



GABRIELA FERREIRA

**INFLUÊNCIA DE CULTURAS INICIADORAS NOS
COMPOSTOS QUÍMICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE
CAFÉS DA REGIÃO DO CAPARAÓ**

**LAVRAS-MG
2019**

GABRIELA FERREIRA

**INFLUÊNCIA DE CULTURAS INICIADORAS NOS COMPOSTOS QUÍMICOS
DURANTE A FERMENTAÇÃO DE CAFÉ DA REGIÃO DO CAPARAÓ**

Monografia apresentada à
Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Curso de Ciências Biológicas para a
obtenção do título de Bacharel

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan
Orientadora
Me. Ana Paula Pereira Bressani
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2019**

GABRIELA FERREIRA

**INFLUÊNCIA DE CULTURAS INICIADORAS NOS COMPOSTOS QUÍMICOS
DURANTE A FERMENTAÇÃO DE CAFÉ DA REGIÃO DO CAPARAÓ**

**INFLUENCE OF STARTER CULTURES ON CHEMICAL COMPOUNDS DURING
COFFEE FERMENTATION OF THE CAPARAÓ REGION**

Monografia apresentada à
Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Curso de Ciências Biológicas para a
obtenção do título de Bacharel

APROVADA em 25 de novembro de 2019

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista - UFLA

Dra. Nádia Nara Batista - UFLA

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan
Orientadora

Me. Ana Paula Pereira Bressani
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2019**

Aos meus pais, irmão e irmã, pelos
incentivos durante essa minha trajetória.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por sempre estar iluminando meu caminho.

À minha família, pelo apoio que serviram de alicerce para as minhas realizações.

Aos meus amigos e colegas, em especial Delane, Carina, Nádia, Patrícia e Kelly, por todos os momentos e aprendizados compartilhados.

À minha orientadora Rosane e coorientadora Ana Paula pela disposição e ajuda no meu aperfeiçoamento profissional.

Aos amigos, colegas e funcionários do laboratório de microbiologia do setor de Biologia por toda colaboração.

À Universidade Federal de Lavras, que permitiu a realização dessa graduação.

Muito obrigada!

Resumo

O café é uma bebida muito popular e consumida em todo o mundo e a qualidade está diretamente relacionada ao sabor e aroma. O objetivo desse trabalho foi analisar o efeito da inoculação de diferentes leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (CCMA 0543), *Candida parapsilosis* (CCMA 0544) e *Torulaspota delbrueckii* (CCMA 0684) separadas e em co-cultivo durante a fermentação de café (variedade Catuaí vermelho- IAC 44) à 600 m por via seca na região do Caparaó. Foi realizada análise de q-PCR para acompanhar a população dos inóculos e análise de ácidos orgânicos por HPLC. Além de analisar compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu, análises de DPPH, FRAP e ABTS foram realizadas para avaliar a atividade antioxidante do café. Os tratamentos que foram inoculados com *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram as maiores populações de leveduras no final da secagem. As maiores concentrações de ácido acético foram encontradas no Controle e no tratamento inoculado com as três leveduras (7,59 mg/g e 7,21 mg/g, respectivamente). Os ácidos cítrico, málico e succínico foram detectados em todos os tratamentos durante todo processo fermentativo e permaneceram até a secagem do fruto. Os grãos torrados apresentaram maior atividade antioxidante em todos os tratamentos se comparados ao café verde, sendo que as maiores concentrações foram observadas nos tratamentos inoculados. As leveduras utilizadas como culturas iniciadoras influenciaram positivamente na composição química dos grãos, podendo melhorar a qualidade da bebida.

PALAVRAS CHAVES: fermentação de café, culturas iniciadoras, co-cultivo, atividade antioxidante, qPCR

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REFERENCIAL TEÓRICO	8
2.1 Características do café no Brasil	8
2.2 Características de cafés na Região do Caparaó	9
2.3 Composição química do café.....	10
2.4 Processamento pós colheita do café.....	12
2.5 Fatores interferentes na qualidade do café.....	13
2.6 Fermentação do café	15
2.7 Atividade Antioxidante.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Amostras de café - variedade, processamento e torra	17
3.2 Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE)	18
3.3 PCR em tempo real (q-PCR)	18
3.4 Preparação das amostras e extração do café.....	19
3.4.1 Determinação do teor total de polifenóis.....	20
3.4.2 Determinação da atividade antioxidante total por DPPH.....	20
3.4.3 Capacidade antioxidante total determinado por ABTS	20
3.4.4 Capacidade antioxidante total determinado por FRAP	21
3.5 Análise Estatística	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 PCR em tempo real (qPCR).....	21
4.2 Ácidos Orgânicos	24
4.3 Compostos fenólicos e atividade antioxidante.....	27
5. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31

1.INTRODUÇÃO

Em 2018 o Brasil alcançou recorde de produção, com 61,7 milhões de sacas, confirmando ser o maior produtor e exportador mundial de café, sendo Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo, os principais estados produtores (CONAB, 2018).

Espírito Santo e Minas Gerais têm em comum o território do Caparaó (SIMÃO et al., 2017). A região ao redor do Parque Nacional do Caparaó possui elevada altitude e clima tropical (verão chuvoso e inverno seco), no qual há uma significativa potencialidade para produção de café especial (FOLHA VITÓRIA, 2013; AQUIES, 2014). O café da espécie *Coffea arabica* é adaptado às condições de clima tropical de altitude, com umidade e temperaturas amenas, características da região do Caparaó. Já o café da espécie *Coffea canephora*, adapta-se bem às regiões baixas, quentes e úmidas, com temperaturas bem elevadas (MATIELLO, 2002).

Muitos fatores influenciam as características do produto final, como o clima, variedade, métodos de colheita, tipo de processamento, torrefação, condições de armazenamento e de preparo (BRESSANELLO et al., 2017). Por este motivo, a busca por qualidade é uma das maiores preocupações da cafeicultura, uma vez que a valorização de cafés especiais é crescente (DE BRUYN et al., 2017). Esse tipo de café é caracterizado por um conjunto de aromas e sabores diferenciados, acidez equilibrada e ausência de defeitos (DA SILVA TAVEIRA et al., 2014).

O sabor e aroma do café são complexos, resultantes da presença combinada de vários constituintes químicos voláteis e não voláteis, dentre eles os ácidos, aldeídos, cetonas (CHIN; EYRES; MARRIOTT, 2015), açúcares, proteínas e compostos fenólicos (LEE et al., 2015).

Devido à sua composição química, os frutos do café são um bom substrato para o crescimento de microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (SILVA, 2015; SILVA et al., 2000), que podem variar de acordo com a origem geográfica, variedade, método de processamento e fermentação (de BRUYN et al., 2017).

A fermentação do café ocorre naturalmente, independentemente do processo, para degradação da mucilagem pelos microrganismos, diminuição do tempo de secagem além de produzir metabólitos que se difundem no interior do café e reagem com substâncias responsáveis pelos sabores e aromas desejáveis da bebida. SILVA et al., 2013).

Culturas iniciadoras são definidas como uma preparação ou material contendo grande número de microrganismos diferentes, que podem ser adicionados para acelerar e melhorar um processo de fermentação.

A seleção de microrganismos para fermentação de café deve se basear na capacidade de crescimento e permanência do mesmo, bem como sua eficiência na produção de pectinase (para degradar a pectina na mucilagem e polpa), ácidos e outros compostos metabólicos, que interferem positivamente na qualidade da bebida além de não produzir compostos tóxicos (SILVA et al., 2013; SILVA, 2014). Portanto, culturas iniciadoras podem ser utilizadas na fermentação do café, podendo melhorar o controle desta etapa e a qualidade sensorial da bebida, através da produção de ácidos orgânicos e compostos voláteis (EVANGELISTA et al., 2014b).

Em um estudo anterior, EVANGELISTA et al (2014b) observaram que o uso de culturas iniciadoras em cafés processados pela via seca, produziam bebidas de café com sabor diferenciado, sendo que cafés inoculados com *Candida parapsilosis* apresentaram sabores de caramelo e herbáceo, enquanto *Saccharomyces cerevisiae* mostrou um forte sabor de fruta. BRESSANI et al (2018) observaram que os tratamentos inoculados com *C. parapsilosis* e *T. delbrueckii*, não apresentaram diferenças significativas na análise sensorial quando comparada ao controle, porém foi possível observar diferenças entre os compostos voláteis detectados, podendo proporcionar sabor diferenciado. Já o café inoculado com *S. cerevisiae* apresentou uma diferença significativa na análise sensorial, indicando melhor resultado quando inoculado pelo método do balde, apresentando sabores característicos de banana e caju.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo analisar a influência da inoculação de diferentes leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* (CCMA 0543), *Candida parapsilosis* (CCMA 0544) e *Torulasporea delbrueckii* (CCMA 0684) na composição química de cafés da variedade Catuaí vermelho- IAC 44 provenientes da região do Caparaó, além de acompanhar a população de leveduras e a atividade antioxidante durante a fermentação em biorreator e secagem dos grãos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características do café no Brasil

O café é um produto nobre do agronegócio mundial (KWON et al., 2015). O Brasil continua sendo o maior produtor e exportador mundial de café, sendo que em 2018, alcançou recorde de produção atingindo 61,7 milhões de sacas, sendo Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo, os principais estados produtores (CONAB, 2018).

O café é pertencente à família *Rubiaceae*, gênero *Coffea*, sendo três espécies utilizadas para a produção da bebida, *C. arabica*, *C. canephora*, e *C. liberica* (DAVIS et al., 2006). Entretanto *C. arabica* e *C. canephora* são as principais espécies cultivadas e responsáveis pela maior parte das bebidas consumidas em todo mundo (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; SAKIYAMA; FERRÃO, 2014). *Coffea arabica* L. é a espécie mais cultivada no Brasil, pois fornece um produto de boa qualidade e é amplamente procurado pelo mercado consumidor (SILVA et al., 2016)

Na busca de um sistema de cultivo ambientalmente e economicamente sustentável, a produção de café brasileira tem passado por diversas modificações. A agregação de valor através da melhoria qualitativa tem sido foco nas últimas décadas. Neste contexto, a adição da indicação geográfica ao produto agrícola pode facilitar sua aceitação no mercado (RAMOS; FERNANDES; SOUZA, 2012). Além disso, diversificando os sistemas de produção do café, permite-se desenvolver produtos com atributos diferenciados para diversos mercados consumidores (SILVA et al., 2016).

Segundo a SindiCafé-MG (2018) as cultivares mais produzidas e importantes do Brasil são Catuaí (Vermelho e Amarelo) e Mundo Novo. A cultivar Mundo Novo foi gerada através de uma hibridização natural entre Sumatra e Bourbon Vermelho em 1943, já a hibridização entre Mundo Novo e Caturra Amarelo, gerou Catuaí Amarelo e Catuaí Vermelho em 1949.

