



**JULIANA MARIA CAMPOS PALUMBO**

**COMPREENDENDO O IMPACTO DA FERMENTAÇÃO  
DE CAFÉ EM BIORREATORES FECHADOS NA  
MICROBIOTA E NA QUALIDADE SENSORIAL DO CAFÉ**

**LAVRAS-MG**

**2020**

**JULIANA MARIA CAMPOS PALUMBO**

**COMPREENDENDO O IMPACTO DA FERMENTAÇÃO  
DE CAFÉ EM BIORREACTORES FECHADOS NA  
MICROBIOTA E NA QUALIDADE SENSORIAL DO CAFÉ**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola do Departamento de Biologia para obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosane Freitas Schwan

Co-orientadores

Prof. Dr. Flávio Meira Borém

Dr<sup>a</sup> Nádia Nara Batista

**LAVRAS-MG**

**2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Palumbo, Juliana Maria Campos.

Compreendendo o impacto da fermentação de café em  
biorreatores fechados na microbiota e na qualidade sensorial do  
café / Juliana Maria Campos Palumbo. - 2020.

83 p. : il.

Orientador(a): Rosane Freitas Schwan.

Coorientador(a): Flávio Meira Borém, Nádía Nara Batista.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Cultura Iniciadora. 2. Fermentação. 3. Processo. I. Schwan,  
Rosane Freitas. II. Borém, Flávio Meira. III. Batista, Nádía Nara.  
IV. Título.

**JULIANA MARIA CAMPOS PAUMBO**

**COMPREENDENDO O IMPACTO DA FERMENTAÇÃO DE CAFÉ EM  
BIORREATORES FECHADOS NA MICROBIOTA E NA QUALIDADE SENSORIAL  
DO CAFÉ**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola do Departamento de Biologia, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 6 de março de 2020.

Dr<sup>a</sup>. Cristina Ferreira Silva UFLA

Dr. Flávio Meira Borém UFLA

Dr<sup>a</sup>. Líbia Diniz Santos UFU

Dr<sup>a</sup> Patrícia Bernardes UFES

Dra. Rosane Freitas Schwan  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2020**

*Aos meus pais, exemplos de ética, amor incondicional e dedicação.  
Amo vocês!*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado, pela oportunidade de viver, por me dar sabedoria, e força para vencer cada um dos obstáculos.

A Universidade Federal de Lavras e ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realizar o presente trabalho.

À CAPES, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À minha orientadora Dra. Rosane, por todos os ensinamentos, confiança, apoio, oportunidades que me proporcionou durante o mestrado, e por acreditar no meu potencial.

Aos meus co-orientadores, Dra. Nádia e Professor Flávio, pela disponibilidade e pelas sugestões apresentadas, apoio e ensinamentos e contribuição com suas experiências.

Ao professor Flávio Meira Borém, por aceitar participar dos trabalhos realizados e por suas sugestões sempre muito grandiosas e aos colegas do Laboratório de Pós-Colheita do Café pela ajuda na condução dos experimentos.

Ao colega Luis, pela participação paralela a este trabalho e trocas de aprendizados.

Ao colega Diego, a Syngenta/Nucofee e os Q-Graders, pela disponibilidade e participação na análise sensorial.

A Fazenda Condado (Santa Rita do Sapucaí- MG), pelo café concedido para realização dos experimentos.

A todos os amigos, colegas e funcionários do departamento de Biologia, do programa de Microbiologia Agrícola, Thayanna, Beatriz, Juliete, Débora, Hugo, Pâmela, Luara, Nathália, Ana Paula, Angélica, Aline, Gustavo, Karen, Marcela, Dirceu, Cidinha, Ivani e Rose

Ao NEFER e a todos os que compõe este Núcleo.

A Dra. Luciana, pela ajuda na orientação dos experimentos e conselhos durante a pesquisa.

Aos professores da Microbiologia que foram responsáveis pela minha formação.

Aos meus antigos amigos e amigos que conheci durante essa caminhada nessa cidade encantadora, pela parceria e alegrias.

A todos os meus familiares, por sempre permanecer ao meu lado.

A minhas irmãs Sandreliza, Suelen, Maraisa e Júlia e aos meus sobrinhos Ana Carolina, Gustavo, Luiza, Maria Fernanda e André, por me inspirar a cada dia e pelas alegrias proporcionadas.

Ao meus pais, Elias e Liberaci, pelo amor, exemplo, incentivo e por me dar força para continuar lutando em todos os momentos em que pensei em desistir.

**MUITO OBRIGADA!**

*“Guia-me com tua verdade e ensina-me, pois tu és Deus, meu Salvador, e minha  
esperança está em ti o tempo todo.”*

Salmo 25 – 5



## RESUMO

O café é uma das bebidas não alcoólicas mais populares consumida mundialmente e sua qualidade está envolvida com o aroma e sabor da bebida. A fermentação em ambientes fechados, em anaerobiose induzida, com inoculação de culturas iniciadoras são etapas de metodologia recentemente utilizada que podem contribuir para a produção de cafés com características especiais. O objetivo do trabalho foi conhecer o perfil químico, sensorial e microbiológico do processo envolvendo a fermentação na fruta íntegra, seguida de descascamento e secagem em pergaminho com mucilagem remanescente, além disso, conhecer os microrganismos presentes na fermentação espontânea e avaliar o efeito da bebida através da inoculação de *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543 em diferentes tempos de fermentação. Cafés cerejas da variedade Mundo Novo foram avaliados nos tempos 0 horas (T1), 24 horas (T2), 48 horas (T3), 72 horas (T4) e 96 horas (T5) na fermentação inoculada e na fermentação espontânea (controle). A fermentação ocorreu em biorreatores fechados, em sistema de batelada simples. Os isolados foram identificados pelo perfil protéico (MALDI-TOF MS) e pelo sequenciamento do DNA. A quantificação do PCR em tempo real (qPCR) foi realizada para avaliar a persistência da cepa de *S. cerevisiae* que foi inoculada. Os açúcares e ácidos orgânicos foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e os compostos voláteis identificados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) durante a fermentação e secagem. Análise sensorial foi realizada no café torrado pela análise de dominância temporal das sensações (TDS). Na fermentação espontânea o tempo de 36 e 48 horas apresentaram as maiores populações de microrganismos. As bactérias dominaram o processo fermentativo em todos tratamentos. No início de secagem, a população bacteriana foi alta, aproximadamente 4,9 UFC/g, decrescendo até o final de secagem, enquanto a população de leveduras dominou (5,4 UFC/ml) no final da secagem. Um total de 228 isolados de bactérias e leveduras foram identificados. A cepa inoculada permaneceu viável durante o processo. A fermentação inoculada com a *S. cerevisiae* CCMA 0543 apresentou altas concentrações de ácido cítrico nos tratamentos 1 (15,15 mg/g) e 5 (14,39 mg/g). Ácido succínico esteve presente em todos os tratamentos, a maior concentração foi no tratamento 5 (5,03 mg/g). A concentração de ácido acético não interferiu na qualidade da bebida variando de 3,25 a 14,93 mg/g na fermentação espontânea e de 1,89 a 15,71 mg/g na fermentação inoculada. A concentração de glicose e frutose diminuiu durante a fermentação no biorreator e secagem. Um total de 118 compostos voláteis foram identificados em todas as amostras. O tratamento CCMA 0543 foi caracterizado pela produção de compostos voláteis pertencentes as classes de furanos, pirazinas e cetonas nos tratamentos 2 e 4 e ácidos nos tratamentos 1, 3 e 5. Cafés inoculados até 48 horas apresentaram sabores de caramelo como dominante, e frutado nas 72 horas, e uma complexidade de sabores foram observadas em 96 horas. A integração da tecnologia de fermentação semi-sólida em anaerobiose induzida pela ação da levedura inoculada no processo utilizado é uma estratégia inovadora. Este método apresentou resultados positivos para a bebida, acrescentando sabores na qualidade da bebida.

**Palavras chaves:** Microrganismos, Análises químicas, Análises microbiológicas, Culturas iniciadoras, Biorreatores.

## Abstract

Coffee is one of the most popular non-alcoholic beverages consumed worldwide, and its quality is involved with the aroma and taste of the beverage. Fermentation in closed environments, in induced anaerobiosis, with inoculation of starter cultures are some of the recently used methodologies that can contribute to the production of coffee with unique characteristics. The objective of the work was to characterize the chemical, sensorial, and microbiological profile of the process involving fermentation in the whole fruit, followed by peeling and drying in parchment with remaining mucilage. Besides, to know the microorganisms present in spontaneous fermentation and to evaluate the effect of the beverage through the inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543 in different fermentation times. New World cherry coffees were evaluated in treatment 1 (0 hours), 2 (24 hours), 3 (48 hours), 4 (72 hours), and 5 (96 hours) in the inoculated fermentation and spontaneous fermentation (control). Fermentation took place in closed bioreactors, in a simple batch system. The isolates were identified by the protein profile (MALDI-TOF MS) and DNA sequencing. Real-time PCR quantification (qPCR) was performed to assess the persistence of the inoculated *S. cerevisiae* strain. Sugars and organic acids were quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) and volatile compounds identified by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) during fermentation and drying. Sensory analysis was performed in roasted coffee by time dominance of sensations (TDS) analysis. In spontaneous fermentation, the time of 36 and 48 hours presented the largest populations of microorganisms. Bacteria dominated the fermentation process in all treatments. At the beginning of drying, the bacterial population was high, approximately 4.9 CFU/g, decreasing until the end of drying, while the yeast population dominated (5.4 CFU/ml) at the end of drying. A total of 228 isolates of bacteria and yeasts were identified. The inoculated strain remained viable during the process. The fermentation inoculated with *S. cerevisiae* CCMA 0543 showed high concentrations of citric acid in treatments 1 (15.15 mg/g) and 5 (14.39 mg/g). Succinic acid was present in all treatments, and the highest concentration was in treatment 5 (5.03 mg/g). The acetic acid concentration did not interfere in the quality of the beverage varying from 3.25 to 14.93 mg/g in spontaneous fermentation and from 1.89 to 15.71 mg/g in inoculated fermentation. The concentration of glucose and fructose decreased during fermentation in the bioreactor and drying. A total of 118 volatile compounds were identified in all samples. The CCMA 0543 treatment was characterized by the production of volatile compounds belonging to the classes of furans, pyrazines, and ketones in treatments 2 and 4 and acids in treatments 1, 3, and 5. Coffee inoculated up to 48 hours had caramel flavors as dominant, and fruity in 72 hours, and a complexity of flavors was observed in 96 hours. The integration of semi-solid fermentation technology in anaerobiosis induced by the action of the inoculated yeast in the process used is an innovative strategy. This method has shown positive results for the beverage, adding flavors to the quality of the beverage.

Keywords: Microorganisms, Chemical analysis, Microbiological analysis, Starter cultures, Bioreactors

## Lista de Figuras e tabelas

### PRIMEIRA PARTE

**Figura 1:** Partes da fruta cereja de café. Fonte: Adaptado de De Castro e Marraccini (2006). .....15

**Figura 2:** Fruto do café em grãos que posteriormente são torrados e darão origem a bebida. Fonte: SILVA, 2015; com adaptação.....25

### SEGUNDA PARTE

**Figura 1:** Biorreatores utilizados no experimento em triplicata (1, 2, 3) – fermentação espontânea (controle); (4, 5, 6) – fermentação inoculada.....42

**Figura 2:** (A) Modelo de biorreator de poliestireno utilizado no experimento e (B) medição de temperatura.....42

**Figura 3:** Café em pergaminho sendo secos ao sol em terreiros suspensos até atingir 11 a 12% umidade.....44

**Figura 4:** Fermentação espontânea (controle) e inoculada do fruto de café seguido de descascamento e secagem com mucilagem remanescente.....44

**Figura 5:** *Heatmap* mostrando o agrupamento das espécies de leveduras e bactérias, baseados na semelhança taxonômica em relação aos tempos 0 horas, 48 horas e 96 horas. Linhas azuis representam baixa abundância enquanto as linhas brancas representam média abundância e linhas vermelhas alta abundância. As linhas azuis representam baixa abundância de determinado grupo enquanto as linhas brancas representam média abundância e as linhas vermelhas alta abundância.....56

**Figura 6:** Comportamento dinâmico da população da levedura *S. cerevisiae* durante o processo fermentativo (A) espontâneo (▪) e inoculada (•) do café cereja e no início (IS) e final (FS) de secagem dos cafés descascados após 0 (T1), 24 (T2), 48 (T3), 72 (T4) e 96 (T5) horas de fermentação.....57

**Figura 7:** Ácidos orgânicos detectados durante a fermentação espontânea (a) e inoculada com *S. cerevisiae* CCMA 0543 (b) do café cereja e no início (1) e final (2) de secagem dos cafés descascados na base seca. Colunas seguidas da mesma letra não difere significativamente pelo teste de Scott – Knott ( $p < 0,05$ ).....59

**Figura 8:** Carboidratos detectados durante a fermentação espontânea (a) e inoculada com *S. cerevisiae* CCMA 0543 (b) do café cereja e no início (1) e final (2) de secagem dos cafés descascados na base seca. Colunas seguidas da mesma letra não difere

significativamente pelo teste de Scott – Knott (p<0,05).....61

**Figura 9:** Classes de compostos voláteis: ácidos, álcool, aldeído, ester, furano, cetona, lactonas, pirazinas, piridinas, pirrole, tiofeno, amina, amida e outros identificadas por HS-SPME GC-MS em grão de café torrado em relação ao tempo de 0 (tratamento 1), 24 (tratamento 2), 48 (tratamento 3), 72 (tratamento 4) e 96 horas (tratamento 5) na fermentação espontânea – 0, 24, 48, 72, 96 e inoculada com *S. cerevisiae* (CCMA 0543) – 1/0, 1/24, 1/48, 1/72, 1/96.....63

**Figura 10:** Domínio temporal das curvas de sensações da variedade de café Mundo Novo (a, c, e, g, i) na fermentação espontânea e (b, d, f, h, j) na fermentação inoculada com *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543. a/b = Tratamento 1 (0 horas); c/d = tratamento 2 (24 horas); e/f = tratamento 3 (48 horas); g/h = tratamento 4 (72 horas); i/j = tratamento 5 (96 horas).....65

**Tabela 1:** População de microrganismos presentes durante o processo fermentativo espontâneo do café natural.....50

**Tabela 2:** População de microrganismos no início e final de secagem do café descascado em diferentes tempos de fermentação .....51

**Material Complementar 1:** Espécies de bactérias e leveduras identificadas durante fermentação do café Catuaí Vermelho.....75

**Tabela 3:** Presença e identificação dos compostos voláteis nos tempos determinados em café torrado e descrição do odor ou sabor dos compostos.....77

## Sumário

RESUMO .....	7
INTRODUÇÃO.....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 Café.....	14
2.2 Economia e produção do café .....	16
2.3 Composição química do café.....	16
2.4 Microbiota presente no café .....	17
2.5 Fermentação de café .....	20
2.6 Qualidade do café e culturas iniciadoras .....	22
2.7 Processamento do café.....	24
2.7.1 Processamento Via Seca ou natural.....	25
2.7.2 Processamento Via Úmida.....	26
2.8 Biorreator.....	28
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	29
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30
SEGUNDA PARTE – ARTIGO .....	37
Resumo .....	38
INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1 Colheita e processamento do café.....	42
2.2 Cultura Iniciadora e Inoculação do café.....	46
2.3 Análise Microbiológica .....	43
2.3.1. <i>Quantificação, isolamento e caracterização fenotípica de microrganismos .....</i>	43
2.3.2. <i>Análise do Perfil Proteico (MALDI-TOF MS) .....</i>	44
2.3.3. <i>Identificação molecular de bactérias e leveduras .....</i>	44
2.4. Extração de DNA do café e PCR em tempo real (qPCR) .....	45
2.5. Análises químicas .....	46
2.5.1. <i>Açúcares e ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) .....</i>	46
2.5.3 <i>Análise de compostos voláteis por cromatografia a gás / espectrometria de massa (GC / MS) .....</i>	47

2.6. Análise sensorial.....	48
2.6.1 TDS.....	48
2.8 Análise estatística.....	48
3.RESULTADOS.....	49
3.1 Análises Microbiológicas.....	49
3.2 qPCR.....	57
3.3 Compostos químicos.....	57
3.4 TDS.....	62
4.DISSCUSSÃO.....	65
5.CONCLUSÃO.....	74
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
Anexos.....	84

## 1. INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais distribuídas no mundo e está entre os cinco produtos agrícola mais negociado internacionalmente (FAO, 2019). O Brasil é o maior produtor e exportador de café, devido a isso, a produção de grãos de café causa importante impacto na economia do país. Nos últimos anos, a qualidade do café tem sido valorizada dando credibilidade aos cafés especiais, que são produzidos com padrões de excelência do início ao fim do processo. Cafés especiais que devem atender aos segmentos do mercado e aceitos por terem aroma, corpo, doçura, acidez e sabor equilibrados.

A qualidade do café é diretamente afetada pelo local onde é cultivado, por aspectos ambientais, ações humanas e pela composição química dos grãos (ALVES et al., 2011). Entre várias classes de compostos químicos, sabe-se que os ácidos orgânicos, a sacarose, frutose, glicose entre outros compostos, contribuem para o sabor (KY et al., 2001; JHAM et al., 2002; CAMPA et al., 2004). Embora existam muitas etapas na elaboração de bebidas de café, a fermentação microbiana desempenha um papel com grande impacto na qualidade e valor do produto (RIBEIRO et al. 2018, BRESSANI et al. 2018). A microbiota responsável pela fermentação, como as, leveduras e bactérias podem contribuir para as características sensoriais e químicas devido à excreção de metabólitos produzidos durante este processo (MARTINEZ et al. 2019). Desse modo, um dos fatores importantes para selecionar culturas iniciadoras no processo de fermentação é o estudo da diversidade microbiana em frutos de café.

O uso de culturas iniciadoras tem proporcionado melhor fermentação e previsibilidade do produto final, uma vez que elas predominam sobre a microbiota presente (EVANGELISTA et al., 2014). Embora bactérias e leveduras tenham importantes características nas bebidas, cada cepa fornece determinada característica sensorial e é seletiva para cada região produtora.

Após a colheita, vários métodos estão disponíveis e vem sendo modificados de acordo com a região. A composição química dos grãos, bem como as características sensoriais da bebida é fortemente influenciada pela escolha do método de processamento, úmido ou seco, que influencia diretamente no perfil sensorial do café (BRANDO, BRANDO, 2015).

Atualmente, os consumidores estão interessados em descobrir novos sabores e aromas. As diferentes maneiras de processar o café pode melhorar ou dar consistência a qualidade, expandir o potencial do sabor, tornando importante o conhecimento do perfil químico, sensorial e microbiológico de novos processamentos.

Contudo, o uso de biorreatores em fermentações semi-sólidas, melhora a permanência dos inóculos, altera o perfil volátil e modifica o conteúdo de trigonelina e cafeína, além disso, já tem sido relatado para outros produtos, como por exemplo, o cacau (PEREIRA et al., 2013). Com o objetivo de incrementar a qualidade e a eficiência do novo processo fermentativo, propôs-se neste trabalho utilizar biorreatores de polietileno de alta densidade fechado, e avaliar o efeito da inoculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543, durante o processo fermentativo do café (fermentação da fruta íntegra e secagem em pergaminho). Além disso, o perfil microbiano e a produção de metabólitos foram avaliados neste trabalho.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Café**

O café é uma planta cultivada em mais de 50 países em desenvolvimento e é uma das bebidas não alcoólicas mais populares consumidas mundialmente (SELVAMURUGAN et al., 2010).

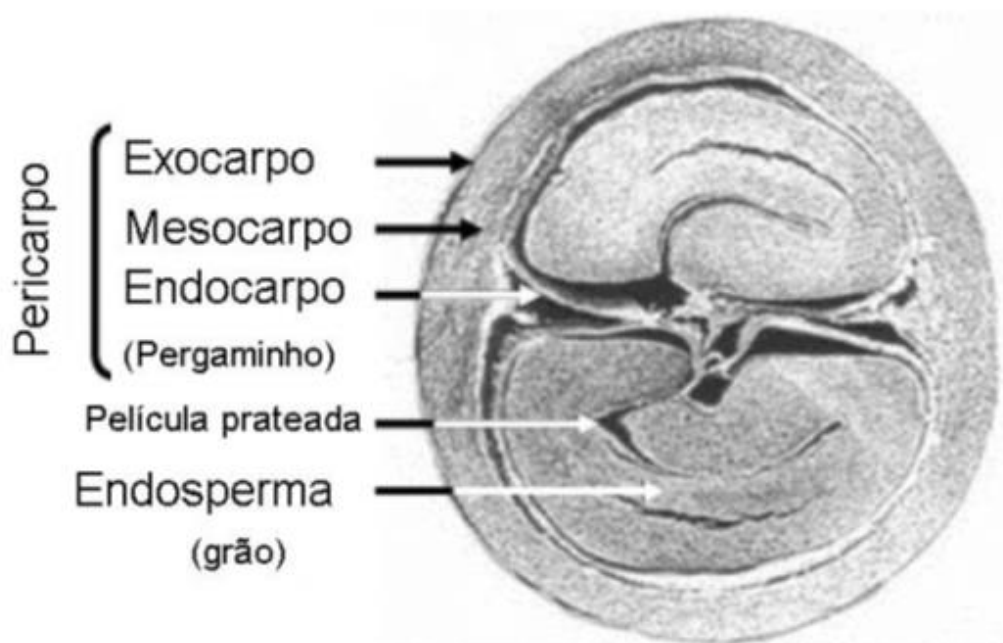
O cafeeiro faz parte do subdomínio das plantas conhecidas cientificamente como Angiosperma, o que significa que a planta se reproduz por sementes que estão dentro de um compartimento, conhecido como o ovário, na base da flor. Pertence ao gênero *Coffea* da família Rubiaceae, que tem cerca de 500 gêneros e mais de 6000 espécies (FARAH et al., 2015). Os membros desta família são em grande parte tropicais ou subtropicais, compreendendo mais de 100 espécies conhecidas, porém apenas duas têm grande importância na atividade comercial: *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (HAMDOUCHE et al., 2016). Essas duas espécies de café dominam o mercado mundial dentre a diversidade de espécies e são responsáveis pela maior parte das bebidas de café consumidas em todo mundo. *Coffea arabica* (arábica) corresponde 75% da produção mundial (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; SAKIYAMA; FERRÃO, 2014).



