



MARIANE HELENA SANCES RABELO

**FERMENTAÇÃO DE FRUTOS DE CAFÉ COM
INOCULAÇÃO SEQUENCIAL DE *Lactobacillus plantarum* E
*Saccharomyces cerevisiae***

**LAVRAS – MG
2020**

MARIANE HELENA SANCES RABELO

FERMENTAÇÃO DE FRUTOS DE CAFÉ COM INOCULAÇÃO SEQUENCIAL DE
Lactobacillus plantarum E *Saccharomyces cerevisiae*

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, área de concentração em Processamento de Produtos Agrícolas, para a obtenção do título de Doutor

Prof. Dr. Flávio Meira Borém
Orientador

LAVRAS – MG
2020

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

Rabelo, Mariane Helena Sances.

Fermentação de frutos de café com inoculação sequencial
de *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae* / Mariane
Helena Sances Rabelo. - 2020.

95 p.

Orientador(a): Flávio Meira Borém.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.
Bibliografia.

1. Bactérias do ácido lático. 2. Coffea arabica. 3. Cultura
iniciadora mista. I. Borém, Flávio Meira. II. Título.

MARIANE HELENA SANCES RABELO

**FERMENTAÇÃO DE FRUTOS DE CAFÉ COM INOCULAÇÃO SEQUENCIAL DE
Lactobacillus plantarum E *Saccharomyces cerevisiae***

**FERMENTATION OF COFFEE FRUITS WITH SEQUENTIAL INOCULATION OF
Lactobacillus plantarum AND *Saccharomyces cerevisiae***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, área de concentração em Processamento de Produtos Agrícolas, para a obtenção do título de Doutor

APROVADA em 04 de dezembro de 2020.

Prof. Dr. Flávio Meira Borém	UFLA
Prof. Dra. Luisa Pereira Figueiredo	UFLA
Dra. Luciana Silva Ribeiro	UFLA
Dra. Claudia Mendes dos Santos	UFLA
Dr. Marcelo Ribeiro Malta	EPAMIG

Prof. Dr. Flávio Meira Borém
Orientador

**LAVRAS – MG
2020**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter-me dado força, coragem, perseverança e, sobretudo, a alegria para realizar este trabalho.

Aos meus pais, Madalena e José Maria, e à minha irmã, Cristiane, pelo apoio e incentivo incondicional.

Ao Victor, pelo amor, compreensão e paciência.

Ao meu orientador Prof. Flávio Borém, pelos constantes e valiosos ensinamentos, pela dedicação, confiança e, em especial, pelo incentivo nos momentos mais difíceis.

Aos membros da banca pela disponibilidade em contribuir e pelos ensinamentos compartilhados.

Aos queridos amigos do LPPA e PÓS-CAFÉ pelos momentos de descontração, experiências compartilhadas e auxílio fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

À empresa Suntory e a Associação do Cafeicultores da Serra da Canastra pelo suporte no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os amigos e familiares que torceram por mim e me apoiaram.

À Universidade Federal de Lavras e ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola pela oportunidade e a CAPES, pela disponibilização da bolsa de estudos.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

Culturas iniciadoras mistas formadas por bactérias do ácido lático e leveduras utilizadas na produção alimentos fermentados, inclusive de café, são uma alternativa favorável a qualidade sensorial e segurança alimentar do produto final. Desta forma, dois artigos foram desenvolvidos com objetivo geral de avaliar o efeito da fermentação de frutos de café com inoculação sequencial de *Lactobacillus plantarum* seguido de *Saccharomyces cerevisiae* nas características sensoriais da bebida e na composição química dos grãos. Além disso, o efeito do tempo total de fermentação dos frutos também foi avaliado. O primeiro artigo teve como objetivo avaliar o efeito da fermentação de frutos de café com inoculação sequencial de *Lactobacillus plantarum* seguido de *Saccharomyces cerevisiae* em dois tempos de fermentação nas características sensoriais de aroma e sabor da bebida e na composição volátil dos grãos torrados; o segundo artigo objetivou avaliar o efeito da fermentação de frutos de café com inoculação sequencial de *Lactobacillus plantarum* seguido de *Saccharomyces cerevisiae* em dois tempos de fermentação nos atributos sensoriais doçura, acidez, amargor, corpo, adstringência, finalização e nota final da bebida e no perfil de ácidos orgânicos, composto bioativos e perfil de ácidos graxos dos grãos. O aroma e o sabor da bebida do café fermentado com inoculação sequencial apresentaram complexidade, com predominância de notas sensoriais frutadas e fermentadas, também foi observado que essa técnica contribuiu para maior acidez na bebida e maior nota final do café. O tempo total de fermentação de 48h foi ideal para obtenção de maior pontuação para os cafés produzidos com inoculação sequencial. Além disso, foram identificados 47 compostos voláteis, sendo que, os principais compostos presentes nos grãos torrados foram furfuryl acetate, thiophene, pyridine e 1-methylpyrrole. Foi observado um maior conteúdo dos ácidos lático, málico, cítrico e succinico nos grãos. Portanto, essa pesquisa mostrou que a técnica de inoculação sequencial de culturas iniciadoras mistas é promissora na produção de cafés naturais especiais.

Palavras-chave: Bactérias do ácido lático, *Coffea arabica*, Cultura iniciadora mista

ABSTRACT

Mixed starter cultures formed by lactic acid bacteria and yeasts used in the production of fermented foods, including coffee, are a favorable alternative to sensory quality and food safety of the final product. Thus, two articles were developed with the general objective of evaluating the effect of coffee fruit fermentation with sequential inoculation of *Lactobacillus plantarum* followed by *Saccharomyces cerevisiae* on the sensory characteristics of the beverage and the chemical composition of the beans. In addition, the effect of the total fermentation time of the fruits was also evaluated. The first article aimed to evaluate the effect of coffee fruit fermentation with sequential inoculation of *Lactobacillus plantarum* followed by *Saccharomyces cerevisiae* in two fermentation times on the sensory characteristics of the beverage's aroma and flavor and on the volatile composition of the roasted beans; the second article aimed to evaluate the effect of fermentation of coffee fruits with sequential inoculation of *Lactobacillus plantarum* followed by *Saccharomyces cerevisiae* in two fermentation times in the sensory attributes sweetness, acidity, bitterness, body, astringency, finalization and final note of the beverage and in the profile of organic acids, bioactive compounds and fatty acid profile of the beans. The aroma and flavor of the fermented coffee beverage with sequential inoculation showed complexity, with a predominance of fruity and fermented sensory notes, it was also observed that this technique contributed to greater acidity in the beverage and a higher final note of the coffee. The total fermentation time of 48h was ideal to obtain a higher score for coffees produced with sequential inoculation. In addition, 47 volatile compounds were identified, the main compounds present in the roasted beans were furfuryl acetate, thiophene, pyridine and 1-methylpyrrole. A higher content of lactic, malic, citric and succinic acids was observed in the beans. Therefore, this research showed that the technique of sequential inoculation of mixed starter cultures is promising in the production of specialty natural coffees.

Keyword: Lactic acid bacteria, *Coffea arabica*, Mixed starter culture

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	5
1 INTRODUÇÃO	5
2 REFERENCIAL TEÓRICO	7
2.1 Fermentação aplicada a produção de Cafés Especiais	7
2.2 Microbiota presente nos frutos de café.....	9
2.3 Uso de culturas iniciadoras.....	11
2.4 Inoculação sequencial de cultura iniciadora mista.....	14
2.5 Compostos químicos produzidos durante a fermentação	15
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	18
REFERÊNCIAS	19
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	22
ARTIGO 1 - FERMENTAÇÃO DE FRUTOS DE CAFÉ COM INOCULAÇÃO SEQUENCIAL DE <i>Lactobacillus plantarum</i> E <i>Saccharomyces cerevisiae</i>: EFEITO NA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL E CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS	22
ARTIGO 2 - FERMENTAÇÃO DE FRUTOS DE CAFÉ COM INOCULAÇÃO SEQUENCIAL DE <i>Lactobacillus plantarum</i> E <i>Saccharomyces cerevisiae</i>: EFEITO NOS ATRIBUTOS SENSORIAIS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS GRÃOS	55

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Leveduras, bactérias e fungos estão naturalmente presentes em todas as etapas de produção do café. A colonização pelos microrganismos ocorre desde o fruto aderido à planta até o armazenamento dos grãos. Ao longo dessas etapas há predominância de grupos ou espécies microbianas devido a mudanças químicas e físicas que acontecem nos frutos de café, principalmente na etapa de secagem. A variação do teor de água dos frutos correlacionado com a atividade de água é um fator que afeta o grau de colonização e as espécies colonizadas (MAGAN; LACEY, 1984).

Durante a secagem ao sol de cafés processados pela via seca, ocorre uma fermentação espontânea devido à presença de diversos microrganismos (SCHWAN; WHEALS, 2003; SILVA et al., 2000). Silva et al. (2008) estudaram a sucessão microbiana durante a fermentação espontânea a seco de cafés naturais e puderam observar que as bactérias foram identificadas em maior número no início da secagem, quando o teor de água dos frutos de café estava em torno de 68% e 0,85 aw, representando 93% do total dos microrganismos isolados. Após 14 dias de secagem a população bacteriana diminuiu, representando 10% dos isolados. Um aumento na população de leveduras foi observado em comparação com a população bacteriana em momentos alternados durante a fermentação e secagem. As bactérias Gram-negativas representaram 19% do total de isolados bacterianos e predominaram nos dias iniciais de fermentação e secagem, pois apresentam menor resistência ao baixo teor de água dos frutos que as bactérias gram-positivas. Os gêneros mais frequentes foram *Enterobacter* e *Serratia*. As espécies *Enterobacter aerogenes* e *Acinetobacter* sp apresentaram a capacidade de produzir pectina liase, o que indica que essas bactérias podem participar da degradação da mucilagem acelerando o processo de fermentação. No que diz respeito às leveduras, os autores identificaram a presença de *Pichia burtonii*, *Debaryomyces polymorphus*, *Arxula adenivorans*, *P. holstii* e *P. anomala*, essas espécies possuem atividade de pectina liase e podem ser importantes para a fermentação do café. A contagem de leveduras foi maior comparada à contagem de bactérias quando atividade de água foi entre 0,82 e 0,85.

Os resultados do estudo de Silva et al. (2008) mostraram que bactérias e leveduras podem atuar em consorcio no processo de fermentação de frutos de cafés. Nesse sentido, a utilização de culturas iniciadoras mistas de bactérias e leveduras através da técnica de

inoculação sequencial pode ser uma alternativa viável para a produção de cafés naturais especiais.

Leveduras e bactérias do ácido láctico já foram utilizadas em estudos recentes como culturas iniciadoras puras no processamento pós-colheita do café, com o objetivo de reduzir o tempo necessário para a fermentação e modular as características químicas e sensoriais dos grãos de café (BRESSANI et al., 2018; CARVALHO NETO et al., 2018b; CARVALHO NETO et al., 2020; EVANGELISTA et al., 2014a; EVANGELISTA et al., 2014b; MARTINEZ et al., 2017; RIBEIRO et al., 2017; PEREIRA et al., 2016; WANG et al., 2019). Dentre os microrganismos mais estudados, é possível destacar a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria do ácido láctico *Lactobacillus plantarum*, espécies com adaptabilidade aos fatores estressantes do processamento pós-colheita, consumo eficiente de açúcares da polpa dos frutos de café e produção adequada de ácidos orgânicos e compostos voláteis.

Apesar do uso de culturas iniciadoras puras no processamento dos frutos de café oferecer vantagens, estudos recentes mostraram que culturas iniciadoras mistas de bactérias e leveduras na produção alimentos fermentados, inclusive de frutos de café, é favorável a qualidade sensorial e segurança alimentar do produto final (GARCÍA et al., 2019; VALE et al., 2019). Além disso, deve-se levar em consideração que, processos espontâneos de fermentação de alimentos são realizados com culturas mistas estabelecidas naturalmente, nas quais participam microrganismos iniciantes e também microrganismos não iniciantes, juntos contribuem para as características físico-químicas e sensoriais do produto final, principalmente em processos não estéreis (EVANGELISTA et al., 2015; GARDNER et al., 2001; LU et al., 2018; PAPALEXANDRATOU et al., 2011; YUNITA; DODD, 2018; ZHANG et al., 2019b).

Em fermentações com inoculação de culturas mistas os microrganismos em consórcios podem interagir e influenciar o metabolismo uns dos outros, de forma positiva, neutra ou negativa, por meio de contato físico, via moléculas de sinalização ou gerando alterações nas propriedades físico-químicas do ambiente (SIEUWERTS et al., 2008). Uma alternativa para evitar possíveis interações negativa entre os microrganismos é a utilização da técnica de inoculação sequencial, que consiste em realizar a inoculação em duas etapas com um intervalo de tempo entre as inoculações.

A inoculação sequencial tem sido utilizada na fabricação de diversos produtos fermentados, como por exemplo vinho, sidra e bebidas fermentadas lácteas e não lácteas (HERRERO et al., 1999; GARCÍA et al. 2017, 2018; LU; PUTRA; LIU, 2018). Em um sistema de fermentação sequencial, podem ser implementados estágios diferenciados nos quais são

aplicadas condições operacionais específicas. Desta maneira, processos são otimizados e o uso de condições mais favoráveis para cada microrganismo são permitidas. Assim, novos consórcios microbianos podem ser explorados por meio da inoculação sequencial evitando possíveis interações amensalistas, inoculando primeiro a cepa sensível para favorecer o desenvolvimento pleno do seu metabolismo e introduzindo a cepa inibidora em um segundo estágio.

Desta forma, dois artigos foram desenvolvidos para compor a presente tese que tem como objetivo geral avaliar o efeito da fermentação de frutos de café com inoculação sequencial de *Lactobacillus plantarum* seguido de *Saccharomyces cerevisiae* nas características sensoriais da bebida e na composição química dos grãos. Além disso, o efeito do tempo total de fermentação dos frutos também foi avaliado.

O primeiro artigo intitulado “Fermentação de frutos de café com inoculação sequencial de *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae*: Efeito na composição volátil e características sensoriais” teve como objetivo avaliar o efeito da fermentação de frutos de café com inoculação sequencial de *Lactobacillus plantarum* seguido de *Saccharomyces cerevisiae* em dois tempos de fermentação nas características sensoriais de aroma e sabor da bebida e na composição volátil dos grãos torrados.

O segundo artigo intitulado “Fermentação de frutos de café com inoculação sequencial de *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae*: Efeito nos atributos sensoriais e composição química dos grãos” teve como objetivo avaliar o efeito da fermentação de frutos de café com inoculação sequencial de *Lactobacillus plantarum* seguido de *Saccharomyces cerevisiae* em dois tempos de fermentação nas nos atributos sensoriais doçura, acidez, amargor, corpo, adstringência, finalização e nota final da bebida e no perfil de ácidos orgânicos, composto bioativos e perfil de ácidos graxos dos grãos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fermentação aplicada a produção de Cafés Especiais

Fermentação é uma palavra que já possuiu muitos significados ao longo do tempo. As definições para fermentação apresentadas por um dicionário são “um processo de variação química com efervescência”, “um estado de agitação ou sem descanso”, “qualquer uma das várias transformações de substâncias orgânicas”. Jay (2005) ao compilar as conclusões de Prescott, Dunn and Doelle sobre o conceito fermentação chegou à seguinte definição “um processo, no qual, transformações químicas são realizadas em um substrato orgânico pela ação

de enzimas produzidas por microrganismos”. Tortora, Funke e Case (2005) foram mais afundo e definiram fermentação como “qualquer processo metabólico que libere energia de um açúcar ou outra molécula orgânica, não requer oxigênio ou um sistema transportador de elétrons e usa uma molécula orgânica como aceptor final de elétrons”. Perante o definido por estes autores, pode-se entender que fermentação é um processo de transformações pelo qual o alimento passa por meio da ação de microrganismos, resultando em um produto diferente de sua matriz original.

As atividades fermentativas dos microrganismos são responsáveis pela produção de muitos alimentos e principalmente por suas características singulares. Diversos alimentos, como queijos maturados, conservas, chucrutes e linguiças fermentadas, possuem uma vida útil consideravelmente maior do que a matéria-prima da qual eles foram feitos. Além de serem mais estáveis, todos os alimentos fermentados possuem aroma e sabor característico que resultam direta ou indiretamente dos organismos fermentadores (JAY, 2005).

A população microbiana dos alimentos e das fermentações envolvidas tem sido alvo de investigação e estudo a muitos anos em vários produtos, dentre eles o café. Estudos têm revelado a microbiota presente em frutos de café e ao longo do processamento (FRANK; LUM; CRUZ, 1965; PEE; CASTELEIN, 1971; SILVA, 2000; MASOUD et al., 2004; VILELA et al., 2010; EVANGELISTA et al., 2015) e mostrado a viabilidade da utilização de organismos fermentativos, naturalmente presentes no fruto, como culturas iniciadoras na produção de cafés especiais (SILVA, et al., 2013; EVAGELISTA, et al., 2014; EVAGELISTA, et al., 2014; RIBEIRO, et al., 2017; BRESSANI, et al., 2018).

O conceito de cafés especiais está relacionado com o prazer que a bebida pode proporcionar ao consumidor por meio de algum atributo específico. A definição deste conceito, por ser ampla e abrangente, depende do segmento da cadeia produtiva ao qual se aplica. A *Specialty Coffee Association* – SCA contextualiza este conceito no âmbito do agricultor, comprador de café cru, torrefador, barista e consumidor, e resume dizendo que um grão de café se torna especial quando todos os envolvidos na cadeia de valor trabalham em harmonia e mantêm um foco aguçado em padrões e excelência do início ao fim.

Café especial, segundo a Brazil Specialty Coffee Association - BSCA, é definido como grãos isentos de impurezas e defeitos que possuem atributos sensoriais diferenciados. Estes atributos, que incluem bebida limpa e doce, corpo e acidez equilibrada, qualificam sua bebida acima de 80 pontos na análise sensorial da escala da SCAA (*Specialty Coffee Association of America*). Além da qualidade intrínseca, os cafés especiais devem ter rastreabilidade certificada

e respeitar critérios de sustentabilidade ambiental, econômica e social em todas as etapas de produção.

O consumo de cafés especiais no mercado mundial está crescendo em proporções maiores do que o por cafés comuns, indicando a preferência dos consumidores por aqueles que possuem qualidade de bebida diferenciada. Dessa forma, verifica-se a crescente busca por informações e tecnologias que contribuam para a qualidade da bebida. Aliado a isso, a fermentação com o uso de culturas iniciadoras apresenta-se como uma tecnologia que pode contribuir para produção de cafés especiais, com características sensoriais que agradem os consumidores mais exigentes.

Evangelista et al. (2014a) e Evangelista et al. (2014b) em seus estudos, avaliaram o uso de culturas iniciadoras selecionadas para fermentação de café durante o processamento seco e semi-seco. Pode-se observar que o aroma do café inoculado foi melhor em comparação com cafés produzidos sem inoculação. Para o processamento seco os cafés inoculados apresentaram sabor caramelo e frutado, já para o processamento cereja descascado os cafés apresentaram aroma de caramelo. Estes resultados demonstram que o emprego de fermentação por meio da utilização de culturas iniciadoras possibilita a obtenção de cafés de alta qualidade sensorial, agrega valor ao produto e padroniza o processo.

Ribeiro et al. (2017) em seu trabalho avaliaram o efeito sensorial da inoculação de três linhagens de levedura (*Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200 e CCMA 0543 e *Torulaspora delbrueckii* CCMA 0684, respectivamente) em duas variedades de café (Ouro Amarelo e Mundo Novo) processadas pelo método semi-seco. Os autores concluíram que o uso de culturas iniciadoras ajudou a controlar o processo de fermentação, garantindo assim a formação de aromas e sabores desejáveis, o que aumenta a possibilidade de produção de cafés especiais.

Desta forma, a fermentação aplicada à produção de cafés especiais com o uso de culturas iniciadoras promove diversos benefícios, tais como incremento de qualidade sensorial, controle sobre o processo fermentativo, previsibilidade do produto final e agregação de valor ao produto, podem ser uma tecnologia alternativa e economicamente viável (EVANGELISTA et al., 2014b).

2.2 Microbiota presente nos frutos de café

A ecologia microbiana presente nos frutos e grãos de café varia em função da região de cultivo, variedade do café cultivada e do tipo de processamento (SILVA et al., 2000). O café natural e o café descascado, por apresentarem em sua polpa grande quantidade de carboidratos,

estão expostos a uma diversidade de microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos que encontram no fruto condições favoráveis para se desenvolver.

A avaliação dos microrganismos presentes no café vem sendo realizada há muito anos, Frank, Lum e Cruz (1965) no Havaí avaliaram os microrganismos presentes ao longo da fermentação em café despulpado e identificaram a presença das espécies de bactérias *Erwinia*, *Paracolobactrum* e *Escherichia*.

Agate e Bhat (1966) na Índia ao pesquisarem os microrganismos presentes em café robusta durante a fermentação do café processado por via úmida identificaram a presença dos gêneros de bactérias *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Proteus* e a presença das seguintes espécies de leveduras *Saccharomyces marxianus*, *S. bayanus*, *S. cerevisiae* var *ellipsoideus* e *Schizosaccharomyces sp.*

Pee e Castelein (1971) na República Dominicana do Congo, região central da África, identificaram na superfície de frutos de café robusta as leveduras *C. parapsilopsis*, *S. cerevisiae*, *Torulopsis famata*, *S. marxianus*, *C. tropicalis*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *C. pelliculosa* e na superfície e mucilagem a levedura *C. guilliermondii*.

Em estudos mais recentes na Tanzânia, também na África, Masoud et al. (2004) identificaram diferentes espécies presentes no café arábica processado via úmida durante a fermentação e secagem. *Pichia kluyveri* e *Pichia anomala* foram identificados em diferentes estágios da fermentação e durante o período da secagem. *Hanseniaspora uvarum* foi identificado principalmente durante a fermentação. *Kluyveromyces marxianus*, *Candida pseudointermedia*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia ohmeri*, *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida xestobii* também foram identificadas.

Erwinia herbicola, *Klebsiella pneumoniae* e *Lactobacillus brevis* foram identificadas durante a fermentação de café descascado por Avallone et al. (2001) em seus estudos realizados no México. As bactérias identificadas são pectinolíticas e podem estar relacionadas com a degradação da mucilagem.

No Brasil, vários estudos já foram realizados para investigar a ecologia microbiana presente nos frutos de café e ao longo do processamento e fermentação. Silva et al. (2000) realizaram um trabalho minucioso ao longo de duas safras em diferentes fazendas do estado de Minas Gerais. Os autores identificaram em cafés processados pela via seca os seguintes gêneros de bactérias *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Lactobacillus* e *Bacillus* e em relação às leveduras foram *Pichia*, *Candida* e *Arxula*. Diante disso, os autores concluíram que existe uma diversidade e abundância de espécies microbianas em cafés naturais, e mais

importante que a quantidade de microrganismos é a presença de grupos que possuem a capacidade de degradação de compostos, sendo esses, essenciais na etapa de fermentação.

Pichia e *Cândida* também foram identificadas em cafés processados por via seca em outro estudo realizado por Silva et al. (2008), espécies do gênero *Debaryomyces* também ocorreram. Em relação as bactérias os gêneros predominantes foram *Bacillus*, *Serratia*, *Enterobacter* e *Acinetobacter*.

Vilela et al. (2010) em Minas Gerais, avaliaram a microbiota presente em café arábica processado por via úmida. Semelhante ao processamento natural (SILVA et al., 2000, 2008) a população de bactérias foi predominante, as espécies com maior incidência foram *Bacillus megaterium*, *Bacillus macerans*, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus cereus* e *Lactobacillus plantarum*. Sobre as leveduras presentes, as espécies mais encontradas foram *Pichia anomala*, *Torulaspora delbrueckii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces bayanus*, *Hanseniaspora uvarium* e *Kloeckera* sp..

Evangelista et al. (2015) investigaram a microbiota presente em frutos de café e ao longo do processamento por via úmida de uma mesma cultivar (Catuaí) em duas regiões distintas do estado de Minas Gerais. *Hanseniaspora uvarum*, *Meyerozyma caribbica*, *Pichia fermentans*, *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Cândida railenensis*, *Cândida quercitrusa*, *Wickerhamomyces ciferriv*, *Cândida glabrata* e *Wickerhamomyces anomalus* foram as espécies de leveduras identificadas. Os gêneros de bactérias presentes foram *Enterococcus*, *Ochrobactrum*, *Chryseobacterium*, *Erwinia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Curtobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Serratia*, *Microbacterium*, *Weissella*, *Kocuria* e *Leuconostoc*.

Em Taiwan, Leang et al. (2014) investigaram a diversidade de bactérias do ácido láctico associadas a frutos de café e isolaram 102 bactérias do ácido láctico em três diferentes fazendas. As espécies heterofermentativas do gênero *Leuconostoc* e *Weissella* foram as bactérias do ácido láctico mais comuns encontrados em duas fazendas localizadas a uma altitude aproximada de 800 m. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* foi a BAL mais comum encontrada na fazenda localizada a uma altitude aproximada de 1.200 m.

Estudos sobre a biodiversidade presente nos frutos do cafeeiro e durante o processamento são de grande relevância, pois permitem conhecer e selecionar microrganismos específicos que podem atuar na melhoria da qualidade sensorial.

2.3 Uso de culturas iniciadoras

Os alimentos fermentados de boa qualidade possuem características sensoriais distintas que agregam valor ao produto e isso ocorre devido ao metabolismo de microrganismos. A produção desses alimentos resulta da presença, do crescimento e do metabolismo de microrganismos específicos.

O método mais simples e antigo de fermentar alimentos depende dos microrganismos naturalmente presentes na matéria-prima. Além dos microrganismos específicos é necessário que condições ideais de crescimento estejam estabelecidas. Mesmos assim o sucesso nas fermentações naturais não é garantido, a probabilidade de obtenção de um produto com o mesmo padrão de qualidade e apto ao consumo é incerta, o que se torna um inconveniente para a produção industrial.

A inconstância das fermentações naturais mostrou a necessidade de buscar tecnologias que permitam produzir alimentos fermentados com valor agregado, qualidade sensorial, segurança alimentar, larga escala e padrão ao longo do tempo.

Uma tecnologia viável para produção de alimentos fermentados se baseia na utilização de uma população isolada de microrganismos, de uma mesma espécie ou um mix, que são denominadas de cultura “*starter*” ou iniciadora. Essa população previamente conhecida é inoculada diretamente na matéria-prima para que possa predominar sobre a microbiota natural e provocar alterações desejáveis e proporcionar uma previsão do produto final.

Na etapa de processamento do café o uso de culturas iniciadoras para a realização de fermentações, é uma alternativa interessante, pois promove a remoção mais rápida da mucilagem e incorporam compostos que melhoram a qualidade sensorial. Além disso, as culturas iniciadoras podem agregar valor ao café sem aumentar significativamente o custo de produção (EVANGELISTA et al., 2014b).

