

## IMAGENS DIGITAIS DO TESTE DE TETRAZÓLIO PARA AVALIAR A QUALIDADE DE GRÃOS DE CAFÉ

Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa<sup>8</sup>; Marcella Nunes de Freitas<sup>3</sup>; André Saúde<sup>4</sup>, Cristiane Carvalho Pereira<sup>5</sup>; Marcelo Ângelo Cirillo<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Trabalho realizado com apoio da Embrapa Café, UFLA, CAPES e FAPEMIG

<sup>2</sup> Pesquisadora Embrapa Café, DAG/UFLA, sttela.rosa@embrapa.br

<sup>3</sup> Doutoranda, Fitotecnia, USP/Esalq, cellanunes@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Professor Dr., DCC/UFLA, saude@dcc.ufla.br

<sup>5</sup> Graduanda, Agronomia, Bolsista PIBIC, DAG/UFLA, cristianecpe@gmail.com

<sup>6</sup> Professor Dr., DEX/UFLA, macufla@dex.ufla.br

**RESUMO:** Testes fisiológicos, tais como germinação, tetrazólio (TTC), condutividade elétrica (CE) e lixiviação de potássio (LK), são utilizadas na indústria de sementes para avaliar a qualidade da semente, após o processamento e a secagem. A qualidade da bebida do café também é afetada pelos processos de pós-colheita, uma vez que podem alterar a composição química dos precursores do sabor e do aroma da bebida. Assim, testes fisiológicos e bioquímicos econômicos rápidos e precisos e de fácil padronização podem constituir alternativas viáveis para a avaliação da qualidade da bebida. No entanto, estudos com abordagens fisiológicas e bioquímicas para avaliação da qualidade da bebida do café são raros. Neste sentido, objetivou-se testar o potencial de análises fisiológicas e bioquímicas para avaliar a qualidade da bebida do café. A pesquisa foi realizada na Universidade Federal de Lavras, MG. Frutos de *Coffea arabica* L., no estágio cereja foram utilizados, compondo um delineamento de blocos casualizados em um esquema fatorial 3 x 3, três tipos de processamento (desmucilado, fermentado e natural) e três métodos de secagem (sol, sombra e secador mecânico). Um tratamento adicional foi utilizado, o qual correspondia a amostra de baixa qualidade sensorial. Foi determinado o teor de água e realizados os testes de germinação, CE, LK, TTC nos embriões e TTC modificado nos endospermas dos grãos de café. Grãos de café que apresentam elevada pontuação na análise sensorial, também apresentam alta germinação, viabilidade dos embriões pelo TTC e baixos valores de condutividade elétrica. Houve alta correlação entre os resultados sensoriais de qualidade dos grãos e os resultados de testes fisiológicos e bioquímicos, com significâncias estatísticas menores do que 1% para protrusão radicular, TTC e CE. Além disso, a avaliação por TTC no endosperma dos grãos de café possibilita verificar diferenças de qualidade sensorial de grãos de café.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Coffea arabica* L., teste de tetrazólio, teste de germinação e análise sensorial.

## DIGITAL IMAGES OF THE TETRAZOLIUM TEST FOR EVALUATING THE COFFEE GRAIN QUALITY

**ABSTRACT:** Physiological tests, such as germination, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC), electrical conductivity (CE) and potassium leaching (LK) are used in the seed industry to assess seed quality after processing and drying. The quality of coffee beverage is also affected by the processes in the post-harvest, since they may affect the chemical composition of the flavor and aroma precursors of coffee brew. Thus, physiological and biochemical fast, accurate, economical tests and easy standardization can constitute viable alternatives for assessing the quality of the drink. However, physiological and biochemical approaches to evaluate the quality of drinking coffee are rare. In this sense, the objective of the present study was to test the potential physiological and biochemical analyses to assess the quality of coffee beverage. The research was conducted at the Federal University of Lavras, MG. Seeds of *Coffea arabica* L., red ripe stage were used and a randomized complete block design in a 3 x 3 factorial, three types of processing (dry, wet and mechanical) and three drying methods (sun, shade and mechanical dryer). One additional treatment was used, corresponding to samples of lower sensory quality coffee. The water content was determined and germination tests, CE, LK, TTC in the embryos, and modified TTC in the endosperms were performed in coffee beans. Coffee beans with high scores in sensory analysis, also have high germination and viability percentages and low electrical conductivity values. There were high correlations between the sensory quality results of coffee grains and physiological or biochemical tests results, with statistical significant levels less than 1% for radicle protrusion, TTC and CE. Furthermore, the evaluation by TTC in the endosperms of the coffee beans makes it possible to verify varieties of sensory quality in coffee beans.

