



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

**DANIELLE GONÇALVES BRAVIM**

**INOCULAÇÃO DE LEVEDURA E BACTÉRIA EM CAFÉ CONILON (*COFFEA  
CANEPHORA*) PROCESSADO POR VIA ÚMIDA**

ALEGRE – ES  
SETEMBRO DE 2021

DANIELLE GONÇALVES BRAVIM

**INOCULAÇÃO DE LEVEDURA E BACTÉRIA EM CAFÉ CONILON (*COFFEA  
CANEPHORA*) PROCESSADO POR VIA ÚMIDA**

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.

Orientador (a): Dra. Patrícia Campos Bernardes  
Coorientador (a): Dra. Jussara Moreira Coelho  
Coorientador (a): Dra. Rosane Freitas Schwan

ALEGRE – ES  
SETEMBRO DE 2021

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

---

B826i Bravim, Danielle Gonçalves, 1996-  
Inoculação de levedura e bactéria em café conilon (*Coffea canephora*) processado por via úmida / Danielle Gonçalves Bravim. - 2021.  
54 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.

1. Café conilon. 2. Fermentação. I. Bernardes, Patrícia Campos. II. Coelho, Jussara Moreira. III. Schwan, Rosane Freitas. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 664

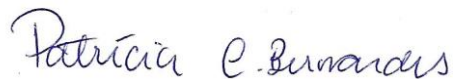
---

**DANIELLE GONÇALVES BRAVIM**

**“ INOCULAÇÃO DE LEVEDURA E BACTÉRIA EM CAFÉ CONILON (COFFEA  
CANEPHORA) PROCESSADO POR VIA ÚMIDA ”**

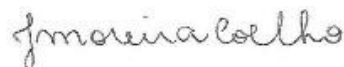
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 23 de setembro de 2021.



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Campos Bernardes  
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES  
Orientadora



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jussara Moreira Coelho  
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES  
Examinadora Interna



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosane Freitas Schwan  
Universidade Federal de Lavras-UFLA  
Examinadora Externa

ALEGRE – ES  
SETEMBRO DE 2021

*Aos meus pais e minha família, motivos de todo esforço e dedicação.*

*Amo vocês.*

*Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela saúde, sabedoria, paciência e resiliência que me permitiram realizar este sonho.

À minha orientadora Profa. Patrícia Bernardes por tanto ensinamento, oportunidade, compreensão, paciência e exemplo ao longo desses 6 anos de parceria.

À minha co-orientadora Profa. Jussara Coelho por tanta dedicação, compreensão e ensinamentos transmitidos.

À professora Dra. Rosane Schwan pela coorientação, contribuições e parceria ao longo do trabalho.

À Carol e ao Denes pela ajuda na realização das análises e parceria que permitiram a realização do experimento.

Ao produtor de café Silvaninho, por fornecer o café para o experimento.

Aos meus pais e irmãos, pelo incentivo, amor incondicional e apoio ao longo de toda minha trajetória.

À toda minha família, base de tudo que sou.

Aos meus amigos de vida e vida acadêmica José Helber, Ualisson e Matheus pela amizade, força e companheirismo.

As minhas amigas de vida Isabella e Karla, por todo amor e apoio que não me deixaram desistir.

À Universidade Federal do Espírito Santo, colegas e funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Universidade Federal de Lavras, Nádía e Ana Paula pela parceria nas análises.

À FAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	13
2.1. Objetivo geral .....	13
2.2. Objetivos específicos .....	13
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
3.1. Aspectos gerais, origem e importância econômica do café .....	14
3.2. Fatores que influenciam a qualidade do café .....	15
3.3. Processamento pós colheita e fermentação do café .....	16
3.4. Fermentação induzida no processamento de café .....	18
3.5. Produção de compostos voláteis .....	21
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
4.1. Café .....	22
4.2. Microrganismos usados na fermentação .....	22
4.3. Preparo do inóculo .....	22
4.4. Fermentação, processamento e amostragem .....	23
4.5. Quantificação de bactérias mesófilas, bactérias lácticas, fungos filamentosos e leveduras ao longo da fermentação .....	24
4.6. Análise de ácidos orgânicos, açúcares e álcoois por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) .....	25
4.7. Análise de compostos voláteis .....	25
4.8. Análise sensorial .....	26
<b>5. RESULTADOS</b> .....	28
5.1. Variação do pH durante a fermentação .....	28
5.2. Quantificação de bactérias mesófilas, bactérias lácticas, fungos filamentosos e leveduras ao longo da fermentação .....	28
5.3. Ácidos e Açúcares .....	30
5.4. Compostos Voláteis .....	32
5.5. Análise Sensorial .....	35
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	42
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	43

## RESUMO

BRAVIM, Danielle Gonçalves. **INOCULAÇÃO DE LEVEDURA E BACTÉRIA EM CAFÉ CONILON (*COFFEA CANEPHORA*) PROCESSADO POR VIA ÚMIDA**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Orientador: Dra. Patrícia Campos Bernardes. Coorientador(es): Dra. Jussara Moreira Coelho e Dra. Rosane Freitas Schwan.

O estado do Espírito Santo é o maior produtor nacional de café conilon. A busca dos consumidores por cafés com perfis diferenciados tem impulsionado pesquisas que visem agregar valor a bebida. A fermentação induzida pode favorecer atributos sensoriais positivos valorizando o café, porém os estudos envolvendo *Coffea canephora* ainda são escassos. O presente estudo objetivou avaliar o impacto da inoculação de uma levedura (*Meyerozyma guilliermondii*), uma bactéria (*Bacillus licheniformis*) e as duas espécies em co-cultura em café conilon processado por via úmida, quantificando os grupos microbianos, ácidos, açúcares e compostos voláteis em diferentes tempos de fermentação, bem como, os efeitos causados por esses compostos na qualidade da bebida. Para isso, quatro tratamentos foram conduzidos por via úmida e inoculados com *Bacillus licheniformis* (CCMA 1673), *Meyerozyma guilliermondii* (CCMA 1740) e as duas espécies em co-cultura. A fermentação foi conduzida por 48 horas em baldes de polietileno. Posteriormente, os cafés foram secos em terreiros suspensos sob exposição solar até que atingissem teor de água 11% b.u. Amostras foram coletadas ao longo da fermentação nos tempos de 0, 24, e 48 horas para enumeração de bactérias mesófilas, bactérias lácticas, leveduras e fungos filamentosos. Os ácidos orgânicos e açúcares (HPLC) foram identificados e quantificados ao longo da fermentação e os compostos voláteis (CG-MS) foram analisados antes e após a torra. Prova da xícara com provadores certificados foi realizada seguindo o protocolo de degustação de robustas finos. A inoculação de MG e BL estimulou a multiplicação de bactérias lácticas, diferindo dos tratamento CON e MB, no final da fermentação. Os ácidos acético, cítrico, láctico, oxálico, málico, succínico e tartárico foram identificados em todos os tratamentos em diferentes concentrações. A concentração de ácido acético foi maior para o tratamento BL nos



tempos 24h e 48h diferindo dos demais tratamentos. A concentração média de frutose variou entre 4,0 e 10,9 mg/g entre as amostras e de glicose entre 0,2 e 2,7 mg/g. Houve redução desses açúcares durante a fermentação, exceto para MB. 2-Heptanol, 2-Nonanol, heptanona e salicilato de metila foram encontrados durante a fermentação. Metilpirazina, 2,6-dimetilpirazina, 2,5-dimetilpirazina, 3-etil-2,5-dimetilpirazina identificados após a torra atribuíram às bebidas notas de “amêndoa” e “chocolate” identificado pelos provadores na prova da xícara. Todos os tratamentos foram classificados como “prêmio” sendo a maior pontuação atribuída ao tratamento BL. *Bacillus licheniformis* obteve melhor desempenho na fermentação, levando a um aumento da nota do café e a produção de compostos voláteis que agregam notas sensoriais positivas a bebida. Dessa forma, o uso dessa bactéria é benéfica na fermentação via úmida de café conilon.

**Palavra-chave:** Fermentação, co-inoculação, café conilon.

## Abstract

The state of Espírito Santo is the largest national producer of conilon coffee. Consumers' search for coffees with different profiles has driven research aimed adding value to the drink. Induced fermentation can favor positive sensory attributes, valuing coffee, but studies involving *Coffea canephora* are still scarce. This study aimed to evaluate the impact of inoculation of a yeast (*Meyerozyma guilliermondii*), a bacteria (*Bacillus licheniformis*) and the two species in co-culture in wet processed conilon coffee, quantifying the microbial groups, acids, sugars and volatile compounds at different times of fermentation, as well as the effects caused by these compounds on the quality of the beverage. For this, four treatments were carried out and inoculated with *Bacillus licheniformis* (CCMA 1673), *Meyerozyma guilliermondii* (CCMA 1740) and the two species in co-culture. Wet fermentation was carried out for 48 hours in polyethylene buckets. Subsequently, the coffees were dried on terraces suspended under sun exposure until they reached a water content of 11% b.u. Samples were collected throughout the fermentation period at 0, 24, and 48 hours for enumeration of mesophilic bacteria, lactic acid bacteria, yeasts and filamentous fungi. Organic acids and sugars (HPLC) were identified and quantified throughout fermentation and volatile compounds (GC-MS) were analyzed before and after roasting. Cup tasting with certified tasters was carried out following the fine robusta tasting protocol. The inoculation of MG and BL stimulated the multiplication of lactic acid bacteria, differing from the CON and MB treatments, at the end of fermentation. Acetic, citric, lactic, oxalic, malic, succinic and tartaric acids were identified in all treatments at different concentrations. The acetic acid concentration was higher for the BL treatment at 24h and 48h times, differing from the other treatments. The mean concentration of fructose ranged between 4.0 and 10.9 mg/g between samples and glucose between 0.2 and 2.7 mg/g. There was a reduction in these sugars during fermentation, except for MB. 2-Heptanol, 2-Nonanol, heptanone and methyl salicylate were found during fermentation and can impart woody, fruity and nutty aromas to beverage. Methylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine identified after roasting give to the drinks "almond" and "chocolate" notes identified by the tasters in the cupping. All treatments were classified as "Premium" with the highest score given to the BL treatment. *Bacillus licheniformis* performed better under the wet fermentation, leading to an increase in the coffee score

and the production of volatile compounds that add positive sensory notes to the beverage. Thus, the use of this bacteria is beneficial in the wet fermentation of conilon coffee.

**Keywords:** Fermentation, co-inoculation, conilon coffee.

## 1. INTRODUÇÃO

O café é pertencente à família Rubiaceae, gênero *Coffea* e possui 124 espécies diferentes identificadas (Davis et al., 2011, 2006). A espécie *Coffea canephora* (*C. canephora*) possui dois materiais genéticos distintos, conhecidos mundialmente como robusta e conilon. Esta espécie é caracterizada por apresentar porte arbustivo e caule lenhoso, ser mais resistente às condições adversas e conter maiores concentrações de cafeína e sólidos solúveis nos grãos. Cafés robustas e conilon apresentam características genéticas, físico-químicas e agrônômicas que os diferenciam, além disso, cafés 'Robusta' são cultivados majoritariamente na Ásia e África, enquanto o 'Conilon' apresenta cultivo predominantemente no Brasil (Ferrão et al., 2017).

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café. Em 2020, o país apresentou produção de 14310,81 mil de sacas (60 kg) de café conilon beneficiadas, sendo o estado do Espírito Santo responsável por 65% desta produção, classificando-se como o maior produtor nacional de café conilon (CONAB, 2020).

Nos últimos anos, o mercado de café encontra-se em ascensão em relação ao consumo e a procura por cafés com qualidade superior. Observa-se um crescimento significativo em relação às pesquisas e inovações no processamento pós colheita do café e a busca por especialização dos estabelecimentos em produzir bebidas de qualidade. O uso de culturas iniciadoras selecionadas no processo fermentativo aumenta a qualidade dos cafés e possibilita a obtenção de diferentes perfis sensoriais, atendendo a demanda dos consumidores (Guimarães et al., 2019; Ufer et al., 2019).

A fermentação acontece naturalmente em todos os cafés. Isso ocorre uma vez que os frutos são ambientes propícios servindo como substrato para o desenvolvimento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, suprindo-os de fontes de carbono e nitrogênio. Estes grupos microbianos podem estar naturalmente presentes no fruto como identificados e isolados em diversos estudos (De Melo Pereira et al., 2014; Pereira et al., 2021; Silva et al., 2000). O processo de fermentação pode ser natural ou induzido e é conduzido para que haja completa degradação da polpa e remoção da mucilagem.

A prática do processamento pós colheita utilizando fermentação induzida consiste em introduzir determinado microrganismo selecionado ao método de

processamento escolhido. O processo induzido proporciona redução do tempo de fermentação, dificulta o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, bem como, propicia agregação de valor ao café, a partir da produção de compostos benéficos que influenciam diretamente a qualidade da bebida. O objetivo da fermentação, natural ou induzida, quando benéfica é potencializar as características sensoriais do café, devido, entre outros fatores, a degradação da pectina, carboidratos e a produção de compostos voláteis e não voláteis (Bressani et al., 2020; da Silva Vale et al., 2019; Elhalis et al., 2021).

