



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

**PRISCILA VARGAS PEREIRA**

**DINÂMICA MICROBIANA E ASPECTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DE CAFÉ  
CONILON (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) CULTIVADO EM DIFERENTES  
AMBIENTES E PROCESSADO POR VIA NATURAL**

ALEGRE – ES

JULHO – 2018

PRISCILA VARGAS PEREIRA

**DINÂMICA MICROBIANA E ASPECTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DE CAFÉ  
CONILON (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) CULTIVADO EM DIFERENTES  
AMBIENTES E PROCESSADO POR VIA NATURAL**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Patricia Campos Bernardes  
Coorientadora: Jussara Moreira Coelho  
Coorientador: Samuel de Assis Silva

ALEGRE – ES  
JULHO – 2018

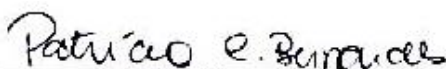
PRISCILA VARGAS PEREIRA

**DINÂMICA MICROBIANA E ASPECTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DE CAFÉ  
CONILON (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) CULTIVADO EM DIFERENTES  
AMBIENTES E PROCESSADO POR VIA NATURAL**

Dissertação 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.

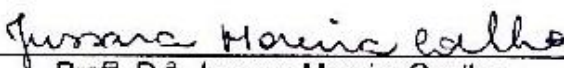
Aprovada em 31 de Julho de 2018

Comissão examinadora:



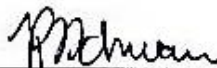
---

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



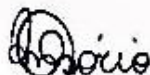
---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jussara Moreira Coelho  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Coorientadora



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosane Freitas Schwan  
Universidade Federal de Lavras  
Coorientadora



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Moreira Osório  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Examinadora

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial Sul, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

P436d Pereira, Priscila Vargas, 1994-  
Dinâmica microbiana e aspectos físicos e químicos de café conilon (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) cultivado em diferentes ambientes e processado por via natural. – 2018.  
83 f. : il.

Orientador: Patrícia Campos Bernardes.

Coorientador: Jussara Moreira Coelho.

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

1. Café conilon. 2. Café – Cultivo. 3. Alimentos – Qualidade. 4. Fermentação. I. Bernardes, Patrícia Campos. II. Coelho, Jussara Moreira. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 664

---

Bibliotecária: Lizzie de Almeida Chaves – CRB-6 ES-000871/O

À minha mãe, meu amor maior, exemplo de superação e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, detentor de toda sabedoria, poder e ciência, por me guiar até o presente momento.

À Universidade Federal do Espírito Santo.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPES pelo financiamento do projeto.

À Universidade Federal de Lavras, pelo suporte nas análises de identificação dos microrganismos.

Aos produtores pela disponibilização das áreas que foram utilizadas no projeto.

Às minhas estagiárias Daila, Danielle, Renata e Larissa pelo suporte durante todo o projeto.

À minha orientadora Patrícia Campos e minha coorientadora Jussara Coelho, pela dedicação incondicional, paciência e por todo conhecimento compartilhado, pela confiança e amizade em mim depositada.

Ao professor Samuel Assis pela coorientação e grande apoio durante todo o projeto.

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

Aos técnicos, Amanda, Letícia, Eduardo e Mauricio, pelo grande apoio. À Ana Paula e Silvia pela grande ajuda durante meu período em Lavras.

À Prof<sup>a</sup> Daniela pelo suporte nas análises no HPLC.

À Prof<sup>a</sup> Vanessa e Patrícia Fontes pela ajuda na análise de compostos voláteis.

À Maria Gabriela pela grande ajuda nas análises de identificação dos microrganismos.

À minha mãe Rosa, pela grande mulher que é abrindo mão de tantas coisas para me fazer chegar até aqui.

À minha irmã Fernanda, mais que uma irmã, uma segunda mãe para mim, além de grande amiga e minha fonte de inspiração.

A toda minha família, base de tudo que sou.

Aos meus amigos Cíntia, Natassia, Raquel e Wallaf, presentes que ganhei de Deus durante o mestrado, obrigada por todas as risadas e lealdade durante os momentos mais difíceis, sem vocês não teria conseguido.

Às minhas melhores amigas Darlene, Mayza, Pâmella e Thamiris pela amizade e cumplicidade durante todos esses anos.

“A ciência incha, mas o amor edifica. Se alguém pensa que conhece alguma coisa, não a conhece ainda como convém conhecer. Tudo quanto sei agora é parcial, mas depois verei tudo com clareza, como Deus conhece o interior do meu coração.”

1 Coríntios 8: 1, 2

13: 12



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química média do grão de café cru e torrado .....	24
Tabela 2- Monitoramento da umidade relativa e temperatura ambiente durante fermentação/secagem do café. ....	32
Tabela 3 – Efeito da interação entre face e altitude sobre a composição química dos frutos de café.....	40
Tabela 4 – Efeito da face de exposição ao sol sobre a composição centesimal dos frutos de café.....	42
Tabela 5 – Efeito da altitude sobre a composição centesimal dos frutos de café. ....	43
Tabela 6- Espécies identificadas durante fermentação do café (Parte 1). ....	49
Tabela 7- Espécies identificadas durante fermentação do café (Parte 2). ....	51
Tabela 8- Porcentagem relativa de compostos voláteis identificados no café torrado. ....	61

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Participação da exportação de café no Brasil.....	22
Figura 2 - Anatomia do fruto café.....	23
Figura 3 - Fluxograma simplificado do processamento do café por via natural.....	27
Figura 4 - Colheita e processamento do café. A: Colheita do café, B: Secagem do café em terreiro suspenso, C: Secagem final em estufa. ....	32
Figura 5 - Comportamento da população de bactérias mesófilas aeróbias, bactérias láticas, fungos filamentosos e leveduras durante secagem do café. A: Noruega 300 m, B: Soalheira 300 m.....	45
Figura 6 - Comportamento da população de bactérias mesófilas aeróbias, bactérias láticas, fungos filamentosos e leveduras durante secagem do café. C: Noruega 600 m, D: Soalheira 600 m.....	46
Figura 7- Ácido acético presente durante fermentação do café. N3: Noruega 300 m, N6: Noruega 600 m, S3: Soalheira 300 m, S6: Soalheira 600 m. ....	56
Figura 8 - Ácido succínico presente durante fermentação do café. N3: Noruega 300 m, N6: Noruega 600 m, S3: Soalheira 300 m, S6: Soalheira 600 m. ....	57
Figura 9- Sacarose presente durante fermentação do café. N3: Noruega 300 m, N6: Noruega 600 m, S3: Soalheira 300 m, S6: Soalheira 600 m.....	58
Figura 10- Frutose presente durante fermentação do café. N3: Noruega 300 m, N6: Noruega 600 m, S3: Soalheira 300 m, S6: Soalheira 600 m.....	59
Figura 11- Glicose presente durante fermentação do café. N3: Noruega 300 m, N6: Noruega 600 m, S3: Soalheira 300 m, S6: Soalheira 600 m.....	60
Figura 12- Cromatogramas do café. A: Noruega 300 m; B: Soalheira 300 m; C: Noruega 600 m; D: Soalheira 600 m.....	63

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	17
2 OBJETIVOS .....	19
2.1 Objetivo geral .....	19
2.2 Objetivos específicos .....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
3.1 Origem e importância econômica do café .....	20
3.2 A cultura do café conilon .....	20
3.3 Composição química do café .....	22
3.4 Fatores ambientais e qualidade do café .....	24
3.5 Processamento do café .....	26
3.6 Microbiota e fermentação do café .....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	31
4.1 Colheita e processamento do café .....	31
4.2 Composição centesimal .....	33
4.2.1 Determinação de pH .....	33
4.2.2 Determinação de acidez titulável total .....	33
4.2.3 Determinação de sólidos solúveis totais .....	33
4.2.4 Determinação de proteína .....	34
4.2.5 Determinação de lipídeos .....	34
4.2.6 Determinação de cinzas .....	34
4.2.7 Determinação de fibra bruta .....	34
4.2.8 Compostos fenólicos .....	34
4.3 Caracterização e identificação da microbiota .....	35
4.3.1 Quantificação, isolamento e caracterização fenotípica .....	35
4.3.2 Identificação dos isolados por Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de voo (Maldi-Tof) .....	36
4.3.3 Sequenciamento .....	37
4.4 Determinação de ácidos orgânicos e açúcares durante a fermentação do café .....	37
4.5 Análise de compostos voláteis .....	38
4.6 Planejamento experimental e análise estatística dos dados .....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40

5.1 Composição centesimal do fruto .....	40
5.2 Caracterização e identificação da microbiota.....	44
5.2.1 Quantificação e caracterização da população microbiana.....	44
5.2.2 Identificação dos isolados.....	48
5.3 Análise de ácidos orgânicos e açúcares .....	56
5.4 Análise de compostos voláteis .....	60
6 CONCLUSÃO.....	66
7 REFERÊNCIAS.....	67
APÊNDICES.....	74
APÊNDICE A- Dendograma das cepas de leveduras identificadas durante a fermentação de café cultivado em Face Noruega e altitude de 300 m. ....	74
APÊNDICE B- Dendograma das cepas de leveduras identificadas durante a fermentação de café cultivado em Face Noruega e altitude de 600 m. ....	75
APÊNDICE C- Dendograma das cepas de leveduras identificadas durante a fermentação de café cultivado em Face Soalheira e altitude de 300 m.....	76
APÊNDICE D- Dendograma das cepas de leveduras identificadas durante a fermentação de café cultivado em Face Soalheira e altitude de 600 m.....	77
APÊNDICE E- Dendograma das cepas de bactérias identificadas durante a fermentação de café cultivado em Face Noruega e altitude de 300 m. ....	78
APÊNDICE F- Dendograma das cepas de bactérias identificadas durante a fermentação de café cultivado em Face Noruega e altitude de 600 m. ....	79
APÊNDICE G- Dendograma das cepas de bactérias identificadas durante a fermentação de café cultivado em Face Soalheira e altitude de 300 m.....	80
APÊNDICE H- Dendograma das cepas de bactérias identificadas durante a fermentação de café cultivado em Face Soalheira e altitude de 600 m.....	81
APÊNDICE I – ANOVA .....	82

## RESUMO

PEREIRA, Priscila Vargas. **Dinâmica microbiana e aspectos físicos e químicos de café conilon (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) cultivado em diferentes ambientes e processado por via natural.** 2018. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES. Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Patricia Campos Bernardes, Coorientadores: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Jussara Moreira Coelho e Prof Dr. Samuel de Assis Silva.

Microrganismos estão presentes nas diferentes etapas do processamento do café e contribuem para a qualidade final da bebida. A microbiota do café pode variar de acordo com mudanças geográficas, variedade cultivada e altitude do local de cultivo. O conhecimento sobre essa microbiota é importante especialmente quando se deseja aplicar culturas *starters* durante o processo de secagem a fim de melhorar a qualidade da bebida. Com esse trabalho se objetivou avaliar a diversidade microbiana presente nos cafés conilon cultivados em diferentes altitudes e faces de exposição ao sol e processados por via natural, a fim de estudar a relação desses fatores sobre a microbiota presente e o impacto destas nas características físico-químicas dos grãos. Foram utilizados cafés conilon de duas altitudes (300 e 600 m) e duas faces de exposição ao sol (Soalheira e Noruega). Os cafés foram secos em terreiro suspenso até 18% b.u de umidade e amostras foram coletadas durante a fermentação/secagem. Após esse período foram transferidos para um secador artificial à 45 °C até umidade de 11% b.u. Acidez, pH, sólidos solúveis, cinzas, fenólicos, proteína, lipídeos, carboidratos, fibra e umidade foram determinados nos frutos de café. Durante a fermentação microrganismos foram isolados e identificados por Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de voo (MALDI-TOF) e sequenciamento. Açúcares e ácidos orgânicos foram identificados e quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC). No café torrado foram identificados compostos voláteis por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). A interação entre altitude e face de exposição ao sol influenciou nas variáveis pH, sólidos solúveis, cinzas e fenólicos dos frutos de café. O mesmo comportamento não foi observado para o conteúdo de lipídeos, proteína, carboidratos, fibra e umidade. Os principais gêneros de microrganismos encontrados foram *Pichia*, *Candida*, *Meyerozyma*, *Bacillus* e *Staphylococcus*. Ácido acético e succínico foram identificados durante o processo de fermentação. A

concentração de sacarose, frutose e glicose variou, entre amostras, ao longo da fermentação. Quarenta compostos voláteis foram identificados nos cafés torrados, havendo diferença entre os compostos em relação à altitude e face de exposição ao sol. A avaliação da microbiota presente em cafés conilon provenientes de diferentes altitudes e faces de exposição ao sol é importante para o conhecimento das espécies microbianas presentes durante o processamento natural no Brasil, uma vez que esses estudos são escassos na literatura científica.

**Palavras-chave:** Qualidade do café, fermentação, culturas iniciadoras.

## ABSTRACT

PEREIRA, Priscila Vargas. Microbial dynamics and physical and chemical aspects of coffee conilon (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) grown in different environments and processed by natural method. 2018. Dissertation (Master's degree in Food Science and Technology) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES. Advisor: Prof Dsc. Patricia Campos Bernardes, Co-advisor: Prof<sup>a</sup> Dsc. Jussara Moreira Coelho and Prof Dsc. Samuel de Assis Silva.

Microorganisms are present in the different stages of coffee processing and contribute to the final quality of the beverage. The coffee microbiota may vary according to geographic changes, cultivated variety and altitude of the growing site. Knowledge about this microbiota is important especially when starter cultures are to be applied during the drying process in order to improve the quality of the beverage. The aim of this work was to evaluate the microbial diversity present in natural conilon coffee grown at different altitudes and shade, in order to study the relationship of these factors on the present microbiota and their impact on the physical and chemical characteristics of grains. Conilon coffee of two altitudes (300 and 600 m) and two shade (Sunny and Norway) were used. The coffees were dried in suspended platform up to 18% moisture and were collected during a fermentation/drying. For the period were transferred to an artificial effect at 45 °C until moisture of 11%. Acidity, pH, soluble solids, ash, phenolics, proteins, lipids, carbohydrates, fiber and moisture were required in coffee fruits. During fermentation by microorganisms were identified by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Flight Time (MALDI-TOF) and sequencing. Sugars and organic acid were found and quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). In the roasted coffee, volatile compounds were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). An interaction between altitude and face exposure to the sun influenced pH, solubility, ash and phenolic variables of coffee fruits. The same context was not observed for the content of lipids, proteins, carbohydrates, fiber and moisture. The main genera of microorganisms were *Pichia*, *Candida*, *Meyerozyma*, *Bacillus* and *Staphylococcus*. Acetic acid and succinic acid during the fermentation process. A concentration of sucrose, fructose and glucose varied between samples throughout the fermentation. Composed of half a dozen toasts, having the same effect in relation

to the altitude and face of sun exposure. The evaluation of the microbiota present in conilon coffees allows different heights and faces of exposure to the sun is important for the knowledge of microbial species present during natural processing in Brazil, since these studies are scarce in the scientific literature.

**Keywords:** Coffea quality, fermentation, culture starters.



## 1 INTRODUÇÃO

Os cafeeiros pertencem ao gênero *Coffea* da família Rubiaceae, e possuem cerca de 80 espécies e centenas de variedades. As espécies mais comuns de café e as mais cultivadas no mundo são *Coffea arabica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café conilon e robusta) (HAMDOUCHE et al., 2016).

A produção de café tem grande importância para a economia brasileira. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café com uma previsão para safra 2017/2018 de 54,44 a 58,51 milhões de sacas de 60 Kg de café beneficiado. Desse total, aproximadamente 12,7 a 13,96 milhões de sacas correspondem à produção de café conilon, sendo o estado do Espírito Santo responsável pela produção de aproximadamente 8,2 milhões de sacas, ou seja, 61,52% da produção nacional (CONAB, 2018).

O estado do Espírito Santo é o maior produtor e exportador nacional de café conilon, o que contribui muito para a economia do estado. O café conilon destaca-se pelo seu alto valor industrial e é muito utilizado em *blends* junto com o café arábica, conferindo corpo ao produto e equilibrando a acidez do café arábica. Além disso, café conilon pode ser aplicado na indústria de café solúvel (MAURI, 2016). Dessa forma, estudos visando à melhoria da qualidade do café conilon são relevantes não só para o estado do Espírito Santo, como para o Brasil.

O café conilon é processado por via natural em sua maioria, devido ao clima quente do Brasil e a escassez de chuvas durante o período de colheita. No processamento por via natural, os frutos de café são secos pela radiação solar com todas as partes que os constituem e são denominados café em coco, de terreiro ou natural (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; SILVA, 2014).

Durante a secagem por via natural, os microrganismos naturalmente presentes nos frutos realizam uma série de fermentações que podem influenciar na qualidade final do produto (SCHWAN; WHEALS, 2003). Estes microrganismos são bactérias, leveduras e fungos filamentosos provenientes das etapas pré e pós colheita, que degradam compostos presentes na polpa e mucilagem dos frutos e excretam metabólitos nos grãos, os quais influenciarão nas características físico-químicas e sensoriais dos mesmos (SILVA et al., 2000; AVALLONE et al., 2002; VILELA et al., 2010; EVANGELISTA et al., 2015).

Estudos de fermentação em café Conilon são ainda muito escassos, muito do que se sabe de fermentação em café foi realizado em café Arábica. Dessa forma, conhecer os microrganismos envolvidos nas etapas de processamento do café conilon processado por via natural é relevante. Esta microbiota pode ser benéfica ou prejudicial e pode variar em função de características da região de produção, como umidade, temperatura e população microbiana do solo, composição da variedade do fruto de café e o método de processamento.

Pesquisas que abordam diferentes ambientes de cultivo do café, como altitude e face de exposição ao sol, são essenciais, pois trazem conhecimento sobre como esses fatores influenciam na produtividade, características físico-químicas e sensoriais do grão. Além disso, podem-se ter respostas relevantes sobre a diversidade microbiana presente no fruto submetido a estas condições de cultivo.

Conhecendo a microbiota do café seria possível selecionar microrganismos benéficos com características específicas e utilizá-los como inóculo para realizar a fermentação do café. Esse tipo de prática possui diversos benefícios ao processamento, como redução do tempo de fermentação e diminuição do crescimento de microrganismos indesejáveis, como fungos micotoxigênicos, que podem contaminar o café. Além disso, pode-se agregar valor ao café, uma vez que esses microrganismos poderiam produzir compostos benéficos à qualidade da bebida.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a diversidade microbiana presente no café conilon processado por via natural, após colheita em diferentes altitudes e faces de exposição ao sol, a fim de estudar a relação desses fatores sobre a microbiota presente e o impacto destas nas características físico-químicas do grão.

### **2.2 Objetivos específicos**

- I. Avaliar as características físico-químicas do fruto de café no estágio cereja.
- II. Identificar as comunidades microbianas presentes nos frutos durante a fermentação/secagem do café conilon processado por via natural e provenientes de diferentes altitudes (300 e 600 m) e faces de exposição ao sol (Noruega e Soalheira).
- III. Quantificar bactérias mesófilas aeróbias, bactérias lácticas, leveduras e fungos filamentosos ao longo da fermentação.
- IV. Identificar os ácidos orgânicos e açúcares formados durante a fermentação/secagem do café.
- V. Identificar os compostos voláteis presentes nos grãos de café após processo de torrefação.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Origem e importância econômica do café

O café se originou na Etiópia e os holandeses trouxeram a planta para a América Central e do Sul. O café foi introduzido no Brasil em 1727 no estado do Pará, e em 1830 se tornou o principal produto de exportação do país (MENDES, 2005, SANTOS, 2008). A produção de café contribui como importante fonte de renda, absorvendo grande mão-de-obra, contribuindo como *commoditie* para o setor agrícola (VILELA, 2011).

O café pertence à família botânica Rubiaceae, com mais de 80 espécies conhecidas, porém poucas são usadas na produção da bebida, sendo as mais usadas *Coffea arabica* (arábica) e *Coffea canephora* (robusta e conilon) (HAMDOUCHE, et al., 2016).