**KEY WORDS:** *Coffea arabica* L., tetrazolium test, germination test and sensory analysis.

## INTRODUÇÃO

A sustentabilidade do agronegócio café no cenário internacional é cada vez mais dependente da produção de cafés especiais e de melhor qualidade. A avaliação da qualidade do café é fundamentada em análises sensoriais, as quais se baseiam em dados subjetivos, de difícil padronização, sendo altamente desejável, a identificação de testes objetivos precisos e fáceis de padronização para avaliar a qualidade e classificar lotes de café para a comercialização. Para avaliar a qualidade de sementes após processamento e secagem, são normalmente utilizados na indústria de sementes os testes fisiológicos e bioquímicos, tais como o de germinação e o de tetrazólio, além do teste de condutividade elétrica e de lixiviação de potássio. No teste de germinação é possível determinar a capacidade germinativa máxima de um lote de sementes. A viabilidade das sementes pode ser determinada pelo teste de tetrazólio (ISTA, 1999), um teste bioquímico, que se baseia na atividade das enzimas desidrogenases reduzindo o sal 2,3,5 trifenilcloroeto ou brometo de tetrazólio, nos tecidos vivos da semente, pela reação de íons de hidrogênio que são transferidos para o referido sal (Delouche et al., 1976). A redução do sal ocorre apenas nas células vivas, resultando na formação do trifenilformazan, um composto vermelho e indifusível que confere cor vermelha ao tecido vivo do embrião. O uso do teste de tetrazólio modificado, realizado em endospermas de grãos de café (Del Terra et al., 2010), demonstrou o potencial do teste para monitorar a qualidade de lotes de café durante o armazenamento. O teste de condutividade elétrica é um método simples, rápido, barato e eficiente, e consiste na quantificação dos eletrólitos lixiviados pela semente na água de embebição, sendo que, sementes com baixo vigor liberam grande quantidade de eletrólitos na solução, resultando em alto valor de condutividade elétrica (Woodstock, 1973; Bedford, 1974) ou em elevadas concentrações de determinados íons, principalmente potássio (Prete, 1992). A qualidade da bebida do café pode também ser afetada pelas operações durante o processamento e a secagem, uma vez que estas etapas podem afetar a composição química dos precursores do sabor e aroma da bebida. Resultados de pesquisas recentes têm demonstrado a associação entre a redução da qualidade sensorial dos grãos de café (Saath, 2010; Taveira et al., 2012) com alterações fisiológicas e bioquímicas, tais como o estresse oxidativo, a hidrólise de lipídios, níveis de aminoácidos e carboidratos (Selmar, 2008), dentre outros. Neste sentido, a realização de pesquisa para avaliar o potencial de análises fisiológicas e bioquímicas, associadas a análises de imagem para a avaliação da bebida de café é algo inovador.

