

AVALIAÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO DE CAFÉS EM DIFERENTES TRATAMENTOS PÓS-COLHEITA POR CG-MS E QUIMIOMETRIA

Evandro Messias¹(PG), Cleidiana Vieira Guimarães²(PG), Ellisson Henrique de Paulo^{1,3}(PG), Márcia Helena Cassago Nascimento²(PQ), Marco Flôres Ferrão³(PQ), Lucas Louzada Pereira²(PQ), Paulo Roberto Filgueiras²(PQ).

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, Vitória, ES, Brasil, evandroqt@gmail.com, marcia.cassago@gmail.com, paulo.filgueiras@ufes.br.

²Instituto Federal do Espírito Santo, Avenida Elizabeth Minete Perim, Venda Nova do Imigrante, ES, Brasil, cleidi99guimaraes@gmail.com, lucaslozada@hotmail.com.

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, Porto Alegre, RS, Brasil, ellisson.hp@gmail.com, mfferrao@gmail.com.

Resumo

Este trabalho buscou investigar a correlação entre os tempos de fermentação de *Coffea Canephora* que foram submetidos a diferentes processos de embebição, com o objetivo de identificar as mudanças químicas que ocorrem durante as diferentes rotinas de fermentação e o impacto dessas mudanças na qualidade final da bebida. Para isso, combinou-se técnica analítica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) com os métodos quimiométricos: análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*, PCA) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares for Discriminant Analysis*, PLS-DA). Os modelos PLS-DA apresentam exatidão do grupo de treinamento igual a 93% e 98% e exatidão dos conjuntos de testes de 80% e 100% para 1º e 2º teste, respectivamente. Os resultados mostraram que os modelos PCA e PLS-DA foram capazes de distinguir o comportamento das amostras pelos tempos de embebição dos diferentes processos de fermentação realizados durante o processo de pós-colheita de cafés *Coffea Canephora*.

Palavras-chave: Café. Fermentação. GC-MS. Quimiometria.

Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra.

Introdução

A busca por cafés de qualidade tem levado a pesquisas utilizando diferentes metodologias de processamento pós-colheita, principalmente com a introdução de novas tecnologias de fermentação, como a maceração carbônica e a utilização de microrganismos endógenos dos grãos de café ou ainda fermentação induzida por microrganismos inoculados nos frutos (BRIOSCHI JUNIOR *et al.*, 2020). Ambas as formas de fermentações alteram a composição química dos grãos de café devido, principalmente, à produção de enzimas que contribuem para degradação de mucilagem, lignina, celulose, pectinases e cafeínas (PEREIRA, 2015).

Diferentes estudos têm sido conduzidos para identificar as mudanças no perfil químico que ocorrem durante as diversas rotinas de fermentação de cafés e o impacto das mesmas na qualidade final da bebida (EVANGELISTA *et al.*, 2014). O avanço das técnicas analíticas como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e a disponibilidade de recursos computacionais para a análise de grandes conjuntos de dados têm possibilitado a interpretação química e a compreensão científica da caracterização da qualidade do café (FIORESI *et al.*, 2020).

Entre os métodos quimiométricos geralmente aplicados ao estudo de qualidade de cafés, a análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*, PCA), juntamente como a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares for Discriminant Analysis*, PLS-

DA) correspondem aos mais empregados em trabalhos envolvendo o estudo do perfil químico do café fermentado (BRESSANELLO *et al.*, 2019). Neste estudo, as análises multivariadas PCA e PLS-DA foram associadas a dados cromatográficos obtidos por GC-MS para fornecer informações químicas importantes na discriminação das amostras pelos tempos de fermentação e tipos de processamento pós-colheita de cafés.

