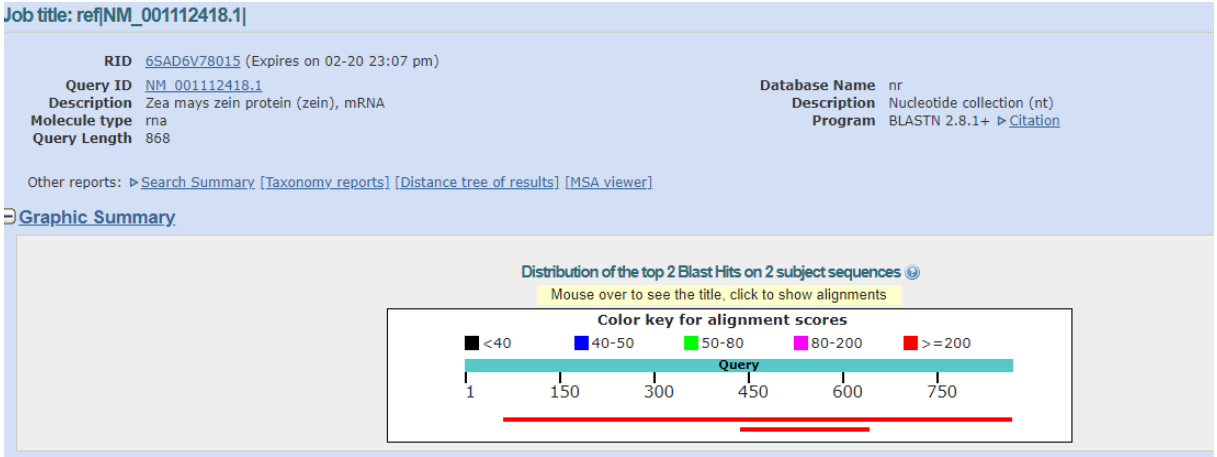


Figura 14: Análise de seletividade da sequência de DNA de milho (NM_001112418.1) através do programa BLAST-TN. Dois organismos (*Acetabularia mediterranea*e, *Nerieneemphana*) apresentaram similaridade com a sequência de milho o com query cover de 92 e 23%, com identidade de 80 e 92%, respectivamente.

Contudo, quando a análise do BLAST foi configurada para analisar sequências da tribo Coffeeae, não ocorrem nenhuma similaridade com as sequências de cevada e milho (Figura 15 e 16).

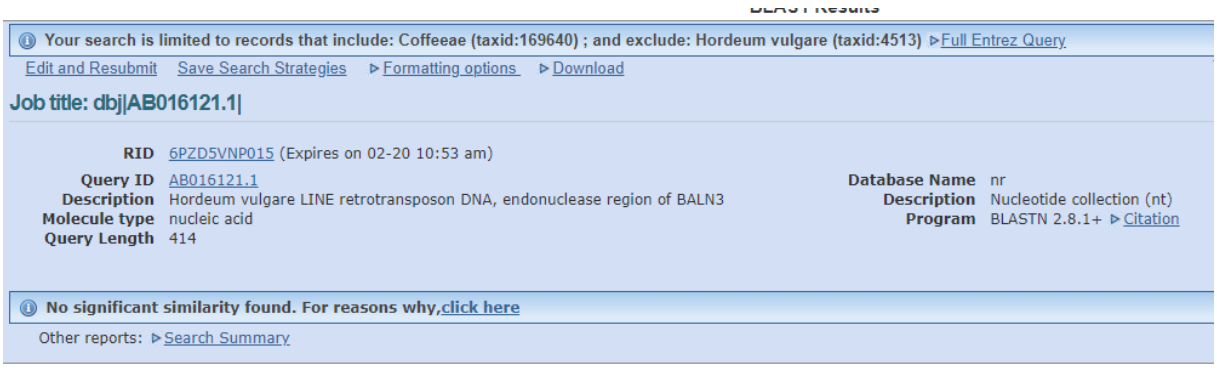


Figura 15: Análise de seletividade entre as sequências de DNA de cevada e as sequências da tribo Coffeeaea través do programa BLAST-TN. Não foi possível encontrar nenhuma região de similaridade entre a sequência de cevada e as sequências da tribo Coffeeae.

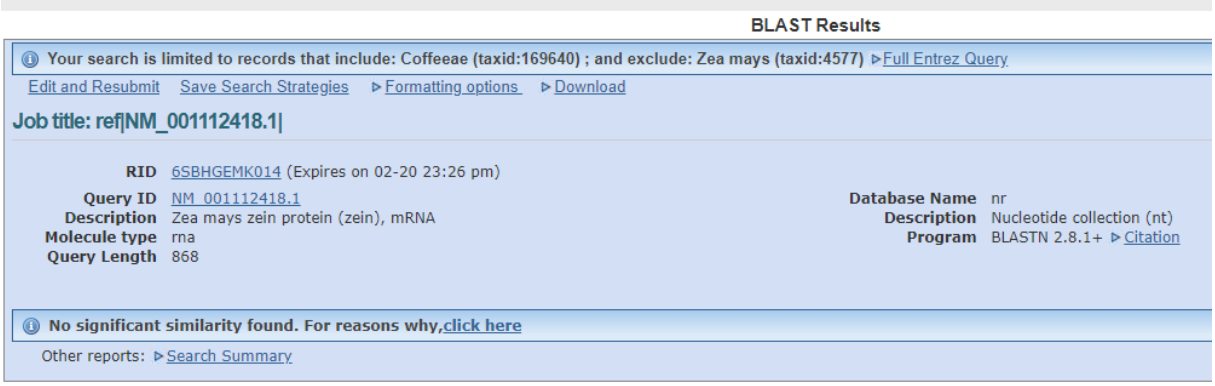


Figura 16: Análise de seletividade entre a sequência de DNA de milho (NM_001112418.1) e as sequências da tribo de café Coffeeae. Nenhuma região de similaridade entre a sequência de milho e as sequências da tribo Coffeeae foi encontrada.

Análises adicionais foram realizadas no CGH para verificar se as duas sequências também foram seletivas quando comparadas ao banco de genes de café *C. canephora*. Como o esperado ambas as sequências foram 100% seletivas no Blast do CGH (Figura 17 e 18).

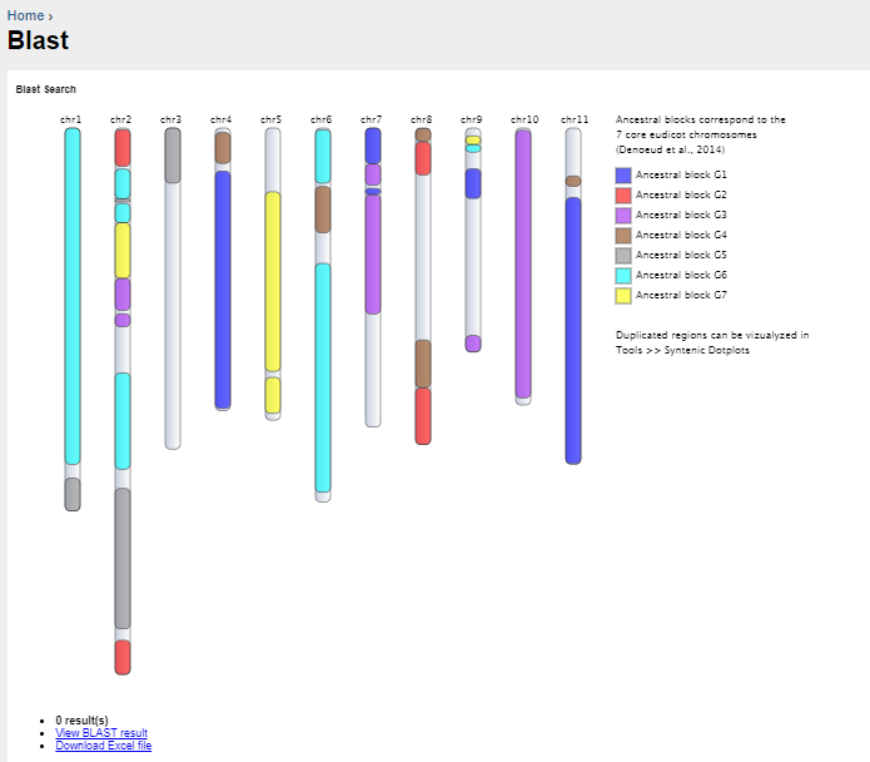


Figura 17: Análise de especificidade com o programa Blast do CGH com a sequência de DNA de cevada (AB016121.1). O programa não encontrou nenhuma região similar a sequência de cevada

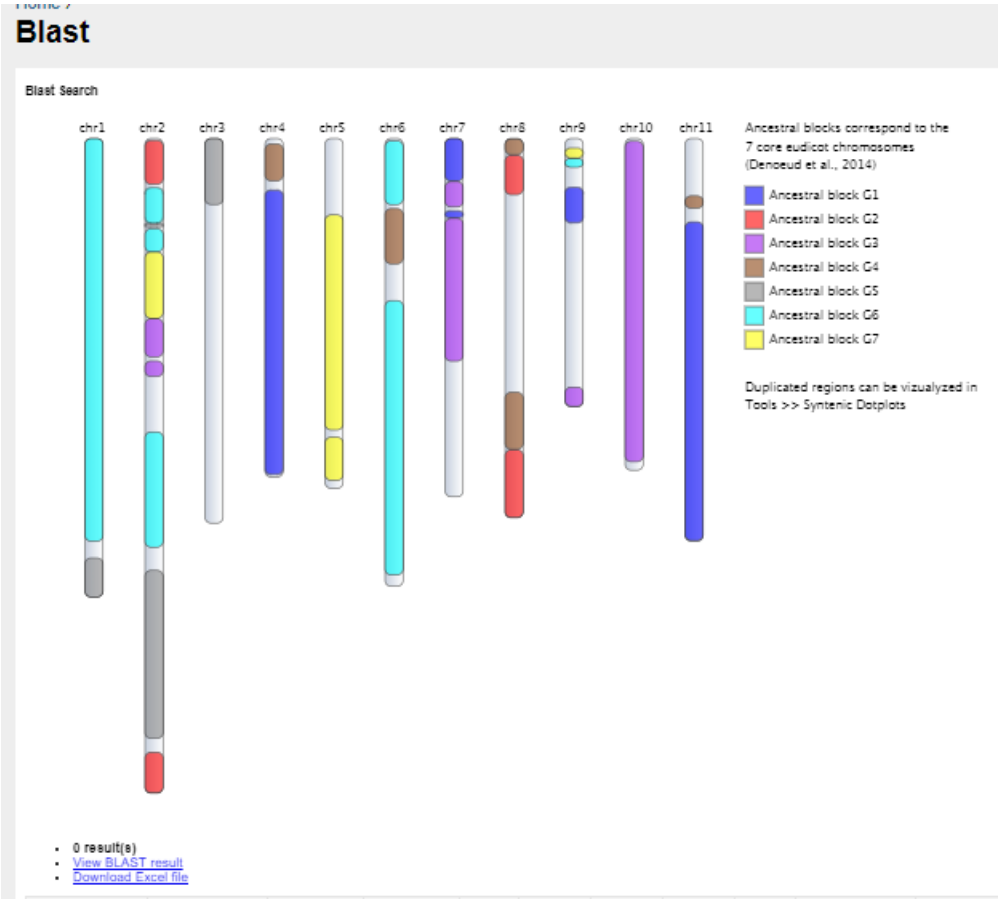


Figura 18: Análise de seletividade da sequência de DNA de milho (NM_001112418.1) com o Blast do CGH com. O programa não encontrou nenhuma região similar a sequência de milho.

Com as sequências selecionadas de cevada e milho foi possível desenhar primers e sondas dentro dos padrões desejáveis (Tabela 2).

Tabela 2: Primers e sondas para detecção de cevada e milho.

	Hordeumvulgare				
	Sequência	<-->	TmºC	GC%	Amplicon
BALN3plus	F-CGGCCACTTCCAGGATTTCT	20 pb	57,4	55,0	71 pb
	R-GCTGCCACGCAATAAGAATG	20 pb	54,9	50,0	
	S-CTTCCTCCCCACGAACGACACTC	25 pb	65,0	60,9	
	Zeamays				
ZEIN	F-CATCCTTATGCTCCTTGCTCTT	22 pb	59,9	45	87 pb
	R-AAGCTCCTATAGCTGCCCTTCT	22 pb	60,0	50	
	S-GTGTTCTGGACGCGACCATTTTTC	24 pb	67,9	50	

Pb: pares de bases. GC%: quantidade em percentual de guanina e citosina. Tm: temperatura de anelamento. Amplicon: comprimento em pares de base do produto da amplificação.<-->: comprimento dos primers e sondas.

Ferreira et al. (2016) desenvolveram um sistema de detecção de arroz em café com intercalante de DNA SybrGreen. A sequência NM_001049010.2 (*Oryza sativa*- arroz) foi utilizada para o desenho dos primers. Contudo, análises de especificidade com ferramentas de bioinformática não haviam sido realizadas. Através das análises descritas neste trabalho, foram identificadas regiões de similaridade entre a sequência NM_001049010.2 e alguns genes do banco de genes do NCBI. Contudo, é comum que sequências longas DNA tenham regiões similares com outras espécies (Figura 19).

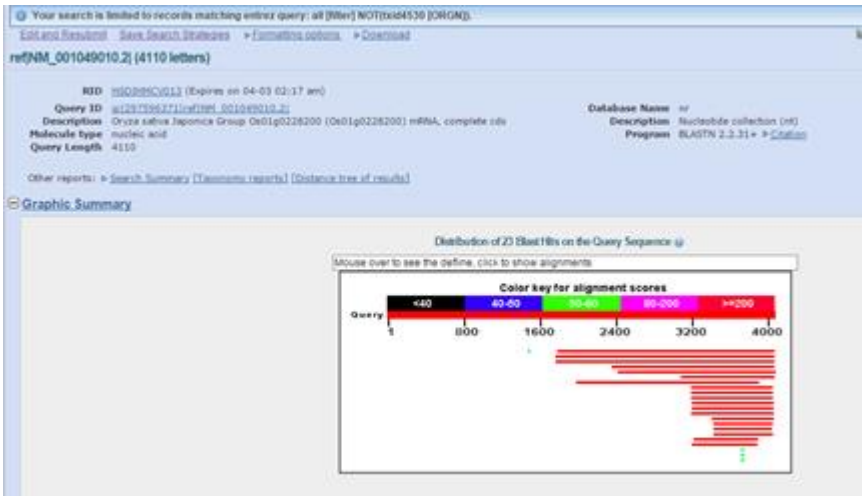


Figura 19: Análise de seletividade da sequência de DNA de arroz (NM_001049010.2) através do programa BLAST, modalidade MEGABLAST. As linhas vermelhas representam sequências com regiões similares a sequência de arroz, com comprimento maior que 200 pb.

Subsequentemente esta sequência foi analisada através do programa ReaptMasker com o objetivo de mascar as regiões de repetições indiscriminadas (Figura 20). Estas regiões apresentam baixa complexidade e dificultam o desenho do primers (BROOKMAN-AMISSAH et al, 2015)

```
>gi|297596371|ref|NM_001049010.2| Oryza sativa

ATGGAGTATCTTCACCATGAGCATTATGAGATTGTCCAGCACTGTGACCA
GAAGCCTAGTAATGTGCTATTTGACGAGGAAACGACGGTGCATGTGGCGG
ACTTTGGCATCGCAAAGCTGCTGCTGGGTGATGACACCTCCAAGATCACC
AATCACGGCAAGCATGCCCACCAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNAGGGAAGCTTGGCGGCAGGATGGCGCAGCG
TATGGGAAGGCGGCGAATCTGGCGCAGCGCCACGGGAAGGCGGCGGCGAA
GGCTGCGGCGAGGCAGCTCCTGTACAACGCACGGGCAAGCGAGCAGCGAG
CAGCATGGTGCGGCAAGCCGGCAATAGCGACGCACGGCGAGCAGCTCGTC
CACAAAGACAAACAATGCCATGTCTCTTCACTGGAAAGCGACCTACGGAT
CGATCGTTTGTTCGTTGGAGAAGTGACCATTAGGCAGTGGGTCAATCAAG
CATTTTCGGCGAAGCTTGTTCATGTTCTGGACGACAAGCTACAGCTAGAT
GAGTCCTCTATCGAAGACCTGAATCACCTTCTTTTGCCAATATTTGAGGT
TGGTTTGCTCTGCTCAAGTGACTCGCCTGACCAGAGGATGTCAATGGCCG
ATGTGGTGGTGACACCGAAGAAGATTAGAAAGGATTATGAAAAAAATTGG
CATTATATTAGAGGATGTCAAATTGTCAATGGCCGATGTTGTGCCAATGA
AGGCTGTTTACCAGCAGTCCTGCACACGGCGGAGTTGTTGATCATCTCGC
TGACAGTGACAGCCCTTGCAGCAGGTGCCTCTTCTTCTCCATCTCCATCC
ATCAACAGCAGCAGCGGCGGCGGCGCCGCAGCCGACCTCGCGGCGCTGCT
GGCTTTCAAGGCCCAGCTCGCCGATCCTCTCGGCGTCCTCGCCGGCAGCT
GGACGACCAACGTCTCCTTCTGCAACTGGGTCGGCGTCTCCTNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNT
CGGAGGGGAGCTCACCGCCCACCTCGGTAACCTCTCATTCCTCTACACCC
TCGACCTCACCAACACCAGCCTCGTCGGCCCCGTCCCCGCCGACCTCGGC
AGGCTACGCCGGCTACGGAGTCTCCTCCTCGGCGACAACCTGCTATCGGC
TGCCATCCCACCCGCCATAGCCAACCTCACGATGCTCGAGCTCCTTCACC
TGGGCAACAACAACCTCTCCGGGGAGATCCCGCCCGACCTGCTGCACGGC
ATGCGCCGCCTCTCGAGGATCGCTCTGCACATGAACCAGCTGACCGGAGA
CCTGCCGCCGCTTCTGTTCAACGGCACGCCCTCGCTGACGTTCGTCAACC
TCGGGAACAACAGCCTGACGGGCGGCGTACCGCACGGCGTGGCGTCGTCG
CCGTCGTCGCTGCCGATGCTCGAGTACCTCAACCTGCGCGGCAACCGCCT
CGCCGGCGCGGTGCCGCCGGCCGTCTACAACATGTCGAGGCTGCGAGGGT
TGGTGCTCTCGCACAACAACCTGACAGGGTGGATCCCGACGACGAGCAAC
GGGAGCTTTCACCTGCCGATGCTGCGCACGTTCTCCATCAGCTCCAACGG
CTTCGCCGGCCGGATTCCGGCAGGGCTCGCGGCATGCCGATACCTGCAAA
CCCTGTCCATTTCGTCGAATAGCTTCGTGGATGTCGTGCCGGCATGGTTG
GCTCAGCTGCCATACCTCACTGAGCTTTTCTTGGGTGGAAATCAGCTCAC
TGGCTCTATCCCTCCTGGTCTCGGCAACCTCACCGGTGTTACCTCGCTGG
ACCTCTCCTTCTGCAACCTGACCGGTGAAATTCCTTCAGAGTTAGGCCTT
ATGAGAAGTC
```

Figura 20: Análise de mascaramento da sequência de DNA de arroz (NM_001049010.2) através do programa online ReaptMasker. As regiões que apresentavam repetição indiscriminada foram marcadas com a letra N. Desta maneira, os programas de desenho de primers desprezarão estas regiões.

Após a sua edição e mascaramento a sequência NM_001049010.2 foi analisada novamente no MEGABLAST (Figura 21). Como é possível observar, o programa do BLAST não encontrou nenhuma região similar a sequência de arroz após a sua edição e mascaramento.

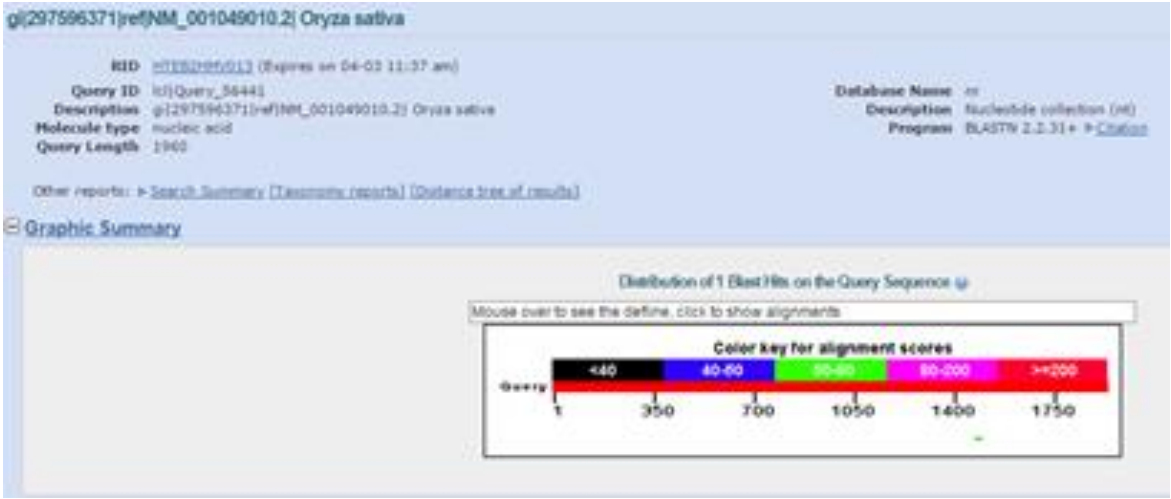


Figura 21: Análise de seletividade da sequência de DNA de arroz (NM_001049010.2) através do programa BLAST, modalidade MEGABLAST. Após a sua edição e análise de mascaramento no ReaptMasker, não foi encontrado nenhuma sequência similar através do MEGABLAST.

Quando comparado com sequências da tribo Coffeeae, a sequência de arroz mostrou pequenos pontos de similaridade (≤ 40 pb), como apresentado na Figura 22. Além disso, como o esperado, nenhuma similaridade foi observada quando a sequência de arroz (editada e mascarada) foi comparada com o genoma de café pelo BLAST do CGH (Figura 23).

Figura 22: Análise de seletividade com o programa BLAST na modalidade MEGABLASTentre a sequências de DNA de arroz (NM_001049010.2) e as sequências da tribo de café Coffeeae. A sequência de arroz apresentou pequenos pontos (≤ 40 pb) de similaridade entre a sequência de arroz com sequências de DNA da tribo de café.

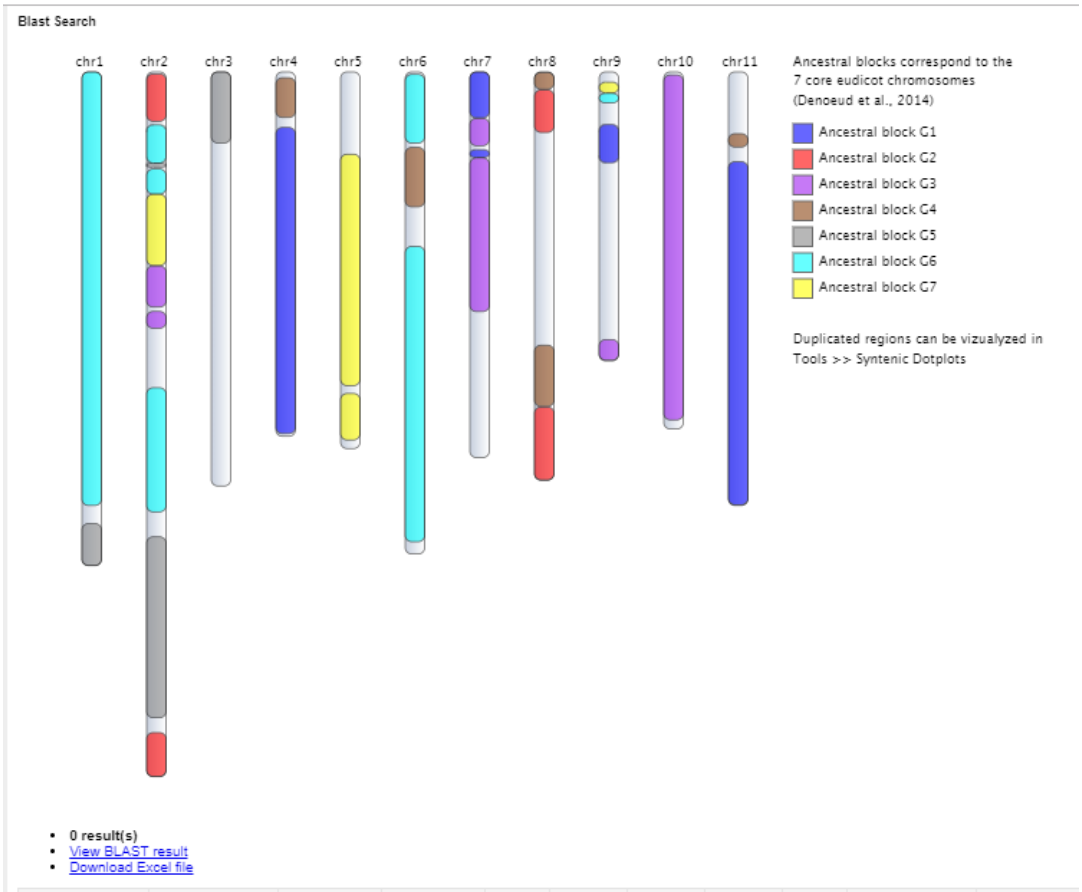


Figura 23: Análise de seletividade da sequência de DNA de arroz (NM_001049010.2) no programa Blast do CGH. O programa não encontrou nenhuma região similar a sequência de arroz. Chr: cromossomo.

Após as análises de bioinformática foi possível desenhar um sistema de detecção com sonda taqman (Tabela 1).

Tabela 1: Primers e sonda para detecção e DNA de arroz.

Oryza sativa					
	Sequência	Comprimento	TmºC	GC%	Amplicon
arroz1|P3plus	F-GGAAATCAGCTCACTGGCTCT	21 pb	60,9	52,0	100 pb
	R-AAGGAATTTCACCGGTCAGG	20 pb	61,2	50,0	
	S-AAGGAATTTCACCGGTCAGG	25 pb	66,3	56,0	

Pb: pares de bases. GC%: quantidade em percentual de guanina e citosina. Tm: temperatura de anelamento. Amplicon: comprimento em pares de base do produto da amplificação.

Análises in vitro: Com o objetivo de avaliar a especificidade dos sistemas para a detecção de arroz, cevada e milho, amostras dearroz, cevada, milho (controles positivos), centeio, orégano, chicória, aveia, trigo, soja e açaí foram analisadas. Os sistemas de detecção de arroz, cevada e milho também foram analisados com DNA genômico de café das espécies *C. arabica* e *C. canephora*.

Na Tabela 13 é apresentado a análise de especificidade do sistema de detecção de arroz. Apenas uma réplica da amostra de centeio amplificou, no entanto com Ct (43,53) muito tardio. Provavelmente, esta amplificação tenha ocorrido devido à contaminação cruzada durante a realização da reação de PCR em tempo real. O sistema de detecção de arroz com sonda TaqMan apresentou seletividade e especificidade tanto em análises *in silico* quanto *in vitro*.

Tabela 3: Análise de especificidade com o sistema TaqMan para detecção de arroz.

Amostras	RéplicasCt			Média	DP
	1	2	3		
Arroz	23,69	23,48	23,54	23,57	0,08
Café arabica	-	-	-	-	-
Café conilon	-	-	-	-	-
Centeio	-	43,53	-	-	-
Orégano	-	-	-	-	-
Chicória	-	-	-	-	-
Aveia	-	-	-	-	-
Trigo	-	-	-	-	-
Açaí	-	-	-	-	-
Cevada	-	-	-	-	-
Milho	-	-	-	-	-
CN	-	-	-	-	-

DP: desvio padrão. -: Ct indeterminado. Ct: ciclo de threshold.