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, seguido pelo Vietnã e Colômbia, sendo que sua participação na exportação corresponde a 30,93%, do Vietnã 20,66% e Colômbia 13,75% (ABIC, 2018). A previsão de produção para safra 2017/2018 está entre 54,44 e 58,51 milhões de sacas de 60 Kg. A produção de café arábica deve se situar entre 41,74 e 44,55 milhões de sacas, representando um aumento de 26% em relação ao ano de 2017, já a produção de café conilon é estimada entre 12,7 e 13,96 milhões de sacas, com crescimento de 24,3% comparado ao ano anterior (CONAB, 2018).

De acordo com a Organização Internacional do Café (2018) o consumo mundial de café supera 150 milhões de sacas por ano e vem registrando um aumento anual de 2,5%. O Brasil é o segundo maior consumidor da bebida no mundo, atrás apenas dos EUA, que consome anualmente 25 milhões de sacas.

#### 3.2 A cultura do café conilon

A espécie *Coffea canephora* tem origem principalmente nas regiões ocidental, centro-tropical e subtropical do continente africano. Geograficamente, é amplamente distribuída e se adapta melhor a regiões quentes, úmidas e áreas baixas da floresta tropical (CHARRIER; BERTHAAUD, 1985).

O primeiro cultivo de *C. canephora* se originou na República do Congo em 1870, e no Brasil foi introduzida no ano de 1912 no estado do Espírito Santo, no município de Cachoeiro de Itapemirim, na região sul do estado. Na década de 60, com a crise do café que levou a erradicação da maioria das lavouras cafeeiras no estado, em sua maioria constituída por café arábica, o café conilon se expandiu e em 1971 lavouras foram implantadas no município de São Gabriel da Palha e se expandiu para outras regiões do estado (ECCARDI; SANDALJ, 2002, SCHMID et al., 2004, GLAZAR, 2005).

Os primeiros plantios de café conilon se originaram de sementes da variedade 'Kouillou' (FONSECA et al., 2007). A palavra 'Kouillou' é um termo francês e está relacionada ao rio situado na costa Atlântica da África, onde a variedade de café foi observada por botânicos franceses. Depois essa variedade ficou popularmente conhecida como Conilon (FERRÃO, 2007). No Brasil, o café conilon é cultivado em altitudes mais baixas (abaixo de 500 m), temperaturas mais elevadas (média entre 22 e 26°C) e déficit hídrico inferior a 350 mm (FERRÃO et al., 2007).

O estado do Espírito Santo é o maior produtor de café conilon do Brasil, responsável por cerca de 80% da produção nacional e por 20% da produção mundial. O café conilon é a principal fonte de renda das propriedades rurais capixabas e é responsável por 35% do PIB Agrícola. Atualmente, existem 256,55 mil hectares plantados de conilon no Estado. São 40 mil propriedades rurais em 63 municípios, com 78 mil famílias produtoras (CONAB, 2018; INCAPER, 2018). O café conilon gera 250 mil empregos diretos e indiretos. Em função do aumento na participação em *blends* e do clima e altitude favorável para o plantio do café conilon, o estado do Espírito Santo tem expandido sua cultura (MAURI, 2016).

O café conilon destaca-se pelo seu alto valor industrial e é muito utilizado pela indústria para a produção de cafés solúveis e em misturas com o café arábica, chegando a participar em até 50% nos *blends*. Ele confere corpo ao produto e equilibra a acidez do café arábica devido a sua menor acidez e maior quantidade de sólidos solúveis (MAURI, 2016). O conilon é responsável por 80% dos *blends* que são destinados a produção de café solúvel (ABIC, 2016). De acordo com o Conselho dos Exportadores de Café do Brasil (2018), o café solúvel representa 12,1% das exportações brasileiras (Figura 1).

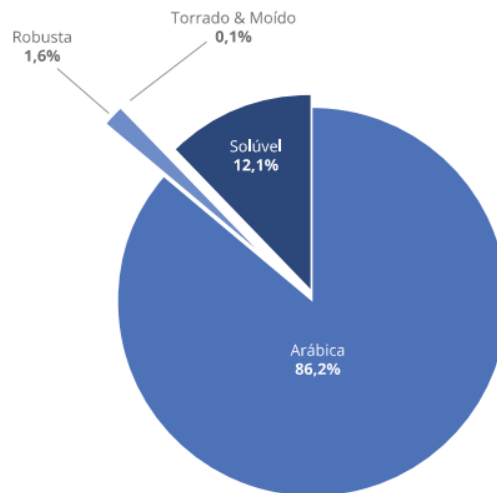


Figura 1- Participação da exportação de café no Brasil. Fonte: CECAFE, 2018.

Ele é essencial na fabricação de café solúvel, devido sua alta extração de sólidos solúveis e carboidratos, que é em média 30% maior que a do café arábica (ABIC, 2016).

### 3.3 Composição química do café

O entendimento dos processos que acontecem durante a formação e maturação do café é essencial para o entendimento da composição bioquímica do fruto (BORÉM, 2008). O conhecimento dos compostos químicos do café também pode permitir a detecção de adulterações no mesmo, além da diferenciação entre espécies (MONAKHOVA et al., 2015).

O café é constituído principalmente por endosperma (semente), que constitui o grão, espermoderma (película prateada), endocarpo (pergaminho), mesocarpo (mucilagem) e exocarpo (casca), que tem como função a proteção dos cotilédones (fruto) (Figura 2) (SALAZAR et al., 1994).

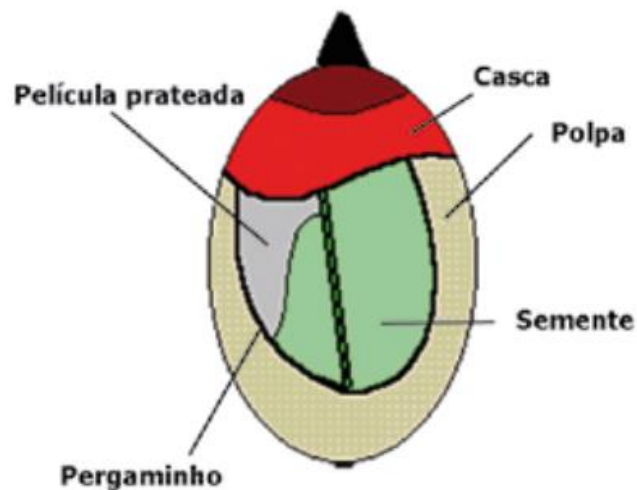


Figura 2 - Anatomia do fruto café. Fonte: EMBRAPA, 2013.

O fruto no estágio de cereja contém em sua mucilagem açúcares simples, polissacarídeos, minerais, proteínas e lipídeos, entre outros compostos, constituindo um excelente meio de cultura para o crescimento de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (AMORIM, 1968). Além disso, a mucilagem contém também água, taninos, cafeína, ácidos clorogênicos e cafeicos, aminoácidos e substâncias pécicas (ELÍAS, 1978).

As substâncias pécicas podem ser classificadas, de acordo com as variações de sua estrutura, em ácidos pectínicos, protopectina, ácidos pécicos e pectina e são constituídas por cadeias de ácido galacturônico, e grupos hidroxil acetilados (ARUNGA, 1982). O ácido pécico é um polímero de ácido galacturônico com baixo grau de xilose, ramnose e arabinose. A pectina é composta de unidades de ácido galacturônico unidas por ligações  $\alpha$  1,4 com pouca quantidade de arabinanas e galactanas (BLANCO, 1999).

A mucilagem só é formada no café com grau de maturação cereja. Os frutos verdes não possuem esse componente. Sem a mucilagem a semente não possui proteção e lubrificação, o que pode ocasionar corte ou esmagamento da mesma, prejudicando assim o sabor final da bebida (ARUNGA, 1982).

O grão do café contém componentes voláteis e não-voláteis, tais como ácidos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, trigonelina, compostos fenólicos e cafeína, além de enzimas, que agem sobre estes compostos (BIOSCI, 1993; MENEZES, 1994), contribuindo para

qualidade sensorial da bebida que está relacionada diretamente com a composição química dos grãos. A Tabela 1 contém a composição química média do grão de café.

Tabela 1 – Composição química média do grão de café cru e torrado

Componente	<i>Coffea canephora</i>		<i>Coffea arabica</i>	
	Cru	Torrado	Cru	Torrado
Minerais	4,0- 4,5	4,6- 5,0	3,0- 4,2	3,5- 4,5
Cafeína	1,6- 2,4	2,0	0,9- 1,2	1,0
Trigonelina	0,6- 0,75	0,3- 0,6	1,0- 1,2	0,5- 1,0
Lipídeos	9,0- 13,0	11,0- 16,0	12,0- 18,0	14,5- 20,0
Ácido Clorogênico	7,0- 10,0	3,9- 4,6	5,5- 8,0	1,2- 2,3
Ácidos alifáticos	1,5- 2,0	1,0- 1,5	1,5- 2,0	1,0- 1,5
Oligossacarídeos	5,0- 7,0	0,0- 3,5	6,0- 8,0	0,0- 3,5
Polissacarídeos	37,0- 47,0	-	50,0- 55,0	24,0- 39,0
Aminoácidos	2,0	-	2,0	-
Proteínas	11,0- 13,0	13,0- 15,0	11,0- 13,0	13,0- 15,0

Fonte: SMITH, 1985.

### 3.4 Fatores ambientais e qualidade do café

Os fatores ambientais delimitam as áreas com potencial adequado de clima e solo para as culturas de café, sendo uma ferramenta fundamental para a implantação de qualquer atividade agrícola. Para alcançar produtividade econômica, cada cultura necessita de condições favoráveis durante todo o seu ciclo vegetativo, isto é, estabelece determinados limites de temperatura nas várias fases do ciclo, de uma quantidade mínima de água e de um período seco nas fases de maturação e colheita. O atendimento dessas exigências será fundamental para que determinada região seja considerada apta para uma dada cultura (ALVES et al., 2011).



Os parâmetros climáticos considerados como favoráveis para a obtenção de uma bebida fina podem ainda ser afetados por efeitos externos, que contribuem para aumento da umidade do ambiente influenciando a composição química da mucilagem, o tipo de atividade microbiana e a intensidade do processo fermentativo. Assim, mesmo regiões apropriadas para produção de cafés de boa qualidade possuem uma diversidade climática que causam variações nas características (acidez, corpo e aroma) da bebida (ALVES et al., 2011).

Tem sido relatado que temperaturas baixas são responsáveis pelo adiamento do processo de amadurecimento, levando a um maior acúmulo de compostos bioquímicos associados à melhora do aroma do café (VAAST et al., 2006; LAVIOLA et al., 2007). A qualidade da bebida do café, também, depende da influência da sombra sobre o desempenho fisiológico do cafeeiro diminuindo o estresse na planta (GEROMEL et al., 2008).

Diferentes altitudes e a posição da encosta da montanha podem influenciar na qualidade final do café, e são alguns dos fatores ambientais que mais exercem influência na cultura do café (SILVA et al., 2006, ZAIDAN et al., 2017), podendo também influenciar na microbiota presente nos frutos do café.

A direção onde a lavoura se encontra é um fator importante na caracterização do microclima das encostas e das temperaturas médias anuais. Em regiões de montanha é comum dois termos para nomear a orientação da encosta da montanha em relação à radiação solar. Um dos termos é “Face Noruega” onde as lavouras de café recebem menor incidência de radiação solar direta ao longo do ano, sendo mais sombreada, úmida e menos aquecida, com temperaturas médias anuais mais baixas. O outro termo é “Face Soalheira”, denominada assim devido a maior incidência de radiação solar direta ao longo do ano, devido a isso ela é mais aquecida, colaborando para que a umidade relativa seja menor quando comparada à “Face Noruega” (SEDIYAMA et al., 2001).

Menchú et al. (1971) observaram aumento na acidez, corpo e aroma da bebida em altitudes mais elevadas. Zaidan et al. (2017), em estudos realizados na região das Matas de Minas, no estado de Minas Gerais, observaram que os atributos acidez, corpo e doçura são os mais influenciados pelos fatores ambientais (altitude e face de exposição ao sol).

O entendimento da melhor combinação de fatores (altitude e face de exposição ao sol) é um instrumento importante para ajudar o produtor na produção

de cafés com maior potencial de qualidade de bebida. É importante que se avalie o impacto desses fatores ambientais sobre as características do café e sobre a produção do café de melhor qualidade para o mercado consumidor (ZAIDAN et al., 2017).

### **3.5 Processamento do café**

O processamento dos frutos de café se inicia na colheita, porém os fatores que influenciam na qualidade devem ser considerados desde o plantio (BORGES; JORGE; NORONHA, 2002). A colheita deve ser realizada quando os frutos estiverem maduros em sua maioria (BORGES; JORGE; NORONHA, 2002; BORÉM, 2008), ela resulta em frutos verdes, maduros (cereja), secos (boia), folhas, ramos, terra, paus e pedra. A proporção de cada um desses constituintes depende do sistema e cuidados com a colheita. Para separação do café, é realizada a abanação (retirada de folhas e outras impurezas mais leves), e depois o café passa por lavagem, para separá-los de acordo com a densidade. Os mais densos são os verdes e cerejas, o menos denso é o café boia. Essas porções devem ser secas separadamente, formando lotes mais homogêneos, permitindo assim secagem uniforme (BORÉM, 2004).

O objetivo do processamento do café é separar os grãos das camadas mais externas do fruto (casca, polpa, mucilagem e pergaminho), visando assim à redução da umidade inicial para aproximadamente 12% b.u.. Existem três tipos de processamento: via natural, via semi-seca e via úmida. No processamento via natural, o café é seco com todas as suas partes constituintes. No processamento via semi-seca a casca e parte da mucilagem dos frutos são retirados mecanicamente e as sementes são secas com o restante da mucilagem e o pergaminho. Na via úmida a casca e a mucilagem dos frutos são retiradas mecanicamente e as sementes são submetidas ao processo de fermentação para a retirada do restante da mucilagem que ficou aderida ao pergaminho (PIMENTA, 2003).

O tipo de processamento influencia diretamente na qualidade do café, devido à variação de compostos formados como açúcares, trigonelina, ácido clorogênico e compostos voláteis (FARAH et al., 2006). Após o processamento os grãos podem ser armazenados durante meses sem alterações significativas do sabor (BORÉM,

2004; BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

O processamento por via natural (Figura 3), também conhecido como processamento por via seca, dá origem ao café denominado coco, natural ou de terreiro. É o método mais antigo, simples e o mais utilizado no Brasil, devido à estação seca característica durante o período da colheita. Nesse tipo de processamento o café é seco com todas as partes que o constitui (casca, mucilagem, pergaminho, película prateada e semente). Esse é o método que menos afeta a condição natural do café, pois todas as suas estruturas são mantidas (BORÉM, 2008). Sua secagem varia entre 10 e 25 dias, dependendo da umidade inicial do fruto, do clima, das instalações disponíveis e da qualidade final desejada (CHALFOUN; CARVALHO et al., 2000; SILVA et al., 2000, SCHWAN; WHEALS, 2003).

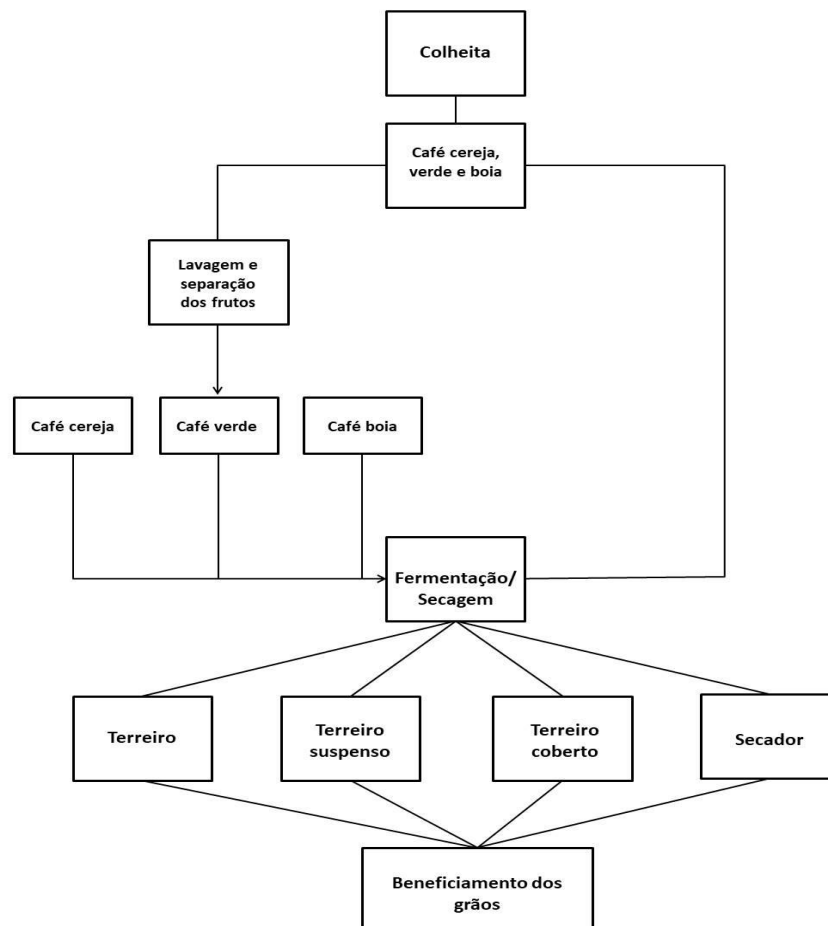


Figura 3 - Fluxograma simplificado do processamento do café por via natural. Fonte: O autor.

A secagem do café pode ser feita ao sol em terreiros (suspenso, coberto ou convencional) ou em secadores mecânicos após uma pré-secagem ao sol (VILELA, 2009). Durante a etapa de secagem ocorre uma fermentação microbiana natural, em que enzimas são liberadas alterando assim a mucilagem, podendo influenciar na qualidade do café (SILVA et al., 2000).

Os cafés que são submetidos à secagem em terreiros convencionais, onde os frutos são espalhados numa superfície de cimento, sofrem com fatores que podem prejudicar a qualidade do grão, como o contato do café com a microbiota da superfície do terreiro, animais domésticos e chuvas repentinas. Já o terreiro coberto e o suspenso tem como vantagem a não influência da microbiota do chão, a prevenção do contato de animais durante a secagem do café e também o melhor fluxo de ar sobre os frutos e assim diminuição do tempo de secagem. Os secadores mecânicos têm como vantagem a diminuição do tempo de secagem e uma alternativa para períodos chuvosos (BORÉM, 2008).

### **3.6 Microbiota e fermentação do café**

A microbiota presente no café é complexa e inclui bactérias, leveduras e fungos filamentosos, e é influenciada por fatores ambientais da região de cultivo, como umidade, temperatura, população microbiana do solo, variedade do café e tipo de processamento (SILVA et al., 2000, SILVA et al., 2003). Alguns microrganismos são relatados como de importância na fermentação do café, como os gêneros *Bacillus*, *Erwinia*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (ARUNGA, 1982).

Dentre os microrganismos presentes no café, alguns deles podem produzir enzimas que aceleram a degradação da mucilagem e, conseqüentemente, o processo de fermentação, como por exemplo as leveduras. Algumas espécies de leveduras como *D. hansenii* e *P.guilliermondii* são capazes de crescerem em meio sintético de pectina, comprovando a importância desses microrganismos na degradação da mucilagem do café (SILVA et al., 2008).

A pectina presente na mucilagem do café possui alto grau de esterificação de grupos metil (superior a 70%) (SCHWAN; WHEALS, 2003). Assim, apenas enzimas pectinolíticas que sejam capazes de utilizar, em conjunto ou isoladamente, esse substrato são de importância na degradação da mucilagem. Microrganismos que

apresentem alta atividade de pectina liase ou alta atividade de poligalacturonase e pectina metilesterase simultaneamente são de grande importância no processo de fermentação e têm potencial para serem utilizados como culturas iniciadoras para a padronização do processo de fermentação do café (VILELA, 2011).

Pectinases são importantes na fermentação de café, pois aceleram o processo de fermentação, melhorando a qualidade do produto final. Enzimas pecticas podem ser adicionadas para remover a camada de mucilagem do grão. Celulases, pectinases e hemicelulases, presentes em preparações comerciais, podem ser aspergidas nos grãos, acelerando o processo de fermentação. Como enzimas comerciais tem alto custo, são utilizadas enzimas pecticas microbianas obtidas da fermentação (KASHYAP et al., 2001; SILVA et al., 2000).

