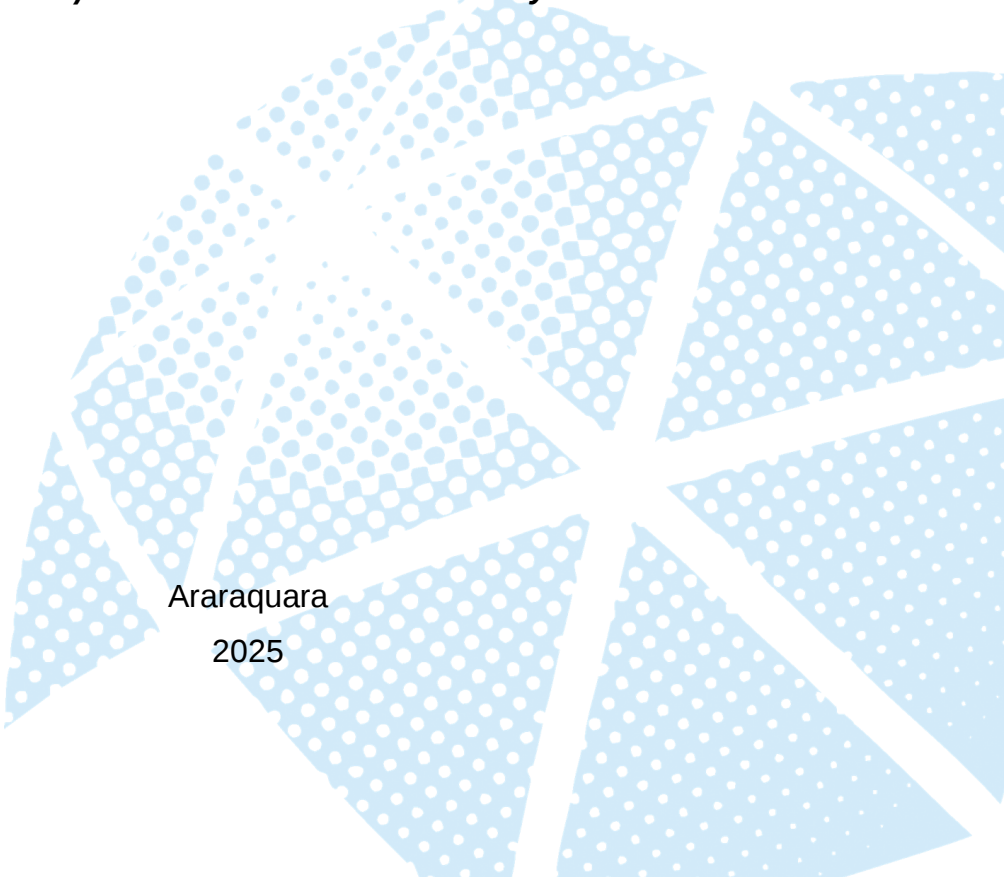


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

André Silva Domingues

Padronização da Reidratação e Fermentação em Estado Sólido de Café
Conilon (*C. canephora*) Beneficiado com *Saccharomyces cerevisiae*

Araraquara
2025



André Silva Domingues

Padronização da Reidratação e Fermentação em Estado Sólido de Café Conilon (*C. canephora*) Beneficiado com *Saccharomyces cerevisiae*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Instituto de Química,
Araraquara, para obtenção do título de
Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Alan Cesar Pilon

Araraquara
2025

D671p

Domingues, André padronização da reidratação e fermentação em estado sólido de café conilon (*C. canephora*) beneficiado com *saccharomyces cerevisiae* / André Domingues. -- Araraquara, 2025 46 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Química)
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química,
Araraquara
Orientador: Alan Cesar Pilon

1. Reidratação. 2. Fermentação. 3. Padronização. 4. *Coffea canephora*. 5. Metabolômica. I. Título.

André Silva Domingues

**Padronização da Reidratação e Fermentação em Estado Sólido de Café
Conilon (*C. canephora*) Beneficiado com *Saccharomyces cerevisiae***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Instituto de Química, Araraquara, para obtenção
do título de Bacharel em Química.

Data da defesa: 01 / 12 / 2025

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alan Cesar Pilon

Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes

Profa. Dra. Kelly Johana Dussan Medina

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que cruzaram meu caminho nesta fase e, de alguma maneira, transformaram quem eu sou.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha mãe, ao meu irmão e ao meu falecido pai, por estarem ao meu lado em todos os momentos, bons e ruins, por me proporcionarem a oportunidade de seguir o caminho da ciência e por todo o amor e acolhimento que sempre me deram.

Agradeço também à minha família, por todo o apoio e carinho, e por me incentivarem a continuar estudando.

À minha namorada, Stella Sales Macedo, que compartilhou comigo os melhores momentos da graduação e a quem tenho eterna gratidão.

A todos os amigos que fiz durante minha jornada acadêmica e que, ao longo desses anos, compartilharam risadas e experiências que guardarei com muito carinho em meu coração.

Aos professores do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, que, além de transmitirem conhecimento essencial para minha formação acadêmica, me inspiraram a buscar sempre o aprendizado e a excelência.

Ao grupo de pesquisa NUBBE, por ter me acolhido e proporcionado todo o apoio necessário para o desenvolvimento desta pesquisa. Em especial, ao meu orientador Prof. Dr. Alan Cesar Pilon, por todo o conhecimento, paciência e confiança em meu potencial.

Por fim, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de pesquisa (processo nº 14803).

*Gandalf olhou para ele.
“Meu caro Bilbo!”, disse.
“Alguma coisa aconteceu com você!
Não é mais o hobbit que um dia foi.”*

J.R.R. Tolkien; O Hobbit

RESUMO

O café (*Coffea arabica* e *C. canephora*) deixou de ser apenas uma *comodity* para ser tornar um produto de experiência, identidade e alto valor agregado. No contexto dos cafés especiais, variações no processo de pós-colheita, torrefação e nos métodos de preparo podem resultar em diferenças marcantes de aroma, sabor e complexidade sensorial. Entre essas etapas, a fermentação de frutos *in natura* (casca, polpa e mucilagem) realizada diretamente na fazenda, tem ganhado destaque como estratégia para intensificar atributos de qualidade. Entretanto, esses processos fermentativos em campo sofrem com forte variabilidade ambiental e de manejo, o que dificulta a reprodutibilidade e a padronização dos resultados. Diante desse cenário, este trabalho propõe estudar a fermentação em estado sólido de grãos de café conilon (*C. canephora*) já beneficiados e secos, por meio de um protocolo de reidratação e viabilização para posterior inoculação de leveduras fermentativas (*Saccharomyces cerevisiae*). Para alcançar esse objetivo, foram investigadas variáveis-chave do processo, incluindo diferentes estratégias de hidratação e secagem, a viabilidade dos grãos após esses tratamentos e os danos estruturais associados. Os processos e as amostras foram caracterizados no contexto de uma abordagem metabolômica, empregando ressonância magnética nuclear, espectroscopia no infravermelho e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, e os dados foram analisados por métodos estatísticos multivariados, como a Análise de Componentes Principais (PCA). Os resultados obtidos ampliam a compreensão das variáveis que modulam a fermentação em estado sólido de grãos de café beneficiados e apontam o potencial da viabilidade de desenvolvimento de protocolos fermentativos padronizados sendo obtidos perfis de lineares para os processos de hidratação e secagem dos grãos, além de espectros RMN que demonstram que dados processos não alteram de maneira crítica quimicamente os grãos de café. Juntamente foram obtidos resultados que demonstram que o tempo de 96h de fermentação foi o tempo mais adequado para a padronização do processo além de terem sido analisados os VIP-Scores e obtidos componentes químicos condizentes. Isso abre novas perspectivas para a participação de outros atores da cadeia do café, como torrefadores e indústrias no desenvolvimento de novos atributos sensoriais e da melhoria da qualidade da bebida do café.

Palavras-chave: Reidratação, Fermentação, Padronização, *Coffea canephora*, Metabolômica

ABSTRACT

Coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) has moved beyond the status of a mere commodity to become a product of experience, identity, and high added value. In the context of specialty coffees, variations in post-harvest handling, roasting, and preparation can result in marked differences in aroma, flavor, and sensory complexity. Among these steps, the fermentation of coffee cherries in natura (with skin, pulp, and mucilage), carried out directly on the farm, has gained prominence as a strategy to enhance quality attributes. However, these on-farm fermentation processes are strongly affected by environmental and management variability, which hinders the reproducibility and standardization of results. In this scenario, the present work aims to investigate solid-state fermentation of conilon coffee (*C. canephora*) beans that have already been processed and dried, using a rehydration and viability protocol prior to inoculation with fermentative yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). To achieve this goal, key process variables were investigated, including different hydration and drying strategies, bean viability after these treatments, and the associated structural damage. In parallel, fermentations were evaluated in different batches of conilon coffee to test the robustness and the standardization potential of the proposed methodology. The processes and samples were characterized using nuclear magnetic resonance, infrared spectroscopy, and liquid chromatography coupled to mass spectrometry, and the data were explored by multivariate statistical methods such as Principal Component Analysis (PCA). The results obtained expand the understanding of the variables that modulate solid-state fermentation of processed coffee beans, yielding linear profiles for the hydration and drying processes, as well as NMR spectra demonstrating that these processes do not critically chemically alter the coffee beans. Furthermore, results showed that a 96-hour fermentation time was the most suitable for process standardization, and VIP-Score analysis identified consistent chemical components. This points to concrete prospects for developing standardized fermentation processes applied to processed beans.

Keywords: Rehydration, Fermentation, Standardization, *Coffea canephora*, Metabolomics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Parte do protocolo de pontuação cafés pela SCA.....	13
Figura 2- Pirâmide de qualidade dos cafés	13
Figura 3– Roda de sabores do café.	14
Figura 4– Foto do vaporizador a quente.....	19
Figura 5- Desenho da seção transversal do vaporizador	20
Figura 6– Foto amostras de café em Erlenmeyer fermentando	22
Figura 7–Metodologia contagem câmara de Neubauer.....	23
Figura 8– Fórmula química da forma azul e incolor do azul de metileno	24
Figura 9– Foto vaporizador ultrassônico	24
Figura 10– Curva de hidratação de massa adicionada em função do tempo	27
Figura 11– Espectro de infravermelho de grão de café cru.....	28
Figura 12– PCA de cafés fermentados comparados a cafés crus (IV)	29
Figura 13– Foto microscópica da contagem de leveduras em câmara de Neubauer	30
Figura 14- Curva de secagem dos grãos de café de água perdida por tempo de secagem.....	31
Figura 15–Espectros de RMN em estado solido ^{13}C sobrepostos	32
Figura 16– LC-MS de café fermentado	36
Figura 17– LC-MS de café não fermentado	36
Figura 18– LC-MS de branco da corrida.	37
Figura 19–PCA dados LC-MS com cafés fermentados e crus	38
Figura 20–PCA comparação de diferentes tempos de fermentação	39
Figura 21- PLS-DA comparação de fermentado e não fermentado	40
Figura 22- PLS-DA comparação de fermentado 96h e não fermentado	40
Figura 23- Estrutura química 1 anotada da PLS-DA	41
Figura 24- Estrutura química 2 anotada da PLS-DA	41
Figura 25- Estrutura química 3 anotada da PLS-DA	42
Figura 26- Estrutura química 4 anotada da PLS-DA	42
Figura 27- Estrutura química 5 anotada da PLS-DA	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Tabela tempos de hidratação e fermentação preliminar 220V	21
Tabela 2– Tempo de hidratação para fermentação estado solido.....	25
Tabela 3– Tempos de fermentação em estado sólidos	26
Tabela 4– Contagem de leveduras vivas e mortas da câmara de Neubauer	30
Tabela 5– Massas iniciais de <i>c. canephora</i> beneficiados.....	34
Tabela 6– Massas de cafés após a hidratação	34
Tabela 7–Massa de cafés após a secagem dos grãos	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SCA	<i>Specialty Coffee Association</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
PLS-DA	<i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
ATP	Trifosfato de adenosina
CONAB	Companhia nacional de abastecimento
Q-graders	Quality graders
DP	Desvio padrão
CV	Coeficiente de variação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 IMPORTÂNCIA DO CAFÉ NO MUNDO	12
1.2 MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO DE CAFÉS ESPECIAIS	12
1.3 PROCESSOS FERMENTATIVOS	15
1.4 METABOLÔMICA.....	16
2 OBJETIVOS	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 VIABILIDADE DE HIDRATAÇÃO, FERMENTAÇÃO E SECAGEM	19
3.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	22
3.3 VIABILIDADE DAS LEVEDURAS	23
3.4 ESTABILIDADE DO PROCESSO DE HIDRATAÇÃO DOS GRÃOS DE CAFÉ BENEFICIADOS	24
3.5 AVALIAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO EM ESTADO SÓLIDO	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 VIABILIDADE NO PROCESSO DE HIDRATAÇÃO, FERMENTAÇÃO E SECAGEM DE GRÃOS BENEFICIADOS	27
4.2 VIABILIDADE DE CRESCIMENTO DE MICROORGANISMOS EM GRÃOS DE CAFÉ BENEFICIADOS E REHIDRATADOS	29
4.3 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE SECAGEM DE GRÃOS BENEFICIADOS PÓS-HIDRATAÇÃO INDUZIDA	31
4.4 ESTABILIDADE DOS GRÃOS	32
4.5 AVALIAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO DE GRÃOS DE CAFÉ BENEFICIADOS EM ESTADO SÓLIDO	33
5 CONCLUSÃO	44
6- PERSPECTIVAS FUTURAS	44
REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 IMPORTÂNCIA DO CAFÉ NO MUNDO

