



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



DESAFIO DO PROCESSO FERMENTATIVO EM CAFÉ E O PAPEL DOS MIRNAS EM ABELHAS

Aluno: Paulo Vinícius Rocha Pereira

Orientador: Prof. Dr. Matheus de Souza Gomes

Coorientadora: Profa. Dra. Líbia Diniz Santos

UBERLÂNDIA - MG

2023



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



DESAFIO DO PROCESSO FERMENTATIVO EM CAFÉ E O PAPEL DOS MIRNAS EM ABELHAS

Aluno: Paulo Vinícius Rocha Pereira

Orientador: Prof. Dr. Matheus de Souza Gomes

Coorientadora: Profa. Dra. Líbia Diniz Santos

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica.

UBERLÂNDIA

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

P436
2023
Pereira, Paulo Vinicius Rocha, 1985-
EXPLORANDO A CONEXÃO CAFÉ E ABELHAS [recurso
eletrônico] : DESVENDADO OS DESAFIOS DA PÓS-COLHEITA E
OS PAPÉIS DOS MIRNAS / Paulo Vinicius Rocha Pereira. -
2023.

Orientador: Matheus de Souza Gomes.
Coorientadora: Líbia Diniz Santos .
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Genética e Bioquímica.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.401>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Gomes, Matheus de Souza, 1981-,
(Orient.). II. , Líbia Diniz Santos, 1978-, (Coorient.).
III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação
em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Doutorado Acadêmico - PPGGB				
Data:	Trinta e um de julho de dois mil e vinte e três	Hora de início:	09:00h	Hora de encerramento:	12:27
Matrícula do Discente:	11723GBI008				
Nome do Discente:	Paulo Vinicius Rocha Pereira				
Título do Trabalho:	Desafio do processo fermentativo em café e o papel dos miRNAs em abelhas				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular e Celular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Aplicação de Métodos moleculares e computacionais para genômica, proteômica e transcriptoma				

Aos trinta e um dias do mês de julho de dois mil e vinte e três, às 09:00 horas, reuniu-se via web conferência pela Plataforma *Microsoft Teams*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Resolução de nº06/2020 e Resolução nº 19/2022 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Dr. Antônio Chalfun Junior, Dr. Fábio Ribeiro Queiroz, Dr. Carlos Ueira Vieira, Dra. Enyara Rezende Moraes e Dr. Matheus de Souza Gomes, orientador do candidato e demais convidados presentes. Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Matheus de Souza Gomes apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato:

APROVADO

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram

encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Matheus de Souza Gomes, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/07/2023, às 12:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fábio Ribeiro Queiroz, Usuário Externo**, em 31/07/2023, às 12:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Ueira Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/07/2023, às 12:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Enyara Rezende Moraes, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/07/2023, às 12:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Chalfun Junior, Usuário Externo**, em 31/07/2023, às 12:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4605101** e o código CRC **8E3B4B96**.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



DESAFIO DO PROCESSO FERMENTATIVO EM CAFÉ E O PAPEL DOS MIRNAS EM ABELHAS

ALUNO: PAULO VINÍCIUS ROCHA PEREIRA

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Matheus de Souza Gomes

Examinadores:

Antônio Chalfun Junior
Carlos Ueira Vieira
Enyara Rezenda Moraes
Fábio Ribeiro de Queiroz

Data da Defesa: 31/07/2023

ORIENTADOR: MATHEUS DE SOUZA GOMES

A Deus, pelo dom da vida. Dedico e transfiro ainda esse feito aos seres que me são mais queridos. Ao meu pai Paulo Virgílio e à minha mãe Maria Inês e meus irmãos Gustavo Virgílio e Guilherme Victor. À toda minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeça ao meu orientador Prof. Dr. Matheus de Souza Gomes, pela oportunidade. Pelo apoio intelectual, moral e profissional; não fosse sua compreensão, confiança, amizade e encorajamento diante dos reveses que enfrentei, seguramente não os teria sobrepujado e aqui chegado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da UFU campus Uberlândia. Na pessoa da Profa. Dra. Vivian Alonso Goulart agradeço aos professores das disciplinas cursadas durante o doutoramento com os quais pude conviver; por terem compartilhado seus engramas intelectuais. Desejo manifestar um especial agradecimento à secretária do programa, Sra. Janaína de Souza Mota, pelo abnegado auxílio que me dispensou, sempre com solicitude, diligência e competência.

Agradeço, vivamente, aos professores e técnicos do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia campus Patos de Minas da UFU. Pelo Prof. Dr. Laurence Rodrigues do Amaral estendo a todos minha gratidão pelo acolhimento e convívio engrandecedor.

Deixo expresso o meu reconhecimento a todos os colegas do Laboratório de Bioinformática e Análises Moleculares (LBAM) e ao Grupo de pesquisa da Semente à Xicara (Desenvolvimentos de tecnologias aplicadas ao café) campus Patos de Minas, pelas colaborações e auxílio na elaboração e execução da pesquisa. A esses companheiros que me secundaram na jornada, desejo compartilhar esse trabalho e assegurar-lhes que não os esquecerei.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFU campus Patos de Minas, agradeço a oportunidade concedida. Agradeço particularmente à Profa. Dra. Líbia Diniz Santos pela possibilidade, ensinamentos prestados e conspícua contribuição dada a minha formação.

Sou grato ao Produtor Rural Elmiro Alves do Nascimento e aos colaboradores da Fazenda Santiago; por proporcionar o desenvolvimento da pesquisa e ajudar no conhecimento *in loco*.

Sou-lhes grato.

*“A abelha fazendo o mel, vale o tempo
que não voou”*

(Beto Guedes; Ronaldo Bastos)

*“O povo humilde e de fé é como o grão
de café,
mesmo torrado e moído,
produz aroma e sabor,
desperta os abatidos e adormecidos,
sendo ainda sinal de acolhida e
hospitalidade.”*

(Luis Henrique Alves Pinto, adaptado)

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	106
2 CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	108
2.1 Café.....	108
2.2 Produção de café no Brasil	112
2.3 Cafeicultura do Cerrado Mineiro.....	118
2.4 Processamento do café.....	120
2.5 Torra do café	124
2.6 Qualidade do café e cafés especiais.....	128
2.7 Abelhas e sua influência na polinização e produção de café	134
2.8 As abelhas.....	137
2.9 Os microRNAs.....	147
REFERÊNCIAS.....	153
3 CAPÍTULO II – UNVEILING THE WORLD OF BEE MICRORNAS: COMPUTATIONAL IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PATHWAY GENES, CONSERVED MICRORNAS, AND THEIR TARGETS.....	173
ABSTRACT:.....	173
1 Introduction.....	174
2 Material and methods.....	176
2.1 miRNA pathway: Gene prediction and proteins characterization.....	176
2.2 Multiple alignment for active site analysis, domain conservation, and phylogenetic analysis of miRNA pathway proteins	177
2.3 Prediction and characterization of both precursor and mature miRNAs ...	178
2.4 miRNA alignment and phylogenetic analysis.....	178
2.5 miRNA target prediction.....	179
2.6 Statistical analysis	180
3 Results and Discussion	180
3.1 miRNA biogenesis pathway in bee	180
3.1.1 ARGONAUTE.....	180
3.1.2 Drosha and Dicer proteins.....	184
3.2 Genome-wide scanning of miRNA in bee.....	185

3.2.1 Mature miRNA and their precursors in bee.....	185
3.2.2 MFE, MFEI and AMFE analysis.....	189
3.2.3 miRNAs characterization	190
3.2.3.1 miR-1b.....	190
3.2.3.2 <i>mir-2b</i> family	193
3.2.3.3 <i>miR-283</i>	195
3.2.4 miRNA target genes of in <i>A. mellifera</i>	198
4. Conclusions.....	200
Acknowledgements	200
REFERENCES.....	201
SUPPLEMENTARY FIGURES	106
Supplementary Figure S1.....	106
Supplementary Figure S2.....	107
Supplementary Figure S3.....	108
Supplementary Figure S4.....	109
Supplementary Figure S5-A.....	110
Supplementary Figure S5-B	110
Supplementary Figure S5-C	111
Supplementary Figure S6.....	112
Supplementary Figure S7	113
Supplementary Figure S8.....	113
Supplementary Figure S9.....	114
Supplementary Figure S10.....	114
Supplementary Figure S11	114
Supplementary Figure S12.....	115
Supplementary Figure S13.....	115
Supplementary Figure S14.....	116
Supplementary Figure S15.....	117
4 CAPÍTULO III - DIFERENTES ESTÁGIOS DE FERMENTAÇÃO DO CAFÉ (COFFEA ARÁBICA L. CV. CATIGUÁ MG2): IMPACTOS DO PROCESSAMENTO PÓS-COLHEITA NA QUALIDADE DO GRÃO BENEFICIADO.....	118
RESUMO.....	118
1 Introdução	119

2	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8	2.9	3.	3.1.	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8	3.9	3.10	3.11	3.11.1	3.11.2	3.12	3.12.1	3.12.2	Conclusão	REFERÊNCIAS	122	122	125	126	126	126	127	128	128	130	131	131	136	138	139	142	144	145	147	151	153	154	154	155	158	158	162	166	168

1 APRESENTAÇÃO

Essa é uma tese resultante de pesquisa realizada no curso de doutoramento no Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, cujo objeto de estudo foi a função de micro RNAs de abelhas e processo fermentativo do café.

O Brasil é um dos maiores produtores de café do mundo e, por isso, a atividade cafeeira é muito relevante para a economia e para a cultura do país. Dentre as diversas regiões cafeeiras do país, pode-se destacar o estado de Minas Gerais, cujo fatores climático e vegetativo corroboram para o plantio de café. Todavia, é importante ressaltar que em virtude de fatores como alteração climática, alteração no solo e até adoecimento do plantio podem prejudicar o cultivo do café, e conseqüentemente, afetar a atividade econômica brasileira. Nesse sentido, é viável pensar em recursos alternativos para que o cultivo do café não sofra danos irreparáveis, uma vez que alguns fatores supramencionados não são controláveis. Um dos recursos alternativos que se pode usar é a polinização de abelhas. O trabalho de polinização de abelhas, por sua vez, é capaz de aumentar a produção de café. Como há uma diversidade de espécies de abelhas no Brasil, é importante estudar com afinco os comportamentos e os fatores genéticos das abelhas para que se depreenda qual espécie tem maior potencial para polinizar as cultivares cafeeiras.

Para tanto, construiu-se a base empírica dessa tese, o Capítulo I, a qual buscou-se em trabalhos acadêmicos a fundamentação teórica. Na fundamentação teórica, discutiu-se a cerca das características do café, de seu cultivo no Brasil, bem como em Minas Gerais, e das diferentes etapas que o café passa até se transformar em bebida. Discutiu-se também acerca das abelhas, quanto à sua contribuição no cultivo do café e quanto a seus fatores genéticos.

O Capítulo II dessa tese, por sua vez, trata-se de um artigo, cujos objetivos primários foram identificar e caracterizar, usando métodos *in silico*, proteínas envolvidas na via do miRNA, incluindo miRNAs precursores e maduros. Para melhorar o entendimento das características e função do miRNA nas abelhas, realizou-se uma varredura e uma análise funcional de todo o genoma do miRNA de oito espécies diferentes de abelhas, classificadas com diferentes comportamentos

sociais, como altamente eussociais, primitivamente eussociais e solitárias. A partir de então, O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar, por métodos *in silico*, miRNAs maduros, seus respectivos precursores, seus possíveis alvos – mais especificamente a Vitelogenina – e os genes envolvidos em sua via de processamento no genoma das espécies: *Apis mellifera*, *Bombus impatiens*, *Dufourea novaeangliae*, *Eufriesea mexicana*, *Habropoda laboriosa*, *Lasioglossum albipes*, *Melipona quadrifasciata* e *Megachile rotundata*.

