UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

NATHÁLIA FERNANDES CERCA

Avaliação da segurança microbiológica de bebidas de café obtidas por métodos de extração inovadores a frio (*coldbrews*).

Rio de Janeiro
2021

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE BEBIDAS DE CAFÉ OBTIDAS POR MÉTODOS DE EXTRAÇÃO INOVADORES A FRIO (*COLDBREWS*).

Nathália Fernandes Cerca

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Área de concentração: Ciência de Alimentos
Orientadores: Adriana Farah de Miranda Pereira e Marco Antônio Lemos Miguel

Rio de Janeiro
Outubro/2021

Cerca, Nathália Fernandes

Avaliação da segurança microbiológica de bebidas de café obtidas por métodos de extração inovadores a frio (*coldbrews*). Nathália Fernandes Cerca. - Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Nutrição Josué de Castro, 2021.

157 f.: il.; 31 cm.

Orientadores: Adriana Farah de Miranda Pereira e Marco Antônio Lemos Miguel.

Dissertação (mestrado) – UFRJ, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Nutrição Humana, 2021.

Referências bibliográficas: f. 136 -157.

1. Café - história. 2. *Coldbrews*. 3. Extração a frio. 4. Segurança microbiológica. 5. Cafeína. 6. Ácidos Clorogênicos. 7. Nutrição - Tese. I. Pereira, Adriana Farah de Miranda. II. Miguel, Marco Antônio Lemos. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição. IV.Título.

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE BEBIDAS DE CAFÉ OBTIDAS POR MÉTODOS DE EXTRAÇÃO INOVADORES A FRIO (*COLDBREWS*)

Nathália Fernandes Cerca

Orientador (a): Adriana Farah de Miranda Pereira

Coorientador (a): Marco Antônio Lemos Miguel

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Aprovada por:

Presidente, Prof. Dra. Adriana Farah de Miranda Pereira
Instituto de Nutrição Josué de Castro – UFRJ

Prof. Dr. Marco Antônio Lemos Miguel
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes– UFRJ

Prof. Dra. Anna Paola Trindade Rocha Pierucci
Instituto de Nutrição Josué de Castro – UFRJ

Prof. Dra. Juliana de Paula Lima
Instituto de Nutrição Josué de Castro – UFRJ

Prof. Dra. Selma Gomes Ferreira Leite
Escola de Química – UFRJ

Prof. Dra. Eliane Lopes Rosado (suplente)
Instituto de Nutrição Josué de Castro – UFRJ

Prof. Dra. Verônica Maria de Araújo Calado (suplente)
Escola de Química – UFRJ

Rio de Janeiro

Outubro/2021

Dedicatória

Para minha mãe,
Pedrox e Moka.

Agradecimentos

Em meio a uma pandemia, definitivamente não foi fácil chegar até aqui.
Agradeço à **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, instituição de ensino superior de excelência, que vem resistindo heroicamente a ataques e negacionismos, e que me possibilitou primeiramente ter um ofício e, depois, me especializar.
Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico **(CNPQ),** à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior **(CAPES)** e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro **(FAPERJ)** pela concessão de recursos que possibilitaram a compra dos materiais para a realização desta dissertação.
Agradeço à **minha mãe Denise** que não me deixou desistir e me incentivou a seguir em frente. Que me apoiou em minhas decisões e me ajudou para que eu pudesse concluir esse mestrado. Obrigada mãe, por tudo desde sempre!
Ao **Pedrox**, meu companheiro, que me ajudou em tudo, incluindo as coisas mais singelas que tornaram meus dias mais leves para que eu pudesse dar conta do que precisava fazer. Eu amo você, me desculpe pela ausência durante esse período.
Aos meus orientadores, **Adriana Farah e Marco Miguel**, por toda ajuda e generosidade.
À professora **Adriana**, por quem tenho profunda admiração desde a época da graduação. Profa, muitíssimo obrigada pela sua generosidade, conhecimento, paciência e incentivo.
Ao professor **Marco**, muito obrigada pelo conhecimento e por toda ajuda nos experimentos.
À **Bruna**, minha grande amiga, obrigada por ser exemplo de força e bom humor mesmo nas adversidades da vida. Obrigada por ter me ajudado com os desenhos desta dissertação.
Ao **Rodrigo**, meu coordenador na Petrobras, que por diversas vezes me ajudou nas escalas de trabalho para que eu pudesse realizar e concluir os experimentos. Obrigada meu amigo!
Ao **Antonio**, técnico do Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Muito obrigada por tudo e vou sentir saudades das nossas conversas com um cafezinho! Você tem um coração gigante, sempre disponível para ajudar!
À **Ju**, por todo incentivo e ajuda com as análises químicas e os cálculos de tantas bebidas de café nesse período pandêmico! Muito obrigada!
À professora **Verônica**, por toda ajuda com as análises estatísticas desta dissertação!
À professora **Valéria Girão** e ao Laboratório de Epidemiologia Molecular das Infecções Bacterianas, pela ajuda com as análises de caracterização microbiológica.
À **Amanda**, muito obrigada por ter me ajudado com as dúvidas, por ter me treinado, ensinado a usar os equipamentos do laboratório e por ter sempre uma palavra de incentivo!
Ao **Felipe**, pela ajuda com os experimentos e com as minhas dúvidas (ah, e por me ajudar a abrir a autoclave), muito obrigada!
Aos **alunos** de iniciação científica, mestrado e doutorado do **NUPECAFÉ** e do **Laboratório de Microbiologia de Alimentos**.
Às professoras **Anna Paola Pierucci**, **Juliana de Paula**, **Selma Leite**, **Eliane Rosado** e **Verônica Calado** por aceitarem compor esta banca e avaliar a minha dissertação.

Epígrafe

“Somos assim, sonhamos o voo, mas tememos a altura. Para voar é preciso ter coragem para enfrentar o terror do vazio. Porque é só no vazio que o voo acontece. O vazio é o espaço da liberdade, a ausência de certezas”.

Fiódor Dostoievski

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Estrutura dos principais ácidos clorogênicos. **Página 35.**

Figura 02: Estrutura da cafeína. **Página 36.**

Figura 03: Estrutura da trigonelina. **Página 38.**

Figura 04: Fluxograma das etapas de processamento e beneficiamento do café e possíveis focos de contaminação microbiológica. **Página 45.**

Figura 05: Etapas de utilização do sistema comercial Toddy®. **Página 51.**

Figura 06: Sistemas comerciais *ColdBruer*® e *Nispira*®. **Página 52.**

Figura 07: Protocolo de extração a vácuo de *coldbrews* com aspirador de pó. **Página 52.**

Figura 08: Sistemas comerciais *Gourmia GCM7800 Brewdini*® e *VacOne Air Brewer*®. **Página 53.**

Figura 09: Principais pontos críticos de controle no processo de fabricação de coldbrews a nível doméstico, comercial e industrial. **Página 58.**

Figura 10: Esquema do método de extração a frio por imersão sem filtro. **Página 62.**

Figura 11: Esquema do método de extração a frio por imersão com filtro. **Página 63.**

Figura 12: Esquema do método de extração a frio por gotejamento. **Página 63.**

Figura 13: Esquema do método de extração a frio por vácuo. **Página 64.**

Figura 14: Esquema do método de extração a quente por gotejamento com filtro de papel. **Página 65.**

Figura 15: Esquema do método de extração a quente por gotejamento com filtro de pano. **Página 65.**

Figura 16: Teor de sólidos solúveis nas bebidas de (a) Café arábica e (b) Café conilon, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC e 25 ºC, por imersão sem filtro (ISF), ao longo de 24 horas. **Página 76.**

Figura 17: Teor de sólidos solúveis nas bebidas de a) Café arábica e (b) Café conilon, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC e 25 ºC, por imersão com filtro (saco de queijo) (ICF), ao longo de 24 horas. **Página 77.**

Figura 18: Teor de sólidos solúveis nas bebidas de a) Café arábica e (b) Café conilon, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC e 25 ºC, por vácuo (Vac), ao longo de 24 horas. **Página 78.**

Figura 19: Teor de sólidos solúveis nas bebidas de a) Café arábica e (b) Café conilon, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC e 25 ºC, por gotejamento (Got), ao longo de 24 horas. **Página 79.**

Figura 20: Teor de sólidos solúveis nas bebidas de café arábica e conilon, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 92,5 ºC, através dos métodos (a) filtração por filtro de papel (b) filtração por filtro de pano, ao longo de 6 horas de extração. **Página 80.**

Figura 21: Teor de sólidos solúveis nas bebidas de a) Café arábica e (b) Café conilon extraídas 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC, extraídas pelos métodos de imersão sem filtro, imersão com filtro de algodão (saco de queijo), vácuo, gotejamento, filtro de papel e filtro de pano, na concentração de 10%. **Página 81.**

Figura 22: Teores de melanoidinas totais (Kmix 405nm) em *coldbrews* de café arábica obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos a 25 °C. **Página 88.**

Figura 23: Teores de melanoidinas totais (Kmix 405nm) em *coldbrews* de café arábica obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo) (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos a 4 °C. **Página 88.**

Figura 24: Teores de melanoidinas totais (Kmix 405nm) em *coldbrews* de café conilon obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos a 25 °C. **Página 89.**

Figura 25: Teores de melanoidinas totais (Kmix 405nm) em *coldbrews* de café conilon obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos a 4 °C. **Página 89.**

Figura 26: Teores de melanoidinas totais (Kmix 405nm) em bebidas com café arábica obtidas por (a) filtração com filtro de papel e (b) filtração com filtro de algodão, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, imediatamente após e 6h após extração a 92,5 ºC. **Página 90.**

Figura 27: Teores de melanoidinas totais (Kmix 405nm) em bebidas com café conilon, obtidas por (a) filtração com filtro de papel e (b) filtração com filtro de algodão, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, imediatamente após e 6h após extração a 92,5 ºC. **Página 90.**

Figura 28: Correlação entre os teores de ácidos clorogênicos totais e de sólidos solúveis em bebidas de café arábica, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC nos métodos (a) *coldbrew* por imersão sem filtro (saco de queijo), (b) *coldbrew* por imersão com filtro de algodão, (c) *coldbrew* por vácuo; (d) *coldbrew* por gotejamento, (e) filtração a quente por filtro de papel; (f) filtração a quente por filtro de pano. **Página 91.**

Figura 29: Correlação entre os teores de cafeína e de sólidos solúveis em bebidas de café arábica, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC nos métodos (a) *coldbrew* por imersão sem filtro, (b) *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) *coldbrew* por vácuo; (d) *coldbrew* por gotejamento, (e) filtração a quente por filtro de papel; (f) filtração a quente por filtro de pano. **Página 92.**

Figura 30: Correlação entre os teores de trigonelina e de sólidos solúveis em bebidas de café arábica, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC nos métodos (a) *coldbrew* por imersão sem filtro, (b) *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) *coldbrew* por vácuo; (d) *coldbrew* por gotejamento, (e) filtração a quente por filtro de papel; (f) filtração a quente por filtro de pano. **Página 93.**

Figura 31: Correlação entre os teores de melanoidinas totais (Kmix 405nm) e de sólidos solúveis de bebidas de café arábica, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC nos métodos (a) *coldbrew* por imersão sem filtro, (b) *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) *coldbrew* por vácuo; (d) *coldbrew* por gotejamento, (e) filtração a quente por filtro de papel; (f) filtração a quente por filtro de pano. **Página 94.**

Figura 32: Correlação entre os teores de ácidos clorogênicos totais e de sólidos solúveis em bebidas de café conilon, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC nos métodos (a) *coldbrew* por imersão sem filtro, (b) *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) *coldbrew* por vácuo; (d) *coldbrew* por gotejamento, (e) filtração a quente por filtro de papel; (f) filtração a quente por filtro de pano. **Página 95.**

Figura 33: Correlação entre os teores de cafeína e de sólidos solúveis em bebidas de café conilon, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC nos métodos (a) *coldbrew* por imersão sem filtro, (b) *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) *coldbrew* por vácuo; (d) *coldbrew* por gotejamento, (e) filtração a quente por filtro de papel; (f) filtração a quente por filtro de pano. **Página 96.**

Figura 34: Correlação entre os teores de trigonelina e de sólidos solúveis em bebidas de café conilon, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC nos métodos (a) *coldbrew* por imersão sem filtro, (b) *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) *coldbrew* por vácuo; (d) *coldbrew* por gotejamento, (e) filtração a quente por filtro de papel; (f) filtração a quente por filtro de pano. **Página 97.**

Figura 35: Correlação entre os teores de melanoidinas totais (Kmix 405nm) e de sólidos solúveis de bebidas de café conilon, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC nos métodos (a) *coldbrew* por imersão sem filtro, (b) *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) *coldbrew* por vácuo; (d) *coldbrew* por gotejamento, (e) filtração a quente por filtro de papel; (f) filtração a quente por filtro de pano. **Página 98.**

Figura 36: Microscopia ótica de microrganismos corados pela técnica de Gram encontrados naturalmente em bebidas de café arábica e conilon extraídas a quente e a frio pelas técnicas de (a) quente por filtração com filtro de papel (café arábica) e (b) *coldbrew* por imersão sem filtro (café conilon). **Página 101.**

Figura 37: Número médio de unidades formadoras de colônias (log UFC/mL), após 24 horas de encubação a 37 ºC em aerobiose, de *Escherichia coli* ATCC 25922 em (a) Caldo triptona de soja (TSB) e (b) Solução salina a 0,85%. **Página 107.**

Figura 38: Número médio de unidades formadoras de colônias (log UFC/mL), após 24 horas de encubação a 37 ºC em aerobiose, de *Bacillus cereus* FF4433 em (a) Caldo triptona de soja (TSB) e (b) Solução salina a 0,85%. **Página 107.**

Figura 39: Quantificação de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 (log UFC/mL), em bebidas de café arábica obtidas por (a) filtração com filtro de papel e (b) filtração com filtro de pano, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a quente (92,5 ºC). **Página 110.**

Figura 40: Quantificação de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 (log UFC/mL), em bebidas de café conilon obtidas por (a) filtração com filtro de papel e (b)

filtração com filtro de pano, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a quente (92,5 ºC). **Página 110.**

Figura 41: Quantificação de células de *Escherichia coli* ATCC 25922 (log UFC/mL) em *coldbrews* de café arábica obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos ao longo de 24 horas, a 25 ºC. **Página 115.**

Figura 42: Quantificação de células de *Escherichia coli* ATCC 25922 (log UFC/mL) em *coldbrews* de café arábica obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos ao longo de 24 horas, a 4 ºC. **Página 116.**

Figura 43: Quantificação de células de *Escherichia coli* ATCC 25922 (log UFC/mL) em *coldbrews* de café conilon obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos ao longo de 24 horas, a 25 ºC. **Página 117.**

Figura 44: Quantificação de células de *Escherichia coli* ATCC 25922 (log UFC/mL) em *coldbrews* de café conilon obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos ao longo de 24 horas, a 4 ºC. **Página 118.**

Figura 45: Quantificação de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 (log UFC/mL) em *coldbrews* de café arábica obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos ao longo de 24 horas, a 25 ºC. **Página 119.**

Figura 46: Quantificação de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 (log UFC/mL) em *coldbrews* de café arábica obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos ao longo de 24 horas, a 4 ºC. **Página 120.**

Figura 47: Quantificação de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 (log UFC/mL) em *coldbrews* de café conilon obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos ao longo de 24 horas, a 25 ºC. **Página 121.**

Figura 48: Quantificação de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 (log UFC/mL) em *coldbrews* de café conilon obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão

com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos ao longo de 24 horas, a 4 ºC. **Página 122.**

Figura 49: Reduções (log UFC/mL) da população de *Escherichia coli* ATCC 25922 entre os tempos inicial e final de produção de *coldbrews* (a) por imersão sem filtro, (b) por imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) por vácuo, (d) por gotejamento, com café arábica e conilon, a 5%, 10% e 15% e em diferentes temperaturas. **Página 125.**

Figura 50: Reduções (log UFC/mL) da população de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 entre os tempos inicial e final de produção de *coldbrews* (a) por imersão sem filtro, (b) por imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) por vácuo, (d) por gotejamento, com café arábica e conilon, a 5%, 10% e 15% e em diferentes temperaturas. **Página 126.**

Figura 51: Efeito antimicrobiano, face a (a) *Escherichia coli* ATCC 25922 e (b) *Bacillus cereus* FF4433, de *coldbrews* de café arábica e conilon a 5%, 10% e 15%, com água a 4 ºC e 25 ºC, ao longo de 24 horas de extração. **Página 130.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Composição química de bebidas de café. **Página 32.**

Tabela 02: Principais agentes causadores de doenças transmitidas por alimentose suas características. **Página 48.**

Tabela 03: Caracterização físico-química de *coldbrews* quanto aos teores de ácidos clorogênicos, trigonelina, cafeína, melanoidinas, acidez titulável, pH e sólidos solúveis(mg/L). **Página 55.**

Tabela 04: Valores de pH após o preparo de bebidas de café arábica extraídas a frio (4 ºC e 25 ºC) e a quente (92,5 ºC). **Página 74.**

Tabela 05: Valores de pH após o preparo de bebidas de café conilon extraídas a frio (4 ºC e 25 ºC) e a quente (92,5 ºC). **Página 75.**

Tabela 06: Teores de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em grãos torrados e moídos de café arábica e conilon (g/100g, base seca). **Página 85.**

Tabela 07: Teores de ácidos clorogênicos, cafeína, trigonelina e sólidos solúveis em bebidas de café arábica extraídas a frio (4 ºC e 25 ºC) e a quente (92,5 ºC). **Página 86.**

Tabela 08: Teores de ácidos clorogênicos, cafeína, trigonelina e sólidos solúveis em bebidas de café conilon extraídas a frio (4 ºC e 25 ºC) e a quente (92,5 ºC). **Página 87.**

Tabela 09: Quantificação de bactérias aeróbias cultiváveis (UFC/mL) em bebidas de café arábica extraídas a frio (4 ºC e 25 ºC) e a quente (92,5 ºC). **Página 99.**

Tabela 10: Quantificação de bactérias aeróbias cultiváveis (UFC/mL) em bebidas de café conilon extraídas a frio (4 ºC e 25 ºC) e a quente (92,5 ºC). **Página 100.**

Tabela 11: Microrganismos encontrados nas bebidas de café arábica e conilon extraídas a frio (4 ºC e 25 ºC) e a quente (92,5 ºC), por espectrometria de massas. **Página 102.**

Tabela 12: Quantificação de fungos de bebidas de café arábica e conilon, extraídas a frio (4 ºC e 25 ºC) e a quente (92,5 ºC), após incubação a 25 ºC por 7 dias em aerobiose em meio de cultura ágar batata dextrose acidicificado com ácido tartárico a 10%. **Página 104.**

Tabela 13: Efeito da utilização de filtros de papel e de pano durante o preparo da bebida de café, na retenção de *Escherichia coli* ATCC 25922 e de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 presentes na água de preparo. **Página 108.**

Tabela 14: Quantificação de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 (log UFC/mL), em *coldbrews* de café arábica e conilon, intencionalmente contaminados com 10^2 UFC/mL, após 24 horas de extração. **Página 111.**

Tabela 15: Quantificação de células de *Escherichia coli* ATCC 25922 (log UFC/mL), em *coldbrews* de café arábica e conilon, intencionalmente contaminados com 10^5 UFC/mL, após 24 horas de extração. **Página 123.**

Tabela 16: Quantificação de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 (log UFC/mL), em *coldbrews* de café arábica e conilon, intencionalmente contaminados com 10^5 UFC/mL de, após 24 horas de extração. **Página 124.**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HMF	5-hidroximetilfurfural
5-CQA	Ácido 5-cafeoilquínico
ABD	Ágar Batata Dextrose
ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café
Abs.	Absorbância
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APH	Alta Pressão Hidrostática
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Econômica
AT	Acidez titulável
ATCC	*American type culture collection*
ATP	Adenosinatrifosfato
BHI	*Brain Heart Infusion*
BPA	Boas Práticas Agrícolas
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAF	Cafeína
CB	*Coldbrew*
CDC	*Center for Disease Control*
CGA	Ácidos clorogênicos totais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAD	Detector de feixe de diodos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTA	Doença Transmitida por Alimentos
EMB	Eosina Azul de Metileno
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FDA	*Food and Drug Administration*
FAO	*Food and Agriculture Organization*
FPN	Extração a quente por filtro de pano
FPP	Extração a quente por filtro de papel

GRAS	*Generally Regarded as Safe*
Got	Extração a frio por gotejamento
ICF	Extração a frio por imersão com filtro
ICO	*International Coffee Organization*
ISF	Extração a frio por imersão sem filtro
ISO	*International Organization for Standardization*
IN	InstruçãoNormativa
kDa	Quilodalton
$\mathbf{K_{mix\ 405nm}}$	Coeficiente de extinção específico a 405nm
MALDI-Tof	*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectometry*
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MPa	Megapascal
ND	Não detectado
nm	Nanômetro
NCA	*National Coffee Association*
NMP	Número mais provável
OTA	OcratoxinaA
PAP	Pasteurização por alta pressão
PCCs	Pontos Críticos de Controle
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleico
SS	Sólidos solúveis
SNC	Sistema Nervoso Central
TA	Temperatura ambiente
TG	Trigonelina
TR	Temperatura refrigerada
TSA	Ágar Triptona de Soja
TSB	Caldo Triptona de Soja
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
Vac	Extração a frio a vácuo

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS ..... **VIII**

LISTA DE TABELAS ..... **XIV**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS ..... **XVI**

1. INTRODUÇÃO **25**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **27**

2.1 O café: história e o conceito de "ondas de consumo do café'' 27

2.2 O resgate histórico e cultural dos *coldbrews* 28

2.3 Consumo e mercado de bebidas de café extraídas a quente e a frio 28

2.4 Café: a planta 29

2.5 Microbiota associada ao café 30

2.6 Composição química do café 31

2.7 Potencial antimicrobiano dos compostos bioativos do café 33
2.7.1 Ácidos clorogênicos 33
2.7.2 Cafeína 35
2.7.3 Trigonelina 36
2.7.4 Melanoidinas 38

2.8 Cadeia produtiva do café: etapas de processamento, pontos críticos de controle e boas práticas agrícolas e de fabricação 40
2.8.1 Processamento 41
2.8.2 Torrefação 42
2.8.3 Moagem 43
2.8.4 Envase e transporte 43

2.9 Pontos críticos na cadeia produtiva do café 45

2.10 Boas Práticas de Fabricação na cadeia do café 49

2.11 *Coldbrews*: técnicas de preparo, caracterização físico-química e riscos de contaminação microbiológica 50
2.11.1 Técnicas de preparo das bebidas de café da categoria *coldbrew* 50
2.11.2 Caracterização físico-química e segurança microbiológica de *coldbrews* 53
2.11.3 Segurança microbiológica de bebidas da categoria *coldbrew* 56

3. JUSTIFICATIVA 59

4. OBJETIVO GERAL 60

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 60

6. MATERIAL E MÉTODOS 60

6.1 Amostras de café 60

6.2 Obtenção das bebidas de café 61

6.3 Extração à quente 62
6.3.1 Extração a quente por filtro de papel (FPP) 62
6.3.2 Extração a quente por filtro de pano (FPN) 62

6.4 Extração à frio (*coldbrew*) 63
6.4.1 Extração a frio por imersão sem filtro (ISF) 63
6.4.2 Extração a frio por imersão com filtro de algodão (ICF) 64
6.4.3 Extração a frio por gotejamento (Got) 64
6.4.4 Extração a frio a vácuo (Vac) 65

6.5 Determinação de sólidos solúveis e pH 66

6.6 Análise de compostos bioativos 66

6.7 Análise de melanoidinas (Kmix 405nm) 67

6.8 Meios de cultura utilizados 67

6.9 Avaliação dos microrganismos cultiváveis na matéria-prima 68

6.10 Análise de fungos e leveduras cultiváveis 68

6.11 Estirpes utilizadas para inóculo intencional de café 69

6.12 Preparo dos inóculos para os experimentos de contaminação intencional da água de preparo de bebidas de café extraídas a frio e a quente 69

6.13 Confirmação da contagem dos inóculos por cultivo e contagem em placa 69

6.14 Efeito da utilização de filtros na extração de bebidas de café preparadas com água intencionalmente contaminada com *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* 70

6.15 Contaminação intencional da água de preparo de bebidas de café extraídas a quente com *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* 70

6.16 Contaminação intencional da água de preparo de *coldbrews* com *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* 71

6.17 Análises estatísticas 72

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO 72

7.1 Determinação de pH e sólidos solúveis totais 72

7.2 Análise de compostos bioativos 82

7.3 Avaliação dos microrganismos cultiváveis na matéria-prima e nas bebidas de café extraídas a quente e a frio 99

7.4 Controles de viabilidade das estirpes utilizadas para contaminação da água de preparo das bebidas 106

7.5 Efeito da utilização de filtros na extração de bebidas de café preparadas com água contaminada intencionalmente com *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* 108

7.6 Sobrevivência de *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* intencionalmente contaminados na água de preparo de bebidas de café extraídas a quente.....109

7.7 Sobrevivência de *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* intencionalmente contaminados na água de preparo de *coldbrews*.....111

8. CONCLUSÕES.....132

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....134

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 136

RESUMO

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE BEBIDAS DE CAFÉ OBTIDAS POR MÉTODOS DE EXTRAÇÃO INOVADORES A FRIO (*COLDBREWS*).

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Coldbrews (CB) são bebidas de café extraídas a baixas temperaturas, por períodos variados de tempo, que vêm ganhando destaque e popularidade entre os consumidores. Contudo, poucos trabalhos analisaram, de forma sistemática, sua composição físico-química e segurança microbiológica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a segurança microbiológica de CB preparados a partir de amostras de *Coffea arabica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café conilon) torradas (torra média) e moídas, utilizando métodos de extração inovadores a frio. Os seguintes métodos foram avaliados frente a contaminações intencionaisda água (10^5 UFC/mL) com *Escherichia coli* ATCC 25922 e células vegetativas de *Bacillus cereus* F4433: imersão sem filtro (ISF), imersão com filtro de algodão (ICF), vácuo (Vac) e gotejamento (Got), com água à temperatura ambiente (TA) e refrigerada (TR), nas concentrações de 5%, 10% e 15%. Métodos por gotejamento a quente (tradicionais) com filtro de papel (FPP) e filtro de pano (FPN) também foram avaliados para comparação. Foram realizadas análises de pH, sólidos solúveis (SS), ácidos clorogênicos (CGA), cafeína (CAF), trigonelina (TG) e melanoidinas (MEL). Os resultados foram comparados por ANOVA, seguida dos pós testes de *Tukey* e *Fisher* e correlação de *Pearson*, com grau de significância de 95%. À medida que a concentração das bebidas aumentou, maiores foram os teores de SS, CGA, CAF, TG e MEL. O café conilon exibiu teores superiores de SS (4,90 ± 0,00 ºBrix), CGA (2,70 ± 0,34 g/100 g), CAF (2,17 ± 0,04mg/100g) e MEL ($K_{mix405nm}$ de 1,690), em relação ao café arábica (4,50 ± 0,00 ºBrix, 1,94 ± 0,31 g/100 g de CGA, 1,06 ± 0,02 g/100 g de CAF, $K_{mix405nm}$ de 1,446). Nas bebidas a quente de café arábica e conilon, não foi detectada *E. coli* e *B. cereus* logo após o preparo. Nas extrações a frio, a segurança microbiológica dos métodos aumentou com o teor de SS e de todos os compostos avaliados, com a concentração do pó, tempo de preparo, armazenamento até

24h e a temperatura da água (TA em relação a TR). Houve redução na população de *E. coli*, em log UFC/mL, de 0,97 ± 0,07 a 5,18 ± 0,09 pelo método ISF; 1,36 ± 0,02 a 5,13± 0,03 por ICF; 0,10 ± 0,01 a 5,04± 0,04 porVac; 0,86 ± 0,08 a 5,20± 0,07 por Got). Ao comparar o comportamento de *E. coli* e *B. cereus*, o segundo foi mais sensível à ação antimicrobiana da bebida, não sendo detectado após 24 horas de extração e/ou armazenamento nas bebidas obtidas pelos métodos ISF e Vac a 15% e ICF e Got de 5% a 15%. Conclui-se que na ausência de processamento térmico como nos métodos tradicionais, CB mais concentrados (15%) e produzidos a partir dos métodos de imersão e gotejamento em TA são preferíveis em virtude do elevado teor de sólidos solúveis e compostos bioativos do café que contribuem para a segurança microbiológica da bebida.

Palavras-chaves: Café; *coldbrew*; extração a frio; segurança microbiológica; ácidos clorogênicos; cafeína; melanoidinas.

ABSTRACT

MICROBIOLOGICAL SAFETY EVALUATION OF COFFEE BEVERAGES OBTAINED BY INNOVATIVE COLD EXTRACTION METHODS (COLDBREWS).

Nathália Fernandes Cerca

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Coldbrews (CB) are coffee beverages extracted at low temperatures, for long periods of time, which have been gaining prominence and popularity among consumers. However, few studies have systematically analyzed its physicochemical composition and microbiological safety. The aim of this work was to evaluate the microbiological safety of CB prepared from samples of *Coffea arabica* (arabica coffee) and *Coffea canephora* (conilon coffee) roasted (medium roast) and ground, using innovative cold extraction methods. The following methods were evaluated against intentional water contamination (10^5 CFU/mL) with *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Bacillus cereus* F4433 vegetative cells: immersion without filter (ISF), immersion with cotton filter (ICF), vacuum (Vac) and dripping (Got), with water at room temperature (TA) and refrigerated (TR), at concentrations of 5%, 10% and 15%. Hot drip (traditional) filter paper (FPP) and filter cloth (FPN) methods were also evaluated for comparison. Analyzes of pH, soluble solids (SS), chlorogenic acids (CGA), caffeine (CAF), trigonelline (TG) and melanoidins (MEL) were conducted. The results were compared by ANOVA, followed by the Tukey and Fisher tests and Pearson correlation, with a significance level of 95%. As the concentration of beverages increased, the higher the levels of SS, CGA, CAF, TG and MEL. Conilon coffee exhibited higher levels of SS (4.90 ± 0.00 ºBrix), CGA (2.70 ± 0.34 g/100 g), CAF (2.17 ± 0.04mg/100g) and MEL (Kmix405nm of 1.690), compared to arabica coffee (4.50 ± 0.00 ºBrix, 1.94 ± 0.31 g/100 g of CGA, 1.06 ± 0.02 g/100 g of CAF, Kmix405nm of 1.446). In arabica and conilon hot brews, *E. coli* and *B. cereus* were not detected after preparation. In cold extractions, the microbiological safety of the methods increased with the content of SS

and all compounds evaluated, with the concentration of powder, preparation time, storage up to 24 hours and water temperature (TA in relation to TR). There was a reduction in the population of *E. coli*, in log CFU/mL, from 0.97 ± 0.07 to 5.18 ± 0.09 for the ISF method; 1.36 ± 0.02 to 5.13 ± 0.03 for ICF; 0.10 ± 0.01 to 5.04 ± 0.04 for Vac; 0.86 ± 0.08 to 5.20 ± 0.07 for Got). When comparing the behavior of *E. coli* and *B. cereus*, the second was more sensitive to the antimicrobial action of coffeebrews, not being detected after 24 hours of extraction and/or storage in the drinks obtained by the ISF and Vac 15% and ICF and Got at all concentrations. It is concluded that in the absence of thermal processing as in traditional methods, CB more concentrated (15%) and produced from the immersion and dripping methods at TA are preferable due to the high content of soluble solids and bioactive compounds that contribute for the microbiological safety of the beverage.

Key words: Coffee; coldbrew; cold extraction; food safety; chlorogenic acids; caffeine; melanoidins.

1. INTRODUÇÃO

Por ano, são consumidas cerca de 500 bilhões de xícaras de café no mundo, o que faz da bebida uma das mais populares a nível mundial (NCA, 2020). Além de seu sabor e perfil sensorial agradáveis ao paladar, há grande interesse em seus efeitos fisiológicos, como a ação estimulante no sistema nervoso central e as propriedades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-mutagênica, dentre outras (MARTÍNEZ-TOMÉ et al., 2011; FOLMER, 2017; FARAH, 2017; FARAH E dePAULA, 2019). Essas propriedades, devem-se a um conjunto de compostos bioativos do café, principalmente ácidos clorogênicos, trigonelina, cafeína e melanoidinas (FARAH, 2015).

Tradicionalmente, bebidas de café são extraídas a quente (MARTINS, 2012); porém nos últimos 10 anos, houve um resgate histórico da técnica de extração *coldbrewing* (FULLER E RAO, 2017; ANGELONI et al., 2019a), que vêm ganhando notoriedade entre os consumidores, especialmente os mais jovens, em consonância com o movimento de "ondas de consumo do café" (SKEIE, 2002). Por definição, *coldbrews* são bebidas de café extraídas com água à temperatura ambiente ou inferior, que permanecem em contato com o pó por longos períodos (12 a 24 horas ou mais) (KIM E KIM, 2014; CORDOBA et al., 2019), mas ainda não há consenso em relação à temperatura da água, a proporção de pó de café para água e o tempo de extração das bebidas de café a frio produzidas a nível doméstico, comercial e industrial.

Em julho de 2018, essas bebidas já representavam 22% do faturamento no mercado de cafés (MINTEL, 2018) e, em 2019, já movimentavam mais de US$339 milhões de dólares (GRAND VIEW RESEARCH, 2019). Uma série de alegações são atribuídas aos *coldbrews* como menor acidez, maior dulçor, sabor agradável e que essas bebidas seriam mais indicadas a indivíduos que apresentam disfunções gástricas (CALDERONI et al., 2015; RAO E FULLER, 2018). Entretanto, não existem protocolos oficiais de extração de *coldbrews*, ao mesmo tempo em que surgem diversas inovações tecnológicas no setor, como novas técnicas de preparo, receitas, dispositivos e equipamentos de extração que ganham popularidade entre baristas e entusiastas desta forma de preparo e consumo das bebidas de café.

Nesse sentido, uma vez que não ocorre o processamento térmico (DAESCHEL et al., 2017), bebidas desta categoria apresentam risco de contaminação microbiológica, considerando o binômio tempo x temperatura, se não forem adotadas condições higiênico-sanitárias satisfatórias ao longo de toda cadeia de processamento do café e produção das bebidas (KWOK et al., 2020; LOPEZ, 2020). Esta dissertação investigou, sistematicamente, a composição físico-química de bebidas de café extraídas a frio a partir de grãos de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* torrados e moídos, sob diferentes temperaturas de extração, proporções de pó para água e métodos de preparo, correlacionando os resultados à segurança microbiológica, a fim de avaliar as melhores condições de extração que minimizem o risco de contaminação do produto final.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O café: história e o conceito de “ondas de consumo do café’’

De origem etíope, o café difundiu-se para o mundo por meio do Egito e da Europa (SMITH et al., 1985). Há cerca de 1.000 anos, tribos africanas moíam os grãos de café e faziam uma pasta à base de gordura animal para alimentar seus rebanhos em longas viagens. Com o tempo, infusões feitas com os grãos de café passaram a ser utilizadas para fins medicinais contra dores de cabeça, letargia, tosse, reumatismo, dentre outros (WELLMAN, 1961; MARTINS, 2012). Não demorou muito para que o plantio do café se estendesse para a península Arábica onde começou a ser cultivado nos mosteiros islâmicos, sendo consumido pelos monges com o intuito de mantê-los acordados durante os longos períodos de oração (MALTEZ, 2018). O hábito de consumir café se espalhou, chegando a Constantinopla em 1.554, e o surgimento das lojas de café aumentou ainda mais a popularidade desse hábito (MARTINS, 2012).

O café é uma das bebidas mais apreciadas em todo mundo. Contudo, o modo como ele é visto e consumido, mudou consideravelmente ao longo da história, principalmente em decorrência das inovações tecnológicas no seu processo de produção e das exigências cada vez maiores do mercado consumidor. Em 2002, a barista *Trish Skeie*, no artigo intitulado “*Norway and Coffee*”, criou o conceito de “ondas” de consumo para descrever essas mudanças. Segundo Skeie (2002), há três “ondas” de consumo, cada uma com suas características e contribuições, que marcam a evolução da produção e do consumo do café ao longo dos anos.

A primeira “onda” é caracterizada pelo aumento do consumo do café focado apenas nos benefícios decorrentes da ingestão de cafeína, como a diminuição do sono, aumento da disposição e concentração, sem ênfase na qualidade da bebida (SKEIE, 2002). Já na segunda “onda”, ocorreu uma reação à baixa qualidade da primeira “onda”, a origem dos grãos passou a ter grande importância e as máquinas de café se popularizaram. Na terceira “onda”, o foco é dado à busca por maior qualidade e diferenciação do café. O preparo artesanal, sem pressa e em frente ao cliente ganha cada vez mais espaço, agregando valor ao produto e oferecendo bebidas exclusivas (GUIMARÃES et al., 2016). Novas melhorias dos métodos já existentes se

popularizaram como os porta-filtros especiais *HarioV60*®, *Chemex*®, *Kalita*®, e os extratores *AeroPress*®, prensa francesa e sifão (globinho).

Embora não seja consenso, alguns especialistas (baristas) defendem a existência de uma quarta "onda" que se caracteriza por maior aproximação entre o produtor e o consumidor final com maior ênfase na sustentabilidade e *fair trade*, acompanhada de um número cada vez maior de pessoas realizando os processos de torrefação e moagem em suas próprias casas (MORI, 2019). Entre a terceira e quarta "ondas" encontra-se o movimento de resgate histórico e cultural da técnica de *cold brewing*, método de extração a frio desenvolvido no século XVII (GUIMARÃES et al., 2016; COFFEE INSIGHT, 2017; BOAVENTURA et al., 2018).

2.2 O resgate histórico e cultural dos *coldbrews*

Tradicionalmente, as bebidas de café são extraídas a quente (expresso, café filtrado, cafeteira elétrica, prensa francesa, cafeteira italiana do tipo *mokapot*, dentre outros) (MARTINS, 2012; ANGELONI et al., 2019b). Entretanto, nos últimos 10 anos houve resgate das técnicas de extração a frio, que consistem em criar um café concentrado embebendo o pó em água fria por longos períodos, de 12 a 24 horas, podendo chegar a 36 horas, denominado *coldbrew* (KIM E KIM, 2014; FULLER E RAO, 2017; CORDOBA et al, 2019).

Traçar uma origem para o surgimento desta forma de preparo não é fácil. De acordo com algumas lendas acerca do café, o *coldbrew* parece ter sido criado pelos holandeses após 1606, como um meio de transportar café preparado para ser aquecido e consumido posteriormente, levando esta forma de extração ao Japão. Ali, as bebidas eram produzidas a partir do *Kyoto-style*, uma técnica primitiva de gotejamento da água gelada sobre o pó de café (UKER, 1922). Há registros, em meados de 1840, de soldados franceses desenvolverem o *mazagran*, tipo de *coldbrew* concentrado e adoçado (DEBRY, 1994). Além disso, sugere-se que o preparo em água fria proporciona uma bebida com sabor mais suave, menos ácido e com maior dulçor (OH et al., 2014).

2.3 Consumo e mercado de bebidas de café extraídas a quente e a frio

Diferentes bebidas preparadas a partir do café torrado são amplamente consumidas e estão em pleno crescimento segundo a *International Coffee Organization* (ICO, 2020). No mundo, cerca de 500 bilhões de xícaras de café são consumidas por ano, o equivalente a 2,25 bilhões de xícaras por dia, o que faz desta bebida uma das mais populares no mundo (NCA, 2020). Já no Brasil, 9 em cada 10 pessoas acima de 15 anos consomem café diariamente, isto é, a bebida com a segunda maior penetração na população, atrás apenas da água (ABIC, 2016). Em 2020, o consumo *per capita* de café torrado e moído foi de 4,79 kg/ano, com crescimento de 1,34% em relação a 2019, mantendo o Brasil como o segundo maior consumidor de café do mundo (ABIC, 2020).

O fato de muitos dos compostos solúveis do café não se dissolverem completamente em extrações a frio resultaria em uma bebida com baixa acidez, baixo teor de cafeína, sabor mais leve, adocicado, aroma menos intenso, o que a tornaria mais indicada a indivíduos que apresentam disfunções gastrointestinais (CALDERONE, 2015; FULLER E RAO, 2017). Pelas razões supracitadas, o mercado global de *coldbrews* cresceu cerca de 580% de 2011 a 2016 (SISEL, 2016) e estima-se que em 2025 movimente 1,63 bilhão de dólares, com uma taxa anual de crescimento de 25,1% (GRAND VIEW RESEARCH, 2019).

A popularidade de produtos artesanais, associada às mudanças nas demandas dos consumidores abriu muitas oportunidades no mercado global. Algumas empresas pioneiras, como *Stumptown*, *Grady's* e *Chameleon ColdBrew* e grandes redes como a *Starbucks* lançaram versões de café gelado extraído a frio, estimulando o crescimento mundial (GUIMARÃES et al., 2016). É importante ressaltar que a preferência do consumidor por cafés especiais e exclusivos fez com que, em 2018, as pequenas cafeterias passassem a deter mais de 50% do mercado (GRAND VIEW RESEARCH, 2019). No Brasil não é diferente. Dados divulgados pela Associação Brasileira das Indústrias de Café (ABIC, 2021) mostraram que a busca dos consumidores por café torrado em grão passou de 3,4% para 15% e a compra de cafés realizada diretamente com o produtor foi de 25,4 para 71% no período de 2000 a 2021.

2.4 Café: a planta

O café é a semente do fruto do cafeeiro, arbusto do gênero *Coffea*, que pertence à família Rubiaceae. Das 124 espécies atualmente catalogadas nesse gênero, *Coffea*

arabica e *Coffea canephora* são as mais importantes economicamente (RAZAFINARIVO et al., 2013; FARAH, 2019). *C. arabica*, conhecida popularmente como café arábica, foi umas das primeiras a ser cultivada. Natural da Etiópia, ela produz cafés de qualidade, com aroma intenso e os mais diversos sabores, com inúmeras variações de corpo e acidez (FARAH, 2015; 2017).

De plantio mais fácil em comparação com as outras espécies, *C. canephora* é originária da África Ocidental, sendo cultivada na África, no Sudeste Asiático e no Brasil, onde recebe o nome de conilon, que é a variedade cultivada no país. Com produção de menor custo, o café conilon é mais resistente a pragas e doenças e, em geral, considerado de qualidade inferior, sendo direcionado aos consumidores menos exigentes (FARAH, 2017). Com cerca de duas vezes mais cafeína, o conilon tem menor acidez, aroma e sabor menos ricos e, por vezes, é mais amargo que o café arábica, podendo apresentar sabor terroso/queimado, após a torrefação (LEROY et al., 2006, FARAH, 2012; 2019). Contudo, é importante destacar que esse cenário vem mudando e, nos últimos anos, um mercado produtor e consumidor de café conilon especial tem se desenvolvido, com alegações de bebida de maior complexidade, dulçor, sabor e aroma agradáveis. (THE PERFECT DAILY GRIND, 2021).

2.5 Microbiota associada ao café

A microbiota associada ao café, consiste na diversidade de microrganismos que podem estar presentes nos grãos de café verde e variar de acordo com fatores ambientais (umidade, temperatura, estação do ano, microrganismos presentes no solo, espécie de café e formas de cultivo) (SILVA et al., 2000; DUONG et al., 2020). Naturalmente estão presentes bactérias, fungos e leveduras em todas as etapas de beneficiamento do café (SILVA et al., 2000; BATISTA, 2016). Na etapa de secagem natural, ocorre fermentação espontânea frente à presença da microbiota majoritariamente composta por bactérias. Conforme a secagem ocorre, a umidade e a atividade de água diminuem, modificando a composição da microbiota que passa, então, a ser predominantemente composta por fungos e leveduras (SILVA et al., 2008; DUONG et al., 2020).

Vilela et al. (2010), isolaram e identificaram em amostras de grãos de café arábica, os gêneros de bactérias *Aeromonas, Pseudomonas, Enterobacter, Serratia, Bacillus, Klebsiella, Arthrobacter, Microbacterium, Acinetobacter* e *Escherichia*, de

levedura *Pichia, Candida, Arxula, Saccharomycopsis, Torulaspora, Debaryomyces* e *Rhodotorula* e de fungos *Aspergillus*. Dentre as espécies predominantes, destacam-se, as bactérias, *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Enterobacter agglomerans, Bacillus cereus* e *Klebsiella pneumoniae* e as leveduras *Pichia anomala* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Silva et al. (2000), encontraram em amostras de café arábica os gêneros de bactérias *Aeromonas, Enterobacter, Pseudomonas, Serratia, Lactobacillus* e *Bacillus*, além das leveduras *Pichia, Cândida* e *Arxula* e fungos dos gêneros *Cladosporium, Fusarium* e *Penicillium*.

No café robusta, foram identificadas as espécies de bactérias *Microbacterium e Enterobacter* e os fungos *Aspergillus* e *Wallemia* (HAMDOUCHE et al., 2016). Cabe ressaltar que esses microrganismos não sobrevivem às altas temperaturas da etapa de torrefação do café (170 a 230 ºC) (ILLY; VIANI, 2005). Assim, a presença de microrganismos nos grãos de café torrados pode ser um indicativo de contaminação microbiológica do produto após a etapa de torrefação, pelo contato direto com solo, utensílios que manipulem grãos verdes e torrados, proximidade aos grãos de café verde ou do próprio meio ambiente (ENTRINGER et al., 2020).

Em relação aos fungos, *Aspergillus ochraceus*, produtor da micotoxina ocratoxina A (OTA), possui grande relevância no cultivo de café, pois pode infectar a planta com esta toxina durante a colheita, a secagem e o armazenamento (TANIWAKI et al., 2003). A OTA é um metabólito altamente nefrotóxico, resistente ao tratamento térmico e amplamente distribuída em plantações de café e cereais como trigo, centeio e cevada (KRUGER, 2006; CODEX ALIMENTARIUS, 2009). Os limites estabelecidos para a presença de OTA em café torrado são de 10 μg/kg no Brasil (ANVISA, 2011) e 5 μg/kg na União Europeia (COMISSION REGULATION, 2005)

2.6 Composição química do café

Em relação à composição química dos grãos de café, alterações podem ocorrer durante seu processamento, principalmente, no processo de torrefação (FARAH, 2012). Durante a torrefação, ocorrem as reações de *Maillard* e pirólise, que degradam a maior parte dos açúcares simples e proteínas (FARAH, 2017). Quanto aos teores de macronutrientes, o café não é considerado um alimento fonte de carboidratos, proteínas e lipídios à exceção de bebidas de café não filtradas que contém maior teor de lipídios,

incluindo os diterpenos cafestol e *kahweol*, em teores entre 3 e 6 mg por xícara (DE ROOS et al., 2001; USDA, 2015; REN et al., 2019).

Em contrapartida, o café torrado contém quantidades consideráveis de vitaminas como a niacina e pequenas quantidades de outras vitaminas do complexo B como a tiamina, a riboflavina, a piridoxina, o ácido fólico e, também, o ácido ascórbico (vitamina C) e a vitamina K (MACRAE E CLARKE, 1985; FARAH, 2102). Oliveira et al. (2015) estimaram que uma xícara de café expresso continha 5,2 a 7,0% das recomendações de ingestão diária para potássio, 2,8 a 7,2% para fósforo, 1,4 a 2,2% magnésio, 1,4 a 1,9% para manganês, 0,14 a 0,28% para cálcio e 0,07 a 0,15% para ferro. A **Tabela 01** apresenta a composição de bebidas de café, preparadas a partir de *blends* de *C. arabica* e *C. canephora*, extraídas a quente.

Tabela 1: Composição química de bebidas de café.

Teor em *blends* de *C. arabica* e *C. canephora* (mg/100 mL)					
Macronutrientes		**Micronutrientes**		**Compostos bioativos**	
Água	94-98,5	**Vitaminas:**		Cafeína	50-380
Açúcares simples	0-100	Tiamina	0,001	Trigonelina	12-50
Proteínas	120-400	Niacina	8-10	Diterpenos	0,2-1,5 (filtro de papel) 2,6-10 (fervidos)
Lipídios	180-400	Riboflavina	0,177	Ácidos clorogênicos	32-500
Fibras solúveis	200-700	Piridoxina	0,002	Melanoidinas	500-1500
Ácidos alifáticos e quínicos	692-2140	Ácido fólico	1,0		
		Vitamina C	0,2		
		Vitamina E	0,01		
		Vitamina K	0,1		
		Minerais:			
		Potássio	115-320		
		Sódio	1-14		
		Cálcio	2-4		
		Fósforo	3-7		
		Ferro	0,02-0,13		
		Zinco	0,01-0,05		
		Manganês	0,02-0,05		

Adaptado de FARAH, 2017. Nota: Vitamina C (ácido ascórbico); Vitamina E (alfa-tocoferol); Vitamina K (filoquinona); Diterpenos (cafestol e *kahweol*).

Devido ao interesse em alimentos promotores de saúde, há grande foco nos efeitos fisiológicos do café. Além da ação estimulante, o consumo de café está relacionado a benefícios à saúde, tais como propriedades antioxidante, anti-inflamatória, anti-mutagênica, redução do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, doenças reumatológicas, doença de *Parkinson*, mal de *Alzheimer*, regulação da insulina e peso corporal, além de propriedades antimicrobianas (MARTÍNEZ-TOMÉ et al., 2011; CRIPPA et al., 2014; FOLMER et al., 2017; FARAH E dePAULA, 2019). Essas propriedades devem-se a um conjunto de compostos bioativos, principalmente os ácidos clorogênicos, a trigonelina e a cafeína (FARAH, 2015).

2.7 Potencial antimicrobiano dos compostos bioativos do café

2.7.1 Ácidos clorogênicos

São os principais compostos fenólicos presentes no café (OLTHOF et al., 2003; FARAH, 2017). Trata-se de uma família de compostos formados pela esterificação de uma molécula de ácido quínico e uma a três moléculas de ácidos hidroxinâmicos (ácidos cafeico, ferúlico e *p*-cumárico), que incluem ácidos cafeoilquínicos, dicafeoilquínicos, feruloilquínicos, ácidos *p*-cumaroilquínicos e diésteres mistos de ácidos cafeoilferuloilquínicos (**Figura 1**) (FARAH et al., 2005; FARAH E DONANGELO, 2006; FARAH, 2012). O teor de ácidos clorogênicos no café conilon pode ser até duas vezes maior do que no café arábica. Além disso, eles são parcialmente degradados ou transformados durante o processo de torrefação e torras mais escuras contém menores teores de ácidos clorogênicos (FARAH, 2017).