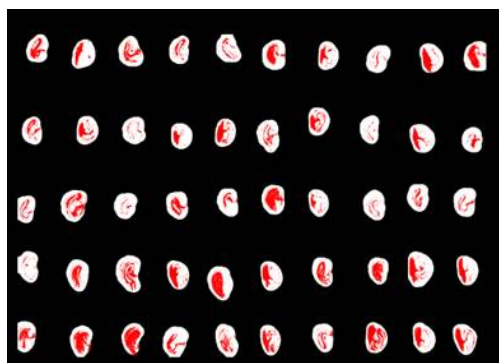
## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados grãos de *Coffea arabica* L. cv. Catuai Amarelo 62, colhidos no estágio de maturação cereja e submetidos a três diferentes tipos de processamentos, natural, desmucilado e despulpado e, secados até a umidade de 11 % bu, por meio de três métodos, secagem à sombra, ao sol e em secador mecânico sob temperatura de 40°C. Da combinação destes fatores foram obtidos nove lotes de grãos, aos quais foi adicionado um lote comercial de grãos de café, totalizando dez lotes. Determinou-se o teor de água dos grãos, de acordo com o método padrão internacional ISO 6673 (ISO, 1999). A análise sensorial foi realizada por dois provadores treinados e qualificados como Juizes Certificados de Cafés Especiais (SCAA Certified Cupping Judges), utilizando-se a metodologia proposta pela Associação Americana de Cafés Especiais (SCCA), para a avaliação de cafés especiais (Lingle, 1986). Os grãos foram então, submetidos à avaliação fisiológica e bioquímica, por meio dos testes de germinação, tetrazólio, condutividade elétrica e lixiviação de potássio. O teste de germinação foi realizado em rolos de papel tipo germitest, umedecidos com água em quantidade de 2,5 vezes o peso do papel, temperatura constante de 30°C, e foram determinadas as porcentagens aos trinta dias, de plântulas normais (Brasil, 2009) e de plântulas normais fortes, computando-se aquelas com hipocótilos de três centímetros de comprimento no mínimo; porcentagem de protrusão radicular aos quinze dias, computando-se aquelas com pelo menos dois mm de comprimento; aos quarenta e cinco dias foi determinada a porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares abertas. No final do teste determinou-se a matéria seca de raízes e de partes aéreas, após secagem sob 60°C até massa constante. O teste de tetrazólio foi realizado em quatro repetições de 25 embriões extraídos após embebição em água por 16 horas, os quais foram mantidos em solução de tetrazólio 0,5%, na ausência de luz e sob 30°C, por 3 horas. Os embriões foram classificados em viáveis e inviáveis de acordo com a localização e extensão dos danos (Krzyzanowski et al., 1991). O teste de condutividade elétrica (Krzyzanowski et al., 1991) foi realizado com quatro repetições de 50 grãos pesadas com precisão de 0,001g e imersas em 75mL de água deionizada, medindo-se a condutividade elétrica na solução de embebição, após cinco horas sob 25°C, com os resultados expressos em  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}\cdot\text{l}\cdot\text{g}^{-1}$  de grãos. A quantidade de potássio lixiviada na solução de embebição foi determinada em ppm (Prete, 1992), utilizando-se fotômetro de chama Digimed NK-2002. Foi, também, realizado o teste de tetrazólio modificado (Del Terra et al., 2010) com adaptações. Após embebição em água por 36 horas a 30 °C, quatro repetições de 25 grãos foram seccionados transversalmente, e as 50 partes foram embebidas em solução de tetrazólio 0,1% na ausência de luz a 30 °C, por 24 horas. Após coloração, os endospermas seccionados foram distribuídos com as faces planas voltadas para cima, em placas de vidro de 5mm em fundo branco, para a captura de imagens com 300 dpi, em em escaner invertido. As imagens no formato TIFF foram processadas pelo programa Matlab R2009b, com a toolbox de processamento de imagens e SDC Morphology Toolbox 1.6. Procedeu-se inicialmente o isolamento utilizando-se a banda azul, espectro que permitiu o maior contraste entre o grão e o plano de fundo da imagem. Para o isolamento foi utilizado o *threshold* automático proposto por Otsu (Gonzales e Woods, 2009), e executou-se a etapa de detecção dos grãos na imagem, utilizando-se a banda azul e o *threshold* de Otsu. Para correção de imperfeições na

distinção da imagem foi utilizada a ferramenta de morfologia matemática (Dougherty e Lotufo, 2003). Após a definição das áreas correspondentes aos grãos nas imagens, foram extraídas as medidas, denominadas de índice de TZ, conforme a intensidade do padrão da banda do vermelho, azul e verde em cada semente, determinada pela equação:

$$\text{área } (th,i) / \text{área } (\text{segmentação},i)$$

Onde: *área* (*th, i*) correspondente à área (em número de pixels da imagem) na região do grão; após um *threshold th*, e *área* (*segmentação, i*) é a área total de cada semente de *i*. Para cada imagem *i*, foram utilizados cinco valores de *threshold*, sendo:  $th1=0.2$   $th$ ;  $th2=0.4$   $th$ ;  $th3=0.6$   $th$ ;  $th4=0.8$   $th$ ;  $th5=th(i)$ . Onde:  $th(i)$  é o *threshold* de Otsu da imagem *i*. Na Figura 1 é possível visualizar o Otsu  $th3$  de uma imagem (*i*).



