



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

BRUNA LESSA DA SILVA

**CAFÉ CONILON (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) PROCESSADO
POR VIA NATURAL COM INOCULAÇÃO DE LEVEDURAS**

ALEGRE – ES
JULHO 2019

BRUNA LESSA DA SILVA

**CAFÉ CONILON (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) PROCESSADO
POR VIA NATURAL COM INOCULAÇÃO DE LEVEDURAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Patrícia Campos Bernardes
Coorientadora: Prof^a. Jussara Moreira Coelho
Coorientadora: Prof^a. Rosane Freitas Schwan

ALEGRE – ES
JULHO 2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

L638c Lessa da Silva, Bruna, 2019-
CAFÉ CONILON (Coffea canephora Pierre ex Froehner)
PROCESSADO POR VIA NATURAL COM INOCULAÇÃO DE
LEVEDURAS / Bruna Lessa da Silva. - 2019.
55 f. : il.

Orientadora: Patrícia Campos Bernardes.
Coorientadores: Jussara Moreira Coelho, Rosane Freitas
Schwan.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de
Ciências Agrárias e Engenharias.

I. Campos Bernardes, Patrícia. II. Moreira Coelho, Jussara.
III. Freitas Schwan, Rosane. IV. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. V.
Título.

CDU: 664

BRUNA LESSA DA SILVA

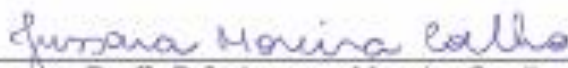
**CAFÉ CONILON (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner)
PROCESSADO POR VIA NATURAL COM INOCULAÇÃO DE
LEVEDURAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 15 de julho de 2019.



Profª. Drª. Patricia Campos Bernardes
Universidade Federal de Espírito Santo-UFES
Orientadora



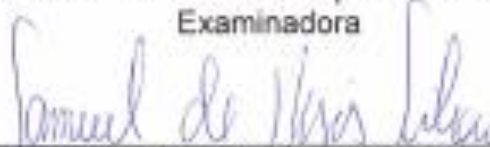
Profª. Drª. Jussara Moreira Coelho
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES
Coorientadora



Profª. Drª. Rosane Freitas Schwan
Universidade Federal de Lavras-UFLA
Coorientadora



Profª. Drª. Patricia Fontes Pinheiro
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES
Examinadora



Prof. Dr. Samuel de Assis Silva
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES
Examinador

Aos meus pais, meu alicerce.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela sustentação que me tem dado até aqui.

À Universidade Federal do Espírito Santo.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPES pelo financiamento do projeto.

À Universidade Federal de Lavras, pelas análises de q-PRC.

Aos produtores pela disponibilização dos cafés que foram utilizadas no projeto.

Às minhas estagiárias Daila Silveira e Larissa Bertoli pelo suporte durante todo o projeto.

À minha orientadora Patrícia Campos e minha coorientadora Jussara Coelho, pelo conhecimento compartilhado comigo e pela confiança, paciência e apoio ao longo deste projeto.

À professora Rosane Schwan, pela coorientação e apoio durante todo o trabalho.

Ao professor Samuel de Assis Silva, pela disponibilidade e apoio intelectual durante o desenvolvimento do projeto.

Aos técnicos, Letícia Bastos, Eduardo Lorencetti, Mauricio Carlos e Mayara Dutra pelo grande apoio durante o trabalho em laboratório.

À Priscila Vargas e a Dra. Nádia Batista pelas análises de q-PRC.

À Prof^a Daniela pelo suporte nas análises no HPLC.

À Prof^a Vanessa e Patrícia Fontes pela ajuda na análise de compostos voláteis.

Aos meus pais Antônio Carlos e Vanuza, pelos esforços durante todos estes anos, que me fizeram chegar até aqui.

Ao Lucas Martins, pela ajuda no trabalho duro, pelo suporte emocional e por acreditar em mim em momentos de crise.

A Carolina Lepre, pela amizade e apoio em todos os obstáculos enfrentados nesta jornada.

A minha família, que me acolheu quando mais precisei.

Aos meus vizinhos e amigos, minha família de coração, pelas orações e pela torcida pelo meu sucesso.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.” (Dalai Lama).

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Ficha utilizada para o teste triangular.....	45
APÊNDICE B – Parecer do comitê de ética em pesquisa.....	46
APÊNDICE C - Resumo da Análise de Variância (ANOVA) para contagem de bactérias totais, bactérias lácticas, leveduras e fungos.....	50
APÊNDICE D – Compostos voláteis.....	51
APÊNDICE E – Resumo da Análise de Variância (ANOVA) para os resultados de ácidos orgânicos e açúcares.....	53
APÊNDICE F – Resumo da Análise de Variância (ANOVA) para o resultados de pH, acidez titulável total, sólidos solúveis, condutividade elétrica e lixiviação de potássio dos grãos crus.....	55

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
2. OBJETIVOS	5
1.1. Objetivo geral	5
1.2. Objetivos específicos	5
2. ARTIGOS ORIGINAIS	6
Caracterização química, microbiológica e sensorial de cafés conilon (<i>Coffea canephora</i> Pierre ex Froehner) inoculados com leveduras.	6
Resumo	6
1. Introdução	6
2. Material e métodos	8
2.1. Café	8
2.2. Leveduras	8
2.3. Inoculação e fermentação do café conilon	8
2.4. Análises microbiológicas	9
Bactérias totais, bactérias lácticas, leveduras e fungos	9
Extração de DNA da microbiota do café e PCR em tempo real (qPCR)	10
2.5. Análises químicas	11
Compostos voláteis	11
Ácidos orgânicos e açúcares	12
2.6. Análise sensorial	12
Análise sensorial baseada no Protocolo de Degustação de Robustas Finos	12
Teste triangular	13
2.7. Delineamento experimental e análise estatística	14

3. Resultados e discussão	15
3.1. Microbiota dos cafés durante a fermentação	15
3.2. Análises químicas	21
3.3. Análise sensorial	25
4. Conclusão	28
Referências bibliográficas	28
Características físico-químicas do café conilon (<i>Coffea</i> <i>canephora</i> Pierre ex Froehner) processado por via natural com inoculação de leveduras.....	32
Resumo	32
1. Introdução	32
2. Material e métodos	34
2.1. Café	34
2.2. Leveduras	34
2.3. Inoculação e fermentação do café conilon	34
2.4. Análises físico-químicas dos grãos de café	35
2.4.1. pH.....	35
2.4.2. Acidez Titulável Total.....	35
2.4.3. Sólidos Solúveis	36
2.4.4. Condutividade elétrica e lixiviação de potássio	36
2.5. Delineamento experimental e análise estatística	36
3. Resultados e discussão	37
4. Conclusão	41
 3. CONCLUSÃO GERAL	44
 APÊNDICES	45

1. INTRODUÇÃO

O café é proveniente de uma planta da família Rubiaceae, do gênero *Coffea*, que abrange mais de 10 mil espécies. Porém, *Coffea arabica* e *Coffea conephora* são as principais espécies estudadas e de maior importância econômica (NASCIMENTO; SPEHAR; SANDI; 2014).

O Brasil é, atualmente, o maior produtor e exportador mundial de café, responsável pela produção de um terço de todo café produzido mundialmente. Em 2018 o país produziu 47,5 milhões de sacas de café arábica e 14,2 milhões de sacas de café conilon e exportou 34.085 mil sacas, sendo 2.710 mil destas de café conilon (CONAB, 2019). Dessa forma, o café é uma commodity de extrema importância para a economia nacional que movimenta bilhões de dólares por ano no mercado global.

Nesse contexto, o estado do Espírito Santo se destaca como o maior produtor nacional de café conilon, com 63% do total produzido no país em 2018. O estado tem na cafeicultura sua principal atividade agrícola, sendo o café a principal fonte de renda em 80% das propriedades rurais do estado, gerando centenas de empregos e correspondendo a 35% do PIB capixaba. Além disso, para 2019 a estimativa é de crescimento da produção devido ao aumento na área plantada (INCAPER, 2019; CONAB, 2019).

Os cafés produzidos no Espírito Santo vêm ganhando destaque nos últimos anos, principalmente devido à qualidade obtida por produtores de microlotes de cafés especiais. O concurso *Coffee of the year 2018*, realizado na Semana Internacional do Café, elegeu em primeiro lugar amostras de café do estado, tanto para categoria Arábica, quanto para Robusta (BSCA, 2018).

Atualmente os consumidores de café tem aumentado a procura por bebidas especiais, o que leva o mercado a investir na produção de cafés de maior qualidade, gerando uma grande variedade de produtos, que vão desde bebidas mais encorpadas até sabores mais leves, orgânicas ou convencionais, de torra mais clara a mais escura, frutados, entre outros, a fim de atender as novas demandas.

O café é uma bebida que se expressa em função do seu local de plantio, o que o torna um produto de *terroir*, ou seja, o produto desenvolve características de acordo com a terra em que foi cultivado. Existem diversos fatores ambientais

que influenciam tanto no desenvolvimento do cafeeiro quanto na qualidade do café, porém, a altitude é um fator de destaque pois tem uma grande influência nas temperaturas médias, com um gradiente térmico decrescente de 0.6°C a cada 100 m de elevação. Temperaturas mais baixas são responsáveis pelo adiamento do processo de amadurecimento do café, o que por sua vez, leva ao maior acúmulo de compostos associados à melhoria do aroma da bebida. Logo, a elevação da altitude está relacionada com o aumento da qualidade da bebida (ALVES et al., 2011).

Além dos fatores ambientais as diferentes práticas pós-colheita desempenham um papel importante na preservação e melhoramento da qualidade do café. Os principais processamentos aplicados ao café são via seca ou natural, via úmida e via semi-seca.

O processamento pela via natural é o mais simples e rustico, requer menor custo, utiliza menos água e tem menor produção de poluentes, quando comparado com os demais métodos. Geralmente este tipo de processamento está relacionado com a menor qualidade da bebida, porém, quando a colheita e a secagem dos frutos é feita de forma cuidadosa os cafés naturais podem dar origem a bebidas de excelente qualidade (BORÉM et al., 2017).

Durante a secagem dos frutos é comum haver fermentação da polpa e da mucilagem por microrganismos. Os microrganismos naturalmente presente nos frutos de café podem afetar significativamente a qualidade da bebida. A relação entre a fermentação dos grãos de café e o aroma da bebida é complexa e delicada, pois este é impactado pelo processo fermentativo. A fermentação dos açúcares presentes no café produz etanol, ácidos, entre outros compostos. A formação de acetoína, acetaldeído, isoamilacetato e furanos por exemplo, conferem melhorias sensoriais à bebida (EVANGELISTA et al., 2014).

Nesse contexto, a utilização de culturas iniciadoras na fermentação do café é capaz de aumentar a qualidade sensorial da bebida, reduzir o tempo de processamento, dependendo do processamento aplicado, e padronizar a qualidade aromática do café (EVANGELISTA et. al., 2014; LEE et.al., 2015).

Estudos sobre fermentação em café conilon ainda são escassos e muito do que se sabe de fermentação em café foi realizado em café arábica. Logo, avaliar o efeito da inoculação de leveduras sobre a qualidade da bebida é de

grande importância, pois pode gerar uma bebida de melhor qualidade sem afetar significativamente os custos de produção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R. C., ALMEIDA, I. M. C., CASAL, S., OLIVEIRA, M. B. P. P. Isoflavones in Coffee: Influence of Species, Roast Degree, and Brewing Method. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.58, s.n., p.3002–3007, 2011.

BORÉM, F.M., ISQUIERDO, E.P., ALVES, G.E., RIBEIRO, D.E., SIQUEIRA, V.C., TAVEIRA, J.H.S. Quality of natural coffee dried under different temperatures and drying rates. **Coffee Science**, Lavras, v. 13, n. 2, p. 159 - 167, 2018.

BSCA, **Brazil**- The coffee nation, 2018. Cup of excellence – Brazil 2018 – Categoria Naturals. Disponível em <<http://brazilcoffeenation.com.br/contest-edition/show/id/10>> Acesso em: 11 de maio de 2019.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Café, Safra 2019. **Monitoramento Agrícola**, v. 5, n. 1, p. 1-62, 2019.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Café, Safra 2019. **Monitoramento Agrícola**, v. 5, n. 2, p. 1-65, 2019.

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**, v. 61, s.n., p. 183-195, 2014.

INCAPER. Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural. Disponível em: < <https://incaper.es.gov.br/cafeicultura-conilon> > Acesso em 31 de Maio de 2019.

LEE, L. W. et al. Coffee fermentation and flavor - An intricate and delicate relationship. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 185, p. 182–191, 2015.

NASCIMENTO, L. M., SPEHAR, C. R., SANDRI, D. Produtividade de cafeeiro orgânico no cerrado após a poda sob diferentes regimes hídricos. **Coffee Science**, v.9, n.3, p. 354- 365, 2014.

2. OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Inocular leveduras, previamente selecionadas, em café conilon processado por via natural e avaliar o impacto da fermentação nas características físico-químicas do grão e sensoriais da bebida.

1.2. Objetivos específicos

I. Acompanhar a microbiota do café conilon inoculado com leveduras durante o processamento via natural.

II. Avaliar o impacto da inoculação de *Meyerozyma guilliermondii* CCMA 1738 e *Pichia kluyveri* CCMA 1743 sobre as características físico-químicas dos grãos de café conilon provenientes de duas altitudes.

III. Avaliar o efeito da inoculação das leveduras sobre as características sensoriais da bebida.

2. ARTIGOS ORIGINAIS

Caracterização química, microbiológica e sensorial de cafés conilon (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) inoculados com leveduras.

Resumo

Existem diversos fatores que podem afetar a qualidade sensorial da bebida, dentre eles destacam-se a altitude de cultivo, as formas de processamento e a ação de microrganismos. Neste contexto leveduras podem ser utilizadas como culturas iniciadoras para gerar importantes precursores de sabor. Foram inoculadas duas leveduras durante a secagem por via natural de café conilon. Foi realizada a contagem de grupos microbianos por plaqueamento. O acompanhamento das leveduras ao longo da fermentação foi realizado por PCR em tempo real. Ácidos orgânicos e açúcares foram quantificados por HPLC. Compostos voláteis foram identificados por cromatografia gasosa. Foi realizado o teste da xícara com seis provadores e teste triangular. A inoculação influenciou significativamente as populações de bactérias lácticas e fungos, sendo que para esta última a inoculação com *M. guilliermondii* na altitude de 600 m foi capaz de reduzir a população final em um ciclo log. A contagem de *P. kluyveri* mostrou-se maior para as amostras inoculadas com esta levedura. Foram identificados 24 compostos voláteis e o perfil destes foi influenciado pela altitude e pela inoculação de leveduras. Nos cafés de 300 m as amostras inoculadas apresentaram maior intensidade de voláteis do que a amostra controle. Foram identificados ácidos acético, láctico, málico, oxálico e propiônico durante todos os tempos de análise. Os açúcares sofreram redução na concentração ao longo da secagem. No teste triangular os consumidores detectaram diferença significativa para a amostra fermentada com *M. guilliermondii* na altitude de 600 m.