Os resultados deste trabalho abrirão um novo caminho para o estudo do miRNA na biologia das abelhas ajudando a compreender, a partir da análise comparativa de elementos moleculares, semelhanças e diferenças que justifiquem modificações morfológicas, fisiológicas e comportamentais; a origem e manutenção da sociabilidade, interações gênicas que levam ao desenvolvimento rotineiro de castas específicas, base genética da infertilidade em operárias, alvos moleculares relacionados à regulação do comportamento polinizador, ação equilibrada de hormônios, entre outros.

O Capítulo III, trata-se de um artigo ao qual teve por objetivo específico avaliar e relacionar, diferentes condições de processamento e fermentação do cultivar Catiguá MG2, com a qualidade final da bebida na xícara, por meio da análise dos resultados de avaliadores credenciados e com o uso de ferramentas de diagnóstico destes resultados visando a busca de correspondências entre os experimentos. Já os objetivos específicos foram: a) Caracterizar o café Catiguá MG2 na safra de 2021/2022; a1) analisar as condições ambientais das fermentações na obtenção de características desejáveis no café; a2) identificar condições ambientais nos processos tradicionais e alternativos; b) avaliar o perfil sensorial de bebidas produzidas a partir dos cafés cereja e cereja Descascado, secos e submersos fermentados na fazenda produtora; c) avaliar o perfil sensorial de bebidas produzidas a partir dos cafés cereja descascado, fermentados, em diferentes condições de tempo e temperatura; d) avaliar os ácidos orgânicos, açúcares e álcoois nos cafés cereja descascados fermentados. Pretende-se através desses objetivos explorar o potencial de produção de cafés especiais de agricultores localizados no Cerrado Mineiro, próximo ao município de Patos de Minas, para investigação e determinação dos padrões das interações no processo fermentativo, de secagem e de torra que influenciam a qualidade do café.

2 CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Café

O cafeeiro é uma planta perene pertencente à família *Rubiaceae* a qual pode ser subdividida em dois gêneros: o *Baracoffea* e o *Coffea*. Este, por sua vez, é o mais popular, pois é largamente distribuído pela África, Américas do Sul e Central, Ásia em algumas ilhas do Oceano Índico, tais como: Comores, Maurícias, Reunião e Madagáscar. Vale ressaltar que no gênero *Coffea* há cerca de 124 espécies, das quais 66 são nativas das ilhas do Oceano Índico. Se tratando do gênero *Baracoffea* restringe-se a oeste de Madagáscar (HAMON *et al.*, 2015).

Das espécies pertencentes ao gênero *Coffea*, apenas as espécies *Coffea arabica* (Café Arábica), *C. canephora* (Café Robusta) e *C. libérica* são usadas para a produção de bebidas. Atualmente somente as duas primeiras espécies oferecem características favoráveis ao cultivo mais performático e representam as principais espécies produzidas e exportadas no mundo (DAVIS *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2006). O café Arábica responde por cerca de 59% da produção mundial, enquanto a espécie *C. canephora* teve uma produção estimada de 41% em 2020 (ICO, 2022).

Em geral, o Café Arábica possui aroma e sabor superiores ao Café Robusta, sendo comercialmente mais valorizado por ser versado por sua qualidade elevada (NÚÑEZ, 2022). De seus frutos origina-se uma bebida de melhor qualidade, com características mais finas e requintadas, de sabores mais acentuados (sabor doce e floral/frutado) e aromáticos que pode ser bebido sem nenhum tipo de “blend” (produto resultante da mistura de diferentes espécies ou qualidade de grãos do gênero *Coffea*). O Café Arábica também normalmente cultivado em encostas de montanhas, o que aumenta o seu preço (CAGLIANI *et al.*, 2013). O baixo conteúdo de cafeína (1,16 a 4% no total de matéria seca) e menor sabor amargo contribui ainda para que seja um café de custo mais elevado (MARQUETTI *et al.*, 2015).

Quase todas as espécies de café são diploides ($2n = 2x = 22$) e a maioria é auto incompatível, exceto o *C. arabica* que apresenta certa complexidade biológica, pois é uma espécie auto fértil e um alotetraploide natural ($2n = 4x = 44$). Além disso, é uma espécie auto polinizadora com uma taxa de cruzamento comum inferior a 10%, o que é suficiente para induzir alguma variação na prole e cultivares de polinização livre (BERTHAUD *et al.*, 1988).

O cultivo do Café Arábica é realizado em regiões com altitude acima de 800m e apresenta grãos de coloração esverdeada. No Brasil sua produção é mais concentrada nos estados de Minas Gerais e São Paulo. As variedades do *C. arabica* apresentam uma nomenclatura muito diversificada: as mais comuns são a Typica e o Bourbon, que originaram outras cultivares como a Caturra (Brasil e Colômbia), Mundo Novo (Brasil), Tico (América Central), San Ramon (América Central), Blue Mountain (Jamaica) e Sumatra (Indonésia). Dessas ainda se originaram outras como a Catuaí, Híbrido do Mundo Novo e do Caturra. (HALAL, 2008; LANDAU *et al.*, 2020)

O *C. canephora* (Café Robusta) é um cultivar mais resistente e resiliente. Ele é nativo das florestas baixas da África Equatorial, possuindo 22 cromossomos. Cresce em temperaturas mais elevadas e em terras mais planas, de menor altitude possibilitando uma produção mecanizada. A robustez da espécie o faz, desse modo, resistente às pragas, doenças e intempéries climáticas (KEMSLEY *et al.*, 1995).

As variedades dessa espécie de café são conhecidas, via de regra, por Robusta, em alusão ao elevado vigor vegetativo da espécie. As cultivares Conilon, Robusta, Guarini, Oka, Uganda, Laurentii e Crassifolia pertencem e referem-se à espécie *C. Canephora*. Esta espécie no Brasil é plantada principalmente, no estado do Espírito Santo e as variedades mais comuns são Robusta e Conilon (GALVÃO, 1986; HALAL, 2008; NASCIMENTO, 2006).

O *C. Canephora* é utilizado em cafés solúveis e em blends – misturas entre as duas espécies - com o arábica, quiçá por revelar maior amargor, menor acidez e maior teor de cafeína. Sua produção e lavouras no Brasil predomina nos estados do Espírito Santo, Rondônia e em parte da Bahia e de Minas Gerais (MAPA., 2022). Devido ao seu baixo custo, os cafés robusta são usados como enchimento em misturas torradas e moídas, adicionando notas de terra e fenólicas a alguns cafés com torras escuras, dando assim corpo e sabor (SANZ *et al.*, 2002).

Uma vez que o Café Arábica oferece bebidas melhores e de maior custo, tem sido reportadas tentativas de fraude, ou seja, há tentativa substituir o Café Arábica de alta qualidade por um Canéfora de menor qualidade. Em consequência disso, há necessidade de ter métodos analíticos sensíveis, rápido, simples e confiáveis para determinar o rácio blends de café (CAGLIANI *et al.*, 2013). A

diferença na composição entre os cafés Canéfora e Arábica é bem explícito, o primeiro apresenta maior teor de sólidos solúveis, alto nível de cafeína e um maior rendimento após a torrefação. Este também tem grande parte de sua produção destinada à fabricação de café solúvel, chás, expresso entre outras bebidas e outros produtos (LANDAU *et al.*, 2020; NASCIMENTO, 2006).

O café foi introduzido na América do Sul e, posteriormente no Brasil, pelos holandeses que passaram a cultivar as plantas nos países que colonizaram, como o Suriname. Dessa forma, a Holanda tornou-se a principal responsável pelo crescimento e popularidade do café na América, despertando o interesse de outros países (MARTINS, 2008).

As plantas do café (*Coffea sp.*) são lenhosas, de folha perene (não cai todos os anos) e de plantação tropical. A floração começa quando os botões em série, nos ramos plagiotrópicos, são induzidos a se diferenciarem em botões florais e, finalmente, em flores, no início de uma estação chuvosa. Quando há diversos eventos de floração, com interstício entre eles, há maior não uniformidade de amadurecimento do fruto.

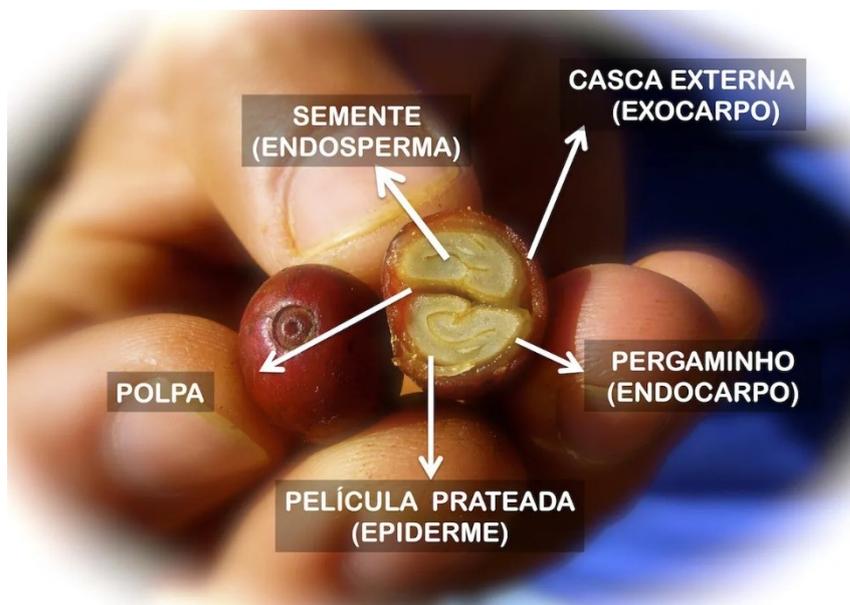
Os frutos podem ser colhidos conjuntamente na planta inteira mesmo não havendo uniformidade da maturação dos frutos (estádio verde, cereja, passas e secas, em proporções variadas). Porém, quando se deseja melhorias na qualidade do café, a colheita seletiva dos frutos maduros, deve ser realizada várias vezes na mesma planta (SAKIYAMA; FERRÃO, 2014).

O fruto do cafeeiro completo é composto pelo pericarpo e semente, pode apresentar duas, três ou mais sementes, que são resultantes de ovários bilocular, triloculares e pluriloculares. O exocarpo é verde nos estágios iniciais do fruto e, à medida que o fruto amadurece, vai se tornando vermelho-violeta, vermelho profundo (amarelo ou laranja dependendo da variedade específica). Quando maduro o fruto é denominado de cereja de forma oval elipsoidal ou ligeiramente achatado. (WILBAUX, 1963; SILVA, 2002).

Esse fruto é classificado como drupa, é poliespermática, carnuda, indeiscente, com pericarpo distinguido em exocarpo (casca), mesocarpo (mucilagem) e endocarpo (polpa). As sementes (endosperma) são envoltas pelo perisperma, uma fina camada, designada como película prateada. O embrião está situado próximo à superfície convexa da semente (GHOSH; GACANJA, 1970;

ARCILA-PULGARIN; OROZCOCASTAÑO, 1987; ÁVILA, 2017). A Figura 1 apresenta essa morfologia do fruto do café.

Figura 1 - Morfologia do grão do café



Fonte: The Coffee Traveler (Acesso em: jul. 2023).