A sensibilidade do sistema de detecção arroz1|P3plus foi avaliada através de diluições seriadas de DNA genômico de arroz: 50, a 0,0005 ng/µL (m/v), em decaplicata. O ponto dois da curva padrão foi removido por apresentar um desvio padrão alto (4,43). Após a retira do *outliers* o sistema obteve linearidade satisfatória (R^2 = 0,9723) (Figura 24).

Os Limites de detecção e quantificação foram de 4,0x10-^{2}ng/µL e 1,31x10^{-1}ng/µL, respectivamente. Com relação a eficiência, o sistema obteve um valor próximode 100% com slope de 3,79 (eficiência de 83%),próximo ao referencial de -3,32. (Figura 24).

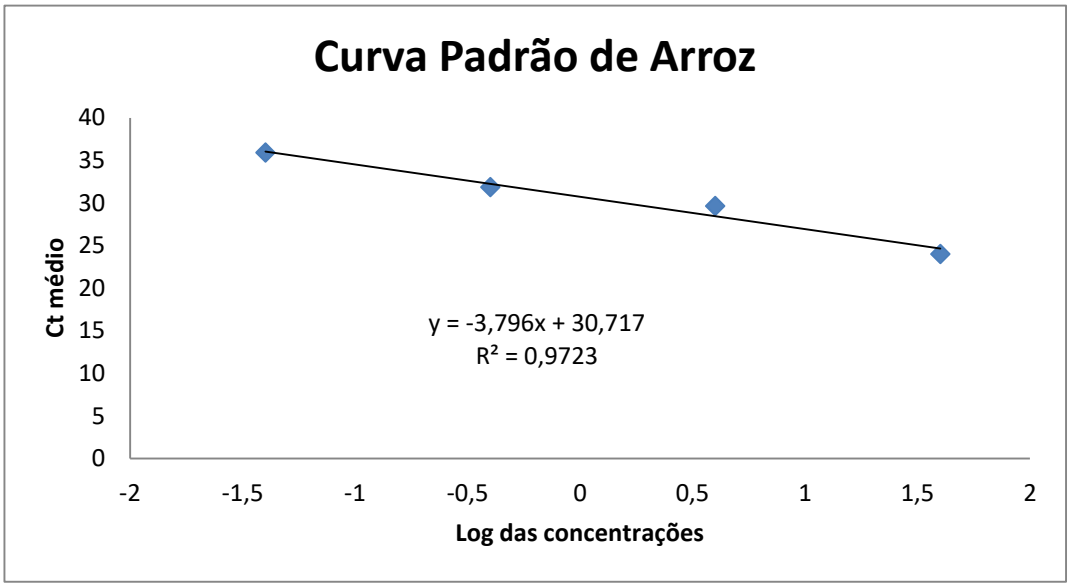


Figura 24: Curva padrão de arroz utilizado para determinação de LD/LQ.Slope: -3,796. O método obteve parâmetros de desempenhos de acordo com o preconizado na literatura.

Os sistemas de detecção para cevada e milho também apresentaram especificidade quando analisados com os DNAs não alvo como: arroz, café (*C. arabica* e *C. canephora*), centeio, orégano, chicória, aveia, trigo e açaí (Tabela 14). Com relação ao sistema BALN3 é possível observar algumas reações inespecíficas nas amostras de centeio, orégano e aveia. Contudo, centeio foi a única amostra que as três réplicas apresentaram amplificação tardia com Ct médio de 41,56±2,26 (reação com 45 ciclos).

O sistema de detecção por sondas é mais específico, por se tratar de um conjunto de três sequências que precisam se anelar de forma coordenada para a emissão do sinal. Como o produto de PCR do sistema BALN3 é menor (71 pb), isto poderia explicar à amplificação não específica. Além disso a espécie do centeio é próxima geneticamente da cevada.

Laube et al. (2010) e Fuchs et al (2012), também obtiveram resultados semelhantes no desenvolvimento de sistemas TaqMan para a certificação de origem de mel e detecção de aipo em temperos comercializados na Europa.

O tamanho do amplicom do sistema BALN3 foi propositalmente escolhido por se tratar de um sistema que será aplicado em amostras altamente processadas, como no caso do café que é torrado em altas temperaturas e posteriormente moído. Assim, estas amostras apresentam DNA de baixa qualidade (fragmentados). O amplicon menor favorece a detecção destes fragmentos e está de acordo com ALINOR do CODEX.

Tabela 4: Análise de especificidade com o sistema TaqMan para detecção de cevada e milho.

BALN3					
Amostras	RéplicasCt			Média	DP
	1	2	3		
Cevada	25,20	25,75	25,80	25,58	0,33
Café arabica	-	-	-	-	-
Café conilon	-	-	-	-	-
Centeio	38,50	42,3	43,9	41,56	2,26
Orégano	-	-	43,22	-	-
Chicória	-	-	-	-	-
Aveia	-	40,17	-	-	-
Trigo	-	-	-	-	-
Açaí	-	-	-	-	-
Arroz	-	-	-	-	-
Milho	-	-	-	-	-
CN	-	-	-	-	-
ZEIN					
Milho	20,40	20,21	20,48	20,36	0,11
Café arabica	-	-	-	-	-
Café conilon	-	-	-	-	-
Centeio	-	-	-	-	-
Orégano	-	-	-	-	-
Chicória	-	-	-	-	-
Aveia	-	-	-	-	-
Trigo	40,95	-	-	-	-
Açaí	-	-	-	-	-
Arroz	-	-	-	-	-
Cevada	-	-	-	-	-
CN	-	-	-	-	-

DP: desvio padrão. - Ct indeterminado. CN: controle negativo (água ultrapura). Ct: ciclo de threshold

Através das diluições seriadas foi possível determinar os LOD e LOQ dos sistemas BALN3 (LOD = 4,0x10^{-4}ng/µL e LOQ = 9,76x10-4 ng/µL) e ZEIN (LOD = 4,0x10^{-4}ng/µL e LOQ = 3,25x10^{-2}ng/µL).

Os coeficientes de correlação (R2) das curvas padrão decevada e milhoobtiveram valores de linearidade de 0,9944 e 0,9989 (Figura 25 e 26). Os sistemas de detecção também apresentaram eficiência (BALN3 = 91% e ZEIN = 94%) satisfatória quando comparadas com aquelas encontradas na literatura (LAUBE; FUCHS; CICHNA-MARKL; HOCHEGGER, 2012).

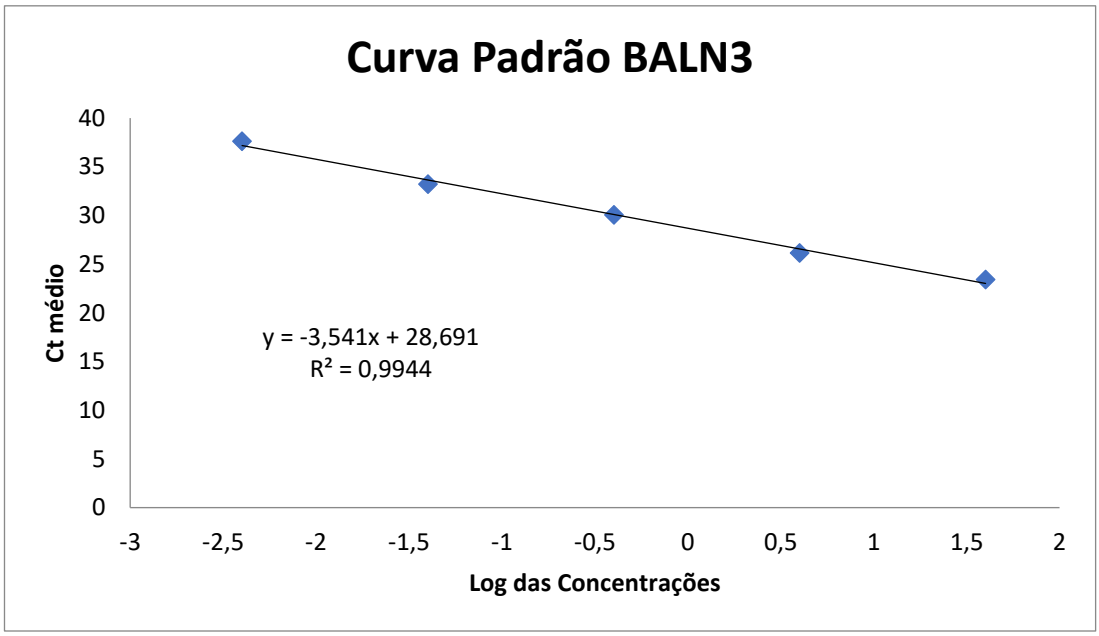


Figura 25: Curva padrão de cevada utilizado para determinação de LD/LQ.Slope: -3,5441. O método obteve parâmetros de desempenhos de acordo com o preconizado na literatura.

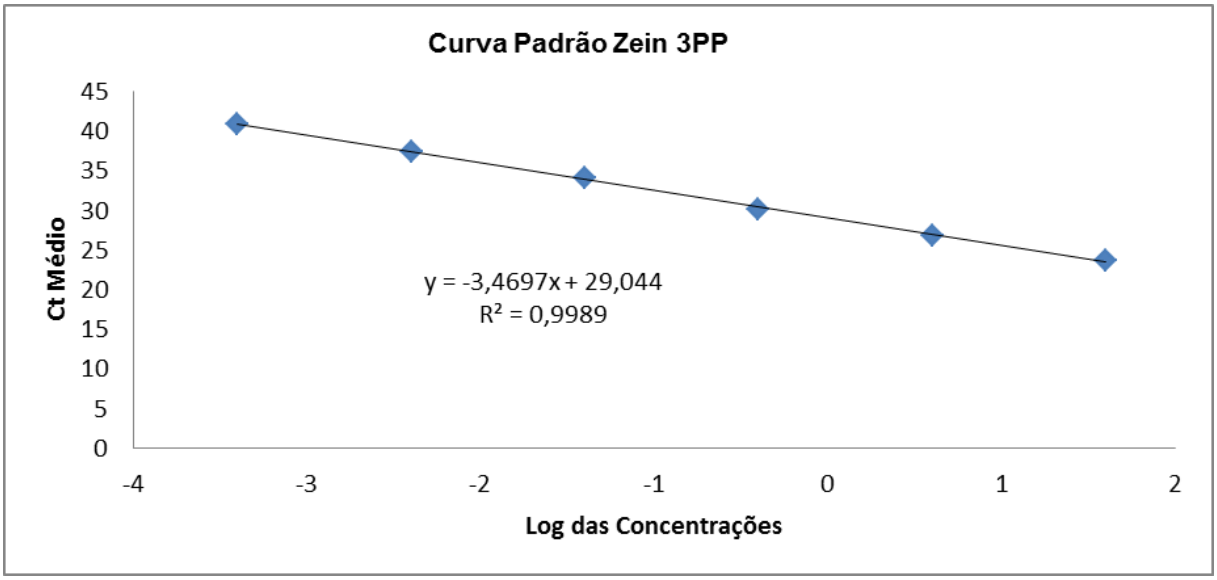


Figura 26: Curva padrão de milho utilizado para determinação de LD/LQ.Slope: -3,4697. O método obteve parâmetros de desempenhos de acordo com o preconizado na literatura.

CONCLUSÃO

As sequências NM_001049010.2, AB016121.1 e NM_001112418.1 de arroz, cevada e milho, respectivamente, que foram previamente estabelecidas apresentaram resultados satisfatórios com relação a análise da sua seletividade e especificidade. Através delas, foi possível desenvolver sistemas de detecção para arroz, cevada e milho. Os métodos apresentaram parâmetros de sensibilidade, linearidade e eficiência dentro dos limites estabelecidos na literatura.

CAPÍTULO 2 - DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES *C. ARABICA* E *C. CANEPHORA*.

INTRODUÇÃO

As principais espécies comerciais são *C. arabica* e *C. canephora* são popularmente conhecidas por seus nomes comerciais Arabica e Conilon. A *C. arabica* é mais apreciada e lidera o mercado mundial (cerca de 70%) devido ao seu rico aroma e sabor característico e, consequentemente, maior aceitação em relação a *C. canephora* (ICO, 2017). Em muitos países, as sementes de *C. canephora* são frequentemente incluídas em misturas comerciais de *C. arabica* em uma certa proporção de 20-30% no máximo, para aumentar o conteúdo de sólidos solúveis, melhorar o corpo e diminuir o custo. Quantidades mais altas podem ser usadas na produção de cafés solúvel.

As sementes de *C. arabica* que são cuidadosamente cultivadas, colhidas e beneficiadas (processadas após a colheita) tendem a atingir maior qualidade sensorial e podem ser vendidas como café do tipo gourmet, com maior valor de mercado em comparação às misturas de *C. arabica* e *C. canephora*. Para isso, eles são rotulados como "café 100% arábica". No entanto, as agências reguladoras frequentemente não monitoram a veracidade de tal alegação.

Apesar do grande volume de produção do café, o seu consumo tem aumentado a cada ano, e uma diminuição nos estoques foi observada (USDA, 2017). Esse cenário tende a estimular valores de mercado ainda mais altos e, consequentemente, a prática de diluição com sementes de menor valor econômico, incluindo a espécie *C. canephora*. Há exceções onde *C. canephora* é a principal espécie cultivada e consumida (por exemplo, Costa do Marfim, Vietnã e outros países orientais).

Até o momento, não existe um método simples para discriminar as duas espécies. Esta é uma tarefa difícil, uma vez que elas compartilham a maioria das características físicas, químicas e genéticas, o que pode ser explicado pelo fato de que a espécie *C. arabica* é uma planta alotetraplóide originada da hibridização natural entre a espécie *C. canephora* e *C. eugenioides* (LASHERMES; ANTHONY 2007). A detecção de marcadores químicos e a comparação de perfis químicos (impressões digitais) foram as abordagens propostas mais recentemente (DANKOWSKA ET AL. 2017; PACETTI ET AL. 2012; KEIDEL ET AL. 2010). Embora esses métodos tenham proporcionado resultados substanciais, eles são suscetíveis ao efeito de matriz, demorados, trabalhosos e muitas vezes dependem de equipamentos caros.

Nas últimas duas décadas, grande número de genomas foram sequenciados e disponibilizado. Embora o genoma de *C. arabica* não esteja completamente sequenciado até o momento, o genoma de *C. canephora* já foi sequenciado e está presente na base de dados do

CoffeeGenome Hub (CGH). No presente estudo, aplicamos uma nova estratégia para discriminar as espécies de café por análises de bioinformática e PCR em tempo real.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem e das amostras: Os grãos de café utilizados para análise foram: *C. arabica*, variedade Catuaí e *C. canephora*. As amostras foram adquiridas de regiões produtoras dos estados do Rio de Janeiro (*C. arabica*) e do Espírito Santo (*C. canephora*), nos municípios de Machado e Castelo, respectivamente. O local de armazenamento das amostras foi nos laboratórios de Diagnóstico Molecular e Micologia da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos. As amostras cruas foram torradas em torrador de leito fluidizado de bancada (Gene Café, Coréia) a 240º C, por 14 min para atingir grau de torrado média. As amostras utilizadas com padrão foram processadas e misturadas de acordo com Couto et al. (2017).

Extração de DNA: A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Molecular da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Para a obtenção de soluções de DNA para serem utilizadas na análise de PCR em tempo real, foram realizadas a extração e quantificação de DNA das seguintes amostras: MR P1.100A 14; MR P4.50A 25; MR P7.100A 24. A pesagem foi feita em triplicata em balança analítica (Bioprecisa, modelo FA-2104N, Brasil), para ser submetida ao processo de extração de DNA. A extração do DNA foi feita através do protocolo (CTAB, descrito no capítulo 1), que possibilita a lise celular, precipitação e a purificação do DNA. Algumas adaptações foram aplicadas ao protocolo convencional do método CTAB, com objetivo de melhorar o rendimento e qualidade do DNA obtido a partir de café torrado e moído, são elas:

a) pesagem de 150 mg de amostra;

b) adição de 1% de β-mercaptoetanol e 4% PVP (Polivinilpirrolidona – PVP-K 30) ao tampão de lise CTAB

c) eluição do DNA para um volume final de 100 μL.

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

Análise de bioinformática e desenvolvimeto dos primers: Com objetivo de encontrar sequencias de DNA que possam ser utilizadas para discriminar as duas espécies de café, análises de bioinformática foram conduzidas nesta ordem:

1. Sequências de DNA da espécie *C. arabica* foram comparadas através do BLAST (na modalidade MEGABLAST) com todas as sequências de DNA da tribo Coffeeae, com objetivo de definir uma sequência específica para a espécie *C. arabica*. Todas as espécies de café e outras plantas com proximidade genética ao café estão agrupados dentro desta tribo. Para evitar qualquer confundimento na análise, as sequências de DNA da espécie *C. arabica* foram excluídas (Figura 27);

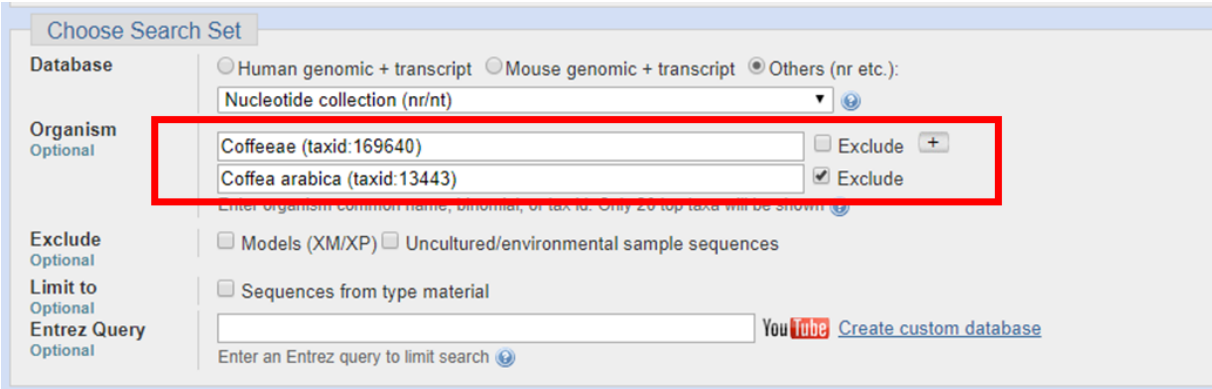


Figura 27: Configuração do BLAST para diferenciação entres as espécies de café, *C. arabica* e *C. canephora*.

2. Após a análise dos BLASTs, as sequências que demonstraram especificidade foram selecionadas e novamente submetidas a análise no BLAST com configuração BLAST-TN. Esta última análise teve o objetivo de selecionar as sequências mais seletivas.

3. As sequências que apresentaram especificidade através do BLAST-TN foram novamente analisadas no BLAST (MEGABLAST), excluindo a tribo Coffeeae. Esta última análise teve como o objetivo a seleção de sequências de DNA que fossem não apenas especificas entres as espécies geneticamente próximas do café, como também especificas quando comparadas com o banco de genes do NCBI.

As mesmas sequênciasde análises realizadas para espécies *C. arabica*, foram também realizadas para espécie *C. canephora*, como é representado pela figura 28.

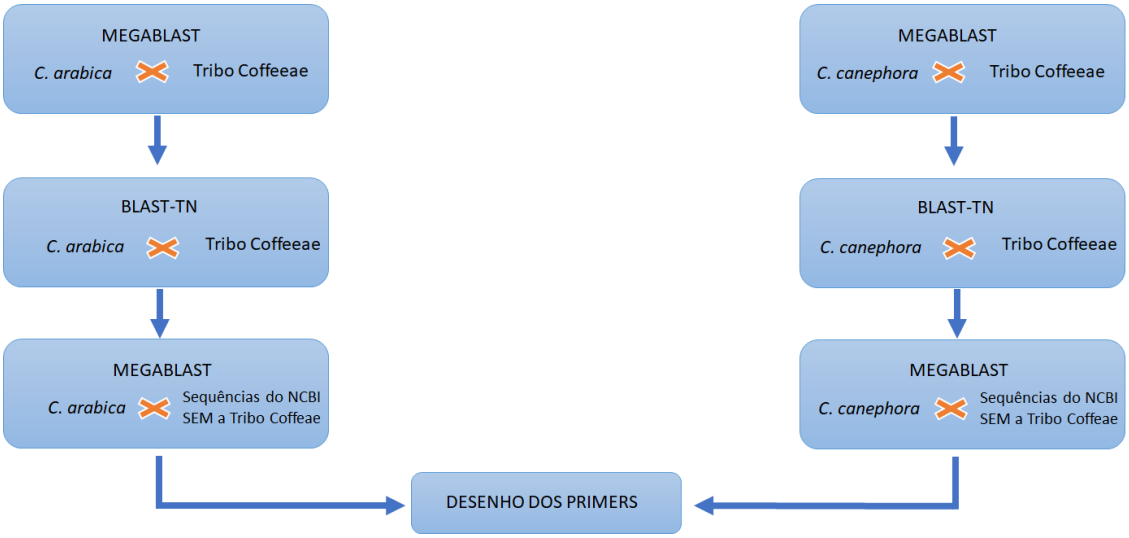


Figura 28. Apresentação do fluxograma das análises de bioinformática para discriminar as espécies de café *C. arabica* e *C. canephora* através das ferramentas de análises de similaridade do NCBI.

Desenho dos primers: Pares de primers foram desenhados pelo software online Primer3Plus (UNTERGASSER et al. 2007) para produzir *amplicons* (quantidade de pares de bases) entre 60 a 90 pares de bases (pb), com temperatura de fusão (Tm) entre 60 e 64 ° C, com conteúdo de guanina e citosina em torno de 50%. A análise de PCR *in silico* foi realizada utilizando o iPCR (ARTIMO et al. 2012).

PCR em tempo real: As reações de amplificação foram preparadas em câmara de fluxo laminar. Os reagentes utilizados na PCR em tempo real foram: SYBR Green PCR Kits (Promega, USA). A contração final de DNA na reação foi de 50 ng. A água ultrapura (Milli-Q) foi utilizada como o controle negativo da reação. O volume final da reação foi de 25 µL, com concentração dos primers de 240 nM.

O volume final da reação foi de 25 µL quando se utilizou DNA de café verde como molde enquanto que, para o DNA obtido a partir de café torrado e moído, o volume final foi de 50 µL. Após o descongelamento dos extratos de DNA, estes foram diretamente homogeneizados em vórtex com posterior centrifugação e então analisados. As reações foram realizadas no termociclador Abi 7500 (AppliedBiosystems, USA). Estas foram as condições térmicas da reação: 10 min. a 95 C, 45 ciclos de 15 s a 95 Ce 1 min. na temperatura de anelamento (Tm) de cada par de primers. O sistema de detecção utilizado foi o sistema intercalante de DNA, SYBR Green (Promega, USA).

Para construção da curva padrão foram utilizadas soluções de DNA extraídas de cafés *C. arabica* e *C. canephora*. A diluição da solução de DNA de café arabica em solução de DNA de café robusta foi feita nos seguintes percentuais: 0%, 25%, 50% 75% e 100%. Posteriormente, foi realizada a PCR em tempo real com as soluções de DNA extraídas das amostras MR P1.100A 14; MR P4.50A 25; MR P7.100A 24 (CINTIA et al, 2016). Todas as análises foram feitas com 10 réplicas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração e qualidade do DNA: As amostras *in natura* de café *C. arabica* e *C. canephora*obtiveram rendimento de DNA genômico satisfatório de 25,70 ng/µL±3,23 ng/µL com razão de Abs_{260}/Abs_{280} e Abs_{260}/Abs_{230} de 1,6±1,1 e 2,0±2,0, respectivamente. A razão entre as absorbâncias (Abs_{260}/Abs_{280}) caracteriza um isolado de DNA suficientemente puro, livre de contaminantes proteicos e pronto para aplicação em PCR em tempo real, seu valor de referência é 1,8. (MURRAY; THOMPSON, 1980; WAGNER et al, 1987; ZIRMMERMANN et al, 1998).as absorbâncias (Abs_{260}/Abs_{230}) traduz o quanto o isolado de DNA da amostra estava contaminado com compostos fenólicos ou outras substâncias de baixo peso molecular, como dissacarídeos, peptídeos e compostos aromáticos e seu valor de referência é 2,2 (MURRAY; THOMPSON, 1980; WAGNER et al, 1987; ZIRMMERMANN et al, 1998). Com menor rendimento, as mostras torradas e moídas obtiveram concentração de 14,23 ng/µL±5,53 ng/µL. A pureza dos isolados de DNA das amostras torradas e moídas foram de baixa qualidade (Abs_{260}/Abs_{280} = 1,2±3,1; Abs_{260}/Abs_{230} = 0,8±2,8). Contudo, foi possível amplificar os extratos de DNA das amostras processadas.

Analises in silico: Trezentos e quatro sequências de DNA da espécie *C. arabica* foram analisadas e comparadas com sequências de todas as espécies dentro da tribo Coffeeae (~169.640 sequências). Destas 304 sequências, 31 sequências apresentaram especificidade para *C. arabica*, mesmo quando analisadas através do BLAST-TN. Foi necessária análise adicional para verificar se tais sequências seriam especificas comparando-as com sequências de DNA do banco de genoma do NCBI. Após esta última análise foi possível selecionar três genes: *C. arabica* isoflavone (FJ972201.1), *C. arabica* constitutive (KF975699.1). Figura 29 e 30.