Palavras chave: Qualidade de café; inoculação; leveduras.

1. Introdução

O café é uma das bebidas mais apreciadas no mundo e uma commodity de extrema importância no mercado global (ALVES et al., 2016). Atualmente a bebida é consumida por milhões de pessoas todos os dias e a demanda por cafés especiais, de alta qualidade, vem aumentando (DONG et al., 2017).

Dentre os muitos fatores que podem afetar a qualidade da bebida o aumento da altitude é constantemente relacionado com o aumento da qualidade final da bebida (ALVES et al., 2011; CHENG et al., 2016). Avelino et al. (2005) constataram, em café arábica cultivado em duas regiões da Costa Rica, relação positiva entre a altitude e acidez e altitude e corpo da bebida, bem como a preferência dos provadores pelos cafés provenientes de maiores altitudes.

O processamento também é um dos fatores que afeta a qualidade sensorial da bebida. Geralmente o processamento via natural está relacionado com a menor qualidade da bebida, porém, quando a colheita e a secagem dos frutos é feita de forma cuidadosa os cafés naturais podem dar origem a bebidas de excelente qualidade, mais encorpadas e com menor acidez, quando comparadas com cafés processados por via úmida ou semi-seca (BORÉM et al., 2017).

Outro agente que pode afetar a qualidade do café é a ação de microrganismos. Os microrganismos estão presentes naturalmente nos frutos de café antes e após a colheita. A biodiversidade microbiana presente nos frutos de café varia de acordo com a espécie, fatores ambientais e principalmente com o método de processamento (PEREIRA et al., 2015; PEREIRA et al., 2016). Durante o processamento do café estes microrganismos são capazes de utilizar os vários compostos da polpa e da mucilagem como nutrientes para o seu desenvolvimento, durante a fermentação, secretando ácidos orgânicos e outros metabólitos que afetam as características sensoriais finais da bebida (SILVA, 2014).

Em geral a fermentação do café é realizada em um processo complexo envolvendo a ação de leveduras, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e fungos filamentosos (PEREIRA et al., 2016).

Silva (2014) afirma que os microrganismos podem afetar o processamento e a qualidade do café pelos seguintes fatores: degradação da polpa e mucilagem; contribuições positivas para o sabor e aroma do café; contribuições negativas para sabor e aroma do café; produção de micotoxinas e segurança do café; e biocontrole da qualidade.

É sabido que leveduras pectinolíticas que secretam pectinases em quantidades adequadas, quando adicionadas durante a fermentação do café, podem acelerar o processamento e melhorar a qualidade final da bebida (LEE et al., 2015. EVANGELISTA et al., 2014b)

A fermentação dos açúcares pectináceos presentes no café produz etanol, ésteres, álcoois superiores, aldeídos, cetonas e terpenóides. Os ésteres são compostos particularmente conhecidos por contribuir com notas florais e frutadas em bebidas fermentadas. Além disso, a produção de etil acetato, isoamil acetato, propil acetato, hexanoato de etila e n-butil acetato contribuem para o

desenvolvimento de notas exóticas como limão siciliano, damasco, caramelo, noz e banana passa (PEREIRA et al., 2019).

A fermentação pode produzir compostos como 2,3-butanodiol, que remete a sabores amanteigados e quando presentes no café são considerados desagradáveis, guaiacol e p-vinilguaiacol, que também estão relacionados com a depreciação da bebida (LEE et al., 2016).

Segundo Lee et al. (2016) a fermentação do café arábica, cultivado na Indonésia, por *Rhizopus oligosporus* provocou mudanças significativas na composição de precursores de aroma em grãos de café verde, como sacarose, aminoácidos e compostos fenólicos não voláteis. A fermentação aumentou a concentração de compostos como guaiacol e p-vinylguaiacol, porém também foi responsável pela produção de palmitato de etilo, composto que fornece notas frutadas a bebida.

Sendo assim o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da inoculação de *Meyerozyma guilliermondii* e *Pichia kluyveri* sobre as características dos grãos de café cultivados em duas altitudes e a qualidade sensorial da bebida.

2. Material e métodos

2.1. Café

Foram utilizados frutos de cafés cereja (variedade “Emcaper 8151 – Robusta Tropical”), colhidos por derriça, em duas regiões produtoras do sul do estado do Espírito Santo, Cachoeiro do Itapemirim, ES (20°50’56”S – 41°06’46”W) e Jerônimo Monteiro, ES (20°47’22”S – 41°23’42”W), com altitudes médias de 600 e 300 m, respectivamente.

2.2. Leveduras

Os inóculos de *Meyerozyma guilliermondii* CCMA 1738 e *Pichia kluyveri* CCMA 1743 foram previamente isolados de amostras de café por Pereira (2018), encontram-se depositadas na Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras (CCMA/UFLA), e foram selecionados com base na literaturatura.

2.3. Inoculação e fermentação do café conilon

Os inóculos de *Meyerozyma guilliermondii* CCMA 1738 e *Pichia kluyveri* CCMA 1743 foram ativados em 10 mL de YEPG com 20 g.L⁻¹ de glicose (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) , 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura (Himedia, Mumbai, Índia), 10 g.L⁻¹ de peptona de soja (Himedia, Mumbai, Índia) e incubados a 28°C. As ativações foram realizadas até a cultura atingir aproximadamente 10⁸ ufc.mL⁻¹ em 500 mL de YEPG. Após a multiplicação o meio foi centrifugado em centrífuga Z 326 K (HERMLE, Wehingen, Alemanha) a 2000 g por 3 minutos e a massa de leveduras foi separada e ressuspensa em 225 mL de solução salina 0,85% m.v⁻¹ que, em seguida, foi pulverizada sobre os frutos de café (BRESSANI et al., 2018; EVANGELISTA et al., 2014a). A contagem de leveduras do inóculo inicial foi confirmada por plaqueamento em ágar YEPD e incubadas a 28 °C durante 5 dias.

Cada unidade experimental de frutos de café cereja (5 Kg) foi inoculada separadamente pulverizando-se 225 mL da suspensão de leveduras com aproximadamente 10⁸ ufc.mL⁻¹ ou água pura (tratamento controle).

As unidades experimentais foram dispostas em camadas únicas e os frutos foram secos por exposição solar em terreiros suspensos até 30% de umidade b.u. (BRESSANI et al., 2018).

Posteriormente, os frutos foram levados para um secador de bandejas (Polidryer, Minas Gerais, Brasil), á 55°C, até que obtivessem 11% de umidade b.u. O acompanhamento da umidade dos frutos durante a secagem foi realizado utilizando-se um medidor de umidade de grãos (GEHAKA, São Paulo, Brasil).

Frutos de café (100 g) foram coletados nos tempos 0, 12, 24, 48 e 72h e colocados em sacos plásticos esterilizados para análises microbiológicas (contagem dos grupos microbianos e qPCR), ácidos orgânicos e açúcares, em duplicata.

2.4. Análises microbiológicas

Bactérias totais, bactérias lácticas, leveduras e fungos

Amostras foram coletadas nos tempos 0, 12, 24, 48 e 72h e as análises foram realizadas no decorrer da fermentação do café. Frutos de café (10 g) foram pesados assepticamente e homogeneizados por 2 minutos em stomacher

com 90 mL de água peptonada 0,25% (m.v⁻¹) esterelizada, e as soluções foram então submetidas a diluições decimais.

Para análise de bactérias aeróbias totais as amostras diluídas foram plaqueadas em duplicata, em ágar padrão para contagem (PCA) (OXOID, Hampshire, Inglaterra). As placas foram então incubadas a 37 °C durante 24 horas. O agar Man Rogosa and Sharpe (MRS) (KASVI, Paraná, Brasil), acrescido de 0,25% (v.v⁻¹) de nistatina (TEUTO, Goiás, Brasil), foi utilizado para contagem de bactérias lácticas. As placas foram incubadas a 30 °C durante 72 horas. O ágar peptona dextrose extrato de levedura (YEPD), acidificado até pH 3,5 com ácido tartárico (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) 10% (v.v⁻¹), foi utilizado para contagem de leveduras. As placas foram incubadas a 28 °C durante 5 dias. Para contagem de fungos filamentosos foi utilizado ágar extrato de malte (MEA) (OXOID, Hampshire, Inglaterra), acrescido de 0,01% (m.v⁻¹) de cloranfenicol (INLAB Confiança, Brasil). As placas foram incubadas a 28 °C durante 7 dias (EVANGELISTA et al., 2015; VILELA et al., 2010). Para bactérias foram contadas placas que continham entre 30 e 300 colônias, já para fungos e leveduras foram contadas as placas entre 15 e 150 colônias.

Extração de DNA da microbiota do café e PCR em tempo real (qPCR)

A fim de acompanhar a persistência das leveduras inoculadas, amostras de frutos de café foram coletadas nos tempos 0, 12, 24, 48 e 72h da fermentação e as análises foram realizadas de acordo com Bressani et al. (2018).

O DNA das amostras de café foi extraído com um kit QIAamp DNA Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante para purificação de DNA a partir de tecidos. O DNA foi armazenado a -20°C para posterior análise.

Primer específico de *P. kluyveri* (PK-5fw 5'-AGTCTCGGGTTAGACGT-3' PK-3bw 5'GCTTTTCATCTTTCCTTCACA-3') utilizada neste estudo foi descrito por Díaz, Molina, Neahring, Fischer (2013). A especificidade do primer foi confirmado através do GenBank using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

O Real-time PCR foi conduzido utilizando Rotor-Gene Q System (Quiagen, Hombrechtikon, ZH, Suíça). Cada reação utilizou 5µL QuantiNova SYBR Green PCR kit (Quiagen, Stockach, Konstanz, Alemanha), 1µM de cada

primer (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) e 1mL do DNA extraído, totalizando volume de 10µL. A mistura foi aquecida a 95°C por 2 segundos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 5 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 10 segundos. Todas as análises foram conduzidas em triplicata. A curva padrão foi preparada a partir do cultivo da levedura em YEPG a 30°C por 24 horas. As células foram contadas utilizando a câmara de Neubauer. O DNA foi extraído utilizando QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) e diluições seriadas (1:10) foram realizadas. Cada ponto da curva de calibração foi mensurado em triplicata.

2.5. Análises químicas

Compostos voláteis

Os compostos voláteis foram extraídos de grãos de café logo após a torra por microextração em fase sólida, de acordo com Evangelista et al.(2014), utilizando-se a Fibra Divinilbenzeno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS).

Após extração dos compostos voláteis a análise foi conduzida por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) equipada com um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna de sílica (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A programação da temperatura da coluna aconteceu da seguinte forma: manteve-se a temperatura do forno a 40 °C durante 5 min, sendo então elevada para 125 °C em incrementos de 3 °C.min⁻¹ e depois mantida a 125 °C durante 1 min. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 245 °C, por 3 min, respectivamente. O gás de arraste (He) foi mantido a uma vazão de 1,67 mL.min⁻¹.

Os compostos voláteis foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os de compostos padrão injetados sob as mesmas condições das amostras e comparados com os dados da biblioteca de espectros (NIST11).

O fator de retenção de cada componente foi calculado conforme a Equação 1:

Equação 1 – Fator de retenção

$$FR = 100Z + 100 \times \frac{\log t_{R X} - \log t_{R Z}}{\log t_{R (Z+1)} - \log t_{R Z}}$$

Onde: Z = número de carbonos do alcano anterior ao composto analisado; $t_{R X}$ = tempo de retenção (min) do composto analisado; $t_{R Z}$ = tempo de retenção do alcano anterior ao composto analisado e $t_{R (Z+1)}$ = tempo de retenção do alcano posterior ao composto analisado.

Ácidos orgânicos e açúcares

Foram avaliadas amostras de frutos de café no tempo zero, e durante a secagem e fermentação, nos tempos 12, 24, 48 e 72h. Os ácidos orgânicos (ácido málico, láctico, acético, butírico, propiônico, cítrico, oxálico, succínico e tartárico) e açúcares (sacarose, frutose e glicose) foram analisados utilizando um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) de acordo com Evangelista et al. (2014) e Silva et al. (2013) com modificações.

Uma amostra de 3 g de frutos de café foi misturada com 5 mL de água Milli-Q durante 10 minutos, e em seguida a mistura foi centrifugada duas vezes a 1000 g durante 10 min a 4 ° C. As amostras foram então microfiltradas através de um filtro de acetato de celulose de 0,2 µm e 20 µL destas foram injetadas diretamente no sistema de cromatografia. A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico 5 mM a um coeficiente de vazão de 0,8 mL.min⁻¹. Uma coluna (Aminez HPX-87C) (250 cm x 4 mm), operando a 55 °C, foi utilizada para se obter a separação cromatográfica. Os açúcares foram determinados por um detector de índice de refração (RID), enquanto os ácidos foram determinados por um detector UV a 210 nm.

Os ácidos e açúcares foram identificados por comparação com tempos de retenção de padrões autênticos. A quantificação dos compostos foi realizada utilizando curvas de calibração. Para a construção da curva foi utilizada uma padronização externa a partir de cinco níveis de concentração das soluções padrão dos ácidos e açúcares, nas mesmas condições das amostras.

2.6. Análise sensorial

Análise sensorial baseada no Protocolo de Degustação de Robustas Finos

A análise sensorial foi realizada utilizando a metodologia do Protocolo de Degustação de Robustas Finos (OIC, 2010).

As amostras foram torradas dentro de um período de 24 horas antes da degustação e em seguida foram deixadas descansando por pelo menos 8 horas. O tempo de torra foi de no mínimo 9 minutos e no máximo 14 minutos, onde os grãos atingiram cor média, não podendo haver chamuscamento nem desigualdade aparente, quando esta for finalizada. Após a torra, as amostras foram resfriadas pelo ar, até atingirem temperatura ambiente (20°C). Em seguida foram estocadas em recipientes hermeticamente fechados ou em sacos impermeáveis até o momento da degustação.