O café é uma planta perene com caule vertical proeminente, com sistema radicular superficial, as raízes de *Coffea arabica* penetram relativamente mais fundo no solo, enquanto o *Coffea canephora*, tem raízes concentradas muito próximas da superfície do solo (BARRETO et. al, 2006). Os cafeeiros crescem em regiões tropicais, temperatura média durante todo o ano de aproximadamente à 35° C (BARRETO et. al, 2006).

As cultivares Mundo Novo, Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo, são as mais cultivadas no Brasil (SINDICAFÉ-MG, 2015). Estas cultivares surgiram da necessidade de produzir plantas para resistir a doenças e pragas, aumentar o vigor vegetativo, tamanho de grãos, produtividade e principalmente a qualidade da bebida (CARVALHO, 2008).

O fruto compreende (1) a pele (epicarpo ou exocarpo), que é uma camada monocelular coberta com uma substância cerosa; é geralmente vermelho, rosa escuro ou amarelo; (2) a polpa (mesocarpo), em frutos maduros, apresenta uma camada pectinácea de mucilagem aderente ao pergaminho; (3) o pergaminho (endocarpo), que é fino, uma cobertura de polissacarídeo; (4) o perisperma, que é o revestimento de sementes composto principalmente por polissacarídeos, especialmente celulose e hemiceluloses, além de monossacarídeos, proteínas, polifenóis, e outros compostos menores; e (5) duas sementes contendo endosperma e embriões (Figura 1).



**Figura 1:** Partes da fruta cereja de café. Fonte: Adaptado de De Castro e Marraccini (2006).

## 2.2 Economia e produção de café

Devido ao aumento do número de consumidores interessados em cafés especiais, a importância econômica do café tem crescido a cada ano. A maior parte da bebida de café preparada no mundo é produzida a partir da espécie de café *Coffea arabica*, pois alcança preços altos nos mercados de exportação brasileira (GIELISSEN; GRAAFLAND, 2009). É considerada mais apreciada, devido suas propriedades sensoriais (BERTRAND et al., 2003).

O Brasil é o principal produtor de café, seguido pelo Vietnã, Colômbia, Indonésia, Etiópia, Índia, México entre outros países. Brasil é também o maior exportador mundial de café (FAO, 2019), e segundo maior consumidor do produto, ficando apenas atrás dos Estados Unidos (SOUSA; COSTA, 2015). Os principais estados produtores de café no Brasil são Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Paraná, Rondônia e Rio de Janeiro, com produção de 30,4 milhões de sacas em café arábica no estado de Minas Gerais (CONAB, 2019).

Aproximadamente 155 milhões de sacas de 60 Kg de café são produzidos anualmente em torno de 10,5 milhões de hectares em mais de 50 países. Do total mundial, cerca de 63% é produzida na América Central e do Sul. Do restante, 30% são produzidos na Ásia e 7% na África (ICO, 2019).

De acordo com International Coffee Organization (ICO) (2019), as exportações aumentaram em 4,1% no ano de 2019, considerando as exportações mundiais de *Coffea arabica* totalizaram 75,32 milhões de sacas, enquanto as exportações de *Coffea canephora*, somaram 43,62 milhões, em comparação com as sacas do ano de 2018.

## 2.3 Composição química do café

O conhecimento das propriedades físicas e químicas pode levar ao melhor entendimento da aplicação do café, tornando uma ferramenta útil para ampliar o mercado de exportação e manter a qualidade e competitividade (KITZBERGER et al., 2013). O perfil químico dos componentes precursores de aroma e sabor do café varia em função de vários parâmetros dentre eles, fatores genéticos, fatores ambientais como: as condições do solo, clima, localizações geográficas, pré e pós colheita, que podem

afetar diretamente a qualidade da bebida (KITZBERGER et al., 2013). Além disso, a qualidade do café é fortemente influenciada pelo processo de secagem e torrefação empregado (SHIBAMOTO, 2015).

Os principais componentes dos tecidos fibrosos do grão de café são: celulose e hemicelulose. A glicose, xilose, galactose, manose e arabinose são os monossacarídeos presentes no exocarpo do café (CARNEIRO et al., 2009, MUSSATTO et al., 2011a). A mucilagem é uma camada viscosa (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012), constituída de: água (84,2%), proteína (8,9%), açúcar (4,1%), substâncias pécnicas (0,91%) e cinzas (0,7%) (BELITZ; GROSCHE; SCHIEBERLE, 2009). A análise da composição dos resíduos insolúveis em álcool mostrou a presença de substâncias pécnicas, celulose e polissacarídeos não celulósicos, cerca de 30%, 8 % e 18%, respectivamente (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012), constituindo excelente substrato para o crescimento de microrganismos (BONILLA-HERMOSA; DUARTE; SCHWAN, 2014).

Os ácidos clorogênicos são ésteres que constituem uma classe de compostos importantes na semente do café, além dos lipídeos, proteínas, trigonelina, e os minerais (BORÉM, 2008). A cafeína é encontrada tanto livre no citoplasma quanto ligada na parede celular do fruto onde, provavelmente, está associada aos ácidos clorogênicos (CLIFFORD, 1985). Dentre os compostos não voláteis, ácido clorogênico e trigonelina, a cafeína é a única substância termoestável, enquanto as demais podem ser transformadas ou até mesmo destruídas pelo processo de torrefação (MUSSATTO et al., 2011).

O grão do café contém componentes voláteis e não-voláteis, tais como cetonas, ácidos, aldeídos, ácidos graxos, carboidratos, compostos fenólicos, açúcares, proteínas, aminoácidos, além de enzimas, que agem sobre estes compostos (LEE et al., 2015) contribuindo para qualidade sensorial da bebida que está relacionada diretamente com a composição química dos grãos. Além disso, a etapa de torra do processo pode modificar a composição química do grão e muitos compostos químicos já foram identificados na bebida apresentando atributos benéficos (BELITZ et al., 2009). A atividade antioxidante e a qualidade da bebida final do café são resultantes da presença destes componentes, além dos compostos fenólicos (PERRONI et al., 2012).

## **2.4 Microbiota presente no café**

A microbiota presente no café é complexa e inclui bactérias, leveduras e fungos filamentosos, é influenciada por fatores ambientais da região de cultivo, como umidade, temperatura, população microbiana do solo, variedade do café e tipo de processamento (SILVA et al., 2000, SILVA et al., 2003; DE BRUYN et al., 2017). Os frutos do café são excelente substrato para o crescimento de microrganismos devido à presença de açúcares e pectinas da mucilagem (SILVA et al., 2000, 2015).

A fermentação microbiana natural do café pode influenciar a qualidade do produto final (SCHWAN; WHEALS, 2003; SILVA et al., 2000). No processamento do café, três papéis importantes são atribuídos a microrganismos (1) a produção de enzimas pectinolíticas e ou celulolíticas, para degradar a mucilagem e a polpa; (2) a produção de micotoxinas devido à pouca secagem e (3) armazenamento, devido as condições inadequadas (SILVA et al., 2008). Os microrganismos estão associados com a degradação da mucilagem devido à produção de enzimas pectinolíticas, consequentemente há produção de metabólitos que se difundem para o interior dos grãos de café e reagem com substâncias responsáveis pelo sabor da bebida. Há formação de álcoois e ácidos, especialmente ácido acético, láctico, ácidos carboxílicos, butírico e propiônico, podendo influenciar de forma positiva ou negativa na bebida final de café (SCHWAN; WHEALS, 2003; SILVA et al., 2000).

As bactérias aparecem com maior frequência durante a fermentação de café natural, semi-seca ou CD e úmida (SCHWAN; WHEALS, 2003). No processamento natural do café, alguns gêneros de bactérias foram encontrados como *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Microbacterium* e *Lactobacillus* (Silva et al., 2000). No processamento semi-seco ou CD, Vilela et al. (2010) isolaram e identificaram espécies de bactérias como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus cereus* e *Klebsiella pneumoniae*. *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* e *Weissella* foram as bactérias ácido lácticas mais abundantes encontradas em estudos da diversidade em café cereja e processado pela via semi-seca ou CD (EVANGELISTA et al., 2014a). As espécies *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Weissella confusa*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis* e *Actinobacterium sp.* foram identificados a partir da fermentação de café pela via úmida (EVANGELISTA et al., 2015). Foi observado também, que as bactérias do ácido láctico predominam o processamento úmido (SCHILLINGER et al., 2008; LEONG et

al., 2014; BATISTA et al., 2016; RIBEIRO et al., 2018). Exemplos de espécies identificadas na via úmida da variedade Mundo Novo foram *Bacillus humi*, *B. simplex*, *Brevibacillus parabrevis*, *Gluconobacter oxydans*, *Lysinibacillus macroides*, *Microbacterium testaceum*, *Paenibacillus lactis*, *Pantoea dispersa*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* (RIBEIRO et al., 2018).

As leveduras tendem a aumentar durante a fermentação/secagem e podem atingir valores superiores aos da população bacteriana com o decréscimo da umidade e atividade de água. Os gêneros de leveduras mais comuns encontrados, independente do processamento são: *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Hanseniaspora* e *Kluyveromyces* (MASOUD et al., 2004; SILVA et al., 2008 ; VILELA et al., 2010; EVANGELISTA et al., 2015). Silva et al. (2000; 2008) isolaram e identificaram leveduras em fermentações pelo processamento natural. Os gêneros comumente encontrados foram *Pichia*, *Candida*, *Arxula*, *Saccharomycopsis* e *Debaryomyces*. As espécies *Torulaspora delbrueckii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces sp.*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kloeckera sp.*, *Candida membranifaciens* foram encontradas no processamento semi-seco ou CD (VILELA et al., 2010). No processamento úmido foram encontradas com maior frequência *Meyerozyma caribbica* e *Hanseniaspora uvarum*, seguidas pelas espécies *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyveri*, *Pichia anomala*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia caribbica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida pseudonitermedia*, *Pichia ohmeri* e *Issatchenkia orientalis* (EVANGELISTA et al., 2015).

Durante o processamento úmido do café arábica foram identificadas por Masoud et al. (2004) algumas leveduras em diferentes estádios de maturação: *Hanseniaspora uvarum* foi predominante sobre café cereja e durante a fermentação. *Pichia anomala* predominou sobre os cafés cerejas, polpas, grãos frescos durante o primeiro dia de fermentação. Essa estirpe foi também isolada durante o processo de secagem. *Pichia kluyveri* foi predominante durante a fermentação e secagem. Outras espécies isoladas foram: *Torulaspora delbrueckii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida pseudonitermedia*, *Pichia ohmeri* e *Issatchenkia orientalis*. As leveduras são as mais estudadas e usadas para fermentar café, devido os seus atributos favoráveis ao sabor da bebida (EVANGELISTA et al., 2014a, b; MARTINEZ et al., 2017; BRESSANI et al., 2018) e por serem microrganismos que apresentam boa capacidade de produzir PL (pectina liase) e compostos orgânicos (SILVA et al., 2013). Alguns desses atributos de sabor

são: caramelo, chocolate, materiais herbáceos, frutas amarelas e amêndoas. Além disso, as leveduras também podem inibir o crescimento de fungos micotoxigênicos (SOUZA et al. 2017) e reduzirem o tempo de processamento e secagem, melhorando a qualidade sensorial e valor econômico do produto (SILVA et al., 2013; EVANGELISTA et al., 2014a). Existem poucos trabalhos de implementação utilizando culturas iniciadoras bacterianas no café, onde especialmente as bactérias do ácido láctico (BAL) foram utilizadas no processamento via úmida (WANG et al., 2018). Recentemente, utilizou-se bactérias mesofílicas como *Bacillus subtilis*, *Pantoea dispersa* e *Arthrobacter koreensis* (MARTINEZ et al., 2019). Embora bactérias e leveduras tenham importantes características nas bebidas, cada cepa fornece uma determinada característica e é seletiva para cada região produtora (MARTINEZ et al., 2019).

Os fungos filamentosos já relatados encontrados em café secos em terreiro são: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium* sp., *Penicillium* spp, *Aspergillus niger*, *Cladosporium* sp, *Rhizopus nigricans* Ehr., *Rhizopus* sp., *Phomopsis* sp. e *Epicoccum* sp. (BITANCOURT, 1957). *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Penicillium* foram isolados de café natural (arábica) (SILVA et al., 2000). Estes fungos estão relacionados com a produção de substâncias toxigênicas, como por exemplo, a Ocratoxina A por *Aspergillus ochraceus* (BATISTA et al., 2008).

Em particular, um cuidado maior durante a secagem e armazenamento são importantes para que não ocorra a produção de substâncias indesejáveis por esses microrganismos e até mesmo o crescimento de microrganismos indesejáveis (MASOUD et al., 2004 , SILVA et al., 2008 , VILELA et al., 2010). A população de cada grupo microbiano depende do método de processamento, variedade, região, altitude e da extensão da perda de água durante o processo natural de secagem do café (SILVA et al., 2000, 2008; SAKIYAMA et al., 2001; SCHWAN e WHEALS, 2003, RIBEIRO et al. 2018; MARTINS et al., 2020).

## **2.5 Fermentação de café**

As fermentações podem ocorrer no fruto do café desde o seu amadurecimento ainda na planta, até a etapa de secagem (BATISTA, CHALFOUN et al, 2016), e podem ser favoráveis ou desfavoráveis à qualidade sensorial e segurança do produto final, a depender das condições ambientais nas quais ocorrem.

A fermentação de frutos de café ocorre de maneira espontânea, independentemente do método de processamento, ou através do uso de culturas iniciadoras, podendo auxiliar na padronização do processo, o que favorece o processamento mais homogêneo de um volume maior de café. Durante a secagem do café natural em terreiro também ocorre fermentação espontânea, devido à presença de diversos microrganismos (SILVA et al., 2008).

Durante a fermentação, ocorrem mudanças físico-químicas nos frutos, como a redução no teor de água e açúcares simples e a formação de precursores de aroma e sabor, além disso, fermentação é a etapa em que a mucilagem é degradada, removendo assim a camada mucilagínosa rica em polissacarídeos (pectinas) (VAAST et al. 2006; SILVA et al., 2013; LEE et al., 2015). Devido a ação de enzimas pectinolíticas e celulolíticas, os microrganismos epifíticos podem passar para a polpa, abrindo microporos na casca do fruto devido à perda de água pela abertura do pedúnculo após a colheita (SCHWAN et al., 2014).

As enzimas poligalacturonase catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 em ácido péctico (ácido poligalacturônico); a pectina liase (PL) que age catalisando a quebra de pectina por meio de transeliminação, liberando ácidos galacturônicos insaturados e a pectina metilesterase (PME) responsável pela desesterificação do grupo metoxil da pectina formadora de ácido péctico e metanol, (ÁGATA e BHAT, 1966; MASOUD e JESPERSEN, 2006, SILVA, 2013). Tais enzimas podem ser adicionadas durante o processo de fermentação, ou podem ser secretadas pelos microrganismos durante a fermentação (JAYANI et al. 2005 ; UENOJO e PASTORE, 2007).

As enzimas pectinolíticas que são capazes de utilizar, em conjunto ou isoladamente, o substrato, é de importância na degradação da mucilagem. Microrganismos que apresentam alta atividade de pectina liase ou alta atividade de poligalacturonase e pectina metilesterase simultaneamente são de grande importância no processo de fermentação e têm potencial para serem utilizados como culturas iniciadoras para a padronização do processo de fermentação do café (VILELA, 2011; SILVA et al., 2013).

A fermentação de açúcares pectinolíticos produz etanol e ácidos carboxílico, acético, butírico entre outros. Quando há formação de ácidos butírico e propiônico em concentrações elevadas a partir da fermentação bacteriana, provoca uma perda de

qualidade devido à difusão dos ácidos para os grãos (AMORIM; AMORIM, 1977), logo a fermentação altera a qualidade da bebida final podendo ser de maneira positiva ou negativa. Portanto é necessário o controle, como por exemplo, a utilização de culturas iniciadoras. Pectinases são importantes na fermentação de café, pois aceleram o processo de fermentação, melhorando a qualidade do produto final. Celulases, pectinases e hemicelulases, presentes em preparações comerciais, podem ser aspergidas nos grãos, acelerando o processo de fermentação. Como enzimas comerciais tem alto custo, são utilizadas enzimas pécticas microbianas obtidas da fermentação (KASHYAP et al., 2001; SILVA et al., 2000).

## **2.6 Qualidade do café e culturas iniciadoras**

O café de boa qualidade é considerado aquele que apresenta sabor e aroma agradáveis, bom corpo, acidez natural e suavidade ao paladar. Deve estar de acordo com as normas higiênico-sanitárias, possuir poucos defeitos, cor e aspecto homogêneo (BORÉM, 2004) e atender aos consumidores. Por isso, a qualidade do café apresenta influência sobre o preço do produto, tornando importante nas relações comerciais (BING CHENG et al., 2016).

A qualidade do café está muito envolvida com o aroma e o sabor da bebida, isso acontece por causa da complexidade dos compostos dos cafés; mais de 800 compostos voláteis compõem a formação do aroma e sabor tais como ácidos, aldeídos, cetonas (CHIN, EYRES; MARRIOTT, 2015), açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, compostos fenólicos e a ação de enzimas (LEE et al., 2015). A formação do aroma de café é desejável e atribuída a reações de Maillard, que são uma cascata de reações que se desenvolvem durante o aquecimento de açúcares redutores, juntamente com outras reações catalisadas termicamente que ocorrem durante a torrefação, resultando na formação de substâncias marrons-melanoidinas (SHIBAO; BASTOS, 2011).

A demanda por cafés especiais é crescente e são considerados especiais por apresentarem sabor e aroma únicos, muito bem aceitos no mercado mundial (SOUZA et al., 2002). É conceituado quanto aos seus atributos de qualidade, como características físicas, sensoriais, sob as quais o café é produzido. De acordo com a metodologia de Avaliação Sensorial da SCAA (Specialty Coffee Association of America, 2013), usada



por todos os países, café especial é todo aquele que atinge, no mínimo, 80 pontos na escala de pontuação, sendo avaliados os atributos como fragrância, doçura, sabor, acidez, corpo, finalização e ausência de defeitos.

Vários são os fatores que interferem na qualidade do café, sendo eles: a microbiota presente no café (EVANGELISTA et al., 2014b), a forma da colheita (se é seletiva ou não) (MURTHY; BASAVARAJ; NAIDU, 2001), parâmetros como a espécie de café, variedade, fatores pré e pós colheita, altitude (ESQUIVEL; JIMENEZ, 2012; RIBEIRO et al., 2018; MARTINS et al., 2020), os constituintes físico-químicos (PIMENTA, 2003), os precursores na formação de compostos voláteis (LEE et al., 2015), além da presença de cafeína, trigonelina e compostos fenólicos (SELMAR et al., 2014).

A seleção de microrganismos específicos como culturas iniciadoras utilizadas durante a fermentação do café é importante para melhorar a qualidade do processo de fermentação e a qualidade sensorial da bebida final (VAUGHAN, MITCHELL e GARDENER, 2015 e SOUZA et al., 2016), além disso prevenir o crescimento de microrganismos indesejáveis (MASSAWE; LIFA, 2010). Leveduras e bactérias podem ser utilizadas como culturas iniciadoras, mas cada grupo ou cepa apresenta características diferentes (SILVA et al., 2013; MARTINEZ et al., 2019), dependendo da variedade de café e do método de processamento (EVANGELISTA et al., 2014a, 2014b). Ribeiro et al. (2017) constatou que a *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543 apresentou maior persistência na inoculação e o grão e café com características sensoriais melhores em comparação com *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200 após fermentação por via semi-seca. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543 foi utilizada neste trabalho com base em sua capacidade de produzir PL e compostos orgânicos (SILVA et al., 2013).

Portanto, leveduras pectinolíticas em quantidades adequadas podem ser adicionadas durante a fermentação do café para acelerar o processamento e melhorar a qualidade do café (SCHWAN E WHEALS, 2003), podendo tornar-se alguns cafés especiais. A seleção de culturas utilizadas na fermentação do café deve ser baseada na produção de pectinase, conseqüentemente, há produção de ácidos e outros compostos metabólicos que interferem na qualidade final da bebida (SILVA et al., 2013).