Evangelista et al. (2014b) avaliaram o potencial de linhagens de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* UFLA YCN727, *S. cerevisiae* UFLA YCN724, *Candida parapsilosis* UFLA YCN448 e *Pichia guilliermondii* UFLA YCN731) como culturas iniciadoras para a fermentação a seco de cafés naturais, lavados e não-lavados. Foi observado que a população de leveduras persistiu do início ao fim da secagem, e foram maiores em cafés não lavados. Em comparação ao controle, os cafés inoculados apresentaram um aumento da qualidade sensorial, a bebida apresentou sabor característico de caramelo e frutado. Desta forma, os autores indicam todas as estirpes para o uso como culturas iniciadoras em cafés processados por via seca.

Em outro estudo Evangelista et al. (2014a) avaliaram em café processado pela via úmida o uso das mesmas leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* UFLAYCN727, *S. cerevisiae* UFLA YCN724, *Candida parapsilosis* UFLA YCN448 e *Pichia guilliermondii* UFLA YCN731) como culturas iniciadoras puras em fermentação semi-seco. O uso dessas culturas de leveduras mostrou-se favorável para a produção de café descascado com diferentes sabores, quando comparado ao controle. *C. parapsilosis* UFLA YCN448 e *S. cerevisiae* UFLA YCN727 apresentaram um melhor resultado em relação à análise sensorial em café processado pela via úmida.

Ribeiro et al. (2017) compararam duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (CCMA 0200 e CCMA 0543) inoculadas em café cereja descascado e constataram que a cepa *S. cerevisiae* CCMA 0543 apresentou maior persistência da população ao longo da secagem e produziu maior número de compostos voláteis.

Bressani et al. (2018) avaliaram o potencial de três leveduras utilizando duas formas de inoculação em cafés naturais. As cepas avaliadas foram *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543, *Candida parapsilosis* CCMA 0544 e *Torulaspora delbrueckii* CCMA 0684 e as formas de inoculação utilizadas foram por pulverização direta sobre os frutos dispostos em terreiro e em baldes por 16h antes da secagem. *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543, inoculado em baldes, obteve a maior pontuação na prova de xícara. A inoculação direta de *Candida parapsilosis* CCMA 0544 apresentou melhores resultados em relação ao método de baldes, já *Torulaspora delbrueckii* CCMA 0684 apresentou bons resultados nos dois métodos de inoculação avaliados.

Além das leveduras, as bactérias também já foram testadas e apresentaram potencial para serem utilizadas como culturas iniciadoras na fermentação de café, em especial as bactérias do ácido láctico. Pereira et al. (2016) observaram que cepas de *Lactobacillus plantarum* se mostraram capazes de produzir ácidos orgânicos e ésteres favoráveis a qualidade sensorial do café. Outro fator observado pelos autores foi o tempo total de fermentação, neste experimento o tempo total de fermentação foi reduzido em 12h devido ao processo de inoculação.

Vale et al. (2019), em um estudo pioneiro, avaliaram o uso de uma cultura mista composto por uma levedura (*Pichia fermentans*) e uma bactéria do ácido láctico (*Pediococcus acidilactici*) na fermentação de frutos de café, os autores observaram que a co-inoculação possui grande potencial para a formação de compostos aromáticos desejáveis e a produção de cafés especiais.

O uso de culturas iniciadoras na fermentação do café é uma alternativa economicamente viável para a produção de cafés de alta qualidade, além de, agregando valor ao produto final,

contribuir no controle sobre a fermentação, padronizar o processo fermentativo e promover repetitividade (EVANGELISTA et al., 2014a, b).

2.4 Inoculação sequencial de cultura iniciadora mista

A fermentação de alimentos através de processos espontâneos é realizada com culturas iniciadoras mistas que foram estabelecidas naturalmente ao longo do tempo. Em processos espontâneos participam microrganismos iniciantes e também microrganismos não iniciantes, juntos contribuem para as características físico-químicas e sensoriais do produto final, principalmente em processos não estéreis (EVANGELISTA et al., 2015; GARDNER et al., 2001; LU et al., 2018; PAPALEXANDRATOU et al., 2011; YUNITA; DODD, 2018; ZHANG et al., 2019b). No entanto, os microrganismos em consórcio durante a fermentação podem interagir e influenciar o metabolismo uns dos outros. A interação que ocorre entre os microrganismos pode ser positiva, neutra ou negativa e ocorre por meio de contato físico via moléculas de sinalização ou através de alterações nas propriedades físico-químicas do ambiente (SIEUWERTS et al., 2008). García e colaboradores (2017, 2018) utilizaram a inoculação sequencial como um artifício para impedir a exclusão competitiva exercida por compostos antimicrobianos produzidos por LAB no *Pseudomonas taetrolens* sensível, inoculando o LAB em segundo lugar em substratos lácteos.

A inoculação sequencial tem sido utilizada na fabricação de diversos produtos fermentados, como por exemplo vinho, sidra e bebidas fermentadas lácteas e não lácteas (HERRERO et al., 1999; GARCÍA et al. 2017, 2018; LU; PUTRA; LIU, 2018). Em um sistema de fermentação sequencial podem ser implementados estágios diferenciados, nos quais são aplicadas condições operacionais específicas. Esse tipo de sistema permite o uso de condições mais favoráveis para cada microrganismo, conseqüentemente, a otimização do processo como um todo.

Na produção de vinho e sidra em *design* sequencial foi observado que a mudança de temperatura em determinadas fases da fermentação impedia a formação de produtos finais voláteis indesejáveis devido ao metabolismo da levedura (HERRERO et al., 1999). No desenvolvimento de bebidas fermentadas para lácteos e não lácteos envolvendo LAB, a introdução de uma levedura em um segundo estágio resultou em uma melhora na sobrevivência da bactéria láctea em decorrência da relação simbiótica desenvolvida (GARCÍA et al. 2017,

2018; LU; PUTRA; LIU, 2018). Desta forma, novos consórcios microbianos podem ser explorados com o uso da inoculação sequencial, evitando possíveis interações negativas.

A duração do intervalo entre a primeira e a segunda inoculação é um parâmetro chave nas fermentações com inoculação sequencial (CIANI et al., 2014). Segundo os autores o intervalo entre as inoculações pode afetar o desenvolvimento e a atividade metabólica do primeiro microrganismo e, conseqüentemente, a concentração de substratos, condições físico-químicas do meio, produtos e outros metabolitos que interagem com o segundo microrganismo. No entanto, esse intervalo pode criar um ambiente com condições mais favoráveis para a inoculação e o desenvolvimento da segunda cultura. Os resultados do estudo de Freire e colaboradores (2017) mostrou claramente essa interação, em que a população de leveduras na fermentação de co-cultura foi favorecida pela redução dos valores de pH para 4,0-4,5 devido a atividade metabólica da LAB.

Baseado na literatura apresentada, a utilização de culturas iniciadoras mistas de bactérias e leveduras aliada a técnica de inoculação sequencial pode ser uma alternativa inovadora na produção de cafés naturais especiais.

2.5 Compostos químicos produzidos durante a fermentação

A biodiversidade de microrganismos presente naturalmente nos frutos do cafeeiro tem influência direta na qualidade da bebida do café, seja pela degradação de compostos presentes nos frutos, bem como pela excreção de metabolitos que se difundem para o interior do grão. O uso de culturas iniciadoras pode ser um aliado na melhoria da qualidade sensorial através da produção de ácidos orgânicos e compostos voláteis desejáveis durante a fermentação (EVANGELISTA et al., 2014b).

Evangelista et al. (2014a, b) avaliaram o uso de quatro linhagens de levedura (*Saccharomyces cerevisiae* UFLA YCN727, *S. cerevisiae* UFLA YCN724, *Candida parapsilosis* UFLA YCN448 e *Pichia guilliermondii* UFLA YCN731) como culturas iniciadoras em cafés processados por via úmida e via seca.

Evangelista et al. (2014a) detectaram 23 compostos voláteis em café cru processado pela via úmida. Dentre os compostos encontrados, o hexanal foi o composto que apresentou maior quantidade, seguido pelo acetato de propila. O café cru foi mais rico em aldeído, éster e álcool. Em grãos de café torrado, quarenta e dois compostos voláteis foram encontrados. Os furanos foram o maior grupo identificado, seguido por ácidos e álcoois. O furfurílico, furfural, ácido isobutírico e 1-pentanol foram os principais compostos detectados. Em relação ao conteúdo de

ácidos orgânicos, ácidos láctico, acético e succínico foram predominantes e detectados durante toda a fermentação. Ácido cítrico e málico foram detectados no início da fermentação. Além disso, em nenhuma das amostras analisadas foram detectados os ácidos oxálico, tartárico, butírico e propiônico.

Já em cafés naturais lavados e não-lavados, Evangelista et al. (2014b) detectaram quarenta e oito compostos voláteis, de forma semelhante para o café verde e torrado. A classe mais abundante de compostos foi álcoois (11-27%) seguidos por furano em grãos torrados (~27%) e aldeídos (~13%) em grãos verdes.

Ribeiro et al. (2017) avaliou duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* inoculadas em cafés das variedades Mundo Novo e Ouro Amarelo processados pela via úmida. Um total de 96 compostos voláteis foi detectado, sendo 46 detectados em café cru e 54 detectados em café torrado. Ácidos, alcoóis, aldeídos, hidrocarbonetos, cetonas e furanos foram predominantes em café cru. Após a torrefação, foram identificados grupos como ésteres, furaldeídos, furanos, cetonas, pirazinas e pirróis.

As cepas *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0200 e CCMA 0543 avaliadas por Ribeiro et al. (2017) favoreceram a produção de ácidos orgânicos desejáveis, como o ácido cítrico e succínico, podendo, portanto, ter influenciado positivamente na qualidade final do café, sugerindo seu potencial uso como culturas “starters” na fermentação do café. O ácido cítrico foi abundante nos grãos de café da variedade Ouro Amarelo inoculado com *S. cerevisiae* CCMA 0543 (8,73 mg/g). As concentrações de ácido succínico aumentaram significativamente em relação ao controle (5,78 e 2,4 mg/g, respectivamente) para a mesma variedade e cepa.

Em cafés processados pela via úmida Martinez et al. (2017) identificaram 112 compostos voláteis em estudo com as espécies de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543, *Cândida parapsilosis* CCMA 0544 e *Torulaspóra delbrueckii* CCMA 0684 variando a forma de inoculação. Alguns dos compostos detectados estão relacionados com o sabor e aroma de frutas, doces, caramelo, nozes e florais, entre outros. Os principais compostos voláteis detectados nos grãos de café verde e torrados foram ácidos, pirazinas e piridinas. Ao investigar a presença de ácidos orgânicos, os autores detectaram ácido cítrico e succínico ao longo de toda a fermentação. O ácido succínico é o principal ácido orgânico produzido por leveduras e é originado no ciclo do glioxilato pela oxidação do isocitrato e no ciclo redutor do ácido cítrico (Jayaram et al., 2014).

Bressani et al. (2018) identificaram um total de 217 compostos voláteis ao estudar diferentes leveduras e métodos de inoculação em cafés naturais. Compostos voláteis

correspondentes ao sabor caramelo pôde ser detectados em amostras inoculadas de forma direta com *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543 em café torrado. Compostos de sabor frutado (maçã, cereja) foram observados em amostras inoculadas de forma direta com o *Candida parapsilosis* CCMA 0544. Em relação ao conteúdo de ácidos orgânicos, todos os tratamentos com inoculação direta apresentaram altas concentrações de ácido cítrico e málico.

Pereira et al. (2016) avaliaram o potencial de uma bactéria do ácido láctico (*Lactobacillus plantarum* LPBR01) na fermentação de café processado por via úmida, foi observado pelos autores que essa bactéria converteu de forma eficiente a polpa do café em ácido láctico e fumárico. Além disso, ocorreu um aumento na produção de compostos aromáticos voláteis durante o processo de fermentação, como por exemplo o acetato de butila, acetato de etila, 1-octanol, acetato de isoamila, hexanoato de etila, succinato de etila e octanoato de etila.

O ácido láctico é o principal produto metabólico de espécies homofermentativas, como é o caso do *Lactobacillus plantarum*. Os açúcares presentes no mesocarpo dos frutos de café são fermentados através da via de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) para gerar piruvato, que é convertido em ácido láctico pela enzima lactato desidrogenase (De BRUYN et al., 2017; ENDO, 2014; LEONG et al., 2014; ZHANG et al., 2019b).

Vale et al. (2019) avaliaram o uso de uma cultura mista composto por uma levedura (*Pichia fermentans*) e uma bactéria do ácido láctico (*Pediococcus acidilactici*) na fermentação de frutos de café. Os autores observaram uma produção de metabólitos, como por exemplo ácido láctico, etanol e acetato de etila. Segundo os autores a produção desses compostos evidencia uma interação sinérgica positiva entre esses dois grupos microbianos.

A presença de ácidos orgânicos nos grãos de café pode atuar como indicador de boa qualidade do produto final, sendo a concentração desses ácidos variável em função do processo utilizado, variedade de café e método de inoculação (SILVA et al., 2008; SUNARHARUM; WILLIAMS; SMYTH, 2014; VILELA et al., 2010).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O consumo de cafés especiais no mercado mundial está crescendo em proporções maiores do que o consumo de cafés comuns, indicando a preferência dos consumidores por cafés que possuem uma bebida com qualidade diferenciada. Dessa forma, verifica-se a crescente busca por informações e tecnologias que contribuam para a qualidade da bebida. Aliado a isso, a fermentação com o uso de culturas iniciadoras vem como uma tecnologia que pode contribuir para produção de cafés especiais, com características sensoriais que agradem os consumidores mais exigentes. O uso de culturas iniciadoras puras no processamento dos frutos de café oferece inúmeras vantagens, no entanto estudos recentes mostraram que culturas iniciadoras mistas de bactérias e leveduras na produção alimentos fermentados, inclusive de frutos de café, é favorável a qualidade sensorial e segurança alimentar do produto final. Além disso, deve-se levar em consideração que, processos espontâneos de fermentação de alimentos são realizados com culturas mistas estabelecidas naturalmente, nas quais participam microrganismos iniciantes e microrganismos não iniciantes, que juntos contribuem para as características físico-químicas e sensoriais do produto final, principalmente em processos não estéreis. Portanto, é importante a realização de pesquisas com culturas iniciadoras mistas de bactérias e leveduras aplicadas a fermentação de frutos de café para a produção de café especiais com características sensoriais complexas e principalmente segurança alimentar.

REFERÊNCIAS

- AGATE, A. D.; BHAT, J. V. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of *Coffea robusta* cherries. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 14, n.2, p. 256-260, 1966.
- AVALLONE, S. et al. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. **Strain**, London, v. 42, n. 4, p. 252-256, Apr. 2001.
- BRESSANI, A. P. P. et al. Characteristics of fermented coffee inoculated with yeast starter cultures using different inoculation methods. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 92, p. 212-219, 2018.
- CARVALHO NETO, D. P. et al. Efficient coffee beans mucilage layer removal using lactic acid fermentation in a stirred-tank bioreactor: Kinetic, metabolic and sensorial studies. **Food Bioscience**, Amsterdam, v. 26, p. 80–87, 2018.
- CARVALHO NETO, D. P. et al. Microbiological, physicochemical and sensory studies of coffee beans fermentation conducted in a yeast bioreactor model. **Food Biotechnology**, New Y, v. 34, n. 2, p. 172–192, 2020.
- CIANI, M. et al. Sequential fermentation using non-Saccharomyces yeasts for the reduction of alcohol content in wine. **BIO Web of Conferences**, v. 3, 02015, 2014.
- DE BRUYN, F. et al. Exploring the impacts of postharvest processing on the microbiota and metabolite profiles during green coffee bean production. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 83, e02398-16, 2016.
- ENDO, A.; DICKS, L. M. T. Physiology of the LAB. In *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. Edited by Holzappel, W. H., & Wood, B. J. B. Wiley Blackwell; 13–30, 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**, Barking, v. 61, p. 183-195, 2014b.
- EVANGELISTA, S. R. et al. Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. **Food Microbiology**, London, v. 44, p. 87-95, 2014a.
- EVANGELISTA, S. R. et al. Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 210, p. 102-112, 2015.
- FRANK, H. A.; LUM, N. A.; CRUZ, A. S. D. Bacteria responsible for mucilage-layer decomposition in kona coffee cherries. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 13, n. 2, p. 201-207, 1965.
- FREIRE, A. L. et al. Nondairy beverage produced by controlled fermentation with potential probiotic starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 248, p. 39–46, 2017.
- GARCÍA, C. et al. A new synbiotic dairy food containing lactobionic acid and *Lactobacillus casei*. **International Journal of Dairy Technology**, Oxford, v. 72, n. 1, p. 47–56, 2018.

- GARCÍA, C.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Liquid-phase food fermentations with microbial consortia involving lactic acid bacteria: A review. **Food Research International**, Barking, v. 119, p. 207–220, 2019.
- GARCÍA, C.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Synbiotic fermentation for the co-production of lactic and lactobionic acids from residual dairy whey. **Biotechnology Progress**, New York, v. 33, n. 5, p. 1250–1256, 2017.
- GARDNER, N. J. et al. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 3, p. 261–275, 2001.
- HERRERO, M. et al. Simultaneous and sequential fermentations with yeast and lactic acid bacteria in apple juice. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v. 22, n. 1, p. 48–51, 1999.
- LU, Y.; PUTRA, S. D.; LIU, S. Q. A novel non-dairy beverage from durian pulp fermented with selected probiotics and yeast. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 265, p. 1–8, 2018.
- LU, Z. M. et al. Microbial ecology of cereal vinegar fermentation: Insights for driving the ecosystem function. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 49, p. 88–93, 2018.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2005. 711 p.
- MAGAN, N.; LACEY, J. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 82, n. 1, p. 83–93, 1984.
- JAYARAM, V. B. et al. Succinic acid in levels produced by yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) during fermentation strongly impacts wheat bread dough properties. **Food Chemistry**, Barking, v. 151, p. 421–428, 2014.
- LEONG, K. H. et al. Diversity of lactic acid bacteria associated with fresh coffee cherries in Taiwan. **Current Microbiology**, New York, v. 68, n. 4, p. 440–447, 2014.
- MARTINEZ, S. J. et al. Different inoculation methods for semi-dry processed coffee using yeasts as starter cultures. **Food Research International**, Barking, v. 102, p. 333–340, 2017.
- MASOUD, W. et al. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**, Chichester, v. 21, n. 7, p. 549–556, May 2004.
- PAPALEXANDRATOU, Z. et al. Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. **Food Microbiology**, London, v. 28, n. 7, p. 1326–1338, 2011.
- 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.
- PEREIRA, G. V. M. et al. Potential of lactic acid bacteria to improve the fermentation and quality of coffee during on-farm processing. **International Journal of Food Science Technology**, Oxford, v. 51, n. 7, p. 1689–1695, 2016.

- RIBEIRO, L. S. et al. Behavior of yeast inoculated during semi-dry coffee fermentation and the effect on chemical and sensorial properties of the final beverage. **Food Research International**, Barking, v. 92, p. 26–32, 2017.
- SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Mixed microbial fermentations of chocolate and coffee. In: BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. (Ed.). **Yeasts in food: beneficial and detrimental aspect**. Hamburg: Behrs Verlag, 2003. p. 426-459.
- SIEUWERTS, S. et al. Unraveling microbial interactions in food fermentations: From classical to genomics approaches. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 74, n. 16, p. 4997–5007, 2008.
- SILVA, C. F. et al. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 29, n.2, p. 235-47, 2013.
- 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**, Amsterdam, v. 60, p. 251-260, 2000.
- 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, Dec. 2008.
- SUNARHARUM, W. B.; WILLIAMS, D. J.; SMYTH, H. E Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective. **Food Research International**, Barking, v. 62, p. 315–325, 2014.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, c2005. xxvi, 894 p.
- VALE, A. S. et al. Effect of Co-Inoculation with *Pichia fermentans* and *Pediococcus acidilactici* on Metabolite Produced During Fermentation and Volatile Composition of Coffee Beans. **Fermentation**, Basel, v. 5, n. 67, p. 1-17, 2019.
- VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, London, v.27, n. 8, p. 128-135, 2010.
- WANG, C. et al. Potential of lactic acid bacteria to modulate coffee volatiles and effect of glucose supplementation: Fermentation of green coffee beans and impact of coffee roasting. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 99, n. 1, p. 409–420, 2019.
- YUNITA, D.; DODD, C. E. R. Microbial community dynamics of a blue-veined raw milk cheese from the United Kingdom. **Journal of Dairy Science**, Champaign v. 101, n. 6, p. 4923–4935, 2018.
- ZHANG, S. J. et al. Following coffee production from cherries to cup: Microbiological and metabolomic analysis of wet processing of *Coffea arabica*. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 85, n. 6, p. 1–22, 2019b.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 - FERMENTAÇÃO DE FRUTOS DE CAFÉ COM INOCULAÇÃO SEQUENCIAL DE *Lactobacillus plantarum* E *Saccharomyces cerevisiae*: EFEITO NA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL E CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS.

Normas do periódico (versão preliminar)

1 **FERMENTAÇÃO DE FRUTOS DE CAFÉ COM INOCULAÇÃO SEQUENCIAL DE**
2 ***Lactobacillus plantarum* E *Saccharomyces cerevisiae*: EFEITO NA COMPOSIÇÃO**
3 **VOLÁTIL E CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS.**

4 Mariane Helena Sances RABELO*^a, Flávio Meira BOREM^a, Yudai MOTOYOSHI^b,
5 Rodrigo Soares PIERONI^c, Ana Paula de Carvalho ALVES^a, Claudia Mendes dos
6 SANTOS^a

7
8 ^aDepartment of Agricultural Engineering, Federal University of Lavras, POB 3037, 37.200-
9 000 Lavras, MG, Brazil.

10 ^bSuntory Company, Japan.

11 ^cAssociação dos produtores de café da Serra da Canastra

12
13 **ABSTRACT**

14 Culturas iniciadoras mistas de bactérias do ácido lático e leveduras utilizadas na produção de
15 alimentos fermentados, inclusive de café, são uma alternativa favorável à qualidade sensorial
16 e segurança alimentar do produto final. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da
17 fermentação de frutos de café com inoculação sequencial de *Lactobacillus plantarum* seguido
18 de *Saccharomyces cerevisiae* e o efeito do tempo de fermentação no aroma e sabor da bebida
19 do café e na composição volátil dos grãos de café torrados. Os frutos de café foram
20 fermentados por 48h e 96h com inoculação de *Lactobacillus plantarum* seguido de
21 *Saccharomyces cerevisiae* e respectivos controles. O aroma e o sabor da bebida do café
22 fermentado com inoculação sequencial apresentaram complexidade, com predominância de
23 notas sensoriais frutadas e fermentadas. Além disso, foram identificados 47 compostos
24 voláteis, os principais compostos presentes nos grãos torrados foram furfuryl acetate, tiofeno,
25 piridina e 1-metilpirrol.

26
27 Key-words: Bactéria do ácido lático, *Coffea arabica*, Cultura iniciadora mista

28
29 **1 INTRODUÇÃO**

30 Bactérias, leveduras e fungos estão naturalmente presentes no café, e a colonização por
31 esses microrganismos ocorre ao longo de toda a cadeia produtiva, desde o fruto ligado ao
32 cafeeiro até o armazenamento dos grãos (Silva et al., 2000).

33 Nas etapas de pós-colheita, os constituintes dos frutos de café servem de substrato para
34 o desenvolvimento desses microrganismos, suprindo-os de fontes de carbono e nitrogênio
35 (Silva et al., 2000). Além disso, ocorrem mudanças químicas e físicas nos frutos que
36 proporcionam a seleção de grupos ou espécies microbianas, que, por meio da atividade
37 metabólica, podem influenciar na qualidade final da bebida do café (Silva et al., 2008).

38 Estudos sobre sucessão microbiana durante o processo de fermentação espontânea e
39 secagem de cafés naturais identificaram que bactérias e leveduras predominam em momentos

40 alternados. No início do processo de fermentação e secagem, as bactérias representam 96,3%
41 do total de microrganismos isolados quando os frutos possuem cerca de 69% de teor de água e
42 a atividade de água de 0,95. Quando a atividade de água dos frutos atinge valores entre 0,82 e
43 0,85 como resultado do processo de secagem, a população de leveduras predomina entre os
44 microrganismos presentes (Silva et al., 2008).

45 Leveduras e bactérias do ácido láctico (LAB) foram utilizadas em estudos recentes
46 como culturas iniciadoras puras no processamento pós-colheita do café com o objetivo de
47 reduzir o tempo necessário para a fermentação e modular as características químicas e
48 sensoriais dos grãos de café (Bressani et al., 2018; Carvalho Neto et al., 2018b; Carvalho Neto
49 et al., 2020; Evangelista et al., 2014a; Evangelista et al., 2014b; Martinez et al., 2017; Ribeiro
50 et al., 2017; Pereira et al., 2016; Wang et al., 2019). Dentre os microrganismos mais estudados,
51 a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria do ácido láctico *Lactobacillus plantarum* são
52 espécies com adaptabilidade aos fatores estressantes do processamento pós-colheita, consumo
53 eficiente de açúcares da polpa dos frutos de café e produção adequada de ácidos orgânicos e
54 compostos voláteis (Pereira et al., 2016; Pereira et al., 2019).

55 Apesar do uso de culturas iniciadoras puras no processamento dos frutos de café
56 oferecer vantagens, estudos recentes mostram que culturas iniciadoras mistas de bactérias e
57 leveduras utilizadas na produção de alimentos fermentados, inclusive de frutos de café, são uma
58 alternativa favorável à qualidade sensorial e segurança alimentar do produto final (Garcia et al.,
59 2019; Vale et al., 2019).

60 Processos espontâneos de fermentação de alimentos são realizados com culturas mistas
61 estabelecidas naturalmente. Microrganismos iniciantes e também microrganismos não
62 iniciantes, contribuem para as características físico-químicas e sensoriais do produto final,
63 principalmente em processos não estéreis (Evangelista et al., 2015; Gardner et al., 2001; Lu et
64 al., 2018; Papalexandratou et al., 2011; Yunita & Dodd, 2018; Zhang et al., 2019b). No entanto,

65 os microrganismos em consórcios podem interagir e influenciar o metabolismo uns dos outros.
66 Essa interação entre os microrganismos pode ser positiva, neutra ou negativa e ocorre por meio
67 de contato físico via moléculas de sinalização ou através de alterações nas propriedades físico-
68 químicas do ambiente (Siewerts et al., 2008). García e colaboradores (2017, 2018) utilizaram
69 a inoculação sequencial como um artifício para impedir a exclusão competitiva exercida por
70 compostos antimicrobianos produzidos por LAB no *Pseudomonas taetrolens* sensível,
71 inoculando o LAB em segundo lugar em substratos lácteos.

72 A inoculação sequencial tem sido utilizada na fabricação de diversos produtos
73 fermentados, como por exemplo vinho, sidra e bebidas fermentadas lácteas e não lácteas
74 (Herrero et al., 1999; García et al. 2017, 2018; Lu, Putra & Liu, 2018). Em um sistema de
75 fermentação sequencial podem ser implementados estágios diferenciados, nos quais são
76 aplicadas condições operacionais específicas. Desta forma, processos são otimizados e são
77 permitidas o uso de condições mais favoráveis para cada microrganismo.