Metodologia

Neste estudo experimental, 64 amostras de café conilon oriundas do estado do Espírito Santo foram utilizadas. A análise cromatográfica foi realizada usando um cromatógrafo a gás com detecção por espectrometria de massas (GC-MS) da (Shimadzu, Japão), modelo CGMS-QP2020 NX. A análise cromatográfica consistiu em uma corrida de 2,5 a 37,9 min para cada amostra. O processamento dos dados do GC-MS foi realizado utilizando o software Labsolutions (solução GC-MS 68 versão 4.20). Foram identificadas as áreas relativas a 95 diferentes compostos. A análise de dados foi realizada no software MATLAB® versão R2024A (The Mathworks. Natick, EUA). A matriz de dados consistiu em 64 amostras versus 95 variáveis. Para o modelo de classificação PLS-DA, o algoritmo Kennard-Stone foi utilizado para separar as amostras em treinamento (70%) e teste (30%) (KENNARD & STONE, 1969). Para uma primeira análise, criou-se os vetores classe com os tempos de fermentação (24h, 64h, 120h e 144h) atribuindo-se os valores de 1 a 4 para as amostras fermentadas e 5 a 8 para as amostras germinadas com a reutilização do mosto. Um segundo modelo foi gerado com o vetor classe atribuído conforme fermentação, sendo classe 1 as amostras fermentadas e classe 2 as amostras germinadas com a reutilização do mosto.

Os cromatogramas foram pré-processados com autoescalamento e variação normal padrão (SNV) antes da construção dos modelos quimiométricos. Os modelos PCA e PLS-DA foram construídos utilizando-se as interfaces *PCA toolbox* e *Classification toolbox* versão 7.0, respectivamente (BALLABIO *et al.*, 2013). Para a PCA, diferentes componentes principais (PCs) de 1 a 10 foram testadas. Para os modelos PLS-DA foram otimizados pelo número de variáveis latentes (VLs) que gerou o modelo com o menor erro. Os modelos PLS-DA foram avaliados quanto a sensibilidade (Sen), especificidade (Esp), precisão (Pre) e exatidão (Exa), que estão apresentados, respectivamente, nas equações 1 a 4. Os valores VP, VN, FP e FN representam o conjunto de amostras classificadas como verdadeiro positivo (VP), verdadeiro negativo (VN), falso positivo (FP) e falso negativo (FN), respectivamente (OLIVIERI *et al.*, 2014).

$$Sen = \frac{VP}{VP+FN} \quad \text{Equação 1}$$

$$Esp = \frac{VN}{FP+VN} \quad \text{Equação 2}$$

$$Exa = \frac{VP+VN}{VP+FN+FP+VN} \quad \text{Equação 3}$$

$$Pre = \frac{VP}{VP+FP} \quad \text{Equação 4}$$

Resultados

Os cromatogramas brutos não alinhados e alinhados podem ser vistos na **Figura 1(a)** e o **Figura 1(b)**, respectivamente. A **Figura 2** mostra os scores e os loadings do modelo PCA para o modelo em função dos diferentes tempos (1º modelo/análise), onde é possível visualizar a distribuição das amostras nos eixos das componentes PC1 e PC2. As amostras de cafés com a reutilização do mosto ficaram praticamente isoladas pela PC2, com exceção de apenas uma amostra. Quanto às amostras fermentadas sem a reutilização do mosto, a maioria se dispersou no quadrante da PC2, porém com três amostras da classe 1 (24h), uma da classe 2 (64h) e duas da classe 4 (144h). Na **Figura 2**, também é possível identificar a formação de pequenos agrupamentos entre amostras pertencentes a uma mesma classe. Além disso, as amostras de 24h e 64h de cafés com a reutilização do mosto formaram um grupo entre si, enquanto as amostras das demais classes se dispersaram no espaço com pequenas variações.

A **Figura 3** traz os resultados obtidos pelo modelo PCA para o modelo com base na fermentação (2º modelo/análise), no qual, os scores e loadings identificam a formação de dois grupos de amostras,

sendo um fermentadas sem a reutilização do mosto (classe 1) e o outro com a reutilização do mosto (classe 2). O modelo PLS-DA para esta análise em função da fermentação está apresentado na **Figura 4**. Através dos *scores* é possível ver como as amostras se comportam entre as classes. A **Figura 4(a)** representa os *scores* para a classe 1 (24h AM). Nela, pode-se observar a sequência de agrupamento das amostras de cada classe, desde a classe 2 à classe 8, tanto para o conjunto treinamento, quanto para o conjunto de teste. Neste gráfico, apenas uma amostra da classe 2 (64h) de café fermentado sem a reutilização do mosto no conjunto treinamento e duas amostras da classe 2 (64h) do mesmo delineamento e classe 6 (64h) do café fermentado com a reutilização do mosto no conjunto de teste foram incorretamente classificadas. O Gráfico de *loadings* deste modelo está apresentado na **Figura 4(b)**. Nele, é possível visualizar a importância que as variáveis tiveram na modelagem pelo PLS-DA. Através do gráfico é possível identificar que os 21º compostos somados ao 45º, 65º e o 89º compostos tiveram influência positiva na separação das classes, enquanto as variáveis acima de 21, 41, 59 e 61 tiveram influência inversa no modelo PLS-DA. Os resultados estatísticos para este modelo estão na **Tabela 1**, na qual, a sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão para a classe 1 no treinamento foram de 100%. Já o conjunto de teste apresentou métricas de sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão iguais a 100%, 78%, 33% e 80% respectivamente para a classe 1.