Como demonstrado na figura, o exocarpo recobre todas as outras partes do fruto; ele é uma camada monocelular protegida por uma substância cerosa, confere resistência externa e recobre o mesocarpo uma polpa carnuda e fibrosa. Abaixo do mesocarpo encontra-se a mucilagem que é doce translúcida, incolor, fina, viscosa e altamente úmida, rica em carboidratos (glicose, frutose e pectina), proteína, gordura, minerais lipídeos e quantidade considerável de taninos, polifenóis (MURTHY; NAIDU, 2012). Sob a mucilagem encontra-se o endocarpo, também chamado de pergaminho, uma camada fina de polissacarídeo, de cor amarelada, quebradiço, parecido com papel, é composto principalmente de alfa-celulose, hemicelulose, lignina e cinzas (ESQUIVEL *et al.*, 2012). O endocarpo recobre a película prateada e o endosperma que é a própria semente do café constituída. A película prateada ou tegumento cobre cada hemisfério da semente de café e é composta predominantemente por polissacarídeos, celulose, hemicelulose, monossacarídeos, proteínas, polifenóis (FARAH *et al.*, 2014; GANDHI, 2010).

A composição química das sementes é extremamente complexa, incluindo mais de mil substâncias com diferentes propriedades químicas, dentre elas estão

carboidratos insolúveis (celulose e hemicelulose), cafeína, lipídios, ácidos clorogênicos e compostos nitrogenados (FADAI *et al.*, 2017; POISSON *et al.*, 2017).

2.2 Produção de café no Brasil

O café é uma preciosa mercadoria agrícola de exportação, sendo a segunda commodities mais negociada no mundo, depois do petróleo. A produção mundial de café na safra 2023/2024 está prevista em 174,3 milhões de sacas de 60 kg, o que representa uma alta de 2,5% na comparação com a temporada anterior. Os três principais países produtores de café, respectivamente, o Brasil, o Vietnã e a Colômbia apresentam previsão de crescimento da produção na safra 2023/2024, em razão de condições climáticas mais favoráveis. A produção de Arábica está estimada em 96,3 milhões de sacas de 60 kg, o que representa uma alta de 6,9% em relação à safra anterior. Enquanto a produção de Robusta está prevista em 78 milhões de sacas de 60 kg, correspondendo a uma queda de 2,4% na comparação com a temporada anterior.

No parâmetro global de consumo de café está previsto em 170,2 milhões de sacas de 60 kg, o que representa novo recorde e um aumento de 1,2% na comparação com o ciclo anterior. O estoque inicial da safra 2023/2024 está conjecturado em 31,6 milhões de sacas de 60 kg, representando uma baixa de 4,4% na comparação com a temporada anterior (CONAB, 2023).

No Brasil, o café Arábica foi trazido em 1727, e logo se tornou um importante produto agrícola, uma vez que se adequou muito bem aos solos e ao clima do país, por ser uma planta de porte arbóreo, adaptada ao clima úmido e temperaturas amenas. Tendo seu cultivo e produção se incorporado de forma diligente e exitosa no país, o café está intimamente ligado à história e ao desenvolvimento econômico do Brasil.

A produção de café tem grande participação no agronegócio brasileiro e uma importância cultural e social conspícua no país. No entanto, a profícua cafeicultura brasileira sofreu um abalo em 1970 quando se observou pela primeira vez no país o adoecimento das folhas do café, causada pela infecção do fungo *Hemileia Vastatrix*. Essa primeira notificação se deu no sul da Bahia, pelo pesquisador brasileiro Arnaldo Gomes Medeiros (ZAMBOLIM *et al.*, 2021).

O fungo biotrófico *H. Vastatrix*, descrito em 1869 por Berkeley e Broome causa uma patologia conhecida como Ferrugem ou Ferrugem alaranjada. Sua disseminação se deu rapidamente atingindo todas as regiões cafeeiras do Brasil (TALHINHAS *et al.*, 2017). Mais de 50 raças fisiológicas de *H. vastatrix* foram identificadas em todo o mundo, conforme apontam Zambolim *et al* (2021) e Noronha-Wagner *et al.* (1967) e segundo Capucho *et al* (2012) 15 das quais foram identificados no Brasil; mas a raça com maior distribuição nos países cafeicultores é a raça II (v5).

No Brasil, a Ferrugem do cafeeiro pode causar perdas de até 50% na produção de café, visto que a doença causa declínio da planta, podendo tornar inviável a exploração econômica da lavoura dependendo do nível de resistência da cultivar, condições climáticas favoráveis à doença e medidas de manejo (ZAMBOLIM *et al.*, 2021).

Não obstante, a Ferrugem seja a fitopatologia mais prevalente que acomete a cafeicultura no Brasil, vale evidenciar que inúmeros distúrbios podem acometer os cafeeiros, provocando anormalidades e são um desafio para os produtores por reduzirem a produtividade da cultura e impactando diretamente da renda dos produtores. Parte desses distúrbios, com causas bióticas, é citada e estudada como pragas e doenças do cafeeiro.

Das doenças fúngicas que acometem o café, além da Ferrugem há uma gama de outras micoses de importância na cafeicultura: Cercosporiose (*Cercospora coffeicola*), Rizoctoniose Tardia (*Rhizoctonia spp.*), Manchas de Phoma (*Phoma costarricensis*), Mancha de Ascochyta (*Phoma tarda*), Antracnose (*Colletotrichum spp.*), Roseliniose (*Rosellinia spp.*), Mancha Manteigosa (*Colletotrichum gloeosporioides*) e Fusariose (*Fusarium spp.*).

O café pode ser infectado também por nematóides de diversos gêneros, dois são mais estudados: *Meloidogyne* e *Pratylenchus*. Inúmeros são ainda as pragas de Insetos causadores de danos aos cafeeiros, como por exemplo: Bicho Mineiro (*Leucoptera coffeella*), Broca do Café (*Hypothenemus hampei*), Cigarras do Cafeeiro (*Quesada sp.*, *Fidicina sp.* e *Carineta sp.*), Ácaro Vermelho (*Oligonychus ilicis*), Cochonilhas das Raízes (*Dysmicoccus texensis*), Berne do Café ou Mosca das Raízes (*Chiomyza vittata*) e outras pragas como lagartas, caramujos, lesmas, besouros, formigas cortadeiras, percevejo castanho, lagartinha das rosetas. A

patologia bacteriana mais preponderante é a Mancha Aureolada (*Pseudomonas syringae*) (MESQUITA *et al.*, 2016).

Todo esse escopo de pragas e outras doenças que influenciam a cafeicultura no Brasil têm potencial para causar grandes reveses econômicos. No caso da disseminação Ferrugem, resultou, de certo modo, em impactos positivos na cafeicultura brasileira, pois impulsionou e exigiu modernização através da geração e adoção de novas tecnologias, bem como mais práticas de manejo eficientes, resultando em uma produção de café mais competitiva e na expansão para novas áreas de produção.

O Manejo Integrado de pragas e doenças na cafeicultura, a título de exemplo, é uma estratégia cada vez mais valorizada, diferentes métodos de controle de forma conjunta obtendo resultados mais sustentáveis do ponto de vista econômico, ambiental e social (ZAMBOLIM *et al.*, 2021). As ações tomadas para resolver estas demandas levaram à renovação e modernização do setor cafeeiro, estabelecendo ainda mais a indústria cafeeira e aumentando a produção de café no Brasil (SERA *et al.*, 2022).

A produção de Café Arábica no Brasil é atingida não apenas por doenças e pragas, como também por más práticas de manejo da cultura, clima, arborização na lavoura, solos pobres, acesso limitado a informações de mercado, falta de infraestrutura física, falta de híbridos melhorados, serviços de extensão ruins e mudanças climáticas dentre outras variáveis que ocasionam estresse a lavoura de café (FEKEDE *et al.*, 2015).

O uso de controle químico pode ser demandado para o manejo cultural com aplicação de fertilizantes, pesticidas e herbicidas no café, tal como a aplicação de fungicidas para o tratamento da Ferrugem. No entanto, a sustentabilidade ambiental deve ser equilibrada e o uso de práticas de segurança e uso racional de pesticidas devem ser empregadas por modelos de previsão para minimizar o número de pulverizações.

Ressalta-se, que parte considerável da produção brasileira de café está localizada em áreas montanhosas, onde a mecanização é dificultosa, tornando o controle químico difícil e resultando em perdas substanciais de produção. Nesses locais, cultivares resistentes são o método mais eficiente de controlar agentes limitantes da produção e vem substituindo lentamente cultivares tradicionais com o

objetivo de melhorar a produtividade e reduzir os custos de produção (SERA et al., 2022).

Além do controle químico, nos últimos anos houve o advento de bioestimulantes, que são quaisquer substância ou microrganismo vivos capazes de desempenhar uma função benéfica quando aplicada às plantas. Um bioestimulante é eficaz se for capaz de melhorar a efetividade da planta na absorção e assimilação de nutrientes, a tolerância ao estresse biótico, abiótico ou melhorar algumas de suas características agrônômicas, independentemente do conteúdo de nutrientes, fornecer aumentos adicionais no rendimento das culturas, estimular e revigorar a germinação e a frutificação (YHONY et al. 2020).

Em contrapartida, em um estudo realizado por Oliveira et al. (2018) avaliou a eficácia de bioestimulantes em mudas de Café Arábica e não observaram benefício dessa aplicação, o que requer, portanto, mais informações e estudos para estágio de desenvolvimento mais adequado para a aplicação dos bioestimulantes em café.

Diante do exposto, o desenvolvimento e o melhoramento de variedades de café de alto rendimento e tolerantes ao estresse são uma alternativa valorosa. Sendo o foco dos programas de melhoramento, por métodos convencionais e moleculares, em várias instituições do mundo a obtenção de cultivares com resistência múltipla e durável a doenças, principalmente à Ferrugem. Assim, é evidente que o melhoramento do café por meio de diferentes métodos é essencial e é uma tarefa crítica a ser enfrentada para superar as restrições da produção de café (MELESE *et al.*, 2021).

Nas últimas décadas, os programas de melhoramento genético do café no Brasil desenvolveram cultivares resistentes à Ferrugem. No entanto, a resistência à Ferrugem não é a única característica que determina a escolha de uma cultivar pelos cafeicultores brasileiros. Características incluindo alto potencial de rendimento, qualidade do grão e da xícara, vigor vegetativo, resposta à poda, ciclo de maturação, fácil colheita mecanizada, resistência a outras doenças e nematóides também são altamente considerados ao escolher cultivares (SERA et al., 2022).

Menciona-se a título de exemplo de um cultivar resistente à Ferrugem o café MG2, que se diga de passagem, por esse motivo, é destaque na espécie arábica.

O Programa de Melhoramento Genético da EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), e a Universidade Federal de Viçosa (UFV) vêm desenvolvendo, desde 1974, um intenso trabalho de pesquisa no Estado de Minas Gerais. Como resultado dessa parceria, o Programa de Melhoramento Genético do Cafeeiro da EPAMIG/UFV desenvolveu as cultivares de café Catiguá MG1 e Catiguá MG2, resistentes às raças de *H. vastatrix*. A origem do Café Catiguá MG2 é o cruzamento de Catuaí Amarelo IAC 86 com Híbrido do Timor UFV 440-10. As cultivares Catiguá MG1 e Catiguá MG2, da espécie *Coffea arabica* L., são resistentes às raças prevalentes do agente causador da ferrugem apresentam porte baixo e copa de formato cônico. Os ramos plagiotrópicos apresentam internódios curtos, com ramificações secundárias abundantes. Os frutos são graúdos e de cor vermelha quando maduros. A cultivar Catiguá MG1 apresenta folhas novas de cor bronze e Catiguá MG2 coloração bronze claro, com produtividades comparáveis a cultivar Catuaí Vermelho IAC 15 e a descendência H419-6-2-5-3 (todas derivadas do cruzamento com o Híbrido do Timor) apresentou pontuações acima 90 pontos em pelo menos uma amostra, indicando seu grande potencial para a produção de cafés especiais (Pereira et al. 2010).