78 Na produção de vinho e sidra, em design sequencial, foi observado que a mudança de
79 temperatura em determinadas fases da fermentação impedia a formação de produtos voláteis
80 indesejáveis devido ao metabolismo da levedura (Herrero et al., 1999). No desenvolvimento de
81 bebidas fermentadas para lácteos e não lácteos envolvendo LAB, a introdução da uma levedura
82 em um segundo estágio resultou em melhora na sobrevivência da bactéria láctea em decorrência
83 da relação simbiótica desenvolvida (García et al. 2017, 2018; Lu, Putra & Liu, 2018). Desta
84 forma, com o uso da inoculação sequencial novos consórcios microbianos podem ser
85 explorados, evitando possíveis interações amensalistas.

86 Nesse sentido, um parâmetro chave nas fermentações com inoculação sequencial é a
87 duração do intervalo entre a primeira e a segunda inoculação (Ciani et al., 2014). O intervalo
88 entre as inoculações pode afetar o desenvolvimento e a atividade metabólica do primeiro
89 microrganismo e, conseqüentemente, a concentração de substratos, condições físico-químicas

90 do meio, produtos e outros metabólitos que interagem com o segundo microrganismo. No
91 entanto, esse intervalo pode criar um ambiente com condições mais favoráveis para a
92 inoculação e o desenvolvimento da segunda cultura. Os resultados do estudo de Freire e
93 colaboradores (2017) mostraram claramente essa interação, em que a população de leveduras
94 na fermentação de co-cultura foi favorecida pela redução dos valores de pH para 4,0-4,5 devido
95 a atividade metabólica da LAB.

96 Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi realizar o processo de fermentação de
97 frutos de café com inoculação sequencial de *Lactobacillus plantarum* seguido de
98 *Saccharomyces cerevisiae* e avaliar o efeito dessa técnica de inoculação e do tempo total de
99 fermentação nas características sensoriais da bebida do café e na composição volátil dos grãos
100 torrados.

101 **2 MATERIAL E MÉTODO**

102 **2.1 Culturas Iniciadoras e Inoculação**

103 Para o processo de fermentação dos frutos de café com inoculação sequencial foram
104 utilizadas duas culturas iniciadoras, sendo uma bactéria do ácido láctico e uma levedura do
105 gênero *Saccharomyces*.

106 A bactéria do ácido láctico utilizada nesta pesquisa foi uma cepa da espécie
107 *Lactobacillus plantarum* isolada e selecionada pela *Università Cattolica del Sacro Cuore –*
108 *Italy* e comercializada na forma liofilizada pela empresa Lallemand. Essa espécie foi escolhida
109 pois foi utilizada em outros estudos como cultura iniciadora e apresentou bons resultados na
110 produção de ácidos orgânicos, compostos voláteis aromáticos e na qualidade sensorial da
111 bebida do café (Carvalho Neto et al., 2018b, Pereira et al., 2016). Além disso, diversos estudos
112 relataram a presença de *Lactobacillus Plantarum* tanto na superfície dos frutos de café, como
113 também durante o processo de fermentação de grãos e frutos de café (Carvalho Neto et al.,

114 2018a; De Bruyn et al., 2017; Leong et al., 2014; Ribeiro et al., 2018; Vilela et al., 2010; Zhang
115 et al., 2019a; Zhang et al., 2019b).

116 A levedura utilizada nesta pesquisa foi uma cepa da espécie *Saccharomyces cerevisiae*
117 isolada e comercializada liofilizada pela empresa Lalvin / Lallemand. A espécie *Saccharomyces*
118 *cerevisiae* já foi utilizada como cultura iniciadora em diversos estudos de fermentação de café
119 e apresentou resultados positivos para a melhoria da qualidade do café (Bressani et al., 2018;
120 Evangelista et al., 2014a; Evangelista et al., 2014b; Martinez et al., 2017; Ribeiro et al., 2017).

121 A ativação da bactéria do ácido lático foi realizada por reidratação com volume de água
122 igual a vinte vezes o peso de bactéria liofilizada, sendo a temperatura da água de
123 aproximadamente 25°C, conforme orientações do provedor. A ativação da levedura ocorreu da
124 mesma forma, no entanto o volume de água foi de dez vezes o peso de levedura liofilizada e a
125 temperatura da água foi aproximadamente 36°C.

126 A inoculação das culturas iniciadoras e a fermentação dos frutos de café foram
127 realizadas em biorreatores cilíndricos de polietileno de alta densidade virgem com capacidade
128 de 100 L e fechamento hermético. A inoculação foi feita por aspersão diretamente sobre os
129 frutos de café contidos nos biorreatores na concentração de 10^7 UFC/g de frutos para ambos os
130 microrganismos.

131 **2.2 Caracterização do experimento**

132 Esta pesquisa foi conduzida na região da Serra da Canastra, no município de Vargem
133 Bonita, Minas Gerais, Brasil. Foram utilizados frutos maduros de *Coffea arabica* da variedade
134 Catuaí Vermelho, processados por via seca, com objetivo de avaliar a composição volátil e as
135 características sensoriais da bebida do café originada de grãos que sofreram um processo de
136 fermentação durante a pós-colheita.

137 Dois fatores do processo de fermentação dos frutos de café foram estudados, a
138 inoculação sequencial das culturas iniciadoras *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces*
139 *cerevisiae* e o tempo total de fermentação.

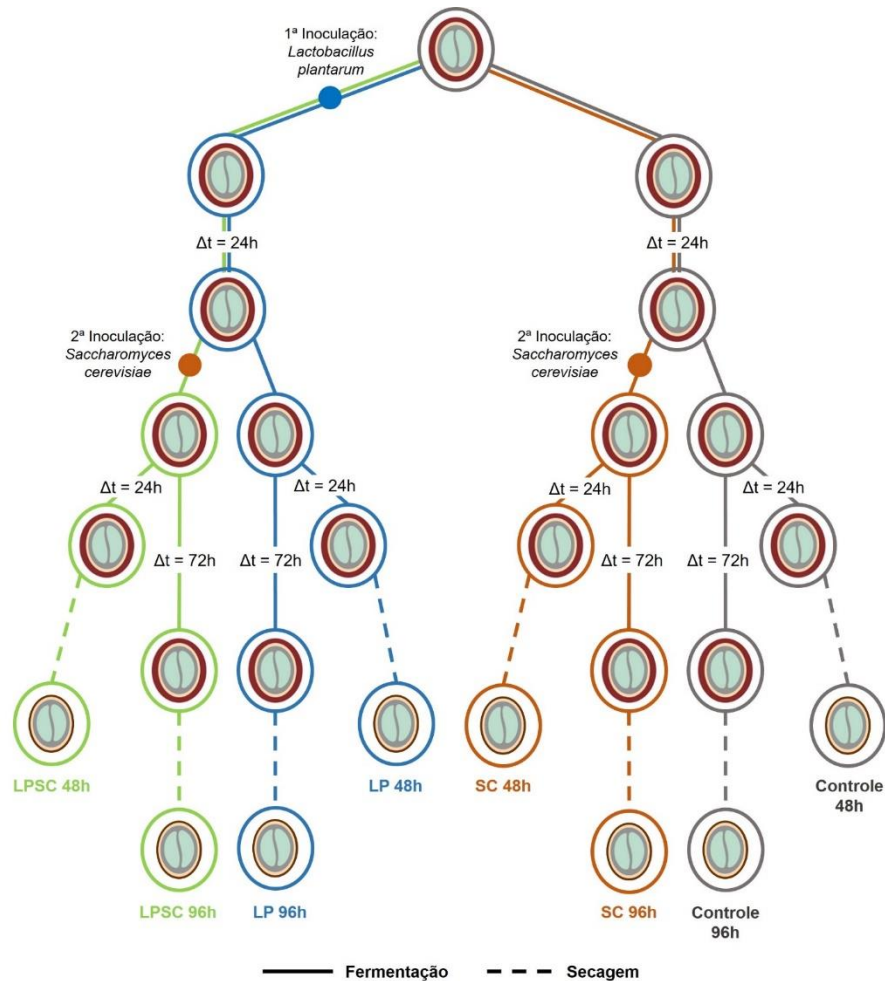
140 Dessa forma, considerando o estudo de sucessão microbiana em frutos de café realizado
141 por Silva e colaboradores (2008), foi estabelecido que primeiro seria inoculada a bactéria do
142 ácido láctico e após um intervalo de 24h ocorreria a inoculação da levedura.

143 O fator inoculação sequencial foi composto por quatro níveis que correspondem à
144 presença ou ausência das culturas iniciadoras. O fator tempo total de fermentação dos frutos de
145 café foi avaliado em dois níveis, 48 horas e 96 horas após o início do processo de fermentação
146 dos frutos. Desta forma, o experimento foi composto por um fatorial de 4 x 2 (4 níveis do fator
147 inoculação sequencial e 2 níveis do fator tempo total), totalizando 8 tratamentos realizados em
148 triplicata. Cada amostra foi composta por 20 L de frutos de café.

149 Portanto, os tratamentos realizados foram: (i) Inoculação de *L. plantarum* seguido de *S.*
150 *cerevisiae* (LPSC), 48h de fermentação, (ii) Inoculação de *L. plantarum* seguido de *S.*
151 *cerevisiae* (LPSC), 96h de fermentação, (iii) Inoculação somente de *L. plantarum* (LP), 48h de
152 fermentação, (iv) Inoculação somente de *L. plantarum* (LP), 96h de fermentação, (v) Inoculação
153 somente de *S. cerevisiae* (SC), 48h de fermentação, (vi) Inoculação somente de *S. cerevisiae*
154 (SC), 96h de fermentação, (vii) Controle, 48h de fermentação e (viii) Controle, 96h de
155 fermentação (Figura 1). Como os tratamentos “v” e “vi” representam o controle da inoculação
156 de *L. plantarum*, a inoculação de *S. cerevisiae* foi realizada somente após 24h do início do
157 processo de fermentação.

158

159 Figura 1 Fluxograma do processo de inoculação sequencial, fermentação dos frutos e
160 secagem.



161

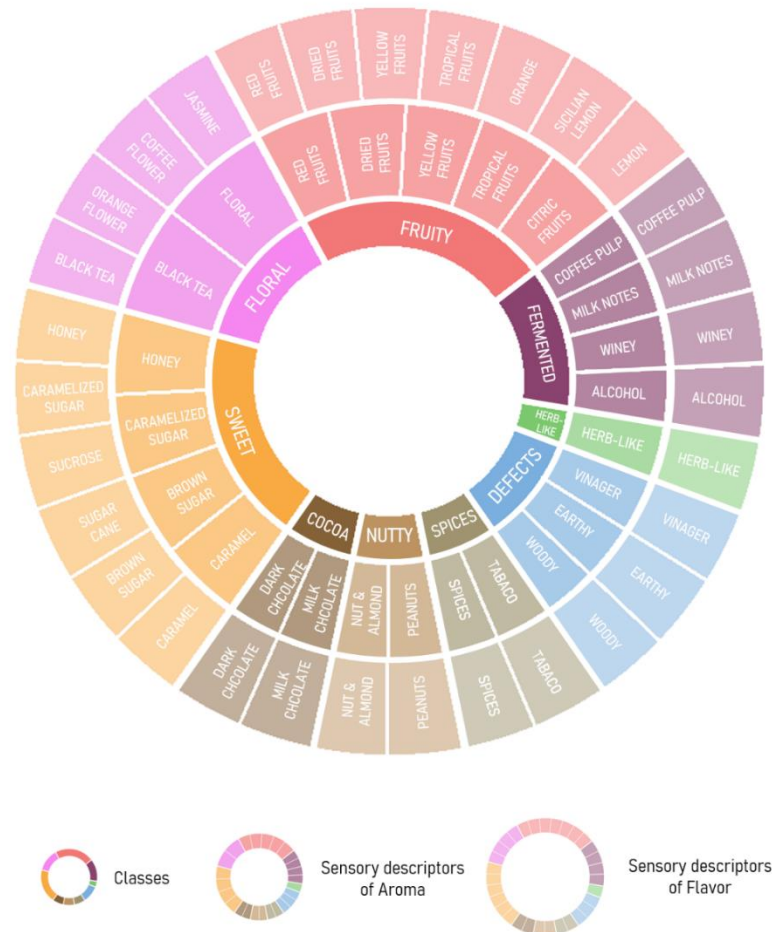
162 2.2 Avaliação Sensorial

163 A avaliação sensorial foi realizada por um painel sensorial composto por cinco
 164 degustadores treinados e com certificação internacional *Q-grader*. Todos os procedimentos de
 165 preparo de amostras e torra foram realizados conforme as recomendações da *Specialty Coffee*
 166 *Association (SCA) Protocols – Cupping Specialty Coffee* (Lingle, 2011).

167 Na primeira etapa de avaliação sensorial, foi realizado um levantamento de descritores
 168 sensoriais que melhor descreviam os atributos aroma e sabor do experimento como um todo.
 169 Posteriormente, foram geradas duas listas de descritores sensoriais, sendo uma lista para cada
 170 atributo. Com base na *Coffee Taster's Flavor Wheel* (Spencer et al., 2016) os descritores
 171 sensoriais listados foram agrupados em 9 classes e cada classe foi nomeada com um termo que
 172 melhor descrevia a classe (Figura 2).

173

174 Figura 2 Descritores sensoriais de aroma e sabor utilizados na avaliação sensorial



175

176 Nota. Figura adaptada de Spencer et al., 2016.

177

178 Na segunda etapa, a metodologia descritiva CATA (*Check All That Apply*) (Adams et
 179 al., 2007) foi utilizada para a avaliação sensorial de cada amostra. O questionário de avaliação
 180 sensorial CATA (Figura 3) foi composto pela lista de descritores sensoriais gerada na primeira
 181 etapa. Os degustadores foram solicitados a provar as amostras e responder o questionário
 182 CATA, assinalando a classe de descritores que melhor descreviam o aroma e o sabor de cada
 183 amostra. O número de marcações não foi restringido, o degustador poderia marcar o número de
 184 classes de descritores sensoriais que achasse necessário. Além disso, o degustador poderia

185 marcar os descritores sensoriais dentro da classe assinalada, desta forma uma descrição mais
186 específica foi realizada.

187

188 Figura 3 Questionário de avaliação sensorial CATA (*Check All That Apply*)

Amostra	CATA			
	AROMA		SABOR	
	FRUTADO	CASTANHAS	FRUTADO	ESPECIARIAS
	Vermelhas	Amendoim	Vermelhas	Especiarias
	Amarelas	Amendoas	Amarelas	Tabaco
	Cítricas	FERMENTADO	Tropicais	CHOCOLATE
	Tropicais	Vinhoso	Cítricas	ao Leite
	Secas	Alcólico	Secas	Amargo
	FLORAL	Polpa de café	Limão cravo	CASTANHAS
	Floral	Lácteo	Laranja	Amendoim
	Chá Preto	HERBACEO	FLORAL	Amendoas
	ADOCICADO	Herbáceo	Jasmim	FERMENTADO
	Açúcar Mascavo	DEFEITOS	Flor de café	Vinhoso
	Mel	Vinagre	Flor de laranja	Alcólico
	Caramelo	Terroso	Chá preto	Polpa de café
	Açúcar Caramelizado	Amadeirado	ADOCICADO	Lácteo
	ESPECIARIAS		Açúcar Mascavo	HERBACEO
	Especiarias		Açúcar Caramelizado	Herbáceo
	Tabaco		Mel	DEFEITOS
	CHOCOLATE		Caramelo	Vinagre
	ao Leite		Cana-de-açúcar	Terroso
	Amargo		Sacarose	Amadeirado
Nome:			OBS:	

189

190

191 2.3 Análise da Composição Volátil

192 As amostras de café torrado foram moídas em moinho IKA 11A, e 2g de cada amostra
193 colocados em *vials* hermeticamente fechados para posterior análise de composição volátil
194 conforme a metodologia de Rabelo et al. (2020, in press).

195 Os compostos voláteis foram extraídos utilizando o headspace estático do equipamento
196 GC-MS modelo QP - 2010 SE (Shimadzu) equipado com uma coluna NST- 100 (30 m × 0,25
197 mm × 0,25 μm) com fase de polietilenoglicol similar a Carbowax®. Os vials contendo as
198 amostras foram colocados no equipamento e permaneceram nele por 30min até atingir o
199 equilíbrio a 70°C.

200 A fase volátil foi injetada no cromatógrafo a gás (GC) com posterior detecção utilizando
201 espectrômetro de massa (MS). A temperatura do injetor foi ajustada a 220 °C. O gás hélio,
202 utilizado como transportador, foi mantido com um de fluxo de 1 mL/min.

203 A programação de aquecimento foi: durante 6 min a temperatura do forno foi mantida
204 a 25 °C, logo após a temperatura foi aquecida até 70 °C com a taxa de 10°C / min, até 95°C a
205 5°C / min, até 115°C a 10°C / min, até 170 °C a 5°C / min e finalmente, até 215 °C a 40°C / min.
206 O tempo total da corrida foi de 35 minutos.

207 A análise dos dados e a identificação dos compostos foram realizadas usando o software
208 GCMSsolution (versão 4.4, Shimadzu Corporation, Japão) e a banco de dados NIST
209 NIST/EPA/NIH 2014. A identificação química foi realizada comparando os espectros de MS
210 com o banco de dados. Os resultados foram expressos em área percentual relativa que
211 corresponde a área do pico referente a cada composto identificado, calculada a partir da área
212 total do cromatograma.

213 **2.4 Análise Estatística**

214 **Análise sensorial**

215 A análise de múltiplos fatores (MFA) foi aplicada aos dados obtidos através do
216 questionário CATA para os atributos aroma e sabor. Os dados correspondem a frequência de
217 uso de cada classe de descritores para descrever cada tratamento, sendo a frequência
218 determinada pela contagem do número de degustadores que usaram a classe multiplicado pelo
219 número de repetições do tratamento. As classes que apresentaram uma frequência menor que
220 20% foram excluídas da análise de múltiplos fatores.

221 As análises foram realizadas conforme metodologia descrita por Ossani et al. (2017)
222 através do software R (R Development Core Team, 2017).

223 **Compostos Voláteis**

224 As áreas percentuais relativas dos compostos voláteis encontrados nos tratamentos
225 foram submetidas a análise de variância (ANAVA) e ao identificar diferenças significativas no
226 teste F, o teste de Scott-Knot foi aplicado, utilizando-se o software estatístico SISVAR
227 (SISVAR, version 5.3). Para melhor compreensão da relação dos tratamentos com a

228 composição volátil foi realizado uma análise dos componentes principais (PCA), utilizando o
229 software estatístico CHEMOFACE (CHEMOFACE, version 1.64). Uma matriz “m x n” foi
230 construída com as áreas relativas dos “n” picos cromatográficos identificados para as “m”
231 amostras avaliadas.

232 **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

233 **3.1 Caracterização Sensorial**

234 Este estudo foi pioneiro na utilização da técnica de inoculação sequencial para a
235 fermentação de frutos de café para a produção de cafés naturais especiais com características
236 complexas de aroma e sabor.

237 Os aromas predominantes da bebida do café que passou pelo processo de fermentação
238 com inoculação sequencial de *Lactobacillus plantarum* seguido de *Saccharomyces cerevisiae*
239 (LPSC) foram das classes frutado, fermentado e floral em ambos os tempos de fermentação (48
240 e 96h), diferindo dos demais tratamentos, como pode ser observado na Figura 4a, 4b e 4c da
241 análise de múltiplos fatores. O centroide que representa a inoculação sequencial (LPSC) está
242 localizado isolado na parte negativa da primeira coordenada (Figura 4b) e os centroides dos
243 tratamentos LP, SC e Controle estão localizados na parte positiva da primeira coordenada, que
244 é responsável por explicar 57,88% da variabilidade dos dados.

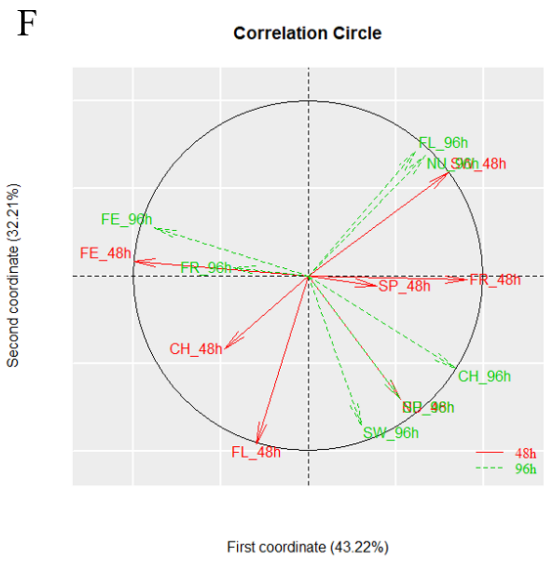
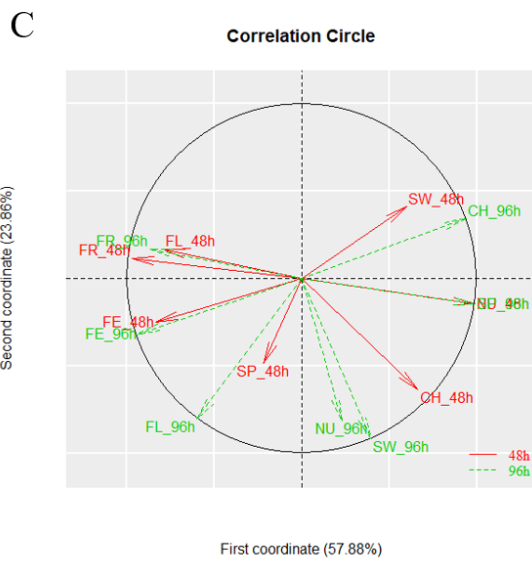
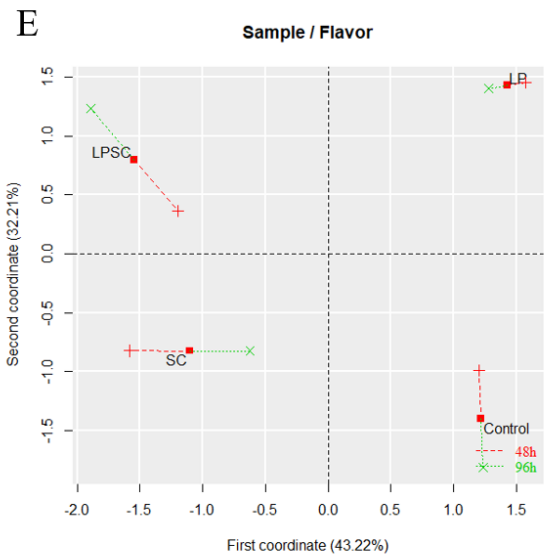
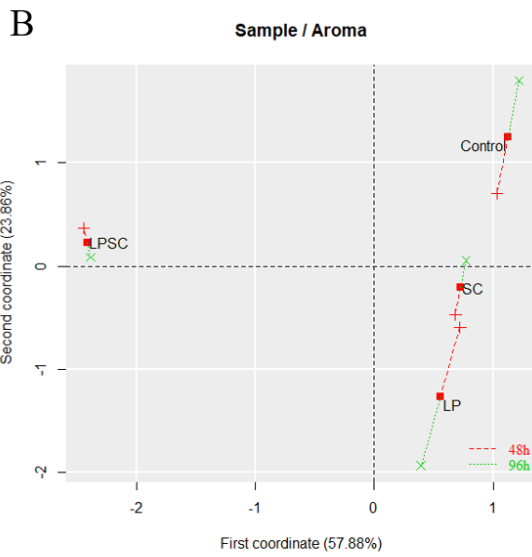
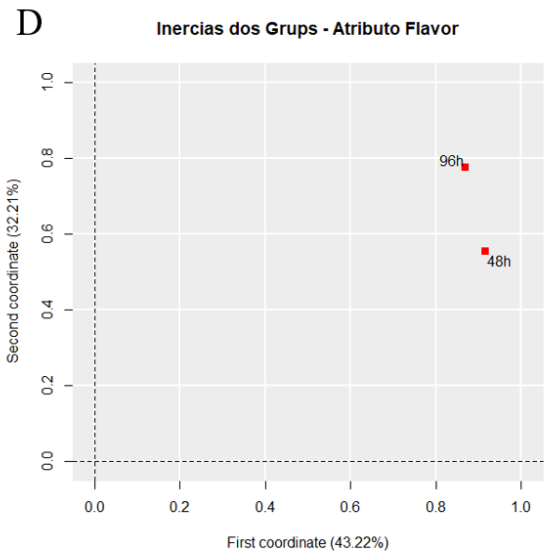
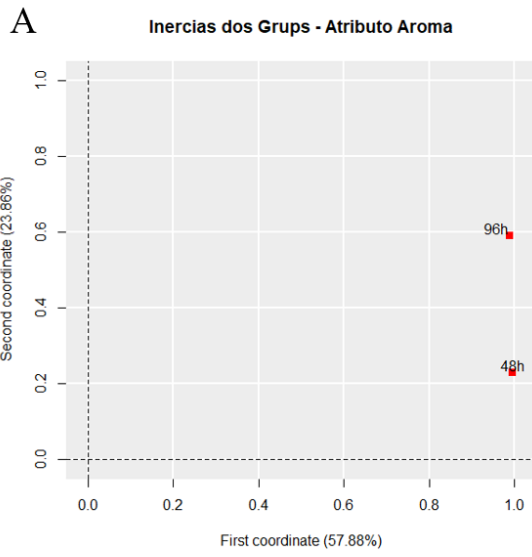
245 Os descritores sensoriais que melhor caracterizaram o aroma dos cafés que passaram
246 por 48h e 96h de fermentação com inoculação sequencial (LPSC) foram: frutas vermelhas,
247 frutas amarelas, frutas tropicais, floral, vinho e alcoólico. Apesar da classe de descritores
248 sensoriais “adocicado” não estar diretamente relacionada com a inoculação sequencial (LPSC)
249 na análise de múltiplos fatores, cabe ressaltar que 60% do painel sensorial atribuiu notas de
250 açúcar mascavo a esse tratamento. O café proveniente do tratamento Controle também foi
251 descrito pela maioria do painel sensorial com notas predominantes de açúcar mascavo em

252 ambos os tempos de fermentação. Notas aromáticas adocicadas estão mais relacionadas a
253 características do café, e não à ação de microrganismos.

254 Aroma e sabor são atributos sensoriais de grande importante da descrição da qualidade
255 da bebida do café. O sabor é um atributo sensorial que pode ser definido como “combinação
256 complexa de sensações olfativas, gustativas e trigeminais percebidas durante a degustação” que
257 “pode ser influenciado por efeitos táteis, térmicos, dolorosos e/ou cinestésicos” (International
258 Standards Organization – ISO 5492, 1992, 2008). O sentido gustativo, por meio das papilas
259 gustativas distribuídas sobre a superfície da língua, origina a percepção dos gostos básicos, que
260 são apenas cinco: doce, amargo, salgado, ácido e umami. Já, o sentido do olfato, através do
261 estímulo do epitélio olfativo, é capaz de distinguir inúmeros compostos voláteis que dão origem
262 aos aromas dos alimentos e bebidas. Desta forma, são os aromas percebidos pelo sentido do
263 olfato que realmente contribuem com a grande maioria das informações para a experiência do
264 sabor (Spence, 2016; Spence, 2015). Portanto, o aroma é a componente mais importante da
265 descrição da qualidade da bebida do café.