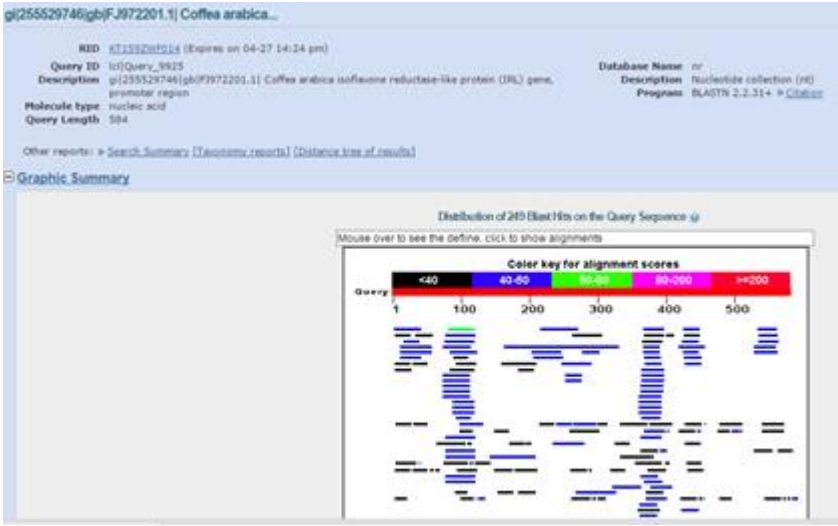


Figura 29: Sequência de DNA *C. arabica*, isoflavone (FJ972201.1), selecionada através de análises de bioinformática de café da espécie *C. arabica.* As linhas pretas (até 40 pb) e azuis (entre 40 e 60 pb) representam sequências de DNA de outras espécies similares a espécie *C. arabica.*

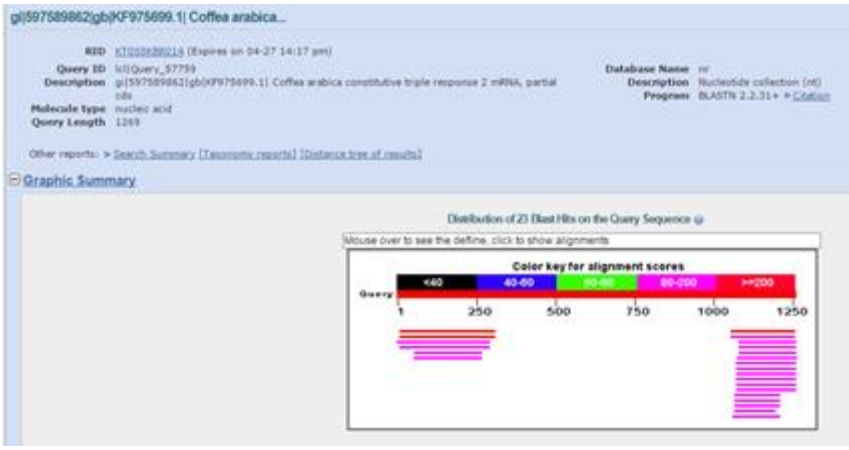


Figura 30: Sequência de DNA *C. arabica*, constitutive (KF975699.1), selecionada através de análises de bioinformática de café da espécie *C. arabica.* As linhas rosas (entre 80 e 200 pb) representam sequências de DNA de outras espécies similares a espécie *C. arabica.*

Com relação a espécie *C. canephora*, foram realizadas no total 281 análises de bioinformática considerando as análises no MEGABLAST, BLAST-TN e MEGABLAST com a exclusão da tribo Coffeeae. Diferente das análises realizadas com *C. arabica*, na espécie *C. canephora* mais ou menos 50 sequências de DNA obtiveram bons resultados com relação a sua seletividade. Contudo,não significa que as mesmas são realmente especificas. Provavelmente, tais sequências apresentem maior quantidade de repetição degenerada de bases com AT, AA, AG, etc. (SCHULER, 2001). Para a escolha das sequências mais especificas, analises com

relação a origem da sequência com também analises de mascaramento pelo Repeatmasker© foram realizadas. A partir de então os genes: OLE-4 (AY841274.1) e Galactomannangalactosyl (EU716313.1) foram selecionados (Figuras 31 e 32).

Figura 31: Sequência de DNA *C. canephora* OLE-4 (AY841274.1), selecionada através de análises de bioinformática para café da espécie *C. canephora*. Não foi identificado regiões similares a sequência OLE-4.

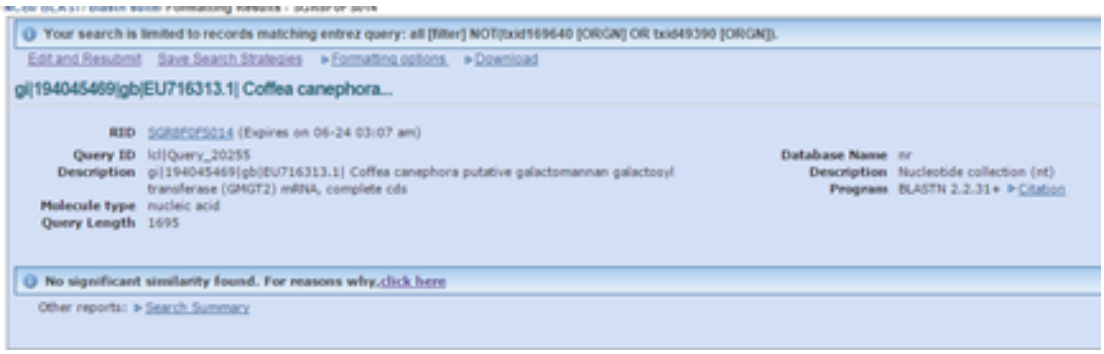


Figura 32: Sequência de DNA *C. canephora* Galactomannangalactosyl (EU716313.1), selecionada através de análises de bioinformática para café da espécie *C. canephora*. Não foi identificado regiões similares a sequência Galactomannangalactosyl.

Após a seleção das sequências através das ferramentas de bioinformática, 5 pares de primers foram desenhados e então sintetizados Tabela 5.

Tabela 5: Primers específicos desenhados para café da espécie *C. arabica* e *C. canephora*.

	Coffeaarabica				
	Sequência	Comprimento	TmºC	GC%	Amplicon
Isoflavone	F-TGATCGTTGATCCAAAGGTTC	21 pb	59,9	42,9	88 pb
	R- AGCTGGACATGACATGGTTG	20 pb	59,6	50,0	
Constitutive	F- CCACCAGCGTACTTGTCAGA	20 pb	59,9	55,0	84 pb
	R- AATGCTACACGGGAAAGTGC	20 pb	60,0	50,0	
	Coffeacanephora				
ole4	F- CGCAGACACAGCACTCAACT	20 pb	60,0	55,0	81 pb
	R- CCGACAGAAGCATGAGTGAA	20 pb	60,3	50,0	
Galactomannan	F- GCAACGTTTGGGCTAAGGTA	20 pb	60,1	50,0	78 pb
	R- CCATCCACCAGATCCACTCT	20 pb	59,9	55,0	

Pb: pares de bases. GC%: quantidade em percentual de guanina e citosina. Tm: temperatura de anelamento. Amplicon: comprimento do produto de PCR produzido pelo primer.

Como preconizado na ALINORM 10/33/23 do CODEX ALIMENTARIUX (2010), o processamento de alimentos, provavelmente levará a degradação do DNA alvo. O comprimento do produto amplificado pode influenciar o desempenho da PCR. Portanto, a seleção de tamanhos menores, como aqueles presentes na tabela 6, aumenta a possibilidade de obter um sinal positivo na análise de alimentos altamente processados, como no caso do café. Além disso, os primers obtiveram quantidade de GC (42,9 – 55,0 %) dentro dos limites aceitáveis para análises de PCR em tempo real (BROEDRS et al, 2014). Primers com porcentagem de GC (Guanina-Citosina) muito baixo ou primers muito longos têm tendência a formarem *primer-dimer* ou *self-dimer*. Estes últimos consomem os reagentes da reação diminuindo sua eficiência (BUSTIN et al, 2009).

Analises in vitro: Após a seleção das sequências e o desenho dos respectivos primers, as reações de seletividade foram conduzidas com DNA de *C. arabica* e seus respectivos primers e DNA de café *C. canphora*também com seus respectivos primers. Dos 5 pares de primers, o primer Isoflavone para *C. arabica* e Ole-4 para *C. canephora* foram selecionados. Assim como previsto nas análises *in silico*, os primers amplificaram com sucesso. Como esperado, o controle negativo (água) não reagiu. Isso indica que o primer foi apropriadamente desenhado. A curva de melting característica foi 76,7 ºC para o primer Isoflavone e 78,40 ºC para o primer ole4 (Figura 33).

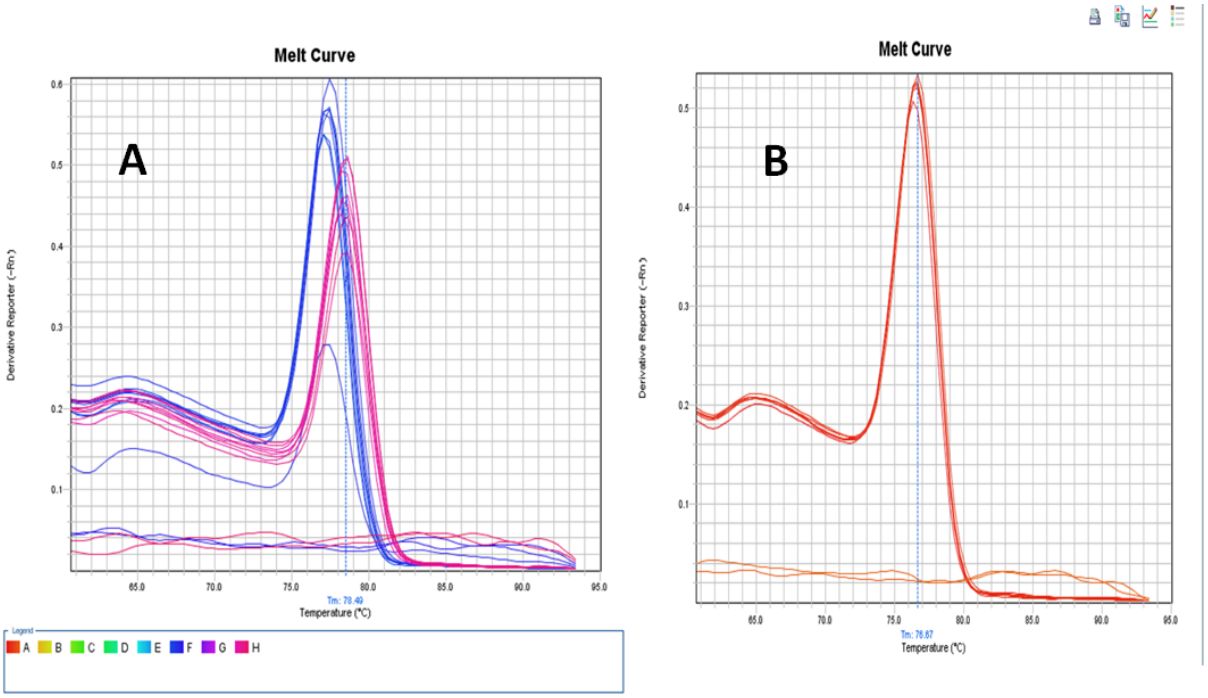


Figura 33: Curva de melting do primer Ole-4 (A) com DNA de café da espécie *C. canephora* e primer Isoflavone (B) com DNA de café da espécie *C. arabica*. Controle negativo água ultrapura.

Embora os parâmetros de bioinformática tenham sido observados, quando os primers Isoflavone e Ole-4 foram analisados com o DNA das espécies não correspondentes (Isoflavone com DNA de café *C. canephora* e Ole-5 com DNA de café *C. arabica*), surpreendentemente todos amplificaram com temperatura de anelamento muito próxima (Figuras 34 e 35). Embora na figura 36, é possível observar uma diferença na temperatura de anelamento (de ~2,8 ºC) quando o primer Ole-4 (para *C. canephora*) foi a com DNA de *C. arabica*, contudo, essa diferença é pouca para o objetivo do estudo. O que poderia explicar essa diferença é o fato de que, o café *C. arabica* é um tretaploide que se originou do agrupamento dos cromossomos diploides dos cafés das espécies *C. canephora* e *eugenoides* (DAVIS, 2006; MAURIN et al, 2007). Além disso, a quantidade de genes/sequências de DNA das espécies de café depositadas n banco de genes do NCBI é pouca quando comparada com outras espécies que já possuem todo o genoma completamente sequenciado.

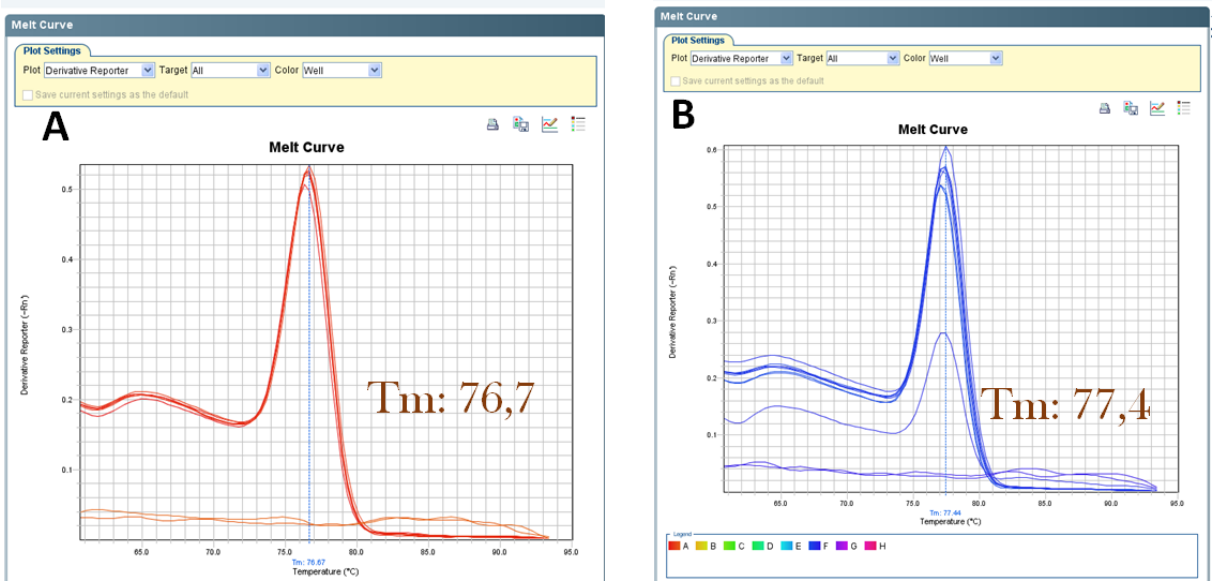


Figura 34: A - curva de melting do primer Isoflavone com DNA de café da espécie *C. arabica*. B- curva de melting do primer Isoflavone com DNA de café da espécie *C. canephora.*

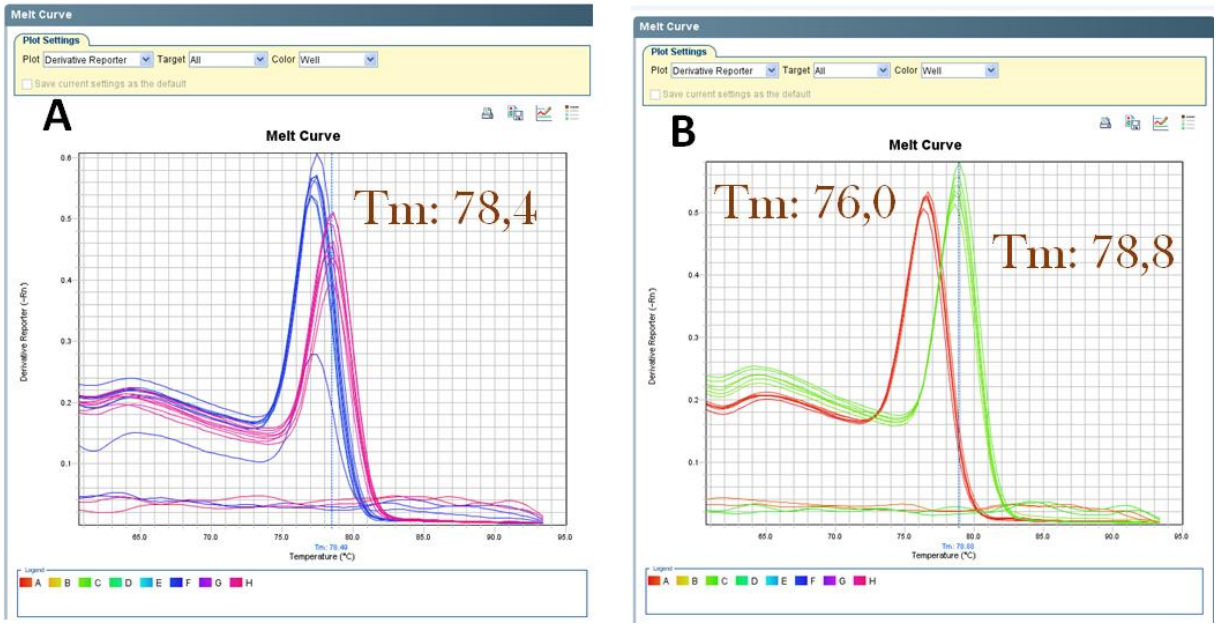


Figura 35: A - curva de melting do primer Ole-4 com DNA de café da espécie *C. canephora*. B- curva de melting do primer Ole-4 com DNA de café da espécie *C. arabica.* Na imagem B, as linhas vermelhas apresentam a curva de dissociação com o DNA de café *C. canephora* e as linhas verdes apresentam a curva de dissociação com DNA de café *C. arabica*.

Como não foi possível a diferenciação das espécies como sistemas de detecção supracitado, uma nova estratégia foi planejada para a discriminação de ambas as espécies de café.

Em 2015, um grupo de pesquisa publicou o sequenciamento do genoma de café *C. canephora* (DEREEPER et al, 2015), e o depositou no banco de genes de café *Coffee Genome Hub* (CGH). Este banco de genes para café se tronou público um ano depois que as análises foram feitas pelo NCBI.A partir de então, análises de similaridades entres as espécies foram realizadas com o objetivo de diferenciá-las. Para tal, uma sequência de DNA da espécie *C. arabica* (GW4412751) foi analisada na ferramenta de análise de similaridade (Blast) do CGH. Assim como NCBI esta ferramenta faz análises de comparação entre sequências de DNA. A diferença aqui é que o programa do CGH só utiliza como base para comparação o genoma do café da espécie *C. canephora*.

A sequência GW4412751 apresentou 8 regiões de similaridade quando comparada cromossomo de *C. canpehora* (Figura 36).

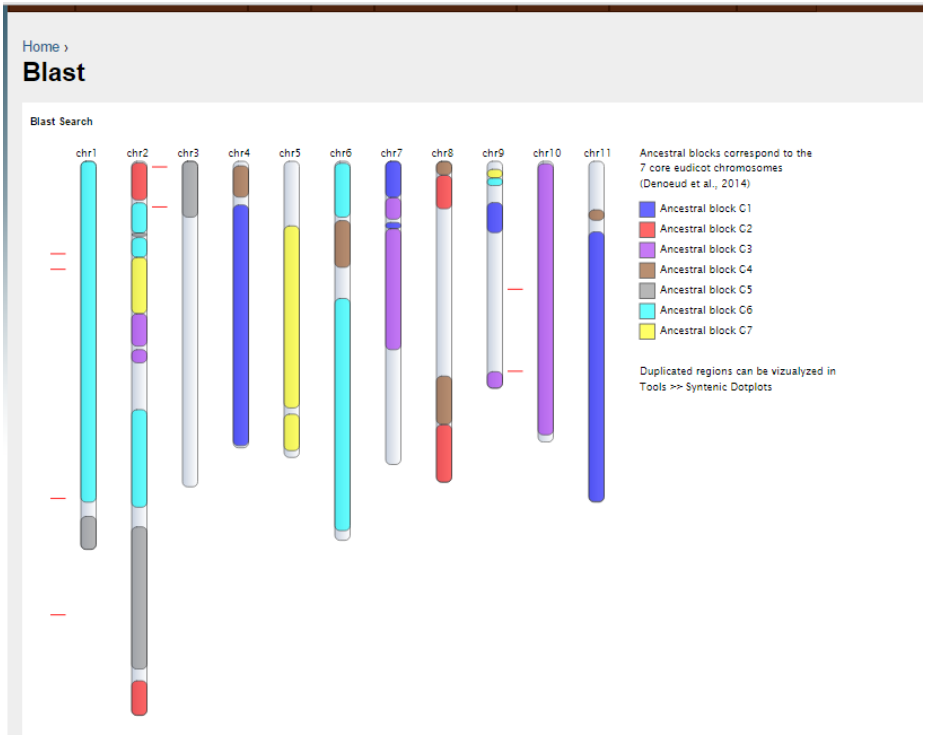


Figura 36: Análise de similaridade no *Coffee Genome Hub*, utilizando a sequência de café *C. arabica* GW4412751. Oito regiões do DNA de café *C. canephora* apresentaram similaridade com a sequência GW4412751. Os traços vermelhos indicam onde a região de similaridade ocorreu nos cromossomos.

Contudo, cada região foi analisada e constatou-se que essas regiões apresentavam quantidade significativas de polimorfismos e espaçamentos, permitindo o desenvolvimento do primer Ara (Tabela 6).

Tabela 6: Parâmetros e características do primer Ara.

	Coffeaarabica				
	Sequência	Comprimento	TmºC	GC%	Amplicon
Ara	F-ACCTTCTTCAAGCCCTTGTG	20 pb	59,3	50,0	72 pb
	R-CCTCCTGGCTCTGTGTTTTC	20 pb	59,8	55,0	

Pb: pares de bases. GC%: quantidade em percentual de guanina e citosina. Tm: temperatura de anelamento. Amplicon: comprimento do produto de PCR produzido pelo primer.

Alinhamentos utilizando o programa MUSCLE - *MultipleSequenceAlignment* foram realizados com o produto de PCR do primer Ara, mais os primers Ara (*forward* e *reverse*) e as sequências de café *C. arabica* e *C. canephora* para a identificação da especificidade do primer Ara, no qual está relacionada ao não anelamento do primer *forward*, além de um polimorfismos encontrado na região do primer *reverse* (Figura 37).

```
CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8) AND iPCR in silico.

   Primers forward= 5'[ACCTTCTTCAAGCCCTTGTG] 3'                        3' CCTCCTGGCTCTGTGTTTTC 5' reverse (complement)
PCR product(amplicon)-ACCTTCTTCAAGCCCTTGTGACATCTCTTCATCTGAAAAAAATTCTCGATGTGAAAACACAGAGCCAGGAGG-(pos=306-377pb length=72pb)
    C.arabica    CATTTACCTTCTTCAAGCCCTTGTGACATCTCTTCATCTGAAAAAAATTCTCGATGTGAAAACACAGAGCCAGGAGG
    C.canephora  ---------------AAGCCCCTTTGACATCTCTTCATCTGCAAATAATTCTCGATGTGAAAACACAGAGCCAGGGGG
                                          * *                   *   *                          *

    C.arabica    CTGATCTTTGTAAAGGAAAAAGAGTGGATCGGCAGGGTCCCAAATGAATTGACTTATTCAAAAAGGGCCTGGTTCTT
    C.canephora  CTGATCTTTGAATAGGAAAAAGAGTGGATCCGCAGGGTCCCAAATGAATTGACTTATTCGAAAAGGGCCTTGTTCTT
                             * *                 *                                *          *

    C.arabica    TGGAAGATCTATTTCGTGTCTGGTACTGAATGGTTCCATTCTGCAAAAACTCTGAATCATTCTCTGGAAGCTCATCC
    C.canephora  TGGAAGATCTATCTCGTGTCTGGTACTGCACGGTTCCATTCTGCAAGAACTCCGAATCATTCTCTTGAAGCTCATCC
                                *                 * *                 *     *            *

    C.arabica    TCTTCATCACAAGTGATCCACTTGCCCCAAAATGGCCTGGACTTTCAAGTGTGTCTGACTTTCTGTGTC
    C.canephora  TCTTCATCATAAATGATCCGCTTGCCCCAAAATGGCCTGGAC---------------------------
                               *  *      *
```

Figura 37: Alinhamentos utilizando o programa MUSCLE - *MultipleSequenceAlignment* foram realizados com o produto de PCR do primer Ara, mais os primers Ara (*forward* e *reverse*) e as sequências de café *C. arabica* e *C. canephora*. [ ] região de especificidade do primer Ara. * Polimorfismos presentes na sequência de DNA.

Foram conduzidas reações de PCR em tempo real com o primer Ara com DNA de café *C. arabica* e *C. canephora*. Na figura 38, é possível observar que ocorreu uma diferença significativa no número de Cts (~ 10 ciclos) entre o primer Ara e o DNA de café *C. arabica* (controle positivo) e *C. canephora*.

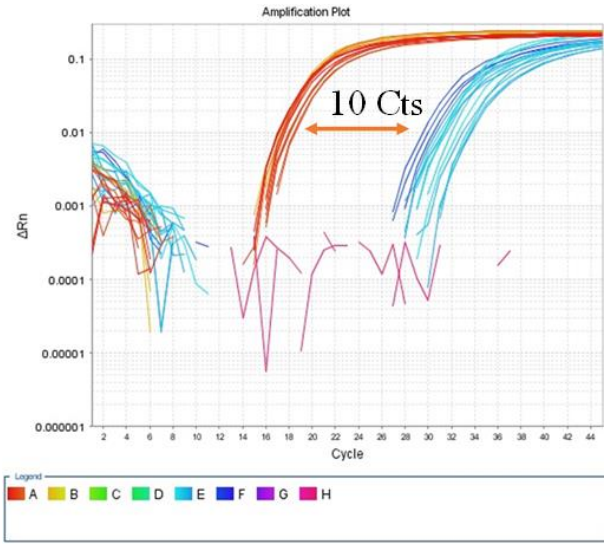


Figura 38: Curva de amplificaçãodo primer Ara com DNA de café *C. arabica* e *C. canephora*. Linhas laranjas e vermelhas: primer Ara com DNA de café *C. arabica***.** Linhas azuis**:** primer Ara com DNA de café *C. canephora*. ΔRn: intensidade do sinal fluorescente normalizado pela referencia interna da reação.

A estratégia para descriminar as espécies de café com o primer Ara foi estabelecida de acordo com a alteraçãoda curva de amplificação de acordo com a diluição do DNA alvo. Neste caso pela adição de um diluente (a presença de DNA de café *C. canephora*). Para verificar esta hipótese, foram realizadas misturas de DNA isoladas de café verde (*C. arabica* e *C. canephora*) nas seguintes proporções: 100% de *C. arabica* + 0% de *C. canephora* (P1); 75% de *C. arabica* + 25% de *C. canephora* (P2); 50% de *C. arabica* + 50% de *C. canephora* (P3); 25% de *C. arabica* + 75% de robusta (P4); 0% de *C. arabica* + 100 % de *C. canephora* (P5).

Na Figura 39**,** estão apresentadas as curvas de amplificação e dissociação com o primer Ara. Como o esperado, as amostras P1 amplificaram previamente das amostras que foram adicionadas de DNA de café *C. canephora*. Esses dados confirmaram que o par de primers ARA é mais específico para DNA de café *C.arabica*.

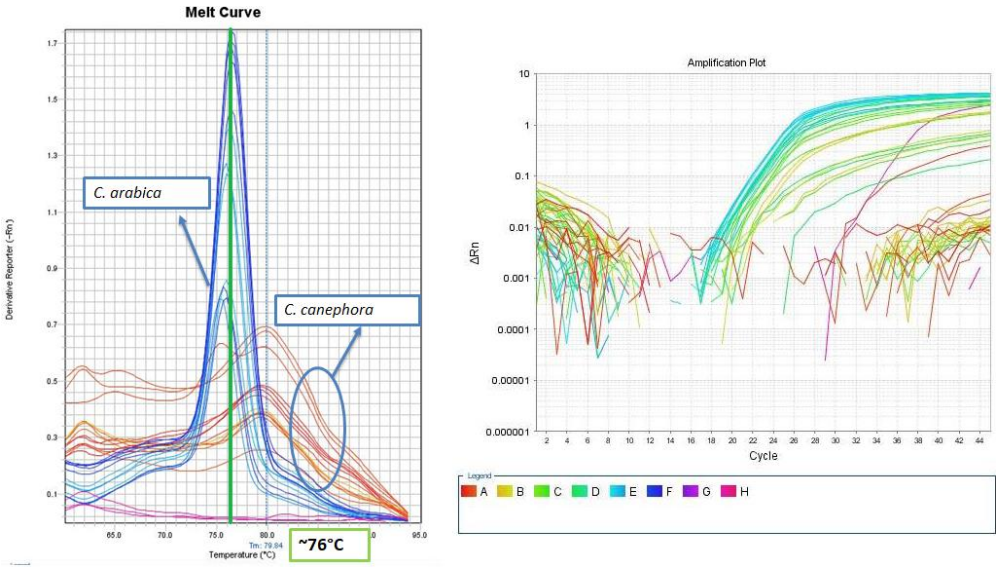


Figura 39: Curva de dissociação e amplificação com as amostras de DNA de café verde *C. arabica* e *C. canephora* nas seguintes proporções 0, 25, 50 75, 100 % de DNA de café C. *canephora*. ΔRn: intensidade do sinal fluorescente normalizado pela referencia interna da reação.