Estudos de Elhalis et. al. (2020), Ribeiro et. al. (2018) e De Melo Pereira et. al. (2015) têm demonstrado a eficiência do processamento via úmida no café arábica, bem como, Bressani et al. (2018; 2020), Da Mota et al. (2020); Evangelista et al. (2014; 2014), Martinez et al. (2017) e Ribeiro et al. (2017) evidenciam o papel das leveduras nos diferentes métodos de processamento pós colheita que contribuem positivamente na formação do perfil volátil e melhorias na qualidade da bebida. Entretanto, esses estudos foram conduzidos utilizando café arábica. Em café conilon, estudos que avaliaram o uso de microrganismos isolados do café na condução da fermentação são escassos. Silva et al. (2021) obtiveram bons resultados com a inoculação de *Meyerozima carribica* em café conilon, porém o café foi processado por via seca. Sendo assim, é extremamente relevante a condução de experimentos que utilizem este gênero de levedura e diferentes formas de processamento. Este estudo avaliou a inoculação da levedura *Meyerozyma guilliermondii* e da bactéria *Bacillus licheniformis* no café conilon processado por via úmida, ressalta-se que não há estudos na literatura utilizando estes microrganismos, tão pouco os dois associados em co-cultura no processo de fermentação de café conilon.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o impacto nas características microbiológicas, químicas e sensoriais da inoculação de microrganismos em café conilon processado por via úmida.

### **2.2. Objetivos específicos**

- I. Conduzir fermentação induzida, por inoculação de bactéria e/ou levedura, durante processamento por via úmida do café conilon.
- II. Quantificar bactérias mesófilas, bactérias lácticas, fungos filamentosos e leveduras durante a fermentação do café.
- III. Identificar e quantificar os ácidos orgânicos e açúcares formados ou degradados durante a fermentação do café.
- IV. Identificar e quantificar os compostos voláteis presentes nos grãos de café durante a fermentação e após a torra.
- V. Avaliar as características sensoriais das bebidas de cafés processados por via úmida com fermentação controlada utilizando bactéria e/ou levedura inoculadas.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Aspectos gerais, origem e importância econômica do café

*Coffea canephora* é originário de Guiné na Bacia do Congo e deriva de fecundação cruzada. As plantas dessa espécie apresentam característica rústica, tolerância a várias doenças e melhor desenvolvimento em condições de baixa altitude e temperaturas mais elevadas. O primeiro registro desta classificação botânica ocorreu por volta de 1895-1897, mais de 150 anos depois do *C. arabica*. Os primeiros cultivos de *C. canephora* ocorreram por volta de 1900 em Java, passando a ser cultivado posteriormente em outras regiões da África, Ásia e América Latina, chegando ao Brasil em 1912 (Ferrão et al., 2017).

A espécie *C. canephora* subdivide-se em dois materiais genéticos distintos, conhecidos mundialmente como robusta e conilon. O café conilon apresenta cultivo predominantemente no Brasil, enquanto o robusta, exceto pela produção em Rondônia, apresenta cultivo predominante na Ásia e África. Entre as características que diferenciam o café conilon do robusta, destaca-se crescimento mais arbustivo das plantas, com caules mais ramificados, folhas menores e alongadas, de coloração verde claro. Os frutos apresentam menor tamanho e menos mucilagem, no entanto, maior potencial de produção e de tolerância a seca e a ferrugem. As características de cultivo desta espécie relaciona-se a altitudes mais baixas (abaixo de 500 m), temperaturas mais elevadas (média entre 22 e 26°C) e escassez hídrica (inferior a 350 mm) (Ferrão et al., 2017).

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo maior consumidor da bebida no mundo. A produção estimada para o café conilon na safra de 2021 é da ordem de 15.442,2 mil sacas de café beneficiado. Apesar desta safra ser representada por uma bialidade negativa, a expectativa indica um aumento de 7,9% em relação ao resultado obtido em 2020, considerando que o café conilon é menos sensível à bialidade em relação ao café arábica. O Espírito Santo é estado dominante na produção de café conilon no Brasil, responsável por aproximadamente 67% da produção nacional (CONAB, 2021).

Em 2021 o Espírito Santo, recebeu a Indicação Geográfica (IG) na categoria de Indicação de Procedência para o café conilon. Ressalta-se a importância deste produto agrícola para o cenário econômico e social do estado, uma vez que o cultivo

é responsável pela geração da maior parte da renda e dos empregos do meio rural (INCAPER, 2021). O reconhecimento destes marcadores ao produto agrícola pode facilitar sua inserção e a aceitação no mercado (Ramos et al., 2012).

Por apresentar alto rendimento na etapa de extração, o café conilon é amplamente utilizado na elaboração de cafés solúveis e em misturas (*blends*) com o café arábica, participando em até 50% desta composição. Desta forma é reconhecido por apresentar alto valor industrial, conferindo corpo ao produto e equilíbrio da acidez da bebida, uma vez que, é caracterizado por apresentar maiores quantidades de sólidos solúveis e menor acidez quando comparado ao café arábica (ABIC, 2018).

### **3.2. Fatores que influenciam a qualidade do café**

O fruto de café é constituído de seis partes: exocarpo (casca), endocarpo (polpa), mesocarpo (mucilagem), pergaminho, película prateada e endosperma (semente). A composição química do café influencia diretamente a qualidade da bebida, principalmente em relação ao sabor e aroma. Esta composição complexa baseia-se em compostos voláteis e não voláteis, tais como ácidos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, aminoácidos, compostos fenólicos, ácidos graxos e enzimas e variam de acordo com a espécie e o estágio de maturação (Chin et al., 2015; Lee et al., 2015a).

Fatores que englobam as etapas de pré-colheita (espécie, variedade, grau de maturação dos frutos, efeitos da adubação, microrganismos) e pós-colheita (fermentação, secagem, torra, beneficiamento, armazenamento) influenciam diretamente a qualidade da bebida em relação ao sabor e aroma (Chalfoun and Fernandes, 2013; Livramento et al., 2017).

Ainda na planta, no decorrer da formação e maturação dos frutos ocorre o desenvolvimento dos precursores de aroma e sabor. A qualidade da bebida percorre as várias etapas do processamento do café, até que possa ser percebida na xícara (Sunarharum et al., 2014). A maturação dos frutos é relacionada diretamente com as variáveis determinantes de clima e altitude, responsáveis pelo desenvolvimento das características intrínsecas dos frutos, influenciadas principalmente pela temperatura, luz e disponibilidade de água (Bertrand et al., 2006). Os frutos verdes/imaturos e secos afetam negativamente a qualidade do café e o sabor da bebida, portanto, os



frutos devem ser colhidos preferencialmente no seu estágio maduro (cereja) a fim de se obter, após processamento, uma bebida de boa qualidade (Bazame et al., 2021; Miranda et al., 2020).

Alguns constituintes do grão cru como alcalóides, proteínas, trigonelina, açúcares, ácidos clorogênicos e lipídeos são fundamentais na formação de compostos voláteis durante a torrefação, sendo utilizados como precursores na reação de Maillard (Ribeiro et al., 2009). A reação de Maillard e outras reações termicamente catalisadas ocorridas no momento da torrefação, resultam nos compostos voláteis, que são desenvolvidos de acordo com o progresso da torra (Lee et al., 2015). Pirazinas, pirimidinas, compostos sulfurados, fenóis e furanos, são exemplos de compostos voláteis formados durante a reação de Maillard (Toci & Boldrin, 2017; Lee et al., 2015). Entre os compostos voláteis constituintes do grãos torrados e encontrados em maiores concentrações nos cafés robustas, destaca-se o grupo das pirazinas, seguido por aldeídos e ácidos (Caporaso et al., 2018). A qualidade da bebida está diretamente correlacionada com as variações nas concentrações desses compostos. A distinção de sabor e aroma da bebida correspondem às diferenças nos perfis voláteis encontrados após esta etapa de processamento.

Existem diferentes tipos de torra, determinadas pelo tempo e temperatura de torrefação. Essas variáveis são responsáveis pelos efeitos distintos nas propriedades físicas e texturais do grão de café torrado, bem como, cor, sabor e aroma do café. Sendo assim, a torra do café é um ponto crítico e determinante na qualidade final da bebida (Anisa et al., 2017; Worku et al., 2018).

### **3.3. Processamento pós colheita e fermentação do café**

O processamento do café pode ocorrer por vias distintas: via seca, por via-úmida obtendo-se os cafés descascado e desmucilado e por via semi-seca produzindo o café despulpado.

O processamento por via seca é amplamente utilizado para o processar café arábica no Brasil e muito empregado pelos produtores capixabas para processar café conilon. Também é muito difundido na Etiópia, Haiti, Indonésia e Paraguai (Ferrão et al., 2017; Silva et al., 2008). No processamento via seca os frutos são colhidos em diferentes estágios de maturação e devem, preferencialmente, passar pela etapa de seleção a fim de obter qualidade satisfatória. Normalmente, acontece sob efeito de luz

solar, espalhados em terreiros de cimento ou terreiros suspensos, e amontoados a noite para evitar reabsorção de umidade e revolvidos periodicamente durante o dia. Este processo envolve o fruto inteiro, ou seja, todas suas partes constituintes (Brando; Brando, 2014). O processamento por via seca, produz o “café natural” e exige menor controle durante a colheita e menores custos operacionais, já que consiste na secagem dos frutos inteiros, sem remoção prévia da casca e da mucilagem. Durante o período de secagem, pode ocorrer fermentação microbiana natural, que influencia na qualidade final do produto. Sabor mais doce, mais corpo e maior complexidade são características sensoriais dos cafés processados por esta via que os diferem dos processados por via úmida (Hameed et al., 2018; Selmar; Kleinwächter; Bytof, 2015).

O processamento por via semi-seca foi desenvolvido no Brasil e resulta no café conhecido como “cereja descascado”, caracterizado pela remoção da casca e polpa, podendo ou não ocorrer a remoção da mucilagem do pergaminho. Neste método os frutos são lavados e separados em frutos verdes e maduros, obtendo-se as cerejas, que são descascadas e levadas para a secagem (Brando and Brando, 2014). Neste caso, a fermentação acontece diretamente sob o pergaminho e durante a secagem, em terreiro e/ou secadores rotativos (Vilela et al., 2010).

No processamento por via úmida ocorre a retirada total da casca e mucilagem mecanicamente. Posteriormente ao processo mecânico, os grãos são conduzidos a tanques de fermentação com adição de água, para que ocorra a remoção completa da mucilagem que ficou aderida ao pergaminho (Haile and Kang, 2019). O tempo de fermentação varia de 6 a 72 horas, dependendo da temperatura ambiente (Brando; Brando, 2014). Este método envolve as etapas de lavagem, despulpamento, fermentação (degradação da mucilagem), lavagem, e secagem em terreiro e/ou secadores rotativos (Ferrão et al., 2017). Embora esteja em expansão para o café robusta, este processo é majoritariamente utilizado para o café arábica, aplicado amplamente na Colômbia, América Central e Havaí (Brando; Brando, 2015; Silva et al., 2008).

Controlando-se adequadamente os parâmetros do processo, o método por via úmida produz cafés com qualidade superior e maior preço de mercado quando comparados ao processamento por via seca, uma vez que, é capaz de preservar as qualidades intrínsecas dos grãos, bem como, diminuir o número de grãos defeituosos (Lee et al., 2015; Lin, 2010). Além disso, a composição química do café processado

por via-úmida e via seca, difere significativamente em relação a aminoácidos livres, ácidos orgânicos e carboidratos não estruturais (Joët et al., 2010). Esse tipo de processamento origina cafés com características mais suaves, com acidez agradável e aroma complexo, se comparados aos naturais (Selmar; Kleinwächter; Bytof, 2015). As vantagens do processamento por via úmida, além do fator qualidade, citado anteriormente, inclui a necessidade de menor área de terreiro, secador de menor dimensão e menor tempo de secagem. Essas vantagens estão baseadas no fato de que há a remoção da casca, aumentando a uniformidade dos grãos e à diminuição da quantidade de água a ser removida durante a etapa de secagem. A principal desvantagem dessa via é a necessidade de um sistema de disposição de água durante o processamento (Ferrão et al., 2017).

O processamento por via seca ainda é muito utilizado pelos produtores capixabas para processar café conilon. Entretanto, observa-se um aumento significativo do uso do processamento por via úmida para esta espécie, buscando agregar valor a bebida (Ferrão et al., 2017).

A etapa de secagem é feita até que se atinja um teor entre 10%-12% de umidade (Haile and Kang, 2019). A fim de manter a qualidade final e evitar alterações indesejáveis pós processamento, o café seco deve ser armazenado em locais com umidade e ventilação adequadas (Borém, 2008). Quando armazenados de forma correta, o café cru mantém sua qualidade por meses, sem alterações significativas do sabor (Belitz, Hans-Dieter; Grosch, Werner; Schieberle, 2009).

### **3.4. Fermentação induzida no processamento de café**

Durante todas as etapas de pré e pós-colheira o café está susceptível a ocorrência de processos fermentativos, tendo em vista que os microrganismos incluindo bactérias, fungos e leveduras estão presente naturalmente em todas as etapas que envolvem o processo produtivo. A fermentação dos grãos pode levar a alterações sensoriais que influenciam diretamente a qualidade final da bebida (Da Silva Vale et al., 2019; Martinez et al., 2019; Silva et al., 2000).