266

267 Figura 4 Análise de múltiplos fatores para a avaliação do aroma e do sabor da bebida de cafés
268 fermentados com inoculação sequencial e respectivos controles (A – Gráfico de inercia dos
269 grupos para o aroma, B – Gráfico de correspondência para aroma, C – Circulo de
270 correspondência para aroma, D – Gráfico de inercia dos grupos para sabor, E – Gráfico de
271 correspondência para sabor e F – Circulo de correspondência para sabor). Legenda: FR –
272 frutado, FL – Floral, FE – fermentado, SP – especiaria, CH – chocolate, SW – adocicadas, NU
273 – castanhas.



274

275

276 Os aromas frutados presentes no café e na sua bebida são na maioria das vezes oriundos
277 da ação de microrganismos, ou seja, de processos fermentativos que utilizam a mucilagem do
278 café como substrato para produção de compostos voláteis relacionados a esses aromas (Zhang
279 et al., 2019a; Zhang et al., 2019b). Estudos realizados em diferentes regiões produtoras de café
280 no Brasil, utilizaram culturas iniciadoras puras de cepas de bactérias do ácido láctico e também
281 de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação de frutos de café e o perfil sensorial
282 dos cafés foram descritos na sua maioria como frutado (Evangelista et al., 2014a; Evangelista
283 et al., 2014b; Pereira et al., 2016).

284 No entanto, nessa pesquisa, os cafés provenientes dos tratamentos LP e SC que
285 consistem em inoculação de culturas iniciadoras puras apresentaram predominância dos aromas
286 das classes chocolate (48h), castanhas (96h) e adocicado (96h) para o tratamento LP e castanhas
287 (48h) e especiarias (96h) para o tratamento SC (Figura 4c).

288 Desta forma, os resultados da análise de múltiplos fatores indicaram que a ação
289 conjunta das culturas iniciadoras *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae* na
290 fermentação dos frutos de café potencializou os aromas frutados, diversificando as notas
291 aromáticas dentro dessa classe, e ainda incorporando aromas característicos de produtos
292 fermentados descritos como vinhoso e alcoólico.

293 Em relação ao tempo total de fermentação na avaliação do aroma, foi observado uma
294 diferença entre os dois tempos (Figura 4a), principalmente nos tratamentos com inoculação das
295 culturas puras (LP e SC) e no tratamento Controle. As principais classes de aromas que
296 diferiram em relação ao tempo de fermentação foram chocolate e adocicado (Figura 4c).

297 Na avaliação do sabor, o centroide de cada tratamento foi disposto em um quadrante
298 distinto da análise de múltiplos fatores como observado na Figura 4e. A primeira coordenada,
299 que explicou 43,22% da variabilidade dos dados, foi responsável por discriminar os tratamentos
300 que continham a cultura iniciadora *Saccharomyces cerevisiae*. Por sua vez, a segunda

301 coordenada, que explicou 32,21% da variabilidade dos dados, discriminou os tratamentos que
302 continham a cultura *Lactobacillus plantarum*.

303 O fator tempo total de fermentação na avaliação do sabor (Figura 4d) apresentou maior
304 variação do que na avaliação do aroma (Figura 4a). Os sabores frutados foram mais
305 predominantes na bebida do café nos quais os frutos fermentaram 96h com inoculação
306 sequencial (LPSC) (Figura 4f). O principal descritor sensorial dessa classe foi frutas vermelhas,
307 assim como ocorreu no aroma. Zhang e colaboradores (2019b) observaram que a duração da
308 fermentação tem maior impacto nas características sensoriais da bebida do café que o tipo de
309 processamento, quando comparando cafés despulpados e desmucilados.

310 Os frutos de café inoculados com a cultura *Lactobacillus plantarum* (LP) apresentaram
311 bebida com sabores da classe adocicado com 48h de fermentação e floral e castanhas com 96h
312 de fermentação. Os sabores predominantes na bebida do café com inoculação da cultura
313 *Saccharomyces cerevisiae* pura (SC) foram chocolate e floral com 48h de fermentação. O
314 Controle apresentou sabores de castanhas e especiarias com 48h de fermentação e chocolate e
315 adocicado com 96h de fermentação.

316 Zhang et al. (2019b) ao estudar fermentações durante o processamento do café por via
317 úmida, observaram que as bactérias do ácido láctico desempenharam a função de proteção do
318 ecossistema de microrganismos indesejados, como por exemplo Enterobactérias e Clostrídios.
319 O ecossistema foi protegido de microrganismos que produzem compostos que causam aromas
320 e sabores desagradáveis, de forma que um perfil desejável de precursores de aroma e sabor
321 pudesse se desenvolver.

322 Além de contribuir para características de aroma e sabor desejáveis na bebida do café,
323 o uso de culturas iniciadoras de bactérias do ácido láctico em consórcio com leveduras secreta
324 compostos que causam a supressão de fungos filamentosos produtores de toxinas, como o
325 *Aspergillus ochraceus* (Massawe & Lifa, 2010).

326 A técnica de inoculação sequencial utilizada na fermentação dos frutos de café contribui
327 para agregar aromas e sabores frutados e fermentados a bebida do café natural especial. Os
328 principais descritores sensoriais da bebida do café natural fermentado com inoculação
329 sequencial (LPSC) foram frutas vermelhas e vinho.

330 **3.2 Perfil de compostos voláteis**

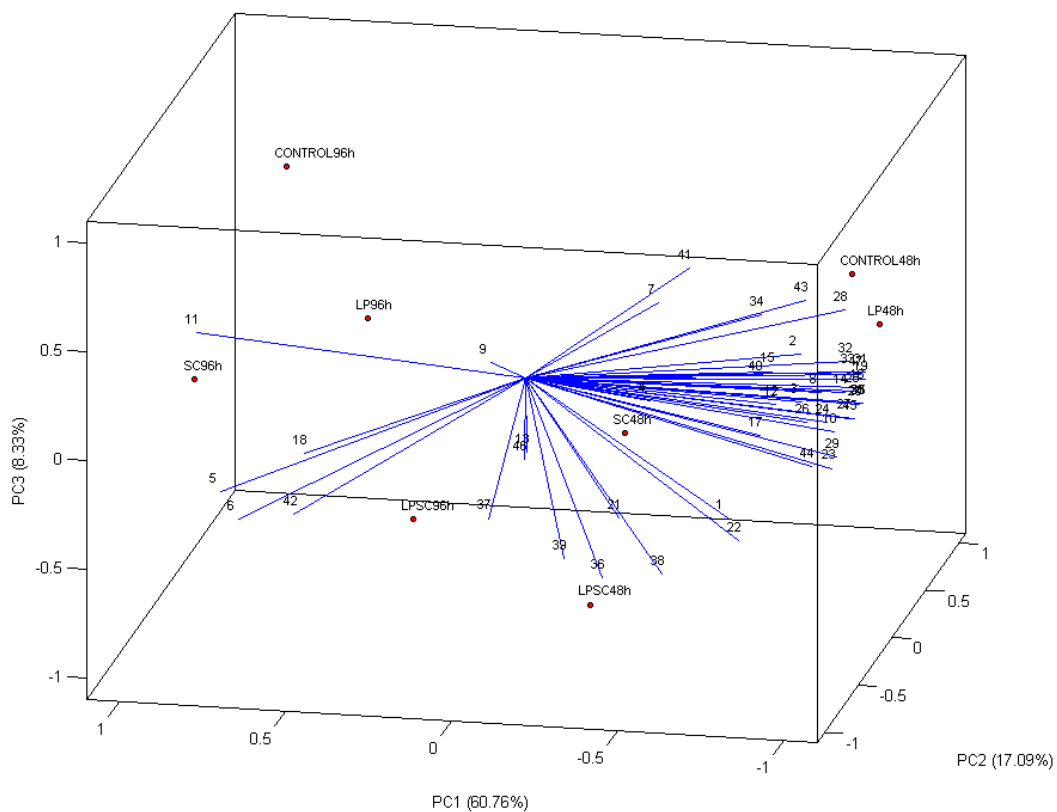
331 Quarenta e sete compostos foram identificados nesta pesquisa, dentre esses compostos,
332 aldeídos (4), ácidos (6), éster (1), furanos (9), tiofeno (1), tiazol (1), cetonas (6), pirazinas (8),
333 pirroles (2), álcoois (3), fenol (1), aminas (2) e amida (1). Para explicar as características
334 químicas e o agrupamento das amostras, a composição volátil foi analisado por meio da análise
335 de componentes principais (PCA) (Figura 5). As três componentes principais juntas explicaram
336 86.18% da variabilidade total dos dados. As amostras foram categorizadas em dois grupos em
337 função do fator tempo total de fermentação. Essa distinção foi relacionada principalmente ao
338 maior número de compostos voláteis relacionados aos grãos de café que fermentaram por 48h.

339 A componente principal 1, que explicou 60.76% da variabilidade dos dados, foi a
340 responsável por agrupar os tratamentos em função do fator tempo total de fermentação. Todos
341 os tratamentos apresentaram o mesmo número de picos cromatográficos, ou seja, o mesmo
342 número de compostos voláteis, no entanto, os tratamentos que fermentaram por 48h
343 apresentaram picos com área relativa maior que os tratamentos que fermentaram por 96h.
344 Devido a essa diferença, na análise de componentes principais (Figura 5) foi possível
345 discriminar os tratamentos LPSC 48h, LP 48h, SC 48h e Controle 48h, que se deslocaram para
346 o mesmo lado do gráfico (à direita do gráfico). Picos com áreas menores, encontrados nos frutos
347 de café fermentados por 96h, podem estar relacionados a degradação e consumo desses
348 compostos pelos microrganismos devido a um tempo prolongado de fermentação dos frutos de
349 café. Os compostos voláteis mais relacionados aos cafés fermentados por 48h com inoculação

350 sequencial de *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae* (LPSC 48h) foram 2,2-
 351 dimetilpropanal, tiofeno, 1-metilpirrole, 2,5-dimetilfurano e piridina.

352

353 Figura 5 Análise de componentes principais (PCA) de compostos voláteis presentes em grãos
 354 café fermentados com inoculação sequencial e simples (LPSC, LP, SC e Controle) em
 355 diferentes tempos totais de fermentação (48h e 96h).



356

357 Legenda: 1- Butanal, 2 - 2-Metilbutanal, 3 - 3-Metilbutanal, 4 - 2,2-Dimetilpropanal, 5 -
 358 Propanoic acid ethyl ester, 6 - 2-Propenoic acid ethyl ester, 7 - Ácido acético, 8 - Ácido
 359 propionóico, 9 - Ácido 4-hidroxi-butanóico, 10 - Ácido 3-metil-butanóico, 11 - Acetato de etila,
 360 12 - 2-Metilfurano, 13 - 2,5-Dimetilfurano, 14 - 2-Vinilfurano, 15 - Éter furfurilmetílico, 16 -
 361 Furfural, 17 - Furfuryl formate, 18 - Furfuryl acetate, 19 - 5-Metil-furfural, 20 - Furfuryl
 362 alcohol, 21 - Tiofeno, 22 - Tiazol, 23 - 2,3-Pentanediona, 24 - 3,4-Hexanediona, 25 - 4-Hidroxi-
 363 3-hexanona, 26 - 2-Hidroxi-3-pentanona, 27 - 1-Hidroxi-2-butanona, 28 - 1-(2-furanil)-etanona,
 364 29 - Pirazina, 30 - Metilpirazina, 31 - 2,5-Dimetilpirazina, 32 - 2,6-Dimetilpirazina, 33 -
 365 Etilpirazina, 34 - 2,3-Dimetilpirazina, 35 - 2-Etil-6-metilpirazina, 36 - 2-Etil-3-metilpirazina,
 366 37 - Piridina, 38 - 1-Acetil-1,4-di-hidropiridina, 39 - 1-Metilpirrol, 40 - 1-Metilpirrol-2-
 367 carboxaldeído, 41 - 2-Metil-3-Buten-2-ol, 42 - 1-Pentanol, 43 - 3-Metil-3-Buten-1-ol, 44 - 3-
 368 Metilfenol, 45 - 5-Nonilamina, 46 - 4-Etilamino-n-butilamina, 47 - Metil-ureia.

369

370 Os cafés que fermentaram por 96h com inoculação apenas da cultura *Saccharomyces*
371 *cerevisiae* (SC 96h) foram relacionados ao composto acetato de etila, um éster com
372 características sensoriais frutadas (Pereira et al., 2019) e muito encontrado em cafés
373 fermentados por essa espécie de levedura (Evangelista et al., 2014b). O acetato de etila foi o
374 composto volátil que apresentou pico com maior área relativo dentre os todos compostos
375 encontrados nessa pesquisa (Tabela 1), principalmente nos cafés que fermentaram por 96h. Esse
376 éster também foi identificado nos tratamentos com inoculação sequencial (LPSC 48h e LPSC
377 96h), no entanto, a área relativa do pico foi menor. Vale et al. (2019) estudaram o uso de culturas
378 mista na fermentação do café e observaram que os compostos acetato de etila e etanol foram os
379 principais compostos voláteis detectados durante os processos de fermentação. Segundo
380 Evangelista et al. (2014b) ésteres em altas concentrações nos grãos de café podem conferir
381 sabor descrito como “super fermentado” a bebida, sendo essa uma característica indesejável em
382 cafés especiais.

383 Foi observado, a partir da análise de variância, que a interação entre os fatores
384 inoculação e tempo total de fermentação foi significativa (* - Tabela 1 e 2) para os compostos
385 butanal, 2-metilbutanal, 2,2-dimetilpropanal, propoinoic acid ethyl ester, 2-propenoic acid ethyl
386 ester, ácido acético, ácido propionóico, ácido 3-metil-butanóico, acetato de etila, furfural,
387 furfuryl acetate, 5-metil-furfural, tiofeno, 2,3-pentanediona, 4-hidroxi-3-hexanona, 2-hidroxi-
388 3-pentanona, 1-hidroxi-2-butanona, 1-(2-furanil)-etanona, metilpirazina, 2,6-dimetilpirazina,
389 2,3-dimetilpirazina, 2-etil-6-metilpirazina, piridina, 1-metilpirrol, 2-metil-3-buten-2-ol, 1-
390 pentanol, 3-metil-3-buten-1-ol, metil-urea.

391 Comparando as inoculações e o controle dentro do mesmo tempo total de fermentação
392 (Tabela 1 – Desdobramento do fator inoculação dentro do fator tempo total de fermentação), os
393 compostos furfuryl acetate, tiofeno, piridina e 1-metilpirrol apresentaram picos com maior área
394 relativa nos frutos de café que fermentaram com inoculação sequencial por 48h (LPSC 48h).

395 No entanto, ao comparar os tempos de fermentação dentro de cada processo de
396 inoculação (Tabela 2 – Desdobramento do fator tempo total de fermentação dentro do fator
397 inoculação), com exceção do composto ácido propiónico, todos os compostos apresentaram
398 picos com maior área relativa nos cafés que fermentaram com inoculação sequencial por 48h
399 (LPSC 48h). Em relação ao ácido propiónico, o composto apresentou pico com maior área
400 relativa para o tempo 48h em ambos os processos com inoculação das culturas puras (LP e SC).

401 O composto acetato de furfúril foi encontrado em estudos de fermentação de café com
402 culturas puras de *Saccharomyces cerevisiae* (Evangelista et al., 2014a, Evangelista et al.,
403 2014b), além disso, esse composto é caracterizado por aromas adocicados, frutados e de banana
404 (Pereira et al., 2019). Em concordância com a literatura, na avaliação sensorial foram atribuídas
405 notas frutadas ao tratamento (LPSC 48h), sendo o tratamento que o composto furfuryl acetate
406 apresentou pico com maior área relativa.

407 Existem dois fatores que contribuem para a formação de compostos voláteis nos grãos
408 de café: compostos inerentes do próprio grão e metabólitos microbianos resultantes de
409 processos de fermentação (Yeretzian et al., 2002). As leveduras produzem muitos compostos
410 voláteis de baixo peso molecular durante o processo de fermentação da mucilagem, como
411 ésteres, álcoois superiores, aldeídos, cetona e terpenóides. Dentre estes compostos, os ésteres
412 (Ésteres de etila e acetato) são em quantidade o grupo mais abundante de compostos voláteis
413 formados (Pereira et al., 2019). Estudos recentes têm realizado a seleção de leveduras
414 produtoras de ésteres, por exemplo, *Candida parapsilosis*, *Pichia fermentans*, *P.*
415 *guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulasporea delbrueckii* e *Yarrowia lipolytica*, para
416 serem utilizadas como culturas iniciadoras na fermentação dos frutos de café e aumentar o
417 conteúdo desses compostos nos grãos (Bressani et al., 2018; Evangelista et al., 2014b; Lee et
418 al., 2017; Pereira et al., 2014; Pereira et al., 2015; Silva et al., 2013). Foi observado que os
419 compostos acetato de n-butila, acetato de etila, acetato de isoamila, acetato de propila e

420 hexanoato de etila contribuíram para o desenvolvimento de notas sensoriais frutadas
421 (Evangelista et al., 2014a; Evangelista et al., 2014b; Pereira et al., 2015). Além das leveduras,
422 as bactérias do ácido láctico (*Lactobacillus plantarum*) também foram recentemente utilizadas
423 na fermentação de café para a formação de ésteres, como acetato de etila, isobutirato de etila e
424 acetato de hexila, e produção de grãos de café com características sensoriais desejáveis (Pereira
425 et al., 2016).

426 Tabela 1. Efeito da inoculação sequencial nas áreas relativas médias dos compostos voláteis de cafés fermentados com diferentes tempos totais de
 427 fermentação. Análise de variância e desdobramento da interação dos fatores inoculação sequencial e tempo total de fermentação, sendo a inoculação
 428 sequencial (LPSC, LP, SC e Controle) desdobrada dentro de cada tempo total de fermentação (48h e 96h)

Compostos Voláteis	48h				96h			
	LPSC	LP	SC	Control	LPSC	LP	SC	Control
<i>Aldeído</i>								
1 Butanal*	0.8382 ^a	0.6979 ^a	0.9166 ^a	0.7871 ^a	0.7442 ^a	0.6632 ^a	0.5649 ^a	0.6037 ^a
2 2-Metilbutanal*	5.6173 ^a	5.9089 ^a	6.1721 ^a	6.8633 ^a	5.4544 ^a	5.9379 ^a	4.8089 ^a	5.0430 ^a
3 3-Metilbutanal	1.9648	2.0341	2.0544	2.1032	1.8171	2.0241	1.6233	1.6787
4 2,2-Dimetilpropanal*	0.2628 ^a	0.2142 ^a	0.2425 ^a	0.2216 ^a	0.1454 ^a	0.2279 ^a	0.1783 ^a	0.1999 ^a
<i>Ácido</i>								
5 Propanoic acid, ethyl ester*	0.3265 ^a	0.0953 ^c	0.2311 ^b	0.0809 ^c	0.4269 ^a	0.3467 ^b	0.4426 ^a	0.2983 ^b
6 2-Propenoic acid, ethyl ester*	0.0799 ^a	0.0000 ^c	0.0527 ^b	0.0000 ^c	0.0751 ^a	0.0554 ^b	0.0829 ^a	0.0564 ^b
7 Ácido acético*	5.3113 ^a	6.9539 ^a	6.0447 ^a	5.7441 ^a	6.5880 ^a	5.8247 ^a	4.7871 ^a	6.5050 ^a
8 Ácido Propiónico*	0.3305 ^b	0.5050 ^a	0.4397 ^a	0.4214 ^a	0.4082 ^a	0.2900 ^b	0.2496 ^b	0.3143 ^b
9 Ácido 4-hidroxi-butanóico	0.2550	0.2651	0.2821	0.2025	0.2055	0.2371	0.2452	0.2684
10 Ácido 3-metil-butanóico*	0.2803 ^b	0.3375 ^a	0.2785 ^b	0.3406 ^a	0.3106 ^a	0.2016 ^b	0.1633 ^b	0.2131 ^b
<i>Éster</i>								
11 Acetato de etila*	8.1566 ^b	2.9899 ^c	10.2334 ^a	3.4074 ^c	20.8892 ^c	20.5493 ^c	30.5736 ^a	27.4281 ^b
<i>Furano</i>								
12 2-Metilfurano	9.1950	8.5685	8.7263	9.2967	7.0411	8.3047	7.4151	7.3925
13 2,5-Dimetilfurano	0.5126	0.3346	0.4326	0.4229	0.3308	0.4400	0.3736	0.3908
14 2-Vinilfurano	0.1961	0.2199	0.2027	0.2166	0.1391	0.1594	0.1444	0.1397
15 Éter furfurilmetílico	0.1225	0.1317	0.1096	0.1116	0.0749	0.1009	0.0891	0.0884
16 Furfural*	6.3992 ^c	9.8238 ^a	7.1619 ^c	8.5019 ^b	6.2562 ^a	5.0337 ^b	3.6565 ^b	4.4141 ^b
17 Furfuryl formate	0.3189	0.3265	0.3012	0.2566	0.2239	0.2897	0.1792	0.2226
18 Furfuryl acetate*	1.6697 ^a	1.1210 ^b	1.2083 ^b	0.9896 ^b	1.1699 ^a	1.4198 ^a	1.4646 ^a	1.4624 ^a
19 5-Metil-furfural*	2.9813 ^b	3.5470 ^a	2.9467 ^b	3.6508 ^a	2.5083 ^a	2.3212 ^a	2.0712 ^a	2.2721 ^a
20 Furfuryl alcohol	15.7926	17.1936	15.1041	16.9193	12.9806	12.5904	11.1924	12.2856

<i>Tiofeno</i>									
21	Tiofeno*	0.1728 ^a	0.1114 ^b	0.1406 ^b	0.1268 ^b	0.0951 ^a	0.1253 ^a	0.1079 ^a	0.1015 ^a
<i>Tiazol</i>									
22	Tiazol	0.0635	0.0464	0.0597	0.0577	0.0594	0.0395	0.0384	0.0409
<i>Cetona</i>									
23	2,3-Pentanediona*	5.1259 ^a	5.0938 ^b	4.9510 ^b	5.5528 ^b	4.5878 ^a	4.3421 ^a	3.7873 ^b	3.5888 ^b
24	3,4-Hexanediona	0.1929	0.1819	0.1628	0.2027	0.1392	0.1491	0.1240	0.1271
25	4-Hidroxi-3-hexanona*	0.2178 ^b	0.2770 ^a	0.2022 ^b	0.2643 ^a	0.1758 ^a	0.1746 ^a	0.1556 ^a	0.1473 ^a
26	2-Hidroxi-3-pentanona*	0.1479 ^a	0.1790 ^a	0.1138 ^b	0.1588 ^a	0.1388 ^a	0.1039 ^a	0.1110 ^a	0.1082 ^a
27	1-Hidroxi-2-butanona*	0.9068 ^b	1.1470 ^a	0.7791 ^c	0.9352 ^b	0.6992 ^a	0.6461 ^a	0.5537 ^a	0.5615 ^a
28	1-(2-furanil)-Etanona*	0.2761 ^b	0.4316 ^a	0.3637 ^b	0.5119 ^a	0.2193 ^a	0.2509 ^a	0.2110 ^a	0.2292 ^a
<i>Pirazina</i>									
29	Pirazina	1.7841	1.7781	1.7084	1.8381	1.4308	1.4439	1.3193	1.2324
30	Metilpirazina*	8.5923 ^b	9.8581 ^a	8.8064 ^b	10.3355 ^a	7.4930 ^a	7.2146 ^a	6.1284 ^b	6.1999 ^b
31	2,5-Dimetilpirazina	0.5487	0.6853	0.5925	0.6748	0.4935	0.4490	0.4334	0.4474
32	2,6-Dimetilpirazina*	0.8223 ^b	1.0178 ^a	0.7002 ^c	1.0264 ^a	0.6203 ^a	0.6898 ^a	0.5498 ^b	0.5563 ^b
33	Etilpirazina	0.8893	1.0192	0.8771	0.9825	0.6871	0.7328	0.7045	0.7135
34	2,3-Dimetilpirazina*	0.2017 ^b	0.2561 ^a	0.1816 ^b	0.2283 ^a	0.2099 ^a	0.1701 ^a	0.1876 ^a	0.2062 ^a
35	2-Etil-6-metilpirazina*	0.0651 ^b	0.1039 ^a	0.0848 ^a	0.0946 ^a	0.0640 ^a	0.0460 ^b	0.0340 ^b	0.0443 ^b
36	2-Etil-3-metilpirazina	0.1913	0.2131	0.1994	0.1532	0.2203	0.1476	0.1932	0.1275
<i>Piridina</i>									
37	Piridina*	12.0326 ^a	8.7763 ^b	9.7017 ^b	8.8065 ^b	8.3632 ^a	10.2052 ^a	9.4361 ^a	8.8993 ^a
38	1-Acetil-1,4-dihidropiridina	0.1379	0.1262	0.0973	0.0861	0.1064	0.0944	0.0978	0.0823
<i>Pirrol</i>									
39	1-Metilpirrol*	1.2800 ^a	0.8163 ^c	1.0742 ^b	0.9950 ^b	0.8882 ^a	1.0418 ^a	0.9216 ^a	0.7686 ^a
40	1-Metilpirrol-2-carboxaldeído	0.1176	0.1206	0.1170	0.1135	0.0838	0.1005	0.0885	0.0961
<i>Álcool</i>									
41	2-Metil-3-Buten-2-ol*	0.1960 ^b	0.1658 ^b	0.2209 ^a	0.2558 ^a	0.0551 ^b	0.2178 ^a	0.0816 ^b	0.1996 ^a
42	1-Pentanol*	0.2980 ^a	0.1376 ^b	0.2628 ^a	0.1027 ^b	0.6956 ^a	0.3438 ^c	0.5601 ^b	0.2546 ^c

43	3-Metil-3-Buten-1-ol <i>Fenol</i>	0.0591	0.0757	0.0524	0.0668	0.0382	0.0553	0.0434	0.0505
44	3-Metilfenol* <i>Amina</i>	0.4382 ^a	0.4137 ^a	0.4064 ^a	0.4461 ^a	0.3401 ^a	0.3730 ^a	0.2974 ^b	0.2831 ^b
45	5-Nonilamina	2.3224	2.5856	2.4553	2.5457	2.0737	1.8629	1.8367	1.8710
46	4-Etilamino-n-butilamina <i>Amida</i>	0.5484	0.5162	0.4420	0.3811	0.4163	0.5857	0.4417	0.3952
47	Metil-ureia*	1.7600 ^c	2.5980 ^a	2.1055 ^b	2.5193 ^a	1.8162 ^a	1.3766 ^b	1.2504 ^b	1.3904 ^b

429 *os valores médios dentro da mesma linha e do mesmo tempo total de fermentação (48h e 96h), seguidos por diferentes letras sobscritas em
430 minúsculas, diferem significativamente (p <0,05) pelo teste de Scott-Knott.

431

432 Tabela 2 Efeito do tempo total de fermentação nas áreas relativas médias dos compostos voláteis de cafés fermentados com diferentes tratamentos
433 de inoculação sequencial. Análise de variância e desdobramento da interação dos fatores inoculação sequencial e tempo total de fermentação, sendo
434 o tempo total de fermentação (48h e 96h) desdobrado dentro de cada tratamento de inoculação sequencial (LPSC, LP, SC e Controle).