A diferença de amplificação através do Cts médios e temperatura de anelamento (Tm) das amostres de café verde das espécies *C. arabica* e *C. canephora* estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Valores deCt e Tm médios para amostras de café *C. arabica* verde adicionada de café *C. canephora*.

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

Ct: cycle threshold. Tm. Temperatura de anelamento.

Ao observar a curva de dissociação das amplificações das amostras de café verde, a temperatura de anelamento para a espécie arabica foi especifica para *C. arabica* (76,42 °C), diferente da espécie *C. canephora* (80 °C).

Com o objetivo de avaliar a aplicabilidade do método, utilizou-se um material de referência de café torrado e moído contendo 0, 25, 50, 75 e 100% de café *C. arabica* (n = 5 para cada ponto da mistura) de acordo com Cinthia et al, 2016.

Os valores de Ct das amostras torradas e moídas também aumentaram de acordo com a quantidade de *C. canephora*adicionada na mistura (0; 36,78 ± 4,33; 35,18 ± 1,18; 34,95 ± 0,59

e 35,82 ± 0,24). Quando comparada com as misturas de DNA de café verde, foi observado uma mudança no perfil de amplificação, com início mais tardio doCt. Isso provavelmente ocorreu devido à co-precipitação de vários compostos de baixo peso molecular (inibidores da reação de PCR) formados durante o processo de torrefação, interferindo na ação da enzima polimerase e, portanto, o método de extração de DNA precisa ser melhorado. Essas questões também foram relatadas em outros estudos envolvendo matrizes de plantas (DEMEKE; ADAMS 1992; DICKINSON et al, 1995; WILSON, 1997).

Algumas abordagens foram sugeridas para melhorar o rendimento da reação, por exemplo, a adição de facilitadores de amplificação, como ácido cítrico, sulfito de sódio, polivinilpirrolidona (PVP), polivinilpolipirrolidona (PVPP), dimetil sulfeto (DMSO), albumina de soro bovino (BSA) ao tampão de extração de DNA (WILSON, 1997). Além disso, a adição de BSA na mistura de PCR, em concentrações de até 0,8 mg / ml, aumentou a eficiência da amplificação de PCR utilizando DNA isolado de amostras complexas como café torrado e moído (SINGH et al, 1998; MA; MICHAILIDES, 2007).

Apesar da mudança nos valores de Ct, mesmo quando amostras foram torradas, os primers Ara mantiveram sua Tm característica (75,9 ± 0,26 ° C) (Figura 40).

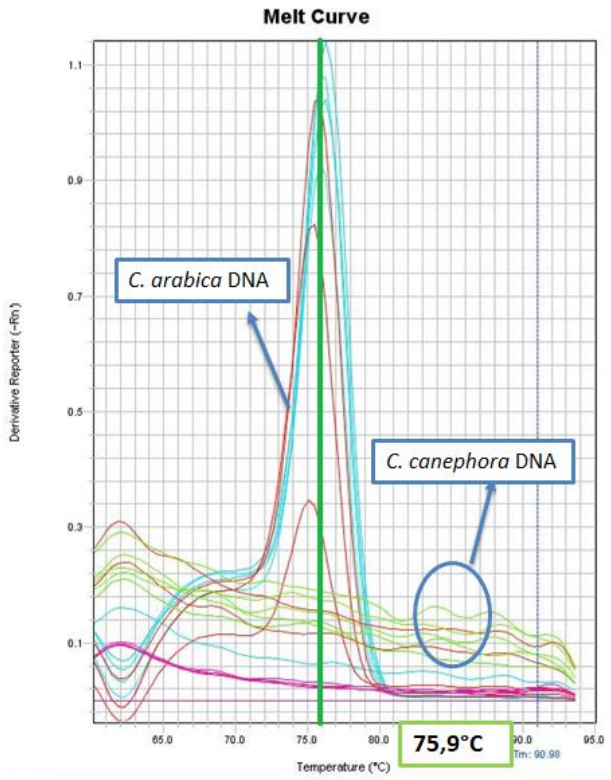


Figura 40: Curva de dissociação do primer Ara, do material de referência de café torado e moído contendo 0, 25, 50, 75 e 100% de *C. arabica* (n = 5 para cada ponto da mistura).

CONCLUSÃO.

Concluindo, neste estudo, foi possível discriminar as espécies *C. arabica* e *C. canephora*, utilizando ferramentas de bioinformática e PCR em tempo real. Esta estratégia abre uma nova janela para o desenvolvimento de um método rápido, simples e de baixo custo que será acessível para aplicação em amostras comerciais com especificidade e confiança. Os valores de Ct de ambas as espécies mostraram que já é possível identificar a presença de *C. canephora* e estimar sua quantidade na mistura. O próximo passo será purificar o extrato de DNA para evitar interferências na reação de PCR e validação do método.

CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETECÇÃO DA BROCA DO CAFÉ

INTRODUÇÃO

De acordo com a ABIC, o clima e a incidência de pragas podem comprometer radicalmente a produção de café e, entre as pragas mais temidas do produtor rural está a broca (ABIC, 2017). que é considerada o principal problema da cultura.

Na Cooperativa dos Cafeicultores de Guaxupé, no Sul de Minas Gerais, a classificação é feita com cuidado e o resultado é assustador. Das 3,4 milhões de sacas de café recebidas, 218 mil vieram com os grãos brocados (ABIC, 2017).

> "*Quando você detecta os efeitos normais, registra em torno de 20% de incidência. Neste ano o índice foi muito mais alto, registrando mais de 30% de incidência", relatou o gerente de classificação da Cooxupé, Carlos César Gomes*."
>
> (ABIC, 2017)

A broca pertence ao gênero *Hypothenemus* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae), composto por 181espécies, embora, apenas a espécie *H. hampei* (Ferrari) é considerada importante para a agricultura (VEGA et al, 2015). Esta espécie é de origem Africana, comumente conhecida como a broca do café. Contudo, desde a dispersão do café para o mundo a broca tem sido encontrada nos países produtores de café. O dano é iniciado por uma fêmea adulta colonizadora de 1,6 a 1,9 mm de comprimento, que perfura um o fruto de café e deposita os ovos em galerias dentro das duas sementes (DAMON, 2000).

Após a eclosão, as larvas consomem as sementes prejudicando de forma significativa o rendimento e qualidade da safra. No Brasil, o prejuízo com a broca do café é estimado em torno de 215-358 milhões de dólares (OLIVEIRA et al, 2013). Mesmo que o inseto tenha sido estudo por mais de 100 anos, ele continua sendo uma grande ameaça à produção de café.

Além da perda econômica, o café brocado é classificado dentro dos defeitos intrínsecos como um dos principais interferente da qualidade global da bebida. O fruto perfurado pela broca aumenta também a possibilidade de contaminação por microrganismos,devido a exposição do interior do fruto ao ar livre. Dos microorganismos os fungos são os mais preocupantes pois, podem produzir substâncias carcinogênicas como as micotoxinas.

A presença da broca no café já foi relacionada a compostos voláteis de característica negativa em estudo utilizando espectrometria de massas (TOCI; FARAH, 2009).

Embora alguns estudos tenham utilizado PCR convencional para a identificação de polimorfismos de resistência aos defensores agrícolas (FRENCH-CONSTANT; STEICHEN;

BRUN, 1996; BORSA, COUSTAU, 1996; NAVARRO; GONGORA; BENAVIDES, 2010), não foi encontrado na literatura um sistema de detecção específico para a detecção da broca do café (*H. hampei*)utilizando PCR em tempo real.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das amostras: A broca foi coletada em seu estágio larval a partir de grãos de café (*C. arabica*, variedade Catuaí) de amostras que foram adquiridas de regiões produtoras dos estados do Rio de Janeiro, nos municípios de Machado. Para análise de especificidade amostras cruas de café (espécie *C. arabica* var. Catuaí Açu, Bourbon Amarelo, Icatu Amarelo, e Iapar 59 e *C. canephora* var. (Conilon, Robusta e BRS) foram obtidas diretamente de produtores dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo. Amostras in natura de cevada (*Hordeum vulgare*), milho não geneticamente modificado (*Zea mayz*) e arroz agulhinha (*Oryza sativa*), soja (*Glicine max*) e trigo (*Triticum aestivum*), centeio(*Secale cereale*),e chicória (*Cichorium intybus*)foram adquiridas no mercado livre de Santa Cruz, Rio de Janeiro. Amostras de açaí (*Euterpe oleracea*) foram cedidas pela EMBRAPA – AMAPÁ. Além das amostras vegetais, espécimes do reino animal da classe Insecta (formiga – *Iridomyrmex*spp, barata – *Periplaneta*spp e mosca – *Musca* spp.) e um da classe Arachnida (aranha – *Nephilengys* spp.), foram coletadas na EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, para análises de especificidade.

Extração de dna: A extração do DNA foi feita através do protocolo CTAB, descrito no capítulo 1. A concentração de DNA dos extratos foi determinada através de leitura da absorbânciaa 260 nm no nano-espectrofotômetro Genova Nano (JENWAY – Stffordshire, UK). Adicionalmente, foram determinadas as razões das leituras de absorbâncias a 260 e 280 nmpara presença de proteínas; e a 260 e 230 nm para compostos fenólicos, que são parâmetros
para análise da qualidade do DNA isolado.

Análise de bioinformática e desenvolvimeto dos primers: Com objetivo de encontrar sequencias de DNA que possam ser utilizadas para o desenho de primers específicos para *H. hampei*, análises de bioinformática foram conduzidas nesta ordem:

1. Sequências de DNA da espécie *H. hampei* foram comparadas através do BLAST (na modalidade MEGABLAST) com sequências de DNA que estão depositadas no NCBI.
2. As sequências que obtiveram especificidade através do MEGABLAST, foram novamente avaliadas através do BlAST na modalidade *MORE DISSIMILAR SEQUENCE*.

3. Para selecionar as sequências ainda mais específicas, análises adicionais através do BLAST-TN foi realizada.

Após esta última análise, as sequências foram editadas para a retirada de regiões homologas ou similares a regiões de DNA de outras espécies e quando necessário análises de mascaramento da sequência foram realizadas pelo ReaptMasker.

Desenho dos primers: Pares de primers foram desenhados pelo software online GeneFisher2 (GIEGERICH; MEYER; SCHLEIERMACHER, 1996) para produzir *amplicons* (quantidade de pares de bases) entre 60 a 90 pares de bases (pb), com temperatura de fusão (Tm) entre 60 e 64 ° C, com conteúdo de guanina e citosina em torno de 50%. A análise de PCR *in silico* foi realizada utilizando o iPCR (ARTIMO et al. 2012).

PCR em tempo real: As reações de amplificação foram preparadas em câmara de fluxo laminar. Os reagentes utilizados na PCR em tempo real foram: SYBR Green PCR Kits (Promega, USA). A contração final de DNA na reação foi de 50 ng. A água ultrapura (Milli-Q) foi utilizada como o controle negativo da reação. O volume final da reação foi de 25 µL, com concentração dos primers de 240 nM.

Após o descongelamento dos extratos de DNA, estes foram diretamente homogeneizados em vórtex com posterior centrifugação e então analisados. As reações foram realizadas no termociclador Abi 7500 (AppliedBiosystems, USA). Estas foram as condições térmicas da reação: 10 min. a 95 C, 45 ciclos de 15 s a 95 Ce 1 min. na temperatura de anelamento (Tm) de cada par de primers. O sistema de detecção utilizado foi o sistema intercalante de DNA, SYBR Green (Promega, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração e qualidade do DNA: As amostras de café obtiveram rendimento de 20,75 ng/µL±6,05 ng/µL e os adulterantes de 42 ng/µL±6,55 ng/µL. As amostras de origem animal também obtiveram concentração de DNA satisfatória (50,75 ng/µL±8,23 ng/µL). Com relação a razão entre as absorbâncias Abs_{260}/Abs_{280} e Abs_{260}/Abs_{230}, todas as amostras apresentaram razões dentro dos padrões da literatura (1,7±2,0; 2,1±0,9, respectivamente).

Análises in silico: No total, 79 análises de BLAST foram realizadas para a definição de sequências de DNA específicas para *H. hampei*. Destas sequências destacaram-se as sequências

CBB mannanase (GQ375156.1), cytochrome 2-P450 (JN416120.1) e GABA-gatedchloride (AF037324.1) por sua seletividade (Figura 42, 42 e 43).

É possível observar nas Figuras 41, 42 e 43 que as sequências GQ375156.1, JN416120.1 e AF037324.1 apresentaram regiões de similaridade com outras espécies. Estas regiões não foram consideradas para o desenho dos primers.

A sequência GQ375156.1 apresentou regiões pontilhadas similares a outras espécies. Como se trata de uma sequência longa (~10.000 pb) a mesma foi editada. Após a sua edição esta foi submetida novamente a análise no BLAST-TN com o objetivo de verificar a sua seletividade. Como observado na figura 44, com a sua edição, a sequência GQ375156.1 apresentou melhor seletividade.

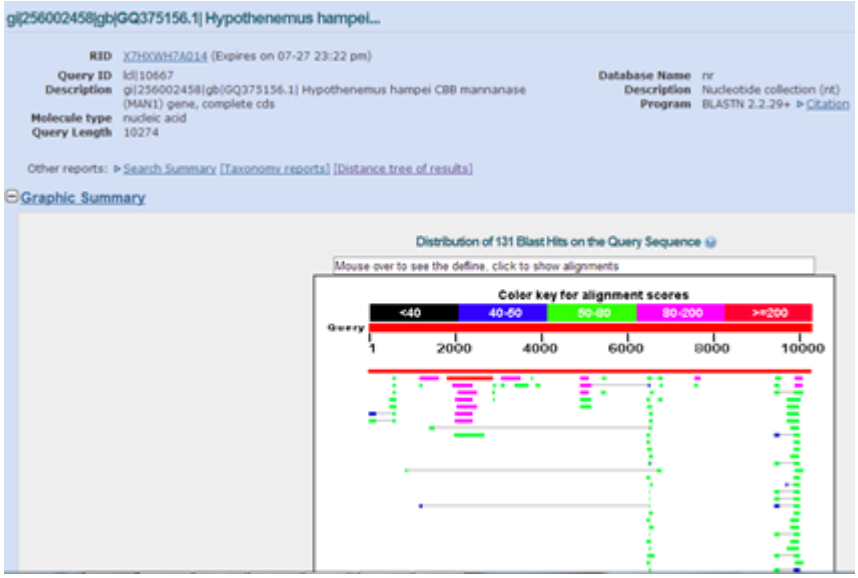


Figura 41: Análise de seletividade da sequência de DNA CBB mannase (GQ375156.1), através do BLAST-TN. A linhas verdes, rosas e pontos azuis demonstram as regiões similares entre a sequência de broca GQ375156.1 com sequências de organismos de outras espécies.

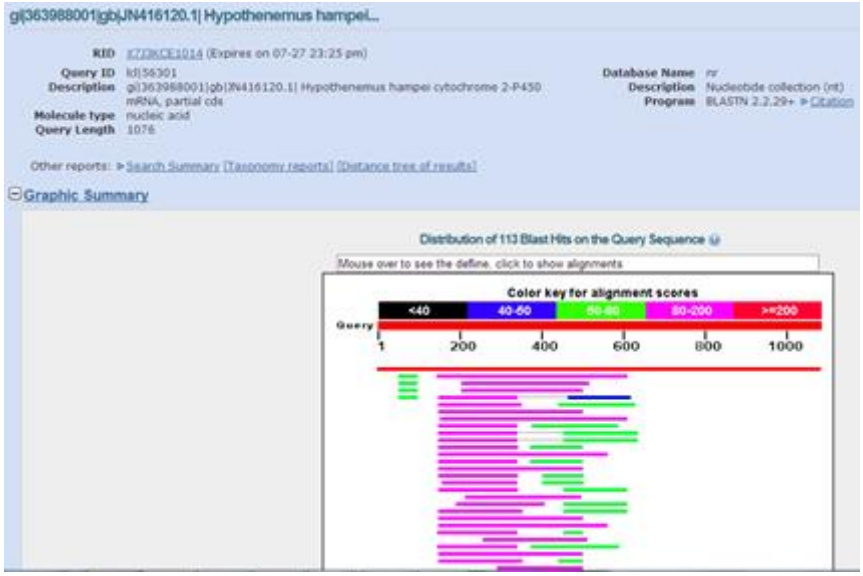


Figura 42: Análise de seletividade da sequência de DNA cytochrome 2-P450 (JN416120), através do BLAST-TN. A linhas verdes, rosas e azuis demonstram as regiões similares entre a sequência de broca JN416120 com sequências de organismos de outras espécies.

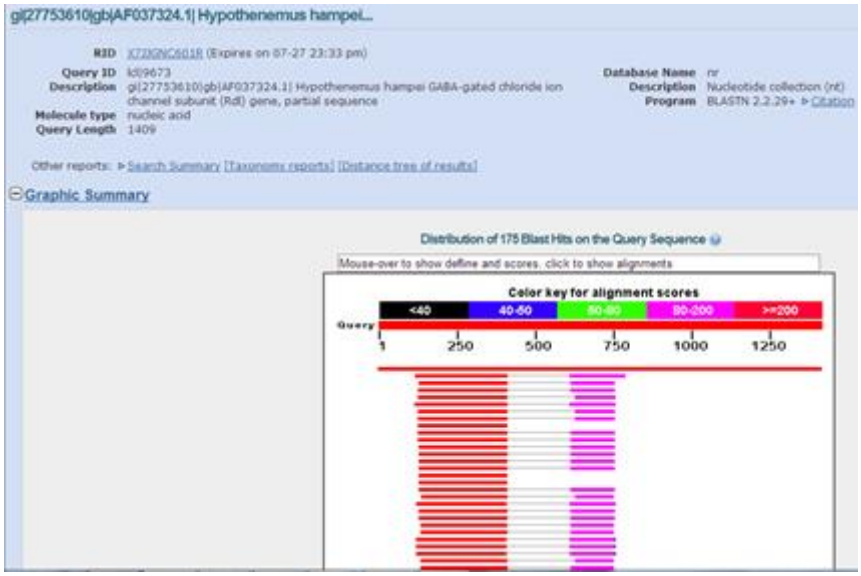


Figura 43: Análise de seletividade da sequência de DNA GABA-gatedchloride (AF037324.1), através do BLAST-TN. A linhas verdes, rosas e azuis demonstram as regiões similares entre a sequência de broca AF037324.1 com sequências de organismos de outras espécies.

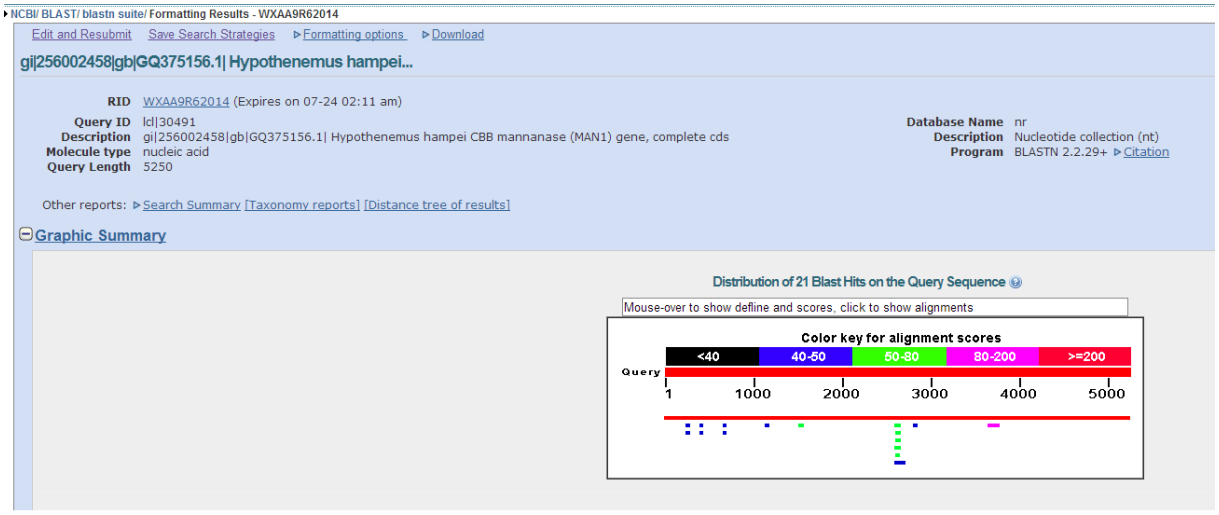


Figura 44: Análise de seletividade da sequência de DNA CBB mannase (GQ375156.1), através do BLAST-TN. Os pontos verdes, rosas e azuis demonstram as regiões similares entre a sequência de broca GQ375156.1 com sequências de organismos de outras espécies. Após a sua edição ocorreu a diminuição destas regiões similares a outras espécies.

Após a seleção das sequências específicas para *H. hampei*, através das ferramentas de bioinformática, 6 pares de primers foram desenhados e então sintetizados (Tabela8).

Tabela 8: Primers específicos desenhados para a broca do café *H. hampei*.

	Hypothenemushampei				
	Sequência	<-->	TmºC	GC%	Amplicon
CBB mannase	F- TCTGGCGTTTCCTGGATG	18 pb	55,9	56,0	62 pb
	R- AACTTGGGGTCCGTAACG	18 pb	55,6	56,0	
2-P450	F- AAATGCGTCGACCAGATG	18 pb	59,9	54,5	62 pb
	R- TCCAAGCCTCATACCAAG	18 pb	50,0	52,5	
GABA-gated	F-CTTATGTCTTTCATCGTGTATCGA	28 pb	60,0	56,0	78 pb
	CTA	20 pb	60,0	56,0	
	R- GAGGGGCAAAACTGAAACAA				

Pb: pares de bases. GC%: quantidade em percentual de guanina e citosina. Tm: temperatura de anelamento. Amplicon: comprimento do produto de PCR produzido pelo primer. F: forward primer. R: reverse primer. <-->: quantidade de bases do primer

Analises in vitro: De forma inesperada, nenhum dos primers amplificaram quando submetidos a análise de PCR em tempo real (Figura 45).

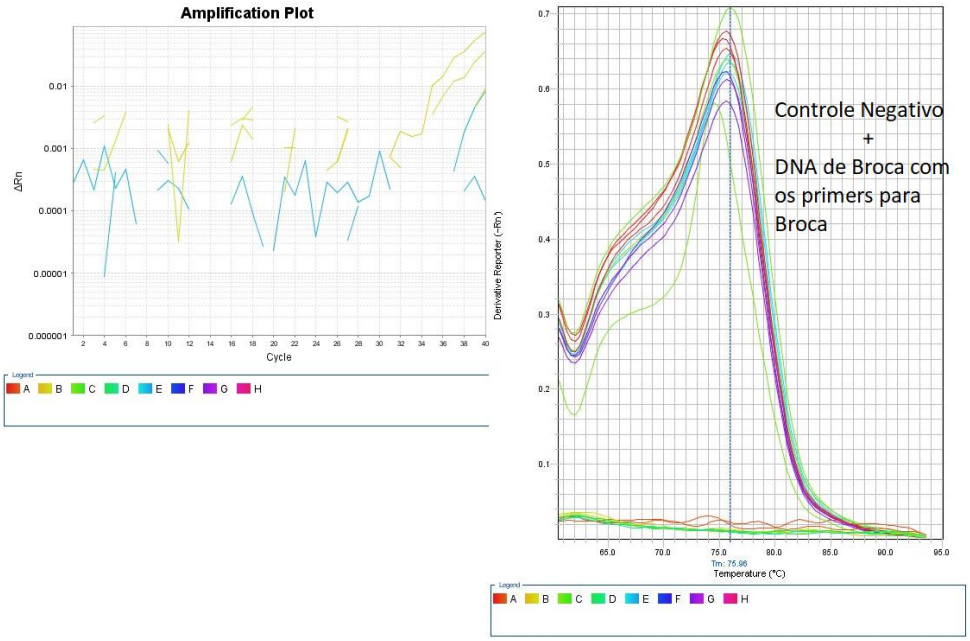


Figura 45: Reação de seletividade dos primers para broca CBB mannase, 2-P450 e GABA-gated com DNA de Broca e com o controle negativo água ultrapura. com os primers**.** Como é apresentado na curva de amplificação e curva de dissociação os primers não amplificaram. ΔRn: intensidade do sinal fluorescente normalizado pela referencia interna da reação.

Há muitos motivos para a não amplificação de primer, tais como: mau desenho dos primers (primers longos com pouca quantidade de bases nitrogenadas guanina e citosina), a concentração do primer na reação, a presença de inibidores da reação de PCR, o ajuste na temperatura de anelamento, diferença na temperatura de anelamento dos primers como também a formação de *hairpins* (o dobramento da fita de DNA do primer nele mesmo) (RYCHLIK; SPENCER; RHOADS, 1990; CLINE; BRAMAN; HOGREFE, 1996; NAVARRO et al, 2014). Contudo, uma justificativa para a não amplificação dos primers poderia ser a própria sequência que foi selecionada para o desenho dos primers.Pois a quantidade de sequências disponíveis no NCBI para esta espécie eram poucas (~300 sequências). Além disso, deve-se considerar a fidedignidade das próprias sequências.

Ainda assim, em 2015, Vega et al. publicaram um trabalho onde o sequenciamento do genoma de um espécime de broca fêmea foi realizado. Então foi utilizado a sequência >scaffold1 61.4 para o desenvolvimento do método (Figura 46).Foi utilizado o programa ReaptMasker com o objetivo de mascarar regiões de baixa complexidade da sequência.

```
>scaffold1 61.4
TACATATACATATAGGTATATATACCAGTTGCCTGAGCGAATCTTTTTAAAATCTCGTTAGTTATTG
ATTTTGTTCAACTTCTCTTATACTTTCTCAAATTGAACTGCCTGCACCAATATAACAAAACAATTGT
CGCCTTGATTGCTAGAAACACCATACAATAATATTTCCCGTTGCGATCGATGTCTCATTAATTTCTT
CCGATAATCCAGTTACCCCCGCTGTCCACTTTACCGCCCCCCGGGGCGGCCTATCGGTCACGCAC
GTCGCCGTCAACATCAGGCGCTTGCCGGCCGTTTCGGGGGCCCCACGTCGGGCTATAGGCTCGAC
GACGTCGTTCCAAAAATCGATATAGGCTCCACTCATAAATAATGCATCGCAGTAGGCCAGGATCA
CCCCGCCTCTCGCGTCGCCTCGTGCACGCGACTCAATGTAATCTGTATATAGGACGGTACATACA
TATATATGTATATANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNTCTTTTGTTTTCGCACTCAATTGTCTATTGTTTGGTTTATTAATTATCGAGTAAATAT
TTGCACGTACTTATTGCTTGTTTTTTCTCGTTGTGTGTGTCTTAAAACAATCATTTTCACAATATACG
GAAAGGCATTAAATTTATTTAATTTAAAAATTGACAAACGCATATTAGAAATTGCCTTACAATTCAT
ACAAAACGAGTTGAATGAAGTTTCCGTAGCTGTTTTTTTTTTGACGAATTATATGTCAAGTTTGTATT
TGTATGAATTATACGGACGTAAGATAATATGTTTTTCGCCTTTTTCGACTGGGAAAAACGTTAACGT
GCGCCTCTGCCATTACGTATGTAAATTTATGCCTCCATTGTTTATGCACAAACGAAGATAACTGTC
AGGATTATGGTAATCCGACTCGGTGACGGTGTATTTTTTTCGTTATTTCTCGATTGTTTTGACATATG
GACGAATATGCCGCAAAAAAGTTATTGTCTTCTCCATTCCAGACTTGTTTTTCTTACAGAAAAAAT
AATAGAAAAAAATTANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTATTTCTT
GCGGTTTTTTTTCACAATTGTAGAGCCGCCTCTGTAAATGAATGCCGCCCTCGTGGCATGCAATCG
ACCCATATGTTTCCGTTCGACGGGCCCATTACTCAAATTATCGAGTCGATATTGTTTAATATGTTTA
TCGTAAACGAGTGGTCATTGAAATAAAAATGATGCTCAACTGAAGTAAAATTAGTTTACAGCGAAT
CAGACTGCAAAAAAAAAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGAACCGTT
CCATATTATGTATATACGTTGCAATTAACGGGTTATCGACATCTATTCGGAACTTTGTTTGAGCGTT
GTAAATAATAAGAAAAATATTAATATAATTTCCGTGAAAAGGCACGTGAAATTTATTCGAAACGTA
TTTCTAAACGTAGTTTAGCACGGTTACGGTAACGAGAAATTCGTGGCGGCACAATTAGTTCTTGGA
ACGCAGACGGTCGTTTATTTTACGATTACGGCTGCTGCTGTGCCAGATTAAGAGTTAAATTTAAAA
ATCCACAATGTTTGGACCTTGTCCATTGCCAATTCATCTATTTAGTCTAAATTAGACATTGACGGTT
TTCGAGAAATTAATTATTTTTCCTACTTGGGCAGTAGTAAATTTTAAAGTAAATACCTGAACAGGAT
```

Figura 46: Sequência de DNA de broca >scaffold1 61.4 utilizada para o desenvolvimento dos sistemas de detecção de broca. As letras N indicam as regiões que foram mascaradas através do programa ReaptMasker. O mascaramento da sequência permite a identificação e neutralização das regiões com repetições degeneradas de bases.