O café sempre ocupou uma posição de destaque entre os principais produtos agrícolas do Brasil, exercendo forte influência econômica, social e cultural. Atualmente, o país não apenas lidera a produção e a exportação mundial de café, como também figura entre os maiores consumidores da bebida¹. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB)² a safra de 2024 atingiu 54,2 milhões de sacas, das quais aproximadamente de 86% tiveram origem na região Sudeste do país.

Dentre os tipos de café produzidos, destacam-se o café arábica (*Coffea arábica*) e café conilon (*C. canephora*), responsáveis por cerca 67% e 33% da produção de café brasileiro³, respectivamente. Essas espécies apresentam diferenças fundamentais tanto nas exigências agronômicas quanto no perfil sensorial. O café arábica, em geral, demanda ambientes de maior altitude e um clima mais amenos, sendo associado a bebidas de perfil mais aromático e suave. Já o conilon é cultivado em altitudes mais baixas, apresenta maior resistência a condições climáticas adversas e doenças, e tende a originar bebidas de caráter mais robusto, com maior teor de cafeína⁴.

Considerando essas diferenças, torna-se ainda mais relevante analisar o impacto das mudanças climáticas sobre a cafeicultura. Projeções indicam que a área adequada ao cultivo de café arábica no Brasil poderá reduzir entre 23% a 35% nas próximas décadas, em função do aumento da temperatura e da alteração nos regimes de precipitação^{5, 6}. Nesse contexto, o plantio e o estudo do *C. canephora* assumem um papel estratégico, uma vez que a maior resiliência dessa espécie a estresses ambientais pode mitigar parte das perdas produtivas associadas às mudanças climáticas.

1.2 MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO DE CAFÉS ESPECIAIS

Devido à complexidade da composição química e a variabilidade sensorial dos cafés, tornou-se necessário a criação de categorias para a classificação de cafés de diferentes qualidades. A principal instituição responsável pela padronização da

metodologia de classificação dos cafés é a *Specialty Coffee Association* (SCA), na qual os cafés são divididos em categorias de acordo com a nota obtida em um protocolo sensorial estruturado, como indicado na Figura 1

Figura 1 -Parte do protocolo de pontuação cafés pela SCA



**Specialty Coffee Association
Arabica Cupping Form**

Name: _____

Date: _____

Table no: _____

Quality Scale

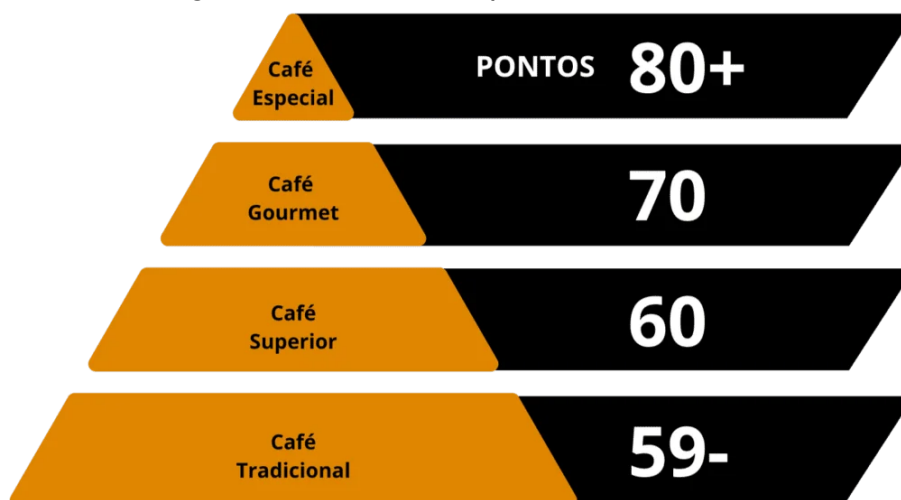
6.00 - GOOD	7.00 - VERY GOOD	8.00 - EXCELLENT	9.00 - OUTSTANDING
6.25	7.25	8.25	9.25
6.50	7.50	8.50	9.50
6.75	7.75	8.75	9.75

Sample No.	Roast Level of Sample	Fragrance/Aroma	Flavor	Acidity	Body	Uniformity	Clean Cup	Overall	Total Score
		6 7 8 9 10 Dry Qualities Break Aftertaste	6 7 8 9 10 Intensity High Low	6 7 8 9 10 Level Heavy Thin	6 7 8 9 10 Balance	6 7 8 9 10 Sweetness	Defects (subtract) Taint - 2 Fault - 4	# of cups Intensity □ × □ = □	
Notes:									Final Score

Fonte: *Specialty coffee association*

A nota do café é atribuída utilizando o protocolo de avaliação padronizado da SCA, na qual o café é julgado por *Q-graders* (avaliadores profissionais certificados) que atribuem notas de 0 a 10 para diferentes atributos físicos e sensoriais, como tamanho do grão, coloração, uniformidade, defeitos, fragrância, aroma, acidez, corpo, entre outros. A soma e o tratamento dessas notas resultam na pontuação final do café, conforme ilustrado na Figura 2.

Figura 2- Pirâmide de qualidade dos cafés



Fonte: *Golden Coffee Special*

Além de avaliação numérica desses atributos, o café também é classificado pelo seu sabor, utilizando a chamada roda de sabores do café. Nessa ferramenta, os descritores mais internos são mais genéricos, enquanto os mais externos se tornam progressivamente mais específicos e detalhados, o que reflete cafés sensorialmente mais complexos e valorizados. Assim, um café pode ser descrito de forma ampla como “frutado” ou, de maneira mais específica, como apresentando notas de “amoras”, conforme representado na Figura 3

Figura 3– Roda de sabores do café.



Fonte: *Speciality coffee association*

Entretanto há um desafio importante quanto a complexidade do café e o fato de que, para que um lote alcance a categoria de café especiais, ele frequentemente passa por algum tipo de processo fermentativo, que pode ser espontâneo durante o processo secagem/beneficiamento ou induzido por meio prolongamento desse

processo ou inoculação de leveduras/bactéria em frutos *in natura*, na própria fazenda, em que os produtores têm dificuldade em obter reprodutibilidade em seus resultados. Dessa forma, torna-se difícil controlar e/ou padronizando o perfil químico e sensorial do café e, portanto, entende-se a importância do estudo sistemático dos processos fermentativos, visando a obtenção de maior controle, à melhor reprodutibilidade e à padronização mais robusta das qualidades dos cafés especiais⁷.

1.3 PROCESSOS FERMENTATIVOS

Os processos fermentativos podem ser definidos como processos metabólicos e bioquímicos pelos quais moléculas orgânicas, como a glicose e outros açúcares, são degradadas para a produção de ATP (energia) na ausência de oxigênio, sendo, portanto, caracterizados como processos anaeróbicos. O produto da fermentação varia de acordo com o organismo que realiza o processo; por exemplo, células musculares humanas realizam a fermentação láctica, produzindo o lactato, enquanto a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem como um dos possíveis produtos o etanol⁸.

As fermentações e seus produtos já são conhecidos a muito tempo pela humanidade, com registros que remontam a cerca de 7000 a.C., na China, onde foram encontrados jarros utilizados para a produção de bebidas fermentadas à base de frutas, mel e arroz. Atualmente, a fermentação continua desempenhando um papel central em diferentes ramos, desde a produção de etanol combustível, até o setor alimentício, com a produção de bebidas alcoólicas, vinhos e pães e iogurtes^{9, 10}.

Entretanto, em contraste com outros produtos consumíveis, como o vinho e a cerveja, nos quais a fermentação gera diretamente o produto, o café se diferencia. No processamento do café, a fermentação constitui uma etapa do pós-colheita, à qual o fruto é submetido, normalmente por meio de fermentações de “via natural” (processo sem controle dos microrganismos) realizadas durante o processo de secagem, quando o fruto ainda está inteiro, com casca e polpa, ou por fermentações de “via úmida”, nas quais os grãos são mantidos submersos em água. Esses processos modificam o perfil sensorial e químico do café, embora o produto continue sendo o próprio grão de café, posteriormente seco e torrado.

Porém, por se tratar majoritariamente de fermentações naturais, os microrganismos responsáveis pelo processo variam em função do *terroir* (conjunto de fatores naturais como solo, clima, altitude e relevo) e em função do manejo e das

condições de processamento às quais o café foi exposto, comprometendo a reprodutibilidade. Além disso, por serem conduzidas quando o fruto ainda está íntegro, essas fermentações precisam ocorrer logo após a colheita, o que limita a flexibilidade do produto e a participação de outros agentes dentro da cadeia do café, como torrefadoras e indústrias do café.

Diante desse contexto, torna-se relevante a criação de métodos de fermentação aplicados a grãos beneficiados, isto é, grãos que já passaram por todas as etapas de pós-colheita, com a remoção de casca, polpa e mucilagem, restando apenas o grão seco, o qual pode ser armazenado por longos períodos. A partir desses grãos, pode-se propor uma fermentação induzida, com o controle dos microrganismos presentes no meio, e conduzida em estado sólido, sem a presença de grandes quantidades de água livre, de forma a aumentar o controle, a padronização, a reprodutibilidade, a viabilidade em termos de escala, e a redução de resíduos do processo fermentativo aplicados ao café.

1.4 METABOLÔMICA

A metabolômica, entendida como o estudo abrangente dos metabólitos de massa molar < 1500 Da, presentes em sistemas biológicos em condições de variações genéticas, ambientais ou patológicas, consolidou-se como uma das abordagens centrais em *foodomics* para investigação de qualidade, autenticidade e rastreabilidade de alimentos¹¹.

Combinando técnicas analíticas de alta resolução como cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), cromatografia gasosa (GC-MS), ressonância magnética nuclear (RMN) com ferramentas quimiométricas multivariadas (por exemplo, PCA, PLS-DA), a metabolômica permite transformar o café em um “mapa químico” de alta dimensionalidade, no qual diferenças sutis de processo, origem ou genótipo podem ser detectadas e modeladas^{12, 13}.

No contexto específico do café, abordagens metabolômicas têm sido empregadas para: (i) discriminar espécies e variedades (*C. arabica* vs. *C. canephora*), (ii) classificar amostras segundo origem geográfica e *terroir*, (iii) monitorar efeitos do processamento pós-colheita e da torra, e (iv) relacionar perfis químicos com atributos sensoriais e pontuações de qualidade.