As amostras foram pesadas ainda em grãos e moídas não mais do que 15 minutos antes do preparo da infusão. A moagem resultou em partículas ligeiramente mais grossas que as que se costuma usar no preparo com filtro de papel, e 70% a 75% delas deveriam passar por peneira de malha tamanho 20 Mesh.

As amostras foram preparadas para degustação despejando-se 150 mL de água, a 93 °C, em 8,75 g de café moído. Foram preparadas 5 xícaras por amostra, para avaliação da uniformidade da amostra. Os atributos sensoriais avaliados foram fragrância/aroma; sabor, retrogosto, salinidade/acidez, amargor/doçura e sensação na boca; equilíbrio, uniformidade e limpeza; conjunto total da amostra e ausência de defeitos. O somatório das notas obtido em cada atributo resultou nas notas finais.

A pontuação para o café conilon varia de 0 a 100, e este pode ser classificado em: Muito Fino (90-100), Fino (80-90), Prêmio (70-80), Boa qualidade usual (50-70), Comercial (40-50), Classificação comercializável (<40), Abaixo da classificação mínima (<30), Não classificável (<20) e Escolha (<10).

A prova de xícara foi realizada por provadores certificados e devidamente treinados no protocolo de degustação de robusta fino. Foi utilizado um número de seis avaliadores para assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos.

Teste triangular

O café foi pilado e torrado por uma empresa especializada, de forma que o grau de torra de todas as amostras fosse o mesmo, minimizando assim a

interferência deste fator na análise sensorial. Em seguida o café torrado foi moído no grau de moagem adequado para filtro de papel.

As amostras foram extraídas por filtração em filtro de papel com água a aproximadamente 90°C e mantidas aquecidas em cafeteiras elétricas até o momento de serem servidas, a aproximadamente 68°C, como recomendado por Dutcosky (2013).

Foi utilizada uma proporção de 80 gramas de pó de café para produzir 1 litro da bebida. Em seguida foram servidos a cada provador 30 mL em copos plásticos.

Foi aplicado um teste triangular onde cada avaliador recebeu três amostras codificadas e uma ficha (Apêndice A). O avaliador foi informado de que duas destas amostras eram iguais e uma diferente. Foi então solicitado que o avaliador provasse as amostras da esquerda para a direita e identificasse qual amostra diferia das demais. As amostras foram apresentadas casualizadas em igual número de vezes em todas as possíveis combinações: AAB, BAA, ABA, ABB, BBA e BAB.

Cada tratamento fermentado com *Pichia kluyveri* (300 e 600 m) e *Meyerozyma guilliermondii* (300 e 600 m) foi avaliado separadamente em relação ao tratamento controle de mesma altitude

Considerando a escolha forçada do participante as chances de acerto ao acaso são de 1/3. A interpretação do resultado foi baseada no número total de julgamentos versus o número de julgamentos corretos. Caso o número de julgamentos corretos fosse maior ou igual a um valor tabelado, concluiu-se que existia diferença significativa entre as amostras no nível de probabilidade 5%.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAEE) da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES (Número do Parecer: 3.080.311)(Apêndice B).

2.7. Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi realizado no Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Os cafés de cada local foram divididos para que pudessem ser testados três tratamentos: T1: inoculação de *Meyerozyma guilliermondii*, T2: inoculação de *Pichia kluyveri*, T3: sem inoculação de leveduras (controle).

Os resultados das análises foram submetidos à análise de variância em parcela subdividida, onde o fator altitude foi considerado a parcela principal e os fatores leveduras e etapas do processamento ou tempo de fermentação foram considerados subparcela e sub-subparcela, respectivamente. Quando o efeito de ao menos um dos fatores foi significativo foi aplicado o teste de Tukey a 5% de significância. A análise de regressão foi utilizada para avaliar o efeito do fator tempo. Os compostos voláteis foram analisados por análise de componentes principais.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GENES (Aplicativo Computacional para Análise de Dados em Estatística Experimental e Genética Quantitativa) (CRUZ, 2013).

3. Resultados e discussão

3.1. Microbiota dos cafés durante a fermentação

Para as variáveis bactérias totais e leveduras houve interação significativa ($p < 0,05$) entre altitude e tempo, enquanto bactérias lácticas e fungos apresentaram interação significativa ($p < 0,05$) entre altitude, levedura e tempo, pela análise de variância (Apêndice C).

A população de bactérias totais variou de 5,4 a 7,3 log UFC.g⁻¹ para a altitude de 300 m, já para a altitude de 600 m a variação foi de 5,6 a 7,1 log UFC.g⁻¹. A contagem de bactérias totais foi influenciada pela interação entre os fatores altitude e tempo de fermentação.

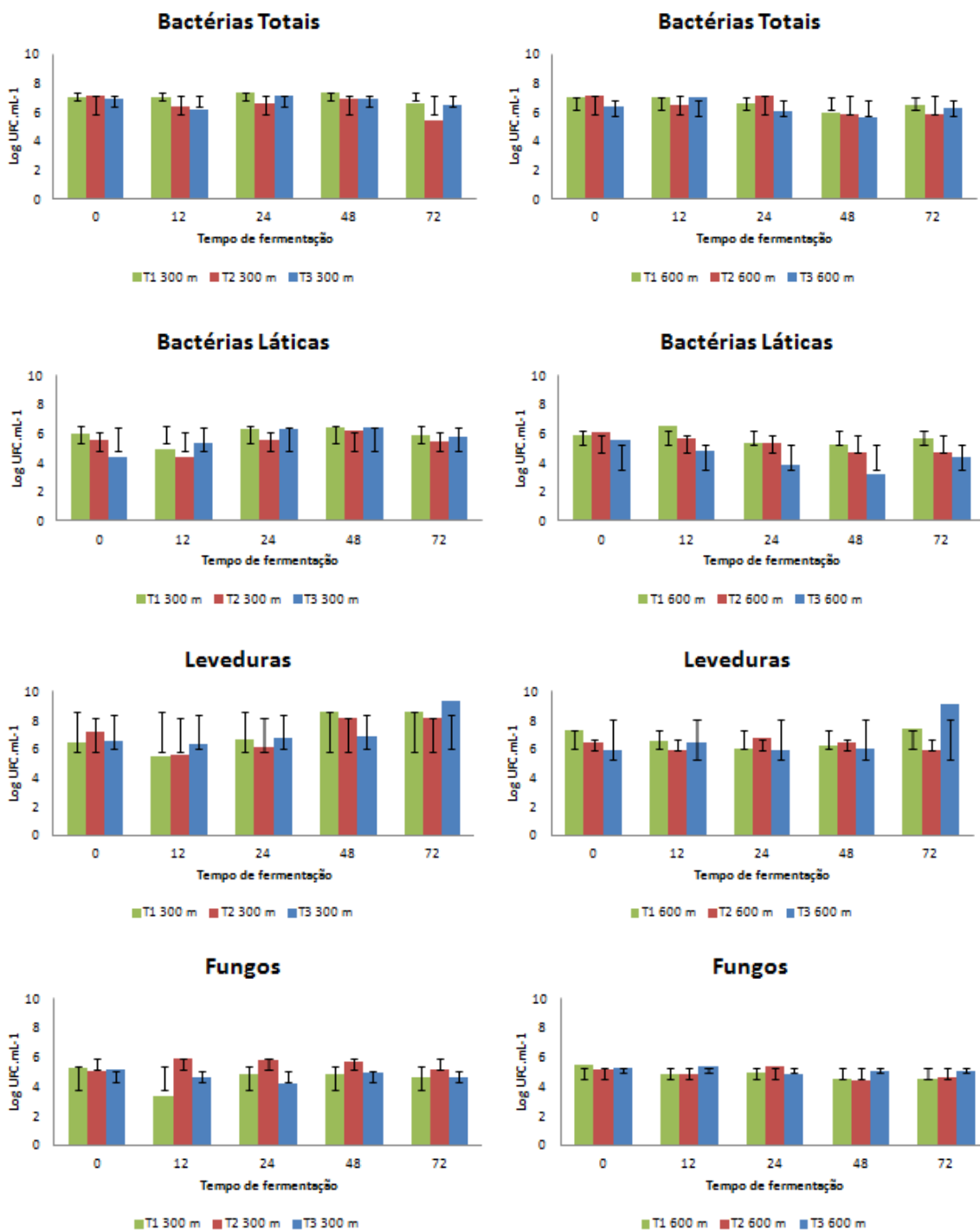
A população de bactérias lácticas foi influenciada pela interação tripla entre altitude, leveduras inoculadas e tempo de fermentação. Nos cafés provenientes de 300 m de altitude a população de bactérias lácticas ficou entre 4,4 e 6,4 log UFC.g⁻¹, enquanto nas amostras de 600 m essa população variou de 3,2 a 6,5 UFC.g⁻¹.

A contagem de leveduras variou de 5,5 a 9,3 log UFC.g⁻¹ para as amostras provenientes de 300 m e de 5,9 a 9,1 UFC.g⁻¹ para as amostras de 600 m. Essa população só foi influenciada pela interação entre altitude e tempo de fermentação, não sendo afetada pela inoculação, o que indica que as amostras não inoculadas, ou tratamentos controle, apresentaram uma contagem de leveduras endógenas que se aproxima da contagem quando feita a inoculação.

A população de fungos variou de 3,3 a 5,9 log UFC.g⁻¹, para as amostras de 300 m, e de 4,4 a 5,5 UFC.g⁻¹, para as amostras de 600 m. A contagem de fungos filamentosos foi influenciada pela interação entre altitude, inoculação e tempo de fermentação.

É possível perceber que a população de bactérias totais sofreu uma leve diminuição das primeiras horas de fermentação para as últimas, já a população de leveduras persistiu ao longo da fermentação, com um aumento nas últimas horas (Figura 1).

Figura 1: Resultados da contagem dos grupos microbianos ao longo da fermentação.



T1: inoculação de *Meyerozyma guilliermondii*; T2: inoculação de *Pichia kluyveri*; T3: controle. I: Desvio padrão

Também é possível notar que a população de bactérias totais é aproximadamente 4% maior do que a população de leveduras no início da

fermentação, situação que tende a inverter ao longo da fermentação, indicando o prevaletimento das leveduras nas horas finais da fermentação (contagem 24% maior).

A população de bactérias lácticas na altitude de 300 m manteve-se relativamente constante ao longo da fermentação, exceto para o tratamento controle, uma vez que a população apresentou crescimento até 48h de fermentação, seguido de uma pequena queda no final da mesma. Já para a altitude de 600 m a população de bactérias lácticas apresentou ligeira diminuição ao final da fermentação.

Bactérias lácticas são frequentemente isoladas de frutos frescos de café e estão mais fortemente relacionadas ao processamento de café via úmida, devido ao menor teor de oxigênio presente no meio durante o mesmo, do que ao processamento por via natural (PEREIRA et al., 2015). Wang et al. (2018) constataram a preferência destes microrganismos pelo consumo de monossacarídeos, como glicose e frutose, sobre dissacarídeos como a sacarose, o que pode explicar a diminuição na população de bactérias lácticas no presente estudo, visto que as concentrações destes açúcares foram diminuindo.

A população de fungos manteve-se constante nos tratamentos da altitude de 300 m, com uma pequena diminuição no tratamento inoculado com *Meyerozyma guilliermondii* no tempo de 12h. Já para a altitude de 600 m o tratamento inoculado com *Meyerozyma guilliermondii* foi capaz de reduzir a população de fungos ao longo do tempo em um ciclo log, enquanto os demais tratamentos apresentaram diminuições mais sutis.

O processamento por via natural é o que mais permite a contaminação do café por fungos filamentosos e seu crescimento, devido ao menor envolvimento de água durante o processamento. Mesmo que estes microrganismos já estejam presentes nos frutos de café cereja, as bactérias e leveduras crescem mais rápido que os fungos em ambientes mais úmidos, o que torna o crescimento de fungos filamentosos mais propício durante os estágios finais da secagem (PEREIRA et al., 2015). Porém, no presente estudo a população de fungos sofreu redução de quase 1 ciclo log para quase todos os tratamentos.

Estudos com inoculação de leveduras para a fermentação de café conilon ainda são escassos, por esta razão não existem dados de contagem de grupos microbianos em cafés conilon inoculados.

Pereira (2018) avaliou a diversidade microbiana presente nos cafés conilon cultivados em diferentes altitudes no estado do Espírito Santo, constatando para a altitude de 300 m que a população de bactérias mesófilas aeróbias e fungos predominaram em relação às populações de leveduras e bactérias lácticas ao longo da fermentação. Por outro lado, para altitude de 600 m as contagens dos quatro grupos microbianos permaneceram mais próximas ao longo da fermentação. Isso implica que a inoculação feita no presente estudo foi capaz de alterar essa tendência, já que as contagens de bactérias totais, bactérias lácticas e leveduras mantiveram-se muito próximas ao longo da fermentação. Apenas a população de fungos apresentou uma contagem menor que os demais grupos. Essa população é um dos principais problemas durante o processamento do café, devido à produção de micotoxinas por fungos filamentosos. Desta forma, a manutenção desta população em contagens mais baixas pode vir a minimizar as concentrações dessas substâncias no café.

O q-PCR é uma análise fundamental para a avaliação da persistência e do comportamento das leveduras inoculadas ao longo da fermentação.

Para os frutos de café inoculados com *Pichia kluyveri* a contagem desta levedura variou de 4,7 a 5,3 log UFC.g⁻¹ para 300 m de altitude e de 4,4 a 4,8 log UFC.g⁻¹ para 600 m de altitude. Já para os frutos inoculados com *Meyerozyma guilliermondii* a contagem variou de menor que 2,0 a 3,4 log UFC.g⁻¹ para 300 m e se manteve menor que 2,0 log UFC.g⁻¹ para 600 m. Nos tratamentos controle a população de *P. kluyveri* manteve-se menor que 2,0 log UFC.g⁻¹ e variou de menor que 2,0 a 3,8 log UFC.g⁻¹, para 300 e 600 m respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1: População de leveduras ao longo da fermentação

Tratamentos	População de <i>Pichia kluyveri</i> (log UFC.g ⁻¹)				
	Fermentação (horas)				
	0	12	24	48	72
Controle 300 m	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
<i>Pichia kluyveri</i> 300 m	4,7	5,1	5,2	5,3	4,7
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> 300 m	3,2	2,8	2,6	3,4	< 2
Controle 600 m	< 2	3,8	3,6	3,6	3,8
<i>Pichia kluyveri</i> 600 m	4,5	4,6	4,4	4,7	4,8
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> 600 m	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2

Pereira (2018) observou a presença de *Meyerozyma guilliermondii* em cafés provenientes das mesmas áreas de estudo do presente trabalho, tanto em cafés cultivados a 600 m como a 300 m. Já *Pichia kluyveri* foi encontrada apenas nos cafés de 600 m pelo mesmo autor (PEREIRA, 2018).