**Figura 1:** Ilustração do Otsu com a imagem segmentada sobreposta à imagem no threshold 3, onde a área em vermelho representa o índice *área* (*th,i*) e a área total da sementes corresponde a *área* (*segmentação,i*). Embrapa/UFLA, Lavras, MG, 2013.

Os resultados das análises sensoriais e dos testes fisiológicos foram submetidos à análise de correlação (SAS, 2003) e os dados obtidos do processamento das imagens foram comparados por meio do teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o software SISVAR (Ferreira, 2003). Os resultados foram, ainda, submetidos a uma análise de correlação simples, aplicando-se a técnica do escalonamento multidimensional, considerando a matriz de dissimilaridade representada por  $\Delta=[\delta_{ij}]$ , em que cada elemento indica a dissimilaridade entre a *i*-ésima e *j*-ésima variável, contextualizada em duas categorias, a fisiológica e a sensorial. Utilizou-se o processo de redução multidimensional, tendo por base a matriz de distância euclidiana  $D=[d_{ij}]$  formada a partir de todas as variáveis, determinando-se a matriz que melhor se aproximou da matriz de dissimilaridade original, ou seja,  $D \approx \Delta$  (Borg e Groenen, 2005). Ressalta-se que essa aproximação pode ser obtida não apenas por diferentes distâncias. Mediante esse problema surge então, a necessidade de se verificar, por meio de um critério estatístico, qual situação favorece uma melhor aproximação em relação à matriz de dissimilaridade original. Desta forma, utilizou-se a função Stress utilizada para medir a diferença entre a matriz de dissimilaridade original e a matriz de distância calculada. O resultado desta função indica que quanto menor for o seu valor, melhor é o ajuste da matriz de distância reproduzida à matriz de distância observada.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises fisiológicas e sensoriais encontram-se na Tabela 1, onde pode ser verificado que, por meio destes testes, é possível diferenciar a qualidade dos lotes de grãos de café, e classificá-los. Os resultados demonstram que existe alta correlação entre os resultados das análises fisiológicas e das sensoriais, com altos coeficientes de correlação (Figura 2) e níveis de significância mínimos de 5%. Estes resultados indicam que grãos de café com alta qualidade sensorial, apresentam, também, qualidade fisiológica. Outros trabalhos recentes tem demonstrado esta correlação (Saath, 2010; Taveira et al., 2012), corroborando os resultados obtidos nesta pesquisa. Observa-se que os resultados da análise sensorial apresentaram índice de correlação de 0,94 com os resultados do teste de tetrazólio e de -0,87 com os da condutividade elétrica. À medida que ocorre um aumento no percentual de viabilidade dos embriões há um aumento nos valores de notas totais da análise sensorial. De forma inversa o teste de condutividade elétrica relaciona-se com a qualidade de bebida de café, de forma que o aumento da condutividade elétrica implica em cafés de qualidade inferior.

Tabela 2. Resultados da avaliação fisiológica e da análise sensorial dos grãos de café. Embrapa/UFLA, Lavras, MG, 2013.

Lotes**	Tetrazólio	Germinação	Análise Sensorial	Condutividade elétrica
	-- % viáveis --	--- % ---		-- $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ --
L1	85.0 b	34.0 e	80.75 a	25.07 c
L2	94.0 a	46.0 d	80.25 a	30.48 d
L3	69.0 c	61.0 c	77.50 b	24.16 c
L4	70.0 c	66.0 c	75.75 c	5.69 a
L5	83.0 b	75.5 b	82.75 a	6.12 a
L6	83.0 b	66.5 c	82.50 a	8.95 a
L7	88.0 a	51.5 d	78.50 b	14.33 b
L8	83.0 b	87.5 a	81.25 a	13.29 b
L9	79.0 b	85.0 a	81.25 a	15.18 b
L10	0.0 d	2.5 f	54.00 d	71.43 e
CV (%)	6.92	12.86	1.38	11.09

\*Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. \*\*T1: Natural/Sol; T2: Natural/Sombra; T3: Natural/Secador; T4: Fermentado/Sol; T5: Fermentado/Sombra; T6: Fermentado/Secador; T7: Desmucilado/Sol; T8: Desmucilado/Sombra; T9: Desmucilado/Secador; T10: Tratamento adicional.