Durante a secagem do café natural em terreiro ocorre uma fermentação espontânea, devido à presença de diversos microrganismos (SILVA et al., 2008). Segundo estudo de Silva et al. (2000), o café natural possui maior quantidade de substratos, devido a isso é encontrada uma grande diversidade de microrganismos. As bactérias aparecem com maior frequência, e as leveduras aumentam durante o processo de fermentação com a diminuição da umidade e atividade de água. Os gêneros mais comuns para bactérias são *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Lactobacillus* e *Bacillus*, e em relação às leveduras os gêneros mais encontrados são *Pichia*, *Candida* e *Arxula*, com tendência a aparecerem em frutos secos e fermentados.

Hamdouche et. al (2016) identificaram algumas espécies de microrganismos durante a secagem de café (*Coffea canephora*) por via natural como *Microbacterium*, *Enterobacter*, *Wallemia* e *Aspergillus*. Já Pee e Castelein (1971) identificaram *Candida guilliermondii* na superfície e mucilagem dos frutos e, *Candida parapsilopsis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis famata*, *Saccharomyces marxianus*, *Candida tropicalis* e *Candida pelliculosa* na superfície dos grãos.

Em café arábica, De Melo Pereira et al. (2014) isolaram e identificaram diferentes espécies de leveduras em café arábica como *P. fermentans*, *P. kluyveri*, *C. glabrata*, *P. caribbica* entre outras espécies. Vilela et al. (2010) identificaram *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pichia anomala*, *Torulasporea delbrueckii* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Silva et al. (2008) identificaram espécies de bactérias como *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. macerans*, *B. polymyxa* e *B. megaterium* e, leveduras das espécies *Candida*

*saitoana*, *C. fermentati*, *Debaromyces polymorvus*, *P. guilliermondii*, *C. membranifaciens*, *D. hansenii*, *P. anomala*, *Arxula adenivorans* e *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação de cafés naturais. Perderon e Breed (1946) observaram a presença de bactérias na fermentação do café arábica natural, em sua maioria do gênero do gênero *Leuconostoc* e *Lactobacillus*.

De acordo com a literatura, fungos filamentosos são o grupo de microrganismos mais encontrados em café secos em terreiro, dentre eles *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium* sp., *Penicillium* spp, *Aspergillus niger*, *Cladosporium* sp, *Rhizopus nigricans* Ehr., *Rhizopus* sp., *Phomopsis* sp. e *Espicoccum* sp. (BITANCOURT, 1957). Silva et al. (2000) isolaram fungos do gênero *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Penicillium* em cafés naturais (arábica) sendo que a maioria pertencia ao gênero *Aspergillus*. Enzimas fúngicas aceleram a quebra da mucilagem, alguns fungos pectinolíticos são: *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (VAUGHN et al., 1958). Estes fungos estão relacionados com a produção de substâncias toxigênicas, como por exemplo, a Ocratoxina A por *Aspergillus ochraceus* (BATISTA et al., 2008).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos de café conilon (variedade “Emcaper 8151 – Robusta Tropical”) utilizados foram provenientes de duas regiões de produção no sul do estado do Espírito Santo nos municípios de Jerônimo Monteiro (20°47'22”S – 41°23'42”W) e Cachoeiro de Itapemirim (20°50'56”S – 41°06'46”W). Em cada município foram coletadas amostras de duas áreas, com faces de exposição ao sol do tipo Soalheira (Noroeste) e Noruega (Sudeste). As áreas do município de Jerônimo Monteiro possuem altitude média de 300 m e as áreas do município de Cachoeiro de Itapemirim possuem altitude média de 600 m.

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, as análises físico-químicas no Laboratório de Química de Alimentos e Operações Unitárias do Departamento de Engenharia de Alimentos. Análise de HPLC e CG-MS foram realizadas no laboratório Central Analítica (CCENS) da UFES campus Alegre. A secagem dos frutos de café conilon foi realizada na Área Experimental do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo. Maldi-Tof foi realizado no laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, e o sequenciamento foi realizado pela MacroGen, EUA.

### 4.1 Colheita e processamento do café

Os frutos de café conilon (15 Kg) foram colhidos por derrixa (Figura 4A) e submetidos à secagem em terreiros suspensos em Alegre-ES (Figura 4B), sob temperatura e umidade ambiente, até que os frutos atingissem uma umidade de  $\pm 18\%$  b.u., sendo então transferidos para um secador (45 °C) (Figura 4C) até umidade de  $\pm 11\%$  b.u.



Figura 4 - Colheita e processamento do café. A: Colheita do café, B: Secagem do café em terreiro suspenso, C: Secagem final em estufa. Fonte: O Autor.

A temperatura ambiente e umidade relativa do ar foi medida durante a fermentação/secagem por uma estação meteorológica instalada na área experimental em Alegre-ES onde os cafés foram processados (Tabela 2).

Tabela 2- Monitoramento da umidade relativa e temperatura ambiente durante fermentação/secagem do café.

Tempo de secagem	Noruega 300		Soalheira 300		Noruega 600		Soalheira 600	
	T <sup>a</sup> (°C)	UR (%)	T <sup>a</sup> (°C)	UR (%)	T <sup>a</sup> (°C)	UR (%)	T <sup>a</sup> (°C)	UR (%)
<b>0</b>	31.5	39.0	21.4	70.0	21.3	82.0	21.3	82.0
<b>12</b>	22.0	81.0	21.5	69.0	19.3	79.0	19.3	79.0
<b>22</b>	22.1	73.0	26.0	44.0	23.0	62.0	23.0	62.0
<b>36</b>	18.0	82.0	20.5	74.0	18.8	79.0	18.8	79.0
<b>46</b>	25.7	55.0	23.6	52.0	22.2	74.0	22.2	74.0
<b>70</b>	26.2	69.0	21.4	56.0	24.2	82.0	24.2	82.0
<b>118</b>	29.9	44.0	23.8	53.0	26.0	61.0	26.0	61.0

\*T<sup>a</sup>: Temperatura ambiente; UR: Umidade Relativa.



Amostras (500 g) de café foram coletadas, em duplicata, nos tempos 0, 12, 24, 36, 46, 72 e 118 h, armazenadas em sacos de polietileno esterilizados, e imediatamente transferidas ao laboratório para análises microbiológicas. Para as análises físico-químicas os cafés foram armazenados a -12 °C até serem analisados.

## **4.2 Composição centesimal**

A umidade nos frutos de café cereja foi determinada em estufa, com temperatura de 105°C, até peso constante da amostra, seguindo a metodologia proposta pela AOAC (1995). O resultado foi expresso em % (b.u.) (g de água/100g de amostra).

Para a realização das demais análises físico-químicas, amostras (300 g) de café cereja foram congeladas a - 80°C, em seguida foram liofilizadas durante 48h em liofilizador (Liotop, modelo L108), a 214 µHg e temperatura de - 60 °C.

Após liofilização, as amostras foram moídas em moinho de facas (SOLAB) em granulometria fina (20 mesh), e embalados em embalagens de polietileno/alumínio, selados e armazenados sob refrigeração (4 °C) até o momento das análises.

### **4.2.1 Determinação de pH**

Para determinação do pH foi utilizado um potenciômetro (Tekna, modelo T 1000), após reidratação (2 g de amostra em 50 mL de água destilada) das amostras em pó, de acordo com o método descrito na AOAC (1995).

### **4.2.2 Determinação de acidez titulável total**

A acidez titulável total foi determinada após reidratação (2 g de amostra em 50 mL de água destilada) das amostras em pó. As suspensões foram tituladas com solução de NaOH 0,1 N, utilizando-se fenolftaleína 1% m/v como indicador, de acordo com método descrito pela AOAC (1995).

### **4.2.3 Determinação de sólidos solúveis totais**

Os sólidos solúveis totais foram determinados por refratômetro digital (Hanna HI 96801), após reidratação (2 g de amostra em 50 mL de água destilada) das amostras em pó, seguindo metodologia descrita na AOAC (1995).

#### **4.2.4 Determinação de proteína**

O teor de nitrogênio foi determinado nas amostras em pó pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995). Foi utilizada 1 g de amostra e 2 g de mistura catalizadora. O fator de 6,25 foi utilizado para conversão de nitrogênio em proteínas e os resultados foram expressos em % (g de proteínas/100g de amostra em base seca).

#### **4.2.5 Determinação de lipídeos**

O teor de lipídeos foi determinado nas amostras em pó (1 g) utilizando-se éter de petróleo e aparelho de Soxhlet (AOAC, 1995). O resultado foi expresso em % (g de lipídeos/100g de amostra em base seca).

#### **4.2.6 Determinação de cinzas**

O teor de cinzas foi determinado nas amostras em pó, em Mufla a 525°C, após incineração (AOAC, 1995). O resultado foi expresso em % (g de cinzas/100g de amostra em base seca).

#### **4.2.7 Determinação de fibra bruta**

A determinação do teor de fibra bruta (FB), nas amostras em pó (1 g), aconteceu após digestão ácida seguida de digestão em meio alcalino (AOAC, 1995).

#### **4.2.8 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos totais foram quantificados de acordo com o método de Folin Denis, descrito pela AOAC (1995).

#### 4.2.9 Carboidratos totais

Os carboidratos totais foram calculados por diferença de acordo com a Equação 1:

$$CT = 100 - (UM + PTN + CIN + LIP) \quad \text{Eq 1.}$$

Onde, CT= Carboidratos totais, UM= umidade, PTN= proteína, CIN= cinzas e LIP= lipídeos.

### 4.3 Caracterização e identificação da microbiota

#### 4.3.1 Quantificação, isolamento e caracterização fenotípica

Amostras de café (10 g) foram adicionadas em 90 mL de água peptonada esterilizada, homogeneizadas por 2 minutos em Stomacher® e submetidas às diluições decimais.

Foram enumeradas (em duplicata) bactérias mesófilas aeróbias em ágar padrão para contagem (PCA); bactérias lácticas em ágar Man Rogosa and Sharpe (MRS), acrescido de 0,25% (v/v) de nistatina; leveduras em ágar peptona dextrose extrato de levedura (YPD), acidificado até pH 3,5 com ácido tartárico 10% (v/v); fungos filamentosos em ágar extrato de malte (MEA), acrescido de 0,01% (m/v) de cloranfenicol. As placas de PCA e YPD foram incubadas à 35 °C por 3-7 dias, as placas de MRS foram incubadas em jarros de anaerobiose à 35 °C por 3-4 dias e as de MEA à 28 °C durante 7 dias (VILELA et al., 2010; EVANGELISTA et al., 2015).

A partir da contagem total foi selecionada, para análise da morfologia de colônia, uma placa de cada meio e diluição cuja contagem esteve entre 30 e 300 colônias. O número de isolados selecionados para identificação foi determinado pela raiz quadrada do número total de isolados contados, conforme mencionado no *Bacteriological Analytical Manual (Food Drugs Administration FDA, 1972)*. A análise de morfologia de colônia incluiu a observação dos seguintes atributos: tamanho da colônia (análise comparativa com outras colônias presentes naquele meio), forma, elevação, cor, textura e bordo.

A preservação dos isolados foi a – 80 °C feita em criotubos contendo os meios de origem líquidos acrescidos de glicerol, para uma concentração final de 20% (v/v) (VILELA, 2010).

A caracterização fenotípica das colônias bacterianas foi realizada utilizando coloração de Gram, testes de catalase, oxidase, motilidade e capacidade de formação de esporos (HOLT et al., 1994). As colônias de leveduras foram caracterizadas por morfologia e por testes de fermentação de glicose, sacarose, xilitose, maltose e galactose (BARNETT, 2000).

#### **4.3.2 Identificação dos isolados por Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de vôo (Maldi-Tof)**

Os isolados foram estriados em placas de ágar YPG (ágar peptona glicose extrato de levedura) para leveduras e ágar nutriente para bactérias. As placas foram incubadas a 28 °C por 18 h e então colônias de cada isolado foram transferidas assepticamente para microtubos. Posteriormente, 3 µL de solução orgânica (água/acetoneitrila/ácido trifluoroacético, 50: 47.5: 2.5) foi adicionado a cada microtubo contendo o isolado bacteriano e 3 µL de ácido fórmico/acetoneitrila (25:75) para o isolado de levedura. Os microtubos foram homogeneizados em vortex por 1 min e, em seguida, 1 µL da suspensão foi transferida para uma placa MALDI flex de 96 poços (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Quando o líquido evaporou, 1 µL de solução matriz [solução saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico (CHCA) em 50% de acetoneitrila/2,5% ácido trifluoroacético] foi adicionado em cada poço (OLIVEIRA et al. 2015). Uma cepa de *Escherichia coli* K12 obtida da Coleção Pública Portuguesa de Cultura da Universidade do Minho (MUM, <http://www.micoteca.deb.uminho.pt>) foi utilizada como padrão para a calibração externa do MALDI-TOF. Células de *E. coli* K12 foram cultivadas em ágar nutriente a 37 °C durante 18 h. Aproximadamente 1 µg de material de uma única colônia de *E. coli* K12 foi transferida para a placa MALDI flex e a solução matriz CHCA foi adicionada. As amostras foram analisadas em triplicata em espectrômetro MALDI-TOF micro flex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), utilizando o sistema automático MALDI Biotyper 3.0. Os microorganismos não identificados por Maldi-Tof foram submetidos à sequenciamento (Item 4.3.3).

### 4.3.3 Sequenciamento

A extração de DNA foi realizada usando o kit InstaGene Matrix (Bio Rad). E os *primers* usados para amplificação foram da região 16S (27F e 1512R) para bactéria e a região ITS (ITS1 e ITS4) para leveduras. As reações foram feitas para 50 µL contendo 25 µL do kit top taq master (QUIAGEN), 1,5 de cada primer, 5 µL de DNA molde e 17 µL de água ultra pura (EVANGELISTA et al., 2014).

As reações foram levadas para um termociclador sob as seguintes condições: 97°C por 5 min, 30 ciclos (97°C por 1 min, 52°C por 1 min e 72°C por 1 min) e a extensão final foi de 72°C por 8 min. Para verificar a qualidade dos *amplicons* as reações foram corridas em gel de agarose a 1,0% (EVANGELISTA et al., 2014).

As amostras foram enviadas para MacroGen USA para sequenciamento e posteriormente analisadas usando o banco de dados BLAST (NCBI).

## 4.4 Determinação de ácidos orgânicos e açúcares durante a fermentação do café

Os ácidos orgânicos (málico, láctico, acético, butírico, propiônico, cítrico, oxálico, succínico e tartárico) e açúcares (sacarose, frutose e glicose) foram analisados utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) de acordo com Silva et al. (2013) e Evangelista et al. (2014a) com adaptações.

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. As amostras foram microfiltradas através de um filtro de acetato de celulose de 0,2 µm. Uma coluna (Aminez HPX-87C) (250 cm x 4 mm), operando a 55 °C, foi utilizada para se obter a separação cromatográfica de ácidos e açúcares. A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico 5 mM a um coeficiente de vazão de 0,8 mL/min. Os açúcares foram determinados por um detector de índice de refração (RID) e os ácidos foram determinados por um detector UV à 210 nm. Os ácidos e açúcares foram identificados por comparação com tempos de retenção de padrões autênticos.

A quantificação dos compostos foi realizada utilizando curvas de calibração. Para a construção da curva analítica foi utilizada uma padronização externa a partir de cinco níveis de concentração das soluções padrão dos ácidos e açúcares. Os padrões foram preparados e injetados nas mesmas condições das amostras.

#### 4.5 Análise de compostos voláteis

Os compostos voláteis foram extraídos de amostras de café torrado por microextração em fase sólida, de acordo com Evangelista et al. (2014), sendo utilizada a Fibra Divinilbenzeno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS). Amostras (3 g) de café foram previamente pesadas em frascos “headspace”, e então foram aquecidas à 70°C por 30 min juntamente com a fibra. Após adsorção dos compostos na fibra, a mesma foi colocada no injetor e aquecida à 250°C por 5 min.

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

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

O índice de Kovats de cada componente foi calculado conforme a Equação 2:

$$IK = 100Z - 100 \times \frac{\log t_{R X} - \log t_{R Z}}{\log t'_{R(Z+1)} - \log t'_{R Z}} \quad \text{Eq 2}$$

Onde: Z = número de carbonos do alcano anterior ao composto analisado;  $t_{R X}$  = tempo de retenção (min) do composto analisado;  $t'_{R Z}$  = tempo de retenção do alcano anterior ao composto analisado e  $t'_{R(Z+1)}$  = tempo de retenção do alcano posterior ao composto analisado.

#### **4.6 Planejamento experimental e análise estatística dos dados**

Cada unidade experimental foi composta por 15 kg de frutos de café, sendo no total 4 unidades experimentais (2 altitudes x 2 faces de exposição) totalizando quatro tratamentos. O experimento foi conduzido em esquema de parcelas subdivididas no espaço, tendo nas parcelas as altitudes (300 e 600 m) e nas subparcelas as faces de exposição ao sol (Noruega e Soalheira).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando encontrado efeito significativo entre os tratamentos, estes foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade usando o programa estatístico GENES, versão 2013.5.1.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Composição centesimal do fruto

Foi observada interação significativa ( $p < 0.05$ ) (Apêndice I), entre as faces e altitudes, para as variáveis pH, sólidos solúveis, cinzas e fenólicos dos frutos de café conilon (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeito da interação entre face e altitude sobre a composição química dos frutos de café.

		Altitude		
		300 m	600 m	
Face	pH	Noruega	5,83 a A	5,58 b A
		Soalheira	5,74 a B	5,68 b B
	Sólidos solúveis (%)	Noruega	2,00 a A	2,10 a A
		Soalheira	2,10 a A	1,90 b B
	Cinzas (%)	Noruega	4,24 a A	4,50 b A
		Soalheira	4,61 a B	3,61 a A
	Fenólicos (g ácido gálico/100g)	Noruega	21,62 a A	26,22 b A
		Soalheira	24,84 a B	28,12 b A

\*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na linha e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Em relação ao pH dos frutos de café conilon (Tabela 3), observa-se menores valores (5,58 e 5,68) para aqueles cultivados em altitudes mais elevadas quando comparado com os de menores altitudes (5,83 e 5,74), o que sugere um maior acúmulo de ácidos orgânicos nos frutos de café conilon cultivados em altitudes maiores.

Os frutos de café cultivados na face Soalheira e altitude de 600 m apresentaram menor porcentagem de sólidos solúveis totais (1,90%), sendo este valor estatisticamente diferente daqueles obtidos nas outras amostras avaliadas. O



maior percentual de sólidos solúveis (2,10%) foi encontrado em frutos cultivados na face soalheira a 300 m de altitude e também nos cultivados na face Noruega a 600 m de altitude. Estes resultados não permitem sugerir de que forma a altitude e face de exposição ao sol influenciam no percentual de sólidos solúveis dos frutos de café conilon.

O conteúdo de cinzas apresentou diferença significativa, entre as duas altitudes avaliadas, na face Noruega. O fruto de café cultivado na maior altitude apresentou maior porcentagem de cinzas (4,50%). Para a face Soalheira não foram encontradas diferenças significativas entre as duas altitudes avaliadas. Para a altitude de 300 m houve diferença significativa entre as faces, sendo que os frutos cultivados na face Soalheira apresentaram a maior porcentagem de cinzas (4,61%). Não foram encontradas diferenças significativas entre os frutos cultivados em faces distintas e na altitude de 600 m. Os resultados não permitem concluir, de forma geral, como a altitude e a face de exposição ao sol influenciam no teor de minerais dos frutos de café conilon, uma vez que os resultados não apresentam a mesma tendência fixando-se um fator (face ou altitude) e variando-se o outro.

Covre et al. (2016) avaliaram o acúmulo dos minerais N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Cu, Mn e B em frutos de café conilon, provenientes de cafeeiros irrigados e não irrigados e obtiveram como resultados valores na faixa de 6,92 a 7,13%. Estes valores são maiores do que o encontrado no presente estudo. Entretanto, a variedade de café usada e as condições de cultivo foram distintas, o que deve ter influenciado nos resultados.