Como demonstrado por Pereira (2018) *Pichia kluyveri* não faz parte da microbiota natural dos cafés de 300 m, por esta razão a sua população nas amostras controle 300 m está abaixo do limite de detecção da análise. Porém seu crescimento parece ter sido favorecido com a inoculação de *Meyerozyma guilliermondii*. Já no café de 600 m o crescimento de *Pichia kluyveri* foi inibido pela inoculação de *Meyerozyma guilliermondii*.

A relação entre leveduras pode ser positiva (mutualismo) ou negativa (competição), como aconteceu no presente estudo nos cafés de 300 e 600 m, respectivamente (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). O fato de mesmas leveduras se comportarem de formas diferentes em meios distintos indica que além das leveduras em questão, fatores como a composição química do meio e a população naturalmente presente no café, podem interferir no tipo de relação entre as leveduras.

Por ser uma levedura naturalmente presente no café de 600 m a população de *Pichia kluyveri*, apesar de ter iniciado baixa, apresentou crescimento ao longo da fermentação nas amostras controle 600 m, porém em contagens menores do que das amostras inoculadas com esta levedura. Bressani et al. (2018) também constataram uma maior contagem de leveduras em cafés arábica inoculados com *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida parapsilosis* do que em cafés não inoculados, ou tratamentos controle.

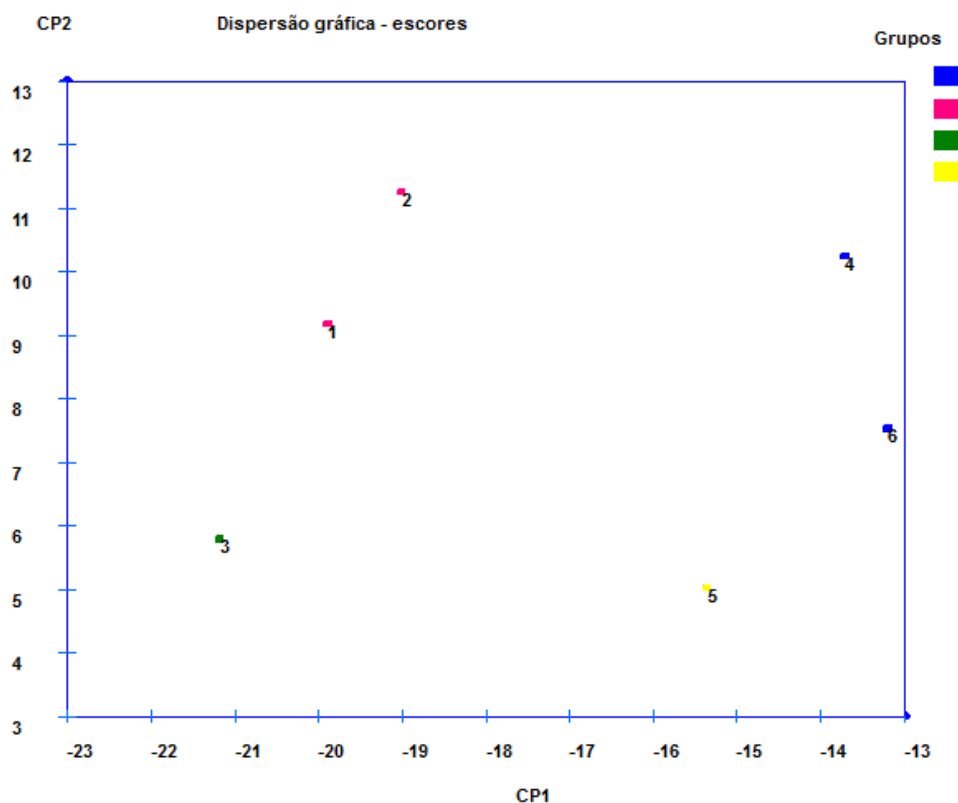
3.2. Análises químicas

Os compostos voláteis são os principais responsáveis pela percepção sensorial de uma amostra de café, portanto qualquer alteração no perfil destes pode vir a afetar a qualidade final da bebida.

Nas amostras de café torrado foram identificados 24 compostos voláteis (Apêndice D) pertencentes às classes dos aldeídos, cetonas, fenóis, pirazinas e pirróis.

As amostras pertencentes ao mesmo grupo apresentam perfis de compostos voláteis similares. As amostras T3 de 300 m e T2 de 600 m apresentaram menor intensidade de todos os compostos voláteis, por esta razão estas amostras permaneceram isoladas no agrupamento (Figura 2).

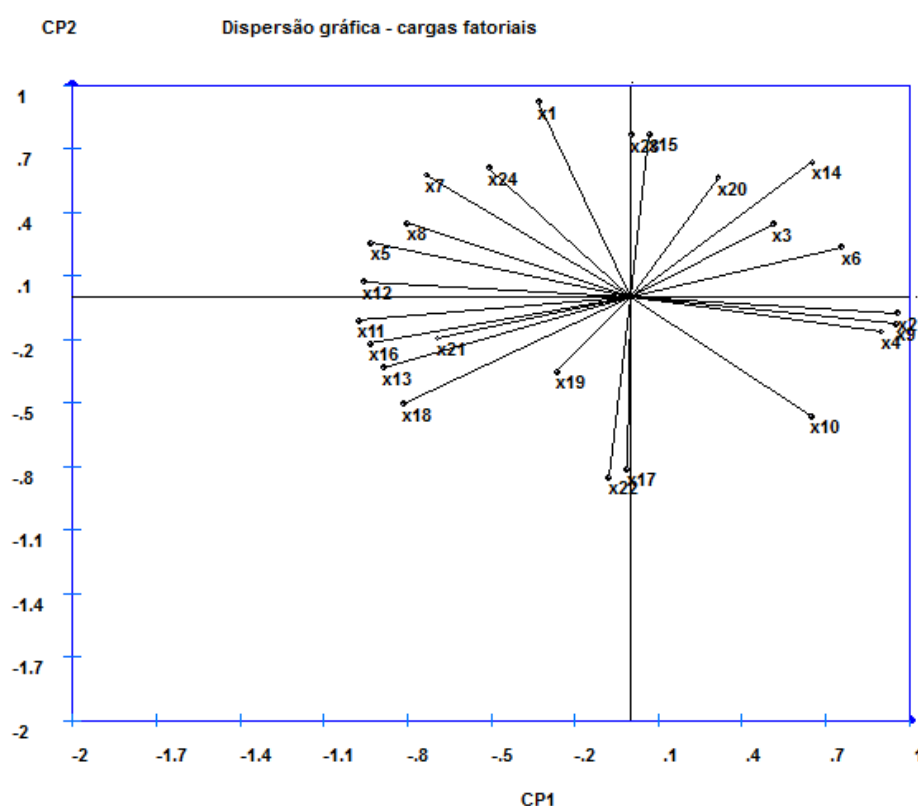
Figura 2: Análise de componentes principais - Dispersão gráfica: escores



1: T1 300 m; 2: T2 300 m; 3: T3 300 m; 4: T1 600 m; 5: T2 600 m; 6: T3 600 m.

As duas componentes principais abrangem 78,37% da variação (Figura 3). Em relação a componente principal 1 (CP1) é possível perceber uma separação entre as amostras das duas altitudes. O furfural e o 5-metilfurfural são dois dos compostos significativos nesta componente e se apresentam de forma mais intensa nas amostras provenientes de 600 m de altitude, enquanto nas amostras de 300 m os compostos significativos mais intensos são o 2-Etil-5-Metilpirazina e o 3-Etil-2,5-Dimetilpirazina.

Figura 3: Análise de componentes principais - Dispersão gráfica: cargas fatoriais



x1: 2-Metilpirazina; x2: Furfural; x3: Álcool furfúrico; x4: Acetoxiacetona; x5: 2,5-Dimetilpirazina; x6: 2,6-Dimetilpirazina; x7: 2-Etilpirazina; x8: 2,3-Dimetilpirazina; x9: 5-Metilfurfural; x10: 2-Etil-6-Metilpirazina; x11: 2-Etil-5-Metilpirazina; x12: 2,3,5-Trimetilpirazina; x13: 2-Etil-3-Metilpirazina; x14: 2-Metil-5-Vinilpirazina; x15: 2-Acetilpirrol; x16: 3-Etil-2,5-Dimetilpirazina; x17: 2-Etil-3,5-Dimetilpirazina; x18: 5-Etil-2,3-Dimetilpirazina; x19: Guaiacol; x20: 2-Acetil-3-Metilpirazina; x21: 3,5-Dietil-2-Metilpirazina; x22: 1-Furfurilpirrol; x23: 2-Metoxi-4-Vinilfenol; x24: 4-Etil-2-Metoxifenol

Caporaso et al. (2018) relataram o furfural como um composto doce, amadeirado que remete a amêndoa, e o 5-metilfurfural a caramelo, especiarias e carvalho. Já os compostos presentes nos cafés de 300 m são descritos pelos

autores como café terroso e torrado. Com base na descrição feita é possível prever uma diferença significativa entre as características sensoriais das bebidas das duas altitudes.

Com relação a componente principal 2 (CP2) os compostos voláteis significativos foram 2-metilpirazina e 2-metoxi-4-vinilfenol, esses compostos foram especificados por Caporaso et al. (2018) como contendo características sensoriais que remetem a nozes e cravo da Índia, respectivamente. É possível perceber maior intensidade de 2-metilpirazina e 2-metoxi-4-vinilfenol nas amostras T1 e T2 da altitude de 300 m, assim como moderadamente mais intensas em T1 de 600 m.

É possível perceber que as amostras provenientes de 600 m de altitude tiveram boa intensidade de voláteis mesmo quando não inoculadas. O mesmo não ocorreu na altitude de 300 m, na qual as amostras inoculadas apresentaram maior intensidade de voláteis do que a amostra controle, isso indica que a inoculação das leveduras foi capaz de alterar o perfil de compostos voláteis das amostras.

Bressani et al. (2018) também obtiveram mudanças no perfil de voláteis de café arábica com inoculação direta de *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida parapsilosis*, obtendo compostos voláteis que apresentam sabor de caramelo e odor frutado, respectivamente.

A maioria dos compostos voláteis presentes no café é derivada de componentes não voláteis presentes no café verde, que durante o processo de torrefação sofrem quebra e participam de uma complexa série de reações químicas e enzimáticas, como a reação de Maillard, por exemplo (CLARKE e MACRAE, 1995).

As concentrações de ácidos orgânicos e sacarose só foram influenciadas pela interação entre os fatores altitude e tempo de fermentação. Já a concentração de frutose foi influenciada pela interação tripla entre altitude, leveduras e tempo de fermentação, enquanto a glicose não sofreu influência de nenhum dos fatores em estudo, segundo a análise de variância ANOVA (Apêndice E).

Dos ácidos analisados neste estudo apenas ácido acético, láctico, málico, oxálico e propiônico foram encontrados nos frutos de café. Os cinco ácidos foram

detectados em todas as amostras durante todos os tempos de fermentação, porém em concentrações diferentes (Tabela 3).

Tabela 3: Concentrações em mg.g⁻¹ de ácidos orgânicos e açúcares ao longo da fermentação em horas.

	300 m				
	0	12	24	48	72
Ácido Oxálico	3,49	3,69	3,95	7,24	4,54
Ácido Málico	2,66	2,79	2,36	7,89	2,45
Ácido Acético	2,39	2,45	2,27	5,12	2,41
Ácido Lático	4,29	5,30	4,04	35,34	5,59
Ácido Propiônico	1,54	1,54	1,53	2,39	1,54
Glicose	0,35	0,36	ND	ND	0,25
Frutose	0,14	0,22	ND	ND	0,16
Sacarose	0,08	0,12	ND	ND	0,10
	600 m				
	0	12	24	48	72
Ác. Oxálico	2,16	2,16	1,48	1,30	1,91
Ác. Málico	2,47	2,21	2,08	2,05	2,17
Ác. Acético	2,36	2,15	2,15	2,06	2,34
Ác. Lático	2,78	2,19	1,86	1,81	3,60
Ác. Propiônico	1,36	1,05	1,53	1,21	1,02
Glicose	0,32	0,20	0,15	0,64	0,14
Frutose	0,17	0,12	0,08	0,08	0,07
Sacarose	0,19	0,07	0,04	0,08	0,04

ND: Não detectável.

Todos os ácidos estavam presentes desde o tempo 0h de fermentação, ou seja, são naturalmente presentes no café. O ácido lático foi o principal ácido detectado, seguido pelos ácidos oxálico e málico. Quanto aos açúcares a glicose foi o principal deles.

Fixando-se a altitude de 300 m os ácidos orgânicos e os açúcares apresentaram comportamento semelhante para todas as amostras. A concentração de ácidos iniciou-se menor e aumentou gradativamente ao longo da fermentação até 48h, depois desta apresenta uma queda. Já os açúcares apresentaram maior concentração nas primeiras horas de fermentação, chegando a concentrações próximas a zero nos tempos 24 e 48h, seguida de um aumento em 72h.

Os comportamentos dos ácidos e açúcares estão fortemente relacionados já que durante a fermentação os açúcares são utilizados como fonte de energia para o metabolismo das leveduras.

Vallarino e Osorio (2019) sugerem que o inverso também pode ocorrer. Os ácidos orgânicos podem sofrer diminuição na concentração pela gliconeogênese, uma via metabólica dos frutos que resulta na geração de glicose a partir do fosfoenolpiruvato proveniente dos ácidos orgânicos. Segundo os autores outra via que leva à degradação de ácidos orgânicos é a fermentação, onde ácidos do ciclo do ácido tricarbóxico podem ser convertidos em etanol.

Para a altitude de 600 m observa-se o mesmo comportamento para ácidos orgânicos entre as amostras. A concentração dos ácidos sofreu uma pequena queda ao longo da fermentação, o que indica que os mesmos podem ter sido degradados pelas leveduras. Os açúcares destas amostras também diferiram da menor altitude, diminuindo gradualmente, porém sem atingir concentrações tão baixas quanto nas amostras de 300 m. É sabido que leveduras utilizam primeiramente os açúcares simples como fonte de energia, isso explica porque nestas amostras a concentração de ácidos orgânicos não diminuiu, visto que, em 72 horas de fermentação ainda havia disponibilidade de açúcares.