Estudos da biodiversidade microbiana em frutos de café são necessários para selecionar microrganismos como culturas iniciadoras específicas para processos de

fermentação (SILVA et al., 2013) e serem utilizados de maneira adequada na variedade e no processamento estudado. Para os produtores, o uso de culturas iniciadoras aumenta o valor da bebida, aumentando substancialmente o incremento recebido pelo produtor.

## 2.7 Processamento do café

Alguns fatores como características climáticas, cultivares, condução e manejo da lavoura, colheita, tipo de processamento, secagem e armazenamento influenciam na qualidade final do café (BORÉM, 2008; CARVALHO et al., 1994; CARVALHO; CHALFOUN, 1985).

O processamento dos frutos de café se inicia na colheita, porém os fatores que influenciam na qualidade devem ser considerados desde o plantio (BORGES; JORGE; NORONHA, 2002). A colheita deve ser feita quando a maior parte dos frutos estiverem maduros, a fim de evitar a presença de grãos verdes, pretos e ardidos, influenciando a qualidade do café (BORÉM, 2008).

O processamento do café é a etapa após a colheita, onde os frutos são transformados e o grão verde é revelado. O processo pode modificar ou ajustar a qualidade intrínseca do grão e, por exemplo, enfatizar características como corpo ou acidez sem necessariamente mudar outras características sensoriais do grão. Frutas de café, também chamadas de café cerejas, têm várias camadas cobrindo as sementes: a pele, referida como polpa, mucilagem, pergaminho e pele prateada (WINTGENS, 2009; BORÉM, 2014).

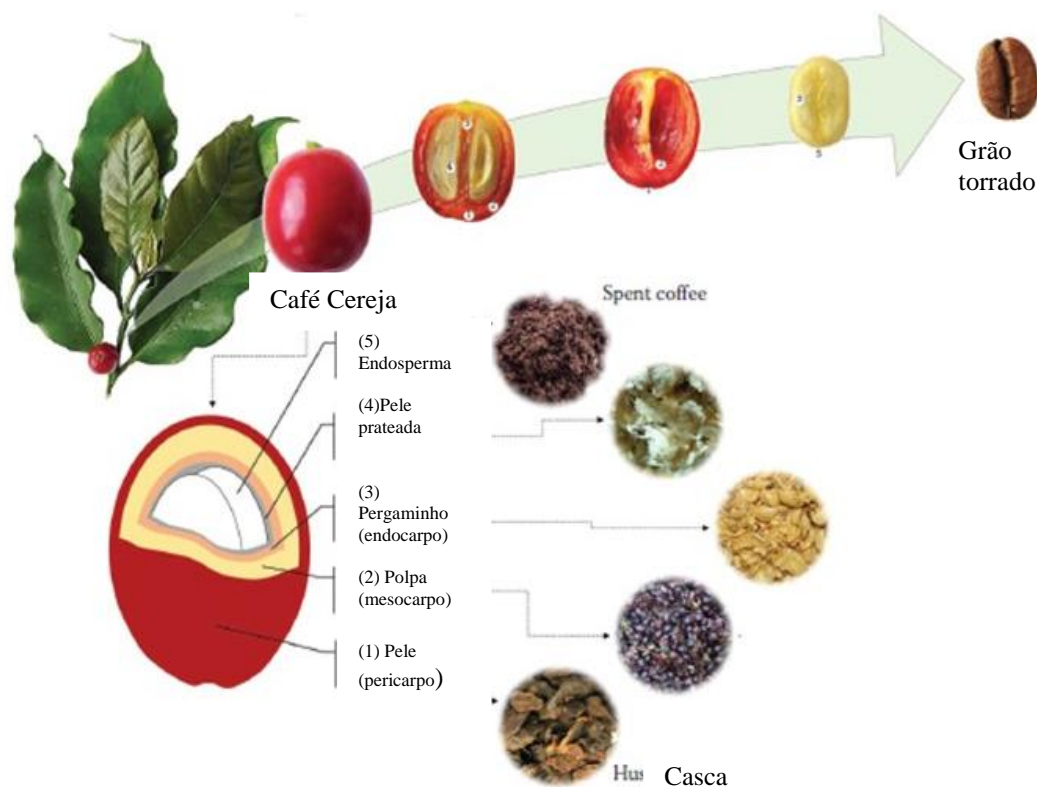
O processamento do café de forma inadequada pode promover fermentações indesejáveis, estimulando a produção de ácidos butírico e propiônico, comprometendo a qualidade da bebida (CHALFOUN; CARVALHO, 2000). Entretanto, quando a fermentação ocorre de forma controlada, pode contribuir para formação de compostos, favorecendo o aroma e sabor do café (BRANDO; BRANDO, 2014).

Após a colheita, o processamento deve ser feito imediatamente para prevenir fermentações indesejáveis, pela ocorrência de micotoxinas a partir de fungos filamentosos, como por exemplo, *Aspergillus ochraceus* (NASCIMENTO et al., 2008). O processamento do café consiste na conversão do fruto em grãos que posteriormente

são torrados e dão origem a bebida, como mostrado na figura 2. A separação entre os frutos verdes e frutos cerejas é fundamental para obtenção de uma bebida de melhor qualidade e, para isto, precisa-se utilizar as mais diferentes técnicas de processamento (WINTGENS, 2004; BORÉM, 2008).

Os cafés cereja são processados por dois métodos distintos: via natural ou seca e via úmida (WINTGENS, 2009; BORÉM, 2014). Além disso, existem muitas variações, como natural despulpado, “honey” ou desmucilado. Todos visam permitir a secagem das frutas até um teor de umidade de 11% a 12% base úmida (bu).

**Figura 2.** Fruto do café em grãos que posteriormente são torrados e darão origem a bebida. Fonte: SILVA, 2015; com adaptação.



### 2.7.1 Processamento Via Seca ou natural

A via natural ou seca para processar café, consiste em secar as frutas junto com o exocarpo e mucilagem, que são removidas apenas uma vez secas. Os cafés processados de maneira natural fornecem uma bebida com corpo pesado e atributos doces, suaves e complexos. Além de controlar a maturidade dos frutos do café que são

colhidos e separando as frutas flutuantes, não há muitas possibilidades de influenciar a qualidade do grão (BORÉM, 2014).

Este processo é o método mais antigo e o mais simples (BORÉM, 2008; BRANDO; BRANDO, 2015). No Brasil, Etiópia e Iêmen predomina esse tipo de método para o café arábica, utilizando também em praticamente todo o café robusta no mundo (BRANDO, 2004; BORÉM, 2008).

O processamento via natural retém uma maior concentração de glicose e frutose nos frutos, pois são menos consumidos durante o metabolismo, sendo caracterizados por ser totalmente aeróbico (KNOPP, BYTOF; SELMAR, 2005; EVANGELISTA et. al., 2014). Esse é o método que menos afeta a condição natural do café, pois todas as suas estruturas são mantidas (BORÉM, 2008).

A fermentação e secagem ocorrem simultâneos e variam entre 10 e 25 dias, dependendo da umidade inicial do fruto, do clima, das instalações disponíveis e da qualidade final desejada (SILVA et al., 2000, SCHWAN; WHEALS, 2003; BORÉM, 2008). Pode ser feita em terreiros (suspenso, coberto ou convencional) ou em secadores mecânicos (VILELA, 2009). Durante a etapa de secagem ocorre fermentação microbiana natural, em que enzimas são liberadas alterando assim a mucilagem, podendo influenciar na qualidade do café (SILVA et al., 2000). A fermentação do fruto inteiro, geralmente, produz uma bebida que, é doce, suave e complexa (SCHWAN; WHEALS, 2003).

### **2.7.2 Processamento Via Úmida**

O método úmido, por outro lado, tem muitas maneiras de modificar o processo para obter alterações de sabor. É muito utilizado para o café arábica, na Colômbia, América Central e no Havaí (BORÉM, 2008). O exocarpo e a mucilagem são removidos, há o processo de fermentação e depois secagem. Variações nesses processos podem influenciar significativamente a qualidade e o potencial de sabor do copo. De acordo com estudo Alves et al., (2017) para o mesmo teor de umidade, o café despulpado pode apresentar uma taxa de secagem mais rápida que o café natural. Além disso, para um determinado teor de umidade e tipo de processamento, a temperatura mais alta resulta em uma taxa de secagem mais rápida. A remoção da água do café se

torna mais difícil devido às fortes forças de adsorção entre a água e os outros constituintes do grão (ALVES et al., 2017).

A via úmida pode ser conduzida de três formas distintas sendo: café despulpado, café desmucilado e café descascado (CD ou honey) também chamado de semi-seco por alguns autores (SCHWAN et al 2003, SILVA et al., 2008, RIBEIRO et al., 2018). A retirada do exocarpo e parte da mucilagem onde as sementes são submetidas ao processo de fermentação anaeróbico realizado em tanques contendo água para a retirada do restante da mucilagem que ficou aderida ao pergaminho, chamado de café despulpado. A remoção do exocarpo e parte da mucilagem, resulta no café cereja descascado (CD). A remoção mecanicamente do exocarpo e da mucilagem, produz o café desmucilado (BORÉM, 2008).

São necessárias etapas de lavagem, despulpamento, fermentação e secagem em terreiro e/ou secadores mecânicos (ABIC, 2015). A maneira de remover a mucilagem é por fermentação natural, que geralmente varia de 6 até 72 horas, dependendo de alguns fatores e principalmente da temperatura ambiente. Temperaturas mais altas (25-30°C) aceleram o processo e a remoção de mucilagem é mais rápida, porém temperaturas muito altas podem influenciar na fermentação de maneira negativa (BRANDO; BRANDO, 2015).

A fermentação em tanques de água enfatiza a acidez, o aroma e descarta alguma adstringência. O café natural descascado ou café “honey” (pergaminho apresenta uma aparência pegajosa, conhecido como mel) consiste na combinação dos métodos úmido e seco. O Instituto de Agronomia de Campinas, IAC, no Brasil, tentou pela primeira vez a realização do processo “Honey”, onde a polpa é removida e o pergaminho é seco com alguma ou toda a mucilagem restante e apresentou impactos positivos na qualidade, conhecido como Cereja Descascado ou CD realizados por outros autores (BORÉM, 2014; SCHWAN et al., 2003).

Dessa maneira foi observado que a quantidade residual de mucilagem no pergaminho influencia o sabor do café, tendo isso em vista, no final dos anos 80, o processo natural descascado ganhou destaque, expandindo-se do Brasil para outras regiões, como o Centro América, onde o café é conhecido como café com mel (honey). O processo permite a produção de cafés naturais de alta qualidade e secagem mais rápida devido a mucilagem presente no pergaminho. Na América Central, três tipos de café foram processados o café amarelo (“Yellow”), vermelho (“Red”) e preto

("Black"), referentes a oxidação do açúcar durante a secagem (SANZ-URIBE et al., 2017).

O método empregado dirigido principalmente pelos parâmetros: quantidade de água, oxigênio (aeróbico ou anaeróbico) ou microrganismo, são exemplos apresentados em alguns casos, como específicos para uma cultura local, o que leva a um sabor específico do café daquela região. Além disso, o processamento controlado, o método utilizado e o uso de biorreatores, pode aumentar a diversidade aromática e, portanto, aumentar o preço do café (SANZ-URIBE et al., 2017). Mas ainda há uma grande área para descobertas sobre os efeitos do método de processamento em biorreatores e oportunidade de adotar métodos para sua utilização em processos por vias naturais ou úmidas.

No entanto, mesmo que a escolha do método de processamento é orientada para a cultura do lugar, há também tendências para variar os processos para alterar deliberadamente o sabor de café (SANZ-URIBE et al., 2017). Os consumidores atualmente estão interessados em descobrir novos sabores e aromas. A partir disso, as diferentes maneiras de processar o café como a fermentação da fruta íntegra durante um certo tempo, seguido de descascamento e secagem em pergaminho com mucilagem remanescente pode melhorar ou dar consistência a qualidade e expandir o potencial do sabor, pois esse processo é empírico e é de grande importância o estudo desse processamento, sendo estudado no presente trabalho.

## **2.8 Biorreator**

Os biorreatores ou reatores químicos, biológicos, de um modo geral, são locais propício onde ocorre uma série de reações bioquímicas catalisadas por células vivas (microbianas ou vegetais) modificando um substrato (SOUSA et al. 2013).

Vários tipos de biorreatores foram desenvolvidos, podem ter formas diferentes e serem abertos ou fechados: quando a substância a ser catalisada é sólida, o controle de todos os parâmetros é dificultado pela heterogeneidade do meio (SOUSA et al., 2013). Quando a substância é líquida e homogênea são utilizados biorreatores para processos submersos que em escala laboratorial, são frascos fechados esterilizados, com ou sem agitação e controle de temperatura, pH, produtos formados, aminoácidos disponíveis, consumo de fonte de carbono e nitrogênio (SOUSA et al., 2013). O uso de biorreatores em fermentações semi-sólidas foi relatado para outros produtos, como o cacau

(PEREIRA et al., 2013), e atualmente está sendo estudado para fermentações de café, com o objetivo de incrementar a qualidade e a eficiência do processo fermentativo.

De um modo geral, dependendo da sua dimensão e do objetivo da sua utilização, os biorreatores podem ser à escala laboratorial, ou escala industrial. A utilização de biorreatores fornece algumas vantagens como a alta produtividade e eficiência do processo; melhor controle das condições de cultura; suprimento controlado de nutriente/biorregulador; automação do processo e mudança e adequação do meio (LI et al., 2018). Além disso, alguns parâmetros são importantes no decorrer do processo de fermentação em biorreatores, como a temperatura e pH (BORZANI et al., 1983; LI et al., 2018), além de contribuir para a permanência dos microrganismos dominantes durante o processamento do café (MARTINEZ et al., 2017) e ambiente propício para seu desenvolvimento com modificação subsequente do substrato. A fermentação utilizando biorreatores tem contribuído de forma positiva e vêm sendo estudadas.

### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A demanda mundial por cafés especiais tem aumentado em proporções maiores do que em cafés regulares. Por isso, é de extrema importância o conhecimento da microbiota do café, do processo utilizado e o impacto que pode causar na qualidade da bebida. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543 tem potencial para ser utilizada como cultura iniciadora em café, devido suas características e foi selecionada neste estudo para avaliar seus efeitos frente ao processamento adotado, pois a inoculação auxilia a inibição de microrganismos indesejáveis e contribui para uma melhor qualidade do produto e sua padronização. Além disso, o perfil dos compostos voláteis e sensorial da bebida, produzidos por essas culturas microbianas, tem proporcionado de forma positiva a bebida de café, fazendo com que esses sejam considerados especiais. No mais, a produção de compostos em relação ao tempo de fermentação e a utilização de biorreatores mostra-se eficiente no decorrer da fermentação, além de contribuir para a permanência de microrganismos desejáveis. Por isso, a seleção de culturas iniciadoras específicas, deve ser realizada do próprio substrato onde serão re-inoculadas e estar aliada às tecnologias apropriadas para a disseminação dessas culturas, além do aprimoramento de novos métodos em processar o café e o conhecimento de processos que influenciam na qualidade da bebida.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGATE A. D, BHAT J. V. Role of pectinolytic yeasts in the degradation mucilage layer of coffea robusta cherries. **Applied Environmental Microbiology**. v14(2): p 256–260. 1966.

ALVES H. M. R., VOLPATO M. M. L., VIEIRA T. G. C, BORÉM F. M, BARBOSA J. N. Características ambientais e qualidade da bebida dos cafés do estado de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, 2011.

ALVES, G. E., BORÉM, F. M., ISQUIERDO, E. P., SIQUEIRA, V. C., CIRILLO, M. Â., & PINTO, A. C. F. Physiological and sensorial quality of Arabica coffee subjected to different temperatures and drying airflows. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 39(2), 225-233. 2017.

AMORIM, H.V., AMORIM, V.L. Coffee enzymes and coffee quality. In: Ory, R.L., Angelo, A.J.St. (Eds.), Enzymes in food and beverage processing. **American Chemical Society**, Washington. p 27–55, 1977.

BARRETO C. V. G., SAKAI E., ARRUDA F. B., SILVA E. A., PIRES R. C. M. Distribuição espacial do sistema radicular do cafeeiro fertirrigado por gotejamento em Campinas. **Bragantia**. vol.65, no.4. 2006.

BATISTA L. R.; CHALFOUN S. S. M.; SILVA E BATISTA C. F.; SCHWAN R. F. Coffee: Types and Production. In: Caballero, B., Finglas, P., and Toldrá, F. (eds.) **The Encyclopedia of Food and Health**. vol. 2, pp. 244-251. 2016.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P (Eds.) **Coffee, tea, cocoa**. Food Chemistry. Leipzig: Springer. 4. p. 938–951. 2009.

BING CHENG, B. et al. Influence of genotype and environment on coffee quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 57, p.20-30, 2016.

BONILLA-HERMOSA, V. A.; DUARTE, W. F.; SCHWAN, R. F. Utilization of coffee by-products obtained from semi-washed process for production of value-added compounds. **Bioresource Technology**, v. 166, p. 142-150, 2014.

BORÉM F. M.; CORADI P. C.; SAATH R.; OLIVEIRA J. A. Qualidade do Café natural e despulpado após secagem em terreiro e em altas temperaturas. **Ciência e agrotecnologia**. v. 32, n. 5, p. 1609-1615. 2008.

BORÉM, F. M. Handbook of Coffee Post-Harvest Technology, ISBN 978-0-9915721-0-6. Cozzolino, D. Near infrared spectroscopy in natural products analysis. **Planta Medica**. v.75 (7), p 746-756. 2014.



BORZANI W.; LIMA U. A.; AQUARONE E. Engenharia Bioquímica, In: Biotecnologia. Editora Blucher. v 03, 1983.

BORGES, F. B.; JORGE, J. T.; NORONHA, R. Influência da idade da planta e da maturação dos frutos no momento da colheita na qualidade do café. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 158-163, 2002.

BRANDO C.H.J. BRANDO M.F. Methods of coffee fermentation and drying. In: Schwan RF, Fleet GH (eds), Cocoa and Coffee Fermentation. CRC Taylor & Francis, Boca Raton, FL, pp. 367–398. 2015.

BRESSANI, A.P.P. MARTINEZ S.J. EVANGELISTA S.R. DIAS D.R. SCHWAN R.F. Characteristics of fermented coffee inoculated with yeast starter cultures using different inoculation methods. **LWT**, v. 92, p. 212-219, 2018.

Café no Brasil. Agricultura, pecuária e abastecimento. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira>. Acessado em 10 novembro 2018.

Café Imports. Available online: <https://www.cafeimports.com/north-america/Processes> Acessado em 24 agosto 2018.

CAMPA, C.; BLLESTER, J. F.; DOULBEAU, S.; DUSSERT, S.; HAMON, S.; NOIROT, M. Trigonelline and sucrose diversity in wild Coffea species. **Food Chemistry**, Washington, v. 88, p. 39-43, Jan. 2004.

CARVALHO, C. H. S. Cultivares de café: origens, características e recomendações. Brasília-DF: **Embrapa Café**, v.1, p. 157-226, 2008.

CARNEIRO L. M.; SILVA J. P. A.; MUSSATO S. I.; ROBERTO I. C.; TEIXEIRA J. A. Determination of total carbohydrates content in coffee industry residues. In: 8th international meeting of the Portuguese Carbohydrate Group, **GLUPO**. p. 94 , 2009.

CARVALHO, V. D.; CHAGAS, S. J. R.; CHALFOUN, S.M.; BORTREL, N.; JUSTE JÚNIOR, E. S. G. Relação entre a composição físico-química dos grãos de café beneficiado e a qualidade da bebida do café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 449-445, mar. 1994.

CARVALHO, V. D.; CHALFOUN, S. M. Aspectos qualitativos do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 79-92, 1985.

CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. D. Efeito de microrganismos na qualidade da bebida do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte- MG, Brasil, v. 18, n. 1, p. 21-26, 2000.

CHIN S. T., EYRES G. T., & MARRIOTT P. J. Application of integrated comprehensive/ multidimensional gas chromatography with mass spectrometry and olfactometry for aroma analysis in wine and coffee. **Food Chemistry**. v 185, p 355–361, 2015.

CONAB. Companhia nacional de abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 02 dezembro. 2019

DEBRUYN, S.J. ZHANG, V. POTHAKOS, J. TORRES, C. LAMBOT, A.V. MORON I. Exploring the impacts of postharvest processing on the microbiota and metabolite profiles during Green coffee bean production. **Applied and Environmental Microbiology**. v 83, p. 1-16, 2017.

ESQUIVEL, V. M. JIMENEZ. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**. v 46, p. 488-496, 2012.

EVANGELISTA, S. R., MIGUEL, M. G. C. P., CORDEIRO, C. S., SILVA, C. F., PINHEIRO, A. C. M., & SCHWAN, R. F. Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. **Food Microbiology**. v 44, p 87–95. 2014a.

EVANGELISTA, S. R., MIGUEL, M. G. C. P., CORDEIRO, C. S., SILVA, C. F., PINHEIRO, A. C. M., & SCHWAN, R. F. Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. **Food Research International**, v 61, p 183–195, 2014b.