Aplicações voltadas à autenticidade e rastreabilidade também avançaram rapidamente. Revisões e estudos de caso mostram que perfis metabolômicas de grãos verdes e torrados podem ser utilizados para inferir a origem geográfica, apoiar sistemas de indicação geográfica e fornecer evidências objetivas contra fraudes em cafés de origem única¹⁴. No âmbito dos cafés especiais, essa abordagem é particularmente relevante, pois conecta o valor agregado do produto a evidências químicas reprodutíveis, em complemento à avaliação sensorial.

A interface entre fermentação e metabolômica em cafés vem ganhando espaço de forma progressiva. Estudos combinando metagenômica e metabolômica mostraram que diferentes estratégias de processamento (por exemplo, *honey* e *pulped natural*) em *C. canephora* resultam em perfis distintos de metabólitos não voláteis, associados a mudanças na atividade microbiana e em atributos de qualidade. Estudos sobre a microbiota e a fermentação de *C. canephora* apontam que o uso de culturas iniciadoras e de condições fermentativas controladas altera de forma consistente o perfil de ácidos orgânicos, açúcares, fenólicos e compostos nitrogenados, impactando diretamente a complexidade aromática, doçura e corpo da bebida¹⁵. Nesse contexto, abordagens metabolômicas permitem quantificar e acompanhar esses metabólitos durante o processo, oferecendo parâmetros objetivos para ajuste fino das condições fermentativas.

No presente trabalho, a metabolômica pode ser explorada como eixo central para a caracterização e o controle da fermentação em estado sólido de grãos de café conilon beneficiados e reidratados. Na proposta, visamos entender o perfil metabólico associado a: (i) à viabilidade e integridade estrutural dos grãos após reidratação e secagem, (ii) ao progresso da fermentação induzida com *Saccharomyces cerevisiae* e (iii) à formação de potenciais marcadores químicos de qualidade. A aplicação sistemática de ferramentas multivariadas sobre esses dados torna possível: discriminar diferentes condições de processo (tempo, atividade de água, temperatura, regime de secagem), identificar assinaturas químicas associadas a fermentações bem-sucedidas e, em perspectiva, propor marcadores metabolômicas que possam ser usados para padronizar e monitorar fermentações em grãos beneficiados, reduzindo a dependência de condições ambientais de campo e aumentando a reprodutibilidade sensorial dos cafés produzidos.

2 OBJETIVOS

Estudar o processo fermentativo em estado sólido aplicado ao café conilon beneficiado compreendendo as diferentes variáveis pelas quais influenciam o processo. Junto a isso estudar um processo fermentativo seco padronizado para diferentes cafés conilon de modo a obter perfis metabólicos similares.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 VIABILIDADE DE HIDRATAÇÃO, FERMENTAÇÃO E SECAGEM

Inicialmente avaliamos a viabilidade de hidratação, fermentação e secagem de grãos de café beneficiados. Isso decorre pois não existem estudos prévios utilizando café secos e beneficiados para esse fim.

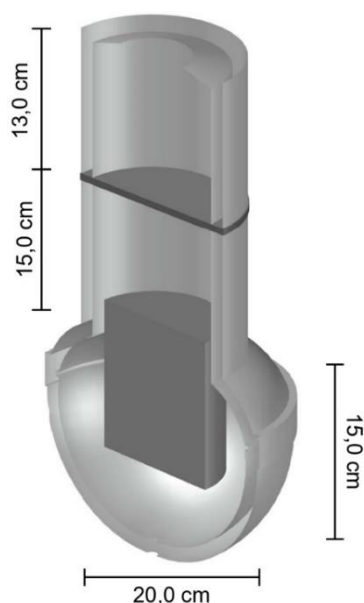
Desse modo, para o processo de hidratação dos grãos de café beneficiados foi utilizado um vaporizador doméstico modificado (Glug - 2,8 L), como indicado na Figura 4. O vapor quente ($\sim 130^{\circ}\text{C}$) é gerado por um sistema de resistências (110 ou 220 V) e direcionado para os suportes superiores em que encontra uma plataforma onde os grãos de café são depositados e um tubo no qual o vapor, é condensado e reintroduzido no sistema de água do vaporizador, conforme ilustrado na Figura 5.

Figura 4– Foto do vaporizador a quente



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Figura 5- Desenho da seção transversal do vaporizador



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Inicialmente, os experimentos foram conduzidos sob a potência de 220V para um maior fluxo/vapor de ar quente. A Tabela 1 mostra os tempos de exposição das amostras de grãos de café beneficiados ao vapor quente. Utilizamos tempos de hidratação que variam entre 10 até 210 minutos. Utilizamos da técnica de gravimetria para definir os graus de hidratação dos grãos de café beneficiados, ou seja, os grãos foram pesados antes e depois do processo de hidratação, considerando a umidade inicial entre e 10 - 11% em massa.

Tabela 1– Tabela tempos de hidratação e fermentação preliminar 220V

AMOSTRA	TEMPO VAPORIZAÇÃO (Min.)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)
1	20	72
2	40	72
3	180	72
4	60	72
5	75	72
6	210	72
7	30	72
8	10	72
9	20	120
10	90	120
11	40	120
12	30	120
13	10	120
14	120	120
15	60	120
16	180	120
17	60	120

Fonte: elaborada pela própria autora.

Após a hidratação e viabilização dos tecidos dos grãos, foi realizado o processo de fermentação em estado sólido com *Saccharomyces cerevisiae* (Zymaflore RB2). Os grãos foram acondicionados em Erlenmeyer de 500 mL sob a temperatura de aproximadamente 35°C (em banho maria), e borrifados com uma solução de *Saccharomyces cerevisiae* e açúcar demerara (União) na concentração de 0,1g/mol. Os frascos foram tampados com algodão e armazenados em temperatura ambiente sob abrigo da luz, como representado na Figura 6.

Figura 6– Foto amostras de café em Erlenmeyer fermentando



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Após os tempos de fermentação os grãos foram secos em estufa de ar circulantes por um período de 40 minutos a 60°C, cessando a atividade da leveduras e posteriormente a 40°C até a redução da umidade a 10 – 12% de massa.

Para o estudo de secagem, um experimento em triplicata com grãos de cafés beneficiados (~100 g) foram hidratados até 110 g, e seguida foram secos em estufa de ar circulante a 40 ° Celsius. As amostras foram pesadas a cada 2 horas a fim de compreender o tempo e velocidade do processo de secagem.

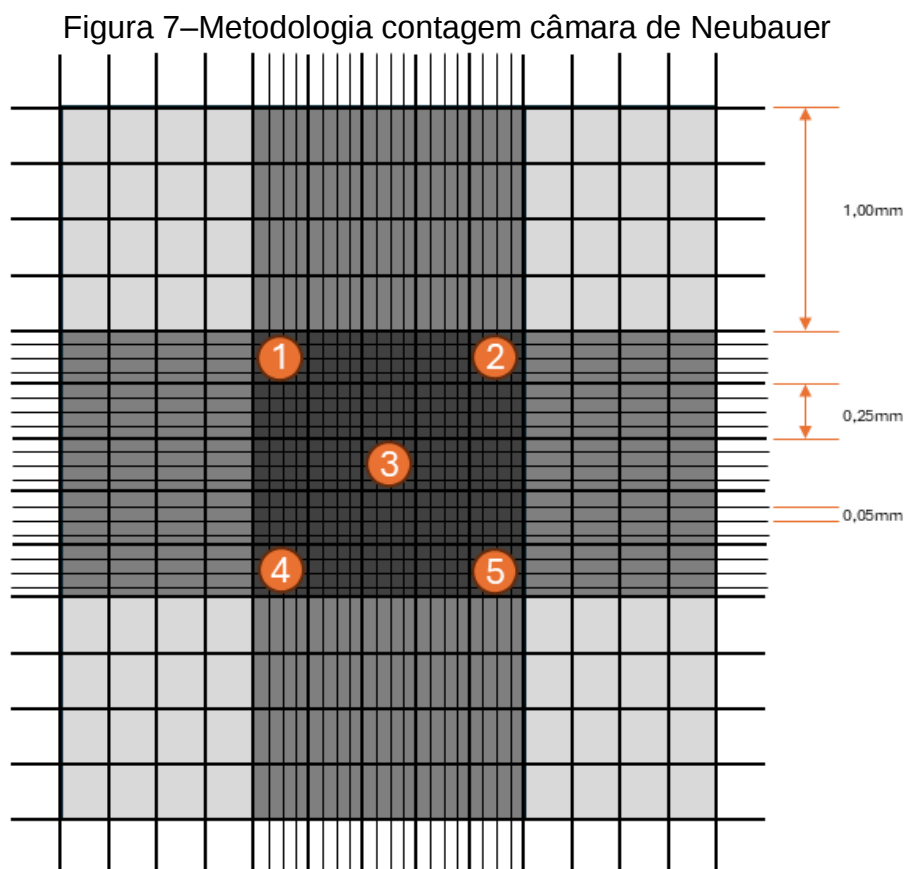
3.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Para avaliar o impacto do processo de hidratação e fermentação foi utilizado análises por infravermelho nos grãos de café (*C. arábica* e *C. canephora*) inicialmente moídos em moinho criogênico e filtrados em uma tamis a 35 mesh.

As análises de infravermelho (FTIR) foram realizadas com espectrômetro Bruker, modelo Vertex 70, equipado com detector DLaTGS, operando com resolução de 4 cm⁻¹. As aquisições espectrais foram realizadas na faixa de 400 a 4.000 cm⁻¹, empregando o modo de reflectância total atenuada (ATR). Os dados do FTIR foram analisados por ferramentas estatísticas da plataforma Metaboanalyst (v. 6.0).

3.3 VIABILIDADE DAS LEVEDURAS

Para se medir a viabilidade das leveduras compradas foram pesados 500 mg levedura pela qual foi inserida em um béquer com 10 mL de água destilada. A solução foi aquecida a 37° durante 10 minutos, ativando a levedura. Após a extração, dilui-se em uma proporção de 1 para 50 e misturada com a solução de azul de metileno com adição de citrato de sódio e distribuída em uma placa de Neubauer. A contagem de leveduras foi realizada utilizando de um microscópio com uma ampliação de 100X a partir da contagem referente aos 4 quadrantes na periferia e no quadrante central como demonstrado na Figura 7, posições 1 a 5.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

A contagem é feita considerando as leveduras azuis e leveduras incolores. As leveduras viáveis reduzem o azul de metileno a sua forma leuco (sem coloração) demonstrando as formas oxidadas e reduzidas, como indicado na Figura 8. Desse modo, é possível diferenciar as leveduras vivas (incolores) e mortas (azuis)

Após a hidratação, os grãos foram secados em estufa de ar circulante a 40°C até retornarem os valores de massas iniciais. Em sequência, os grãos foram moídos e encaminhados para a análise no RMN em estado sólido por CPMAS de ^{13}C das amostras de café, onde os *experimentos de CP-MAS- ^{13}C foram conduzidos no* espectrômetro Bruker Avance III HD 9,4T WB em uma sonda de dupla ressonância de 4 mm (MAS 4 BL CP BB DVT) utilizando a sequência *cp* disponível na biblioteca padrão do TopSpin 3.5pl7 sob rotação de 10 kHz. Foram adquiridos 2300 transientes com 3 s de tempo de recuperação entre cada transiente e uma janela espectral de 50 kHz com 2048 pontos. A duração do pulso de excitação foi de 3,2 μs com tempo de contato de 2,0 ms e o esquema de desacoplamento utilizado foi o *tpm15*. O espectro foi processado utilizando 4096 pontos e apodização exponencial com fator de alargamento de linha de 20 Hz.

3.5 AVALIAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO EM ESTADO SÓLIDO

O experimento foi iniciado com 6 diferentes amostras de cafés conilon de diferentes origens. Os 6 cafés (nomeados por letras de A a F) foram então separados em um total de 36 experimentos, distribuídos em um total de 6 procedimentos experimentais onde foram variados tanto tempo de hidratação quanto tempo de fermentação (nomeados de números de 0 a 5 sendo o 0 refere-se ao processo sem fermentação).