Pereira (2018) em café conilon processado por via natural foi capaz de identificar apenas ácido acético e succínico, e observou concentrações de sacarose de 0,68 a 5,30 mg.g⁻¹, frutose de 1,30 a 4,60 mg.g⁻¹ e glicose de 0,24 a 1,25 mg.g⁻¹ ao longo da fermentação. As concentrações de açúcares encontradas pelo autor ao final da fermentação são maiores do que as do presente estudo, o que indica maior consumo de açúcares. A concentração de açúcares nos frutos de café depende, além da fermentação, de fatores como estágio de maturação dos frutos e velocidade de maturação dos mesmos.

3.3. Análise sensorial

A análise sensorial é um dos principais procedimentos para a avaliação da qualidade do café. De acordo com a pontuação total das amostras observou-se que todas as amostras provenientes de 300 m de altitude podem ser classificadas como bebida prêmio (70-80), enquanto as amostras de 600 m de altitude classificam-se como bebida fina (80-90) (Tabela 4).

Tabela 4: Pontuação total das amostras segundo o protocolo de degustação de robustas finos.

Altitude	Tratamentos		
	T1	T2	T3
300 m	76,82	78,65	78,91
600 m	82,10	80,08	81,82

T1: *Meyerozyma guilliermondii*; T2: *Pichia kluyveri*; T3: Controle.

Como já foi relatado, a altitude é um fator que influencia diretamente a qualidade da bebida, devido a mudanças na temperatura e na velocidade de maturação do fruto (ALVES, et al., 2011). Essas mudanças foram evidenciadas na análise sensorial, bem como no perfil de voláteis das amostras. Silva et al. (2018) concluíram que a altitude é um dos fatores que compõem o *terroir* e que influenciam a qualidade do café, expressa em sua classificação geral.

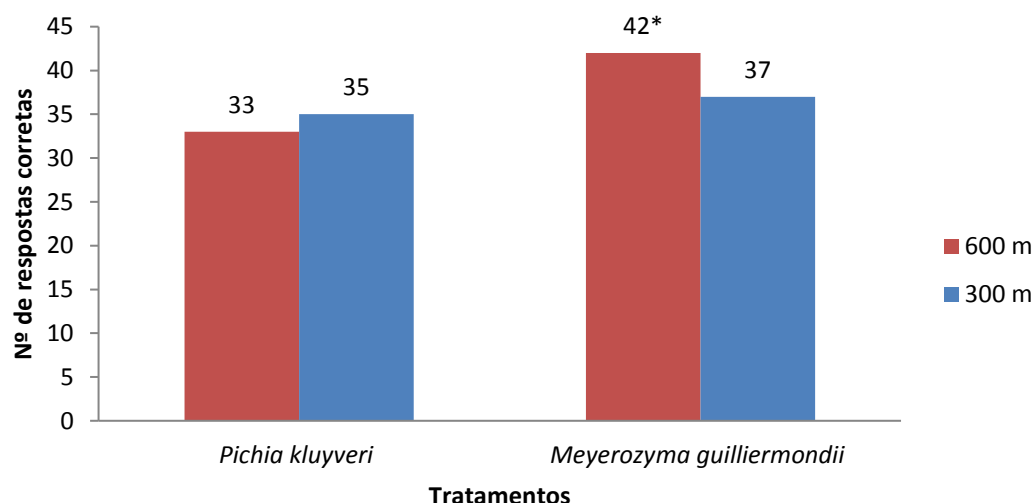
A inoculação de *Meyerozyma guilliermondii* e *Pichia kluyveri*, para as amostras provenientes de 300 m de altitude, não foi capaz de aumentar a pontuação das amostras apesar de ter sido observado maior intensidade de compostos voláteis nas amostras inoculadas com relação ao controle dessa altitude. Já para altitude de 600 m houve um aumento da nota dada pelo provadores treinados para amostra inoculada com *M. guilliermondii* (82,10) em relação ao controle (81,82). Bressani et. al (2018) também não observaram diferenças significativas nas notas sensoriais de café arábica inoculado com leveduras pelo método direto, mesmo método utilizado no presente estudo.

Além da pontuação total a análise sensorial apresentou outros resultados, como notas frutadas intensas, suaves, cítricas, dentre outras, regularmente relacionadas às amostras de café fermentadas por *P. kluyveri*. As amostras inoculadas com *M. guilliermondii* foram repetidamente identificadas com notas de caramelo, amadeiradas e amendoadas. Enquanto amostras controle foram descritas como leve e suave pelos provadores treinados. Vales destacar ainda que dos seis provadores treinados um atribuiu nota 87,00 e dois 85,00 aos cafés de 600 m inoculados com *M. guilliermondii*. Já o café inoculado com *P. kluyveri* foi o que obteve a menor nota (80,08) e também o que apresentou a menor intensidade de compostos voláteis (PK) na altitude de 600 m.

O teste triangular é um teste de diferença que indica se as mudanças provocadas pela fermentação do café podem ser percebidas pelo consumidor. É importante ressaltar que esse teste não indica se as diferenças relatadas são positivas ou negativas.

Para um total de 90 provadores era necessário que 38 destes apresentassem a resposta correta no teste para que este fosse considerado significativo a 5%. Portanto, foi possível detectar diferença significativa ($p < 0,05$) apenas para a amostra fermentada com *Meyerozyma guilliermondii* na altitude de 600 m (Figura 4), o que indica que a redução na pontuação geral, obtida pela análise sensorial com provadores treinados, pode ter sido percebida pelos consumidores durante este teste.

Figura 4: Número de respostas corretas para cada teste triangular.



*Significativo a 5%

Apesar de o teste triangular não identificar preferência de uma amostra sobre outra, foi possível observar constantes comentários sobre o sabor das bebidas. Os consumidores que conseguiram identificar a diferença entre as amostras constantemente relataram que as amostras controle apresentaram sabor mais “forte” ou mais amargo, enquanto as amostras fermentadas pela *Pichia kluyveri* e *Meyerozyma guilliermondii* foram apontadas como sendo mais “leves” e “perfumadas”.

4. Conclusão

A inoculação de *M. guilliermondii* pode contribuir para o controle da população de fungos durante o processo de secagem/fermentação do café natural.

Do ponto de vista sensorial apesar de não ter sido observada mudança expressiva nas notas dos cafés de mesma altitude foi constatado maior intensidade de voláteis nas amostradas inoculadas com leveduras, especialmente nos cafés provenientes de baixas altitudes. Além disso, para o café de 600 m os consumidores foram capazes de perceber a diferença no café inoculado com *M. guilliermondii*. Dessa forma, a inoculação dessa levedura pode ser capaz de alterar o perfil sensorial do café mesmo que a nota não seja alterada.

É preciso reforçar ainda a necessidade de mais estudos científicos de fermentação de café conilon para verificar a viabilidade das leveduras em outras variedades de conilon, de diferentes métodos de processamento, assim como testar o efeito da utilização de outras leveduras, ou até mesmo uma combinação destas, sobre a qualidade do café.

Referências bibliográficas

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, v. 32, n. 261, mar./abr. 2011

ALVES, L.C., DE MAGALHÃES, D.M., LABATE, M.T.V., GUIDETTI-GONZALEZ, S., LABATE, C.A., DOMINGUES, D.S., SERA, T., VIEIRA, L.G.E, PEREIRA, L.F.P. Differentially accumulated proteins in *Coffea arabica* seeds during perisperm tissue development and their relationship to coffee grain size. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 1635–1647, 2016

AVELINO, J., BARBOZA, B., ARAYA, J.C., FONSECA, C., DAVRIEUX, F., GUYOT, B., CILAS, C. Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitude terroirs of Costa Rica, Orosi and Santa María de Dota. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 1869–1876, 2005

BORÉM, F.M., ISQUIERDO, E.P., ALVES, G.E., RIBEIRO, D.E., SIQUEIRA, V.C., TAVEIRA, J.H.S. Quality of natural coffee dried under different temperatures and drying rates. **Coffee Science**, Lavras, v. 13, n. 2, p. 159 - 167, 2018.

BRESSANI, A. P. P. et al. Characteristics of fermented coffee inoculated with yeast starter cultures using different inoculation methods. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 92, n. October 2017, p. 212–219, 2018

CAPORASO, N., WHITWORTH, M. B., CUI, C., FISK, I. D. Variability of single bean coffee volatile compounds of Arabica and robusta roasted coffees analysed by SPME-GC-MS. **Food Research International**, [s.l.], v. 108, p.628-640, 2018.

CHENG, B., FURTADO, A., SMYTH, H.E., HENRY, R.J. Influence of genotype and environment on coffee quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 57, p. 20-30, 2016

CLARKE, R.J.; MACRAE, R. **Coffee**: volume 1: Chemistry. Elsevier science publishing: Nova lorque, ed. 1, p.306. 1985.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

DONG, W., HU, R., CHU, Z., ZHAO, J., TAN, L. Effect of different drying techniques on bioactive components, fatty acid composition, and volatile profile of robusta coffee beans, **Food Chemistry**, v. 234, p. 121-130, 2017.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 4ª Ed. Curitiba: PUCPRes, 2013.

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**, v. 61, s.n., p. 183-195, 2014a.

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, s.n., p. 87-95, 2014b.

EVANGELISTA, S. R., MIGUEL, M. G. C. P., SILVA, C. F., PINHEIRO, A. C. M., SCHWAN, R. F. Microbiological diversity associated with the spontaneous wetmethod of coffee fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 210, s.n., 102–112, 2015.

FLAMENT, I. **Coffee flavor chemistry**. John Wiley & Sons, Inglaterra, 2002, 410 p.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts**: a taxonomic study. 5ª ed. Elsevier, Reino Unido, 2011, 2354 p.

LEE, L. W., CHEONG, M. W., CURRAN, P., YU, B., LIU, S. Q. Modulation of coffee aroma via the fermentation of green coffee beans with *Rhizopus oligosporus*: II. Effects of different roast levels. **Food Chemistry**, v.211, s.n., p. 925–936, 2016.

MALTA, M. R., CHAGAS, S. J. R. Avaliação de compostos não-voláteis em diferentes cultivares de cafeeiro produzidas na região sul de Minas Gerais. **Acta Scientiarum**. Agronomy, Maringá, v.31, n. 1, p. 57 – 51, 2009.

NASCIMENTO, E.A., AQUINO, F.J.T., NASCIMENTO, P.M., CHANG, R., MORAIS, S.A.L. Constituintes voláteis e odorantes potentes do café conilon em diferentes graus de torração. **Ciência & Engenharia**, v. 16, n. 1/2, p. 23 - 30, jan, 2007.

OIC. Organização Internacional do Café. **Protocolo de Degustação de Robustas Finos**, p. 22, 2010. Disponível em: < <http://www.ico.org/documents/pscb-123-p-robusta.pdf>> Acesso em 23 de Mai de 2018.

PEREIRA, G. V. M., NETO, D. P. C., JÚNIOR, A. I. M., VÁSQUEZ, Z. S., MEDEIROS, A.B.P., VANDENBERGHE, L.P.S., SOCCOL, C.R. Exploring the impacts of postharvest processing on the aroma formation of coffee beans – A review, **Food Chemistry**, v.272, p. 441-452, 2019

PEREIRA, G.V.M., SOCCOL, V.T., BRAR, S.K., NETO, E., SOCCOL, C.R. Microbial ecology and starter culture technology in coffee processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.57, n.13, p. 2775 – 2788, 2015

PEREIRA, G.V.M., SOCCOL, V.T., SOCCOL, C.R. Current state of research on cocoa and coffee fermentations. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 50–57, 2016

PEREIRA, P. V. **Dinâmica microbiana e aspectos físicos e químicos de café conilon (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) cultivado em diferentes ambientes e processado por via natural**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2018.

RIBEIRO, B. B.; MENDONÇA, L. M. V. L.; ASSIS, G. A.; MENDONÇA, J. M. A.; MALTA, M. R.; MONTANARI, F. F. Avaliação química e sensorial de blends de *Coffea canephora* Pierre e *Coffea arabica* L. **Coffee Science**, Lavras, v. 9, n. 2, p. 178-186, abr./jun. 2014.

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, n. 2, p. 235-247, 2013.

SILVA, C.F., 2014. Microbial activity during coffee fermentation. In: SCHWAN, R.F., FLEET, G.H. (Eds.), **Cocoa and Coffee Fermentation**. CRC Taylor & Francis, Boca Raton, FL, p. 398–423.

SILVA, S.A., QUEIROZ, D.M., SANTO, N.T., PINTO, F.A.C. Influence of Climate, Soil, Topography and Variety on the Terroir and on Coffee Quality. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 24, n. 3, p. 1-15, 2018.

VALLARINO, J. G., OSORIO, S. Organic Acids. In: Yahia, E. M. **Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables**. Woodhead Publishing, 2019. p. 207 - 224

VELMOUROUGANE, K. Impact of Natural Fermentation on Physicochemical, Microbiological and Cup Quality Characteristics of Arabica and Robusta Coffee. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, India, v. 83, n. 2, p. 233–239, 2013.

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

WANG, C., SUN, J., LASSABLIERE, B., YU, B., ZHAO, F., ZHAO, F., CHEN, Y., LIU, S.Q. 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 of the science of food and agriculture**, v. 99, n. 1, p. 409 – 420, 2019.

Características físico-químicas do café conilon (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) processado por via natural com inoculação de leveduras

Resumo

A demanda por cafés de qualidade vem aumentando nos últimos anos. Diversos fatores podem influenciar na obtenção de uma bebida de qualidade, dentre eles destaca-se a altitude. Foram realizadas análises de pH, acidez titulável total, sólidos solúveis, condutividade elétrica e lixiviação de potássio nos grãos de café verde. A interação entre altitude e leveduras teve influência significativa sobre acidez e sólidos solúveis das amostras. Para acidez titulável total só houve diferença significativa entre tratamentos para as amostras de 600 m, enquanto para sólidos solúveis houve diferença significativa para as amostras de ambas as altitudes. Nos cafés provenientes de 600 m foi possível perceber que o café inoculado com *Meyerozyma guilliermondii* apresentou maior teor de sólidos solúveis (30%) do que os demais tratamentos. A condutividade elétrica e a lixiviação de potássio dos grãos só foram afetadas pela altitude de cultivo. Já para pH não houve diferença entre tratamentos e as médias foram condizentes com a literatura. O presente estudo permitiu concluir que a altitude de cultivo do café é um fator de impacto sobre a fermentação visto que a inoculação com as leveduras apresentou diferentes resultados em função desta.