Compostos Voláteis	LPSC		LP		SC		Control		
	48h	96h	48h	96h	48h	96h	48h	96h	
<i>Aldeído</i>									
1	Butanal*	0.8382 ^a	0.7442 ^a	0.6979 ^a	0.6632 ^a	0.9166 ^a	0.5649 ^b	0.7871 ^a	0.6037 ^b
2	2-Metilbutanal*	5.6173 ^a	5.4544 ^a	5.9089 ^a	5.9379 ^a	6.1721 ^a	4.8089 ^b	6.8633 ^a	5.0430 ^b
3	3-Metilbutanal	1.9648	1.8171	2.0341	2.0241	2.0544	1.6233	2.1032	1.6787
4	2,2-Dimetilpropanal*	0.2628 ^a	0.1454 ^b	0.2142 ^a	0.2279 ^a	0.2425 ^a	0.1783 ^b	0.2216 ^a	0.1999 ^a
<i>Ácido</i>									
5	Propoioic acid, ethyl ester*	0.3265 ^b	0.4269 ^a	0.0953 ^b	0.3467 ^a	0.2311 ^b	0.4426 ^a	0.0809 ^b	0.2983 ^a
6	2-Propenoic acid, ethyl ester*	0.0799 ^a	0.0751 ^a	0.0000 ^b	0.0554 ^a	0.0527 ^b	0.0829 ^a	0.0000 ^b	0.0564 ^a
7	Ácido acético*	5.3113 ^a	6.5880 ^a	6.9539 ^a	5.8247 ^a	6.0447 ^a	4.7871 ^a	5.7441 ^a	6.5050 ^a
8	Ácido propiónico*	0.3305 ^a	0.4082 ^a	0.5050 ^a	0.2900 ^b	0.4397 ^a	0.2496 ^b	0.4214 ^a	0.3143 ^b
9	Ácido 4-hidroxi-butanóico	0.2550	0.2055	0.2651	0.2371	0.2821	0.2452	0.2025	0.2684
10	Ácido 3-metil-butanóico*	0.2803 ^a	0.3106 ^a	0.3375 ^a	0.2016 ^b	0.2785 ^a	0.1633 ^b	0.3406 ^a	0.2131 ^b
<i>Éster</i>									

11	Acetato de etila*	8.1566 ^b	20.8892 ^a	2.9899 ^b	20.5493 ^a	10.2334 ^b	30.5736 ^a	3.4074 ^b	27.4281 ^a
	<i>Furano</i>								
12	2-Metilfurano	9.1950	7.0411	8.5685	8.3047	8.7263	7.4151	9.2967	7.3925
13	2,5-Dimetilfurano	0.5126	0.3308	0.3346	0.4400	0.4326	0.3736	0.4229	0.3908
14	2-Vinilfurano	0.1961	0.1391	0.2199	0.1594	0.2027	0.1444	0.2166	0.1397
15	Éter furfurilmetílico	0.1225	0.0749	0.1317	0.1009	0.1096	0.0891	0.1116	0.0884
16	Furfural*	6.3992 ^a	6.2562 ^a	9.8238 ^a	5.0337 ^b	7.1619 ^a	3.6565 ^b	8.5019 ^a	4.4141 ^b
17	Furfuryl formate	0.3189	0.2239	0.3265	0.2897	0.3012	0.1792	0.2566	0.2226
18	Furfuryl acetate*	1.6697 ^a	1.1699 ^b	1.1210 ^b	1.4198 ^a	1.2083 ^b	1.4646 ^a	0.9896 ^b	1.4624 ^a
19	5-Metil-Furfural*	2.9813 ^a	2.5083 ^b	3.5470 ^a	2.3212 ^b	2.9467 ^a	2.0712 ^b	3.6508 ^a	2.2721 ^b
20	Furfuryl alcohol	15.7926	12.9806	17.1936	12.5904	15.1041	11.1924	16.9193	12.2856
	<i>Tiofeno</i>								
21	Tiofeno*	0.1728 ^a	0.0951 ^b	0.1114 ^a	0.1253 ^a	0.1406 ^a	0.1079 ^b	0.1268 ^a	0.1015 ^b
	<i>Tiazol</i>								
22	Tiazol	0.0635	0.0594	0.0464	0.0395	0.0597	0.0384	0.0577	0.0409
	<i>Cetona</i>								
23	2,3-Pentanediona*	5.1259 ^a	4.5878 ^b	5.0938 ^a	4.3421 ^b	4.9510 ^a	3.7873 ^b	5.5528 ^a	3.5888 ^b
24	3,4-Hexanediona	0.1929	0.1392	0.1819	0.1491	0.1628	0.1240	0.2027	0.1271
25	4-Hidroxi-3-hexanona*	0.2178 ^a	0.1758 ^b	0.2770 ^a	0.1746 ^b	0.2022 ^a	0.1556 ^b	0.2643 ^a	0.1473 ^b
26	2-Hidroxi-3-pentanona*	0.1479 ^a	0.1388 ^a	0.1790 ^a	0.1039 ^b	0.1138 ^a	0.1110 ^a	0.1588 ^a	0.1082 ^b
27	1-Hidroxi-2-butanona*	0.9068 ^a	0.6992 ^b	1.1470 ^a	0.6461 ^b	0.7791 ^a	0.5537 ^b	0.9352 ^a	0.5615 ^b
28	1-(2-furanyl)-Ethanona*	0.2761 ^a	0.2193 ^a	0.4316 ^a	0.2509 ^b	0.3637 ^a	0.2110 ^b	0.5119 ^a	0.2292 ^b
	<i>Pirazina</i>								
29	Pirazina	1.7841	1.4308	1.7781	1.4439	1.7084	1.3193	1.8381	1.2324
30	Metilpirazina*	8.5923 ^a	7.4930 ^b	9.8581 ^a	7.2146 ^b	8.8064 ^a	6.1284 ^b	10.3355 ^a	6.1999 ^b
31	2,5-Dimetilpirazina	0.5487	0.4935	0.6853	0.4490	0.5925	0.4334	0.6748	0.4474
32	2,6-Dimetilpirazina*	0.8223 ^a	0.6203 ^b	1.0178 ^a	0.6898 ^b	0.7002 ^a	0.5498 ^b	1.0264 ^a	0.5563 ^b
33	Etilpirazina	0.8893	0.6871	1.0192	0.7328	0.8771	0.7045	0.9825	0.7135
34	2,3-Dimetilpirazina*	0.2017 ^a	0.2099 ^a	0.2561 ^a	0.1701 ^b	0.1816 ^a	0.1876 ^a	0.2283 ^a	0.2062 ^a

35	2-Etil-6-metilpirazina*	0.0651 ^a	0.0640 ^a	0.1039 ^a	0.0460 ^b	0.0848 ^a	0.0340 ^b	0.0946 ^a	0.0443 ^b
36	2-Etil-3-metilpirazina	0.1913	0.2203	0.2131	0.1476	0.1994	0.1932	0.1532	0.1275
	<i>Piridina</i>								
37	Piridina*	12.0326 ^a	8.3632 ^b	8.7763 ^a	10.2052 ^a	9.7017 ^a	9.4361 ^a	8.8065 ^a	8.8993 ^a
38	1-Acetil-1,4-dihidropiridina	0.1379	0.1064	0.1262	0.0944	0.0973	0.0978	0.0861	0.0823
	<i>Pirrol</i>								
39	1-Metilpirrol*	1.2800 ^a	0.8882 ^b	0.8163 ^b	1.0418 ^a	1.0742 ^a	0.9216 ^a	0.9950 ^a	0.7686 ^b
40	1-Metilpirrol-2-carboxaldeído	0.1176	0.0838	0.1206	0.1005	0.1170	0.0885	0.1135	0.0961
	<i>Álcool</i>								
41	2-Metil-3-Buten-2-ol*	0.1960 ^a	0.0551 ^b	0.1658 ^b	0.2178 ^a	0.2209 ^a	0.0816 ^b	0.2558 ^a	0.1996 ^b
42	1-Pentanol*	0.2980 ^b	0.6956 ^a	0.1376 ^b	0.3438 ^a	0.2628 ^b	0.5601 ^a	0.1027 ^b	0.2546 ^a
43	3-Metil-3-Buten-1-ol	0.0591	0.0382	0.0757	0.0553	0.0524	0.0434	0.0668	0.0505
	<i>Fenol</i>								
44	3-Metilfenol*	0.4382 ^a	0.3401 ^b	0.4137 ^a	0.3730 ^a	0.4064 ^a	0.2974 ^b	0.4461 ^a	0.2831 ^b
	<i>Amina</i>								
45	5-Nonilamina	2.3224	2.0737	2.5856	1.8629	2.4553	1.8367	2.5457	1.8710
46	4-Etilamino-n-butilamina	0.5484	0.4163	0.5162	0.5857	0.4420	0.4417	0.3811	0.3952
	<i>Amida</i>								
47	Metil-ureia*	1.7600 ^b	1.8162 ^a	2.5980 ^a	1.3766 ^b	2.1055 ^a	1.2504 ^b	2.5193 ^a	1.3904 ^b

435 *os valores médios dentro da mesma linha e do mesmo tratamento (LPSC, LP, SC e Controle), seguidos por diferentes letras sobrescritas em
436 minúsculas, diferem significativamente (p <0,05) pelo teste de Scott-Knott.

437 **4 CONCLUSÃO**

438 O aroma e o sabor da bebida do café nos quais os frutos foram fermentados com
439 inoculação sequencial de *Lactobacillus plantarum* seguido de *Saccharomyces cerevisiae*
440 apresentaram notas sensoriais desejáveis e requeridas em cafés naturais especiais. Os principais
441 descritores sensoriais do aroma e sabor foram das classes frutado e fermentado.

442 Os grãos de café fermentados com inoculação sequencial por 48h geralmente
443 apresentaram compostos voláteis com picos com maior área relativa que os grãos fermentados
444 por 96h. Os principais compostos voláteis relacionados a esse tratamento foram furfuryl acetate,
445 tiofeno, piridina e 1-metilpirrol.

446 Desta forma, essa pesquisa mostrou a viabilidade da técnica de inoculação sequencial
447 para a formação de compostos voláteis e produção de cafés naturais especiais com
448 características sensórias complexas.

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462 REFERÊNCIAS

- 463 Adams, J., Williams, A., Lancaster, B., & Foley, M. (2007). Advantages and uses of check all-
464 that-apply response compared to traditional scaling of attributes for salty snacks. In *7th*
465 *Pangborn Sensory Science Symposium*, 12–16 August, Minneapolis, MN, USA.
- 466 Bressani, A. P. P., Martinez, S. J., Evangelista, S. D., & Schwan, R. F. (2018). Characteristics
467 of fermented coffee inoculated with yeast starter cultures using different inoculation
468 methods. *LWT – Food Science and Technology*, 92, 212-219.
469 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.029>
- 470 Cañas, P. M. I., Romero, E. G., Pérez-Martín, F., Seseña, S., & Palop, M. L. (2015). Sequential
471 inoculation versus co-inoculation in Cabernet Franc wine fermentation. *Food Science and*
472 *Technology International*, 21(3), 203–212. [https://doi-](https://doi-org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1177/1082013214524585)
473 [org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1177/1082013214524585](https://doi-org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1177/1082013214524585)
- 474 Carvalho Neto, D. P. De, Pereira, G. V. De M., Finco, A. M. O., Rodrigues, C., De Carvalho,
475 J. C., & Soccol, C. R. (2020). Microbiological, physicochemical and sensory studies of
476 coffee beans fermentation conducted in a yeast bioreactor model. *Food Biotechnology*,
477 34(2), 172–192.
- 478 Carvalho Neto, D. P., Pereira, G. V. M., de Carvalho, J. C., Soccol, V. T., & Soccol, C. R.
479 (2018a). High-throughput rRNA gene sequencing reveals high and complex bacterial
480 diversity associated with Brazilian coffee bean fermentation. *Food Technol Biotechnol*,
481 56(1), 88–93. <http://dx.doi-org/10.17113/ftb.56.01.18.5441>
- 482 Carvalho Neto, D. P., Pereira, G. V. M., Finco, A. M. O., Letti, L. A. J., Silva, B. J. G.,
483 Vandenberghe, L. P. S., & Soccol, C. R. (2018b). Efficient coffee beans mucilage layer
484 removal using lactic acid fermentation in a stirred-tank bioreactor: Kinetic, metabolic and
485 sensorial studies. *Food Bioscience*, 26, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.10.005>
- 486 Ciani, M., Canonico, L., Oro, L., & Comitini, F. (2014). Sequential fermentation using non-
487 *Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *BIO Web of*
488 *Conferences*, 3, 02015. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20140302015>
- 489 Cinai, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture
490 fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking.
491 *FEMS Yeast Research*. 10(2), 123–133. [https://doi-org/10.1111/j.1567-](https://doi-org/10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x)
492 [1364.2009.00579.x](https://doi-org/10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x)
- 493 De Bruyn, F., Zhang, S. J., Pothakos, V., Torres, J., Lambot, C., Moroni, A. V., Callanan, M.,
494 Sybesma, W., Weckx, S., & De Vuyst, L. De. (2016). Exploring the impacts of postharvest
495 processing on the microbiota and metabolite profiles during green coffee bean production.

- 496 *Applied and Environmental Microbiology*, 83, e02398-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02398-16>.
497
- 498 Evangelista, S. R., Miguel, M. G. C. P., Cordeiro, C. S., Silva, C. F., Pinheiro, A. C. M., &
499 Schwan, R. F. (2014a). Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*)
500 fermentation process. *Food Microbiology*, 44, 87–95.
501 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.013>
- 502 Evangelista, S. R., Miguel, M. G. C. P., Silva, C. F., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F.
503 (2015). Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee
504 fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 102–112.
505 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.008>
- 506 Evangelista, S. R., Silva, C. F., Miguel, M. G. P. D. C, Cordeiro, C. d. S., Pinheiro, A. C. M.,
507 & Duarte, W. F., et al. (2014b). Improvement of coffee beverage quality by using selected
508 yeasts strains during the fermentation in dry process. *Food Research International*, 61,
509 183–195. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.033>
- 510 Farah, A., Monteiro, A. C., Calado, V., Franca, A. S., & Trugo, L. C. (2006). Correlation
511 between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry*, 98(2),
512 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.032>
- 513 Freire, A. L., Ramos, C. L., da Costa Souza, P. N., Cardoso, M. G. B., & Schwan, R. F. (2017).
514 Nondairy beverage produced by controlled fermentation with potential probiotic starter
515 cultures of lactic acid bacteria and yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 248,
516 39–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.011>
- 517 García, C., Bautista, L., Rendueles, M., & Díaz, M. (2018). A new synbiotic dairy food
518 containing lactobionic acid and *Lactobacillus casei*. *International Journal of Dairy*
519 *Technology*, 72(1), 47–56. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12558>
- 520 García, C., Rendueles, M., & Díaz, M. (2017). Synbiotic fermentation for the co-production of
521 lactic and lactobionic acids from residual dairy whey. *Biotechnology Progress*, 33(5),
522 1250–1256. <https://doi.org/10.1002/btpr.2507>
- 523 García, C., Rendueles, M., & Díaz, M. (2019). Liquid-phase food fermentations with microbial
524 consortia involving lactic acid bacteria: A review. *Food Research International*, 119, 207–
525 220. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.043>
- 526 Gardner, N. J., Savard, T., Obermeier, P., Caldwell, G., & Champagne, C. P. (2001). Selection
527 and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot,

- 528 cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *International Journal of Food Microbiology*,
529 64(3), 261–275. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00461-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00461-X)
- 530 Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M.
531 (2013). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and
532 sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality
533 of wine. *Food Microbiology*, 33(2), 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.004>
- 534 Herrero, M., de la Roza, C., García, L. A., & Díaz, M. (1999). Simultaneous and sequential
535 fermentations with yeast and lactic acid bacteria in apple juice. *Journal of Industrial*
536 *Microbiology and Biotechnology*, 22(1), 48–51. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900599>
- 537 Lee, L. W., Tay, G. Y., Cheong, M. W., Curran, P., Yu, B., & Liu, S.Q. (2017). Modulation of
538 the volatile and non-volatile profiles of coffee fermented with *Yarrowia lipolytica*: I.
539 Green coffee. *LWT – Food Science and Technology*, 77, 225-232.
540 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.047>
- 541 Leong, K. H., Chen, Y. S., Pan, S. F., Chen, J. J., Wu, H. C., Chang, Y. C., & Yanagida, F.
542 (2014). Diversity of lactic acid bacteria associated with fresh coffee cherries in Taiwan.
543 *Current Microbiology*, 68(4), 440–447. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0495-2>
- 544 Lingle, T. R. (2011) *The Coffee Cupper’s Handbook: Systematic Guide to the Sensory*
545 *Evaluation of Coffee’s Flavor*. (2011 Specialty Coffee Association of America, Ed.) (4,
546 revisad ed.).
- 547 Lu, Y., Putra, S. D., & Liu, S. Q. (2018). A novel non-dairy beverage from durian pulp
548 fermented with selected probiotics and yeast. *International Journal of Food Microbiology*,
549 265, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.030>
- 550 Lu, Z. M., Wang, Z. M., Zhang, X. J., Mao, J., Shi, J. S., & Xu, Z. H. (2018). Microbial ecology
551 of cereal vinegar fermentation: Insights for driving the ecosystem function. *Current*
552 *Opinion in Biotechnology*, 49, 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.006>
- 553 Martinez, S. J., Bressani, A. P. P., Miguel, M. G. C. P., Dias, D. R., Schwan, R. F. (2017).
554 Different inoculation methods for semi-dry processed coffee using yeasts as starter
555 cultures. *Food Research International*, 102, 333-340.
556 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.096>
- 557 Massawe, G. A., Lifa, S. J. (2010). Yeasts and lactic acid bacteria coffee fermentation starter
558 cultures. *International Journal of Postharvest Technology and Innovation*, 2(1), 41-82.
559 <https://doi.org/10.1504/IJPTI.2010.038187>
- 560 Papalexandratou, Z., Vrancken, G., De Bruyne, K., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2011).
561 Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a

- 562 restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food*
 563 *Microbiology*, 28(7), 1326–1338. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.003>
- 564 Pereira, G. V. M., Carvalho Neto, D. P., Magalhaes, A. L., Vasquez, Z. S., Medeiros, A. B. P.,
 565 Vandenberghe, L. P. S., & Soccol, C. R. (2019). Exploring the impacts of postharvest
 566 processing on the aroma formation of coffee beans - A review. *Food Chemistry*, 272, 441-
 567 452. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.061>
- 568 Pereira, G. V. M., Carvalho Neto, D. P., Medeiros, A. B. P., Soccol, V. T., Neto, E.,
 569 Woiciechowski, A. L., & Soccol, C. R. (2016). Potential of lactic acid bacteria to improve
 570 the fermentation and quality of coffee during on-farm processing. *International Journal*
 571 *of Food Science Technology*, 51(7), 1689–1695. <https://doi-org/10.1111/ijfs.13142>
- 572 Pereira, G. V. M., Neto, E., Soccol, V. T., Medeiros, A. B. P., Woiciechowski, A. L., Soccol,
 573 C. R. (2015) Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during
 574 on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. *Food Research*
 575 *International*, 75, 348–356. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.027>
- 576 Pereira, G. V. M., Soccol, V. T., Pandey, A., Medeiros, A. B. P., Andrade Lara, J. M. R., Gollo,
 577 A. L., & Soccol, C. R. (2014). Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in
 578 fermentation of coffee beans by the wet process. *International Journal of Food*
 579 *Microbiology*, 188, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.008>.
- 580 Rabelo, M. H. S., Borém, F. M., Lima, R. R. de, Alves, A. P. de C., Pinheiro, A. C. M., Ribeiro,
 581 D. E., Santos, C. M., Pereira, R. G. F. A. (2020, in press). Impacts of Quaker beans over
 582 sensory characteristics and volatile composition of specialty natural coffees. *Food*
 583 *Chemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128304>.
- 584 Ribeiro, L. S., Evangelista, S. R., Miguel, M. G. C. P., van Mullem, J., Silva, C. F., & Schwan,
 585 R. F. (2018). Microbiological and chemical-sensory characteristics of three coffee
 586 varieties processed by wet fermentation. *Annals of Microbiology*, 68, 705–716.
 587 <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1377-4>
- 588 Ribeiro, L. S., Pedrozo, M. G. C. P., Evangelista, S. R., Martins, P. M. M., van Mullem, J.,
 589 Belizario, M. H., Schwan, R. F. (2017). Behavior of yeast inoculated during semi-dry
 590 coffee fermentation and the effect on chemical and sensorial properties of the final
 591 beverage. *Food Research International*, 92, 26–32.
 592 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.011>
- 593 Sieuwerts, S., de Bok, F. A. M., Hugenholtz, J., & van Hylckama Vlieg, J. E. (2008).
 594 Unraveling microbial interactions in food fermentations: From classical to genomics

- 595 approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), 4997–5007.
596 <https://doi.org/10.1128/AEM.00113-08>
- 597 Silva, C. F., Batista, L. R., Abreu, L. M., Dias, E. S., Schwan, R. F. (2008). Succession of
598 bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation.
599 *Food Microbiology*, 25(8), 951-957. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.07.003>
- 600 Silva, C. F., Schwan, R. F., Sousa Dias, E., & Wheals, A. E. (2000). Microbial diversity during
601 maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil.
602 *International Journal of Food Microbiology*, 60(2–3), 251–260.
- 603 Silva, C. F., Vilela, D. M., Cordeiro, C. S., Duarte, W. F., Dias, D. R., Schwan, R. F. (2013).
604 Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. *World*
605 *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(2), 235-247.
606 <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1175-2>
- 607 Spence C. (2015). Just how much of what we taste derives from the sense of smell? *Flavour*, 4,
608 30. <https://doi.org/10.1186/s13411-015-0040-2>
- 609 Spence C. (2016) The neuroscience of flavor. In: Piqueras-Fiszman B, Spence C, eds.
610 Multisensory Flavor Perception: From Fundamental Neuroscience through to the
611 Marketplace. Oxford, UK: Elsevier; 2016:235e248.
- 612 Spencer, M., Sage, E., Velez, M., & Guinard, J. X. (2016). Using Single Free Sorting and
613 Multivariate Exploratory Methods to Design a New Coffee Taster’s Flavor Wheel. *Journal*
614 *of Food Science*, 81(12), S2997-S3005. <https://doi.org/10.1111/1750-841.13555>
- 615 Vale, A. S., Pereira, V. M. P., Carvalho Neto, D. P., Rodrigues, C., Pagnoncelli, M. G. B., &
616 Soccol, C. R. (2019). Effect of Co-Inoculation with *Pichia fermentans* and *Pediococcus*
617 *acidilactici* on Metabolite Produced During Fermentation and Volatile Composition of
618 Coffee Beans. *Fermentation*. 5(67), 1-17. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030067>
- 619 Vilela, D. M., Pereira, G. V. M., Silva, C. F., Batista, L. R., & Schwan, R. F. (2010). Molecular
620 ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry
621 processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*, 27(8), 1128–1135.
622 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.024>
- 623 Wang, C., Sun, J., Lassabliere, B., Yu, B., Zhao, F., Zhao, F., Chen, Y., & Liu, S. Q. (2019).
624 Potential of lactic acid bacteria to modulate coffee volatiles and effect of glucose
625 supplementation: Fermentation of green coffee beans and impact of coffee roasting.
626 *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 99(1), 409–420.
627 <https://doi.org/10.1002/jsfa.9202>

- 628 Yeretian, C., Jordan, A., Badoud, R., & Lindinger, W. (2002). From the green bean to the cup
629 of the coffee: Investigating coffee roasting by on-line monitoring of volatiles. *European*
630 *Food Research and Technology*, 214(2), 92–104. [https://doi-org/10.1007/s00217-001-](https://doi-org/10.1007/s00217-001-0424-7)
631 0424-7
- 632 Yunita, D., & Dodd, C. E. R. (2018). Microbial community dynamics of a blue-veined raw milk
633 cheese from the United Kingdom. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 4923–4935.
634 <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14104>
- 635 Zhang, S. J., De Bruyn, F., Pothakos, V., Contreras, G. F., Cai, Z., Moccand, C., Weckx, S., &
636 De Vuyst, L. (2019a). Influence of Various Processing Parameters on the Microbial
637 Community Dynamics, Metabolomic Profiles, and Cup Quality During Wet Coffee
638 Processing. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2621.
639 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02621>
- 640 Zhang, S. J., De Bruyn, F., Pothakos, V., Torres, J., Falconi, C., Moccand, C., Weckx, S., & De
641 Vuyst, L. (2019b). Following coffee production from cherries to cup: Microbiological and
642 metabolomic analysis of wet processing of *Coffea arabica*. *Applied and Environmental*
643 *Microbiology*, 85(6), 1–22. <https://doi.org/10.1128/AEM.02635-1>

ARTIGO 2 - FERMENTAÇÃO DE FRUTOS DE CAFÉ COM INOCULAÇÃO SEQUENCIAL DE *Lactobacillus plantarum* E *Saccharomyces cerevisiae*: EFEITO NOS ATRIBUTOS SENSORIAIS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS GRÃOS

Normas do periódico (versão preliminar)

1 **FERMENTAÇÃO DE FRUTOS DE CAFÉ COM INOCULAÇÃO SEQUENCIAL DE**
 2 ***Lactobacillus plantarum* E *Saccharomyces cerevisiae*: EFEITO NOS ATRIBUTOS**
 3 **SENSORIAIS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS GRÃOS**

4 Flávio Meira BOREM^a, Mariane Helena Sances RABELO*^a, Yudai MOTOYOSHI^b,
 5 Rodrigo Soares PIERONI^c, Ana Paula de Carvalho ALVES^a, Claudia Mendes dos
 6 SANTOS^a

7
 8 ^aDepartment of Agricultural Engineering, Federal University of Lavras, POB 3037, 37.200-
 9 000 Lavras, MG, Brazil.

10 ^bSuntory Company, Japan.

11 ^cAssociação dos produtores de café da Serra da Canastra

12
 13 **ABSTRACT**

14 Este estudo foi pioneiro na utilização da técnica de inoculação sequencial de *Lactobacillus*
 15 *plantarum* seguido de *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação de frutos de café para a
 16 produção de cafés naturais especiais. O objetivo foi avaliar o efeito dessa técnica e do tempo
 17 total de fermentação nos atributos sensoriais da bebida do café e no perfil de ácidos orgânicos,
 18 compostos bioativos e perfil de ácidos graxos dos grãos. A fermentação dos frutos com
 19 inoculação sequencial proporcionou maior acidez para a bebida e contribuiu para aumentar a
 20 nota final do café. O tempo total de fermentação de 48h é ideal para obtenção de maior
 21 pontuação para os cafés produzidos com inoculação sequencial. Foi observado um maior
 22 conteúdo dos ácidos láctico, málico, cítrico e succínico nos grãos. Desta forma, essa pesquisa
 23 mostrou que a técnica de inoculação sequencial é promissora na produção de cafés naturais
 24 especiais.