No campo da pesquisa cafeeira, deve-se dar prioridade à utilização e conservação eficientes da diversidade genética existente. Dentre os genótipos de café arábica, três grupos de plantas podem ser identificados: os genótipos silvestres da região Sudão-Etíope; as linhagens cultivadas não introgridas (tipos *Typica* e *Bourbon*); e as variedades introgressadas, construídos principalmente a partir de genótipos Híbridos de Timor. (LEROY *et al.*, 2006). O desenvolvimento de variáveis através da abordagem de melhoramento clássico é um processo que habitualmente demanda mais de 15 anos para se lançar uma nova variedade.

Deste modo, é necessário fortalecer as tecnologias de engenharia genética moderna de melhoramento do café, como a biotecnologia (cultura de tecidos e caracterização molecular e seleção assistida por marcadores). Nesse sentido, pesquisas foram realizadas sobre a aplicação de ferramentas biotecnológicas, principalmente embriogênese somática, para propagar híbridos F1 de *C. arabica* e conservar os recursos genéticos para futuros programas de melhoramento, que mostram resultados promissores. Sobretudo, hodiernamente, o melhoramento do café tem a necessidade de desenvolver variedades adaptadas às mudanças

climáticas. Genótipos de café estão cada vez mais ameaçados devido à erosão genética. (JUSTIN et al., 2017; AFEWORK et al., 2019; GUDETA, 2020).

Vislumbra-se uma tendência profundamente negativa no futuro da distribuição do café arábica nativo em virtude das mudanças climáticas nas áreas de seu cultivo, reduzindo o rendimento e a qualidade, aumentando os surtos de pragas e doenças e os custos de produção. Há, progressivamente, uma redução do número de áreas ecologicamente adequadas para o cultivo do café, e o pior cenário seria uma redução de quase 100% até 2080 devido ao efeito do aumento da temperatura global.

As áreas de produção de café vão se inviabilizando por se tornarem muito quentes ou propensas a secas periódicas. Isso assinala que a mudança climática está ameaçando as lavouras de café em praticamente todas as principais regiões produtoras de café do mundo. Assim sendo, o principal objetivo do melhoramento deve ser cultivar variedades de café adequadas para as mudanças climáticas (WATTS, 2016; KILLEEN et al., 2016).

Ante as ameaças da erosão genética do café e para ser utilizado em programas de melhoramento o genótipo do café são estrategicamente conservados. Os germoplasmas do gênero *Coffea* estão sendo conservados em Bancos Ativos de Germoplasmas (BAG) *In situ* e *Ex situ* (*In vitro*, *In vivo* e Criopreservação). A observação, mensuração e documentação de caracteres da planta que são consistentes, expressos de forma homogênea em vários ambientes e herdáveis, podem ser chamadas de caracterização de germoplasma. (FERREIRA; MARINHO, 2007).

Os BAG representam um acervo de genes e um reservatório de variabilidade genética natural, potencial e indispensável para os programas de melhoramento genético de plantas cultivadas não renováveis (COSTA et al., 2011), No Brasil, os germoplasmas do gênero *Coffea* são mantidos e caracterizados, por exemplo, pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) e Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais (EPAMIG). A coleção de acessos de *Coffea* implantada na Fazenda Experimental de Patrocínio

da EPAMIG, é composta por diversos mutantes que representam formas silvestres espontâneas e subespontâneas de *C. arabica*. (CARVALHO et al., 1991).

O Brasil é internacionalmente reconhecido por sua capacidade de produzir café em grandes volumes e a preços competitivos. Atualmente, a estimativa para a safra cafeeira no Brasil, apresentada em maio de 2023 (café total - arábica e conilon), ciclo de bienalidade negativa, indica produção total de 54.742,9 mil sacas beneficiadas. Essa produção é 7,5% sacas superior à colhida em 2022, ano de bienalidade positiva, que foi acometida por adversidades climáticas nas diversas regiões produtoras do país, com baixas precipitações pluviométricas, longas estiagens e temperaturas acima do normal, durante grande parte do seu desenvolvimento. A área destinada à cafeicultura no país em 2023 totaliza 2,25 milhões de hectares, aumento de 0,3% sobre a área da safra anterior, com 1,87 milhão de hectares destinados às lavouras em produção, com crescimento de 1,7% (CONAB, 2023).

2.3 Cafeicultura do Cerrado Mineiro

Dentre os estados brasileiros com maior produtividade de café destaca-se o estado de Minas Gerais. Especificamente três regiões do estado mineiro são mais notáveis no cultivo de excelentes cafés, são elas: Matas de Minas, Sul de Minas e Oeste de Minas, também conhecida como Região do Cerrado Mineiro, que está localizada no noroeste do estado e é composta de 55 municípios (PEREIRA, 2014).

O Cerrado Mineiro atinge alta produtividade, uniformidade de frutos e qualidade de grãos produzidos por ser uma área que proporciona uma faixa térmica ideal para o cultivo do café arábica. O plantio é realizado em altitudes que variam de 800 a 1300 metros, a baixa umidade relativa do ar. O Cerrado apresenta dois tipos de relevo, um plano e outro suavemente ondulado, com predominância do solo tipo latossolo, que ocupa quase 46% da extensão da área total. Tais solos são caracteristicamente profundos, bem drenados, sem impedimento à mecanização, porém, com baixa fertilidade natural, mas que podem ser corrigidos pelo processo de calagem (FERNANDES et al., 2012; PAIVA, 2010).

A precipitação anual da região está entre 600 e 1000 milímetros e temperatura anual média entre 18 e 23°C. Esses aspectos benéficos da região, faz

com que os cafés cultivados tenham características únicas e singulares. Os cafés produzidos pela região são caracterizados pelo sabor doce com notas de chocolate; aroma intenso, caramelo e nozes; acidez delicada, moderada e cítrica; encorpado e com finalização de longa duração (BORÉM; FRIEDLANDER, 2009).

No período da colheita, a região apresenta um clima seco e baixa pluviosidade, o que permite menor influência da umidade sob o café após a colheita, o que seria prejudicial pela ocorrência de fermentação indesejada causada por fungos no café colhido e espalhado em terreirões. A temperatura mais amena permite que o processo de maturação do grão seja por um período mais longo e uniforme (EVANGELISTA et al., 2002; BSCA, 2021).

Contudo, por se tratar de uma área mais seca, faz-se necessária a utilização de técnicas avançadas de irrigação o que permite a expansão da área de cultivo e uma maior produção (BORÉM; FRIDLANDER, 2009). De modo geral, a cafeicultura empregada no Cerrado Mineiro emprega tecnologia de ponta no plantio, nos tratamentos culturais e na colheita do café. A colheita é majoritariamente mecanizada, com grande percentual de áreas irrigadas nos municípios que integram a região (BSCA, 2021).

A produção cafeeira no estado de Minas Gerais, conforme a segunda estimativa para a safra cafeeira, apresentada em maio de 2023 (café total - arábica e conilon), é estimada em 27,83 milhões de sacas; aumento de 26,7% em comparação ao volume total colhido na safra anterior, justificado pelo aumento da área, pelo ganho na produtividade e, principalmente, pelas melhores condições das lavouras após as últimas safras, caracterizadas por climas adversos.

Particularmente na região do Triângulo, Alto Paranaíba e Noroeste Mineiro a área destinada à cafeicultura em 2023 totaliza 199.471,0 hectares (ha). A produtividade conjecturada é de 32,7 sacas por hectare (sc/ha), aumento de 41,7% em comparação ao volume total colhido na safra anterior e a produção é de 6.532,4 mil sacas beneficiadas, incremento de 55,6% em relação ao volume total produzido no ano de 2022 (CONAB, 2023).

2.4 Processamento do café

O processamento do café visa, basicamente, a remoção da polpa/mucilagem e a diminuição do teor de umidade do fruto cereja do café, possibilitando a redução do seu conteúdo de água de 65% para um grau de umidade entre 10 e 12%. Para prevenir fermentações indesejáveis, o processamento deve ser feito imediatamente após a colheita. Os grãos processados podem ser armazenados sem alteração significativa do sabor. Dessa forma, o café é comercializado internacionalmente como café verde, coberto ou não com a película prateada (NASCIMENTO et al., 2008; ESQUIVEL et al., 2012).

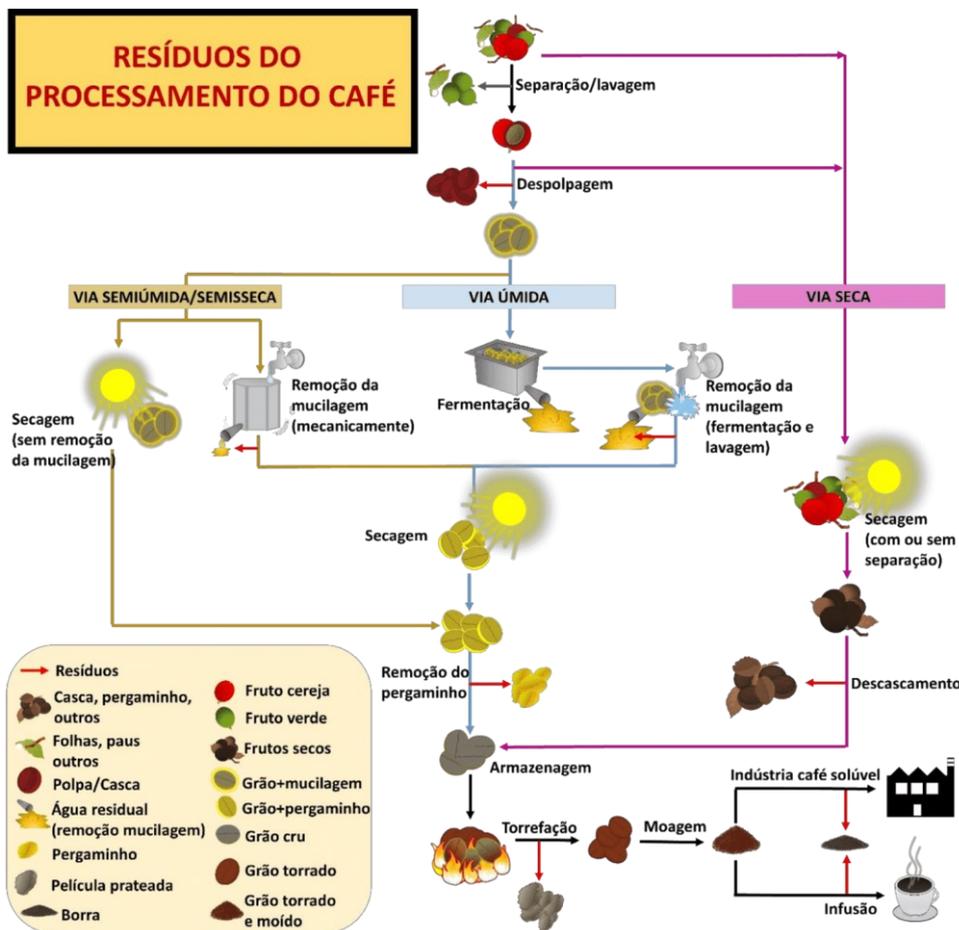
O processamento é uma etapa importante da pós-colheita, fazendo com que ocorra a maior homogeneidade possível dos frutos, evitando possíveis comprometimentos na qualidade da bebida (WINTGENS, 2004). A demora no processamento do café permite a ocorrência de fermentações indesejáveis, provocando a produção de substâncias químicas, principalmente ácidos, (acético, láctico, butírico e propiônico) que se difundem da mucilagem para a semente, comprometendo sua qualidade (CHALFOUN; CARVALHO, 2000). Portanto, os métodos de secagem dos frutos devem reduzir o teor de umidade, de forma que irá garantir a diminuição das reações químicas, verificando um menor metabolismo, impedindo ou reduzindo a proliferação de microrganismos, ocorrência de fungos e micotoxinas permitindo a conservação dos frutos por longos períodos. (PIMENTA, 2003; BORÉM, 2008; REIS; CUNHA; CARVALHO, 2011).