Palavras chave: Qualidade de café, inoculação de leveduras, análises químicas.

1. Introdução

O cafeeiro é uma planta pertencente ao gênero *Coffea* da família *Rubiaceae*, que abrange cerca de 80 espécies e centenas de variedades (HAMDOUCHE et al., 2016). Porém as espécies mais comumente estudadas e cultivadas no mundo são *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, conhecidas como café arábica e café robusta, respectivamente (NASCIMENTO; SPEHAR; SANDRIL, 2014). O café conilon, muito cultivado no Brasil, é uma variedade do *Coffea canephora*, *C. canephora* var. *kouilouensis* (CLARKE; MACRAE, 1985).

O Brasil é, atualmente, o maior produtor e exportador mundial de café, o país produziu em 2018 61,7 milhões de sacas de café beneficiado. A maior parte da produção é de café arábica, 47,5 milhões de sacas, enquanto o restante, 14,2 milhões de sacas, é referente ao café conilon (SILVA, et al., 2013; CONAB, 2018).

A produção de café conilon para a safra de 2019 está estimada entre 14,36 a 16,33 milhões de sacas, um crescimento entre 1,3% e 15,2% quando comparada ao ano passado (CONAB, 2019).

Neste contexto, o estado do Espírito Santo é o maior produtor brasileiro de café conilon, principalmente em virtude das condições favoráveis de

temperatura e topografia da região (TEIXEIRA; SILVA; MENDONÇA, 2017). O café conilon abrange 403.719 hectares de área plantada destinada a colheita, sendo 256.884 destas no estado do Espírito Santo (BRASIL, 2017).

A demanda por cafés especiais vem crescendo ultimamente (DONG et al., 2017). Diversos fatores podem influenciar tanto no desenvolvimento do cafeeiro quanto na qualidade do café. Os mais estudados são irrigação, adubação, face de exposição ao sol e altitude (JUNIOR, et al., 2017; ZAIDAN, et al., 2017).

A altitude é um dos principais fatores relacionados a qualidade do café. Isso acontece devido a relação entre altitude e temperatura, e a influência desta última no processo de amadurecimento dos frutos. Temperaturas baixas são responsáveis pelo adiamento do amadurecimento o que leva um acúmulo de compostos bioquímicos que são associados à melhora do aroma do café. A altitude tem uma grande influência nas temperaturas médias, com um gradiente térmico decrescente de $0.6^{\circ}\text{C} / 100 \text{ m}$ de elevação (ALVES et al., 2011).

O processamento dos frutos é outro fator de interesse quando se trata de qualidade de café. O processamento por via natural está normalmente relacionado com a menor qualidade da bebida, porém quando a colheita e a secagem dos frutos é feita de forma cuidadosa os cafés naturais podem dar origem a bebidas de excelente qualidade. Além disso, este tipo de processamento é mais simples, requer menor custo, utiliza menos água e tem menor produção de poluentes, quando comparado com os demais métodos (BORÉM et al., 2017).

Outro fator conhecido que pode afetar a qualidade do café é a microbiota naturalmente presente nos frutos. Os microrganismos presentes nos frutos de café durante o processamento são capazes de utilizar os vários compostos da polpa e da mucilagem como nutrientes para o seu desenvolvimento, durante a chamada fermentação. Nesta etapa os microrganismos secretam ácidos orgânicos e outros metabólitos que podem afetar as características do grão de café (EVANGELISTA, et al., 2015).

A atividade microbiana durante a fermentação pode determinar as concentrações de açúcares livres (por exemplo, glicose e frutose) e aminoácidos que permanecem no grão de café e conseqüentemente contribuir para a produção de compostos voláteis pela reação de Maillard durante o processo de

torrefação (SCHWAN e FLEET, 2014). Além disso, a fermentação pode acarretar mudanças no pH e acidez dos grãos de café, fatores que tem sido relacionados com a qualidade sensorial da bebida (FILHO, et al. 2015).

Sendo assim, a inoculação de leveduras durante a fermentação pode afetar características físico químicas dos grão e por consequência a qualidade da bebida. Neste contexto o objetivo do presente trabalho foi analisar a influência da altitude e da utilização de leveduras nas características físico químicas dos grãos de café.

2. Material e métodos

2.1. Café

Foram utilizados frutos de cafés cereja (variedade “Emcaper 8151 – Robusta Tropical”), colhidos por derrça, em duas regiões produtoras do sul do estado do Espírito Santo, Cachoeiro do Itapemirim, ES (20°50’56”S – 41°06’46”W) e Jerônimo Monteiro, ES (20°47’22”S – 41°23’42”W), com altitudes médias de 600 e 300 m, respectivamente.

2.2. Leveduras

Os inóculos de *Meyerozyma guilliermondii* CCMA 1738 e *Pichia kluyveri* CCMA 1743 foram previamente isolados de amostras de café por Pereira (2018), e encontram-se depositados na Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras (CCMA/UFLA), e foram selecionados com base na literatura.

2.3. Inoculação e fermentação do café conilon

Os inóculos de *Meyerozyma guilliermondii* CCMA 1738 e *Pichia kluyveri* CCMA 1743 foram ativados em 10 mL de YEPG com 20 g.L⁻¹ de glicose (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura (Himedia, Mumbai, Índia), 10 g.L⁻¹ de peptona de soja (Himedia, Mumbai, Índia) e incubados a 28°C. As ativações foram realizadas até a cultura atingir aproximadamente 10⁸ ufc.mL⁻¹ em 500 mL de YEPG. Após a multiplicação o meio foi centrifugado em centrífuga Z 326 K (HERMLE, Wehingen, Alemanha) a 2000 g por 3 minutos e a

massa de leveduras foi separada e ressuspensa em 225 mL de solução salina 0,85% m.v⁻¹ que, em seguida, foi pulverizada sobre os frutos de café (BRESSANI et al., 2018; EVANGELISTA et al., 2014a). A contagem de leveduras do inóculo inicial foi confirmada por plaqueamento em ágar YEPD e incubadas a 28 °C durante 5 dias.

Cada unidade experimental de frutos de café cereja (5 Kg) foi inoculada separadamente pulverizando-se 225 mL da suspensão de leveduras com aproximadamente 10⁸ ufc.mL⁻¹ ou água pura (tratamento controle).

As unidades experimentais foram dispostas em camadas únicas e os frutos foram secos por exposição solar em terreiros suspensos até 30% de umidade b.u. (BRESSANI et al., 2018).

Posteriormente, os frutos foram levados para um secador de bandejas (Polidryer, Minas Gerais, Brasil), à 55°C, até que obtivessem 11% de umidade b.u. O acompanhamento da umidade dos frutos durante a secagem foi realizado utilizando-se um medidor de umidade de grãos (GEHAKA, São Paulo, Brasil).

2.4. Análises físico-químicas dos grãos de café

2.4.1. pH

Para a determinação do pH foi utilizado o método descrito pela AOAC (1990). Foram pesados 2 g de grãos de café cru moído que em seguida foram adicionados a 50 mL de água destilada. Posteriormente a mistura obtida foi filtrada em papel de filtro para então serem efetuadas as leituras de pH com auxílio de um pHmetro T- 1000 (TEKNA, São Paulo, Brasil).

2.4.2. Acidez Titulável Total

A Acidez Titulável Total foi determinada por titulação com Hidróxido de Sódio 0,1 Mol.L⁻¹. Para tal, foram pesados 2 g de grãos de café cru moído que, em seguida, foram adicionados a 50 mL de água destilada. Posteriormente a mistura obtida foi filtrada em papel de filtro comum. Após a filtragem 5 mL da solução foram retirados e misturados em Erlenmeyer com 50 mL de água destilada. Foram então acrescentadas 3 gotas de fenolftaleína para a imediata titulação até que ocorresse a viragem. O resultado obtido foi expresso em mL de

NaOH 0,1 mol.L⁻¹ por 100 g de amostra, segundo a metodologia descrita pela AOAC (1990).

2.4.3. Sólidos Solúveis

Para a determinação do teor de sólidos solúveis nos grãos de café cru, foram pesados 2 g de café moído e adicionados a 50 mL de água destilada. Posteriormente a mistura obtida foi filtrada em papel de filtro comum, de acordo com o descrito pela AOAC (1990). Finalmente o teor de sólidos solúveis foi determinado a partir do filtrado obtido, utilizando um refratômetro digital HI 96801 (HANNA Instruments, São Paulo, Brasil).

2.4.4. Condutividade elétrica e lixiviação de potássio

Amostras de 50 grãos crus foram pesadas e imersas em 75 mL de água destilada e, em seguida, colocadas em estufa ventilada a 25 ° C, por 5 horas. Após o período de embebição foram retirados os grãos de café, e as soluções sem os grãos foram vertidas para outro recipiente, onde foi realizada a leitura da condutividade elétrica com auxílio de um condutivímetro SC1800 (Sensoglass, São Paulo, Brasil). Os resultados foram expressos em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de amostra.

Após a leitura da condutividade elétrica, a mesma solução foi utilizada para a leitura de lixiviação de potássio, com o auxílio de um fotômetro de chama DM – 62 (Digimed, São Paulo, Brasil). Os resultados da quantidade de potássio lixiviado foram expressos em mg.L⁻¹ (MALTA, et al., 2005).

2.5. Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi realizado no Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), considerando os fatores altitude, com dois níveis (300 e 600 m), e leveduras com três níveis (Levedura 1, levedura 2 e controle). Os resultados das análises foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), a 5% de significância. Quando o efeito de ao menos um dos fatores foi significativo foi aplicado o teste de Tukey a 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GENES (Aplicativo Computacional para Análise de Dados em Estatística Experimental e Genética Quantitativa) (CRUZ, 2013).

3. Resultados e discussão

As análises físico-químicas de pH, acidez total titulável, sólidos solúveis, condutividade elétrica e lixiviação de potássio podem ser indicadores da qualidade do café, uma vez que alterações nesses parâmetros podem influenciar o sabor da bebida ou indicar a presença de grãos defeituosos, que depreciam sua qualidade.

Foi possível observar interação significativa ($p < 0.05$) entre altitude e levedura para as variáveis sólidos solúveis e acidez (Apêndice F). Dessa forma, foram feitos os desdobramentos a partir da interação, aplicando-se o teste de Tukey (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito da interação entre altitude e levedura sobre a acidez titulável total e os sólidos solúveis dos grãos crus.

Variável	Altitude	Tratamentos*		
		T1	T2	T3
Acidez (mL de NaOH 0,1N.100g ⁻¹)	300 m	105,56 a A	83,33 a A	83,33 a A
	600 m	41,67 b B	66,67 b B	100,00 a A
Sólidos Solúveis(%)	300 m	15,00 ab B	7,22 b A	21,11 a A
	600 m	30,00 a A	13,33 b A	20,83 b A

* Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na horizontal, e pelas mesmas letras maiúsculas na vertical, não diferem estatisticamente entre si à 5% de significância pelo teste de Tukey. T1: *Meyerozyma guilliermondii*; T2: *Pichia kluyveri*; T3: Controle.

Não houve diferença significativa na acidez das amostras inoculadas com *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia kluyveri* ou não inoculadas para altitude de 300 m. Porém, na altitude de 600 m as amostras de café inoculadas com as leveduras apresentam menor valor de acidez, 41,67 mL de NaOH 0,1N/100g para *Meyerozyma guilliermondii* e 66,67 mL de NaOH 0,1N/100g para *Pichia kluyveri*, quando comparado ao tratamento controle (100,00 mL de NaOH 0,1N/100g).

Peisino et al. (2015) encontraram acidez de 185,27 mL de NaOH 0,1N.100g⁻¹ para café arábica cultivado a 774,5 m de altitude. O café conilon é naturalmente menos ácido do que o café arábica. Filho et al. (2015) verificaram

uma diminuição da acidez titulável total à medida que aumentaram a concentração de conilon em blends com café arábica.

Agnoletti et al. (2019) obtiveram valores de acidez titulável total entre 86,26 – 107,73 para cafés conilon de diferentes produtores dos estados de Minas Gerais e do Espírito Santo. Estes valores são condizentes com os valores encontrados no presente estudo para cafés de 300 m e para o tratamento controle de 600 m. Os menores valores de acidez titulável total encontrados nos tratamentos T1 e T2 podem ser explicados devido ao consumo de ácidos orgânicos durante a fermentação alcoólica (VALLARINO E OSORIO, 2019).

Dentro dos tratamentos nota-se que para o café inoculado com *Meyerozyma guilliermondii* o que apresenta maior acidez é o café proveniente de 300 m de altitude (105,56), o mesmo pode ser dito do café inoculado com *Pichia kluyveri* (83,33). Porém, no tratamento controle os resultados de acidez para o café de ambas as altitudes são estatisticamente iguais.

Segundo Vilela et al. (2010) a acidez do café é um bom indicador da qualidade do produto, pois quando esta não é suficiente, a bebida de café pode ter um sabor desagradável. A acidez no café pode variar de acordo com o tempo de fermentação e os diferentes estágios de maturação dos frutos, e, como ocorrido no presente estudo, com a altitude e a inoculação de leveduras.

Em relação ao teor de sólidos solúveis, para a menor altitude (300 m), percebe-se que houve uma diminuição significativa do café inoculado com *Pichia kluyveri* quando comparado ao tratamento controle, de 21,11% para 7,22%. Já o café inoculado com *Meyerozyma guilliermondii* não apresentou diferenças significativas no teor de sólidos solúveis quando comparado aos outros dois tratamentos, para esta altitude.

Nos cafés provenientes de maior altitude (600 m) é possível perceber que o café inoculado com *Meyerozyma guilliermondii* apresentou maior teor de sólidos solúveis (30%) do que os demais tratamentos, o que pode indicar que estes microrganismos metabolizaram compostos complexos presentes na polpa e mucilagem, produzindo açúcares e outros compostos mais simples e dessa forma aumentando o teor de sólidos solúveis dos grãos. É possível perceber ainda que *Pichia kluyveri* demonstrou-se mais eficiente na redução de sólidos solúveis do que *Meyerozyma guilliermondii* e o tratamento controle, o que indica melhor utilização destes.