Então após a separação dos cafés nos 36 grupos experimentais, foi realizado a pesagem e armazenamento das amostras, em seguida, eles foram levados para a reidratação no vaporizador (Glug) sendo separados pelos tempos indicados a seguir na Tabela 2.

Tabela 2– Tempo de hidratação para fermentação estado solido

<i>procedimento</i>	<i>tempo hidratação (min)</i>
0	0
1	120
2	180
3	120
4	180
5	150

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Após a hidratação de todos os cafés seguiram para a fermentação a seco seguindo o mesmo procedimento descrito na seção 3.1 e com tempos indicados na Tabela 3

Tabela 3– Tempos de fermentação em estado sólidos

<i>procedimento</i>	<i>tempo fermentação</i>
0	0 horas
1	72horas
2	72horas
3	120horas
4	120horas
5	96horas

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Após o processo fermentativo os cafés foram secos em estufa durante 7 horas sendo os primeiros 45 minutos a 60°C, cessando atividade celular das leveduras e o restante do tempo a 40°C.

Após a secagem, os grãos foram moídos e extraídos em eppendorf de 2 mL contendo 50 mg e 1 mL de uma solução de metanol: água, 80:20v/v contendo ácido ascórbico como padrão interno. Em seguida, as amostras passaram por vórtex (20s) para homogeneização, e em banho ultrassônico (15 min) e centrifugação por mais 15 minutos, separando o sobrenadante do material vegetal. 500µl foram coletados em vials aos quais foram submetidos ao secador de amostras e armazenados.

Para as análises de LC-MS foi utilizado do cromatógrafo líquido Shimadzu Nexera X2, equipado com bomba binária LC-30AD, amostrador automático SIL-30AC e forno de coluna CTO-20A. A separação cromatográfica ocorreu em uma coluna Kinetex C18 (5 µm, 100 Å, 150 x 3,0 mm), mantida a 40 °C, com fluxo de 0,45 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. O amostrador foi mantido a 4 °C para garantir a estabilidade das amostras. A fase móvel consistiu em água com 0,1% de ácido fórmico (fase A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (fase B). O gradiente de eluição foi programado da seguinte forma: de 0 a 15 minutos, a porcentagem de fase B variou de 5% a 100%; entre 15 e 20 minutos manteve-se em 100%; de 20 a 20,5 minutos retornou de 100% a 5%; e, de 20,5 a 22 minutos, permaneceu em 5%. Antes de cada análise, foi estabelecido um tempo de equilíbrio de 5 minutos para a estabilização do

sistema. A detecção foi realizada em um espectrômetro de massas 3200 QTRAP (quadrupolo-ion trap linear) da AB SCIEX, utilizando ionização por *electrospray* (*Turbo Ion Spray*) operando no modo negativo.

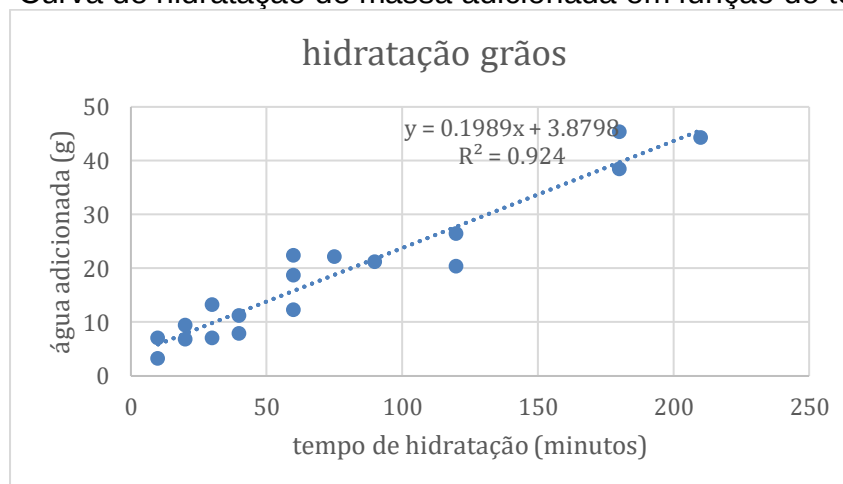
Os arquivos com os dados brutos foram processados pelo software MS-Dial, com detecção de picos, deconvolução e alinhamento entre amostras, gerando a matriz de recursos (*feature*). Em seguida, a matriz foi importada para o metaboanalyst, onde os dados foram normalizados (e, quando aplicável, transformados e autoescalados) e submetidos a análises de componentes principais (PCA). Os *loadings* foram então utilizados para priorizar as variáveis discriminantes. A anotação de candidatos foi realizada com base nas variáveis de maior contribuição no PCA, recorrendo a banco de dados químicos e espectrais como por exemplo, o *FoodDB* e outras bibliotecas espectrais como Massbank, NuBBE entre outros.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VIABILIDADE NO PROCESSO DE HIDRATAÇÃO, FERMENTAÇÃO E SECAGEM DE GRÃOS BENEFICIADOS

Inicialmente avaliamos a viabilidade do processo de hidratação em grãos de cafés (*C. canephora*) beneficiados. Para isso, usamos o vaporizador Glug a 220V, o que leva a maiores temperaturas (~150° C), pesando os grãos antes e após a submissão aos vapores aquecidos. A Figura 10 mostra curva de hidratação em função do tempo de exposição aos vapores aquecidos.

Figura 10– Curva de hidratação de massa adicionada em função do tempo

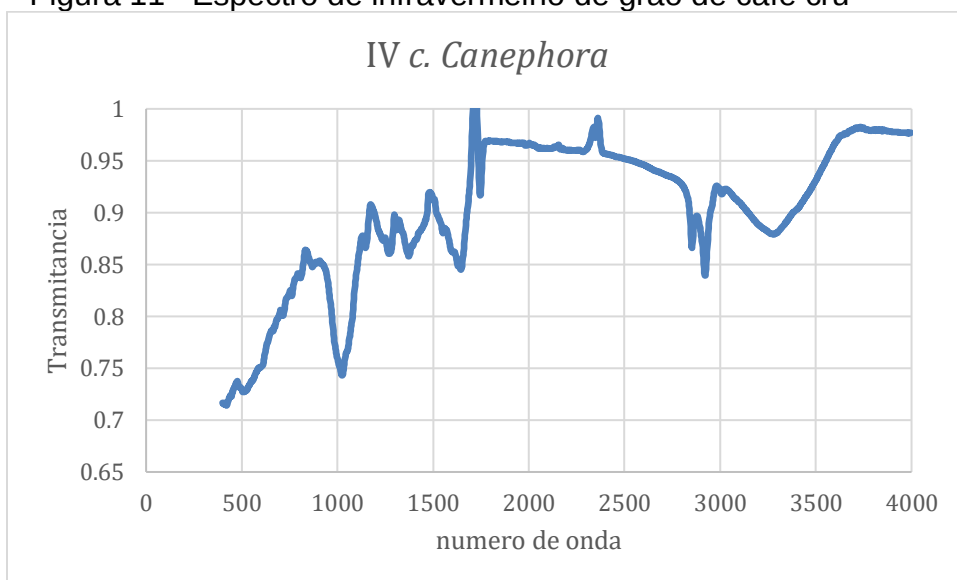


Fonte: elaborado pelo próprio autor.

A Figura 10 apresenta os pontos de coleta durante o processo de hidratação, o que nos revela um comportamento com características de linearidade. Para confirmar essa correlação entre os valores de hidratação e tempo de exposição foi calculado o coeficiente de determinação (R^2) que forneceu um fator de 0,924 confirmando a tendência dessa relação entre o tempo exposição e a capacidade de hidratação.

Posteriormente, com o a fermentação e secagem dos grãos, ao realizar a análise no FTIR foi obtido espectros como na Figura 11

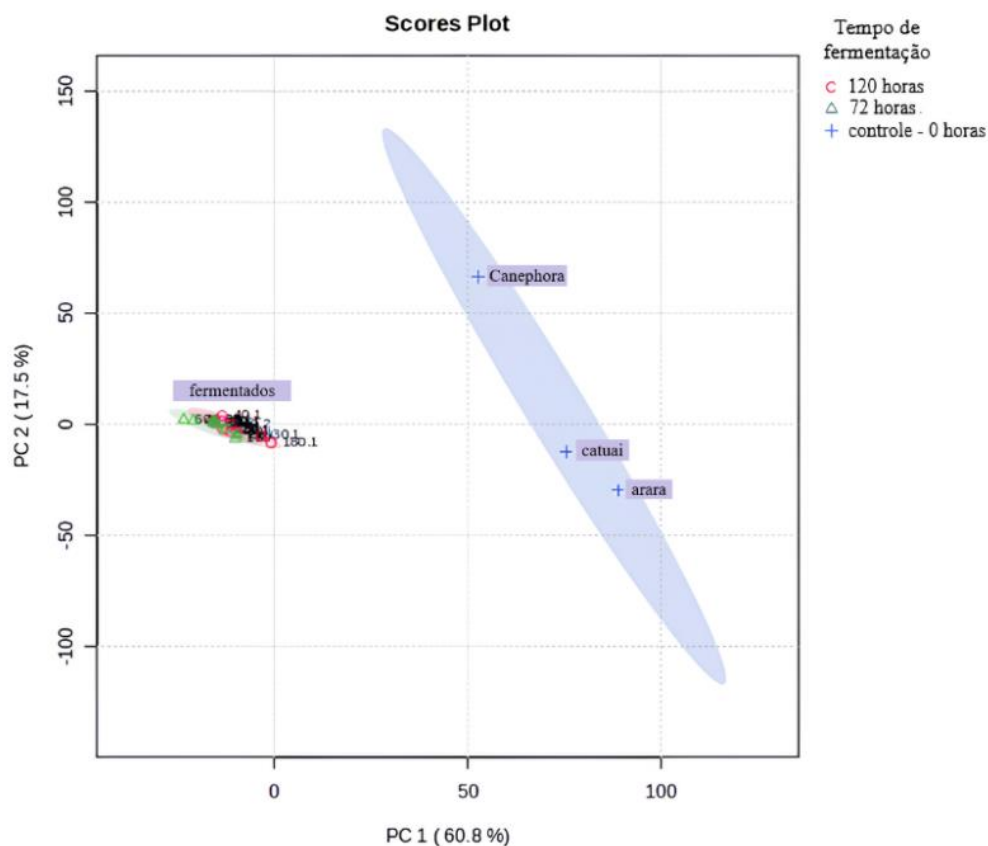
Figura 11– Espectro de infravermelho de grão de café cru



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

E ao realizara as análises estatísticas com os dados de infravermelho foi então obtido a PCA indicada na Figura 12

Figura 12– PCA de cafés fermentados comparados a cafés crus (IV)



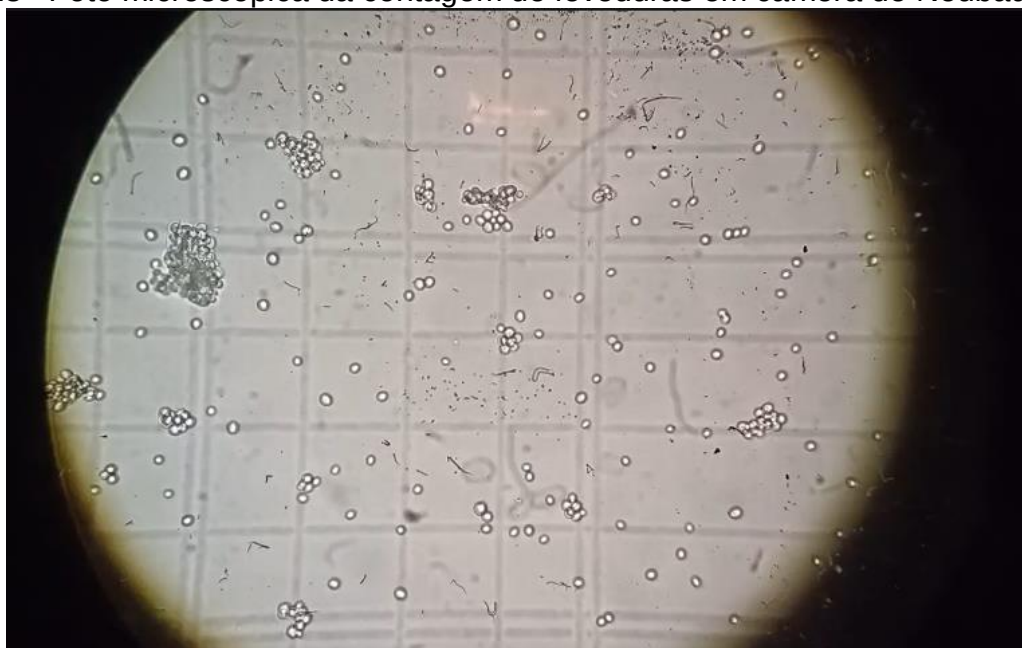
Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Ao analisar a PCA é possível verificar a separação entre os cafés fermentados e não fermentados e ainda uma separação entre o café canephora (conilon) e os dois tipos de café arábica, assim sendo é possível compreender que o processo fermentativo a seco realmente ocorreu e modificou o perfil químico das amostras.