Os minerais são compostos essenciais para o desenvolvimento de alterações fisiológicas e morfológicas que levam à formação do fruto café. Além disso, segundo Covre et al. (2016) o conteúdo de minerais é determinante para o cafeeiro tolerar o estresse provocado por mudanças climáticas. Dessa forma, esperava-se como resultado dessa pesquisa uma tendência mais clara da influência dos fatores altitude e face de exposição ao sol, sobre o percentual de cinzas dos frutos de café conilon.

Em relação às concentrações de compostos fenólicos foram determinados valores distintos significativamente entre frutos cultivados nas altitudes de 300 e 600 m, independente da face de exposição ao sol. Os maiores valores (26,22 e 28,12 g ácido gálico. 100 g<sup>-1</sup>) foram determinados nas amostras cultivadas em 600 m de altitude. Fixando-se a altitude e variando-se a face de exposição ao sol, foram encontradas diferenças significativas na concentração de fenólicos somente na

altitude de 300 m, sendo que na face Soalheira foi encontrada maior concentração desses compostos.

A altitude tem influência na mudança de temperatura do ar, pois à medida que a altitude aumenta a temperatura do ar diminui. Conseqüentemente, altitudes mais elevadas provocam adiamento do processo de amadurecimento dos frutos de café conilon, ocasionando mais transformações químicas e síntese de compostos (VAAST et al., 2006). No caso do presente estudo estes compostos podem ser fenólicos e ácidos que levam a uma diminuição do pH.

Para as variáveis de umidade, acidez, proteínas, lipídeos, fibra e carboidratos não foram observadas interações significativas (ANOVA em Apêndice I) entre as faces e altitudes, assim os fatores face e altitude foram avaliados separadamente (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 – Efeito da face de exposição ao sol sobre a composição centesimal dos frutos de café.

	Face	
	Noruega	Soalheira
Umidade (%)	36,55 a	34,44 b
Acidez (mL de NaOH 0,1N/100g)	2,92 a	3,03 a
Proteína (%)	11,61 a	11,48 a
Lipídeos (%)	1,71 a	1,18 a
Carboidratos (%)	46,27 a	48,23 a
Fibra (%)	5,70 a	5,08 a

\*Médias seguidas pelas mesmas letras na linha não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de significância pelo teste F.

Tabela 5 – Efeito da altitude sobre a composição centesimal dos frutos de café.

	Altitude	
	300 m	600 m
Umidade (%)	35,28 a	35,71 a
Acidez (mL de NaOH 0,1N/100g)	2,88 a	3,07 a
Proteína (%)	11,26 a	11,84 a
Lipídeos (%)	1,43 a	1,47 a
Carboidratos (%)	47,59 a	46,91 a
Fibra (%)	4,46 a	6,32 b

\*Médias seguidas pelas mesmas letras na linha não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de significância pelo teste F.

Avaliando-se os fatores separadamente foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na umidade de frutos de café cultivados em diferentes faces de exposição ao sol (Tabela 4). Na face Noruega determinou-se um valor de umidade inicial dos frutos maior (36,55%) que na face Soalheira (34,44%). Esse valor mais elevado da umidade pode ser devido à menor exposição solar dos cafeeiros na face Noruega, fazendo com que os frutos cultivados na face mais fria (Noruega) perdessem menos água para o ambiente.

Foram também encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no teor de fibras de frutos de café cultivados em diferentes altitudes (Tabela 5). O conteúdo de fibra foi maior para a altitude de 600 m (6,32%) em relação à de 300 m (4,46%). Braham e Bressani (1979) avaliaram o percentual de fibras da polpa do café, sem mencionar a espécie, e encontraram um resultado em torno de 3,4%.

Neste trabalho foram encontrados nos frutos do café teores de acidez titulável entre 2,81 e 3,11 mL de NaOH 0,1N.100g<sup>-1</sup>, e não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as amostras estudadas, tanto para as faces, quanto para as altitudes avaliadas (Tabelas 3 e 4).

O teor de proteínas não foi influenciado pela altitude e nem pela face de exposição ao sol ( $p > 0,05$ ) (Tabelas 4 e 5). Não foram encontradas diferenças significativas no teor de proteínas de frutos de café conilon cultivados em altitudes distintas. Para os frutos cultivados a 300 e 600 m foram encontrados 11,26 e

11,84%, respectivamente. Frutos cultivados em faces de exposição distintas também não foram diferentes, significativamente, em relação ao teor de proteína, sendo os percentuais encontrados de 11,61 e 11,48 para as faces Noruega e soalheira, respectivamente. Braham e Bressani (1979) encontraram valores de proteína em torno de 11,2% em polpa de café de espécie não mencionada.

O conteúdo de lipídeos não diferiu entre as faces e as altitudes a 5% de probabilidade. Para as faces Noruega e Soalheira foram encontrados percentuais de 1,71 e 1,18%, respectivamente. Em relação às altitudes foram encontrados valores de 1,43 e 1,47%, a 300 e 600 m, respectivamente.

Os principais constituintes da fração de carboidratos são celulose, açúcares redutores e não redutores e substâncias pécticas (BRAHAM; BRESSANI, 1979). Não houve diferença significativa entre os teores de carboidratos tanto para a altitude, quanto para a face, porém os maiores valores encontrados foram para a face Soalheira (48,23%) e a altitude de 300 m (47,59%).

## **5.2 Caracterização e identificação da microbiota**

### **5.2.1 Quantificação e caracterização da população microbiana**

O comportamento da população microbiana foi distinto entre as faces de exposição ao sol e altitude (Figuras 5 e 6). Para a altitude de 300 m pode-se observar, na maior parte do tempo, que a população de bactérias mesófilas aeróbias e fungos predominaram em relação às populações de leveduras e bactérias lácticas ao longo da fermentação, em ambas as faces (Figura 5). Enquanto que, para altitude de 600 m, nas duas faces, as contagens dos quatro grupos microbianos avaliados ficaram mais próximas ao longo da fermentação. Vale destacar que na face Noruega/300 m observou-se uma grande variação na população de bactérias lácticas durante a fermentação.

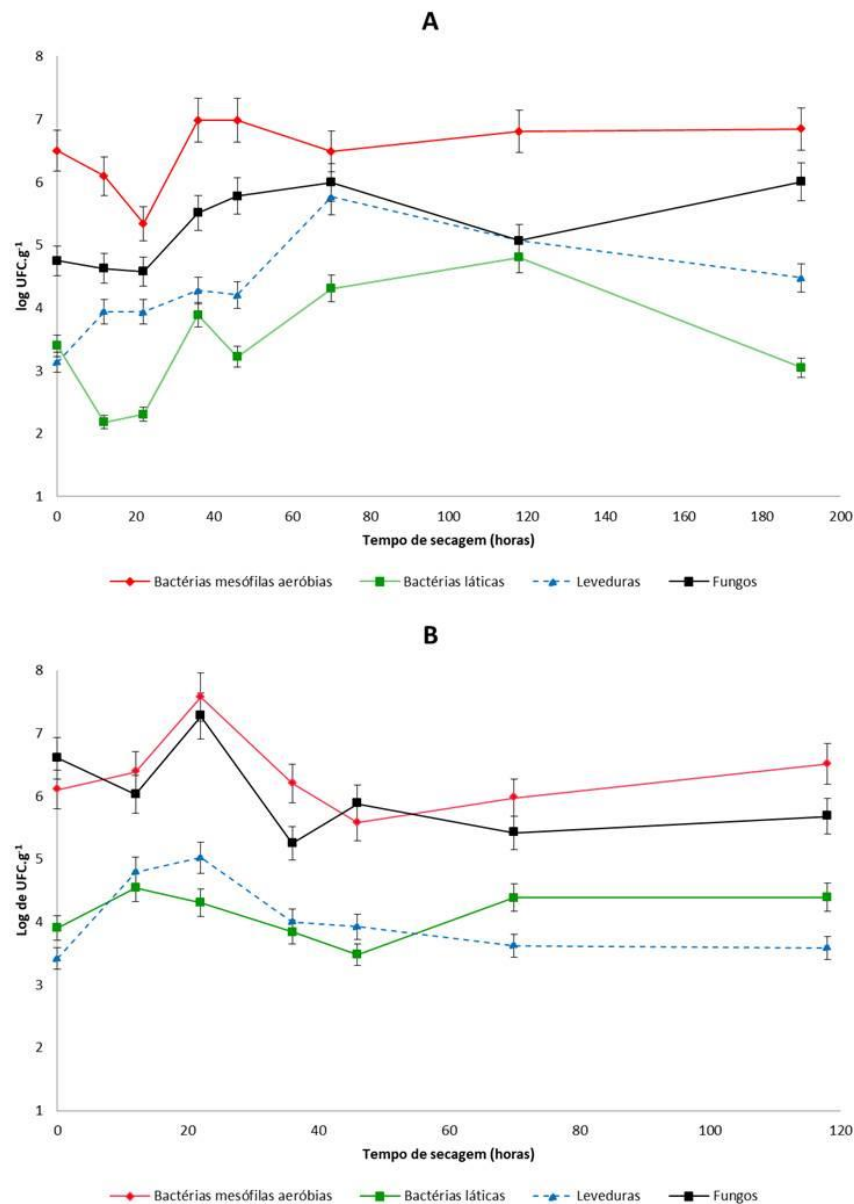


Figura 5 - Comportamento da população de bactérias mesófilas aeróbias, bactérias lácticas, fungos filamentosos e leveduras durante secagem do café. A: Noruega 300 m, B: Soalheira 300 m.

Silva et al. (2000) também observaram, em café arábica processado por via natural, predomínio da população de bactérias, seguido por fungos e por último de leveduras em frutos de café coletados da planta e do solo. Já Velmourougane (2013) observou que a população de leveduras foi dominante em relação à população de bactéria para café robusta. Esse autor também observou que a população de fungos que inicialmente era baixa foi aumentando ao longo da fermentação.

Para altitude de 600 m, nas duas faces, as contagens dos quatro grupos microbianos avaliados ficaram próximas até o tempo de 120 h, com exceção para a face Soalheira, onde houve um decréscimo na população de bactérias lácticas e aumento na população de leveduras (Figura 6). A partir do tempo de 120 h, para ambas as faces, as contagens se comportaram de forma semelhante, com ênfase para o crescimento da população de bactérias mesófilas aeróbias (Figura 6).

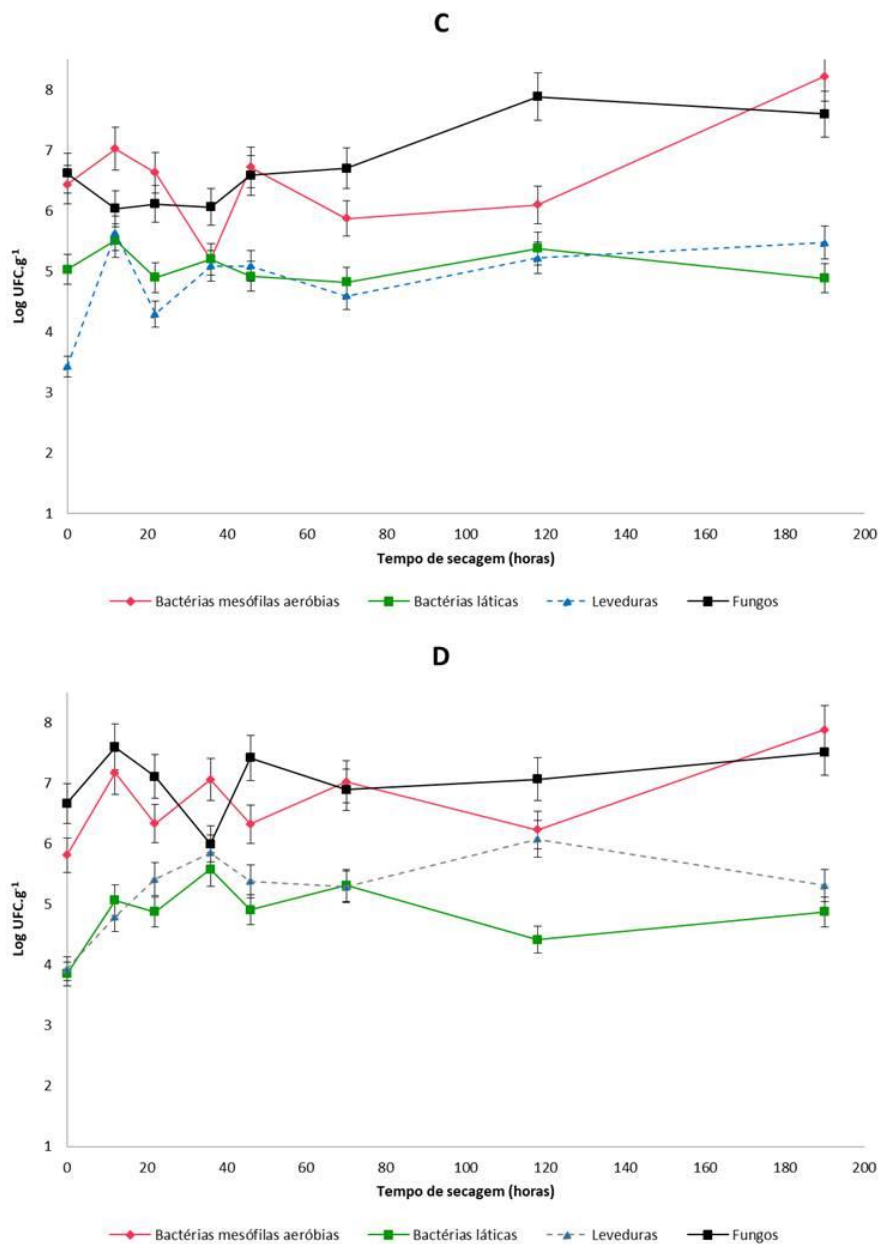


Figura 6 - Comportamento da população de bactérias mesófilas aeróbias, bactérias lácticas, fungos filamentosos e leveduras durante secagem do café. C: Noruega 600 m, D: Soalheira 600 m.

A contagem de bactérias mesófilas aeróbias variou de 5,33 a 6,98 log UFC.g<sup>-1</sup> para amostra Noruega/300m, 5,58 a 7,58 log UFC.g<sup>-1</sup> para amostra Soalheira/300 m, 5,19 a 8,21 log UFC.g<sup>-1</sup> para Noruega/600m e 5,81 a 7,88 log UFC.g<sup>-1</sup> para Soalheira/600m. A contagem de bactérias láticas variou de 2,17 a 4,79 log UFC.g<sup>-1</sup> para amostra Noruega/300m, 3,48 a 4,55 log UFC.g<sup>-1</sup> para amostra Soalheira/300 m, 4,81 a 5,50 log UFC.g<sup>-1</sup> para Noruega/600m e 3,85 a 5,57 log UFC.g<sup>-1</sup> para Soalheira/600m.

A população de leveduras variou de 3,13 a 5,76 log UFC.g<sup>-1</sup> para amostra Noruega/300m, 3,42 a 5,02 log UFC.g<sup>-1</sup> para amostra Soalheira/300 m, 3,42 a 5,62 log UFC.g<sup>-1</sup> para Noruega/600m e 3,93 a 6,08 log UFC.g<sup>-1</sup> para Soalheira/600m. A população de fungos filamentosos variou de 4,57 a 6,00 log UFC.g<sup>-1</sup> para amostra Noruega/300m, 5,25 a 7,27 log UFC.g<sup>-1</sup> para amostra Soalheira/300 m, 6,02 a 7,87 log UFC.g<sup>-1</sup> para Noruega/600m e 6,00 a 7,60 log UFC.g<sup>-1</sup> para Soalheira/600m. Vilela et al. (2010) encontraram valores de contagem de bactérias de 3,70 a 7,00 log UFC.g<sup>-1</sup>, de leveduras de 3,36 a 7,87 log UFC.g<sup>-1</sup> e de fungos filamentosos de < 1,00 a 3,74 log UFC.g<sup>-1</sup> em café arábica.

Um total de 234 bactérias e 89 leveduras foram isoladas das amostras coletadas. Sendo que dos 234 isolados bacterianos, 10,25% eram gram negativos e 89,75% gram positivos. Nas amostras coletadas na face Noruega e altitude de 300 m, 77,7% eram cocos e 22,3% bacilos, na face Soalheira e altitude de 300 m, 62,7% eram cocos e 37,3% bacilos, na face Noruega e altitude de 600 m, 58,7% cocos e 41,3% bacilos, e na face Soalheira 600 m, 42,9% cocos e 57,1% bacilos. Silva et al. (2000) também encontraram alta porcentagem (80,4%) de bactérias gram-positivas em café arábica processado por via natural.

Todas as leveduras isoladas possuíram capacidade de fermentar glicose, galactose e sacarose. Apenas 3,4% não fermentaram maltose e 31,5% fermentaram xilose. Das 89 leveduras isoladas 66,3% fermentaram glicose nas primeiras 12h, 30,3% após 24h e 3,4% após 36h. Em relação à galactose 7% fermentaram nas primeiras 12h, 80,9% após 24h, 6,7% após 36h, 1,1% após 72h e 3,4% após 7 dias. Já para a sacarose, 44,9% fermentaram após 12h, 47,2% após 24h e 7,9% após 36h. Dos isolados, 40,4% fermentaram a maltose após 12h, 51,7% após 24h e 3,8% após 36h. Dos que fermentaram xilose, 9% fermentaram após 12h, 2,2% após 36h, 4,5% após 48h, 10,1% após 72h e 5,6% após 7 dias.

Estudos demonstraram que as leveduras dependem de fontes de carbono para seu crescimento e obtenção de energia, sendo os carboidratos os nutrientes de maior importância. Alguns açúcares simples como a glicose, frutose e manose são assimiladas pela maioria das espécies (AMORIM, 2005). Diferenças na fermentação e assimilação de carboidratos são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, pois estes microrganismos apresentam uma variação na habilidade de fermentação de açúcares (AMORIM, 2005).

### **5.2.2 Identificação dos isolados**

Os 323 isolados foram identificados por MALDI-TOF, os microrganismos não identificados foram submetidos à análise de sequenciamento. Dendogramas foram gerados com representantes de cada grupo de microrganismos (bactérias e leveduras) baseado em seus perfis proteicos (Apêndices A a H). As Tabelas 6 e 7 foram construídas com todas as espécies identificadas.











<i>Hanseniaspora uvarum</i>	KP010401.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.70
<i>Meyerozyma caribbica</i>	KY810496.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.00	3.20	3.15	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KX791358.1	2.00	2.90	2.00	2.48	-	-	3.15	2.41	3.71	2.66	3.30	3.18	3.61	4.54	
<i>Pichia cecembensis</i>	KJ706939.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Pichia guilliermondii</i>	EU816401.1	-	-	-	2.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Pichia kluyveri</i>	KY580407.1	-	2.00	-	-	-	-	3.20	-	-	-	-	2.00	-	-	

As espécies de leveduras *Candida dendronema*, *C. glabrata*, *C. orthopsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *Hanseniaspora opuntiae*, *H. uvarum*, *Meyerozyma caribbica*, *M. guilliermondii*, *Pichia cecembensis*, *P. guilliermondii* e *P. kluyveri* foram identificadas durante a fermentação do café (Tabela 6 e 7). As espécies *Meyerozyma caribbica* e *Meyerozyma guilliermondii* estiveram presentes em todas as amostras de cafés cultivadas nas diferentes faces e altitudes estudadas e a espécie *Pichia kluyveri* esteve presente somente nas amostras de cafés de altitude de 600 m em ambas as faces de exposição ao sol avaliadas, o que pode sugerir que essas espécies estão mais adaptadas a estes ambientes.

Algumas espécies estiveram presentes em apenas uma amostra de café estudada. *Candida glabrata* e *Pichia cecembensis* foram encontradas em amostras da face Noruega e altitude 300 m, *C. tropicalis* e *P. guilliermondii* em amostras da face Noruega e 600 m de altitude, *C. dubliniensis* e *C. parapsilosis* em amostras da face Soalheira e altitude de 300 m e *C. dendronema*, *H. opuntiae* e *H. uvarum* em amostras da face Soalheira e 600 m de altitude. *Candida tropicalis* e *C. parapsilosis* também foram identificadas por Pee e Castelein (1971) em café robusta processado por via natural. Esse gênero de levedura é muito encontrado em plantas (AVALLONE et al., 2001).