FAO. Enhancement of coffee quality through the prevention of mould formation. **Final Technical Report**; 2006.

FARAH, A.; DOS SANTOS, T. F. The coffee plant and beans: An introduction. *In Coffee in health and disease prevention*. Academic Press. p 5-10. 2015.

GIELISSEN, R., & GRAAFLAND, J. Concepts of price fairness: Empirical research into the Dutch coffee market. **Business Ethics: A European Review**, 2(18), 165–178. 2009.

HAMDOUCHE, Y., MEILE, J. C., NGANOU, D. N., DURAND, N., TEYSSIER, C., & MONTET, D. Discrimination of post-harvest coffee processing methods by microbial ecology analyses. **Food Control**, 65, 112-120. 2016.

International Coffee Organization (ICO) (2019) [http://consorciopesquisacafe.com.br/arquivos/consorcio/publicacoes\\_tecnicas/Relatorio-OIC-marco-2015.pdf](http://consorciopesquisacafe.com.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/Relatorio-OIC-marco-2015.pdf). Accessed 16 March 2019.

JAYANI RS, SAXENA S, GUPTA R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**. v 40, p 2931–2944. 2005.

JHAM G. N.; FERNANDES S. A.; GARCIA C. F.; SILVA A. A. D. Comparison of GC and HPLC for the quantification of organic acids in coffee. **Phytochemistry Anal**. v 13(2), p 99-104, 2002.

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 77, n. 3, p. 215-227, 2001.

KITZBERGER, C. S. G. et al. Composição química de cafés arábica de cultivares tradicionais e modernas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 11, p. 1498-1506, 2013.

KY C-L, LOUARN J, DUSSERT S, GUYOT B, HAMON S, NOIROT M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. **Food Chemistry**. v 75, p 223-230, 2001.

LEE L.W.; CHEONGE M.W.; CURRAN P.; YU B.; LIU S. Q. Coffee fermentation and flavor – An intricate and delicate relationship. **Food Chemistry**. v 185, p 182–191, 2015.

LEONG, K. H., CHEN, Y. S., PAN, S. F., CHEN, J. J., WU, H. C., CHANG, Y. C., & YANAGIDA, F. Diversity of lactic acid bacteria associated with fresh coffee cherries in Taiwan. **Current Microbiology**, 68(4), 440–447. 2014

LI G.; LI H.; WEI G.; ELE X.; XU S.; CHEN K.; OUYANG P.; JI X. Hydrodynamics, mass transfer and cell growth characteristics in a novel microbulle stirred bioreactor employing sintered porous metalplateimpeller as gas sparger. **Chemical Engineering Science**. v 192, p 665-677, 2018.

MARTINEZ S.J.; BRESSANI A. N. P.; MIGUEL G. C. P.; DIAS D. R.; SCHWAN R. F. Different inoculation methods for semi-dry processed coffee using yeasts as starter cultures. **Food Research International**. p 333–340, v 102. 2017.

MARTINEZ, S. J.; DIAS D. R.; SCHWAN R. F. Effect of Bacterial and Yeast Starters on the Formation of Volatile and Organic Acid Compounds in Coffee Beans and Selection of Flavors Markers Precursors During Wet Fermentation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

MARTINS, P. M. M.; BATISTA, N. N.; MIGUEL M. G. C.P.; SIMAO, J. B. P.; SOARES J. R.; SCHWAN R. F. Coffee growing altitude influences the microbiota, chemical compounds and the quality of fermented coffees. **Food Research International**. 129.2020.

MASOUD, W.; CESAR, L.B.; JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**. v 21, p 549–556, 2004.

MASOUD W, JESPERSEN L. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. **International Journal Food Microbiology**. v 110, p 291–296. 2006.

MASSAVE, G.A., LIFA, S.J. Yeasts and lactic acid bacteria coffee fermentation starter cultures. **International Journal Postharvest Technology Innovations**. v 2 (1), p 41 e 80, 2010.

MUSSATO S. I.; ERCÍLIA E. M. S.; MARTINS S.; JOSÉ A. T. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. **Food and Bioprocess Technology**. v 4, p 661–72, 2011a.

PERRONE, D.; FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 4265-4275, 2012.

PEREIRA, G. V. M.; MAGALHÃES, K. T.; ALMEIDA A. G.; COELHO I. S.; SCHWAN R. F. Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical–chemical properties. **International Journal of Food Microbiology**. v. 161, p.121-133. 2013.

PIMENTA, C. J. Qualidade de café. **Lavras: UFLA**. p. 77-160. 2003..

RIBEIRO, L.S. EVANGELISTA S.R. MIGUEL M.G.C.P. MULLEM J.V. SILVA C.F. SCHWAN R.F. Microbiological and chemical-sensory characteristics of three coffee varieties processed by wet fermentation. **Annals of microbiology**, v. 68, n. 10, p. 705-716, 2018.

SAIYAMA, N. S.; FERRÃO, A. G. Botany and Production of Coffee. In: R. F. SCHWAN, N. S. FLEET, G. H. (Eds.) **Cocoa and Coffee Fermentations**. New York: CRC Press. p. 341-366. 2015.

SANZ-URIBE J. R.; YUSIANTO; MENON S. N.; AINDA PEN~UELA; OLIVEIROS C.; HUSSON J.; BRANDO C.; RODRIGUEZ A. Postharvest Processing Revealing the Green Bean. **The Craft and Science of Coffee**. Cap. 3. P 51-79. 2017.

SCAA. Specialty Coffee Association of America. <http://www.scaa.org/PDF/resources/cupping-protocols.pdf> Accessed 23.08.2019.

SCAA. Specialty Coffee Association of America (2013). <http://www.scaa.org/PDF/resources/cupping-protocols.pdf> Accessed 10.11.2019.

SCHILLINGER, U., BOEHRINGER, B., WALLBAUM, S., CAROLINE, L., GONFA, A., HUCH, M., & FRANZ, C. M. A genus-specific PCR method for differentiation between *Leuconostoc* and *Weissella* and its application in identification of heterofermentative lactic acid bacteria from coffee fermentation. **FEMS Microbiology Letters**, 286(2), 222–226. 2008.

SCHWAN R. F., WHEALS A. E. Mixed microbial fermentations of chocolate and coffee. In: Boekhout, T., Robert, V. (Eds.), **Yeast sin Food**. p.429–449, 2003.

SCHWAN, R.F., GRAHAM, H.F. Cocoa and Coffee Fermentations. In: Encyclopedia of **Food Microbiology**, p. 466-473. 2014.

SELMAR, D.; KLEINWÄCHTER, M.; BYTOF, G. Metabolic responses of coffee beans during processing and their impact on coffee flavor. In: SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H (Eds.) **Cocoa and Coffee Fermentations**. CRC Press, 2014, p. 431-476. 2015.

SELVAMURUGAN, M., DORAISAMY, P., MAHESWARI, M. An integrated treatment system for coffee processing wastewater using anaerobic and aerobic process. **Ecological Engineering**. v. 36, p. 1686-1690. 2010.

SHIBAO, J.; BASTOS, D. H. M. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 24, n. 6, p. 895-904, 2011.

SHIBAMOTO, T. Volatile chemicals from thermal degradation of less volatile coffee components. In: **Coffee in Health and Disease Prevention**. Academic Press. p. 129-135. 2015.

SILVA, C. F., SCHWAN R. F., DIAS E. S., WHEALS A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal Food Microbiology**. v 60, p 251–260, 2000.

SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. Microbiota presente em frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.) despulpado e natural: uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 37, n. 1, p. 22-28, 2003.

SILVA C.F.; BATISTAM, L.R.; ABREU, L.M.; DIAS, E.S.; SCHWAN, R.F. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**. v 25, p 951–957, 2008.

SILVA, C. F., VILELA, D. M., CORDEIRO, C. S., DUARTE, W. F., DIAS, D. R., & SCHWAN, R. F. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v 29, p 235–247, 2013

SILVA, C. R.; SCHWAN R. F. Microbial activity during coffee fermentation G.H. Fleet (Eds.), **Cocoa and coffee fermentations**, CRC Press, New York, pp. 398-423, 2015.

SOUZA M. L.; PASSAMANI F. R. F.; BATISTA L. R.; ÁVILA C. L. S.; DUARTE W. F.; SCHWAN R. F. Use of wild yeasts as a biocontrol agent against toxigenic fungi and OTA production. *Acta Scientiarum*. **Agronomy**, v 39. 2016.

SOUZA, M. C. M.; SAES. M. S. M.; OTANI, M. N. Pequenos agricultores familiares e sua inserção no Mercado de cafés especiais: uma abordagem preliminar. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 32, n. 11, 2002.

SOUSA, A. G.; COSTA, T. H. M. de. Usual coffee intake in Brazil: results from the National Dietary Survey 2008–9. **British Journal of Nutrition**, v. 113, p. 1615–1620, 2015.

SOUSA G. P., PEREIRA L. L., SILVEIRA M. C. A. Produção de biorreator tipo bandeja fechado com aeração forçada em escala laboratorial. **Ciências Tecnológicas**. 2013.

UENOJO M, PASTORE G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**. v 30, p 388–394. 2007.

VAUGHAN M. J.; MITCHELL T., & GARDENER B. B. Mc. S. What's inside that seed we brew? A new approach to mining the coffee microbiome. **Applied and Environmental Microbiology**. v 81(19), p 6518–6527, 2015.

VILELA, D.M.; PEREIRA, G.V.M.; SILVA, C.F.; BATISTA, L.R.; SCHWAN, R.F. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**. v 27, p 1128–1135, 2010.

WANG, C., SUN, J., LASSABLIERE, B., YU, B., ZHAO, F., ZHAO, F. et al. Potential of lactic acid bacteria to modulate coffee volatiles and effect of glucose supplementation: fermentation of green coffee beans and impact of coffee roasting. **Journal Sci Food Agriculture**. v 99, 409–420. doi: 10.1002/jsfa. 9202. 2018.

WINTGENS, J. Factors influencing the quality of green coffee. In: Wintgens, J.N. (Ed.), *Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production. A Guidebook for Growers, Processors, Traders and Researchers*. Wiley-VCH, pp. 797 e 817. 2009

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

---

**Compreendendo o impacto da fermentação de café em  
biorreatores fechados, na microbiota, no perfil metabólico e  
na qualidade do café**

## Resumo

O objetivo do trabalho foi conhecer o perfil químico, sensorial e microbiológico do processo envolvendo a fermentação do fruto de café inteiro e café em pergaminho durante a secagem. Os microrganismos presentes na fermentação espontânea, e o efeito na bebida pela inoculação de *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543 em biorreatores fechados com limite de oxigênio foram avaliados. O processo fermentativo foi avaliado por 96 h. Os isolados foram identificados pelo Perfil Proteico (MALDI-TOF MS) e sequenciamento do DNA. Amostras foram coletadas para análise de qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (persistência do inóculo), HPLC (ácidos e açúcares) e GC-MS (compostos voláteis). Análise sensorial foi realizada no café torrado pela análise de dominância temporal das sensações (TDS). Bactérias mesofílicas, lácticas e leveduras de diversas espécies foram presentes ao decorrer da fermentação espontânea, sem inoculação de levedura. No início de secagem, a população bacteriana foi alta, aproximadamente 4,9 UFC/g, decrescendo até o final de secagem. Leveduras foram o grupo microbiano dominante no final de secagem (5,4 UFC/g). Um total de 228 isolados foram identificados sendo dominantes as bactérias *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* e *Staphylococcus warneri* e as leveduras *Torulaspora delbrueckii* e *Hanseniaspora uvarum*. Na fermentação inoculada, altas concentrações de ácido cítrico nos tratamentos 1 (15,15 mg/g) e 5 (14,39 mg/g) e ácido succínico a maior concentração no tratamento 5 (5,03 mg/g). Açúcares (glicose, frutose) diminuíram durante a fermentação no biorreator e secagem. Um total de 118 compostos voláteis foram identificados nos grãos de café torrados. Após a torrefação, a fermentação com CCMA 0543 foi caracterizada pela produção de compostos voláteis pertencentes às classes de furanos, pirazinas e cetonas (24 e 72 horas) e ácidos (0, 48 e 96 horas). CCMA 0543 apresentou sabores de caramelo dominante até 48 horas, frutado nas 72 horas, e uma complexidade de sabores em 96 horas. Na fermentação espontânea variadas sensações foram percebidas. A *S. cerevisiae* CCMA 0543 manteve viável durante o processo. O uso de biorreatores e a metodologia utilizada neste trabalho contribuiu para eficiência da fermentação e incrementou sabores na qualidade do café.

**Palavras chaves:** Microrganismos, Análises químicas, Análises microbiológicas, Culturas iniciadoras, Biorreatores.



## INTRODUÇÃO

O café é uma das commodities mais importantes do mundo, feito a partir de grãos de café moídos e torrados, que é amplamente consumido e considerado popular devido às suas propriedades estimulantes (BALLESTEROS et al., 2014, CONTRERAS-CALDERÓN et al., 2016, MARTINEZ et al., 2017).

O Brasil é o principal produtor de café, seguido pelo Vietnã, Colômbia, Indonésia, Etiópia, Índia, México entre outros países, Além disso, lidera a exportação mundial (FAO, 2019), exportando principalmente para EUA, Rússia, Japão e Coreia (KWAK et al., 2018). Em alguns países europeus, o café é uma das principais fontes de antioxidantes na dieta (KWAK et al., 2018).

Nos últimos anos, a qualidade do café tem sido valorizada, ressaltando os cafés especiais, caracterizados pela ausência de defeitos e por um conjunto específico de aromas e sabores (RIBEIRO et al., 2017). As tecnologias que podem ser implementadas para melhorar a qualidade, vão desde a plantação de café até o armazenamento.

O café pode ser processado de maneira íntegra (fruta intacta) ou descascado sendo denominados como método natural e úmido, respectivamente (BORÉM et al., 2008). A combinação dos métodos de processamento tem ganhado destaque. A fermentação do fruto íntegro seguido do descascamento tem acelerado o processo de secagem e contribuído para melhorar a performance sensorial.

O perfil sensorial é resultado da combinação entre compostos voláteis e não voláteis contribuindo com a qualidade da bebida final (CHIN, EYRES E MARRIOTT, 2015). As interações entre compostos voláteis e proteínas, componentes fenólicos, carboidratos ou lipídeos podem modificar a liberação de componentes voláteis podendo ser responsáveis pelo decréscimo na intensidade de percepção de determinados aromas (MUNRO et al., 2003; ZELLNER et al., 2008). A diversidade de sabores do café é atribuído a microbiota presente durante o processo fermentativo que é influenciada pelas condições climáticas da região. Microrganismos pectinolíticos tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *Candida parapsilosis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia caribbica*, *Pichia guiliermondii*, foram selecionadas como culturas iniciadoras e tem mostrado grande alternativa na modulação do sabor do café (LEE et al., 2015; LEE et al., 2016; LEE et al., 2017; SILVA et al., 2014).

A produção de pectinases são importantes na fermentação de café, pois aceleram o processo de fermentação, melhorando a qualidade do produto final (KASHYAP et al., 2001; SILVA et al., 2000). Microrganismos que apresentam alta atividade de pectina liase ou alta atividade de poligalacturonase e pectina metilesterase são de grande importância no processo de fermentação e têm potencial para serem utilizados como culturas iniciadoras para a padronização do processo de fermentação do café (VILELA, 2011; SILVA et al., 2013). Esse processo precisa de estudo frequente para desenvolver culturas iniciais para fermentação do café, com objetivo de proporcionar mais sabor e qualidade à bebida (SILVA et al 2013; RIBEIRO et al 2018; HAILE E KANG, 2019). A utilização de um processo controlável seria adequada para a produção industrial e é particularmente aplicável aos grãos de café para melhorar sua qualidade e agregar valores econômicos. Os cafés resultantes podem ser utilizados na produção de vários produtos relacionados ao café, como bebidas, doces e aromas, a fim de proporcionar um sabor aprimorado para os produtos finais (WANG et al., 2020).

A utilização de biorreatores em fermentações semi-sólidas durante o processo fermentativo tem mostrado melhor performance das culturas e dos microrganismos epifíticos contribuindo positivamente com a qualidade da bebida final (SILVA et al., 2008; DE NETO et al., 2017). Além disso, altera o perfil volátil e modifica o conteúdo de trigonelina e cafeína, uma vez que já tem sido relatado para outros produtos, como por exemplo, o cacau (PEREIRA et al., 2013).

O processo de fermentação bem conduzido, proporciona benefícios sensoriais significativamente melhorados e qualidades diferenciadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil microbiano do fruto de café integro fermentado em biorreatores e secos em pergaminho. Além disso, investigar o comportamento da cultura iniciadora *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543 e sua influência na produção de metabolitos e no perfil sensorial da bebida.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Colheita e processamento do café.**

Frutos cereja (*Coffea arabica* L.) variedade Mundo Novo foram coletados mecanicamente na fazenda Condado, localizada em Santa Rita do Sapucaí, (Latitude: 22° 14' 60" Sul, Longitude: 45° 43' 11" Oeste) região sudoeste de Minas Gerais - Brasil,

à aproximadamente 825 a 980 metros de altitude, com clima subtropical úmido. O café (75Kg) foi fermentado espontaneamente (controle) e inoculado com *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543, em biorreatores de polietileno de alta densidade, cilíndrico com capacidade para 100 L (Figura 1). A cepa foi crescida em meio YEPG [g/L: 10 extrato de levedura (HiMedia)], 10 peptona (HiMedia)], 20 glicose (Dinamica), 20 ágar (HiMedia)] a 30°C e repicadas a cada 24 horas (Evangelista et al. 2014a). As células foram recuperadas por centrifugação (7000 rpm, 10 min) e ressuspensas em 1 L de água peptona estéril [1 g / L de Peptona (Himedia)]. A solução foi aspergida sobre os cafés cereja, atingindo uma concentração de aproximadamente 7 células/g de café.



Figura 1: Biorreatores utilizados no experimento em triplicata (1, 2, 3) – fermentação espontânea (controle); (4, 5, 6) – fermentação inoculada.

Figura 2: (A) Modelo de biorreator de poliestireno utilizado no experimento e (B) medição de temperatura.



Após 0, 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação, os frutos de café (15Kg) foram descascados (PENAGOS/DCV-183) e secos em terreiro suspenso até atingir 11 a 12%

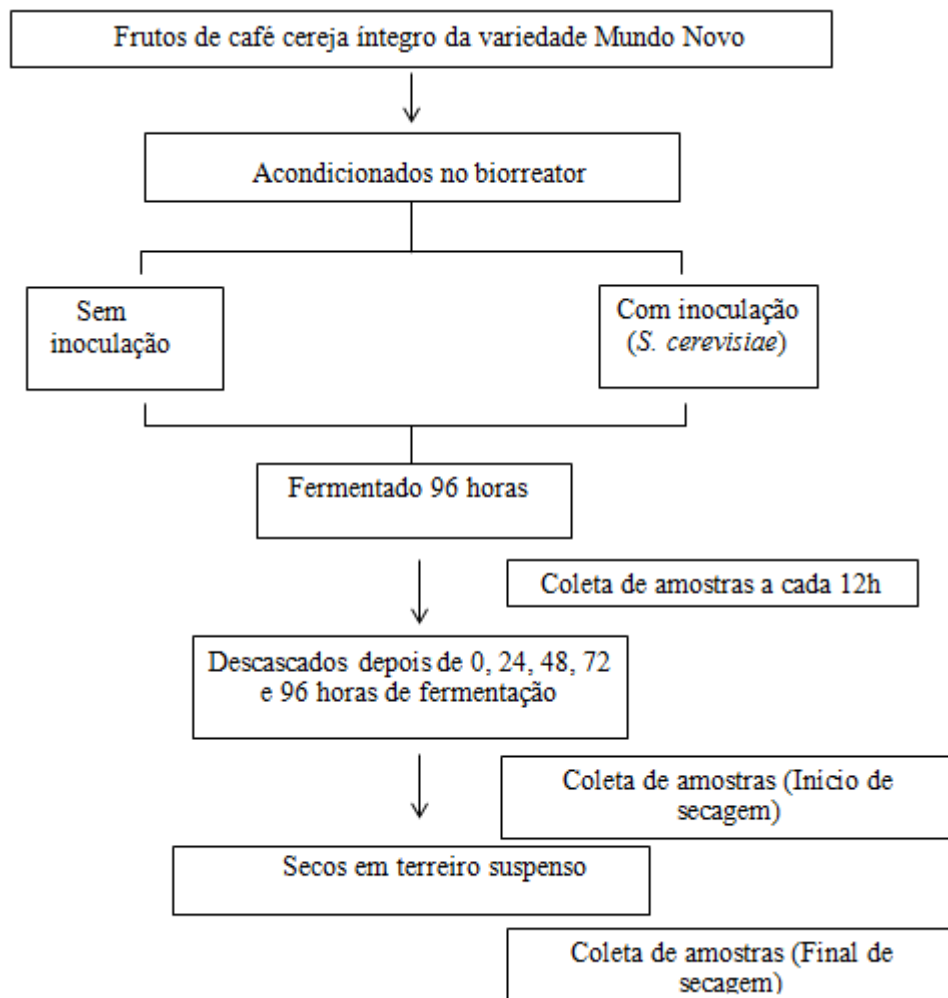
umidade (Figura 3). A secagem em pergaminho com mucilagem remanescente é uma variação do processo conhecido como “honey” (POLTRONIERE E ROSSI, 2016). O processamento do café está esquematizado na figura 4.