Esses compostos possuem propriedades antioxidantes, desempenhando papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres, quelação de metais de transição e ação anti-inflamatória (TORRES E FARAH, 2016; FOLMER et al., 2017; FARAH E dePAULA, 2019). O potencial antimicrobiano de cafés deve-se, dentre outros, aos ácidos ferúlico, cinâmico, *p*-cumárico e cafeico, os quais exibem efeito inibitório ao crescimento de diversos microrganismos, como a *E. coli*, *S. enterica* e *Staphylococcus aureus* (MARTÍNEZ-TOMÉ et al., 2011). Também foi demonstrada atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e *Stenotrophomona smaltophilia*

(KARUNANIDHI et al., 2013), *Helicobacter pylori* (FARZAEI et al., 2015), *Staphylococcus epidermidis* (FU et al., 2016), *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium* (LOU et al., 2011) e *Klebsiella pneumonia* (BAJKO et al., 2016).

O mecanismo de ação proposto seria a capacidade do ácido cafeico e dos ácidos clorogênicos, especialmente o ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), o composto majoritário dentre os ácidos clorogênicos do café, se ligarem à membrana celular do microrganismo, aumentando a permeabilidade celular e promovendo despolarização, uma vez que a célula perde a capacidade de manter o potencial de membrana, levando a liberação de nucleotídeos com dano ao material genético e provocando a ruptura e morte celular (LOU et al., 2011; CAI et al., 2019). Duangjai et al. (2016), testaram extratos da polpa de café arábica e verificaram que as zonas de inibição de bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) foram significativamente maiores (a partir de 4,69 mg/mL dos extratos de café) do que de bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*) (a partir de 37,50 mg/mL dos extratos de café). Os autores propõem que muitos fatores, como a estrutura dos microrganismos e a própria composição química dos extratos de café, seriam responsáveis pela atividade antimicrobiana demonstrada. Isso porque compostos relativamente hidrofóbicos, como os ácidos clorogênicos, possuem dificuldade de atravessar a membrana celular de bactérias Gram-negativas. Por outro lado, bactérias Gram-positivas que não apresentam essa estrutura celular, seriam mais susceptíveis à ação desses compostos, podendo provocar alterações de permeabilidade que levam à ruptura da membrana celular (LOU et al., 2011).

O efeito tóxico dos ácidos clorogênicos aos microrganismos pode ser em virtude da inibição enzimática, reações com grupamentos sulfidril das proteínas que levam a alterações no material genético (MASON E WHARSSON, 1987; COWAN, 1999), ou por meio de interações mais específicas, como a inibição das vias de reparo celular (GRIGG et al., 1972). Além disso, os ácidos clorogênicos também exercem efeito antifúngico contra *Candida albicans*, por ruptura da membrana celular e tanto o ácido caféico quanto o 5-CQA são conhecidos por suas propriedades antivirais, especialmente frente ao vírus *Herpes simplex* tipos 1 e 2 (KHAN et al., 2005; FARAH E dePAULA, 2019).

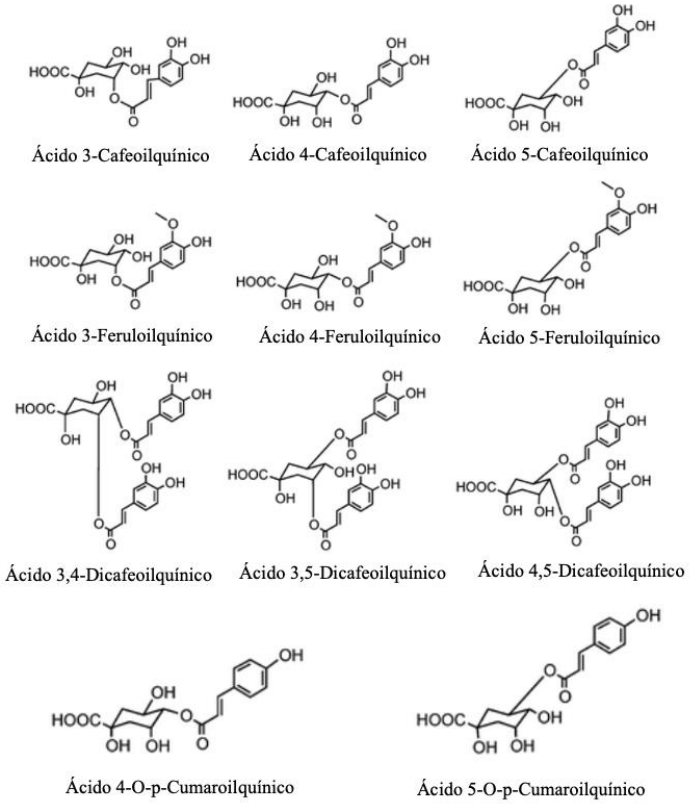


Figura 01: Estrutura dos principais ácidos clorogênicos (adaptado de CLIFFORD et al., 2017).

2.7.2 Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) atua no organismo humano como um antagonista do receptor de adenosina e exerce efeito diurético (**Figura 3**) (SHLONSKY et al., 2003; SAAB et al., 2014). É o componente mais conhecido do café, em virtude das suas propriedades fisiológicas e farmacológicas (MONTEIRO; TRUGO, 2005). Pertencente ao grupo das xantinas, possui efeito estimulante sobre o sistema nervoso central e sobre o músculo cardíaco (NEHLIG, 2016). Desde a década de 70, a ação antimicrobiana da cafeína vem sendo estudada. Em 1978, Buchanan e Fletcher observaram efeito inibidor da cafeína sobre fungos produtores de micotoxinas. Buchanan et al. (1981) e Chaufoun; Corrêa (2002), também observaram efeito inibidor da cafeína sobre o crescimento micelial de fungos associados ao grão de café.

Ibrahim et al. (2006), estudaram a eficácia da cafeína na inativação de *E. coli* O157:H7, uma bactéria Gram-negativa capaz de provocar intoxicação alimentar com colite hemorrágica. Cepas desse microrganismo foram inoculadas em meio de cultura

rico em nutrientes contendo cafeína em diferentes concentrações (0,25 a 2%). As amostras foram incubadas a 37 °C por 24 horas e o crescimento microbiológico foi monitorado em diferentes intervalos de tempo. Foi observado que a adição de cafeína ao meio de cultura foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli* O157:H7 e que essa inibição foi mais significativa em concentrações superiores a 0,50%. Os autores concluíram que a cafeína é um potencial agente antimicrobiano para o tratamento da infecção por *E. coli* O157:H7 e pode ser utilizada na indústria de alimentos como aditivo, aumentando a segurança microbiológica de diversos produtos (sucos, bebidas prontas para o consumo, dentre outros).

Dash e Gummadi (2008), investigaram o efeito da cafeína no crescimento, morfologia e viabilidade de diferentes microrganismos. A cafeína retardou o crescimento de *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *B. subtilis*. Por outro lado, *Pseudomonas sp.* apresentaram aumento no crescimento após a adição de cafeína ao meio de cultura. De acordo com os autores, a cafeína também afetou a viabilidade das cepas bacterianas. Fato que parece estar associado a alterações na morfologia celular. A *E. coli*, por exemplo, perdeu viabilidade em razão do alongamento anormal das células, enquanto as outras cepas bacterianas Gram-negativas estudadas, como *E. aerogenes* e *P. aeruginosa*, se tornaram inviáveis, devido à completa lise celular que ocorreu após a adição de cafeína. No entanto, as bactérias Gram-positivas (*B. subtilis* e o *S. aureus)* mantiveram a viabilidade celular após a exposição à cafeína.

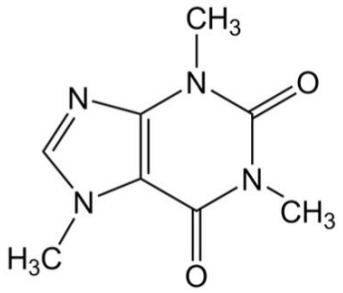


Figura 02: Estrutura da cafeína (ZAKIR et al., 2013).

2.7.3 Trigonelina

A trigonelina é um composto nitrogenado presente nos grãos de café, especialmente, nos ainda verdes (**Figura 2**). Após a torrefação, cerca de 70% desse

alcalóide é transformado em compostos voláteis (MONTEIRO E TRUGO, 2005) e 10 a 20% é convertido a niacina, uma vitamina do complexo B (FARAH, 2017). Com sua degradação térmica, há formação de pirróis e piridinas, que são importantes para o aroma do café (DE MARIA et al., 1999; CASAL et al., 2000). Segundo Farah (2017), o café arábica possui maiores teores de trigonelina quando comparado ao café conilon.

A niacina exerce importante papel sobre o metabolismo energético celular e na reparação do DNA. Além disso, auxilia na remoção de substâncias tóxicas, possui efeito sobre o SNC, na secreção da bile, na motilidade intestinal e apresenta propriedades antimicrobianas (CLARKE E MACRAE, 1985; ALMEIDA et al., 2012). A trigonelina foi capaz de inibir o potencial invasivo de células cancerosas *in vitro* (HIRAKAWA et al., 2005*)* e exerceu efeito antimicrobiano, impedindo o crescimento de *S. mutans*, maior causador de cáries em humanos (ALMEIDA et al., 2012). Da Silva et al. (2014), testaram o efeito antimicrobiano de extratos de café conilon a 20% contra microrganismos cariogênicos e observaram que a trigonelina exerceu atividade bacteriostática e bactericida contra todas as estirpes testadas, exceto para *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595.

Almeida et al. (2006) estudaram a ação antimicrobiana dos ácidos clorogênicos, da cafeína e da trigonelina sobre nove espécies de enterobactérias (*Citrobacter freundii*, *E. aerogenes*, *Enterobacter cloacea*, *E. coli*, *Klebsiela oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Proteus hauseri*, *Salmonella enterica* e *Serratia marcescens*). Os autores observaram que, dentre os compostos bioativos avaliados, a cafeína, a trigonelina e o ácido cafeico foram os que apresentaram maior efeito antimicrobiano nas concentrações de 2,0 a 8,0 mg/mL, após 24 horas de contato. Frente a isso, eles concluíram que esses compostos bioativos possuem ação antimicrobiana efetiva sobre enterobactérias.

O mecanismo de ação da trigonelina ainda não foi completamente elucidado (MOHAMADI et al., 2017). Contudo, este composto já demonstrou atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. enterica*, *Enterococcus faecalis*, *B. subtilis* (ÖZÇELIK et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012; DA SILVA et al., 2014) e propriedades antivirais e antifúngicas contra o vírus *H. simplex* (tipo 1) e os fungos *C. albicans* e *Candida parapsilosis* (ÖZÇELIK et al., 2011).

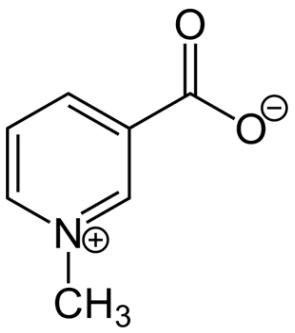


Figura 03: Estrutura da trigonelina (FARAH, 2012).

2.7.4 Melanoidinas

Melanoidinas são pigmentos escuros (castanhos/marrons), formados durante a torrefação do café pela reação de *Maillard* (MOREIRA et al., 2012), que consiste no escurecimento não enzimático devido à reação entre os grupos carbonila de açúcares redutores e o grupamento amino de aminoácidos durante o processamento térmico (HODGE et al., 1953). Correspondem a aproximadamente 25% do peso seco dos grãos de café torrados (BELITZ et al., 2009) e também, estão presentes em cervejas, biscoitos, mel, malte e produtos de panificação. As melanoidinas possuem a capacidade de quelar metais (NUNES E COIMBRA, 2007) e sobre a sua constituição, é proposto que principalmente polissacarídeos como as galactomananas e arabinogalactanas, aminoácidos, compostos fenólicos (especialmente ácidos clorogênicos) e compostos desconhecidos estejam presentes em sua estrutura (BEKEDAM et al., 2006; FARAH et al., 2006; 2012). Já foi demonstrada a presença de 5-CQA, ácido cafeico, ferúlico e quínico em frações de melanoidinas (BORRELLI et al., 2002; BEKEDAM et al., 2008).

As melanoidinas podem ser divididas em frações de baixo, intermediário e alto peso molecular. Aminas heterocíclicas, furanos como o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) e alfa-dicarbonil são os principais compostos das frações de baixo peso molecular das melanoidinas (BEKEDAM et al., 2008; RUFIAN-HENARES, 2008). Vale destacar que o alfa-dicarbonil e o 5-HMF, produtos da degradação de açúcares durante a reação de *Maillard*, demonstraram importante atividade antimicrobiana (DAGLIA et al., 2007). Segundo Moreira et al. (2012), as melanoidinas apresentam propriedade antioxidante, principalmente devido à presença de ácidos clorogênicos incorporados à sua estrutura (DELGADO-ANDRADE et al., 2005; FARAH, 2012; VIGNOLI et al., 2014), atividade

antinflamatória, especialmente a nível hepático, onde poderiam atuar na neutralização da progressão de doenças hepáticas (OHFUJI et al., 2006) e efeito antimicrobiano em concentrações de 2 a 10 mg/mL contra bactérias Gram-positivas como *S. aureus* e *B. cereus* e Gram-negativas como *E. coli, P. mirabilis, P. aeruginosa,* e *S. typhymurium* (RUFIAN-HENARES et al., 2008; 2009).

Observou-se que bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis à atividade antimicrobiana de frações de melanoidinas de alto peso molecular (>10kDa) do que as Gram-negativas. Segundo Rufian-Henares et al. (2008) em baixas concentrações (2,50 mg/mL), as melanoidinas poderiam exercer atividade bacteriostática mediada pela quelação de cobre, zinco e ferro, minerais essenciais ao crescimento e sobrevivência de microrganismos patogênicos (EINARSSON et al., 1983) ou poderiam exercer atividade bactericida em altas concentrações (> 30-35mg/mL ou 5mg/mL para as frações de peso molecular superior a 10kDa), provocando alterações de membrana irreversíveis, removendo íons Mg^{2+} da membrana externa e levando à desestabilização e perda de integridade da parede celular. Também parecem interferir na inibição do transporte de nutrientes (NUNES E COIMBRA, 2007; MORALES et al., 2004). Os mecanismos pelos quais bactérias Gram-positivas parecem ser mais sensíveis às melanoidinas do que bactérias Gram-negativas não estão completamente elucidados (LOU et al., 2011; MOREIRA et al., 2012).

O potencial antimicrobiano das frações de melanoidinas do café contra oito estirpes bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas incluindo *B. cereus* e *E. coli,* foi avaliado por Rufian-Henares et al. (2009). As bactérias Gram-positivas como o *B. cereus* foram mais sensíveis à atividade antimicrobiana das melanoidinas do que as Gram-negativas como *E. coli,* o que foi atribuído à ausência da membrana externa em microrganismos Gram-positivos, tornando-os mais vulneráveis aos compostos antimicrobianos presentes nas frações de melanoidinas como, por exemplo, os ácidos clorogênicos.

Canci et al. (2020), conduziram estudo de atividade antimicrobiana de extratos de café arábica e conilon (0,5%, 2,5% e 5%) frente ao crescimento de *E. coli*. Os autores concluíram que extratos de conilon a concentração de 2,5%, foram suficientes para inibir o crescimento da estirpe testada e os extratos com maiores teores de melanoidinas (0,638 para café arábica e 0,686 para café conilon) foram correlacionados

negativamente com a velocidade de crescimento do microrganismo, isto é, quanto maior o teor de melanoidinas, maior a inibição de *E. coli*. É importante ressaltar que microrganismos Gram-negativos possuem membrana externa e as melanoidinas precisam primeiro penetrar através dessa estrutura celular para que possam atingir a membrana citoplasmática e exercer atividade bactericida ou bacteriostática a depender da concentração. Portanto, esse processo requer mais tempo em bactérias Gram-negativas quando comparado às Gram-positivas que, na ausência de membrana externa, possuem apenas uma parede celular composta por peptídeoglicanos na qual as melanoidinas podem facilmente atuar (RUFIAN-HENARES et al., 2009).

Embora o café tenha grande potencial antimicrobiano, medidas de controle precisam ser adotadas durante a colheita e beneficiamento dos grãos de café com o objetivo de minimizar o risco de contaminação microbiológica (ENTRINGER et al., 2020). Considerando que o processamento ocorre em diversas etapas e alguns microrganismos podem ser resistentes às altas temperaturas da torrefação ou contaminar os grãos de café já torrados nas fases subsequentes, é imprescindível que a devida atenção seja dada às condições higiênico-sanitárias durante o processamento da cadeia do café.

2.8 Cadeia produtiva do café: etapas de processamento, pontos críticos de controle e boas práticas agrícolas e de fabricação

Os cuidados na cadeia do café começam ainda na pré-colheita, com a remoção de folhas, impurezas e a realização da limpeza dos equipamentos e dos locais de armazenamento dos frutos, eliminando qualquer resíduo que tenha ficado da safra anterior para evitar possível foco de contaminação (NASCIMENTO, 2006; BOREM, 2008). A colheita manual do café pode ser feita a dedo (catação) ou por derriça, sendo que a primeira permite melhor seleção dos frutos. A colheita por derriça, por sua vez, pode ser feita no pano ou no chão e medidas de controle devem ser adotadas para diminuir o risco de contaminação nesta fase, como por exemplo limpeza adequada do local destinado à catação, que deve ser livre de vetores e pragas (EMBRAPA, 2016; GUIMARÃES et al., 2019). Máquina colhedeiras podem também ser usadas no processo.

2.8.1 Processamento

Após a colheita, os frutos de café são limpos e, em seguida, se inicia o processamento, cujo objetivo é o controle das impurezas, dos microrganismos e das fermentações indesejáveis (ILLY E VIANI, 2005; HEEGER et al., 2017). Esse processamento pode ser feito pela via seca, pela via úmida ou pela via semiúmida (EMBRAPA, 2016; FARAH, 2019). Na via seca o produto (com casca) ao ser colhido, sai direto da lavoura para secagem, que é tradicionalmente realizada ao sol e, com menos frequência, em secadores. A secagem mista é também comum, especialmente em caso de chuvas. Na via úmida, os frutos sem a polpa passam pelo processo de fermentação em tanques, que ocorre naturalmente com a remoção da mucilagem, degradada por microrganismos que a dissolvem através de reações enzimáticas (AVALLONE et al., 2002; MASSOUD E KALTOFT, 2006). Na via semi-úmida, os frutos são lavados e posteriormente prosseguem à secagem que pode ser feita ao natural ou por meio de secadores mecânicos (OSORIO-HERNANDEZ et al., 2015), podendo haver fermentação parcial.

É importante destacar que a mucilagem pode favorecer o crescimento de fungos e bactérias, o que poderia alterar negativamente a qualidade e segurança dos grãos. Assim, sua eliminação reduz o risco de contaminação por microrganismos (EMBRAPA, 2016). A via seca tem sido tradicionalmente mais utilizada em países ensolarados nos quais as propriedades possuem espaço para espalhamento dos frutos como no Brasil e em países da África (EMBRAPA, 2016). Porém, a via semiúmida, criada no Brasil, ganha vez mais adeptos devido a questões sanitárias e ao desenvolvimento de sabor pela fermentação parcial.

Após a secagem, o grão de café deve apresentar umidade de 10 a 12%, o que impede o crescimento de fungos, a exemplo, *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*, produtores de micotoxinas (CHAUFOUN E CORRÊA, 2002; FOLMER, 2017). Os grãos passam pelos seguintes equipamentos: ‘’bica de jogo’’, composto por um sistema de peneiras para separá-los das impurezas, catador de pedras e metais, descascador (composto por um conjunto de navalhas giratórias) e o classificador que separa o café por tamanho, forma e densidade (ENTRINGER et al., 2020). Finalmente, o grão de café é armazenado a temperatura máxima de 21 ºC, umidade relativa do ar

máxima de 70%, ventilação adequada e proteção contra a incidência de luz solar diretamente sobre o grão (FAGANELLO, 2006).

2.8.2 Torrefação

A torrefação transforma os grãos verdes em grãos secos prontos para a moagem. Essa transformação é essencial para que o café adquira características sensoriais desejáveis, uma vez que os grãos verdes dão origem a uma bebida de sabor e aroma desagradáveis (ANUNCIAÇÃO E SILVA, 2016). Na torrefação do café, os grãos atingem temperaturas entre 170 e 230 ºC (ILLY E VIANI, 2005) o que faz com que a água contida no grão seja convertida em vapor e uma série de reações de escurecimento não enzimático como *Maillard* e caramelização, e pirólise, dentre outras ocorram, formando vasta gama de compostos voláteis (ANUNCIAÇÃO E SILVA, 2016).

Após a torrefação, o teor de água presente no grão deve ser inferior a 3% (LAVAZZA et al., 2018), o que minimiza o risco de contaminação do grão torrado quando comparado ao grão verde, devido a baixa umidade e baixa atividade de água (inferior a 0,6) (ANUNCIAÇÃO E SILVA, 2016). A presença de compostos antimicrobianos no café como os ácidos clorogênicos, a cafeína e as melanoidinas também pode impedir e/ou dificultar o crescimento microbiológico (CANCI et al., 2020).

Após a torrefação, os grãos de café passarão por uma etapa de resfriamento que tem como objetivo reduzir rapidamente a temperatura dos grãos para que eles parem de absorver o calor, cessando as reações endotérmicas e exotérmicas. Este procedimento pode ocorrer por meio da aplicação de ar frio durante 5 minutos (GONZALEZ, 2004) ou pela técnica de resfriamento denominada *quenching*. A maioria dos torradores de médio e grande porte que utilizam transferência de calor principalmente por condução (superfície de contato aquecida), possuem um dispositivo que borrifa pequena quantidade de água nos grãos após a torrefação, para acelerar o processo de resfriamento (BAGGENSTOSS et al., 2008; FOLMER, 2017). Os torradores mais modernos, que utilizam condução (ar quente) ou sistema misto, utilizam ar frio para reduzir a temperatura dos grãos. É importante ressaltar que em pequenas quantidades, não há impacto negativo da água na qualidade dos grãos, já que ocorre evaporação imediata. Porém, se elevada quantidade de água for borrifada nos grãos, pode favorecer

o crescimento de microrganismos pelo aumento de umidade (CARDELLI E LABUZA, 2001). Além disso, deve-se garantir a limpeza e adequada calibração dos dispositivos borrifadores de água dos torradores assim como da caixa d'água e de todos os equipamentos e/ou utensílios utilizados para evitar possíveis pontos de contaminação no café já torrado (ENTRINGER et al., 2020).

2.8.3 Moagem

Nesta etapa, os grãos de café são reduzidos a partículas menores. A granulometria pode variar de extrafina, a fina, média e grossa e o modo de preparo da bebida define o tamanho mais adequado das partículas (ANDUEZA et al., 2003; ABIC, 2012). Cabe destacar que embora o consumo de café em grãos para moagem nos lares venha aumentando nos últimos anos, no Brasil a maior parte da população ainda consome café torrado e moído (85%) (ABIC, 2021). Assim, o estado de conservação e limpeza do moedor e utensílios utilizados durante a moagem nas torrefadoras devem estar adequados de forma a evitar a contaminação do café torrado com microrganismos, impurezas, resíduos e pêlos de animais (BRASIL, 2016; ENTRINGER et al., 2020).

Segundo Alves et al. (2003), o café torrado e moído é mais vulnerável à perda de qualidade pela exposição ao oxigênio, à luz, à umidade e a temperaturas elevadas, porque a granulometria tem influência direta na capacidade de absorção de água. Quanto menor o tamanho das partículas, maior é a absorção. A partir de determinado teor de água há aumento da atividade microbiológica e, consequentemente, maior risco de deterioração do produto (ANUNCIAÇÃO E SILVA, 2016). Outro fator responsável pela perda de qualidade da bebida relacionado à granulometria é a oxidação, uma vez que partículas menores são mais susceptíveis à ação do oxigênio (CARDELLI E LABUZA, 2001). A oxidação das substâncias responsáveis pelo aroma e sabor e dos lipídios presentes nos grãos de café, levam a perda das características sensoriais agradáveis da bebida (FOLMER, 2017).

2.8.4 Envase e transporte

O envase do café é uma etapa de extrema importância no que diz respeito à qualidade e segurança microbiológica do produto. A embalagem tem como objetivo

minimizar a perda de qualidade e reduzir o risco de transmissão de doenças (ALVES et al., 2003). De acordo com Allarcon e Hotchkiss (1993), fatores como a composição do produto, condições de estocagem e propriedade das embalagens são os principais responsáveis pela perda de qualidade do café com o passar do tempo.

No Brasil, a embalagem tipo “almofada” e a embalagem a vácuo são as mais comuns, em virtude do baixo custo de produção (ABIC, 2020). Na primeira, o café é acondicionado na embalagem logo após a torrefação e moagem. Para evitar o abaulamento devido à liberação de gás carbônico, a embalagem era frequentemente furada, o que acabava reduzindo a validade do produto, uma vez que ocorria o contato do café com o oxigênio (ALVES et al., 2003). Atualmente a maior parte das indústrias utiliza uma válvula que permite apenas a saída do gás exalado pelos grãos, evitando o estufamento, sem deixar que o ar externo penetre nas embalagens (FARAH, 2012), porém, indústrias menores podem ainda utilizar técnicas mais primitivas como furar as embalagens. Na embalagem a vácuo, o café torrado e moído passa pela remoção de ar antes de ser acondicionado. Esse tipo de embalagem, age como uma barreira de proteção contra o oxigênio e a umidade, aumentando a vida útil do café (de 1 a 1,5 anos no mercado brasileiro) e desfavorecendo a proliferação de microrganismos que necessitam de oxigênio para a sua sobrevivência (HOFFMAN et al., 2001; ALVES et al., 2003).

Tão importante quanto o tipo de embalagem a ser utilizada, são os cuidados no transporte e distribuição do café, garantindo que em todas as etapas do processamento sejam adotadas medidas higiênico-sanitárias seguras. Durante o transporte, o café deve ficar protegido da umidade e das altas temperaturas. Uma atenção especial deve ser dada aos veículos, garantindo adequado estado de limpeza e conservação, ausência de vetores e pragas e evitando a ruptura das embalagens. Essas medidas são importantes, uma vez que a contaminação microbiológica dos grãos de café ou café já moído após a etapa de torrefação pode colocar em risco a saúde do consumidor, especialmente se o café for destinado ao preparo de bebidas extraídas a frio como os *coldbrews* (BRASIL, 2020). A **Figura 04** resume as principais etapas do processamento e beneficiamento do café e possíveis focos de contaminação do produto baseado nas legislações brasileiras vigentes (EMBRAPA, 2016; BRASIL, 2019).

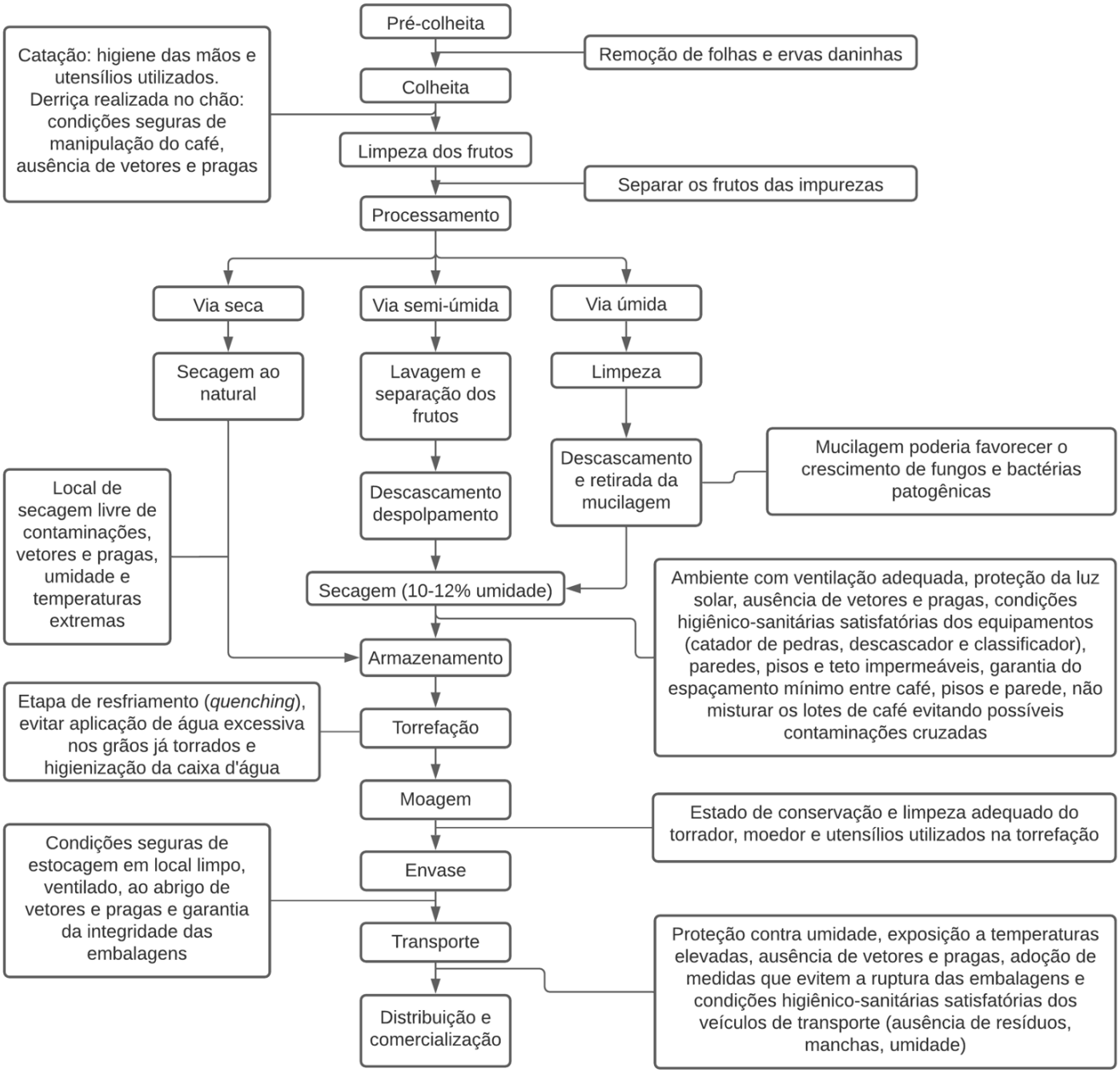


Figura 04: Fluxograma das etapas de processamento e beneficiamento do café e possíveis focos de contaminação microbiológica (Adaptado de FAGANELLO, 2006; FARAH, 2012; ANUNCIAÇÃO E SILVA, 2016; EMBRAPA, 2016; LAVAZZA, 2018; BRASIL, 2019; ENTRINGER et al., 2020).

2.9 Pontos críticos na cadeia produtiva do café

Embora a contaminação do café por fungos, especialmente aqueles produtores de micotoxinas como a OTA (LEITÃO, 2019), seja a que causa maior preocupação por parte dos produtores e consumidores, a contaminação por bactérias patogênicas, como

as enterobactérias, não é incomum e está associada, principalmente, ao descumprimento das normas sanitárias vigentes (SOUZA E ABRANTES, 2012). Em relação à contaminação por fungos, a preocupação com a temperatura e a umidade parece ser um ponto bastante relevante em quase todas as etapas de produção, pois condições de altas temperaturas e umidade tornam o café mais susceptível à proliferação de microrganismos, especialmente, fungos. Assim, o controle dessas duas variáveis é essencial para a qualidade e segurança microbiológica da bebida (TANIWAKI et al., 2003; VIEGAS et al., 2017).

Além disso, a temperatura necessária para torrar os grãos de café, em torno de 170 a 230 ºC, é suficiente para eliminar a maioria dos microrganismos (ILLY E VIANI, 2005; SOUZA E ABRANTES, 2012). Portanto, os procedimentos pós-torrefação devem ser realizados com cautela, estando em conformidade com as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e outros programas de controle de qualidade (PADILHA et al., 2019). As BPF são um grupo de atividades predefinidas com o intuito de assegurar as condições higiênico-sanitárias básicas dos estabelecimentos envolvidos em toda a cadeia produtiva de alimentos, prevenindo danos à saúde do consumidor e garantindo a inocuidade dos alimentos (BRASIL, 2020).

Infelizmente, de acordo com Souza; Abrantes (2012), as BPF vêm sendo negligenciadas na cadeia do café. Esses autores detectaram a presença de *Enterococcus* em 88,1% de 10 amostras de café torrado e moído comercializados na cidade do Rio de Janeiro. Em 2009, os mesmos autores identificaram a presença de *B. cereus* em 13 de 23 (56,5%) amostras comerciais de café torrado e moído analisadas (SOUZA E ABRANTES, 2009). Apesar das limitações do uso desses microrganismos como indicadores de contaminação fecal, sua presença em números elevados em alimentos indica práticas sanitárias inadequadas ou exposição do alimento a condições que permitiram a multiplicação de microrganismos indesejáveis, o que poderia levar ao acometimento por Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (SOUZA E ABRANTES, 2009; 2012).

DTA são provocadas pela ingestão de alimentos ou água contaminados por agentes biológicos, químicos ou físicos, sendo potencialmente prejudiciais à saúde e causa frequente de morbidade e mortalidade no mundo (BRASIL, 2010; BRASIL, 2019). No Brasil, de 2009 a 2018 foram registrados 6.903 surtos alimentares pelo

Ministério da Saúde com 99 óbitos (0,08% de letalidade), 672.873 indivíduos expostos e 122.187 acometidos. Esses surtos foram provocados principalmente por *E. coli* (24% dos casos), *Salmonella sp.* (11,2%), *S. aureus* (9,5%), *B. cereus* (2,6%) (BRASIL, 2021). Em relação à distribuição, o principal local de ocorrência dos surtos foi residencial (36,9% dos casos), seguido de restaurantes e padarias (15,9%) e os principais alimentos reportados foram alimentos mistos (25,5%) e água (21,2%). A **Tabela 02** apresenta os principais microrganismos causadores de DTA e suas características, assim como as formas de transmissão, principais alimentos fonte de contaminação e estudos que tenham registrado a ocorrência desses microrganismos em cafés torrados comerciais (em grãos ou moídos) ou bebidas de café extraídas a frio (BRASIL, 2021).

Tabela 02: Principais agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos e suas características.

Microrganismo	Características	Forma de transmissão	Principais alimentos fonte de contaminação	Contaminação de cafés
Salmonella sp.	Bactéria da família Enterobacteriaceae, Gram-negativa, não encapsuladas e em formato de bacilos, anaeróbias facultativas e não esporulam.	Via fecal-oral, pelo consumo de água e/ou alimentos contaminados.	Ovos, leite, aves, carnes bovina e suína.	15 de 59 amostras de *Coldbrews* comerciais no Canadá (CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY, 2020).
Escherichia coli	Bactéria da família Enterobacteriaceae, Gram-negativa, em formato de cocos, anaeróbias facultativas com maior crescimento em condições aeróbias.	Contato direto com animais ou indivíduos acometidos ou através do consumo de alimentos contaminados.	Carnes, salsicha, leite cru, queijo, alface e água.	9 de 10 amostras comerciais de café torrado e moído no Rio de Janeiro com presença de *E. faecalis* (SOUZA; ABRANTES, 2012).
Staphylococcus aureus	Bactéria da família Micrococcaceae, Gram-positiva e em formato de bastonete, anaeróbias facultativas e não esporulam.	Ingestão de toxinas e/ou manipulação de alimentos por indivíduos contaminados com ferimentos nas mãos, produtos de origem animal mal-cozidos ou refrigerados incorretamente e superfícies, equipamentos e utensílios contaminados.	Leites e derivados, carnes, aves e peixes, molhos para salada, produtos enlatados e de panificação.	Não foram encontrados estudos que tenham detectado a presença de *S. aureus* em amostras comerciais de café ou bebidas de café prontas para consumo.
Bacillus cereus	Bactéria da família Bacilaceae, Gram-positiva, em formato de bacilos, anaeróbia facultativa, esporula e produz 2 tipos de enterotoxinas: diarreica e emética, agentes responsáveis pela intoxicação alimentar.	*B. cereus* encontra-se distribuído na natureza, no solo, nas colheitas de cereais, vegetação, pêlos de animais, água e matéria em decomposição. Ingestão de alimentos contaminados com o microrganismo e/ou com asenterotoxinasproduzidas durante o seu crescimento.	Alimentos frescos (hortifrutigranjeiros e derivados de animais).	13 de 23 amostras comerciais de café torrado e moído no Rio de Janeiro (SOUZA; ABRANTES, 2009).

Adaptado de: FORSYTHE et al., 2013; MELO et al., 2018; ASAE, 2021; Brasil, 2021; PEROTTO et al., 2021.

2.10 Boas Práticas de Fabricação na cadeia do café

Desde 1997, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da portaria 368/97, estabelece os princípios das BPF nos quais se definem como partes do processo produtivo: área de procedência das matérias-primas, condições higiênico-sanitárias, requisitos de higiene como limpeza e sanitização dos estabelecimentos, na manipulação dos alimentos, nas condições de armazenamento e transporte de matérias primas ou produtos acabados. Segundo a EMBRAPA (2004), devem ser aplicadas as Boas Práticas Agrícolas (BPA) na cadeia produtiva do café de forma a garantir a segurança do produto e a reduzir ou mitigar pontos que ofereçam perigos à saúde do consumidor.

Outro documento importante no que diz respeito à segurança dos alimentos no Brasil é a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº. 331/2019, que estabelece novos padrões microbiológicos de alimentos. Nesta RDC ficou definido que os setores envolvidos na cadeia produtiva de alimentos devem realizar análises periódicas e assegurar que, durante todo o prazo de validade, os alimentos cumpram com os novos padrões microbiológicos definidos na Instrução Normativa nº. 60/2019 (BRASIL, 2019). Desta forma, ficam estabelecidos que na categoria ‘’cafés, chás e produtos para infusão’’ não devem conter mais do que 10^2 unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) de *E. coli* e ausência de *Salmonella sp.* em 25g do produto. Infelizmente, não há nesta categoria parâmetro estabelecido para *B. cereus,* apesar de já ter sido demonstrada a contaminação de amostras comerciais de café torrado e moído com esse microrganismo (SOUZA E ABRANTES, 2009).

Recentemente, foi apontada a necessidade de um passo a passo de preparo seguro de bebidas de café, especialmente as extraídas a frio da categoria *coldbrew*, uma vez que estão com alta popularidade e elevado consumo a nível doméstico e comercial (NORTHROP et al., 2018; por CLAANSSEN et al., 2021; LACHENMEIER et al., 2021). Para a elaboração desse passo a passo, os autores sugerem a utilização do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) que consiste em um sistema de levantamento de perigos biológicos, químicos e físicos na cadeia produtiva do café com o objetivo de controlá-los, nos chamados Pontos Críticos de Controle (PCCs), durante a sua produção, processamento e/ou beneficiamento (PADILHA et al., 2019). É importante ressaltar que tanto o sistema de BPF quanto o APPCC atendem aos requisitos de qualidade do *International Organization for Standardization* (ISO) como,

por exemplo, a ISO 22.000 específica para a segurança microbiológica de alimentos (BRASIL, 2019). Assim, a aplicação do sistema de BPF na extração e comercialização de *coldbrews* atenderia, a nível nacional, o proposto a nível internacional por Claanssen et al. (2021).

2.11 *Coldbrews*: técnicas de preparo, caracterização físico-química e riscos de contaminação microbiológica

2.11.1 Técnicas de preparo das bebidas de café da categoria *coldbrew*

A extração do café a frio é feita em temperaturas muito baixas e isso gera problemas específicos. Um deles é o longo tempo para concluir a extração, que pode levar até 36 horas, dependendo da granulometria e das características desejadas (BODNARIUC, 2020; CASTAÑEDA-RODRIGUEZ et al., 2020; CORDOBA et al., 2019; 2021). A extração a frio pode ser realizada por imersão com ou sem filtro, por gotejamento ou a vácuo.

A extração a frio por imersão é o método mais popular, simples e barato (BODNARIUC, 2020), que consiste em embeber o pó de café em água gelada ou em temperatura ambiente por um período de 12 a 24 horas, podendo chegar a 36 horas (OH et al., 2014). Essa técnica pode apresentar variações como a utilização de filtros de algodão ou *nylon* (CORDOBA et al., 2019). A extração a frio por imersão depende dos fenômenos físicos de dispersão e difusão para extrair os compostos solúveis do café. Como o processo de dispersão é muito lento, o tempo para concluir a extração é longo. Portanto, algumas vezes, opta-se por fabricar um concentrado de café, também chamado de xarope de café que é diluído em água no momento do consumo (COFFEE BREWING METHODS, 2017). Após o período de imersão, a solução é filtrada e a bebida é servida ou armazenada sob refrigeração, podendo chegar até sete dias de armazenamento (CLAANSSEN et al., 2021).

Existem alguns sistemas comerciais para extração de *coldbrews* através do método de imersão como o *Toddy*®, um equipamento patenteado que alega produzir extratos de chás e *coldbrews* aromáticos e encorpados garantindo maior rendimento final da bebida. Neste dispositivo é utilizado um filtro de papel e, segundo as instruções do fabricante, 2 kg de pó de café devem ser acondicionados sobre o filtro, em seguida 11,2 L de água devem ser adicionados ao recipiente (sem misturar) e aguardar o período

de 12 a 24 horas sob infusão. O rendimento final será de aproximadamente 8 L de *coldbrew* conforme ilustrado na **Figura 05** (TODDY, 2021).

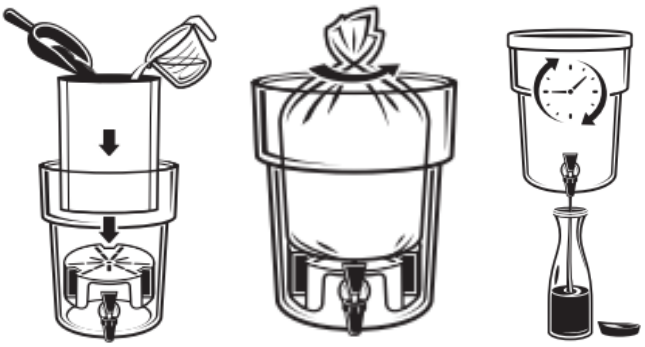


Figura 05: Etapas de utilização do sistema comercial *Toddy*® (Fonte: O próprio fabricante).

A extração a frio por gotejamento é o método de preparo no qual a água gelada é lentamente gotejada sobre o café moído. Também é conhecido como *café holandês (Deutch coffee)* ou *Kyoto-Style.* Na extração a frio por gotejamento, a água ‘’lava’’ os compostos solúveis do café e é passada através de um filtro para um recipiente coletor. O gotejamento depende da difusão e da gravidade para extrair os compostos solúveis. Nesse método, *coldbrews* são fabricados em aproximadamente 3,5 horas, isto é, uma extração mais rápida do que os métodos de imersão (COFFEE BREWING METHODS, 2017; ANGELONI et al., 2019a). Entretanto o tempo de extração varia de acordo com o volume de água utilizado.

Também existem sistemas comerciais de extração de *coldbrews* a partir da técnica de gotejamento como o *ColdBruer*® e a *Nispira*®, equipamentos patenteados que produzem bebidas de café extraídas a frio e possuem três compartimentos: um recipiente onde deve ser acondicionada a água gelada, um recipiente intermediário com um porta-filtro e um filtro de papel onde é depositado o pó de café, uma torneira gotejadora que irá permitir a passagem lenta e constante da água sobre o pó de café e, finalmente, um recipiente coletor do *coldbrew* conforme ilustrado na **Figura 06** (COLDBRUER, 2021; NISPIRA, 2021).

Figura 06: Sistemas comerciais *ColdBruer®* e *Nispira®* (Fonte: Os próprios fabricantes).

Na extração a frio a vácuo, utiliza-se a pressão para acelerar o processo de extração da bebida, cujo tempo é consideravelmente mais rápido, cerca de 35 a 60 segundos. Para tanto, utiliza-se um equipamento de extração adaptado a partir de uma bomba a vácuo conectada a um recipiente com o pó de café sobre um filtro de papel (BODNARIC, 2020). O objetivo da aplicação de vácuo neste caso, é acelerar a difusão dos compostos e sólidos solúveis do café forçando a passagem de água pelas partículas de café torrado e moído. Em 2016, foi divulgada pelo barista Martin Lersch uma maneira alternativa de preparo de *coldbrews* a vácuo, utilizando um aspirador de pó, porta-filtros especiais como *Hario V60®* ou *Kalita®*, filtro de papel, pó de café e água em temperatura ambiente (**Figura 7**).

Segundo Martin Lersch:

> ‘’Quando a pressão do aspirador de pó é liberada, ocorre dissolução dos gases e formação de bolhas que se expandem levando à ruptura das células e liberação dos compostos do café para a bebida’’.

Figura 07: Protocolo de extração a vácuo de *coldbrews* com aspirador de pó (Fonte: LERSCH, 2016).

Até o presente momento, foram encontrados dois sistemas comerciais que utilizam vácuo associado a infusão (quantidade de ar/vácuo não informada pelos fabricantes) para extração de bebidas de café a frio: o *Gourmia* GCM7800 *Brewdini*® e o *VacOne Air Brewer*® (**Figura 8**), que alegam produzir *coldbrews* menos amargos, intensos e com menor acidez. (GOURMIA, 2020; VACCOFFEE, 2021).

Figura 08: Sistemas comerciais *Gourmia* GCM7800 *Brewdini*® e *VacOne Air Brewer*® (Fonte: Os próprios fabricantes).

2.11.2 Caracterização físico-química e segurança microbiológica de *coldbrews*

Apesar do crescimento e popularidade de cafés extraídos a frio (HEO et al., 2019) e do grande consumo de cafés extraídos por métodos tradicionais a quente (DUARTE et al., 2010; BASTOS, 2012; FARAH, 2017), há poucos estudos que avaliam a composição química da bebida, especialmente *coldbrews*. Especialistas (baristas) e apreciadores apontam inúmeras vantagens das técnicas de extração de café a frio em relação aos métodos tradicionais. Segundo eles, *coldbrews* apresentam menor acidez, sabor mais leve e adocicado e aroma intenso, além de ter maior quantidade de substâncias antioxidantes e menor teor de cafeína (FULLER E RAO, 2017; PANOFF, 2019).

Durante o preparo de *coldbrews*, atenção especial deve ser dada à água utilizada na produção do ponto de vista sensorial, físico-químico e microbiológico. A água deve ser isenta de sabores e odores. Além disso, sua dureza, a quantidade de íons magnésio e cálcio presentes na água, não deve prejudicar o processo de difusão dos sólidos do café. Isso porque esses íons podem se precipitar na forma de sais insolúveis e atrapalhar o processo de extração das bebidas a quente e a frio (PETRACCO, 2005; ANGELONI et al., 2019a). A nível doméstico, a maior parte dos indivíduos preparam *coldbrews* com

água filtrada que, dependendo da composição química, pH e dureza, pode interferir nas propriedades químicas e sensoriais e ser um possível foco de contaminação microbiológica da bebida (NAVARINI et al., 2010; FARAH, 2017; CLAANSSEN et al., 2021).

A composição das bebidas de café obtidas por diferentes métodos é variável, uma vez que a temperatura da água, a concentração, a pressão aplicada, a granulometria do pó e o tempo de extração variam (ANGELONI et al., 2019b). Considerando os resultados de estudos prévios, os graus de torrefação mais utilizados vão do médio claro ao médio escuro, dependendo do país. Em alguns lugares, porém, o café ainda é muito torrado, o que tende a reduzir sua capacidade antioxidante e o teor de compostos bioativos importantes (FARAH, 2009; 2012; GLOESS et al., 2013; CORDOBA et al., 2019).

Com relação à granulometria, embora o tamanho da partícula seja frequentemente negligenciado pela maioria dos consumidores, este é um passo importante na extração da bebida, uma vez que existe um tamanho padrão de partícula apropriado para cada método de extração a quente. Porém, ainda não há um protocolo oficial que define a granulometria mais apropriada para os *coldbrews* (ABIC, 2010; BASTOS, 2012; CASTAÑEDA-RODRIGUEZ et al., 2020). Portanto, recomenda-se ajustar o tamanho da partícula à temperatura, à pressão e ao tempo de contato entre a água e o pó de café (BASTOS, 2012; FARAH, 2017). A **Tabela 03** resume a caracterização físico-química de *coldbrews* a partir de dados disponíveis na literatura.

A maioria dos estudos realizados até o presente momento avaliou *coldbrews* apenas na proporção de pó de café para água de 8 a 10% (FULLER; RAO, 2017; ANGELONI et al., 2019a; RAO E FULLER, 2018; CORDOBA et al., 2019; CASTAÑEDA-RODRIGUEZ et al., 2020; RAO et al., 2020) e nenhum trabalho encontrado utilizou café conilon ou robusta no preparo de *coldbrews* para posterior caracterização físico-química. Entretanto, Claanssen et al. (2021), relataram existir grande diversidade nas espécies de café utilizadas pelos apreciadores de *coldbrews* (*C. arabica. C. canephora, C. liberica* ou *blends*) e concentrações (5%, 5 a 10%, 10 a 15%, 15 a 20% e superior a 20%) utilizadas para o preparo de bebidas extraídas a frio, principalmente a nível doméstico. Nesse sentido, torna-se importante investigar a influência e o efeito de diferentes espécies de café e concentrações nas cinéticas de

extração dos compostos bioativos e se essas variáveis poderiam, por exemplo, conferir maior ou menor segurança microbiológica de bebidas da categoria *coldbrew*.

Tabela 03: Caracterização físico-química de *coldbrews* quanto aos teores de ácidos clorogênicos, trigonelina, cafeína, melanoidinas, acidez titulável, pH e sólidos solúveis* (mg/L).