*Meyerozyma guilliermondii* foi a levedura mais frequente durante o processamento do café conilon por via natural (Tabela 6 e 7). Essa espécie já estava presente nos frutos recém-colhidos e permaneceu até o final do processo.

Estudos em café arábica avaliando os gêneros *Pichia*, *Candida* e *Meyerozyma* concluíram que as mesmas fornecem benefícios para o processamento devido a seu importante papel na degradação da mucilagem, rica em pectina, e também devido à sua capacidade de inibição do crescimento de fungos micotoxigênicos (MASOUD; JESPERSEN, 2006; SILVA et al., 2012; EVANGELISTA et al., 2014). A remoção da mucilagem por microrganismos facilita a secagem e produz metabólitos que se difundem para o interior dos grãos de café, responsáveis pelo sabor da bebida final (SILVA et al., 2012).

As espécies de bactérias *Acinetobacter pittii*, *A. radioresistens*, *Bacillus altitudinis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. shackletonii*, *B. subtilis*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *Citrobacter braakii*, *C. freundii*, *Dermacoccus nishinomiyaensis*, *Enterobacter asburiae*, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *E. ludwigii*, *Enterobacteriaceae bacterium*, *Enterococcus pallens*, *Escherichia vulneris*,

*Kosakonia cowanii*, *Lactobacillus oligofermentans*, *L. oris*, *L. paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Micrococcus luteus*, *M. yunnanensis*, *Pantoea agglomerans*, *P. ananatis*, *Pectobacterium parmentieri*, *Pseudomonas putida*, *Raoutella ornithinolytica*, *Salmonella* sp, *Staphylococcus cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. xylosus*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Streptomyces variabilis* foram identificadas durante a fermentação do café (Tabela 5). *Enterobacter*, *Enterobacteriaceae*, *Pantoea ananatis* e *Pantoea* sp. foram identificadas por Hamdouche et al. (2016) em cafés Robusta processados por via natural. O gênero *Enterobacter* é largamente encontrado no solo e água, é similar à *Erwinia*, porém não excreta pectinases (BALOWS et al., 1992).

O gênero *Staphylococcus* sp. esteve presente em todas as amostras avaliadas. *Escherichia vulneris* esteve presente nos cafés cultivados na face Noruega em ambas as altitudes estudadas. *Kosakonia cowanii* foi a espécie mais frequente, seguida por *B. cereus* e espécies do gênero *Staphylococcus* sp.

*Citrobacter freundii* e *C. braakii* estiveram presentes apenas nas amostras cultivadas na face Noruega, altitude de 300 m, e Soalheira, altitude de 600 m. O gênero *Citrobacter* é relatado por ter atividade pectinolítica (BALOWS et al., 1992). O gênero *Bacillus* sp. é encontrado em solos. Esse gênero possui capacidade de secretar enzimas como celulases, amilases e proteases, que podem ser importantes para o processo fermentativo (SORIANO et al., 2000).

Algumas espécies estiveram presentes apenas em uma amostra, *Bacillus pumilus*, *Stenotrophomonas maltophilia* e o gênero *Lactobacillus* sp. na face Noruega e altitude 300 m, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus safensis*, *Dermacoccus nishinomiyaensis*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacteriaceae bacterium*, *Salmonella* sp. e *Streptomyces variabilis* em Noruega/600 m, *Bacillus shackletonii*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *Micrococcus luteus* e *Micrococcus yunnanensis* em Soalheira/300 m e *Acinetobacter pittii*, *Enterococcus pallens* e *Pseudomonas putida* em Soalheira/600 m. *Cellulosimicrobium cellulans* tem alta capacidade de liberação de enzimas como celulases e xilanases (SONG; WEI, 2010). *Pseudomonas* é um fitopatógeno, encontrado em plantas, principalmente em folhas (BALOWS et al., 1992).

### 5.3 Análise de ácidos orgânicos e açúcares

Foram encontrados nas amostras de café, durante a fermentação, somente o ácido acético e succínico (Figura 7 e 8). Os ácidos butírico, cítrico, láctico, málico, oxálico, propiônico e tartárico não foram detectados.

O ácido acético foi identificado em todas as amostras e em todos os tempos de fermentação e variou de 0,76 a 6,54 mg.g<sup>-1</sup> para Noruega 300m, 1,40 a 6,06 mg.g<sup>-1</sup> para Noruega 600m, 0,69 a 6,71 mg.g<sup>-1</sup> para Soalheira 300m e 0,45 a 3,34 mg.g<sup>-1</sup> para Soalheira 600m (Figura 7).

Para as amostras colhidas nas faces Noruega e Soalheira, na altitude de 300 m, observou-se um aumento no final da fermentação (Figura 7). Normalmente, o ácido acético é mais acumulado durante a fermentação/secagem em temperaturas ambientais mais quentes (>22°C) (EVANGELISTA et al., 2014). A temperatura variou durante os dias de fermentação/secagem entre 18 e 31,5°C (Tabela 2), principalmente nos últimos dias de fermentação (média de 30°C) o que provavelmente influenciou o acúmulo de ácido acético.

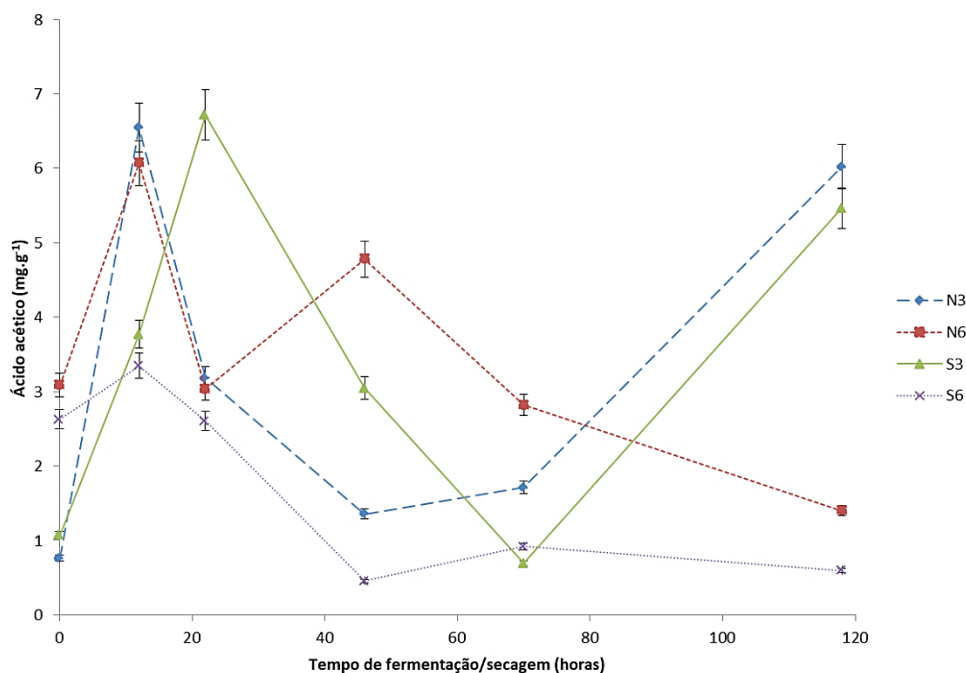


Figura 7- Ácido acético presente durante fermentação do café. N3: Noruega 300 m, N6: Noruega 600 m, S3: Soalheira 300 m, S6: Soalheira 600 m.



A produção de ácido acético é um processo metabólico aeróbico que pode ser de origem bacteriana ou produto da oxidação espontânea do etanol produzido por leveduras. As bactérias presentes na superfície do café produzem este ácido, que pode então difundir para a polpa e mucilagem, podendo interferir na qualidade sensorial da bebida (SILVA et al, 2012).

O ácido succínico foi identificado em todas as amostras e em todos os tempos de fermentação e variou de 0,12 a 0,61 mg.g<sup>-1</sup> para Noruega 300m, 0,21 a 0,84 mg.g<sup>-1</sup> para Noruega 600m, 0,05 a 0,47 mg.g<sup>-1</sup> para Soalheira 300m e 0,13 a 0,66 mg.g<sup>-1</sup> para Soalheira 600m. Cabe destacar que para as amostras da face Noruega, em ambas as altitudes, houve um aumento na concentração de ácido entre o tempo de fermentação de 70 e 120 h (Figura 8).

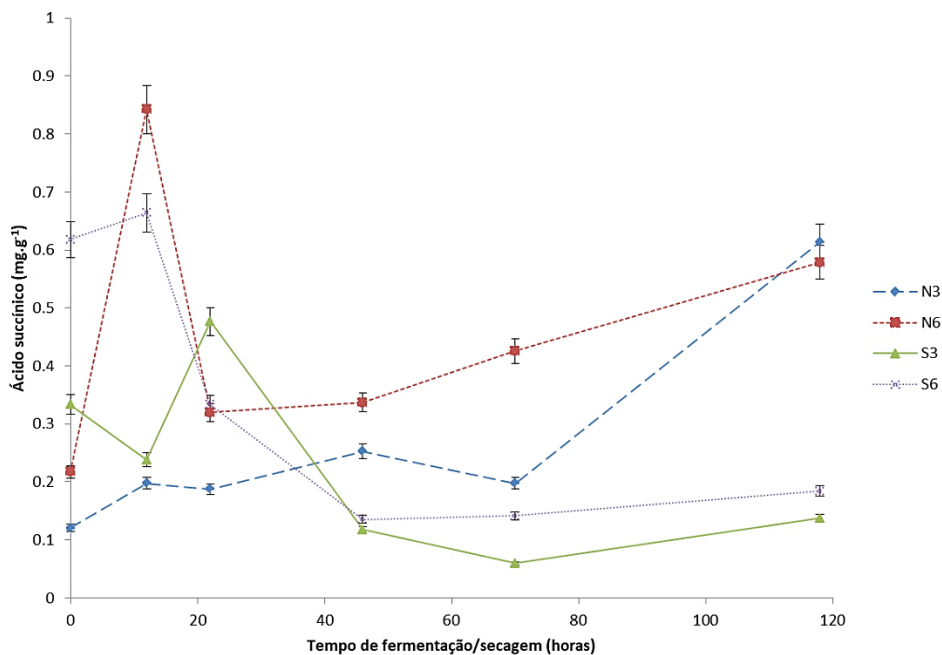


Figura 8 - Ácido succínico presente durante fermentação do café. N3: Noruega 300 m, N6: Noruega 600 m, S3: Soalheira 300 m, S6: Soalheira 600 m.

O ácido succínico está naturalmente presente no fruto de café ou pode ser produzido por *Bacillus* spp. (SILVA et al., 2012) e por bactérias lácticas heterofermentativas (SWIEGERS et al., 2005), que foram identificadas no presente estudo.

É importante observar que a simples presença dos ácidos orgânicos não é responsável pela interferência na qualidade final da bebida, mas sim suas concentrações. Neste estudo, a maior concentração de ácido acético observada foi de  $6,06 \text{ mg.g}^{-1}$  e a maior concentração de ácido succínico foi de  $0,61 \text{ mg.g}^{-1}$ .

A análise de açúcares permitiu o acompanhamento da concentração de sacarose, frutose e glicose durante a fermentação do café (Figuras 9, 10 e 11).

Observa-se que houve variação nas concentrações de sacarose de  $0,68$  a  $5,30 \text{ mg.g}^{-1}$  (Figura 9), frutose de  $1,30$  a  $4,60 \text{ mg.g}^{-1}$  (Figura 10) e glicose de  $0,24$  a  $1,25 \text{ mg.g}^{-1}$  (Figura 11) ao longo da fermentação.

Pode-se observar, em média, aumento de 50% nas concentrações de açúcares no tempo de 12 h em relação ao tempo de 0h, em todas as amostras (Figuras 9, 10 e 11). Isso pode ser devido à grande variação de umidade do fruto durante a secagem fazendo com que a concentração de açúcares no fruto variasse em proporção. Também pode ser explicado pela atividade microbiana no café, uma vez que os microrganismos secretam enzimas, como pectinases, importantes na transformação da polpa e mucilagem em açúcares menores.

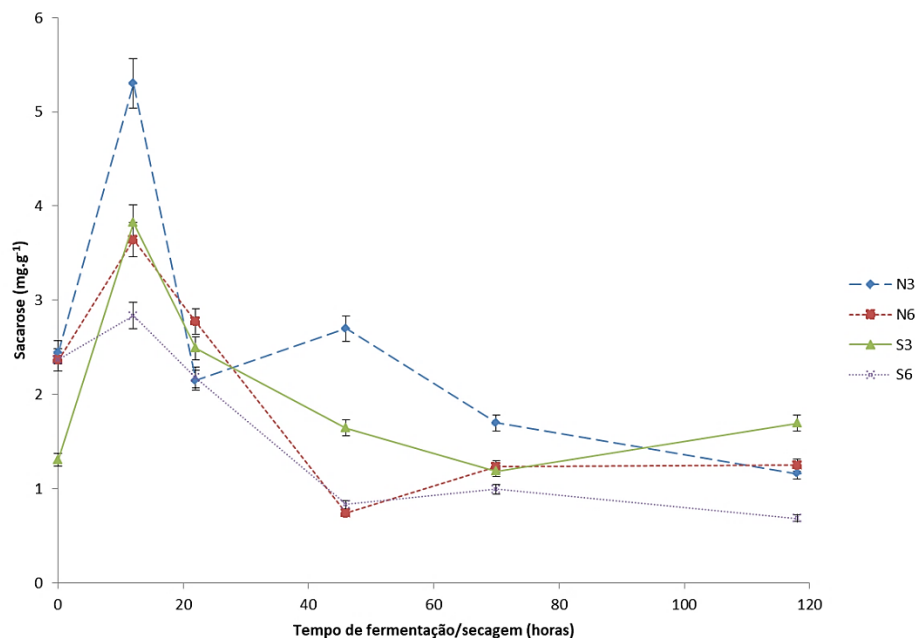


Figura 9- Sacarose presente durante fermentação do café. N3: Noruega 300 m, N6: Noruega 600 m, S3: Soalheira 300 m, S6: Soalheira 600 m.

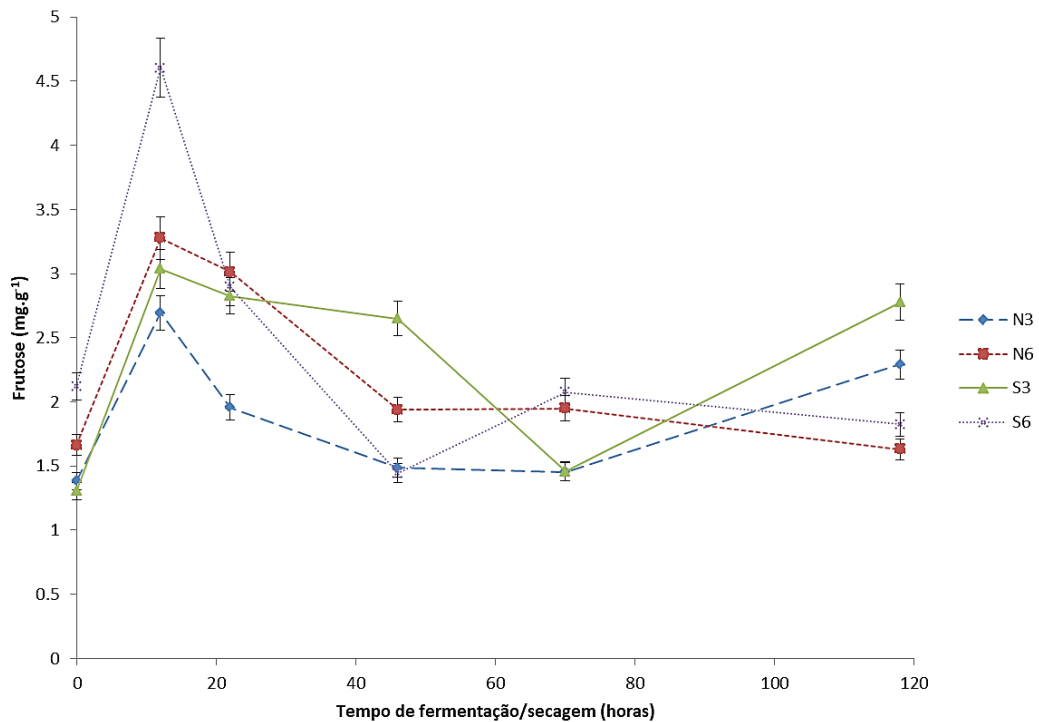


Figura 10- Frutose presente durante fermentação do café. N3: Noruega 300 m, N6: Noruega 600 m, S3: Soalheira 300 m, S6: Soalheira 600 m.

Houve grande variação na concentração de glicose durante a fermentação, sem apresentar uma tendência (Figura 11). Em algumas amostras e tempos de fermentação, houve um aumento na concentração de glicose enquanto a concentração de sacarose diminuía. Na amostra Soalheira 300 m, por exemplo, houve um aumento na concentração de glicose no tempo de fermentação de 22h e diminuição na concentração de sacarose respectivamente. Isso pode ser devido à hidrólise da sacarose em glicose, pelos microrganismos, fazendo com que sua concentração aumentasse em alguns pontos, enquanto que a concentração da sacarose diminuía.

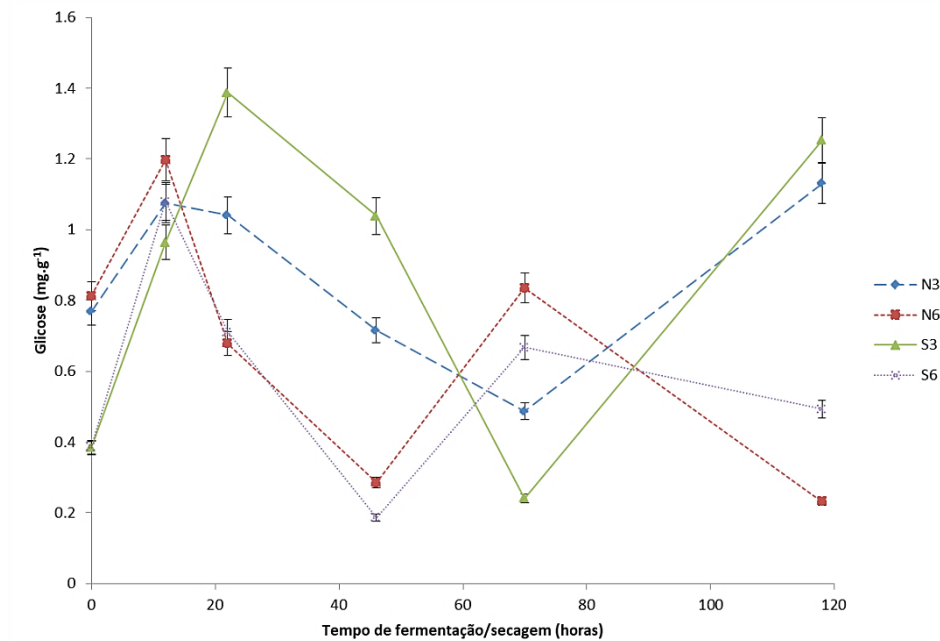


Figura 11- Glicose presente durante fermentação do café. N3: Noruega 300 m, N6: Noruega 600 m, S3: Soalheira 300 m, S6: Soalheira 600 m.

Os açúcares da polpa fornecem os substratos necessários para que ocorra a fermentação microbiana e conseqüentemente a formação de metabólitos importantes (SILVA et al., 2012). Em geral, os microrganismos consomem primeiro o substrato que é facilmente metabolizado, como um monossacarídeo (glicose e frutose), antes de hidrolisar um polissacarídeo (sacarose).

#### 5.4 Análise de compostos voláteis

Quarenta compostos voláteis foram detectados nas amostras de café torrado (Tabela 8), dentre estes compostos, 19 na amostra Noruega/300 m, 25 na amostra Soalheira/300m, 24 na Noruega/600 m e 13 na Soalheira/600 m.

Tabela 8- Porcentagem relativa de compostos voláteis identificados no café torrado.