A etapa de fermentação conduzida no processamento por via úmida é realizada para eliminar qualquer mucilagem aderida ao grão, além de possibilitar melhorias no sabor da bebida pela produção de metabólitos secundários produzidos por microrganismos, que são precursores de compostos voláteis formados durante a

torrefação (De Melo Pereira et al., 2014; Mussatto et al., 2011). Ainda, de acordo com Haile e Kang (2019) os microrganismos atuam, além da degradação da mucilagem, na produção de enzimas, álcoois e ácidos durante o processo de fermentação. A mucilagem e a polpa possuem, entre outros componentes, açúcares fermentescíveis, polissacarídeos complexos, proteínas/aminoácidos livres, que servirão como substrato para o crescimento microbiano responsável pelo processo fermentativo. A presença da mucilagem no grão pode dificultar a etapa de secagem e possibilitar o desenvolvimento de fungos, que prejudicam a qualidade final da bebida. No processamento via úmida, a etapa de fermentação antecede a secagem e é responsável por torna-la mais fácil (Haile; Kang, 2019; Silva et al., 2013).

Diversos estudos (De Melo Pereira et al., 2014; Evangelista et al., 2015; Lee et al., 2017; Ribeiro et al., 2017; Elhalis et al., 2020) avaliaram como a fermentação afeta a qualidade do café durante seu processamento e quais características são produzidas ou alteradas, tendo em vista, a variedade de microrganismos e variáveis envolvidas nesta etapa. Durante a fermentação ocorre a degradação dos materiais de polpa e mucilagem, o consumo dos açúcares pelos microrganismos presentes na matriz fermentativa e a formação de metabólitos como álcoois, ácidos orgânicos e compostos voláteis correlacionados à contribuições positivas em relação a aspectos sensoriais de sabor e aroma. Por outro lado, se conduzida de maneira descontrolada, a fermentação poderá resultar em contribuições negativas, possibilitando a produção de micotoxinas ou metabólitos secundários que afetam a segurança e a qualidade da bebida (Batista et al., 2003; Silva et al., 2013).

Na seleção de culturas microbianas a serem utilizadas durante a fermentação como culturas iniciadoras, pode-se incluir testes sequenciais e bioquímicos, a fim de atender a critérios específicos e obter-se resultados positivos. De acordo com De Melo Pereira et al., (2020) os microrganismos devem ser avaliados em relação à condições de tolerância ao estresse e adaptação ao meio fermentativo, bem como, a produção de metabólitos desejáveis e a avaliação de parâmetros tecnológicos que se deseja atingir, tais como, cultivo em alta escala, utilização de substratos viáveis, entre outros. Ao final desta triagem, seleciona-se os genótipos que apresentarem maior propriedade funcional e tecnológica.

Entretanto, a fermentação apresenta como principal desafio, a dificuldade de controle do processo uma vez que, quando os grãos de café são fermentados

insuficientemente, estes podem conter mucilagem e açúcar residual, que dificultam o processo de secagem, além de serem potencialmente utilizados como substrato para o desenvolvimento de bactérias e fungos deteriorantes. O excesso do processo fermentativo pode resultar na produção de compostos indesejáveis, como os ácidos propiônico, butírico, acético e láctico prejudicando as características sensoriais da bebida (Haile and Kang, 2019; Silva et al., 2008).

Estudos utilizando leveduras para fermentar café, estão em ascensão devido às contribuições positivas de sabor e aroma na bebida (Bressani et al., 2018, 2020; Da Silva Vale et al., 2019; Elhalis et al., 2020; Evangelista et al., 2014; Martinez et al., 2017) e a inibição de fungos micotoxigênicos indesejáveis (Batista et al., 2003). Elhalis et al., (2020); De Melo Pereira et al., (2015) e De Melo Pereira et al., (2014) estudaram o efeito de diferentes leveduras na fermentação por via úmida em café arábica e observaram contribuições positivas no controle do processo fermentativo e na produção de bebidas de qualidade.

*M. guilliermondii* é uma levedura aeróbia, que não pode crescer sob as condições anaeróbicas estritas. Sua temperatura ótima de crescimento é de 30° C, podendo tolerar até 42°C. Este microrganismo apresenta amplas aplicações industriais, é responsável pela produção de diferentes enzimas, capaz de realizar a síntese de diferentes metabólitos (álcoois, aldeídos, hidrocarbonetos e terpenos) e está associada ao biocontrole pós-colheita (Yan et al., 2021). De maneira geral, bactérias do gênero *Bacillus* apresentam atividade pectinolítica (Silva et al., 2008). *B. licheniformis* possui temperatura ótima de crescimento entre 30 e 45°C e é uma bactéria facultativamente anaeróbia (De Almeida, 2014; De Sousa, 2008).

Estudos envolvendo co-inoculação de microrganismos ainda são escassos pra café arábica e inexistentes para café conilon. O potencial do uso combinado de leveduras e bactérias ou de diferentes leveduras em conjunto, pode melhorar a eficiência da fermentação e influenciar positivamente a composição química dos grãos de café, produzindo bebidas com características desejáveis (Bressani et al., 2021; da Silva Vale et al., 2019). Entretanto, ainda são necessários estudos que investiguem os mecanismos de sinergismo entre diferentes grupos ou diferentes culturas microbianas durante o processo de fermentação, bem como, como eles influenciam as propriedades sensoriais do café.

### 3.5. Produção de compostos voláteis

O café é mundialmente consumido e apreciado pelos consumidores por apresentar sabor e aroma agradáveis. Tais características derivam de sua composição físico-química, composta por constituintes químicos voláteis e não voláteis e por todas as variáveis presentes nas etapas de pré e pós colheita. Os principais atributos pré-colheita incluem a espécie utilizada, a variedade de café, o local do cultivo, a maturação dos frutos, a incidência de microrganismos e os efeitos das adubações. Já os fatores pós-colheita, incluem os processos de fermentação enzimáticas e microbianas, os processos de armazenamento do café beneficiado, a composição dos blends e o ponto de torra dos grãos (Chalfoun and Fernandes, 2013).

Os atributos voláteis e não voláteis relacionados a qualidade do café incluem ácidos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos e compostos fenólicos. De acordo com Lee et al. (2015) e Lee et al., (2016) culturas iniciadoras de leveduras têm sido utilizadas na fermentação de diferentes substratos de café com o propósito principal de modular os perfis voláteis e aromáticos das bebidas. Esses perfis voláteis e os compostos aromáticos produzidos estão diretamente relacionados com as notas sensoriais descritas pelos provados treinados na prova da xícara.

A partir da inoculação de leveduras previamente isoladas do café é possível aumentar a produção de compostos aromáticos voláteis após a torra e obter maiores pontuações sensoriais para aroma frutado, amanteigado e fermentado na prova da xícara. Além disso, as leveduras possuem capacidade de aumentar o controle e a padronização do processo fermentativo e conseqüentemente produzir bebidas de café com novos perfis sensoriais desejáveis (De Melo Pereira et al., 2014). De Melo Pereira e colaboradores (2015) identificaram que a inoculação de levedura em café arábica durante o processamento por via úmida do café aumentou a produção de compostos aromáticos (etanol, acetaldeído, acetato de etila e acetato de isoamil) e diminuiu a produção de ácido láctico durante o processo de fermentação.

Entre os compostos voláteis encontrados em maiores concentrações nos cafés robustas, destaca-se o grupo das pirazinas, incluindo 2-metil-pirazina, 2,6-dimetilpirazina, 2,5-dimetilpirazina, pirazina, etilpirazina, 2-etil-6-metilpirazina, 2-etil-5-metilpirazina e 3-etil-2,5-dimetilpirazina, seguido por aldeídos e ácidos (Caporaso et al., 2018).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Café

Café conilon da variedade Vitória cultivado a 430 metros de altitude na comunidade de Feliz Lembrança pertencente ao município de Alegre – ES (20°45'49"S - 41°31'57"W) foi utilizado para realização deste experimento. O café cereja foi selecionado manualmente e processado por via úmida.

### 4.2. Microrganismos usados na fermentação

Os microrganismos utilizados como culturas iniciadoras foram previamente isolados de café conilon por Pereira et al., (2021) e estão depositados na Coleção de Culturas de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras (CCMA/UFLA). Foram utilizadas a bactéria *Bacillus licheniformis* (CCMA 1673) e a levedura *Meyerozyma guilliermondii* (CCMA 1740) separadamente e em co-cultura (mistura das duas culturas). Quatro tratamentos distintos foram conduzidos da seguinte forma:

- I. Controle – fermentação espontânea sem inoculação de microrganismos (CON)
- II. Inoculação da levedura *Meyerozyma guilliermondii* (MG)
- III. Inoculação de bactéria *Bacillus licheniformis* (BL)
- IV. Inoculação de levedura e bactéria em co-cultura (MB)

A escolha destes microrganismos é justificada pela capacidade do *Bacillus licheniformis* produzir enzimas pectinolíticas (Rehman et al., 2015), auxiliando na degradação da estrutura do polímero de pectina do café, maximizando a disponibilidade de nutrientes ao meio fermentativo, o que possibilita um aumento na qualidade da fermentação. *Meyerozyma guilliermondii* apresenta diversas vantagens em processos biotecnológicos, entre elas, a produção de ácidos orgânicos e metabólitos desejáveis e adaptabilidade a diferentes substratos (Yan et al., 2020).

### 4.3. Preparo do inóculo

*M. guilliermondii* foi ativada em caldo YEPG, incubado à 28 °C, aumentando-se o volume até que a contagem atingisse aproximadamente  $10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup>. Em seguida, as células foram centrifugadas a 2000 g por 3 min e ressuspensas em 500 mL de água destilada para inoculação no café (Bressani et al., 2018; Evangelista et al., 2014). A

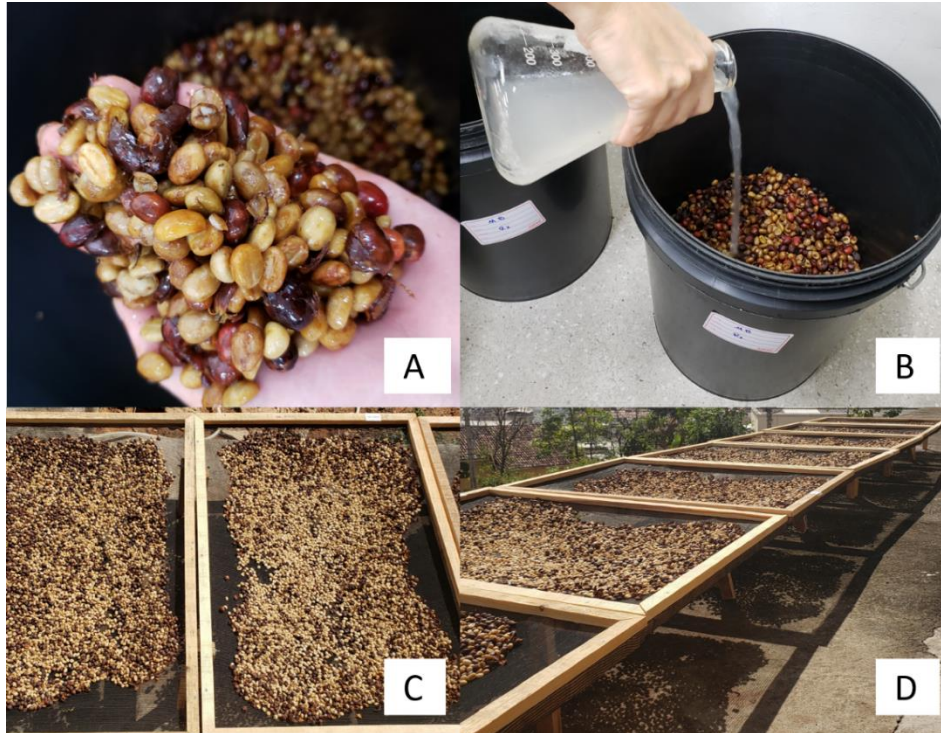
bactéria *B. licheniformis* foi ativada em volumes crescentes de caldo nutriente, incubado à 30 °C, até atingir aproximadamente  $10^9$  ufc.mL<sup>-1</sup>. Em seguida, as células foram centrifugadas a 2000 g por 3 min e ressuspensas em 500 mL de água destilada para inoculação no café (Ribeiro et al., 2020).

#### **4.4. Fermentação, processamento e amostragem**

Os frutos do café maduro passaram pelo processo de descascamento mecânico em descascador (Pinhalense, Brasil) (Figura 1A), seguidos de fermentação por 48 horas (Ribeiro et al., 2020). A fermentação ocorreu em recipientes de polipropileno (Figura 1B) com adição de três litros de água, o suficiente para cobrir toda a massa de grãos. Para acompanhar a fermentação, o pH da fração líquida foi medido nos tempos 0, 24 e 48h.

Cada unidade experimental foi composta por 5 kg de grãos de café cereja, sendo o processo fermentativo conduzido por 48 horas, após inoculação dos microrganismos previamente ativados. Após 48h, os cafés foram lavados e dispostos em terreiros suspensos em camadas de 5 a 8 cm de espessura (Figura 1C e 1D) para serem secos por exposição solar até atingir 11-12% de umidade base úmida (b.u). Os tratamentos foram conduzidos em triplicata, totalizando 12 unidades experimentais.





**Figura 1:** Etapas do processamento pós colheita do café. A) Grãos de café cereja descascados; B) Inoculação dos microrganismos; C) e D) Secagem em terreiros suspensos.