	TA (20-25 ºC) Granulometria Média			**TA (20-25ºC) Granulometria Grossa**			**TR (4-5 ºC) Granulometria Média**			**Referências**
	5-7h	**12-14h**	**22-24h**	**5-7h**	**12-14h**	**22-24**	**5-7h**	**12-14h**	**22-24h**	
AT (mLNaOH/mL)	2,13-8,04	4,83	-	-	-	-	-	-	-	FULLER E RAO, 2017; RAO E FULLER, 2018; ANGELONI et al., 2019b; CASTAÑEDA-RODRIGUEZ et al., 2020.
pH	4,96-5,54	4,90-5,47	4,86-5,60	5,47	5,40	5,12	-	-	5,70	FULLER E RAO, 2017; RAO E FULLER, 2018; ANGELONI et al., 2019a; 2019b; CASTAÑEDA-RODRIGUEZ et al., 2020.
SS (ºBrix)	2,32	2,18	1,09	-	-	1,54	-	-	-	RAO E FULLER, 2018; ANGELONI et al., 2019b; CASTAÑEDA-RODRIGUEZ et al., 2020.
CGA (mg/L)	1730-2200	-	-	-	-	2080	-	-	-	RAO E FULLER, 2018; ANGELONI et al., 2019b; RAO et al., 2020;
5-CQA (mg/L)	480-1120	510	282-354	490	520	1390	-	-	244-272	FULLER E RAO, 2017; RAO; E FULLER, 2018; ANGELONI et al., 2019a; 2019b.
TG (mg/L)	-	-	-	-	-	450	-	-	-	CLAANSSEN et al., 2021.
Cafeína (mg/L)	1060	1180	784-973	1130	1230	-	-	-	761-893	FULLER E RAO, 2017; ANGELONI et al., 2019a;
MEL (Abs. 420nm)	0,386	-	-	-	-	-	-	-	-	RAO et al., 2020.

*Bebidas de café arábica extraídas a frio, na proporção de pó para água de 8 a 10%.
Nota: TA – Temperatura ambiente; TR – Temperatura refrigerada; Abs. – Absorbância; CGA – Ácidos clorogênicos totais; TG – Trigonelina; SS – Sólidos solúveis; AT – Acidez titulável; - Não analisado.

Em relação à temperatura da água, a maioria dos trabalhos utilizam temperatura ambiente (20-25 ºC) no preparo de *coldbrews*. Porém há relatos da utilizaçãode água em diferentes temperaturas (inferior a 4 ºC, entre 4-8 ºC, 10-20 ºC, acima de 20-30 ºC) e, de acordo com alguns autores, à medida que há o aumento da temperatura da água, há o aumento da solubilidade e da taxa de extração e/ou velocidade de difusão de compostos do café para a bebida (CORDOBA et al., 2019; CLAANSSEN et al., 2021), o que poderia explicar o perfil químico e sensorial diferenciado de *coldbrews* extraídos em diferentes temperaturas (ANGELONI et al., 2019a).

Quanto aos teores de compostos bioativos, alguns estudos verificaram que a quantidade de cafeína, ácidos clorogênicos e 5-CQA em bebidas a frio e a quente são semelhantes (LANE et al., 2017; FULLER E RAO, 2017; ANGELONI et al., 2019a; RAO et al., 2020), ao contrário das alegações feitas por fabricantes, de que *coldbrews* teriam menor teor de cafeína e maior teor de compostos antioxidantes. O pH e o teor de sólidos solúveis de *coldbrews* foi maior quando comparado às bebidas a quente, conferindo menor acidez aos *coldbrews* (RAO E FULLER, 2018; RAO et al., 2020). Segundo Gloess et al. (2013), a eficiência de extração dos compostos é influenciada pela solubilidade em água e quanto maior a quantidade de água, maior a extração de compostos dos grãos de café, como, por exemplo, o 5-CQA e a cafeína. Além disso, a solubilidade aumenta conforme aumenta a temperatura e, segundo Rao et al. (2020), alguns compostos formados durante a torrefação não são solúveis em água à temperatura ambiente, como as melanoidinas, por exemplo.

2.11.3 Segurança microbiológica de bebidas da categoria *coldbrew*

Em 2017, o FDA (*Food and Drug Administration*), solicitou que o *Nitro Brew*®, café da marca *Death Wish Coffee*, extraído a frio e acrescido de nitrogênio, fosse recolhido do mercado, devido ao risco de contaminação por *Clostridium botulinum*. Segundo o FDA, a acidez do produto associada à atmosfera modificada e à ausência de oxigênio poderia favorecer o crescimento do microrganismo. Por isso, um relatório do *Center for Disease Control* (CDC, 2017), alertou sobre a importância de avaliar a segurança microbiológica de cafés preparados a partir dos métodos inovadores da categoria *nitro coldbrewing*, por estes apresentarem maiores riscos no processamento. Como os *coldbrews* em geral não são pasteurizados, os microrganismos viáveis após a torrefação não são controlados. O fato do tempo de extração ser estendido poderia favorecer o crescimento microbiológico das bebidas que não são consumidas de forma imediata.

Do plantio até o consumo, o café passa por diversas etapas de processamento, o que aumenta consideravelmente o risco de contaminação do produto por fungos e bactérias, como a *E. coli*, que seria um indicativo de práticas higiênico-sanitárias insatisfatórias e o *B. cereus*, microrganismo naturalmente presente no solo, com capacidade de formar esporos e provocar surtos de DTA. Essas contaminações, além de

prejudicar a qualidade do café ao produzir odores e sabores desagradáveis, poderiam colocar em risco a saúde do consumidor (VIEGAS et al., 2017). Viegas et al. (2017), avaliaram a contaminação por fungos em 28 amostras de café de diferentes países e isolaram 15 espécies de fungos, sendo as espécies *Aspergillus nigri* e *Aspergillus fumigatti* as mais predominantes. Os autores concluíram que a presença de fungos toxigênicos nos grãos de café verde é um achado frequente e, como algumas micotoxinas são resistentes à torrefação, existe a possibilidade dos indivíduos se exporem a elas ao consumir a bebida de café.

Na ausência de processamento térmico, a diminuição do risco de contaminação de *coldbrews* depende, exclusivamente, da refrigeração e da presença de compostos antimicrobianos do próprio café como a cafeína, a trigonelina, os ácidos clorogênicos e, até mesmo, as melanoidinas (DAESCHEL et al., 2017; LOPEZ, 2020). Daeschel et al. (2017) inocularam cepas de *E. coli* O15:H7, *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes* em amostras comerciais de *coldbrews* mantidas sob refrigeração a 4 ºC. Os autores verificaram que não houve multiplicação bacteriana em nenhuma das amostras estudadas. Além disso, após 7 dias, não foram detectadas células viáveis de *Salmonella sp.* nas amostras. O mesmo ocorreu em relação à *E. coli* e à *L. monocytogenes* após 11 e 14 dias, respectivamente. Por fim, eles concluíram que a falta de nutrientes e/ou a presenças de substâncias com atividade antimicrobiana fazem do café extraído a frio um meio desfavorável ao crescimento microbiológico.

Mais recentemente, em relatório divulgado pela Agência de Inspeção Alimentar Canadense (CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY, 2020), foram analisadas 59 amostras comerciais de *coldbrews* para verificar a presença de *Salmonella sp.* e *E. coli* O.157. Foi detectada *Salmonella sp.* Em 15 das 59 amostras (25,4%). Segundo o documento, os resultados indicam que *coldbrews* são seguros para o consumo. Porém, a presença de microrganismos patogênicos poderia provocar um surto de DTA em potencial, uma vez que existem muitos pontos críticos no processo de fabricação dessas bebidas relacionados à matéria-prima, qualidade da água, condições de higiene e estado de conservação dos equipamentos, utensílios e boas práticas dos manipuladores.

De modo geral, o risco de contaminação do café, especialmente por bactérias patogênicas é baixo. Isso se deve principalmente, à presença de substâncias antimicrobianas na bebida (DUANGJAI et al., 2016). Como essas substâncias estão presentes em maior ou menor grau, a depender das variáveis envolvidas no processo de

extração (espécie de café, temperatura da água, nível de torrefação, granulometria e proporção de pó para água), tanto as bebidas de café extraídas a frio quanto a quente constituem meio pouco favorável à multiplicação microbiológica (PURO et al., 2016; DAESCHEL et al., 2017; LOPEZ, 2020). Contudo, o risco de contaminação por bactérias e fungos não deve ser subestimado ao longo da cadeia de processamento do café e da produção de *coldbrews*. A **Figura 09** apresenta os principais PCCs identificados no processo produtivo de bebidas de café da categoria *coldbrew*, a nível doméstico, comercial e industrial.

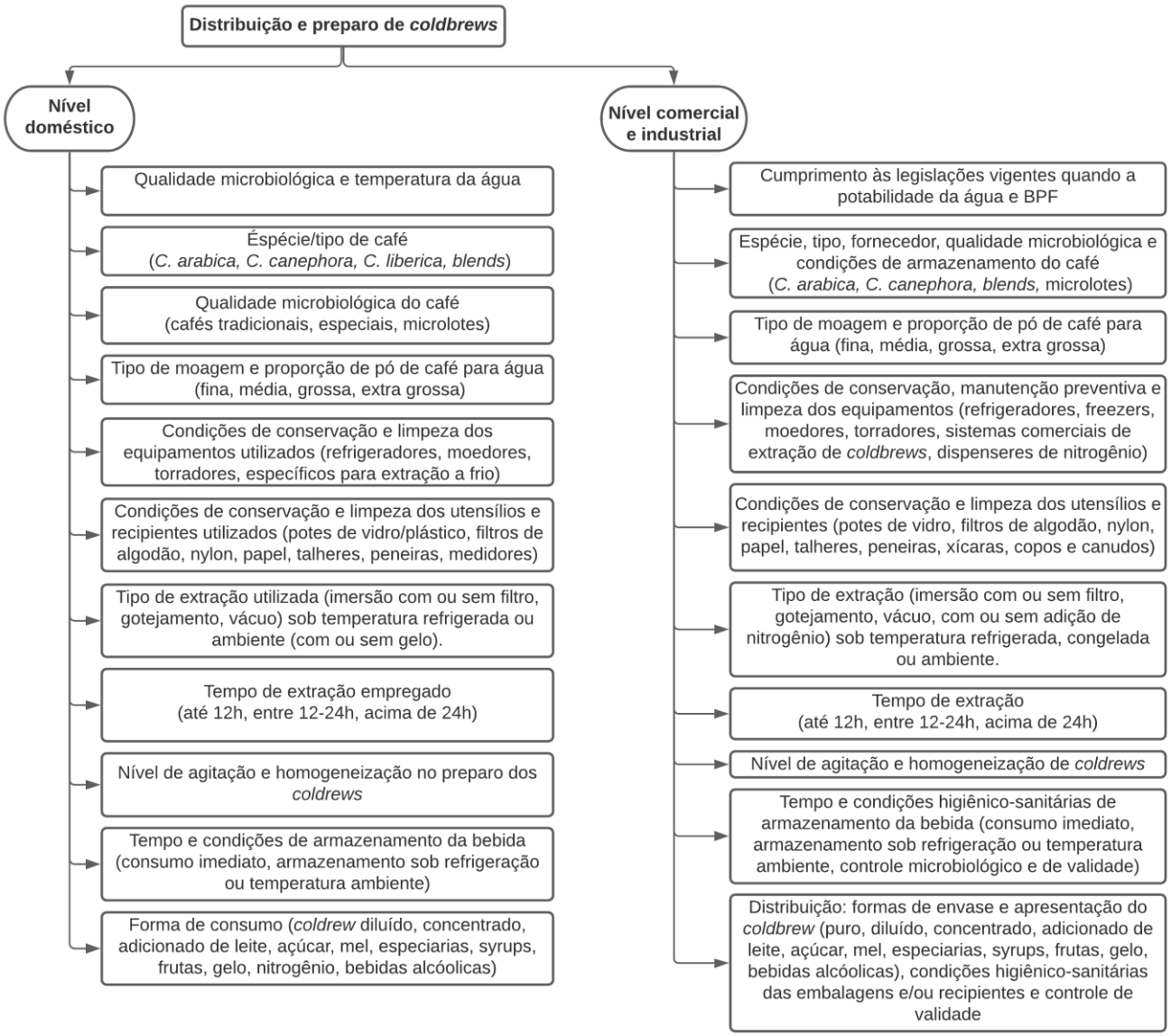


Figura 09: Principais pontos críticos de controle no processo de fabricação de *coldbrews* a nível doméstico, comercial e industrial (Adaptado de PORTARIA CVS-5, 2013; BRASIL, 2016; 2019; PADILHA et al., 2019; 2020; KWOK et al., 2020; LOPEZ, 2020; CLAANSSEN et al., 2021).

3. JUSTIFICATIVA

Apesar do crescimento no mercado global de *coldbrews*, e do grande consumo de cafés extraídos a quente, há poucos estudos que avaliam de forma sistemática a composição química das bebidas, especialmente os *coldbrews*, o que torna difícil confirmar a série de alegações a elas atribuídas, tendo em vista a grande diversidade de variáveis envolvidas no processo de produção (espécie e tipo de café, proporção de pó de café para água, granulometria, tipo e temperatura da água, método e tempo de extração, tempo de armazenamento e forma de consumo). Não há, também, estudos correlacionando esta composição com contaminação microbiológica e são escassos os trabalhos sobre a segurança microbiológica em si e o risco de contaminação e proliferação de microrganismos em bebidas de café a frio.

Independentemente do método de preparo, *coldbrews* geralmente não recebem nenhum processamento térmico, o que, em tese, aumenta a suscetibilidade à contaminação microbiológica, a despeito do efeito antimicrobiano de alguns componentes do café. Além disso, ao longo de toda cadeia produtiva, o café passa por diversas etapas de processamento, o que aumenta consideravelmente o risco de contaminação do produto por fungos e bactérias, que poderiam prejudicar a qualidade do café e colocar em risco a saúde do consumidor.

Considerando as especificidades e características da técnica de *cold brewing* e seu crescente consumo, é de grande importância investigar o risco de contaminação das bebidas desta categoria por microrganismos patogênicos, considerando que o binômio tempo x temperatura poderia ser um facilitador de contaminação e/ ou proliferação microbiológica. Desta forma, estudos que elucidem as questões relacionadas com a cinética de contaminação de métodos de extração a frio das bebidas de café, em relação aos métodos extraídos a quente, são necessários para que se possa entender melhor o risco inerente à ingestão dessas bebidas. É de importância, também, relacionar o risco potencial de crescimento microbiano à composição de compostos bioativos da bebida, a fim de adequar a metodologia de extração de acordo com a composição química desejada, garantindo segurança microbiológica ao consumidor.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar a suscetibilidade de bebidas de café extraídas a frio à inativação de microrganismos, em comparação com bebidas extraídas a quente, e relacionar os resultados com parâmetros físicos, químicos e físico-químicos das mesmas.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

▪ Caracterizar microbiologicamente, bebidas preparadas a partir de grãos moídos das espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, em diferentes concentrações, por métodos a quente e a frio, extraídas em temperatura ambiente e refrigerada e por tempos diferentes;

▪ Avaliar os teores de compostos bioativos (ácidos clorogênicos, cafeína, trigonelina e melanoidinas), pH e sólidos solúveis das bebidas de café em diferentes concentrações, por métodos extraídos a quente e a frio, em temperatura ambiente e refrigerada;

▪ Avaliar o efeito das bebidas de café produzidas a frio e a quente sobre a viabilidade/multiplicação de *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*, em diferentes tempos de incubação;

▪ Determinar as melhores condições de preparo do *coldbrew* a fim de garantir condições higiênico-sanitárias satisfatórias, especialmente face a *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Amostras de café

Para o presente estudo foram adquiridas e utilizadas amostras já torradas de *Coffea arabica* obtida em fazenda localizada na região da Mogiana, no estado de São Paulo, e *Coffea canephora*, cultivar conilon, obtida em fazenda da Serra do Caparaó, no estado do Espírito Santo. Foram escolhidas amostras comerciais de café por se tratar de uma versão mais fidedigna à realidade dos consumidores. As amostras foram torradas por 15 minutos a 223ºC, em torrador Pinhalense® (modelo T1BL, São Paulo, Brasil) até atingir o grau de torrefação médio (#55 escala Agtron-SCAA), visto que este é o mais consumido no mundo devido ao aroma e sabor mais acentuados. Além disso, os cafés de

grau de torrefação médio possuem, em geral, características mais desejáveis em relação ao teor de compostos bioativos do que os mais escuros (FARAH, 2017).

As amostras foram armazenadas sob refrigeração a 4 ºC. Durante os experimentos, os grãos de café foram moídos separadamente em moedor LEOGAP® (modelo de bancada A11 basic, São Paulo, Brasil) para alcançar a granulometria média. Com base em dados da indústria fornecidos pela ABIC, o café em pó foi considerado de granulometria média quando comportou partículas com tamanhos majoritariamente entre 0,71mm e 0,85mm (ABIC, 2012). Foram utilizadas peneiras com a classificação de *Mesh* 20. A escolha pela granulometria média se deu em função das formas mais utilizadas de extração a frio (*colbrew*) serem realizadas com granulometria de média a grossa (CORDOBA et al., 2019; ANGELONI et al., 2019a; CASTAÑEDA-RODRIGUEZ et al., 2020; RAO et al, 2020; CLAASSEN et al., 2021), ao passo que nos métodos extraídos a quente, o tamanho da partícula varia de fino a grossa (FARAH, 2017; ANGELONI et al., 2019b).

6.2 Obtenção das bebidas de café

Todas as bebidas foram preparadas a partir de grãos de café arábica e café conilon, na granulometria média, nas proporções de 5%, 10% e 15% de pó de café para água. A escolha destes valores reflete as principais formas de preparo de bebidas de café quentes e frias no mundo (FARAH, 2017). Foi utilizada água mineral (sem gás, Minalba® com pH de 7.76 e lote L20C0143) esterilizada em autoclave PHOENIX® (modelo AV50, São Paulo, Brasil) a 121ºC, por 15 minutos, refrigerada a 4ºC (TR) e à temperatura ambiente de 25 ºC (TA) para os métodos a frio, e aquecida a 92,5 ºC em placa aquecedora digital CORNING® (modelo PC420D, São Paulo, Brasil) para os métodos extraídos a quente (SCA, 2016).

Optou-se pela utilização de água mineral com pH superior a 7.0 conforme recomendado pelo protocolo *Water for Brewing Specialty Coffee* (SCA, 2009) e Angeloni et al. (2019a), que utilizaram água com pH de 8.10 na extração de *coldbrews* por imersão e gotejamento a 5 e 22 ºC. Além disso, a água com pH de 7.76 também foi utilizada para evitar possíveis interferências desta variável nos experimentos de contaminação intencional, uma vez que o café já possui natureza mais ácida e a utilização de água com pH inferior a 6.0 (por exemplo, água mineral de várias marcas comerciais com pH inferiores à 5.81), poderia exercer algum grau de influência nos

experimentos de cinética de 24 horas das bebidas de café (ANGELONI et al., 2019a). As extrações foram realizadas em triplicatas técnicas. As bebidas foram consideradas prontas após toda água passar pelo pó de café de acordo com a especificidade de cada método.

6.3 Extração à quente

Para comparação com os métodos a frio, foram realizados dois métodos de extração a quente (os mais comumente utilizados no país), descritos a seguir:

6.3.1 Extração a quente por filtro de papel (FPP)

As bebidas foram preparadas de acordo com o protocolo do *Best Brewing Practices* (SCA, 2016). O pó de café foi acondicionado em filtro de papel (Melitta®, número 102) e, posteriormente, foi adicionada água à temperatura de 92,5 ºC em movimentos lentos e circulares, conforme o esquema demonstrado na **Figura 14**. Após a filtração com duração de aproximadamente 2 minutos, as bebidas de café foram armazenadas a 75 ºC pelas 6 horas de duração do experimento, que tinha como objetivo simular a extração a quente e armazenamento da bebida em uma garrafa térmica (SCHENEIDER et al., 2011).

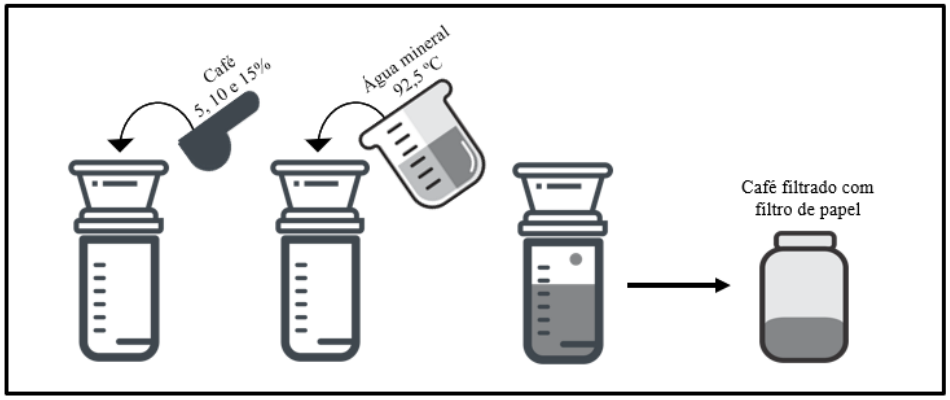


Figura 10: Esquema do método de extração a quente com filtro de papel.

6.3.2 Extração a quente por filtro de pano (FPN)

As bebidas foram preparadas de acordo com o protocolo do *Best Brewing Practices* (SCA, 2016). O pó de café foi acondicionado em filtro de pano (algodão) e posteriormente foi adicionada água à temperatura de 92,5 ºC em movimentos lentos e

circulares, conforme o esquema demonstrado na **Figura 15**. Após a filtração, com duração de aproximadamente 2 minutos, as bebidas de café foram armazenadas a 75 ºC pelas 6 horas de duração do experimento, que tinha como objetivo simular a extração a quente e armazenamento da bebida em uma garrafa térmica (SCHENEIDER et al., 2011).

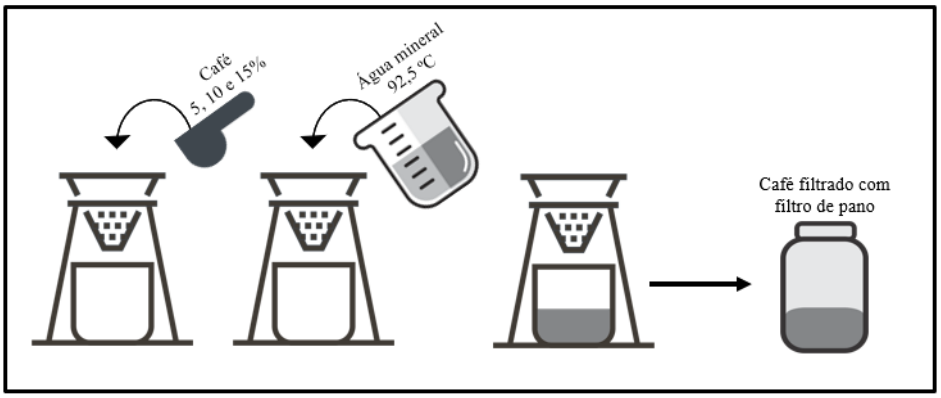


Figura 11: Esquema do método de extração a quente com filtro de pano.

6.4 Extração à frio (*coldbrew*)

Foram realizados quatro métodos de extração a frio, descritos a seguir:

6.4.1 Extração a frio por imersão sem filtro (ISF)

As bebidas foram preparadas segundo o protocolo adaptado do *COFFEE BREWING METHODS* (2017). Neste método, o pó de café foi colocado em recipiente de vidro com tampa estéril e foi imerso em água mineral estéril, nas temperaturas de 4 ºC e 25 ºC, por período de 24 horas, conforme esquema demonstrado na **Figura 10**.

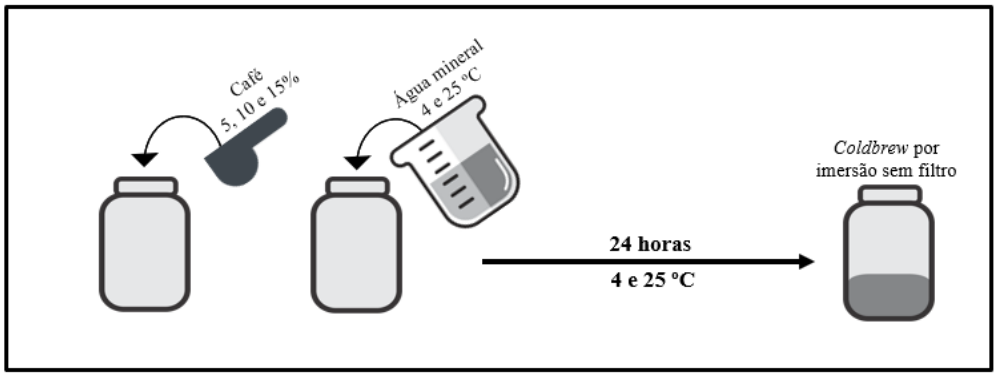


Figura 12: Esquema do método de extração a frio, por imersão sem filtro.

6.4.2 Extração a frio por imersão com filtro de algodão (ICF)

As bebidas foram preparadas segundo o protocolo adaptado do *COFFEE BREWING METHODS* (2017). Neste método o pó de café foi depositado dentro de um ‘’saco de queijo’’ (filtro de algodão) (AUXIN® *NutMilk Bag/Cheese Cloth Bags*, China) estéril, colocado em recipiente de vidro com tampa e foi imerso em água mineral estéril nas temperaturas de 4 ºC e 25 ºC, por período de 24 horas, conforme esquema demonstrado na **Figura 11**.

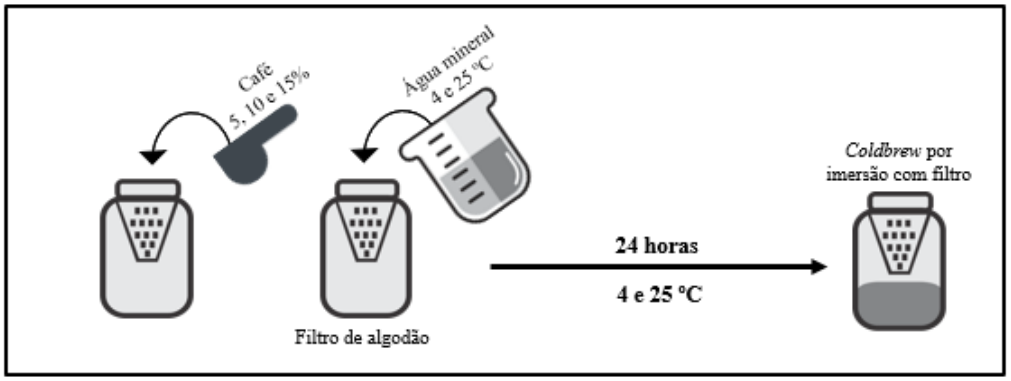


Figura 13: Esquema do método de extração a frio por imersão com filtro.

6.4.3 Extração a frio por gotejamento (Got)

Este método de extração foi realizado a partir do protocolo do *COFFEE BREWING METHODS* (2017) com adaptações. Neste método utilizou-se um sistema estéril de funil de decantação de 125 mL (RONI ALZI, Rio de Janeiro, Brasil) acoplado a um suporte para filtro de papel (Melitta®, número 102) e béquer graduado. A água nas temperaturas de 4 ºC e 25 ºC, foi gotejada sobre o pó de café a uma velocidade de gotejamento de, aproximadamente, 1-2 gotas por segundo (ANGELONI et al., 2019a), conforme esquema demonstrado na **Figura 12**. Após o gotejamento, as bebidas de café foram armazenadas pelas 24 horas de experimento.

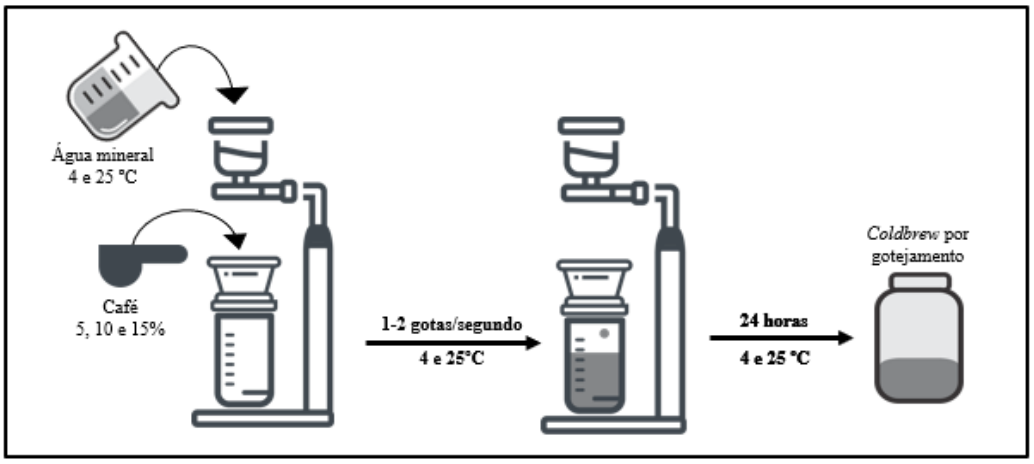


Figura 14: Esquema do método de extração a frio por gotejamento.

6.4.4 Extração a frio a vácuo (Vac)

Para a produção de bebidas desse tipo foi utilizada uma bomba a vácuo FALBE® (modelo 141, Indústria Mecânica Primar Ltda., São Paulo, Brasil) a 0,25 kgf/cm^2, acoplada a dois kitassatos com mangueiras de silicone, sendo um dos kitassatos o recipiente coletor e contendo um funil de porcelana onde foi adicionado filtro de papel (Melitta®, número 102) e o pó de café. O segundo kitassato foi utilizado para vedação do sistema de vácuo, conforme o esquema demonstrado na **Figura 13**. Esse sistema permitiu que o vácuo forçasse o ar para fora da bebida, forçando também a entrada de água. O café foi aspirado e após a pressão normal ser restabelecida, o café foi filtrado e as bebidas de café foram armazenadas pelas 24 horas de experimento (COFFEE BREWING METHODS, 2017).

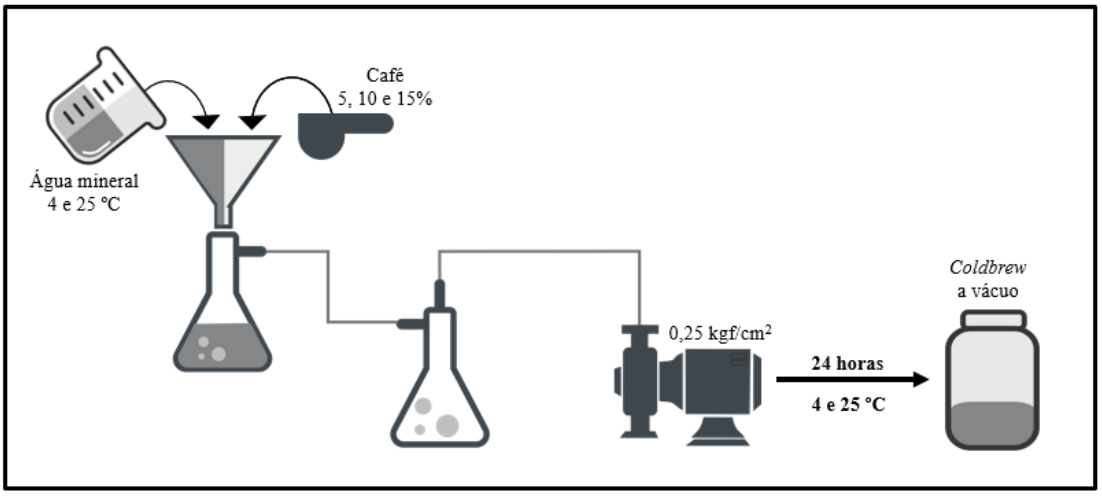


Figura 15: Esquema do método de extração a frio por vácuo.

6.5 Determinação de sólidos solúveis e pH

O pH das bebidas de café foi determinado por meio de potenciômetro digital (*Babyboomersbr®*, Brasil), calibrado com soluções tampão de 4.0 e 7.0. Foram aferidos os valores de pH no tempo final de extração de todas as bebidas extraídas em triplicatas técnicas. As bebidas produzidas foram filtradas em papel *Whatman* número 1 e analisadas quanto ao teor de sólidos solúveis por meio de refratômetro específico *Pocket Refractometer* ATAGO® (modelo PAL-1, Japão). Foram quantificados os teores de sólidos solúveis nos tempos de 0, 3, 6, 9, 12 e 24 horas para os métodos extraídos a frio (inovadores) e 0,3 e 6 horas para os métodos extraídos a quente (tradicionais). Os resultados foram expressos em ºBrix.

6.6 Análise de compostos bioativos

As bebidas foram clarificadas, com precipitação de proteínas e outros compostos de elevado peso molecular, utilizando 1% de cada solução de Carrez (Carrez I [K2Fe(CN)6 - 0,3 M] e Carrez II [Zn(OAc)2 - 1,0 M) para análise de ácidos clorogênicos e cafeína, e acetato de chumbo (60%) para análise de trigonelina. Os extratos das amostras foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detector de feixe de diodos (DAD) – sistema de fase reversa (*Shimadzu*, LC-10-AD, Japão) e coluna C18 (*Phenomenex*, 5µm, 250 x 4.6 mm, Estados Unidos). Padrões de cafeína, trigonelina e 5-CQA, foram adquiridos da *Sigma-Aldrich* (St Louis, MO, Estados Unidos). Ácidos clorogênicos foram analisados utilizando as seguintes condições cromatográficas: ácido fórmico a 0.3% (eluente A) e metanol 100% (eluente B) como fase móvel, em fluxo de 1mL/min, volume de injeção de 50µL; DAD operando a 325 nanômetros (nm) (FARAH et al., 2006). As informações cromatográficas foram gravadas e integradas no *software* LC *Solution* (*Shimadzu*). Os picos cromatográficos foram confirmados pelo espectro ultravioleta visível (UV/*Vis)* de cada composto. O limite de quantificação para ácidos clorogênicos foi 3 µg/100g nessas condições.

Cafeína e trigonelina também foram analisadas em HPLC-DAD, sistema isocrático, operando a 272 nm e 264 nm, respectivamente, em condições cromatográficas consistindo em metanol 40% e 5% como fase móvel, respectivamente,

com limite de quantificação de 5µg/100g nessas condições. Todas as análises foram realizadas em duplicatas técnicas e à temperatura de 15 ºC.

6.7 Análise de melanoidinas ($K_{mix\ 405nm}$)

Os teores de melanoidinas foram medidos indiretamente, usando o coeficiente de extinção das bebidas de café em 405 nm de absorbância, conforme descrito por Bekedam et al. (2006) com adaptações. As soluções aquosas de café foram preparadas dissolvendo 0,01 mL das bebidas de café extraídas a quente e a frio em 100 mL de água desmineralizada (água MilliQ). Cada solução foi preparada imediatamente antes da análise. Os espectros de absorção foram aferidos em espectrofotômetro (Shimadzu UV-2700, Kyoto, Japão). Os coeficientes de extinção específicos (K_{mix}) foram calculados usando a lei de *Lambert-Beer*: Absorbância (-) = K_{mix}× concentração ($g.L^{-1}$) × comprimento de luz (cm). Segundo Bekedam et al. (2006), o uso do coeficiente de extinção específico (K_{mix}) é preferível ao coeficiente de extinção molar, uma vez que os pesos moleculares das melanoidinas são desconhecidos e variáveis. As análises foram realizadas em triplicatas técnicas e os resultados foram expressos em $K_{mix\ 405nm}$.

6.8 Meios de cultura utilizados

Foram utilizados os meios de cultura ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI™ *Brain Heart Infusion Agar*, Kasvi) e ágar Triptona de Soja (TSA™ *Tryptic Soy Agar*, Kasvi) para os experimentos de contaminação dos métodos extraídos a frio; meio de cultura Ágar Batata Dextrose (ABD™ *Potato Dextrose Agar*, Kasvi) para análise de fungos e leveduras; meio de cultura Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB™ *Eosin Methylene Blue Agar*, Kasvi) para confirmação das colônias de *E. coli*; caldo lactose (*Lactose Broth*™, Kasvi) para a análise dos métodos extraídos a quente; Colilert-18® (IDEXX, Maine, EUA) para confirmação das colônias de *E. coli* nos métodos de extração a quente e Ágar Base *Bacillus cereus* (Mossel) (*Bacillus cereus Agar Base Mossel*™, Kasvi) para confirmação das colônias de *B. cereus* nos métodos extraídos a frio e a quente.

6.9 Avaliação dos microrganismos da matéria-prima cultiváveis na matéria-prima

6.9.1 Contagens de bactérias aeróbias cultiváveis

Foram preparadas bebidas de café a partir de grãos torrados e moídos de café arábica e conilon a 5%, 10% e 15% (proporção de pó de café para água), 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC e diferentes métodos de extração a quente e a frio. Uma alíquota de 1 mL de cada bebida de café foi semeada em meio de cultura Ágar Triptona de Soja (TSA™ *Tryptic Soy Agar*, Kasvi) pela técnica de semeadura em profundidade (SILVA et al., 1997) e incubada a 25 ºC e a 37 ºC por 72 horas, em aerobiose. As colônias obtidas das bebidas de café foram isoladas através da técnica de esgotamento e as colônias viáveis foram submetidas à coloração de Gram e observadas em microscópio óptico, usando lente objetiva de imersão de 100x (MORETTI, 2008). Em seguida, as colônias foram submetidas à identificação a partir da técnica de espectrometria de massas.

Estas foram inoculadas em meio de cultura Ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI™ *Brain Heart Infusion Agar*, Kasvi) para realização da análise dos perfis protéicos das amostras e caracterização microbiológica a partir da espectrometria de massas *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectometry* (MALDI-Tof). Os perfis protéicos foram obtidos de acordo com o protocolo de extração, conforme descrito por Carvalho et al. (2016). Essas análises foram realizadas em parceria com o Laboratório de Epidemiologia Molecular das Infecções Bacterianas (LEMIB), no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

6.10 Análise de fungos e leveduras cultiváveis

Foram preparadas bebidas de café a partir dos métodos de extração a quente e a frio, dessa vez, sem a contaminação intencional. Três alíquotas de 300 µL, 300 µL e 400 µL, totalizando 1 mL de amostra, foram semeadas em placas de *Petri* contendo meio de cultura ABD, seletivo para o crescimento de fungos e leveduras, acidificado com ácido tartárico a 10% para ajuste do pH em 3,5. As amostras foram armazenadas em temperatura de 25 ºC por 7 dias em aerobiose. No terceiro e sétimo dias foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias de fungos e leveduras na placa de *Petri*. Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e a partir da técnica de contagem padrão em placa foi possível quantificar o número de microrganismos viáveis

em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) (SILVA, 1996; SILVA et al., 1997; FOWLER, 2013; DINIZ E CEBALLOS, 2017).

6.11 Estirpes utilizadas para inóculo intencional do café

Foram utilizadas as estirpes *Escherichia coli* do *American Type Culture Collection* (ATCC) 25922 e *Bacillus cereus* FF4433, preservadas em meio inclinado BHI e glicerol a 20% (volume/volume), obtidas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Através da técnica de esgotamento, parte do inóculo presente no meio ágar BHI foi inoculado, com auxílio de alça de *Drigalski*, na superfície da placa de *Petri*, contendo ágar BHI e incubada a 37 ºC, por 24 horas, em aerobiose.

6.12 Preparo dos inóculos para os experimentos de contaminação intencional da água de preparo de bebidas de café extraídas a frio e a quente

A partir do cultivo da *E. coli* e do *B. cereus* em meio de cultura BHI em fase logarítmica de crescimento, foram realizadas diluições decimais em solução salina (cloreto de sódio) a 0,85%, de modo a obter concentração inicial de 10^8 UFC/mL, utilizando-se, para isso, a escala nefelométrica de *McFarland* 1,0 (MCFARLAND, 1907). Os testes foram realizados em triplicatas técnicas e os resultados expressos em log UFC/mL.

6.13 Confirmação da contagem dos inóculos por cultivo e contagem em placa

Para garantir que as estirpes utilizadas estavam em condições viáveis de multiplicação, foram realizados testes de viabilidade adicionando 100 µL do inóculo previamente preparado em uma amostra de 100 mL de solução salina estéril a 0,85% e em 100 mL de caldo triptona de soja (rico em nutrientes). A solução salina a 0,85% foi incubada à temperatura de 25 ºC, em aerobiose, durante as 24 horas de experimento e o caldo triptona de soja foi incubado a 37 ºC, por 24 horas, em aerobiose. Foram semeadas alíquotas de 100 µL das respectivas soluções em placas de *Petri* com meio de cultura TSA nos tempos de 0, 3, 6, 9, 12 e 24 horas de incubação, homogeneizando as soluções antes de semeá-las em meio de cultura. Os experimentos foram realizados em

triplicatas técnicas e a partir da técnica contagem padrão em placa, foi possível quantificar o número de microrganismos viáveis em log UFC/mL (SILVA, 1996; SILVA et al., 1997; DINIZ E CEBALLOS, 2017).

6.14 Efeito da utilização de filtros na extração de bebidas de café preparadas com água intencionalmente contaminada com *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*

Este controle foi realizado para quantificar a retenção de microrganismos pelos filtros de papel e de pano e os impactos desta retenção nas análises microbiológicas com as bebidas de café intencionalmente contaminadas. Foram adicionados 100 µL do inóculo previamente preparado com *E. coli* e *B. cereus* em uma amostra de 100 mL de água mineral estéril a 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC. A água contendo os microrganismos na grandeza de 10^5 UFC/mL, foi adicionada sobre os filtros de papel Melitta® número 102, filtro de pano (algodão) e saco para queijo (filtro de algodão) (AUXIN® *NutMilk Bag/Cheese Cloth Bags*, China). Em seguida, foram semeadas alíquotas de 100 µL da solução em placas de *Petri* com meio de cultura TSA, incubadas a 37 ºC por 24 horas em aerobiose e os microrganismos viáveis foram quantificados através da técnica de contagem padrão em placa (FOWLER, 2013; CEBALLOS E DINIZ, 2017). As análises foram realizadas em triplicatas técnicas e os resultados expressos em log UFC/mL.

6.15 Contaminação intencional da água de preparo de bebidas de café extraídas a quente com *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*

Para avaliar a sobrevivência da *E. coli* em bebidas de café extraídas a quente, foram adicionados 100 µL do inóculo previamente preparado em uma amostra de 100 mL de água mineral estéril a 92,5 ºC. A água contendo o microrganismo na grandeza de 10^5 UFC/mL, foi utilizada para o preparo das bebidas de café extraídas a quente. Foi utilizada a metodologia do Número Mais Provável (NMP), que consistiu em retirar alíquotas de 10 mL, 1,0 mL e 0,1 mL, das bebidas de cafés (CEBALLOS E DINIZ, 2017) e semeá-las em tubo de ensaio contendo um tubo de *Durhan* invertido e 10mL de caldo lactose nas concentrações simples e dupla (preparado de acordo com as instruções do fabricante e com apenas 50% do volume de água para as concentrações simples e dupla, respectivamente). Após a inoculação, as amostras foram incubadas a 37 ºC por

24 horas em aerobiose. Quando houve formação de gás no tubo de *Durhan*, o teste foi considerado presumível positivo para a presença do microrganismo pesquisado (CEBALLOS E DINIZ, 2017; CETESB, 2018). Posteriormente, uma alíquota foi transferida para um tubo contendo meio Colilert-18 e incubada a 37 ºC por 24 horas em aerobiose. Foram considerados como positivos para *E. coli* os poços de cor amarela que perante a luz ultravioleta (366 nm) adquiriram fluorescência azul.

Para células vegetativas de *B. cereus*, foram adicionados 100 µL do inóculo previamente preparado em uma amostra de 100 mL de água mineral estéril a 92,5 ºC. A água contendo o microrganismo na grandeza de 10^5 UFC/mL foi utilizada para o preparo das bebidas de café. Após o preparo da bebida utilizando a extração a quente por filtro de pano ou de papel, foram semeadas alíquotas de 1 mL da bebida em placas de *Petri* com meio de cultura TSA, pela técnica de semeadura em profundidade, nos tempos de 0, 3 e 6 horas de extração. As bebidas de café foram armazenadas a 75 ºC pelas 6 horas de duração do experimento, que tinha como objetivo simular a extração a quente e armazenamento da bebida em uma garrafa térmica (SCHENEIDER et al., 2011). As placas foram incubadas a 37 ºC por 24 horas em aerobiose e quantificadas pela técnica de contagem padrão em placa dos microrganismos viáveis (FOWLER, 2013; CEBALLOS E DINIZ, 2017).

Tanto para *E. coli* quanto para *B. cereus*, a diluição do inóculo a 10^{-2}, 10^{-4} e 10^{-6} foi realizada para confirmar que a concentração inicial de microrganismos inoculados nas bebidas de café encontrava-se na grandeza de 10^5 UFC/mL (SILVA, 1996; SILVA et al., 1997). Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e, a partir da técnica de contagem padrão em placa, foi possível quantificar o número de microrganismos viáveis em log UFC/mL.

6.16 Contaminação intencional da água de preparo de *coldbrews* com *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*

Para avaliar a sobrevivência dos microrganismos testados em bebidas da categoria *coldbrews*, foram adicionados 100 µL do inóculo previamente preparado em uma amostra de 100 mL de água mineral estéril a 4 ºC e 25 ºC. A água contendo o microrganismo na grandeza de 10^5 UFC/mL foi utilizada para o preparo das bebidas de café. Após o preparo dos *coldbrews*, foram semeadas alíquotas de 100 µL da bebida em

placas de *Petri* com meio de cultura TSA, nos tempos de 0, 3, 6, 9, 12 e 24 horas de extração, homogeneizando as bebidas de café antes de semeá-las no meio de cultura. As bebidas de café foram armazenadas sob temperatura de 4 ºC e 25 ºC pelas 24 horas de experimento, as placas foram incubadas a 37 ºC por 24 horas em aerobiose e quantificadas através da técnica de contagem padrão em placa dos microrganismos viáveis (FOWLER, 2013; CEBALLOS E DINIZ, 2017).

Para aumentar o limite de detecção, nos experimentos realizados com *coldbrews* intencionalmente contaminados com células vegetativas de *B. cereus*, adicionalmente foram semeadas alíquotas de 1 mL da bebida em placa de *Petri* com meio de cultura TSA através da técnica de semeadura em profundidade (CEBALLOS E DINIZ, 2017). As placas foram incubadas a 37 ºC, por 24 horas, em aerobiose. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas técnicas e foi realizada a diluição do inóculo a 10^{-2}, 10^{-4} e 10^{-6} para confirmar que a concentração inicial de microrganismos inoculados nas bebidas de café encontrava-se na grandeza de 10^{5} UFC/mL (SILVA, 1996; SILVA et al., 1997).

6.17 Análises estatísticas

Os resultados das análises foram tratados por ANOVA seguida de pós teste de *Tukey* no *software GraphPadPrism®*, versão 8.4.3 (San Diego, CA, USA) para as análises químicas e físico-químicas das bebidas de café extraídas a quente e a frio e ANOVA seguida de pós teste de *Fisher* no *software STATISTICA®*, versão 13.4.0.14, para os experimentos de contaminação intencional e análise de melanoidinas. Foram considerados significativos resultados com nível de significância de 95% ou maiores. Os resultados foram apresentados no formato de médias dos valores obtidos e desvio-padrão.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Determinação de pH e sólidos solúveis totais

Até o momento, este foi o primeiro trabalho que avaliou sistematicamente bebidas de café extraídas a frio produzidas a partir de café arábica e conilon, em diferentes concentrações e temperaturas de água e os teores dos principais compostos

bioativos, bem como o efeito na multiplicação de microrganismos potencialmente danosos à saúde humana, o que torna difícil estabelecer comparações específicas.

Os valores de pH das bebidas de café obtidas por métodos tradicionais e inovadores estão apresentados nas **Tabelas 04 e 05** e os teores de sólidos solúveis nas **Figuras 16 a 21**. De forma geral, bebidas de café extraídas a frio e a quente exibiram teores semelhantes de pH. Esses resultados estão de acordo com os reportados na literatura para torra média (ANGELONI et al., 2019a; 2019b; RAO et al., 2020). Cabe destacar, que nesta dissertação foi utilizada água mineral com pH de 7,76 para a produção das bebidas de café, assim como no estudo de Angeloni et al. (2019a), que utilizou água com pH de 8,10 e obteve *coldbrews* com pH de 5,40 a 5,80 para bebidas extraídas a 22 ºC e 5 ºC, respectivamente.

Os valores de pH obtidos foram superiores aos encontrados por Cordoba et al. (2019) (4,36 ± 0,09 e 4,92 ± 0,01 para bebidas a quente e a frio, respectivamente), entretanto esses autores não especificaram o pH da água utilizada. Rao e Fuller (2018), após avaliarem o grau de acidez e a atividade antioxidante do café extraído a frio e a quente concluíram que o grau de acidez da bebida a frio é menor, diferentemente dos achados no presente estudo. Outros autores também relataram que compostos como os ácidos acético, cítrico, málico, láctico, fosfórico, quínico e clorogênicos (5-CQA), poderiam ser responsáveis pela maior acidez observada em bebidas a quente, pois são extraídos rapidamente devido à alta solubilidade em temperaturas mais elevadas (BÄHRE E MAIER, 1999; ILLY E VIANI, 2005; RAO et al., 2020). No presente estudo, no entanto, os valores foram variáveis, não sendo observada diferença entre os valores médios das bebidas semelhantes extraídas a quente e a frio.

Em geral, bebidas de café conilon exibiram teores de sólidos solúveis superiores quando comparadas às bebidas de café arábica. Comparativamente, bebidas de café a frio apresentaram teores superiores de sólidos solúveis do que bebidas extraídas a quente, exceto para o método Vac que exibiu os menores teores de sólidos solúveis em todas as concentrações (**Figura 18**), temperaturas de água e espécies de café utilizadas. Esses resultados são consistentes com os obtidos por Rao et al. (2020) (2,06 ºBrix para o *coldbrew* a 25 ºC e 2,12 ºBrix para o café a quente), Castañeda-Rodriguez et al. (2020) (2,32 ºBrix para *coldbrews* a 25 ºC e 2,18 ºBrix para *coldbrews* a 10 ºC) todos a 10% e Cordoba et al. (2019) (1,87 ºBrix para bebidas de café a 8,5% extraídas a quente)

No caso de *coldbrews*, apesar das baixas temperaturas da água (4 ºC e 25 ºC) dificultarem a difusão dos compostos do pó de café, o longo tempo de contato entre o pó e a água permitiu extrair os sólidos de forma mais eficiente do que nas bebidas a quente (tempo de extração inferior a 2 minutos). De acordo com Nicoli et al. (1991), essa cinética de extração dos compostos é regulada pela espécie de café, grau de torrefação, proporção de água para pó de café (concentração), tamanho das partículas (granulometria), método e temperatura de extração.