Para verificar a especificidade da sequência >scaffold1 61.4, foram realizadas análises de bioinformática utilizandoo programaBlast do banco de genomas de café CGH etambém o BLAST do NCBI.

A sequência de broca >scaffold1 61.4 não apresentou qualquer similaridade atravésdo programaBlast do CGH (Figura47).

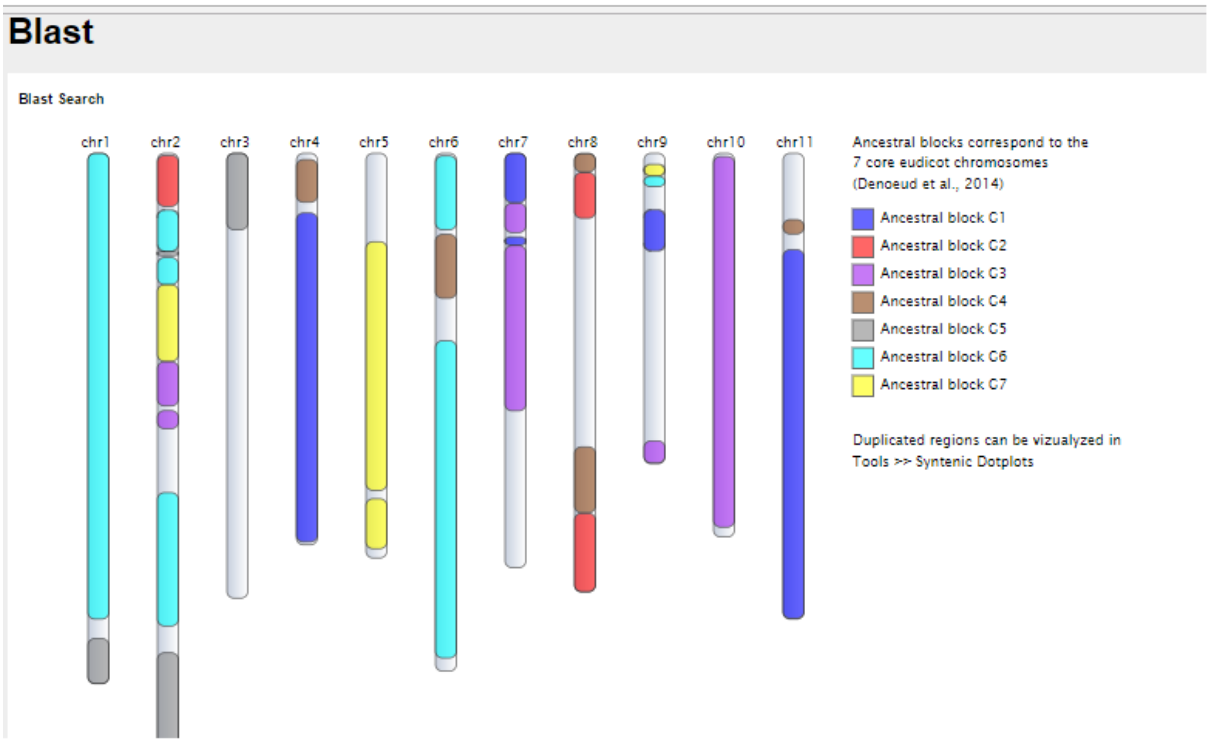
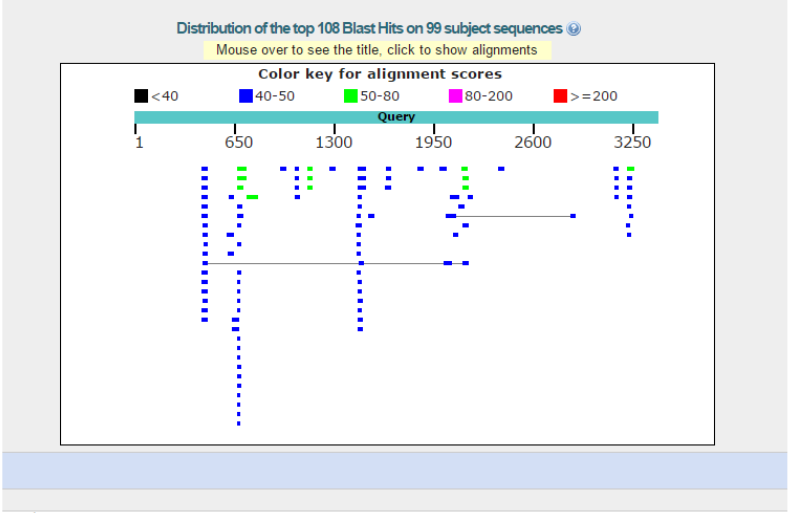


Figura 47: Análise de seletividade da sequência de DNA de broca >scaffold1 61.4 através da ferramenta Blast do banco de genomas de café onde está depositado o genoma completo de café da espécie *C. canephora*. A sequência >scaffold1 61.4 não apresentou qualquer similaridade com o genoma de café *C. canephora.*

Subsequentemente, a sequência >scaffold1 61.4 foi analisada través da ferramenta BLAST do banco de genomas do NCBI.

Quando a sequência >scaffold1 61.4 foi comparada com os genes do NCBI (BLAST-TN), poucas regiões foram similares (query cover de 1% com identidade de 87%). Como é possível observar na figura 48, que a maioria das espécies que apresentaram similaridade com o DNA de broca são do reino animal.



Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Human DNA sequence from clone RP11-388B24 on chromosome 9, complete sequence	59.0	59.0	1%	8e-04	87%	AL158047.9
Angiostrongylus costaricensis genome assembly A_costaricensis_Costa_Rica, scaffold ACOC_contig0000859	53.6	53.6	1%	0.036	87%	LK941461.1
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-135H16 in linkage group 23, complete sequence	53.6	53.6	1%	0.036	85%	CR339058.11
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-11F6 in linkage group 23, complete sequence	53.6	53.6	1%	0.036	85%	BX548074.9
Strongyloides venezuelensis genome assembly S_venezuelensis_HH1, scaffold SVE_scaffold0000095	51.8	51.8	1%	0.12	80%	LM525084.1
Strongyloides venezuelensis genome assembly S_venezuelensis_HH1, scaffold SVE_scaffold0000040	51.8	51.8	1%	0.12	80%	LM525009.1
Cyprinus carpio genome assembly common carp genome, scaffold: LG32, chromosome: 32	51.8	51.8	1%	0.12	86%	LN590696.1
Solanum lycopersicum chromosome ch10, complete genome	51.8	51.8	0%	0.12	97%	HG975522.1
Solanum lycopersicum chromosome ch03, complete genome	51.8	51.8	2%	0.12	78%	HG975515.1
Solanum pennellii chromosome ch10, complete genome	51.8	51.8	0%	0.12	97%	HG975449.1
Solanum lycopersicum strain Heinz 1706 chromosome 10 clone hba-172n10 map 10, complete sequence	51.8	51.8	0%	0.12	97%	AC240195.1
Saccharomyces paradoxus strain UWOPS91-917.1 chromosome XIV, complete sequence	50.0	50.0	0%	0.43	94%	CP020323.1
Saccharomyces paradoxus strain UFRJ50816 chromosome XII sequence	50.0	50.0	0%	0.43	94%	CP020304.1
Saccharomyces paradoxus strain YPS138 chromosome XIV, complete sequence	50.0	50.0	0%	0.43	94%	CP020289.1
PREDICTED: Ailuropoda melanoleuca sirtuin 4 (SIRT4), transcript variant X1, mRNA	50.0	50.0	0%	0.43	100%	XM_019792799.1
Kluyveromyces marxianus strain CBS4857 chromosome 2 sequence	50.0	50.0	1%	0.43	86%	CP015055.1
PREDICTED: Poecilia mexicana uncharacterized LOC106915532 (LOC106915532), ncRNA	50.0	50.0	0%	0.43	94%	XR_001417810.1
PREDICTED: Papilio polytes protein PIH1D3 (LOC106099568), mRNA	50.0	50.0	1%	0.43	89%	XM_013278136.1
Strongyloides venezuelensis genome assembly S_venezuelensis_HH1, scaffold SVE_scaffold0000050	50.0	50.0	1%	0.43	86%	LM525021.1
Clostridium botulinum Prevot_594 genome	50.0	50.0	0%	0.43	94%	CP006902.1

Figura 48: Análise de seletividade da sequência de DNA de broca >scaffold1 61.4 através da ferramenta BLAST-TN do NCBI. Poucas regiões de similaridade foram observadas entre a sequência de DNA de broca em relação as sequências de DNA depositadas no NCBI. Os pontos azuis e verdes demonstram as regiões de similaridade da sequência >scaffold1 61.4 com outras espécies.

Quando a sequência >scaffold1 61.4 foi comparada com tribo Coffeeae através da análise BLAST-TN também poucas regiões foram similares (Figura 49).

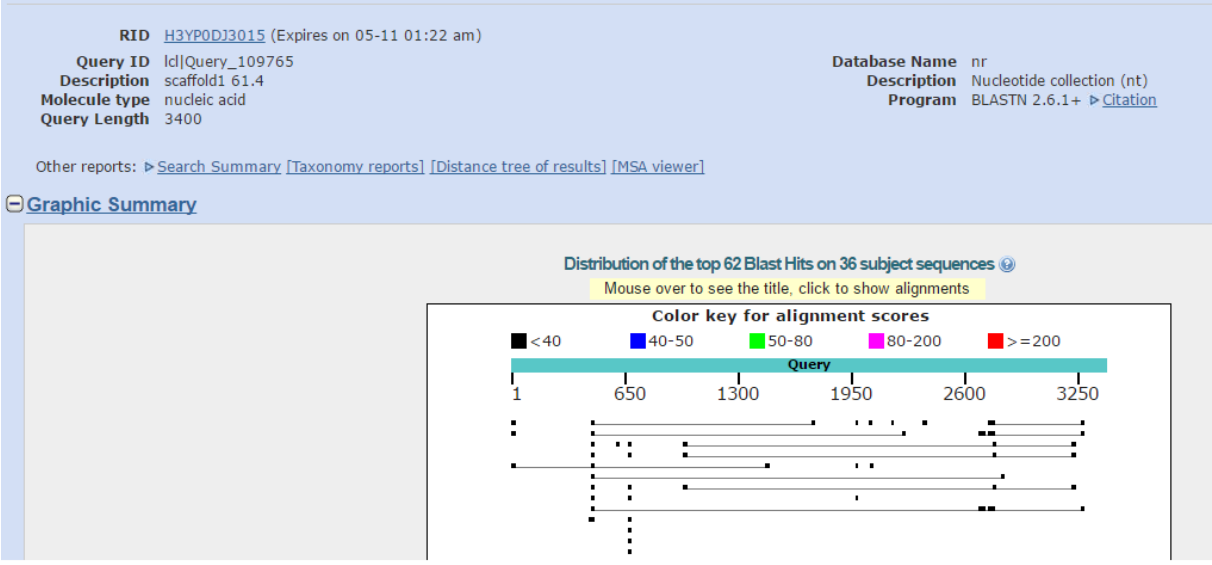


Figura 49: Análise de seletividade da sequência de DNA de broca >scaffold1 61.4 e a tribo Coffeeae, através da ferramenta BLAST-TN do NCBI. Poucas regiões de similaridade foram observadas entre a sequência de DNA de broca e a tribo Coffeeae. Os pontos pretos demonstram essas pequenas regiões de similaridade.

Os resultados das análises *in silico* indicam que a sequência >scaffold1 61.4 é seletiva para a broca do café.

ANÁLISES*IN VITRO*- Três novos primers foram desenhados e sintetizados utilizando a sequência >scaffold1 61.4 como DNA molde (Tabela 9).

Tabela 9: Primers desenhados para a broca do café *H. hampei* através da sequência >scaffold1 61.4.

	Hypothenemushampei				
	Sequência	<-->	TmºC	GC%	Amplicon
Hham 1	F-GTCGTAATGGCACCGTTCTT	20 pb	55,4	50.0	79 pb
	R-GTCCTTTGCAGCAACAACAA	20 pb	54,4	45.0	
Hham 2	F-TCGGATCGAGATCGTCGAA	19 pb	55,3	52.6	73 pb
	R-CCTGTCGACGGGCTATAAAAAC	22 pb	55,8	50.0	
Hham 3	F-GCCTTGATTGCTAGAAACACCAT	23 pb	55,7	43.0	84 pb
	R-GGTAACTGGATTATCGGAAGGAAA	24 pb	54,5	41.7	

Pb: pares de bases. GC%: quantidade em percentual de guanina e citosina. Tm: temperatura de anelamento. Amplicon: comprimento do produto de PCR produzido pelo primer. F: forward primer. R: reverse primer.<-->: quantidade de bases do primer

Diferente dos primers previamente desenvolvidos, os primers Hham 1, 2 e 3 9 (n=3) amplificaram com sucesso (Hham 1Ct= 16,85±0,08; Hham 2 Ct=17,44±0,14; Hham 3

Ct=16,77±0,06) durante as análises de seletividade (Figura 50). Os primers apresentaram temperaturas de anelamento específicas de 78,4; 79,2 e 76,4 ºC para os primers Hham 1, 2 e 3, respectivamente (Figura 51).

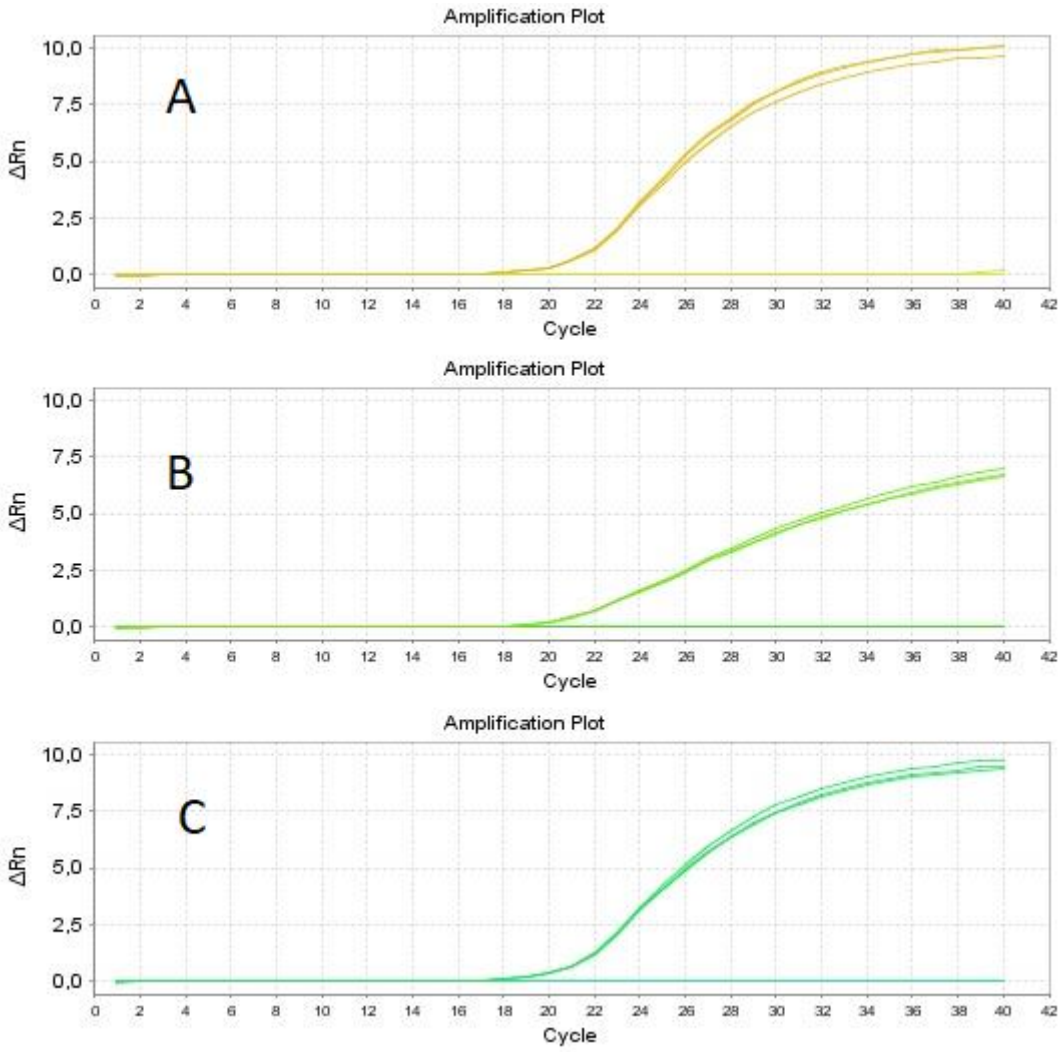


Figura 50: Análise de seletividade dos primers Hham 1 (A), 2 (B) e 3 (C) com DNA genômico de broca (n =3). Controle negativo água ultrapura. Todas as amostras amplificaram com sucesso. ΔRn: intensidade do sinal fluorescente normalizado pela referencia interna da reação.

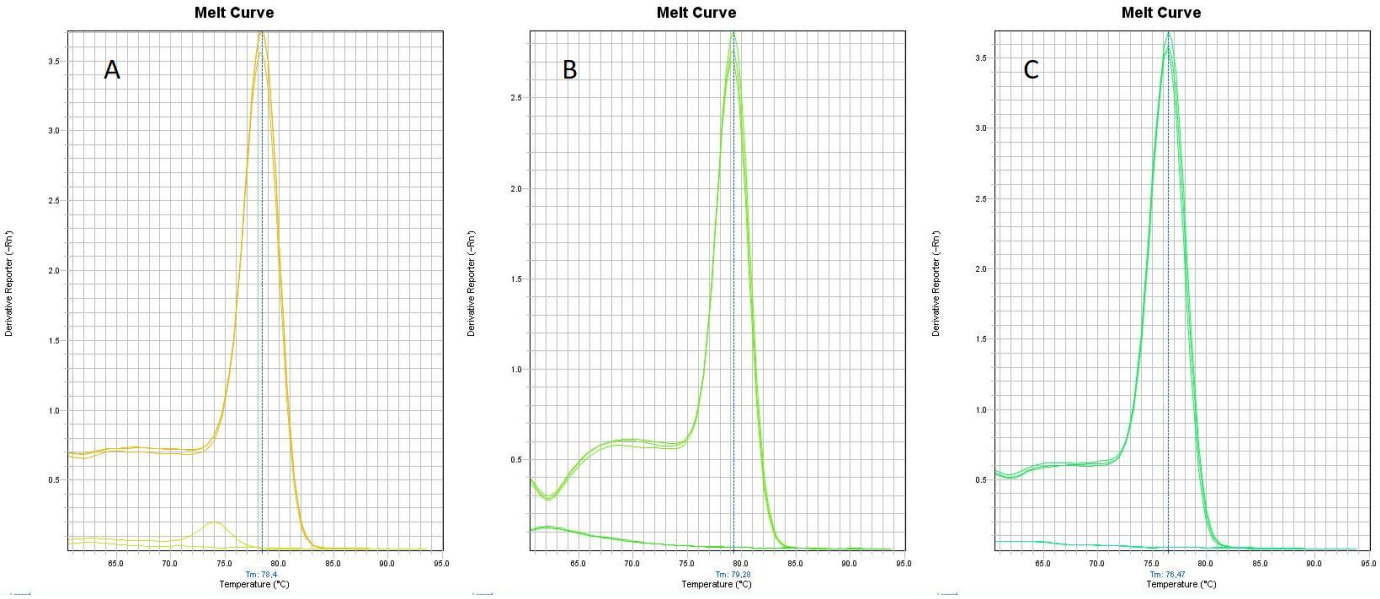


Figura 51: Curva de dissociação dos primers Hham 1 (A), 2 (B) e 3 (C), com DNA genômico de broca (n=3). Com controle negativo água ultrapura. Os primers apresentaram temperatura de anelamento específico de 78,4; 79,2 e 76,4 ºC para os primers Hham 1, 2 e 3, respectivamente. ΔRn: magnitude do sinal gerado por um determinado conjunto de condições da PCR.

Como os três pares de primers amplificaram com sucesso, estes foram então submetidos a análise de especificidade. A análise de especificidade foi realizada em duas etapas. Na primeira,a reação foi conduzida utilizando os primers Hham 1, 2 e 3 com DNAs genômicos de café das espécies *C. arabica* (var. Catuaí Açu, Bourbon Amarelo, Icatu Amarelo, e Iapar 59) e *C. canephora*(var. Conilon, Robusta e BRS) (n=3). Na segunda etapa, a reação foi conduzida utilizando os primers que foram mais específicos na primeira etapa com DNAs genômico de cevada, milho, arroz, soja, trigo, centeio, chicória e os espécimes do reino animal formiga, barata, mosca e aranha.

O primer Hham 1 apresentou amplificações tardias e não específicas com o DNA genômico de café *C. arabica* variedade Icatu, Café arabica, Bourbon Amarelo e Iapar 59. Contudo, nestas condições ocorreu amplificação tardia (Ct=34,53±0,26) porem específica nas amostras Mundo Novo (Figura 52).

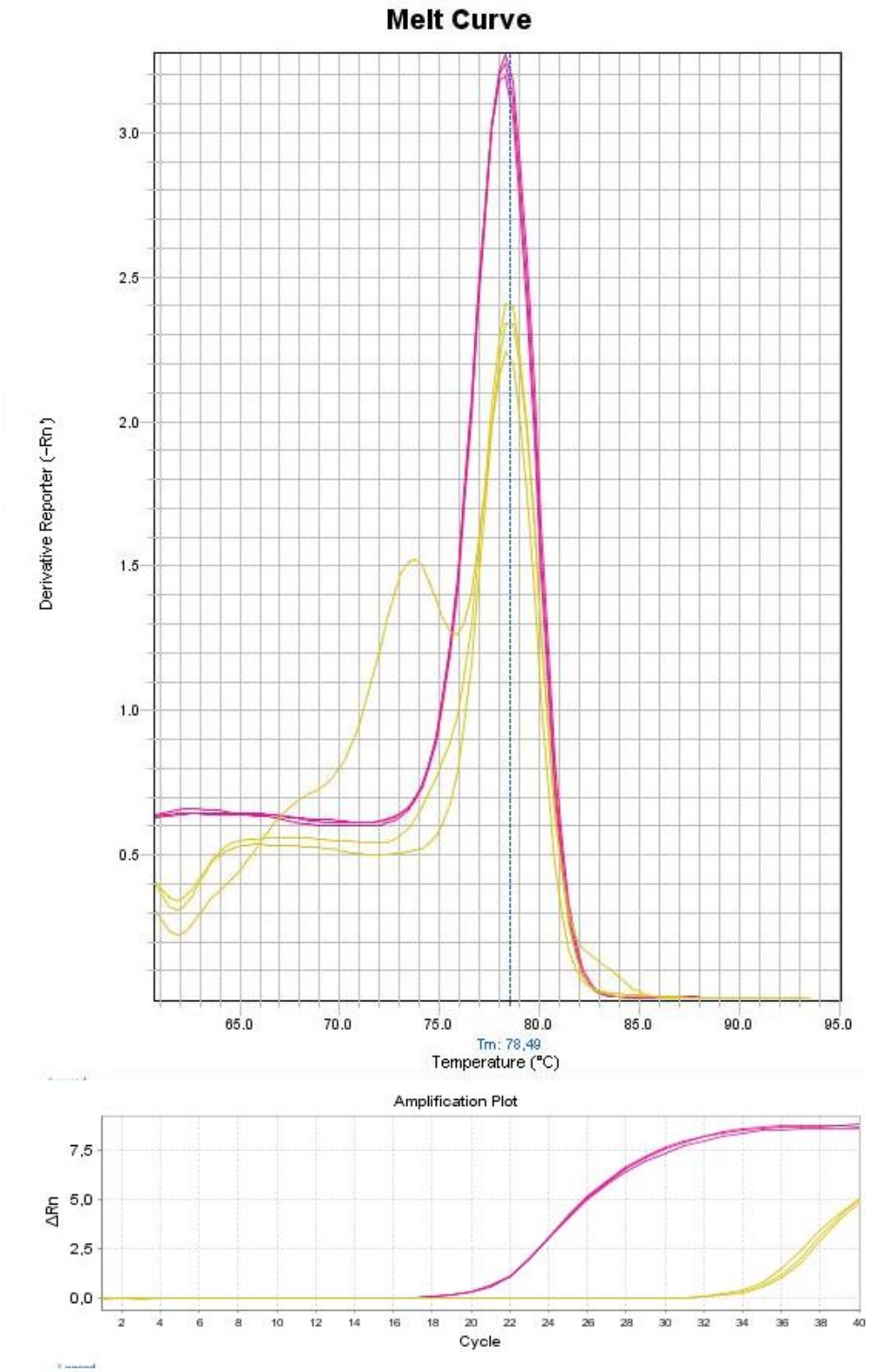


Figura 52: Curva de amplificaçãoe dissociação com o primer Hham1com DNA de *C. arabica* var. Mundo Novo. Linhas lilás: primer Hham1 com DNA genômico de broca. Linhas amarelas: primer Hham1 com DNA genômico de café (Ct=34,53±0,26). Através da curva de dissociação é possível observar que ocorreu amplificação especifica com esta variedade (Tm igual a 56 Cº).

ΔRn: intensidade do sinal fluorescente normalizado pela referencia interna da reação. ΔRn: intensidade do sinal fluorescente normalizado pela referencia interna da reação.

Todas as três variedades de café da espécie *C. canephora* também amplificaram (Ct=30,70±2,81) de forma especifica com o primer Hham1 (Figura 53).