Amostras de 10 gramas (grãos + fração líquida) foram coletadas nos tempos 0, 24 e 48 horas para realização das análises químicas e microbiológicas. As análises microbiológicas foram realizadas logo após a coleta e as amostras para análise químicas foram armazenadas à  $-12^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.5. Quantificação de bactérias mesófilas, bactérias lácticas, fungos filamentosos e leveduras ao longo da fermentação**

A fim de se enumerar os microrganismos presentes durante a fermentação do café foram coletadas amostras contendo 10g de grão e fração líquida nos tempos 0, 24 e 48 horas. As alíquotas foram adicionadas em 90 mL de água peptonada 0,1% (m/v) esterilizada e homogeneizadas por dois minutos em Stomacher (ST-400 – STOMAX). As soluções obtidas foram então submetidas a diluições decimais.

Para quantificação de bactérias mesófilas, as alíquotas diluídas foram plaqueadas, em duplicata, em ágar padrão para contagem (PCA) (OXOID, Hampshire, Inglaterra). As placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}/24$  horas. Para bactérias lácticas utilizou-se ágar Man Rogosa and Sharpe (MRS) (KASVI, Paraná, Brasil), acrescido de 0,1% (v/v) de nistatina, incubando-se as placas a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas. O ágar

peptona dextrose extrato de levedura (YPD) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), acidificado até pH 3,5 com ácido tartárico 10% (v/v), foi utilizado para contagem de leveduras. As placas foram incubadas a 28 °C por 5 dias. Para contagem de fungos filamentosos ágar extrato de malte (MEA) (OXOID, Hampshire, Inglaterra) acrescido de 0,01% (m/v) de cloranfenicol foi utilizado, sendo as placas incubadas a 28 °C durante 7 dias (Evangelista et al., 2015; Vilela et al., 2010).

#### **4.6. Análise de ácidos orgânicos, açúcares e álcoois por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

Os ácidos orgânicos (málico, láctico, acético, butírico, propiônico, cítrico, oxálico, succínico e tartárico) foram analisados utilizando um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho. Amostras (3 g) de frutos de café foram misturadas com 5 mL de água Milli-Q durante 10 min e os fluidos foram centrifugados (10000 x g) duas vezes durante 10 min a 4 °C. Posteriormente foram microfiltradas utilizando filtro de acetato de celulose de 0,2 µm. Em seguida, 10 µL das soluções obtidas foram injetadas diretamente na coluna de cromatografia (Aminez HPX-87H) (300 cm x 7,8 mm), operando a 55 °C. A fase móvel utilizada consistiu em uma solução de ácido sulfúrico 5 mM a um coeficiente de vazão de 0,4 mL/min (Evangelista et al., 2014; Silva et al., 2013).

A determinação dos açúcares glicose, frutose e sacarose, bem como, manitol e glicerol foi realizada utilizando detector de índice de refração (RID) e os ácidos foram determinados com detector UV à 210 nm. Os ácidos e açúcares foram identificados por comparação com padrões de tempos de retenção. A quantificação dos compostos foi realizada utilizando curvas de calibração construídas com injeções de diferentes concentrações de compostos padrão, nas mesmas condições das amostras (Silva et al., 2013).

#### **4.7. Análise de compostos voláteis**

Para avaliação dos compostos voláteis produzidos durante a fermentação alíquotas da fração líquida e grãos (4 g) foram adicionadas em frascos hermeticamente fechados contendo 5 mL de NaCl a 5% (m/v) para diminuir a atividade de água da amostra e impedir que a coluna fosse saturada, seguidos de aquecimento durante 10 minutos a 60 °C (Evangelista et al., 2014; Da Silva Vale et al., 2019).

Para os grãos torrados, adicionou-se 3 g de café a frascos de 20 mL hermeticamente fechados. Estes frascos foram aquecidos por 10 minutos a 60 °C até atingir o *headspace* da amostra, para que as substâncias voláteis entrem em equilíbrio na fase gasosa. Através da inserção da fibra de SPME no topo do frasco (60 °C/30min) realizou-se a extração dos compostos voláteis. A dessorção foi efetuada colocando-se a fibra na porta de injeção do cromatógrafo, aquecido a 200 °C (Evangelista et al., 2014).

Um cromatógrafo gasoso (GC) acoplado a um espectrômetro de massa (MS), (QP-PLUS-2010, Shimadzu), foi utilizado para analisar os compostos voláteis presentes nos grãos de café crus e torrados. Para a programação, a temperatura do forno foi mantida a 40 °C durante 5 min, elevada para 125 °C em incrementos de 3 °C/min e posteriormente mantida a 190 °C durante 1 min. As temperaturas do injetor e do detector permaneceram entre 230 e 245 °C, por 3 min. Nitrogênio (N<sub>2</sub>) foi o gás de arraste utilizado, mantido a uma vazão de 1,2 mL/min. A identificação dos compostos voláteis foi feita por comparação do tempo de retenção dos mesmos com o banco de dados da Shimadzu, NIST 11 (Evangelista et al., 2014).

#### **4.8. Análise sensorial**

A prova de xícara foi realizada de acordo com o protocolo de degustação de Robustas Finos, por três provadores certificados, conforme metodologia da Organização Internacional do Café (ICO, 2010).

Em cumprimento ao protocolo, os grãos de café foram torrados dentro de um período de 24 horas antes da degustação, seguidos de descanso mínimo de 8 horas. O tempo de torra durou entre 9 e 14 minutos, até que os grãos adquirissem a cor média. Posteriormente, as amostras foram resfriadas até atingir temperatura ambiente (20 °C) e armazenadas corretamente em embalagens herméticas para a degustação. Para o preparo da infusão, utilizou-se 150 mL de água a 93 °C e 8,75 g de café moído em partículas ligeiramente mais espessas do que aquelas comumente usadas na preparação de filtro de papel, sendo que 70% a 75% delas passaram por uma peneira granulométrica de 20-mesh. Preparou-se cinco xícaras por amostra. Fragrância/aroma, sabor, gosto residual, salinidade/acidez, amargor/doçura, sensação na boca, equilíbrio, uniformidade, xícara limpa, impressão global e ausência de defeitos foram os atributos sensoriais avaliados. A pontuação do resultado final

deverá estar entre 0 a 100, sendo 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).

#### **4.9. Análise estatística**

Os dados coletados foram submetidos a análises de variância (ANOVA) e teste de Fisher à 10% usando o software Statistica® (Statsoft). Compostos voláteis foram analisados por PCA (análise de componentes principais) utilizando o software SensoMaker (Nunes e Pinheiro, 2012).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Variação do pH durante a fermentação

O pH é um dos parâmetros utilizados para acompanhar a evolução da fermentação via úmida, uma vez que, sua redução é causada pela atividade microbiana. Durante a fermentação do café, o valor do pH diminui devido à produção de ácidos orgânicos provenientes do metabolismo dos microrganismos. Houve decréscimo ( $p < 0,10$ ) nos valores de pH ao longo das 48 horas de fermentação em todos os tratamentos avaliados (Tabela 1).

**Tabela 1:** Valores de pH (média e desvio-padrão) ao longo da fermentação de café conilon por via úmida

Tratamentos	Tempo de fermentação		
	0 h	24 h	48 h
<b>CON</b>	5,45 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	4,73 ± 0,00 <sup>Ab</sup>	4,22 ± 0,03 <sup>ABc</sup>
<b>BL</b>	5,32 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	4,76 ± 0,21 <sup>Ab</sup>	4,28 ± 0,10 <sup>Bc</sup>
<b>MG</b>	5,37 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	4,46 ± 0,02 <sup>Bb</sup>	4,12 ± 0,02 <sup>Ac</sup>
<b>MB</b>	5,28 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	4,77 ± 0,03 <sup>Ab</sup>	4,30 ± 0,03 <sup>Bc</sup>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,10$ ) entre os tempos pelo teste de Fisher. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos, ao nível de 10% de significância pelo teste de Fisher. CON: tratamento controle; BL: Inoculação com *Bacillus licheniformis*; MG: Inoculação com *Meyerozyma guilliermondii*; MB: Inoculação em co-cultura.

No momento da inoculação (tempo 0) não houve diferença ( $p > 0,10$ ) no valores de pH entre os tratamentos conduzidos. Em 24 horas de fermentação, o tratamento MG apresentou menor pH (4,46) e diferiu dos demais. Após 48h de fermentação MG apresentou o menor valor de pH (4,12), diferindo de BL e MB, porém não diferiu do controle.

### 5.2. Quantificação de bactérias mesófilas, bactérias lácticas, fungos filamentosos e leveduras ao longo da fermentação

Foram observadas diferenças ( $p < 0,10$ ) apenas na contagem da população de bactérias lácticas entre os tratamentos (Tabela 2). Os tratamentos MG e BL, apresentaram maiores contagens de bactérias lácticas ao final da fermentação (7,7 e 7,8 log ufc/g, respectivamente) quando comparado aos tratamentos controle e MB (6,3 e 6,6 log ufc/g, respectivamente).

**Tabela 2:** Contagem (log ufc/g) de bactérias mesófilas, bactérias lácticas, fungos filamentosos e leveduras ao longo da fermentação via úmida

	Tempo (h)	Contagem (log UFC/g)			
		CON	BL	MG	MB
<b>Bactérias Mesófilas</b>	0	7,2 ± 0,43 <sup>aA</sup>	7,1 ± 0,15 <sup>aA</sup>	6,8 ± 0,24 <sup>aA</sup>	7,1 ± 0,53 <sup>aA</sup>
	24	8,0 ± 0,27 <sup>aA</sup>	7,8 ± 0,04 <sup>aB</sup>	7,4 ± 0,57 <sup>aA</sup>	7,7 ± 0,15 <sup>aA</sup>
	48	7,7 ± 0,13 <sup>aA</sup>	7,4 ± 0,45 <sup>aA</sup>	7,6 ± 0,17 <sup>aA</sup>	7,5 ± 0,33 <sup>aA</sup>
<b>Bactérias Lácticas</b>	0	5,8 ± 0,20 <sup>aA</sup>	5,8 ± 0,04 <sup>aA</sup>	6,3 ± 0,90 <sup>aA</sup>	6,2 ± 0,62 <sup>aA</sup>
	24	7,6 ± 0,24 <sup>aB</sup>	7,4 ± 0,16 <sup>aB</sup>	7,6 ± 0,15 <sup>aB</sup>	7,5 ± 0,10 <sup>aA</sup>
	48	6,3 ± 0,18 <sup>aC</sup>	7,8 ± 0,13 <sup>bC</sup>	7,7 ± 0,08 <sup>bB</sup>	6,6 ± 0,75 <sup>aA</sup>
<b>Leveduras</b>	0	5,5 ± 0,12 <sup>aA</sup>	5,5 ± 0,15 <sup>aA</sup>	5,7 ± 0,02 <sup>aA</sup>	5,3 ± 0,23 <sup>aA</sup>
	24	6,1 ± 0,55 <sup>aA</sup>	6,4 ± 0,43 <sup>aB</sup>	6,7 ± 0,70 <sup>aA</sup>	6,0 ± 0,11 <sup>aB</sup>
	48	6,8 ± 0,65 <sup>aB</sup>	6,7 ± 0,16 <sup>aB</sup>	6,2 ± 0,17 <sup>aA</sup>	6,1 ± 0,29 <sup>aB</sup>
<b>Fungos</b>	0	6,5 ± 0,15 <sup>aA</sup>	6,4 ± 0,19 <sup>aA</sup>	6,7 ± 0,87 <sup>aA</sup>	6,5 ± 0,65 <sup>aA</sup>
	24	5,6 ± 0,13 <sup>aB</sup>	5,8 ± 0,28 <sup>aB</sup>	5,7 ± 0,08 <sup>aA</sup>	5,8 ± 0,33 <sup>aA</sup>
	48	7,0 ± 0,61 <sup>aA</sup>	6,9 ± 0,31 <sup>aA</sup>	6,7 ± 0,19 <sup>aA</sup>	6,6 ± 0,04 <sup>aA</sup>

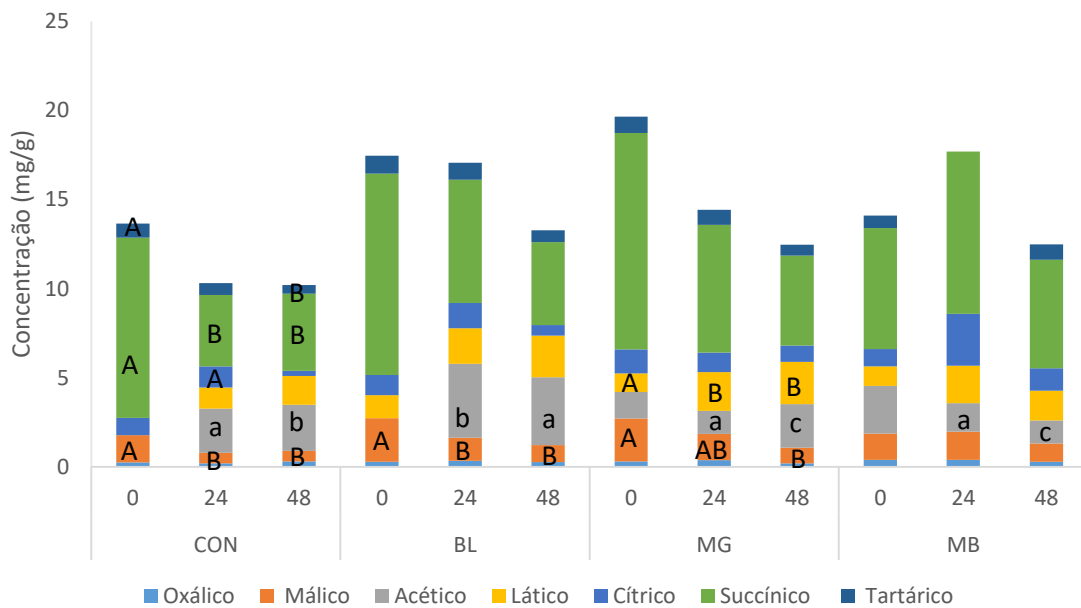
Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,10$ ) entre os tratamentos pelo teste de Fisher. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tempos, ao nível de 10% de significância pelo teste de Fisher. CON: tratamento controle; BL: Inoculação com *Bacillus licheniformis*; MG: Inoculação com *Meyerozyma guilliermondii*; MB: Inoculação em co-cultura.