Aproximadamente 100g de café foram coletadas a cada 12 horas do processo fermentativo e no início e final da secagem. As amostras foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até à realização das análises químicas e microbiológicas. A fermentação foi realizada em triplicata e acompanhada pela medição da temperatura.



Figura 3: Café em pergaminho secos ao sol em terreiros suspensos até atingir 11 a 12% umidade.

Figura 4: Fermentação espontânea (sem inoculação) e inoculada do fruto de café seguido de descascamento e secagem com mucilagem remanescente.



## 2.3 Análise Microbiológica

### 2.3.1. Quantificação, isolamento e caracterização fenotípica de microrganismos

A análise microbiológica foi realizada durante a fermentação e secagem da fermentação espontânea. Amostras de café (10 g) foram homogeneizadas em 90 ml de água peptonada (0.1% v/w peptona bacteriológica (HiMedia) em Orbital Shaker (200 rpm – 20 min) e diluições seriadas foram realizadas (RIBEIRO et al., 2018). Bactérias mesófilas foram enumeradas e isoladas em meio AN [Ágar Nutriente (HiMedia)] e bactérias lácticas utilizando Ágar MRS [De Man, Rogosa e Sharpe (HiMedia)] adicionados de 0,1 % de nistatina, para inibição de fungos filamentosos e leveduras. As placas foram incubadas a 28 e 37 °C por 48 h, respectivamente. Leveduras foram enumeradas e isoladas em meio YEPG [g/L: 10 extrato de levedura (HiMedia), 10 peptona (HiMedia), 20 glicose (Dinamica), 20 ágar (HiMedia)] e as placas foram

incubadas a 28 °C por 48 h. Após o período de incubação, foi obtido Unidades Formadoras de Colônias (UFC/ml).

O isolamento dos microrganismos foi realizado nos tempos de 0, 48 e 96 horas de fermentação que corresponde ao início, meio e fim do processo. As colônias foram aleatoriamente selecionadas e repicadas em número igual à raiz quadrada do número total de colônias (SENGUNA et al., 2009). As culturas puras foram crescidas e estocadas a 20% de glicerol em ultra freezer a -80° C.

### **2.3.2. Análise do Perfil Proteico (MALDI-TOF MS)**

Todos os isolados (228) foram submetidos a análise do perfil protéico no MALDI-TOF MS. As células foram crescidas em placas utilizando meios específicos para cada grupo de microrganismo, como descrito acima, e incubadas por 18 horas.

A extração protéica foi realizada com solução orgânica contendo etanol, acetonitrila e ácido trifluoroacético (10%) na proporção 1:1:1 para bactérias e para leveduras foi utilizado a solução de 25 % ácido fórmico em água (v/v). A massa celular de cada estirpe foi transferida para eppendorfs com 6 µL de solução orgânica, agitadas em vórtex por 30 segundos e colocadas no sonicador por 5 minutos. Uma alíquota de 0,6 µL da extração proteica foi adicionada à placa do MALDI-TOF. Em seguida foi adicionado 1 µL de solução matriz [ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA)], previamente preparada para uma concentração final de 10 mg CHCA/mL de solução orgânica. A bactéria *Escherichia coli* foi utilizada como padrão para o MALDI-TOF, como descrito por Lima-Neto et al. (2014). Cada isolado foi analisado em triplicata para medir a qualidade e reprodutibilidade dos espectros. As amostras foram analisadas em um espectrômetro MALDI-TOF microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) utilizando o sistema de identificação MALDI Biotyper 3.0 (LIMA-NETO et al., 2014).

### **2.3.3. Identificação molecular de bactérias e leveduras**

A partir do agrupamento realizada pela técnica de MALDI TOF cepas com abaixo de 1,7 e algumas acima de 2 foram selecionadas para sequenciamento do DNA.

O DNA da comunidade bacteriana foi amplificada com primer 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1512R (5' ACGGCTACCTTGTTACGACT 3') (MAGALHÃES et al., 2010) abrange a região 16S rRNA. O DNA da comunidade de leveduras foi amplificada utilizando primer ITS1 (5'-CGTAGGTGAACCTGCGG-3'); e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (SILVA et al., 2012). As reações foram feitas para 25 µL contendo 12,5 µL do kit top taq master (Quiagen), 0,5 de cada primer, 3 µL de DNA molde e 8,5 µL de água ultra pura (EVANGELISTA et al., 2014), com modificações.

As reações foram levadas para um termociclador sob as seguintes condições: 94°C por 2 min, 30 ciclos (94°C por 40 s, 58°C por 40 s e 72°C por 1 min e 30 s) e a extensão final foi de 72°C por 7 min. Para verificar a qualidade dos *amplicons* as reações foram corridas em gel de agarose a 1,0% (EVANGELISTA et al., 2014) com modificações. Os produtos de PCR amplificados foram purificados usando kit (Quiagen), e enviados para sequenciamento à GoGenetic (Curitiba – PR). As sequências foram alinhadas usando um editor de alinhamento de sequências BioEdit 7.7 e comparado com o banco de dados do GenBank usando o algoritmo BLAST (National Center for Biotechnology Information, Maryland, EUA).

Microrganismos identificados foram depositados na Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras – CCMA (<http://www.ccma.dbi.ufla.br/>).

#### **2.4. Extração de DNA do café e PCR em tempo real (qPCR)**

O DNA total das amostras de café foram extraídas e acordo com a metodologia de Cocolin et al. (2000). Três gramas do café foram homogeneizados com 5 ml de água ultrapura durante 10 min e centrifugado a 9000 rpm, 4°C durante 10 min. O pellet resultante foi usado para extração de DNA. O DNA total foi extraído durante a fermentação e secagem do café.

Os primers específicos foram descritos anteriormente (DÍAZ et al., 2013). Para *S. cerevisiae*, foram utilizados os primers SC-5fw 5'-AGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAG-3' e SC-3bw 5'-TGAAATGCGAGATTCCCCT-3', obtendo os seguintes parâmetros da qPCR:  $R^2 = 0.996$ , inclinação = -3.296 e

eficiência de 1.01. A especificidade de cada par de primers foi confirmada pesquisando no GenBank usando BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

A qPCR foi realizado usando o Rotor-Gene Q System (Qiagen, Hombrechtikon, ZH, Suíça), de acordo com Batista et al. (2015) com modificações. Cada reação foi realizada com 12,5 µl de PCR 2 × Mix Master Gene SYBR Green PCR (Qiagen, Stockach, Konstanz, Alemanha), 0,5 µM de cada primer (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) e 1 µl de DNA extraído de grãos de café para um volume total de 25 µl. A mistura foi aquecida a 95 °C por 10 min, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10s e emparelhamento / extensão a 60 °C por 15s. A temperatura do ciclo foi então aumentada em 1 °C a cada 5s de 50 °C a 99 °C para obter a curva de melt. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A concentração de DNA foi limitada a 50 ng por análise. A curva padrão foi realizada a partir de diluições seriadas ( $10^8$  a  $10^4$  células/mL) do DNA extraído da a levedura *S. cerevisiae*. Cada ponto na curva de calibração foi medido em triplicata.

## 2.5. Análises químicas

### 2.5.1. Açúcares e ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Ácidos orgânicos (ácido málico, láctico, acético, butírico, propiônico, cítrico, oxálico, succínico e tartárico) e açúcares (frutose, glicose e sacarose) foram analisados na fermentação espontânea e inoculada.

Os frutos de café cereja foram avaliados durante a fermentação no biorreator e no início e final de secagem. Uma alíquota de cada amostra (3 g) foi homogeneizada em 20 mL de água Milli-Q por vortex a temperatura ambiente durante 10 min. As amostras foram centrifugadas a 8000 rpm a 4°C por 10 min. O pH do sobrenadante foi ajustado para pH 2,11 usando solução de ácido perclórico 200 mM e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi filtrado em filtro de acetato de celulose de 0,22 µm e armazenado a -18 °C até a análise. As condições operacionais foram realizadas conforme descrito por Evangelista et al. (2014b).

Os extratos foram analisados usando um sistema de HPLC (Shimadzu), utilizou-se uma coluna Shim-pack SCR-101C para CHO (7,9 mm x 30 cm) com uma solução 100 mM de água Miliq pH ajustado 2,1 com ácido perclórico 70% como



fase móvel e com fluxo de 0,6 ml / min e para ácidos uma coluna Shim-pack SCR-101H. A temperatura do forno foi mantida a 50°C para análise dos ácidos, detectada com detector de UV a 210 nm e a 30°C para análise dos açúcares, detectada com um detector de índice de refração. A quantificação dos compostos foi realizada utilizando curvas de calibração construídas com diferentes concentrações de compostos padrão [ácidos málico, propiônico e cítrico (Merck, Alemanha); ácidos lático, oxálico e tartárico (Sigma Chemical, EUA); ácidos acético e succínico (Sigma Aldrich, Alemanha); ácido butírico (Riedel-deHaen, Alemanha)] e analisadas usando as mesmas condições para as amostras. A análise será feita em duplicata.

### ***2.5.3 Análise de compostos voláteis por cromatografia a gás / espectrometria de massa (GC / MS)***

Grãos de café torrados após 0, 24, 48 e 96 horas de fermentação foram analisados por GC-MS. Compostos voláteis foram identificados usando cromatografia gasosa QP2010 acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) (Shimadzu) utilizando coluna capilar de sílica Carbo- Wax 20 M (30m × 0,25 mm × 0,25 mm). A extração foi realizada utilizando microextração em fase sólida (HS-SPME) de acordo com Evangelista et al. (2014b). O café torrado (2 g) foi macerado com nitrogênio líquido e colocado no vial de 15 ml hermeticamente selado. As amostras foram aquecidas a 60°C durante 15 min. A fibra foi colocada a 60°C e exposta por 30 min. O tempo de dessorção na coluna foi de 2 min. As condições operacionais foram realizadas conforme descrito por Visintin et al. (2017). Os espectros de massa de cada composto detectado foram comparados com biblioteca NIST11, e uma série de alcanos (C10 – C40) foi usada para calcular o índice de retenção (IR) (PICCINO et al., 2014).

## 2.6. Análise sensorial

As amostras de café foram armazenadas durante cinco meses em sacos hermeticamente selados a 16 °C e foram preparadas de acordo com a Specialty Coffee Association of America (SCA, 2013). Os grãos de café foram torrados (torra média) em torrador (modelo Leogap, Brasil) com capacidade de 150 g e moída em moedor elétrico (modelo Leogap, Brasil). A proporção foi de 8,25 g de café por 150 ml de água. Painel de três especialistas em café treinados, com Q-Grader Coffee Certificate, avaliou as amostras.

### 2.6.1 TDS

A análise de dominância temporal das sensações (TDS) foi utilizada para avaliar as características do café produzido a partir da fermentação de cada ensaio fermentado espontânea e inoculada. Previamente foi realizada uma mesa redonda para definir os atributos dominantes dos cafés: frutado, chocolate, caramelo, especiarias, amadeirado, castanha, vinhoso e herbáceo. Antes do início da análise, os provadores foram familiarizados com a metodologia. A duração da análise foi de 20 s para cada amostra (5 segundos - delay). As curvas TDS foram obtidas de acordo com a metodologia proposta por Pineau et al. (2009). O software utilizado foi SensoMaker, versão 1.8. A análise foi realizada em triplicata.

## 2.8 Análise estatística

O experimento foi realizado com Delineamento de forma Inteiramente Casualizado (DIC), com parcelas repetidas pelo tempo. As análises de contagem e HPLC foram avaliadas de acordo com análises de variância (ANOVA) e o teste de Scott Knott foi usado por comparação entre médias, com nível de 5 % de significância. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2014).

Principais compostos responsáveis pelo aroma no café torrado foram analisados estatisticamente por análise de componentes principais (PCA) usando Software Rotor-Gene. Uma matriz ( $m \times n$ ) foi construída com as áreas relativas do ( $n$ ) picos cromatográficos identificados para as amostras ( $m$ ) para os compostos voláteis.

O Heatmap foi realizado para avaliar a diferença populacional da comunidade bacteriana e de leveduras utilizando software estatístico R. A abundância microbiana foi calculada em relação à população total.

### 3. Resultados

#### 3.1 Análises Microbiológicas

A população microbiana foi avaliada durante o processo fermentativo espontâneo do café natural e durante a secagem. A população das bactérias mesofílicas (4,14 a 6,39 log UFC/g), bactérias lácticas (4,33 a 6,31 log UFC/g) e leveduras (2,62 a 5,20 log UFC/g) aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) nas primeiras 48 horas do processo fermentativo (Tabela 1).

**Tabela 1:** População de microrganismos presentes durante o processo fermentativo espontâneo do café natural

<b>Biorreator</b>									
<b>Fermentação UFC/g</b>									
	<b>0h</b>	<b>12h</b>	<b>24h</b>	<b>36h</b>	<b>48h</b>	<b>60h</b>	<b>72h</b>	<b>84h</b>	<b>96h</b>
<b>Bactérias Mesofílicas</b>	5,37 <sup>≠</sup> 0,02 <sup>b</sup>	4,68 <sup>≠</sup> 0,00 <sup>c</sup>	5,29 <sup>≠</sup> 0,00 <sup>b</sup>	6,39 <sup>≠</sup> 0,00 <sup>a</sup>	6,40 <sup>≠</sup> 0,05 <sup>a</sup>	4,65 <sup>≠</sup> 0,00 <sup>c</sup>	5,16 <sup>≠</sup> 0,01 <sup>b</sup>	4,14 <sup>≠</sup> 0,00 <sup>d</sup>	5,07 <sup>≠</sup> 0,01 <sup>b</sup>
<b>Bactérias Lácticas</b>	4,90 <sup>≠</sup> 0,00 <sup>c</sup>	4,33 <sup>≠</sup> 0,01 <sup>d</sup>	4,87 <sup>≠</sup> 0,01 <sup>c</sup>	6,39 <sup>≠</sup> 0,00 <sup>a</sup>	6,08 <sup>≠</sup> 0,00 <sup>a</sup>	4,79 <sup>≠</sup> 0,00 <sup>c</sup>	4,45 <sup>≠</sup> 0,01 <sup>d</sup>	5,20 <sup>≠</sup> 0,02 <sup>b</sup>	5,19 <sup>≠</sup> 0,00 <sup>b</sup>
<b>Leveduras</b>	2,62 <sup>≠</sup> 0,01 <sup>d</sup>	3,12 <sup>≠</sup> 0,00 <sup>c</sup>	4,13 <sup>≠</sup> 0,00 <sup>b</sup>	5,20 <sup>≠</sup> 0,02 <sup>a</sup>	5,01 <sup>≠</sup> 0,00 <sup>a</sup>	4,00 <sup>≠</sup> 0,01 <sup>b</sup>	4,05 <sup>≠</sup> 0,02 <sup>b</sup>	4,47 <sup>≠</sup> 0,01 <sup>b</sup>	3,95 <sup>≠</sup> 0,01 <sup>b</sup>

Colunas seguidas da mesma letra não difere significativamente pelo teste de Scott – Knott ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2:** População de microrganismos no início e final de secagem do café descascado em diferentes tempos de fermentação

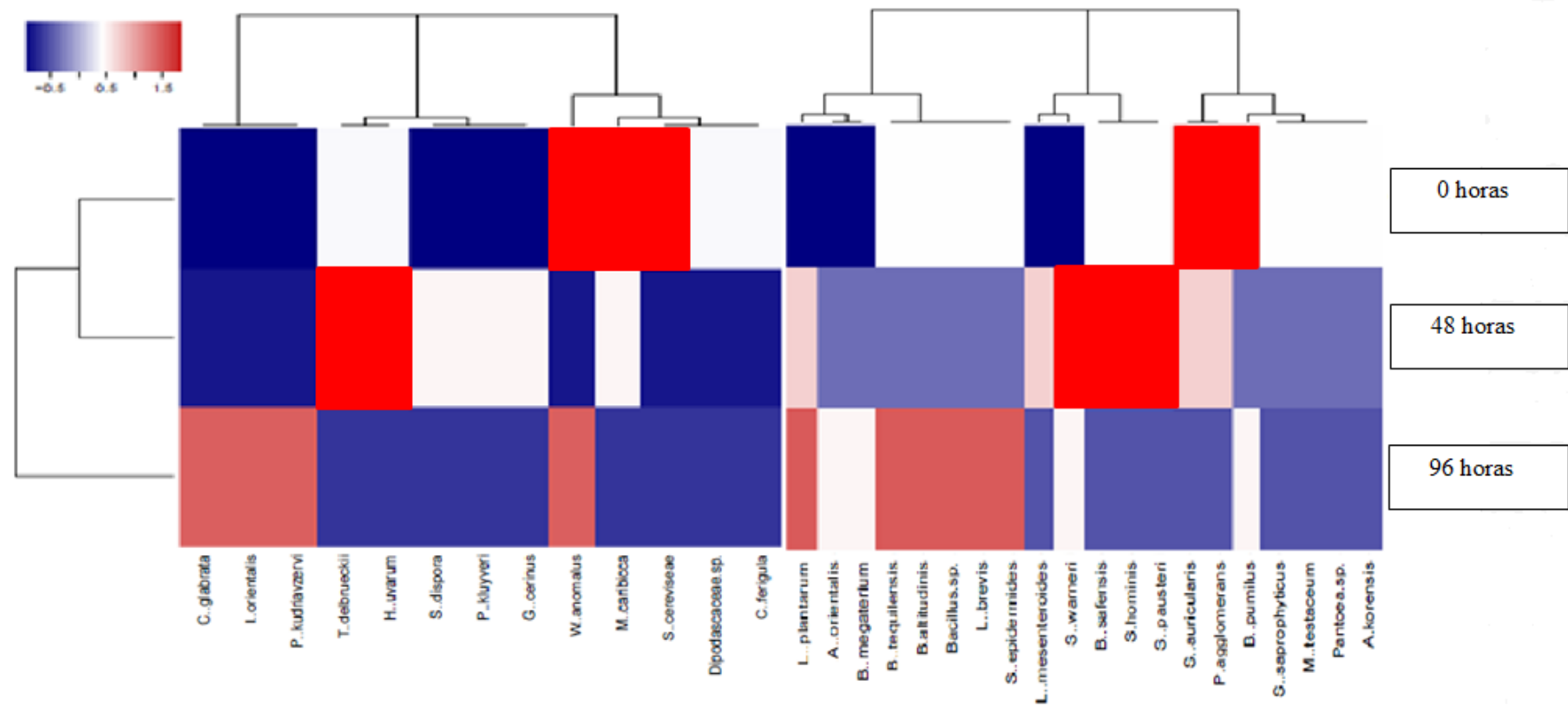
		Secagem (Café descascado) UFC/g				
		T1	T2	T3	T4	T5
		(0h)	(24h)	(48h)	(72h)	(96h)
<b>Bactérias Mesofílicas</b>	Início secagem	3,67 bA	3,62 bA	4,88 aA	3,48 bA	4,92 aA
	Final secagem	< 2 aB	< 2 aB	< 2 aB	< 2 aB	< 2 aB
<b>Bactérias Lácticas</b>	Início secagem	3,89 bA	4,01 bA	4,98 aA	3,30 cA	3,52 cA
	Final secagem	< 2 aB	< 2 aB	< 2 aB	< 2 aB	< 2 aB
<b>Leveduras</b>	Início secagem	4,00 bA	5,16 aA	3,09 cB	3,30 cB	3,87 bA
	Final secagem	5,19 aA	3,28 cB	5,47 aA	4,26 bA	3,71 cA

T1= tratamento 1, T2= tratamento 2, T3= tratamento 3, T4= tratamento 4, T5= tratamento 5. Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não difere significativamente pelo teste de Scott – Knott ( $p < 0,05$ ).

Após o descascamento, houve redução de 30% da população microbiana (Tabela 2). No final da secagem apenas leveduras foram detectadas, sendo a maior população detectada em T3 (48 horas de fermentação).

As espécies de bactérias do ácido láctico, mesofílicas e leveduras identificadas (material complementar 1) durante o processamento do café foram classificadas de acordo com abundância. A abundância das espécies de microrganismo diferiu durante o processamento (Figura 5). No início do processo fermentativo as espécies com maior abundância foram *Wickerhamomyces anomalus*, *Meyerozyma caribicca*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pantoea agglomerans*, *Bacillus pumilus*. *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Hanseniaspora uvaum*, *Torulasporea delbrueckii*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus pausteyri*, *Staphylococcus hominis* e *Bacillus safensis* após 48 h de fermentação. No final do processo fermentativo (96 horas) *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus sp.*, *Bacillus altitudinis* e *tequilenses*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida glabrata*, *Issatchenkia orientalis* e *Pichia kudriavzevii*.