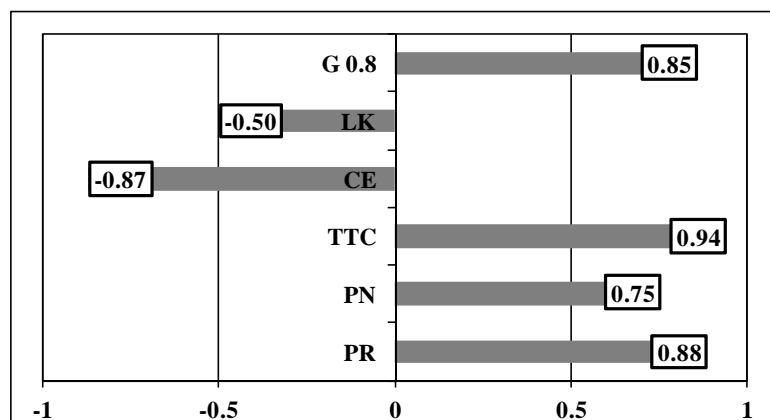


Figura 2. Coeficientes de correlação ( $r^2$ ) entre os resultados das análises fisiológicas e sensorial de grãos de *Coffea arabica* L. PR=protrusão radicular; PN=germinação; CE=condutividade elétrica; TTC=teste de tetrazólio em embriões de café e LK=lixiviação de potássio de grãos de *Coffea arabica* L. Embrapa/UFLA, Lavras, MG, 2013.

O teste de condutividade elétrica baseia-se na integridade das membranas celulares dos grãos, e os resultados elevados evidenciam a desorganização ou rompimento das membranas celulares, que propiciam o extravasamento de íons celulares e, dessa forma, propiciando reações oxidativas ou reações catalíticas com produtos indesejáveis e prejudiciais à qualidade sensorial da bebida do café. Observou-se maiores valores de condutividade elétrica em cafês de pior qualidade de bebida, assim como foi constatado em outros estudos (Prete, 1992). A análise da imagem por meio do software Matlab pode demonstrar maior resposta ao espectro de cor da banda do vermelho no endosperma das sementes de café. Para a banda vermelha, o threshold 5 possibilitou a maior diferenciação dos tratamentos. No entanto para a banda do espectro do verde e azul o threshold 3 mostrou maior diferenciação dos tratamentos (Figura 3). O tratamento adicional (L10), que compreende os grãos destinados ao consumo, apresentou pior qualidade fisiológica, indicado pelo teste de tetrazólio e de germinação e pior qualidade de bebida, conforme o resultado da análise sensorial (Tabela 2). Este tratamento também apresentou menor resposta ao espectro de luz avaliada, evidenciando que o fato do embrião e do endosperma estarem inviáveis afetou a qualidade sensorial da bebida de café. Os tratamentos processados de forma natural e secados ao sol e secador (L1 e L3), apresentaram relativa redução da viabilidade em relação aos demais tratamentos, de acordo com o teste de tetrazólio no embrião, no entanto os mesmos tratamentos apresentaram elevada resposta aos espectros de cores avaliadas. Existem duas explicações possíveis para tal comportamento. Conforme Del Terra et al. (2010) o embrião, por ser a parte mais delicada da semente, demonstra sinais de perda de viabilidade mais rápido quando comparado com o endosperma, que é um tecido de reserva muito resistente. É de se esperar, portanto, que durante o processamento e secagem dos grãos de café o embrião possa ser o primeiro tecido a perder a viabilidade, enquanto que as células do endosperma permanecem vivas. Outro fato que justifica a intensa coloração no endosperma dos grãos de café dos tratamentos processados de forma natural e secados ao sol e em secador, possa ter sido pela intensa atividade respiratória presente neste tecido. A análise sensorial não possibilitou a diferenciação dos tratamentos de forma clara, demonstrando que os testes fisiológicos e a análise da imagem é mais sensível em diferenciar os tratamentos.