4.2 VIABILIDADE DE CRESCIMENTO DE MICROORGANISMOS EM GRÃOS DE CAFÉ BENEFICIADOS E REHIDRATADOS

A viabilidade de leveduras foi avaliada por coloração com azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer, conforme ilustrado na Figura 14. Após a coloração, a suspensão foi distribuída na câmara e foram contados cinco quadrantes (central e cantos), seguindo o procedimento descrito nos Métodos 3.3.

Figura 13– Foto microscópica da contagem de leveduras em câmara de Neubauer



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Então, observando os 5 quadrantes como descrito anteriormente, foi possível então realizar a contagem de leveduras obtendo então a Tabela 4

Tabela 4– Contagem de leveduras vivas e mortas da câmara de Neubauer

<i>Quadrante</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
<i>vivas</i>	41	44	32	55	46
<i>mortas</i>	0	0	0	0	0

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

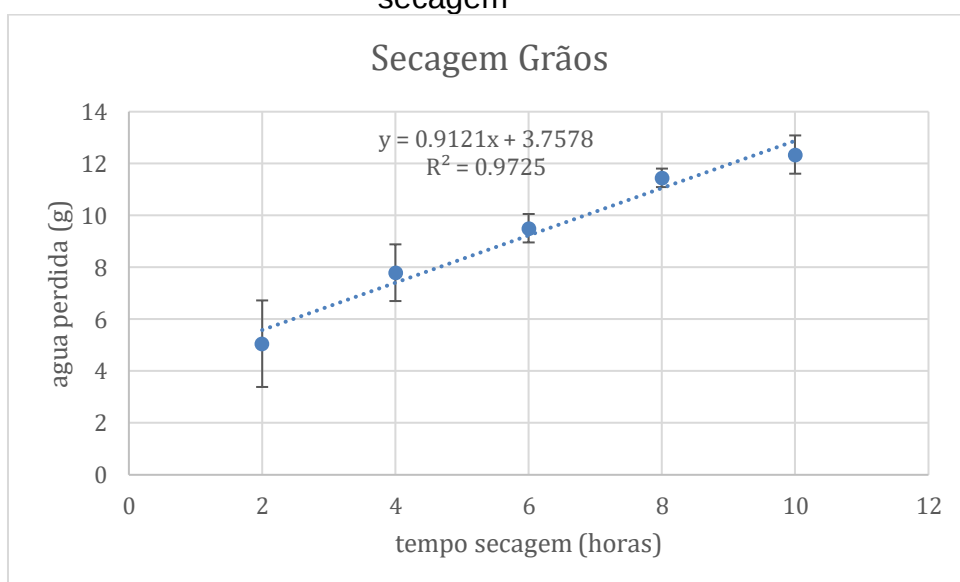
Observou-se ausência de células coradas (mortas) em todos os quadrantes, indicando viabilidade de 100% nas condições avaliadas. Com base nas contagens, a média de leveduras vivas foi de 43,6 células/quadrante (DP ~ 8,3; CV ~ 19%). Esses resultados indicam que os processos fermentativos realizados durante a pesquisa não foram prejudicados devido a leveduras mortas, além de demonstrar a alta viabilidade dela.

4.3 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE SECAGEM DE GRÃOS BENEFICIADOS PÓS-HIDRATAÇÃO INDUZIDA

Após a confirmação da viabilidade do processo de reidratação, três lotes de café foram submetidos à secagem em estufa, com pesagens a cada 2 horas. A curva de secagem exibiu comportamento aproximadamente linear entre 2 e 10 horas, descrito pela equação da Figura 14 ($y = 0,9121x + 3,7578$ - $R^2 = 0,9725$), onde y é a massa de água perdida (g) e x o tempo de secagem (h). A inclinação ($\sim 0,91 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$) indica a taxa média de perda de água no intervalo avaliado.

As estatísticas por tempo reforçam a interpretação do processo. Em 2 h, a média de água perdida foi $5,1 \pm 1,67 \text{ g}$ (Coeficiente de Variação (CV) = 33,01%), revelando alta dispersão inicial entre réplicas, possivelmente devida a heterogeneidade superficial logo após a reidratação. Em 4 h, observa-se $7,8 \pm 1,09 \text{ g}$ (CV = 14,03%), ainda com variabilidade relevante. A partir de 6 h ($9,51 \pm 0,54 \text{ g}$; CV = 5,77%) e 8 h ($11,45 \pm 0,35 \text{ g}$; CV = 3,01%), há convergência acentuada das réplicas e maior padronização do processo. Em 10 h, obtém-se $12,34 \pm 0,74 \text{ g}$ (CV = 5,97%), mantendo boa consistência e sugerindo aproximação a umidade de equilíbrio sob as condições empregadas.

Figura 14- Curva de secagem dos grãos de café de água perdida por tempo de secagem



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

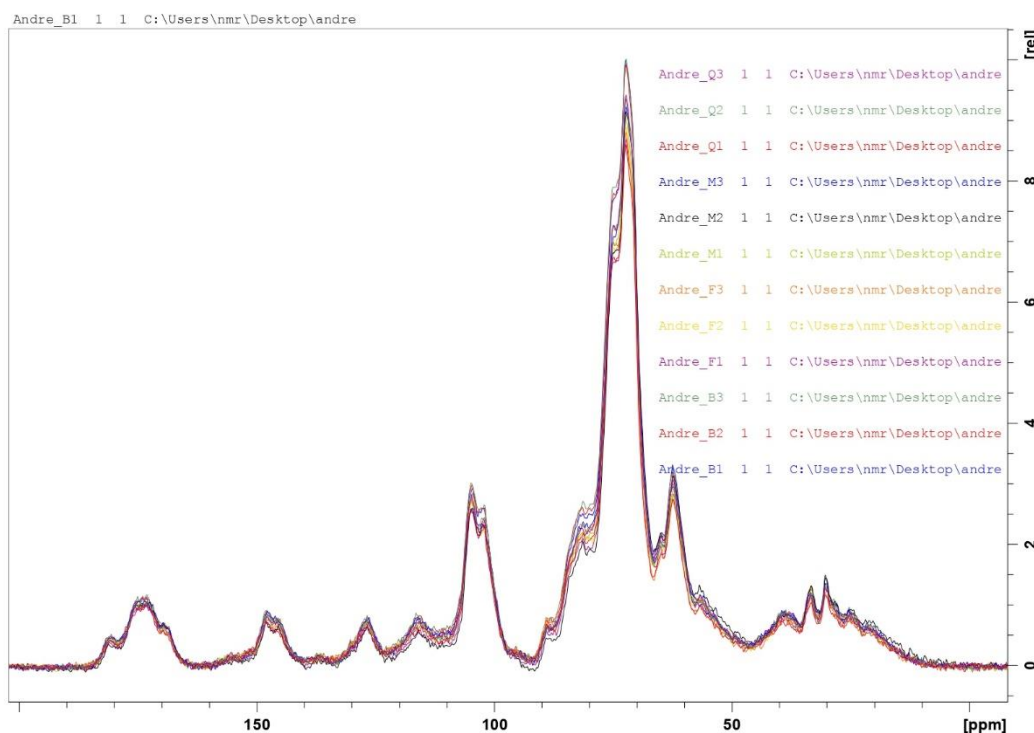
Em conjunto, a linearidade global ($R^2 \sim 0,97$) e a queda progressiva do CV ao longo do tempo indicam que, neste regime, a secagem pode ser modelada

satisfatoriamente por ajuste linear e que a padronização do protocolo (espessura de leito, carga por bandeja, fluxo/renovação de ar) impacta diretamente a reprodutibilidade.

4.4 ESTABILIDADE DOS GRÃOS

Para avaliar se o protocolo de reidratação e secagem altera o perfil químico de grãos beneficiados, foram adquiridos espectros de RMN de estados Sólido de ^{13}C , de 12 amostras 12 correspondendo a 4 condições experimentais em triplicata (B1-B3, F1-F3, M1-M3, Q1-Q3), correspondendo a: B – branco; F – vapor frio; M – vapor de média temperatura; Q – vapor quente. Os espectros foram sobrepostos para inspeção visual comparativa dos perfis químicos, como mostrado na Figura 15.

Figura 15–Espectros de RMN em estado solido ^{13}C sobrepostos



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

A sobreposição revela alta coincidência espectral entre todas as amostras, sem deslocamentos químicos relevantes além da largura de linha típica de sólidos heterogêneos, indicando estabilidade do perfil químico global após os tratamentos. As

principais bandas observadas concentram-se nas regiões esperadas para a matriz de grãos de café:

- **δ 172 – 176 ppm:** região relacionados a grupos carboxílicos, ésteres e amidas, como por exemplo, ácidos clorogênicos, componentes lipídicos oxigenados;
- **δ 150 – 156 ppm:** referente aos grupos aromáticos O-substituídos ou heteroaromáticos como por exemplo a cafeína e outras xantinas;
- **δ 103 – 106 ppm (pico proeminente):** referente aos carbonos anoméricos de polissacarídeos como por exemplo celulose ou hemicelulose e outros polímeros;
- **δ 72 – 76 e 60 – 63 ppm:** pode estar relacionado a carbonos de carboidratos estruturais;
- **δ 30 – 35 e 20 – 25 ppm:** carbonos alifáticos de lipídios cadeias acílicas;

A conservação relativa das intensidades nessas janelas, associada à ausência de novas bandas intensas ou perdas localizadas, sustenta que o ciclo de reidratação e secagem não promoveu degradações detectáveis na escala capturada pelo ^{13}C CP/MAS, preservando a integridade estrutural do grão beneficiado.

4.5 AVALIAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO DE GRÃOS DE CAFÉ BENEFICIADOS EM ESTADO SÓLIDO

Seis lotes de *Coffea canephora* (A–F) foram pesados (massa inicial), reidratados em vaporizador a quente, segundo cinco procedimentos/tempos (Medidas 1–5), fermentados em estado sólido e, ao término, secos por 6 h. Os procedimentos (1–5) correspondem às seguintes combinações de tempo:

- Proc. 1: hidratação 120 min → fermentação 72 h
- Proc. 2: hidratação 180 min → fermentação 72 h
- Proc. 3: hidratação 120 min → fermentação 120 h
- Proc. 4: hidratação 180 min → fermentação 120 h
- Proc. 5: hidratação 150 min → fermentação 96 h

Observação: (Proc. 0 = controle, 0 min / 0 h;)

Tabela 5– Massas iniciais de *c. canephora* beneficiados

Medida	Amostras de café					
	A	B	C	D	E	F
0	20,88	11,34	9,72	11,26	9,98	22,3
1	98,09	98,28	98,19	98,13	98,05	98,18
2	98,22	98,33	98,22	98,18	98,1	98,15
3	98,18	98,11	98,13	98,2	98,23	98,32
4	98,25	98,18	98,15	98,07	98,18	98,11
5	98,23	98,22	98,23	98,11	98,11	98,2

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Tabela 6– Massas de cafés após a hidratação

Medida	A	B	C	D	E	F
1	115,95	109,56	119,85	107,58	111,21	109,45
2	113,14	108,21	116,78	108,12	111,29	106,52
3	106,19	113,12	110,68	118,02	115,4	108,26
4	113,59	110,46	118,15	116,27	117,63	111,27
5	106,09	111,05	103,35	109,12	110,15	111,3

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Tabela 7–Massa de cafés após a secagem dos grãos

Medida	A	B	C	D	E	F
1	101,74	101,09	103,01	98,8	98,95	99,31
2	102,01	99,5	102,9	98,72	101,94	96,74
3	98,49	99,67	99	99	100,06	96,4
4	99,69	99,78	100,18	100,18	99,36	98,9
5	97,65	98,53	95,52	96,81	97,43	97,79

Fonte: elaborada pela próprio autor.