Tabela 04: Valores de pH após o preparo de bebidas de café arábica extraídas a frio (4 ºC e 25 ºC) e a quente (92,5 ºC).

Amostra	Concentração (%)	pH	Amostra	Concentração (%)	pH
ISF TA	5	$5,67 \pm 0,06^{aA}$	Vac TA	5	$5,87 \pm 0,06^{bB}$
ISF TA	10	$5,56 \pm 0,06^{aA}$	Vac TA	10	$5,76 \pm 0,06^{bB}$
ISF TA	15	$5,53 \pm 0,06^{aA}$	Vac TA	15	$5,56 \pm 0,06^{aA}$
ISF TR	5	$5,86 \pm 0,06^{bB}$	Vac TR	5	$5,90 \pm 0,00^{bB}$
ISF TR	10	$5,66 \pm 0,06^{aA}$	Vac TR	10	$5,83 \pm 0,06^{bB}$
ISF TR	15	$5,54 \pm 0,06^{aA}$	Vac TR	15	$5,76 \pm 0,06^{bB}$
ICF TA	5	$5,74 \pm 0,06^{aA}$	Got TA	5	$5,63 \pm 0,06^{aA}$
ICF TA	10	$5,63 \pm 0,06^{aA}$	Got TA	10	$5,43 \pm 0,06^{aA}$
ICF TA	15	$5,46 \pm 0,06^{aA}$	Got TA	15	$5,13 \pm 0,06^{cC}$
ICF TR	5	$5,83 \pm 0,06^{bB}$	Got TR	5	$5,76 \pm 0,06^{bB}$
ICF TR	10	$5,77 \pm 0,06^{bB}$	Got TR	10	$5,56 \pm 0,06^{aA}$
ICF TR	15	$5,64 \pm 0,06^{aA}$	Got TR	15	$5,33 \pm 0,06^{aA}$
FPP	5	$5,86 \pm 0,06^{bB}$	FPN	5	$5,76 \pm 0,06^{bB}$
FPP	10	$5,77 \pm 0,06^{bB}$	FPN	10	$5,63 \pm 0,06^{bA}$
FPP	15	$5,66 \pm 0,06^{bA}$	FPN	15	$5,46 \pm 0,06^{aA}$

Nota: ISF – *coldbrew* por imersão sem filtro; ICF – *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo); Vac – *coldbrew* a vácuo; Got – *coldbrew* por gotejamento; FPP – Extração a quente por filtro de papel; FPN – Extração a quente por filtro de pano; TA – Temperatura ambiente (25 ºC); TR – Temperatura refrigerada (4 ºC). Letras maiúsculas diferentes para um mesmo composto significam diferença estatística entre métodos diferentes pelo pós teste de *Tukey* ($p<0,05$) e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística em um mesmo método.

Tabela 05: Valores de pH após o preparo de bebidas de café conilon extraídas a frio (4 ºC e 25 ºC) e a quente (92,5 ºC).

Amostra	Concentração (%)	pH	Amostra	Concentração (%)	pH
ISF TA	5	5,33 ± 0,06^{aA}	Vac TA	5	5,56 ± 0,06^{aA}
ISF TA	10	5,24 ± 0,06^{aA}	Vac TA	10	5,37 ± 0,06^{aA}
ISF TA	15	5,14 ± 0,06^{bB}	Vac TA	15	5,30 ± 0,00^{aA}
ISF TR	5	5,43 ± 0,06^{aA}	Vac TR	5	5,77 ± 0,06^{cC}
ISF TR	10	5,30 ± 0,00^{aA}	Vac TR	10	5,67 ± 0,06^{cC}
ISF TR	15	5,24 ± 0,06^{aA}	Vac TR	15	5,57 ± 0,06^{aA}
ICF TA	5	5,24 ± 0,06^{aA}	Got TA	5	5,33 ± 0,06^{aA}
ICF TA	10	5,13 ± 0,06^{bB}	Got TA	10	5,46 ± 0,06^{aA}
ICF TA	15	5,03 ± 0,06^{dD}	Got TA	15	5,06 ± 0,06^{dD}
ICF TR	5	5,27 ± 0,06^{aA}	Got TR	5	5,23 ± 0,06^{aA}
ICF TR	10	5,33 ± 0,06^{aA}	Got TR	10	5,13 ± 0,06^{bB}
ICF TR	15	5,24 ± 0,06^{aA}	Got TR	15	5,06 ± 0,06^{dD}
FPP	5	5,33 ± 0,06^{aA}	FPN	5	5,33 ± 0,06^{aA}
FPP	10	5,13 ± 0,06^{bB}	FPN	10	5,41± 0,06^{aA}
FPP	15	5,03 ± 0,06^{dD}	FPN	15	5,16± 0,00^{bB}

Nota: ISF – *coldbrew* por imersão sem filtro; ICF – *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo); Vac – *coldbrew* a vácuo; Got – *coldbrew* por gotejamento; FPP – Extração a quente por filtro de papel; FPN – Extração a quente por filtro de pano; TA – Temperatura ambiente (25 ºC); TR – Temperatura refrigerada (4 ºC). Letras maiúsculas diferentes para um mesmo composto significam diferença estatística entre métodos diferentes pelo pós teste de *Tukey* (p<0,05) e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística em um mesmo método.

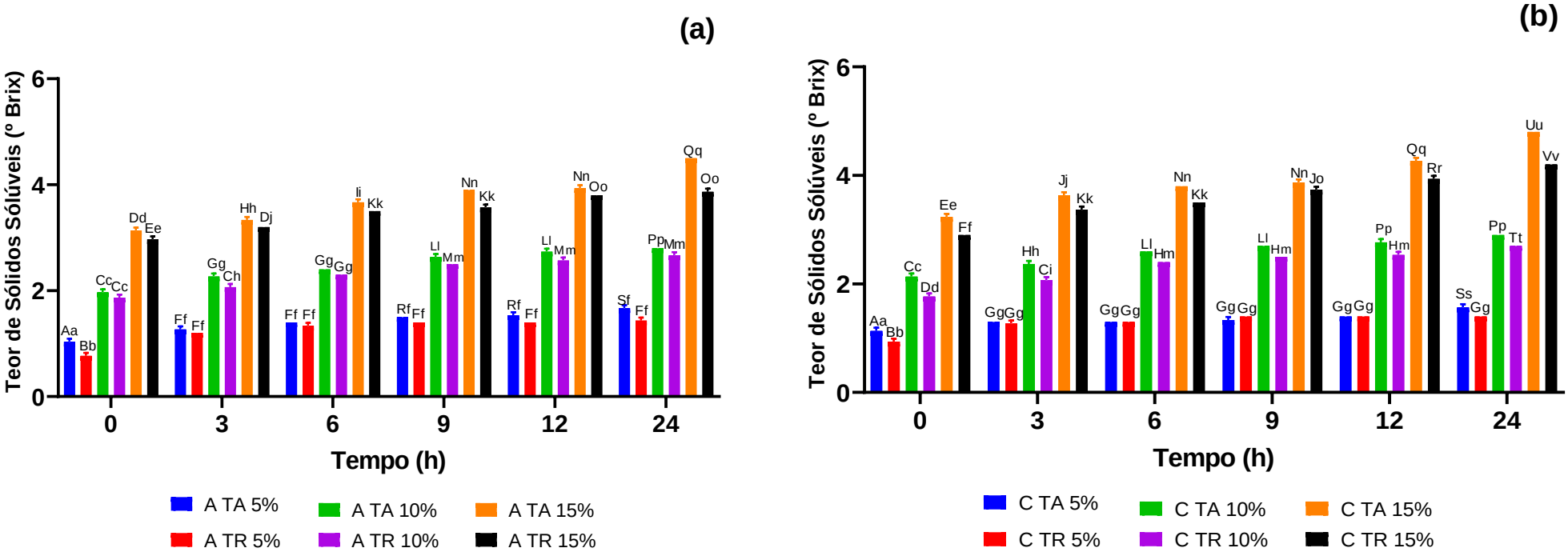


Figura 16: Teor de sólidos solúveis nas bebidas de (a) Café arábica e (b) Café conilon, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC e 25 ºC, por imersão sem filtro (ISF), ao longo de 24 horas. Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre tempos diferentes e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística no mesmo tempo pelo pós teste de *Tukey* (p<0,05).

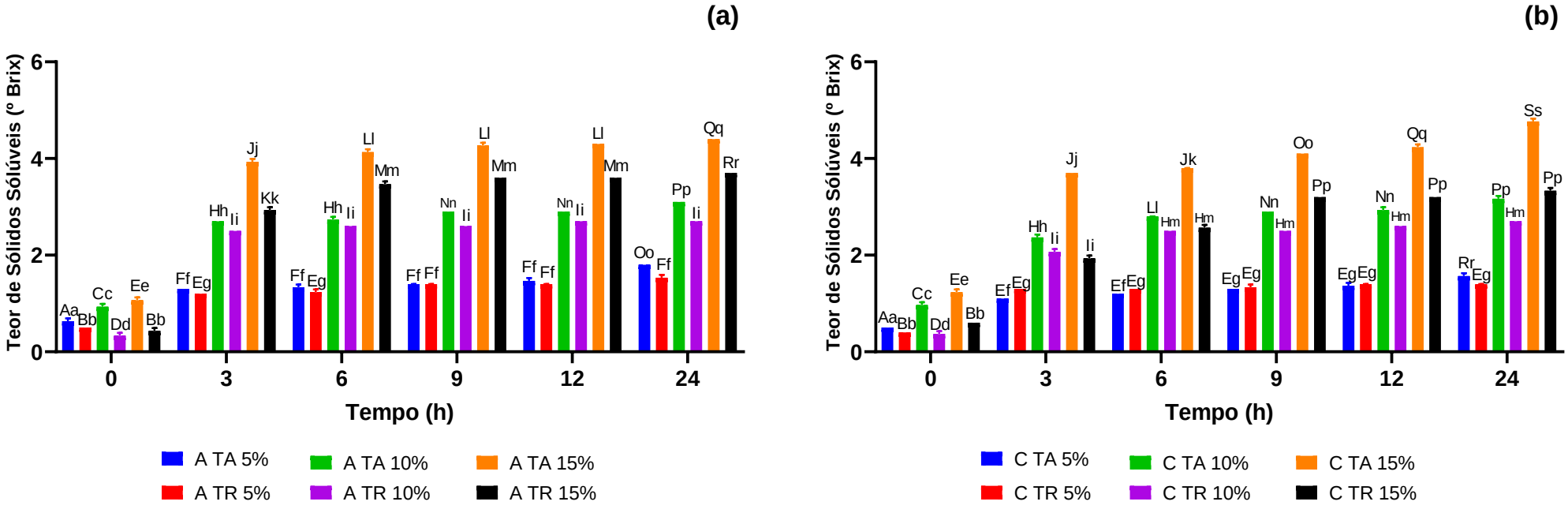


Figura 17: Teor de sólidos solúveis nas bebidas de a) Café arábica e (b) Café conilon, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC e 25 ºC, por imersão com filtro de algodão (saco de queijo) (ICF), ao longo de 24 horas. Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre tempos diferentes e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística no mesmo tempo pelo pós teste de *Tukey* (p<0,05).

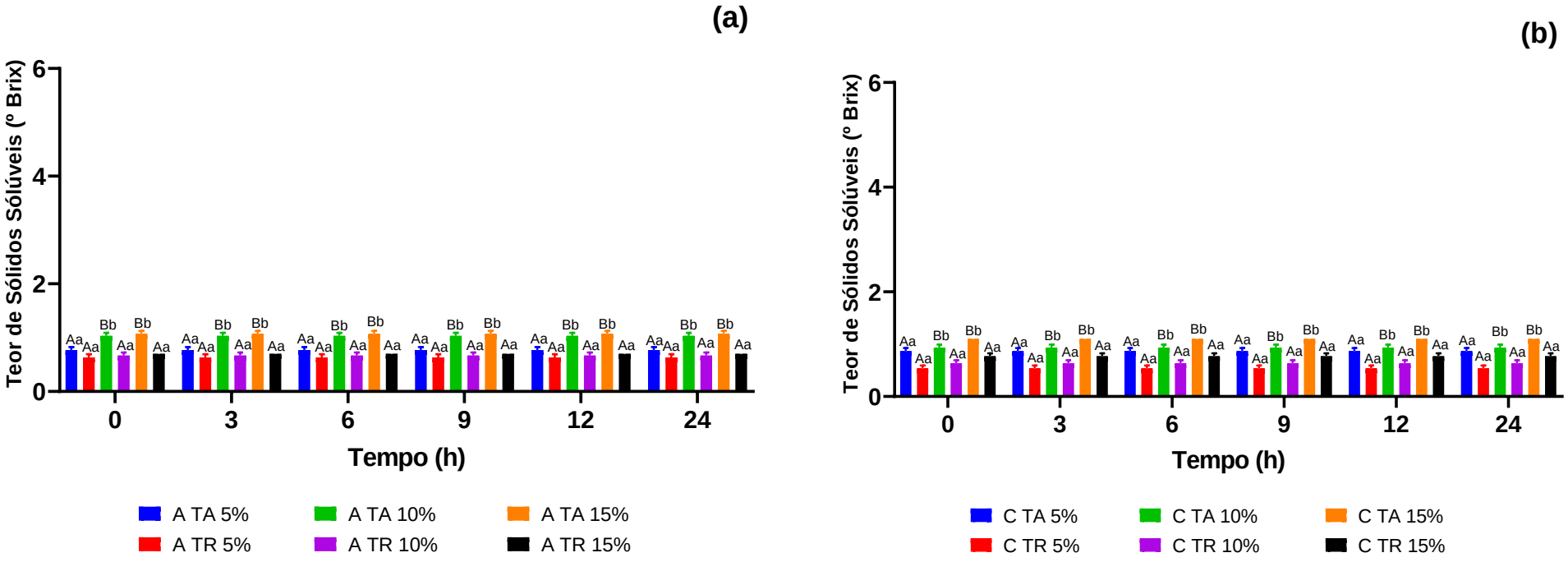


Figura 18: Teor de sólidos solúveis nas bebidas de a) Café arábica e (b) Café conilon, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC e 25 ºC, por vácuo (Vac), ao longo de 24 horas. Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre tempos diferentes e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística no mesmo tempo pelo pós teste de *Tukey* (p<0,05).

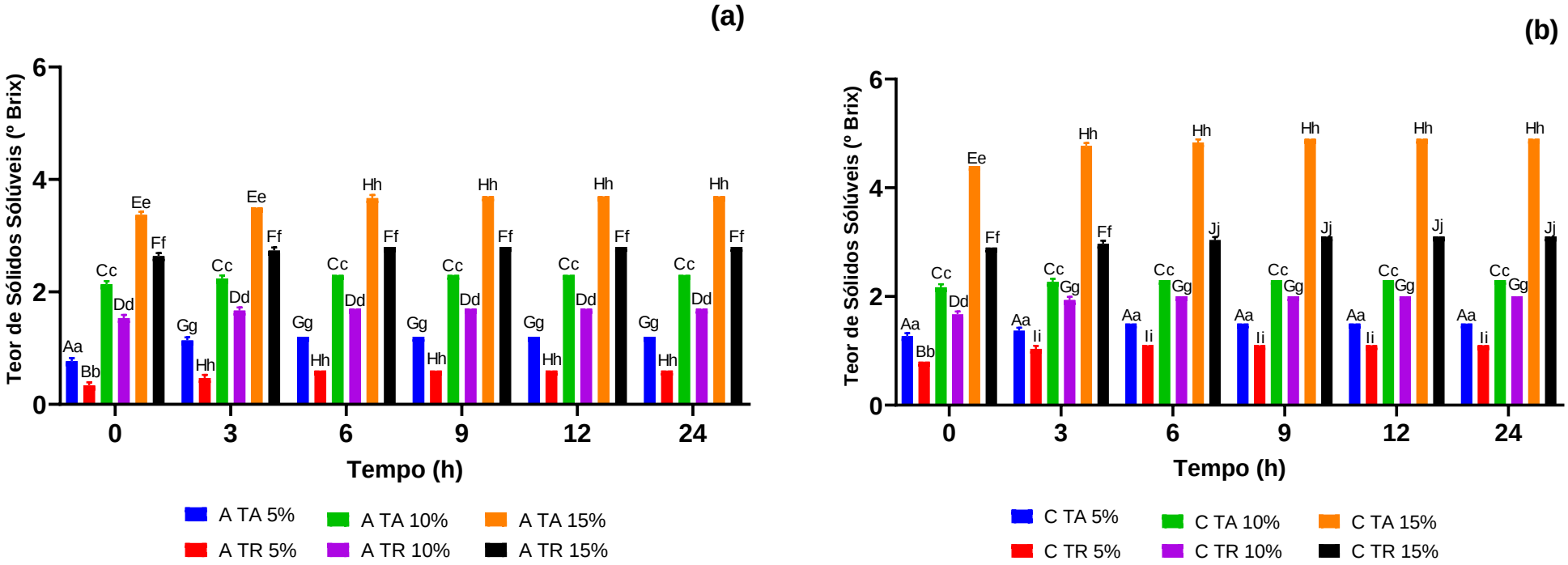
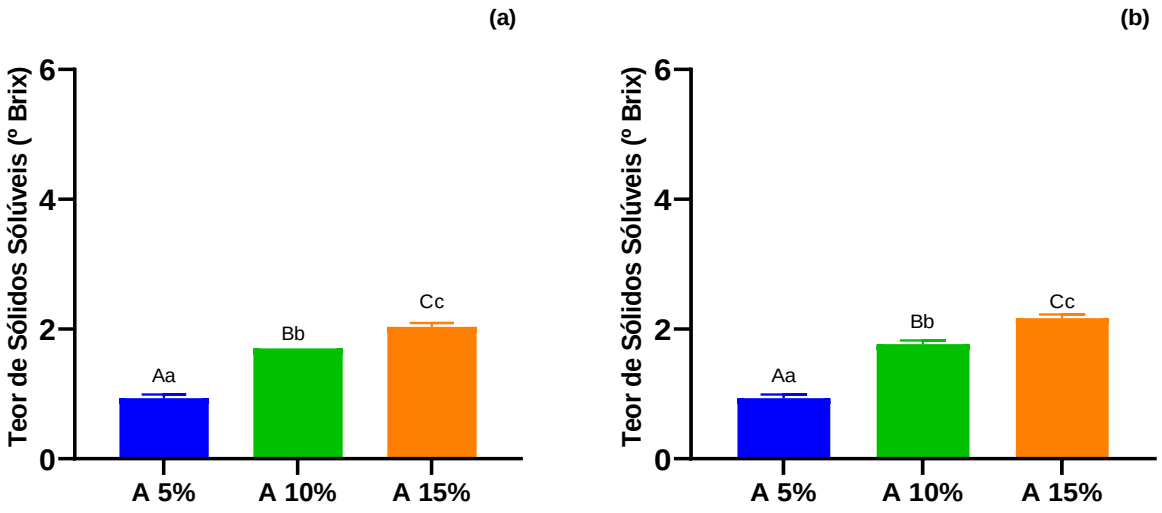


Figura 19: Teor de sólidos solúveis nas bebidas de a) Café arábica e (b) Café conilon, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC e 25 ºC, por gotejamento (Got), ao longo de 24 horas. Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre tempos diferentes e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística no mesmo tempo pelo pós teste de *Tukey* (p<0,05).

Café arábica



Café conilon

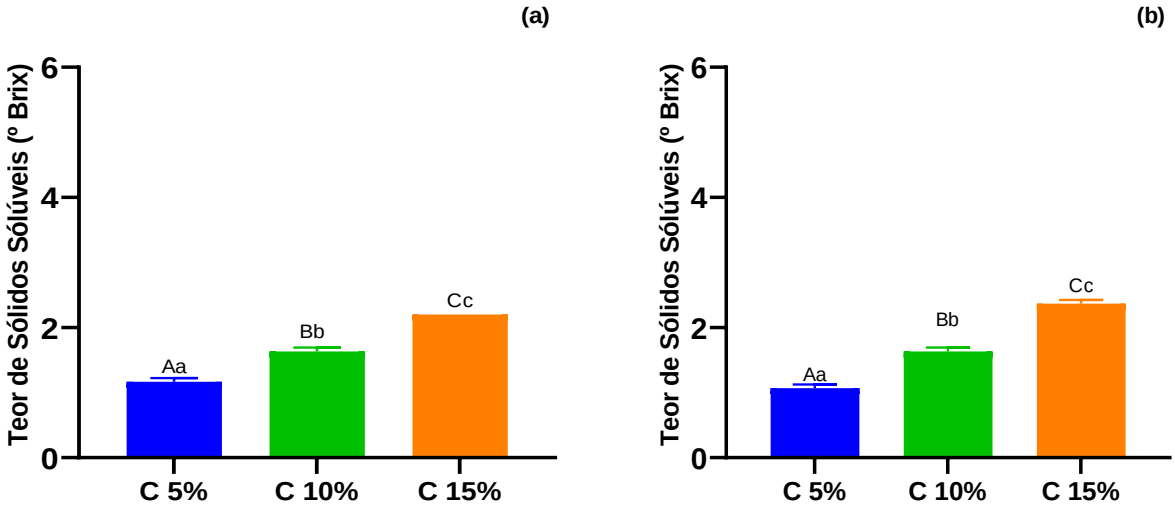


Figura 20: Teor de sólidos solúveis nas bebidas de café arábica e conilon, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 92,5 ºC, através dos métodos (a) filtração por filtro de papel (b) filtração por filtro de pano. Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre tempos diferentes e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística no mesmo tempo pelo pós teste de *Tukey* (p<0,05).

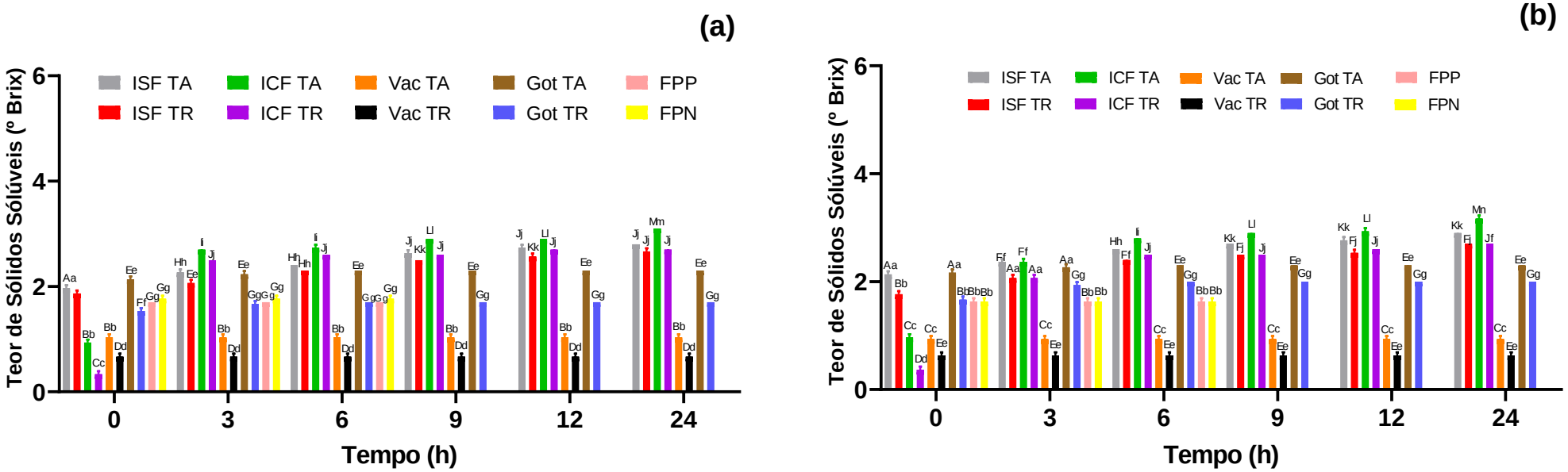


Figura 21: Teor de sólidos solúveis nas bebidas de a) Café arábica e (b) Café conilon extraídas 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC, extraídas pelos métodos de imersão sem filtro, imersão com filtro, vácuo, gotejamento, filtro de papel e filtro de pano, na concentração de 10%. Nota: ISF - *coldbrew* por imersão sem filtro; ICF – *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo); Vac – *coldbrew* por vácuo; Got – *coldbrew* por Gotejamento; FPP – Extração a quente com filtro de papel; FPN – Extração a quente com filtro de pano; TA – temperatura ambiente (25 ºC); TR – temperatura refrigerada (4 ºC). Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre tempos diferentes e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística no mesmo tempo pelo pós teste de *Tukey* (p<0,05).

7.2 Análise de compostos bioativos

Os teores de ácidos clorogênico totais (CGA), cafeína e trigonelina dos grãos de café arábica e conilon estão apresentados na **Tabela 06**. A caracterização dos compostos bioativos em comparação com os sólidos solúveis no tempo final de extração de bebidas de café arábica e conilon a quente e a frio estão apresentados nas **Tabelas 07 e 08**, respectivamente. Os teores de melanoidinas ($K_{mix\ 405nm}$) das bebidas de café a frio e a quente estão apresentados nas **Figuras 22 a 27** e as correlações entre os teores de sólidos solúveis e os compostos bioativos nas **Figuras 28 a 35.**

O café arábica torrado e moído apresentou teores superiores de trigonelina (0,89 ± 0,06 g/100g) em relação ao café conilon (0,67 ± 0,10 g/100 g) que, por sua vez, apresentou maiores teores de CGA (2,70± 0,34 g/100 g) e cafeína (2,17 ± 0,04 g/100 g), em comparação ao café arábica (tabela 06). Esses valores estão de acordo com os reportados por Sualeh et al. (2020) para café arábica na torra média (1,96, 1,29 e 0,87 g/100g para CGA, cafeína e trigonelina, respectivamente) e Pinheiro et al. (2019) para o café conilon na torra média (2,60 a 3,65, 2,20 e 0,84 g/100 g, respectivamente)

Sobre as bebidas de café, à medida que a proporção de pó de café para água aumentou, também aumentaram os teores de compostos bioativos (15% > 10% > 5%) extraídas. De modo geral, os métodos de imersão e gotejamento foram mais eficientes na extração de compostos bioativos. Enquanto os métodos de imersão e gotejamento a frio extraíram melhor os CGA, cafeína e trigonelina foram melhor extraídas a quente. *Coldbrews* (métodos de imersão e gotejamento) em TA, na concentração de 15%, extraíram de 9 a 15% a mais CGA em relação a TR (**Tabelas 07 e 08**). Esses resultados estão de acordo com os apresentados por Angeloni et al. (2019a).

Houve forte correlação entre os teores de sólidos solúveis e compostos bioativos (r = 0,9045 a 0,9996, incluindo as duas espécies). No método Vac, embora com diferença significativa, as correlações foram mais fracas entre os teores de sólidos solúveis e cafeína (r = 0.7298 para arábica e r = 0.7934 para conilon), trigonelina (r = 0.7079 para arábica e r = 0.7715 para conilon) e melanoidinas (r = 0.9578 para arábica e r = 0.9922 para conilon) (**Figuras 22 a 29**) quando comparados aos outros métodos de extração a frio e a quente.

Angeloni et al. (2019a), compararam os métodos de imersão e gotejamento em diferentes temperaturas e verificaram que a 22 ºC houve aumento nos teores de sólidos

solúveis, cafeína e 5-CQA e que o método de gotejamento foi mais eficiente do que o método de imersão. Segundo os autores, isso deve-se ao fato de que no gotejamento há uma constante renovação do solvente (água) aumentando a eficiência de extração dos compostos, diferentemente do método de imersão, um sistema estático que pode resultar em saturação do solvente. Infelizmente, não foram encontrados trabalhos que utilizaram café conilon no preparo de *coldbrews* e que tenham caracterizado quimicamente essas bebidas para fins de comparação.

No presente estudo, *coldbrews* de café arábica e conilon (métodos ISF e ICF a 5% e 10%), exibiram teores de CGA superiores quando comparados ao método Got (a 5% e 10%) e Vac (5%, 10% e 15%) (**Tabelas 07 e 08**). Por outro lado, na concentração de 15% no café conilon, não houve diferença entre os métodos Got e ISF/ICF quando extraídos com água em TA, indicando que pode ter ocorrido, sob estas condições, extração de compostos bioativos na mesma taxa do que os métodos que mantém o pó de café em contato com a água por 24 horas ou que, sistemas estáticos como os de imersão, podem ter levado à saturação do solvente em altas concentrações reduzindo a taxa de difusão e extração dos compostos do café para a bebida (ANGELONI et al., 2019a).

Em relação às bebidas extraídas a quente, os teores de compostos bioativos estão de acordo com os obtidos por Bravo et al. (2012) e Kalschne et al. (2019). Alguns autores sugerem que a quantidade média de cafeína presente no café extraído a frio é semelhante à bebida extraída a quente (LANE et al., 2017; RAO et al., 2020), enquanto outros apontam que bebidas extraídas a frio possuem menores teores de cafeína apenas quando comparadas ao café expresso, mas não quando comparadas a outros métodos de extração a quente como a prensa francesa, o *Aeropress®*, o *HarioV60®* e a cafeteira italiana (ANGELONI et al., 2019b). Muitas alegações feitas acerca dos *coldbrews* são exatamente sobre as bebidas desta categoria possuírem menores teores de cafeína, considerando que este composto possui solubilidade limitada a 16 mg/mL em temperatura ambiente (BUDAVARI et al., 1996; CALDERONI et al., 2015). Esta tendência foi observada na presente dissertação, pois *coldbrews* mais concentrados exibiram teores semelhantes de cafeína às bebidas de café a quente menos concentradas (*coldbrews* a 10% e 15% semelhantes às bebidas de café quente a 5% e 10%, respectivamente).

Quanto à cinética de extração dos compostos bioativos em *coldbrews*, alguns estudos de caracterização química, alegam que não seriam necessários longos períodos de extração (superiores a 12 horas), pois a cafeína e o 5-CQA atingem um equilíbrio de

extração por volta de 6 a 7 horas (FULLER E RAO, 2017; 2018) e o teor de compostos fenólicos e flavonóides em torno de 7 horas para a granulometria média (CASTAÑEDA-RODRIGUEZ et al., 2020). Mais recentemente, foi demonstrado por Claanssen et al. (2021), por meio de de análises de ressonância magnética nuclear, que após 120 minutos para CGA, 140 minutos para cafeína e 40 minutos para trigonelina, não ocorreram modificações significativas nos teores desses compostos, avaliados até 7 horas em *coldbrews* de café arábica, produzidos com água em temperatura ambiente (23 ºC), granulometria grossa e na proporção de pó de café para água de 8%. Contudo, a partir de dados obtidos nesta dissertação, foi demonstrado que, ao longo de 24 horas de extração dos *coldbrews*, houve variação no teor de sólidos solúveis que se correlacionaram fortemente com o teor de compostos bioativos (r = 0.9045 a 0.9884 para os métodos ISF, ICF e Got e r = 0.7079 a 0.9321 para o método Vac). Desta forma, mais estudos são necessários para investigar a cinética de extração desses compostos em função do tempo considerando as diversas variáveis envolvidas na produção de *coldbrews*.

Em relação às melanoidinas, em bebidas extraídas a frio por vácuo e a quente, não houve diferença entre os $K_{mix\ 405nm}$ nos tempos inicial e final dos experimentos. Para os *coldbrews* de café arábica e conilon extraídos a 25 ºC, o método ISF foi o que exibiu os maiores $K_{mix\ 405nm}$ no tempo de 24 horas, seguido por ICF e Got (**Figuras 22 e 24**). Já os *coldbrews* extraídos a 4 ºC, exibiram teores inferiores de $K_{mix\ 405nm}$ quando comparados às bebidas produzidas em temperatura ambiente (**Figuras 23 e 25**). Foram obtidos $K_{mix\ 405nm}$ de 0,119 a 0,759 para café arábica e 0,129 a 0,875 para café conilon nos métodos a quente e $K_{mix405nm}$ de 0,332 a 0,731 para café arábica a 10% e 0,367 a 0,884 para café conilon em *coldbrews* a 10%. Os resultados obtidos são consistentes com os reportados por Rao et al. (2020), que encontraram $K_{mix\ 420nm}$ de 0,572 a 0,777 para melanoidinas de bebidas de café a quente e de 0,386 a 0,422 para *coldbrews* de café arábica a 10%.

Quanto à solubilidade, compostos de alto peso molecular como as melanoidinas tendem a ser mais solúveis em água aquecida (a partir de 80 ºC) (SPIRO et al., 1985). No entanto, à exceção do método Vac, os outros métodos de extração a frio exibiram $K_{mix\ 405nm}$ superiores nas bebidas a frio do que nas bebidas a quente (**Figuras 22 a 27**). É possível que o longo tempo de extração tenha compensado as baixas temperaturas da água (ANGELONI et al., 2019a; 2019b; CORDOBA et al., 2019). Além disso, Bekedam et al. (2008), isolaram e analisaram as frações de baixo, intermediário e alto

peso molecular da melanoidinas. Os autores demonstraram que, na torra média, havia 13% de compostos fenólicos e 5-CQA incorporados às frações de alto peso molecular, 19% nas frações intermediárias e 23% nas frações de baixo peso molecular. Assim, ainda que a solubilidade das frações de alto peso molecular das melanoidinas fique prejudicada nos *coldbrews* devido à baixa temperatura da água, é possível que as frações intermediárias e de baixo peso molecular sejam eficientemente extraídas considerando a alta solubilidade do 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, dentre outros (RAO et al., 2020), o que poderia, mais provavelmente, explicar os valores de $K_{mix405nm}$ obtidos nesta dissertação.

Bebidas de café conilon exibiram teores superiores de $K_{mix405nm}$ quando comparadas às bebidas de café arábica ($K_{mix405nm}$ de 0,025 a 1,446 para café arábica e 0,055 a 1,690 para café conilon, $p<0,01$), resultados consistentes com os reportados na literatura (KALSCHNE et al., 2019; CANCI et al., 2020; SALES et al., 2020).

Tabela 06: Teores de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em grãos torrados e moídos de café arábica e conilon (g/100 g, base seca).

Amostra	CGA*	Cafeína	Trigonelina
Arábica	$1,94 \pm 0,31^{A}$	$1,06 \pm 0,02^{A}$	$0,89 \pm 0,06^{A}$
Conilon	$2,70 \pm 0,34^{B}$	$2,17 \pm 0,04^{B}$	$0,67 \pm 0,10^{B}$

*Somatório dos teores de nove ácidos clorogênicos (ácidos 3-cafeoilquínico, 4-cafeoilquínico, 5-cafeoilquínico, 3-feruloilquínico, 4-feruloilquínico, 5-feruloilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-dicafeoilquínico) e duas lactonas (ácido 3-cafeoilquínico-y-lactona, ácido 4-cafeoilquínico-y-lactona).

Nota: CGA - ácidos clorogênicos totais. Letras diferentes para um mesmo composto, indicam diferença estatística entre as espécies de café pelo pós teste de *Tukey* ($p<0,05$).

Tabela 07: Teores de ácidos clorogênicos, cafeína, trigonelina e sólidos solúveis em bebidas de café arábica extraídas a frio (4 ºC e 25 ºC) e a quente (92,5 ºC).

Trata-mento	Concentração (%)	CGA* (mg)	Cafeína (mg)	Trigonelina (mg)	Sólidos solúveis (ºBrix)
ISF TA	5	82,30 ± 2,57 ^{aA}	39,87 ± 0,20^{aA}	22,50 ± 0,41^{aA}	1,63 ± 0,06^{aA}
ISF TA	10	280,30 ± 4,89^{bE}	65,88 ± 0,41^{bDE}	57,91 ± 0,66^{bC}	2,80 ± 0,00^{bB}
ISF TA	15	356,81 ± 3,97^{cF}	116,68 ± 0,79^{cG}	78,68 ± 0,62^{cD}	4,50 ± 0,00^{cC}
ISF TR	5	79,22 ± 1,92 ^{aABC}	30,00 ± 0,13^{aAB}	20,52 ± 0,55^{aA}	1,40 ± 0,06^{aA}
ISF TR	10	277,26 ± 4,49^{bE}	60,17 ± 0,98^{bE}	55,04 ± 0,10^{bC}	2,66 ± 0,07^{bB}
ISF TR	15	324,77 ± 3,09^{cG}	105,06 ± 0,04^{cFH}	73,60 ± 0,72^{cD}	3,86 ± 0,06^{dD}
ICF TA	5	81,05 ± 0,86 ^{aA}	25,59 ± 0,15^{aBC}	17,44 ± 0,16^{aA}	1,80 ± 0,00^{aA}
ICF TA	10	293,12 ± 1,20^{bE}	58,04 ± 0,01^{bDE}	50,31 ± 0,09^{bBC}	3,10 ± 0,00^{bE}
ICF TA	15	339,01 ± 4,96^{cF}	106,82 ± 0,64^{cGH}	65,64 ± 0,84^{cC}	4,40 ± 0,00^{cC}
ICF TR	5	70,84 ± 1,71^{aAC}	23,18 ± 0,30^{aC}	16,11 ± 1,08^{aA}	1,50 ± 0,00^{dA}
ICF TR	10	278,66 ± 0,45^{bE}	56,16 ± 0,40^{bE}	48,50 ± 0,38^{bBC}	2,70 ± 0,00^{eB}
ICF TR	15	303,73 ± 0,30^{bG}	103,30 ± 0,06^{cGHI}	64,62 ± 0,81^{cC}	3,70 ± 0,00^{fD}
Vac TA	5	18,28 ± 0,25^{aJ}	12,38 ± 0,18^{aC}	8,33 ± 0,06^{aA}	0,77 ± 0,06^{aG}
Vac TA	10	33,00 ± 0,25^{bK}	23,61 ± 0,01^{aC}	14,94 ± 0,87^{bA}	1,03 ± 0,05^{bH}
Vac TA	15	57,65 ± 0,91^{cK}	28,39 ± 0,05^{aBC}	20,91 ± 0,69^{bA}	1,10 ± 0,00^{bH}
Vac TR	5	13,27 ± 0,12^{aJ}	11,70 ± 0,37^{aC}	7,67 ± 0,13^{aA}	0,60 ± 0,00^{aG}
Vac TR	10	16,44 ± 0,06^{aJ}	22,62 ± 0,18^{aC}	12,16 ± 1,16^{bA}	0,67 ± 0,05^{aG}
Vac TR	15	18,21 ± 0,10^{aJ}	19,94 ± 0,69^{aC}	16,83 ± 0,69^{bA}	0,70 ± 0,00^{aG}
Got TA	5	71,09 ± 1,49^{aBC}	45,64 ± 0,11^{aA}	41,79 ± 0,08^{aB}	1,20 ± 0,00^{aA}
Got TA	10	164,03 ± 0,21^{bD}	71,47 ± 0,16^{bDE}	59,02 ± 0,36^{bC}	2,30 ± 0,00^{bB}
Got TA	15	271,46 ± 0,23^{cE}	126,95 ± 0,77^{cI}	86,91 ± 0,83^{cD}	3,70 ± 0,00^{cD}
Got TR	5	38,73 ± 0,16^{aK}	43,63 ± 0,47^{aA}	39,80 ± 0,25^{aB}	0,60 ± 0,00^{dG}
Got TR	10	136,13 ± 0,18^{bD}	64,66 ± 0,67^{bDE}	52,15 ± 0,06^{bC}	1,70 ± 0,00^{eA}
Got TR	15	231,83 ± 0,16^{cH}	114,37 ± 0,25^{cGI}	84,28 ± 0,09^{cD}	2,80 ± 0,00^{fB}
FPP	5	97,35 ± 0,08 ^{aA}	63,75 ± 0,09^{aE}	43,74 ± 0,67^{aB}	1,10 ± 0,00^{aH}
FPP	10	149,55 ± 0,81^{bD}	103,96 ± 0,54^{bFG}	88,19 ± 0,78^{bD}	1,70 ± 0,00^{bA}
FPP	15	178,90 ± 0,41^{cI}	162,86 ± 0,17^{cJ}	135,51 ± 1,63^{cE}	2,10 ± 0,00^{cB}
FPN	5	88,14 ± 0,22 ^{aA}	65,87 ± 0,13^{aE}	45,25 ± 0,76^{aB}	1,00 ± 0,00^{aH}
FPN	10	147,22 ± 1,77^{bD}	108,42 ± 1,63^{bFG}	95,71 ± 0,54^{bD}	1,76 ± 0,05^{bA}
FPN	15	173,89 ± 0,04^{cI}	167,62 ± 1,89^{cJ}	138,11 ± 0,80^{cE}	2,13 ± 0,06^{cB}

*Somatório dos teores de nove ácidos clorogênicos (ácidos 3-cafeoilquínico, 4-cafeoilquínico, 5-cafeoilquínico, 3-feruloilquínico, 4-feruloilquínico, 5-feruloilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-dicafeoilquínico) e duas lactonas (ácido 3-cafeoilquínico-y-lactona, ácido 4-cafeoilquínico-y-lactona).

Nota: CGA* - Ácidos clorogênicos totais; ISF – *coldbrew* por imersão sem filtro; ICF – *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo); Vac – *coldbrew* por vácuo; Got – *coldbrew* por gotejamento; FPP – Extração a quente por filtro de papel; FPN – Extração a quente por filtro de pano; TA – Temperatura ambiente (25 ºC); TR – Temperatura refrigerada (4 ºC). Letras maiúsculas diferentes para um mesmo composto significam diferença estatística entre métodos diferentes pelo pós teste de *Tukey* (p<0,05) e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística em um mesmo método.

Tabela 08:Teores de ácidos clorogênicos, cafeína, trigonelina e sólidos solúveis em bebidas de café conilon extraídas a frio (4 ºC e 25 ºC) e a quente (92,5 ºC).

Trata-mento	Concentração (%)	CGA* (mg)	Cafeína (mg)	Trigonelina (mg)	Sólidos solúveis (ºBrix)
ISF TA	5	103,40 ± 0,75^{aA}	68,59 ± 0,35^{aA}	18,68 ± 0,21^{aA}	1,56 ± 0,06^{aA}
ISF TA	10	292,95 ± 0,98^{bD}	137,83 ± 0,16^{bC}	44,72 ± 0,58^{bBC}	2,90 ± 0,00^{bB}
ISF TA	15	365,03 ± 1,00^{cI}	192,91 ± 0,56^{cE}	68,45 ± 0,16^{cD}	4,80 ± 0,00^{cC}
ISF TR	5	98,39 ± 1,07^{aAB}	65,20 ± 0,74^{aA}	15,56 ± 0,16^{aA}	1,40 ± 0,00^{aA}
ISF TR	10	281,07 ± 0,39^{bD}	125,56 ± 0,19^{bC}	42,66 ± 0,33^{bBC}	2,70 ± 0,00^{bB}
ISF TR	15	346,33 ± 1,57^{cJ}	164,65 ± 1,47^{cH}	65,18 ± 0,05^{cD}	4,20 ± 0,00^{cD}
ICF TA	5	107,66 ± 0,82^{aA}	54,08 ± 0,16^{aA}	14,67 ± 0,45^{aA}	1,56 ± 0,06^{aA}
ICF TA	10	306,92 ± 0,83^{bE}	110,05 ± 0,08^{bB}	42,00 ± 0,21^{bBC}	3,17 ± 0,06^{bE}
ICF TA	15	346,83 ± 2,20^{bJ}	208,68 ± 1,31^{cE}	58,90 ± 1,10^{bC}	4,76 ± 0,05^{cC}
ICF TR	5	98,96 ± 1,14^{aAB}	45,15 ± 0,11^{aAJ}	13,08 ± 0,19^{aA}	1,36 ± 0,05^{aA}
ICF TR	10	286,88 ± 1,91^{bD}	102,58 ± 0,28^{bB}	39,54 ± 0,30^{bBC}	2,67 ± 0,06^{dB}
ICF TR	15	338,64 ± 0,14^{cJ}	193,43 ± 0,07^{cE}	55,99 ± 0,16^{bC}	3,34 ± 0,06^{eF}
Vac TA	5	22,89 ± 0,11^{aK}	14,32 ± 0,05^{aI}	7,50 ± 0,59^{aA}	0,77 ± 0,05^{aG}
Vac TA	10	34,37 ± 0,20^{aK}	37,26 ± 0,03^{bJ}	12,29 ± 0,06^{aA}	0,94 ± 0,05^{bH}
Vac TA	15	61,79 ± 0,69^{bL}	55,62 ± 0,05^{cA}	17,05 ± 1,03^{aA}	1,10 ± 0,00^{bH}
Vac TR	5	12,86 ± 0,07^{aK}	12,82 ± 0,10^{aI}	6,33 ± 0,17^{aA}	0,50 ± 0,00^{aG}
Vac TR	10	19,65 ± 0,28^{aK}	26,87 ± 0,16^{aI}	11,05 ± 0,40^{aA}	0,60 ± 0,00^{aG}
Vac TR	15	26,05 ± 0,05^{aK}	41,31 ± 0,10^{bJ}	13,60 ± 0,54^{aA}	0,74 ± 0,05^{aG}
Got TA	5	82,19 ± 0,09^{aB}	61,87 ± 0,11^{aA}	36,06 ± 0,13^{aB}	1,50 ± 0,00^{aA}
Got TA	10	170,40 ± 0,44^{bF}	122,12 ± 0,57^{bBC}	51,82 ± 1,00^{bC}	2,30 ± 0,00^{bB}
Got TA	15	363,71 ± 0,49^{cI}	186,11 ± 0,72^{cDE}	79,39 ± 1,17^{cD}	4,90 ± 0,00^{cC}
Got TR	5	58,57 ± 0,26^{aM}	55,77 ± 0,83^{aA}	25,27 ± 7,04^{aA}	1,10 ± 0,00^{aH}
Got TR	10	154,91 ± 0,16^{bG}	115,98 ± 0,80^{bB}	50,23 ± 0,02^{bC}	1,97 ± 0,06^{dI}
Got TR	15	309,20 ± 0,58^{cE}	174,28 ± 0,41^{cEH}	73,81 ± 0,68^{cD}	3,07 ± 0,06^{eE}
FPP	5	128,34 ± 0,42^{aC}	104,22 ± 0,93^{aB}	36,76 ± 0,74^{aB}	1,20 ± 0,00^{aH}
FPP	10	193,22 ± 0,88^{bH}	183,05 ± 0,74^{bD}	68,97 ± 0,38^{bD}	1,60 ± 0,00^{bA}
FPP	15	281,41 ± 0,94^{cD}	230,53 ± 0,06^{cG}	103,40 ± 1,47^{cE}	2,20 ± 0,00^{cB}
FPN	5	103,28 ± 0,83^{aAC}	113,85 ± 1,15^{aB}	34,68 ± 0,87^{aB}	1,10 ± 0,00^{aH}
FPN	10	170,87 ± 1,17^{bFGH}	177,62 ± 1,39^{bD}	77,64 ± 1,41^{bD}	1,60 ± 0,00^{bA}
FPN	15	256,86 ± 0,76^{cD}	285,10 ± 2,55^{cF}	113,34 ± 0,91^{cE}	2,40 ± 0,00^{cB}

*Somatório dos teores de nove ácidos clorogênicos (ácidos 3-cafeoilquínico, 4-cafeoilquínico, 5-cafeoilquínico, 3-feruloilquínico, 4-feruloilquínico, 5-feruloilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-dicafeoilquínico) e duas lactonas (ácido 3-cafeoilquínico-y-lactona, ácido 4-cafeoilquínico-y-lactona).

Nota: CGA* - Ácidos clorogênicos totais; ISF – *coldbrew* por imersão sem filtro; ICF – *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo); Vac – *coldbrew* por vácuo; Got – *coldbrew* por gotejamento; FPP – Extração a quente por filtro de papel; FPN – Extração a quente por filtro de pano; TA – Temperatura ambiente (25 ºC); TR – Temperatura refrigerada (4 ºC). Letras maiúsculas diferentes para um mesmo composto significam diferença estatística entre métodos diferentes pelo pós teste de *Tukey* (p<0,05) e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística em um mesmo método.

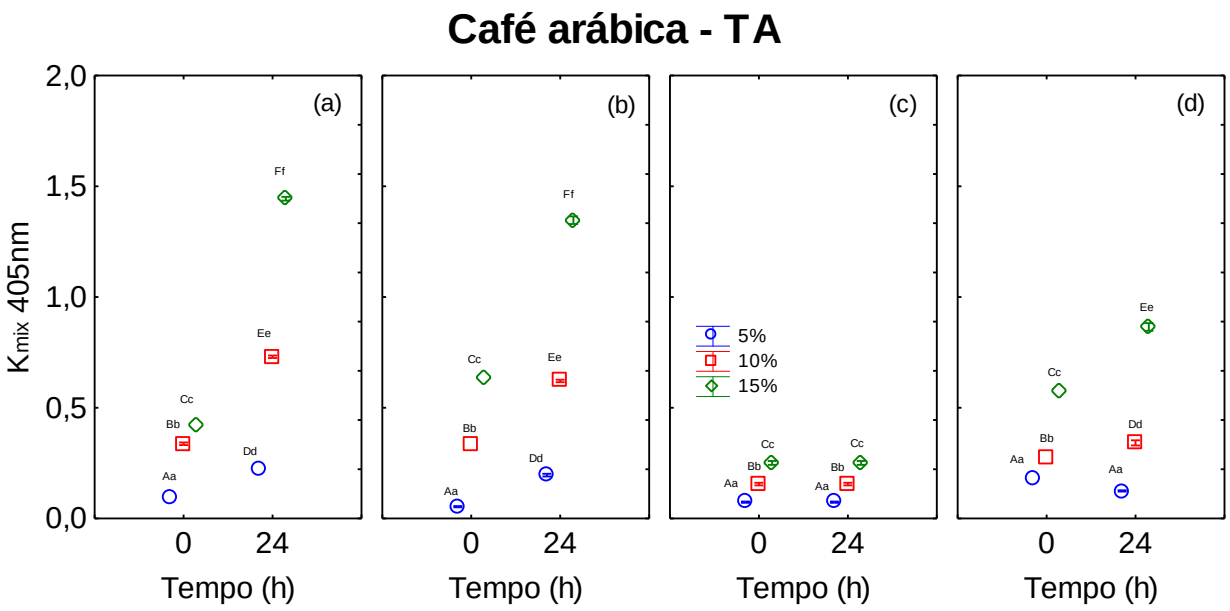


Figura 22: Teores de melanoidinas totais (K_{mix} 405nm) em *coldbrews* de café arábica obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos a 25 °C. Nota: TA – temperatura ambiente (25 ºC). Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre tempos diferentes e letras minúsculas diferentes indicam diferença estática no mesmo tempo pelo pós teste de *Fisher* (p<0,05).