25
 26 Key-words: Bactérias do ácido láctico, *Coffea arabica*, Cultura iniciadora mista

27
 28 **1 INTRODUÇÃO**

29 Para que os frutos do café se transformem em uma bebida com atributos sensoriais
 30 agradáveis é necessário uma série de etapas pós-colheita e de industrialização. Essas etapas são
 31 determinantes para a qualidade do café (Batista & Chalfoun, 2014; Brando & Brando, 2014;
 32 Poisson et al., 2017; Waters et al., 2017). Durante as etapas pós-colheita, acontece uma
 33 interação entre as atividades microbianas e o metabolismo endógeno do grão, o que resulta em
 34 precursores específicos que desempenham um papel importante no desenvolvimento do aroma
 35 do café durante a torrefação dos grãos (Waters et al., 2017).

36 A ecologia e dinâmica da microbiota associada às etapas pós-colheita do café dependem
 37 de muitos fatores, como a espécie e variedade do cafeeiro, métodos de processamento pós-
 38 colheita e fatores ambientais como clima e altitude (Silva et al., 2000; Vilela et al., 2010). Silva

39 e colaboradores (2008) investigaram a dinâmica da microbiota do café processado a seco no
40 Brasil e os resultados indicaram que a ocorrência dos microrganismos foi influenciada pelo teor
41 e atividade de água dos frutos. As bactérias predominaram nos frutos de café durante os
42 primeiros dias de secagem, a partir do oitavo dia de secagem as leveduras prevaleceram. Os
43 principais gêneros de bactérias presentes durante a fermentação e secagem dos frutos café foram
44 *Bacillus*, *Serratia*, *Enterobacter* e *Acinetobacter* e de leveduras foram *Pichia*, *Candida* e
45 *Debaryomyces*.

46 Os resultados do estudo de Silva et al. (2008) mostraram que bactérias e leveduras
47 podem atuar em consórcio no processo de fermentação de frutos de cafés. Nesse sentido, a
48 utilização de culturas iniciadoras mistas de bactérias e leveduras através da técnica de
49 inoculação sequencial pode ser uma alternativa inovadora na produção de cafés naturais
50 especiais. Diversos estudos já foram realizados utilizando culturas iniciadoras puras de
51 bactérias e leveduras na fermentação de frutos de café (Bressani et al., 2018; Carvalho Neto et
52 al., 2018; Carvalho Neto et al., 2020; Evangelista et al., 2014a; Evangelista et al., 2014b;
53 Martinez et al., 2017; Ribeiro et al., 2017; Pereira et al., 2016; Wang et al., 2019), comprovando
54 a viabilidade do uso de culturas iniciadoras puras. No entanto, a utilização de culturas
55 iniciadoras mistas ainda foi pouco explorada na produção de cafés com alta qualidade sensorial.

56 A inoculação sequencial é uma técnica que consiste em inocular duas culturas
57 iniciadoras com um intervalo entre a primeira e a segunda inoculação, desta forma, podem ser
58 implementados estágios diferenciados nos quais são aplicadas condições operacionais mais
59 favoráveis para cada microrganismo. Além disso, pode-se evitar interações que podem
60 comprometer o desenvolvimento de uma das culturas inoculadas (Garcia et al., 2019). Essa
61 técnica tem sido utilizada no processo de fermentação de diversos produtos alimentícios, como
62 por exemplo vinho, sidra e bebidas fermentadas lácteas e não lácteas (Herrero et al., 1999;
63 García et al. 2017, 2018; Lu, Putra & Liu, 2018).

64 Na inoculação sequencial, a duração do intervalo entre a primeira e a segunda
65 inoculação é um parâmetro determinante para a obtenção de um produto final com
66 características sensoriais desejáveis (Ciani et al., 2014). Durante o intervalo entre as
67 inoculações a ação da primeira cultura inoculada pode criar um ambiente favorável para a
68 inoculação e desenvolvimento pleno da segunda cultura (Freire et al., 2017).

69 Diante dos estudos sobre dinâmica microbiana, culturas iniciadoras e técnicas de
70 inoculação, o objetivo desse trabalho foi realizar a fermentação de frutos de café com
71 inoculação sequencial de *Lactobacillus plantarum* seguido de *Saccharomyces cerevisiae* e
72 avaliar o efeito da técnica de inoculação e do tempo total de fermentação nos atributos
73 sensoriais doçura, acidez, amargor, corpo, adstringência, finalização e nota final da bebida do
74 café e no perfil de ácidos orgânicos, composto bioativos e perfil de ácidos graxos dos grãos
75 crus.

76 **2 MATERIAL E METODO**

77 **2.1 Culturas Iniciadoras**

78 Uma cultura mista composta por uma bactéria do ácido láctico e uma levedura do gênero
79 *Saccharomyces* foram inoculadas nos frutos de café através da técnica de inoculação
80 sequencial.

81 A primeira cultura iniciadora inoculada foi uma bactéria do ácido láctico da espécie
82 *Lactobacillus plantarum*, isolada e selecionada pela Università Cattolica del Sacro Cuore – Italy
83 e comercializada na forma liofilizada pela empresa Lallemand. Essa bactéria do ácido láctico
84 foi utilizada na pesquisa pois, diversos estudos relataram a presença do *Lactobacillus plantarum*
85 tanto no exocarpo dos frutos de café, como também ao longo do processo de fermentação de
86 grãos e frutos de café (Carvalho Neto et al., 2018a; De Bruyn et al., 2017; Leong et al., 2014;
87 Ribeiro et al., 2018; Vilela et al., 2010; Zhang et al., 2019a; Zhang et al., 2019b). Além disso,
88 essa espécie já foi utilizada como cultura iniciadora em outros estudos de fermentação de café

89 e apresentou bons resultados na produção de ácidos orgânicos e na qualidade sensorial da
90 bebida do café (Carvalho Neto et al., 2018; Pereira et al., 2016).

91 A segunda cultura iniciadora inoculada foi uma levedura da espécie *Saccharomyces*
92 *cerevisiae*, isolada e comercializada liofilizada pela empresa Lalvin / Lallemand. A espécie
93 *Saccharomyces cerevisiae* já foi utilizada como cultura iniciadora em diversos estudos de
94 fermentação de café e apresentou resultados positivos (Bressani et al., 2018; Evangelista et al.,
95 2014a; Evangelista et al., 2014b; Martinez et al., 2017; Ribeiro et al., 2017), por esse motivo
96 foi utilizada essa espécie nessa pesquisa.

97 Os microrganismos liofilizados foram ativados por reidratação, o volume de água
98 utilizado para reidratação da bactéria foi igual a vinte vezes o seu peso seco e para a reidratação
99 da levedura foi de dez vezes o seu peso seco, conforme as orientações do provedor.

100 Para a realização do processo de inoculação das culturas iniciadoras e a fermentação, os
101 frutos de café foram acondicionados em biorreatores cilíndricos de polietileno de alta densidade
102 virgem com capacidade de 100 L e fechamento hermético. A inoculação foi realizada por
103 aspersão diretamente sobre o exocarpo dos frutos de café na concentração de 10^7 CFU/g de
104 fruto.

105 **2.2 Caracterização do experimento**

106 Essa pesquisa utilizou frutos maduros de *Coffea arabica* da variedade Catuaí Vermelho
107 colhidos em uma lavoura localizada na região da Serra da Canastra, no município de Vargem
108 Bonita, Minas Gerais, Brasil.

109 Dois fatores do processo de fermentação dos frutos de café foram estudados, a
110 inoculação sequencial das culturas iniciadoras *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces*
111 *cerevisiae* e o tempo total de fermentação. Com base no estudo de sucessão microbiana em
112 frutos de café, realizado por Silva et al. (2008), foi estabelecido que a primeira cultura a ser

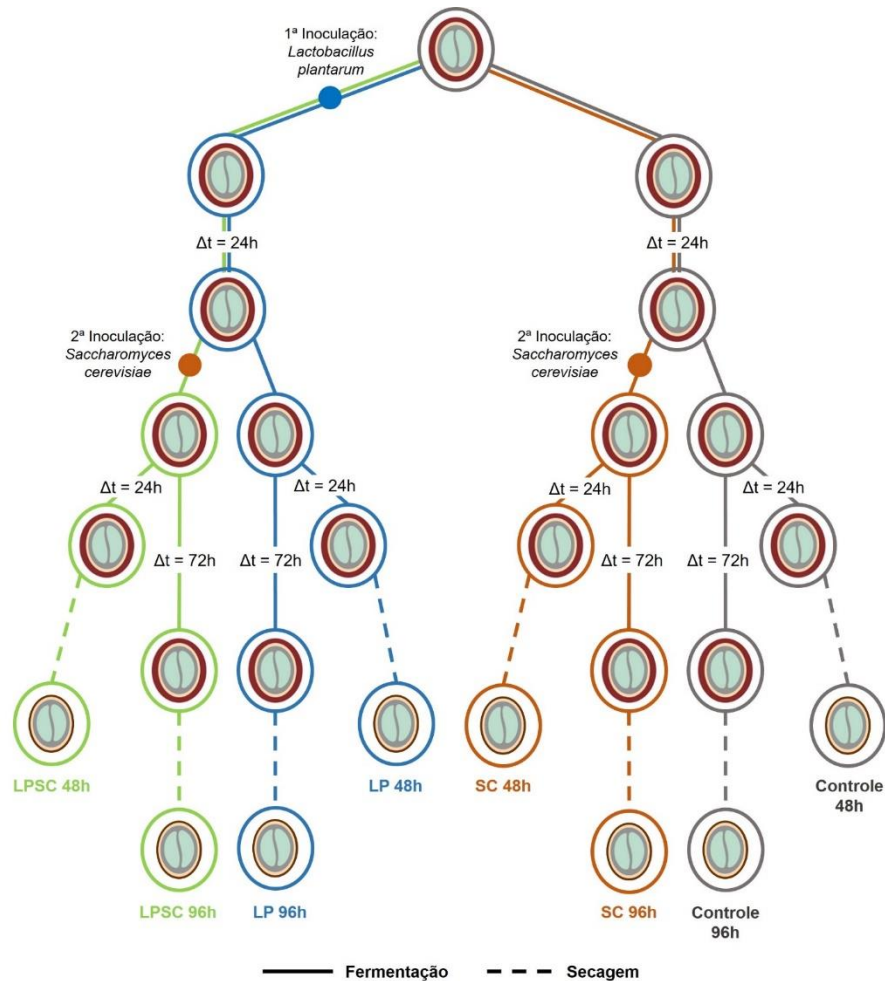
113 inoculada seria a bactéria do ácido láctico e após um intervalo de 24h ocorreria a inoculação da
114 levedura.

115 A fonte de variação inoculação sequencial foi composto por quatro níveis que
116 correspondem a presença ou ausência das culturas iniciadoras. A segunda fonte de variação,
117 tempo total de fermentação dos frutos de café, foi avaliado em dois níveis, 48 horas e 96 horas
118 após o início do processo de fermentação dos frutos. Desta forma, o experimento foi composto
119 por um fatorial de 4 x 2 (4 níveis do fator inoculação sequencial e 2 níveis do fator tempo total),
120 totalizando 8 tratamentos realizados em triplicata. Sendo que, cada amostra foi composta por
121 20 L de frutos de café.

122 Portanto, os tratamentos foram: (i) Inoculação de *L. plantarum* seguido de *S. cerevisiae*
123 (LPSC), 48h de fermentação, (ii) Inoculação de *L. plantarum* seguido de *S. cerevisiae* (LPSC),
124 96h de fermentação, (iii) Inoculação somente de *L. plantarum* (LP), 48h de fermentação, (iv)
125 Inoculação somente de *L. plantarum* (LP), 96h de fermentação, (v) Inoculação somente de *S.*
126 *cerevisiae* (SC), 48h de fermentação, (vi) Inoculação somente de *S. cerevisiae* (SC), 96h de
127 fermentação, (vii) Controle, 48h de fermentação e (viii) Controle, 96h de fermentação (Figura
128 1). Como os tratamentos “v” e “vi” representam o controle da inoculação de *L. plantarum*, a
129 inoculação de *S. cerevisiae* foi realizada somente após 24h do início do processo de
130 fermentação.

131

132 Figura 1 Fluxograma do processo de inoculação sequencial, fermentação dos frutos e
133 secagem.



134

135

136 2.2 Avaliação Sensorial

137

138

139

140

141

142

143

144

A avaliação sensorial das amostras foi realizada por um painel sensorial composto por cinco degustadores treinados e com certificação internacional *Q-grader*. Todos os procedimentos de preparo de amostras e torra foram realizados conforme as recomendações da *Specialty Coffee Association (SCA) Protocols – Cupping Specialty Coffee* (Lingle, 2011).

Os atributos sensoriais doçura, acidez, corpo, amargor, adstringência e finalização foram avaliados por meio de uma escala linear de intensidade ancorada em suas extremidades com o número “0” que representa ausência e o número “10” que representa intensidade máxima do atributo (Meilgaard et al., 2006 – adaptado). Os padrões de referência para cada atributo

145 sensorial foram estabelecidos conforme o *Sensory Lexicon - World Coffee Research* (Chambers
146 et al., 2016).

147 A nota global foi avaliada em uma escala de 0 a 100 por meio da metodologia *Specialty*
148 *Coffee Association (SCA) Protocols – Cupping Specialty Coffee* (Lingle, 2011).

149 **2.3 Análise da composição química dos grãos**

150 **2.3.1 Perfil de Ácidos Orgânicos**

151 A determinação de ácidos orgânicos foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta
152 Eficiência (HPLC) com base na metodologia descrita por Jham et al. (2002), utilizando-se
153 10mM de ácido perclórico a uma taxa de fluxo constante de 0,6 mL/min como fase móvel e
154 a coluna de cromatografia utilizada foi C610H a 50 ° C, monitorada por espectrofotometria de
155 UV a 210 nm. A extração dos ácidos orgânicos para posterior análise foi realizada da seguinte
156 forma: 250 mg de café verde moído foram colocados em tubo falcon com 25 mL de ácido
157 perclórico 0,23% e a solução foi agitada por 10 minutos em agitador mecânico, posteriormente,
158 o extrato foi filtrado em papel de filtro comum e em seguida, filtrado em membrana de
159 porosidade 0,45 µM.

160 Soluções padrão de ácidos cítrico, málico, tartárico, succínico, láctico, quínico e acético
161 foram utilizadas para a identificação dos picos do cromatograma, comparações dos tempos de
162 retenção e para o cálculo de sua concentração nas amostras. Os níveis finais de ácidos orgânicos
163 foram dados em porcentagem de matéria seca (% m.s).

164 **2.3.2 Perfil de Ácidos Graxos**

165 Para a determinação dos ácidos graxos, 250 mg de grão de café verde moído foram
166 colocados em tubos de centrífuga de 2,0 mL e 1,0 mL de hexano foi adicionada. Em seguida,
167 os tubos foram colocados e mantidos em banho ultrassônico por 10 minutos em temperatura
168 ambiente. Após esse processo, os tubos foram centrifugados por 2 minutos a 5.000 rpm e uma
169 alíquota de 500 µL do sobrenadante foi transferida para tubos criogênicos de 2,0 mL. O hexano

170 residual presente na alíquota foi evaporado no exaustor e o conteúdo de ácidos graxos foi
171 submetido a hidrólise lipídica.

172 Na etapa de hidrólise lipídica, aproximadamente 10 mg de óleo extraído foram diluídos
173 em 100 µl de solução de etanol (95%) e hidróxido de potássio a 1 mol/L (5%). Após 10
174 segundos de agitação mecânica, o óleo foi hidrolisado usando um forno micro-ondas
175 convencional Panasonic® de 80 W, durante 5 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados
176 400 µL de ácido clorídrico a 20%, uma pequena quantidade de NaCl e 600 µL de acetato de
177 etila. Após 10 segundos em agitação e repouso por 5 minutos, 300 µL da camada orgânica
178 foram removidos, colocados em tubos de microcentrífuga e secos por evaporação, obtendo-se
179 os ácidos graxos livres (Christie, 1989, adaptado).

180 Os ácidos graxos livres foram metilados com 100 µL de BF₃ / metanol (14%) e
181 aquecidos em banho-maria, a 80 ° C por 10 minutos. Posteriormente, eles foram diluídos com
182 300 µL de hexano e analisados por cromatografia gasosa.

183 Os ácidos graxos foram determinados em um cromatógrafo a gás Shimadzu GC2010 com
184 um detector de ionização de chama (FID). Uma coluna SP-2560 (Supelco) 100 m x 0,25 mm
185 foi usada com gradiente de temperatura de 140 °C, 5 min, 4 °C / min até 240 °C permanecendo
186 nessa temperatura por 30 min; Injetor (1/20 split), a 240 °C e detector a 240 °C; Hélio como
187 gás de arraste (2 mL/min) e 2 µl de volume de injeção. A identificação dos picos
188 correspondentes a cada ácido graxo foi feita comparando-os com os padrões de ácidos graxos
189 metilados Supelco37. Os níveis finais foram dados em porcentagem da área relativa.

190 **2.3.3 Compostos Bioativos**

191 Os compostos não-voláteis como cafeína, trigonelina e o ácido clorogênico foram
192 determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), seguindo a metodologia
193 adaptada de Vitorino et al. (2001). Amostras de 0,5 g de café moído verde foram extraídas em
194 50 mL de água destilada no ponto de ebulição e colocadas em banho-maria com água fervente

195 por 3 min. O extrato foi filtrado em um papel de filtro comum e depois filtrado em membrana
196 de 0,45 μm .

197 A determinação desses compostos foi realizada em cromatógrafo líquido, marca
198 Shimadzu, com sistema de detecção por arranjo de diodos (modelo SPD_M10A), coluna
199 cromatográfica Discovery C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm), comprimento de onda de 272 nm. A fase
200 móvel consistiu em metanol: água: ácido acético (20: 80: 1), com fluxo de 1 mL.min⁻¹. Uma
201 curva de calibração foi elaborada para a identificação e análise quantitativa usando padrões de
202 cafeína, trigonelina e ácido-5-cafeiolquínico (5-ACQ).

203 **2.4 Análise Estatística**

204 **Análise sensorial**

205 A análise de múltiplos fatores (MFA) foi aplicada aos dados obtidos através da Escala
206 de Intensidade para os atributos doçura, acidez, amargor, adstringência, finalização e nota
207 global. As análises foram realizadas conforme metodologia descrita por Ossani et al. (2017)
208 através do software R (R Development Core Team, 2017).

209 **Composição química**

210 O perfil de ácidos orgânicos, de ácidos graxos e compostos bioativos encontrados nos
211 tratamentos foram submetidos a análise de variância (ANAVA) e ao identificar diferenças
212 significativas no teste F, o teste de Scott-Knot foi aplicado, utilizando-se o software estatístico
213 SISVAR (SISVAR, version 5.3). Para melhor compreensão da relação dos tratamentos com a
214 composição química foi realizado uma análise dos componentes principais (PCA), utilizando o
215 software estatístico CHEMOFACE (CHEMOFACE, version 1.64). Uma matriz m x n foi
216 construída com o conteúdo dos compostos químicos identificados e atribuído sensoriais para as
217 m amostras avaliadas.

218 **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

219 **3.1 Caracterização Sensorial**

220 Este estudo foi pioneiro na utilização da técnica de inoculação sequencial na
221 fermentação de frutos de café para a produção de cafés naturais especiais com características
222 sensoriais complexas.

223 Os atributos sensoriais doçura, acidez e amargor são percebidos pelo sentido gustativo,
224 por meio das papilas gustativas distribuídas sobre a superfície da língua. Esses atributos
225 sensoriais fazem parte dos cinco gostos básicos (doce, amargo, salgado, ácido e umami) que o
226 sentido gustativo humano é capaz de perceber e são de extrema importância para a
227 caracterização dos alimentos. A doçura está relacionada aos carboidratos presentes nos grãos,
228 a acidez está relacionada aos ácidos orgânicos que além de estar presente naturalmente nos
229 grãos, podem ser originados nos processos de fermentação e o amargor está relacionado a
230 compostos como a cafeína e os ácidos clorogênicos. Os atributos corpo e adstringência são
231 sensações táteis que são percebidos através do sentido do somatossensorial oral e que estão
232 correlacionadas com os componentes não voláteis da bebida, como por exemplo os ácidos
233 graxos. O atributo finalização mede o tempo que a bebida é percebida na boca após a sua
234 ingestão. Todos esses atributos sensoriais devem estar em equilíbrio, ou seja, eles devem
235 trabalhar juntos e se complementarem, em intensidade e qualidade, para a composição da nota
236 final. A nota final é um parâmetro numérico que descreve a qualidade sensorial da bebida do
237 café (Lingle, 2011).

238 Os atributos sensoriais e a nota final foram submetidos a análise de múltiplos fatores
239 (MFA) para melhor compreensão das diferenças sensoriais causadas pela inoculação sequencial
240 de *Lactobacillus plantarum* seguido de *Saccharomyces cerevisiae* e pelo tempo total de
241 fermentação. De forma geral, o tempo total de fermentação dos frutos apresentou um efeito
242 significativo no perfil sensorial da bebida do café. Foi observado no gráfico de inércia (Figura
243 2a) um distanciamento entre os centroides que representam os tempos totais de fermentação
244 (48h e 96h). A análise de variância indicou que o tempo total de fermentação afetou

245 significativamente os atributos doçura, acidez, adstringência, amargor e na nota final (Tabela
246 1/0.

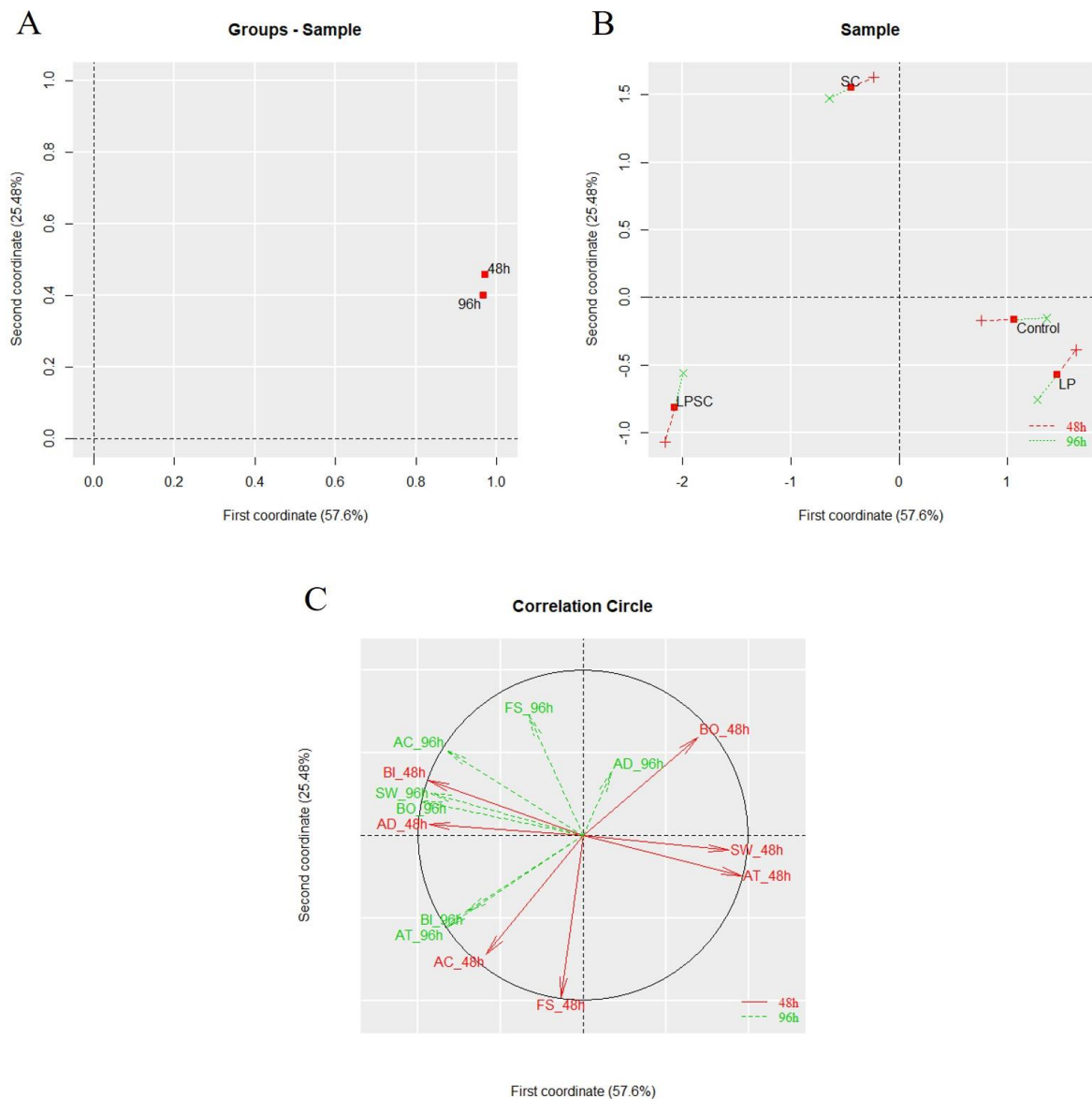
247 A técnica de fermentação de frutos de café com inoculação de duas culturas iniciadoras
248 de forma sequencial causou mudanças no perfil sensorial da bebida em relação aos demais
249 tratamentos, o centroide que representa a inoculação sequencial (LPSC) apresentou um
250 distanciamento dos demais centroides (LP, SC e Controle), como pode ser observado na Figura
251 2b. Foi observado uma interação entre o tempo total de fermentação e a inoculação sequencial
252 (Figura 2b), pois, ocorreu a formação de vetores, que representam os tempos totais de
253 fermentação, nos centroides que representam a inoculação sequencial e os demais tratamentos.
254 O resultado da análise de variância (Tabela 1) também indicou uma interação significativa entre
255 o tempo total de fermentação e a inoculação sequencial, a interação desses fatores teve um
256 efeito significativo na nota final da bebida do café.

257 A análise de múltiplos fatores explicou 83,08% da variabilidade dos dados sensoriais.
258 A primeira coordenada explicou 57,6% da variabilidade dos dados e foi responsável por
259 categorizar os tratamentos em função da presença da cultura iniciadora *Saccharomyces*
260 *cerevisiae*.

261 O gráfico do círculo de correlação (Figura 2c) indica através de vetores quais atributos
262 sensoriais estão mais correlacionados com cada tratamento. A bebida do café dos frutos
263 fermentaram por 48h com inoculação sequencial de *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces*
264 *cerevisiae* apresentou maior acidez e maior nota final, no entanto, a bebida dos quais os frutos
265 que fermentaram por 96h com inoculação sequencial foi correlacionada com os atributos
266 amargor e finalização. Os frutos de café inoculados somente com *Saccharomyces cerevisiae* e
267 fermentados por 96h apresentaram uma bebida com maior nota final, maior acidez, doçura e
268 corpo, já com 48h de fermentação a bebida foi correlacionada com os atributos amargor e
269 adstringência.

270

271 Figura 2. Análise de múltiplos fatores para a avaliação dos atributos sensoriais e nota final da
 272 bebida de cafés fermentados com inoculação sequencial e respectivos controles (A – Gráfico de
 273 inercia dos grupos, B – Gráfico de correspondência, C – Circulo de correspondência). Legenda:
 274 SW – doçura, AC – acidez, BO – corpo, BI – amargor, AD – adstringência, AT – Finalização,
 275 FS – nota final.