Em relação ao tempo de fermentação, houve um aumento ( $p < 0,10$ ) de bactérias mesófilas após 24h de fermentação no tratamento BL. Observou-se aumento da população de bactérias lácticas nos tratamentos controle, MG e BL (0,5; 1,4 e 2 log ufc/g, respectivamente) do início ao final da fermentação. Já para população de leveduras, notou-se um aumento das contagens nos tratamentos controle, BL e MB (1,3; 1,2 e 0,8 log ufc/g, respectivamente). Em 24h de fermentação

houve uma redução significativa da população de fungos nos tratamentos controle e BL. Porém, não foi observado diferença significativa na população de fungos entre o início e final da fermentação em nenhum dos tratamentos avaliados.

### 5.3. Ácidos e Açúcares

Sete ácidos orgânicos foram identificados durante a fermentação do café conilon. Os ácidos acético, cítrico, láctico, oxálico, málico, succínico e tartárico foram identificados em todos os tratamentos em diferentes concentrações (Figura 2).

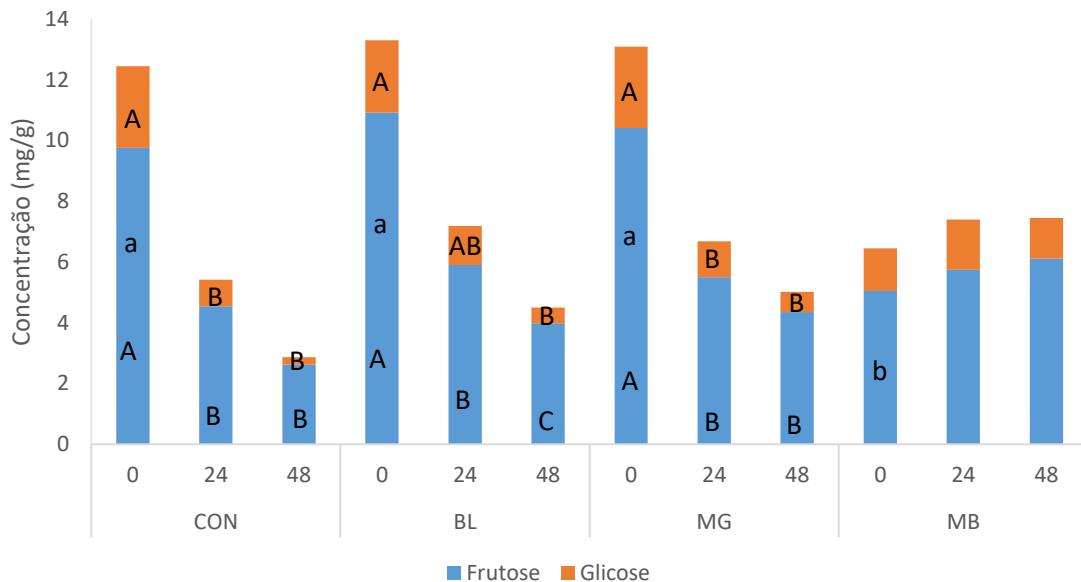


**Figura 2:** Concentrações de ácidos orgânicos durante a fermentação via úmida do café. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos, no mesmo tempo de fermentação, pelo teste de Fisher à 10%. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tempos de fermentação, para cada tratamento, pelo teste de Fischer à 10%. CON: tratamento controle; BL: Inoculação com *Bacillus licheniformis*; MG: Inoculação com *Meyerozyma guilliermondii*; MB: Inoculação em co-cultura. 0: tempo 0 (momento da inoculação); 24: 24 horas de fermentação; 48: 48 horas de fermentação.

Os ácidos butírico e propiônico não foram detectados neste estudo. Ácido succínico foi encontrado em todos os tempos e tratamentos com média variando entre 4,0 e 11,3 mg/g. Os ácidos acético e láctico não foram identificados no tempo 0 para o tratamento controle. Ácido oxálico foi o ácido encontrado em menor quantidade nas amostras, com médias variando entre 0,2 e 0,4 mg/g. Ácido tartárico não foi encontrado no tempo de 24 horas para o tratamento co-cultura. Para esses dois ácidos não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,10$ ) entre os diferentes tempos e tratamentos conduzidos. Para o ácido acético, no tempo de 24h, foi observada a maior

concentração (4,2 mg/g) no tratamento BL diferindo significativamente ( $p < 0,10$ ) dos demais. Em 48 horas a produção deste ácido continuou maior no tratamentos BL, seguido de CON, enquanto MG e MB apresentaram os menores valores e não diferiram entre si. Ácido málico apresentou maiores concentrações no tempo 0 para os tratamentos CON e BL, não diferindo ( $p < 0,10$ ) em nenhum tempo para o tratamento MB.

Sacarose, manitol e glicerol não foram detectados nas amostras avaliadas. A concentração média de frutose variou entre 4,0 e 10,9 mg/g entre as amostras e de glicose entre 0,2 e 2,7 mg/g (Figura 3).



**Figura 3:** Concentrações de açúcares durante a fermentação via úmida do café. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos, no mesmo tempo de fermentação, pelo teste de Fisher à 10%. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tempos de fermentação, para cada tratamento, pelo teste de Fisher à 10%. CON: tratamento controle; BL: Inoculação com *Bacillus licheniformis*; MG: Inoculação com *Meyerozyma guilliermondii*; MB: Inoculação em co-cultura. 0: tempo 0 (momento da inoculação); 24: 24 horas de fermentação; 48: 48 horas de fermentação.

Em relação ao tempo de fermentação, não houve nenhuma diferença significativa para o tratamento MB. Entretanto, este tratamento foi o único que diferiu significativamente ( $p < 0,10$ ) entre os tratamentos, apresentando menor concentração de frutose no tempo 0.

A concentração de frutose reduziu significativamente ( $p < 0,10$ ) ao longo das 48 horas de fermentação para o tratamento BL, indicando o consumo deste açúcar,



que passou de 10,9 mg/g no momento da inoculação, para 4,0 mg/g ao final da fermentação. Também houve redução significativa de frutose em CON e MG nas primeiras 24h de fermentação.

Foi observada redução da concentração de glicose ( $p < 0,10$ ) ao longo da fermentação para todos os tratamentos, exceto MB, indicando que este açúcar foi metabolizado pelos microrganismos no processo fermentativo.

#### 5.4. Compostos Voláteis

Ao longo das 48 horas de fermentação do café, foram identificados 2 álcoois, 1 cetona e 1 éster (Tabela 3). Dos voláteis encontrados durante a fermentação do café, 2-Heptanol esteve presente em maiores quantidades em todos os tratamentos e tempos estudados. 2-Heptanona foi identificado somente para os tratamentos MG e MB. 2-Nonanol não foi associado a nenhum tratamento BL, mas foi identificado em todos os tempos para os tratamentos MG e MB. Salicilato de metila esteve em todos os tratamentos nos tempos de 0 e 24 horas mas, ao final da fermentação, manteve-se apenas no tratamento MG.

**Tabela 3:** Porcentagem relativa de compostos voláteis identificados no café conilon durante a fermentação via úmida.

Composto	RI	Descritor sensorial	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (horas)											
			0				24				48			
			CON	BL	MG	MB	CON	BL	MG	MB	CON	BL	MG	MB
2-Heptanona		Frutado, floral	-	-	4,61	4,30	-	-	2,22	-	-	-	-	-
2-Heptanol		fresco, herbáceo, doce, floral, nozes, verde	47,29	62,30	58,55	50,32	67,04	69,54	69,28	68,75	64,47	80,3	73,31	73,71
2-Nonanol	1565	Ervas	-	-	4,52	3,78	5,50	-	6,13	7,12	-	-	6,69	6,20
Salicilato de metila		Caramelo, hortelã-pimenta	26,15	19,45	14,83	18,90	5,39	8,34	6,55	9,43	-	-	3,67	-

Cafeína	1841	-	16,07	10,70	5,01	5,59	25,49	18,04	8,41	11,25	28,31	17,07	8,42	12,18
---------	------	---	-------	-------	------	------	-------	-------	------	-------	-------	-------	------	-------

\* RI: Índice de Retenção

\*\* Descritores sensoriais retirados da literatura (Bressani et al., 2020; Da Silva et al., 2020; Elhalis et al., 2020; Bressani et al., 2018; Caporaso et al., 2018; De Melo Pereira et al., 2015).

- não detectado.

- CON: tratamento controle; BL: Inoculação com *Bacillus licheniformis*; MG: Inoculação com *Meyerozyma guilliermondii*; MB: Inoculação em co-cultura.

No café torrado, foram identificados 13 compostos voláteis (Tabela 4), sendo que entre eles estavam presentes pirazinas (5), pirroles (2), furanos (2), álcoois (1), cetonas (1), fenóis (1), lactonas (1) e outros.

**Tabela 4:** Porcentagem relativa de compostos voláteis identificados no café conilon torrado.

Composto	RI*	Descritor sensorial**	CON	BL	MG	MB
Metilpirazina	811	Noz, torrado, doce, verde, amargo, amêndoa	5,09	5,36	5,03	5,68
Furfural	829	Caramelo, torrado	11,16	11,05	11,74	11,07
Álcool furfúrico	856	Sabor suave e levemente caramelizado	15,60	15,44	16,48	17,12
1-hidroxi-2-propanona	-	Odor picante, caramelo doce, sabor doce	3,88	4,95	3,98	4,69
2,5-Dimetilpirazina	903	Torrado, Nozes, gramíneo	3,88	1,90	2,05	2,34
2,6-Dimetilpirazina	904	Cacau, café, noz torrada	2,14	2,68	2,25	3,00
5-Metilfurfural	955	Apimentado, caramelo, bordo	7,59	8,32	8,02	8,14
2-Oxobutil acetato	-	-	0,91	0,99	0,99	1,04
Butirolactona	-	Caramelo, fruta, noz torrada	0,30	-	-	-
2-Etil-5-metilpirazina	990	Fruta, torrado, doce	-	1,31	1,30	-
3-Etil-2,5-dimetilpirazina	1071	Terroso, torrado	3,37	3,13	3,51	3,49
Maltol	1108	Torrado, odor de nozes, noz, caramelo	2,20	2,57	2,57	2,60
1-Furfurilpirrole	1163	Feno, cogumelo, verde	2,55	2,92	2,36	2,36
Pirrole-2-Carboxaldeído	-	Mofo, café	2,15	-	2,02	-
p-Etilguaiacol	1269	Picante, fenólico, doce	19,52	19,99	20,44	19,13
Ácido ftálico	-	-	0,22	0,26	0,21	0,27
Cafeína	1841	-	1,67	2,34	1,93	2,75

\* RI: Índice de Retenção

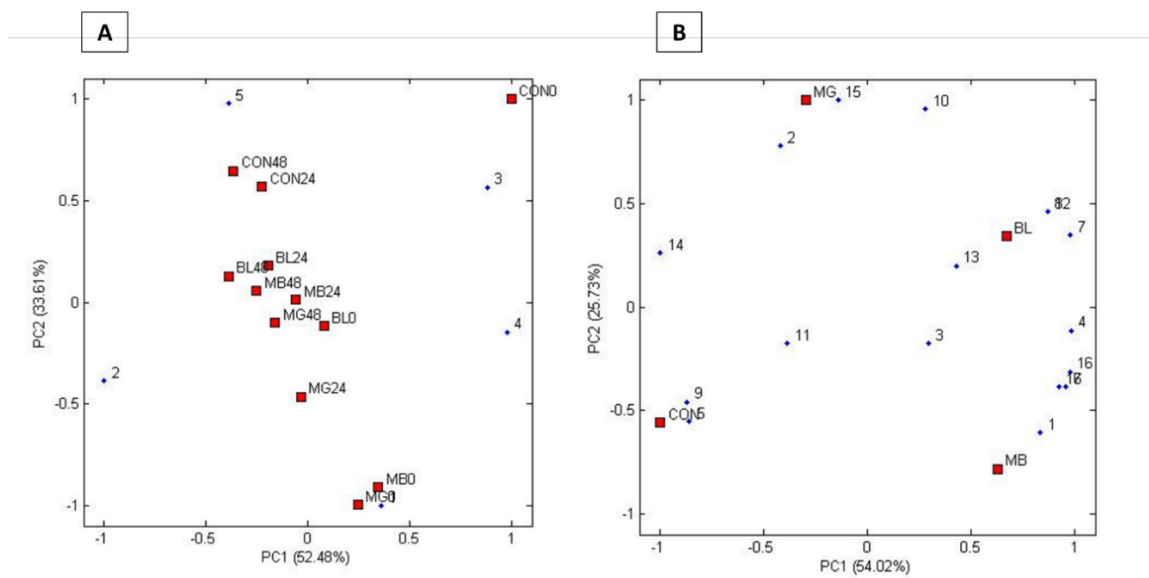
\*\* Descritores sensoriais retirados da literatura (Bressani et al., 2020; DA SILVA et al., 2020; Bressani et al., 2018; Caporaso et al., 2018; Laukaleja e Kruma, 2018; Do Nascimento et al., 2007;).