Estudando-se os dados na vertical é possível perceber que o único tratamento que apresentou diferença significativa em relação às altitudes foi o inoculado com *Meyerozyma guilliermondii*, que apresentou maior teor de sólidos na maior altitude (600 m). Já para *Pichia kluyveri* e para o tratamento controle não houve diferenças significativas entre as altitudes. Segundo Alves et al. (2011) quanto maior a altitude de cultivo do café menores as temperaturas médias da região, o que leva ao adiamento da maturação dos frutos e, por consequência, ao maior acúmulo de substâncias pelos frutos, o que explica o maior teor de sólidos solúveis encontrados nas amostras provenientes de 600 m.

O teor de sólidos solúveis em um café sofre influência dos fatores genéticos, ambientais, das condições em que são produzidos e processados. O café conilon pode apresentar valores de sólidos solúveis que variam entre 26,0% e 30,0% (FERRÃO et al., 2017).

Já para pH, condutividade elétrica e lixiviação de potássio a interação entre os fatores estudados foi não significativa, portanto o efeito destes foi estudado separadamente (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2: Efeito da altitude sobre pH, condutividade elétrica e lixiviação de potássio dos grãos crus.

Variáveis	Altitude*	
	300 m	600 m
pH	5,90 a	5,91a
Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)	69,94 a	40,68b
Lixiviação ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	29,38 a	16,22b

* Médias seguidas pelas mesmas letras na horizontal não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. T1: *Meyerozyma guilliermondii*; T2: *Pichia kluyveri*; T3: Controle.

Tabela 3: Efeito de tratamentos sobre pH, condutividade elétrica e lixiviação de potássio dos grãos crus.

Variáveis	Tratamentos*		
	T1	T2	T3
pH	5,87 a	5,97 a	5,88 a
Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)	54,06 a	57,81 a	54,06 a

Lixiviação (mg.L ⁻¹)	21,56 a	23,50 a	23,35 a
----------------------------------	---------	---------	---------

* Médias seguidas pelas mesmas letras na horizontal não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de significância pelo teste F. T1: *Meyerozyma guilliermondii*; T2: *Pichia kluyveri*; T3: Controle.

Não houve diferença significativa ($p < 0.05$) para o parâmetro pH entre os tratamentos, ou seja, o pH das amostras não variou em função da altitude e da espécie de levedura inoculada.

Segundo Velmourougane et al. (2013) o declínio no pH durante a fermentação do café é atribuído principalmente à degradação de substâncias orgânicas complexas da mucilagem em açúcares mais simples, que após a ação dos microrganismos produzem os compostos ácidos. No presente trabalho não foi constatada queda no pH das amostras inoculadas, isso pode ter ocorrido devido a menor exposição da mucilagem, já que a inoculação foi realizada com o fruto inteiro.

De acordo com Balzer (2001) cafés arábica são ligeiramente mais ácidos do que os cafés conilon, que tem um pH na faixa de 5,25 a 5,40. Porém, Filho et al. (2013) encontraram pH no valor de 5,81 para café conilon processado por via natural, que corrobora com os valores encontrados no presente estudo.

Não houve interação significativa entre os fatores altitude e levedura para as variáveis condutividade elétrica e lixiviação de potássio, porém foi possível perceber que houve diferença significativa entre altitudes. Os cafés de maiores altitudes (600 m) apresentaram menores valores de condutividade elétrica e lixiviação de potássio.

A condutividade elétrica e a lixiviação de potássio de uma amostra de café estão diretamente relacionadas com a qualidade da bebida, já que estas análises avaliam a qualidade dos grãos baseando-se na perda de integridade das membranas. Considera-se que qualquer fator que altere a estrutura da membrana do grão, como ataque de insetos, quebra ou deterioração por microrganismos, provocam uma rápida degradação dos grãos de café, depreciando assim a qualidade da bebida (MALTA, et al., 2005).

Malta et al. (2005) encontraram valores de condutividade elétrica por volta de 227,58 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de amostra, e de lixiviação de potássio por volta de 50,35

ppm em grãos sadios de café arábica, valores muito acima dos encontrados no presente estudo.

4. Conclusão

A altitude de cultivo do café se mostrou um fator de impacto sobre a fermentação visto que a inoculação com as leveduras apresentou diferentes resultados em função desta. A interação entre estes fatores apresentou efeito sobre a acidez total titulável e os sólidos solúveis dos grãos.

O comportamento divergente das duas leveduras utilizadas sugere que o mesmo microrganismo se comporta de forma diferente de acordo com a matriz onde está inserido, ou seja, mesmo trabalhando-se com microrganismos isolados de café conilon os resultados podem não ser os mesmos quando aplicados em outras regiões, devido a mudanças, principalmente, na composição da mucilagem dos frutos cultivados em diferentes altitudes. Desta forma, é importante ressaltar a necessidade de mais estudos para avaliar a composição do fruto café e o efeito da inoculação de leveduras em diversas matrizes, além de seu efeito.

Referências bibliográficas

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15. ed. Washington, 1990.

BALZER, H. H. Acids in coffee. In: CLARKE, R. J.; VITZTHUM, O. G. (Ed.). **Coffee: recent developments**. London: Blackwell Science, 2001. cap. 1B, p. 18-32.

BORÉM, F.M., ISQUIERDO, E.P., ALVES, G.E., RIBEIRO, D.E., SIQUEIRA, V.C., TAVEIRA, J.H.S. Quality of natural coffee dried under different temperatures and drying rates. **Coffee Science**, Lavras, v. 13, n. 2, p. 159 - 167, 2018.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministerio da Agricultura Pecuaria e Abastecimento, Brasília, DF, 398 p, 2009.

BRESSANI, A. P. P. et al. Characteristics of fermented coffee inoculated with yeast starter cultures using different inoculation methods. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 92, n. October 2017, p. 212–219, 2018

CLARKE, R.J.; MACRAE, R. **Coffee**: volume 1: Chemistry. Elsevier science publishing: Nova Iorque, ed. 1, p.306. 1985.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Café, Safra 2018. **Monitoramento Agrícola**, v. 5, n. 4, p. 1-84, 2018.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Café, Safra 2019. **Monitoramento Agrícola**, v. 5, n. 1, p. 1-62, 2019.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

DONG, W., HU, R., CHU, Z., ZHAO, J., TAN, L. Effect of different drying techniques on bioactive components, fatty acid composition, and volatile profile of robusta coffee beans, **Food Chemistry**, v. 234, p. 121-130, 2017.

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**, v. 61, s.n., p. 183-195, 2014a.

EVANGELISTA, S. R., MIGUEL, M. G. C. P., SILVA, C. F., PINHEIRO, A. C. M., SCHWAN, R. F. Microbiological diversity associated with the spontaneous wetmethod of coffee fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 210, s.n., 102–112, 2015.

FERRÃO, R. G., FONSECA, A. F. A., FERRÃO, M. A. G., MUNER, L. H. **Café conilon**. Incaper: Vitória, ES, dd. 2, p.784, 2017.

FILHO, T. L., LUCIA, S. M. D., SARAIVA, S. H., LIMA, R. M. Características físico-químicas de bebidas de café tipo expresso preparadas a partir de blends de café arábica e conilon. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 62, n.4, p. 333-339, 2015.

HAMDOUCHE, Y. et al. Discrimination of post-harvest coffee processing methods by microbial ecology analyses. **Food Control**, [s. l.], v. 65, p. 112–120, 2016.

JUNIOR, M. P. B., POZZA, E. A., SOUZA, P. E., SILVA, M. L. O., POZZA, A. A. A., GUIMARÃES, R. J. Irrigação por gotejamento e manejo do fósforo no progresso da ferrugem do cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 12, n. 2, p. 187 - 196, 2017.

MALTA, M. R. et al., Condutividade elétrica e lixiviação de potássio do exsudato de grãos de café: alguns fatores que podem influenciar essas avaliações. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 5, p. 1015-1020, 2005.

NASCIMENTO, L. M., SPEHAR, C. R., SANDRI, D. Produtividade de cafeeiro orgânico no cerrado após a poda sob diferentes regimes hídricos. **Coffee Science**, v.9, n.3, p. 354- 365, 2014.

PEISINO, F. M., PEREIRA, L. L., CARDOSO, W. S., CATEN, C. S., COSTA, R. G., BUSATO, T., PIMENTA, L. H. B., BRIOSCHI, D., VENTURIN, B.

Caracterização e avaliação de pH, acidez titulável e extrato aquoso de cafés finos por estratos de altitude. In: **IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 2015.

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, n. 2, p. 235-247, 2013.

SILVA, C.F., 2014. Microbial activity during coffee fermentation. In: SCHWAN, R.F., FLEET, G.H. (Eds.), **Cocoa and Coffee Fermentation**. CRC Taylor & Francis, Boca Raton, FL, p. 398–423.

TEIXEIRA, A. F. R., SILVA, V. M., MENDONÇA, E. S. Fauna edáfica em sistemas arborizados de café conilon em solo de tabuleiros costeiros. **Coffee Science**, v.9, n.3, p.385-393, 2017.

VELMOUROUGANE, K. Impact of Natural Fermentation on Physicochemical, Microbiological and Cup Quality Characteristics of Arabica and Robusta Coffee. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, India, v. 83, n. 2, p. 233–239, 2013.

VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 1128–1135, 2010.

ZAIDAN, U. R. et al. Ambiente e variedades influenciam a qualidade de cafés das matas de minas. **Coffee Science**, Lavras, v. 12, n. 2, p. 240-247, 2017.

3. CONCLUSÃO GERAL

O estudo contribuiu para o melhor entendimento da ação de leveduras inoculadas em cafés de diferentes altitudes processados pela via natural. A altitude de cultivo se mostrou um fator de grande impacto sobre a fermentação, uma vez que a inoculação com as leveduras apresentou resultados diferentes em função desta.

A inoculação de *M. guilliermondii* pode contribuir para o controle da população de fungos durante o processo de secagem/fermentação do café natural. Do ponto de vista sensorial apesar de não ter sido observada mudança expressiva nas notas dos cafés de mesma altitude foi constatado maior intensidade de voláteis nas amostradas inoculadas com leveduras, especialmente nos cafés provenientes de baixas altitudes. Além disso, para o café de 600 m os consumidores foram capazes de perceber a diferença no café inoculado com *M. guilliermondii*. Dessa forma, a inoculação dessa levedura pode ser capaz de alterar o perfil sensorial do café mesmo que a nota não seja alterada.

A inoculação de leveduras e a altitude também tiveram influência no perfil de compostos voláteis, acidez total titulável e sólidos solúveis. Estes resultados sugerem que as leveduras se comportam de forma diferente em cafés provenientes de diferentes altitudes, como a altitude é um fator que influencia diretamente na composição da mucilagem, logo esta também influencia no desenvolvimento dos microrganismos.

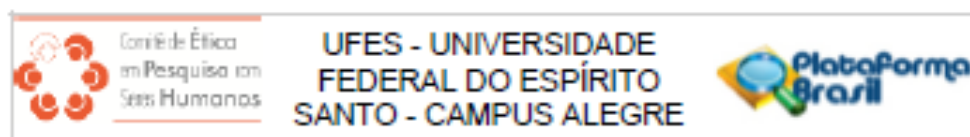
É preciso reforçar a necessidade de mais estudos para verificar a viabilidade da inoculação de leveduras em cafés de diferentes regiões, assim como testar o efeito da utilização de outras leveduras, ou até uma combinação destas, e de outros métodos de processamento do café, sobre a qualidade final do café.

APÊNDICES**APÊNDICE A – Ficha utilizada para o teste triangular**

Nome: _____ Data: ____/____/____
Você está recebendo três amostras codificadas, sendo duas iguais e uma diferente. Identifique com um círculo a amostra diferente

Comentários: _____

APÊNDICE B – Parecer do comitê de ética em pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CAFÉ CONILON (*Coffea canephora*) PROCESSADO POR VIA SECA COM UTILIZAÇÃO DE CULTURAS STARTERS

Pesquisador: Bruna Lessa da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 01319118.9.0000.8151

Instituição Proponente: COORDENAÇÃO ADMINISTRATIVA DO SUL DO ESPÍRITO SANTO - CASES -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.080.311

Apresentação do Projeto:

O estudo cita que alguns microrganismos são capazes de degradar compostos presentes nos frutos de café e produzir outros compostos durante o seu metabolismo e que a fermentação do café por microrganismos pode acarretar em melhorias ou depreciação da qualidade da bebida. Ainda, que a utilização de leveduras como culturas starters pode melhorar a qualidade sensorial, reduzir o tempo de processamento e inibir o crescimento de fungos micotoxigênicos, sem o aumento de custos. O trabalho tem por objetivo avaliar as características físico-químicas dos grãos de café processados com utilização de culturas starters de leveduras previamente isoladas, relacionando a fermentação por diferentes leveduras com a qualidade sensorial da bebida. Será realizado a pulverização do café com leveduras, o café será pilado, torrado e moído. As amostras serão extraídas por filtração em filtro de papel com água a aproximadamente 90°C e mantidas aquecidas em cafeteiras elétricas até o momento de serem servidas. Será utilizada uma proporção de 80 gramas de pó de café para produzir 1 litro da bebida. Serão servidos a cada provador 30 mL em copos plásticos. Será aplicado um teste triangular onde cada avaliador receberá três amostras codificadas. O avaliador será informado de que duas destas amostras são iguais e uma é diferente. Será solicitado que o avaliador prove as amostras da esquerda para a direita e identifique qual amostra difere das demais. Será aplicado um teste de aceitação de escala hedônica de 9 pontos situados entre "gostei extremamente" e "desgostei extremamente". As amostras codificadas com algarismos de três dígitos e aleatorizadas serão apresentadas ao provador para avaliar o quanto

Endereço: Alto Universitário, s/n, Guararema

Bairro: CENTRO

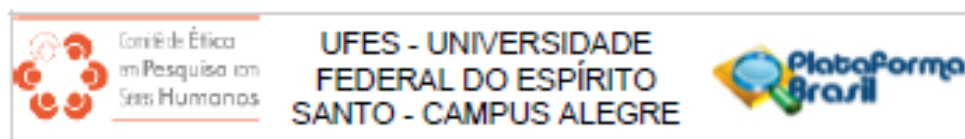
CEP: 29.500-000

UF: ES

Município: ALEGRE

Telefone: (28)3852-8771

E-mail: cep.alegre.ufes@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.080.311

gosta ou desgosta de cada uma delas através desta escala.

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com o pesquisador responsável, os objetivos da pesquisa são:

Processar café Conilon por Via seca, após inoculação de leveduras previamente selecionadas, avaliando-se o impacto dos microrganismos nas características sensoriais da bebida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Existe o risco de que os voluntários se sintam fadigados com o número de amostras que serão oferecidas. Para evitar este inconveniente será esclarecido a priori que os provedores podem abandonar o experimento a qualquer momento caso seja de sua vontade. Não será necessário que os voluntários que se apresentaram em um dia retornem, mas caso seja de interesse dos mesmo será permitida participação.