Tabela 1. Resultados dos modelos PLS-DA para os modelo 1 e 2.

Modelo	Conjunto	Sensibilidade	Especificidade	Precisão	Exatidão
PLS-DA – Modelo 1	Treinamento	100%	100%	100%	93%
	Teste	100%	78%	33%	80%
PLS-DA – Modelo 2	Treinamento	95%	100%	100%	98%
	Teste	100%	100%	100%	100%

Fonte: Os autores.

A **Figura 5(a)** representa os *scores* do modelo PLS-DA para o 2º modelo, no qual, as amostras foram classificadas com e sem a reutilização do mosto originado no processo fermentativo. Apenas uma amostra do café fermentado sem a reutilização do mosto foi incorretamente atribuída como pertencente ao café fermentado com a reutilização do mosto no conjunto de treinamento. Quanto ao conjunto de teste, todas as amostras foram corretamente atribuídas à classe as quais realmente pertencem. O modelo apresentou resultados de sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão para o treinamento iguais a 95%, 100%, 100% e 98%, respectivamente (**Tabela 1**). Para o conjunto de teste, estes resultados foram iguais a 100% em todos os casos. O gráfico de *loadings* na **Figura 5(b)** mostra as variáveis mais importantes na separação. Nele, é possível identificar que a variável 3-Metil-butano, seguida das variáveis 2-Furano, 5-metil, 2(5H)-Furano e a 2,5-Dimetil-pirazina influenciam positivamente, enquanto a 2,3-Pentano-diona, 2,3-Hexano-diona, 2,3-Butano-diona, 2,6-Dimetil-pirazina, 2,5-Furano-diona e 2-Ácido-butanóico , 3-metil influenciam negativamente na separação dos cafés.

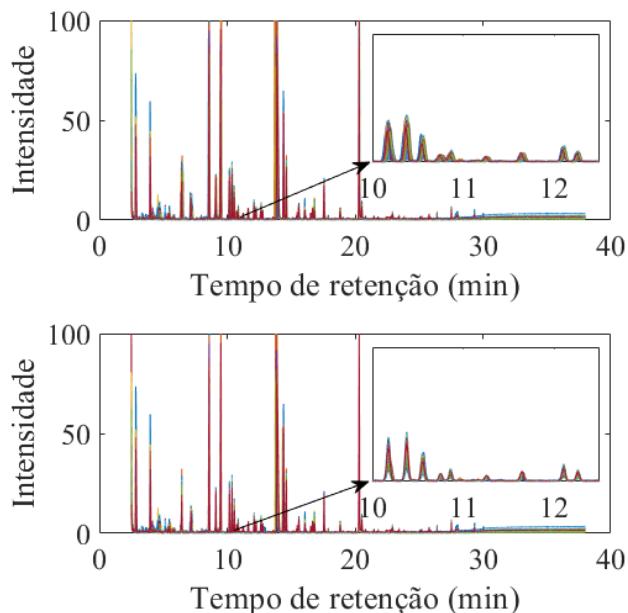


Figura 1 – Cromatogramas completos sem alinhamento (a) e com alinhamento (b) pelo algoritmo *icoshift*.
Fonte: Os autores.