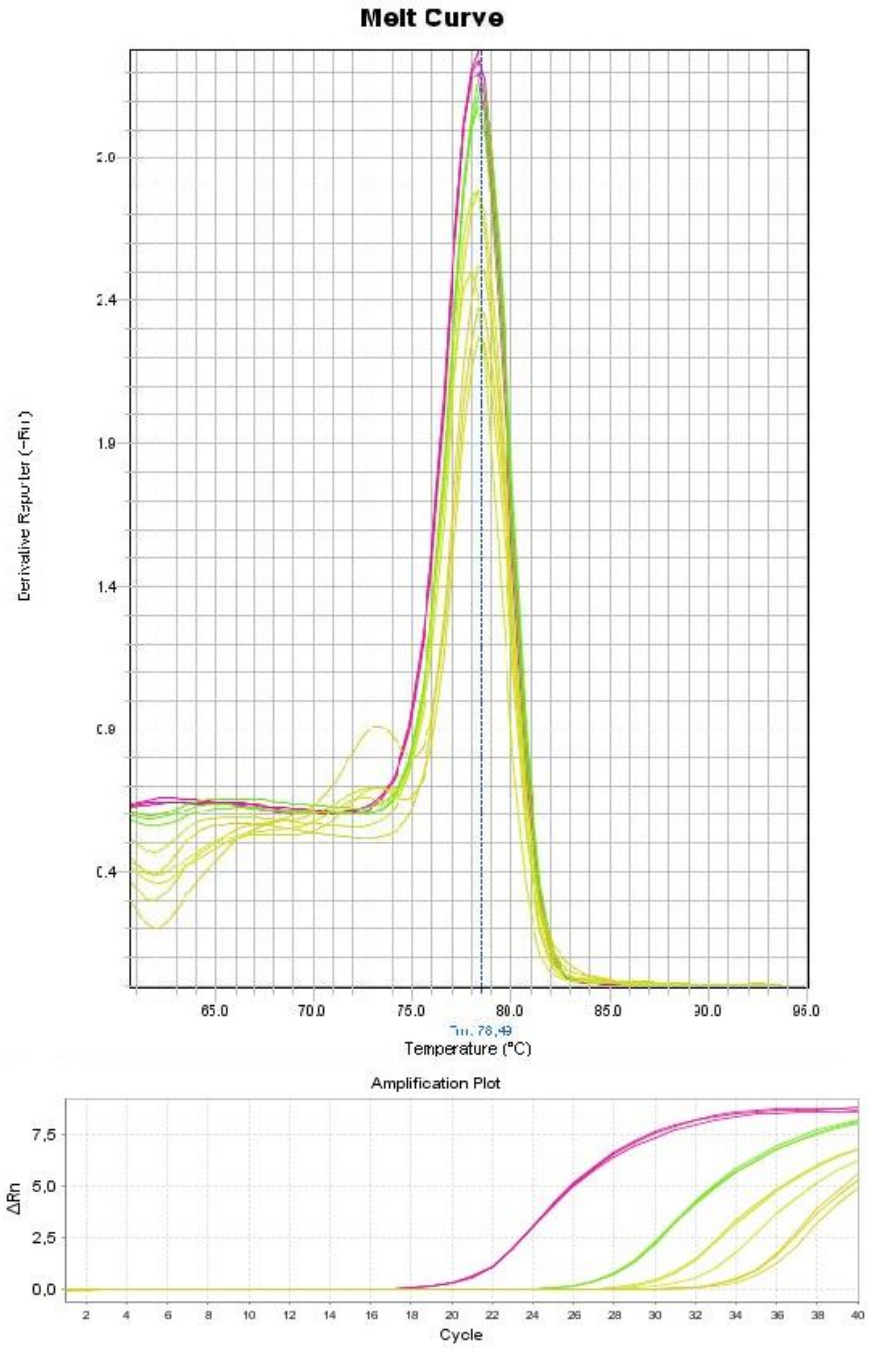


Figura 53: Curva de amplificação e dissociação com o primer Hham1 com DNA de *C. arabica* var. Mundo Novo. Linhas lilás: primer Hham1 com DNA genômico de broca. Linhas amarelas

e verdes: primer Hham1 com DNA genômico de café (Ct=30,70±2,81). Através da curva de dissociação é possível observar que ocorreu amplificação especifica com esta variedade com (Tm igual a 56 Cº). ΔRn: intensidade do sinal fluorescente normalizado pela referencia interna da reação.

Nenhuma das amostras de café *C. arabica* amplificaram com o primer Hham2 exceto a variedade Mundo Novo (Figura 54).

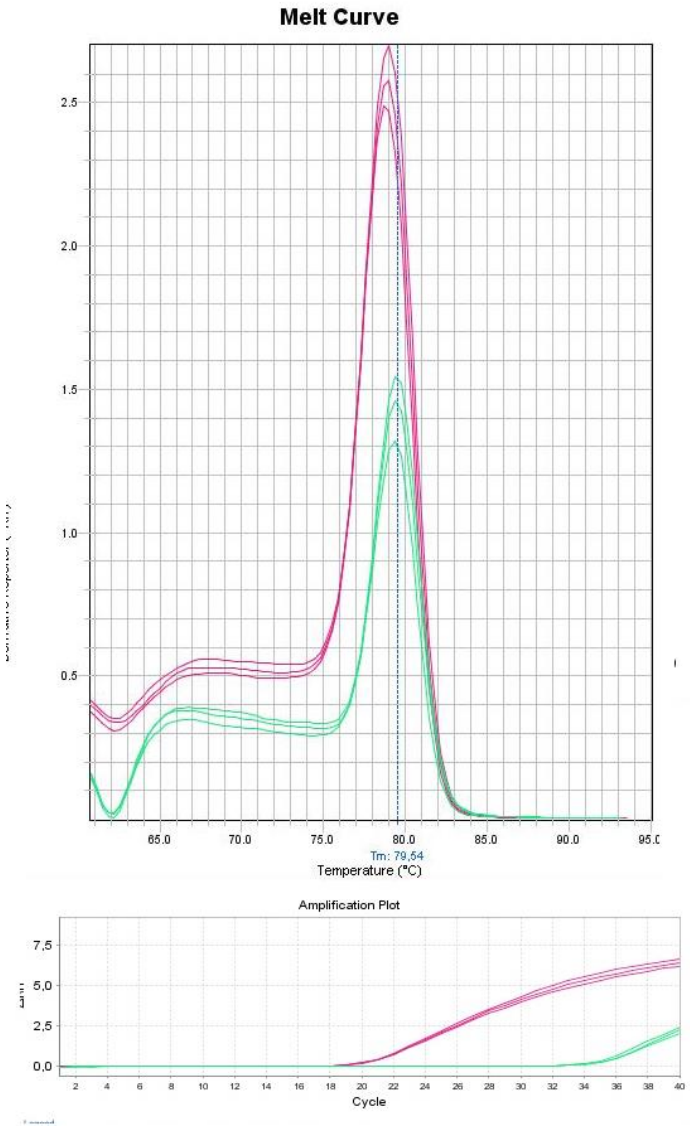


Figura 54: Curva de amplificação e dissociação com o primer Hham2 com DNA de *C. arabica* var. Mundo Novo. Linhas lilás: primer Hham1 com DNA genômico de broca. Linhas verdes: primer Hham1 com DNA genômico de café (Ct=35,75±0,20). Através da curva de dissociação é possível observar que ocorreu amplificação especifica com esta variedade com (Tm igual a 56 Cº). ΔRn: intensidade do sinal fluorescente normalizado pela referencia interna da reação.

Com relação aos cafés da espécie *C. canephora* o primer Hham2 apresentou o mesmo perfil de amplificação do primer Hham1 (Figura 55).

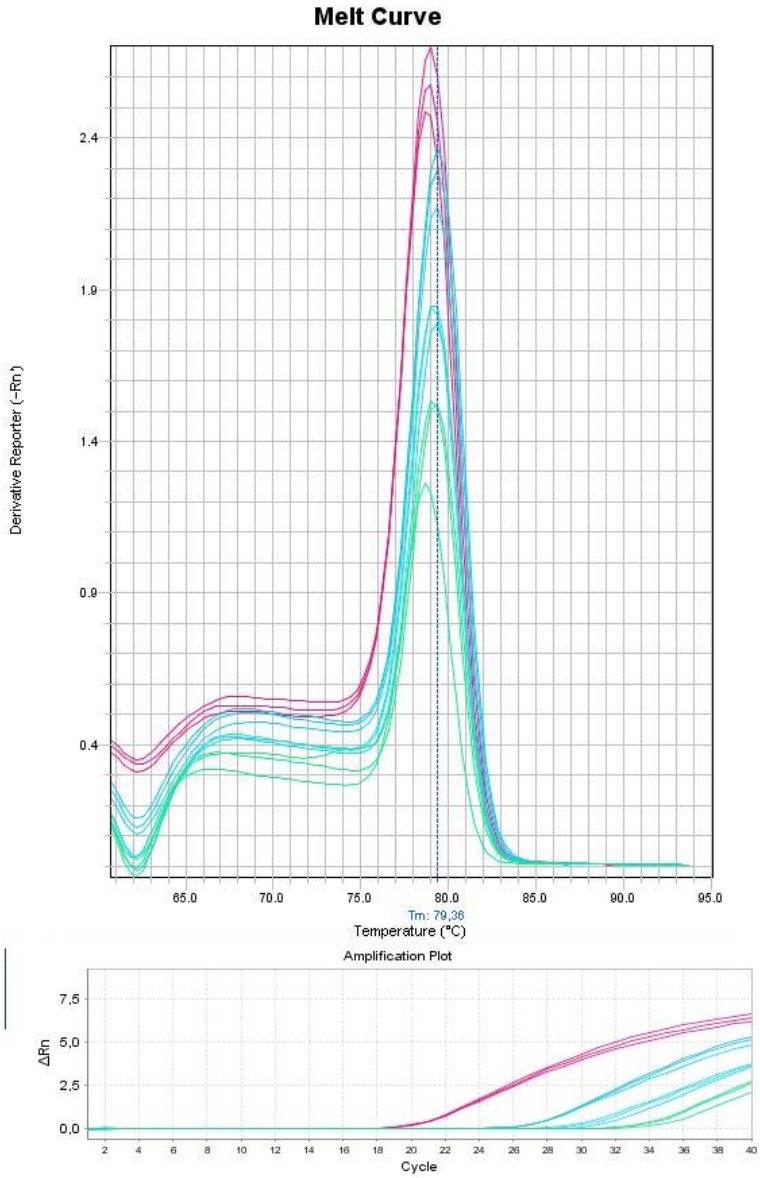


Figura 55: Curva de amplificação e dissociação com o primer Hham2 com DNA de *C. canephora* var. Robusta, Conilon e BRS. Linhas lilás: primer Hham1 com DNA genômico de broca. Linhas verdes e azuis: primer Hham1 com DNA genômico de café (Ct=31,39±2,87). Através da curva de dissociação é possível observar que ocorreu amplificação especifica com esta variedade (Tm igual a 56 Cº). ΔRn: intensidade do sinal fluorescente normalizado pela referencia interna da reação.

Assim como ocorreu com os primers Hham1 e Hham2 o par de primer Hham3 também amplificou de forma específica como DNA de café *C. arabica* var. Mundo Novo e café *C. canephora* var. Robusta, Conilon e BRS (Figura 56).

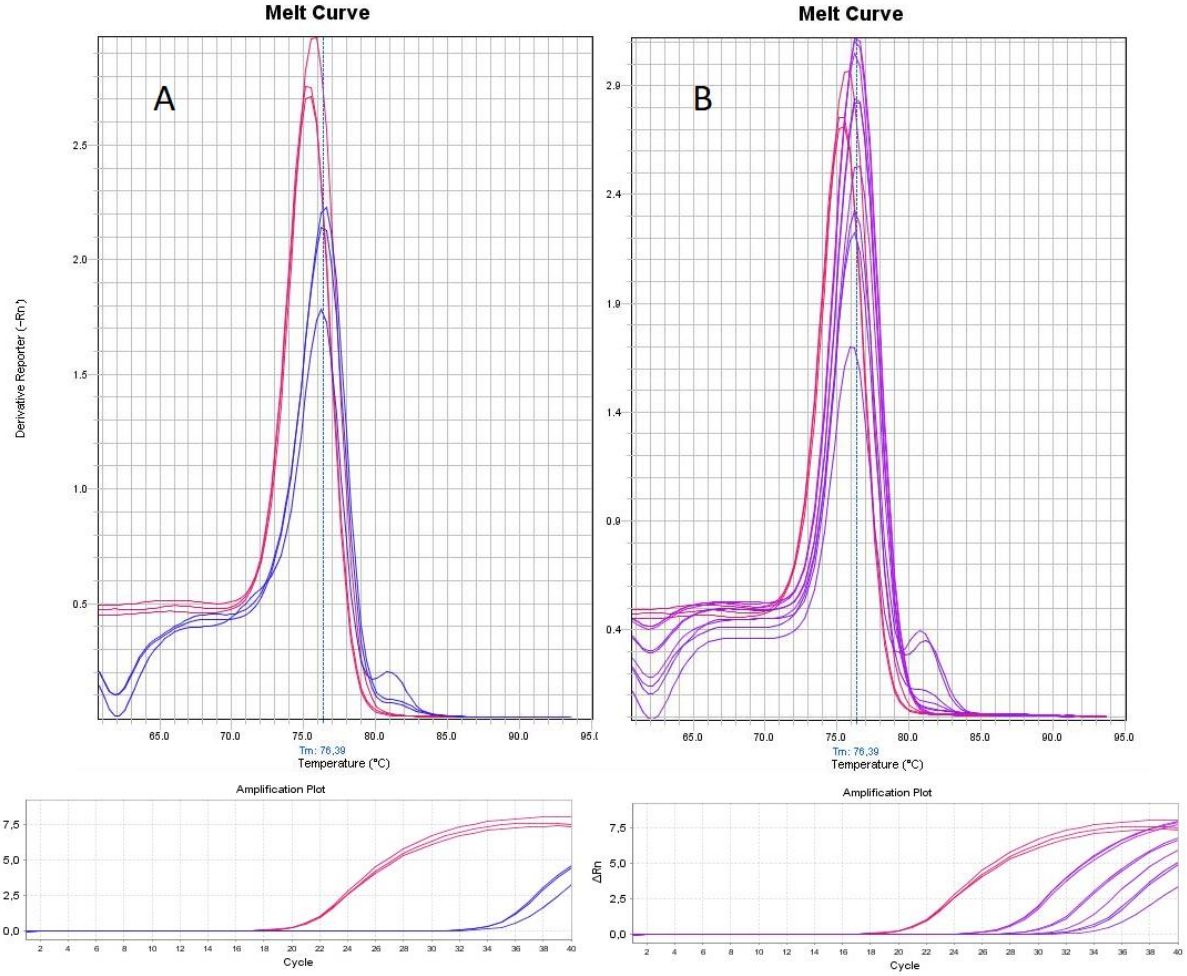


Figura 56: Curva de amplificação e dissociação com o primer Hham3 com DNA de Café *C. arabica* **A** (var. Mundo Novo) e *C. canephora I***B** (var. Robusta, Conilon e BRS). Linhas rosas: primer Hham1 com DNA genômico de broca. Linhas roxas e azuis: primer Hham1 com DNA genômico de café Mundo Novo (Ct=34,90±0,60) e café Robusta, Conilon e BRS (Ct=30,97±2,67). Através da curva de dissociação é possível observar que ocorreu amplificação especifica com estas variedades (Tm igual a 56 Cº). ΔRn: magnitude do sinal gerado por um determinado conjunto de condições da PCR. ΔRn: intensidade do sinal fluorescente normalizado pela referencia interna da reação.

Dos três pares de primers desenvolvidos, o primer Hham2 obteve melhor resultado com relação a sua especificidade, considerando as amostras da espécie de café *C. arabica*. Com

objetivo de alcançar mais especificidade. novas análises foram realizadas com temperatura de anelamentosuperior (58ºC).

Mesmo com o aumento da temperatura para 58ºC a reação com o primer Hham2 ocorreu com sucesso (Ct = 20,25±0,03). Com o aumento da temperatura nenhuma amostra de café da espécie *C. arabica* amplificou (Figura 57).

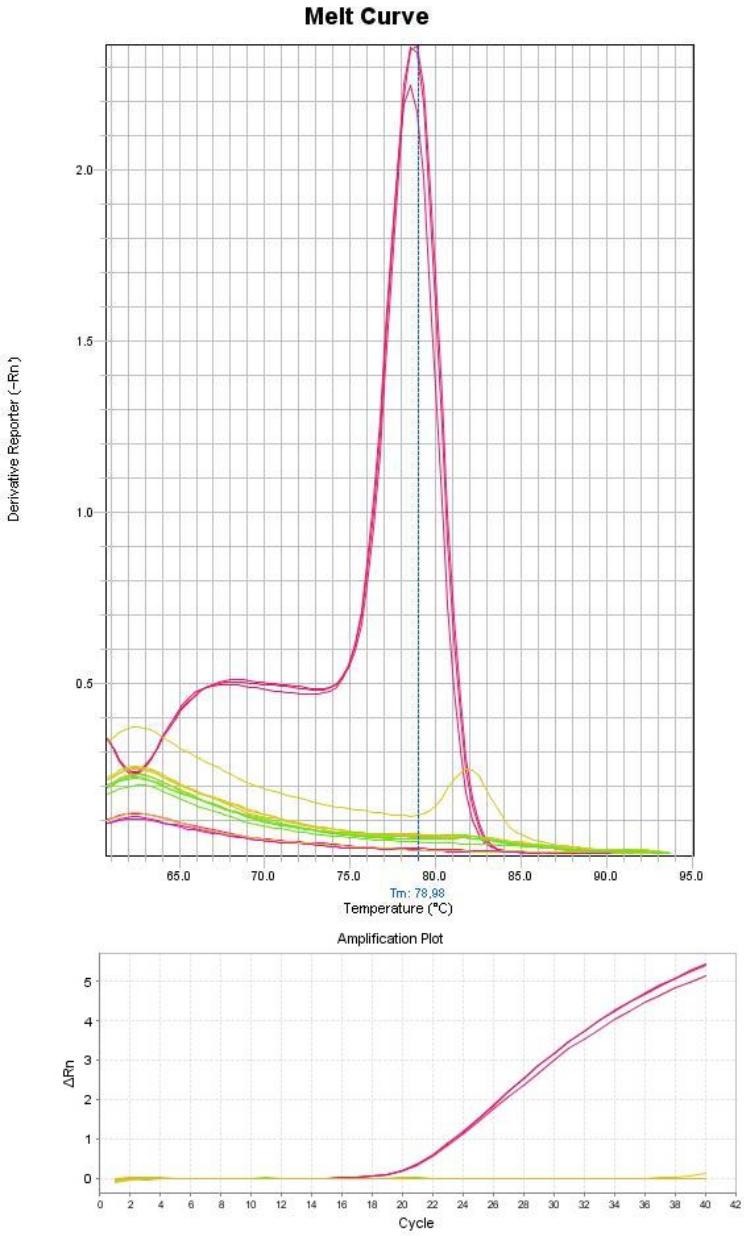


Figura 57: Curva de amplificação e dissociação com o primer Hham2 e DNA de café *C.arabica* (Mundo Novo, Catuaí Açu, Bourbon Amarelo, Icatu Amarelo, e Iapar 59). Linhas rosas: primer Hham2 com DNA genômico de broca (Ct = 20,25±0,03). Linhas verdes e amarelas: primer Hham1 com DNA genômico de café. O primer Hham2 foi específico para broca com Tm igual a 58 Cº. ΔRn: intensidade do sinal fluorescente normalizado pela referencia interna da reação.

Embora os resultados de especificidade com o primer Hham2 tenham sido satisfatórios, quando analisados com DNA de variedades de café *C. arabica*, o mesmo perfil de amplificação específica com as amostras de café *C. canephora* se repetiu (Figura 58).

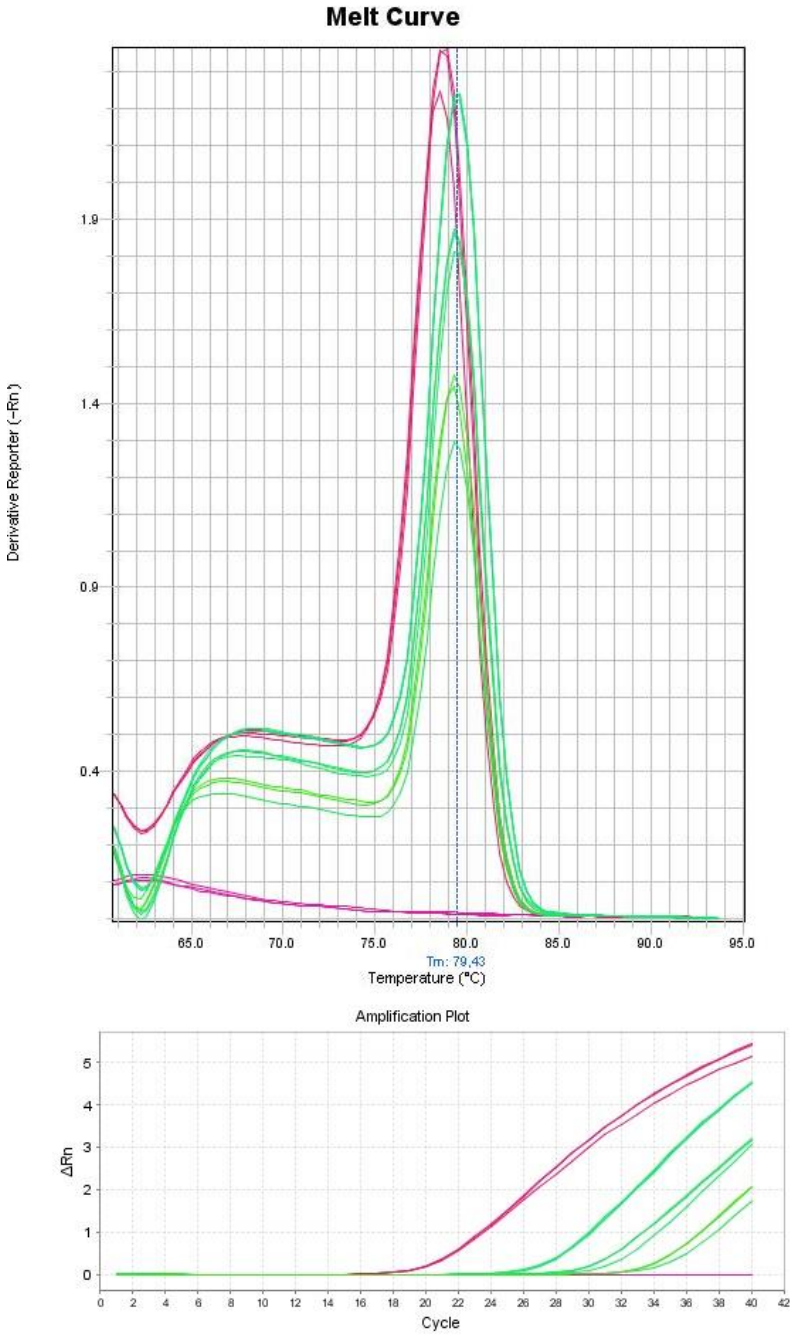


Figura 58: Curva de amplificação e dissociação com o primer Hham2 e DNA de café *C. canephora* (Robusta, Conilon e BRS). Linhas rosas: primer Hham2 com DNA genômico de broca (Ct = 20,25±0,03). Linhas verdes: primer Hham1 com DNA genômico de café (Ct = 30,55±2,85). O primer Hham2 não foi específico quando a reação foi realizada com amostras de café *C. canephora* com Tm igual a 58 Cº. ΔRn: intensidade do sinal fluorescente normalizado pela referencia interna da reação.

As análises *in vitro* parece ser conflitante com as análises *in silico*. OBlast do CGH não havia apresentado qualquer região de similaridade entre as espécies de café (*C. canephora*) e a sequência >scaffold1 61.4 de broca (*H. hampei*).

Diante deste cenário, novas amostras de café *C. canephora* foram adquiridas diretamente da fazenda experimental de café *C. canephora* da Universidade Federal Rural do Rio Janeiro, Seropédica, RJ. Novas análises foram conduzidas com o objetivo de verificar se as amostras de café *C. canephora* estavam brocadas ou contaminadas com broca. Para estas análises dois tipos de controles foram assumidos, o controle negativo padrão (água ultrapura, n=3) e dois controles positivos. Para tal, foi utilizado o primer Café1 com o DNA das novas amostras de cafés, que foi desenvolvido previamente, e o primer Hham2 com DNA de broca. Desta maneira, si não houver amplificação entre o DNA de café e o primer para broca, ficará descartada a hipótese do falso negativo. A reação foi realizada em decaplicata.

Como o esperado os controles negativos (água ultrapura) do primer Hham2 e Café1 não amplificaram assim como os controles positivos (Hham2 + DNA de broca e Café1 + DNA de café) amplificaram perfeitamente (figura 59).

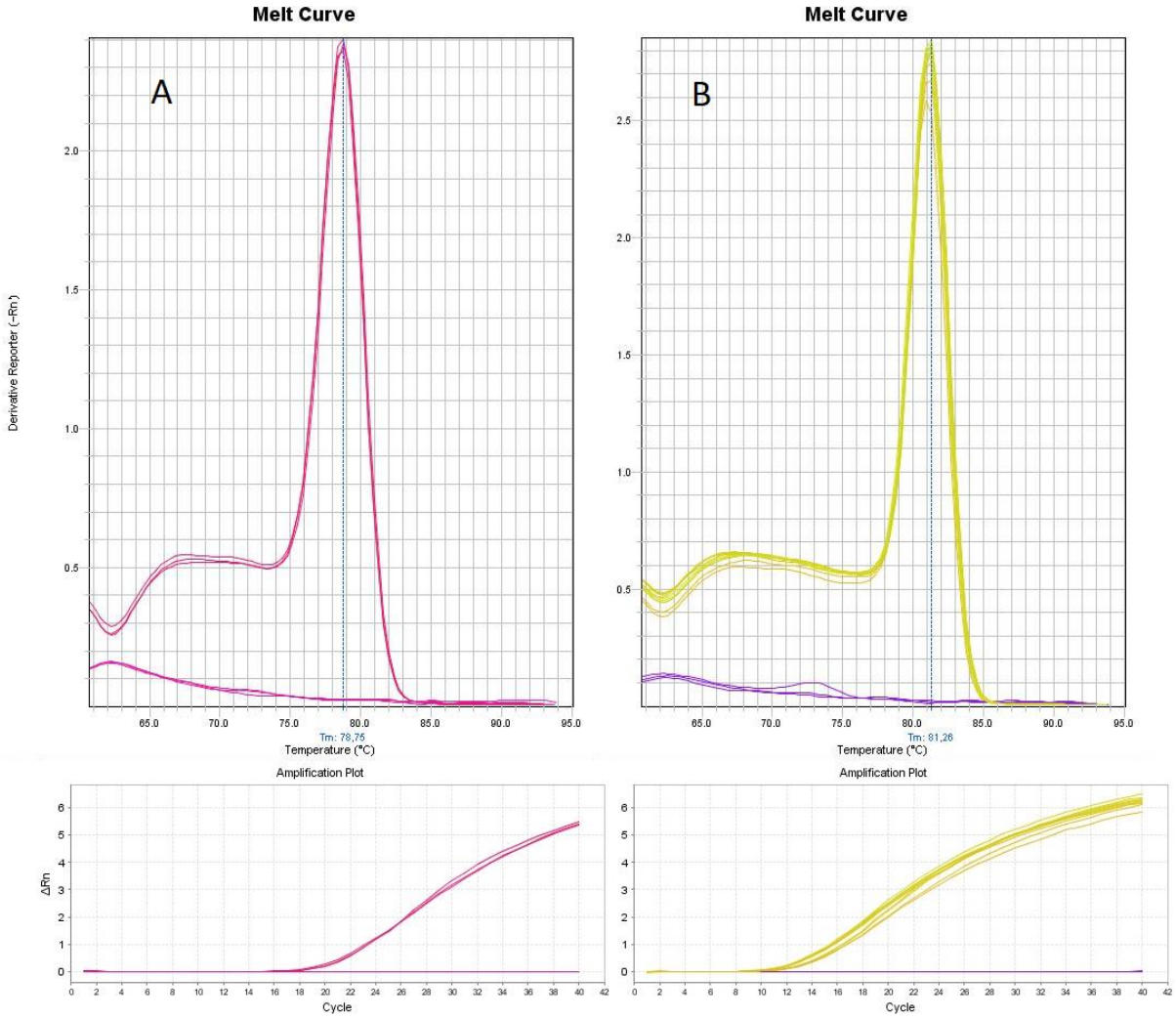


Figura 59: Curva de amplificação e dissociação dos primers Hham2 e Café1. **A:** Primer Hham2 com DNA de broca e água. **B:** Primer Café1 com DNA de café e água**.** Estes resultados indicam que não há contaminação de DNA na água utilizada na reação e nem dos equipamentos. ΔRn: intensidade do sinal fluorescente normalizado pela referencia interna da reação.