Balanço de massa por amostra (médias de proc. 1–5) mostrou que a reidratação acrescentou, em média, de 11 a 16 g por lote (11% a 16%). A secagem removeu ~ 10 a 14 g (~ 9,7% a 12,0% da massa hidratada). As massas finais ficaram muito próximas das iniciais (Δ final de – 0,37% a +1,98%).

A: 98,19 → 110,99 (+12,80; +13,03%) → 99,92 (-11,08; -9,98%) → Δ +1,72 g (+1,75%);
 B: 98,22 → 110,48 (+12,26; +12,48%) → 99,71 (-10,77; -9,74%) → Δ +1,49 g (+1,52%);
 C: 98,18 → 113,76 (+15,58; +15,87%) → 100,12 (-13,64; -11,99%) → Δ +1,94 g (+1,98%);
 D: 98,14 → 111,82 (+13,68; +13,94%) → 98,70 (-13,12; -11,73%) → Δ +0,56 g (+0,57%);
 E: 98,13 → 113,14 (+15,00; +15,29%) → 99,55 (-13,59; -12,01%) → Δ +1,41 g (+1,44%);
 F: 98,19 → 109,36 (+11,17; +11,37%) → 97,83 (-11,53; -10,54%) → Δ -0,36 g (-0,37%);

O efeito do procedimento (medidas de tempo 1 a 5) mostrou um ganho médio entre as medidas de A–F. Houve um ganho de hidratação (g): 14,11 (P1/120 min); 12,48 (P2/180 min); 13,75 (P3/120 min); 16,40 (P4/180 min); 10,33 (P5/150 min).

Na perda na secagem (g e % da massa hidratada) observamos: 11,78 e 10,41% (P1/72 h); 10,38 e 9,34% (P2/72 h); 13,18 e 11,68% (P3/120 h); 14,88 e 12,93% (P4/120 h); 11,22 e 10,30% (P5/96 h).

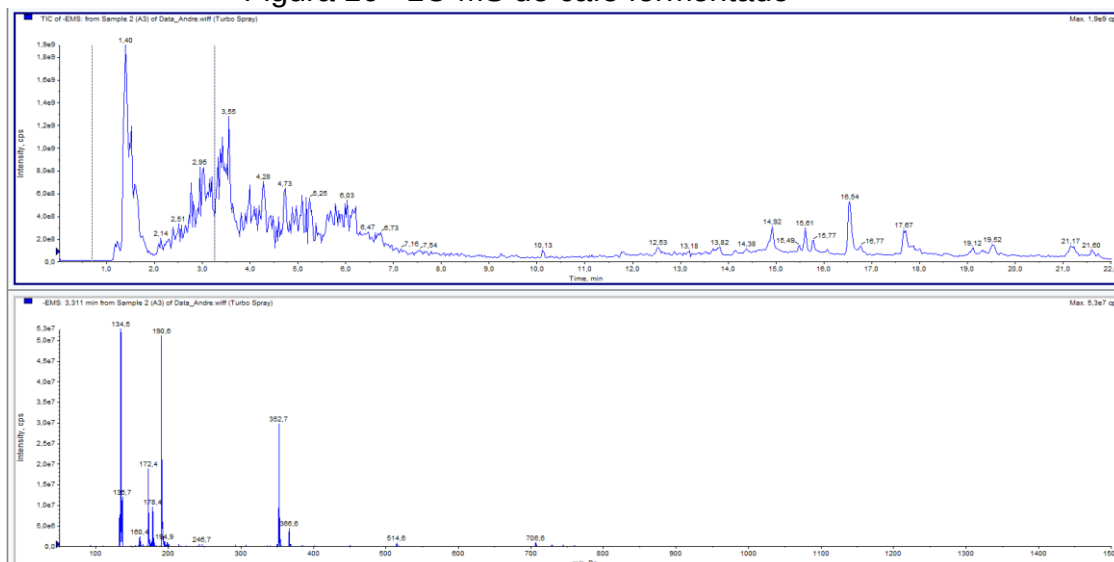
Quanto a reprodutibilidade pós-secagem (CV da massa seca entre A–F) foi observado: 1,72% (P1); 2,37% (P2); 1,30% (P3); 0,50% (P4); 1,06% (P5), o que revela uma baixa dispersão final em todas as combinações de tempo. Em relação a eficiência de secagem (perda/ganho): 0,85 (P1); 0,87 (P2); 0,97 (P3); 0,91 (P4); 1,13 (P5), procedimentos com fermentação mais longa (120 h) tendem a maior remoção absoluta (P3 – P4). O P5 (96 h / hidratação 150 min) apresentou eficiência >100%, coerente com a condição operacional em que P5 foi seco isoladamente, favorecendo transferência de calor/massa (leito mais fino/carga menor).

Com relação a cinética de secagem (comum aos procedimentos), a relação água perdida (g) vs. tempo de secagem (h) foi linear entre 2 – 10 h com a equação de $y = 0,9121x + 3,7578$ gerando um coeficiente de determinação (R^2) de 0,8773 e uma taxa média de cerca de 0,91 g.h⁻¹. O coeficiente de variação por tempo foi de 38,19% (2 h) → 22,63% (4 h) → 5,95% (6 h) → 1,90% (8 h) → 7,76% (10 h). A variabilidade cai acentuadamente após 6 h, indicando padronização do processo na aproximação da umidade de equilíbrio.

Após a secagem dos grãos, seus metabolitos foram extraídos e levados para análise por HPLC-MS onde foram obtidos espectros como os indicados nas Figuras 16 a 18. Os *Total Ion Chromatograms* (TIC) em modo negativo (ESI⁻) mostram três janelas relevantes: 1,2 – 6,5 min (constituintes mais polares com picos em ~1,3 – 4,5 min com íons com relação massa-carga 134 – 135, 172 – 173, 190 – 191, 350 – 365), 10 – 12,5 min (intermediários; picos discretos), 14,5 – 18 min e > 18 min (menos

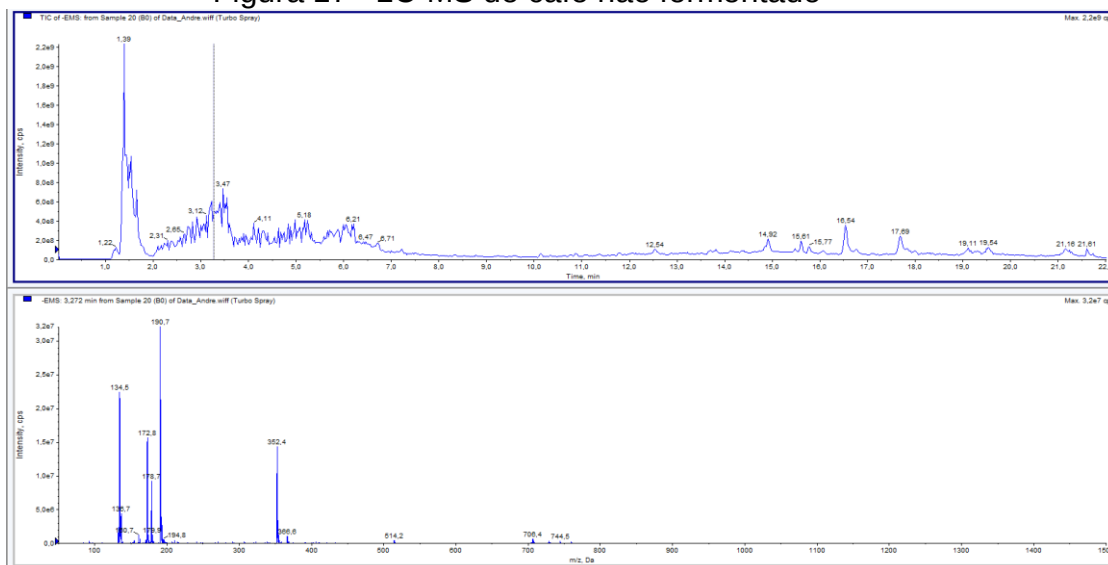
polares). Observou-se maior intensidade entre 12 – 20 min em uma das amostras, sugerindo incremento de compostos menos polares sob determinada combinação de tempos.

Figura 16– LC-MS de café fermentado



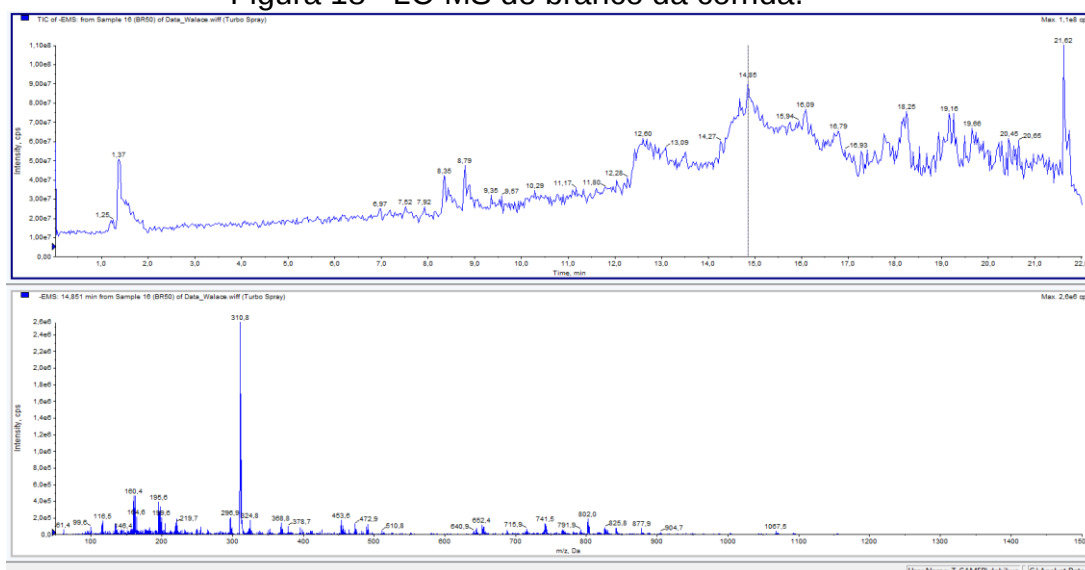
Fonte: elaborada pela próprio autor.

Figura 17– LC-MS de café não fermentado



Fonte: elaborada pela próprio autor.

Figura 18– LC-MS de branco da corrida.



Fonte: elaborada pela próprio autor.

Os perfis de LC-MS confirmam diferenças entre amostras fermentadas e não fermentadas. Nas fermentadas observam-se maior densidade de picos e o surgimento de sinais adicionais, sobretudo nas janelas de retenção de 1,2 a 6,5 min e 14,5 a 18min, ausentes ou menos intensos nas amostras não fermentadas. O branco de extração (metanol + padrão interno – ácido ascórbico) exibiu apenas sinais esperados, reforçando que as diferenças observadas são decorrentes do processo de fermentação e não artefatos analíticos.