É pertinente mencionar que para o processamento do café acontecer adequadamente, parâmetros adequados da colheita precisam ser observados. A colheita de frutos verdes pode ocasionar prejuízos quanto a classificação por tipo e no rendimento de colheita, por provocar desgaste da planta, na qualidade da bebida e no valor do produto. O ideal é que os produtores iniciem a colheita com, no máximo 5% de cafés verdes; portanto deve ser assegurado a colheita de frutos maduros (WINTGENS, 2004; BORÉM, 2008; REIS; CUNHA; CARVALHO, 2011).

Após a colheita, os frutos são separados das impurezas e materiais estranhos (gravetos, caroços e folhas), posteriormente lavados no lavador, onde passam também por uma separação hidráulica. Nesta separação, os frutos verde e cereja, que têm maior densidade, afundam no lavador, e os frutos que já

passaram do estágio de maturação, chamados de “bóia”, são menos densos e flutuam na superfície do tanque. Após esta etapa, o café pode ser processado seguindo a via seca, via úmida ou via semiseca, como apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Etapas do processamento de café



Fonte: Blog Agro para negócios rurais (Acesso em: jul.2023).

No processo por via úmida, o exocarpo (casca) e o mesocarpo (mucilagem) são removidos mecanicamente. A remoção do exocarpo acontece através de descascadores do café cereja e a realização da remoção ocorre pela diferença de resistência da pressão do fruto verde e do fruto maduro. A mucilagem remanescente é removida de forma mecânica ou biologicamente (cereja descascado), ou seja, a casca dos grãos é removida por despulpadores (BORÉM, 2008; EVANGELISTA et al., 2014).

Após a remoção da casca os grãos podem ser submetidos a dois processos distintos. Os grãos podem ser submetidos à fermentação submersa que ocorre em

tanques submergidos em água ou, em estado sólido, onde os grãos são expostos a uma fermentação na ausência ou exígua presença de água (TANG et al., 2021).

A fermentação do café é o processo pelo qual o mesocarpo mucilaginoso, aderido ao pergaminho, é degradado por enzimas que ocorrem naturalmente no café cereja e/ou são secretadas pela microbiota do fruto. Posteriormente a mucilagem é lavada para ser separada do pergaminho (AVALLONE et al., 2002). O tempo de fermentação varia de acordo com a temperatura e a espessura da mucilagem, entre outros fatores (PIMENTA, 2003).

Por um período médio de 15 a 20 dias os grãos são secos ao sol até atingirem 10-12% de umidade. Este método diminui o tempo e a área necessária para a secagem. O processamento adequado, por via úmida, preserva as qualidades intrínsecas dos grãos, resultando em um produto homogêneo e com poucos defeitos (BARTHOLÓ; GUIMARÃES, 1997; BORÉM, 2008). Todavia é preciso considerar que o processamento por via úmida demanda equipamentos específicos e quantidades substanciais o que acarreta custos adicionais ao processo. Por sua vez, a colheita dos frutos maduros, a remoção da casca e da mucilagem, o controle da fermentação e a secagem de forma cuidadosa que esse processo propicia em uma bebida de melhor qualidade.

O processamento por via seca, é um método que envolve o fruto inteiro ou na sua forma integral, sendo a estratégia mais antigo, simples e que requer pouco maquinário. Também conhecido como método “natural”, dá origem ao café denominado coco, de terreiro ou natural (SILVA et al., 2000). O fruto que passou pelo lavador é encaminhado para o terreiro (de terra, suspensos, de concreto ou de asfalto), onde é revolvido diariamente para que seque uniformemente. Os frutos inteiros do café são espalhados em camadas de aproximadamente 3 cm de espessura, e amontoados à noite. A composição química do fruto favorece a uma fermentação microbiana natural que ocorre simultânea com a secagem. (SCHWAN; WHEALS., 2003; SILVA et al., 2008).

O tempo de secagem pode chegar a quatro semanas para, ou em torno de 20 a 25 dias no terreiro. Esse processo permanece até o grão atingir umidade, aproximadamente 11-12% (SILVA et al., 2008). Os cafés processados pela via seca apresentam características sensoriais que os diferenciam dos cafés produzidos pela via úmida, com menor maciez e maior corpo, que é fundamental para as ligas

de café expresso (VILELA, 2002). Esse processo apresenta a vantagem de não afetar a condição natural do café, pois o fruto é mantido intacto, forma de café cereja; e que menos agride o meio ambiente, pois produz poucos resíduos sólidos e líquidos (BORÉM, 2008; ESQUIVEL, et al., 2012).

No processamento semiseco os frutos do café são transferidos para o terreiro para a etapa de secagem, durante a qual também ocorre a fermentação natural. O que o diferencia é que os frutos do café são descascados e a mucilagem remanescente que ainda permanece aderida ao pergaminho são transferidos para o terreiro onde a secagem ocorre simultaneamente com a fermentação natural. O objetivo do processo semiseco é apartar mecanicamente as cerejas verdes das maduras para tratá-las separadamente e melhorar a qualidade do café, afora o processo de secagem (BRANDO, 2010). À vista disso esse método é denominado cereja descascado e apresenta etapas tanto do método via seca quanto via úmida (DUARTE et al., 2010; VILELA et al., 2010). Após a secagem, os grãos são armazenados em sacos de juta, onde aguardam de 20 a 30 dias para serem descascados e para a remoção do pergaminho (HAILE, KANG., 2019; PEREIRA et al., 2019).

A importância da microbiota associada ao café em todas as etapas, pré e pós-colheita deve ser salientado. Durante o processamento do café, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos estão presentes durante os diferentes estádios (ARUNGA, 1982). O controle, isolamento e identificação dos microrganismos presentes na planta e no grão do café é desejável uma vez que essa microbiota influencia na bebida, seja pela degradação de compostos presentes nos grãos ou pela excreção de metabólitos (MASOUD et al., 2004). Alguns microrganismos são relatados como de importância na fermentação do café, como os gêneros *Bacillus*, *Erwinia*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (ARUNGA, 1982). Espécies bacterianas foram isoladas durante a fermentação de café processado por via úmida e verificaram a ocorrência de espécies como *Klebsiella Ozaenae*, *Erwinia herbicola*, *Leuconostoc mesenterioides* e *Lactobacillus brevis* (AVALLONE et al. 2001). Masoud et al. (2004) verificaram, em isolamento de cafés processados via úmida, que a maior incidência de fungos leveduriformes foram das espécies *Pichia anomala*, *P. kluyveri* e *Hanseniaspora uvarum* durante o processo.

2.5 Torra do café

O processo torração ou torrefação do café é um dos processos mais relevantes de seu processamento. Nesse, os grãos são submetidos a uma série de transformações químicas, físicas, estruturais e sensoriais quando submetidos ao calor, esse procedimento afeta diretamente no sabor, aroma e qualidade das bebidas (FABBRI *et al*, 2011; TRUGO, 2004). A torra é controlada pelo tempo, temperatura, mecanismo de transferência de calor e é, muitas vezes, avaliada qualitativamente apenas pela cor (Kucera *et al*, 2016). As mudanças físicas provocadas são também em relação ao tamanho e alteração na estrutura da parede celular dos grãos, já que ocorre grande perda de dióxido de carbono e água (JANSEN, 2006).

O ponto final da torra pode ser determinado de várias maneiras, utilizando por exemplo o tempo e a temperatura final dos grãos de café. Um dos métodos de detecção de cores é baseado nos discos de cores padrão, também chamados de discos de Agtron (MELO, 2004). No Brasil as características da torrefação do café são baseadas nos discos de Agtron é normatizado pela Portaria Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) nº 570, de 9 de maio de 2022 do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) que estabelece o padrão oficial de classificação do café torrado conforme Quadro 1.

Quadro 1 - Características de torrefação do café

Ponto de torra	Nº Disco Agtron	Classificação da torra
Escura	25	Muito escura
	35	Escura
	45	Moderadamente escura
Média	55	Média
	65	Média Clara
Clara	75	Moderadamente Clara
	85	Clara
	95	Muito Clara

Fonte: Brasil, 2022.

Assim, subentende-se que quanto maior for o número do disco de Agtron, a classificação da torra ficará mais clara.

Da perspectiva técnica, a torra do café consiste num fluxo de gases quentes gerados eletricamente, ou pela queima de combustíveis fósseis que produzem ar quente que passa através de um leito de café em movimento. O calor é transferido do ar quente para o grão por mecanismos convectivos e, dependendo da técnica, também por irradiação e/ou por condução devido ao contato direto com as paredes do torrador (FABBRI et al, 2011). Os grãos de café entram verdes no torrador, com a alteração do binômio tempo versus temperatura há mudanças na cor do grão, essas mudanças ocorrem em 4 estágios.

No primeiro estágio, também chamado de amarelo, a temperatura interna dos grãos varia entre 90° e 120°C, nesse estágio os grãos apresentam tons mais alaranjados (MELO, 2004). No segundo estágio o grão atinge um nuance marrom claro e a temperatura interna do grão se aproxima de 120-150°C, nesse estágio ocorre aqui uma reação endotérmica ocasionada pela evaporação da umidade dos grãos, consequência da elevada temperatura externa. Simultâneo ao aumento da temperatura, ocorre reações exotérmicas que formam compostos voláteis e CO₂. Posteriormente, com a elevação da pressão interna, o grão se expande causando rachaduras em sua estrutura, essa quebra é chamada “crack”. O café alcança o estágio chamado de *city*, nele a expansão dos grãos é devida ao escape dos gases do primeiro crack e a tonalidade do grão torna-se mais amarronzada. Nesse estágio ocorre caramelização do café, que se dá em temperaturas entre 170° a 205°C; é importante mencionar que é sabido que o ponto de fusão da sacarose é de aproximadamente 185°C. Por derradeiro o processo de torra atinge o estágio *Full City*; comumente nessa fase ocorre o segundo crack e à vista disso a ruptura da matriz celular do grão que atinge aqui temperatura interna do grão aproximada de 220°C. Nesse estágio, observa-se grãos mais lustrosos, em razão da liberação de seus óleos. Há estágios de aquecimento mais avançados que o grão pode atingir, nestes a torra se torna mais agressiva, há degradação dos açúcares redutores e as características organolépticas se tornam indesejáveis resultando em bebidas com sabor amargo e aroma queimado (CARNEIRO, 2021; MUINHOS, 2017; PIRES, 2019).

A eficiência e qualidade do processo de torra do café depende de vários fatores, tais como: a composição do gás, temperatura, pressão, tempo, velocidade relativa dos grãos e o fluxo de gás (FABBRI et al, 2011). Durante a torra, as

mudanças provocadas por reações químicas incluem a reação de Maillard ou reação não enzimática, a browning reaction e a degradação de Strecker de proteínas, açúcares, polissacarídeos, caramelização de carboidratos, pirólise de compostos orgânicos e outros componentes (Somporn et al, 2011).

Durante a torra, existe a formação de compostos heterocíclicos voláteis que têm sido descritos com potenciais antioxidantes, como o hidroximetilfurfural, um intermediário na reação de Maillard, que demonstrou ter compostos antioxidantes semelhantes ao 2,6-dibutil-4-metilfenol e ao α -tocoferol (VIGNOLI et al, 2014). O uso de altas temperaturas pode acarretar a degradação dos ácidos clorogênicos, que confere sabor amargo às bebidas. Um composto importante para a formação de cor nos grãos são as Melanoidinas, que são degradadas gradualmente durante este processo (FARAH; DONANGELO, 2006; TRUGO, 2004). Neste processo ocorrem alterações dos macroconstituintes que, durante as reações de Maillard, promovem a formação de Melanoidinas que têm influências nas propriedades organolépticas do café proporcionando sabores agradáveis (caramelo, tostado, maltado etc.) e aromas positivos (malte fino, cheiro a pão etc.), mas também alguns sabores desagradáveis (amargo e queimado) e aromas desagradáveis (queimado, cebola, solvente, ranço e suor) (KUCERA et al, 2016).