2.2 Características de cafés na Região do Caparaó

No Espírito Santo, a cafeicultura é a principal atividade agrícola do estado (SIMÃO et al., 2017). A produção de café arábica no estado representa 40% da atividade cafeeira, estando presente principalmente na região Centro Serrana e Sul do Estado, que são as de maior altitude e atendem a exigência agroclimática da cultura (CETCAF, 2014). A maioria das propriedades são pequena e de base familiar (CCCV, 2014).

A região ao redor do Parque Nacional do Caparaó é de elevada altitude e possui clima tropical de altitude, com verão chuvoso e inverno seco, no qual há uma significativa potencialidade para produção de café especial, haja vista o grande número de cafeicultores desta localidade que foram campeões em concursos de café (FOLHA VITÓRIA, 2013; AQUIES, 2014).

Durante a maturação dos frutos de café, o clima e a altitude irão desempenhar um importante papel em decorrência da temperatura, luz e água disponível (BERTRAND et al., 2006). A diferença de altitude pode estar relacionada a alterações fisiológicas e

morfológicas, plantas em altitudes mais elevadas possuem maior exposição a irradiação, variações térmicas, limitação de nutrientes, entre outros (ZHU et al., 2010).

Em uma pesquisa realizada por DA PASCHOA et al. (2017), ficou evidenciado que propriedades em maior altitude e mais próximas ao parque nacional produzem cafés mais bem pontuados, mesmo com mais dias de fermentação, enquanto que em propriedades em menor altitude, um maior tempo de fermentação pode acarretar uma piora na avaliação sensorial do café. Com intuito de agregar valor ao café, os produtores começaram a trabalhar com a agroindustrialização e/ou a valorização de atributos regionais, culturais e ecológicos do processo produtivo, bem como aspectos trabalhistas (SIQUEIRA; SOUZA; PONCIANO, 2011).

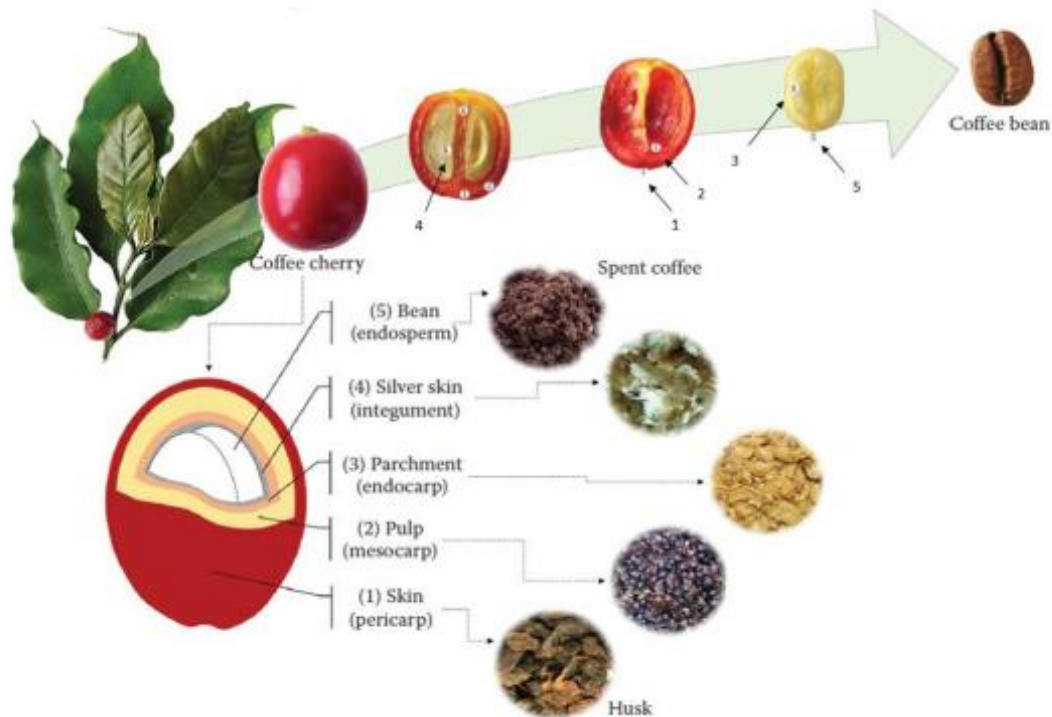
A produção cafeeira em pequenas propriedades rurais situadas em áreas montanhosas tem custos altos que dificultam a permanência das famílias no campo, dessa maneira têm buscado alternativas para agregar valor à produção e na melhoria na gestão da propriedade (SANTOS; SIMÃO, 2015). Cada vez mais a região do Caparaó vem se destacando por produzir cafés arábica de maior qualidade, possuindo grande variedade de acidez, corpo e sabor, além de intensa doçura e aroma (APOSTÓLICO et al 201, CLUB CAFÉ, 2016).

2.3 Composição química do café

A compreensão da fisiologia e composição bioquímica dos frutos é fundamental para o entendimento dos processos fisiológicos que ocorrem durante a formação e maturação dos frutos de café (BORÉM, 2008).

O fruto de café é constituído de cinco partes: pericarpo (casca), mesocarpo (polpa e mucilagem), endocarpo (pergaminho), película prateada e endosperma (semente) como descrito na Figura 1 (SCHWAN; FLEET, 2015). O pericarpo é o tecido mais externo do fruto, liso e resistente, possui coloração verde em frutos verdes, e, geralmente torna-se vermelho quando maduro, podendo apresentar coloração laranja ou amarela devido a genótipos particulares.

Figura 1. Estrutura do fruto do café. Os números entre parênteses no diagrama do café estão relacionados às setas nas fotos da estrutura do café.



Fonte: SCHWAN; FLEET, 2015.

O mesocarpo apresenta características de ser amarelado, fibroso e doce (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012) representando, em base seca, em torno de 29% do peso integral, constituindo 76% de água, 10% de proteína, 2% de fibra, 8% de sais minerais e 4% de diferentes materiais solúveis e insolúveis (pectina, taninos, açúcares, cafeína, ácidos, entre outros) (VILELA, 2010 apud ELIAS, 1978), constituindo um excelente meio de cultura para o crescimento de microrganismos que irão interferir na qualidade do café (BONILLA-HERMOSA et al., 2014).

Existe ainda um endocarpo fino de cor amarelada, chamado de pergaminho. Café em pergaminho é composto por α -celulose (40-49%), hemicelulose (25-32%), lignina (33-35%) e cinzas (0,5-1%) (BEKALO; REINHARDT, 2010). E, por fim, o grão de café (endosperma) que é recoberto por uma camada prateada (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012), utilizada na preparação da bebida, contendo todos os precursores para o sabor característico do café que são desenvolvidos durante a torrefação (SCHWAN; FLEET, 2015).

O grão de café também é constituído por celulose, minerais (potássio, magnésio, cálcio, sódio, ferro, manganês, rubídio, zinco, cobre, estrôncio, crômio, vanádio, bário, molibdênio, e cádmio), açúcares (sacarose, glicose, frutose, arabinose, galactose e manose), lipídios, tanino, polifenóis, ácido clorogênico e aminoácidos (alanina, arginina, asparagina, cisteína, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina e valina) (BELITZ et al., 2009).

O conhecimento da composição dos grãos é uma ferramenta útil para ampliar o mercado de exportação e manter a qualidade e competitividade. O perfil químico dos precursores de aroma e sabor do café modifica devido a vários fatores, como genéticos, ambientais, colheita e pós-colheita que podem afetar diretamente a qualidade da bebida (KITZBERGER et al., 2013). Dentre os componentes do grão, a cafeína é a mais conhecida. A quantidade deste constituinte pode variar de acordo com a variedade, sendo encontrados valores entre 0,8 a 1,4% (p/p) para café arábica e 1,7 a 4,0% (p/p) para robusta (BELITZ et al., 2009), que influencia no corpo e amargor da bebida (SUNARHARUM; WILLIAMS; SMYTH, 2014). A cafeína é a única substância do café que possui efeito termoestável, enquanto as outras substâncias como proteínas, ácido clorogênico e trigonelina podem ser transformados ou até mesmo destruídos pelo processo de torrefação (MUSSATO et al., 2011). Segundo FARAH et al. (2006), a atividade antioxidante e a qualidade da bebida do café é muito influenciada pela presença de cafeína, trigonelina, ácido cafeico e compostos fenólicos, cujos principais representantes são os ácidos clorogênico.

2.4 Processamento pós colheita do café

A etapa de pós-colheita desempenha um papel importante na preservação e melhoria da qualidade do café. O processamento deve ser realizado logo após a colheita, evitando fermentações indesejáveis (HAMDOUCHE et al., 2016). Quando a fermentação ocorre de forma controlada, esta pode contribuir para formação de compostos químicos favorecendo o aroma e sabor do café (SCHWAN; FLEET, 2015).

A colheita deve ser feita quando a maior parte dos frutos estiver maduros (BORGES et al., 2002), a fim de evitar a presença de grãos imaturos (verdes), pretos e ardidos. De acordo com BRANDO; BRANDO (2015), há três formas distintas de realizar o processamento do café: por via seca, via úmida e via semi-seca (descascado natural).

O processamento por via seca, também chamado de café natural é muito utilizado (em torno de 95%) no Brasil (SCHWAN; WHEALS, 2003; BRANDO; BRANDO, 2015), principalmente em regiões tropicais onde o clima é seco no período da colheita. Os frutos de café são secos com todas as partes que os constituem (DE BRUYN et al., 2017).

Os frutos colhidos em vários estádios de maturação (verde, cereja, uva passa e seco), podem ou não ser lavados e devem preferencialmente ser separados, a fim de melhorar a qualidade do café (BORÉM, 2008), e espalhados em camadas finas (5-8 cm) em terreiros de cimento ou suspensos, sendo amontoados a noite e revolvidos periodicamente durante o dia. Durante o período de secagem, a fermentação microbiana natural que ocorre pode influenciar na qualidade final do produto. Cafés processados por via seca apresentam atributos sensoriais que os diferem dos cafés produzidos por via úmida, como sabor doce, suave e complexo (SCHWAN; WHEALS, 2003).

Na Colômbia, América Central e no Havaí, o processamento via úmida é muito utilizado para o café arábica (SILVA et al., 2008). Neste tipo de processamento, o exocarpo e uma parte do mesocarpo são removidos mecanicamente. O processo de fermentação é realizado em tanques com um grande volume de água para a retirada do restante do mesocarpo que ficou aderido ao pergaminho (BRANDO; BRANDO, 2015). O tempo de fermentação pode variar, podendo ocorrer de 6 a 72 horas, dependendo da temperatura ambiente. Temperaturas mais altas e camadas mais espessas de mucilagem aceleram a fermentação (BRANDO; BRANDO, 2015). Então, os grãos são lavados com água limpa e secos em terreiros e/ou secadores rotativos (LEE et al., 2015, BRANDO; BRANDO, 2015).