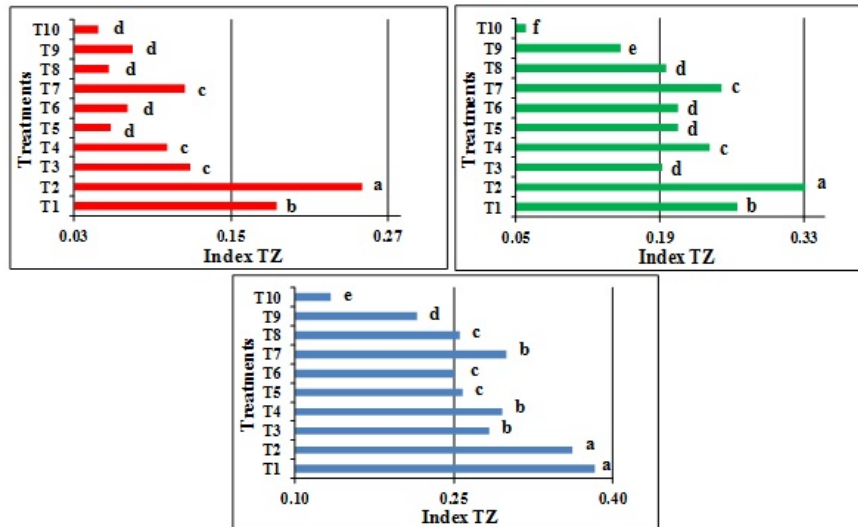


Figura 3. Índices de TZ para a banda vermelha no threshold 5, e no threshold 3 para a banda verde e azul. Letras minúsculas distintas diferem os tratamentos estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. \*T1:Natural/Sol; T2:Natural/Sombra; T3:Natural/Secador; T4:Despolpado/Sol; T5:Despolpado/Sombra; T6:Fermentado/Secador; T7:Desmucilado/Sol; T8:Desmucilado/Sombra; T9:Desmucilado/Secador; T10:Tratamento adicional. Embrapa/UFLA, Lavras, MG, 2013.

Com relação à técnica do escalonamento multidimensional, os resultados ilustrados na Figura 4 correspondem aos biplots construídos a partir de variáveis relacionadas à qualidade sensorial e fisiológica que permitem identificar grupos de tratamentos que podem ser considerados similares. Avaliando as respostas dos tratamentos evidencia-se que os tratamentos L1-L9 podem ser considerados similares no que tange à variável sensorial com a variável fisiológica porcentagem de plântulas normais aos 30 dias (N30d). Evidencia-se também que o tratamento L10 apresenta respostas heterogêneas dos demais. Convém ressaltar que outros agrupamentos formados por outras variáveis identificaram outros grupos similares.

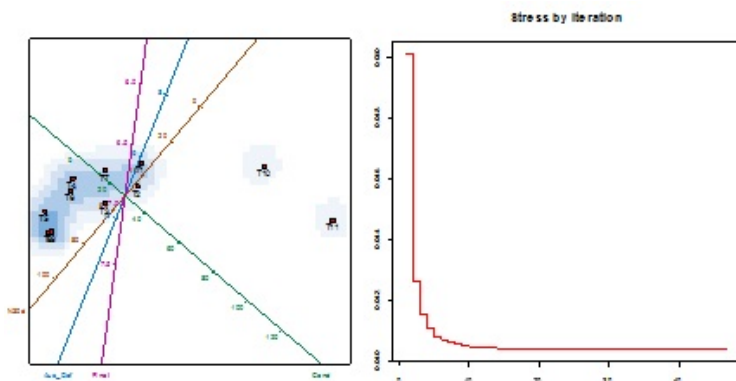


Figura 4: Biplots para variáveis sensoriais e fisiológicas (esquerda). Valores obtidos para a função STRESS em cada iteração para validação das variáveis selecionadas utilizadas (direita). Embrapa/UFLA, Lavras, MG, 2013.