As melanoidinas são polímeros heterógenos de grande massa molecular que se formam quando o açúcar e aminoácidos se combinam e que podem absorver a luz em comprimentos de onda até 420 nm sendo, por isso, predominantemente responsáveis pela cor acastanhada característica dos alimentos (WANG et al., 2011).

A cor da torra não é o parâmetro único a ser controlado no processo de torra do café. O nível de cor da torra não pode ser descorrelacionado de uma análise sensorial rigorosa e esta pode ser alcançada de múltiplas maneiras, tais como, duração, temperatura e mecanismos de transferência de calor. (DE LUCA et al, 2016). A Portaria SDA nº 570, de 9 de maio de 2022 do MAPA que estabelece o padrão oficial de classificação do café torrado conforme também estabelece características sensoriais do café torrado que devem ser observados no Quadro 2.

Quadro 2 - Características sensoriais do café torrado

Atributos	Tipo Único	Fora de Tipo
Fragrância do pó	Regular a excelente	Desagradável, inaceitável, repugnante, estranho ao produto.
Aroma da bebida	Regular a excelente	Desagradável, inaceitável, estranho ao produto.
Acidez	Baixa a alta	Desagradável, azeda.
Amargor	Intenso a leve	Desagradável e excessivo
Sabor	Regular a excepcional	Desagradável, estranho ao produto.
Adstringência	Intensa a nula	Repugnante
Corpo	Leve a moderadamente encorpado	Incipiente
Percepção dos defeitos	Moderado a intenso	Excessiva percepção, com realce dos grãos mofados, sujos e terrosos.
Sabor residual	Regular a excelente	Desagradável, excessivo sabor fenicado e sujo
Qualidade Global	Regular a Excelente e nota de Qualidade Global igual ou maior que 4,5 pontos	Abaixo de 4,5 pontos

Fonte: Brasil, 2022.

Configura ainda alteração no processo de torra do café a presença de grãos defeituosos durante o processo; influenciando no perfil organoléptico da bebida uma vez que pode introduzir aromas e sabores indesejáveis (odores medicinais, mofados, sulfurosos e sabores metálicos entre outros). Os processos de plantação, colheita e processamento (despolpagem, secagem e armazenamento) dos grãos de café são cruciais para a sua qualidade na preparação da bebida, uma vez que podem introduzir aromas e sabores negativos. Os principais tipos de defeitos na cadeia de processamento do café são os grãos pretos, parcialmente pretos, fermentados e imaturos.

Além disso, a presença de elementos extrínsecos tais como cascas, paus e outros detritos provenientes do próprio cafeeiro são impurezas a se considerar, ademais de matérias estranhas: os corpos ou detritos de qualquer natureza, estranhos ao produto, tais como grãos ou sementes de outras espécies vegetais, areia, pedras, torrões e demais sujidades (MANCHA et al., 2007). A Portaria SDA nº 570, de 9 de maio de 2022 do MAPA prevê parâmetros de qualidade para o café torrado de acordo com o Quadro 3.

Quadro 3 - Parâmetros de qualidade do café torrado

Parâmetro	Tipo Único
Somatório de matérias estranhas e impurezas	Máximo 1,0%*
Elementos estranhos	Ausência**
Teor de cafeína no café descafeinado	Máximo 0,1%
* Matéria estranha e impureza acima de 1,0% (um por cento) é considerado desclassificado. ** Café com presença de elementos estranhos é considerado desclassificado.	

Fonte: Brasil, 2022.

Portanto, para que haja qualidade no café torrado é indispensável que os grãos sejam selecionados para que seguir a esses parâmetros de qualidade previstos pela Portaria referida anteriormente.

2.6 Qualidade do café e cafés especiais

De acordo com dados da *Specialty Coffee Association* (SCA), o café especial representa um mercado em ascensão notadamente em regiões consumidoras não produtoras de café, como América do Norte e Europa. O mercado de cafés premium classifica as últimas décadas por intermédio de ondas do consumo de café. Na primeira onda, a bebida era mais consumida do que apreciada, apenas pelo valor energético que oferecia dado os efeitos estimulantes da cafeína e pouco pelo seu sabor ou outros atributos intangíveis. Nesse contexto, houve a expansão da produção e comercialização dos grãos commodities, com enfoque na distribuição em larga escala (BORRELLA; MATAIX; CARRASCO-GALLEGO, 2015; GUIMARÃES et al., 2016).

A partir da Segunda Onda, por volta dos anos 60 aos anos 90, o consumo do café foi marcado pela melhoria na qualidade da commodity e abertura de grandes redes de cafeterias e cafés especiais foram introduzidos no mercado. O café ganhou uma perspectiva mais social, com a disponibilidade de cafés de qualidade em ambientes agradáveis. (GUIMARÃES et al., 2016; HARTMAN, 2011).

Vive-se a terceira onda do consumo; etapa que começou a ganhar força no Brasil nos últimos anos e trouxe uma revolução no consumo de cafés especiais, pautada, sobretudo, na diferenciação de produtos e experiências de consumo. Os cafés especiais, de qualidade superior ao café commodity, ganharam espaço e mostraram aos produtores a possibilidade de margens de lucro mais elevadas. Nos cafés especiais são valorizadas as especificidades dos grãos e a bebida é

degustada levando-se em consideração seu aroma, sabor, doçura, acidez, corpo e sabor residual (MANZO, 2015; BORRELLA; MATAIX; CARRASCO-GALLEGO, 2015; GUIMARÃES et al., 2016).

Os grãos de cafés especiais são de procedência controlada e de rigoroso padrão de qualidade no processamento do café cru, na torra, no envase e no preparo. Uma diferenciação é feita pelos especialistas entre café especial e o gourmet; segundo o qual o termo café especial seria um termo mais amplos empregados para cafés que além da questão sensorial, tem outros quesitos observados, como: responsabilidade social na produção, certificações de qualidade e rastreabilidade do produto (MANZO, 2015; BORRELLA; MATAIX; CARRASCO-GALLEGO, 2015; GUIMARÃES et al., 2016).

A qualidade do café pode ser determinada como um conjunto de atributos físicos, químicos, sensoriais, manejo higiênico, sanitários, ambientais e de aspectos sociais que são decisivos à aceitação do produto pelos consumidores. Em cada estágio da produção e processamento do café, aquele que recebe o produto como matéria-prima para seu processo é denominado cliente interno. Os clientes externos incluem o público intermediário e os consumidores finais. Com base nessas definições, a qualidade deve ser uma constante em todas as etapas da cadeia produtiva. Assim, características como: edafoclimáticas, cultivares, condução e manejo da lavoura, colheita, tipo de processamento, secagem e armazenamento são determinantes para a qualidade do produto. (CARVALHO et al., 1994; PEREIRA, 2003; LEME, 2007; RODARTE, 2008).

A determinação da qualidade do café brasileiro compreende duas fases distintas: a classificação por tipos ou defeitos dos grãos e a classificação pela bebida. Ademais o café pode também ser classificado por: peneira, cor, torração e aspecto (MALAVOLTA, 2000). Com o intuito de aumentar o consumo de café, valorizar sua qualidade e evitar fraudes, a Associação Brasileira da Indústria do Café (ABIC) implementou o selo de pureza no início da década de 1990. Posteriormente, foram inseridos outros, como o selo de qualidade e diversos programas de valorização da qualidade do café brasileiro (RODARTE, 2008).

A Instrução Normativa nº8 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é que define a Classificação Oficial Brasileira (COB). Inicialmente, os grãos crus são analisados e classificados em relação ao formato e ao tamanho

dos grãos, ao percentual de defeitos e à coloração, bem como a presença de matérias estranhas e impurezas mesma. De acordo com a coloração, o café beneficiado pode ser classificado em oito classes: verde-azulado e verde-cana, verde-amarelado, amarela, marrom, chumbado, esbranquiçado e discrepante. Outros parâmetros também são contemplados na legislação, quais sejam, o formato do grão (moca e chato), o tamanho (peneira 16 acima) dentre outros (BRASIL, 2003).

A avaliação sensorial do café é o método de análise mais empenhado para realizar a avaliação da qualidade da bebida, visto que esta é um fator que dita o valor comercial do café. A classificação pela bebida tem dois objetivos fundamentais: conhecer a qualidade do café a ser comercializado e definir as ligas ou blends que valorizem determinados lotes de café. É influenciada pela presença de grãos verdes, verdes-pretos, pretos ou ardidos, ou ainda pela ocorrência de fermentações nos grãos, durante a fase de colheita ou preparo (ANGÉLICO, 2008; BÁRTHOLO; GUIMARÃES, 1977).

A análise sensorial é definida como a disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos e materiais como são percebidos pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição (ABNT, 1993). A análise sensorial de cafés acontece por meio da “prova de xícara”. Este método foi introduzido no Brasil por George Howel em 1997 e consiste na sorção, degustação e descarte da bebida. As principais características analisadas são o aroma, doçura, amargor, corpo, sabor e acidez. (Paiva, 2005). A avaliação sensorial do café por meio da “prova de xícara” (também chamada de *cupping*) é realizada conforme metodologias estabelecidas pela Classificação Oficial Brasileira (COB) (BRASIL, 2003). Além dessas metodologias impostas pela COB, há também as metodologias da Associação Americana de Cafés Especiais (SCA, 2015). Essas provas utilizam café submetidos à torrefação leve, já que esta permite uma melhor percepção de sabores, notas e aromas que caracterizam a qualidade da bebida e auxilia na identificação de defeitos ou sabores indesejados (SCAA, 2015; TAVARES, 2016).

A Instrução Normativa nº 8, de 11 de junho de 2003, do Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece os parâmetros para a classificação de identidade e qualidade para o café beneficiado quanto aos

aspectos de aroma e sabor, conforme classificação é apresentada no Quadro 4. (BRASIL, 2003).

Quadro 4 – Classificação da bebida do café pelo sabor e pelo aroma

Bebidas Finas - Arábica	
Estritamente mole	café que apresenta, em conjunto, todos os requisitos de aroma e sabor “mole”, porém mais acentuado;
Mole	café que apresenta aroma e sabor agradável, brando e adocicado;
Apenas mole	café que apresenta sabor levemente doce e suave, mas sem adstringência ou aspereza de paladar;
Duro	café que apresenta sabor acre, adstringente e áspero, porém não apresenta paladares estranhos.
Bebidas Fenicadas - Arábica	
Riado	café que apresenta leve sabor, típico de iodofórmio;
Rio	café que apresenta sabor típico e acentuado de iodofórmio;
Rio Zona	café que apresenta aroma e sabor muito acentuado, assemelhado ao iodofórmio ou ao ácido fênico, sendo repugnante ao paladar.
Bebidas - Robusta	
Excelente	café que apresenta sabor neutro e acidez mediana;
Boa	café que apresenta sabor neutro e ligeira acidez;
Regular	café que apresenta sabor típico de robusta sem acidez;
Anormal	café que apresenta sabor não característico ao produto.

Fonte: Brasil, 2023.

De acordo com a COB os parâmetros exigidos a Instrução Normativa nº 8 são utilizadas para café commodities (BRASIL, 2003; SCA, 2019; PIMENTA, 2020). Na realização da análise sensorial há um protocolo que deve ser seguido, incluindo as etapas de equipamentos necessários, preparo da amostra, preparo para degustação e ainda as características da água a ser utilizada na avaliação (SCA, 2015).

O conhecimento mais acurado do *terroir* do café concomitante a novos hábitos de consumidores e apreciadores de cafés fazem com que estes se tornem cada vez mais exigentes, desse modo as buscas por qualidade aumentaram consideravelmente nesse setor, logo têm parâmetros mais exigentes, para além da produção de café commodities, precisaram emergir (BUITRON, 2019).