O café ainda pode ser processado pelo método semi-seco. Os frutos de café são despulpados e a fermentação ocorre diretamente sob o sol em terreiro e/ou secadores rotativos (VILELA et al., 2010, BRANDO; BRANDO, 2015).

A secagem visa diminuir a umidade dos grãos para 12 a 11%. Então o café deve ser armazenado em locais com umidade e ventilação adequados, a fim de não ocorrer alteração da qualidade (BORÉM, 2008). Desta forma, os grãos já processados (cafés crus) podem ser armazenados durante meses, sem alteração significativa do sabor (BELITZ et al., 2009).

2.5 Fatores interferentes na qualidade do café

O café de boa qualidade pode ser considerado como a bebida que apresenta um sabor e aroma agradáveis e balanceados, bom corpo, acidez natural, suavidade ao paladar e

ausência de defeitos (BORÉM, 2004; RIBEIRO et al., 2017), além disso está relacionado a diferentes fatores, como tipo de solo, altitude, variedade, processamento e torrefação, que proporcionarão uma identidade única ao produto (MEHARI et al., 2016; SILVA et al., 2016).

A ação dos microrganismos durante a fermentação do café pode resultar em diferentes tipos de bebidas que se diferem por diversas características em termos de corpo, aroma, acidez e adstringência (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012). Portanto, culturas iniciadoras podem ser utilizadas na fermentação do café podendo melhorar o controle desta etapa e a qualidade sensorial da bebida, através da produção de ácidos orgânicos e compostos voláteis (EVANGELISTA et al., 2014a).

O aroma é um atributo que está intimamente relacionado com a qualidade do café, assim como o nível de aceitação do consumidor à bebida (EVANGELISTA et al., 2014a; TOLEDO et al., 2016). Principalmente os constituintes químicos do grão verde são responsáveis pela aparência dos grãos torrados, aroma e sabor característicos da bebida, destacando os compostos voláteis, fenólicos (principalmente o ácido clorogênico), proteínas, ácidos orgânicos e açúcares (PIMENTA, 2003).

Os precursores de aroma do café são primordiais na formação de compostos voláteis durante a torrefação, sendo que alterações das concentrações desses precursores correspondem às diferenças nos perfis voláteis do café torrado, tornando-o responsável pelas diferentes qualidades da bebida (LEE et al., 2015), além do desenvolvimento de características de sabor e cor (devido a pirólise de compostos orgânicos) (BELITZ et al., 2009). De acordo com um estudo realizado por FARAH et al. (2006), a qualidade da bebida do café está correlacionada positivamente com os níveis de precursores de aroma como a trigonelina e ácido 3,4-dicafeoilquínico e relaciona-se de forma negativa com mono-ésteres dos componentes fenólicos como o ácido 3- cafeoilquínico presente em grãos de café verde antes da torrefação.

Durante a torrefação dos grãos, a reação de Maillard é iniciada pela interação do grupo carbônico de um açúcar redutor e o grupo amino livre de um aminoácido, um peptídeo ou mesmo uma proteína (HO et al., 1993) que participam como potenciais precursores de sabor em outras reações (HWANG; CHEN; HO, 2012), como pirólise, interação com açúcar redutor e degradação térmica (RIBEIRO et al., 2009) gerando importantes compostos voláteis como piridinas, ácidos, aldeídos, furanos, fenóis e compostos sulfurados (TOCI; BOLDRIN, 2017).

2.6 Fermentação do café

A fermentação do café ocorre logo após a colheita. O tempo necessário para que ocorra esta etapa, irá depender do tipo de fermentação realizada. Entretanto, independentemente do processamento realizado, as alterações físico-químicas ocorrem nos grãos, tais como redução no teor de água e açúcares e a formação de precursores de aroma e de sabor (VAAST et al., 2006).

A presença de diferentes microrganismos durante a fermentação do café interfere nas características finais da bebida (RIBEIRO et al., 2017). Assim, pesquisas foram desenvolvidas para controlar essa fermentação e melhorar a qualidade usando culturas iniciadoras (EVANGELISTA et al., 2014a, EVANGELISTA et al., 2014b, PEREIRA et al., 2015, QUINTERO; MOLINA, 2015, SILVA et al., 2013).

Culturas iniciadoras são definidas como uma preparação ou material contendo grande número de microrganismos diferentes, que podem ser adicionados para acelerar e melhorar um processo de fermentação (HOLZAPFEL, 2002). Espera-se que os microrganismos selecionados para serem utilizados como culturas iniciadoras tenham algumas características, como adaptação fácil à matéria-prima e processo, desenvolvimento de qualidade sensorial, extensão da vida útil, redução do tempo de processamento e energia durante a produção e inibição de microrganismos patogênicos relacionados a alimentos (CORSETTI et al., 2012).

A seleção de microrganismos para fermentação de café deve se basear na capacidade de crescimento e permanência do mesmo, bem como sua eficiência na produção de pectinase (para degradar a pectina na mucilagem e polpa), ácidos e outros compostos metabólicos, que interferem positivamente na qualidade da bebida além de não produzir compostos tóxicos (SILVA et al., 2013; SILVA, 2014). Portanto, culturas iniciadoras podem ser utilizadas na fermentação do café, podendo melhorar o controle da etapa de fermentação e a qualidade sensorial da bebida, através da produção de ácidos orgânicos e compostos voláteis (EVANGELISTA et al., 2014b).

2.7 Atividade Antioxidante

Por definição, a atividade antioxidante (AA) é a capacidade de um composto de inibir degradação oxidativa (VIGNOLI et al., 2012). A cafeína está fortemente relacionada com a

qualidade da bebida do café porque contribui para a seu amargor (FARAH et al., 2006). Além disso, possui capacidade antioxidante já descrita por vários autores, como NAIDU et al. (2008) e JESZKA-SKOWRON; STANISZ; DE PEÑA (2016).

Os compostos fenólicos, além de serem relatados como contribuintes do sabor e aroma característicos das bebidas de café, são conhecidos em razão das propriedades fisiológicas e farmacológicas que conferem à saúde humana, como a atividade antioxidante. Entre os principais componentes da fração fenólica estão os ácidos clorogênicos, na forma de diversos isômeros, considerados os mais importantes e os que se apresentam em maior quantidade nos grãos de café verde (ABRAHÃO et al., 2010). Os ácidos clorogênicos reagem durante a torra, produzindo compostos ácidos, lactonas e outros derivados fenólicos que contribuem para o aroma e sabor do café, acidez final e adstringência da bebida (LÓPEZ-GALILEA et al., 2007)

O café ainda possui outros compostos bioativos com capacidade antioxidante, como tocoferóis e trigonelina (JESZKA-SKOWRON; STANISZ; DE PEÑA, 2016). Diversos métodos podem ser utilizados para determinar a atividade antioxidante nos alimentos. As metodologias desenvolvidas baseiam-se na captura do radical peroxila (ORAC, TRAP), no poder de redução do metal (FRAP; CUPRAC), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), captura do radical orgânico (ABTS, DPPH), quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS, oxidação do LDL, co-oxidação do caroteno) (FRANKEL; MEYER, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002; ARUOMA, 2003).

Existem muitas evidências de que a dieta rica em antioxidantes alimentares, especialmente de plantas, ervas, especiarias e bebidas, mostra efeito protetor na saúde humana e reduz o risco de várias doenças (BENZIE; CHOI, 2014). Inúmeros estudos realizados com compostos fenólicos, demonstram a capacidade de captar radicais livres (atividade antioxidante) e seus efeitos na prevenção de enfermidades cardiovasculares e circulatórias (NESS; POWLES, 1997; STOCLET et al., 2004), cancerígenas (WANG; MAZZA, 2002; KATSUBE et al., 2003), no diabetes e no mal de Alzheimer (HERTOG et al., 1997; ISHIGE et al., 2001; ABDILLE et al., 2005).

Ainda não foi estabelecido um método padronizado para determinar as propriedades antioxidantes em alimentos. No entanto, recomenda-se que pelo menos dois métodos sejam combinados para fornecer informações abrangentes sobre a capacidade total dos alimentos (BATISTA et al., 2016; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). A atividade antioxidante pode ser atribuída a vários mecanismos, como prevenção da iniciação da cadeia, ligação de catalisadores de íons de metais de transição, decomposição de peróxidos, capacidade redutora e atividade de eliminação de radicais (GUNALAN et al., 2012). Entre os métodos

mais comumente utilizados são ABTS, FRAP, DPPH e ORAC (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006; TIVERON, 2010), devido a simplicidade de análise e aplicação em rotinas de laboratório. Portanto, para um resultado mais completo deve-se escolher métodos que sejam mais aceitos, validados e padronizados, com informações na literatura (TIVERON, 2010).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras de café - variedade, processamento e torra

Foi utilizado neste trabalho o fruto de café cereja da variedade Catuaí Vermelho IAC-44 da região de Caparaó a 600 m de altitude (20 ° 47'15,58 "S de latitude e 41 ° 39'32,62" O de longitude) de Guaçuí-ES, Brasil.

O café cereja (20 kg para cada tratamento) foi processado pelo método natural e fermentados com e sem inoculação de leveduras durante 72 horas em biorreatores de polipropileno. Os tratamentos com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543, *Candida parapsilosis* CCMA 0544 e *Torulaspora delbrueckii* CCMA 0684 consistiram em inoculá-las separadamente, duas a duas e as três juntas, em um total de 7 tratamentos (Tabela 1). O Controle foi realizado nas mesmas condições sem inoculação.

Tabela 1. Denominação dos tratamentos com inoculação de culturas iniciadoras durante a fermentação do café pelo processo natural.

Denominação do tratamento	Tratamento
Tratamento 1	<i>S. cerevisiae</i>
Tratamento 2	<i>C. parapsilosis</i>
Tratamento 3	<i>T. delbrueckii</i>
Tratamento 4	<i>S. cerevisiae</i> + <i>C. parapsilosis</i>
Tratamento 5	<i>S. cerevisiae</i> + <i>T. delbrueckii</i>
Tratamento 6	<i>C. parapsilosis</i> + <i>T. delbrueckii</i>
Tratamento 7	<i>S. cerevisiae</i> + <i>C. parapsilosis</i> + <i>T. delbrueckii</i>

* Controle = sem inoculação de microrganismos.

As cepas foram reativadas em 10 mL de caldo YEPG (20 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de peptona de soja; pH 3,5) a 28 °C por 24 h até uma concentração de 10⁷ células/mL (*S. cerevisiae* e *C. parapsilosis*) e 10⁵ células/mL (*T. delbrueckii*) para inoculação. As células foram então centrifugadas e ressuspensas em 500 mL de água destilada

(quantidade suficiente para inoculação sem aumentar o teor de umidade do café) (BRESSANI et al., 2018; MARTINEZ et al., 2017).