É importante ressaltar que diferentes combinações das variáveis sensoriais e fisiológicas poderiam ser utilizadas para avaliar a formação de agrupamentos entre os tratamentos. Entretanto, para garantir que as variáveis selecionadas sejam adequadas para redução dimensional, no sentido de que a diferença entre a matriz de similaridade formada com todas as variáveis e a matriz formada apenas com as variáveis escolhidas seja mínima torna-se necessário avaliar a qualidade de ajuste. Utilizando a função STRESS, é possível observar da análise gráfica (Figura 4), os valores obtidos para esta função em cada iteração numérica.

## CONCLUSÕES

1. Testes fisiológicos, tais como o de germinação e condutividade elétrica são sensíveis em determinar a qualidade do café, sendo, portanto marcadores eficientes.
2. O teste de tetrazólio em embriões de café, bem como o tetrazólio no endosperma apresenta alta correlação com a análise sensorial da qualidade de bebida.
3. O teste de tetrazólio modificado apresenta-se como uma metodologia inovadora que poderá vir a complementar às análises sensoriais de qualidade de bebida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEDFORD, L. V. Conductivity tests in commercial and hand harvested seed of pea cultivars and their relation to field establishment. *Seed Science and Technology*, Zurich, v. 2, n. 3, p. 323-335, 1974.
- BORG, I.; GROENEN, P. (2005). *Modern Multidimensional Scaling: Theory and Applications*. New York: Springer Series in Statistics.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *REGRAS PARA ANÁLISE DE SEMENTES*. Brasília: Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Brasília, DF, Brasil. 2009. 399p.
- DEL TERRA, L.; BARNABA, M.; SILIZIO, F.; NAVARINI, L. *A novel approach to triphenyltetrazolium staining as a quality control tool for green coffee: correlation with aging, geographical origin and sensory analysis*. The 23<sup>o</sup> International conference on coffee science Bali, Indonesia. 41 p. 2010.
- DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. *O teste de tetrazólio para viabilidade da semente*. Brasília, DF: AGIPLAN, 1976. 103p.
- DOUGHERTY, E.R.; LOTUFO, R.A. *Hands-on Morphological Image Processing*. SPIE Tutorial Texts in Optical Engineering, Vol. TT59. 2003.
- FERREIRA, D. F. *Programa de análises estatísticas (statistical analysis software) e planejamento de experimentos - SISVAR 5.0*, build 67. Lavras: DEX/UFLA, 2003. Software.
- GONZALES, R.C.; WOODS, R.E. *Processamento digital de imagens*. 3. Ed. 2009.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *Green coffee – determination of loss mass at 105°C*, ISO 6673:2003, 1999.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 1999, *Seed Sci Technol* 27: Suppl. 223.
- KRZYŻANOWSKI, F.C.; FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. Relatos dos testes de vigor disponíveis as grandes culturas. *Informativo Abrates*, Brasília, v.1, n.2, p.15-50, mar. 1991.
- LINGLE, T.R. The coffee cupper's handbook. A systematic guide to the sensory evaluation of coffee's flavor. Washington, *Coffee Development Group*, 1986. 32 p.
- PRETE, C.E.C. *Condutividade elétrica do exsudato de grãos de café (Coffea arabica L.) e sua relação com a qualidade da bebida*. 1992 125p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- SAATH, R. *Qualidade do café natural e despulpado em diferentes condições de secagem e tempos de armazenamento*. 2010. 246 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP. Botucatu, SP.
- SAS INSTITUTE INC. *Statistical Analysis System*. Release 9.1. (Software). Cary, 2003.
- SELMAR D., BYTOF G., KNOPP S.E. (2008) "The Storage Of Green Coffee (Coffea Arabica): Decrease Of Viability And Changes Of Potential Aroma Precursors" *Annals Of Botany* 101: 31-38
- TAVEIRA, J. H. S. et al. Perfis proteicos e desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 47, n. 10, p. 1413-1554, out. 2012.
- WOODSTOCK, L. W. Physiological and biochemical tests for seed vigor. *Seed Science & Technology*, Zurich, v. 1, p. 127-157, 1973.