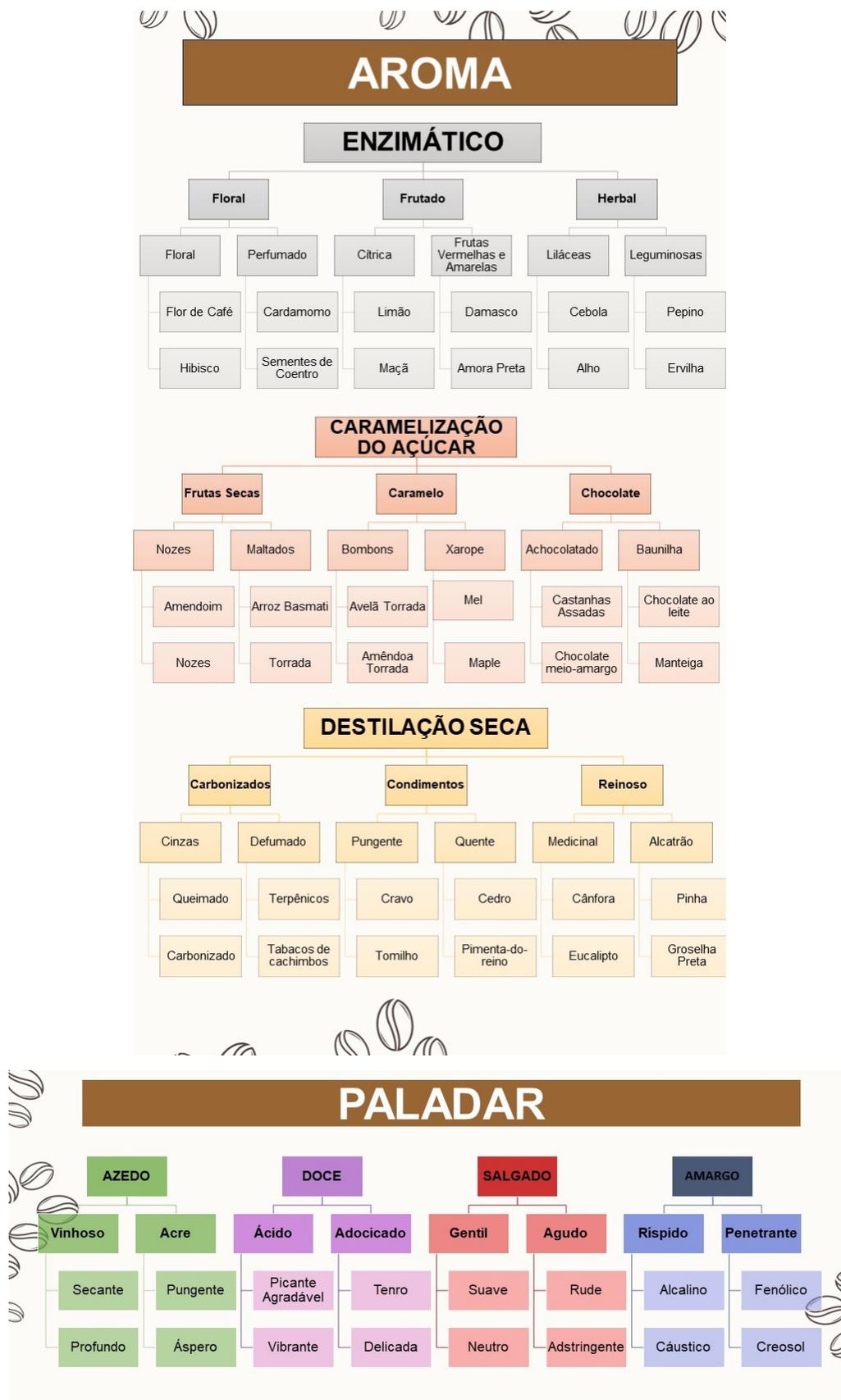
Na década de 80 surgiu, então, o termo “café especial” que foi suscitado pela SCA com o objetivo de aprofundar questões da qualidade e parâmetros para o comércio de cafés especiais. Atualmente, o SCA tem padrões para água, semente de café, torrefação, preparo do café e a prova de xícara (SCA, 2021). Essa classe de cafés é caracterizada por uma alta qualidade sensorial e ausência de defeitos, e por isso alcançam altos valores no mercado internacional. A qualidade da bebida

dos cafés especiais está intrinsecamente relacionada com a qualidade dos grãos, que origina a composição química pela interação genótipo, ambiente e processamento (MALTA et al, 2021; RAFAEL, 2020).

De acordo com a classificação estabelecida pela SCA, para um lote de café ser considerado especial, ele deve atender a três requisitos em três tipos de verificações, sendo duas de natureza física (amostra de grão cru [defeitos] e torrado [grãos Quackers]) e uma de natureza sensorial (SCA, 2021). Atualmente a associação conta com uma metodologia específica para a classificação destes cafés envolvendo uma pontuação que varia de 0 a 100 pontos. Cafés considerados especiais, devem ter pontuação acima de 80 quando avaliados seus atributos sensoriais (CÉSAR, 2021).

A SCA estabeleceu uma completa e consistente codificação para a definição e avaliação de café, introduzindo a chamada avaliação objetiva, que quantifica a qualidade do café através de uma escala que vai de zero a cem pontos. Essa qualidade codificada em números, caracteriza a bebida em relação a dez atributos, pontuados de 0 a 10: acidez, aroma, sabor, corpo, doçura, balanço, uniformidade, finalização, xícara limpa e qualidade geral. A soma das pontuações de cada atributo constitui a nota final do café em avaliação. De acordo com a pontuação final obtida, o café é classificado em especial ou não especial. São considerados cafés especiais aqueles que obtêm notas 90-100 (Excepcional), 85-89,99 (Excelente) e 80-84,99 (Muito Bom). Aos cafés que são atribuídos notas inferiores a 80 (abaixo da qualidade *Specialty*) são classificados como não especiais (CARDOSO et al., 2021; PIMENTA., 2020). De acordo com SCA os grupos de aromas e sabores são representados na Figura 3.

Figura 3 – Guia sensorial segundo SCAA entre aroma e paladar



Fonte: Adaptado de Revista Espresso (2014) pelo autor, jul. 2023.

Conforme representação, no que diz respeito ao aroma, são divididos em três grupos principais que consideram à sua natureza e velocidade de ataque (volatilidade). Cafés do grupo Enzimáticos apresentam notas mais voláteis, oriundas de processos enzimáticos e fermentativos que podem ocorrer durante o processo de maturação na planta ou imediatamente antes da secagem dos grãos. Os do grupo Caramelização do Açúcar são aromas com notas de volatilidade média, obtidos durante o processo de torra do café. Por sua vez, o agrupados na categoria Destilação Seca: aromas com notas de menor volatilidade, decorrentes do processo de torra do café em sua fase de pirólise e por fim os do grupo Defeitos apresentam aromas com notas de ampla gama de volatilidade que ocorrem por contaminações ou processos fermentativos indesejáveis (SCA, 2020).

2.7 Abelhas e sua influência na polinização e produção de café

A polinização é definida como o processo pelo qual o pólen se move das anteras masculinas para os estigmas femininos, seja dentro da mesma flor (autopolinização) ou entre plantas (polinização cruzada). Os polinizadores são os principais atores do processo de rendimento das culturas, uma vez que as plantas dependem de vetores para transferir seu pólen na polinização cruzada. Por exemplo, incorporar espécies de abelhas selvagens e manejadas em uma região pode aumentar a polinização cruzada. (SUKUMARAM; KHANDURI; SHARMA, 2020; GARCÍA-BREIJO, 2020).

A polinização desempenha um papel vital na manutenção do equilíbrio natural dos ecossistemas e é a pedra angular da produção agrícola, proporcionando um elo entre a agricultura e o ciclo da vida. Conseqüentemente, a polinização tem um desempenho no setor econômico devido à melhoria da qualidade e quantidade nas produções agrícolas (GIL *et al*, 2016).

Com efeito, a polinização das abelhas tem efeitos diretos na lucratividade e produtividade de uma quantidade substancial de variedades de culturas globais, incluindo a maioria das hortaliças, sementes e nozes, e alguns produtos agrícolas de alto valor como o café. Atualmente, 5 a 8% de toda a produção agrícola global seria perdida sem os serviços de polinização fornecidos pelas abelhas, exigindo

mudanças na dieta humana e a expansão de terras agricultáveis para resolver os déficits na produção agrícola (BREEZE et al, 2011).

As abelhas são consideradas polinizadores significativos devido à sua eficácia e ampla disponibilidade. A relação mutualística entre plantas e abelhas resulta da troca de néctar e pólen. As abelhas desempenham um papel vital na polinização das plantas, e as plantas secretam um rico açúcar líquido semelhante ao néctar de suas glândulas para atrair polinizadores para suas flores, de modo que o pólen possa aderir aos grãos de pólen coletados pelas abelhas (HUNG et al., 2018; Shin et al., 2019).

Os pesquisadores descobriram que as abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) parecem preferir culturas ricas em néctar e pólen para armazenar grandes quantidades de alimentos, sustentando assim o crescimento da colônia e melhorando o desempenho do forrageamento (GOSH; JEON; JUNG, 2020).

Globalmente, os serviços suplementares de polinização de culturas são predominantemente fornecidos por diversas espécies de abelhas, a saber, abelhas melíferas (*A. mellifera*) e, em menor grau, por algumas espécies de abelhas (por exemplo, *Bombus terrestris* L., *Bombus impatiens cresson* e *Bombus ignitus* Smith; Hymenoptera: *Apidae*) e abelhas sem ferrão (*Hymenoptera; Apidae; Meliponini*). No entanto, abelhas polinizadoras suplementares diferem em sua capacidade de polinizar diferentes culturas, e a implantação de uma espécie de abelha inadequada para uma determinada cultura reduz seus serviços de polinização (MACIAS-MACIAS et al. 2009; BENJAMIN; WINFREE 2014).

As abelhas sem ferrão contidas na fauna brasileira constituem cerca de 40 a 90% dos polinizadores em diversos ambientes. Os 60 a 10% restantes são polinizadas pelas abelhas solitárias, borboletas, besouros, morcegos, aves, alguns mamíferos, água, vento, e, recentemente, pelas abelhas africanizadas. Além disso as abelhas são consideradas espécies-chave na comunidade da floresta porque ajudam na ciclagem de nutrientes (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996).

Vale salientar que a capacidade de polinização das abelhas diferem-se, pois as preferências de abelhas solitárias distinguem-se das sociais. Espécies de abelhas sociais como *A. mellifera* e *Bombus spp* têm a capacidade de buscar alimento a quilômetros de distância do ninho, e estas têm predileção por grandes floradas. Em contrapartida, espécies solitárias como *Lasioglossum spp* se

deslocam por apenas algumas dezenas de metros para a coleta de pólen, e podem coletar tanto de flores esparsas como de grandes plantações; bem como ter preferência por determinadas espécies de plantas. Isso torna, por sua vez, as abelhas sociais mais performáticas ao trabalho de polinização, pelo número de indivíduos, e sua capacidade de cobrir áreas maiores (LINSLEY, 1958; BÄNSCH et al, 2021).

As abelhas e outros polinizadores ofertam uma contribuição significativa para a frutificação de *C. arabica*. Sua conservação pode, portanto, ser usado como uma estratégia para aumentar a produtividade e as receitas do café ao mesmo tempo em que fortalece a biodiversidade nas fazendas. Os habitats florestais com alta densidade podem ter efeitos positivos no sucesso da polinização biótica. Assim sendo, identificar e capitalizar as características que tornam alguns polinizadores mais adequados do que outros pode aumentar consideravelmente o rendimento e a qualidade das culturas cafeeiras.