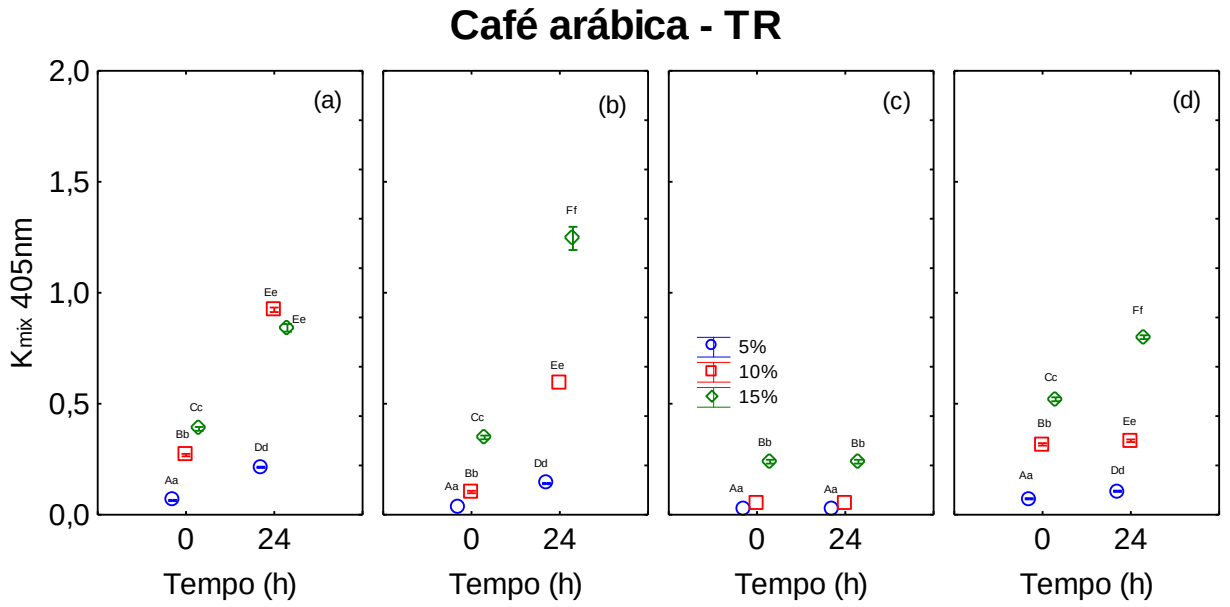


Figura 23: Teores de melanoidinas totais (K_{mix} 405nm) em *coldbrews* de café arábica obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos a 4 °C. Nota: TR – temperatura refrigerada (4 ºC). Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre tempos diferentes e letras minúsculas diferentes indicam diferença estática no mesmo tempo pelo pós teste de *Fisher* (p<0,05).

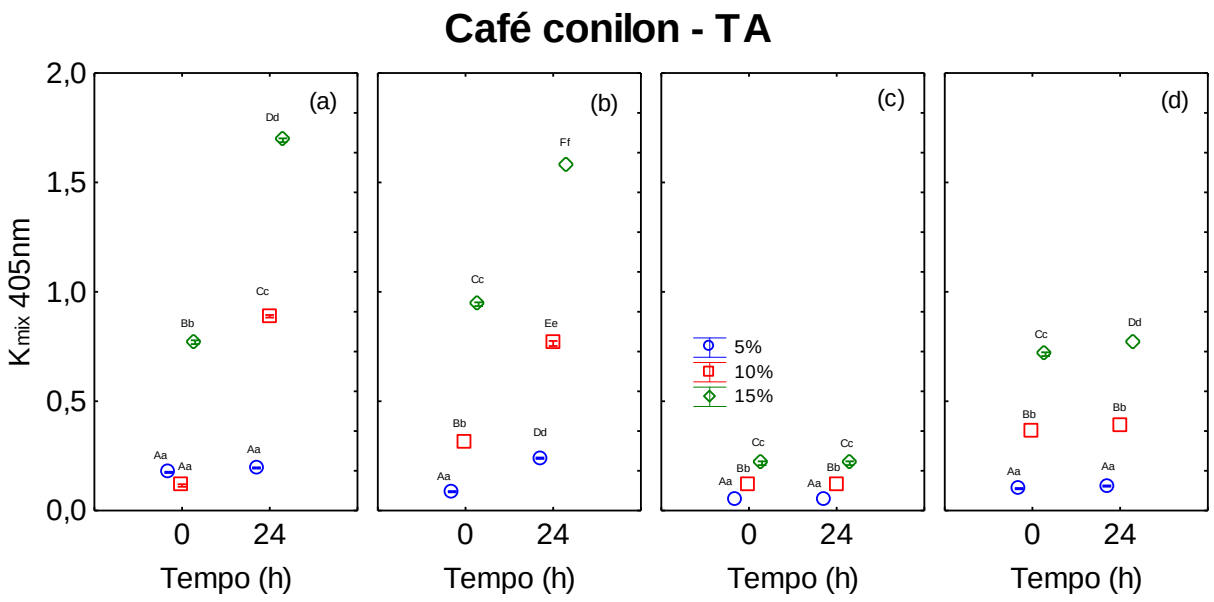


Figura 24: Teores de melanoidinas totais (K_{mix} 405nm) em *coldbrews* de café conilon obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos a 25 °C. Nota: TA – temperatura ambiente (25 ºC). Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre tempos diferentes e letras minúsculas diferentes indicam diferença estática no mesmo tempo pelo pós teste de *Fisher* (p<0,05).

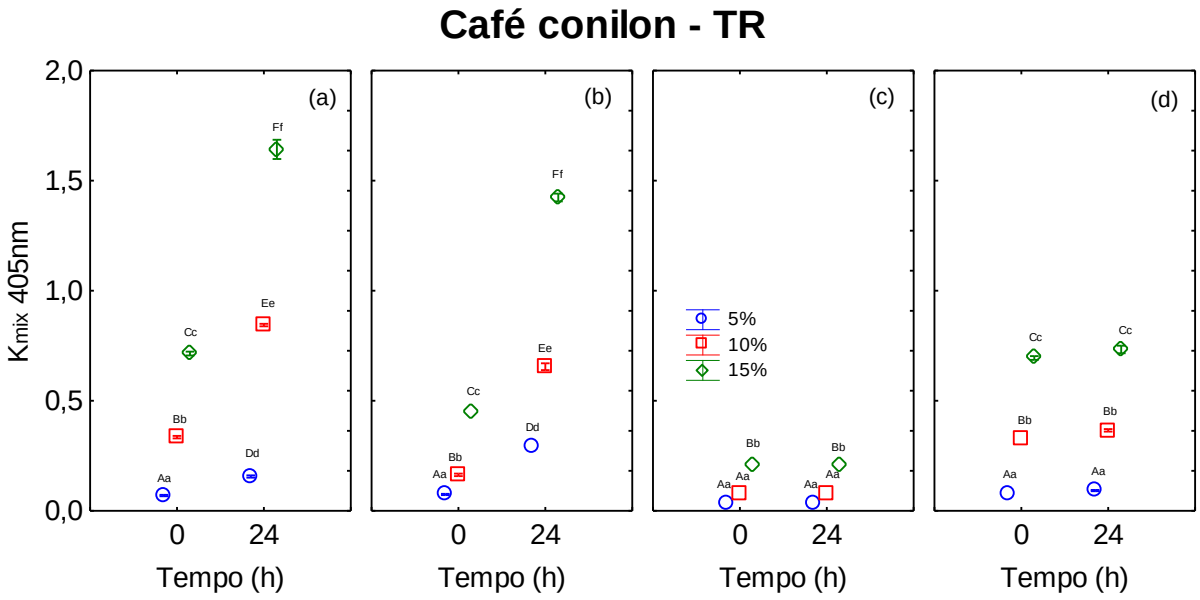


Figura 25: Teores de melanoidinas totais (K_{mix} 405nm) em *coldbrews* de café conilon obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos a 4 °C. Nota: TR – temperatura refrigerada (4 ºC). Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre tempos diferentes e letras minúsculas diferentes indicam diferença estática no mesmo tempo pelo pós teste de *Fisher* (p<0,05).

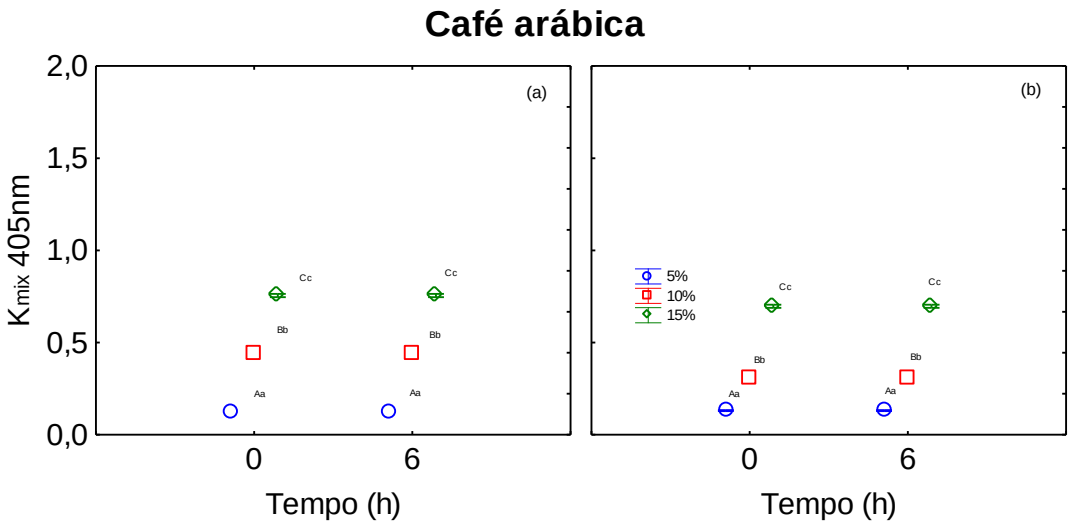


Figura 26: Teores de melanoidinas totais (K_{mix} 405nm) em bebidas com café arábica obtidas por (a) filtração com filtro de papel e (b) filtração com filtro de algodão, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, imediatamente após e 6h após extração a 92,5 ºC. Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre tempos diferentes e letras minúsculas diferentes indicam diferença estática no mesmo tempo pelo pós teste de *Fisher* (p<0,05).

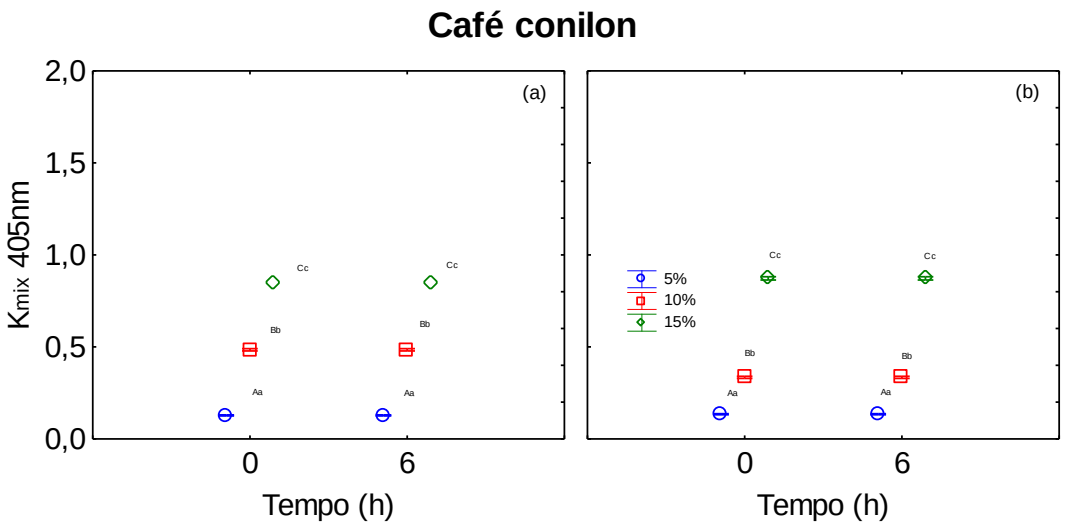


Figura 27: Teores de melanoidinas totais (K_{mix} 405nm) em bebidas com café conilon, obtidas por (a) filtração com filtro de papel e (b) filtração com filtro de algodão, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, imediatamente após e 6h após extração a 92,5 ºC. Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre tempos diferentes e letras minúsculas diferentes indicam diferença estática no mesmo tempo pelo pós teste de *Fisher* (p<0,05).

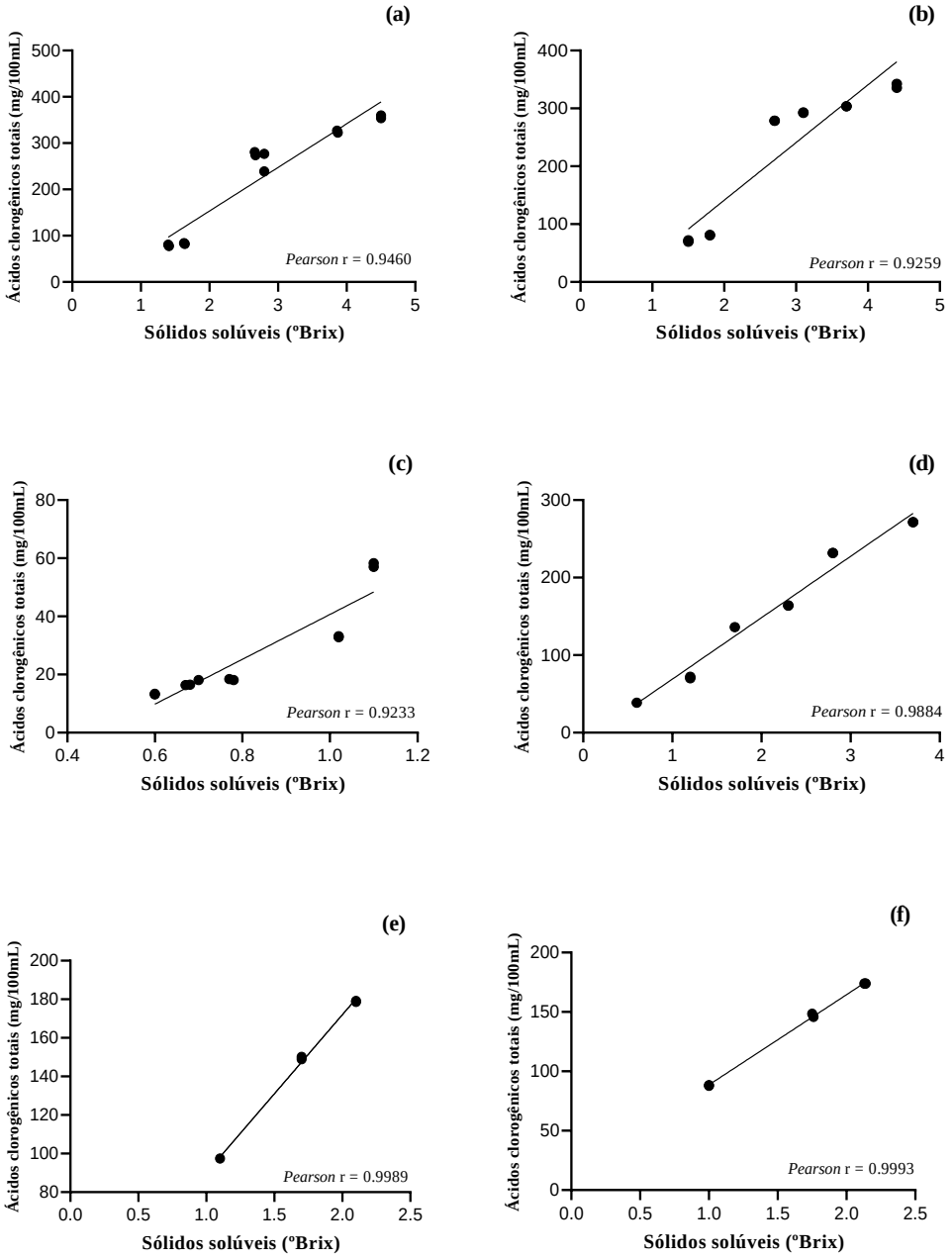


Figura 28: Correlação entre os teores de ácidos clorogênicos totais e de sólidos solúveis em bebidas de café arábica, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC nos métodos (a) *coldbrew* por imersão sem filtro, (b) *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) *coldbrew* por vácuo; (d) *coldbrew* por gotejamento, (e) filtração a quente por filtro de papel; (f) filtração a quente por filtro de pano.

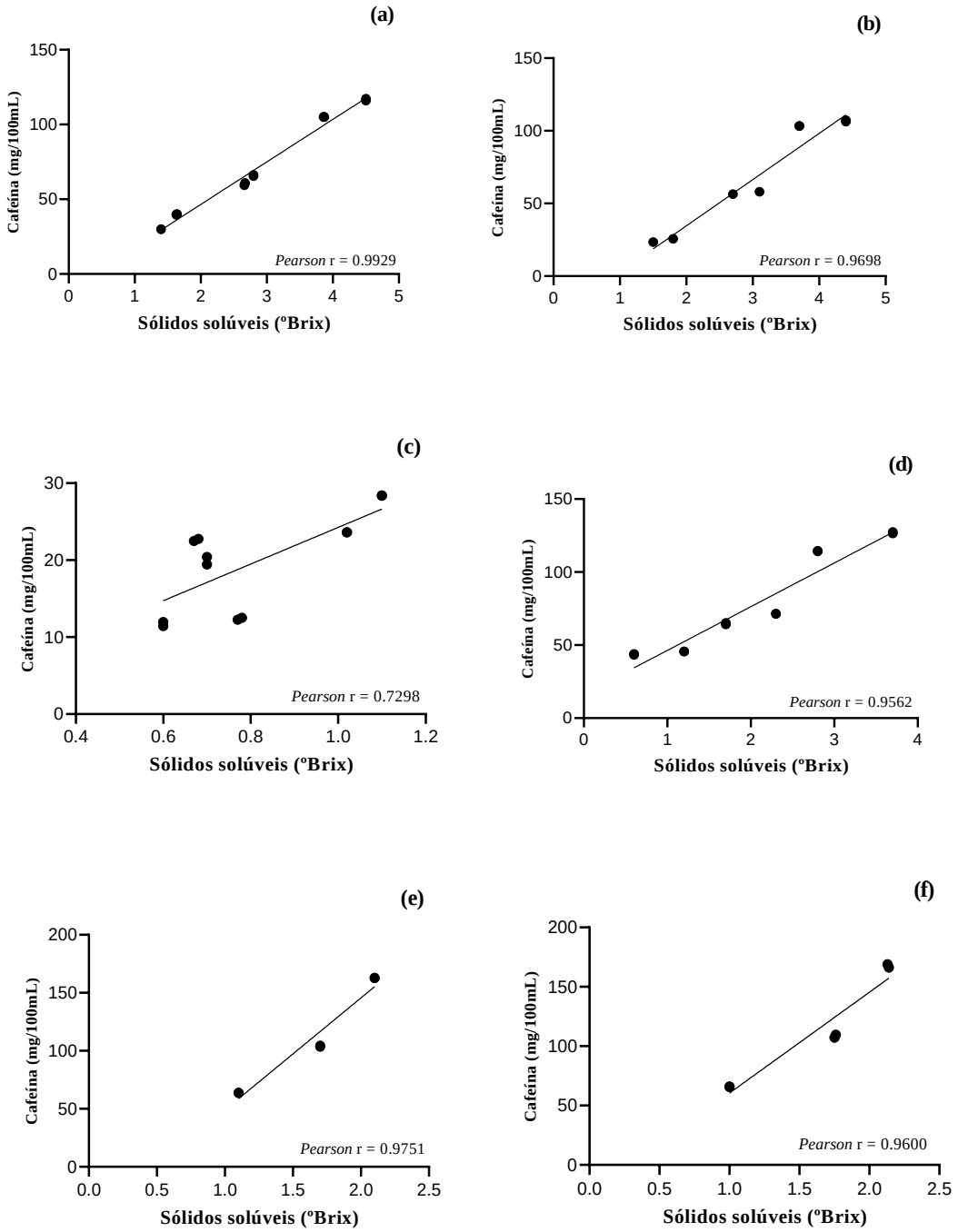


Figura 29: Correlação entre os teores de cafeínae de sólidos solúveis em bebidas de café arábica, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC nos métodos (a) *coldbrew* por imersão sem filtro, (b) *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) *coldbrew* por vácuo; (d) *coldbrew* por gotejamento, (e) filtração a quente por filtro de papel; (f) filtração a quente por filtro de pano.

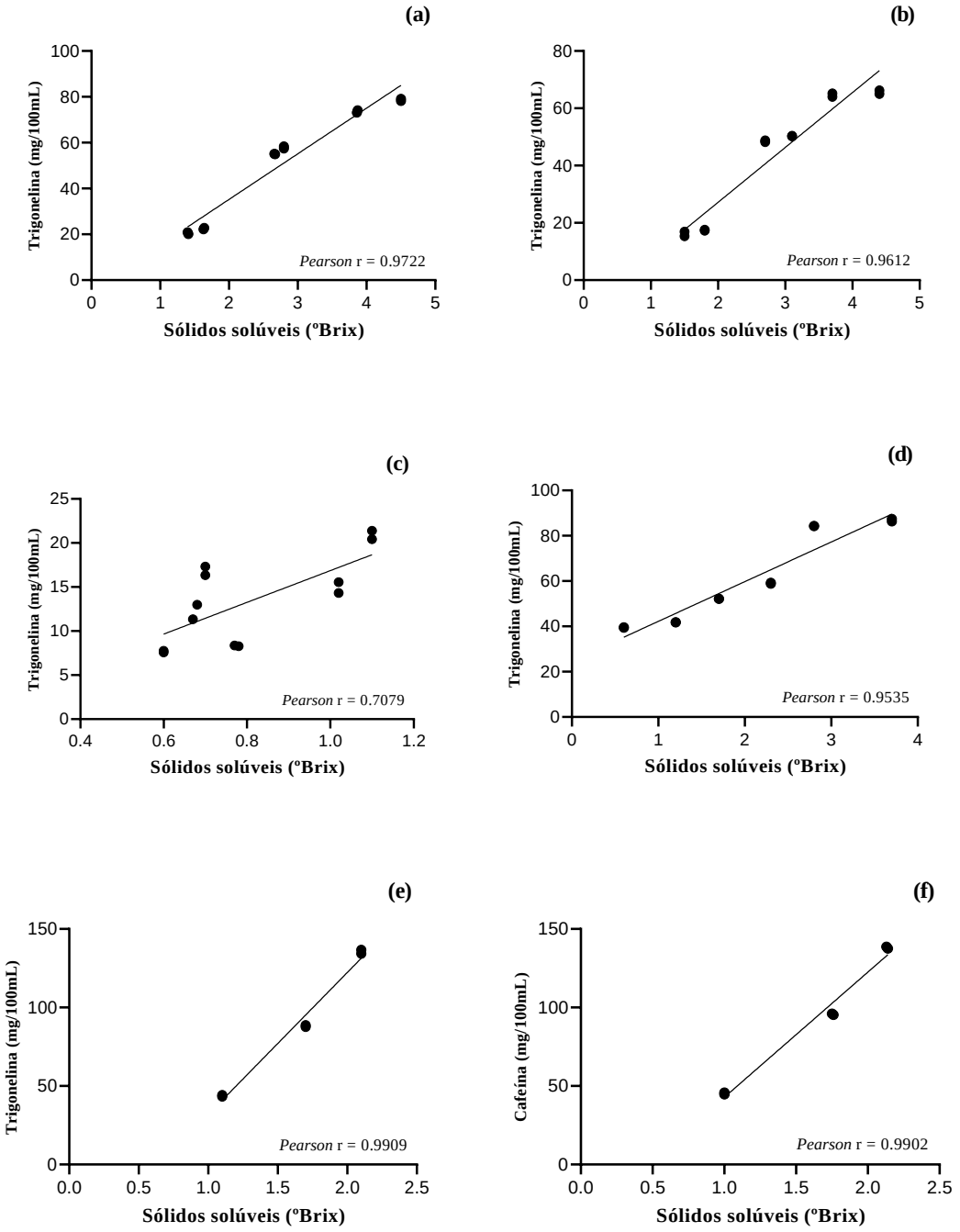


Figura 30: Correlação entre os teores de trigonelina e de sólidos solúveis em bebidas de café arábica, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC nos métodos (a) *coldbrew* por imersão sem filtro, (b) *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) *coldbrew* por vácuo; (d) *coldbrew* por gotejamento, (e) filtração a quente por filtro de papel; (f) filtração a quente por filtro de pano.

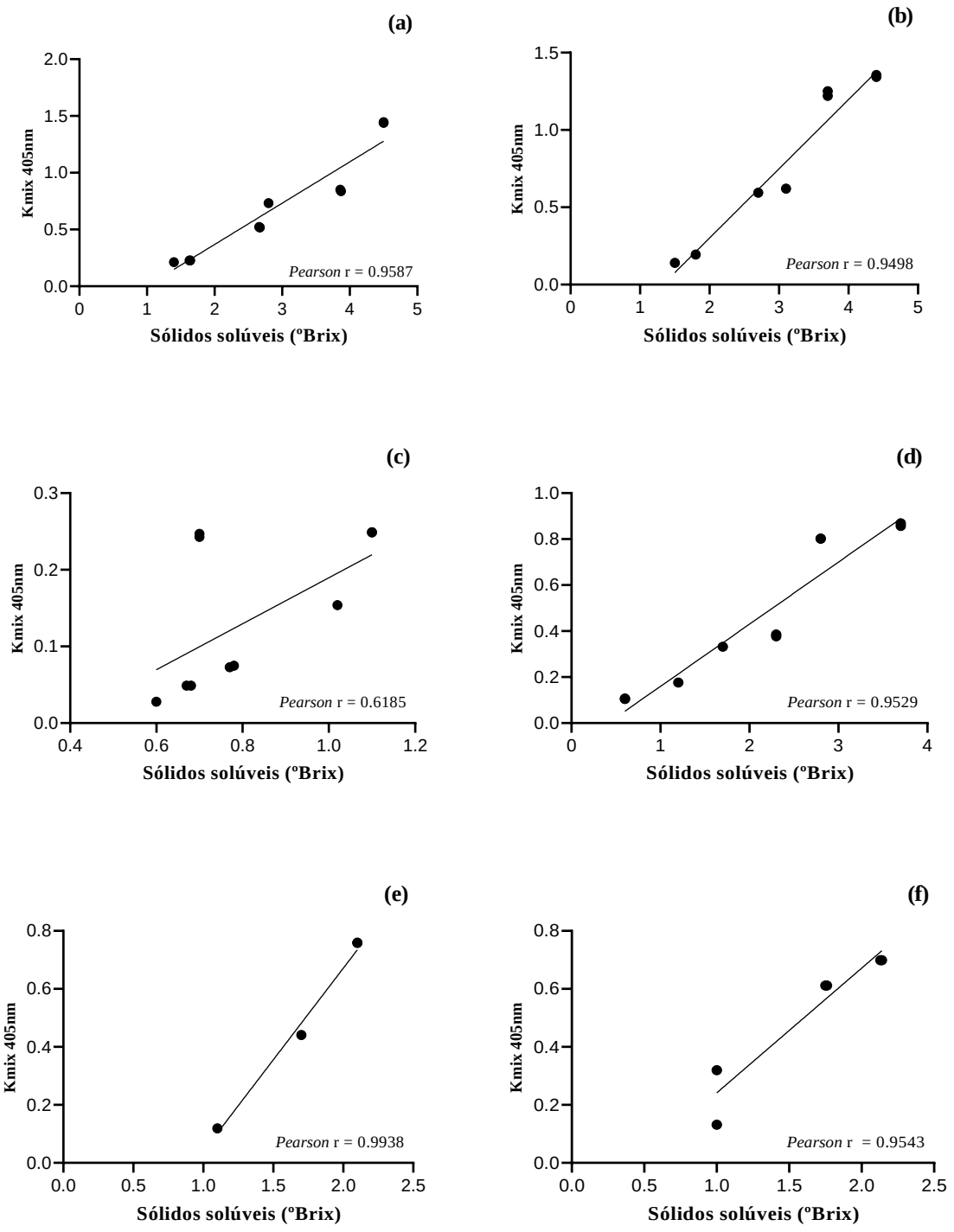


Figura 31: Correlação entre os teores de melanoidinas totais (Kmix 405nm) e de sólidos solúveis de bebidas de café arábica, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC nos métodos (a) *coldbrew* por imersão sem filtro, (b) *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) *coldbrew* por vácuo; (d) *coldbrew* por gotejamento, (e) filtração a quente por filtro de papel e (f) filtração a quente por filtro de pano.

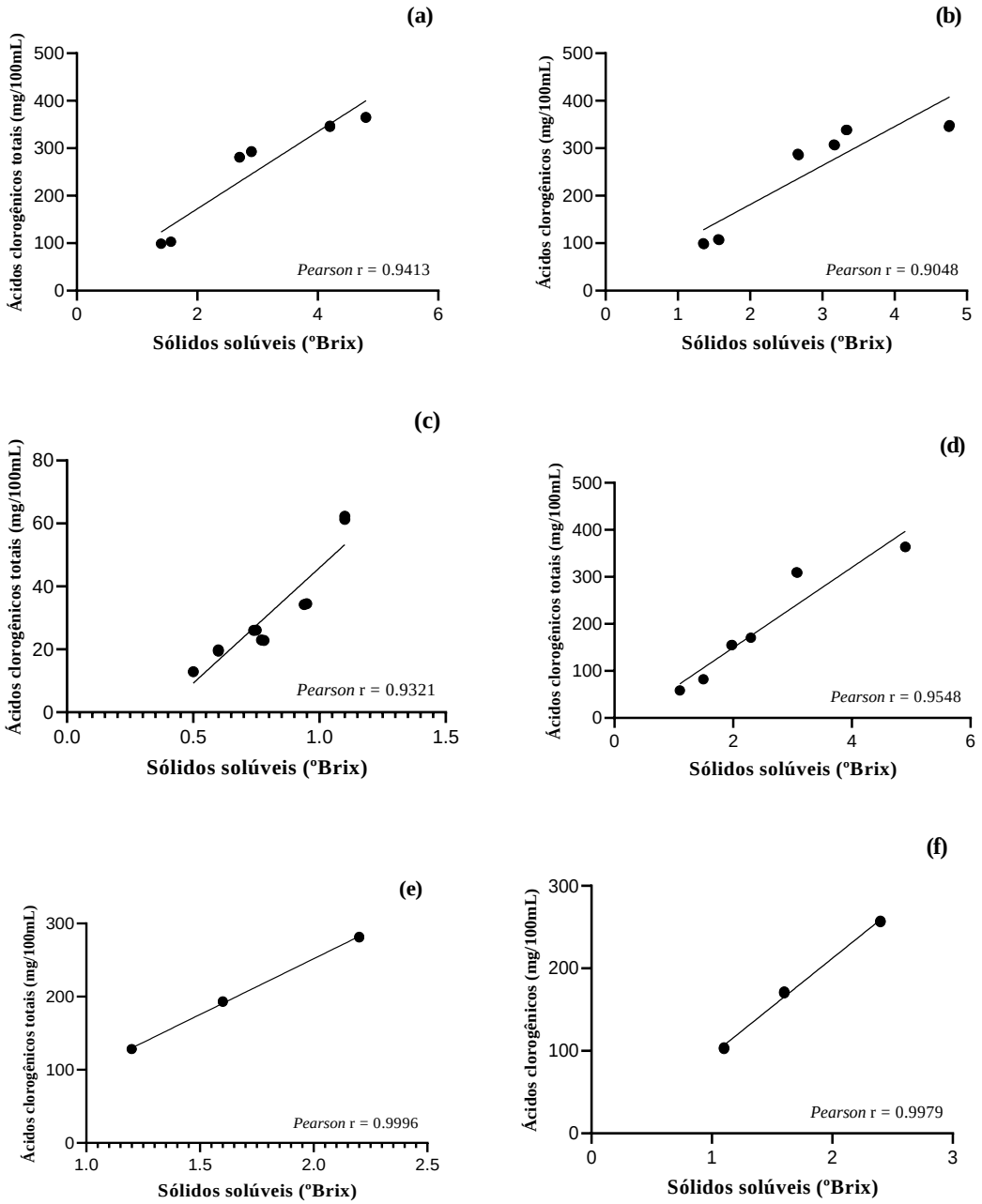


Figura 32: Correlação entre os teores de ácidos clorogênicos totais e de sólidos solúveis em bebidas de café conilon, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC nos métodos (a) *coldbrew* por imersão sem filtro, (b) *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) *coldbrew* por vácuo; (d) *coldbrew* por gotejamento, (e) filtração a quente por filtro de papel; (f) filtração a quente por filtro de pano.

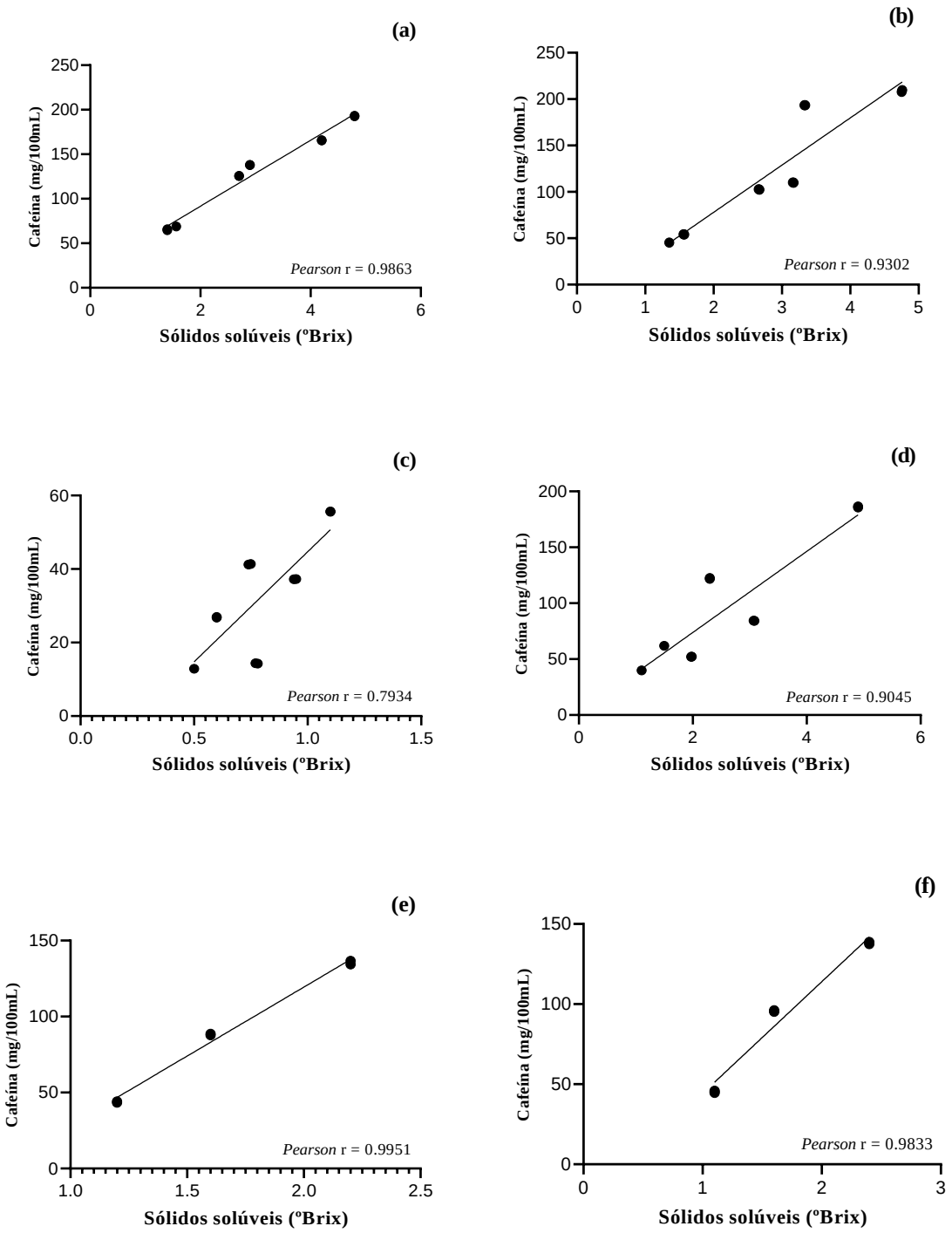


Figura 33: Correlação entre os teores de cafeína e de sólidos solúveis em bebidas de café conilon, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC nos métodos (a) *coldbrew* por imersão sem filtro, (b) *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) *coldbrew* por vácuo; (d) *coldbrew* por gotejamento, (e) filtração a quente por filtro de papel; (f) filtração a quente por filtro de pano.

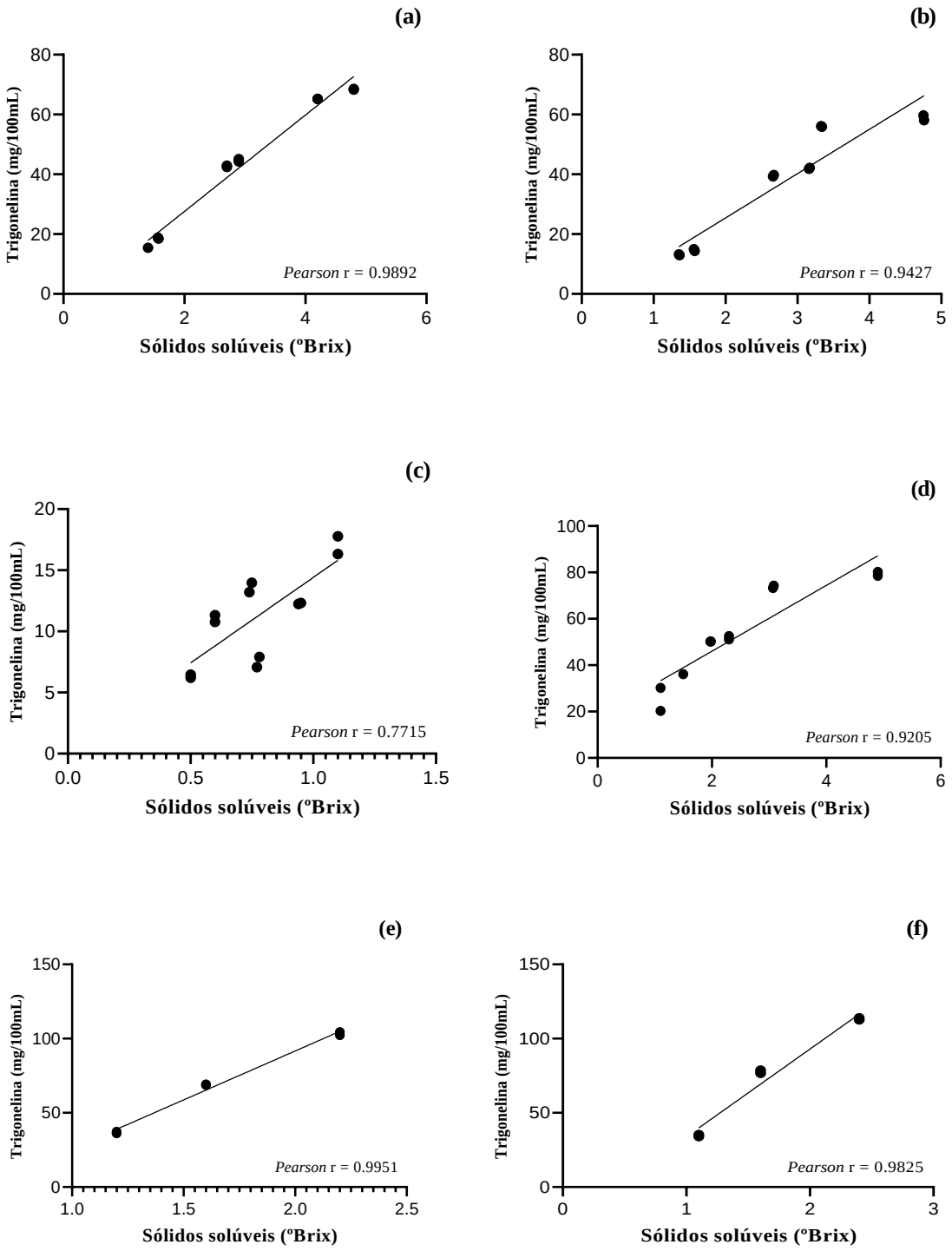


Figura 34: Correlação entre os teores de trigonelina e de sólidos solúveis em bebidas de café conilon, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC nos métodos (a) *coldbrew* por imersão sem filtro, (b) *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) *coldbrew* por vácuo; (d) *coldbrew* por gotejamento, (e) filtração a quente por filtro de papel; (f) filtração a quente por filtro de pano.

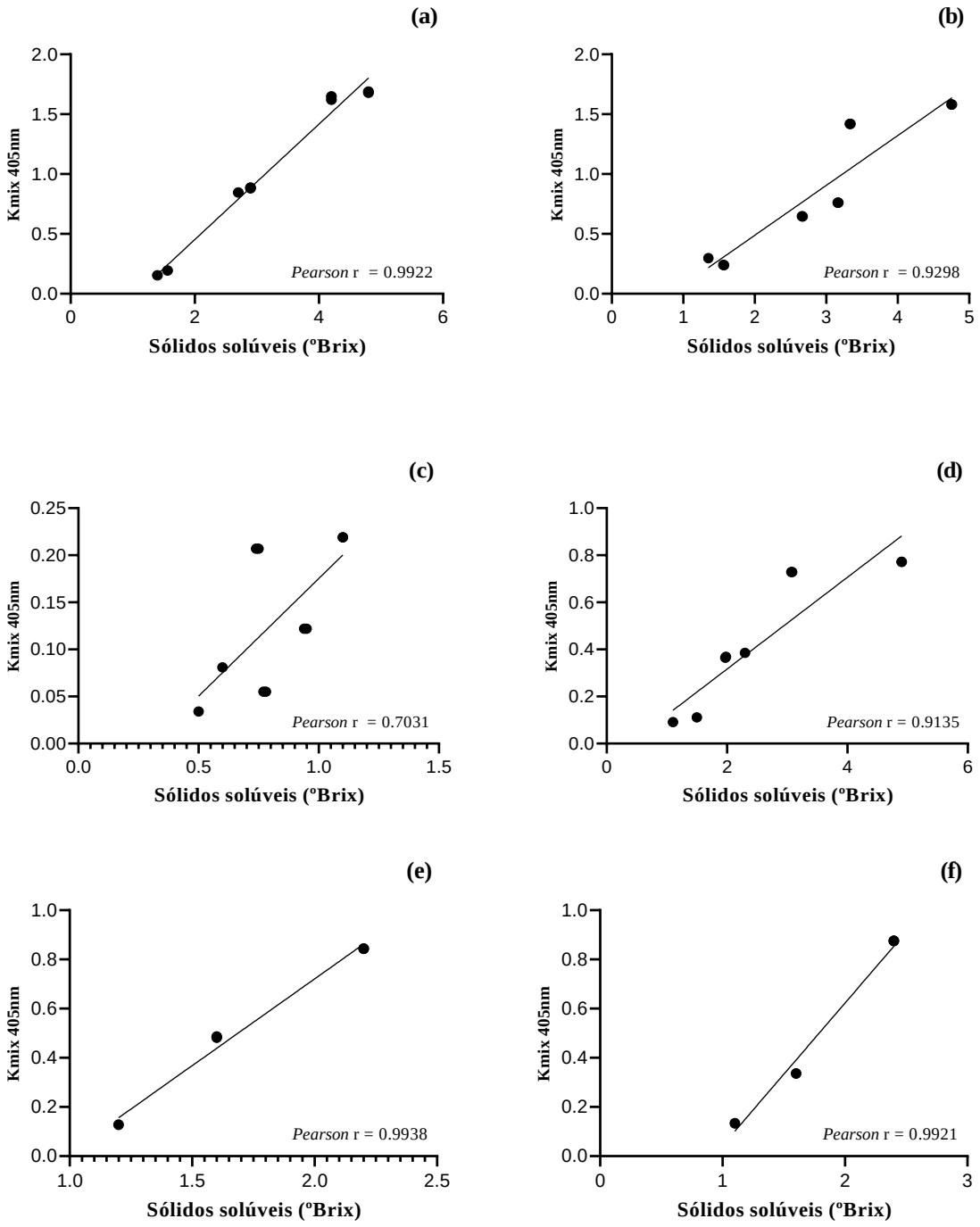


Figura 35: Correlação entre os teores de melanoidinas totais (Kmix 405nm) e de sólidos solúveis de bebidas de café conilon, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a 4 ºC, 25 ºC e 92,5 ºC nos métodos (a) *coldbrew* por imersão sem filtro, (b) *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) *coldbrew* por vácuo; (d) *coldbrew* por gotejamento, (e) filtração a quente por filtro.

7.3 Avaliação dos microrganismos cultiváveis na matéria-prima e bebidas de café extraídas a quente e a frio

O crescimento microbiano nas bebidas de cafés arábica e conilon produzidas com água não contaminada, a frio e a quente, e incubadas por até 72 horas a 37 ºC, estão apresentados nas **Tabelas 09 e 10**. A 25 ºC não foram detectados microrganismos ao longo das 72 horas de incubação.

Tabela 09: Quantificação de bactérias aeróbias cultiváveis (UFC/mL) em bebidas de café arábica extraídas a frio (4 ºC e 25 ºC) e a quente (92,5 ºC).

Amostra (0h - 37 ºC)	Concentração (%)	Microrganismo (UFC/mL)	Amostra (72h – 37 ºC)	Concentração (%)	Microrganismo (UFC/mL)
ISF TA	5	ND	ISF TA	5	ND
ISF TA	10	ND	ISF TA	10	$1,00 \pm 0,00^{aA}$
ISF TA	15	ND	ISF TA	15	$0,67 \pm 0,57^{aA}$
ISF TR	5	ND	ISF TR	5	ND
ISF TR	10	ND	ISF TR	10	$0,67 \pm 0,57^{aA}$
ISF TR	15	ND	ISF TR	15	$0,67 \pm 0,57^{aA}$
ICF TA	5	ND	ICF TA	5	$0,33 \pm 0,57^{aA}$
ICF TA	10	ND	ICF TA	10	$0,33 \pm 0,57^{aA}$
ICF TA	15	ND	ICF TA	15	$1,00 \pm 0,00^{aA}$
ICF TR	5	ND	ICF TR	5	ND
ICF TR	10	ND	ICF TR	10	$0,67 \pm 0,57^{aA}$
ICF TR	15	ND	ICF TR	15	$1,00 \pm 0,00^{aA}$
Vac TA	5	ND	Vac TA	5	$0,33 \pm 0,57^{aA}$
Vac TA	10	ND	Vac TA	10	$0,67 \pm 0,57^{aA}$
Vac TA	15	ND	Vac TA	15	ND
Vac TR	5	ND	Vac TR	5	ND
Vac TR	10	ND	Vac TR	10	$1,00 \pm 0,00^{aA}$
Vac TR	15	ND	Vac TR	15	ND
Got TA	5	ND	Got TA	5	ND
Got TA	10	ND	Got TA	10	$0,33 \pm 0,57^{aA}$
Got TA	15	ND	Got TA	15	ND
Got TR	5	ND	Got TR	5	ND
Got TR	10	ND	Got TR	10	$0,33 \pm 0,57^{aA}$

Got TR	15	ND	Got TR	15	ND
FPP	5	ND	FPP	5	ND
FPP	10	ND	FPP	10	ND
FPP	15	ND	FPP	15	0,33± 0,57^{aA}
FPN	5	ND	FPN	5	ND
FPN	10	ND	FPN	10	ND
FPN	15	ND	FPN	15	0,67± 0,57^{aA}

Nota: ISF – *coldbrew*por imersão sem filtro; ICF – *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo); Vac – *coldbrew* por vácuo; Got – *coldbrew* por gotejamento; FPP – Extração a quente por filtro de papel; FPN – Extração a quente por filtro de pano; TA – Temperatura ambiente (25 ºC); TR – Temperatura refrigerada (4 ºC); ND – Não detectado. Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre métodos diferentes e letras minúsculas indicam diferença estatística no mesmo método pelo pós teste de *Tukey* (p<0,05).

Tabela 10: Quantificação de bactérias aeróbias cultiváveis (UFC/mL) em bebidas de café conilon extraídas a frio (4 ºC e 25 ºC) e a quente (92,5 ºC).