- não detectado.

- CON: tratamento controle; BL: Inoculação com *Bacillus licheniformis*; MG: Inoculação com *Meyerozyma guilliermondii*; MB: Inoculação em co-cultura.

Os compostos voláteis p-etilguaiacol, álcool furfurílico, furfural e 5-metilfurfural obtiveram maior percentual relativo nas amostras de café torrado. Butirolactona foi identificado apenas no tratamento controle. Encontrou-se 2-etil-5-metilpirazina somente nos tratamentos BL e MG. Compostos como 1-hidroxi-2-propanona que apresentam notas de caramelo doce, sabor doce e 2,6-Dimetilpirazina com notas de cacau, café, noz torrada estiveram presentes em maiores quantidades no tratamento BL e MB. Cafeína esteve presente em todas as amostras durante a fermentação e após a torra.

Uma PCA foi realizada para correlacionar os compostos voláteis identificados durante a fermentação e após a torrefação do café (Figura 4). Durante a fermentação os dois componentes principais representam 86,09% da variação no conjunto de dados, e após a torra, representam 79,75%.



**Figura 4:** Análise de componentes principais de compostos voláteis de café inoculados com *Bacillus licheniformis* (BL), *Meyerozyma guilliermondii* (MG), levedura e bactéria em co-cultura (MB) e controle (CON).

**A:** Análise de componentes principais de compostos voláteis do café durante a fermentação. 1: heptanona; 2: 2-Heptanol; 3: 2-Nonanol; 4: Salicilato de metila; 5: Cafeína. Tratamentos com final 0: tempo 0, momento da inoculação; Tratamentos com final 24: tempo de 24 horas de fermentação; Tratamentos com final 48: tempo de 48 horas de fermentação.

**B:** Análise de componentes principais de compostos voláteis do café após a torra. 1: Metilpirazina; 2: Furfural; 3: Álcool furfurílico; 4: 1-hidroxi-2-propanona; 5: 2,5-Dimetilpirazina; 6: 2,6-Dimetilpirazina; 7: 5-Metilfurfural; 8: 2-Oxobutil acetato, 9: Butirolactona; 10: 2-Etil-5-metilpirazina; 11: 3-Etil-2,5-dimetilpirazina; 12: Maltol; 13: 1-Furfurilpirrole; 14: Pirrole-2-Carboxaldeído; 15: p-Etilguaiacol; 16: Ácido ftálico; 17: Cafeína.

Durante a fermentação, o tratamento MG apresentou correlação forte e positiva com heptanona (1) no tempo 0, que também esteve associada ao tratamento MB neste tempo. 2-Heptanol (2) foi correlacionou-se fracamente e negativamente ao tratamento MG nos tempos de 24 e 48 horas. O composto 2-Nonanol (3) apresentou correlação com o tratamento controle no tempo 0. Os tratamentos controle e BL e MG foram correlacionados a salicilato de metila (4) no momento da inoculação (tempo 0). Controle, BL e MB também estiveram correlacionados a cafeína (5) nos tempos 24 e 48 horas de fermentação.

Nas análises após a torra, o tratamento controle foi correlacionado aos compostos butirolactona (9), 2,5-Dimetilpirazina (5) e 3-Etil-2,5-dimetilpirazina (11). Furfural (2), p-Etilguaiacol (15) e Pirrole-2-carboxaldeído (14) foram correlacionados com o tratamento MG. O tratamento BL apresentou-se fortemente correlacionado com 1-Furfurilpirrole (13), 5-metilfurfural (7), 2-Oxobutil acetato (8) e maltol (12). Apesar de apresentar correlação mais fraca, o tratamento MB foi correlacionado ao maior número de compostos voláteis, sendo eles, metilpirazina (1), 2,6-Dimetilpirazina (6), 1-hidroxi-2-propanona (4), álcool furfurílico (3), ácido ftálico (16) e cafeína (17).

## 5.5. Análise Sensorial

As amostras de café foram avaliadas por três provadores treinados que possuem certificação, seguindo o protocolo recomendado pela Organização Internacional do Café (International Coffee Organization – ICO) para Robustas Finos. Os quatro tratamentos conduzidos receberam classificação sensorial “Prêmio” caracterizado por cafés que apresentam pontuação entre 70 e 80 pontos.

O tratamento que apresentou maior pontuação foi o inoculado com a bactéria *Bacillus licheniformis* (BL), alcançando um ponto a mais em relação ao controle (Tabela 4).

**Tabela 4:** Pontuação, atributos sensoriais e classificação sensorial do café conilon fermentado via úmida

Tratamento	Pontuação*	Atributos sensoriais	Classificação sensorial
CON	78,73 ± 0,32	Caramelo, Amendoado, Herbáceo, Chocolate, Cereal	Prêmio
BL	79,77 ± 0,65	Amêndoas, Caramelo, Chocolate	Prêmio
MG	78,77 ± 0,47	Amêndoas, Caramelo, Cereal	Prêmio
MB	79,13 ± 0,55	Chocolate, Amêndoas, Amadeirado	Prêmio

\*Médias de três provadores. CON: tratamento controle; BL: Inoculação com *Bacillus licheniformis*; MG: Inoculação com *Meyerozyma guilliermondii*; MB: Inoculação em co-cultura.

A nota sensorial amêndoa foi observada em todos os tratamentos. Chocolate e caramelo foram detectados em todos os tratamentos, exceto MG e MB, respectivamente, assim como herbáceo e amadeirado estiveram presentes apenas nas amostras controle e MB, respectivamente. Nos tratamentos controle e MG foi descrita a nota sensorial de cereal.

## 6. DISCUSSÃO

Os microrganismos utilizam nutrientes, fontes de carbono e nitrogênio provenientes do grão e da fração fermentativa para produzir quantidades significativas de etanol, ácido acético, lático e outros metabólitos microbianos, ocasionando redução do pH (Avallone et al., 2001; de Melo Pereira et al., 2014). A redução do pH durante a fermentação em todos os tratamentos conduzidos indica que os microrganismos presentes no ambiente fermentativo foram capazes de metabolizar os nutrientes contituíntes do café, produzindo ácidos orgânicos. O acompanhamento do pH ao longo do processo fermentativo é um parâmetro de extrema importância para avaliar o progresso da fermentação, evitando subfermentações ou superfermentações para garantir a qualidade da bebida, sem que haja alterações indesejáveis nos grãos de café (Jackels and Jackels, 2005; Lee et al., 2015a).

O crescimento dos microrganismos é determinado pela capacidade das células de metabolizar os açúcares da polpa do café, se adaptando ao ambiente hostil e as condições de estresse que são encontradas na matriz de fermentação do café (De Carvalho Neto et al., 2017; de Melo Pereira et al., 2014). No presente estudo, observou-se o favorecimento de bactérias lácticas ao longo da fermentação para os tratamentos MG e BL, devido às baixas concentrações de oxigênio e baixos valores de pH (De Carvalho Neto et al., 2017; de Melo Pereira et al., 2015). A presença de enzimas pectinolíticas e celulolíticas produzidas por esses microrganismos em relações sinérgicas com os ácidos, leva à hidrólise das macromoléculas (carboidratos, proteínas e polifenóis) e permitem a disponibilização de açúcares simples ao meio para que sejam utilizados como substrato pelas bactérias do ácido lático (da Silva et al., 2021; Ribeiro et al., 2020).

As bactérias do ácido lático realizam o uso eficiente dos açúcares presentes da polpa como fontes primárias de carbono e energia para seu crescimento. Estes açúcares são convertidos em ácido lático pela enzima lactato desidrogenase através da via Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP). O ácido lático formado é difundido na matriz fermentativa ocasionando a redução do pH (De Melo Pereira et al., 2019).

Durante a fermentação do café por via úmida podem ocorrer interações simbióticas ou sinérgicas entre os diferentes microrganismos inoculados e naturalmente presentes no meio, que irá determinar sua sobrevivência ao longo do processo. Relações de sinergismo entre leveduras e bactérias do ácido lático foram

relatadas em produtos fermentados (Ponomarova et al., 2017; Titilayo Adesulu-Dahunsi et al., 2020). Observou-se que após 48h de fermentação a contagem de bactérias lácticas foi significativamente maior nos tratamentos MG e BL quando comparados ao controle, indicando relações simbióticas entre as culturas inoculadas (*M. guilliermondii* e *B. licheniformis*) e as bactérias do ácido láctico. A formação de vitaminas e nitrogênio solúvel através do metabolismo secundário das leveduras, podem ser utilizados como substrato para o crescimento de bactérias do ácido láctico. Além disso, a autólise das células de leveduras, disponibiliza aminoácidos, riboflavinas e polissacarídeos na matriz fermentativa, tornando o ambiente propício para o desenvolvimento de bactérias (Alexandre and Guilloux-Benatier, 2006; Fleet, 2003).

A maior população de bactérias mesófilas no tempo de 24 horas (7,8 log UFC/g) para o tratamento BL é importante devido às suas atividades pectinolíticas e produção de ácidos e compostos voláteis, este resultado também foi encontrado por Elhalis et al., (2020) e Evangelista et al., (2015) em café arábica.

No processamento por via úmida o crescimento de bactérias lácticas e leveduras é favorecido devido às baixas concentrações de oxigênio e baixos valores de pH, apresentando maiores contagens com o passar do tempo de fermentação (de Melo Pereira et al., 2015; de Carvalho Neto et al., 2017). A população de leveduras não diferiu significativamente no tratamento MG ao longo do processo, portanto, não houve predomínio da levedura inoculada após 48 horas de fermentação, indicando que *M. guilliermondii* não foi favorecida pelas condições fermentativas. *M. guilliermondii* é uma levedura aeróbia (Yan et al., 2021), o que explica a dificuldade de desenvolvimento desta cultura no ambiente fermentativo. A fermentação dos grãos ocorreu submersa em água e em baldes fechados, com pouco oxigênio disponível para a atividade metabólica dos microrganismos inoculados. Além da inoculação induzida, havia a presença dos microrganismos naturalmente presentes no grão, aumentando a competição pelos nutrientes e oxigênio disponível.

Não houve aumento da população de fungos ao final da fermentação em nenhum dos tratamentos avaliados. As condições parcialmente anaeróbias, a produção de ácidos orgânicos, a disputa por oxigênio e o aumento de temperatura ao longo da fermentação via úmida é desfavorável à multiplicação desse grupo microbiano, fato que é desejável, uma vez que fungos filamentosos apresentam

potencial toxigênico e possível produção de toxinas (Batista et al., 2003; Elhalis et al., 2020).

Neste estudo observou-se um decréscimo dos açúcares de acordo com a evolução da fermentação, indicando que possivelmente, estes foram consumidos pelos microrganismos, permitindo a multiplicação dos diferentes grupos microbianos. Sacarose, glicose e frutose fazem parte da composição da mucilagem, podem ser degradados por reações enzimáticas e geram impactos positivos no aroma do café (Lee et al., 2015a).

A ausência de sacarose pode estar associada ao nível de maturação do fruto e ao método de processamento conduzido, tendo em vista que este é um açúcar hidrossolúvel. Além disso, os microrganismos podem ter utilizado este açúcar como uma fonte de energia primária para conduzir seus processos metabólicos (Martinez et al., 2017). Os carboidratos são utilizados na reação de Maillard durante a etapa de torrefação, para o desenvolvimento da cor, sabor e aroma do café (Worku et al., 2018).

A presença de ácidos orgânicos e açúcares estão fortemente correlacionados, uma vez que os açúcares que compõem o fruto, são usados como uma fonte de energia para o metabolismo de microrganismos durante a fermentação, produzindo os ácidos. O sabor da bebida pode ser desenvolvido de diferentes formas e intensidades em relação a acidez, classificando-se como um atributo desejável em quantidades que não excedam o ideal, podendo ainda, realçar a percepção do atributo doçura. Durante a torra e o preparo do café, pode haver hidrólise dos ácidos orgânicos, afetando diretamente as sensações sensoriais percebidas na bebida (Farah; De Lima, 2019).

O ácido succínico, encontrado abundantemente neste estudo, é um ácido orgânico produzido naturalmente durante o processamento do café por leveduras (Bressani et al., 2020; Martinez et al., 2017) e por *Bacillus* spp. (SILVA et al., 2013). Este ácido é amplamente encontrado em estudos realizados com café (Avallone et al., 2001; Bressani et al., 2020; Ribeiro et al., 2020; Wang et al., 2019), pode resistir as temperaturas e condições de torra e sua presença no ambiente fermentativo relaciona-se a características positivas na bebida. A produção de ácido succínico pela levedura é feita principalmente pelo ciclo do glioxilato e pelo ciclo de redução do ácido cítrico (Jayaram et al., 2014).