Compostos voláteis	N300			S300		N600		S600	
	IK Tabelado	IK calculado	Área (%)	IK calculado	Área (%)	IK calculado	Área (%)	IK calculado	Área (%)
1,4-Dimetoxi-2-metilbenzeno	<b>1273</b>	nd	nd	nd	nd	1273	1,22	nd	nd
1-Acetoxibutan-2-ona	<b>971</b>	972	1,25	nd	nd	970	0,01	nd	nd
2,2,4,6,6-Pentametilheptano	<b>1319</b>	nd	nd	1319	0,46	nd	nd	nd	nd
2,3,5-trimetilpirazina	<b>999</b>	nd	nd	nd	nd	995	2,31	nd	nd
2,3-Dimetilpirazina	<b>920</b>	nd	nd	nd	nd	914	1,19	nd	nd
2,5-Dimetilpirazina	<b>911</b>	909	7,03	nd	nd	902	4,40	909	6,39
2,6-Dietil-3-metilpirazina	<b>1256</b>	1256	1,00	1256	1,46	nd	nd	nd	nd
2,6-Dimetilpirazina	<b>912</b>	nd	nd	908	8,48	904	7,81	914	10,22
2-3 Metiltetrahidrofurano	<b>806</b>	809	1,62	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-Etil-3,6-dimetilpirazina	<b>1072</b>	1177	4,41	1177	6,93	1175	3,48	1177	3,17
2-etil-3-metilpirazina	<b>1001</b>	996	13,89	996	20,36	992	2,13	nd	nd
2-Etil-5-metilpirazina	<b>995</b>	nd	nd	nd	nd	994	2,51	nd	nd
2-Furanilmetanol	<b>866</b>	863	7,09	863	5,36	857	7,14	863	9,85
2-Hexiloct-1-eno	<b>1360</b>	nd	nd	1360	0,28	nd	nd	nd	nd
2-Metilpirazina	<b>826</b>	826	6,89	825	7,58	816	7,97	825	6,59
2-Pirrolcarboxaldeido	<b>1023</b>	nd	nd	nd	nd	1008	0,11	nd	nd
3-Metiltridecano	<b>1364</b>	nd	nd	1364	0,25	nd	nd	nd	nd
4-Etenil-2-metoxifenol	<b>1311</b>	1309	3,39	1308	2,68	1306	11,68	1309	12,70
5-Metilfurfural	<b>962</b>	965	4,81	965	4,07	962	5,73	965	10,62
Acetoxiacetona	<b>870</b>	871	3,33	871	2,39	871	2,44	876	3,22
alfa-Copaeno	<b>1376</b>	nd	nd	1368	0,24	nd	nd	nd	nd
bis(2-Etilexil) éter	<b>1345</b>	nd	nd	1345	0,55	nd	nd	nd	nd
Cafeína	<b>1837</b>	1857	0,23	1856	0,41	1853	3,06	1922	0,76
Diocil éter	<b>1657</b>	1658	1,43	nd	nd	nd	nd	1658	8,69

Dodecan-1-ol	<b>1385</b>	nd	nd	1385	0,26	nd	nd	nd	nd
Éter salicílico	<b>1366</b>	nd	nd	1366	0,30	nd	nd	nd	nd
Etilpirazina	<b>906</b>	nd	nd	nd	nd	908	3,68	nd	nd
Furfural	<b>830</b>	838	9,81	837	8,33	830	4,70	838	4,96
Heptan-2-ol	<b>900</b>	nd	nd	900	1,22	nd	nd	900	2,51
Hexametil-piranoindano	<b>1861</b>	1861	0,53	nd	nd	nd	nd	nd	nd
n-Dodecano	<b>1295</b>	1295	1,77	1295	1,77	nd	nd	nd	nd
N-Furfurilpirrol	<b>1166</b>	1280	1,46	1280	1,53	1178	1,64	1180	2,31
n-Undecano	<b>1196</b>	1196	1,19	1196	1,83	nd	nd	nd	nd
Pentadecano	<b>1392</b>	nd	nd	1392	0,38	nd	nd	nd	nd
Pirazina	<b>1196</b>	nd	nd	nd	nd	1196	0,68	nd	nd
Piridina	<b>1181</b>	1181	3,81	1181	0,91	nd	nd	nd	nd

N: Noruega, S: Soalheira.\*nd = não detectado.

Os cromatogramas referentes aos compostos voláteis entre as amostras avaliadas foram diversificados (Figura 13). Nota-se que na altitude de 300 m, os picos foram mais elevados do que na altitude de 600 m.

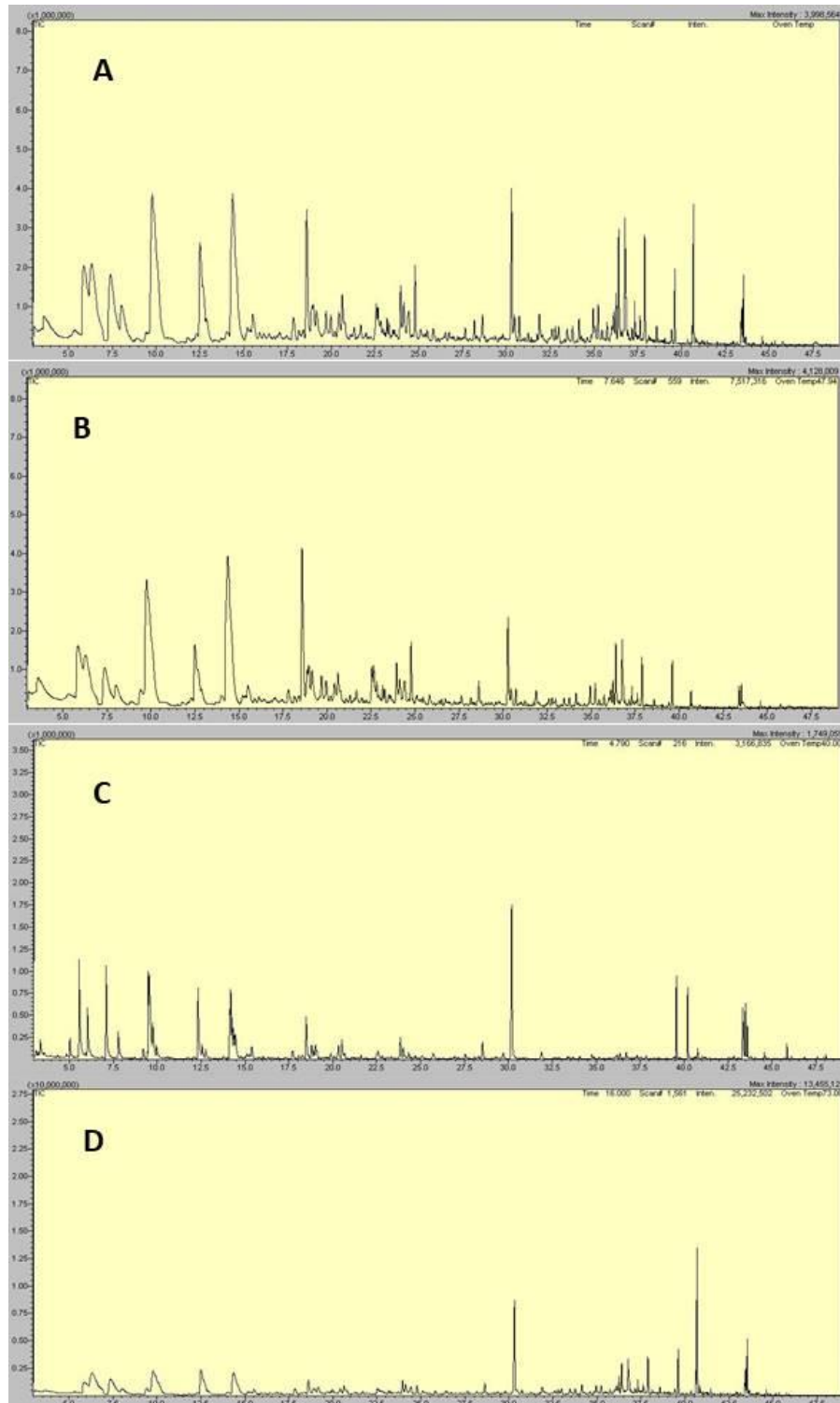


Figura 12- Cromatogramas do café. A: Noruega 300 m; B: Soalheira 300 m; C: Noruega 600 m; D: Soalheira 600 m.

Alguns compostos foram identificados apenas em uma das altitudes: Piridina, n-Undecano, 2,6-Dietil-3-metilpirazina e n-Dodecano nos cafés de 300 m e Heptan-2-ol na altitude de 600 m. Os compostos 2-Metilpirazina, Furfural, 2-Furanilmetanol, 5-Metilfurfural, 4-Etenil-2-metoxifenol, Acetoxiacetona e Cafeína foram detectados em todas as amostras. Sendo que 4-Etenil-2-metoxifenol na altitude de 600 m obteve uma porcentagem de área quatro vezes maior (11,68 e 12,80%) comparada à altitude de 300 m (3,39 e 2,68%) e 2-etil-3metilpirazina na altitude de 300 m (13,89 e 20,36%) foi superior comparado a altitude de 600 m (2,13% e nd).

Os compostos éter salicílico, 2,2,4,6,6-Pentameteptano, bis(2-Etilexil) éter, 2-Hexiloct-1-eno, 3-Metiltridecano, alfa-Copaeno, Dodecan-1-ol e Pentadecano foram detectados apenas na amostra de café da face Soalheira e 300 m de altitude e 2-metilpropanoato, Pirazina, Penta-2,4-dienonitrila, 2-metil-3-oxo-tetraidrofurano, Etilpirazina, 2,3-Dimetilpirazina, 2-Etil-5-metilpirazina, 2,3,5-trimetilpirazina, 2-Etil-3metilpirazina, 2-Pirrolcarboxaldeido e 1,4-Dimetoxi-2-metilbenzeno foram detectados apenas na amostra de café da face Noruega e 600 m de altitude.

Observa-se que os compostos voláteis citados foram identificados nos pontos extremos das quatro amostras avaliadas, Soalheira 300 m, onde a temperatura ambiente é mais elevada e, Noruega 600 m, onde a temperatura é mais baixa. O que pode indicar que esses compostos são influenciados pela altitude e face exposição ao sol, principalmente devido a diferenças no microclima que propicia melhores condições fisiológicas à planta.

Fatores ambientais, como temperaturas mais baixas recorrentes em maiores altitudes, associados a eventos fisiológicos são relatados na literatura e fornecem indícios para explicar as diferenças encontradas para as variáveis químicas (VAAST et al., 2006; GEROMEL et al., 2008).

Os dois fatores que contribuem para a formação de compostos voláteis no café são os metabólitos microbianos formados durante a fermentação e os compostos inerentes aos grãos (YERETZIAN et al., 2002). Os compostos voláteis identificados nos grãos de café torrado diferiram entre as amostras estudadas (Figura 12). A microbiota envolvida durante o processamento do café e as variáveis altitude e face de exposição ao sol podem ter influenciado nessa diferença.

Algumas espécies de microrganismos apareceram somente em algumas amostras (Tabela 5), como por exemplo o gênero *Lactobacillus* sp. na face Noruega e altitude 300 m. *Bacillus altitudinis*, *B. safensis*, *Dermacoccus nishinomiyaensis*,



*Enterobacter hormaechei*, *Enterobacteriaceae bacterium*, *Salmonella* sp. e *Streptomyces variabilis* em Noruega/600 m. *Bacillus shackletonii*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *Micrococcus luteus* e *Micrococcus yunnanensis* em Soalheira/300 m e *Acinetobacter pittii*, *Enterococcus pallens* e *Pseudomonas putida* em Soalheira/600 m, o que pode ter influenciado nessa variação de compostos.

Os compostos de maiores áreas foram 2-Metilpirazina, Furfural, 2-Furanilmetanol, 2,5-Dimetilpirazina, 4-Etenil-2-metoxifenol, 2,6-Dimetilpirazina e 2-etil-3metilpirazina. Esses compostos contribuem para o aroma do café. Furfural confere aroma de caramelo e amargo ao café, 2-metilpirazina é responsável por uma sensação adstringente semelhante à avelã, 2,5-Dimetilpirazina confere aroma doce, de noz, torrado e grama ao café (FLAMENT, 2002).

Alguns compostos são conhecidos por desempenhar um papel no desenvolvimento do aroma durante a fermentação, como os ésteres que foram detectados nas amostras. A presença de furanos e cetonas contribuem para a produção de aromas de frutos cítricos e herbáceos, e podem fornecer notas de ervas ou frutas, enquanto as cetonas são descritas como aromas de manteiga, caramelo, notas frutadas ou semelhantes a cogumelos (LÓPEZ-GALILEA et al., 2006)

Os mecanismos da formação do aroma do café são extremamente complexos, e há uma ampla gama de interações entre todos os caminhos envolvidos. Reações de Maillard ocorrem entre carboidratos e proteínas e são responsáveis pela formação de muitos compostos voláteis durante a torrefação (LÓPEZ-GALILEA et al., 2006). A reação de Maillard é a principal via de formação do aroma do café, pois é responsável pela geração de várias classes de compostos que influenciam no aroma, como pirazinas, pirróis, tióis, furanonas, piridinas e tiofenos (LEE et al., 2015).

## 6 CONCLUSÃO

Este estudo contribuiu para um melhor entendimento da microbiota presente durante o processamento natural do café conilon e como a altitude e face de exposição ao sol exercem influência sobre estes microrganismos.

Os ácidos acético e succínico foram identificados nas amostras e estão relacionados com microrganismos presente durante a fermentação. A concentração de sacarose, frutose e glicose variou durante o processo de fermentação, devido ao consumo pelos microrganismos e também a variação da umidade.

Os compostos voláteis identificados foram diversificados entre as amostras, principalmente entre as altitudes estudadas, a microbiota envolvida durante o processamento do café também pode ter influenciado nessa diferença.

A avaliação da microbiota presente em cafés conilon provenientes de diferentes altitudes e faces de exposição ao sol é importante para o conhecimento das espécies microbianas presentes durante o processamento via natural no estado do Espírito Santo, uma vez que esses estudos são escassos na literatura científica.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABIC. Associação Brasileira da Indústria Brasileira de Café solúvel. **Relatório do café Solúvel do Brasil, 2016.** Disponível em: <<http://www.abics.com.br/secao/informacoes/estatisticas/>>. Acesso em 8 de fev de 2018.
- ABICS. Associação Brasileira da Indústria Brasileira de Café solúvel. **Relatório do café Solúvel do Brasil, 2018.** Disponível em: <<http://www.abics.com.br/secao/informacoes/estatisticas/>>. Acesso em 8 de fev de 2018.
- ALVES, H. M. R. et al. Características ambientais e qualidade da bebida dos cafés do estado de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 32, p. 18-29, abr. 2011.
- AMORIM, H. V. Estado nutricional do cafeeiro e qualidade da bebida. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 43, n. 2, p. 93-102, 1968.
- AMORIM, H. V; LEÃO, R. M. Fermentação alcoólica: Ciência e tecnologia, Piracicaba: Fermentec, 448 p., 2005.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International**, ed. 16. Gaithersburg, Maryland, USA: AOAC International, 1995.
- ARUNGA, R. O. Coffee. In: ROSE, A. H. (Ed.). **Economic microbiology: fermented foods**. Amsterdam: Elsevier, p. 259-279, 1882
- AVALLONE, S., GUYOT, B., BRILLOUET, J.-MARC, OLGUIN, E., GUIRAUD, J.-Pierre. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. **Current Microbiology** v. 42, p. 252–256, 2001.
- AVALLONE, S. et al. Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 191–198, 2002.
- BALOWS, A., TRUPER, H. G., DWORKIN, M., HARDER, W., SCHLEIFER, K. H. (Eds.). **The Prokaryotes**. Springer, Berlin, p. 4126, 1992.
- BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3.ed. EUA: Cambridge University, 2000. 1139 p.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; SILVA, C. F.; CIRILLO, M.; VARGA, E. A.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F. Ocratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, Kidlington Oxford, United Kingdom, DOI 10.1016, 2008.

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

BIOSCI, M. A. **Biotechnology biochemical**. Cambridge: Cambridge University, 1043 p, 1993

BITANCOURT, A. A. As fermentações e podridões da cereja de café. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, São Paulo, p. 1179- 1184, 1957.

BLANCO, P.; SIEIRO, C.; VILLA, T.G. Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, Netherlands, v. 45, n. 1, p. 1-9, 1999.

BORÉM, F. M. **Pós-colheita do café**. Lavras: Ed. UFLA, p. 129-156, 2008.

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

BRAHAM, J. E. BRESSANI, R. **Coffea pulp: composition, technology, and utilization**. Ottawa, 95p, 1979.

CECAFE. Conselho dos exportadores de café do Brasil. **Relatório mensal, 2018**. Disponível em <<http://www.cecafe.com.br>> Acesso em 8 de Jan de 2018.

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

CHARRIER, A.; BERTHAAUD, J. Botanical classification of coffee. In: CLIFFORD, M.N.; WILSON, K.C. (Ed.). **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. London: Croom Herm, p. 13-47, 1985.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Café, Safra 2017. **Monitoramento Agrícola, primeiro levantamento**, v. 5, n. 1, p. 1-72, 2018.

COVRE, A. M.; RODRIGUES, W. P.; VIEIRA, H. D.; BRAUN, H.; RAMALHO, J. C.; PARTELLI, F. L. Nutrient accumulation in bean and fruit from irrigated and non-irrigated *Coffea canephora* cv. Conilon. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 28, p. 402-409, 2016.

DE MELO PEREIRA, G. V. et al. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 60–66, 2014.

DE MELO PEREIRA, G. V. et al. Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. **Food Research International**, v. 75, p. 348–356, 2015.

ECCARDI, F.; SANDALJ, V. **Coffee: a celebration of diversity**. Trieste: Sandalj Eccardi, 228 p, 2002.

ELÍAS, L. G. Composición química de la pulpa de café y otros subproductos. In: BRAHAM, J. E.; BRESSANI, R. (Ed.). **Pulpa de café: composición, tecnología y utilización**. Panamá: INCAP, p. 19-29, 1978.

EMBRAPA. Produção de café cereja descascado - Equipamentos e custo de processamento. **Comunicado técnico**. n. 4, 16 p., 2013.

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

EVANGELISTA, S. R. Avaliação da microbiota presente no processamento úmido do café, e do uso de culturas iniciadoras no processamento natural e semi-seco. **Tese (Doutorado em Ciência dos alimentos)**, Universidade Federal de Lavras, p. 184, 2014.

EVANGELISTA, S. R. et al. Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. **Food Research International**, v. 61, p. 183–195, 2014.

EVANGELISTA, S. R. et al. Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 210, p. 102–112, 2015.

FARAH, A.; MONTEIRO, M. C.; CALADO, V.; FRANCA, A. S.; TRUGO, L. C. Correlation between cup quality and chemical attributes os Brazillian coffe. **Food Chemical**, Kidlington Oxford, United Kingdom v. 98, n. 2, p. 373-380, 2006.

FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G.; DE MUNER, L. H.; VERDIN FILHO, A. C.; VOLPI, P. S.; MARQUES, E. M. G.; ZUCATELI, F. **Café conilon: técnicas de produção com variedades melhoradas**. 3. ed. Vitória: INCAPER, 2007, 60p. (INCAPER. Circular Técnica, 03-I).

FLAMENT, I. **Coffee Flavor Chemistry**. Chichester, Inglaterra: Ed. Wiley, 2002.

FONSECA, A. F. A. et al. Manejo da cultura do café conilon: espaçamento, densidade de plantio e podas. In: FERRÃO, R.G.; FONSECA, A. F. A.; BRAGANÇA, S. M.; FERRÃO, M. A. G.; DEMUNER, L.H. (Ed.). **Café conilon**. Vitória: INCAPER, p. 259-277, 2007.

FOOD DRUGS ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. EUA, ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). International, 1972. 187 p.

GEROMEL, C. et al. Effects of shade on the development and sugar metabolism of coffee (*Coffea arabica* L.) fruits. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46 p. 569-579, 2008.