Os frutos foram transferidos para terreiros suspensos até obter 11,5% de umidade. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. As amostras foram torradas de acordo com as diretrizes fornecidas pela Specialty Coffee Association (SCA, 2018) (Probat Leogap modelo TP2 2, Curitiba, Brasil) e armazenadas sob temperatura controlada até a análise ser realizada. Amostras (100 g) foram coletadas e colocadas em sacos plásticos estéreis e armazenadas a -20 °C até a realização das análises químicas.

3.2 Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE)

Os ácidos orgânicos foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no início e final de fermentação em biorreatores e final de secagem. A extração das amostras dos grãos crus foi realizada de acordo com a metodologia de EVANGELISTA et al. (2014b) com algumas modificações. Os extratos foram centrifugados duas vezes a 12745 RCF, a 4 °C durante 10 minutos. O segundo sobrenadante foi filtrado utilizando microfiltros de acetato de celulose de 0,22 µm. 300µL do extrato foi diretamente injetado na coluna cromatográfica. Os ácidos láctico, acético, málico, oxálico, succínico, tartárico, cítrico, butírico, propiônico e isoaléico) foram quantificados utilizando um cromatógrafo Shimadzu modelo LC-10Ai (Shimadzu Corp., Japão) com um sistema de detecção UV a 210 nm (SILVA et al., 2013). A coluna utilizada foi a Shimpack SCR-101H (7,9 mm x 30 cm) e uma solução de 100 mM de ácido perclórico, com taxa de fluxo de 0,6 mL/min foi utilizada como fase móvel. A temperatura foi mantida em 50 °C durante a análise. Valores dos tempos de retenção dos ácidos identificados foram comparados com tempos de retenção de compostos padrão e a quantificação foi obtida a partir de curvas de calibração feitas com diferentes concentrações de compostos padrão (EVANGELISTA et al., 2014b). As análises foram realizadas em duplicata.

3.3 PCR em tempo real (q-PCR)

Para acompanhamento da população das culturas iniciadoras, foi utilizado amostras do início e final de fermentação em biorreatores, após 6 e 35 dias de secagem. O DNA total das amostras foi extraído usando Mini Kit QIAamp DNA (Qiagen, Hilden, Alemanha) e diluído em série (1:10) de 10^8 a 10^4 células/mL. Cada ponto na curva de calibração foi realizado em triplicata. O cultivo de todas as espécies de leveduras utilizadas no presente trabalho foi

realizado em ágar YEPG, incubadas a 30 °C durante 24 h, após esta etapa, foi realizada a contagem de células usando câmara de Neubauer (BATISTA et al., 2015).

Na análise de PCR em tempo real foi utilizado um sistema de Q-Rotor Gene (Qiagen) em que cada reação compreende em 12,5 mL Rotor Gene-SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 0,8 mM de cada primer e 1 mL de DNA extraído a partir de grãos de café, para um volume total de 25 mL, como recomendado pelo fabricante. As condições de análise foram: aquecimento a 95 °C durante 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 10 segundos e emparelhamento/extensão a 60 °C durante 15 segundos. A temperatura do ciclo foi aumentada de 50 para 99 °C, em progressão de 1 °C a cada 5 segundos para obter a curva de fusão. Todas as análises foram executadas em triplicata (BRESSANI et al., 2018).

Para esta análise foi necessário o uso de primers específicos como representado na Tabela 2. A especificidade de cada par de iniciadores foi confirmada através de pesquisa no GenBank utilizando BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). As análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 2. Primers específicos utilizados para análise de qPCR.

Espécies	Primers	
	Nome	Sequência
<i>S. cerevisiae</i> ¹	SCER-R	5'-CGCAGAGAAACCTCTCTTTGGA-3'
	SCER-F	5'-ATCGAATCTTTGAACGCACATTG -3'
<i>C. parapsilosis</i> ²	SADH F	5' GCTGCGGCTTCAACTGATGC 3'
	SADH R	5' CTTGGTCACGAGCCTCC 3'
<i>T. delbruekii</i> ³	Primer 1 Tods L2	5' CAAAGTCATCCAAGCCAGC 3'
	Primer 2 Tods R2	5' TTCTCAAACAATCATGTTTGGTAG 3'

Primers descritos por ¹Hierro et al. (2007); ²HAYS et al. (2011) and ³ZOTT et al. (2010).

3.4 Preparação das amostras e extração do café

As amostras (4 g) foram extraídas três vezes com 20 mL de n-hexano para eliminar lipídios das amostras. O sólido desengordurado foi seco ao ar durante 24 h para evaporar os resíduos de solvente orgânico. Amostras (2,75 g) de cada amostra de café moído foi extraído com 65 mL de água destilada a 90 °C em repouso à temperatura ambiente por 20 min, seguida por filtração através de papel de filtro Whatman No. 2 (KIM et al., 2018).

3.4.1 Determinação do teor total de polifenóis

O teor total de polifenóis de cada extrato de café foi determinado por um ensaio colorimétrico. 0,5 mL de extrato de café (início e final de fermentação em biorreatores e grão torrado) ou 0,5 mL de água destilada, foi adicionado de 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (10%) e após 6 minutos, 2 mL de solução de Na₂CO₃ a 7% (p/v) foram adicionados e a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 120 minutos. A absorbância foi medida a 750 nm. As concentrações do teor total de polifenóis foram obtidas de uma curva padrão de ácido gálico (variando de 10 a 100 µg/mL) e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/100 g de café (BATISTA et al., 2016). As análises foram realizadas em duplicata.

3.4.2 Determinação da atividade antioxidante total por DPPH

O ensaio de eliminação do radical DPPH foi realizado conforme descrito por KIM et al. (2018) com pequenas modificações. 100 µL de amostra (início e final de fermentação em biorreatores e grão torrado) em quatro diluições diferentes (sem diluição, 1:2; 1:5, e 1:10 para grão verdes e 1:10, 1:15, 1:20 e 1:30 para grão torrados) foram adicionados a 3,9 mL da solução de radical DPPH (0,06 mM) e armazenados no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. A capacidade de eliminação de radicais livres foi avaliada medindo a absorbância a 515 nm. Uma curva de calibração ($y = -0,0005x + 0,6082$), na faixa de 0,1-1,0 mmol Trolox / mL foi utilizado para a quantificação de atividade antioxidante e apresentou boa linearidade ($R^2 = 0,9964$). Os resultados foram expressos em µM de trolox/g de café moído. As análises foram realizadas em duplicata.

3.4.3 Capacidade antioxidante total determinado por ABTS

O ensaio ABTS foi realizado de acordo com KIM et al. (2018) com pequenas modificações. A mistura foi aquecida em banho a 70 °C durante 30 min. A solução do radical ABTS foi diluída com etanol para obter uma absorbância de 0,70 ($\pm 0,05$) a 734 nm. Alíquotas de 30 µL das amostras (início e final de fermentação em biorreatores e grão torrado) em quatro diluições diferentes (sem diluição, 1:2; 1:5, e 1:10 para grão verdes e 1:10, 1:15, 1:20 e 1:30 para grão torrados) foram adicionadas a 3,0 mL da solução radical ABTS e após 6 minutos as leituras de absorbância foram realizadas. Uma curva de calibração foi desenvolvida ($y = -0,0003x + 0,6802$) usando um intervalo de 0,5-10,0 mL de solução padrão de trolox (6-Hidroxi-

2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) e apresentou boa linearidade ($R^2 = 0.9983$). A capacidade antioxidante do extrato de café foi descrita como μM de trolox/g de café moído. As análises foram realizadas em duplicata.

3.4.4 Capacidade antioxidante total determinado por FRAP

O ensaio FRAP utiliza uma reação de oxidação/redução para medir a capacidade de uma amostra reduzir o ferro (III) ao ferro (II). Foi utilizado o protocolo de HUNDHAUSEN et al. (2005) com modificações. O reagente FRAP foi obtido a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M com pH 3,6, 2,5 mL de solução de TPTZ 10 mM (2,4,6-tris-2-pyridyl-1,2,5-triazine) (Sigma-Aldrich) e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico 20 mM (SigmaAldrich). Esta solução incubada por 30 minutos à 37 °C. 2,7 mL de reagente FRAP recém-preparado foi misturado com 270 μL de água destilada e 90 μL de amostra (início e final de fermentação em biorreatores e grão torrado) em quatro diluições diferentes (sem diluição, 1:2; 1:5, e 1:10 para grão verdes e 1:10, 1:15, 1:20 e 1:30 para grão torrados) ou reagente padrão (sulfato ferroso 2 mM). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Uma curva de calibração foi desenvolvida ($y = 0,0006x - 0,0062$) usando um intervalo de 2,5- 10 mL de sulfato ferroso com boa linearidade ($R^2 = 0,9988$) a capacidade antioxidante do extrato de café foi descrita como μM solução padrão de sulfato ferroso/g de café moído. As análises foram realizadas em duplicata.

3.5 Análise Estatística

Para a análise de ácidos orgânicos e qPCR, as médias foram comparadas usando o teste de Student-Newman-Keuls (SNK) a 5% de significância através do programa R. A análise de Kruskal- Wallis ($p > 0,1$), através do programa Xlstat, foi realizado para dados não paramétricos das análises de compostos fenólicos, DPPH, ABTS e FRAP.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PCR em tempo real (qPCR)