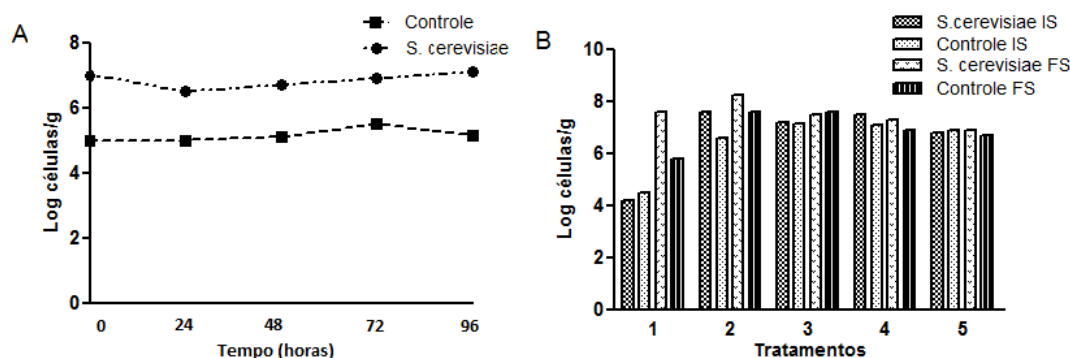
*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus warneri*, *Torulasporea delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Hanseniaspora uvarum* foram as espécies dominantes durante todo processo.



**Figura 5:** *Heatmap* mostrando o agrupamento das espécies de leveduras e bactérias, baseados na semelhança taxonômica em relação aos tempos 0 horas, 48 horas e 96 horas. Linhas azuis representam baixa abundância enquanto as linhas brancas representam média abundância e linhas vermelhas alta abundância. As linhas azuis representam baixa abundância de determinado grupo enquanto as linhas brancas representam média abundância e as linhas vermelhas alta abundância.

### 3.2 qPCR

A avaliação do comportamento dinâmico da população de *S. cerevisiae* CCMA 0543 durante o processo fermentativo espontânea (Controle) e inoculada foi verificado por qPCR (Figura 6).



**Figura 6:** Comportamento dinâmico da população da levedura *S. cerevisiae* durante o processo fermentativo (A) espontâneo (■) e inoculada (●) do café cereja e no início (IS) e final (FS) de secagem dos cafés descascados após 0 (T1), 24 (T2), 48 (T3), 72 (T4) e 96 (T5) horas de fermentação.

*S. cerevisiae* CCMA 0543 foi predominante em ambas fermentações, no entanto, a população no controle foi menor (5 Log células/g) (Figura 6A). Os cafés secos após 0 (T1) e 24 (T2) horas de fermentação (Figure 6B) apresentaram aumento populacional no final da secagem. A partir de 48h de fermentação a população de *S. cerevisiae* se manteve constante durante a secagem.

### 3.3 Compostos químicos

Os ácidos orgânicos foram mensurados durante a fermentação e secagem do café (Figura 7). Em ambas fermentações ácido cítrico e málico foram detectados em altas concentrações no final do processo fermentativo (18,66 mg/g e 3,29 mg/g espontânea, e, 14,39 mg/g e 5,03 mg/g inoculada, respectivamente). O ácido málico diminuiu durante o processo fermentativo espontâneo (4,69 a 0,15 mg/g) e inoculado (5,86 a 0,194 mg/g).

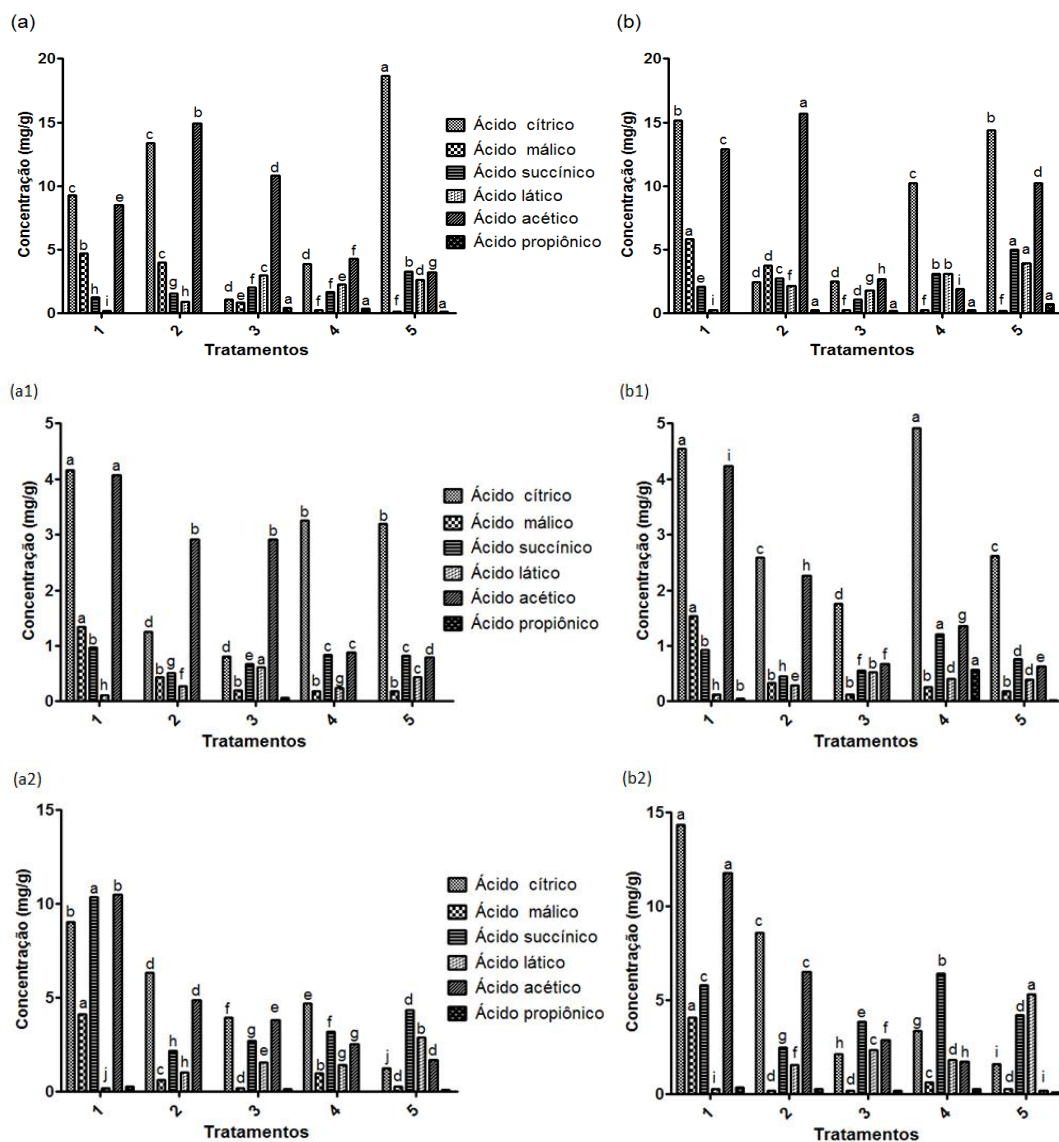
A inoculação contribuiu com altas concentrações de ácido láctico e ácido acético no final do processo fermentativo (3,91 mg/g; 15mg/g, respectivamente). O ácido propiônico foi detectado em baixas concentrações, variando de 0,015 a 0,138 mg/g

fermentação espontânea e 0,001 a 0,710 mg/g fermentação inoculada. Ácido butírico e tartárico não foram detectados.

Durante o processo fermentativo, a temperatura da massa foi monitorada. O aumento da temperatura (19° a 34 °C) indicando que os microrganismos estavam metabolicamente ativos.

No início da secagem (a1/b1), os ácidos diminuíram suas concentrações. O ácido cítrico diferiu significativamente nos grãos secos após 24, 48 e 96 horas de fermentação espontânea e inoculada. O ácido málico manteve a concentração, em média de 0,22 mg/g a partir do tratamento 2 durante a fermentação inoculada (b). O ácido succínico obteve concentração maior em 96 horas (T5) (3,29 mg/g - espontânea e 5,03 mg/g - inoculada).

No final de secagem (a2/b2) a concentração de ácido cítrico, málico e acético diminuíram em ambas fermentações. Ácido málico e ácido acético variando aproximadamente de 4,11 a 0,27 mg/g e 11,0 a 1,71 mg/g respectivamente. Ácido cítrico diminuindo até 48 horas (9,0 a 3,95mg/g – a2; 14,35 a 2,14 mg/g- b2) e 72 horas houve aumento (4,72mg/g - a2; 3,39 mg/g – b2).



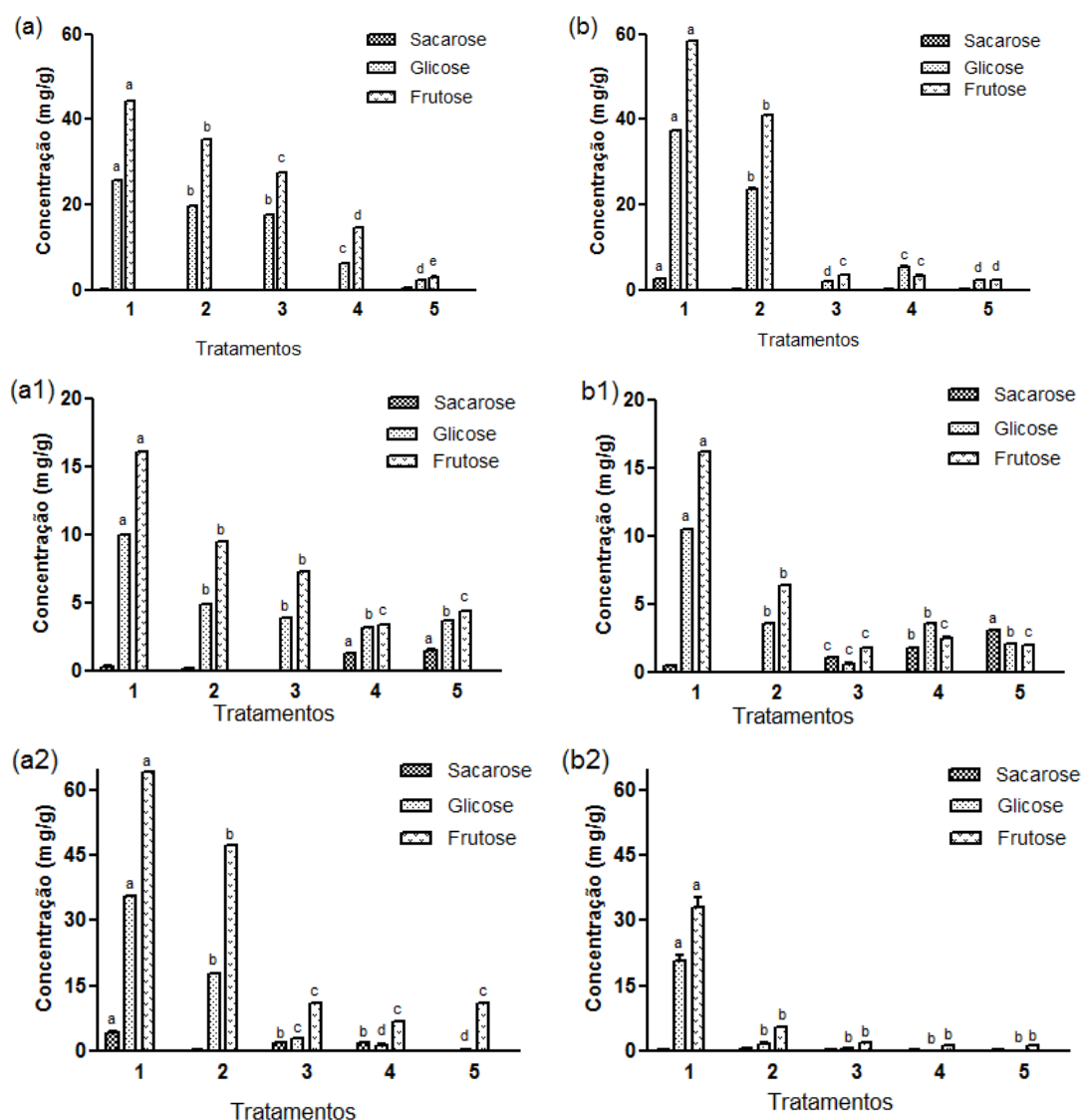
**Figura 7:** Ácidos orgânicos detectados durante a fermentação espontânea (a) e inoculada com *S. cerevisiae* CCMA 0543 (b) do café cereja e no início (1) e final (2) de secagem dos cafés descascados na base seca. Colunas seguidas da mesma letra não difere significativamente pelo teste de Scott – Knott ( $p < 0,05$ ).

Reduzidas concentrações de sacarose (0,03 a 0,61 mg/g – espontânea) (0,08 a 2,5 mg/g – inoculada) foram detectadas no fruto íntegro. A frutose e glicose na fermentação inoculada apresentaram diminuição em relação aos tratamentos, variou de 58,32 a 2,25 mg/g e 37,50 a 2,23 mg/g, respectivamente. No tratamento 3 a menor concentração foi observada de ambos os açúcares na fermentação inoculada (3,48 e 2,04 mg/g) comparada com a fermentação espontânea (27,44 e 17,55 mg/g), respectivamente (a/b). A glicose foi o primeiro açúcar a ser consumido durante as fermentações.



No início da secagem (a1/b1), o café descascado após 72 horas de fermentação (T4) apresentou aumento na concentração de sacarose (1,26 mg/g espontânea e 1,78 mg/g inoculada). Além disso, concentração de glicose na fermentação inoculada foi menor nos tratamentos 2, 3 e 5 (3,58; 0,61; 2,09 mg/g) comparadas com a fermentação espontânea (4,84; 3,87; 3,64 mg/g).

No final da secagem (a2/b2), os cafés descascados com 0 horas de fermentação inoculada e 0 e 24 horas de fermentação espontânea apresentaram elevada concentração de glicose (20,63; 35,60 e 64,22, respectivamente) e frutose (33,11; 17,75 e 47,33 mg/g, respectivamente).



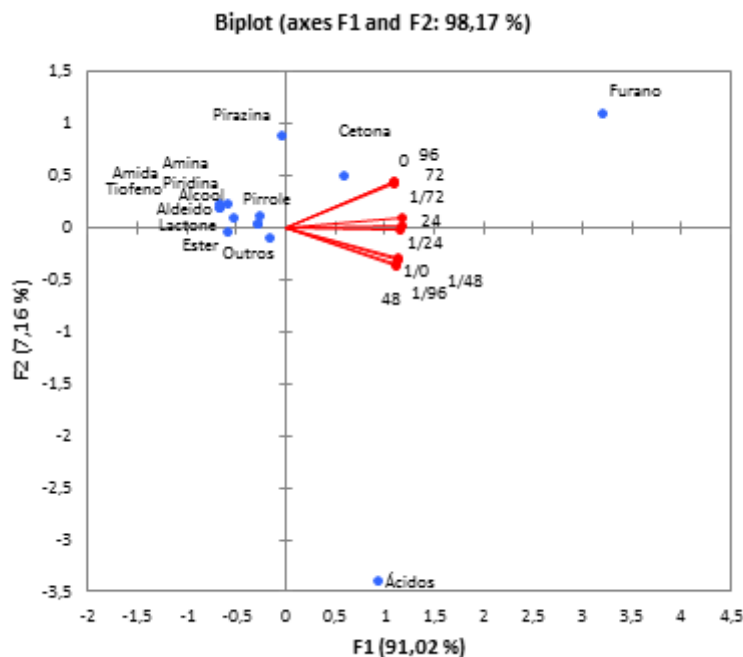
**Figura 8:** Carboidratos detectados durante a fermentação espontânea (a) e inoculada com *S. cerevisiae* CCMA 0543 (b) do café cereja e no início (1) e final (2) de secagem

dos cafés descascados na base seca. Colunas seguidas da mesma letra não difere significativamente pelo teste de Scott – Knott ( $p < 0,05$ ).

Total de 118 compostos voláteis foram detectados por GC/MS nos grãos torrados secos em diferentes tempos de fermentação espontânea e inoculada (Tabela 2). A PCA (análise de componentes principais) foi realizada para correlacionar o tempo na fermentação com a formação de compostos voláteis (Figura 9). As componentes principais responderam por 98,18% (F1 91,02% e F2 7,16%) da variabilidade total dos dados para a fermentação espontânea e inoculada.

Nos tratamentos de 1 (0h), 3 (48h) e 5 (96h) na fermentação inoculada foi caracterizada principalmente para ácidos e nos tratamentos 2 (24h), e 4 (72h) para furanos e cetonas. A presença de pirazinas também foi associado nos tratamentos 2 e 4. Para a fermentação espontânea, nos tratamentos 1, 4 e 5 houve correlação para furanos e cetonas e no tratamento 3 para ácidos.

Na fermentação inoculada foram detectados 26 compostos, tais como, 1-Hexadecanol (0, 24 horas), 2-Isoamylpyrazine (48horas), 2-Pyrrolididone 1- butyl (48 horas), 2-Pyridinemethanol acetato (ester) (48, 96 horas), Methyl acetato (72 horas), ácido pentadecanoico (24, 72 horas), etanol 2-hexadecyloxy (0 horas), heneicosanal (24 horas), 2 undecenaal- E (0 horas), siccindialdehyde (24, 48 horas), phtalic acid 2 methyl ester (24 horas), benzoic acid, 2 hydroxy ethyl ester (48 horas), 9,12 otadecadienois acid ethyl ester (96 horas), 3,4 dimethyl 2 pentanone (24 horas), 2 propanone 1 hidroxy (0 horas), pyrazine 2 ethyl 3 methyl (24 horas), 5 H-methyl 6,7 dihydrocyclopentapyrazine (24 horas), pyridine 3,2 methylpropyl (96 horas), 2 naphthalenol; p-nitrophenyl salicylate; cyclohexadecane (0 horas), benzonitrile 4 hydroxy 3 methoxy (24 horas), acetamide n-2 methoxyphenyl (72 horas), thiophene 2,3 dihydro (0, 48horas), squalene (24 horas), 2 propannamine n-methyl nitroso (24 horas) e dois pertencentes a fermentação espontânea (2,3 butanediol e ácido acético nonyl ester) (tabela 2).



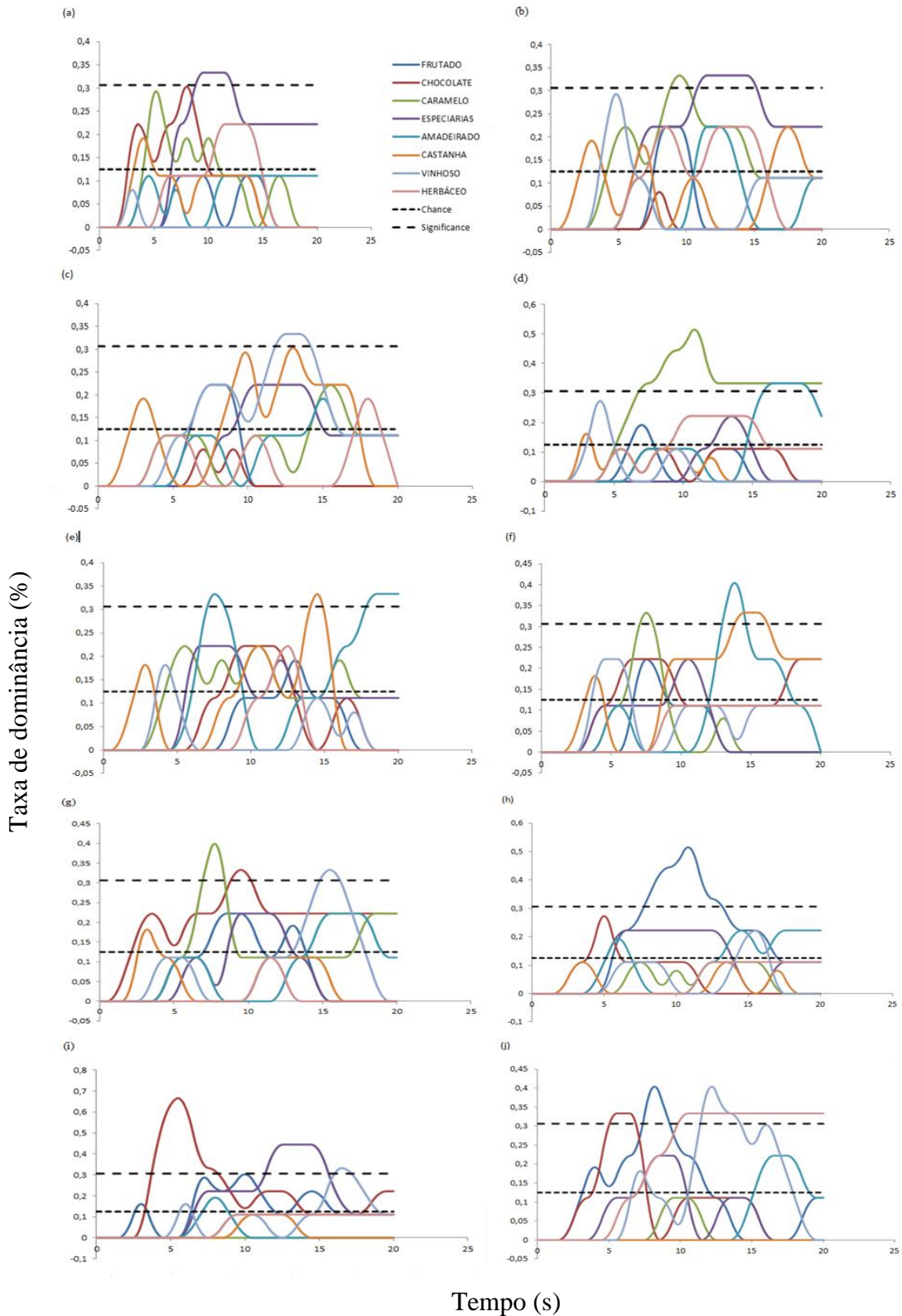
**Figura 9:** Classes de compostos voláteis: ácidos, álcool, aldeído, ester, furano, cetona, lactonas, pirazinas, piridinas, pirrole, tiofeno, amina, amida e outros identificadas por HS-SPME GC-MS em grão de café torrado em relação ao tempo de 0 (tratamento 1), 24 (tratamento 2), 48 (tratamento 3), 72 (tratamento 4) e 96 horas (tratamento 5) na fermentação espontânea – 0, 24, 48, 72, 96 e inoculada com *S. cerevisiae* (CCMA 0543) – 1/0, 1/24, 1/48, 1/72, 1/96.