GLAZAR, E. **Brava gente polonesa**: memórias de um imigrante, formação histórica de São Gabriel da Palha e expansão do café conilon no Espírito Santo. Vitória: Flor & Cultura, 207 p, 2005.

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

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

INCAPER. Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural. Disponível em: <<https://incaper.es.gov.br/cafeicultura-conilon>> Acesso em 8 de Fev de 2018.

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

LAVIOLA, B. G. et al. Assimilates allocation in fruits and leaves of coffee plants cultivated in two altitudes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 11, p. 1521-1530, 2007.

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

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

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

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 8 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997.

MASSAWE, G. A.; LIFA, S. J. Yeasts and lactic acid bacteria coffee fermentation starter cultures. **International Journal of Postharvest Technology and Innovation**, Genève, v. 2, n. 1, p. 41-82, 2010.

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

MAURI, R. Adubação do café conilon irrigado por gotejamento: fertirrigação x fertilizantes de eficiência aprimorada. **Tese (Doutorado em Engenharia de Sistemas Agrícolas) Universidade de São Paulo**, p. 93, 2016.

MENCHÚ E., J. F.; ORTEGA, E. Correlación entre algunas propiedades físicas del café tostado y su calidad inherente. **Agronomía**. n. 2, p. 9–19. 1971.

MENDES, L. C. **Estudos para determinação das melhores Formulações de blends de café arábica (*C. arabica*) com Café robusta (*C. canephora* Conilon) para uso no setor de Cafés torrados e moídos e de cafés espresso**. 2005. 196f. Tese (Doutorado em tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2005.

MENEZES, H. C. The relationship between the state of maturity of raw coffee beans and the isomers of caffeoylquimic acid. **Food Chemistry**, Oxford, v. 50, n. 3, p. 293-296, June 1994.

MONAKHOVA, Y. B. et al. Rapid approach to identify the presence of Arabica and Robusta species in coffee using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 182, p. 178–184, 2015.

OIC. Organização Internacional do Café. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.ico.org/prices>> Acesso em 8 de Fev de 2018.

OLIVEIRA, M., et al. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Research Microbiology**, n. 166, p. 102–110, 2015.

PEE, W. van; CASTELEIN, J. M. The yeasts flora of fermenting robusta coffee. **East African Agricultural and Forestry Journal**, Nairobi, v. 26, n.3, p. 308-310, 1971.

PERDERSON, C. S.; BREED, R. S. **Fermentation of coffee**. Oxford: Food Research, v. 11, 99 p, 1946.

PIMENTA, C. J. **Qualidade de café**. Lavras, MG: UFLA, 297 p, 2003.

SALAZAR, G. M. R.; RIAÑO, H. N. M.; ARCILA, P. J.; PONCED, C. A. Estudio morfológico, anatómico y ultraestructural del fruto de café *Coffea arabica* L. **Cenicafé**, Colômbia, v. 45, n. 3, p. 93-105, 1994.

SANTOS, R. A. **Monitoramento de Parâmetros Físico-Químicos na Pós Colheita de Café Arábica (*Coffea arabica* L.) colhido em Diferentes Estádios de Maturação**. 2008. 170f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008.

SCHMIDT, H. C.; DE MUNER, L. H.; FORNAZIER, M. J. (Ed.) **Cadeia produtiva do café arábica da agricultura familiar no Espírito Santo**. Vitória: INCAPER, 52 p, 2004.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Mixed microbial fermentations of chocolate and coffee. In: Boekhout, T., Robert, V. (Ed.), **Yeasts in Food**. Behr's Verlag, Hamburg, 2003, p.426–459.

SEDIYAMA, G. C. et al. Zoneamento agroclimático do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) para o Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Passo Fundo, v. 9, n. 3, p. 501-509, 2001.

SILVA, C. F. et al. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 2–3, p. 251–260, 2000.

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

SILVA, R. F. et al. Altitude e a qualidade do café cereja descascado. **Revista Brasileira de Armazenamento Especial Café**, Viçosa, n. 9, p. 40-47, 2006.

SILVA, C. F. et al. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 8, p. 951-957, 2008.

SILVA, C. F., VILELA, D. M., SOUZA, C. C., DUARTE, W. F., DIAS, D. R., SCHWAN, R. F. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 29, p. 235–247, 2012.

SILVA, C. F. et al. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 235–247, 2013.

SILVA, C. F. Microbial activity during coffee fermentation. In: R. F. Schwan, & G. H. Fleet (Eds.), **Cocoa and Coffee Fermentations**. New York, CRC Press, p. 398-423, 2014.

SMITH, A. W. Introduction. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. *Coffea*: Chemistry. **New York: Elsevier Applied Science**, v.1, cap. 1, p. 1-41, 1985

SONG, J. M., WEI, D. Z. Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 12, p. 1930-1934, 2010.

SORIANO, M., BLANCO, A., DIAZ, P., JAVIER PASTOR, F. I. An usual pectate lyase from a *Bacillus* sp. with high activity on pectin: cloning and characterization. **Microbiology (UK)** p. 89-95, 2000.



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

VAAST, P.; BERTRAND, B.; PERRIOT, J. J.; GUYOT, B.; GÉNARD, M. Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 86, p. 197-204, 2006

VAUGHN, R. H.; CAMARGO, R. De; FALLANGE, H.; MELLO AYRES, G.; SERGEDELLO, A. Observations on the microbiology of the coffee fermentation in Brazil. **Food Technology**, Chicago, v. 12, n. 2, p. 12-57, 1958.

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

VILELA, D. M. Isolamento e caracterização convencional e molecular por ARDRA e DGGE da microbiota associada ao café despulpado (*Coffea arabica* L.). **Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras**, p. 86, 2009.

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

VILELA, D. M. Seleção in vitro de culturas iniciadoras para fermentação de frutos de café (*Coffea arabica* L.) processados via seca e semi-seca. **Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras**, p. 82, 2011.

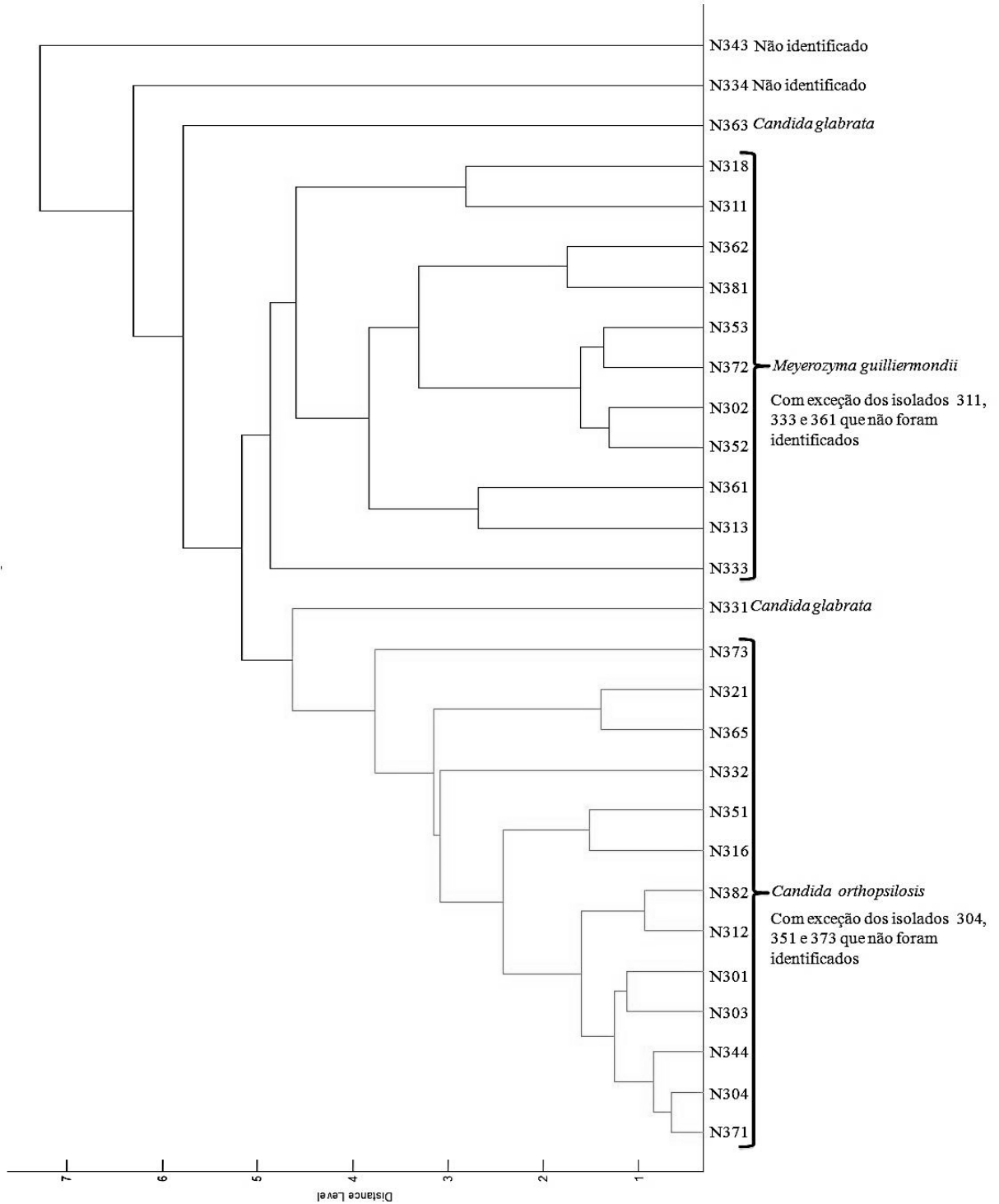
WALT, J. P. van der; YARROW, D. Methods for isolation maintenance, classification and identification of yeasts. KREGER-VAN RIJ, NJW (Ed.). **The Yeasts: a taxonomy study**. Amsterdam: Elsevier Science, 1984.

YERETZIAN, C., JORDAN, A., BADOUD, R., LINDINGER, W. From the green bean to the cup of coffee: investigating coffee roasting by on-line monitoring of volatiles. **European Food Research and Technology**, v. 214, p. 92–104, 2002

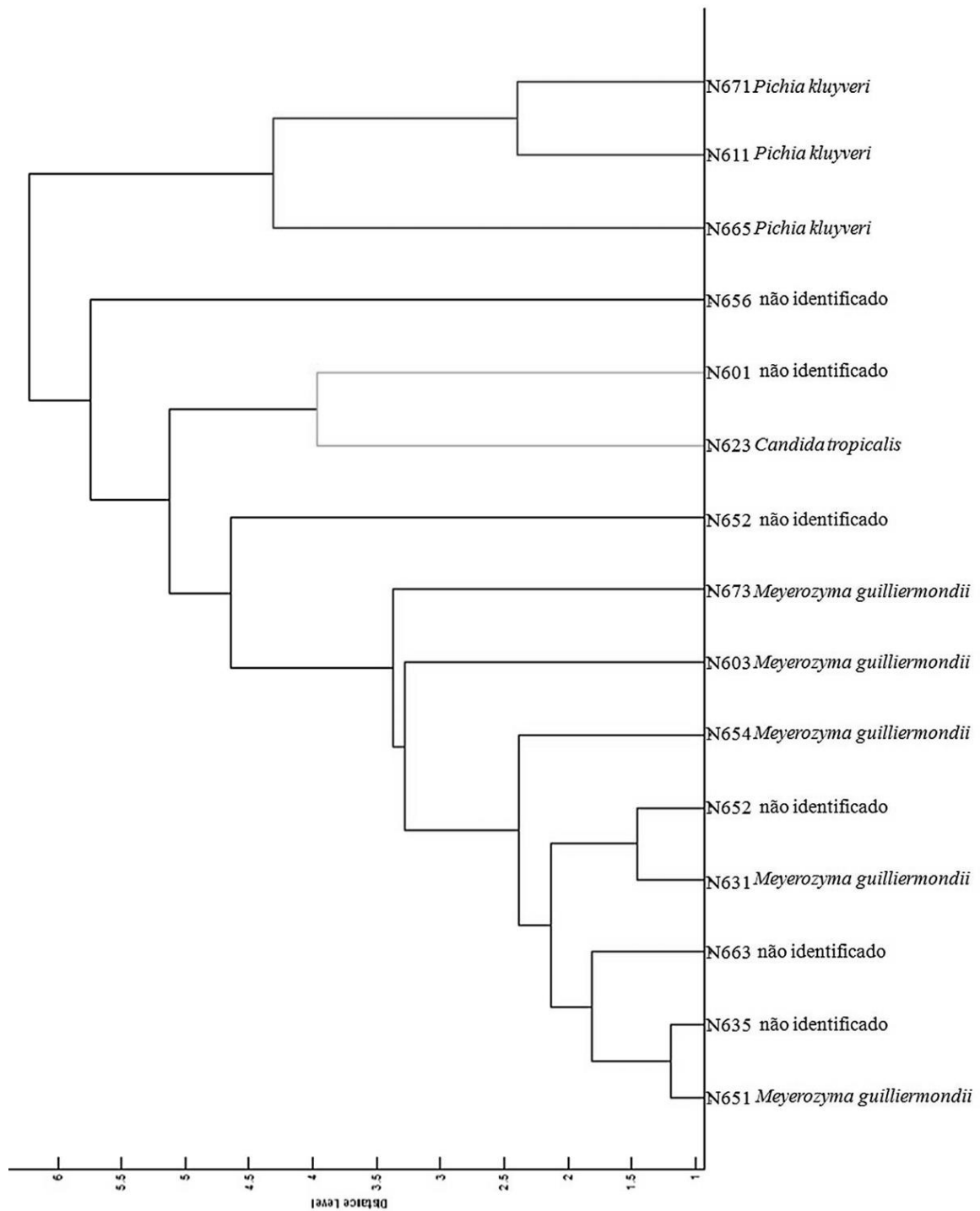
Z Aidan, U. R. et al. Ambiente e variedades influenciam a qualidade de cafés das matas de minas. **Coffee Science**, Lavras, v. 12, n. 2, p. 240-247, 2017.

## APÊNDICES

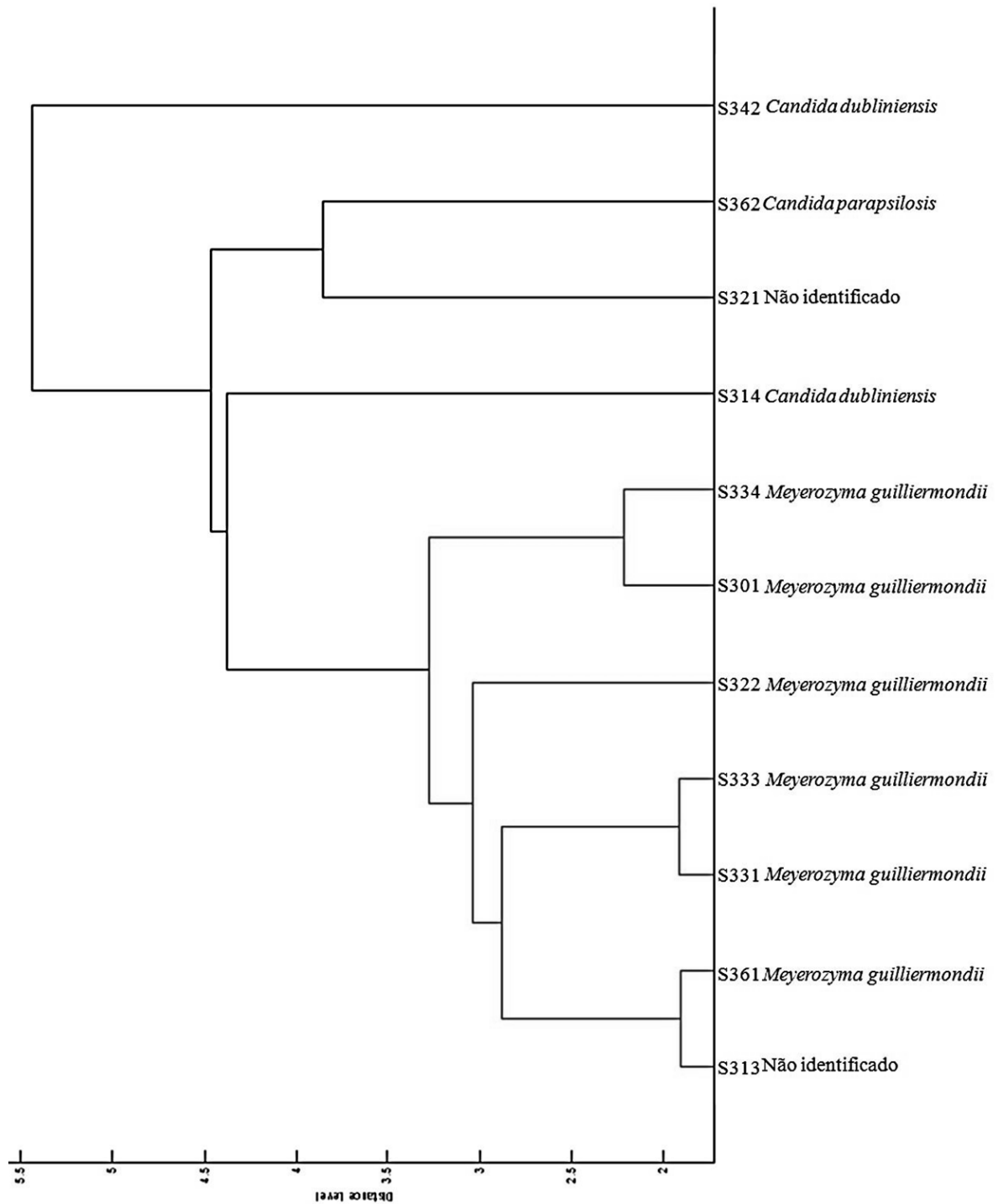
APÊNDICE A- Dendograma das cepas de leveduras identificadas durante a fermentação de café cultivado em Face Noruega e altitude de 300 m.



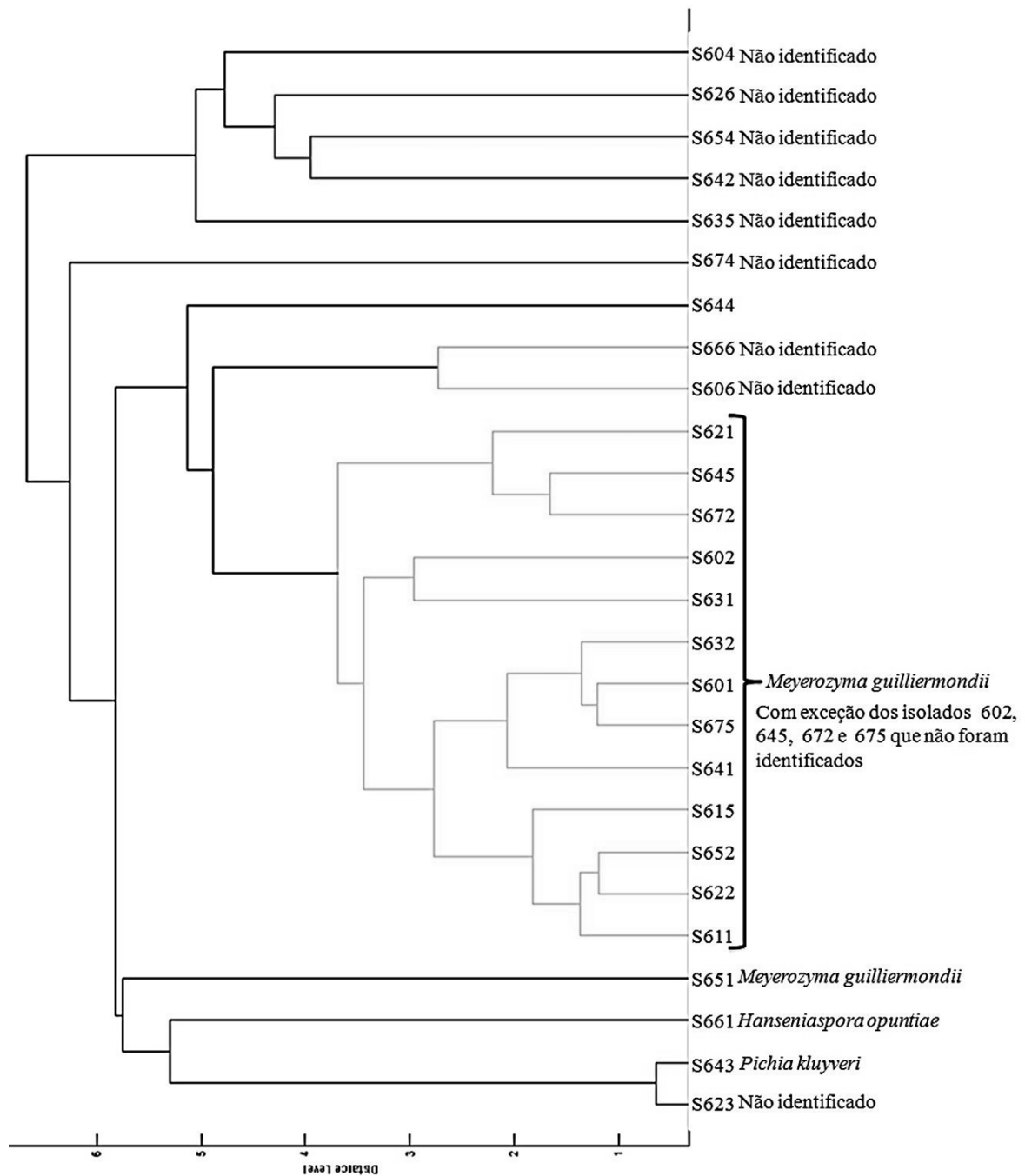
APÊNDICE B- Dendograma das cepas de leveduras identificadas durante a fermentação de café cultivado em Face Noruega e altitude de 600 m.