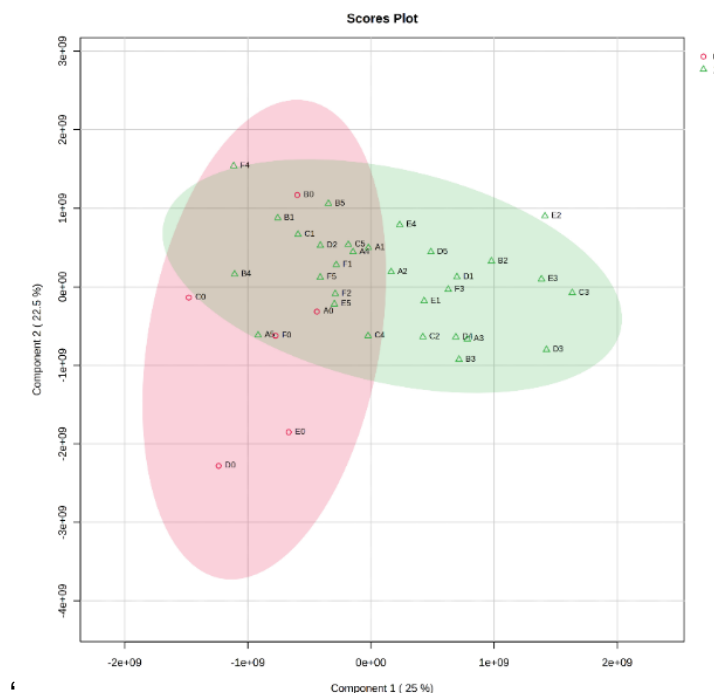
Para organizar e interpretar o conjunto, os dados por LC-MS foram processados no MS-DIAL (detecção de picos, deconvolução e alinhamento RT- m/z), aplicando-se filtro baseado em branco e remoção de isótopos, adutos e duplicatas. Em seguida, a matriz de *features* foi importada no MetaboAnalyst, com normalização (por intensidade global) e inspeções de qualidade. A partir desse processamento, aplicou-se a análise de componentes principais (PCA).

A PCA resultante (Figuras 19 e 20) evidencia o agrupamento das amostras por condição de tratamento (estado de fermentação) e gradiente temporal entre os diferentes tempos de fermentação (72, 96 e 120 h), indicando uma modulação sistemática do metaboloma.

Na Figura 19 (PC1 25%, PC2 22,5% e variância explicada ~ 47,5%) mostra separação parcial entre não fermentados (0) e fermentados (1), sobretudo ao longo de PC1. A região de sobreposição indica um metaboloma basal compartilhado,

enquanto o deslocamento do grupo fermentado para valores mais positivos de PC1 é consistente com o surgimento/elevação de metabólitos nas janelas cromatográficas já destacadas (1,2–6,5; 10–12,5; 14,5–18 min). Em suma, há evidência clara de modulação química associada ao processo fermentativo, embora nem todo o espaço amostral seja completamente.

Figura 19—PCA dados LC-MS com cafés fermentados e crus

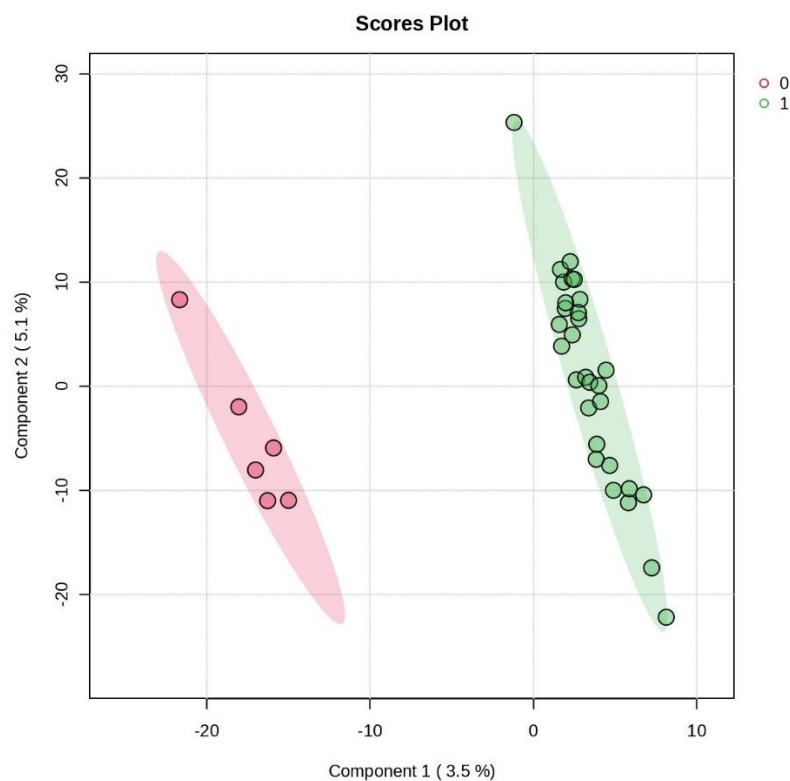


Fonte: elaborada pela próprio autor.

Na PCA envolvendo os diferentes tempos de fermentação (72, 96 e 120 h) com PC1 37%, PC2 12,5% e variância ~ 49,5%. Observa-se que: (i) 96 h (símbolos “+”) forma o cluster mais compacto, com menor dispersão intra-grupo (elipse estreita, centrada em PC1 ligeiramente positivo), sugerindo maior consistência química entre réplicas; (ii) 72 h (triângulos) exhibe dispersão intermediária; (iii) 120 h (círculos) apresenta elipse mais ampla ao longo de PC1, indicando maior variabilidade entre amostras nessa condição.

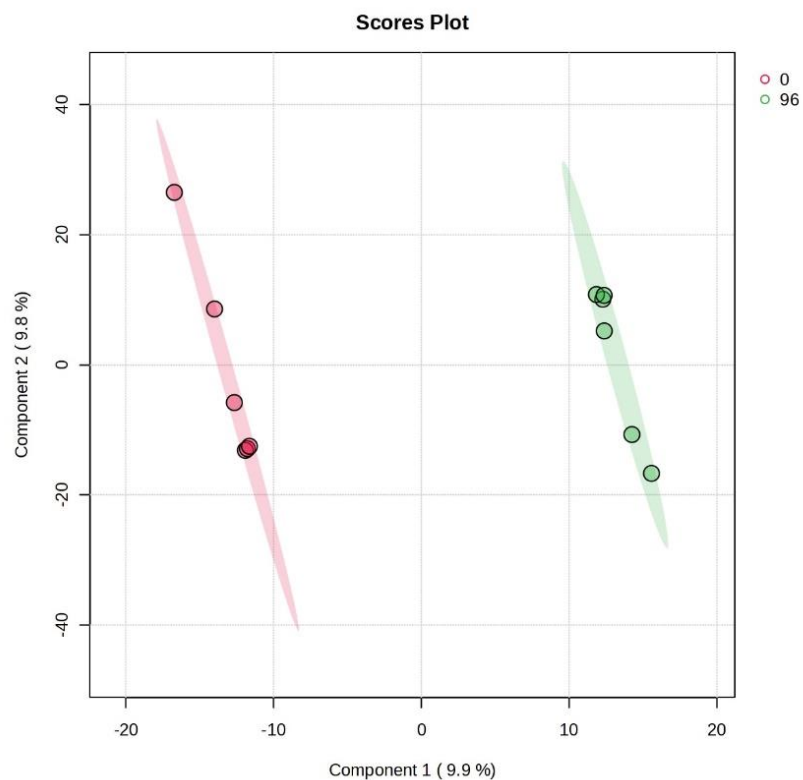
Esses padrões apontam para um gradiente temporal na composição química: o aumento do tempo amplia a magnitude da modulação (PC1) mas pode elevar a variabilidade (120 h), ao passo que 96 h se destaca por equilíbrio entre mudança de perfil e reprodutibilidade.

Figura 21- PLS-DA comparação de fermentado e não fermentado



Fonte: elaborada pela próprio autor.

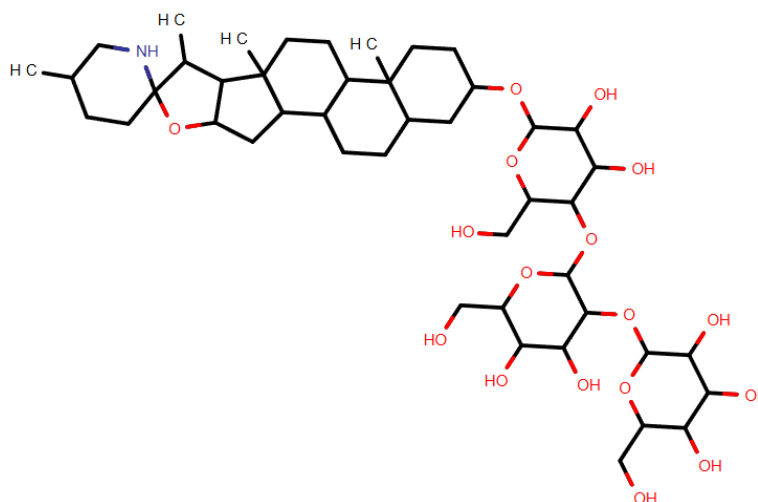
Figura 22- PLS-DA comparação de fermentado 96h e não fermentado



Fonte: elaborada pela próprio autor.

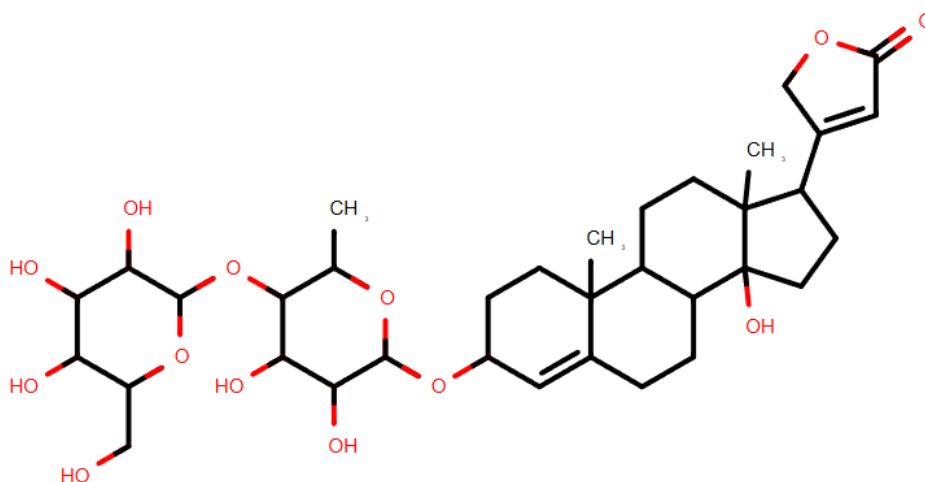
A triagem por VIP-scores dos modelos priorizou *features* (pares RT-m/z) responsáveis pela separação, que foram anotadas putativamente (nível MSI 3 ou 4) a partir de bases de dados, resultando nos candidatos ilustrados nas Figuras 23 a 27: β 1-tomatidina (glicoesterol/esteroidal glicosilado), folato poliglutamilado, canarigenina 3-[glicosil-(1 $\rightarrow$ 4)-6-desoxi-alosídeo] (flavonoide glicosilado), ciclosquamosina F (peptídeo/macrociclo) e (S)-NADHX. Dado o modo de aquisição (LC-MS sem alta resolução), estes rótulos devem ser entendidos como indicadores de classe química; a confirmação em nível MSI 2 ou 1 requer MS/MS dirigido e, quando possível, padrões autênticos.