O ácido láctico é produzido pelas bactérias do ácido láctico, conferindo nota amanteigada à bebida (Farah; De Lima, 2019). Algumas espécies pertencentes a este



grupo microbiano, também podem produzir etanol, CO<sub>2</sub> e ácido acético (Peinado, 2012).

Ácido acético produz aromas frutados e vinhoso na bebida (Seninde; Chambers IV, 2020), bem como, acidez final e sabor global favorável (Farah; De Lima, 2019; Bressani et al., 2018). Esse ácido é proveniente de processos metabólicos aeróbios de origem bacteriana, sendo produzido por *B. licheniformis* em fermentações industriais e também por leveduras a partir da oxidação de álcoois (Silva et al., 2013; De Sousa, 2008).

O ácido cítrico está naturalmente presente no café (Bressani et al., 2020) e sua produção está relacionada à presença de *Bacillus*, especialmente *B. licheniformis*, que são produtores conhecidos deste metabólito (Soccol et al., 2006).

A produção de ácido málico é favorecida a partir de altas concentrações de açúcar e valores de pH próximos de 5 (Saayman and Viljoen-Bloom, 2017). Este ácido faz parte da composição natural de muitas frutas, apresenta sabor suave e persistente, podendo conferir notas de maçã, pêsego ou ameixa na bebida. Sua acidez é menos intensa quando comparado com o ácido cítrico (Farah; De Lima, 2019).

A ausência dos ácidos butírico e propiônico é positiva, pois a presença destes compostos estão associados a parâmetros indesejáveis relacionados a fermentação excessiva (Haile e Kang, 2019; Bade-Wegner et al., 1997).

A cafeína, presente nas amostras durante a fermentação e após a torra, é um metabólito secundário nitrogenado, que influencia no corpo e amargor da bebida (Sunarharum et al., 2014). Além disso, é um composto termoestável, ou seja, não é destruída pelo processo de torrefação (Mussatto et al., 2011).

As notas sensoriais descritas para os tratamentos utilizados neste estudo, estão diretamente relacionadas aos compostos voláteis identificados. Compostos como metilpirazina, 2,6-dimetilpirazina, 2,5-dimetilpirazina, 3-etil-2,5-dimetilpirazina são encontrados predominantemente em cafés robustas (Caporaso et al., 2018b). Estes compostos atribuem às bebidas notas de “amêndoa” e “chocolate” identificado pelos provadores em todos os tratamentos na prova da xícara. 2-Etil-5-metilpirazina foi identificado somente nos tratamento MG e BL após a torra. Este composto está relacionado com os atributos sensoriais “doce” e “frutado”.

O grupo de pirazinas e piridinas apresentam sabor de nozes, aromas terrosos, torrados e verdes. Os ácidos e pirazinas podem ser correlacionado com os atributos caramelo, amêndoas (Martinez et al., 2017) chocolate, nozes e torrado (Flament, 2002). A formação das pirazinas ocorre a partir da condensação dos grupos carbonila e amina para produzir uma base Schiff. A atividade do grupo amino depende diretamente dos valores de pH, sendo que condições muito ácidas impedem a formação de pirazinas. Ao contrário, furfural e álcool furfurílico são favorecidos com a acidez. Estes compostos são formados pela degradação térmica de hexoses, como a glicose e frutose, durante a torra do café, produzindo aroma doce e notas de caramelo, canela e amêndoa. A reação de Strecker catabolizada por aldeídos, seguidas de heterociclicização podem formar as piridinas e os pirróis (Caporaso et al., 2018; Flament, 2002). Furanos podem fornecer notas de ervas ou frutadas e as cetonas notas de amanteigado, caramelo, mofo, notas de cogumelo ou frutadas (Ribeiro et al., 2017).

A presença de álcoois (2-Heptanol; 2-Nonanol), cetonas (heptanona) e éster (salicilato de metila) encontrados durante a fermentação neste estudo, podem conferir aromas que variam entre amadeirado, frutado e nozes as bebidas (Lyman et al., 2003). Álcoois e cetonas estão entre as classes químicas voláteis frequentemente encontradas em abundância em grãos de café verdes (Bressani et al., 2020a; Martinez et al., 2017). A torra é a etapa responsável pelas mudanças que ocorrem na composição química do grão, formando compostos químicos com atributos desejáveis na bebida (Belitz, Hans-Dieter; Grosch, Werner; Schieberle, 2009). Durante a torra ocorre a formação dos diferentes perfis voláteis, o desenvolvimento do aroma do café torrado, responsáveis pela qualidade da bebida (Lee et al., 2015) e as características de sabor e cor devido a pirólise de compostos orgânico (Belitz, Hans-Dieter; Grosch, Werner; Schieberle, 2009).

A maior pontuação para o tratamento BL na prova da xícara, bem como, a presença de atributos como amêndoas, caramelo e chocolate são extremamente importantes para o produtor. A pontuação derivada da análise sensorial é primordial na determinação do preço agregado ao café, portanto, maiores notas obtidas permitem melhores retornos financeiros aos produtores. Além disso, BL foi o único que não apresentou atributos sensoriais indesejáveis como amadeirado, cereal e herbacéo (Dalazen et al., 2020), valorizando ainda mais a bebida.

## 7. CONCLUSÃO

A inoculação de *B. licheniformis* foi positiva no processamento por via úmida de café conilon. Esta cultura ocasionou um aumento da população de bactérias lácticas durante a fermentação, aumentou a pontuação do café em relação ao controle e não apresentou notas sensoriais indesejáveis na prova da xícara. Além disso, foi correlacionado à produção de compostos voláteis responsáveis por agregar características de sabor e aroma positivas à bebida. 2-etil-5-metilpirazina, 1-hidroxi-2-propanona e 2,6-Dimetilpirazina são compostos voláteis importantes para a formação do sabor e aroma do café, estes estiveram presentes em maiores percentuais relativos nos tratamentos BL e MB, o que demonstra uma resposta positiva de *B. licheniformis* neste estudo. Por outro lado, a inoculação da levedura *Meyerozyma guilliemondii* pura ou em co-cultura com *B. licheniformis*, nesse trabalho, não apresentou resultados positivos.

A fermentação utilizando culturas iniciadoras é uma alternativa que possibilita a agregação de valor a bebida e a produção de cafés com atributos sensoriais desejáveis. Os resultados reforçam a necessidade da realização de mais estudos envolvendo o café conilon, avaliando cada inóculo em cada tipo de processamento.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Associação Brasileira de Cafés Especiais (BSCA). 2020. Disponível em: <https://brazilcoffeenation.com.br/a-bsca>. Acesso em: 15 de agosto 2021.
- Associação Brasileira da Indústria de Torrefação e Moagem de Café (ABIC, A.B. da I. de café, 2018. Tendências de Consumo de Café: Torrado, Torrado e Moído e Solúvel. 2, 227–249.
- Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., 2006. Yeast autolysis in sparkling wine - A review. *Aust. J. Grape Wine Res.* 12, 119–127. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00051.x>
- Anisa, A., Solomon, W.K., Solomon, A., 2017. Optimization of roasting time and temperature for brewed hararghe coffee (*Coffea Arabica L.*) using central composite design. *Int. Food Res. J.* 24, 2285–2294.
- Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J.M., Olguin, E., Guiraud, J.P., 2001. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. *Curr. Microbiol.* 42, 252–256. <https://doi.org/10.1007/s002840110213>
- Bade-Wegner, H., Bendig, I., Holscher, W., & Wollmann, R. Volatile compounds associated with the over-fermented flavour defect. In: *Colloque Scientifique International Sur Le Cafe*. Asic Association Cientifique Internationale, 1997. p. 176-182.
- Batista, L.R., Chalfoun, S.M., Prado, G., Schwan, R.F., Wheals, A.E., 2003. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica L.*). *Int. J. Food Microbiol.* 85, 293–300. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00539-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00539-1)
- Bazame, H.C., Molin, J.P., Althoff, D., Martello, M., 2021. Detection, classification, and mapping of coffee fruits during harvest with computer vision. *Comput. Electron. Agric.* 183. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2021.106066>
- Belitz, Hans-Dieter; Grosch, Werner; Schieberle, P., 2009. *Food Chemistry*, Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7>
- Bertrand, B., Vaast, P., Alpizar, E., Etienne, H., Davrieux, F., Charmetant, P., 2006. Comparison of bean biochemical composition and beverage quality of Arabica

- hybrids involving Sudanese-Ethiopian origins with traditional varieties at various elevations in Central America. *Tree Physiol.* 26, 1239–1248. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.9.1239>
- Borém, F.M., 2008. Pós-colheita do café. *Lavras uFLA* 1, 631.
- Brando, C.H.J., Brando, M.F., 2014. Methods of coffee fermentation and drying. *Cocoa Coffee Ferment.* 367–396.
- Bressani, A.P.P., Martinez, S.J., Batista, N.N., Simão, J.B.P., Dias, D.R., Schwan, R.F., 2021. Co-inoculation of yeasts starters: A strategy to improve quality of low altitude Arabica coffee. *Food Chem.* 361. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130133>
- Bressani, A.P.P., Martinez, S.J., Evangelista, S.R., Dias, D.R., Schwan, R.F., 2018. Characteristics of fermented coffee inoculated with yeast starter cultures using different inoculation methods. *LWT* 92, 212–219.
- Bressani, A.P.P., Martinez, S.J., Sarmiento, A.B.I., Borém, F.M., Schwan, R.F., 2020a. Organic acids produced during fermentation and sensory perception in specialty coffee using yeast starter culture. *Food Res. Int.* 128, 108773. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108773>
- Bressani, A.P.P., Martinez, S.J., Sarmiento, A.B.I., Borém, F.M., Schwan, R.F., 2020b. Organic acids produced during fermentation and sensory perception in specialty coffee using yeast starter culture. *Food Res. Int.* 128. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108773>
- Caporaso, N., Whitworth, M.B., Cui, C., Fisk, I.D., 2018a. Variability of single bean coffee volatile compounds of Arabica and robusta roasted coffees analysed by SPME-GC-MS. *Food Res. Int.* 108, 628–640. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.077>
- Chalfoun, S.M., Fernandes, A.P., 2013. Efeitos da fermentação na qualidade da bebida do café. *Visão agrícola* 12, 105–208.
- Chin, S.T., Eyres, G.T., Marriott, P.J., 2015. Application of integrated comprehensive/multidimensional gas chromatography with mass spectrometry and olfactometry for aroma analysis in wine and coffee. *Food Chem.* 185, 355–

361. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.003>

Companhia Nacional de Abastecimento - (CONAB), 2021. Acompanhamento da Safra Brasileira - CAFÉ. Obs. Agrícola 2, 1–60.

Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2020. Acompanhamento da safra brasileira - café. Obs. agrícola 6, 1–62.

da Silva, R.N., Melo, L.F. de A., Luna Finkler, C.L., 2021. Optimization of the cultivation conditions of *Bacillus licheniformis* BCLLN-01 for cellulase production. *Biotechnol. Reports* 29. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00599>

da Silva Vale, A., de Melo Pereira, G.V., de Carvalho Neto, D.P., Rodrigues, C., Pagnoncelli, M.G.B., Soccol, C.R., 2019a. Effect of Co-Inoculation with *Pichia fermentans* and *Lactobacillus acidilactici* on metabolite produced during fermentation and volatile composition of coffee beans. *Fermentation* 5, 1–17. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030067>

Dalazen, J.R., Rocha, R.B., Pereira, L.L., Alves, E.A., Espindula, M.C., de Souza, C.A., 2020. Beverage quality of most cultivated *Coffea canephora* clones in the western amazon. *Coffee Sci.* 15, 1–10. <https://doi.org/10.25186/v15i.1711>

Davis, A.P., Govaerts, R., Bridson, D.M., Stoffelen, P., 2006. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 152, 465–512.