Amostra (0h – 37 ºC)	**Concentração (%)**	**Microrganismo (UFC/mL)**	**Amostra (72h - 37 ºC)**	**Concentração (%)**	**Microrganismo (UFC/mL)**
ISF TA	5	ND	ISF TA	5	ND
ISF TA	10	ND	ISF TA	10	ND
ISF TA	15	ND	ISF TA	15	0,33± 0,57^{aA}
ISF TR	5	ND	ISF TR	5	ND
ISF TR	10	ND	ISF TR	10	ND
ISF TR	15	ND	ISF TR	15	0,33± 0,57^{aA}
ICF TA	5	ND	ICF TA	5	0,33± 0,57^{aA}
ICF TA	10	ND	ICF TA	10	ND
ICF TA	15	ND	ICF TA	15	ND
ICF TR	5	ND	ICF TR	5	1,00± 0,00^{aA}
ICF TR	10	ND	ICF TR	10	ND
ICF TR	15	ND	ICF TR	15	0,33± 0,57^{aA}
Vac TA	5	ND	Vac TA	5	ND
Vac TA	10	ND	Vac TA	10	ND
Vac TA	15	ND	Vac TA	15	ND
Vac TR	5	ND	Vac TR	5	ND
Vac TR	10	ND	Vac TR	10	ND
Vac TR	15	ND	Vac TR	15	ND
Got TA	5	ND	Got TA	5	ND
Got TA	10	ND	Got TA	10	ND

Got TA	15	ND	Got TA	15	ND
Got TR	5	ND	Got TR	5	ND
Got TR	10	ND	Got TR	10	ND
Got TR	15	ND	Got TR	15	ND
FPP	5	ND	FPP	5	ND
FPP	10	ND	FPP	10	ND
FPP	15	ND	FPP	15	ND
FPN	5	ND	FPN	5	0,33± 0,57^{aA}
FPN	10	ND	FPN	10	ND
FPN	15	ND	FPN	15	ND

Nota: ISF – *coldbrew* por imersão sem filtro; ICF – *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo); Vac – *coldbrew* por vácuo; Got – *coldbrew* por gotejamento; FPP – Extração a quente por filtro de papel; FPN – Extração a quente por filtro de pano; TA – Temperatura ambiente (25 ºC); TR – Temperatura refrigerada (4 ºC); ND – Não detectado. Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre métodos diferentes e letras minúsculas indicam diferença estatística no mesmo método pelo pós teste de *Tukey* ($p<0,05$).

A partir da coloração de Gram, as bactérias isoladas nas bebidas preparadas por todos os métodos incubadas por 72 horas a 37°C apresentaram forma de bastão (bacilos) e coloração positiva conforme exemplificado na **Figura 36** para os métodos a quente de filtração com filtro de papel e a frio por imersão sem filtro.

(a) (b)

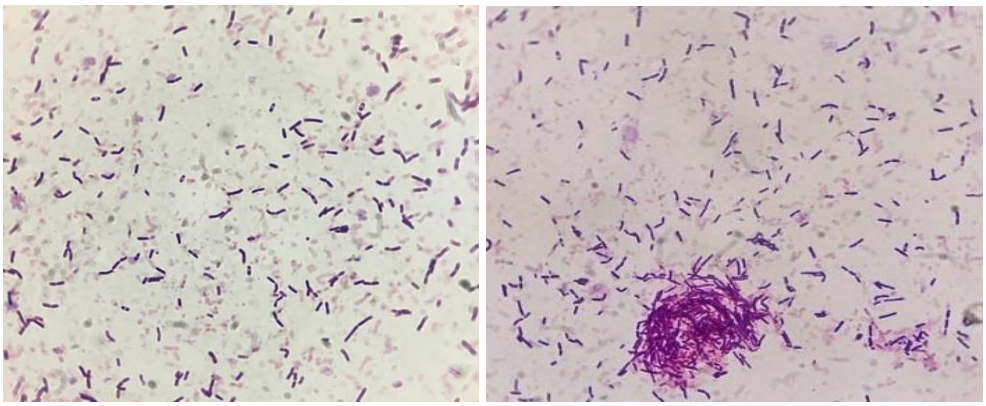


Figura 36: Microscopia ótica de microrganismos corados pela técnica de Gram encontrados naturalmente em bebidas de café arábica e conilon extraídas a quente e a frio pelas técnicas de (a) quente por filtração com filtro de papel (café arábica) e (b) *coldbrew* por imersão sem filtro (café conilon).

Com auxílio de um espectrômetro de massas (Maldi-tof), foi possível analisar os perfis protéicos e caracterizar microbiologicamente as colônias com características

morfotinturiais distintas das bebidas de cafés arábica e conilon extraídas a quente e a frio. Os microorganismos foram identificados como *Bacillus subtillis* (*score*>2.0) e *Bacillus lincheniformis* (*score*s de 1.784 e 1.810). A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante, que indicam que valores de *score* ≥ 1.7 e < 2.0 são confiáveis a nível de gênero e *score* ≥ 2.0 são confiáveis a nível de gênero e espécie para o equipamento da marca Bruker® (SCHULTHESS et al., 2014). O resultado da análise de espectrometria de massas está apresentado na **Tabela 11.** As contagens médias de fungos das bebidas de café ao longo de 7 dias de incubação estão descritas na **Tabela 12**.

Tabela 11: Microrganismos encontrados nas bebidas de café arábica e conilon extraídas a frio (4 ºC e 25 ºC) e a quente (92,5 ºC), por espectrometria de massas.

Amostra	Microrganismo	*Score*
CB café arábica	*Bacillus subtilis*	2.156
CB café arábica	*Bacillus subtilis*	1.873
CB café arábica	*Bacillus subtilis*	1.971
CB café conilon	*Bacillus lincheniformis*	1.810
CB café conilon	*Bacillus subtilis*	2.039
CB café conilon	*Bacillus lincheniformis*	1.784
FPP café arábica	*Bacillus subtilis*	2.154
FPP café conilon	ND	ND
FPN café arábica	*Bacillus subtilis*	2.211
FPN café conilon	ND	ND

Nota: CB – *Coldbrew*; FPP – Extração a quente por filtro de papel; FPN – Extração a quente por filtro de pano; ND – Não detectado.

De fato, a presença do gênero *Bacillus* e de *B. subtillis* em grãos de café verde já havia sido identificada por alguns autores (SILVA et al., 2000; VILELA et al., 2010; MIGUEL, 2011; DUONG et al., 2020). *B. subtilis* é uma bactéria Gram-positiva e não patogênica, amplamente distribuída no solo. Algumas cepas (DE111, PLSSC ATCC SD 7280, BS-MB40 PTA-122264, DSM 32444, dentre outras) receberam do FDA o *status* GRAS (*Generally Regarded as Safe*) (FDA, 2021). Em condições de falta de nutrientes ou temperaturas extremas, esse microrganismo é capaz de formar esporos (WANG et al., 2017; ALVES et al., 2018). Os esporos de *B. subtilis* são utilizados como

probióticos na Ásia e na África (DE SOUZA, 2014), como adjuvantes vacinais (BARNES et al., 2007) e como suplemento para a alimentação animal (LIU et al., 2017).

A relação entre *B. subtilis* e os grãos de café verde parece ser de simbiose, onde este microrganismo atua de forma eficaz no controle de nematóides como *Meloidogyne exigua* e da ferrugem, praga provocada pelo fungo *Hemileia vastatrix* (DUONG et al., 2020). Ele age secretando metabólitos que podem levar à lise e destruição da estrutura celular do fungo (BETTIOL E GHINI, 1995). Além disso, alguns autores sugerem que *B. subtillis* melhora a disponibilidade de nutrientes, fixação de nitrogênio e estimula a produção de fitormônios promotores de crescimento na planta (MANJULA E PODILE, 2005; OLANREWAJU et al., 2017). Por isso, existem produtos comerciais para lavouras de café que contém *B. subtillis* em suas formulações, chamados de bionematicidas, por exemplo, Quartzo® (ARPINI et al., 2018).

Mais recentemente, um documento do FDA (2019), constatou que *B. subtillis* DE111 é um componente natural de alimentos destinados ao consumo humano, podendo ser adicionado até 1x 10^6 UFC/porção e até 1x 10^9 UFC/porção para produtos infantis (crianças de 2 a 12 anos), como ingrediente probiótico. Esta cepa pode ser adicionada a diversas categorias de alimentos como produtos de panificação, cereais matinais, chicletes, condimentos, óleos e gorduras, sucos de fruta, leites e derivados, castanhas, vegetais processados, misturas para sopa, *syrups*, chás e café, dentre outros (FDA, 2019).

Contudo, a presença de *B. subtillis* no café já torrado, é indicativo de contaminação do produto nas etapas subsequentes à torrefação, podendo ter ocorrido o contato dos grãos já torrados com grãos verdes ou acondicionamento inadequado e contato do café com o solo, que é o *habitat* natural desta estirpe (ARPINI et al., 2018; ENTRINGER et al., 2020). A despeito dos efeitos potencialmente benéficos da aplicação de *B. subtillis* nas lavouras de café (OLANREWAJU et al., 2017; DUONG et al., 2020), a presença deste microrganismo em grãos de café torrados e moídos e/ou em bebidas de café pode representar risco à segurança microbiológicar do produto, a depender da cepa de *B. subtillis*, uma vez que algumas cepas com *status* GRAS podem ser adicionadas ao café já torrado (FDA, 2019).

Miyai et al. (2012), avaliaram o comportamento de *B. subtillis*, *B. cereus* e *Bacillus coagulans* durante o armazenamento de bebidas de café, chá verde e chá preto. Os esporos desses microrganismos foram inoculados nas bebidas e, em seguida, as

mesmas foram pasteurizadas (85 ºC por 30 minutos) e armazenadas por 2 semanas. Os microrganismos viáveis foram quantificados diariamente por 14 dias. Todas as estirpes testadas reduziram seu crescimento nas bebidas de café, chá preto e verde, porém quando o café e o chá preto foram adicionados de leite, *B. cereus* e *B. subtillis* se multiplicaram nas bebidas. A partir destes resultados, os autores sugerem que bebidas pasteurizadas de café, chá preto e chá verde, sem adição de leite, podem ser armazenadas por até 2 semanas mesmo se o gênero *Bacillus* estiver presente nas bebidas. Nesse sentido, destaca-se que algumas bebidas de café da categoria *coldbrew* são comercializadas com leite e que essas bebidas não passam pelo processo de pasteurização, o que poderia representar um risco à saúde do consumidor especialmente frente à contaminação por *B. cereus.*

A virulência de *B. subtillis* ainda é pouco conhecida (BAIS, 1927; GU et al., 2019). Gu et al. (2019), isolaram a cepa G7 que apresentou genes de virulência associados com adesão, invasão, disseminação, antifagocitose e sobrevivência intracelular. Esta cepa foi capaz de provocar mortalidade em peixes e camundongos e se replicar em macrófagos de camundongos e leucócitos de peixes. Em suma, esses achados sugerem potencial efeito patogênico de *B. subtillis* (cepa G7). Bais (1927) e Weinstein et al. (1950), descreveram casos de pacientes com febre, tosse, infecção pulmonar, meningite e bacteremia provocados por *B. subtillis*, sugerindo possível patogeneicidade desta estirpe em humanos (cepas não especificadas pelos autores). Também já foi descrita a capacidade de *B. subtillis* provocar infecções oculares (FRAÇOIS, 1934) e infecções do trato urinário (SHULTZ, 1938).

Tabela 12: Quantificação de fungos de bebidas de café arábica e conilon, extraídas a frio (4 ºC e 25 ºC) e a quente (92,5 ºC), após incubação a 25 ºC por 7 dias em aerobiose em meio de cultura ágar batata dextrose acidicificado com ácido tartárico a 10%.

Amostra	Concen-tração (%)	Fungos (UFC/mL)	Amostra	Concen-tração (%)	Fungos (UFC/mL)
A ISF TA	5	$0,33 \pm 0,57^{aA}$	C ISF TA	5	$1,00 \pm 0,00^{aA}$
A ISF TA	10	$1,67 \pm 2,88^{aA}$	C ISF TA	10	$3,33 \pm 3,05^{aA}$
A ISF TA	15	$1,33 \pm 0,57^{aA}$	C ISF TA	15	$0,00 \pm 0,00^{aA}$
A ISF TR	5	$3,00 \pm 1,73^{aA}$	C ISF TR	5	$1,66 \pm 1,15^{aA}$
A ISF TR	10	$0,66 \pm 1,15^{aA}$	C ISF TR	10	ND
A ISF TR	15	$2,33 \pm 0,57^{aA}$	C ISF TR	15	$1,66 \pm 1,15^{aA}$
A ICF TA	5	ND	C ICF TA	5	ND

A ICF TA	10	1,66 ± 1,15^{aA}	C ICF TA	10	ND
A ICF TA	15	1,33 ± 0,57^{aA}	C ICF TA	15	4,33 ± 1,53^{aA}
A ICF TR	5	1,00 ± 0,00^{aA}	C ICF TR	5	1,00 ± 0,00^{aA}
A ICF TR	10	4,00 ± 1,73^{aA}	C ICF TR	10	ND
A ICF TR	15	0,67 ± 0,57^{aA}	C ICF TR	15	2,33 ± 0,57^{aA}
A Vac TA	5	5,67 ± 0,57^{bB}	C Vac TA	5	1,00 ± 0,00^{aA}
A Vac TA	10	2,66 ± 1,15^{aA}	C Vac TA	10	0,33 ± 0,57^{aA}
A Vac TA	15	2,00 ± 0,00^{aA}	C Vac TA	15	0,66 ± 0,57^{aA}
A Vac TR	5	1,66 ± 1,15^{aA}	C Vac TR	5	ND
A Vac TR	10	1,33 ± 2,30^{aA}	C Vac TR	10	0,33 ± 0,57^{aA}
A Vac TR	15	2,00 ± 0,00^{aA}	C Vac TR	15	0,66 ± 0,57^{aA}
A Got TA	5	0,66 ± 0,57^{aA}	C Got TA	5	ND
A Got TA	10	ND	C Got TA	10	ND
A Got TA	15	ND	C Got TA	15	ND
A Got TR	5	ND	C Got TR	5	ND
A Got TR	10	ND	C Got TR	10	ND
A Got TR	15	ND	C Got TR	15	ND
A FPP	5	1,33 ± 0,57^{aA}	C FPP	5	ND
A FPP	10	0,67 ± 0,57^{aA}	C FPP	10	ND
A FPP	15	2,33 ± 1,15^{aA}	C FPP	15	ND
A FPN	5	ND	C FPN	5	ND
A FPN	10	ND	C FPN	10	ND
A FPN	15	ND	C FPN	15	0,33 ± 0,57^{aA}

Nota: ISF – *coldbrew* por imersão sem filtro; ICF – *coldbrew* por imersão com filtro (saco de queijo); Vac – *coldbrew* por vácuo; Got – *coldbrew* por gotejamento; FPP – Extração a quente por filtro de papel; FPN – Extração a quente por filtro de pano; TA – Temperatura ambiente (25 ºC); TR – Temperatura refrigerada (4 ºC); A – arábica; C – conilon; ND – Não detectado. Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre métodos diferentese letras minúsculas indicam diferença estatística no mesmo método pelo pós teste de *Tukey* ($p<0,05$).

A presença de fungos foi detectada em todas as bebidas extraídas a quente e a frio analisadas neste estudo após 7 dias de incubação. O *coldbrew* de café arábica (método Vac em temperatura ambiente a 5%) apresentou as maiores concentrações de fungos (5,67 ± 0,57 UFC/mL). No método de gotejamento, à exceção das bebidas de café arábica em temperatura ambiente a 5%, em todas as outras condições, a presença de fungos não foi detectada, sendo, portanto, o método mais eficiente em produzir *coldbrews* com presença mínima de fungos.

A contaminação do café por fungos é uma preocupação desde o plantio até o preparo final da bebida, especialmente em relação às espécies produtoras de micotoxinas. Segundo Alves e Castro (1998), as espécies *Colletotrichum sp.*, *Phoma sp.*, *Cercospora sp.*, *Fusarium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Colletotrichum sp.* e *Phoma sp*. são as mais encontradas no café. Das 624 cepas identificadas por Silva et al. (2000) no café colhido em 15 fazendas de Minas Gerais, 16,1% eram leveduras e 40,1% eram fungos filamentosos. Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* já foram isolados de amostras de grãos de café torrado (com baixa umidade e baixa atividade de água). O grande risco se deve ao fato de que esses microrganismos podem sobreviver durante todo o período de armazenamento dos grãos de café e muitas espécies desses gêneros são capazes de produzir metabólitos secundários e micotoxinas como a aflatoxina e a OTA, potencialmente patogênicos (GAMBOA-GAITÁN et al., 2012).

Assim, o armazenamento de *coldbrews* por períodos superiores a 24 horas, pode ser um ponto crítico quanto ao risco biológico, especialmente devido à suscetibilidade de contaminação por fungos (KWOK et al., 2020). Já foi reportado por Claanssen et al. (2021), que a nível doméstico e comercial, alguns indivíduos, baristas e pequenos fabricantes, chegam a armazenar *coldbrews* por até 7 dias, o que do ponto de vista de controle microbiológico, estaria contraindicado. Também tem sido divulgado por meio de *blogs* e redes sociais, que é possível armazenar *coldbrews* por até 14 dias (ROSENMAN, 2020). *Coldbrews* de café arábica e conilon extraídos por gotejamento foram os mais eficientes em inibir o crescimento fúngico, especialmente em bebidas mais concentradas (10% e 15%).

7.4 Controles de viabilidade das estirpes utilizadas para contaminação da água de preparo das bebidas

Os resultados relativos à viabilidade das estirpes utilizadas estão apresentados nas **Figuras 37 e 38**, com as curvas de crescimento de *E. coli* e *B. cereus*, nos tempos de 0, 3, 6, 9, 12 e 24 horas, considerando as condições de crescimento em caldo triptona de soja e solução salina (cloreto de sódio) a 0,85%.

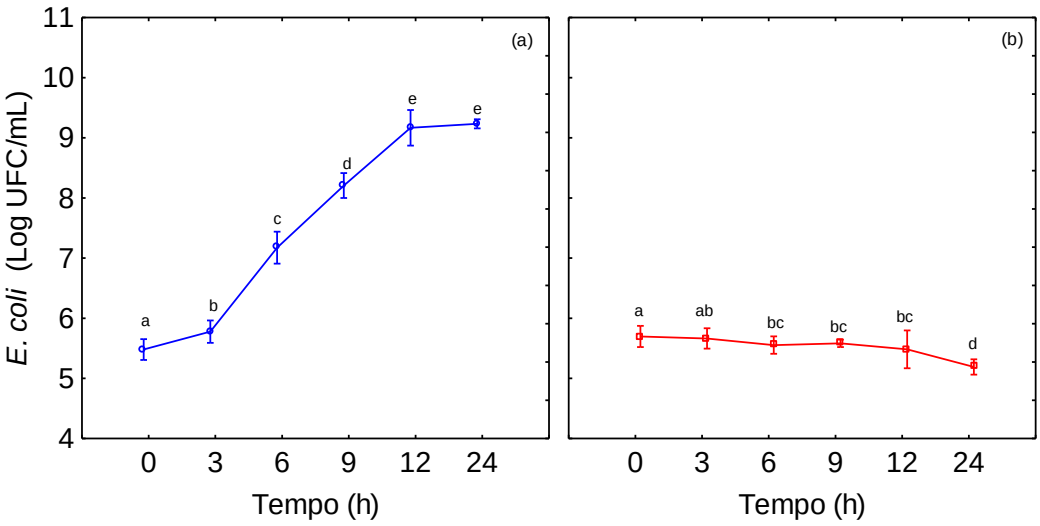


Figura 37: Número médio de unidades formadoras de colônias (log UFC/mL), após 24 horas de encubação a 37 ºC em aerobiose, de *Escherichia coli* ATCC 25922 em (a) Caldo triptona de soja (TSB) e (b) Solução salina a 0,85%. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística em tempos diferentes pelo pós teste de *Fisher* (p<0,05).

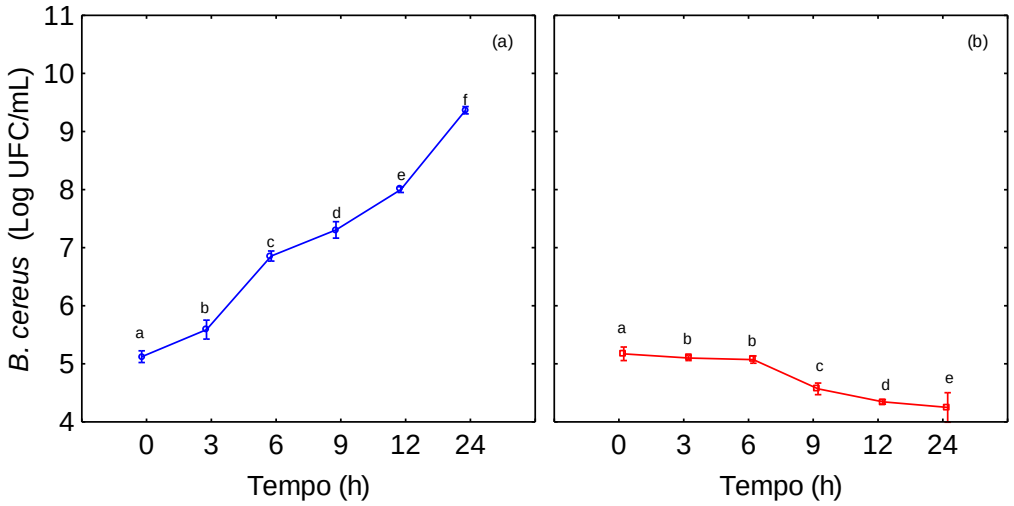


Figura 38: Número médio de unidades formadoras de colônias (log UFC/mL), após 24 horas de encubação a 37 ºC em aerobiose, de *Bacillus cereus* FF4433 em (a) Caldo triptona de soja (TSB) e (b) Solução salina a 0,85%. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística em tempos diferentes pelo pós teste de *Fisher* (p<0,05).

Nos controles de viabilidade para *E. coli* e *B. cereus*, quando inoculados em meio de cultura rico em nutrientes como o caldo TSB, os microrganismos se multiplicaram confirmando que se encontravam em pleno potencial de crescimento. As médias em log UFC/mL foram diferentes nos tempos de 0 a 24 horas (p<0,000). Não houve diferença na curva de multiplicação de *E. coli* em caldo TSB entre 12 e 24 horas de incubação. Em contrapartida, quando inoculadas em solução salina a 0,85%, as estirpes se mantiveram estáveis, com pequeno decréscimo em relação à concentração

inicial dos inóculos. Portanto, matrizes capazes de reduzir acentuadamente o número médio (log UFC/mL) do microrganismo poderiam ser investigadas como potenciais agentes antimicrobianos frente a *E. coli* e *B. cereus*.

7.5 Efeito da utilização de filtros na extração de bebidas de café preparadas com água contaminada intencionalmente com *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*

Os resultados do controle do efeito da utilização de filtros de papel e de pano na retenção de *E. coli* e *B. cereus* durante a extração de bebidas de café a quente e a frio está apresentado na **Tabela 13**. É possível observar que sob temperatura de 92,5 ºC, *E. coli* não foi detectada em todos os filtros testados. *B. cereus* foi detectado, porém, em menor concentração quando comparado a condições que utilizaram água em temperaturas ambiente (25 ºC) e refrigerada (4 ºC). Além disso, em ambas as temperaturas da água, não houve retenção dos microrganismos testados em relação aos filtros utilizados, considerando que a concentração inicial inoculada foi na grandeza de 10^5 UFC/mL. Desta forma, os filtros (papel e pano) não retiveram os microorganismos presentes na água, passando integralmente para as bebidas de café.

Tabela 13: Efeito da utilização de filtros de papel e de pano durante o preparo da bebida de café, na retenção de *Escherichia coli* ATCC 25922 e de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 presentes na água de preparo.

Tipo de filtro	Temperatura da água (ºC)	*Escherichia coli* ATCC 25922 (UFC/mL)	*Bacillus cereus* FF4433 (UFC/mL)
Filtro de papel	4	$2,88 \times 10^5$	$1,41 \times 10^5$
Filtro de papel	25	$2,37 \times 10^5$	$1,25 \times 10^5$
Filtro de papel	92,5	ND	$2,46 \times 10^2$
Filtro de pano	4	$2,44 \times 10^5$	$2,02 \times 10^5$
Filtro de pano	25	$2,16 \times 10^5$	$1,93 \times 10^5$
Filtro de pano	92,5	ND	$2,73 \times 10^2$
Saco para queijo	4	$2,73 \times 10^5$	$1,82 \times 10^5$
Saco para queijo	25	$2,52 \times 10^5$	$1,77 \times 10^5$
Saco para queijo	92,5	ND	$2,62 \times 10^2$

Nota: UFC – Unidades Formadoras de Colônias; ND – Não detectado.

7.6 Sobrevivência de *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* intencionalmente contaminados na água de preparo de bebidas de café extraídas a quente

Os resultados relativos aos experimentos de contaminação intencional da água de preparo de bebidas de café a quente estão apresentados nas **Figuras 39 e 40** com as curvas de multiplicação de células vegetativas de *Bacillus cereus* nos tempos de 0, 3 e 6 horas.

Escherichia coli não foi detectada nas bebidas de café arábica e conilon extraídas a quente e contaminadas intencionalmente com esta estirpe. De acordo com Fogolari et al. (2012), a resistência térmica de *E. coli* reduz consideravelmente em temperaturas acima de 50 °C. O uso de água a 92,5 ºC e o consumo imediato normalmente levam a contaminação insignificante do café extraído a quente (CANCI et al. 2020; KWOK et al., 2020; CLAANSSEN et al., 2021). Na contaminação intencional com *Bacillus cereus*, não foram detectadas células vegetativas do microrganismo a partir de 3 horas após a extração a quente em todas as bebidas produzidas a 5%, 10% e 15%, conforme apresentado na **Tabela 14.**

As bebidas foram armazenadas por 6 horas, a 75 ºC, em banho-maria, que tinha como objetivo simular o armazenamento de bebidas de café em uma garrafa térmica. É importante ressaltar que as bebidas de café do presente estudo foram contaminadas com células vegetativas de *Bacillus cereus* e este microrganismo tem a capacidade de formar esporos diante de condições adversas de crescimento, como aplicação de altas temperaturas, restrição de nutrientes e a própria presença de compostos antimicrobianos do café (DAESCHEL et al., 2017; CHO E CHUNG, 2020; KWOK et al., 2020). Tratamentos térmicos acima de 100 ºC são capazes de eliminar a forma vegetativa, mas os esporos ou fragmentos de esporos podem resistir a essa temperatura (BATISTA et al., 2018). Nesse caso, a aplicação de uma técnica alternativa como a alta pressão hidrostática seria necessária para promover a destruição de esporos (LÓPEZ et al., 2003; LUU-THI et al., 2014).

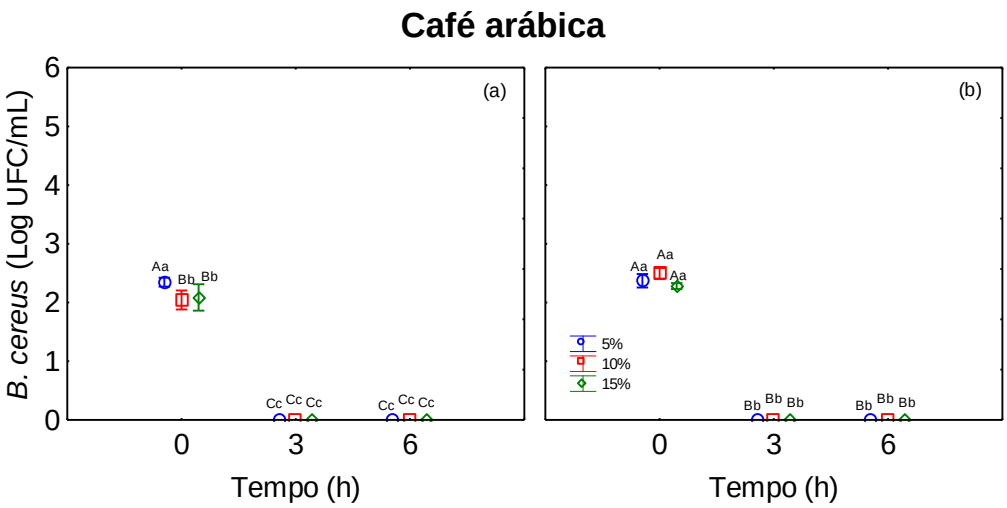


Figura 39: Quantificação de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 (log UFC/mL), em bebidas de café arábica obtidas por (a) filtração com filtro de papel e (b) filtração com filtro de pano, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a quente (92,5 ºC). Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre tempos diferentes e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística no mesmo tempo pelo pós teste de *Fisher* (p<0,05).

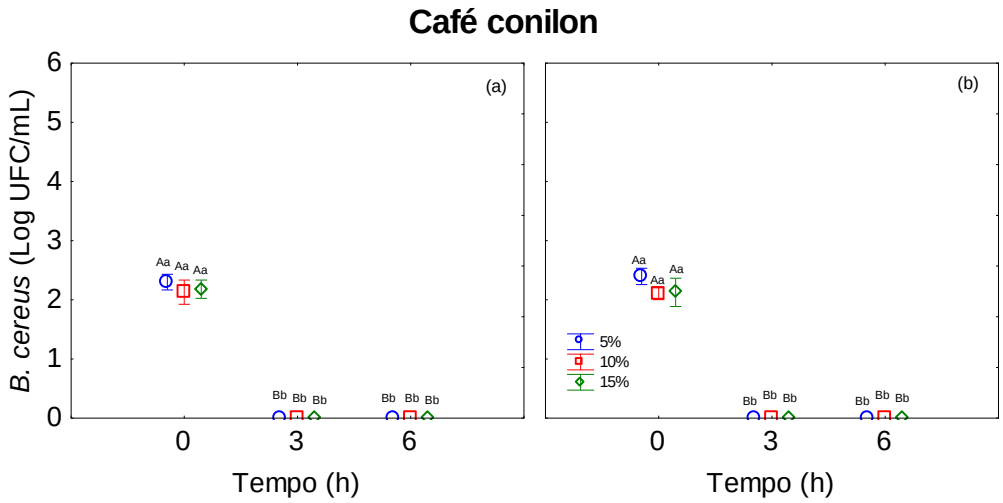


Figura 40: Quantificação de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 (log UFC/mL), em bebidas de café conilon obtidas por (a) filtração com filtro de papel e (b) filtração com filtro de pano, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídas a quente (92,5 ºC). Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre tempos diferentes e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística no mesmo tempo pelo pós teste de *Fisher* (p<0,05).

Tabela 14: Quantificação de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 (log UFC/mL), em *coldbrews* de café arábica e conilon, intencionalmente contaminados com 10^2 UFC/mL, após 24 horas de extração.

		Café arábica		Café conilon	
Método	**Concentração (%)**	**t0h**	**t3h/t6h**	**t0h**	**t3h/t6h**
	5	2,35 ±0,03^{aA}	ND	2,30 ±0,06^{aA}	ND
FPP	10	2,05 ±0,07^{bB}	ND	2,13 ±0,08^{aA}	ND
	15	2,09 ±0,09^{bB}	ND	2,18 ±0,06^{aA}	ND
	5	2,37 ±0,05^{aA}	ND	2,40 ±0,05^{aA}	ND
FPN	10	2,49 ±0,04^{aA}	ND	2,10 ±0,04^{aA}	ND
	15	2,28 ±0,02^{aA}	ND	2,13 ±0,10^{aA}	ND

Nota: FPP – Método de extração a quente por filtro de papel; FPN – Método de extração a quente por filtro de pano; ND – Não detectado. Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre métodos diferentes e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística no mesmo método pelo pós teste de *Fisher* (p<0,05).

7.7 Sobrevivência de *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* intencionalmente contaminados na água de preparo de *coldbrews*

Os resultados relativos aos experimentos de contaminação intencional da água de preparo de *coldbrews* com *E. coli* e células vegetativas de *B. cereus* estão apresentados nas **Figuras 41 a 48**, com as curvas de crescimento nos tempos de 0, 3, 6, 9, 12 e 24 horas.

Para os experimentos de contaminação intencional dos *coldbrews* com *E. coli* e *B. cereus*, houve influência da espécie de café, concentração, temperatura da água e método de extração utilizados. Os métodos Got e ICF foram os que mais inibiram a multiplicação das estirpes testadas, enquanto o método Vac foi o que menos impactou nessa multiplicação. Em relação aos *coldbrews* de café arábica em temperatura ambiente, cuja água foi contaminada intencionalmente com *E. coli*, à exceção do método Vac a 5%, todas as bebidas reduziram em mais de 99% o número médio (log UFC/mL) de microrganismos ao longo de 24 horas. O método Got a 15% exerceu maior efeito inibitório contra *E. coli*, pois, no tempo de 9 horas de extração, este microrganismo não foi mais detectado nas bebidas de café. O mesmo ocorreu para Got a 10% no tempo de 24 horas. Este método apresentou teores superiores de cafeína a 10% e a 15% (71,47 ± 0,16 e 126,95 ± 0,77 mg/100 mL) e trigonelina a 10% e a 15% (59,02

± 0,36 e 86,91 ± 0,83), quando comparado aos métodos ISF, ICF e Vac. Apesar dos métodos de imersão terem exibido os maiores teores de CGA, ressalta-se que o método de gotejamento também demonstrou elevados teores desses compostos (164,03 ± 0,21 e 271,46 ± 0,23 mg/ 100 mL a 10% e 15%, respectivamente).

Coldbrews de café conilon em temperatura ambiente, foram os mais eficientes na redução de *E. coli* (p<0,000) ao longo das 24 horas de extração, quando comparados às bebidas de café arábica. Nas bebidas preparadas pelo método ICF a 15%, a partir de 9 horas de extração, e a 5% e 10% no tempo de 24 horas, o microrganismo não foi detectado. Bebidas extraídas por ICF a 15% apresentaram teores superiores de cafeína (208,68 ± 1,31 mg/100 mL) em relação aos métodos ISF e Got. O mesmo ocorreu para Got a 10% e 15%, a partir de 9 horas de extração (teores superiores de trigonelina em comparação com ISF e ICF). Ressalta-se aqui também os teores consideráveis de CGA (363,71 ± 0,49 e 170,40 ± 0,44 mg/ 100 mL a 10% e 15%, respectivamente).

Em relação à contaminação intencional da água com células vegetativas de *B. cereus*, todas as bebidas produzidas reduziram a multiplicação do microrganismo ao longo das 24 horas de extração (p<0,000). À exceção dos métodos ISF e Vac, ambos a 5%, ao final dos experimentos, *B. cereus* não foi detectado em todas as bebidas preparadas pelos outros métodos e demais condições de extração empregadas. Os métodos ISF, ICF e Got, todos a 15% exibiram teores superiores de sólidos solúveis, CGA e cafeína, quando comparados às bebidas a 5% e 10% nos mesmos métodos (**Tabelas 07 e 08**). *B. cereus* não foi detectado nas bebidas de café a partir de 3 horas de extração. Destaca-se que o método Vac a 5% apresentou os menores teores de CGA (18,28 ± 0,25 mg/100 mL), cafeína (12,38 ± 0,18 mg/100 mL) e trigonelina (8,33 ± 0,06 mg/100 mL). Para *coldbrews* de café arábica e conilon em temperatura refrigerada, os números médios (UFC/mL) de *E. coli* e *B. cereus*, reduziram (p<0,000) em relação à contaminação inicial. Porém, foram maiores quando comparados às mesmas bebidas extraídas em temperatura ambiente (**Tabelas 14 e 15**).

Se por um lado na técnica de gotejamento lento e constante ocorre a renovação da água que possibilita maior extração dos compostos bioativos (ANGELONI et al., 2019a), por outro, no método de imersão (com e sem filtro) o longo tempo de contato pode ter compensado a possível saturação da água, possibilitando a maior extração de cafeína, trigonelina e CGA, havendo, portanto, maior ação antimicrobiana da bebida. Já no método Vac, a rápida velocidade de extração não permitiu o contato eficiente da

água com pó de café para que houvesse extração de compostos bioativos em quantidade suficiente de forma a exercer efeito antimicrobiano mais significativo.

No método a vácuo, foi visualmente observado que a água não conseguiu penetrar completamente através das partículas de café. Nesse sentido, destaca-se que a porosidade do café torrado e moído é modificada pelo processo de encharcamento quando em contato com a água, ocorrendo reestruturação da matriz que permite maior extração de compostos químicos (MATEUS et al., 2007; FOLMER, 2017). Conforme demonstrado por Mateus et al. (2007), a intensidade com que ocorre o processo de difusão dos compostos da matriz do café para a água aumenta em função do tempo e, após o encharcamento dos grãos, há aumento na extração de compostos. Esses achados poderiam explicar por que, na técnica a vácuo, os *coldbrews* exibiram os menores teores de compostos bioativos e sólidos solúveis dentre todas as bebidas, uma vez que o tempo de contato do café com a água fria (4 ºC e 25 ºC) foi extremamente rápido (35-60 segundos), impossibilitando o adequado encharcamento das partículas e, consequentemente, a modificação da porosidade dos grãos (de 5% na matriz seca para 30% na matriz encharcada), necessária à extração dos compostos para a bebida.

Em geral, *coldbrews* de café conilon apresentaram maior capacidade inibitória frente a *E. coli* e ao *B. cereus* (**Figuras 47 e 48**). Segundo Martínez-Tomé et al. (2011) e Persidou et al. (2015), conforme há aumento na concentração de bebidas de café, também aumenta a atividade antimicrobiana com maior efeito em bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas. Além disso, as frações de melanoidinas presentes nas bebidas, também podem ter exercido efeito antimicrobiano devido à presença de compostos fenólicos incorporados em sua estrutura (ácidos cafeico, quínico, 5-CQA e outros ácidos clorogênicos) (BEKEDAM et al., 2006; 2008; FARAH et al., 2006; 2012; MORAIS et al., 2012). Segundo Langner; Rzeski (2014), as melanoidinas podem inibir o crescimento de bactérias patogênicas como *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* e *S. typhimurium*.

Em microrganismos Gram-negativos, a membrana externa, composta de lipopolissacarídeos e proteínas, é equilibrada com a presença de cátions divalentes que formam pontes iônicas entre os grupos fosfatos e os fosfolipídeos. As melanoidinas (carga aniônica), assim como os CGA, são capazes de se ligar aos cátions divalentes como, íons Mg^{2+}, promovendo perda de função da membrana externa com ruptura celular, impedimento do transporte de nutrientes e efeito bactericida. Essa ruptura também promove desequilíbrio do material genético celular (DNA e RNA) (RUFIAN-

HENARES et al., 2008; 2009; MOREIRA et al., 2012). Após a destruição da membrana externa, os compostos bioativos do café conseguem acessar o interior da célula provocando uma descarga de enzimas citoplasmáticas que levam à dissolução de componentes intracelulares (NEIDHARDT et al., 1990; LANCIOTTI et al., 1999; STECCHINI et al., 1999; BEKEDAM et al., 2006; RUFIAN-HENARES et al., 2008).

Sobre as bebidas de café preparadas em TA exibirem maior efeito antimicrobiano face a *E. coli* e ao *B. cereus* (tabelas 15 e 16 e figuras 49 e 50) ao longo de 24 horas, do que aquelas preparadas em TR, tal fato pode ser explicado pela solubilidade dos compostos bioativos. Embora o ácido clorogênico (5-CQA), apresente ampla solubilidade tanto na temperatura ambiente quanto na refrigerada, melanoidinas e cafeína são razoavelmente solúveis em temperatura ambiente, mas não em temperatura refrigerada, reduzindo, assim, a eficiência de extração em *coldbrews* (SPIRO et al., 1985; BUDAVARI et al., 1996; ANDUEZA et al., 2003; ANGELONI et al., 2019a; CORDOBA et al., 2019; CASTAÑEDA-RODRIGUEZ et al., 2020; RAO E FULLER, 2020).

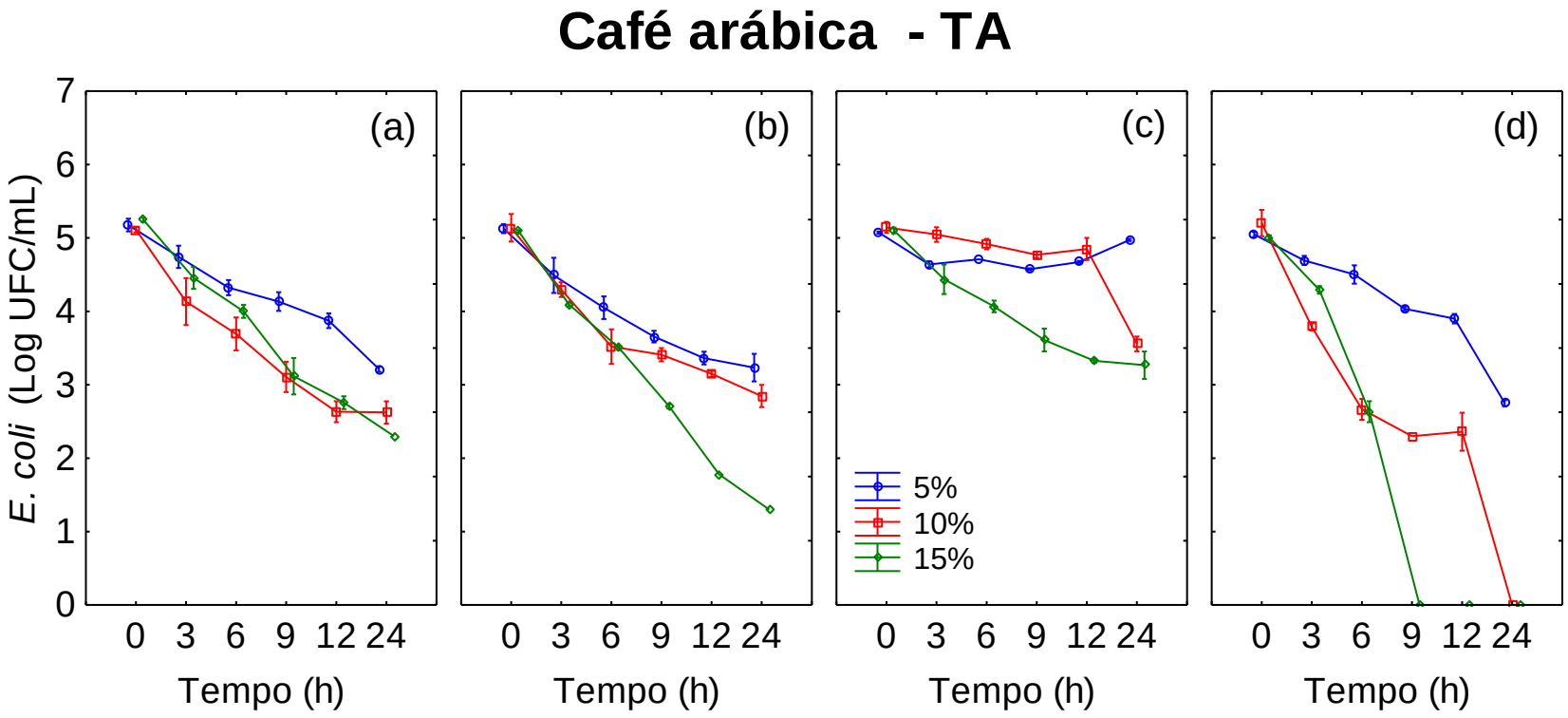


Figura 41: Quantificação de células de *Escherichia coli* ATCC 25922 (log UFC/mL) em *coldbrews* de café arábica obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos ao longo de 24 horas, a 25 ºC. Nota: TA – temperatura ambiente (25 ºC).

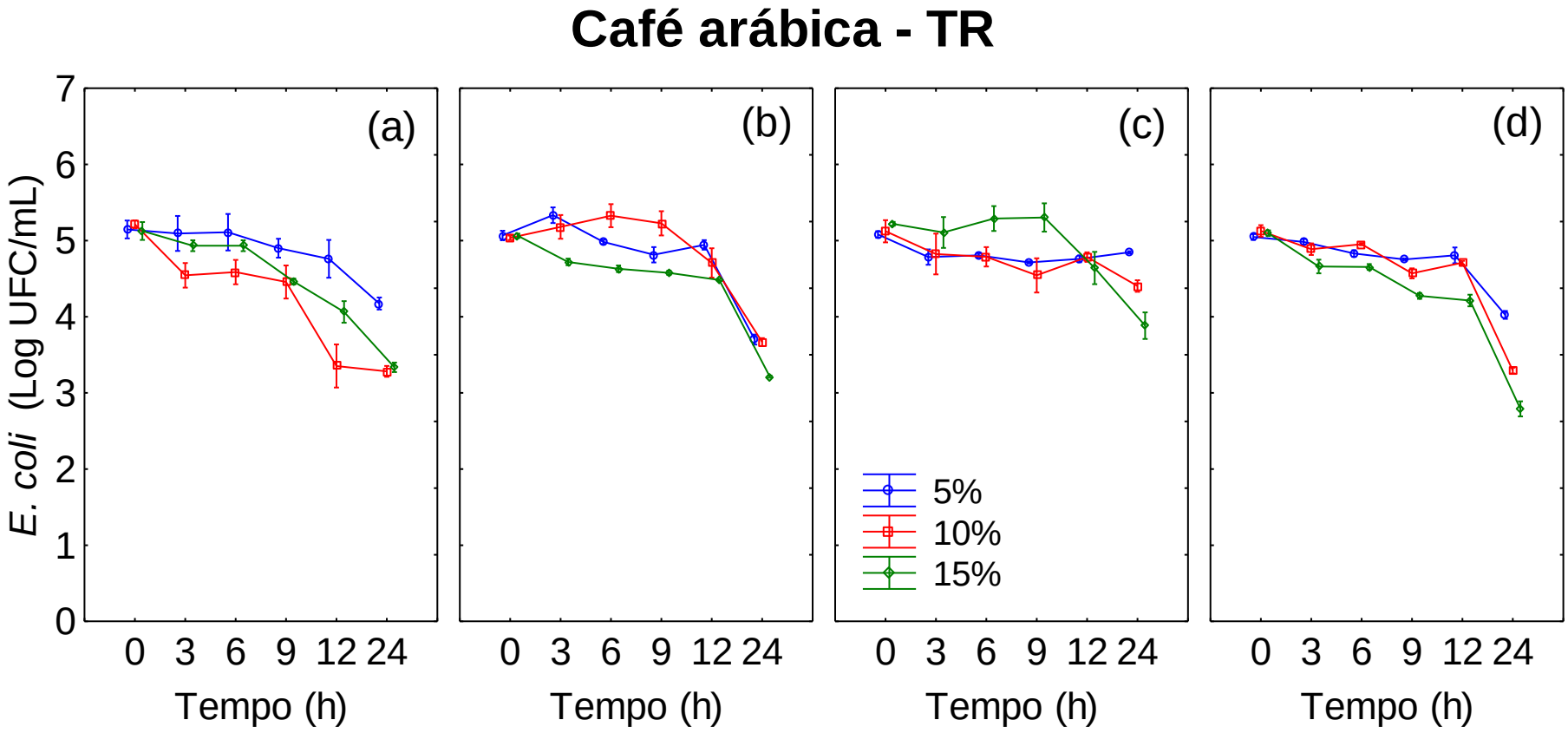


Figura 42: Quantificação de células de *Escherichia coli* ATCC 25922 (log UFC/mL) em *coldbrews* de café arábica obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos ao longo de 24 horas, a 4 ºC. Nota: TR – temperatura refrigerada (4 ºC).

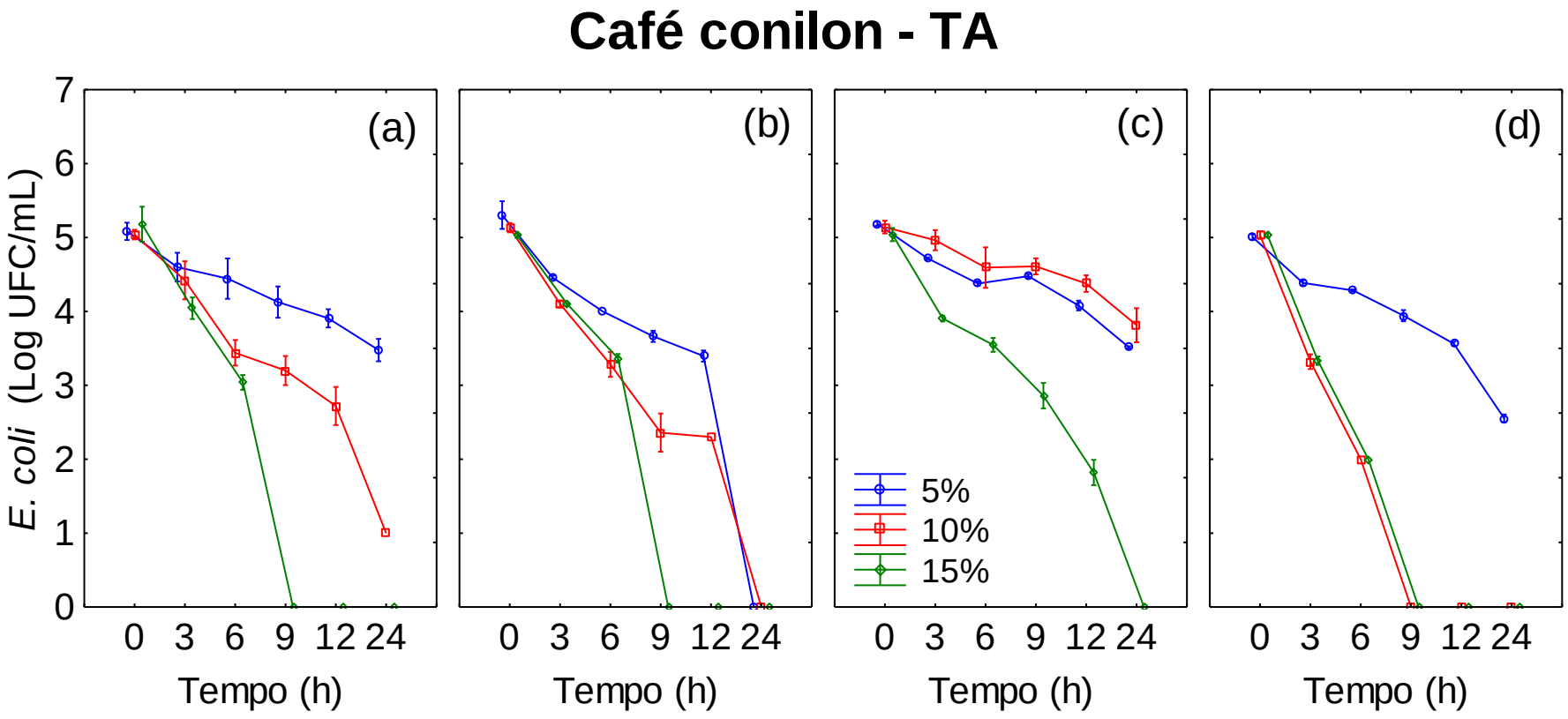


Figura 43: Quantificação de células de *Escherichia coli* ATCC 25922 (log UFC/mL) em *coldbrews* de café conilon obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos ao longo de 24 horas, a 25 ºC. Nota: TA – temperatura ambiente (25 ºC).