### 3.4 TDS

A análise TDS (Temporal Dominance of Sensations) consistiu em avaliar quais sensações são dominantes ao longo do tempo (LABBE et al., 2009). O sabor foi um atributo escolhido por pertencer a avaliação sensorial do café especial, adotada pela SCA (LINGLE, 2011). As curvas TDS para fermentação espontânea e inoculada são apresentadas na figura 10.

A complexidade do flavor do café é influenciada pelas modificações físico-químicas que o grão sofre durante o processamento pré e pós colheita. Nas primeiras 48 horas da fermentação inoculada foi intensificado a percepção de amadeirado e caramelo. A partir de 72 horas de fermentação o sabor frutado foi predominante. Além disso, os atributos com menor taxa de dominância foram percebidas por mais tempo e com sobreposição entre os atributos. O perfil sensorial dos cafés fermentados

espontaneamente após 0 horas foi especiarias (5 a 11s), caramelo (3 a 5s) e chocolate (5 a 9 s); 24 horas castanha (11 a 13s); 48 horas amadeirado (6 a 8s) e castanha (14 a 15 s); 72 horas caramelo (6 a 8s), chocolate (8 a 10s) e vinhoso (15 a 6s); 96 horas chocolate (3 a 7s) e especiarias (11 a 15s). A fermentação inoculada apresentou dominância de especiarias (10s a 15 s), caramelo (8s a 10 s), e vinhoso (3 a 5 s) no início da fermentação. 24 horas caramelo (5 a 12 s); 48 horas caramelo (6 a 8s), amadeirado (11 a 15 s) e castanha (13 a 16 s). 72 horas frutado (7 a 12s); 96 horas chocolate (4 a 7s), frutado (8 a 10s), vinhoso (10 a 16 s) e herbáceo (10 s até o final da análise).



**Figura 10:** Domínio temporal das curvas de sensações da variedade de café Mundo Novo (a, c, e, g, i) na fermentação espontânea e (b, d, f, h, j) na fermentação inoculada com *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543. a/b = Tratamento 1 (0 horas); c/d =

tratamento 2 (24 horas); e/f = tratamento 3 (48 horas); g/h = tratamento 4 (72 horas); i/j = tratamento 5 (96 horas).

#### 4. Discussão

As modificações químicas e microbiológicas do café íntegro fermentado espontaneamente e inoculado foram monitorados durante fermentação e secagem. Levedura, bactérias do ácido láctico e bactérias mesofílicas são os principais grupos microbianos detectados durante o processo fermentativo do café.

A diversidade microbiana, bem como a sua abundância durante a fermentação, pode ser atribuída a fatores climáticos, como temperatura, oxigênio e altitude em que o café foi cultivado (QUINTERO et al 2012; MARTINS et al., 2020).

Bactéria é grupo microbiano detectado em maiores concentrações nas primeiras 72 horas do processo fermentativo. *L. mesenteroides*, *L. brevis* e *L. plantarum*, são bactérias do ácido láctico comumente encontradas durante processo fermentativo do café. Elas contribuem com produção ésteres e ácidos orgânicos, como ácido láctico, que reduzem o pH do meio contribuindo com a inibição de microrganismos indesejáveis como fungos ocratoxigênicos (HAILE E KANG, 2019; PEREIRA et al., 2016).

As alterações físicas e nutricionais que ocorrem no fruto durante o processamento contribuem com redução populacional das bactérias, favorecendo o desenvolvimento das leveduras (BRANDO; BRANDO, 2015). O número de células pode variar de acordo com o microrganismo e o tempo de fermentação (HAILE E KANG, 2019). O aumento de leveduras após 0 e 24 horas de fermentação pode ser explicado pela atividade dos microrganismos e sua permanência durante o processo de fermentação, devido ao açúcares livres presentes nos grãos e secagem (SILVA, 2015). A diminuição após 48 h pode estar associada a alterações de pH e depleção dos substratos, como o teor total de sólidos solúveis (HAILE E KANG, 2019).

As leveduras são consideradas importantes para o desempenho fermentativo pois auxiliam na quebra da pectina aumentando a fonte de carbono do meio. Além disso, os metabólicos aromáticos produzidos influenciam na formação aromas e sabores na bebida final (MARTINS et al., 2019; RIBEIRO et al., 2017). *S. cerevisiae*, *T. delbruekii* e *Hanseniaspora uvarum* são comumente encontrados durante o processo fermentativo do café. *S. cerevisiae* e *T. delbruekii* tem se destacado como culturas iniciadoras, pois

além da atividade proteolítica, o perfil de compostos voláteis tem contribuído com a produção de cafés especiais (SILVA et al., 2000, EVANGELISTA et al., 2014b; 2015; VILELA et al., 2010).

As diferenças populacionais detectadas após o descascamento podem estar relacionadas à disposição dos grupos microbianos no fruto do café. As bactérias demonstraram estar mais associadas a casca do café enquanto as leveduras, nas primeiras 24 horas de fermentação, se associam mais à semente e conforme o processo fermentativo acontece, elas migram para próximo a casca. Apesar da baixa umidade, a mucilagem remanescente e às fortes forças de adsorção entre a água e os outros constituintes como substâncias nitrogenadas, os açúcares e os ácidos clorogênicos no grão (ALVES et al., 2017), contribuíram para que a população de leveduras mantivesse viáveis até o final da secagem (MARTINS et al., 2020).

Após a secagem, a composição e concentração de compostos voláteis e não voláteis no café irão influenciar na qualidade do café. A acidez é um dos atributos avaliados durante a degustação da bebida e é influenciada pela composição de ácidos orgânicos. O ácido málico, cítrico e succínico estão naturalmente presente no fruto do café e sua concentração varia com tempo de fermentação (EVANGELISTA et al., 2015). O ácido málico pode ser degradado formando ácidos como o succínico, maléico, glutárico, fumárico, entre outros e sua concentração pode ser reduzida com o desenvolvimento do processo de maturação. Enquanto ácido cítrico apresenta valores menores nos estágios iniciais do desenvolvimento do grão e aumento durante a maturação (CLARKE E VITZTHUM 2001; KITZBERGER et al., 2012).

O aumento (73,6%) na concentração de ácido cítrico no final da fermentação (96 horas) pode estar relacionada a abundância do gênero *Bacillus* no final do processamento. Esta bactéria tem sido relatada como produtora de ácido cítrico (SOCCOL et al., 2006; RIBEIRO et al., 2018). O ácido succínico em 96 horas pode ser produzido tanto por bactérias mesofílicas e leveduras presentes. (SILVA et al., 2013; SWIEGERS et al., 2005).

O aumento populacional das bactérias lácticas (6,08 UFC/g) proporcionou aumento na concentração de ácido láctico após 48 horas (2,99 mg/g) de fermentação espontânea e 96 horas (3,91 mg/g) na fermentação inoculada.

O ácido acético aumentou durante o processo fermentativo, normalmente é acumulado durante a fermentação em temperaturas ambientais mais quentes (>26°C)

(BERTRAND et al., 2012). Este ácido também é considerado um metabólito importante na bebida e em elevadas concentrações se deve a uma fermentação indesejável (AVALLONE et al., 2001). Durante a condução do experimento a temperatura variou de 19° a 34°C, contudo, os altos teores de ácido acético não afetaram a qualidade do café (AVALLONE et al., 2001; BERTRAND et al., 2012). Esse ácido também foi encontrado em outros estudos quando *S. cerevisiae* foi inoculada (EVANGELISTA et al., 2018).

O ácido propiônico é metabólito relacionado à qualidade da bebida, pois concentrações baixas interferiram na produção de uma bebida de qualidade (LOPEZ et al., 1989; BERTRAND et al., 2012). Esses ácidos não devem estar presentes em concentrações mais altas 1 mg / mL para uma boa bebida de café (Lopez et al., 1989). A presença do ácido butírico durante o processo fermentativo contribui negativamente para a qualidade da bebida (EVANGELISTA et al., 2014). Esse ácido normalmente é produzido quando o processo fermentativo não é monitorado. A presença de microrganismos contaminantes como Bactérias da espécie *Clostridium butyricum* está na dependência de cuidados no manuseio, pré e pós-colheita. Esses microrganismos, em seu desenvolvimento, produzem suas próprias enzimas, que agem sobre os componentes químicos da mucilagem, principalmente sobre os açúcares, fermentando-os e produzindo álcool, transformando-se este em ácido acético, láctico, butírico e outros ácidos carboxílicos superiores. Ao se iniciar a produção de ácido butírico e propiônico, começa a haver prejuízos na qualidade do café, produzindo compostos responsáveis pelos sabores indesejáveis. (PIMENTA et al., 2003).

No início da secagem, a diminuição dos ácidos pode ser explicada através dos processos fisiológicos que ocorrem no grão e durante o processamento do café. Além disso, pela alteração da temperatura que afeta diretamente o grão (SOMPORN et al., 2012; PEREIRA et al., 2019). Ao final da secagem o aumento dos ácidos pode ser explicado pelas reações bioquímicas que ocorrem no interior do grão de café, que podem ser responsáveis por notas florais e frescas (TOLEDO et al., 2016), interferindo no perfil químico e sensorial do café.

Durante o processo fermentativo os microrganismos utilizam os açúcares da mucilagem como fonte de carbono para seu desenvolvimento, ocorrendo diminuição gradual nos níveis destes compostos (MARTINEZ et al., 2017; ELHALIS et al., 2020). Entretanto, é importante a presença de açúcares redutores, como glicose e frutose, no



final do processamento pois contribuem com a formação flavor durante a reação de Maillard (CHENG et al., 2016).

Reduzidas concentrações de glicose foram detectadas na fermentação inoculada. *S. cerevisiae* é uma levedura robusta presente em diversos processos fermentativos, possuindo metabolismo dinâmico e eficiente. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543 foi utilizada neste trabalho com base em sua capacidade de produzir PL e compostos orgânicos (SILVA et al., 2013). Além disso, apresenta maior persistência na inoculação, características sensoriais melhores após fermentação semi-seca (RIBEIRO et al., 2017), ainda prevenir o crescimento de microrganismos indesejáveis (MASSAWE; LIFA, 2010).

Cada grupo ou cepa apresenta características diferentes no perfil sensorial da bebida (SILVA et al., 2013; MARTINEZ et al., 2019), dependendo da variedade de café e do método de processamento (EVANGELISTA et al., 2014a, 2014b). O perfil de voláteis foi influenciado pela inoculação e tempo de fermentação no biorreator. A composição dos álcoois, aldeídos, ésteres e cetonas foram modificados com a inoculação. Tais compostos como 2-propanone, 1- hydroxy; 1- heneicosanol; 2-hydroxy ethyl ester; Acetamide, N-(2-methoxyphenyl) e 9,12 ácido otadecadienoico ethyl ester foram produzidos com 0, 24, 48, 72 e 96 horas, respectivamente, na fermentação inoculada podendo ser considerados marcador tempo da fermentação para esse processo.

Estes compostos foram produzidos quando inoculou *S. cerevisiae* até 48 horas (RIBEIRO et al., 2018; MARTINEZ et al., 2019). Após 72 horas de fermentação ainda houve produção específica de compostos até 96 horas com a metodologia utilizada no presente estudo. 2-propanone, 1- hydroxy pode ser produzido pela degradação de vários açúcares (MOREIRA et al., 2000). A maioria dos ésteres voláteis é produzida no fruto do café antes da torrefação, sofrendo pirólise durante o aquecimento. Os ésteres produzidos durante a torrefação poderiam ser gerados a partir da reação de esterificação entre um ácido e um álcool presentes no café. Os álcoois seriam produzidos por leveduras a partir dos compostos intermediários da síntese de aminoácidos, tais como os oxí-ácidos (MOREIRA et al., 2000).

Os metabólitos gerados pela fermentação conferem características únicas a bebida. No início do processo fermentativo 2,3 butanediol pode ter influenciado a sensação de caramelo na bebida. Benzeneacetaldeído pode ter influenciado na

percepção floral, caramélica e doce em todos os tempos de fermentação (BRESSANI et al., 2018).

2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona tem conexão direta com o processo de fermentação (LI et al., 2017). Este composto tem características doces, caramelo e nozes, encontrado em todos os tempos. Os açúcares redutores apresentam características ácidas devido à presença de componentes como ácido butanóico e ácido 3-metilbutanóico, juntamente com 2,3-Di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona e 5-metil-2-pirazinilmetanol encontrado em todos os tempos de fermentação e 2,5-dimetilpirazina encontrado em 0, 48 e 96 horas (ASIKIN et al., 2016).

Pirazinas, 3-etil-2,5-dimetilpirazina, conferem notas terrosas negativas (TOLEDO et al., 2016), possivelmente caracterizado pelo sabor amadeirado na análise, sabor este que pode interferir na qualidade da bebida.

O tempo de fermentação e o método utilizado influenciou positivamente no sabor do café, vale ressaltar que durante a fase de fermentação os microrganismos podem exibir modificação nos precursores de compostos voláteis. O uso de biorreatores para fermentação de café contribuiu para a permanência dos microrganismos desejáveis na bebida de café como *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae*, *Bacillus subtilis*. Outras espécies microbianas podem ser estudadas objetivando a utilização como culturas iniciadoras que incrementam a qualidade final. A utilização da cultura iniciadora também contribuiu para a fermentação, impactando positivamente a bebida. Contudo, sabores específicos no café, levando em consideração o tempo de fermentação e o processo utilizado podem ser selecionados e apresentados aos produtores para a produção de uma bebida elaborada de qualidade e com perfis sensoriais diferenciados.

## 5. Conclusão

A eficiência no processo de fermentação do fruto íntegro em biorreatores, seguido da secagem em pergaminho torna-se uma estratégia inovadora. Esse processo apresentou aspectos positivos no perfil químico, microbiológico e sensorial, uma vez que contribuiu para a permanência de microrganismos desejáveis, contribuindo para uma fermentação espontânea adequada. *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus warneri* espécies de *Bacillus* e as leveduras *Torulaspota delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Hanseniaspora uvarum* foram as espécies

abundantes detectadas na variedade Mundo Novo. 2-propanone, 1- hydroxy, 1-heneicosanol, 2- hydroxy ethyl ester, Acetamide, N-(2-methoxyphenyl) e 9,12 ácido otadecadienoico ethyl ester podem ser utilizados como marcadores potenciais de tempo de fermentações inoculadas com *S. cerevisiae* CCMA 0543. A inoculação durante o processo fermentativo proporcionou a diminuição na sobreposição na percepção dos atributos e contribuiu com notas de caramelo nas primeiras 48 horas de fermentação e frutado com 72 horas de fermentação. Além disso, a fermentação de café em ambiente de anaerobiose induzida por leveduras promoveu incremento nos sabores encontrados na bebida. É importante enfatizar que o controle do processo fermentativo e o tempo de fermentação influenciaram nas características químicas, microbiológicas e sensoriais do café.

## Anexos

### Material Complementar 1: Espécies de bactérias e leveduras identificadas durante fermentação do café Mundo Novo.

Espécies Identificadas	Número de acesso	Log UFC/g		
		Tratamento 1 (0 Horas)	Tratamento 3 (48 Horas)	Tratamento 5 (96 Horas)
<b>Bactérias Mesofílicas</b>				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MN511770.1	3,79	5,18	4,00
<i>Staphylococcus hominis</i>	MK465357.1	-	-	4,75
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	MN175941.1	3,95	-	-
<i>Staphylococcus warneri</i>	MK465359.1	2,30	6,13	-
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	MN624222.1	-	5,93	-
<i>Staphylococcus auricularis</i>	n.s	4,49	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	JN853256.1	4,18	-	-
<i>Bacillus altitudinis</i>	JQ389710.1	4,32	-	3,48
<i>Bacillus safensis</i>	MH040817.1	-	4,30	4,67
<i>Bacillus subtilis</i>	MN496131.1	4,64	4,00	4,56
<i>Bacillus tequilensis</i>	KC834391.1	-	-	3,00
<i>Bacillus megaterium</i>	MN134005.1	-	-	4,04
<i>Bacillus pumilus</i>	MN066572.1	3,70	-	3,00
<i>Arthrobacter koreensis</i>	n.s	3,60	-	-
<i>Microbacterium testaceum</i>	MK920173.1	4,32	-	-
<i>Bacillus sp.</i>	KF496136.1	3,00	4,30	4,67
<i>Gluconobacter cerinus</i>	n.s	-	4,56	-
<i>Pantoea sp.</i>	JN853256.1	3,30	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KF697607.1	-	5,90	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	KR055053.1	-	-	3,85
<b>POPULAÇÃO</b>		<b>5,37</b>	<b>6,39</b>	<b>5,07</b>
<b>Bactérias ácido lácticas</b>				
<i>Lactobacillus plantarum</i>	KR055053.1	-	6,20	5,00
<i>Lactobacillus brevis</i>	MH666102.1	3,49	6,08	5,11
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KF697607.1	-	6,20	-
<i>Acetobacter orientalis</i>	EU676343.1	-	-	3,48
<b>POPULAÇÃO</b>		<b>3,90</b>	<b>6,31</b>	<b>5,19</b>
<b>Leveduras</b>				
<i>Pichia kluyveri</i>	MN268784.1	-	3,30	-
<i>Pichia kudriavzevii</i>	CP039617.1	-	-	2,70
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	MN371883.1	3,40	5,01	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	MK394130.1	2,30	-	2,00
<i>Meyerozyma caribicca</i>	KC556809.1	3,59	3,10	-
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	MK267806.1	3,38	4,53	3,67
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MN244399.1	3,38	-	-
<i>Issatchenkia orientalis</i>	n.s	-	-	2,85
<i>Cystofilobasidium Ferigula</i>	AF444445.1	3,15	-	-
<i>Candida glabrata</i>	FJ873458.1	-	-	2,00
<i>Dipodascaceae sp.</i>	KT828738.1	2,00	-	-
<i>Saturnispora dispora</i>	n.s	-	5,01	-
<b>POPULAÇÃO</b>		<b>2,62</b>	<b>5,20</b>	<b>3,95</b>

n.s- não foi sequenciado, - não detectado. A população foi calculada através da média da contagem das repetições.