Davis, A.P., Tosh, J., Ruch, N., Fay, M.F., 2011. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Bot. J. Linn. Soc.* 167, 357–377.

de Carvalho Neto, D.P., de Melo Pereira, G.V., Tanobe, V.O.A., Soccol, V.T., da Silva, B.J.G., Rodrigues, C., Soccol, C.R., 2017. Yeast diversity and physicochemical characteristics associated with coffee bean fermentation from the Brazilian Cerrado Mineiro region. *Fermentation* 3. <https://doi.org/10.3390/fermentation3010011>

de Melo Pereira, G.V., Neto, E., Soccol, V.T., Medeiros, A.B.P., Woiciechowski, A.L., Soccol, C.R., 2015. Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial

- effects. *Food Res. Int.* 75, 348–356.
- de Melo Pereira, G.V., Soccol, V.T., Pandey, A., Medeiros, A.B.P., Andrade Lara, J.M.R., Gollo, A.L., Soccol, C.R., 2014. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *Int. J. Food Microbiol.* 188, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.008>
- de Melo Pereira, G. V., da Silva Vale, A., de Carvalho Neto, D.P., Muynarsk, E.S., Soccol, V.T., Soccol, C.R., 2020. Lactic acid bacteria: what coffee industry should know? *Curr. Opin. Food Sci.* 31, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.004>
- de Melo Pereira, G. V., de Carvalho Neto, D.P., Magalhães Júnior, A.I., Vásquez, Z.S., Medeiros, A.B.P., Vandenberghe, L.P.S., Soccol, C.R., 2019. Exploring the impacts of postharvest processing on the aroma formation of coffee beans – A review. *Food Chem.* 272, 441–452. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.061>
- De Almeida, M. A. *Bacillus licheniformis* specific DNA markers for identification and culture-independent monitoring. 2014. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/80084/2/32985.pdf>. Acesso em 17 de agosto de 2021.
- Elhalis, H., Cox, J., Frank, D., Zhao, J., 2021. The role of wet fermentation in enhancing coffee flavor, aroma and sensory quality. *Eur. Food Res. Technol.* 247, 485–498. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03641-6>
- Elhalis, H., Cox, J., Frank, D., Zhao, J., 2020. The crucial role of yeasts in the wet fermentation of coffee beans and quality. *Int. J. Food Microbiol.* 333, 108796. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108796>
- Sousa, L. C. de. Avaliação do desempenho de *Bacillus licheniformis* E-44 em diferentes condições de cultivo visando a obtenção de hidrolisado enzimático de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97132/tde-04102012-112323/en.php>. Acesso em 17 de agosto de 2021.
- Evangelista, S.R., da Cruz Pedrozo Miguel, M.G., de Souza Cordeiro, C., Silva, C.F.,

- Marques Pinheiro, A.C., Schwan, R.F., 2014. Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. *Food Microbiol.* 44, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.013>
- Evangelista, S.R., Miguel, M.G. da C.P., Silva, C.F., Pinheiro, A.C.M., Schwan, R.F., 2015. Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 210, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.008>
- Evangelista, S.R., Silva, C.F., Miguel, M.G.P. da C., Cordeiro, C. de S., Pinheiro, A.C.M., Duarte, W.F., Schwan, R.F., 2014. Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. *Food Res. Int.* 61, 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.033>
- Farah, A., De Lima, Â.G. 2019. Organic Acids. In: Farah, Adriana (Ed.), *Coffee: Chemistry, Quality and Health*. The Royal Society of Chemistry (pp. 517–536). <https://doi.org/10.1039/9781782622437>.
- Ferrão, Romário Gava; Muner, Lúcio Herzog de; Fonseca, Aymbiré Francisco Almeida da; Ferrão, M.A.G., 2017. *Café Conilon*, 2 ed. ed. Vitória, ES.
- Flament, I. *Coffee Flavor Chemistry*. Hoboken: JohnWiley & Sons, 2002.
- Fleet, G.H., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 11–22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9)
- Fleet, G. H. (eds.). *Cocoa and coffee fermentations*. New York: CRC Press, 2015. cap. 12, p. 431–476.
- Guimarães, E.R., Leme, P.H.M.V., De Rezende, D.C., Pereira, S.P., Dos Santos, A.C., 2019. The brand new Brazilian specialty coffee market. *J. Food Prod. Mark.* 25, 49–71. <https://doi.org/10.1080/10454446.2018.1478757>
- Haile, M., Kang, W.H., 2019. The Role of Microbes in Coffee Fermentation and Their Impact on Coffee Quality. *J. Food Qual.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4836709>
- Hameed, A., Hussain, S.A., Ijaz, M.U., Ullah, S., Pasha, I., Suleria, H.A.R., 2018. Farm to Consumer: Factors Affecting the Organoleptic Characteristics of Coffee. II: Postharvest Processing Factors. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17, 1184–



1237. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12365>

Organização Internacional do Café (OIC). 2010. Protocolo de Degustação de Robustas Finos. Disponível em: [http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/publicacoes\\_tecnicas/Cafe-na-AmazoniaFIOROTT.pdf](http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/Cafe-na-AmazoniaFIOROTT.pdf). Acesso em 17 de agosto de 2021.

Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER). Espírito Santo conquista IG de Indicação de Procedência para Café Conilon. 2021. Disponível em: <https://incaper.es.gov.br/Not%C3%ADcia/espírito-santo-conquista-ig-de-indicacao-de-procedencia-para-cafe-conilon>. Acesso em: 15 de agosto de 2020.

Jackels, S.C., Jackels, C.F., 2005. Characterization of the coffee mucilage fermentation process using chemical indicators: A field study in Nicaragua. *J. Food Sci.* 70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09960.x>

Jayaram, V.B., Cuyvers, S., Verstrepen, K.J., Delcour, J.A., Courtin, C.M., 2014. Succinic acid in levels produced by yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) during fermentation strongly impacts wheat bread dough properties. *Food Chem.* 151, 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.025>

Joët, T., Laffargue, A., Descroix, F., Doubeau, S., Bertrand, B., Kochko, A. de, Dussert, S., 2010. Influence of environmental factors, wet processing and their interactions on the biochemical composition of green Arabica coffee beans. *Food Chem.* 118, 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.048>

Lee, L.W., Cheong, M.W., Curran, P., Yu, B., Liu, S.Q., 2016. Modulation of coffee aroma via the fermentation of green coffee beans with *Rhizopus oligosporus*: I. Green coffee. *Food Chem.* 211, 916–924. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.076>

Lee, L.W., Cheong, M.W., Curran, P., Yu, B., Liu, S.Q., 2015. Coffee fermentation and flavor - An intricate and delicate relationship. *Food Chem.* 185, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.124>

Lee, L.W., Tay, G.Y., Cheong, M.W., Curran, P., Yu, B., Liu, S.Q., 2017. Modulation of the volatile and non-volatile profiles of coffee fermented with *Yarrowia lipolytica*:

- II. Roasted coffee. *LWT - Food Sci. Technol.* 80, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.070>
- Lin, C.-C., 2010. Approach of Improving Coffee Industry in Taiwan-Promote Quality of Coffee Bean by Fermentation. *J. Int. Manag. Stud.* 5, 154–159.
- Livramento, K.G. do, Borém, F.M., José, A.C., Santos, A.V., Livramento, D.E. do, Alves, J.D., Paiva, L.V., 2017. Proteomic analysis of coffee grains exposed to different drying process. *Food Chem.* 221, 1874–1882. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.069>
- Martinez, S.J., Bressani, A.P.P., Dias, D.R., Simão, J.B.P., Schwan, R.F., 2019. Effect of bacterial and yeast starters on the formation of volatile and organic acid compounds in coffee beans and selection of flavors markers precursors during wet fermentation. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01287>
- Martinez, S.J., Bressani, A.P.P., Miguel, M.G. da C.P., Dias, D.R., Schwan, R.F., 2017. Different inoculation methods for semi-dry processed coffee using yeasts as starter cultures. *Food Res. Int.* 102, 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.096>
- Miranda, F.R., Drumond, L.C.D., Ronchi, C.P., 2020. Synchronizing coffee blossoming and fruit ripening in irrigated crops of the Brazilian Cerrado Mineiro Region. *Aust. J. Crop Sci.* 14, 605–613. <https://doi.org/10.21475/ajcs.20.14.04.p2118>
- Mussatto, S.I., Machado, E.M.S., Martins, S., Teixeira, J.A., 2011. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food Bioprocess Technol.* 4, 661–672. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0565-z>
- Peinado, J.M.R., 2012. The Transformation of Must into Wine, in: *Enological Chemistry*. Elsevier, pp. 157–182. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-3884381.00011-X>
- Pereira, P.V., Bravim, D.G., Grillo, R.P., Bertoli, L.D., Osório, V.M., da Silva Oliveira, D., da Cruz Pedrozo Miguel, M.G., Schwan, R.F., de Assis Silva, S., Coelho, J.M., Bernardes, P.C., 2021. Microbial diversity and chemical characteristics of *Coffea canephora* grown in different environments and processed by dry method. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 37, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03017-2>

- Pinheiro, A. C. M.; Nunes, C. A.; Viotoris, V., 2013. SensoMaker: Uma ferramenta para caracterização sensorial de produtos alimentícios. *Ciência e Agrotecnologia*. v.37, p.199–201.
- Ponomarova, O., Gabrielli, N., Sévin, D.C., Mülleder, M., Zirngibl, K., Bulyha, K., Andrejev, S., Kafkia, E., Typas, A., Sauer, U., Ralser, M., Patil, K.R., 2017. Yeast Creates a Niche for Symbiotic Lactic Acid Bacteria through Nitrogen Overflow. *Cell Syst*. 5, 345-357.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.09.002>
- Ramos, B.D., Fernandes, L.R.R. de M.V., de Souza, C.G., 2012. An overview of geographical indications in Brazil. *J. Intellect. Prop. Rights* 17, 133–140.
- Rehman, H. U., Aman, A., Nawaz, M. A., & Qader, S. A. U., Characterization of pectin degrading polygalacturonase produced by *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21. *Food Hydrocolloids*, v. 43, p. 819-824, 2015.
- Ribeiro, J.S., Augusto, F., Salva, T.J.G., Thomaziello, R.A., Ferreira, M.M.C., 2009. Prediction of sensory properties of Brazilian Arabica roasted coffees by headspace solid phase microextraction-gas chromatography and partial least squares. *Anal. Chim. Acta* 634, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.12.028>
- Ribeiro, L.S., da Cruz Pedrozo Miguel, M.G., Martinez, S.J., Bressani, A.P.P., Evangelista, S.R., Silva e Batista, C.F., Schwan, R.F., 2020. The use of mesophilic and lactic acid bacteria strains as starter cultures for improvement of coffee beans wet fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02963-7>
- Ribeiro, L.S., Miguel, M.G. da C.P., Evangelista, S.R., Martins, P.M.M., van Mullem, J., Belizario, M.H., Schwan, R.F., 2017. Behavior of yeast inoculated during semi-dry coffee fermentation and the effect on chemical and sensorial properties of the final beverage. *Food Res. Int.* 92, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.011>
- Saayman, M., Viljoen-Bloom, M., 2017. The Biochemistry of Malic Acid Metabolism by Wine Yeasts – A Review. *South African J. Enol. Vitic.* 27, 113–122. <https://doi.org/10.21548/27-2-1612>

- Selmar, D.; Kleinwächter, M.; Bytof, G. Metabolic responses of coffee beans during processing and their impact on coffee flavor. In: SCHWAN, R. F.;
- Seninde, D. R.; Chambers IV, E. Coffee flavor: A review. *Beverages*, [Switzerland], v. 6, n. 44, p. 28–33, July 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2306-5710/6/3/44>. Acesso em: 21 maio 2020.
- Silva, C.F., Batista, L.R., Abreu, L.M., Dias, E.S., Schwan, R.F., 2008. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food Microbiol.* 25, 951–957.
- Silva, Cristina F., Schwan, R.F., Sousa Dias, E., Wheals, A.E., 2000. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00315-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00315-9)
- Silva, C.F., Vilela, D.M., de Souza Cordeiro, C., Duarte, W.F., Dias, D.R., Schwan, R.F., 2013. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 235–247. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1175-2>
- Socol, C.R., Vandenberghe, L.P.S., Rodrigues, C., Pandey, A., 2006. New perspectives for citric acid production and application. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 141–149.
- Specialty Coffee Association (SCA). *Coffee Standards Table of Contents*, 2018. p. 14. Disponível em: <https://static1.squarespace.com/static/584f6bbef5e23149e5522201/t/5bd985c1352f53cb4cc1be48/1540982325719/Coffee+Standards-Digital.pdf>. Acesso em: 15 de agosto de 2020.
- Statsoft, n.d. *Statistica®*. Disponível em: <https://www.xlstat.com/>.
- Sunarharum, W.B., Williams, D.J., Smyth, H.E., 2014. Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective. *Food Res. Int.* 62, 315–325. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.030>
- Titilayo Adesulu-Dahunsi, A., Dahunsi, S.O., Olayanju, A., 2020. Synergistic microbial interactions between lactic acid bacteria and yeasts during production of Nigerian

- indigenous fermented foods and beverages. *Food Control J.* 110, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106963>
- Toci, A. T.; Boldrin, M. V. Z. Coffee beverages and their aroma compounds. In: A. M. Grumezescu, & A. M. Holban (Eds.). *Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes. Handbook of Food Bioengineering*, Elsevier Inc., 7, p. 397–424, 2017.
- Ufer, D., Lin, W., Ortega, D.L., 2019. Personality traits and preferences for specialty coffee: Results from a coffee shop field experiment. *Food Res. Int.* 125, 108504. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108504>
- Vilela, D.M., Pereira, G.V. de M., Silva, C.F., Batista, L.R., Schwan, R.F., 2010. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiol.* 27, 1128–1135.
- Wang, C., Sun, J., Lassabliere, B., Yu, B., Zhao, Feifei, Zhao, Fangju, Chen, Y., Liu, S.Q., 2019. Potential of lactic acid bacteria to modulate coffee volatiles and effect of glucose supplementation: fermentation of green coffee beans and impact of coffee roasting. *J. Sci. Food Agric.* 99, 409–420. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9202>
- Worku, M., de Meulenaer, B., Duchateau, L., Boeckx, P., 2018. Effect of altitude on biochemical composition and quality of green arabica coffee beans can be affected by shade and postharvest processing method. *Food Res. Int.* 105, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.016>
- Yan, W., Gao, H., Qian, X., Jiang, Y., Zhou, J., Dong, W., Xin, F., Zhang, W., Jiang, M., 2021. Biotechnological applications of the non-conventional yeast *Meyerozyma guilliermondii*. *Biotechnol. Adv.* 46, 107674. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107674>