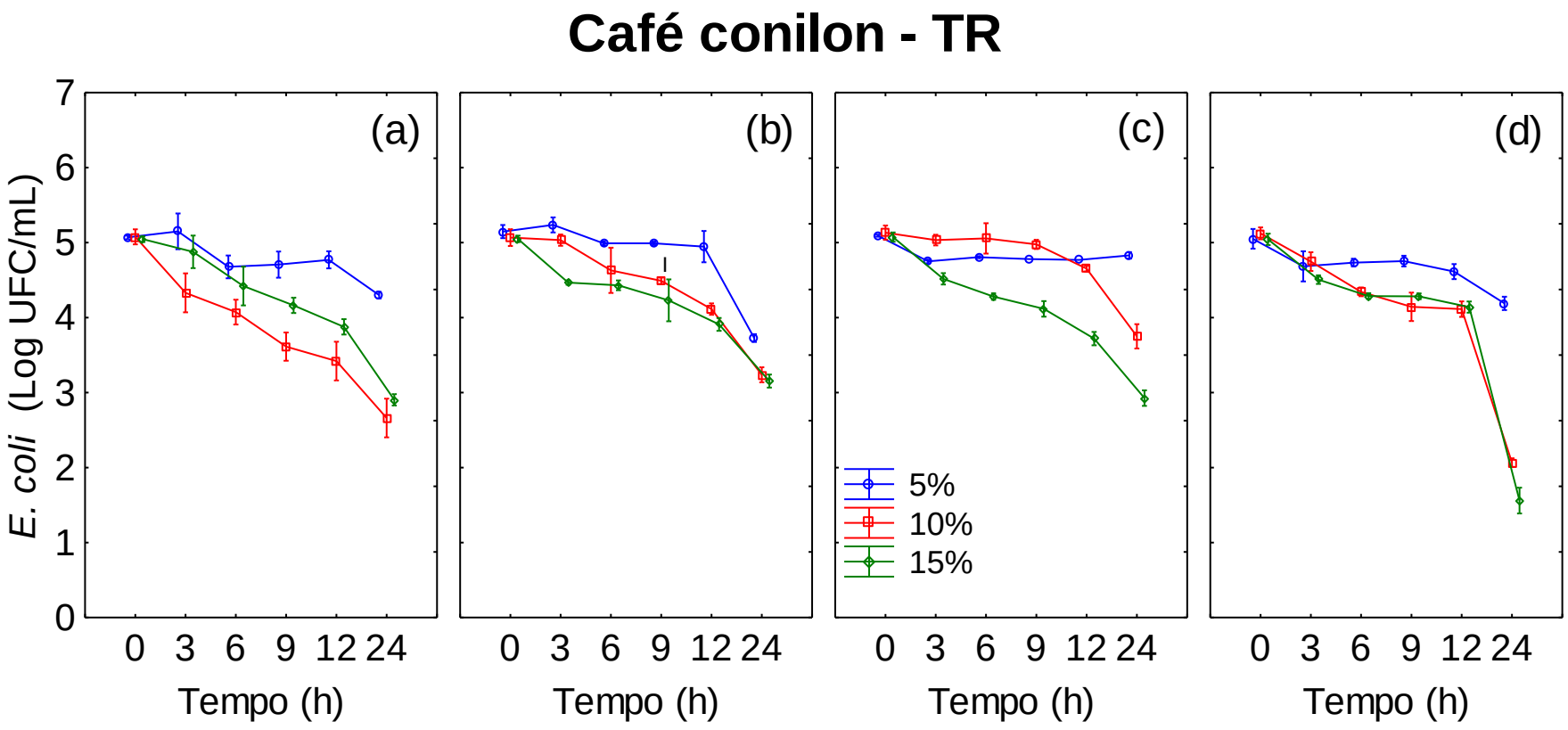


Figura 44: Quantificação de células de *Escherichia coli* ATCC 25922 (log UFC/mL) em *coldbrews* de café conilon obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos ao longo de 24 horas, a 4 ºC. Nota: TR – temperatura refrigerada (4 ºC).

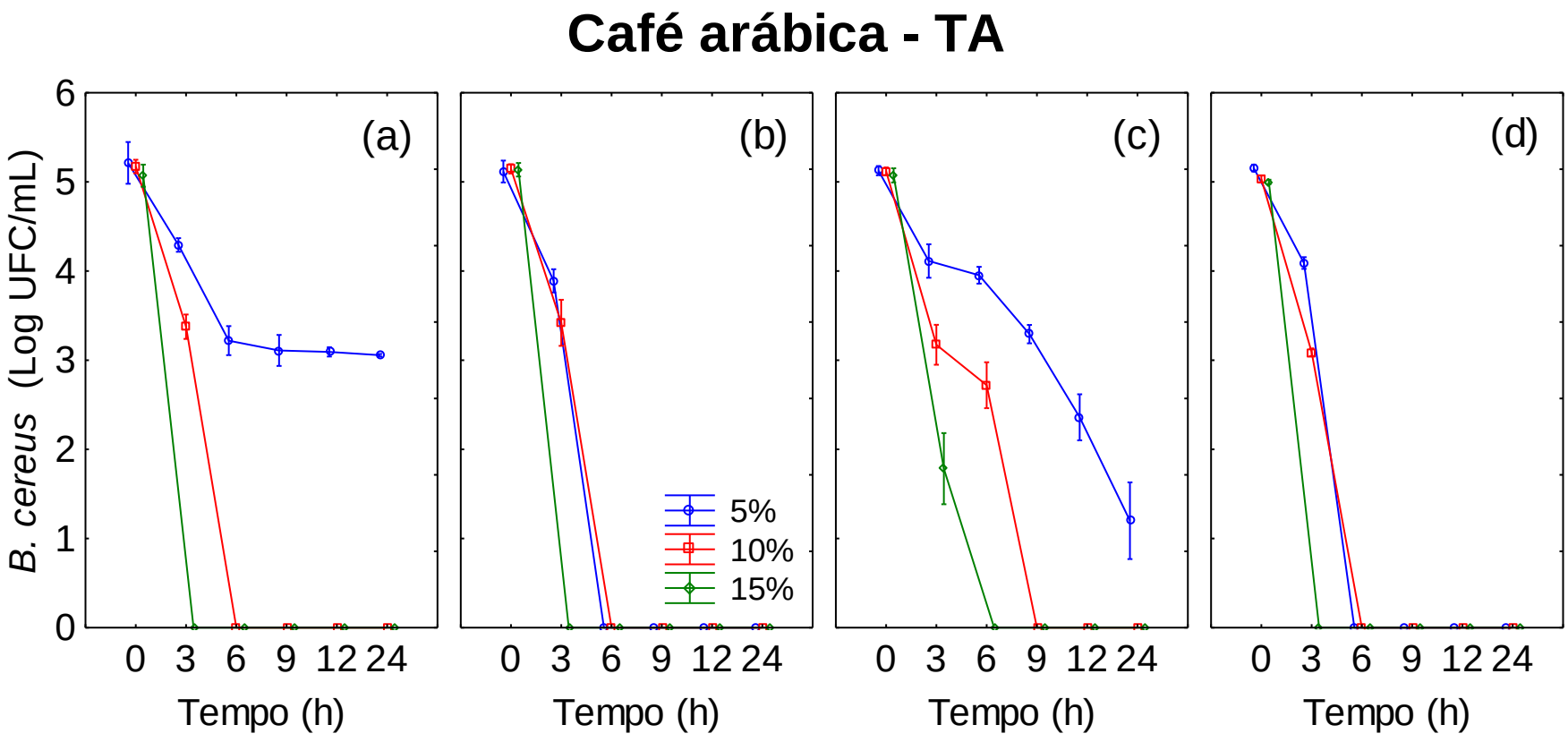


Figura 45: Quantificação de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 (log UFC/mL) em *coldbrews* de café arábica obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos ao longo de 24 horas, a 25 ºC. Nota: TA – temperatura ambiente (25 ºC).

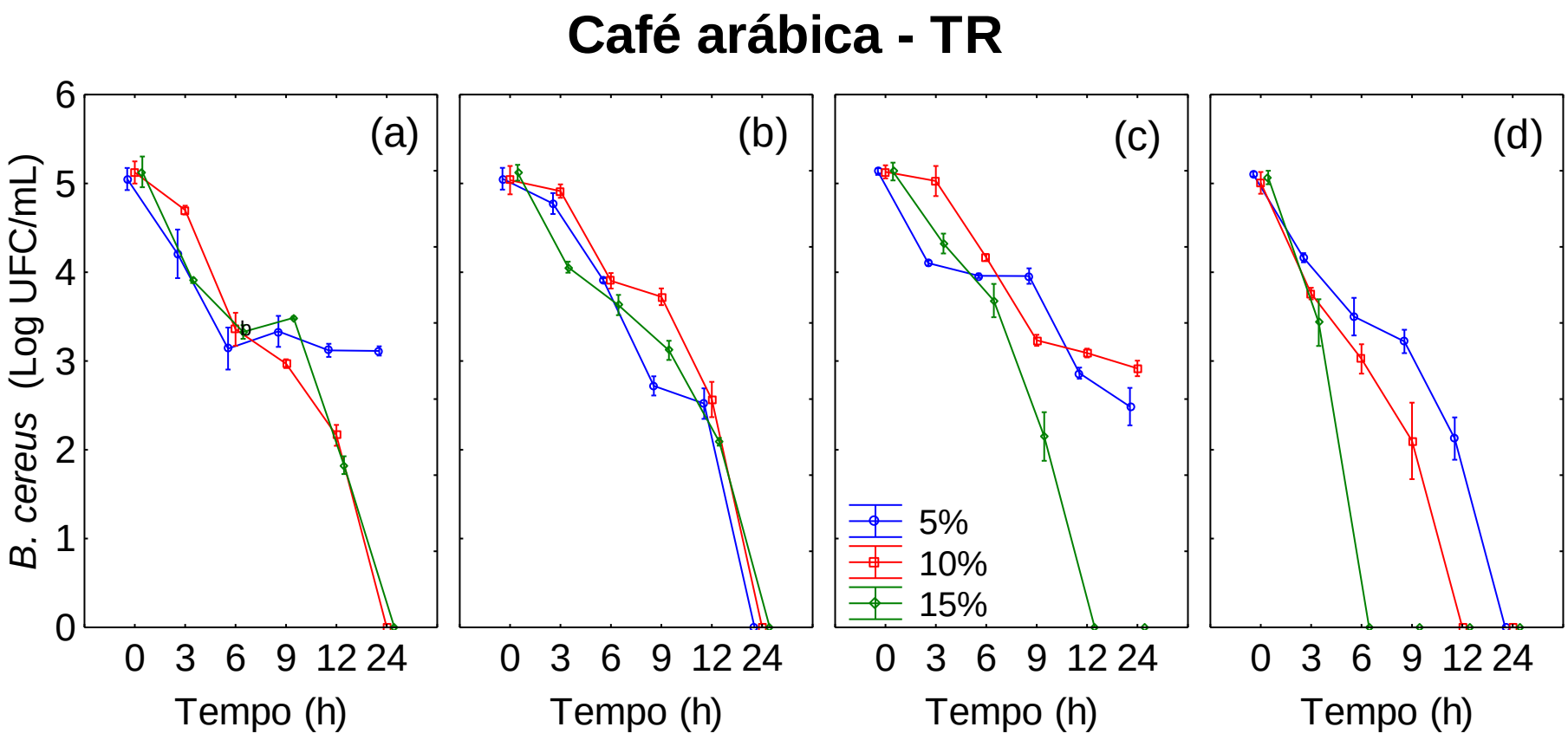


Figura 46: Quantificação de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 (log UFC/mL) em *coldbrews* de café arábica obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos ao longo de 24 horas, a 4 ºC. Nota: TR – temperatura refrigerada (4 ºC).

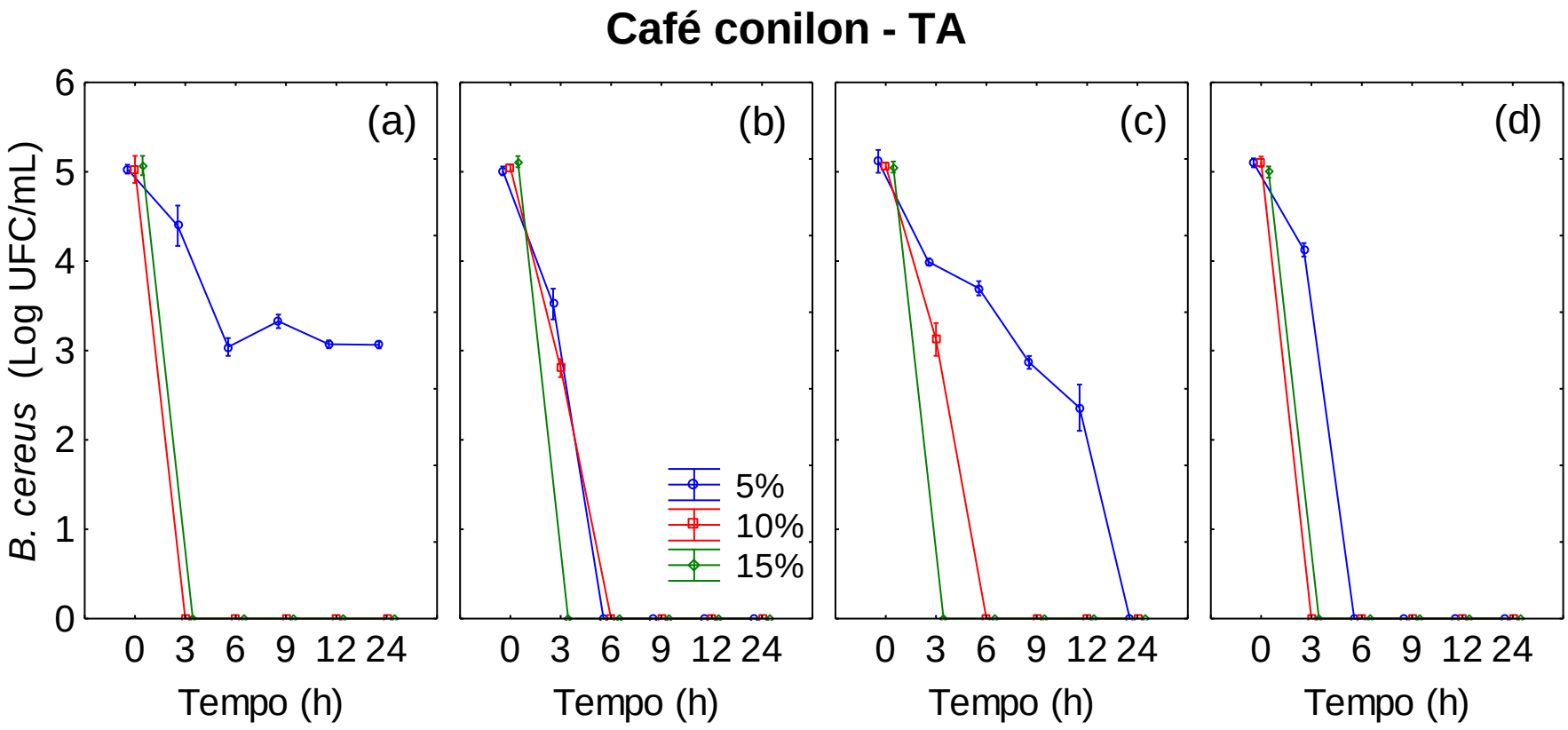


Figura 47: Quantificação de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 (log UFC/mL) em *coldbrews* de café conilon obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos ao longo de 24 horas, a 25 ºC. Nota: TA – temperatura ambiente (25 ºC).

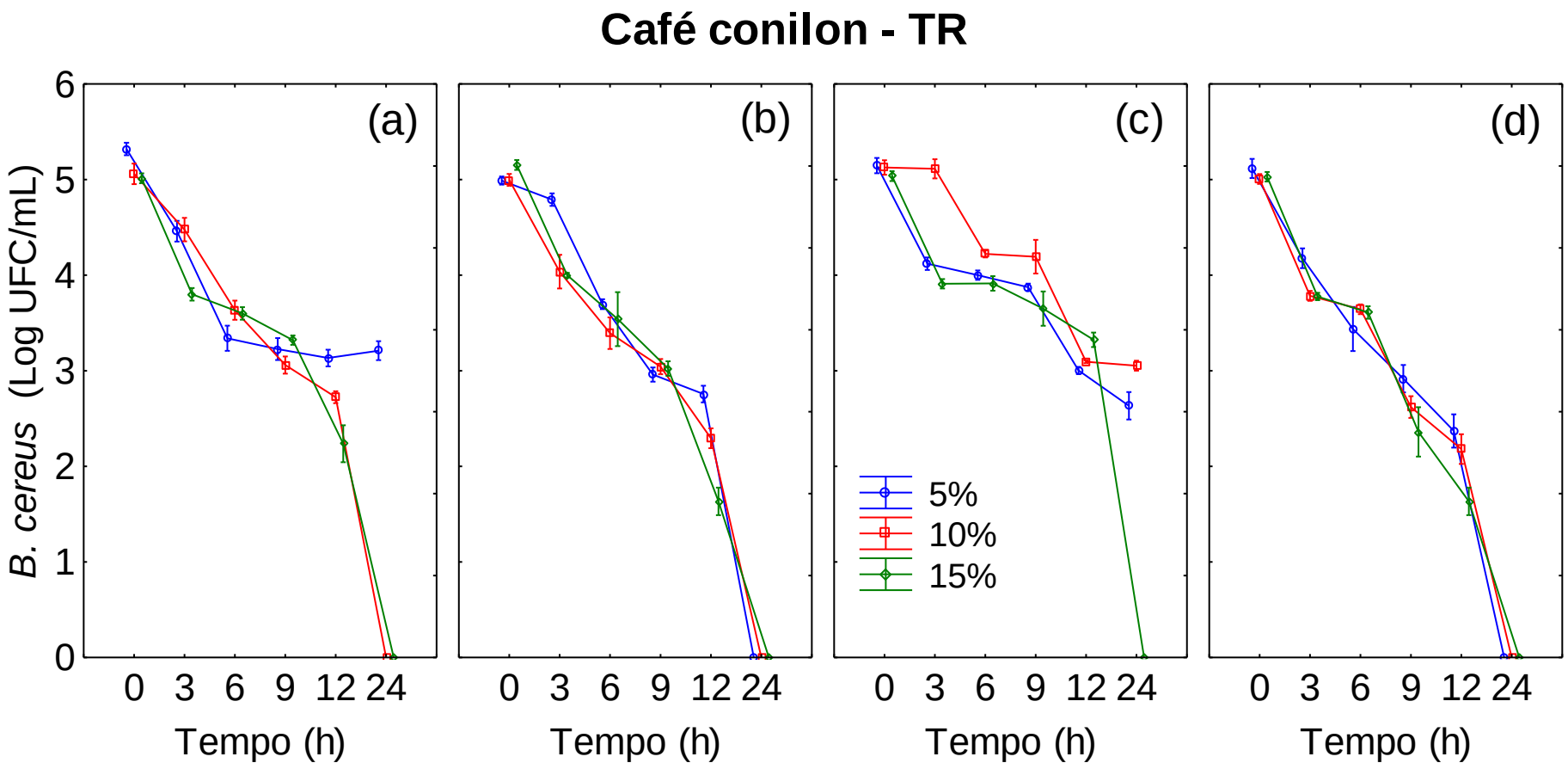


Figura 48: Quantificação de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 (log UFC/mL) em *coldbrews* de café conilon obtidos por (a) imersão sem filtro, (b) imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) vácuo e (d) gotejamento, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, extraídos ao longo de 24 horas, a 4 ºC. Nota: TR – temperatura refrigerada (4 ºC).

Tabela 15: Quantificação de células de *Escherichia coli* ATCC 25922 (log UFC/mL), em *coldbrews* de café arábica e conilon, intencionalmente contaminados com 10^5 UFC/mL, após 24 horas de extração.

Método	**Concentração**	**A TA**		**A TR**		**C TA**		**C TR**	
	(%)	**t0h**	**t24h**	**t0h**	**t24h**	**t0h**	**t24h**	**t0h**	**t24h**
	5	5,18 ±0,03^{aA}	3,21 ±0,02^{bB}	5,15 ±0,05^{aA}	4,18 ±0,03^{bB}	5,08 ±0,05^{aA}	3,48 ±0,06^{bB}	5,07 ±0,01^{aA}	4,30±0,02 ^{aA}
ISF	10	5,11 ±0,01^{aA}	2,62 ±0,06^{cC}	5,21 ±0,02^{aA}	3,29 ±0,03^{cC}	5,04 ±0,03^{aA}	1,00 ±0,00^{cC}	5,08 ±0,04^{aA}	2,66 ±0,10^{bB}
	15	5,25 ±0,01^{aA}	2,30 ±0,00^{dD}	5,13 ±0,04^{aA}	3,34 ±0,02^{cC}	5,18 ±0,09^{aA}	ND	5,05 ±0,02^{aA}	2,91 ±0,03^{cC}
	5	5,12 ±0,02^{aA}	3,23 ±0,08^{eB}	5,07 ±0,03^{aA}	3,70 ±0,03^{dD}	5,30 ±0,08^{aA}	ND	5,15 ±0,04^{aA}	3,73 ±0,02^{dB}
ICF	10	5,14 ±0,08^{aA}	2,85 ±0,06^{fC}	5,03 ±0,01^{aA}	3,67 ±0,02^{dD}	5,13 ±0,03^{aA}	ND	5,05 ±0,03^{aA}	3,24 ±0,04^{eE}
	15	5,09 ±0,00^{aA}	1,30 ±0,00^{gG}	5,06 ±0,01^{aA}	3,22 ±0,00^{eC}	5,02 ±0,01^{aA}	ND	5,05 ±0,01^{aA}	3,15 ±0,04^{eE}
	5	5,07 ±0,00^{aA}	4,97 ±0,01^{hH}	5,08 ±0,02^{aA}	4,84 ±0,00^{fF}	5,19 ±0,02^{aA}	3,51 ±0,00^{dB}	5,10 ±0,01^{aA}	4,83 ±0,02^{fF}
Vac	10	5,14 ±0,03^{aA}	3,56 ±0,04^{iI}	5,13 ±0,06^{aA}	4,40 ±0,03^{gG}	5,14 ±0,04^{aA}	3,81 ±0,09^{eE}	5,13 ±0,04^{aA}	3,75 ±0,07^{gB}
	15	5,10 ±0,02^{aA}	3,27 ±0,07^{jB}	5,22 ±0,01^{aA}	3,88 ±0,07^{hH}	5,04 ±0,04^{aA}	ND	5,07 ±0,02^{aA}	2,93 ±0,05^{hC}
	5	5,05 ±0,01^{aA}	2,75 ±0,02^{kC}	5,05 ±0,01^{aA}	4,03 ±0,02^{iI}	5,01 ±0,01^{aA}	2,55 ±0,02^{fF}	5,05 ±0,05^{aA}	4,19 ±0,03^{iI}
Got	10	5,20 ±0,07^{aA}	ND	5,13 ±0,03^{aA}	3,29 ±0,01^{jC}	5,03 ±0,02^{aA}	ND	5,13 ±0,03^{aA}	2,07 ±0,02^{jJ}
	15	5,01 ±0,01^{aA}	ND	5,10 ±0,02^{aA}	2,79 ±0,04^{kK}	5,03 ±0,01^{aA}	ND	5,04 ±0,03^{aA}	1,56 ±0,07^{kK}

Nota: A – Arábica; C – Conilon; TA – Temperatura ambiente (25ºC); TR – Temperatura refrigerada (4 ºC); ISF – *coldbrew* por imersão sem filtro; ICF – *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo); Vac – *coldbrew* por vácuo; Got – *coldbrew* por gotejamento; ND – Não detectado. Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística em métodos diferentes e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística no mesmo método pelo pós teste de *Fisher* (p<0,05).

Tabela 16: Quantificação de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 (log UFC/mL), em *coldbrews* de café arábica e conilon, intencionalmente contaminados com 10^5 UFC/mL de, após 24 horas de extração.

Método	**Concentração**	**A TA**		**A TR**		**C TA**		**C TR**	
	(%)	**t0h**	**t24h**	**t0h**	**t24h**		**(%)**	**t0h**	**t24h**
	5	5,21 ±0,10^{aA}	3,06 ±0,01^{bB}	5,05 ±0,05^{aA}	3,12 ±0,02^{bB}	5,03 ±0,02^{aA}	3,06 ±0,0^{bB}	5,32 ±0,03^{aA}	3,21 ±0,04^{bB}
ISF	10	5,17 ±0,03^{aA}	ND	5,12 ±0,05^{aA}	ND	5,07 ±0,06^{aA}	ND	5,06 ±0,05^{aA}	ND
	15	5,07 ±0,05^{aA}	ND	5,13 ±0,07^{aA}	ND	5,01 ±0,04^{aA}	ND	5,01 ±0,02^{aA}	ND
	5	5,12 ±0,05^{aA}	ND	5,05 ±0,05^{aA}	ND	5,01 ±0,02^{aA}	ND	4,99 ±0,02^{aA}	ND
ICF	10	5,15 ±0,02^{aA}	ND	5,04 ±0,07^{aA}	ND	5,05 ±0,02^{aA}	ND	5,00 ±0,02^{aA}	ND
	15	5,13 ±0,03^{aA}	ND	5,12 ±0,04^{aA}	ND	5,11 ±0,02^{aA}	ND	5,15 ±0,02^{aA}	ND
	5	5,13 ±0,02^{aA}	1,20 ±0,17^{bC}	5,13 ±0,01^{aA}	2,49 ±0,09^{bC}	5,12 ±0,05^{aA}	ND	5,15 ±0,03^{aA}	2,63 ±0,06^{bC}
Vac	10	5,12 ±0,01^{aA}	ND	5,13 ±0,03^{aA}	2,92 ±0,04^{bD}	5,06 ±0,02^{aA}	ND	5,12 ±0,03^{aA}	3,06 ±0,03^{cD}
	15	5,07 ±0,03^{aA}	ND	5,13 ±0,04^{aA}	ND	5,05 ±0,02^{aA}	ND	5,14 ±0,02^{aA}	ND
	5	5,16 ±0,02^{aA}	ND	5,10 ±0,01^{aA}	ND	5,10 ±0,02^{aA}	ND	5,11 ±0,04^{aA}	ND
Got	10	5,21 ±0,10^{aA}	ND	5,05 ±0,05^{aA}	ND	5,11 ±0,02^{aA}	ND	5,01 ±0,02^{aA}	ND
	15	5,17 ±0,03^{aA}	ND	5,12 ±0,05^{aA}	ND	5,00 ±0,02^{aA}	ND	5,03 ±0,02^{aA}	ND

Nota: A –Arábica; C – Conilon; TA – Temperatura ambiente (25ºC); TR – Temperatura refrigerada (4 ºC); ISF – *coldbrew* por imersão sem filtro; ICF – *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo); Vac –*coldbrew* por vácuo; Got – *coldbrew* por gotejamento; ND – Não detectado. Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística em métodos diferentes e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística no mesmo método pelo pós teste de *Fisher* (p<0,05).

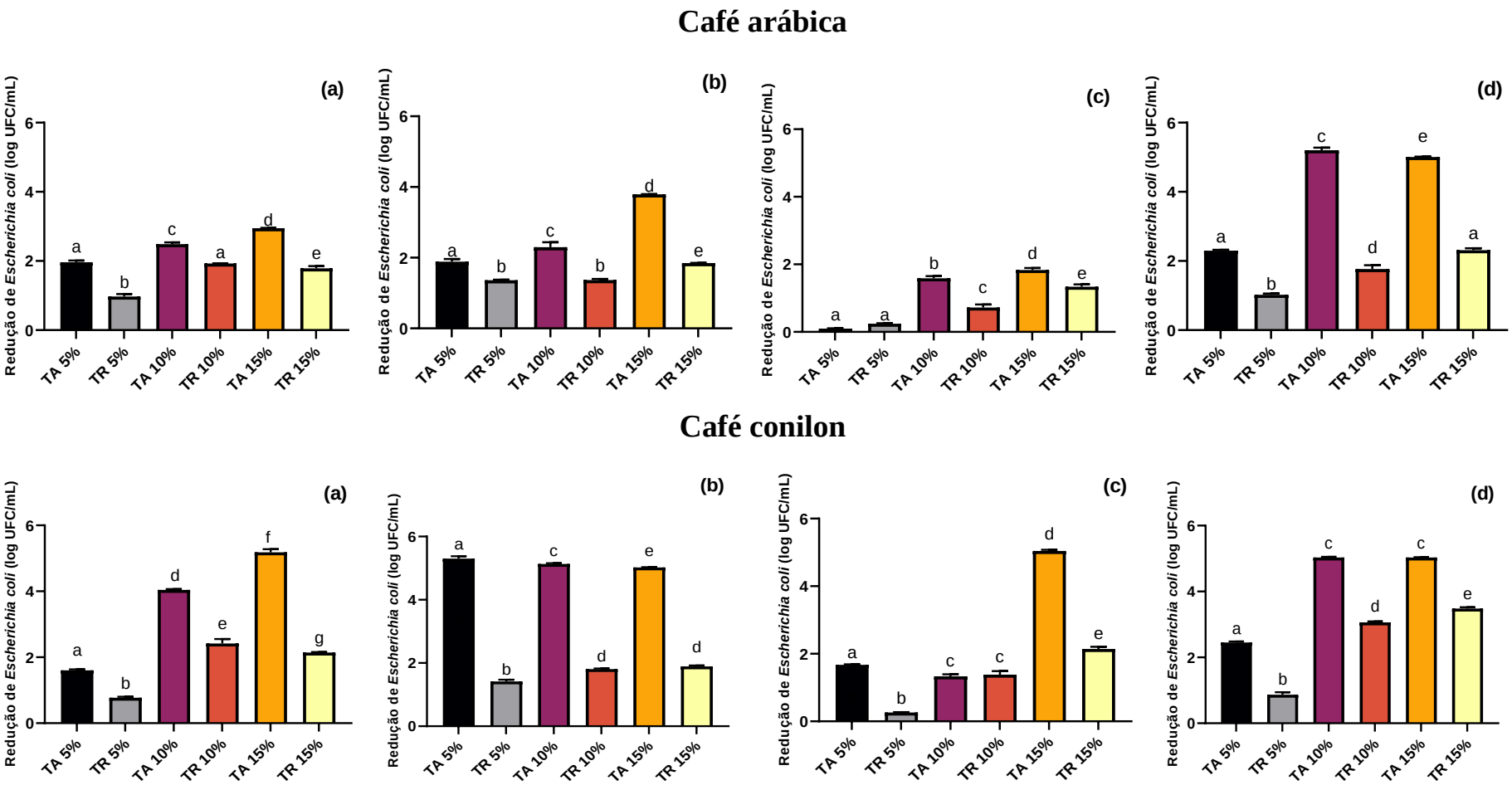


Figura 49: Reduções (log UFC/mL) da população de *Escherichia coli* ATCC 25922 entre os tempos inicial e final de produção de *coldbrews* (a) por imersão sem filtro, (b) por imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) por vácuo, (d) por gotejamento, com café arábica e conilon, a 5%, 10% e 15% e em diferentes temperaturas. Nota: TA – Temperatura ambiente (25ºC); TR – Temperatura refrigerada (4 ºC); ND – Não detectado. Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística em métodos diferentes e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística no mesmo método pelo pós teste de *Fisher* (p<0,05).

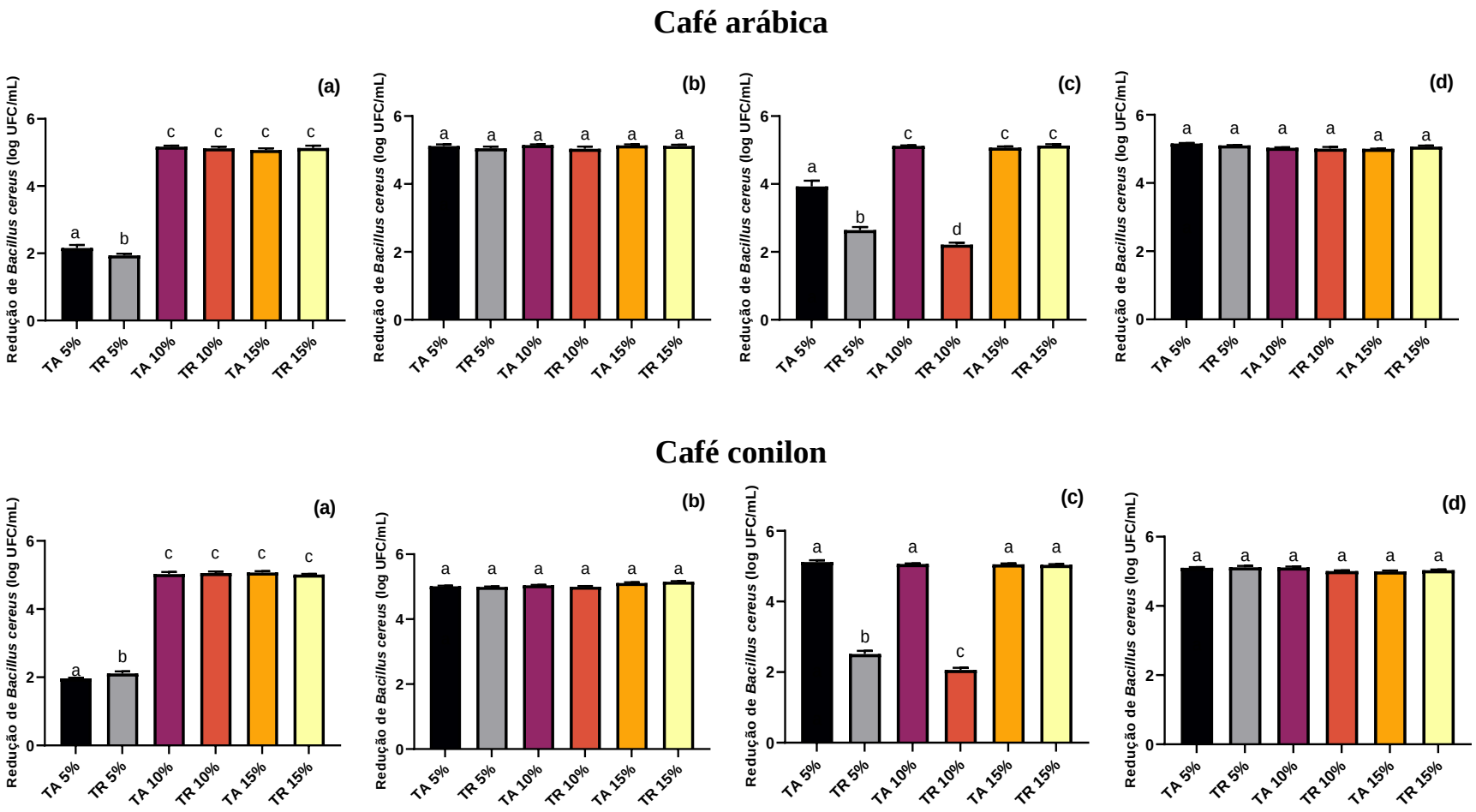


Figura 50: Reduções (log UFC/mL) da população de células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433 entre os tempos inicial e final de produção de *coldbrews* (a) por imersão sem filtro, (b) por imersão com filtro de algodão (saco de queijo), (c) por vácuo, (d) por gotejamento, com café arábica e conilon, a 5%, 10% e 15% e em diferentes temperaturas. Nota: TA – Temperatura ambiente (25ºC); TR – Temperatura refrigerada (4 ºC); ND – Não detectado. Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística em métodos diferentes e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística no mesmo método pelo pós teste de *Fisher* (p<0,05).

Em relação aos achados da literatura acerca do efeito antimicrobiano dos compostos bioativos do café, no presente estudo foram obtidos teores na mesma faixa de concentração de CGA (200 mg/100 mL) (CAI et al., 2019), cafeína (62,5 mg/100 mL) (WHITNEY E WEIR, 2015) e trigonelina (69 mg/100 mL) (SILVA et al., 2014), especialmente em *coldbrews* mais concentrados (10% e 15%).

Cai et al. (2019), investigaram os mecanismos e propriedades antibacterianas de 5-CQA e ácido cinâmico e concluíram que a partir de 2 mg/mL de 5-CQA e 0,375 mg/mL de ácido cinâmico houve efeito antimicrobiano contra *Alicylobacillus acidoterrestris* (VASCONCELOS et al., 2018). Herald e Davison (1983), avaliaram o efeito antimicrobiano dos ácidos hidroxicinâmicos (cafeico, ferúlico e *p*-cumárico), precursores e metabólitos dos CGA, contra *E. coli, S. aureus* e *B. cereus*. O ácido *p*-cumárico foi o mais efetivo em inibir os microrganismos testados (inibição > 99,9%) a partir de 500 µg/mL para as estirpes Gram-positivas (*S. aureus* e *B. cereus*) e a partir de 1000 µg/mL para a estirpe Gram-negativa (*E. coli*). De acordo com os autores, *B. cereus* foi a estirpe mais suscetível aos compostos testados com inibição de crescimento em mais de 99%. Esses resultados são consistentes com os observados na presente dissertação.

Existem três teorias sobre os fatores que poderiam explicar a atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos (HERALD E DAVISON, 1983; REGUANT et al., 2000):

1. Quanto maior a cadeia e número de duplas ligações, maior a atividade antimicrobiana.
2. Quanto maior o teor de ácidos não-dissociados, maior a atividade antimicrobiana.
3. Quanto menor a polaridade, melhor a permeabilidade de compostos na membrana do microrganismo.

Porém, alguns autores sugerem que apesar da menor polaridade e maior atividade antimicrobiana em teoria, na prática deve existir um equilíbrio na solubilidade das fases polares e apolares (DAGLIA et al., 2004; CAMPOS et al., 2003b). Vale ressaltar que entre os nove CGA avaliados no presente estudo, há diferenças de polaridade que serão futuramente exploradas, em especial, o fato dos ácidos dicafeoilquínicos, conhecidos constituintes de vários tipos de própolis coletadas no Brasil (MARTINS et al., 2019), terem possivelmente maior atividade antimicrobiana do

que os cafeoilquínicos e os feruloilquínicos. Os compostos fenólicos que possuem carga aniônica em geral, promovem desequilíbrio de pH na membrana externa de microrganismos que impede o transporte adequado de nutrientes e remove cátions divalentes. Sem esses cátions, os fosfolipídeos da membrana se repelem, levando a instabilidade da membrana celular (BASHFORD et al., 1988; RUFIAN-HENARES et al., 2008).

Sales et al. (2020), investigaram a influência da espécie de café, grau de torrefação e o processo de descafeinação no potencial probiótico dos compostos do café. Após 48 horas de incubação, extratos de café arábica de torra média e escura aumentaram seletivamente a multiplicação de estirpes probióticas de forma dose-dependente. Além disso, extratos de café arábica e conilon inibiram a multiplicação de *E. coli*, ao passo que extratos de café descafeinados promoveram sua multiplicação, reforçando o potencial antimicrobiano da cafeína. Whitney e Weir (2015), sugerem que a exposição de *E. coli* à cafeína em concentrações de 0,625 mg/mL, provoca dano irreversível com alterações de morfologia celular como o alongamento das células. Esse alongamento seria uma resposta da *E. coli* frente ao dano de DNA celular provocado pela ação da cafeína, que bloqueia a replicação do material genético do microrganismo (DASH E GUMMADI, 2008). Alguns autores propõem que a cafeína também poderia se ligar a proteínas de reparo celular do microrganismo, devido à sua estrutura química similar aos nucleotídeos purínicos, impedindo que as vias de reparo fossem acionadas (KANG et al., 2012).

Além da presença de compostos fenólicos, a adição de cafeína com compostos alfa-dicarbonil (glioxal, metilglioxal e diacetil) e 5-HMF, formados durante o processo de torrefação a partir da fragmentação de açúcares nas reações de *Maillard*, agem em sinergia aumentado a atividade antimicrobiana da cafeína (OLASUPO et al., 2003; DAGLIA et al., 2007; MALETTA E WERE, 2012). Em pH ácido (especialmente abaixo de 5), os compostos fenólicos exercem maior atividade antimicrobiana, pois apresentam melhor permeabilidade e solubilidade nos fosfolipídeos da membrana do microrganismo (HERALD E DAVISON, 1983). Para trigonelina, Silva et al. (2014) testaram extratos de café conilon a 20% e observaram que dentre os compostos bioativos do café analisados, o composto em questão (0,69 ± 0,0014 mg/mL) exibiu efeito bacteriostático e bactericida contra microrganismos cariogênicos, embora não pudessem explicar o mecanismo de ação.

Embora os compostos bioativos do café apresentem atividade antimicrobiana individualmente, o efeito aditivo (quando a atividade antimicrobiana de compostos combinados é igual a soma das atividades das substâncias isoladas) e o efeito sinérgico (quando a atividade antimicrobiana de compostos combinados é maior do que a atividade da soma das substâncias isoladas), não devem ser negligenciados (DAVISON E PARISH, 1989). Desta forma, as propriedades do café não devem ser atribuídas a um composto específico, e sim, a interação de vários compostos que atuam em diversos alvos celulares (ALMEIDA et al., 2006; KABIR et al., 2014). Em *coldbrews* obtidos a partir dos métodos de imersão e gotejamento, parece ter ocorrido aumento da atividade antimicrobiana devido à sinergia entre os diferentes compostos bioativos do café face a *E. coli* e *B. cereus* para todos os métodos, concentrações, temperaturas e espécies de café testados. Esses resultados, associados à interação entre os diversos compostos bioativos do café com propriedades antimicrobianas, poderiam explicar o efeito inibitório de bebidas de café extraídas a frio frente a células de *E. coli* e *B. cereus*.

Em *coldbrews*, houve maior efeito inibitório de *B. cereus* do que de *E. coli* em 24 horas, dados consistentes com os reportados na literatura (HERALD E DAVISON, 1983; RUFIAN-HENARES et al., 2008; 2009; MARTÍNEZ-TOMÉ et al., 2011; LANGNER; RZESKI, 2014; PERSIDOU et al., 2015; DUANGJAI et al., 2016). Embora haja essa diferença, vale destacar que ambos os microrganismos testados tiveram sua taxa de multiplicação reduzida no período de 24 horas (**Tabelas 15 e 16**). Alguns autores referem que extrações por períodos superiores a 7 horas seriam desnecessárias, dada a cinética de extração dos compostos bioativos do café (RAO E FULLER, 2017; FULLER E RAO, 2018; CASTAÑEDA-RODRIGUEZ et al., 2020; RAO et al., 2020), outros propõem que existem diferenças nos teores de sólidos solúveis e compostos fenólicos totais de *coldbrews* extraídos em 14 e 22 horas (CORDOBA et al., 2019). Do ponto de vista microbiológico, a partir de 9 horas de extração nos métodos de imersão e gotejamento, especialmente em bebidas preparadas com água em temperatura ambiente a 10% e 15%, houve tempo hábil para que os compostos bioativos presentes nos *coldbrews* de café arábica e conilon pudessem exercer efeito antimicrobiano contra *E. coli* e a partir de 3 horas de extração contra *B. cereus*, conforme apresentado na **Figura 51.**

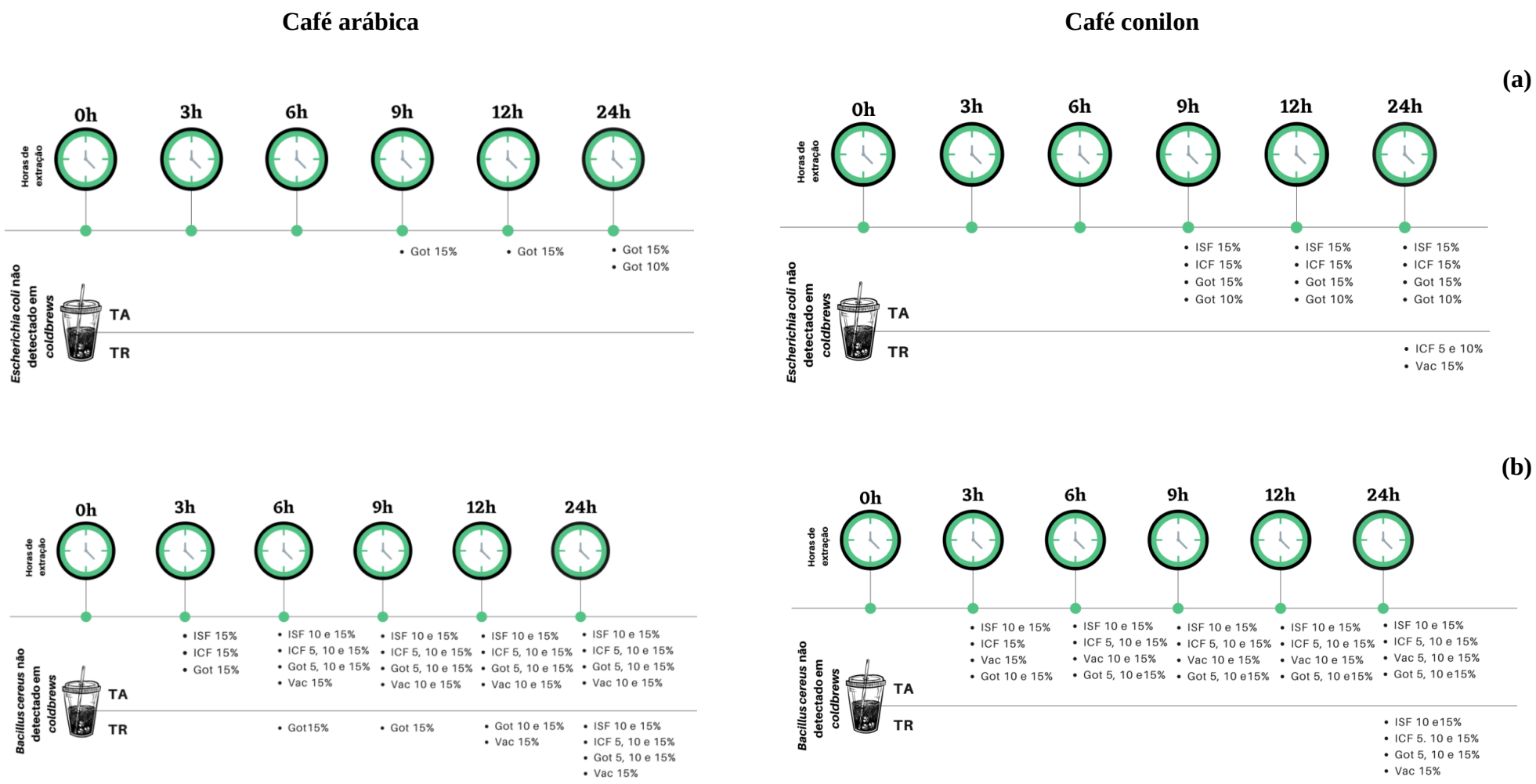


Figura 51: Efeito antimicrobiano, face a (a) *Escherichia coli* ATCC 25922 e (b) *Bacillus cereus* FF4433, de *coldbrews* de café arábica e conilon a 5%, 10% e 15%, com água a 4 ºC e 25 ºC, ao longo de 24 horas de extração. Nota: TA – Temperatura ambiente (25 ºC); TR – Temperatura refrigerada (4 ºC); ISF – *coldbrew* por imersão sem filtro; ICF – *coldbrew* por imersão com filtro de algodão (saco de queijo); Vac – *coldbrew* por vácuo; Got – *coldbrew* por gotejamento.

As contaminações intencionais desta dissertação foram superiores aos limites reportados pelas legislações vigentes (BRASIL, 2011). Porém, em situações de desastres ambientais, vazamentos de esgoto no sistema de água ou, até mesmo, deficiência no sistema de saneamento ambiental, a presença de *Escherichia coli*, bactéria abundante em fezes de animais e importante indicador microbiológico da qualidade da água, pode exceder as concentrações permitidas pela Resolução da Comissão Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) número 274/2000, que estabelece o limite máximo de 2 x 10^3 UFC/100 mL de água para este microrganismo (BRASIL, 2000). Um exemplo disso foi a contaminação em um canal de drenagem em São Paulo, conforme descrito por Roveri e Muniz (2016), que encontraram em três dias de coleta, concentrações de *E. coli* de 1,5x10^5 a 4,5x10^5 UFC/100 mL de água, indicando, segundo os autores, elevada contaminação fecal no trecho do canal analisado e expondo a população consumidora desta água a um elevado risco de DTA, podendo provocar quadros agudos de diarréia, vômitos, dores abdominais, febre e até mesmo óbito (PEROTTO et al., 2021). Mais recentemente, o Rio de Janeiro passou por uma crise hídrica nos verões de 2020 e 2021. Bacha et al. (2021), analisaram, entre 2019 e 2020, a qualidade microbiológica da água na barragem do rio Guandu, que abastece a cidade do Rio de Janeiro, e encontraram 7 x 10^3 UFC de *E. coli* /100 mL de água (com variações de 1 x 10^4 a 5 x 10^4 UFC/100 mL de água), concentrações superiores às preconizadas nas legislações vigentes (BRASIL, 2000; 2011).

Nesse cenário extremo, se essa água fosse utilizada para o preparo de *coldbrews*, o consumo destas bebidas poderia colocar em risco a saúde do consumidor. Por exemplo, *coldbrews* de café arábica a 10% (concentração comumente utilizada) extraídos com água em temperatura refrigerada (4 ºC) (temperatura comumente utilizada e indicada em sites e *blogs* para o preparo de *coldbrews*), exibiram concentrações médias de *E. coli* em UFC/100 mL de 1,93 x 10^5 para o método ISF; 4,64 x 10^5 para o método ICF; 2,54 x 10^6 para o método Vac; e 1,96 x 10^5 para o método Got, valores bem próximos aos reportados por Roveri e Muniz (2016) e superiores aos apresentados por Bacha et al. (2021), indicando risco em potencial de acometimento por uma DTA em decorrência do consumo dessas bebidas de café se preparadas com água em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias.