Com as novas amostras de DNA de café *C. canephora* o primer Hham2 não amplificou em nenhuma delas (Figura 60). Ao contrário, o primer Café1 amplificou perfeitamente, indicando a qualidade do DNA isolado e certificando que a não amplificação do primer Hham2 não foi devido a falso negativo.

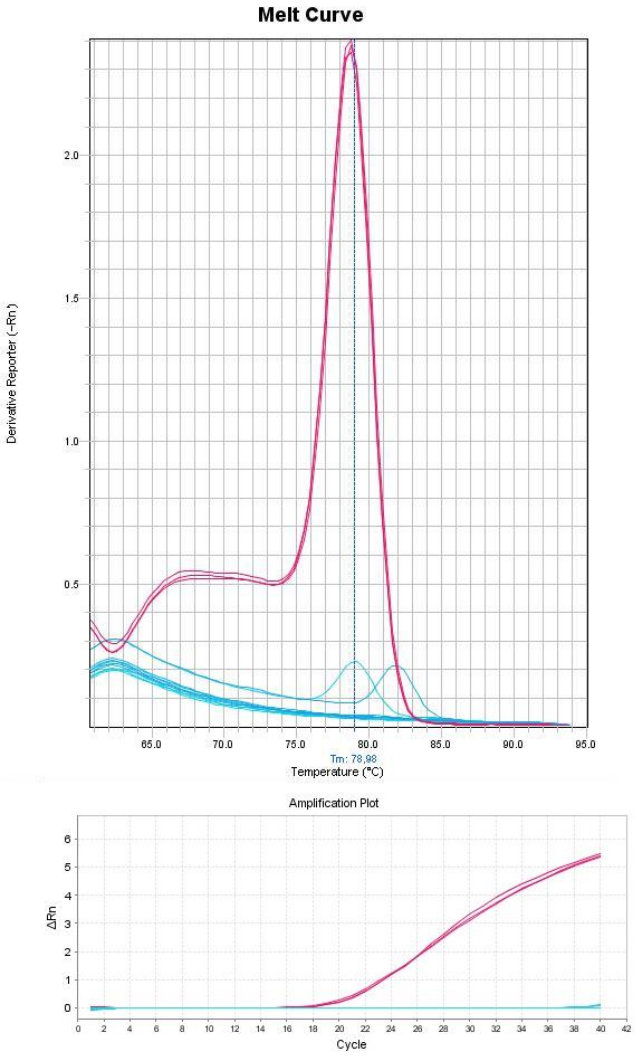


Figura 60: Curva de amplificação e dissociação do primer Hham2 e DNA de café *C. canephora* (n=10). Linhas rosas: primer Hham2 com DNA de broca (Ct= 20,83±0,20). Linhas azuis: primer Hham2 com DNA de café *C. canephora*. Não houve amplificação entre o primer Hham2 e o DNA de café. ΔRn: intensidade do sinal fluorescente normalizado pela referencia interna da reação.

Estes resultados indicam que as amostras estavam contaminadas com DNA de broca. Após estás análises foi observado que as amostras de café continham quantidade considerável de grãos brocados. A broca é um inseto pequeno e somente a fêmea perfura o grão. Uma vez que que o grão é perfurado, ela deposita os seus ovos dentro do fruto. Quando estes eclodem, somente as fêmeas deixam o fruto, os machos permanecem dentro do fruto até que alguma fêmea se aproxime do fruto para acasalar (VEGA et al, 2015).Desta forma, não é possível

identificar facilmente o grão brocado com análise visual. Ficou claro o porquê das amostras de café *C. canephora* amplificarem.

Além das análises com café a especificidade do sistema de detecção com o primer Hham2 foi avaliada também com de DNA de arroz, centeio, orégano, chicória, aveia, trigo, soja, açaí, cevada e milho (n=3).

As amostras de arroz, orégano, chicória, soja, açaí, cevada e milho não amplificaram ou obtiveram o Ct indeterminado (Figura 61).

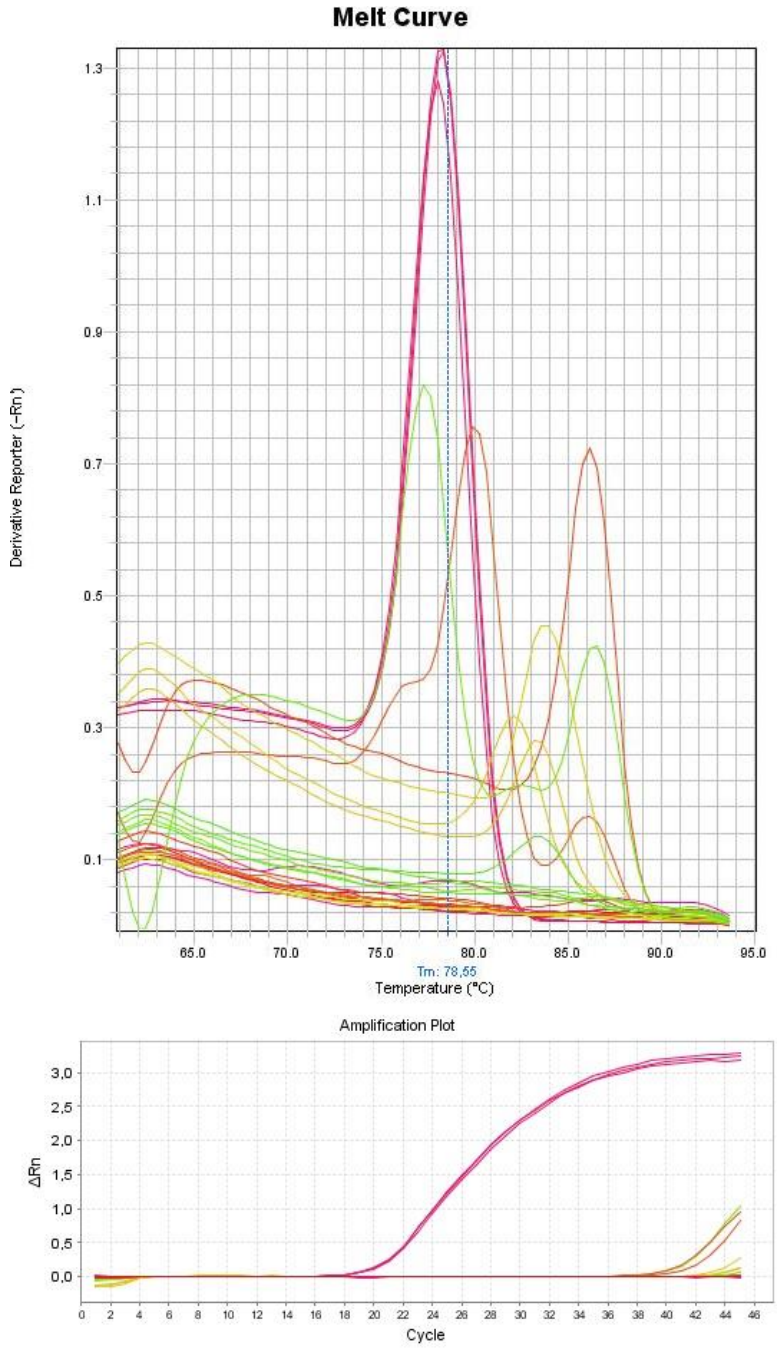


Figura 61: Curva de amplificação e dissociação do primer Hham2 e DNA de arroz, orégano, chicória, soja, açaí, cevada e milho (n=3). Linhas rosas: primer Hham2 com DNA de broca (Ct= 20,83±0,20). Linhas amarelas, vermelhas e verdes: primer Hham2 com DNA de arroz, orégano, chicória, soja, açaí, cevada e milho. É possível observar na curva de amplificação que poucas amostras amplificaram. E através da curva de dissociação é identificado que estas amplificaram de forma inespecífica. ΔRn: intensidade do sinal fluorescente normalizado pela referencia interna da reação.

Centeio, aveia e trigo apresentaram amplificação tardia (Ct= 33,89±0,39; 39,66±0,62; 34,32 ±0,78, respectivamente) e de forma inespecífica com Tm de 84,6 ºC; 81,7 ºC e 82,6 ºC, para centeio, aveia e trigo, respectivamente. Ao observar a figura 62 é possível diferenciar as amplificações específicas (~79 C) daquelas não específicas.

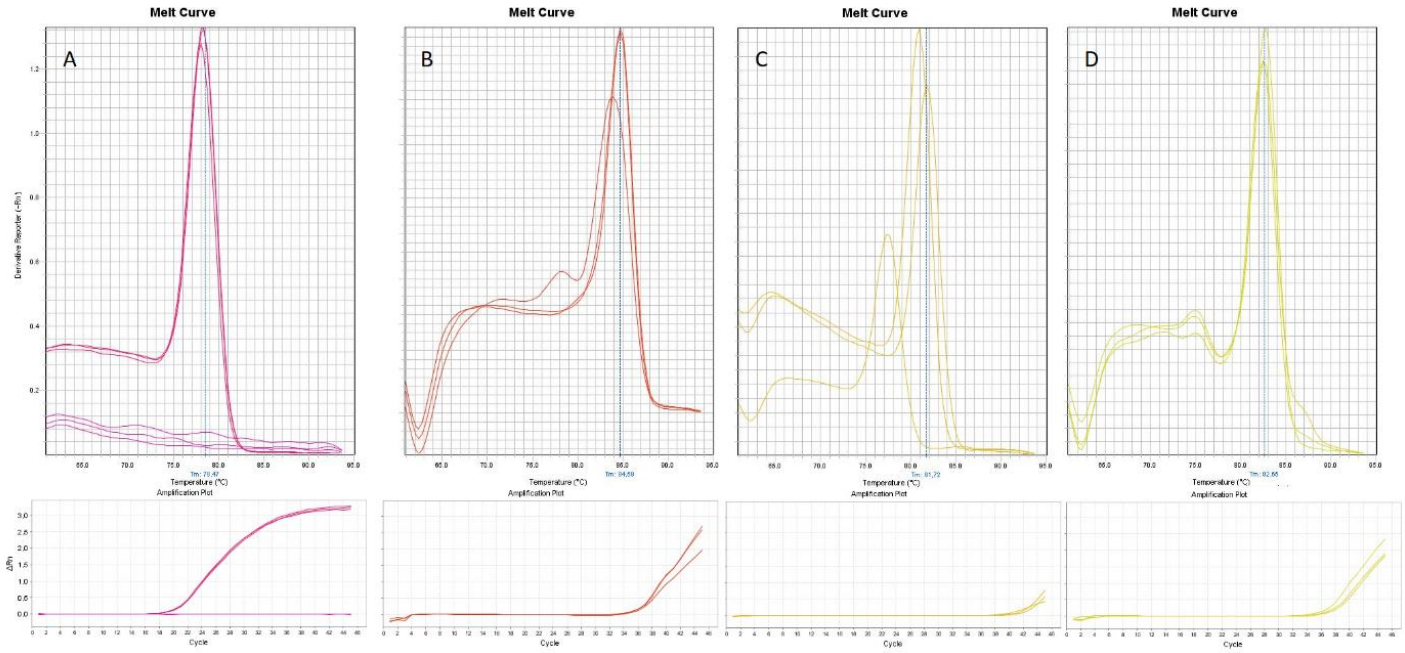


Figura 62: Curva de amplificação e dissociação do primer Hham2 com DNA de broca **A**, centeio **B**, aveia **C** e trigo **D** (n=3). Comparando as figuras **A**, **B**, **C** e **D**, é possível diferenciar as temperaturas de anelamento (Tm) entre o primer Hham2 com DNA de broca (alvo) e os demais alimentos. Centeio, aveia e trigo, apresentaram Cts tardios (Ct= 33,89±0,39; 39,66±0,62; 34,32 ±0,78, respectivamente). ΔRn: intensidade do sinal fluorescente normalizado pela referencia interna da reação.

Com o objetivo de avaliar a especificidade do primer Hham2 com relação a fonte de DNAs de animal, foi realizado reação de PCR em tempo real utilizando o primer Hham2 com DNA de aranha, formiga, formiga, barata e mosca.

O primer Hham2 também apresentou especificidade, mesmo quando analisado com espécimes do reino animal. Considerando a média dos Cts dos espécimes (Ct= 39,77±1,73) este foram ainda mais tardios quando comparados com os Cts das espécies vegetais.

Na figura 63 observa-se que o perfil daTm das amostras de aranha, formiga, formiga, barata e mosca foram acentuadamente diferentes da Tm do alvo (padrão, Hham2 com DNA de broca).

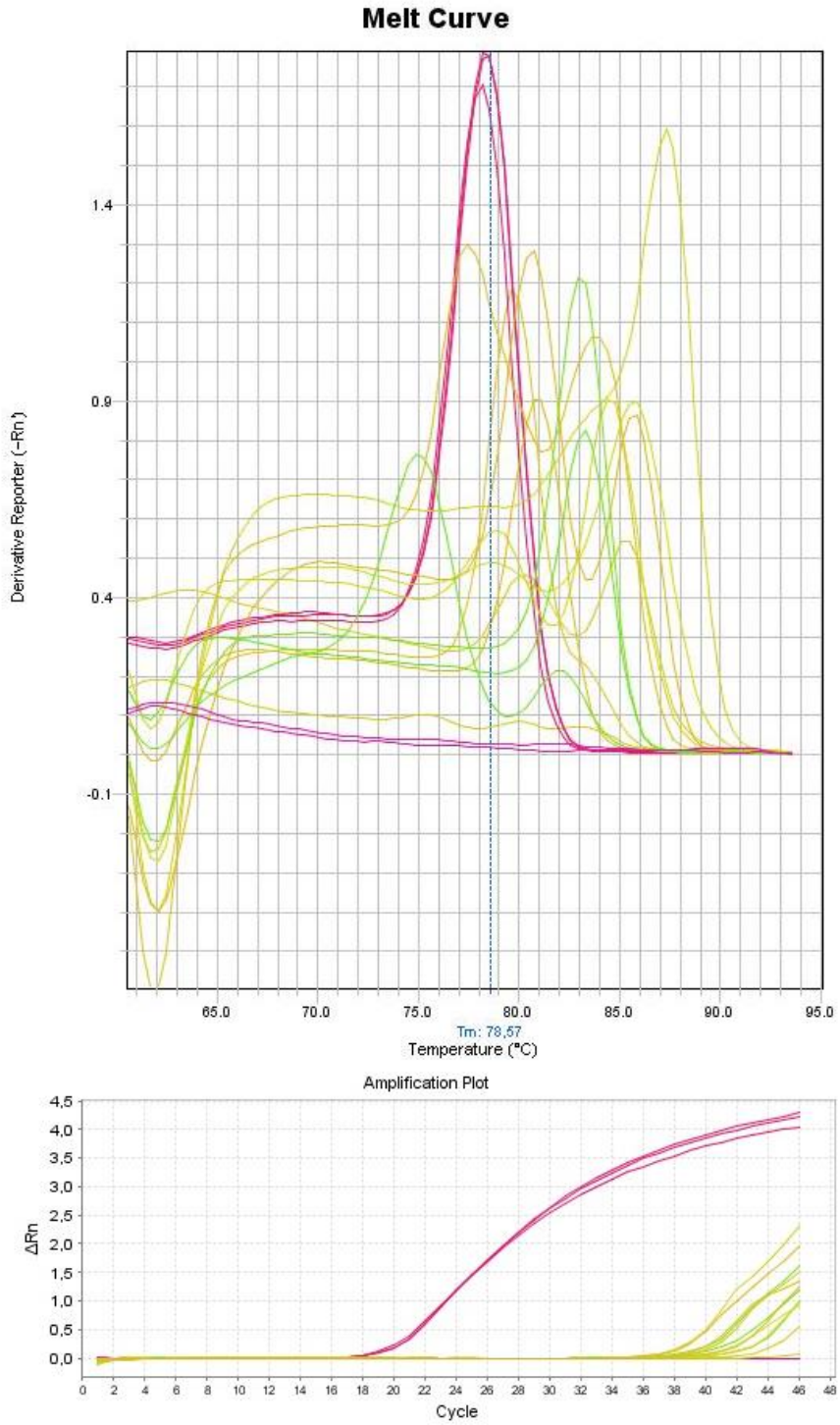


Figura 63: Curva de amplificação e dissociação do primer Hham2 e DNA de aranha, formiga, formiga, barata e mosca (n=3). Linhas rosas: primer Hham2 com DNA de broca. Linhas amarelas, beges e verdes: primer Hham2 com DNA de aranha, formiga, formiga, barata e mosca

(Ct= 39,77±1,73). O primer Hham2 apresentou especificidade mesmo quando analisado com espécimes do reino animal. ΔRn: intensidade do sinal fluorescente normalizado pela referencia interna da reação.

A amplificação não específica ocorre quando pequenas regiões do primer, na porção 3', se anelam em qualquer região do DNA ou quando o par de primers forma estruturas secundárias entre eles que permitem que a Taq polimerase reconheça a pentose 3' e inicie a polimerização indiscriminada da molécula de DNA. Com a curva de dissociação é possível identificar a amplificação não específica. As principais características da amplificação não específica são a amplificação tardia como também a Tm diferente da Tm do alvo (controle positivo) (RUIZ-VILLALBAA et al, 2017). A ocorrência da amplificação não específica significa que na ausência da região alvo alguns produtos de PCR podem ser produzidos.

CONCLUSÃO.

Foi possível desenvolver um par de primer específico para broca através de análises *in silico* e *in vitro*. Todas as amplificações inespecíficas foram devidamente identificadas demonstrando a seletividade e especificidade do método. E mesmo quando o DNA de espécimes do reino animal foi analisado com o primer Hham2 este obteve especificidade. Assim foi identificado e estabelecido uma região do genoma de broca que pode ser utilizada para a sua identificação através da técnica de PCR em tempo real com o sistema de detecção Sybr Green.

CAPÍTULO 4: CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pela primeira vez métodos moleculares baseados em DNA foram desenvolvidos para analisar a autenticidade e qualidade do café. Através das ferramentas de bioinformática, sequências de DNA - espécie específica, foram descobertas e testadas quanto a sua aplicação na análise do café. Em etapas futuras, métodos de extração de DNA mais eficazes serão desenvolvidos para serem aplicados em amostras torradas e moídas. Além disso, para a validação destes métodos estudos com materiais de referências certificados serão necessários com o objetivo de garantir a detecção e quantificação em amostras comerciais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Amboni, R. D. M. C., Francisco, A. & Teixeira, E. " Utilização de microscopia eletrônica de varredura para detecção de fraudes em café torrado e moído." **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** v.19, n.3, pp. 311–313, 1999.

Accum, F. C. (1820). *A Treatise on the Adulterations of Food, and Culinary Poisons*. Philadelphia : Printed and published by Ab'm Small.

Andreas D. Baxevanis. Bioinformatics and the internet; Bioinformatics: *A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*. USA: John Wiley & Sons, Inc. 2001.

Anthony. F., Berthaud. J., Guillaumet, J. L., Lourd, M. "Collecting wild Coffea species in Kenya and Tanzania." **Plant Genetic Resources**. v. 69, pp. 23–29, 1987.

Anthony, F., Combes, C., Astorga C., Bertrand, B., Graziosi, G., Lashermes, P. "The origin of cultivated Coffea arabica L. varieties revealed by AFLP and SSR markers." **Theoretical and Applied Genetics**. v. 104, n. 5, pp. 894-900, 2002.

Anthony, F., Diniz, L. E. C., Combes, M.C., Lashermes, P. "Adaptive radiation in *Coffea* subgenus *Coffea* L. (Rubiaceae) in Africa and Madagascar." **Plant Systematics and Evolution.** v. 285, pp. 51–64, 2010.

Anthony, F., Bertrand, B., Etienne, H., Lashermes, P. (2011). In C. Kole (Ed.), **Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Ferreira, T., Shuler, J., Guimarães, R., & Farah, A. (2019) Introduction to Coffee Plant and Genetics. In A. Farah (Ed.), **Coffee: Production, Quality and Chemistry.** London, Royal Society of Chemistry.

Aquino, F. J.T., Augusti, R., Alves, J. O., Diniz, M. E. R., Morais, S. A. L., Alves, B. H. P, .Sabino, A. A. " Direct infusion electrospray ionization mass spectrometry applied to the detection of forgeries: Roasted coffees adulterated with their husks."**MicrochemicalJournal.** v. 117, pp. 127–132, 2014.

Assad, A. E., Sano, E. E., Cunha, R. A. S., Correa, S. B. T., Rodrigues, R. H. "Identificação de impurezas e misturas em pó de café por meio de comportamento espectral e análise de imagens digitais." **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** v. 37, n. 2, pp. 211-216, fev. 2002.

Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC). Consumo Brasileiro de Café Cresce. Disponível em: http://abic.com.br/consumo-brasileiro-de-cafe-cresce-35-revela-pesquisa-da-abic/. Acesso em 27/01/2019.

Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC). Indicadores da indústria. Disponível em: http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#1910. Acesso em: 31/01/ 2013.

Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC). Norma de Qualidade Recomendável e Boas Práticas de Fabricação de Cafés Torrados em Grão e Cafés Torrados e Moídos. Disponível em: http://abic.com.br/src/uploads/2017/07/2.8.1-Norma-de-qualidade-PQC.pdf. Acessoem: 27/10/2019.

Atkins, P. J. (2013). "Social History of the Science of Food Analysis and the Control of Adulteration." In A. M. W. Belasco & P. Jackson (Eds.). **The handbook of food research.** pp. 97–108, Newyork, Bloomsbury Academic.

Anzueto, F., Baumann, T. W., Graziosi, G., Piccin, R. R., Söndahl, M. R., Van der Vossen, H. A. M. in *Espresso Coffee*, ed. A. I lly and R. Viani, Elsevier,London, 2005, p. 21.

Barros, N.E.F., Oliveira, E. M. M., Marin, V. A. "Applicability of the real-time polymerase chain reaction based-methods in quantification of genetically modified organisms in foods." **Journal of nutrition.** v.21, pp.85-92, 2008.

Bee, S., Brando, C. H. J., Brumen, G., Carvalhaes, N., Kolling-Speer, I.,Speer, K… et al. (2005). *The raw bean*. In: Illy A, Viani R, editors. Espressocoffee, the science of quality. (Italy): Elsevier Academic Press. pp. 87–178.

Berger, A., Brülhart, M., &Prodolliet, J. "Detection of adulteration in pure soluble coffee by enzymatic sugar determination."**Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie.** v.24, pp. 59-62, 1991.

Bernal, J. L., Del Alamo, M., and Del Nozal, M. J. "HPLC Analysis of carbohydrates in wines and instant coffees using anion exchange chromatography coupled to pulsed amperometric detection." **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 44, pp. 507–511, 1996.

Bertrand, B., Boulanger, R., Dussert, S., Ribeyre, F., Berthiot, L., Descroix, F., Joët, T. "Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green arabica coffee bean as well as coffee beverage quality." **Food Chemistry.** v. 135, n.4, pp. 2575–2583. Dez. 2012.

Blanc, M. B., Davis, G. E., Parchet, J. M., Viani, R. "Chromatographic profile of carbohydrates in commercial soluble coffees." **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.37, n.4, pp. 926 – 930, Jul. 1989.

Blanco, M., &Villarroya, I. "NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool." **Trends in analytical chemistry**, v. 21, n.4, pp. 240–250, 2002.

Bower, J. A. (1895). "Simple Methods for Detecting Food Adulteration." London, **Society for Promoting Christian Knowledge**. 1895.

Briandet, R., Kemsley, E.K., Wilson, R.H. "Approaches to adulteration detection in instant coffees using infrared spectroscopy and chemometrics." **Journal of the Science of Food and Agriculture.** v.71, pp. 359–366, 1996.

Bridson, D.M. "Studies in Coffea and Psilanthus for part of 'Flora of Tropical East Africa': Rubiaceae." **KewBulletin.** v. 36, pp. 817–860, 1982.

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

Brasil, Instrução normativa nº 98, do Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anexo 1. Regulamento técnico para o café torrado em grão e para o café torrado e moído. Diário oficial [da] República Federativa do Brasil, poder executivo, Brasília, DF, Brasília, 16 de maio de 2010.

Brasil, Instrução normativa nº 7, do Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário oficial [da] República Federativa do Brasil, poder executivo, Brasília, DF, Brasília, 22 de fev. 2013.

Cankar, K., Chauvensy-Ancel, V., Fortabat, M., Gruden, K., Kobilinsky, A., Bertheau, J. Y. "Detection of nonauthorized genetically modified organisms using differential quantitative polymerase chain reaction: application to 35s in maize." **Analytical Biochemistry.** v. 376, pp.189–199. 2008.

Cesar, C. L., Vargas, C. H., Lima, C. S., Filho, J. M., Miranda, M. "On the use of photoacoustic spectroscopy for investigating adulterated or altered powerd coffee samples."**Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 32, pp. 1355-1358, 1984. Clifford and K. C. Willson, Croom Helm.

Charrier, A.,Berthaud, J. 1985, *Coffee Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*, ed. M .N . Clifford and K. C. Willson, Croom Helm, London.

Codex Alimentarius Commission, Alinorm 10/33/23. Draft guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific dna sequences and specific proteins in foods, 2010.

CODEX (Codex Alimentarius Commission) (2018). History, Timeline [webpage]. Disponívelem: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/history/en/. Acesso em: 29 de Julho 2018.

Companhia Nacional de Abastecimento, CONAB 2019. Safra de café em 2018 é recorde e supera 61 milhões de sacas. Disponível em: https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/2626-producao-do-cafe-em-2018-e-recorde-e-supera-61-milhoes-de-sacas. Acesso em 03/02/2019

Cooperativa Regional de Cafeicultores em Guaxupé (COOXUPÉ). Disponível em: https://www.cooxupe.com.br/. Acesso em 16/09/2013.

Correia, R. M., Tosato, F., Domingos, E., Rodrigues, R. R. T., Aquino, L. F. M., Filgueirasa, P. R, .Romão, W. (2018). "Portable near infrared spectroscopy applied to quality control of Brazilian coffee." Talanta, v. 176, pp. 59–68, 2018.

Craig, A, P., Franca, A, S., Oliveira L, S. "Evaluation of the potential of FTIR and chemometrics for separation between defective and non-defective coffees." **Food Chemistry.** v. 132, pp.1368–1374. 2012.

Crawford. J. (1852). "History of Coffee." **Journal of the Statistical Society of London.** v. 15, n.1, pp. 50–58, 1852.

CRS (Congressional Research Service) (2014). "Food Fraud and Economically Motivated Adulteration of Food and Food Ingredients [webpage]." Disponível em: https://fas.org/sgp/crs/misc/R43358.pdf. Acesso em: 29 de Julho de 2018.