(hexadecyloxy) n- heptadecanol-1	999		x	x		x						-
n- Pentadecanol	981					x		x		x		Inodor
1-Hexadecanol	985		x			x						-
1-Heneicosanol	971					x						-
Menthyl acetate	934								x	x		-
1-Tetradecanol	999	x							x			Gordura
Phenylethyl Alcohol	933						X	x				Floral, amadeirado, rosa com mel
2-Undecenal, E			x									-
5-Hydroxymethylfurfural	1100	x	x	x	x	X	x	x	x	x	x	-
Furane-2-carboxaldeido,5-(4-nitrophenoxy methyl)	924	x	x	x	x				x			-
5-Ethyl-2-furaldehyde	923	x	x	x	x	X	x	x	x	x		-
Benzeneacetaldehyde, alpha-ethylidene	936	x	x	x	x	X	x	x	x	x	x	Floral, doce, odor de caramelo
5-Acetoxy methyl-2-furaldehyde	975	x	x	x	x	X	x	x	x	x	x	-
Succindialdehyde	978				x		x					-
Hexadecanoic acid, methyl ester	977	x	x	x								-
Hexadecanoic acid, ethyl ester	982		x	x				x			x	-
Linoleico acid ethyl ester	1015		x			x						-
Acetic acid, nonyl ester	919	x		x								-
1,2-Benzenedicarboxylic	1100	x	x	x	x	x	x	x	x		x	-



3,4-dimethyl-2-pentanone	951				X							-
2,5-Furandione, dihydro-3-methylene	842	x	x	x		X				x		-
Trans-Furfurylideneacetone	932	x	x	x	x			x	x	x	x	-
Ketone. Methyl 6-methyl-2-pyridyl	958	x			x					x		-
2-Butanone,1-(acetyloxy)	848	x	x	x	x	X	x	x	x	x	x	Amanteigado
4H-Pyran-4-one,2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl	986	x	x	x	x	X	x		x	X	x	-
1,3-Dioxol-2-one,4,5-dimethyl	968	x	x	X			x	x			x	-
2-Propanone,1-(1-methylethoxy)	971		x	X	x			x		x	x	-
2-Pentadecanone,6,10,14-trimethyl	965	x	x	X	x				x			Nota suave, fresca, jasmin
Ethanone,1-(1H-pyrrol-2-yl)	942	x	x	X	x	x	x		x	x	x	Noz
4-Hydroxy-3-methylacetophenone	948	x	x	X	x		x	x			x	-
2-Butanone,1-(acetyloxy)	848	x	x	X	x	x	x	x	x	x	x	-
2-Propanone,1-(acetyloxy)	825	x	x	X	x	x	x		x	x		-
2-Propanone, 1-hydroxy	830		x									Doce caramelo, sabor doce
Butyrolactone	876	x	x	X	x	x	x		x	x	x	-
Alpha.-Amino-gama-	996								x	x	x	-



butyrolactone												
2-Methoxy-4-vinylphenol	975	x	x		x	x	x	x	x		x	-
Acetyl-3-methylpyrazine	892	x	x	X	x	x	x	x		x	x	-
Pyrazine,3-ethyl-2,5-dimethyl	829	x	x	X	x	x	x	x	x	x	x	Avelã, terroso, batata
Pyrazine,methyl	754	x			x				x	x		Noz, torrado, doce, sabor suave
Pyrazine,2,6-dimethyl	784					x		x	x	x		Sabor verde
Pyrazine, 2,5-dimethyl	823	x			x	X				x		Batata fritas, chocolate, sabor de amendoim torrado
Pyrazine,2-ethyl-3,5-dimethyl	835	x		X	x			x		x	x	Chocolate, cacau, torrado
Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl	806	x		X	x							Sabor avelã torrado
Pyrazine, 2-ethyl-3-methyl	813				x							-
Pyrazine, trimethyl	817	x		X	x		x	x			x	Noz e torrado
5-H-5-Methyl-6,7-dihydrocyclopentapyrazine	829				x							-
2-Isoamylpyrazine	990						x					-
1,3- Diazine	911	x	x	X	x	X		X		x		-
1-(6-Methyl-2-pyrazinyl)-1-ethanone	895	x	x	X	x	x	x	X	x	x	x	-
Pyrazine, 2-methyl-5-(1-propenyl)-,(E)	905	x	x	X	x	x	x	X	x	x	x	Frutas verdes
3-Pyridinol	1009			X		x	x		x	x	x	-
Pyridine, 3-(2-methylpropyl)	876										x	-
4(H)-Pyridine, N-acetyl	896	x	x	X	x	x	x	X	x	x	x	-

2-Pyrrolidinone	964					x	x				x	-
2,5-Pyrrolidinedione, 1-(2-methylene-3-butenyl)	1003	x	x			x	x			x		-
1H-Pyrrole,1-(2-furanylmethyl)	916		x				x		x		x	-
2- Pyrrolidinone, 1-butyl	859						x					-
1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde,1-methyl	873	x	x	x	x	x	x	X	x	x	x	Pipoca (Bressani 2018)
1H-Pyrole-2-carboxaldehyde	950	x	x	x	x	x	x	X	x	x	x	Café, Vegetal cogumelo (Bressani 2018)
2-Thiophhenemethanol	937	x	x	x	x	x	x	X	x	x	x	-
2-Cyclopente-1one,3-ethyl-2-hydroxy	937	x	x		x	x	x	X	x	x	x	-
1,2-Cyclopentanedione, 3-methyl-	922	x	x	x	x	x	x	X	x	x	x	-
Menthyl acetate	929								x			
3- Hydroxypyridine monoacetate	907	x	x	x	x	x	x	X	x	x	x	-
Menthyl salicylate	927		x			x	x					
2-Naphthalenol	910		x									
Benzonitrile, 4-hydroxy-3-methoxy	899				x							-
Cyclopropyl carbinol	963		x	x	x	x	x		x		x	
p-Nitrophenyl salicylate	932		x									-
Cyclohexadecane	970		x									-
Piracetam	989	x	x	x		x					x	-
Acetamide, N-(2-methoxyphenyl)	984								x			-
Thiophene , 2,3-dihydro	997		x				X					-

Dibutyl phthalate	1036	x	x	x	x	x	X	x	x	x	x	Sabor inodoro
Squalene	1077				x							-
Homosalate	1008	x			x			X				Furanos com função aldeído
Indole	1100	x	x	x	x	x	X	X	X	X	x	Notas florais
Acetamide,2-(4-morpholy)-N-(4,5,6,7-tetrahydro-2-cyano)	1002								x			-
Bis(2-furfuryl) disulfide	1021	X	x	x	x			X				-
Diethylene glycol monododecyl ether	1029		x	x	x							-
Caffeine	1132	X	X	x	x	x	x	x	x	x	x	-
2-Propanamine, methyl-N-nitroso	N-996				x							-
1-Naphthalenol,2-amino	962		X			x	x					-

IRL: Índice de retenção linear experimental. Percepção sensorial obtidas de Bressani et al., 2018; Martinez et al., 2017; Ribeiro et al., 2018; Lee et al. (2016a, 2016b); Flament (2002). – não encontrado. PCA foi realizada através da área de cada composto obtido dos picos na análise de GC-MS.

## 6. Referências Bibliográficas

ASIKIN, Y., HIROSE, N., TAMAKI, H., ITO, S., OKU, H., & WADA, K. Effects of different dryingsolidification processes on physical properties, volatile fraction, and antioxidant activity of noncentrifugal cane brown sugar. **LWT - Food Science and Technology**, 66, 340–347. 2016.

AVALLONE, S.; GUYOT, B.; BRILLOUET, J-M.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J-P. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. **Current Microbiology**. v. 42, n. 4, p. 252–256, Apr. 2001a.

ALVES H. M.R., VOLPATO M.M.L., VIEIRA T.G.C, BORÉM .F.M, BARBOSA J. N. Características ambientais e qualidade da bebida dos cafés do estado de Minas Gerais. **Informação Agropecuária**. Belo Horizonte, 2017.

BALLESTEROS, L. F., TEIXEIRA, J. A., & MUSSATTO, S. I. Chemical, functional and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. **Food and Bioprocess Technology**. 7, 3493–3503. 2014.

BERTRAND, B., BOULANGER, R., DUSSERT, S., RIBEYRE, F., BERTHIOT, L., DESCROIX, F., & JOET, T. Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. **Food Chemistry**. 135(4), 2575–2583. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.060>. 2012.

BORÉM F. M.; CORADI P. C.; SAATH R.; OLIVEIRA J. A. Qualidade do Café natural e despulpado após secagem em terreiro e em altas temperaturas. **Ciência e agrotecnologia**. v. 32, n. 5, p. 1609-1615. 2008.

BRANDO C.H.J. BRANDO M.F. Methods of coffee fermentation and drying. In: SCHWAN R.F, FLEET G.H (eds), **Cocoa and Coffee Fermentation**. CRC Taylor & Francis, Boca Raton, FL, pp. 367–398. 2015.

BRESSANI, A.P.P. MARTINEZ S.J. EVANGELISTA S.R. DIAS D.R. SCHWAN R.F. Characteristics of fermented coffee inoculated with yeast starter cultures using different inoculation methods. **LWT- Food Science and Technology**., v. 92, p. 212-219, 2018.

COCOLIN, L., BISSON, L. F., & MILLS, D. A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**. v.189(1), p. 81–87. 2000.

CONAB. Companhia nacional de abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 02 dezembro. 2019.

CONTRERAS-CALDERÓN, J., MEJÍA-DÍAZ, D., MARTÍNEZ-CASTAÑO, M., BEDOYA-RAMÍREZ, D., LÓPEZ-ROJAS, N., GÓMEZ-NARVÁEZ, F., VEGA-CASTRO, O. Evaluation of antioxidante capacity in coffees marketed in Colombia: Relationship with the extent of non-enzymatic browning. **Food Chemistry**, 209, 162–170. 2016.

CHENG B, FURTADO A, SMYTH HE, HENRY R. Influence of genotype and environment on coffee quality. **Trends Food Sci Technology**. v, 57, p 20-30. 2016.

CHIN, S. T., EYRES, G. T., & MARRIOTT, P. J. Application of integrated comprehensive/multidimensional gas chromatography with mass spectrometry and olfactometry for aroma analysis in wine and coffee. **Food Chemistry**, v 185, p 355–361. 2015.

DE CARVALHO NETO, D., DE MELO PEREIRA, G., TANOBE, V., THOMAZ SOCCOL, V., DA SILVA, B. G., RODRIGUES, C., & SOCCOL, C. Yeast diversity and physicochemical characteristics associated with coffee bean fermentation from the Brazilian Cerrado Mineiro region. **Fermentation**, 3(1), 11. 2017. <https://doi.org/10.3390/fermentation3010011>.

ELHALIS, H.; COX, J.; ZHAO, J. Ecological diversity, evolution and metabolism of microbial communities in the wet fermentation of Australian coffee beans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 321, p. 108544, 2020.

EVANGELISTA, S. R., MIGUEL, M. G. P. C., CORDEIRO, C. S., SILVA, C. F., PINHEIRO, A. C. M.,; SCHWAN, R. F. Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. **Food Microbiology**, 44, 87–95. 2014a.

EVANGELISTA, S. R., SILVA, C. F., MIGUEL, M. G. P. C., CORDEIRO, C. S., PINHEIRO, A. C. M., DUARTE, W. F., & SCHWAN, R. F. Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. **Food Research International**, *61*, 183–195. 2014b.

EVANGELISTA, S. R., MIGUEL, M. G. P. C., SILVA, C. F., PINHEIRO, A. C. M., & SCHWAN, R. F. Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. **International Journal of Food Microbiology**. *v 210*, p 102-112. 2015.

FERREIRA, D. F. (2014). Sisvar: Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia**, *v 38*, p 109–112. 2014.

HAILE M.; KANG H..Isolation, Identification, and Characterization of Pectinolytic Yeasts for Starter Culture in Coffee Fermentation. **Microorganisms**, *v. 7*, n. 10, p. 401, 2019.

HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A., STALEY, J. T., WILLIAMS, S. T. Bergey's manual of determinative bacteriology. ed.9 W. & Wilkins, Baltimore, 1994.

KASHYAP, D. R., VOHRA, P. K., CHOPRA, S., & TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource technology**, *v. 77*(3), p. 215-227. 2001.

KITZBERGER, C. S. G.; DOS SANTOS SCHOLZ, M. B.; DE TOLEDO B. M. Bioactive compounds content in roasted coffee from traditional and modern Coffea arabica cultivars grown under the same edapho-climatic conditions. **Food Research International**, *v. 61*, p. 61-66, 2014.

KWAK, HAN SUB; JEONG, YOONHWA; KIM, MISOOK. Effect of yeast fermentation of green coffee beans on antioxidant activity and consumer acceptability. **Journal of Food Quality**. 2018.

LABBE, D., SCHLICH, P., PINEAU, N., GILBERT, F., & MARTIN, N. Temporal dominance of sensations and sensory profiling: A comparative study. **Food Quality and Preference**. 20(3), 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2008.10.001>. 2009.

LEE, L. W., CHEONG, M. W., CURRAN, P., YU, B., & LIU S. Q. Coffee fermentation and flavor – an intricate and delicate relationship. **Food Chemistry**, 185, 182–191. 2015.

LEE, L. W., TAY, G. Y., CHEONG, M. W., CURRAN, P., YU, B., AND LIU, S. Q. Modulation of the volatile and non-volatile profiles of coffee fermented with *Yarrowia lipolytica*: I. Green coffee. **LWT- Food Sci. Technol.** v.77, p. 225–232. 2017.

LI, J., WANG, S., LIU, H.-Y., ZHOU, H., & FU, Y. Effective Hydrodeoxygenation of Stearic Acid and Cyperus Esculentus Oil into Liquid Alkanes over Nitrogen-Modified Carbon Nanotube-Supported Ruthenium Catalysts. **Chemistry Select**, 2(1), 33–41. 2017.

LIMA-NETO, R., SANTOS, C., LIMA, N., SAMPAIO, P., PAIS, C., & NEVES, R. P. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. **Brazilian Journal of Microbiology**, 45(2), 515n Jou. 2014.

LINGLE, T. R. The coffee cupper's handbook: A systematic guide to the sensory evaluation of coffee's flavor (4th ed.). Long Beach California: Specialty **Coffee Association of America**. 2011.

LOPEZ, C. I.; BAUTISTA, E.; MORENO, E.; DENTAN, E. Factors related to the formation of “overfermented coffee beans” during the wet processing method and storage of coffee. **ASIC**, 13 Colloque, Paipa, p. 373–384, 1989.

LOPEZ-GALILEA, I., FOURNIER, N., CID, C., & GUICHARD, E. (2006). Changes in headspace volatile concentrations of coffee brews caused by the roasting process and the brewing procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54(22), 8560-8566. 2006.

MARTINEZ S. J.; BRESSANI A. N. P.; MIGUEL G. C. P.; DIAS D. R.; SCHWAN R. F. Different inoculation methods for semi-dry processed coffee using yeasts as starter cultures. **Food Research International**. p 333–340, v 102. 2017.

MARTINEZ, S.J. DIAS D.R., SIMÃO J.B.P. SCHWAN R.F. Effect of Bacterial and Yeast Starters on the Formation of Volatile and Organic Acid Compounds in Coffee Beans and Selection of Flavors Markers Precursors During Wet Fermentation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

MARTINS, P. M. M.; BATISTA, N. N.; MIGUEL M. G. C.P.; SIMAO, J. B. P.; SOARES J. R.; SCHWAN R. F. Coffee growing altitude influences the microbiota, chemical compounds and the quality of fermented coffees. **Food Research International**. 129. 2020.

MARTINS, P. M. M., RIBEIRO, L. S., MIGUEL, M. G. C. P., EVANGELISTA, S. R., & SCHWAN, R. F. Production of coffee (*Coffea arabica*) inoculated with yeasts: Impact on quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9820>. 2019.

MASSAWE, G. A., & LIFA, S. J. Yeasts and lactic acid bacteria coffee fermentation starter cultures. **International Journal of Postharvest Technology and Innovation**, 2(1), 41–82. <https://doi.org/10.1504/IJPTI.2010.038187>. 2010.

MOREIRA, R. F. A., TRUGO, L. C.; DE MARIA, C. A. B. Componentes voláteis do café torrado. Parte II. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química nova**, 23(2), 195-203. 2000.

MUNRO, L. J., CURIONI, A., ANDREONI, W., YERETZIAN, C., & WATZKE, H. The elusiveness of coffee aroma: new insights from a non-empirical approach. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.51(10), p. 3092-3096. 2003.

PEREIRA, H.; PUJOL, D., LIU, C., GOMINHO, J., OLIVELLA, M. À., FIOL, N., VILLAESCUSA, I.; (2013). The chemical composition of exhausted coffee waste. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 423-429.



PEREIRA, G. V. D. M., DE CARVALHO NETO, D. P., MEDEIROS, A. B. P., SOCCOL, V. T., NETO, E., WOICIECHOWSKI, A. L., & SOCCOL, C. R. Potential of lactic acid bacteria to improve the fermentation and quality of coffee during on-farm processing. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51(7), p. 1689-1695. 2016.

PEREIRA L. L.; GUARÇONI, R. C.; PINHEIRO, P. F.; OSÓRIO, V. M; PINHEIRO, C. A.; MOREIRA, T. R.; TEN CATEN C. S. New propositions about coffee wet processing: Chemical and sensory perspectives. **Food Chemistry**, v. 310, p. 125943, 2019.

PICCINO, S., BOULANGER, R., DESCROIX, F., AND SING, A. S. C. Aromatic composition and potent odorants of the “specialty coffee” brew “Bourbon Pointu” correlated to its three trade classifications. **Food Research International**. v.61, p. 264–271. 2014.

PIMENTA, C. J., & VILELA, E. R. Microbiol composition and ochratoxina a in coffee (*Coffea arabica* L.) submitted to different waiting times before drying. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27(6), p. 1315-1320. 2003.

PINEAU, N., SCHLICH, P., CORDELLE, S., MATHONNIERE, C., ISSANCHOU, S., IMBERT, A., & KOSTER, E. Temporal dominance of sensations: Construction of the TDS curves and comparison with time–intensity. **Food Quality and Preference**. v. 20(6), p 450–455. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2009.04.005>. 2009.

QUINTERO, G. I. P. Factores, procesos y controles en la fermentación del café. Manizales, Colombia: **Avances Técnicos Cenicafé**. 2012.

RIBEIRO, L. S., EVANGELISTA, S. R., MIGUEL, M. G. D. C. P., VAN MULLEM, J., SILVA, C. F., & SCHWAN, R. F. Microbiological and chemical-sensory characteristics of three coffee varieties processed by wet fermentation. **Annals of Microbiology**. v. 68(10), p 705–716. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1377-4>. 2018.

RIBEIRO, L. S., RIBEIRO, D. E., EVANGELISTA, S. R., MIGUEL, M. G. D. C. P., PINHEIRO, A. C. M., BOREM, F. M., & SCHWAN, R. F. Controlled fermentation of semi-dry coffee (*Coffea arabica*) using starter cultures: A sensory perspective. **LWT- Food Science and Technology**. v 82, p 32–38. 2017.

SAKIYAMA, N. S., & FERRAO, M. A. G. Botany and production of coffee. In R. F. Schwan, & G. H. Fleet (Eds.). **Cocoa and coffee fermentations**. Florida, EUA: CRC Press, Taylor & Francis Group. pp. 341–365. 2015.

SANZ-URIBE, J. R., MENON, S. N., PEÑUELA, A., OLIVEROS, C., HUSSON, J., BRANDO, C., & RODRIGUEZ, A. Postharvest Processing—Revealing the Green Bean. In **The Craft and Science of Coffee**. Academic Press, pp. 51-79. 2017.

SCAA. Specialty Coffee Association of America. <http://www.scaa.org/PDF/resources/cupping-protocols.pdf> . 2013.

SENGUNA IY, NIELSEN DS, KARAPINAR M, JAKOBSEN M. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. **International Journal Food Microbiology**. v. 35. p. 105–111. 2009.

SILVA, C. F. Microbial activity during coffee fermentation. In: R. F. Schwan, & G. H. Fleet (Eds.), **Cocoa and coffee fermentations** (pp. 398-423). New York: CRC Press. 2015.

SILVA, C. F., SCHWAN, R. F., DIAS, E. S., & WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, 60(23), 251-260. 2000.

SILVA, C. F., VILELA, D. M., CORDEIRO, C. S. DUARTE, W. F., DIAS, D. R., SCHWAN, R. F. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 29, 235-347. 2013.

SILVA C.F.; BATISTA, L.R.; ABREU, L.M.; DIAS, E.S.; SCHWAN, R.F. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**. v 25, p 951–957. 2008.

SILVA C., F. Microbial activity during coffee fermentation. In: Schwan RF and Fleet G (eds.) **Cocoa and coffee fermentation**. Boca Raton, FL: CRC Press, Chapter 11. 2014.

SOCCOL CR, VANDENBERGHE LPS, RODRIGUES C, PANDEY A. New perspectives for citric acid production and application. **Food Technology Biotechnology**. v 44. p 141–149. 2006.

SOMPORN, C., KAMTUO, A., THEERAKULPISUT, P., & SIRIAMORNPUN, S. Effect of shading on yield, sugar content, phenolic acids and antioxidant property of coffee beans (*Coffea Arabica* L. cv. Catimor) harvested from north-eastern Thailand. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 92(9), 1956–1963. 2012.

SWIEGERS, J. H., BARTOWSKY, E. J., HENSCHIKKE, P. A., PRETORIUS, I. S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. **Australian Journal Grape Wine Research**. v. 11, p. 139-173. 2005.

TOLEDO, P. R. A. B., PEZZA, L., PEZZA, H. R., TOCI, A. T. Relationship between the different aspects related to coffee quality and their volatile compounds. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 00, 1-15. 2016.

VON WRIGHT A, AXELSSON L. Lactic Acid Bacteria: an introduction. In: Lahtinen S, Ouwehand AC, Salminen S, Von Wright A (eds.) **Lactic acid bacteria, microbiological and functional aspects**. CRC: Taylor & Francis, Boca Raton, FL, pp. 1-16. 2012.

VILELA, D. M., PEREIRA, G. V. M., SILVA, C. F., BATISTA, L. R., & SCHWAN, R. F. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, 27(8), 1128–1135. 2010.

VILELA, D. M.; RODARTE, M. P., DIAS, D. R SCHWAN, R. F. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 33(3), p. 457-464. 2011.

VISINTIN, S., RAMOS, C. L., BATISTA, N., DOLCI, P., SCHWAN, R. F., & COCOLIN, L. Impact DF *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbruckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.257, p.31–40. 2017.

VITZTHUM, O. G.; CLARKE, Ronald James (Ed.). **Coffee: recent developments**. Blackwell Science, 2001.

WANG C.; SUN, J.; LASSABLIERE, B.; YU, B.; LIU, S. Q. Coffee flavour modification through controlled fermentation of green coffee beans by *Lactococcus lactis* subsp. cremoris. **LWT- Food Science and Technology**, v. 120, p. 108930, 2020.

ZELLNER, D. A., STEWART, W. F., ROZIN, P., & BROWN, J. M. (1988). Effect of temperature and expectations on liking for beverages. *Physiology & behavior*, 44(1), 61–68. 2008.