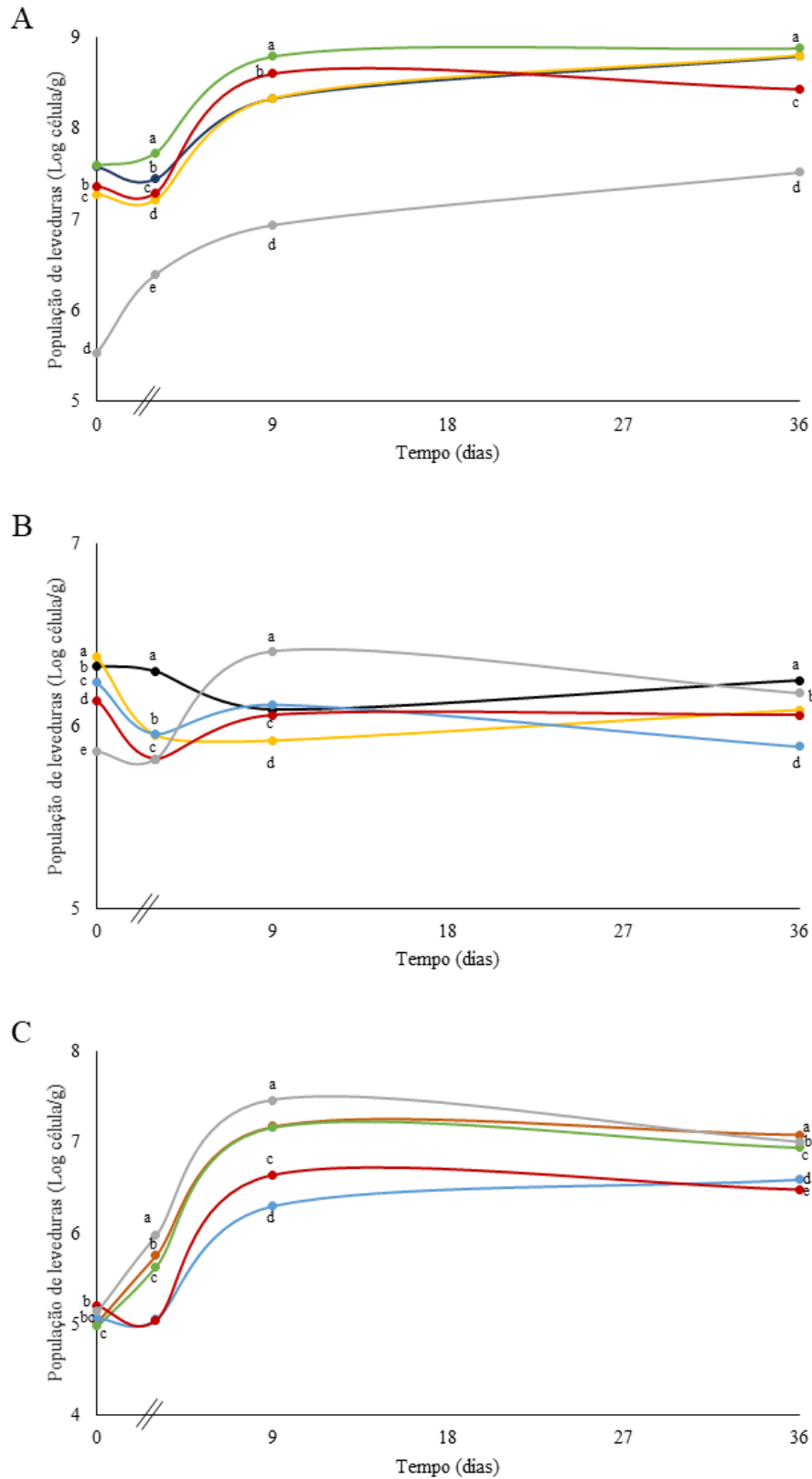
O comportamento dinâmico das populações de *S. cerevisiae*, *C. parapsilosis*, *T. delbrueckii* sem e com inoculação foi verificado por qPCR (Figura 2).

Diferença significativa foi observada para a população de *S. cerevisiae*, tanto para os tratamentos inoculados quanto para o Controle. No início da fermentação, a maior diferença significativa foi observada para o Controle, que apresentou aproximadamente 2 Log a menos (5,54 Log de célula/g) do que os tratamentos inoculados. Do início até o final da secagem, todos os tratamentos inoculados aumentaram sua população a exceção do tratamento 7 (*S. cerevisiae* + *C. parapsilosis* + *T. delbrueckii*), que a partir do nono dia apresentou uma diminuição na população (de 8,60 Log célula/g para 8,43 Log célula/g). Mesmo com esse pequeno decréscimo, a população de *S. cerevisiae* ao final da secagem apresentou 1 Log acima (8,43 Log de célula/g) quando comparado com o Controle (7,52 Log de célula/g).

Altas populações de *S. cerevisiae* pode ser explicada principalmente por sua excelente aptidão biológica e sua tolerância aos fatores de estresse que convergem durante o processo de fermentação (RAMÍREZ; VELÁZQUEZ, 2018).

Monitorando a população de *C. parapsilosis*, pode-se perceber que os tratamentos 4 (*S. cerevisiae* + *C. parapsilosis*) e 6 (*C. parapsilosis* + *T. delbrueckii*) apresentaram dinâmica populacional semelhante até o final da secagem. Durante a fermentação, todos os tratamentos apresentaram um decréscimo de população. A menor população foi detectada no Controle (5,82 Log de célula/g), enquanto o tratamento 2 (*C. parapsilosis*) apresentou a maior população (6,3 Log de célula/g). Durante a secagem, no 9º dia, foi detectado um aumento de população no Controle, apresentando a maior população (6,41 Log de célula/g). Entretanto, ao final da secagem, a maior população observada foi para o tratamento 2 (inoculado apenas com *C. parapsilosis*, com 6,25 Log de célula/g) com diferença significativa dos demais tratamentos. A menor população foi observada no tratamento 6 (*C. parapsilosis* + *T. delbrueckii* com 5,89 Log de célula/g) e os tratamentos 4 (*S. cerevisiae* + *C. parapsilosis*) e 7 (*S. cerevisiae* + *C. parapsilosis* + *T. delbrueckii*), (6,09 e 6,06 Log de célula/g, respectivamente) não apresentaram diferença significativa (Figura 2-B).

Figura 2. Monitoramento da população de culturas iniciadoras no café fermentado por qPCR.



A = primer *S. cerevisiae*; B = primer *C. parapsilosis*; C = *T. delbrueckii*. Tratamentos: 1 (—); 2 (—); 3 (—); 4 (—); 5 (—); 6 (—); 7 (—) e Controle (—). // = Final da fermentação em biorreator (72 horas).

Fatores como a umidade e a temperatura dos grãos de café podem afetar o grau de colonização e as espécies presentes (SILVA et al., 2013), além disso, o co-cultivo com outras leveduras pode ter influenciado no crescimento de *C. parapsilosis*. MARTINEZ et al. (2017) destacaram que a fermentação em biorreatores pode ter favorecido o crescimento dessa levedura, uma vez que ela atingiu 7,5 Log de célula/g. Entretanto esse comportamento não foi verificado no presente trabalho.

Durante o processo fermentativo em biorreatores é possível perceber que apenas os tratamentos 6 (*C. parapsilosis* + *T. delbrueckii*) e 7 (*S. cerevisiae* + *C. parapsilosis* + *T. delbrueckii*) apresentaram um pequeno decréscimo na população de *T. delbrueckii*. RAMÍREZ; VELÁZQUEZ (2018) afirmaram que o processo fermentativo dessa levedura é menor se comparado a *S. cerevisiae* em ambiente anaeróbio. Além disso, os autores afirmaram que a taxa de dominância da *T. delbrueckii* é muito influenciada pela quantidade e tipos de microrganismos presentes no início da fermentação. Nesse sentido, pode-se inferir que a *C. parapsilosis* pode influenciar no crescimento da *T. delbrueckii* em biorreatores. Além disso, apesar de apresentar diferença significativa, o perfil desses dois tratamentos (6 e 7) foram muito semelhantes até o final da secagem (6,59 e 6,48 Log de célula/g, respectivamente) (Figura 2-C). Por ser um microrganismo aeróbio (RAMÍREZ; VELÁZQUEZ, 2018), a *Torulaspora delbrueckii* possui maior crescimento no início da secagem.

4.2 Ácidos Orgânicos

De acordo com a Tabela 3, os ácidos cítrico, málico e succínico foram detectados em todos os tratamentos no início de fermentação. Isso se deve ao fato de que esses compostos já estão presentes no café (EVANGELISTA et al., 2014b). Todos esses ácidos permaneceram durante a fermentação e secagem do fruto, não sendo encontrado diferença significativa em nenhum dos tratamentos para a produção de ácido cítrico e succínico, porém o Controle foi o que apresentou maior concentração de ácido cítrico (1,83 mg/g) e o tratamento 2 (*C. parapsilosis*) apresentou maior concentração de ácido succínico (0,87 mg/g) ao final da secagem. BRESSANI et al. (2018) também não encontraram diferença na concentração de ácido cítrico durante a fermentação de café por via seca. Além disso, maiores concentrações de ácido cítrico foram observadas no início da fermentação de café (MARTINEZ et al., 2017).

No final da fermentação foi verificado uma diminuição de ácido málico em todos os tratamentos, exceto para o Controle e tratamento inoculado com *T. delbrueckii*. O tratamento inoculado com *T. delbrueckii* foi o que apresentou maior concentração de ácido láctico no final

da fermentação (1,83 mg/g) apresentando diferença significativa do restante dos tratamentos, enquanto os tratamentos inoculados com *S. cerevisiae* apresentaram as menores concentrações desse composto, inferindo que essa levedura pode estar inibindo a formação desse ácido. Dadas essas diferenças, e como as fermentações dominadas por *T. delbrueckii* são mais lentas que as dominadas por *S. cerevisiae*, o eventual desenvolvimento de bactérias do ácido láctico pode promover a fermentação malolática (que consiste na descarboxilação do ácido L-málico em ácido L-lático) que ocorre simultaneamente com a fermentação alcoólica (RAMÍREZ; VELÁZQUEZ, 2018, BELTRAMO et al, 2006).

O ácido acético é um dos principais metabólitos produzido por leveduras durante a fermentação da mucilagem do café (DE MELO PEREIRA et al., 2019), sendo desejável já que contribui para a acidez final da bebida (BRESSANI et al., 2018). As maiores concentrações de ácido acético foram encontradas no Controle (7,59 mg/g) e no tratamento 7 (*S. cerevisiae* + *C. parapsilosis* + *T. delbrueckii*, com 7,21 mg/g) (Tabela 3). De acordo com PEÑUELA-MARTÍNEZ; ZAPATA-ZAPATA; DURANGO-RESTREPO (2018) altas concentrações de ácido acético podem estar relacionadas à altas temperaturas de fermentação. Além disso, esse ácido pode se decompor durante o processo de torrefação e gerar metabólitos importantes de sabor, como piridinas e pirróis (DE MELO PEREIRA et al., 2019).

Tabela 3. Ácidos orgânicos encontrados durante a fermentação inoculada e espontânea (Controle) de café pelo processamento natural.