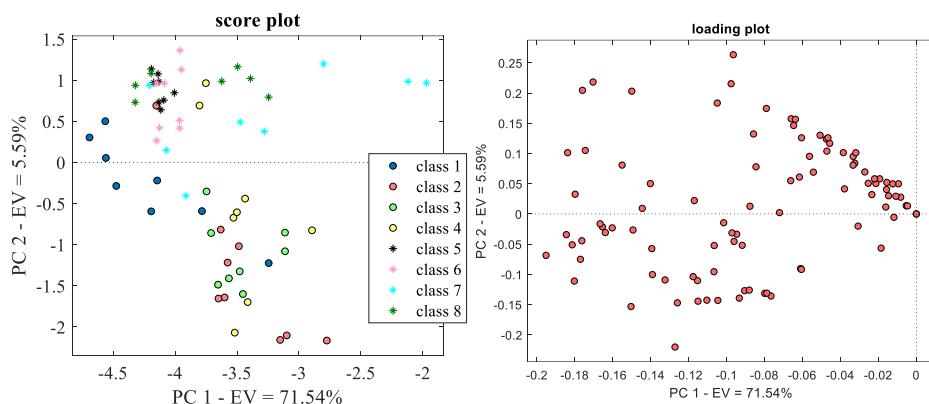


Figura 2 – Modelo PCA para o primeiro teste.
Fonte: Os autores.

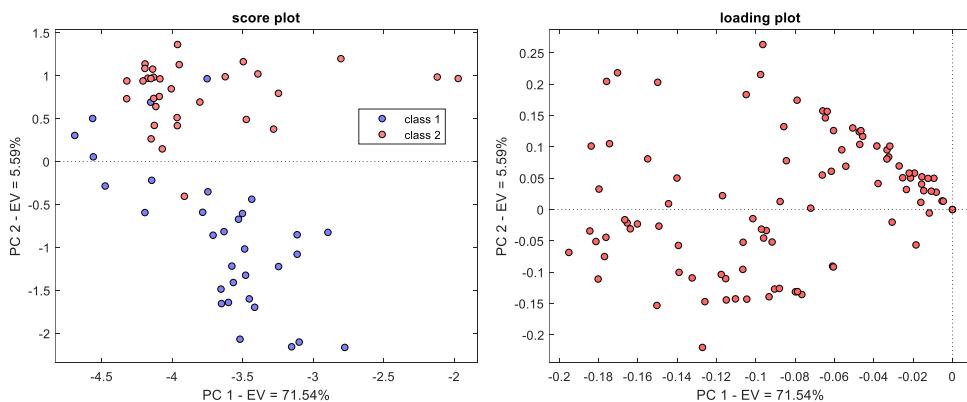
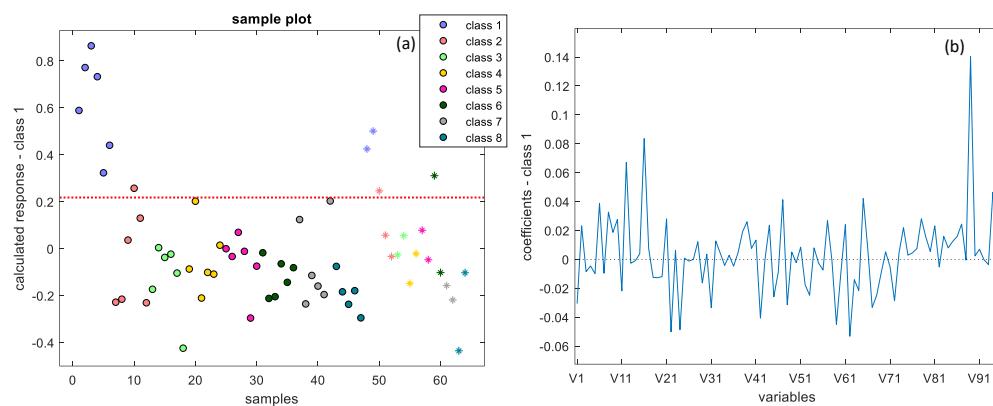
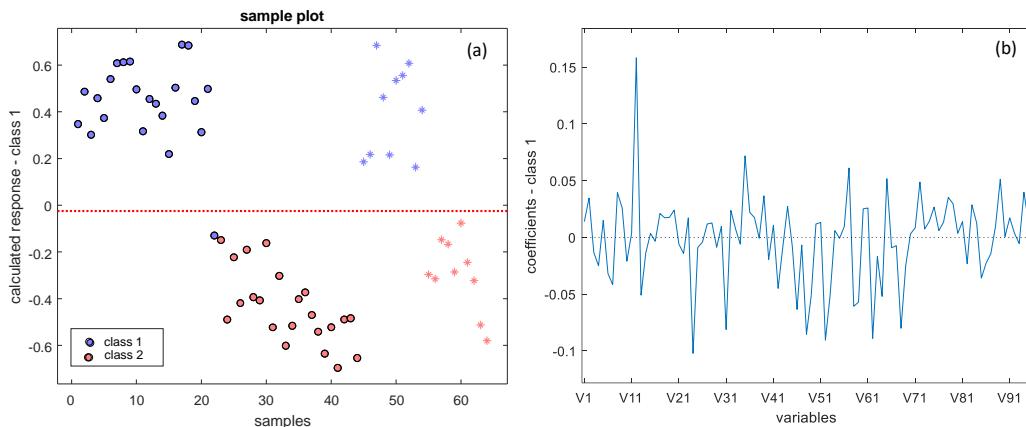