Figura 23- Estrutura química 1 anotada da PLS-DA



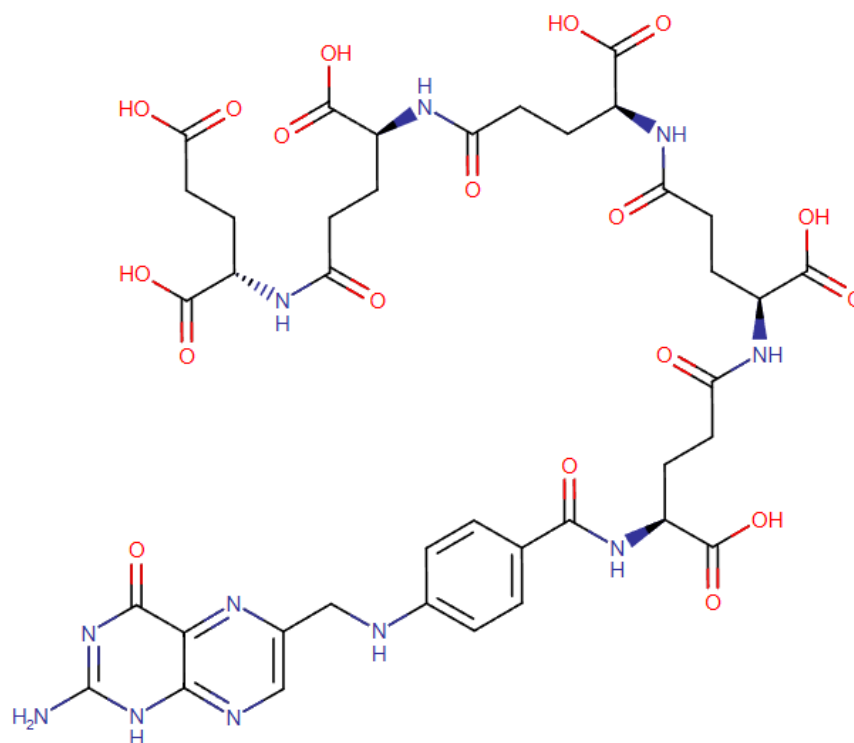
Fonte: elaborada pela próprio autor.

Figura 24- Estrutura química 2 anotada da PLS-DA



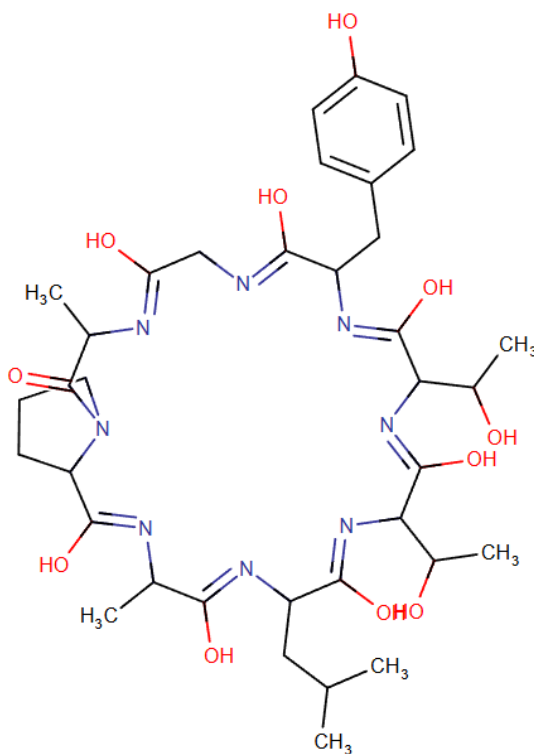
Fonte: elaborada pela próprio autor.

Figura 25- Estrutura química 3 anotada da PLS-DA



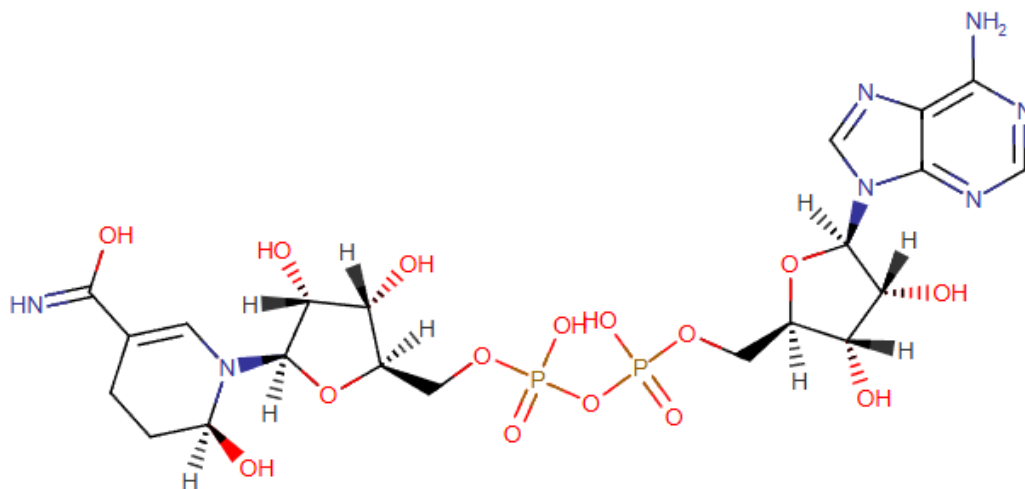
Fonte: elaborada pela próprio autor.

Figura 26- Estrutura química 4 anotada da PLS-DA



Fonte: elaborada pela próprio autor.

Figura 27- Estrutura química 5 anotada da PLS-DA



Fonte: elaborada pela próprio autor.

A relação bioquímica dos metabólitos encontrados e a presença de produtos fermentados pela *Saccharomyces cerevisiae*, mostra alguns grupos fenólicos, flavonoides glicosilados (p.ex., canarigenina-glicosídeo) que podem estar associados a β -glicosidases/esterases, promovendo deglicosilações e rearranjos (incluindo lactonas de ácidos clorogênicos), o que explica features VIP nas janelas de retenção iniciais (1,2–6,5 e 10–12,5 min) observadas nos TICs.

A presença de esteróis glicosilados como tomatidina pode estar associado a remodelação de sua membrana durante a fermentação (síntese/turnover de ergosterol, esteril-glicosídeos e acil-esteril-glicosídeos). Autólise ou liberação desses conjugados aumenta sinais em regiões menos polares (14,5–18 min), compatíveis com o padrão cromatográfico visto.

Os folatos poliglutamilados podem estar presentes em *S. cerevisiae* na sua forma poliglutamilada (via FPGS) sugerindo metabolismo anabólico ativo durante a fermentação. O (S)-NADHX deve estar relacionado ao produto de hidratação anômala de NADH sob estresse redox/energético. A levedura possui enzimas de reparo (epimerase/deidratase). A presença de NADHX é um marcador funcional de atividade fermentativa e de balanço NADH/NAD⁺ alterado.

Em relação aos peptídeos ou macrociclos como é a ciclosquamosina, embora a *S. cerevisiae* não seja produtora típica de NRPS macro-cíclicos, DKPs e peptídeos pequenos, eles são comuns em fermentações e podem gerar features VIP com esse padrão.

As PLS-DA confirmam que a fermentação por *S. cerevisiae* modula o metaboloma de grãos beneficiados reidratados e que 96 h produz um perfil mais consistente. Os VIPs apontam para transformações de fenólicos glicosilados, remodelagem de esteróis de membrana, ativação de rotas e ajustes redox, um conjunto mecanisticamente coerente com a biologia da levedura.

5 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que o fluxo reidratação → fermentação em estado sólido → secagem é tecnicamente padronizável para grãos beneficiados de *C. canephora*. A cinética de secagem apresentou comportamento aproximadamente linear no intervalo observado ($y = 0,9121 \cdot x + 3,7578$; $R^2 = 0,9725$), com queda acentuada da dispersão após 6 h (CV de 33% → 3% entre 2 – 8 h), e massas finais muito próximas das iniciais (Δ de – 0,37% a + 1,98%). A RMN de ^{13}C CPMAS indicou estabilidade do perfil químico a granel após reidratação e secagem, sugerindo ausência de danos qualitativos ao material. No nível molecular, os dados de LC-MS evidenciaram modulação do metaboloma induzida pela fermentação, com separação multivariada entre não fermentados e fermentados (PCA/PLS-DA) e maior consistência química nas amostras fermentadas por 96 h (clusters mais compactos). Os VIP-scores apontaram classes compatíveis com a bioquímica de *Saccharomyces cerevisiae* indicando grupos fenólicos glicosilados, esteróis glicosilados, folatos poliglutamilados, (S)-NADHX e sinais peptídicos, trazendo luz para possíveis mecanismos envolvidos no processo de fermentação.

De modo geral, este trabalho demonstrou a viabilidade de um protocolo de fermentação para grãos beneficiados que preserva a integridade durante a hidratação e secagem e alterando de forma controlada o perfil químico nas etapas fermentativas, com ênfase para o tempo de 96 h como ponto operacional para a padronização.

6- PERSPECTIVAS FUTURAS

Ademais, entende-se que para análises futuras é necessário realizar a análise sensorial dos cafés fermentados e comparar a nota obtida por *Q-graders* a fim de maior compreensão sobre a variabilidade sensorial e padronização das notas, além de realizar processos fermentativos com novas leveduras e substratos, para a maior compreensão do processo e obtenção de novos processos padronizados.

REFERÊNCIAS

- 1 Brasil é o maior produtor mundial e o segundo maior consumidor de café. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/brasil-e-o-maior-produtor-mundial-e-o-segundo-maior-consumidor-de-cafe>>.
- 2 Boletim da Safra de Café — Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<https://www.gov.br/conab/pt-br/atuacao/informacoes-agropecuarias/safras/safra-de-cafe/safra-de-cafe-1>>.
- 3 Safra 2025: Primeira estimativa para a produção brasileira de café é de 51,8 milhões de sacas. Disponível em: <<https://www.gov.br/conab/pt-br/assuntos/noticias/safra-2025-primeira-estimativa-para-a-producao-brasileira-de-cafe-e-de-51-8-milhoes-de-sacas>>. Acesso em: 20 out. 2025.
- 4 Conheça os principais tipos de grãos de café cultivados no Brasil. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/conheca-os-principais-tipos-de-graos-de-cafe-cultivado-no-brasil>>.
- 5 DELLA PERUTA, R. et al. Projecting trends of arabica coffee yield under climate change: A process-based modelling study at continental scale. *Agricultural Systems*, v. 227, p. 104353, 19 abr. 2025.
- 6 DIAS, C. G.; MARTINS, F. B.; MARTINS, M. A. Climate risks and vulnerabilities of the Arabica coffee in Brazil under current and future climates considering new CMIP6 models. *Science of The Total Environment*, v. 907, p. 167753, 10 jan. 2024.
- 7 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, set. 2015.
- 8 NELSON, David L.; COX, Michael M.; HOSKINS, Aaron A. Princípios de bioquímica de Lehninger. V.1. 8. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2022. E-book. p.529. ISBN 9786558820703. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9786558820703/>. Acesso em: 20 out. 2025.

- 9 PARKER, N. et al. MICROBIOLOGY. Disponível em: <<https://openstax.org/details/books/microbiology>>.
- 10 MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; BENDER, Kelly S.; et al. Microbiologia de Brock. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016. E-book. p.11. ISBN 9788582712986. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788582712986/>. Acesso em: 20 out. 2025.
- 11 FARAG, M. A. et al. Metabolomics-Based Approach for Coffee Beverage Improvement in the Context of Processing, Brewing Methods, and Quality Attributes. **Foods**, v. 11, n. 6, p. 864, 18 mar. 2022.
- 12 SILVA et al. Plant Sample Preparation for Metabolomics, Lipidomics, Ionomics, Fluxomics, and Peptidomics. **Separations**, v. 12, n. 2, p. 21–21, 24 jan. 2025.
- 13 PILON, A. et al. METABOLÔMICA DE PLANTAS: MÉTODOS E DESAFIOS. **Química Nova**, 2020.
- 14 MARKOS, M. U. et al. Metabolomics: A suitable foodomics approach to the geographical origin traceability of Ethiopian Arabica specialty coffees. **Food Science & Nutrition**, v. 11, n. 8, p. 4419–4431, 24 maio 2023.
- 15 BERNARDES, P. C. et al. Microbial ecology and fermentation of *Coffea canephora*. **Frontiers in Food Science and Technology**, v. 4, 5 abr. 2024.