Tempo de fermentação	Tratamentos (mg/g)							Controle
	1	2	3	4	5	6	7	
Cítrico*								
IF	2,22±0,10	1,22±0,05	2,10±0,12	1,88±0,02	2,07±0,15	1,65±0,25	1,74±0,27	1,98±0,33
FF	1,81±0,24	1,41±0,07	1,81±0,04	1,58±0,32	1,39±0,24	1,27±0,17	1,59±0,44	1,95±0,09
FS	1,40±0,27	1,11±0,22	0,93±0,06	1,34±0,18	1,34±0,16	1,00±0,16	1,24±0,15	1,83±0,05
Málico								
IF	3,21±0,38 ^{aB}	1,53±0,20 ^{bC}	2,70±0,37 ^{aC}	2,59±0,26 ^{aC}	4,49±0,19 ^{aA}	3,39±0,04 ^{aB}	2,31±0,17 ^{aC}	2,55±0,11 ^{bC}
FF	0,67±0,09 ^{bCB}	1,23±0,30 ^{bbB}	2,87±0,13 ^{aA}	0,61±0,15 ^{cC}	1,28±0,24 ^{bbB}	1,18±0,16 ^{bbB}	1,49±0,13 ^{bbB}	2,78±0,05 ^{baA}
FS	1,78±0,07 ^{cC}	2,45±0,00 ^{aBC}	2,90±0,13 ^{aB}	2,02±0,22 ^{bC}	1,90±0,17 ^{cC}	2,03±0,06 ^{cC}	2,02±0,19 ^{aC}	3,40±0,03 ^{aA}
Succínico*								
IF	0,74±0,22	0,42±0,18	0,69±0,02	0,73±0,33	0,90±0,03	0,66±0,10	0,71±0,02	0,77±0,35
FF	0,87±0,17	0,56±0,19	0,60±0,04	0,60±0,12	0,49±0,15	0,43±0,01	0,58±0,23	1,05±0,12
FS	0,61±0,15	0,87±0,38	0,71±0,07	0,68±0,03	0,58±0,09	0,50±0,01	0,56±0,11	0,86±0,01
Lático								
IF	0,00±0,00 ^{bB}	0,00±0,00 ^{cB}	0,00±0,00 ^{cB}	0,57±0,06 ^{bA}	0,00±0,00 ^{cB}	0,16±0,01 ^{cB}	0,00±0,00 ^{cB}	0,00±0,00 ^{cB}
FF	1,16±0,28 ^{aB}	1,27±0,15 ^{bbB}	1,83±0,28 ^{baA}	0,91±0,33 ^{bbB}	0,77±0,00 ^{bbB}	1,09±0,13 ^{bbB}	0,75±0,07 ^{bbB}	1,27±0,12 ^{bbB}
FS	1,02±0,12 ^{aE}	2,77±0,31 ^{aB}	3,24±0,31 ^{aA}	1,43±0,14 ^{aD}	1,70±0,24 ^{aCD}	3,34±0,07 ^{aA}	2,02±0,04 ^{aC}	3,43±0,09 ^{aA}
Acético								
IF	11,62±0,18 ^{aA}	0,00±0,00 ^{bC}	9,39±1,61 ^{aB}	0,00±0,00 ^{cC}	0,00±0,00 ^{bC}	8,56±0,11 ^{aB}	0,00±0,00 ^{bC}	0,00±0,00 ^{bC}
FF	8,07±0,11 ^{baA}	3,73±0,25 ^{aD}	6,02±0,08 ^{bC}	7,56±0,44 ^{aAB}	6,33±0,33 ^{aC}	4,46±0,52 ^{bdD}	7,36±0,13 ^{aAB}	6,97±0,13 ^{aAB}
FS	5,16±0,22 ^{cB}	3,38±0,27 ^{aC}	5,05±0,02 ^{bbB}	5,96±0,09 ^{baB}	6,24±0,05 ^{aAB}	4,46±0,18 ^{bbB}	7,21±0,05 ^{aA}	7,59±0,10 ^{aA}

1= *S. cerevisiae*, 2= *C. parapsilosis*, 3= *T. delbrueckii*, 4= *S. cerevisiae* + *C. parapsilosis*, 5= *S. cerevisiae* + *T. delbrueckii*, 6= *C. parapsilosis* + *T. delbrueckii*, 7= *S. cerevisiae* + *C. parapsilosis* + *T. delbrueckii* e Controle. Os dados são mostrados como a média. ± = desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam uma diferença estatística significativa (p <0,05) pelo teste de Student-Newman-Keuls, avaliando a interação de cada tratamento e cada ácido nos diferentes tempos avaliados. Letras minúsculas diferentes indicam uma diferença estatística significativa (p <0,05) pelo teste de Student-Newman-Keuls, avaliando a interação dos tratamentos ao longo de cada tempo. IF = Início de fermentação; FF = Final de fermentação; FS = Final de secagem. * não apresentou diferença significativa em nenhum dos tratamentos.

4.3 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

Comparando cada tratamento ao longo do tempo, todos os tratamentos no início da fermentação foram diferentes significativamente dos grãos torrados em todas as análises (fenólicos totais, DPPH, ABTS e FRAP), sendo que ao final de fermentação, nenhum tratamento apresentou diferença significativa (Figura 3).

No início da fermentação, os tratamentos 3 (*T. delbrueckii*) e 5 (*S. cerevisiae* + *T. delbrueckii*) foram significativamente iguais e diferentes entre os demais tratamentos, apresentando as maiores concentrações de fenólicos totais (328,37 e 333,23 mg de ácido gálico/g, respectivamente) (Figura 3-A).

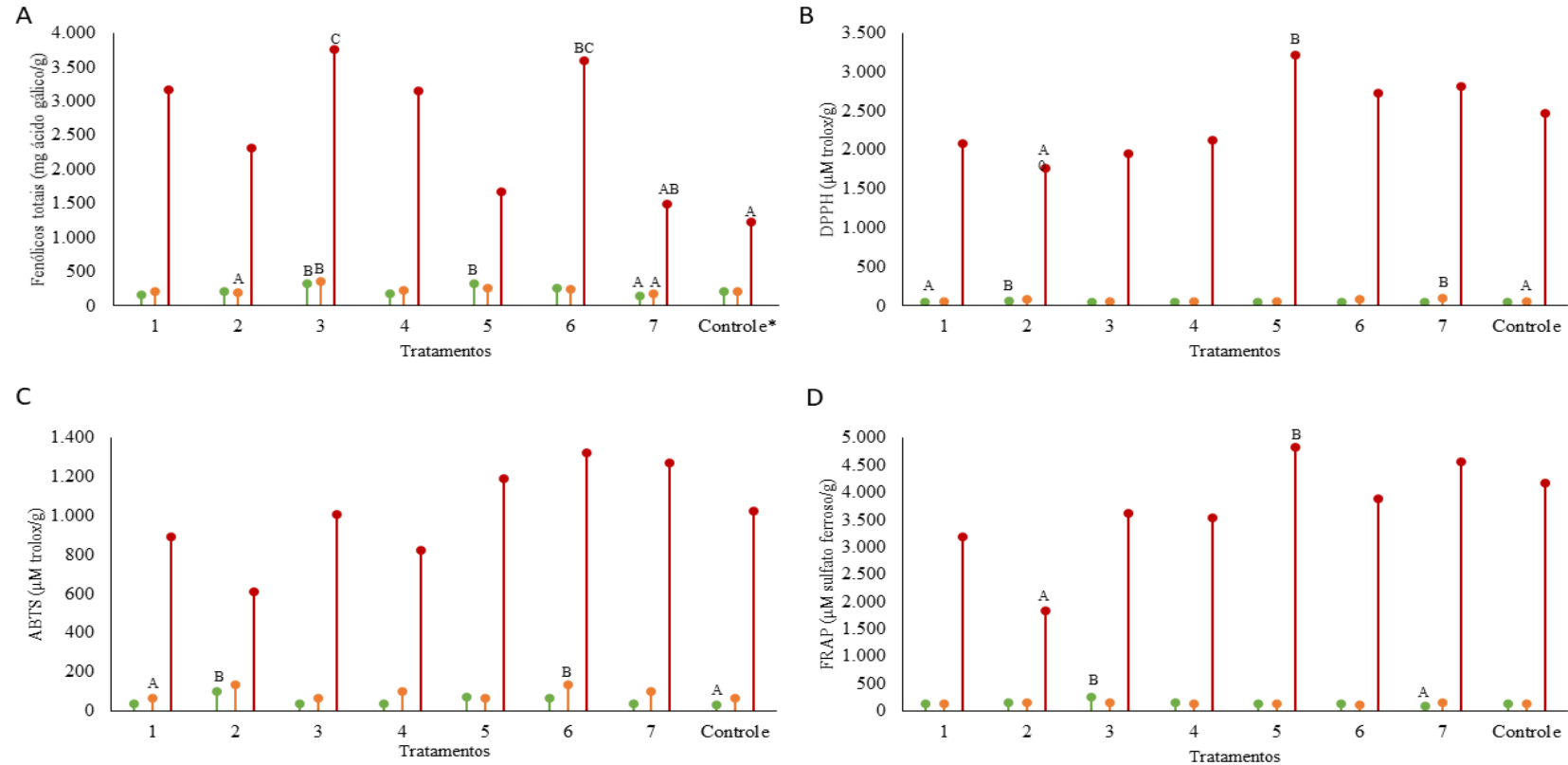
No final da fermentação, as menores concentrações de fenólicos foram observadas nos tratamentos 2 (*C. parapsilosis*, com 198,36 mg de ácido gálico/g) e 7 (*S. cerevisiae* + *C. parapsilosis* + *T. delbrueckii*, com 181,49 mg de ácido gálico/g), que não apresentaram diferenças significativas, mas foram significativamente diferentes dos outros tratamentos. A maior concentração foi apresentada pelo tratamento 3 (*T. delbrueckii*, com 355,76 mg de ácido gálico/g), que apresentou diferença significativa se comparado aos outros tratamentos.

A maior concentração de compostos fenólicos foi observada nos grãos torrados para o tratamento 3 (*T. delbrueckii*, com 3753,30 mg de ácido gálico/g) que apresentou diferença significativa dentre o restante dos tratamentos, além disso, a menor concentração foi observada no Controle (1228,39 mg de ácido gálico/g), que também apresentou diferença significativa dos restantes dos tratamentos (Figura 3-A).

Para a análise de DPPH, foi observado que no início de fermentação, o tratamento 2 (*C. parapsilosis*) apresentou maior concentração de antioxidante (60,60 μ M de trolox/g), enquanto a menor concentração foi detectada no Controle (48,84 μ M de trolox/g). Já no final de fermentação a maior concentração foi para o tratamento 7 (102,88 μ M de trolox/g) e a menor, no Controle (52,06 μ M de trolox/g) (Figura 3-B).

Os únicos tratamentos que apresentaram diferenças significativas na concentração de DPPH nos grãos torrados foram os tratamentos 2 (*C. parapsilosis*) e 5 (*S. cerevisiae* + *T. delbrueckii*), sendo que o tratamento 5 apresentou maior concentração (3215,13 μ M de trolox/g) enquanto o tratamento 2 a menor concentração (1759,45 μ M de trolox/g) (Figura 3-B).

Figura 3. Compostos fenólicos totais (A) e a capacidade antioxidante total (B, C, D) de cafés fermentados com e sem a adição de culturas iniciadoras.