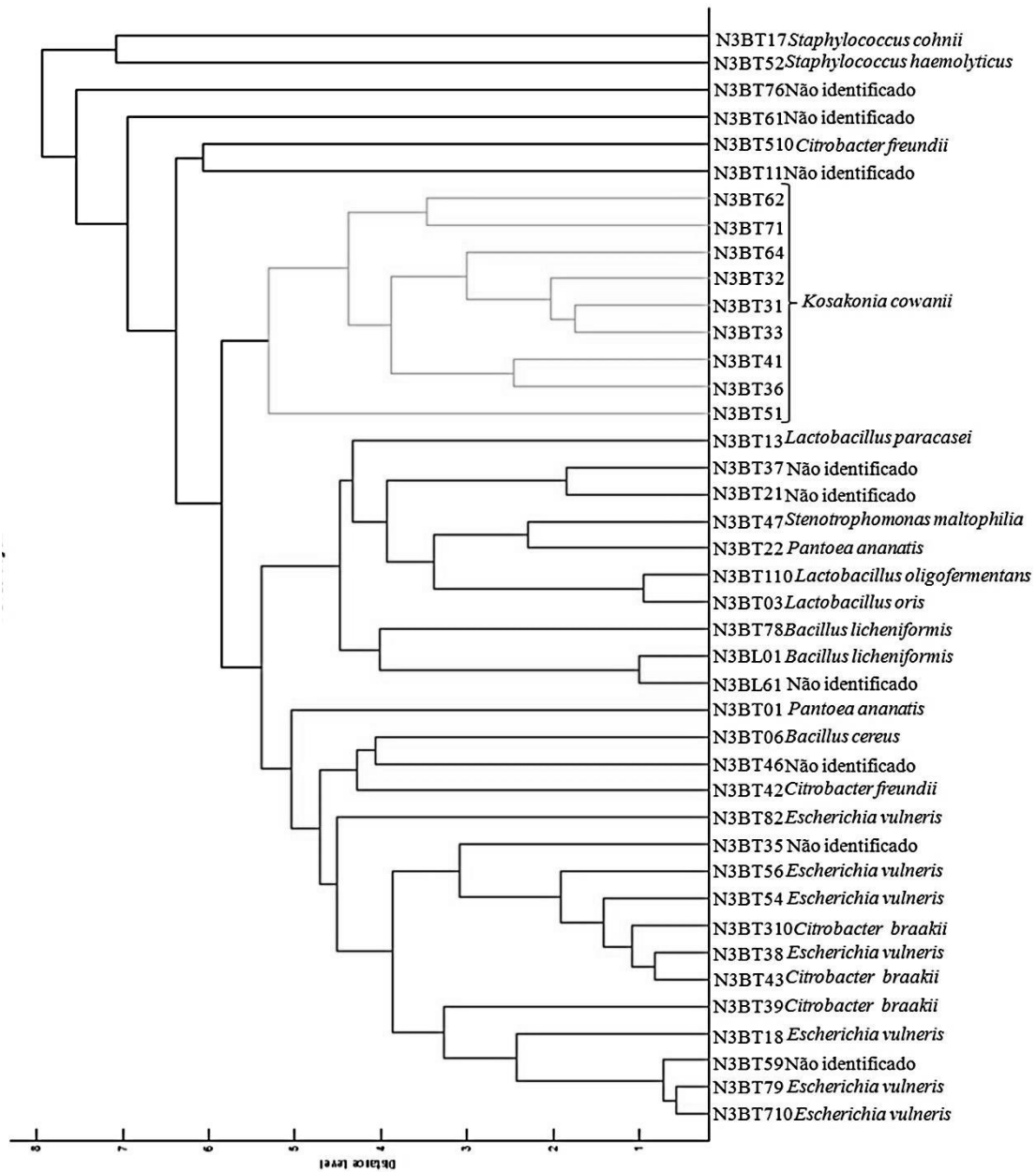
APÊNDICE C- Dendograma das cepas de leveduras identificadas durante a fermentação de café cultivado em Face Soalheira e altitude de 300 m.



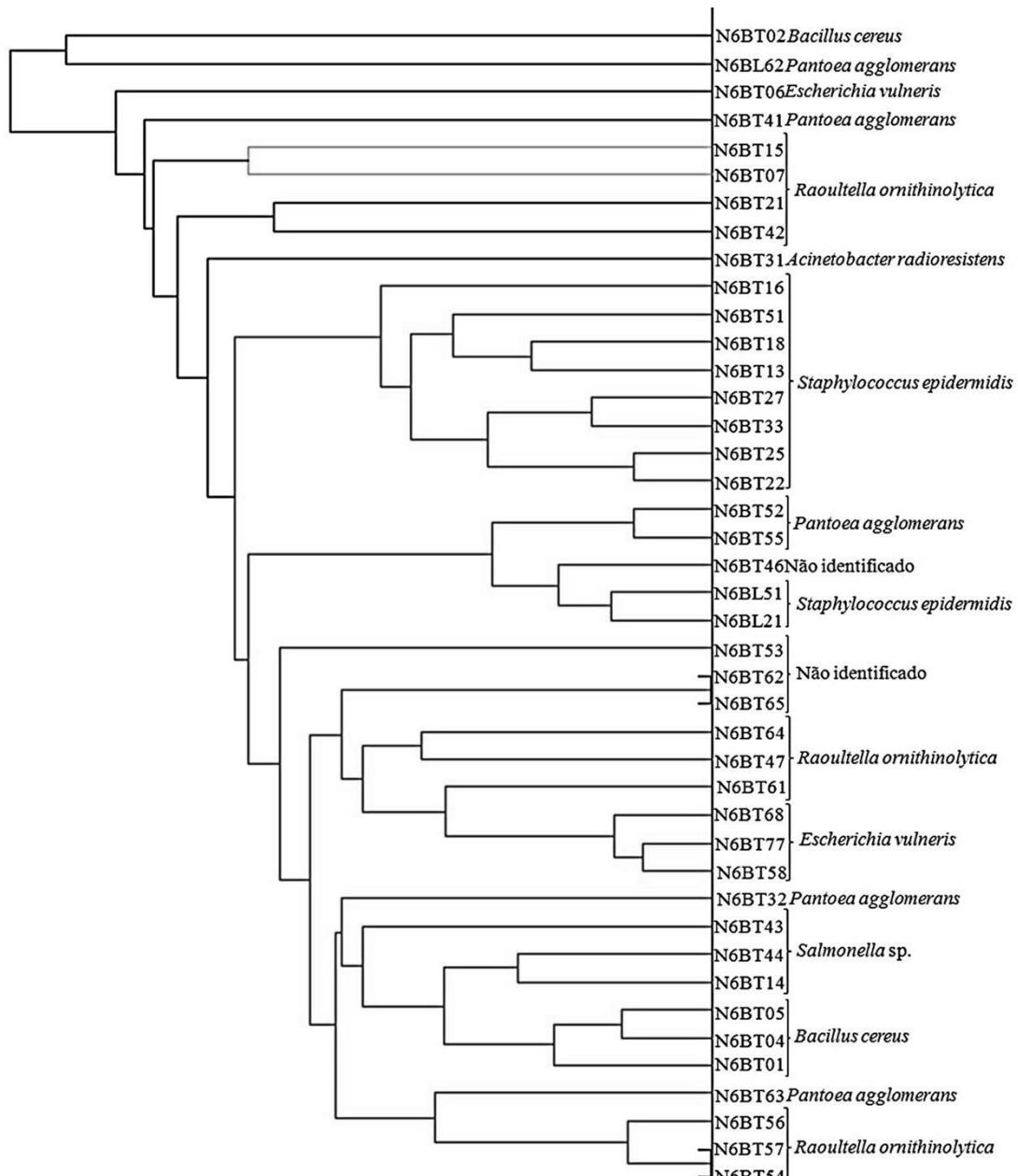
APÊNDICE D- Dendograma das cepas de leveduras identificadas durante a fermentação de café cultivado em Face Soalheira e altitude de 600 m.



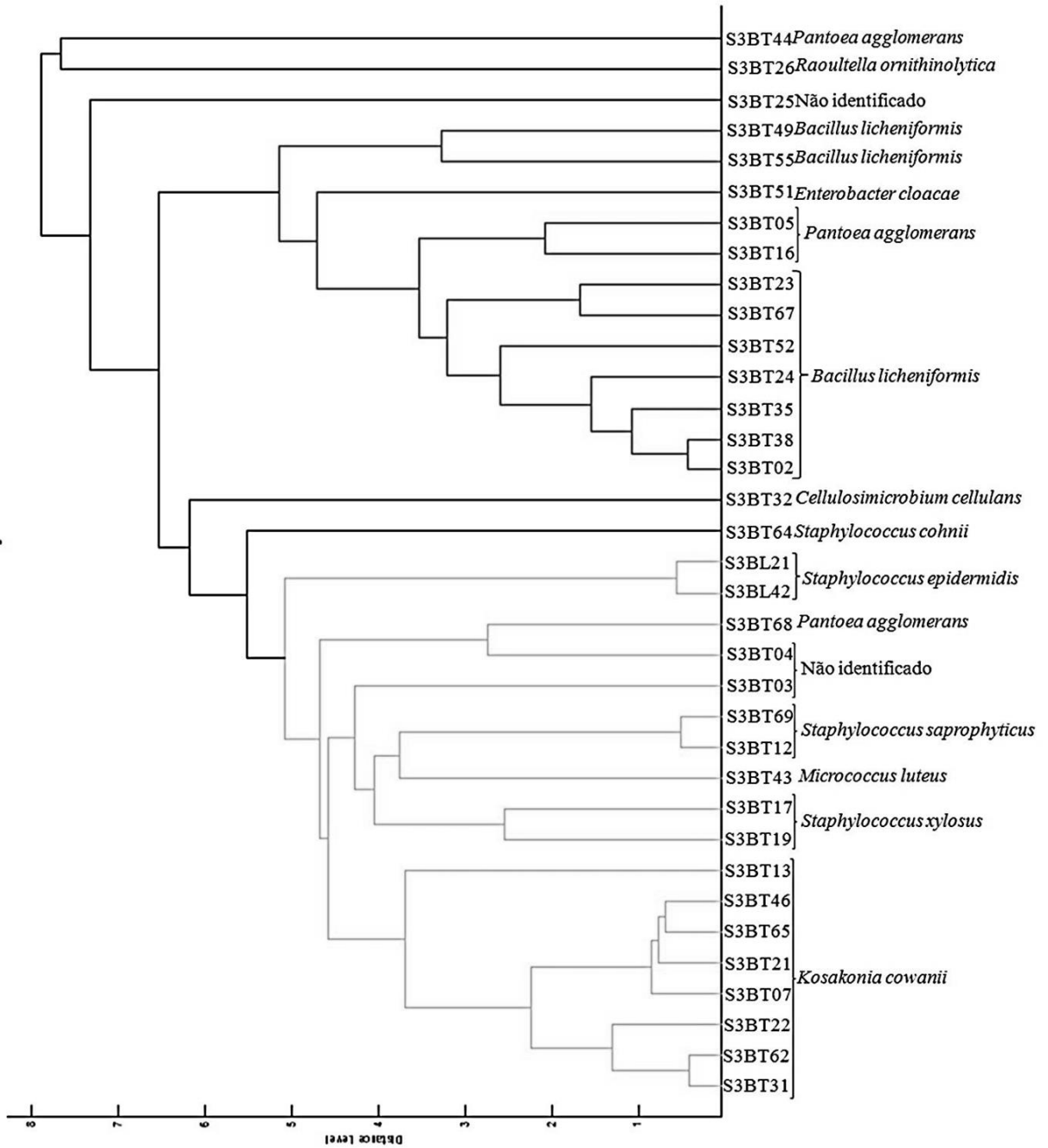
APÊNDICE E- Dendograma das cepas de bactérias identificadas durante a fermentação de café cultivado em Face Noruega e altitude de 300 m.



APÊNDICE F- Dendograma das cepas de bactérias identificadas durante a fermentação de café cultivado em Face Noruega e altitude de 600 m.

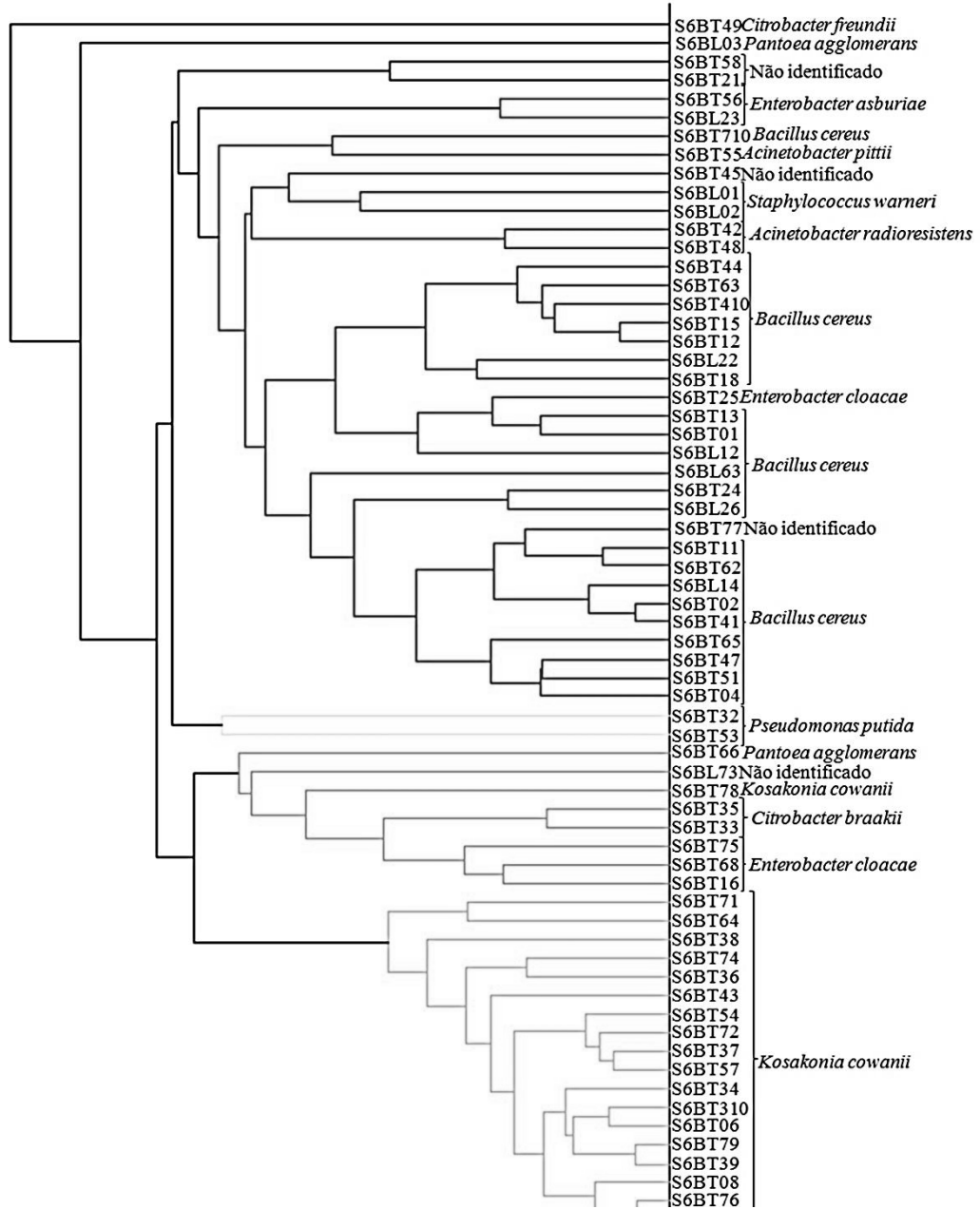


APÊNDICE G- Dendograma das cepas de bactérias identificadas durante a fermentação de café cultivado em Face Soalheira e altitude de 300 m.





APÊNDICE H- Dendograma das cepas de bactérias identificadas durante a fermentação de café cultivado em Face Soalheira e altitude de 600 m.



## APÊNDICE I – ANOVA

Dados gerados pelo programa GENES:

```

=====
Programa GENES                                ANOVA
                                           Arquivo de dados
                                           C:\Users\prisc\Desktop\Genes\DadosG.dat
Número de variáveis                          9
Número de ambientes                          2
Número de genótipos                          2
Número de repetições                         3
Natureza do modelo                           G e A fixos
Decomposição                                 Genótipos/Ambientes
Ajuste de GL - Relação >                    1000
Data                                          06-01-2018
=====

```

Modelo :  $Y_{ijk} = m + G_i + A_j + G A_{ij} + E_{ijk}$   
 Efeitos : Efeitos

## ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL =====&gt; UMIDADE

FV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTOS	1	.56768	.56768	.28514
AMBIENTES	1	13.25101	13.25101	6.65587
TRATxAMB	1	10.02841	10.02841	5.03719

## ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL =====&gt; LIPIDEOS

FV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTOS	1	.0048	.0048	.01038
AMBIENTES	1	.83213	.83213	1.7996
TRATxAMB	1	.02083	.02083	.04505

## ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL =====&gt; PH

FV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTOS	1	.0768	.0768	24.6747
AMBIENTES	1	.0	.0	.0
TRATxAMB	1	.02613	.02613	8.39625

## ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL =====&gt; SÓLIDOS SOLUVEIS TOTAIS

FV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTOS	1	.0075	.0075	.81744
AMBIENTES	1	.02083	.02083	2.27066
TRATxAMB	1	.0675	.0675	7.35695

## ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL =====&gt; ACIDEZ

FV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTOS	1	.10267	.10267	.78663
AMBIENTES	1	.03967	.03967	.30396
TRATxAMB	1	.00368	.00368	.02816

## ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL =====&gt; PROTEINA

FV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTOS	1	1.02083	1.02083	.98038
AMBIENTES	1	.04813	.04813	.04623
TRATxAMB	1	.37453	.37453	.35969

## ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL =====&gt; CINZAS

FV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTOS	1	.4107	.4107	164.28
AMBIENTES	1	.20803	.20803	83.21333
TRATxAMB	1	1.1907	1.1907	476.28

## ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL =====&gt; CARBOIDRATOS

FV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTOS	1	1.41179	1.41179	.42471
AMBIENTES	1	11.56009	11.56009	3.47761
TRATxAMB	1	1.74041	1.74041	.52356

## ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL =====&gt; FENOLICOS

FV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTOS	1	46.49572	46.49572	1249.79254
AMBIENTES	1	19.6086	19.6086	527.07388
TRATxAMB	1	1.28782	1.28782	34.61625