276

277 3.2 Perfil de Ácidos Orgânicos

278 Os ácidos orgânicos produzidos por microrganismos durante o processo de fermentação
 279 dos frutos de café podem influenciar as características sensoriais da bebida do café de diferentes

280 maneiras. Os ácidos butírico, acético e propiônico, que são produtos de sobre-fermentação,
281 podem prejudicar a qualidade final da bebida, conferindo um sabor de cebola quando presente
282 em concentrações superiores a 1 mg mL^{-1} (Lopez et al., 1989; Silva et al., 2013). Por outro lado,
283 a produção de ácido lático pode auxiliar no processo de acidificação da polpa de café,
284 favorecendo o desenvolvimento de determinados microrganismos, sem interferir na qualidade
285 final do produto (Pereira et al., 2015). Neste estudo foram identificados os ácidos cítrico,
286 oxálico, málico, quinico, succinico, lático e acético em todos os tratamentos. Na Tabela 1 são
287 apresentadas as concentrações médias para os ácidos orgânicos identificados e o resultado da
288 análise de variância.

289 Tabela 1 Efeito da inoculação sequencial, tempo total de fermentação e interação entre eles no perfil de ácidos orgânicos, atributos sensoriais e
290 nota final.

		Cítrico	Oxálico	Málico	Quínico	Succínico	Lático	Acético	Doçura	Acidez	Corpo	Adstringência	Amargo	Finalização	Nota final
	LPSC	1.2309 ^a	0.0092	0.4440 ^a	0.4300 ^a	0.2659 ^a	0.3253 ^a	0.0682 ^b	8.19	8.46	8	0.24	0.44	7.62	86.32
	LP	1.1856 ^a	0.0103	0.4605 ^a	0.4188 ^a	0.2364 ^b	0.2940 ^a	0.0557 ^c	8.35	8.21	8	0.21	0.25	7.73	85.77
	SC	1.0937 ^b	0.0132	0.3922 ^b	0.3816 ^b	0.2561 ^a	0.3074 ^a	0.0821 ^a	8.27	8.34	8.15	0.27	0.35	7.47	85.8
	Control	1.0706 ^b	0.0096	0.4083 ^b	0.3876 ^b	0.2211 ^b	0.2599 ^b	0.0805 ^a	8.14	8.12	7.93	0.15	0.19	7.74	86.26
	48H	1.1401	0.0104	0.4547 ^a	0.4084	0.2264 ^b	0.2450 ^b	0.0588 ^b	8.55 ^a	8.46 ^a	8.11	0.12 ^b	0.16 ^b	7.78	86.93 ^a
	96H	1.1503	0.0108	0.3978 ^b	0.4006	0.2633 ^a	0.3483 ^a	0.0844 ^a	7.92 ^b	8.1 ^b	7.93	0.31 ^a	0.45 ^a	7.5	85.14 ^b
	LPSC	1.1946	0.0074 ^b	0.4552	0.4332	0.254	0.2720 ^a	0.0685 ^b	8.26	8.66	7.86	0.21	0.31	7.42	87.57 ^a
48h	LP	1.2004	0.0058 ^b	0.4835	0.4168	0.2199	0.2227 ^b	0.0346 ^d	8.9	8.5	8.25	0.01	0.03	8.07	87.10 ^a
	SC	1.0673	0.0165 ^a	0.4253	0.3871	0.2262	0.2576 ^a	0.0894 ^a	8.48	8.34	8.26	0.14	0.28	7.56	85.93 ^a
	Control	1.0979	0.0119 ^a	0.4549	0.3967	0.2054	0.2279 ^b	0.0485 ^c	8.54	8.34	8.08	0.11	0.03	8.07	87.12 ^a
	LPSC	1.2672	0.0110 ^a	0.4328	0.4268	0.2778	0.3787 ^a	0.0680 ^b	8.11	8.26	8.13	0.26	0.57	7.82	85.07 ^a
96h	LP	1.1707	0.0148 ^a	0.4375	0.4209	0.2529	0.3654 ^a	0.0768 ^b	7.8	7.92	7.75	0.41	0.47	7.39	84.43 ^a
	SC	1.12	0.0099 ^a	0.3592	0.3762	0.2859	0.3573 ^a	0.0804 ^b	8.05	8.34	8.04	0.39	0.42	7.37	85.67 ^a
	Control	1.0433	0.0073 ^a	0.3617	0.3785	0.2368	0.2919 ^b	0.1125 ^a	7.73	7.89	7.79	0.19	0.35	7.4	85.40 ^a
LPSC	48h	1.1946	0.0074 ^a	0.4552	0.4332	0.254	0.2720 ^b	0.0685 ^a	8.26	8.66	7.86	0.21	0.31	7.42	87.57 ^a
	96h	1.2672	0.0110 ^a	0.4328	0.4268	0.2778	0.3787 ^a	0.0680 ^a	8.11	8.26	8.13	0.26	0.57	7.82	85.07 ^b

LP	48h	1.2004	0.0058 ^b	0.4835	0.4168	0.2199	0.2227 ^b	0.0346 ^b	8.9	8.5	8.25	0.01	0.03	8.07	87.10 ^a
	96h	1.1707	0.0148 ^a	0.4375	0.4209	0.2529	0.3654 ^a	0.0768 ^a	7.8	7.92	7.75	0.41	0.47	7.39	84.43 ^b
SC	48h	1.0673	0.0165 ^a	0.4253	0.3871	0.2262	0.2576 ^b	0.0894 ^a	8.48	8.34	8.26	0.14	0.28	7.56	85.93 ^a
	96h	1.12	0.0099 ^a	0.3592	0.4106	0.2859	0.3573 ^a	0.0804 ^a	8.05	8.34	8.04	0.39	0.42	7.37	85.67 ^a
Control	48h	1.0979	0.0119 ^a	0.4549	0.3967	0.2054	0.2279 ^b	0.0485 ^b	8.54	8.34	8.08	0.11	0.03	8.07	87.12 ^a
	96h	1.0433	0.0073 ^a	0.3617	0.3785	0.2368	0.2919 ^a	0.1125 ^a	7.73	7.89	7.79	0.19	0.35	7.4	85.40 ^b

291 Os valores médios dentro da mesma coluna seguidos por diferentes letras sobreescritas em minúsculas, diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo
 292 teste de Scott-Knott.
 293

294

295

296

297

298

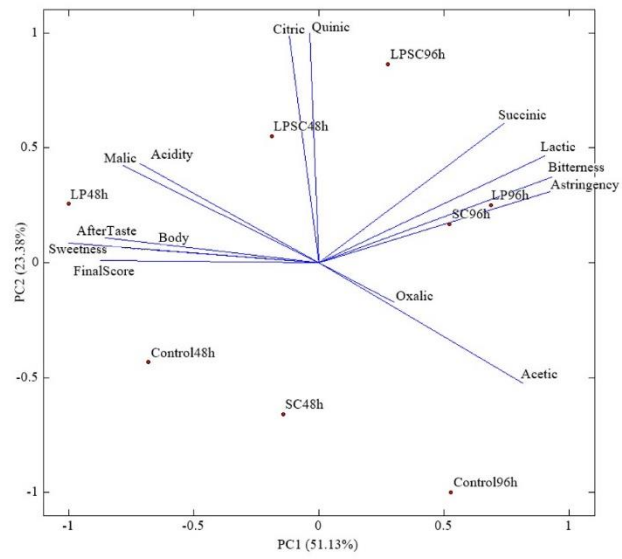
299

300 O resultado da análise de variância indicou interação significativa entre as fontes de
301 variação inoculação sequencial e tempo total de fermentação para a nota final e para o conteúdo
302 dos ácidos oxálico, láctico e acético. Houve diferenças significativas no conteúdo dos ácidos
303 cítrico, málico, quinico, succinico, láctico e acético em função da inoculação sequencial e nos
304 atributos sensoriais doçura, acidez, adstringência, amargor e nota final e no conteúdo dos ácidos
305 málico, succinico, láctico e acético em função do tempo total de fermentação. Os conteúdos dos
306 ácidos orgânicos, os atributos sensoriais e a nota final foram submetidos a análise de
307 componentes principais (PCA) para melhor compreensão das diferenças químicas e sensoriais
308 relacionadas as fontes de variação inoculação sequencial e tempo total de fermentação. As duas
309 componentes principais explicaram 74,51% da variabilidade dos dados, sendo que a primeira
310 componente foi responsável por explicar 51,13% e a segunda componente principal por
311 23,38%. Segundo o conteúdo de ácidos orgânicos e os atributos sensoriais, existe uma diferença
312 entre os tempos de fermentação (48h e 96h) independente da variável inoculação sequencial,
313 essa diferença foi evidenciada pela primeira componente principal (Figura 3a). Os ácidos
314 cítrico, málico e quinico e os atributos sensoriais doçura, acidez, corpo, finalização e a nota
315 final foram correlacionados com os tratamentos que fermentaram por 48h e os demais ácidos
316 orgânicos (oxálico, succinico, láctico e acético) e os atributos sensoriais amargor e adstringência
317 foram correlacionados com os tratamentos que fermentaram por 96h.

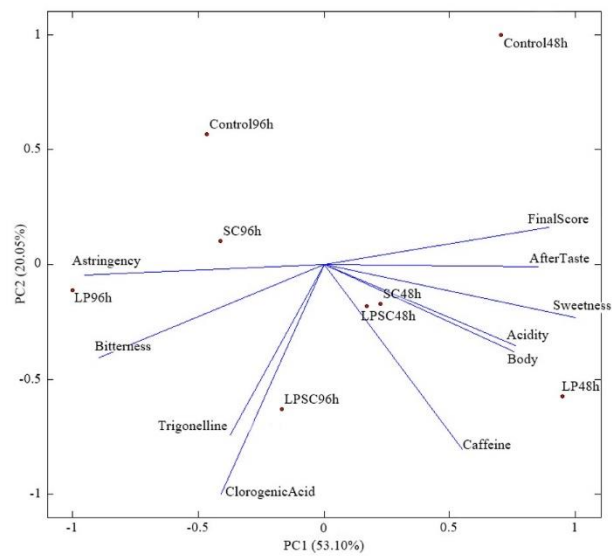
318

319 Figura 3 Análise de componentes principais (PCA) em função do conteúdo de ácidos orgânicos
320 e atributos sensoriais (A), conteúdo de compostos bioativos e atributos sensoriais (B) e perfil
321 de ácidos graxos e atributos sensoriais (C) dos grãos de café fermentados com inoculação
322 sequencial e simples (LPSC, LP, SC e Controle) em diferentes tempos totais de fermentação
323 (48h e 96h).

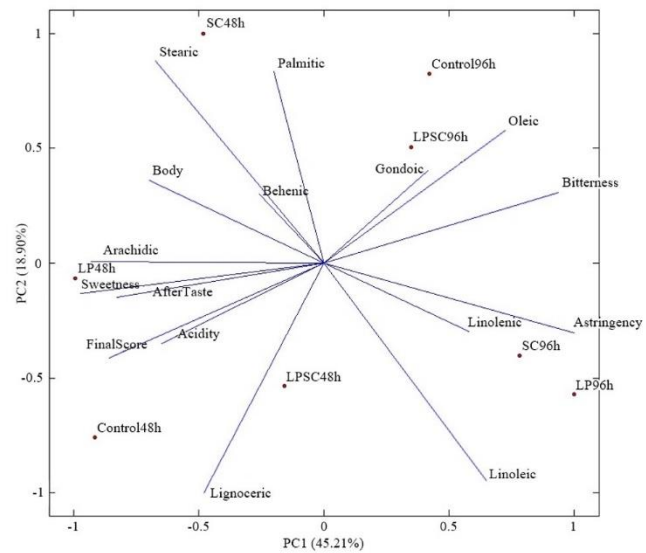
A



B



C



325 O conteúdo de ácido lático foi significativamente superior nos grãos de café que
326 fermentaram por 96h, além disso, ocorreu uma maior produção de ácido lático nos tratamentos
327 com inoculação sequencial. Esse fato pode indicar uma interação ecológica positiva entre os
328 microrganismos. A complexa interação entre esses microrganismos é destacada tanto pela ação
329 da bactéria do ácido lático como também pela ação da levedura, pois, a acidificação do meio de
330 fermentação pela LAB proporciona um ambiente propenso ao desenvolvimento da levedura e
331 a autólise da levedura libera nutrientes, como aminoácidos, polissacarídeos e riboflavina,
332 favoráveis ao crescimento bacteriano (Vale et al., 2019). O ácido lático é o principal produto
333 metabólico de espécies homofermentativas, como é o caso do *Lactobacillus plantarum*. Os
334 açúcares presentes no mesocarpo dos frutos de café são fermentados através da via de Embden-
335 Meyerhoff-Parnas (EMP) para gerar piruvato, que é convertido em ácido lático pela enzima
336 lactato desidrogenase (De Bruyn et al., 2017; Endo, 2014; Leong et al., 2014; Zhang et al.,
337 2019b).

338 Foi detectado um maior conteúdo de ácido succínico nos tratamentos em que a cultura
339 iniciadora *S. cerevisiae* (LPSC e SC) estava presente, além disso o tempo de fermentação
340 apresentou uma relação direta com o conteúdo de ácido succínico, quanto maior o tempo de
341 fermentação maior o conteúdo. O ácido succínico é o principal ácido orgânico produzido por
342 leveduras e é originado no ciclo do glioxilato pela oxidação do isocitrato e também no ciclo
343 redutor do ácido cítrico (Jayaram et al., 2014).

344 O ácido acético foi encontrado em maior quantidade nos tratamentos controle e com
345 inoculação simples de *S. cerevisiae*. O tempo total de fermentação foi significativo para o
346 conteúdo de ácido acético, o conteúdo foi maior nos grãos que fermentaram por mais tempo.
347 Essa maior produção de ácido acético nesses tratamentos pode estar relacionada à população
348 de bactérias naturalmente presentes nos frutos de café (Avallone et al., 2001; Evangelista et al.,
349 2015), essa população pode ter sido inibida nos demais tratamentos (LPSC e LP) pela presença

350 da cultura iniciadora *Lactobacillus plantarum*. A produção de ácido acético e lático pode
351 ocorrer a partir da fermentação de açúcares disponíveis ou usando o ácido cítrico como fonte,
352 como foi registrado recentemente em fermentação de cacau (Ho et al., 2018). Esse fato pode
353 justificar a menor concentração de ácido cítrico encontrada nos tratamentos Controle e SC.

354 A acidez no café é um importante parâmetro organoléptico, que pode ser desejável ou
355 não, dependendo da natureza e da concentração do ácido predominante na bebida. Uma acidez
356 desejável pode contribuir para a vivacidade da bebida do café, aumentando a percepção de
357 outros atributos como a doçura. No entanto, uma acidez exagerada pode ser desagradável e estar
358 relacionada a gostos incomuns na bebida (Illy & Viani, 2005; Lingle, 2011). Os resultados deste
359 trabalho corroboram com os autores, pois, a nota global apresentou uma relação inversamente
360 proporcional com o conteúdo de ácido lático, oxálico e acético, ou seja, quanto maior o
361 conteúdo desses ácidos menor a nota global da bebida do café. Os ácidos acético, oxálico,
362 propiônico e butírico tendem a afetar a qualidade do café negativamente (Borém et al., 2016;
363 Farah & Lima, 2019). No entanto, o ácido acético, em pequenas quantidades, contribui para o
364 sabor global e pode conferir “brilho” à bebida, mas, em concentrações mais altas, pode ser
365 muito desagradável (Lingle, 2011).

366 **3.3 Compostos Bioativos**

367 A trigonelina e os ácidos clorogênicos são compostos não voláteis que possuem grande
368 importância na definição da qualidade sensorial da bebida do café, pois, esses compostos
369 desempenham a função de precursores de compostos voláteis que contribuem para o sabor e o
370 aroma do café (Farah et al., 2006; Maria et al., 1994; Trugo & Macrae, 1984). Por sua vez, a
371 cafeína está associada com o amargor que, em alta concentração, pode depreciar a bebida do
372 café (Borém et al., 2016).

373 O conteúdo de trigonelina, ácido clorogênico e cafeína nas amostras avaliadas,
374 conforme apresentado na Tabela 2, variaram entre 1,42 – 1,54 %, 3,40 – 3,94 % e 1,24 – 1,34

375 % respectivamente. Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com valores
376 apresentados em trabalhos anteriores que quantificaram esses compostos (Ky et al., 2001;
377 Rogers et al., 1999). A análise de variância, apresentada na Tabela 2, indicou que houve
378 interação significativa entre as fontes de variação inoculação sequencial e tempo total de
379 fermentação somente para a nota final, para a variável tempo total de fermentação houve
380 diferenças significativas para a nota final e para os atributos sensoriais doçura, acidez,
381 adstringência e amargor, para a variável inoculação sequencial os conteúdos de trigonelina e
382 ácido clorogênico apresentaram diferenças significativas.

383 As diferenças químicas e sensoriais relacionadas as fontes de variação inoculação
384 sequencial e tempo total de fermentação foram mais bem compreendidas após a análise de
385 componentes principais (PCA). Os conteúdos de trigonelina, ácido clorogênico e cafeína, os
386 atributos sensoriais (doçura, acidez, corpo, adstringência, amargor e finalização) e a nota final
387 foram submetidos a análise de componentes principais e a partir da análise, um biplot foi gerado
388 (Figura 3b). A primeira e a segunda componente principal explicaram juntas 73,15% da
389 variabilidade dos dados, sendo que a primeira componente explicou 53,10% da variabilidade e
390 foi responsável por agrupar os tratamentos em função da variável tempo total de fermentação.
391 Os tratamentos LPSC48h, LP48h, SC48h e Control48h foram agrupados no quadrante direito
392 da primeira componente principal e correlacionados positivamente com a cafeína e os atributos
393 sensoriais doçura, acidez, corpo, finalização e nota final. Já os tratamentos LPSC96h, LP96h,
394 SC96h e Control96h foram agrupados no quadrante esquerdo da primeira componente principal
395 e correlacionados com a trigonelina e o ácido clorogênico e os atributos sensoriais amargor e
396 adstringência.

397 A trigonelina é conhecida por contribuir na formação de aromas desejáveis durante a
398 torração do café (Macrae, 1985), mas, ainda não foi totalmente elucidado como a trigonelina
399 afeta os demais atributos sensoriais. Farah e colaboradores (2006) relataram uma relação direta

400 entre o conteúdo de trigonelina nos grãos crus e a qualidade sensorial do café, ou seja, quanto
401 menor o conteúdo de trigonelina, menor a qualidade da bebida do café. Os resultados desta
402 pesquisa apontam uma relação inversa, o conteúdo de trigonelina foi relacionado com os
403 tratamentos que apresentaram notas finais mais baixas foi relacionada com os atributos
404 sensoriais amargor e adstringência. Esse resultado corrobora com Fassio et al. (2016), segundo
405 os autores os conteúdos de trigonelina, ácido clorogênico e cafeína não apresentaram uma boa
406 relação com os atributos sensoriais.

407 De acordo com a literatura, o ácido clorogênico e seus derivados contribuem para a
408 acidez final, conferem adstringência e amargor à bebida do café (Carelli et al., 1974; Clifford
409 & Wight, 1976; Trugo & Macrae, 1984; Variyar et al., 2003). Durante a torrefação ocorre a
410 liberação de ácido cafeico e formação de lactonas, como resultado das reações de Maillard e
411 Strecker, esses compostos são responsáveis pelo aumento do amargor da bebida do café (Ginz
412 & Enhelhardt, 1995; Maria et al., 1994; Variyar et al. 2003). Segundo Farah et al. (2006) os
413 níveis totais de ácidos clorogênicos apresentaram associação inversa com a qualidade do café,
414 um maior conteúdo de ácidos clorogênicos foi observado em amostras de menor qualidade. Os
415 resultados desta pesquisa corroboram com a literatura, pois o ácido clorogênico foi
416 correlacionado com o amargor e adstringência e apresentou correlação negativa com a nota
417 final.

418

419 Tabela 2 Efeito da inoculação sequencial, tempo total de fermentação e interação entre eles no conteúdo de trigonelina, ácido clorogênico, cafeína,
 420 atributos sensoriais e nota final.

	Trigonelina	Ácido Clorogênico	Cafeína	Doçura	Acidez	Corpo	Adstringência	Amargor	Aftertaste	Nota Final
LPSC	1.4649 ^b	3.9337 ^a	1.3223	8.19	8.46	8	0.24	0.44	7.62	86.32
LP	1.5162 ^a	3.9073 ^a	1.292	8.35	8.21	8	0.21	0.25	7.73	85.77
SC	1.4751 ^b	3.8173 ^a	1.2633	8.27	8.34	8.15	0.27	0.35	7.47	85.8
Control	1.4266 ^b	3.5963 ^b	1.2626	8.14	8.12	7.93	0.15	0.19	7.74	86.26
48H	1.4616	3.7656	1.2972	8.55 ^a	8.46 ^a	8.11	0.12 ^b	0.16 ^b	7.78	86.93 ^a
96H	1.4799	3.8617	1.2729	7.92 ^b	8.1 ^b	7.93	0.31 ^a	0.45 ^a	7.5	85.14 ^b
LPSC	1.4505	3.9299	1.3115	8.26	8.66	7.86	0.21	0.31	7.42	87.57 ^a
LP	1.496	3.8879	1.3428	8.9	8.5	8.25	0.01	0.03	8.07	87.10 ^a
SC	1.4705	3.8419	1.283	8.48	8.34	8.26	0.14	0.28	7.56	85.93 ^b
Control	1.4293	3.4027	1.2513	8.54	8.34	8.08	0.11	0.03	8.07	87.12 ^a
LPSC	1.4793	3.9375	1.3332	8.11	8.26	8.13	0.26	0.57	7.82	85.07 ^a
LP	1.5365	3.9266	1.2412	7.8	7.92	7.75	0.41	0.47	7.39	84.43 ^a
SC	1.4797	3.7927	1.2435	8.05	8.34	8.04	0.39	0.42	7.37	85.67 ^a
Control	1.424	3.7899	1.2739	7.73	7.89	7.79	0.19	0.35	7.4	85.40 ^a
48h	1.4505	3.9299	1.3115	8.26	8.66	7.86	0.21	0.31	7.42	87.57 ^a
96h	1.4793	3.9375	1.3332	8.11	8.26	8.13	0.26	0.57	7.82	85.07 ^b

LP	48h	1.496	3.8879	1.3428	8.9	8.5	8.25	0.01	0.03	8.07	87.10 ^a
	96h	1.5365	3.9266	1.2412	7.8	7.92	7.75	0.41	0.47	7.39	84.43 ^b
	48h	1.4705	3.8419	1.283	8.48	8.34	8.26	0.14	0.28	7.56	85.93 ^a
	96h	1.4797	3.7927	1.2435	8.05	8.34	8.04	0.39	0.42	7.37	85.67 ^a
	48h	1.4293	3.4027	1.2513	8.54	8.34	8.08	0.11	0.03	8.07	87.12 ^a
	96h	1.424	3.7899	1.2739	7.73	7.89	7.79	0.19	0.35	7.4	85.40 ^b

421 Os valores médios dentro da mesma coluna seguidos por diferentes letras sobrescritas em minúsculas, diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo
 422 teste de Scott-Knott.
 423

424

425

426

427

428

429

430

431

432 3.4 Perfil de ácidos graxos

433 O perfil de ácidos graxos dos grãos crus de café é determinante para geração de produtos
434 de oxidação termicamente induzidos, principalmente os aldeídos, que reagem com os
435 intermediários da reação de Maillard durante a torração, originando compostos relacionados as
436 características sensoriais do café (Flament, 2002). Desta forma, a análise do perfil de ácidos
437 graxos presentes no grão cru permite ampliar a compreensão da qualidade do café.

438 Foram identificados 9 ácidos graxos que estão presentes em todas as amostras
439 analisadas, os ácidos graxos encontrados foram os ácidos graxos saturados palmítico, esteárico,
440 araquídico, beénico e lignocérico, os ácidos graxos monoinsaturados oléico e gondoico e os
441 ácidos graxos poli-insaturados linoleico e linolênico. Na Tabela 3 são apresentadas as médias
442 das áreas relativas dos picos obtidos para os ácidos graxos identificados. Os ácidos graxos
443 insaturados corresponderam a 53,2% da área total do cromatograma. Esse resultado está de
444 acordo com Chu (2012), que menciona que a maioria de ácidos graxos presentes nos grãos de
445 café são insaturados.

446 Conforme apresentado na Tabela 3, os ácidos linoleico e palmítico se destacaram por
447 apresentar as maiores médias de áreas relativas em todos os tratamentos. Os ácidos esteárico e
448 oléico apresentaram áreas relativas variando entre 7% e 10%. Os demais ácidos graxos,
449 araquídico, gondoico, linolênico, beénico e lignocérico, apresentaram os menores valores de
450 áreas relativas, sendo inferiores a 3%. Na literatura, as porcentagens dos principais ácidos
451 graxos encontrados em grãos crus de café da espécie *Coffea arabica* são: ácido linoleico entre
452 38,10% - 45,50%, palmítico 31,85% - 38,64%, esteárico 6,74% - 8,37%, oléico 7,21% -
453 10,23%, araquídico 2,36% - 4,27%, beénico 0,32% - 0,84%, linolênico 1,14% - 1,88% e
454 lignocérico 0,01% - 0,30% (Bertrand et al., 2008; Joët et al., 2010; Ribeiro, 2017). O ácido
455 gondoico encontrado nessa pesquisa também foi encontrado pelos autores Bertrand et al., 2008

456 e Joët et al., 2010 e as porcentagens variaram entre 0,28% - 0,36%. Os resultados obtidos neste
457 estudo (Tabela 3) são muito próximos aos relatados na literatura.

458 O resultado da análise de variância indicou que não houve interação significativa entre
459 as fontes de variação inoculação sequencial e tempo total de fermentação, também não houve
460 diferenças significativas para a variável inoculação sequencial, mas, para a variável tempo total
461 de fermentação o ácido graxo saturado araquídico apresentou diferença significativa (Tabela
462 3).

463 Para melhor compreensão da complexidade da interação entre características sensoriais
464 e perfil de ácidos graxos em relação a cada tratamento, os dados foram submetidos a análise de
465 componentes principais (PCA). Um biplot foi gerado (Figura 3c) em função do conteúdo de
466 ácidos graxos, dos atributos sensoriais (doçura, acidez, corpo, adstringência, amargor e
467 finalização) e da nota final.

468 As duas primeiras componentes principais explicaram 64,11% da variabilidade entre os
469 tratamentos, entre os quais 45,21% correspondem a primeira componente principal e 18,90%
470 corresponde a segunda componente. A primeira componente principal foi responsável por
471 agrupar os tratamentos em função da variável tempo total de fermentação. Os tratamentos que
472 fermentaram por 48h (LPSC48h, LP48h, SC48h e Control48h) foram agrupados no quadrante
473 negativo da primeira componente principal, já os tratamentos que fermentaram por 96h
474 (LPSC96h, LP96h, SC96h e Control96h) foram agrupados na parte positiva. Segundo Zhang e
475 colaboradores (2019b) a duração da fermentação tem impacto significativo sobre a qualidade
476 sensorial da bebida do café, sobrepondo até mesmo o fator tipo de processamento, quando
477 comparado cafés despulpados e desmucilados.

478 Tabela 3 Efeito da inoculação sequencial, tempo total de fermentação e interação entre eles no perfil de ácidos graxos, atributos sensoriais e nota
479 final.