Além da escolha de bebidas mais concentradas e longo períodos de extração para garantir maior atividade antimicrobiana do café no preparo de *coldbrews*, uma

contribuição no preparo do produto a nível comercial, seria o emprego da técnica de Pasteurização por Alta Pressão (PAP), também conhecida como Alta Pressão Hidrostática (APH). Este recurso se destina ao processamento de produtos termossensíveis com a aplicação de alta pressão (100 a 1000 MPa) no intuito de promover a destruição microbiológica e retardar reações enzimáticas (CAMPOS et al., 2003a). Recentemente, Bellumori et al. (2021), avaliaram diferentes técnicas de estabilidade ao longo de 4 meses, com o objetivo de aumentar o tempo de prateleira de *coldbrews*, preservando as características sensoriais e garantindo a segurança microbiológica da bebida. Foram testadas as técnicas PAP, microfiltração, radiação ultravioleta e ultra resfriamento. Dentre elas, a PAP exibiu o melhor desempenho, mantendo a estabilidade, o teor de CGA, cafeína, compostos voláteis e garantindo a segurança microbiológica. A PAP se mostrou como alternativa viável, ainda que de alto custo, às grandes redes fabricantes de *coldbrews*, no sentido de minimizar os riscos de contaminação e atender aos requisitos higiênico-sanitários necessários à confecção de bebidas de café extraídas a frio conforme preconizam os sistemas de BPF e APPCC (PADILHA et al., 2019).

O presente estudo avaliou a segurança microbiológica de bebidas de café obtidas por métodos de extração a frio inovadores. Os achados reforçam a necessidade de padronização dos métodos de extração de *coldbrews*, assim como a garantia do adequado armazenamento dos grãos ou pó de café, da qualidade microbiológica da água a ser utilizada e do bom estado de limpeza e conservação dos equipamentos e utensílios utilizados durante a extração. O tempo de armazenamento de *coldbrews* por 24 horas em temperatura ambiente, mostrou-se potencialmente eficiente para a segurança microbiológica da bebida, sendo que outros microrganismos patogênicos precisam ser testados. Porém, é essencial que sejam garantidas as BPF e condições higiênico-sanitárias satisfatórias ao preparo de *coldbrews*, tanto a nível doméstico quanto comercial e industrial.

8. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesta dissertação pode-se concluir que:

- Os teores de sólidos solúveis se correlacionaram fortemente com os teores dos compostos bioativos quantificados nas bebidas de café extraídas a quente e a frio.
- Não houve diferença de pH entre bebidas de café extraídas a frio e a quente ao longo de 24 horas.
- Os grãos de café torrados e moídos apresentaram baixa contaminação microbiana, sendo identificada a presença de *Bacillus subtillis* e fungos.
- Os filtros de papel e de pano não retiveram os microrganismos (*Escherichia coli* ATCC 25922 e células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433) presentes na água de preparo das bebidas de café.
- A água de preparo a 92,5 ºC contaminada com *Escherichia coli* ATCC 25922 e células vegetativas de *Bacillus cereus* FF4433, eliminou o risco do consumo de bebidas de café quente.
- O processo de extração com água em temperatura ambiente resultou em maior teor de compostos bioativos quando comparadas a bebidas extraídas com água em temperatura refrigerada.
- Todas as condições das bebidas de café avaliadas reduziram na bebida final, em diferentes níveis, a carga microbiana intencionalmente contaminada.
- Os métodos a frio que resultaram em maior extração de compostos bioativos (imersão e gotejamento), realizados com água em temperatura ambiente e mais concentrados, obtiveram os melhores resultados de redução da carga microbiana.
- A extração a vácuo é desaconselhada no preparo de *coldbrews*, pois dentre todas as técnicas testadas, foi a que se mostrou menos eficiente em inibir a multiplicação de *E. coli* e *B. cereus*.
- Considerando a água, o pó de café e os utensílios de preparo em condições higiênico-sanitárias satisfatórias, a técnica de *cold brewing* mostrou-se segura desde que a bebida seja consumida logo após o preparo de 24 horas.
- Os resultados confirmam a atividade antimicrobiana dos compostos bioativos do café.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Coldbrews são bebidas de café complexas que necessitam de requisitos especiais de higiene em termos de segurança microbiológica. Isso se deve ao fato de que não ocorre nenhum processamento térmico durante a sua produção, de forma que o cumprimento das BPF e legislações sanitárias devem ser implementados e monitorados regularmente. Em geral, recomenda-se que a bebida extraída a frio seja preparada e consumida no mesmo dia. Longo período de armazenamento poderia aumentar o risco de contaminação microbiológica, afetando as características sensoriais da bebida e até mesmo podendo colocar em risco a saúde dos consumidores.

Atenção deve ser dada à procedência da matéria-prima, pois podem ocorrer contaminações nas etapas subsequentes à torrefação, durante o processamento do café. A adoção de boas práticas ao longo de todo processo produtivo de *coldbrews* (incluindo aquisição e acondicionamento da matéria-prima, estado de limpeza e conservação de equipamentos, recipientes, utensílios, insumos e do próprio manipulador), parece ser uma medida muito mais importante na garantia da qualidade e segurança microbiológica da bebida do que confiar exclusivamente na ação antimicrobiana dos compostos bioativos do café. Isso porque os teores desses compostos dependem de inúmeras variáveis, incluindo espécie, região de origem, condições de cultivo, grau de torrefação, granulometria, método de preparo, nível de agitação e temperatura da água utilizada durante a extração.

Uma das limitações do estudo foi a adaptação dos métodos e técnicas de extração a frio como, por exemplo, o gotejamento e vácuo. No gotejamento, sistemas comerciais como *Nispira*® ou *Coldbruer*® são utilizados na extração de bebidas de café, porém neste estudo, como os equipamentos e materiais necessitavam estar estéreis a cada ciclo de experimentos de contaminação intencional, não foi possível utilizar o *Nispira*® que poderia danificar em contato com as altas temperaturas da autoclave (121 ºC de 15 a 30 minutos). Da mesma forma, à época do planejamento experimental, ainda não havia disponível no mercado os sistemas comerciais de extração a vácuo, *VacOneCoffee*® e *Gourmia* GCM7800® (lançados em 2020), e por isso, a metodologia de extração foi adaptada com um sistema de kitassatos conectados a uma bomba a vácuo e o gotejamento a partir de um sistema composto por funil de decantação com suporte para filtro de papel e um recipiente coletor da bebida. Além disso, não foram realizados experimentos de contaminação por tempo superior a 24 horas por não serem

comumente utilizados pelos consumidores, embora esta forma de preparo não seja impossível de ser realizada.

São necessários estudos futuros que investiguem as cinéticas de extração de CGA, cafeína, trigonelina e melanoidinas em *coldbrews* ao longo de todo tempo de extração das bebidas de café arábica e conilon, em diferentes graus de torrefação, métodos de preparo, concentrações, granulometrias e temperaturas para aumentar o nível de compreensão dos processos de difusão desses compostos. Também são importantes estudos de contaminação intencional com outros microrganismos relevantes do ponto de vista da segurança alimentar como *S. aureus*, *Salmonella sp*. e *L. monocytogenes* e mais estudos que elucidem sobre o comportamento de esporos produzidos por microrganismos patogênicos em *coldbrews*.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). Resolução nº 216, de 15 de setembro de 2004. **Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação.** Diário Oficial da União, Brasília, DF. 15 set. 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos.** Diário Oficial da União, Brasília, DF. 9 mar. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 331, de 23/12/2019. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 dez. 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Instrução Normativa IN n°60, de 23 de dezembro de 2019. **Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 dez. 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regularização de Empresas – Alimentos: Boas Práticas de Fabricação.** 2020. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/alimentos/empresas/boas-praticas-de-fabricacao. Acessado em: 30 mar. 2020.

ALLARCON, B.; HOTCHKISS, J. H. **The effect of Fresh Pax oxygen-absorbing packets on the shelf–life of foods.** New York: Cornell University/Department of Food Science, 1993, p.1-7 (Technical Report).

ALMEIDA, A. A. P. et al. Influence of natural coffee compounds, coffee extracts and increased levels of caffeine on the inhibition of *Streptococcus mutans*. **Food Research International**, v.49, n.1, p.459–461, 2012.

ALMEIDA, A. M. P. et al. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.54, n.1, p.8738-8743, 2006.

ALVES, R. M. V. et al. Café torrado e moído em embalagens inertizadas. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.1 p. 22-27, 2003.

ALVES, E.; CASTRO, H. A. Fungos associados ao café (Coffea arabica) nas fases de pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. **SummaPhytopathologica**, v.24, n.1, p.4-7, 1998.

ALVES, K. C. S. et al. *Bacillus subtilis*: uma versátil ferramenta biotecnológica. **ScientiaAmazonia**, v7, n.2, B15-B23, 2018.

ARPINI, B. S. et al. Controle de *Meloidogyne exigua* em cafeeiro arábica com uso de bionematicida constituído por *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis*. **XVIII Encontro Latino-Americano de Pós-Graduação**, outubro, 2018.

ANDUEZA, S. P. et al. Chemical and sensorial characteristics of espresso coffee as affected by grinding and torrefacto roast. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.51, n.1, p.7034-7039, 2003.

ANGELONI G. et al. Characterization and comparison of cold brew and cold drip coffee extraction methods. **Journal of Science Food and Agriculture**, v.99, n.1, p.391–399, 2019a.

ANGELONI, G. et al. What kind of coffee do you drink? An investigation on effects of eight different extraction methods. **Food Research International**, v.116, n.1 p.1327-1335, 2019b.

ANUNCIAÇÃO, A. S.; SILVA, L. S. S. Análise da qualidade do café obtido por torrefação a vácuo. **Revista CSBEA**, v.2, n.1, p.1-7, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDUSTRIA DE CAFÉ (ABIC). 2012. **Granulometria.** Disponível em: http://www.abic.com.br/scafe_dicas.html Acessado em 30 nov. 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDUSTRIA DE CAFÉ (ABIC). 2016. **Consumo de café.** Disponível em. https://www.abic.com.br/wp-content/uploads/2020/01/2016.pdf. Acessado: 30 nov. 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDUSTRIA DE CAFÉ (ABIC). 2021. **Estatísticas de consumo em 2020**. Disponível em: https://estatisticas.abic.com.br/estatisticas/indicadores-da-industria/indicadores-da-industria-de-cafe-2020/. Acessado em: 25 jul. 2021.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDUSTRIA DE CAFÉ (ABIC). 2020. **Recomendações técnicas.** Disponível em: https://www.abic.com.br/institucional/recomendacoes-tecnicas-da-abic/. Acessado em: 30 jul. 2020.

AUTORIDADE DE SEGURANÇA ALIMENTAR E ECONÔMICA (ASAE). 2021. ***Bacillus cereus***. Disponível em: https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/bacillus-cereus.aspx. Acessadoem: 03 ago. 2021.

AVALLONE, S. et al. Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. **International Journal of Food Science & Technology**, v.37, n.2, p.191e198, 2002.

BACHA, L. et al. Risk of Collapse in Water Quality in the Guandu River (Rio de Janeiro, Brazil). **Microbial Ecology,** August 23, 2021.

BAGGENSTOSS, J. et al. Influence of Water Quench Cooling on Degassing and Aroma Stability of Roasted Coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.16, p.6685–6691, 2007.

BÄHRE, F.; MAIER, H. G. **New non-volatile acids in coffee**. Deutsche Lebensmittel-Rundschau (Alemanha) 95, 1999.

BAIS, W. J. A Case of Pathogenicity of *Bacillus Subtilis*. **The Journal of Infectious Diseases**, v.40, n.2, p.313–315, 1927.

BAJKO, E. et al. Aspectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity. **LWT-Food Science Technology**, v.65, n.1, p.471–479, 2016.

BARNES, A. G. et al. *Bacillus subtilis* spores: a novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. **European Journal of Immunology**, v.37, n.6, p.1538–1547, 2007.

BASHFORD, C. L. et al. Ion modulation of membrane permeability: effect of cations on intact cells and on cells and phospholipid bilayers treated with pore-forming agents. **Journal of Membrane Biology**, v.103, n.1, p.79-94, 1988.

BASTOS, I. P. N. **Influência dos métodos de preparo e granulometria do café sobre os teores de ácidos clorogênicos e lactonas na bebida e Sobre a preferência do consumidor.** Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

BATISTA, R.D. et al. Contaminação por *Bacillus cereus* e os riscos gerados através da intoxicação alimentar. **Revista Desafios**, v.5, n.2, 2018.

BEKEDAM, E. K. et al. High molecular weight melanoidins from coffee brew, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.1, p.7658, 2006.

BEKEDAM, E.K. et al. Roasting Effects on Formation Mechanisms of Coffee Brew Melanoidins. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.56, n.1, p.7138–7145, 2008.

BELLUMORI, M. et al. Effects of different stabilization techniques on the shelf life of cold brew coffee: Chemical composition, flavor profile and microbiological analysis. **Food Science and Technology**, v.142, n.1, p.111043, 2021.

BELITZ, H. D. et al. 4th. **Food chemistry**. Heidelberg: Springer, 2009.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controlebiológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia. Princípios e conceitos**. 3ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.717-727.

BOAVENTURA, P. S. M. et al. Value co-creation in the specialty coffee value chain: the third-wave coffee movement. **Journal of Business Management**, v.58, n.3, p.254-266, 2018.

BODNARIUC, D. **Coffee Brewing Methods**.2020. Disponível em: https://coffee-brewing-methods.com/entity/cold-brew/. Acessado em: 31 mar. 2020.

BORÉM, F. M. **Pós colheita do café**. Lavras : UFLA, 2008. 630p.

BORRELLI, A. R. C. et al. Chemical Characterization and Antioxidant Properties of Coffee Melanoidins. **Journal Agricultural Food Cemistry**, v.50, n.1 p.6527-6533, 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde, 2019. **Doenças Transmitidas por alimentos: causas, sintomas, tratamento e prevenção**. Disponível em: http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-poralimentos. Acessado em: 03 ago. 2019.

BRASIL, Portaria nº 367, set. 1997. **Regulamento Técnico sobre as condições Higiênico-sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF: MAPA, 08 set. 1997. Seção 1, p. 1997.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA Resolução n° 274, de 29 de novembro de 2000. **Dispõe sobre os padrões de balneabilidade das praias**. República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2010. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. 2. ed. Brasília.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2011. Portaria no. 2914, de 12 de dezembro de 2011. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Brasília. DF, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2021. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil.** Brasília. Disponível em: https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/maio/17/Apresentacao-Surtos-DTA-Maio-2019.pdf . Acessado em: 03 ago. 2021.

BRAVO, J. et al. Evaluation of spent coffee obtained from the most common coffeemakers as a source of hydrophilic bioactive compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.1, p.12565–12573, 2012.

BROISSIN-VARGAS, L. M. et al. Impact of storage conditions on fungal community composition of green coffee beans*Coffea arabica*L. stored in jute sacks during 1year. **Journal of Applied Microbiology**, v.124, n.2, p.547-558, 2018.

BUCHANAN, R. L. et al. Caffeine inhibition of ochratoxin A production. **Journal of Food Science**, v.47, n.1, p.319-321, 1981.

BUCHANAN, R. L.; FLETCHER, A. M. Methylxanthine inhibition of aflatoxin production. **Journal of Food Science**, v.43, n.2, p.654-655, 1978.

BUDAVARI, S. et al. **The Merck Index**, Print Version, Twelfth Edition. CRC Press, 1996.

CAI, R. et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamic acid and chlorogenic acid against *Alicylobacillus acidoterrestris* vegetative cells in apple juice. **Food Science and technology**, v.54, n.1, p.1697-1705, 2019.

CALDERONE, J. 2015. **A new trend in serving cold brew coffee uses science to make it more delicious.** Business Insider. Disponível em: http://www.businessinsider.com/whycold-brew-coffee-nitrogen-bubbles-tastes-better-2015-8. Acessado em: 30 mai. 2017.

CALDORIN, M. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúdepública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.10, n.1, p.4-20, 2013.

CAMPOS, F. P. Utilização da Tecnologia de Alta Pressão no Processamento de Alimentos. **Brazilian Journal of Food Techonology**, v.6, n.2, p.351-357, 2003a.

CAMPOS, M. G. et al. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.3, p.742-745, 2003b.

CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY. **Bacterial pathogens in Cold Brewed Coffee.** Food Microbiology, Target Surveys, Final Report, 2020.

CANCI, L. A. et al. Extratos de café demostram atividade antimicrobiana frente ao crescimento de *Escherichia coli*. **Sétimo simpósio de segurança alimentar**, 2020.

CARDELLI, C.; LABUZA, T. P. Application of Weibull Hazard Analysis to the Determination of the Shelf Life of Roasted and Ground Coffee. **LWT – Food Science and Technology**, v.34, n.5, p.273-27, 2001.

CARVALHO, B. F. et al. Fermentation profile and identification of acid lactic bacteria and yeasts of rehydrated corn kernel silage. **Journal of Applied Microbiology**, v.122, n.1, p.589-600, 2016.

CASAL, S.et al. Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid and caffeine content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.1, p.3420-3424, 2000.

CASTANEDA-RODRÍGUEZ, R. et al. Brewing temperature and particle size affect extraction kinetics of cold brew coffee in terms of its physicochemical, bioactive, and antioxidant properties. **Journal of Culinary Science & Technology**. In press, 2020.

CEBALLOS, B. S. O.; DINIZ, C. R. 2017. **Técnicas de Microbiologia Sanitária e Ambiental.**Campina Grande: EDUEPB.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). 2017. **Nitro cold brew coffee food safety risks.** Food Issue. Notes from the field.

CHALFOUN, S. M.; CORRÊA, T. B. S. **Micotoxinas em café – Riscos e controle.** In: Simpósio de pesquisas dos cafés do brasil, 1., 2000, Poços de Caldas. Palestras do I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Brasília: Embrapa Café, p.237-256, 2002.

CHO, W.; CHUNG, M. *Bacillus* spores: a review of their properties and inactivation processing technologies. **Food and Science Biotechnology**, v.29, n.11, p.1447–1461, 2020.

CLAANSSEN, L. et al. Cold Brew Coffee—Pilot Studies on Definition, Extraction, Consumer Preference, Chemical Characterization and Microbiological Hazards. **Foods**, v.10, n.1, 865, 2021.

CLARKE, R.J.; MACRAE, R. **Coffee: chemistry**. New York: Elsevier Applied Science, 1985.

CLLIFORD, M. N. et al. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. **Natural Products Report**, v.12, 2017.

CODEX ALIMENTARIUS. **Código de prática**. Prevention and reduction of food and feed contamination, 1st Edition, 2009.

COFFEE BREWING METHODS. 2017. **Methods of extraction of coldbrews**. Disponível em: https://coffee-brewing-methods.com/cold-brew-coffee/. Acessado em: 14 nov. 2017.

COFFEE INSIGHT. **A quarta onda de café começou?** 2017. Disponível em: https://coffeeinsight.com.br/a-quarta-onda-do-café-começou-ab01ebd10741. Acessado em: 03 ago. 2021.

COLD BRUER. 2021. **Cold dripping system**. Disponível em: https://www.bruer.co/pages/brewing-guide. Acessadoem: 23 ago. 2021.

COMMISSION REGULATION.Amending Regulation No 466/2001 as regards Ochratoxin A. **Official Journal of European Union**, L.25/3-L.25/5., 2005.

CORDOBA, N. et al. Chemical and sensory evaluation of cold brew coffees using different roasting profiles and brewing methods. **Food Research International**, v.141, n.1, p.110141, 2021.

CORDOBA, N. et al. Effect of grinding, extraction time and type of coffee on the physicochemical and flavour characteristics of cold brew coffee. **Scientific Reports**, v.9, p.8440, 2019.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology**, v.12, n.1, p.564-582, 1999.

CRIPPA, A. et al. Coffee consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: A dose-response meta-analysis. **American Journal of Epidemiology**, v.180, n.1, p.763-775, 2014.

DA SILVA, F. M. et al. Antibacterial effect of aqueous extracts and bioactive chemical compounds of *Coffea canephora* against microorganisms involved in dental caries and periodontal disease. **Advances in Microbiology**, v.4, n.14, p.978-985, 2014.

DAESCHEL, M. A. et al. **Survival of non-spore forming foodborne pathogens in cold brewed coffee**. Oregon State University, 2017.

DAGLIA, M., et al. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.48, p.1449–1454, 2000.

DAGLIA, M. et al. In Vitro and ex Vivo Antihydroxyl Radical Activity of Green and Roasted Coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.6, p.1700–1704, 2004.

DAGLIA, M. et al. Isolation, identification, and quantification of roasted coffee antibacterial compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.12, n.55, p.10208-10213, 2007.

DASH, S. S.; GUMMADI, S. N. Inhibitory effect of caffeine on growth of various bacterial strains. **Research Journal of Microbiology**, v.3, n.6, p.457-462, 2008.

DAVIDSON, P. M.; PARISH, M. E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. **Food Technology**, v.43, n.1, p.148–155, 1989.

DE MARIA, C. A. B. et al. Componentes voláteis do café torrado. Parte I: compostos heterocíclicos. **Química nova**, v.22, p.209-217, 1999.

DE ROOS, B. et al. The coffee diterpene cafestol increases plasma triacylglycerol by increasing the production rate of large VLDL apolipoprotein B in healthy normolipidemic subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.45–52, 2001.

DE SOUZA, R.D. et al. *Bacillus subtilis* spores as vaccine adjuvants: further insights into the mechanisms of action. **PLoS One**, v.27; n.9, e87454, 2014.

DEBRY, G. **Coffee and Health**, Edititon John Libbey, Eurotext, Paris, France, 1994.

DELGADO-ANDRADE, C. et al. Assessing the Antioxidant Activity of Melanoidins from Coffee Brews by Different Antioxidant Methods. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.53, p.7832–7836, 2005.

DUANGJAI, A. et al. Comparison of antioxidant, antimicrobial activities and chemical profiles of three coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extracts. **Integrative Medicine Research**, v.5, n.4, p.324–331, 2016.

DUARTE, G. et al. Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. **Food Chemistry**, v.118, p.851-855, 2010.

DUONG, B. et al. Coffee Microbiota and Its Potential Use in Sustainable Crop Management. A Review. **Frontiers in Sustainable Food System**, v.4, p.607935, 2020.

EINARSSON, H. et al. Inhibition of bacterial growth by Maillard reaction products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.31, n.1, p.1043–1047, 1983.

EMBRAPA. **Manual do café: colheita e preparo *(Coffea arabica L.).*** Belo Horizonte: EMATER-MG, 52 p. il, 2016.

ENTRINGER, T. L. et al. **Boas Práticas na Produção Cafeeira: garantia de qualidade e sustentabilidade.** Santa Catarina: AdVerbum, 33p. il, 2020.

FAGANELLO, L. R. **Fatores que influenciam a Qualidade do Café no Paraná**. In: PREMIA EXTENSAO RURAL, 2. Santa Terezinha de Itaipu. Anais eletrônicos [Santa Terezinha de Itaipu]: EMATER, p.1-41, 2006.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. Brazilian **Journal of Plant Physiology**, v.18, p.23–36, 2006.

FARAH, A. **Coffee as speciality and functional beverage**. In: PAQUIN, P. (Ed.) Functional and speciality beverage technology. Sawston: Woodhead Publishing, 2009. 512 p., cap.15, p.370–395.

FARAH, A. **Coffee Constituents**. In: Chu, Y-F (Ed.), Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention. IFT Press/Willey-Blackwell. USA, p.21-58, 2012.

FARAH, A. et al. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.5, p.1505-1513, 2005.

FARAH, A. **Flavor development during roasting**. In: LIK, H. C.; BORÉM, F. (Orgs.) Drying and roasting of cocoa and coffee. Nova Iorque: CRC Press, 2019. 368 p., cap.9, p.267-303, 2019.

FARAH, A. **Nutritional and health effects of coffee**. In: LASHERMES, P. (Ed). Achieving sustainable cultivation of coffee. Londres: BurleighDodds Science Publishing, 2017. 400 p., p.1-31, 2017.

FARAH, A.; dePAULA, J. Consumption of chlorogenic acids through coffee and health implications. **Beverages**, v.5, 2019.

FARAH, A.; DUARTE, G. **Bioavailability and metabolism of chlorogenic acids from coffee.** In: PREEDY, V. R. (Ed). Coffee and health disease prevention. Cambridge: Elsevier, 2015. 1080 p., cap.87, p.789-801.

FARZAEI, M. H. et al. Role of dietary polyphenols in the management of peptic ulcer. **World Journal Gastroenterolgy**, v.21, p.6499–6517, 2015.

FOGOLARI, O. et al. Determining kinetic parameters for thermal inactivation of *Escherichia coli* in sewage sludge. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.17, n.3, p.255-262, 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2019. **GRAS Notice No. GRN 000831.** Disponível em: https://www.fda.gov/media/131900/download. Acessado em: 18 set. 2021.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2021. **Recently Published GRAS Notices and FDA Letters.** Disponível em: https://www.fda.gov/food/gras-notice-inventory/recently-published-gras-notices-and-fda-letters. Acessado em: 18 set. 2021.

FOLMER, B. **The craft and science of coffee**. Academic Press Elsevier, London. 2017.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FOWLER, H. G. 2013. **Ecologia de populações: crescimento microbiano.** Disponível em: https://pt.slideshare.net/popecologia/crescimento-de-bacteria. Acessado em: 13 set. 2021.

FRANÇOIS, J.: Le bacilli subtilique en pathologie oculaire. **Société François d'Ophtalmologie**, v.47, p.423-437, 1934.

FREEDOM BREW. 2015. **Cold Brew Coffee: About the industry and the ultimate guide.** Disponível em: https://cdn.shopify.com/s/files/1/1224/5690/files/EBOOK_COLD_COFFEE_BREWING.pdf. Acessado em 30 nov. 2017.

FU, L. et al. Phenolic compounds and in vitro antibacterial andantioxidant activities of three tropic fruits: Persimmon, guava, and sweetsop. **BioMedical Research International,** 2016.

FUJIMAKI, M. et al. Urinary excretion of fructoselysine in human volunteers and diabetic patients. Amino-carbonyl reactions in food and biological systems. **Developments in Food Science**, Tokyo, p.503–508, 1986.

FULLER, M.; RAO, N. Z. The Effect of Time, Roasting Temperature, and Grind Size on Caffeine and Chlorogenic Acid Concentrations in Cold Brew Coffee. **Scientific Reports,** v.7, p.17979, 2017.

GAMBOA-GAITÁN, M. Presence of *Aspergillus* and other fungal symbionts in coffee beans from colombia. **Acta Biológica Colombiana**, v.17, 2012.

GLOESS, A. N. et al. Comparison of nine common coffee extraction methods: instrumental and sensory analysis. **European Food Research and Technology**, v.236, p.607–627, 2013.

GONZALEZ, E.A.S. **Estudo da viabilidade de implantação de pequenas unidades de torrefação de café.** Trabalho final (Graduação em Bacharelado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estácio de Sá. Rio de Janeiro, 2004.

GOURMIA. 2020. **Vacuum coldbrew coffee maker.** Disponível em: https://www.gourmia.com/pdf/GCM7800%20-%20User%20Manual.pdf. Acessado em: 28 ago. 2021.

GRAND VIEW RESEARCH. C**old Brew Coffee Market Worth $1.63 Billion by 2025.**2019. Disponível em: https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-cold-brew-coffee-market. Acessadoem: 31 mar 2020.

GRIGG, G. Effects of coumarin, pyronin Y, 6,9-dimethyl 2-methyl- thiopurine and caffeine on excision repair and recombination repair in *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**, v.70, p.221- 230, 1972.

GU, H. et al. A First Study of the Virulence Potential of a *Bacillus subtilis* Isolate From Deep-Sea Hydrothermal Vent. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.9, n.183, p.1-14, 2019.

GUIMARÃES, E. R. et al. A terceira onda do café em Minas Gerais. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, v.18, n.3, p.14-227, 2016.

GUIMARÃES, R. J. et al. **Coffee growing and post-harvest processing**. In: FARAH, A. (Org.). Coffee: production, quality and chemistry. Londres: Royal Society of Chemistry, 2019. 1, 836 p., cap.2, p.26-88.

HAMDOUCHE, Y. et al. Discrimination of post-harvest coffee processing methods by microbial ecology analyses. **Food Control**, v.65, n.2, p.112–120, 2016.

HEEGER A. et al. Bioactives of coffee cherry pulp and its utilisation for production of cascara beverage. **Food Chemistry**, v.221, p.969-75, 2017.

HEROLD, P. J.; DAVISON, P. M. Antibacterial activity of selected hydroxycinnamic acids. **Journal of Food Science**, v.48, 1379, 1983.

HEO, J. et al. Cold Brew Coffee: Consumer Acceptability and Characterization Using the Check-All-That-Apply (CATA). **Methodology Foods**, v.8, n.8, p.344, 2019.

HODGE, J. E. Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. **Journalof Agricultural and Food Chemistry**, v.1, p.928–943, 1953.

HOFFMANN, C.E. **Resfriamento no processo de torra nas características de qualidade tecnológica e sensorial do café.** Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2001.

IBRAHIM, S. A. et al. Application of caffeine, 1,3,7-trimethylxantine to control Escherichia coli O157:H7. **Food Chemistry**, v.99, p.645-650, 2006.

ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso coffee: The science of quality**. Academic Press, 2005.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). 2020. **Consumo de café mundial.** Disponível em: http://www.ico.org/prices/new-consumption-table.pdf. Acessadoem: 30 mai. de 2020.

KABIR, F. et al. Antimicrobial Effects of Chlorogenic Acid and Related Compounds. **Journal of Korean Applied Biological Chemistry**, v.57, n.3, p.359−365, 2014.

KALSCHNE, D. L. et al. Sensory characterization and acceptance of coffee brews of *C. arabica* and *C. canephora* blended with steamed defective coffee. **Food Research International, v.**124, p.234-238, 2019.

KANG, T. M. et al. The aminoglycoside antibiotic kanamycin damages DNA bases in *Escherichia coli:* caffeine potentiates the DNA-damaging effects of kanamycin while suppressing cell killing by ciprofloxacin in *Escherichia coli* and *Bacillus anthracis*. **Antimicrobial Agents**, v.56, p.3216, 2012.

KARUNANIDHI, A. et al. *Invitro* antibacterial and antibiofilm activities of chlorogenic acid against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* including the trimethoprim/sulfamethoxazole resistant strain. **BioMedical Research International**, 2013.

KHAN, M.T.H. et al. Extracts and molecules from medicinal plants against *Herpes simplex* viruses. **Antiviral Research**, v.67, p.107–119, 2005.

KIM, A. R.; KIM, J. S. Flavor contributing nonvolatile chemical and sensory characterization of coldwater extraction based coffee by different extraction methods (dripping vs steeping) and time. **Journal of The Korea Society for Coffee Industry**, v.3, p.1-9, 2014.

KRUGER, C. D. **Ocratoxina A em suínos abatidos no estado do Rio de Janeiro sob inspeção sanitária.** Tese (PósGraduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Niterói, Rio de Janeiro, 2006.

KWOK, R. et al. Current challenges of cold brew coffee: roasting, extraction, flavor profile, contamination, and food safety. **Challenges**, v.11, p.1–13, 2020.

LACHENMEIER, D.W. et al. Cold brew coffee – a microbial hazard? **Tea Coffee Trade Journal,** v.193, p.32–33, 2021.

LANCIOTTI, R. et al. Effects of heated glucose–fructose–glutamic acid solutions on the growth of *Bacillus stearothermophilus*. **LebensmWiss Technology**, v.32, p.223–230, 1999.

LANE, S. et al. Can Cold Brew Coffee be Convenient? A Pilot Study for Caffeine Content in Cold Brew Coffee Concentrate Using High Performance Liquid Chromatography, **The Arbutus Reviews**, v.8, n.1, p.15-23, 2017.

LANGNER, E.; RZESKI, W. Biological properties of melanoidins: A review. **International Journal of Food Properties**, v.17, n.2, p.344-353, 2014.

LAVAZZA. 2018. **O Sabor Ganha Forma**. Disponível em: http://www.lavazza.com.br/br/coffee-passion/our-coffee/production/. Acessado em: 28 ago. 2021.

LEITÃO, A. L. Occurrence of Ochratoxin A in Coffee: Threads and Solutions - A Mini-Review. **Beverages,** v.5, n.36, 2019.

LERSCH, M. 2016. **Vaccuum infusion – Coldbrew under 10 minutes**. Disponívelem: http://www.brewingisforeveryone.com/blog/vacuum-infusion-cold-brew-in-under-10-minutes. Acessadoem: 28 ago. 2021.

LEROY, T. et al. Genetics of coffee quality. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.18, n.1, p.229-242, 2006.

LI, J. X. et al. Coffee Consumption and Risk of Breast Cancer: An Up-To-Date Meta-Analysis. **PLoS One**, v.8, n.1, p.e52681, 2013.

LIU, H. et al. Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Shellfish Immunology**, v.60, p.326-333, 2017.

LIU, L. et al. Fermentation and complex enzyme hydrolysis enhance total phenolics and antioxidants activity of aqueous solution of rice bran pretreated by steaming with alfa-amylase. **Food Chemistry**, v.221, p.636-643, 2017.

LOPEZ, J. **Cold Brew Coffee Regulations and Policies**. Association of Food and Drug Officials.2020. Disponível em: https://www.ifpti.org/s/ Lopez_AFDO-Journal-Article_FINAL_June2020.pdf. Acessado em: 24 jan. 2021.

LÓPEZ, T. J. et al. A. Evaluation of the importance of germinative cycles for destruction of *Bacillus cereus* spores in miniature cheeses. **High Pressure Research**, v.23, n.2, p.81–85, 2003.

LOU, Z. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. **Journal of Food Science**, v.76, p.398–403, 2011.

LUDWIG, I. A. et al. Extraction of Coffee Antioxidants: Impact of Brewing Time and Method. **Food Research International**, v.48, p.57–64, 2012.

LUU-THI, H. et al. Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.189, p.183–188, 2014.

MALETTA, A. B.; WERE, L. M. Effect of Coffee Filtrate, Methylglyoxal, Glyoxal, and Caffeine on *Salmonella typhimurium* and *S. enteritidis* Survival in Ground Chicken Breasts. **Journal of Food Science**, v.77, n.2, p.M135-M141, 2012.

MALTEZ, A. C. S. **Aspectos históricos do café.** 2018. Disponível em: https://www.cafedoantonio.com.br/artigos/aspectos-historicos-do-cafe/. Acessado em: 30 mar. 2020.

MANJULA, K.; PODILE, A.R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1057–1062, 2005.

MARTINS, A. L. **História do café**, 2a. ed. Contexto: São Paulo, 2012.

MARTINS, M. L. et al. Antibacterial and cytotoxic potential of a Brazilian red propolis. Pesquisa Brasileira em Odontopediatria Clínica Integrada, p.e4626, 2019.

MASON, T. L.; WASSERMAN, B. P. Inactivation of red beet /3-glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. **Phytochemistry**, v.6, n.8, p.2197-2202, 1987.

MASSOUD, W.; KALTOFT, C.H. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, n.2, p.229e234, 2006.

MATEUS, M. L. et al. Characterization of Water Mobility in Dry and Wetted Roasted Coffee Using Low-Field Proton Nuclear Magnetic Resonance. **Journal of Food Engeneering**, v.81, p.572–579, 2007.

MARTÍNEZ-TOMÉ, M. et al. Assessment of antimicrobial activity of coffee brewed in three different ways from different origins. **European Food Research Technology**, v.233, p.497, 2011.

MCFARLAND, J. The nephelometer: an instrument for estimating the numbers of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. **Journal of America Medical Association**, v.49, p.1176-1178, 1907.

MELO, E. S. et al. Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil: revisão. **Pubvet,** v.12, n.a191, p.1-9, 2018.

MEYDAV, S. et al. Browning Determination in Citrus Products. **Journal of Science and Food Agricultural**, v.25, p.602–604, 1977.

MIGUEL, P. S. B. **Diversidade de bactérias endofíticas em frutos de *Coffea canephora* em três estádios de maturação**. Dissertação (Mestrado em microbiologia agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

MINTEL. 2018. **Functional benefits top off atributes US consumers look for in ready-to-drink cold coffees**. Disponível em: https://www.mintel.com/press-centre/food-and-drink/functional-benefits-top-off-attributes-us-consumers-look-for-in-ready-to-drink-cold-coffee. Acessado em: 30 ago. 2021.

MIRANDA, S. **Dicas para nunca mais errar o tipo de moagem do seu café**. 2019. Disponível: http://blog.coffeeandjoy.com.br/tag/tipos-de-moagem-do-cafe/. Acessadoem: 31 mar. de 2020.

MIYAI, T. et al. Behavior of *Bacillus* Bacteria in Coffee, Black Tea, and Green Tea Drinks. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v.59, n.11, p. 591-594, 2012.

MOHAMADI, N. et al. A Review on Biosynthesis, Analytical Techniques, and Pharmacological Activities of Trigonelline as a Plant Alkaloid. **Journal of Dietary Supplements,** p.2-16, 2017.

MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**, v.28, n.4, p.637-641, 2005.

MORALES, F. J; PÉREZ, J., S. Peroxyl radical scavenging activity of melanoidins in aqueous systems. **European Food Research Technology**, v.218, p.515–520, 2004.

MOREIRA, A. S. P. et al. Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health Impacts. **FoodFunction**, v.3, p.903–915, 2012.

MORETTI, P. **Microbiologia: fundamentos e aplicações**. 2008. Disponível em: https://www.fam.br/microrganismos. Acessado em: 14 abr. 2019.

MORI, M. 2019. **Quarta onda do café: especialistas explicam se estamos surfando nela.** Disponível em: https://www.gazetadopovo.com.br/bomgourmet/bebidas/quarta-onda-do-cafe/. Acessadoem: 28 ago. 2020.

MORONEY, K. M. et al. Modelling of coffee extraction during brewing using multiscale methods: An experimentally validated model. **Chemical Engineering Science**, v.137, p.216–234, 2016.

NASCIMENTO, P. M. **Estudo da composição química, atividade antioxidante e potencial odorífico de um café conillon, em diferentes graus de torrefação e análise comparativa com café arábica** [mestrado]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2006.

NATIONAL COFFEE ASSOCIATION (NCA). 2020. **Global consume of coffee.** Disponível em: https://muchneeded.com/coffee-consumption-statistics/. Acessado em: 08 jul. 2020.

NAVARINI, L.; RIVETTI, D. Waterquality for espressocoffee. **Food Chemistry**, v.122, p.424-428, 2010.

NEHLIG, A. Effects of coffee/caffeine on brain health and disease: what should I tell my patients? **Practical Neurology**, v.16, n.2, p.89-95, 2016.

NEIDHARDT, F. C. et al. **Physiology of the bacterial cell – a molecular approach**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990.

NICOLI, M. C. et al. **Effect of some extraction conditions on brewing and stability of coffee beverage.** Proceedings of the 14th ASIC Colloquium, San Francisco, p.649-656, 1991.

NISPIRA. 2021.**Cold dripping coffee system**. Disponívelem: https://www.nispira.com/Ice-Cold-Brew-Dripping-Coffee-Maker-137.htm. Acessadoem: 23 ago. 2021.

NORTHROP, R. Manufacturing food safe cold brew. **Tea Coffee Trade Journal**, v.190, p.46-47, 2018.

NUNES, F.M.; COIMBRA, M.A. Melanoidins from Coffee Infusions. Fractionation, Chemical Characterization, and Effect of the Degree of Roast. **Journal of Agricultural Food Chemistry,** v.55, p.3967–3977, 2007.

OH, Y. A. et al. A study on anti-bacterial activity of cold-brewed coffee extracts. **Journal of The Korea Society for Coffee Industry, v.**3, p.26-33, 2014.

OHFUJI, S. et al. Coffee consumption and reduced risk of hepatocellular carcinoma among patients with chronic type C liver disease: A case–control study. **Hepatology Research**, v.36, p.201-208, 2006.

OLANREWAJU, O. S. et al. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v.33, p.197, 2017.

OLASUPO, N. A. et al. Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, p.448–451, 2003.

OLIVEIRA, M. et al. Espresso beverages of pure origin coffee: Mineral characterization, contribution for mineral intake and geographical discrimination. **Food Chemistry**, v.177, p.330-338, 2015.

OLTHOF, M. R. et al. Chlorogenic acid, quercitin-3rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. **Journal of Nutrition**, v.133, n.6, p.1806-1814, 2003.

OSORIO-HERNANDEZ, R. et al. Simulation of a thermal environment in two buildings for the wet processing of coffee. **Dyna**, v.82, n.194, p.214-20, 2015.

ÖZÇELIK, B. et al. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. **Pharmaceutical Biology**, v.49, n.4, p.396–402, 2011.

PADILHA, M. R. F. et al. Benefícios e desafios da implantação de APPCC em indústrias de alimentos para segurança de alimentos. Contextos da Alimentação – **Revista de Comportamento, Cultura e Sociedade**, v.7, n.2, 2019.

PANOFF, L. 2019. **9 Impressive Benefits of Cold Brew Coffee (Plus How to Make It).** Disponível em: https://www.ecowatch.com/cold-brew-coffee-health-benefits-2636694728.html. Acessado em: 31 mar. 2020.

PEROTTO, D. L. et al. **Microrganismos causadores de DTAs, um olhar pautado na legislação.** Câmara do Livro, Porto Alegre, 160p., 2021.

PERSIDOU, T. **Microflora and the antimicrobial activity of coffee**, 2015.

PETRACCO, M. In **Espresso coffee: the Science of Quality**, ed. A. Illy and R. Viani, Elsevier, Oxford, UK, p.259-289, 2005.

PINHEIRO, C. A. et al. Physico-chemical properties and sensory profile of *Coffea canephora* genotypes in high-altitudes. **Australian Journal of Crop Science**, v.13, p.2046-2052, 2019.

PURO, E. Cold brew with caution. Food safety and quality concerns for the growing market. **Roast**, p.36-49, 2016.

RAO N. Z.; FULLER M. Acidity and antioxidant activity of cold brew coffee. **Scientific Reports**, v.8, p.1–9, 2018.

RAO, N. Z. et al. Physiochemical Characteristics of Hot and Cold Brew Coffee Chemistry: The Effects of Roast Level and Brewing Temperature on Compound Extraction. **Foods**, v.9, 902, 2020.

RAZAFINARIVO N. J. et al. Genetic structure and diversity of coffee (*Coffea*) across Africa and the Indian Ocean islands revealed using microsatellites. **Annals of Botany,** v.111, p.229– 248, 2013.

REN, C. et al. Cafestol and Kahweol: A Review on Their Bioactivities and Pharmacological Properties. **International Journal of Molecular Science**, v.20, 4238, 2019.

RENGUANT, C. et al. Influence of phenolic compounds on the physiology of *OEnococcusoeni* from wine. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n.6, p.1065-71, 2000.

ROSENMAN, M. **Iced coffee and coldbrew coffee**. 2020. Disponível em: https://www.instagram.com/p/CFu3KS2HCJQ/?utm_medium=copy_link. Acessado em: 17 jun. 2021.

ROVERI, V.; MUNIZ, C. C. Contaminação microbiológica por *Escherichia coli:* estudo, preliminar, no canal de drenagem urbana da av. Lourival Verdeiro do Amaral – São Vicente/SP. **Revista Don Domênico**, v.8, 2016.

RUFIAN-HENARES, J. A. et al. Antimicrobial Activity of Melanoidins against Escherichia coli Is Mediated by a Membrane-Damage Mechanism. **Journal of Agricultural Food Chemistry,** v.56, n.7, p.2357–2362, 2008.

RUFIAN-HENARES, J. A.; et al. Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. **Food Research International**, v.40, n.8, p.995-1002, 2007.

SAAB, S. et al. Impact of coffee on liver diseases: a systematic review. **Liver International,** v.34, p.495-504, 2014.

SALES, A. L. et al. Effects of regular and decaffeinated roasted coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) extracts and bioactive compounds on in vitro probiotic bacterial growth. **Food & Function**, v.11, p.1410, 2020.

SANDLIE I. et al. The effect of caffeine on cell growth and metabolism of thymidine in *Escherichia coli*. **Mutation Research**, v.73, p.29–41, 1980.

SCHENEIDER, E. L. et al. Análise e seleção de materiais para garrafas térmicas. **Revista Liberato**, v.12, n.18, p.107-206, 2011.

SCHULTHESS, B. et al. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for Identification of Gram-Positive Rods: Development of a Diagnostic Algorithm for the Clinical Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v.52, n.4, p.1089–1097, 2014.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. PORTARIA CVS-5 de 09 de abril de 2013. **Aprova o regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação, e o roteiro de inspeção, anexo**. São Paulo, SP. 19 abr. 2013.

SENINDE, D. R. et al. Determining the impact of roasting degree, coffee to water ratio and brewing method on the sensory characteristics of cold brew Ugandan coffee. **Food Research International**, v.137, p.109667, 2020.

SHLONSKY, A. K. et al. Traits of persons who drink decaffeinated coffee. **Annals of Epidemiology**, v.13, p.273-279, 2003.

SHULTZ, W. G. *Bacillus subtilis* Infection of the Kidney, **Urology**, v.42, p.493-498, 1938.

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, 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, N. **Novos métodos de análise microbiológica de alimentos**. Coletânea do ITAL, 25, 1, p.1-13, 1996.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo: Varela, 259p, 1997.

SISEL, E. 2016. **The strength of cold brew**. Mintel. Disponível em: http://www.mintel.com/ blog/drink-market-news/the-strength-of-cold-brew. Acessadoem: 13 nov. 2017.

SKEIE, Trish R. **"Norway and Coffee".** The Flamekeeper, Spring, 2002.

SMITH, R. F. **A history of coffee**. In Clifford, and Willson, (eds.), Coffee: Botany, Chemistry and Production of Beans and Beverage, Croom Helm Ltd, England, p.1-12, 1985.

SOUZA, C. M. O.; ABRANTES, S. M. P. Isolamento e Contagem de *B. cereus* em Amostras de Café Torrado e Moído comercializado no Município do Rio de Janeiro. **Revista Científica da UFPA**, v.7, n.1, 2009.

SOUZA, C. M. O.; ABRANTES, S. M. P. Ocorrência de *Enterococcusfaecalis* em amostras de café torrado e moído comercializado no município do Rio de Janeiro. **Revista Analytica**, v.56, p.38-41, 2012.

SOUZA, F. F. **Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia,** Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2004.

SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION (SCA). 2009. SCAA **Standard: Water for Brewing Specialty Coffee.**Disponível em: https://www.scaa.org/PDF/resources/water-standards.pdf. Acessadoem: 30 ago. 2021.

SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION (SCA). 2016. **Best Practice. Guidelines for Using By-Pass in the Drip Coffee Brewing Process.**Disponível em: http://www.scaa.org/PDF/resources/best-practices-bypass-brewing.pdf. Acessado em: 13 nov. 2017.

SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION (SCA). 2018. **Coffee Standards.**Disponível em: https://sca.coffee/research/coffee-standards. Acessadoem: 04 set. 2021.

SPIRO, M. et al. The Kinetics and Mechanism of Caffeine Infusion from Coffee: The Effect of Roasting. **Journal of Science and Food Agricultural,** v.36, p.871–876, 1985.

SONIC DUTCH. 2020. **Coldbrew in 5 minutes**. Disponível em: https://www.sonicdutch.us. Acessadoem: 15 ago. 2020.

STECCHINI, M. L. et al. Effect of *Maillard* reaction products on the growth of selected food-poisoning micro-organism. **Letter of Applied Microbiology**, v.13, p.93–96, 1999.

STOLK A. C. et al. **The systematics of the terverticillate penicillia**. In: Samson RA & Pitt JI, editors. Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. New York, Plenum Press; p.121-137, 1990.

SUALEH, A. et al. Biochemical composition of green and roasted coffee beans and their association with coffee quality from different districts of southwest Ethiopia. **Heliyon**, v.6, p.e05812, 2020.

TANIWAKI, M. H. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, v.82, p.173–179, 2003.

THE PERFECT DAILY GRIND. 2015. **How To Make Cold Brew Coffee in 60 Seconds (No Nitrous Involved).** Disponível em: https://www.perfectdailygrind.com/2015/07/how-to-make-cold-brew-in-60-seconds-no-nitrous-involved/. Acessado em: 14 nov. 2017.

TODDY. 2021. **Comercial ColdBrew System**. Disponível em: https://toddycafe.com/product/commercial-model. Acessado em: 23 ago. 2021.

TORRES, T.; FARAH, A. Coffee, maté, açaí and beans are the main contributors to the antioxidant capacity of Brazilian's diet. **European Journal of Nutrition**, v.56, p.1523–1533, 2016.

UKER, W. H. **All about coffee**. New York: The Tea and Coffee Trade Journal Company, 1922.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE USDA, 2015. **National Nutrient Database for Standard Reference.**Disponível em: https://ndb.nal.usda.gov/ndb/. Acessado em: 27 jul. 2021.

VACCOFFEE. 2021. **Vacuum coldbrew comercial system**. Disponível em: https://vaccoffee.com/vacone-small-coffee-maker-cold-brew-maker. Acessado em: 23 ago. 2021.

VASCONCELOS, N.G. et al. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: a review. **Microbial Pathogenesis**, v.120, p.198–203, 2018.

VIEGAS C. et al. Fungal contamination in green coffee beans samples: A public health concern. **Journal of Toxicology Environmental Health**, v.80, n.13, p.719-728, 2017.

VIGNOLI, J.A. et al. Roasting Process Affects Differently the Bioactive Compounds and the Antioxidant Activity of Arabica and Robusta Coffees. **Food Research International,** v.61, p.279–285, 2014.

VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology,** London, v.27, n.8, p.128-135, 2010.

WANG, H. et al. Recent progress in *Bacillus subtilis* spore-surface display: concept, progress, and future. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.101, n.3, p.933-949, 2017.

WEINSTEIN, L. M. D. et al. *Bacillus subtilis* meningitis and bacteremia: Report of a Case and Review of the Literature on "Subtilis" Infections in Man. **JAMA International Medicine**, v.86, n.4, p.585-594, 1950.

WELLMAN, F. L. **Coffee: Botany, Cultivation and Utilization**. Leonard Hill (Books), London, 1961.

WHITNEY, A. K.; WEIR, T. L. Interaction of caffeine with the SOS response pathway in *Escherichia coli*. **Gut Pathology**, v.7, n.21, 2015.

YU, J. et al. Analysis of phenolic acids in barley by high performance liquid cromathography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4352-4360, 2001.

ZAKIR, Z. et al. Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine): the good and the bad: a review. Journal of Public **Health and Biological Sciences**, v.2, n.4, p.313-323, 2013.