1= *S. cerevisiae*, 2= *C. parapsilosis*, 3= *T. delbrueckii*, 4= *S. cerevisiae* + *C. parapsilosis*, 5= *S. cerevisiae* + *T. delbrueckii*, 6= *C. parapsilosis* + *T. delbrueckii*, 7= *S. cerevisiae* + *C. parapsilosis* + *T. delbrueckii* e Controle. Início da fermentação (—), final da fermentação (—) e grãos torrados (—). As letras maiúsculas diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos em cada tempo de fermentação e no grão torrado. Comparando cada tratamento nos tempos de fermentação e do grão torrado, houve diferença significativa entre o tempo inicial de fermentação e os grãos torrados, pelo teste de Kruskal- Wallis ($p > 0,1$). *Não apresentou diferença significativa entre os tempos de fermentação e grãos torrados.

No início da fermentação, os tratamentos que apresentaram menor e maior concentração de ABTS foram o Controle (32,42 μM de trolox/g) e 2 *C. parapsilosis*, com 99,65 μM de trolox/g), respectivamente. No final da fermentação a maior concentração de ABTS foi para o tratamento 6 (*S. cerevisiae* + *C. parapsilosis* + *T. delbrueckii*), com 134,78 μM de trolox/g) e a menor concentração foi no Controle (66,61 μM de trolox/g), enquanto os outros tratamentos não apresentaram diferença significativa. Nos grãos torrados, nenhum dos tratamentos apresentou diferenças significativas, porém as maiores concentrações foram observadas nos tratamentos 6 (4828,58 μM de trolox/g) e 7 (4556,98 μM de trolox/g) (Figura 3-C).

No início da fermentação, os tratamentos que apresentaram diferenças significativas na concentração de FRAP foram os tratamentos 3 (*T. delbrueckii*) e 7 (*S. cerevisiae* + *C. parapsilosis* + *T. delbrueckii*), onde a menor concentração de FRAP foi observada no tratamento 7 (91,39 μM de sulfato ferroso/g) e a maior concentração no tratamento 3 (242,18 μM de sulfato ferroso/g). Já no final da fermentação, nenhum tratamento apresentou diferença significativa. Nos grãos torrados, a menor concentração de FRAP foi observada no tratamento 2 (*C. parapsilosis*, com 1835,52 μM de sulfato ferroso/g) e a maior concentração no tratamento 5 (*S. cerevisiae* + *T. delbrueckii*, com 4828,58 μM de sulfato ferroso/g), sendo que esses tratamentos apresentaram diferenças significativas entre eles, enquanto os outros tratamentos não apresentaram diferença significativa na concentração de FRAP (Figura 3-D).

De modo geral, em todas as análises realizadas, foi observado maior atividade antioxidante nos grãos torrados em todos os tratamentos. Esse resultado pode ser devido as mudanças na composição química que ocorrem durante a torra (principalmente da reação de Maillard) e pela formação de uma ampla variedade de compostos que possuem atividade antioxidante (NICOLI et al., 1999). Em um estudo realizado por KWAK et al (2018), a fermentação de leveduras de café verde por 24 horas foi eficaz em fortalecer a funcionalidade do café, induzindo um aumento significativo da atividade antioxidante, além de promover que os compostos fenólicos sejam liberados após a torrefação.

Em um estudo feito por PÉREZ-BURILLO et al. (2019), indicou que em muitos casos, a fermentação de café torrado apresentou valores de antioxidantes mais altos se comparado aos cafés verdes. Além disso, nos ensaios FRAP e Folin-Ciocalteu, valores mais altos foram obtidos para os cafés fermentados, apresentando resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho. DEL CASTILLO et al. (2002) encontraram um aumento na atividade antioxidante do café arábica na reação com o ABTS de acordo com o grau

de torrefação quando comparado ao café verde. Esses diferentes resultados apresentados entre DPPH, ABTS e FRAP na análise da atividade antioxidante do café, podem ser relacionados aos diferentes mecanismos de reação (PRIOR et al., 2005, CRUZ et al., 2018).

Dessa forma é recomendável que pelo menos dois ou mais métodos sejam combinados para fornecer informações abrangentes sobre a capacidade antioxidante total de um alimento, já que um método padronizado para a determinação das propriedades antioxidantes de certos alimentos e bebidas ainda não foi estabelecido (BATISTA et al., 2016).

5. CONCLUSÃO

De modo geral, as culturas iniciadoras utilizadas na fermentação do café por via seca apresentaram manutenção da população até o final da secagem. Uma inibição de crescimento pode ser observada em tratamentos com inoculação em co-cultivo, principalmente para as leveduras *C. parapsilosis* CCMA 0544 e *T. delbrueckii* CCMA 0684, enquanto uma maior população foi observada para tratamentos inoculados com *S. cerevisiae* CCMA 0543. A utilização de leveduras como culturas iniciadoras pode influenciar nas diferentes concentrações e formação de alguns ácidos orgânicos, como ácidos málico, succínico, láctico e acético. Ao final da fermentação pode ser observado maior concentração de atividade antioxidante se comparado com o início da fermentação, e, as maiores concentrações foram observadas nos grãos torrados, independente da metodologia utilizada. Apesar do comportamento de antioxidantes apresentarem o mesmo perfil nos diferentes métodos utilizados, os tratamentos inoculados apresentaram maior atividade antioxidante quando comparados aos Controles, sendo que dentre os tratamentos inoculados, o com *C. parapsilosis* CCMA 0544 foi o que apresentou menores concentrações em todas as análises realizadas. O tratamento com melhor resultado, foi o tratamento 5 (*S. cerevisiae* + *T. delbrueckii*), que exibiu a maior população de leveduras no final da secagem e apresentou as maiores concentrações de atividade antioxidante em duas das análises realizadas (DPPH e FRAP). Dessa maneira, a utilização de leveduras pode influenciar positivamente na composição química e atividade antioxidante do grão e, conseqüentemente, na melhora da bebida

REFERÊNCIAS

- ABDILLE, M. H. et al. **Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits**. Food chemistry, v. 90, n. 4, p. 891-896, 2005.
- ABRAHÃO, S. A. et al. **Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.)**, 2010.
- APOSTÓLICO, J. G. et al. **Mapeamento de concursos de qualidade de café e resultados de capixabas premiados de 2010 a 2015**. In: J. B. P. Simão (Eds.), Cafeicultura do Caparaó: Resultados de Pesquisas. Editoração Eletrônica Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Estado do Espírito Santo, p. 216-232, 2017.
- AQUIES. O Portal de Notícias do Sul Capixaba. **Café do Caparaó eleito o 2º melhor do Brasil pela ABIC**. Disponível em: <<http://www.aquies.com.br/2014/conteúdo.asp?codigo=4834>, 2014>. Acesso: 20 junho de 2019.
- ARUOMA, O. I. **Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 523, p. 9-20, 2003.
- BATISTA, N. N. et al. **Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate**. LWT-Food Science and Technology, v. 63, n. 1, p. 221-227, 2015.
- BATISTA, N. N. et al. **Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR**. Food Research International, v. 90, p. 313-319, 2016.
- BELTRAMO, C. et al. **Real-time PCR for characterizing the stress response of *Oenococcus oeni* in a wine-like medium**. Research in Microbiology, v. 157, p. 267-274, 2006.
- BELITZ, H.-D.; GROSCH, W., SCHIEBERLE, P (Ed.). **Coffee, tea, cocoa**. Food Chemistry, Leipzig: Springer, 4º ed., p. 938–951, 2009.
- BEKALO, S. A.; REINHARDT, H. W. **Fibers of coffee husk and hulls for the production of particleboard**. Materials and Structures, v. 43, p. 1049–1060, 2010.
- BENZIE, I. F.; & CHOI, S. W. **Antioxidants in food: content, measurement, significance, action, cautions, caveats, and research needs**. In Advances in food and nutrition research (Vol. 71, pp. 1-53). Academic Press, 2014.

BERTRAND, B. et al. **Comparison of bean biochemical composition and beverage quality of Arabica hybrids involving Sudanese-Ethiopian origins with traditional varieties at various elevations in Central America.** *Tree Physiology*, v. 26, n. 9, p. 1239–1248, 2006.

BRANDO, C. H. J.; BRANDO, M. F. P. **Methods of coffee fermentation and drying.** In: R. F. SCHWAN & G. H. FLEET (Eds.), *Cocoa and Coffee Fermentations*. New York: CRC Press, p. 367-396, 2015.

BRESSANELLO, D. et al. **Coffee aroma: Chemometric comparison of the chemical information provided by three different samplings combined with GC–MS to describe the sensory properties in cup.** *Food chemistry*, v. 214, p. 218-226, 2017.

BRESSANI, A. P. P. et al. **Characteristics of fermented coffee inoculated with yeast starter cultures using different inoculation methods.** *LWT*, v. 92, p. 212-219, 2018.

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

BORÉM, F. M. (Ed.). **Pós-colheita do café.** Lavras: UFLA, p. 127, 2004.

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

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

CÄMMERER, B., & KROH, L. W. **Antioxidant activity of coffee brews.** *European Food Research and Technology*, v. 223, n.4, p. 469-474, 2006.

CENTRO DO COMÉRCIO DE CAFÉ DE VITÓRIA: **O café.** Disponível em: <<https://www.cccv.org.br/institucional/historia-cafe>> Acesso em: 19 de Novembro de 2019.

CENTRO DE DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DO CAFÉ. **Cafeicultura capixaba.** Disponível em: <http://www.cetcaf.com.br/Links/cafeicultura%20capixaba.htm>. Acesso em: 19 de novembro de 2019.

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

CLUB CAFÉ. **Tipos de café arábica - para café gourmet.** Disponível em: <<http://www.clubcafe.net.br/tipos-de-cafe-arabica>> Acesso em: 04 de Dezembro de 2019.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de café**. Disponível em: <http://www.cncafe.com.br/ba/file/Conab/Conab%20-%204%20estimativa%202018.pdf>. Acesso em: 20 junho de 2019.

CORSETTI, A. et al. **Application of starter cultures to table olive fermentation: an overview on the experimental studies**. *Frontiers in microbiology*, v. 3, p. 248, 2012.

CRUZ, R. G.; VIEIRA, T. M. F. S.; LIRA, S. P. **Potential antioxidant of brazilian coffee from the region of Cerrado**. *Food Science and Technology*, v. 38, n. 3, p. 447-453, 2018.

DA PASCHOA, R. P. et al. **Compreensão e adoção de itens de conformidade visando rastrear cafés do Caparaó**. In: J. B. P. Simão (Eds.), *Cafeicultura do Caparaó: Resultados de Pesquisas*. Editoração Eletrônica Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Estado do Espírito Santo, p. 54-67, 2017.

DA SILVA TAVEIRA, J. H. et al. **Potential markers of coffee genotypes grown in different Brazilian regions: a metabolomics approach**. *Food Research International*, v. 61, p. 75-82, 2014.