	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C20:1	C18:3	C22:0	C24:0	Doçura	Acidez	Corpo	Adstringência	Amargor	Aftertaste	Nota Final
LPSC	35.9209	8.2164	9.1771	42.6068	1.9212	0.1967	1.3155	0.4962	0.1492	8.19	8.46	8	0.24	0.44	7.62	86.32
LP	35.1866	8.114	9.1275	43.08	2.2208	0.2188	1.3119	0.5744	0.166	8.35	8.21	8	0.21	0.25	7.73	85.77
SC	36.3726	8.1318	9.1819	42.4238	1.813	0.2061	1.2391	0.4911	0.1408	8.27	8.34	8.15	0.27	0.35	7.47	85.8
Control	36.3728	8.1921	9.0486	42.4007	2.0291	0.2134	1.0422	0.5232	0.1779	8.14	8.12	7.93	0.15	0.19	7.74	86.26
48H	36.0408	8.2852	9.0769	42.2703	2.2831 ^a	0.2001	1.1566	0.5167	0.1703	8.55 ^a	8.46 ^a	8.11	0.12 ^b	0.16 ^b	7.78	86.93 ^a
96H	35.8856	8.042	9.1907	42.9853	1.7089 ^b	0.2174	1.2977	0.5257	0.1466	7.92 ^b	8.1 ^b	7.93	0.31 ^a	0.45 ^a	7.5	85.14 ^b
LPSC	35.9113	8.146	9.1227	42.6487	2.0692	0.1796	1.3079	0.4508	0.1637	8.26	8.66	7.86	0.21	0.31	7.42	87.57 ^a
LP	35.3511	8.3408	9.11	42.2944	2.5493	0.2149	1.3138	0.6569	0.1689	8.9	8.5	8.25	0.01	0.03	8.07	87.10 ^a
SC	36.8062	8.5269	9.1439	41.419	2.2516	0.2034	1.0472	0.4745	0.1274	8.48	8.34	8.26	0.14	0.28	7.56	85.93 ^b
Control	36.0947	8.1269	8.9309	42.7193	2.2624	0.2024	0.9574	0.4846	0.2214	8.54	8.34	8.08	0.11	0.03	8.07	87.12 ^a
LPSC	35.9306	8.2868	9.2315	42.5649	1.7732	0.2137	1.3232	0.5415	0.1346	8.11	8.26	8.13	0.26	0.57	7.82	85.07 ^a
LP	35.0221	7.8872	9.145	43.8657	1.8923	0.2228	1.3099	0.4919	0.1631	7.8	7.92	7.75	0.41	0.47	7.39	84.43 ^a
SC	35.9389	7.7366	9.2199	43.4286	1.3745	0.2088	1.4309	0.5076	0.1542	8.05	8.34	8.04	0.39	0.42	7.37	85.67 ^a
Control	36.6509	8.2574	9.1663	42.0821	1.7957	0.2245	1.1269	0.5618	0.1344	7.73	7.89	7.79	0.19	0.35	7.4	85.40 ^a
48h	35.9113	8.146	9.1227	42.6487	2.0692	0.1796	1.3079	0.4508	0.1637	8.26	8.66	7.86	0.21	0.31	7.42	87.57 ^a
96h	35.9306	8.2868	9.2315	42.5649	1.7732	0.2137	1.3232	0.5415	0.1346	8.11	8.26	8.13	0.26	0.57	7.82	85.07 ^b
48h	35.3511	8.3408	9.11	42.2944	2.5493	0.2149	1.3138	0.6569	0.1689	8.9	8.5	8.25	0.01	0.03	8.07	87.10 ^a

96h	35.0221	7.8872	9.145	43.8657	1.8923	0.2228	1.3099	0.4919	0.1631	7.8	7.92	7.75	0.41	0.47	7.39	84.43 ^b
48h	36.8062	8.5269	9.1439	41.419	2.2516	0.2034	1.0472	0.4745	0.1274	8.48	8.34	8.26	0.14	0.28	7.56	85.93 ^a
96h	35.9389	7.7366	9.2199	43.4286	1.3745	0.2088	1.4309	0.5076	0.1542	8.05	8.34	8.04	0.39	0.42	7.37	85.67 ^a
48h	36.0947	8.1269	8.9309	42.7193	2.2624	0.2024	0.9574	0.4846	0.2214	8.54	8.34	8.08	0.11	0.03	8.07	87.12 ^a
96h	36.6509	8.2574	9.1663	42.0821	1.7957	0.2245	1.1269	0.5618	0.1344	7.73	7.89	7.79	0.19	0.35	7.4	85.40 ^b

480 Os valores médios dentro da mesma coluna seguidos por diferentes letras sobrescritas em minúsculas, diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo
481 teste de Scott-Knott. Fatty acids in percentage of dry matter (% d.m.): palmítico (C16: 0), esteárico (C18: 0), oléico (C18: 1), linoleico (C18: 2),
482 araquídico (C20: 0), gondoico (C20:1), linolênico (C18: 3), beénico (C22:0), and lignocérico (24:0).
483

484

485

486

487

488

489

490

491

492 A primeira componente principal categorizou os ácidos graxos em função da presença
493 de insaturações. Os ácidos graxos palmítico, esteárico, beénico, araquídico e lignocérico foram
494 correlacionados com os tratamentos que fermentaram por 48h e com os atributos sensoriais
495 doçura, acidez, corpo e finalização e a nota final. Por outro lado, os ácidos graxos oléico,
496 linoleico, linolênico e gondoico foram correlacionados com os tratamentos que fermentaram
497 por 96h e com os atributos sensoriais amargo e adstringência.

498 Figueiredo e colaboradores (2015) encontraram uma relação positiva entre os ácidos
499 graxos saturados araquídico, esteárico e palmítico com características sensoriais da bebida do
500 café e uma relação negativa com o ácido graxo insaturado elaídico. Os autores sugeriram que
501 esses ácidos graxos podem ser possíveis marcadores da qualidade do café. Segundo Banks et
502 al. (2007) a falta de sabor e o desequilíbrio de sabor nos alimentos estão associados a baixos
503 níveis de ácidos graxos saturados, como o ácido butanoico e hexanoico.

504 O óleo presente nos grãos de café é composto principalmente de triacilgliceróis, que
505 possuem ácidos graxos em proporções semelhantes às encontradas nos óleos comestíveis de
506 origem vegetal (Speer & Kölling-Speer, 2006). Esse óleo proporciona uma sensação oleosa e
507 cremosa na boca, característica da bebida do café, essa sensação é causada devido a capacidade
508 dos óleos de cobrir a superfície da língua durante a ingestão da bebida (Illy & Viani, 2005). Em
509 concordância com os estudos apresentados, o atributo sensorial corpo foi correlacionado
510 positivamente com os ácidos graxos saturados palmítico, esteárico, araquídico e beénico.

511 Nesta pesquisa, todos os ácidos graxos que apresentaram uma correlação negativa com
512 a nota final e os atributos sensoriais desejáveis (doçura, acidez, corpo, finalização) da bebida
513 do café, são ácidos graxos insaturados (oléico, linoleico, linolênico e gondoico). A presença de
514 insaturações aumenta a propensão do ácido graxo a oxidação, essa oxidação leva ao
515 desenvolvimento de ranço e à formação de aromas indesejáveis, tanto em óleos de origem
516 vegetal (Jham et al., 2008) como também em óleos de origem animal (Wood et al., 2008).

517 Avaliando a relação da inoculação sequencial e o tempo total de fermentação com o
518 conteúdo de ácidos graxos, foi possível observar que um maior tempo de fermentação está
519 associado a presença de ácidos graxos insaturado e a variável inoculação sequencial não afetou
520 a discriminação dos ácidos graxos.

521 **4 CONCLUSÃO**

522 A fermentação dos frutos com inoculação sequencial proporcionou maior acidez para a
523 bebida e contribuiu para aumentar a nota final do café. O tempo total de fermentação teve um
524 efeito significativo nos atributos sensoriais da bebida, indicando que um menor tempo de
525 fermentação é ideal para obtenção de maior pontuação para os cafés produzidos com inoculação
526 sequencial.

527 Na composição química dos grãos de café, a fermentação dos frutos com inoculação
528 sequencial contribuiu para o aumento do conteúdo dos ácidos lático, málico, cítrico e succinico.
529 O tempo total de fermentação apresentou uma relação direta com o conteúdo de ácidos
530 orgânicos, quanto maior o tempo total de fermentação maior o conteúdo de ácidos orgânicos.
531 Os conteúdos de ácidos graxos e de composto bioativos tiveram pouca variação entre os
532 tratamentos.

533 Desta forma, essa pesquisa mostrou que a técnica de inoculação sequencial de *S.*
534 *cerevisiae* com *L. plantarum* é promissora a produção de cafés naturais especiais com um tempo
535 de 48h.

536 REFERÊNCIAS

- 537 Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J.-M., Olguin, E., & Guiraud, J.-P. (2001). Microbiological
538 and biochemical study of coffee fermentation. *Current Microbiology*, 42, 252–256.
539 <https://doi.org/10.1007/s002840110213>.
- 540 Banks, J. M., Brechany, E.Y., & Christie, W. (2007). The production of low fat Cheddar-type
541 cheese. *International Journal Dairy Technology*, 42, 6-9. [https://doi.org/10.1111/j.1471-](https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1989.tb01699.x)
542 [0307.1989.tb01699.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1989.tb01699.x).
- 543 Batista, L. R., & Chalfoun, S. M. (2014). Quality of coffee beans. In Schwan, R. F., & Fleet,
544 G. H. (Eds.), *Cocoa and coffee fermentations* (pp. 477–508). New York: CRC Press (Taylor
545 & Fr).
- 546 Bertrand, B., Villarreal, D., Laffargue, A., Posada, H., Lashermes, P., & Dussert, S. (2008).
547 Comparison of the effectiveness of fatty acids, chlorogenic acids, and elements for the
548 chemometric discrimination of coffee (*Coffea arabica* L.) varieties and growing origins.
549 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6), 2273-80.
550 <https://doi.org/10.1021/jf073314f>.
- 551 Borém, F. M., Figueiredo, L. P., Ribeiro, F. C., Taveira, J. H. S., Giomo, G. S., & Salva, T. J.
552 G. (2016). The relationship between organic acids, sucrose and the quality of specialty
553 coffees. *African Journal of Agricultural Research*, 11(8), 709-717.
554 <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.10569>.
- 555 Brando, C. H., & Brando, M. F. P. (2014). Methods of coffee fermentation and drying. In
556 Schwan, R. F., & Fleet, G. H. (Eds.), *Cocoa and coffee fermentations* (pp. 367–396). New
557 York: CRC Press (Taylor & Fr).
- 558 Bressani, A. P. P., Martinez, S. J., Evangelista, S. D., & Schwan, R. F. (2018). Characteristics
559 of fermented coffee inoculated with yeast starter cultures using different inoculation
560 methods. *LWT – Food Science and Technology*, 92, 212-219.
561 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.029>
- 562 Carelli, M. L. C., Lopes, C. R.O., & Monaco, L. C. (1974). Chlorogenic acid content in species
563 of *Coffea* and selections of *Coffea arabica*. *Turrialba*, 24, 398-401.
- 564 Carvalho Neto, D. P. De, Pereira, G. V. De M., Finco, A. M. O., Rodrigues, C., De Carvalho,
565 J. C., & Soccol, C. R. (2020). Microbiological, physicochemical and sensory studies of
566 coffee beans fermentation conducted in a yeast bioreactor model. *Food Biotechnology*,
567 34(2), 172–192.
- 568 Carvalho Neto, D. P., Pereira, G. V. M., Finco, A. M. O., Letti, L. A. J, Silva, B. J. G.,
569 Vandenberghe, L. P. S., & Soccol, C. R. (2018). Efficient coffee beans mucilage layer

- 570 removal using lactic acid fermentation in a stirred-tank bioreactor: Kinetic, metabolic and
571 sensorial studies. *Food Bioscience*, 26, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.10.005>
- 572 Chambers, E., Sanchez, K., Phan, U. X. T., Miller, R., Civille, G. V., & Di Donfrancesco,
573 B. (2016). Development of a "living" lexicon for descriptive sensory analysis of brewed
574 coffee. *Journal of Sensory Studies*, 31(6), 465– 480. [https://doi-](https://doi-org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1111/joss.12237)
575 [org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1111/joss.12237](https://doi-org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1111/joss.12237)
- 576 Christie, W. W. (1989). *Gas chromatography and lipids: a Pratical Guide*. Ayr: The Oily Press.
- 577 Chu, Y.-F. (2012). *Coffee: Emerging health effects and disease prevention*. UK: John Wiley
578 & Sons.
- 579 Ciani, M., Canonico, L., Oro, L., & Comitini, F. (2014). Sequential fermentation using non-
580 *Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *BIO Web of*
581 *Conferences*, 3, 02015. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20140302015>
- 582 Clifford, M. N., & Wight, J. (1976). The measurement of feruloylquinic acids and cafeoilquinic
583 acids in coffee beans. Development of the technique and its preliminary application to
584 green coffee beans. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 27(1), 73-84.
585 <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740270112>.
- 586 De Bruyn, F., Zhang, S. J., Pothakos, V., Torres, J., Lambot, C., Moroni, A. V., Callanan, M.,
587 Sybesma, W., Weckx, S., & De Vuyst, L. De. (2016). Exploring the impacts of postharvest
588 processing on the microbiota and metabolite profiles during green coffee bean production.
589 *Applied and Environmental Microbiology*, 83, e02398-16. [https://](https://doi.org/10.1128/AEM.02398-16)
590 doi.org/10.1128/AEM.02398-16.
- 591 Endo, A., & Dicks, L. M. T. (2014). Physiology of the LAB. In *Lactic Acid Bacteria:*
592 *Biodiversity and Taxonomy*. Edited by Holzapfel, W. H., & Wood, B. J. B. Wiley
593 Blackwell; 13–30. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch2>.
- 594 Evangelista, S. R., Miguel, M. G. C. P., Cordeiro, C. S., Silva, C. F., Pinheiro, A. C. M., &
595 Schwan, R. F. (2014a). Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*)
596 fermentation process. *Food Microbiology*, 44, 87–95.
597 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.013>
- 598 Evangelista, S. R., Miguel, M. G. C. P., Silva, C. F., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F.
599 (2015). Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee
600 fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 102-112.
601 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.008>

- 602 Evangelista, S. R., Silva, C. F., Miguel, M. G. P. D. C., Cordeiro, C. d. S., Pinheiro, A. C. M.,
603 & Duarte, W. F., et al. (2014b). Improvement of coffee beverage quality by using selected
604 yeasts strains during the fermentation in dry process. *Food Research International*, 61,
605 183–195. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.033>
- 606 Farah, A., & Lima, A. G. (2019). Organic Acids. In Farah, A. (Ed.) *Coffee: Production, Quality*
607 *and Chemistry* (pp. 517-536). Royal Society of Chemistry.
- 608 Farah, A., Monteiro, A. C., Calado, V., Franca, A. S., & Trugo, L. C. (2006). Correlation
609 between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry*, 98(2),
610 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.032>
- 611 Fassio, L. O., Malta, M. R., Carvalho, G. R., Liska, G. R., Lima, P. M., & Pimenta, C. J. (2016).
612 Sensory Description of Cultivars (*Coffea Arabica* L.) Resistant to Rust and Its Correlation
613 with Caffeine, Trigonelline, and Chlorogenic Acid Compounds. *Beverages*, 2(1), 1-12.
614 <https://doi.org/10.3390/beverages2010001>
- 615 Figueiredo, L. P., Borém, F. M., Ribeiro, F. C., Giomo, G. S., Taveira, J. H. S., & Malta, M. R.
616 (2015). Fatty acid profiles and parameters of quality of specialty coffees produced in
617 different Brazilian regions. *African Journal of Agricultural Research*, 10(35), 3484–3493.
618 <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.9697>.
- 619 Flament, I., & Bessière-Thomas, Y. (2002). *Coffee Flavor Chemistry*. New York: John Wiley
620 and Sons, LTD.
- 621 Freire, A. L., Ramos, C. L., da Costa Souza, P. N., Cardoso, M. G. B., & Schwan, R. F. (2017).
622 Nondairy beverage produced by controlled fermentation with potential probiotic starter
623 cultures of lactic acid bacteria and yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 248,
624 39–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.011>
- 625 García, C., Bautista, L., Rendueles, M., & Díaz, M. (2018). A new synbiotic dairy food
626 containing lactobionic acid and *Lactobacillus casei*. *International Journal of Dairy*
627 *Technology*, 72(1), 47–56. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12558>
- 628 García, C., Rendueles, M., & Díaz, M. (2017). Synbiotic fermentation for the co-production of
629 lactic and lactobionic acids from residual dairy whey. *Biotechnology Progress*, 33(5),
630 1250–1256. <https://doi.org/10.1002/btpr.2507>
- 631 García, C., Rendueles, M., & Díaz, M. (2019). Liquid-phase food fermentations with microbial
632 consortia involving lactic acid bacteria: A review. *Food Research International*, 119, 207–
633 220. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.043>

- 634 Ginz, M., & Enhelhardt, U. H. (1995). Analysis of bitter fractions of roasted coffee by LC-ESI-
635 MS - New Chlorogenic acid derivatives. In: Proceedings of International Conference on
636 Coffee Science, ASIC.
- 637 Herrero, M., de la Roza, C., García, L. A., & Díaz, M. (1999). Simultaneous and sequential
638 fermentations with yeast and lactic acid bacteria in apple juice. *Journal of Industrial
639 Microbiology and Biotechnology*, 22(1), 48–51. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900599>
- 640 Ho, V. T. T., Fleet, G., & Zhao, J. (2018). Unravelling the contribution of lactic acid bacteria
641 and acetic acid bacteria to cocoa fermentation using inoculated organisms. *International
642 Journal of Food Microbiology*, 279, 43–56.
643 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.040>.
- 644 Illy, A., & Viani, R. (2005). Espresso coffee: the science of quality. 2nd ed. E.S. and
645 Technologyed. London.
- 646 Jayaram, V. B., Cuyvers, S., Verstrepen, K. J., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2014). Succinic
647 acid in levels produced by yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) during fermentation strongly
648 impacts wheat bread dough properties. *Food Chemistry*, 151, 421–428.
649 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.025>.
- 650 Jham, G. N., Fernandes, S. A., Garcia, C. F., Silva, A. A. (2002). Comparison of GC and HPLC
651 for the quantification of organic acids in coffee. *Phytochemical Analysis*, 13(2), 99–104.
- 652 Jham, G. N., Muller, H. V., & Cecon, P. (2008). Triacylglycerol molecular species variation in
653 stored coffee beans determined by reverse-high performance liquid
654 chromatography/refractive index detector. *Journal of Stored Products Research*, 44(1),
655 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2007.05.003>.
- 656 Joët, T., Laffargue, A., Descroix, F., Doulebeau, S., Bertrand, B., de Kochko, A., & Dussert, S.
657 (2010). Influence of environmental factors, wet processing and their interactions on the
658 biochemical composition of green Arabica coffee beans. *Food Chemistry*, 118(3), 693–
659 701. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.048>.
- 660 Ky, C.-L., Louarn, J., Dussert, S., Guyot, B., Hamon, S., & Noirot, M. (2001). Caffeine,
661 trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C.
662 canephora* P. accessions. *Food Chemistry*, 75(2), 223-230.
- 663 Leong, K.-H., Chen, Y.-S., Pan, S.-F., Chen, J.-J., Wu, H.-C., Chang, Y.-C., & Yanagida, F.
664 (2014). Diversity of lactic acid bacteria associated with fresh coffee cherries in Taiwan.
665 *Current Microbiology*, 68(4), 440–447. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0495-2>.

- 666 Lingle, T. R. (2011) *The Coffee Cupper's Handbook: Systematic Guide to the Sensory*
667 *Evaluation of Coffee's Flavor*. (2011 Specialty Coffee Association of America, Ed.) (4,
668 *revisad ed.*).
- 669 Lopez, C. I., Bautista, E., Moreno, E., & Dentan, E. (1989). Factors related to the formation of.
670 "overfermented coffee beans" during the wet processing method and storage of coffee.
671 *ASIC*, 13, Colloque, Paipa.
- 672 Lu, Y., Putra, S. D., & Liu, S. Q. (2018). A novel non-dairy beverage from durian pulp
673 fermented with selected probiotics and yeast. *International Journal of Food Microbiology*,
674 265, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.030>.
- 675 Macrae, R. (1985). Nitrogenous Components. In Clarke, R. J., & Macrae, R. (Eds.), *Coffee*
676 *Chemistry* (pp. 115-152). New York: Elsevier.
- 677 Maria, C. B., Trugo, L. C., Moreira, R. F. A., & Werneck, C. C. (1994). Composition of green
678 coffee fractions and their contribution to the volatiles profile formed during roasting. *Food*
679 *Chemistry*, 50(2), 141-145. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90111-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90111-2).
- 680 Martinez, S. J., Bressani, A. P. P., Miguel, M. G. C. P., Dias, D. R., Schwan, R. F. (2017).
681 Different inoculation methods for semi-dry processed coffee using yeasts as starter
682 cultures. *Food Research International*, 102, 333-340.
683 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.096>
- 684 Meilgaard, M., Civille, G. V., Carr, B. T. (2006). *Sensory evaluation techniques*. (4th ed.) New
685 York: CRC Press (Tayor & Fr).
- 686 Pereira, G. V. M., Carvalho Neto, D. P., Medeiros, A. B. P., Soccol, V. T., Neto, E.,
687 Woiciechowski, A. L., & Soccol, C. R. (2016). Potential of lactic acid bacteria to improve
688 the fermentation and quality of coffee during on-farm processing. *International Journal*
689 *of Food Science Technology*, 51(7), 1689–1695. <https://doi-org/10.1111/ijfs.13142>
- 690 Pereira, G. V. M., Soccol, V. T., Brar, S. K., Neto, E., & Soccol, C. R. (2015b). Microbial
691 ecology and starter culture technology in coffee processing. *Critical Reviews in Food*
692 *Science and Nutrition*, 57(13), 2775-2788.
693 <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1067759>.
- 694 Poisson, L., Blank, I., Dunkel, A., & Hofmann, T. (2017). "Chapter 12 the chemistry of
695 roasting-decoding flavour formation," in *The Craft and Science of Coffee*, ed. B. Folmer,
696 (Cambridge, MA: Academic Press), 273–309. doi: 10.1016/b978-0-12-803520-7.00012-8
- 697 Ribeiro, L. S., Evangelista, S. R., Miguel, M. G. C. P., van Mullem, J., Silva, C. F., & Schwan,
698 R. F. (2018) Microbiological and chemical-sensory characteristics of three coffee varieties

- 699 processed by wet fermentation. *Annals of Microbiology*, 68, 705–716.
700 <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1377-4>
- 701 Ribeiro, L. S., Pedrozo, M. G. C. P., Evangelista, S. R., Martins, P. M. M., van Mullem, J.,
702 Belizario, M. H., Schwan, R. F. (2017). Behavior of yeast inoculated during semi-dry
703 coffee fermentation and the effect on chemical and sensorial properties of the final
704 beverage. *Food Research International*, 92, 26–32.
705 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.011>
- 706 Rogers, W. J., Michaux, S., Bastin, M., Bucheli, P. (1999). Changes to the content of sugars,
707 sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains
708 from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees.
709 *Plant Science*, 149(2),115-123.
- 710 Silva, C. F., Batista, L. R., Abreu, L. M., Dias, E. S., Schwan, R. F. (2008). Succession of
711 bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation.
712 *Food Microbiology*, 25(8), 951-957. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.07.003>
- 713 Silva, C. F., Schwan, R. F., Sousa Dias, E., & Wheals, A. E. (2000). Microbial diversity during
714 maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil.
715 *International Journal of Food Microbiology*, 60(2–3), 251–260.
- 716 Silva, C. F., Vilela, D. M., Cordeiro, C. S., Duarte, W. F., Dias, D. R., Schwan, R. F. (2013).
717 Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. *World*
718 *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(2), 235-247.
719 <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1175-2>
- 720 Speer, K., & Kölling-Speer, I. (2006). The lipid fraction of the coffee bean. *Brazilian Journal*
721 *Plant of Physiology*, 18(1), 201-216. [https://doi.org/10.1590/S1677-](https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100014)
722 [04202006000100014](https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100014).
- 723 Trugo, L. C., & Macrae, R. (1984). A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid
724 composition of coffee using HPLC. *Food Chemistry*, 15(3), 219-
725 227. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(84\)90006-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(84)90006-2).
- 726 Vale, A. S., Pereira, V. M. P., Carvalho Neto, D. P., Rodrigues, C., Pagnoncelli, M. G. B., &
727 Soccol, C. R. (2019). Effect of Co-Inoculation with *Pichia fermentans* and *Pediococcus*
728 *acidilactici* on Metabolite Produced During Fermentation and Volatile Composition of
729 Coffee Beans. *Fermentation*. 5(67), 1-17. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030067>
- 730 Variyar, P. S., Ahmad, R., Bhat, R., Niyas, Z., & Sharma, A. (2003). Flavoring components of
731 raw monsooned arabica coffee and their changes during radiation processing. *Journal of*

- 732 *Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7945- 7950.
733 <https://doi.org/10.1021/jf030408q>.
- 734 Vilela, D. M., Pereira, G. V. M., Silva, C. F., Batista, L. R., & Schwan, R. F. (2010). Molecular
735 ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry
736 processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*, 27(8), 1128–1135.
737 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.024>
- 738 Vitorino, M. D., França, A. S., Oliveira, L. S., Borges, M. L. A. (2001). Metodologias de
739 obtenção de extrato de café visando a dosagem de compostos não voláteis. *Revista*
740 *Brasileira de Armazenamento*, 26(3), 17-24.
- 741 Wang, C., Sun, J., Lassabliere, B., Yu, B., Zhao, F., Zhao, F., Chen, Y., & Liu, S. Q. (2019).
742 Potential of lactic acid bacteria to modulate coffee volatiles and effect of glucose
743 supplementation: Fermentation of green coffee beans and impact of coffee roasting.
744 *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 99(1), 409–420.
745 <https://doi.org/10.1002/jsfa.9202>
- 746 Waters, D. M., Moroni, A. V., & Arendt, E. K. (2017). Overview on the mechanisms of coffee
747 germination and fermentation and their significance for coffee and coffee beverage
748 quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(2), 259–274. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.902804>.
- 749
- 750 Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., Hughes, S.
751 I., & Whittington, F. M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality:
752 A review. *Meat Science*, 78(4), 343-58. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.019>.
- 753 Zhang, S. J., De Bruyn, F., Pothakos, V., Contreras, G. F., Cai, Z., Moccand, C., Weckx, S., &
754 De Vuyst, L. (2019a). Influence of Various Processing Parameters on the Microbial
755 Community Dynamics, Metabolomic Profiles, and Cup Quality During Wet Coffee
756 Processing. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2621.
757 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02621>
- 758 Zhang, S. J., De Bruyn, F., Pothakos, V., Torres, J., Falconi, C., Moccand, C., Weckx, S., & De
759 Vuyst, L. (2019b). Following coffee production from cherries to cup: Microbiological and
760 metabolomic analysis of wet processing of *Coffea arabica*. *Applied and Environmental*
761 *Microbiology*, 85(6), 1–22. <https://doi.org/10.1128/AEM.02635-18>.