Cubero-Leon, E., Peñalver, R., &Maquet, A. (2014). "Review on metabolomics for food authentication." **Food Research International.** v.60, pp. 95–107, 2014.

Cubry, P., Bellis, F., Avia, K., Bouchet, S., Pot, D., Dufour, M., Legnate, H., Leroy, T. "An initial assessment of linkage disequilibrium(LD) in coffee trees: LD patterns in groups of*Coffeacanephora* Pierre using microsatelliteanalysis."**BMC Genomics**. v. 14. pp. 10. 2013.

Cubry, P., Bellis, F., Pot, D., Musoli P., Leroy, T. “Global analysis of *Coffeacanephora* Pierre ex Froehner (Rubiaceae) from the Guineo-Congolese region reveals impacts from climatic refuges and migration effects.” **Genetic Resources and Crop Evolution**. v. 60. n. 2, pp. 483-501. 2013.

Dahlgren, B. E. (1938).*Coffee. Field in a Popular Series, Botany*. Chicago, Field Museum of Natural History.

Daniel, D., Lopes, F. S., Santos, V. B., & Lago, C. L. (2018). “Detection of coffee adulteration with soybean and corn by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry.” **Food Chemistry.** pp. 305–310, 2018 .

Davis, G.E., Garwood, V.W., Barfuss, D.L., Husaini, S.A., Blanc, M. B., Viani, R. “Chromatographic profile of carbohydrates in commercial coffees. 2. identification of mannitol.” **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 38, pp. 1347–1350, 1990.

Davis, A. P., R. Govaerts, D. Bridson, and P. Stoffelen. “An annotated taxonomic conspectus of the genus Coffea (Rubiaceae).” **Botanical Journal of the Linnean Society.** v. 152, pp. 465–512, 2006.

Davis, A. P. “Six species of *Psilanthus* transferred to *Coffea* (Coffeeae, Rubiaceae).”**Phytotaxa.** v.10, pp. 41–45, 2010.

Davis, A. P., J. Tosh, N. Ruch, and M. Fay. “Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*.” **Botanical Journal of the Linnean Society.** v.167, pp. 357–377, 2011.

Davis, A.P., Bridson, D.M., Rakotonasolo, F. (2005). A re-examination of *Coffea* subgenus *Baracoffea* and comments on the morphology and classification of *Coffea* and *Psilanthus* (Rubiaceae–Coffeeae. In: Keating RC, Hollowell VC, Croat T, eds. A festschrift for William G. D’Arcy: *The legacy of a taxonomist*. (Monographs in Systematic Botany104). Missouri: Missouri Botanical Garden Press, 398–420.

DEFRA (Department for Environment, Food & Rural Affairs) (2013). The Codex standards (Codex Alimentarius) [webpage]. Disponívelem: https://www.gov.uk/guidance/food-standards-labelling-durability-and-composition#the-codex-standards-codexalimentarius. Acessoem: July 29, 2018.

Domingues, D, S., Pauli, E. D., Abreu, J. E. M., Massura, F. W., Cristiano, V., Santos, M. J., &Nixdorf, S. "Detection of roasted and ground coffee adulteration by HPLC by amperometric and by post-column derivatization UV–Vis detection."**Food Chemistry.** v. 146, pp. 353–362, 2014.

Alves, D. J. in Cultivates de Café: *Origem, Características e Recomendações*, ed. S. H. S. Siqueira, Embrapa café, Brasília, pp. 35, 2008.

Draper, D. J. (1869). *Coffee and its Adulterations*. New York, The New York Printing Company.

Ebrahimi-Najafabadi, H., Leardi, R., Oliveri, P., Casolino, M. C., Jalali-Heravi, M., &Lanteri, S. (2012). "Detection of addition of barley to coffee using near infrared spectroscopy and chemometric techniques." Talanta. v. 99, pp. 175–179, 2012.

EPRS (European Parliamentary Research Service) (2014). Food fraud rising [webpage]. Disponível em: http://www.europarl.europa.eu/RegData/bibliotheque/briefing/2014/130679/LDM_BRI%282014%29130679_REV1_EN.pdf. Acessoem: 29 de Julho de 2018.

European commission (2018) Food authenticity and quality [webpage]. Disponível em: https://ec.europa.eu/jrc/en/research-topic/food-authenticity-and-quality. Acesso em: 29 de Julho de 2018.

EuropeanCoffee Federation. (2018). EuropeanCoffeeReport 2017/2018.

Farah, A., Ferreira, T. (2015). The Coffee Plant and Beans: An Introduction. In V. R, Preedy (Ed.), **Coffee in health and disease prevention.** London, Elsevier.

Farah, A. Mariana, m. C., Veronica, C., Adriana, F., Trugo, L. C. “Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee.”**Food Chemistry**. v. 98, n.2, pp. 373-380, 2006.

Farah, A. (2009). Coffee as a Speciality and Functional Beverage In: Prof Paul paquin, Canada. (Org.). *Functional and Speciality Beverage Technology*. 1ed.London, UK: Woodhead Publishing Limited / CRC Press, p. 370-395.

FDA (Food and Drug Administration of the USA) (2018). Meetings, Conferences, & Workshops [webpage]. Disponívelem: https://www.fda.gov/newsevents/ meetingsconferencesworkshops/ucm163656.htm.Acesso em: 29 de Julho de 2018.

Ferreira, T., Shuler, J., Guimarães, R., & Farah, A. (2019) Introduction to Coffee Plant and Genetics. In A. Farah (Ed.), **Coffee: Production, Quality and Chemistry.** London, Royal Society of Chemistry.

FLCP (Food Law Code of Practice of the England) (2017). [webpage]. Disponível em: https://www.food.gov.uk/about-us/food-and-feed-codes-of-practice. Acesso em: 25 de Julho de 2018.

Flament, I. (2002). *Coffeeflavorchemistry*. (West Sussex, England): JohnWilley& Sons, Ltd.

Fontes, A.S., Bento, A.C., Miranda, L.C.M., Baesso, M.L. “Thermal lens evaluation of the presence of adulterants in brewed coffee.”**AnalyticalSciences.** v. 17, pp. 526 - 529, 2001.

Fontes, A. B., Bento, A. C., Miranda, L. C. M., &Baesso, M. L. (2006). “Thermal lens and pH measurements in pure and adulterated brewed coffee.” **Instrumentation Science and Technology**, v. 34, pp. 163–181, 2006.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO. Corporate DocumentRepository. Arabicacoffee manual for Lao PDR 2005. Disponível em: http://www.fao.org/docrep/008/ae939e/ae939e00.htm. Acessoem 31 Janeiro de 2014.

FSA (Food Standards Agency of the United kingdom) (2017). Packaging and labelling [webpage]. Disponívelem: https://www.food.gov.uk/business-guidance/packaging-and-labelling. Acessoem: 29 de Julho de 2018.

Fuchs, M., Cichna-Markl, M., Hochegger, R. "Development and validation of a novel real-time PCR method for the detection of celery (Apiumgraveolens) in food." **Food Chemistry.** v.130. pp189–195. 2012.

Garcia, L. M. Z., Pauli, E. D., Cristiano, V., Camara, C. A. P., Ieda SpacinoScarminio, I. S., &Nixdorf, S. L. "Chemometric evaluation of adulteration profile in coffee due to corn and husk by determining carbohydrates using HPAEC–PAD." **Journal of Chromatographic Science**. v. 47, pp. 825–832, 2009.

Girard, P., Stober, P., Blanc, M., Prodolliet, J. J. "Carbohydrate specification limits for the authenticity assessment of soluble (instant) coffee: statistical approach." **AOAC International.** v.89, pp. 999 – 1003. 2006.

GMA (Grocery Manufacturers Association) (2018). GMA and Battelle Launch Tool to Fight Food Fraud [webpage]. Disponível em: https://www.gmaonline.org/news-events/newsroom/the-grocery-manufacturers-association-gma-and-battelle-launch-tool-to-/. Acesso em: 29 de Julho de 2018.

Gonçalves, E. B., Corrêa, T. B. S., Assad, E. D., Rodrigues, H. R., Sano, E. E., Cunha, S. A. R, . Lopes, J. R. H. "Validação intralaboratorial de método por imagem para detecção e quantificação de impurezas em café torrado e moído: cascas e paus como exemplo."**Brazilian Journal of Food Technology.** v.10, n.2, pp. 144–150, (ano).

González, A. G., Pablos, F., Martı´n, M. J, León-Camacho, M., &Valdenebro S. "HPLC Analysis of tocopherols and triglycerides in coffee and their use as authentication parameters."**Food Chemistry.** v. 73, pp. 93-101. 2001.

Guerreiro-Filho, O., Maluf, M. P. (2019). Breeding Strategies. In A. Farah (Ed.), **Coffee: Production, Quality and Chemistry.** London, Royal Society of Chemistry.

Gray, E. A. (1983). *By Candlelight: Life of Dr. Arthur Hill Hassall*, London, Robert Hale Ltd.

Hassall, A. H. (1855).*Food and its Adulterations; Comprising the Reports of the Analytical Sanitary Commission of 'The Lancet' for the Years 1851 to 1854.* London, Longman, Brown, Green, and Longmans.

He, Z; 2015. "Introduction to Bioinformatics." In: He, Z. **Data Mining for Bioinformatics Applications**, Chapter 2, Elsevier Ltd. 2015.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M. "Real time quantitative PCR. Genome Methods." **published by cold spring harnor laboratory press.** 2011.

International Coffee Organization- ICO, 2019, International Coffee Agreement 2007 Disponível em: http://www.ico.org/ica2007.asp .Acessoem: Outubro 2018.

Jham, G. M.,Winkler, J. K., Berhow, M. A.,Vaughn, S. V. "y-Tocopherol as a marker of brazilian coffee (coffeaarabical.) adulteration by corn." **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 55, n. 15, 2007.

Jham, G, N., Berhow, M. A., Manthey, L. K., Palmquist D. A., & Vaughn, S. F. "The use of fatty acid profile as a potential marker for brazilian coffee (Coffea arabica L.) for corn adulteration." **Journal of the Brazilian Chemical Society.** v.19, n.8, pp. 1462–1467, 2008.

Kazi, T. "Coffee mixtures - Spectrophotometric method for the determination of coffee content." **Food Chemistry.** v.4, pp. 73–80, 1979.

Kew, Royal Botanic Gardens. Word Checklist of Selected Plant Families, C. arabica. Diponível em: http://apps.kew.org/wcsp/home.do. Acesso em: Outubro 2015.

Knopp, S., Bytof, G., Selmar D. "Influence of processing on the contentof sugars in green Arabica coffee beans."**European Food Research and Technology.** v. 223, pp. 195–201. 2006.

Krishnan, S., Ranker, T.A., Davis, A.P., Rakotomalala, J.-J. “Current status of coffee genetic resources: implications for conservation – case study in Madagascar.” **Acta horticulturae.** pp. 15-20, 2015.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. “The real-time polymerase chain reaction.” **Molecular Aspects of Medicine .** v. 27, n. 2-3, pp. 95– 125, Abr- Jun 2006.

Lasztity, R., Petro-Turza, M., &Foldes, T. (2004). “History of Food Quality Standards, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS).” In R. Lasztity (Ed.), **Food Quality Standards.** pp 38-55. Oxford, EOLSS Publishers.

Laube, I., Hird, H., Brodmann, P., Ullmann, S., Schöne-Michling, M., Chisholm, J., Broll, H. “Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey.”**Food Chemistry**. v.118, p. 979–986, 2010.

Lécolier, A., Besse, P., Charrier, A., Tchakaloff, T. N., Noirot, M. “Unraveling the origin of Coffea arabica 'Bourbon pointu' from La Réunion: a historical and scientific perspective.” **Euphytica**, v. 168, n. 1, pp. 1-10. 2009.

Leroy J-F. “Sur la classification biologique des caféierset sur l’origine et l’aire du genre Coffea. Copte Rendu Hebdomadaire des Séances de l’Académie des Sciences Série D. **Sciences Naturelles**, v. 265, pp. 1043–1045, 1967.

Lockley, A. K., Bardsley, R. G., 2000. “DNA-based methods for food authentication.” **Trends in Food Science & Technology**. v.11, pp. 67–77, 2000.

McGill, A. (1918)*Coffee and Substitutes*.Ottawa, Department of Trade and Commerce.

Nicol, R. (1831). *Treatise on Coffee; its Properties; and the Best Mode of Keeping and Preparing it.* (2rd ed). London, Baldwin and Cradock, Paternoster Row.

Madden T. The BLAST Sequence Analysis Tool. 2013 Mar 15. In: The NCBI Handbook [Internet]. 2nd edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2013-. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK153387/. Acesso em:

Mafra, I., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Oliveira, M. B. P. P. "Food authenticationby PCR-basedmethods."**European Food Research and Technology.** v. 227, pp. 649–665. 2008.

Manning, L., & Soon, J. M. "Developing systems to control food adulteration."**Food Policy.** v.49, pp. 23–32, 2014.

Maurin, O., A. P. Davis., M. Chester., E. F. Mvungi., Y. Jaufeerally-Fakim., M. F. Fay. "Towards a phylogeny for *Coffea* (Rubiaceae): Identifying well-supported lineages based on nuclear and plastid DNA sequences." **AnnalsofBotany**. v. 100, pp. 1565–1583, 2007.

Menezes Júnior, J. B. F.; Bicudo, B. A. A. "Sobre um método microscópico para contagem de cascas no café em pó." **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.11, pp. 13-47, 1958.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. GABINETE DO MINISTRO INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 8, DE 11 DE JUNHO DE 2003. Disponível em:http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/legislacao/Instrucao_Normativa_n_8.pdf. Acessoem: 27/10/2019.

Mullis, K. B., Jolla, L., Erlich, A., Gelfand, D. H. Process for amplifying, detecting, and/or clonig nucleic acid sequences using a thermostable enzyme. United States Patent. Patent number: 4,965, pp. 188. 1990.

Murray, M. G., Thompson, W. F. "Rapid isolation of high molecular weight plant dna." **NucleicAcidsResearch.** v.8, pp. 4321-4325. 1980.

Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. "Real-time PCR detection chemistry." **Clin Chim Acta.** pp. 231-250, Jan. 2015.

N'Diaye, A., Poncet, V., Louarn, J., Hamon, H., Noirot, M. Genetic differentiation between *Coffealiberica* var. liberica and *C. liberica* var. Dewevrei and comparison with *C. canephora***Plant Systematics and Evolution.** v.95,pp. 253; 2005.

Nick Lucius,*, Kevin Rose, Callin Osborn, Matt E. Sweeney, RenelChesak,ScottBeslow, Tom Schenk Jr. "Predicting *E.coli* concentrations using limited qPCR deployments at Chicago beaches". **Water Research X**. v. 2, 2019.

Nicol, R. (1831). *Treatise on Coffee; its Properties; and the Best Mode of Keeping and Preparing it.* (2rd ed). London, Baldwin and Cradock, Paternoster Row.

Nogueira, T., Lago, L. C. "Detection of adulterations in processed coffee with cereals and coffee husks using capillary zone electrophoresis." **Journal of Separation Science.** v. 32, n. 20, pp. 3507 – 3511, 2009.

Nowak, M. D., Davis, A. P., Yoder, A. D. "Sequence data from new plastid and nuclear COSII regions resolves early diverging lineages in *Coffea* (Rubiaceae)." **Systematic Botany**. v. 37, pp. 995–1005. 2012.

Pacetti, D., Boselli, E., Balzano, M., Frega, N. G. "Authentication of Italian espresso coffee blends through the GC peak ratio between kahweol and 16-O-methylcafestol." **Food Chemistry.** v. 135, n. 3, pp. 1569–1574, 2012.

Pafundo, S., Gullì, M., Marmiroli, N. "Sybr Green ertm Real-Time PCR to detect almond in traces in processed food." **Food Chemistry.** v.116, pp. 811–815. 2009.

P. Lashermes, M . C. Combes, J. Robert, P. Trouslot, A. D'Hont, F. Anthony and A. Introduction to Coffee Plant and Genetics. In: Charrier, Mol. Gen. Genet. pp. 259-261. 1999.

Pauli, E. D., Barbieri, F., Garcia, P. S., Madeira, T. B., Junior, V. R. A., Scarminio, I. S. Nixdorf, S. L. "Detection of ground roasted coffee adulteration with roasted soybean and wheat." **Food Research International. v.** 61 pp. 112–119 (ano).

Pizarro, C., Esteban-Dìez, I., Gonzalez-Saiz, J. M. “Mixture resolution according to the percentage of robusta variety in order to detect adulteration in roasted coffee by near infrared spectroscopy.”**Analytica Chimica Acta**. v. 585, pp. 266–276. 2007.

Pragst, R. (2008). Forensic science handbook of analytical separations. In M. J. Bogusz (Ed.), **High performance liquid chromatography in forensic toxicological analysis** pp. 485–489. Amsterdam, Elsevier B.V.

Prodolliet, J., Hischenhuber, C. “Food authentication by carbohydrate chromatography.” ZlebensmUntersForsch A. v. 207, pp. 1-12, 1998.

Pushpa S. Murthy, P. S., Naidu, M, M. “Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—a review”. **Resources, Conservation and Recycling.** V. 66, pp. 45– 58, Sept. 2012.

Brookman-Amissah, N., Packer, H., Prediger, E., Sabel, J. (2015). *qPCR Application Guide Experimental Overview. Protocol, Troubleshooting*.Fourth Edition. Integrated DNA Technologies, Belgium.

Raquel, B. D. C. C., Aline T. Toci., Luiz C. Trugo., Adriana Farah. “Composição volátil dos defeitos intrínsecos do café por CG/em-Headspace.”**Química Nova.** v. 32, pp. 309-314. 2009.

Reis, N., Franca, A. S., & Oliveira, L. S. “Concomitant use of fourier transform infrared attenuated total reflectance spectroscopy and chemometrics for quantification of multiple adulterants in roasted and ground coffee.” **JournalofSpectroscopy**. pp. 1–7, 2016.

Reis, N., Franca, A. S., & Oliveira, L. S. “Discrimination between roasted coffee, roasted corn and coffee husks by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy.” **LWT - Food Science and Technology**. v.50, pp. 715–722, 2013.

Reis, N., Franca, A. S., Oliveira, L. S. “Discrimation roasted coffee, roasted corn and coffee husks by diffuse reflectance infrared fourier transform spectroscopy.” **LWT-Food Sciense and Tecnology.** 2012.

Reis, N., Franca, A. S., & Oliveira, L. S. "Performance of diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy and chemometrics for detection of multiple adulterants in roasted and ground coffee." **LWT -Food Science and Technology.** v. 53, pp. 395–401, 2013.

Reis, N., Franca, A. S., & Oliveira, L. S. "Quantitative evaluation of multiple adulterants in roasted coffee by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTS) and chemometrics." **Talanta**, v.115, pp. 563–568, 2013.

Reischl, U., Wittwer, C. T., Cockerill, F. "Rapid cycle Real-Time PCRr: methods and applications; Microbiology and Food analysis." **New York: Springer-Verlag.** 2002.

Ribeiro, M. V. M., Borallea, N., Pezzaa, H, R., Pezzaa, L., &Tocib, A. T. "Authenticity of roasted coffee using1H NMR spectroscopy." **Journal of Food Composition and Analysis.** v.57, pp. 24–30, 2017.

Rozen, S., Skaletsky, H. J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, N. J, pp. 365-386.

RSC (Royal Society of Chemistry) (2018). Modern chemical techniques: electron microscopy [webpage]. Disponívelem: http://www.rsc.org/learn-chemistry/resource/ res00001302/electron-microscopy?cmpid=CMP00002751. Acessoem: 30 de Julhode 2018.

Ruiz-Matute, A. I., Montilla, A., Del Castillo, M. D., Martinez-Castro, I., Sanz, M. L. "A GC method for simultaneous analysis of bornesitol, other polyalcohols and sugars in coffee and its substitutes."**JournalofSeparation Science.** v.30, pp. 557 – 562. 2007.

Saldaña, M. D. A., Mazzafera, P., Mohamed, R. S. "Extração de alcaloides: cafeína e trigonelina dos grãos de café com C supercrítico." **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** v. 17, pp. 371-376, 1997.

Santos, J. R. S., Sarraguça, M. S., Rangel, A. O. S. S., Lopes, J. A. "Evaluation of green coffee beans quality using near infrared spectroscopy: A quantitative approach."**Food Chemistry.** v.135, pp. 1828–1835. 2012.

Sayre, L. E. (1906). “Coffee and estimation of its value.” **Transactions of the Kansas Academy of Science.** v. 20, n.1, pp. 37–48, 1906.

Sezer, B., Apaydin, H., Bilge, G., &Boyaci, I. H. (2018). “Coffee arabica adulteration: Detection of wheat, corn and chickpea.” **Food Chemistry.** v.264, pp. 142–148, 2018.

Simmonds, P. L. (1864). *Coffee and Chicory: Their Culture, Chemical Composition, Preparation for Market, and Consumption, with Simple Tests for Detecting Adulteration, and Practical Hints for The Producer and Consumer.* London, E. & F. N. Spon, 16, Bucklersbury.

Smith, S. D. “Coffee, Microscopy, and the Lancefs Analytical Sanitary.” **Commission. Social History of Medicine.** v.14, n.2, pp. 171–197, 2001.

Souto, U. T. C. P., Barbosa, M. F., Dantas, H. V., Pontes, A. S., Lyra, W. S., Diniz, P. H. G. D, .Silva. E. C. (2014). “Screening for coffee adulteration using digital images and SPA-LDA.” **Food AnalyticalMethods.** (falta restante da referência)

Souto, U. T. C. P., Barbosa, M. F., Dantas, H. V., Pontes, A. S., Lyra, W. S., Diniz, P. H. G. D, . . . Silva. E. C. (2014). Identification of adulteration in ground roasted coffees using UV-Vis spectroscopy and SPA-LDA LWT - **Food Science and Technology.** pp. 1–5.

Spaniolas, S., Tsachaki, M., Bennett, M. J., Tucker, “G. A. Evaluation of DNA extraction methods from green and roasted coffee beans.” **Food Control.** v. 19, n.3, pp. 257–262, março 2008.

Speer, K., & Montag, A. “16-O-methylcafestol – Ein neuesDiterpenimKaffee, ersteErgebnisse: Gehalte in Roh- und Röstkaffees.” **Deutsche Lebensmittel-Rundschau.** v.85, pp. 381–384. 1989.

Speer, K., Tewis, R., & Montag, A. “16-O-Methylcafestol a quality indicator for coffee.” **Proceedings of the 14eme ColloqueScientifique International sur le Café.** pp. 14, 19. 1991.

Spink, J., & Moyer, D. C. (2011). “Defining the Public Health Threat of Food Fraud.” **Journal of Food Science.** v. 76, n. 9, pp. 157–163, 2011.

Stefan Washietl, S., Hofacker, I. L. Data Mining Techniques for the Life Sciences, Methods in Molecular Biology: Nucleic Acid Sequence and Structure Databases, New York, Humana Press, a part of Springer Science+Business Media. 2010.

Stevenson, J. (1830). *Advice medical, and economical, relative to the purchase and consumption of tea, coffee, & chocolate, wines, and malt liquors: including tests to detect adulteration*. Also remarks on water, with directions to purify it for domestic use. London, F. C. Westley.

Stober, P., Benet, S., Hischenhuber, C., Fischer, M., & Fay, L. B. (2001). Stachyose: a marker of the presence of legume adulterants in soluble coffee? In: Proceedings of 19th International Conference on Coffee Science. Disponívelem: http://www.asiccafe. org/en/proceedings/3588/toc. Acessoem: 29 de Julho de 2018.

Streuli, H. (1970). Kaffee. In Schormiiller, J (Ed.), AlkaloidhaltigeGenussmittel, Gewürze, Kochsalz. (pp. 1-95). Berlin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg https://doi. org/10.1007/978-3-642-46225-2 (???)

Tavares, K. M., Pereira, R. G. F. A., Nunes, C. A., & Pinheiro, A. C. M. (2012). “Espectroscopia no infravermelho médio e análise sensorial aplicada à detecção de adulteração de café torrado por adição de cascas de café.”**Química Nova.** v. 35, n.6, pp. 1164–1168, 2012.

Thurber, F. B. (1881). *Coffee: plantation to cup. a brief history of coffee production and consumption*. New York, American Grocer Publishing Association.

Toci, A. T., Farah, A. “Volatile compounds as potential defective coffee beans’ markers.” **Food Chemistry.** v. 108, n. 3, pp. 1133-1141, 2008.

Toledo, J. L., Barbosa, A. T. Classificação e degustação do café, SEBRAE; Rio de Janeiro, 1998.

Ukers, W. (1922). All about Coffee. New York, Tea & Coffee **Trade Journal Company.**

USDA. United States Department of Agriculture. Classification for Kingdom Plantae Down to Species Coffeaarabica L .Natural Resources Conservation Service. Disponível em: http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=COAR2. Acessoem: Maio 2016.

USDA (United States Department of Agriculture) (2018). Coffee: World Markets and Trade [webpage]. Disponível em: https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/ coffee.pdf. Acesso em: 29 de Janeiro de 2019.

USDA (United States Department of Agriculture) (1892). Foods and Food Adulterants. Tea, Coffee, and Cocoa Preparations [webpage]. Disponível em: https://ia801801.us.archive.org/0/items/foodsfoodadulter13spen/foodsfoodadulter13spen.pdf. Acesso em: 30 de Julho de 2018.

Valasek, M. A., Repa, J. J. "The power of Real-Time PCR."**Advances in Physiology Education.** v.29, pp. 151–159, 2005.

Valdenebro, M. S., León-Camacho, M., Pablos, F., González, A. G., &Martìn, M. J. "Determination of the arabica/robusta composition of roasted coffee according to their sterolic content." **Analyst.** v. 124, pp. 999–1002. 1999.

Van der Vossen, H. A. M., Bertrand, B., Charrier, A. "Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (Coffea arabica L.): a review."**Euphytica**, v. 204, n. 2, pp. 243–256, 2015.

Walsh, J. M. (1894). *Coffee: its history, classification and description.*Philadelphia, The author.

Wanklyn, J. A. (1874). Tea, Coffee, andr Cocoa: A Practical Treatise on the Analysis of Tea, Coffee, Cocoa, Chocolate, Maté (Paraguay Tea). London, Trübner& Co. (???)

Wellman, F. L. (1961). Coffee: Botany, Cultivation and Utilization, Leonard H ill Books, London.

Willian, h., Ukers, M. A. in All about Coffee, The Tea and Coffee Trade Journal, New York, USA, 1922, vol. 15, p. 131.

Winkler-Moser, J. K., Singh, M., Rennick, K. A., Bakota, E. L., Jham, G., Liu, S, X., & Vaughn, S. F. (2015). "Detection of corn adulteration in brazilian coffee (*Coffea arabica* L) by tocopherol profiling and near-infrared (NIR) Spectroscopy." **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 63, pp. 10662−10668, 2015.

Woolfe, M., Gurung, T., & Walker, M. J. "Can analytical chemists do molecular biology? A survey of the up-skilling of the UK official food control system in DNA food authenticity techniques." **Food Control.** v. 33, pp. 285–392, 2013.

Yat-Tung Lo, Pang-Chui Shaw. "DNA-based techniques for authentication of processed food and food supplements." **Food Chemistry.** v. 240, pp 767-774, Fev. 2018.

Zhang, J., Zhang, X., Dediu, L., & Victor, C. "Review of the current application of fingerprinting allowing detection of food adulteration and fraud in China." **Food Control.** pp. 1126–1135, 2011.