DAVIS, A. P.; et al. **An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae)**. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 152, p. 465-512, 2006.

DE BRUYN; F. et al. **Exploring the impacts of postharvest processing on the microbiota and metabolite profiles during green coffee bean production**. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 83, n. 1, p. e02398-16, 2017.

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

DE MELO PEREIRA, G. V. et al. **Exploring the impacts of postharvest processing on the aroma formation of coffee beans—A review**. *Food chemistry*, 272, 441-452, 2019.

DEL CASTILLO, M. D.; AMES, J. M.; GORDON, M. H. **Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 13, p. 3698-3703, 2002.

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

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

EVANGELISTA, S. R. et al. **Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process.** Food microbiology, 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, 210, 102-112, 2015.

FARAH, A. et al. **Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee.** Food Chemistry, v. 98, n. 2, p. 373-380, 2006.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. **The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 80, n. 13, p. 1925-1941, 2000.

FOLHA VITÓRIA. **Café produzido no Caparaó faz sucesso até no exterior.** Disponível em: <<http://www.folhavoria.com.br/geral/blogs/riquezas-de-norte-a-sul/2014/10/22/cafe-produzido-no-caparao-faz-sucesso-ate-no-exterior/>, 2014.> Acesso: 20 de junho de 2019.

GUNALAN, G., MYLA, N., BALABHASKAR, R. **In vitro antioxidant analysis of selected coffee bean varieties.** *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 4, n. 4, p. 2126-2132, 2012.

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

HAYS, C. et al. **Rapid and accurate identification of species belonging to the *Candida parapsilosis* complex by real-time PCR and melting curve analysis.** Journal of Medical Microbiology, v. 60, p. 477-480, 2011.

HERTOG, M. G. et al. **Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study.** The American journal of clinical nutrition, v. 65, n. 5, p. 1489-1494, 1997.

HIERRO, N. et al. **Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR.** FEMS Yeast Research, v. 7, n. 8, p. 1340-1349, 2007.

HUNDHAUSEN, C. et al. **Effect of vitamin E and polyphenols on ochratoxin A-induced cytotoxicity in liver (HepG2) cells.** Journal of plant physiology, v. 162, p. 818-822, 2005.

HO, C.T. et al. **An overview of the Maillard reactions related to aroma generation in coffee.** In: Proceedings of the 15th ASIC Colloquium (Montpellier); ASIC: Paris, France, p. 519-527, 1993.

HOLZAPFEL, W. H. **Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries.** International journal of food microbiology, v. 75, n. 3, p. 197-212, 2002.

HWANG, C.F.; CHEN, C.C.; HO, C.T. **Contribution of coffee proteins to roasted coffee volatiles in a model system.** International Journal of Food Science and Technology, v. 47, p. 2117–2126, 2012.

ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. **Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. Free Radical. Biology and Medicine,** v. 30, n. 4, p. 433-446, 2001.

JESZKA-SKOWRON, M.; STANISZ, E.; PEÑA, M. P. **Relationship between antioxidant capacity, chlorogenic acids and elemental composition of green coffee.** LWT - Food Science and Technology, v. 73, p. 243-250, 2016.

KATSUBE, N. et al. **Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins.** Journal of agricultural and food chemistry, v. 51, n. 1p. 68-75, 2003.

KIM, W. et al. **Puffing, a novel coffee bean processing technique for the enhancement of extract yield and antioxidant capacity.** Food Chemistry, v. 240, p. 594–600, 2018.

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

KWON, D.-J.; et al. **Assessment of green coffee bean metabolites dependent on coffee quality using a ¹H NMR-based metabolomics approach.** Food Research International, v. 67, p. 175–182, 2015.

KWAK, H. S.; JEONG, Y.; KIM, M. **Effect of yeast fermentation of green coffee beans on antioxidant activity and consumer acceptability.** Journal of Food Quality, 2018.

LEE, L. W. et al. **Coffee fermentation and flavor—An intricate and delicate relationship.** Food chemistry, v. 185, p. 182-191, 2015.

LÓPEZ-GALILEA, I.; DE PENA, M. P.; CID, C. **Correlation of selected constituents with the total antioxidant capacity of coffee beverages: influence of the brewing procedure.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 55, n. 15, p. 6110-6117, 2007.

MARTINEZ, S. J. et al. **Different inoculation methods for semi-dry processed coffee using yeasts as starter cultures.** Food research international, v. 102, p. 333-340, 2017.

MATIELLO, J. B. **Cultura de café no Brasil: Novo manual de recomendações**. Fundação Procafé, 2002

MEHARI, B. et al. **Profiling of phenolic compounds using UPLC–MS for determining the geographical origin of green coffee beans from Ethiopia**. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 45, p. 16-25, 2016.

MUSSATO, S. I. et al. **Production, composition, and application of coffee and its industrial residues**. *Food and Bioprocess Technology*, v. 4, n. 5, p. 661, 2011.

NAIDU, M. M. et al. **Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee**. *Food Chemistry*, v. 107, p. 377–384, 2008.

NESS, A.R.; POWLES, J.W. **Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review**. *International Journal of epidemiology*, v.26, n.1, p.1-13, 1997.

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; PARPINEL, M. T. **Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables**. *Trends Food Science Technological*, v.10, p.94-100, 1999.

PEÑUELA-MARTÍNEZ, A. E.; ZAPATA-ZAPATA, A. D.; DURANGO-RESTREPO, D. L. **Performance of different fermentation methods and the effect on coffee quality (*Coffea arabica L.*)**. *Coffee Science*, Lavras, v. 13, n. 4, p. 465 – 476, 2018.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. **Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays**. *Food Research International* v. 39, n. 7, p. 791-800, 2006.

PÉREZ-BURILLO, S. et al. **Effect of in vitro digestion-fermentation on green and roasted coffee bioactivity: The role of the gut microbiota**. *Food chemistry*, v. 279, p. 252-259, 2019.

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

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. **Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements**. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 53, n.10, p. 4290-4302, 2005.

QUINTERO, G. P.; MOLINA, J. E. **Fermentación controlada del café: tecnología para agregar valor a la calidad**. Cenicafé, Manizales, Caldas, Colombia, *Avances técnicos*, n. 454, p. 1-12, 2015.

RAMÍREZ, M.; VELÁZQUEZ, R. **The Yeast *Torulaspora delbrueckii*: An Interesting But Difficult-To-Use Tool for Winemaking**. *Fermentation*, v. 4, p. 94, 2018.

RAMOS, B. D.; FERNANDES, L. R. R. M. V.; SOUZA, C. G. **An overview of geographical indications in Brazil.** *Journal of Intellectual Properties Rights*, v. 17, p. 133-140, 2012.

RIBEIRO, J. S. et al. **Prediction of sensory properties of Brazilian Arabica roasted coffees by headspace solid phase microextraction-gas chromatography and partial least squares.** *Analytica Chimica Acta*, v. 634, n. 2, p. 172-179, 2009.

RIBEIRO, L. S.; et al. **Controlled fermentation of semi-dry coffee (*Coffea arabica*) using starter cultures: A sensory perspective.** *LWT - Food Science and Technology*, v. 82, p. 32-38, 2017.

RIBÉREAU-GAYON, P. et al. **Biochemistry of alcoholic fermentation and metabolic pathway of wine yeasts.** *Handbook of enology: the microbiology of wine and vinifications.* Chichester: Wiley, cap. 2, p. 53-77, 2006.

SAKIYAMA, N. S.; FERRÃO, A. G. **Botany and Production of Coffee.** In: R. F. SCHWAN, N. S. FLEET, G. H. (Eds.) *Cocoa and Coffee Fermentations.* New York: CRC Press, p. 341-366, 2014.

SÁNCHEZ-MORENO, C. **Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems.** *Food science and technology international*, v. 8, n.3, p. 121-137, 2002.

SANTOS, J. A.; SIMÃO, J. B. P. **Avaliação de conformidade da agricultura do Caparaó Capixaba nos processos de produção integrada visando a certificação de café.** *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 10, n. 2, p. 261 – 270, 2015.

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

SCHWAN, F. R.; FLEET, H. G. (Ed.). **Cocoa and coffee fermentations.** Boca Raton: CRC, p. 341-588, 2015.

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

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

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

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

SILVA, S. D. A. et al. **Mapping the potential beverage quality of coffee produced in the Zona da Mata, Minas Gerais, Brazil**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 96, p. 3098–3108., 2016.

SIMÃO, J.B.P. et al. **Cafeicultura do Caparaó: resultados de pesquisa**. Alegre: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Estado do Espírito Santo, p. 9-10, 2017.

Sindicato da Indústria de Café do Estado de Minas Gerais (SINDICAFÉ-MG). Disponível em: < <http://sindicafe.com.br/historia-do-cafe/> > Acesso em: 19 de Novembro de 2019.

SIQUEIRA, H. M.; SOUZA, P. M.; PONCIANO, N, J. **Café convencional versus café orgânico: perspectivas de sustentabilidade socioeconômica dos agricultores familiares do Espírito Santo**. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 58, n. 2, p. 155-160, 2011.

Specialty Coffee Association (SCA). Disponível em: <https://sca.coffee/research/protocols-best-practices/> Acesso em: 19 de Novembro de 2019.

STOCLET, J. C. et al. **Vascular protection by dietary polyphenols**. *European journal of pharmacology*, v. 500, n. 1-3, p. 299-313, 2004.

SUNARHARUM, W. B.; WILLIAMS, D. J.; SMYTH, H. E. **Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective**. *Food Research International*, v. 62, p. 315–325., 2014.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição de legumes e verduras consumidos no Brasil**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2010.

TOCI, A. T.; BOLDRIN, M. V. Z. **Coffee beverages and their aroma compounds**. In: A. M. GRUMEZESCU, & A. M. HOLBAN (Eds.). *Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes*. Handbook of Food Bioengineering, Elsevier Inc., 7, p. 397–424, 2017.

TOLEDO, P. R. A. B. et al. **Relationship between the different aspects related to coffee quality and their volatile compounds**. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 15, p. 705-719, 2016.

VAAST, P. et al. **Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica L.*) under optimal conditions**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 86, n. 2, p. 197-204, 2006.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. D. T. **Atividade antioxidante de cafés torrado e solúvel: padronização e validação de métodos**, 2012.

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

WANG, J.; MAZZA, G. **Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor α in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.50, p.4183-4189, 2002.

ZHU, J. T. et al. **Ecophysiological adaptation of *Calligonum roborovskii* to decreasing soil water content along an altitudinal gradient in the Kunlun Mountains, Central Asia. Russian. Journal of Plant Physiology**, v. 57, n. 6, p. 826-832, 2010.

ZOTT, K. et al. **Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR**. Food microbiology, v. 27, n. 5, p. 559-567, 2010.