Benefícios:

O projeto pode trazer benefícios como inserir no mercado um café de melhor qualidade, sem que haja um aumento substancial nos custos, beneficiando diretamente os consumidores da bebida. Além disso, pode ser possível uma maior padronização da qualidade do café, o que aumenta a confiança do consumidor no ato da compra.

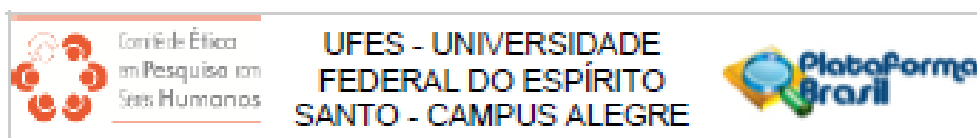
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador atendeu às pendências do CEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Folha de rosto: apresentada e adequada.
- Projeto detalhado: apresentado e adequado.
- TCLE: apresentado e adequado.
- Termo de anuência da instituição onde a pesquisa será realizada: não se aplica.
- Cronograma: apresentado e adequado.
- Orçamento: apresentado e adequado*

Endereço: Alto Universitário, s/n, Guanema	CEP: 29.500-000
Bairro: CENTRO	
UF: ES	Município: ALEGRE
Telefone: (28)3552-8771	E-mail: cep.alegre.ufes@gmail.com



Continuação do Parecer 3.080/2011

Recomendações:

Recomenda-se a aprovação deste protocolo por este comitê de ética, uma vez que foram atendidas todas as pendências listadas anteriormente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências listadas foram atendidas em sua totalidade.

Considerações Finais a critério do CEP:

1. O CEP/Alegre/UFES deverá ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo.
2. Caso a pesquisa seja suspensa ou encerrada antes do previsto, o CEP/Alegre/UFES deverá ser comunicado, estando os motivos expressos no relatório final a ser apresentado.
3. O TCLE deverá ser obtido em duas vias, uma ficará com o pesquisador e a outra com o sujeito de pesquisa.
4. Em conformidade com a Carta Circular nº.003/2011-GONEP/CNS, faz-se obrigatório a rubrica em todas as páginas do TCLE pelos participantes de pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador.
5. Em muitos estudos, para que os benefícios aos participantes sejam efetivos, posteriormente à realização da pesquisa, é de grande importância o pesquisador retornar à instituição onde foi realizada a pesquisa e apresentar os resultados e conclusões.*

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PE_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1233144.pdf	05/12/2018 20:08:03		Aceito
Outros	cartarespostaauspências.pdf	05/12/2018 16:31:10	Bruna Lessa da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	escalahedonicamodificada.pdf	05/12/2018 16:29:42	Bruna Lessa da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	trinagulamodificado.pdf	05/12/2018 16:29:18	Bruna Lessa da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	brochuramodificada.pdf	05/12/2018 16:29:05	Bruna Lessa da Silva	Aceito

Endereço: Alto Universitário, s/n, Guaraniema

Bairro: CENTRO

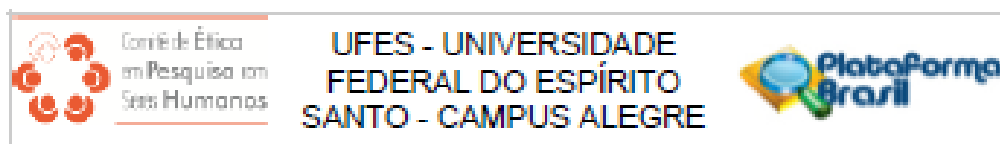
CEP: 29.500-000

UF: ES

Município: ALEGRE

Telefone: (27)3652-8771

E-mail: cep.alegre.ufes@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.080.311

Folha de Rosto	folhaderosto1.pdf	17/10/2018 22:09:09	Bruna Lessa da Silva	Aceito
----------------	-------------------	------------------------	----------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

ALEGRE, 13 de Dezembro de 2018

Assinado por:
JUSSARA MOREIRA COELHO
 (Coordenador(a))

Endereço: Alto Universitário, s/n, Guaraniá	
Bairro: CENTRO	CEP: 29.500-000
UF: ES	Município: ALEGRE
Telefone: (28)3852-9771	E-mail: cep.alegre.ufes@gmail.com

APÊNDICE C - Resumo da Análise de Variância (ANOVA) para contagem de bactérias totais, bactérias lácticas, leveduras e fungos.

Variável	F.V.	G.L.	Valor p
Bactérias totais	Altitude	1	0,248 ^{n.s.}
	Levedura	2	0,169 ^{n.s.}
	Interação (AxL)	2	0,434 ^{n.s.}
	Tempo	4	0,000*
	Interação (AxT)	4	0,000*
	Interação (LxT)	8	0,078 ^{n.s.}
	Interação (AxLxT)	8	0,186 ^{n.s.}
Bactérias lácticas	Altitude	1	0,054 ^{n.s.}
	Levedura	2	0,004*
	Interação (AxL)	2	0,012*
	Tempo	4	0,418 ^{n.s.}
	Interação (AxT)	4	0,000*
	Interação (LxT)	8	0,393 ^{n.s.}
	Interação (AxLxT)	8	0,021*
Leveduras	Altitude	1	0,238 ^{n.s.}
	Levedura	2	0,305 ^{n.s.}
	Interação (AxL)	2	0,888 ^{n.s.}
	Tempo	4	<0,01*
	Interação (AxT)	4	<0,01*
	Interação (LxT)	8	0,073 ^{n.s.}
	Interação (AxLxT)	8	0,265 ^{n.s.}
Fungos	Altitude	1	0,465 ^{n.s.}
	Levedura	2	0,019*
	Interação (AxL)	2	0,010*
	Tempo	4	0,057 ^{n.s.}
	Interação (AxT)	4	0,049*
	Interação (LxT)	8	0,001*
	Interação (AxLxT)	8	0,014*

* Efeito significativo ($p < 0,05$) pelo teste F, n.s. Efeito não significativo ($p > 0,05$) pelo teste F.

APÊNDICE D – Compostos voláteis

Composto voláteis	FR	Percepção sensorial	Referências	Amostras					
				T1 300	T2 300	T3 300	T1 600	T2 600	T3 600
2-Metilpirazina	811,8	Noz	CAPORASO et al., 2018	5,43%	5,67%	4,99%	5,24%	4,84%	5,07%
Furfural	829	Doce, amadeirado, amêndoa	CAPORASO et al., 2018	8,61%	7,75%	7,02%	10,61%	10,31%	10,77%
Álcool furfurílico	856	Caramelo, queimado, fumaça	CAPORASO et al., 2018	11,82%	11,68%	9,29%	12,11%	12,4%	11,08%
Acetoxiacetona	867	Frutado, amanteigado, lático	CAPORASO et al., 2018	1,4%	1,68%	1,55%	2,10%	2,1%	1,97%
2,5-Dimetilpirazina	903	Noz, torrado, grama	CAPORASO et al., 2018	2,69%	2,72%	2,64%	2,40%	2,48%	2,34%
2,6-Dimetilpirazina	904	Chocolate, cacau, nozes torradas	CAPORASO et al., 2018	4,35%	4,14%	4,02%	4,43%	4,3%	4,37%
2-Etilpirazina	899	Noz, amendoim, manteiga	CAPORASO et al., 2018	2,41%	2,41%	2,28%	2,25%	2,23%	2,16%
2,3-Dimetilpirazina	908	Cru, noz, pimenta verde	CAPORASO et al., 2018	0,92%	1,01%	0,99%	0,90%	0,88%	0,86%
5-Metilfurfural	955	Especiarias, caramelo, carvalho	CAPORASO et al., 2018	5,79%	5,18%	4,78%	7,16%	7,11%	7,34%
2-Etil-6-Metilpirazina	993	Floral, frutado, avelã	CAPORASO et al., 2018	2,54%	1,88%	2,03%	2,36%	3,32%	3,12%
2-Etil-5-Metilpirazina	990	Café	CAPORASO et al., 2018	2,01%	1,86%	2,1%	1,54%	1,67%	1,61%
2,3,5-Trimetilpirazina	992	Nozes	-	1,41%	1,35%	1,36%	1,17%	1,25%	1,17%
2-Etil-3-Metilpirazina	990	Noz, amendoim	CAPORASO et al., 2018	2,19%	2,04%	2,2%	1,94%	2,08%	1,91%
2-Metil-5-Vinilpirazina	1005		-	0,78%	1,14%	0,76%	1,4%	0,74%	1,25%
2-Acetilpirrol	1064	Noz, pão, mofo	NASCIMENTO et al., 2007	0,99%	1,18%	0,83%	1,3%	-	1,21%
3-Etil-2,5-Dimetilpirazina	1071	Terroso, torrado	CAPORASO et al., 2018	4,15%	3,64%	4,1%	2,99%	3,52%	3,2%
2-Etil-3,5-Dimetilpirazina	1072	Terroso, torrado	CAPORASO et al., 2018	1,92%	1,78%	2,01%	1,72%	2%	2,08%
5-Etil-2,3-Dimetilpirazina	1069		-	0,81%	0,5%	0,93%	-	0,73%	0,2%
Guaiacol	1080	Fenólico, queimado, fumaça	CAPORASO et al., 2018	1,62%	1,55%	1,67%	1,66%	1,68%	1,48%
2-Acetil-3-Metilpirazina	1112	Matéria torrada, noz, vegetal, caramelo	NASCIMENTO et al., 2007	2,78%	2,79%	0,92%	2,5%	2,57%	2,12%
3,5-Dietil-2-Metilpirazina	1152	Noz, carne assada, vegetais, matéria torrada	NASCIMENTO et al., 2007	1,61%	1,23%	1,53%	1,24%	1,25%	1,31%
1-Furfurilpirrol	1163		-	1,23%	1,15%	1,34%	1,2%	1,48%	1,18%
4- Vinilguaiacol	1300	Alho	CAPORASO et al., 2018	16,35%	14,02%	10,84%	14,37%	11,52%	13,15%

4- Etilguaiacol	1269	Picante, fenólico, doce	CAPORASO et al., 2018	1,58%	1,68%	1,36%	1,59%	1,25%	0,83%
-----------------	------	-------------------------	-----------------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

FR: Fator de retenção

APÊNDICE E – Resumo da Análise de Variância (ANOVA) para os resultados de ácidos orgânicos e açúcares.

Variável	F.V.	G.L.	Valor p
Ácido oxálico	Altitude	1	0,00*
	Levedura	2	0,51 ^{ns}
	Interação (AxL)	2	0,13 ^{ns}
	Tempo	4	0,02*
	Interação (AxT)	4	0,00*
	Interação (LxT)	8	0,46 ^{ns}
	Interação (AxLxT)	8	0,82 ^{ns}
Ácido málico	Altitude	1	0,03*
	Levedura	2	0,94 ^{ns}
	Interação (AxL)	2	0,85 ^{ns}
	Tempo	4	0,00*
	Interação (AxT)	4	0,00*
	Interação (LxT)	8	0,93 ^{ns}
	Interação (AxLxT)	8	0,90 ^{ns}
Ácido acético	Altitude	1	0,00*
	Levedura	2	0,79 ^{ns}
	Interação (AxL)	2	0,86 ^{ns}
	Tempo	4	0,00*
	Interação (AxT)	4	0,00*
	Interação (LxT)	8	0,89 ^{ns}
	Interação (AxLxT)	8	0,90 ^{ns}
Ácido láctico	Altitude	1	0,00*
	Levedura	2	0,60 ^{ns}
	Interação (AxL)	2	0,54 ^{ns}
	Tempo	4	0,00*
	Interação (AxT)	4	0,00*
	Interação (LxT)	8	0,30 ^{ns}
	Interação (AxLxT)	8	0,40 ^{ns}
Ácido propiônico	Altitude	1	0,00*
	Levedura	2	0,13 ^{ns}
	Interação (AxL)	2	0,01*
	Tempo	4	0,00*
	Interação (AxT)	4	0,00*
	Interação (LxT)	8	0,03*
	Interação (AxLxT)	8	0,18 ^{ns}
Glicose	Altitude	1	0,35 ^{ns}
	Levedura	2	0,47 ^{ns}
	Interação (AxL)	2	0,26 ^{ns}
	Tempo	4	0,47 ^{ns}
	Interação (AxT)	4	0,10 ^{ns}
	Interação (LxT)	8	0,35 ^{ns}
	Interação (AxLxT)	8	0,44 ^{ns}

Frutose	Altitude	1	0,96 ^{ns}
	Levedura	2	0,34 ^{ns}
	Interação (AxL)	2	0,56 ^{ns}
	Tempo	4	0,00*
	Interação (AxT)	4	0,00*
	Interação (LxT)	8	0,00*
	Interação (AxLxT)	8	0,01*
Sacarose	Altitude	1	0,08 ^{ns}
	Levedura	2	0,68 ^{ns}
	Interação (AxL)	2	0,43 ^{ns}
	Tempo	4	0,00*
	Interação (AxT)	4	0,00*
	Interação (LxT)	8	0,51 ^{ns}
	Interação (AxLxT)	8	0,72*

* Efeito significativo ($p < 0,05$) pelo teste F, n.s. Efeito não significativo ($p > 0,05$) pelo teste F.

APÊNDICE F – Resumo da Análise de Variância (ANOVA) para o resultados de pH, acidez titulável total, sólidos solúveis, condutividade elétrica e lixiviação de potássio dos grãos crus.

Variável	F.V.	G.L.	Valor p
pH	Altitude	1	1,000 ^{n.s.}
	Levedura	2	0,116 ^{n.s.}
	Interação	2	0,353 ^{n.s.}
Acidez titulável total	Altitude	1	0,031*
	Levedura	2	0,005*
	Interação	2	0,004*
Sólidos solúveis	Altitude	1	0,003*
	Levedura	2	0,001*
	Interação	2	0,024*
Condutividade elétrica	Altitude	1	0,037*
	Levedura	2	1,000 ^{n.s.}
	Interação	2	1,000 ^{n.s.}
Lixiviação de potássio	Altitude	1	0,033*
	Levedura	2	1,000 ^{n.s.}
	Interação	2	1,000 ^{n.s.}

* Efeito significativo ($p < 0,05$) pelo teste F, n.s. Efeito não significativo ($p > 0,05$) pelo teste F.