Figura 3 – Modelo PCA para o segundo teste.
Fonte: Os autores.



**Figura 4 – Modelo PLS-DA para o primeiro teste.
Fonte: Os autores.**



**Figura 5 – Modelo PLS-DA para o segundo teste.
Fonte: Os autores.**

Discussão

Percebe-se que os tempos de fermentação de 64h, 120h e 144h sem reutilização do mosto produzem amostras semelhantes entre si, se comparadas às amostras com tempo de fermentação de 24h para o mesmo delineamento. O resultado sugere que os processos metabólicos gerados durante a fase de fermentação quando aplicados com maiores intervalos resultou na alteração química dos cafés (Lee *et al.*, 2015). Possivelmente, os metabólitos gerados não obtiveram efeitos significativos no intervalo de 24h de fermentação. Os resultados do modelo PCA do 2º teste corroboram com os resultados obtidos no 1º teste. O modelo permite visualizar de forma clara a diferença entre os cafés fermentados sem reaproveitamento do mosto e germinados com o reaproveitamento do mosto através dos resultados obtidos da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Os modelos PLS-DA apresentaram métricas elevadas, porém, deve-se ressaltar que a quantidade de amostras presentes em cada classe no teste 1 foi relativamente baixa. Contudo, é possível perceber o ajuste do modelo para agrupar as amostras de cada tempo de fermentação em um grupo individual. Quanto ao modelo 2, a quantidade de amostras nas classes 1 e 2 é elevada e isso se refletiu nas métricas finais. O modelo PLS-DA é capaz de discriminar amostras com e sem mosto.

Conclusão

Neste estudo, os modelos PCA e PLS-DA podem ser usados para verificar o comportamento das amostras pelos tempos de fermentação e tipos de processamento pós-colheita de cafés. Os testes das PCAs mostram a separação entre os cafés fermentados sem e com o reaproveitamento do mosto de fermentação. A maioria das amostras com os tempos de fermentação 64h, 120h e 144h sem o reaproveitamento do mosto formam grupos distintos das amostras de fermentação 24h e 64h de fermentação com a reutilização do mosto. Apenas cinco amostras de cafés sem a reutilização do mosto e um com reaproveitamento do mosto foram discriminadas incorretamente pela PCA. Os modelos PLS-DA apresentam exatidão do grupo de treinamento igual a 93% e 98% para 1º e 2º teste, respectivamente e exatidão dos conjuntos de testes de 80% e 100% para os mesmos testes.

Referências

- BRIOSCHI JUNIOR, Dério et al. Microbial fermentation affects sensorial, chemical, and microbial profile of coffee under carbonic maceration. **Food Chemistry**, [s. l.], n. September, p. 128296, 2020.
- Bressanello, D., Liberto, E., Cordero, C., Rubiolo, P., Pellegrino, G., Ruosi, M. R., & Bicchi, C. (2019). 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, 218–226.
- 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.
- Evangelista, S. R., Miguel, M. G. C. P., Cordeiro, C. S., Silva, C. F., Pinheiro, A. C. M., Schwan, R. F. Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. **Food Microbiology**, v. 44, p. 87, 95, 2014b.
- Fioresi, D. B., Pereira, L. L., Oliveira, E. C. S., Moreira, T. R., Ramos, A. C. Mid infrared spectroscopy for comparative analysis of fermented arabica and robusta coffee. **Food Control**, 121, 107625-107625, 2020.
- MATLAB. MathWorks. 2021. Disponível em: <https://www.mathworks.com/login>. Acesso em: 10 jul. 2024.

Agradecimentos

UFES, IFES, UFRGS, CAPES, CNPq.