O café arábica (*C. arabica*) podem se autopolinizar, mas os polinizadores bióticos melhoram a produtividade do café aumentando a frutificação, o tamanho dos frutos e o rendimento geral, com impactos diretos nas receitas. Relata-se que a produção aumenta de 10 a 30% em *C. arabica* L de frutos em *C. arabica* L., em comparação com autopolinização (HIPOLITO et al., 2018). Além da produção quantitativa, a polinização animal também pode melhorar a qualidade do café, medido pelo tamanho da baga, peso e xícara de café qualidade (CLASSEN et al., 2014)

As abelhas enfrentam muitos desafios que podem comprometer a viabilidade e sobrevivência de suas populações, tais como incêndios florestais, mudanças na exploração dos biomas e uso da terra, mudanças climáticas, pesticidas, stress humano induzido, subnutrição, poluição, perda de biodiversidade, agricultura intensiva e predadores como as vespas.

Assim, devido a preocupações com o declínio de abelhas domésticas e silvestres intensificaram a necessidade de encorajar o uso de polinizadores silvestres em terras agrícolas. Como as viagens de abelhas selvagens aumentaram com o desenvolvimento de habitats de abelhas de alta diversidade na paisagem circundante, a restauração de habitats de abelhas de alta diversidade é necessária para aumentar os níveis de polinização livre.

Como parte da crise global da biodiversidade, os insetos polinizadores e as funções do ecossistema que eles fornecem também estão cada vez mais ameaçadas. Uma preocupação atual é que uma perda contínua de abelhas (e talvez outras abelhas) possa prejudicar os serviços de polinização das culturas e, portanto, a produção agrícola em todo o mundo (KLEIN et al., 2007; POTTS et al., 2010). Em virtude disso, houve declínios documentados de abelhas em toda a Europa, América e China, particularmente nos últimos 50 anos (BARTOMEUS et al., 2013).

Nas últimas décadas, as florestas tropicais vêm sendo objeto de especial atenção quanto a estratégias de conservação por seus potenciais e também para a preservação de agentes polinizadores, especialmente as abelhas. Roubik (2002a, 2002b) levantou a hipótese de que as florestas tropicais fornecem habitats de alta qualidade para abelhas polinizadoras e que os rendimentos de *C. arabica* podem ser maiores perto habitats florestais.

2.8 As abelhas

Os registros fósseis mostram que as primeiras abelhas surgiram há 125 milhões de anos, nas regiões áridas do Oeste de Gondwana, onde as angiospermas se originaram (JAMIL NETO, 2006). O processo evolutivo pelo qual as abelhas passaram no transcurso do tempo, desde o aparecimento das flores até o presente, deu origem a milhares de espécies distintas. De 18.000 e 20.000 espécies de abelhas descritas em todo o mundo são conhecidas atualmente, e novas espécies são descritas continuamente, especialmente nas florestas tropicais e equatoriais das Américas, da África e da Ásia. Esses organismos são encontrados hoje em várias regiões áridas, semiáridas e não áridas do mundo (BOMFIM; OLIVEIRA; FREITAS, 2017 *apud* ANDRADE, 2021).

Do ponto de vista da classificação taxonômica esses insetos pertencentes ao filo dos Arthropoda, pertencem à classe Insecta, subclasse *Pterygogenea*, ordem *Hymenoptera*, subordem *Cristogastra*, superfamília *Apoidea*, família *Apidae*, subfamília *Apinae*; subdivididas ainda em aproximadamente 4 mil gêneros dentre os quais evidencia a tribo *Meliponi* com os gêneros: *Melipona*, *Trigonaimelitta* e *Lestrimelitta* (KEER, 1948 *apud* ANDRADE, 2021).

Dentre esses gêneros, as espécies são comumente divididas e conhecidas por uma característica fenotípica de fácil observação, a presença ou não de ferrão. Nos criadouros é mais comum a utilização da espécie de ferrão *Apis mellifera*, devido à sua produção abundante de mel e fácil adaptação, sendo presente em várias regiões do planeta. A denominação sem ferrão é devida ao fato de possuírem o ferrão atrofiado sendo, portanto, incapazes de ferroar.

As abelhas silvestres são encontradas em todo o mundo, mas apenas algumas sociedades humanas conseguiram manejar e manter abelhas para suas necessidades. Desde os tempos antigos, os seres humanos têm praticado apicultura para mel com abelhas locais. Nos tempos hodiernos, a apicultura tornou-se uma atividade global usando principalmente a abelha afro-europeia, *A. mellifera*. Das mais de 20.000 espécies de abelhas estimadas, apenas oito delas são as abelhas melíferas, com um total de 43 subespécies: *Apis cerana* (a abelha oriental); *Apis dorsata* (a abelha gigante); *Apis florea* (a abelha anã vermelha); *Apis andreniformis* (a abelha anã negra); *Apis koschevnikovi* (abelha de Koschevnikov); *Apis laboriosa* (abelha gigante do Himalaia); *Apis mellifera* (a abelha ocidental), e *Apis nigrocincta* (a abelha Filipina) (ROUBIK, 2021).

Desse modo, a presença das abelhas com ferrão (*A. mellifera*) nas Américas é relativamente recente. No Brasil, sua introdução ocorreu há, aproximadamente, duzentos anos. Até o século XIX, portanto, as abelhas sociais produtoras de mel que habitavam o território brasileiro eram estritamente as abelhas nativas pertencentes aos gêneros *Trigona* e *Telipona*, ou seja, denominadas. Assim o atual panorama dos apídeos do Brasil não foi o mesmo encontrado na América portuguesa durante o século XVI. (ROUBIK, 1989, p. 4-14 *apud* SANTOS; SILVA FILHO, 2013, p. 171).

Apesar de sua popularização no Brasil, essa espécie não é nativa do nosso país, foi trazida em 1839 pelo Padre Antônio Carneiro Aureliano, com a colaboração posterior de Paulo Barbosa e Sebastião Clodovil de Siqueira e Mello, em março de 1839, proveniente do Porto, Portugal. Mais tarde, em 1965, o Prof. Warwick Kerr trouxe um uma raça nova, *Apis mellifera scutellata*, para aumentar a produção de mel e colocar o Brasil no mapa dos maiores produtores a nível mundial (NOGUEIRA-NETO, 1997).

No Brasil o gênero *Melipona* tem especial importância. Atualmente existem mais de 500 espécies de abelhas sem ferrão em todo o mundo, porém, a literatura científica demonstra, que é no Brasil que se concentra a maior quantidade de meliponíneos do planeta, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país. Embora os animais de destaque no país englobem somente as espécies do gênero *Melipona*, não é descartada e não exequível a ideia da criação de abelhas sem ferrão de outros gêneros e espécies (Jamil Neto, 2006).

Os Meliponíneos (*Apidae: Meliponini*) são popularmente conhecidos como abelhas sem ferrão, também recebem a denominação de abelhas nativas e/ou abelhas indígenas (SILVEIRA et al., 2002; OLIVEIRA; RICHERS, 2019). Trata-se de um grupo com distribuição geográfica Pantropical, ou seja, que podem ser encontrados em todo território nacional, representando um recurso socioeconômico importante, dado ao seu valor para a conservação ambiental, merecendo atenção especial (CAMARGO; PEDRO, 2007). No Brasil, há mais de 400 espécies de meliponíneos descritas (SILVEIRA et al., 2002; PEDRO, 2014).

Esse gênero se caracteriza por espécies de abelhas com diversidades biológicas e adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais. Apresentam a vantagem de serem sociáveis, podendo ser criadas e domesticadas pelo homem, isto é, criação racional ou manejo (TEIXEIRA, 2007). É perceptível que entre as abelhas sem ferrão, o gênero *Melipona* é o de maior notoriedade, tendo em vista que os metabólitos produzidos por essas espécies têm possibilidade de aplicação na indústria farmacêutica e alimentícia, sendo conhecido pelo menos 40 espécies deste grupo (LIMA; SILVESTRE, 2017).

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), apesar de se ter a compreensão da existência de mais de 500 espécies de abelhas sem ferrão, apenas uma pequena quantidade destas são indicadas e propícias a meliponicultura. Sendo que as espécies frequentemente indicadas para a produção de mel são: *Melipona scutellaris*, *Melipona fasciculata*, *Melipona subnitida*, *Melipona manausensis*, *Melipona quadrifasciata* *Anthidioides* e *Tetragonisca angustula* (PEREIRA; SOUZA; LOPES, 2017).

Os meliponíneos possuem uma grande importância no ecossistema brasileiro. Essas abelhas são as principais responsáveis pela polinização da grande maioria dos biomas do país. Além disso seus produtos são industrializados e

comercializados sendo, conspícua sua contribuição comercial e o impacto financeiro. Existe, sobretudo, uma forte cultura popular do seu criatório e da apreciação de seus produtos. Lima e Santos (2010) em pesquisa com populações originárias brasileiras avaliaram a utilização e a aplicabilidade dos produtos da apicultura e relataram que 47% dos entrevistados utilizam méis para o tratamento de vários tipos de doenças, tanto respiratórias, quanto digestivas e até em lesão de pele. O Mel é empregado ainda na: medicina popular; medicina etnoveterinária; ritual místico/cosmológico e zooterapia; Cera; Artesanato; Defesa contra pragas e utilidade doméstico/profissional. Embora a Resina, o Ninho e a Geopropolis sejam recursos com menos versatilidade de uso, ainda assim são utilizados (PEDRO, 2014).

Diferente da apicultura, a meliponicultura é a criação de um grupo maior de abelhas que compreende todas as espécies das chamadas abelhas sem ferrão. Esse grupo possui cerca de 244 espécies descritas no Brasil até o ano de 2014, mas muitas outras espécies vêm sendo descritas a partir de então (NOGUEIRA et al., 2022; OLIVEIRA; MADELLA-AURICCHIO; FREITAS, 2020).

No Brasil, apesar da grande diversidade de abelhas como os meliponíneos, o polinizador manejado mais utilizado é a *A. mellifera* devido ao comportamento generalistas e a facilidade de manejo e reprodução (GIANNINI et al., 2020).

Quanto ao nível de socialização a evolução das espécies de abelhas traçam um itinerário compreendendo desde espécies não sociais (solitárias), Primitivamente sociais e altamente sociais (Eussociais), sendo esse fenômeno considerado uma das maiores transições evolutivas do comportamento zoológico. Os grupos Eussociais possuem várias características que os distinguem de outros grupos de indivíduos sociais, que incluem gerações sobrepostas dentro de uma sociedade, cuidados cooperativos com a ninhada e divisão do trabalho em grupos reprodutivos e não reprodutivos. Insetos eussociais, incluindo os das ordens *Hymenoptera* (formigas, abelhas e vespas) e *Blattodea* (cupins), estão entre os animais eussociais mais bem estudados (WILSON, 1971; WOODARD et al., 2011).

Do escopo de espécies abelhas descritas, estima-se que 78% das espécies tenham comportamento solitário. As espécies solitárias se distinguem das espécies sociais em praticamente todos os seus hábitos, cada ninho é composto por um indivíduo fêmea que é rainha e operária, realizando todas as obrigações da

colmeia. Ela quem constrói e protege o ninho, reproduz, busca alimento, dentre outras tarefas. Neste caso temos ninhos menores, apenas para abrigar a abelha responsável e sua ninhada, normalmente construídos em buracos no solo, na madeira, ou no caule de plantas (DANFORTH, 2002).

Considerando a importância dos estudos citogenéticos para taxonomia, filogenia, genética, sistemática, conservação e evolução estimativas do tamanho do genoma nuclear de abelhas (em picograma, pg) também foram registradas (POTTER; DEAKIN, 2018). Todavia, a variabilidade da contagem de cromossomos e a biologia do genoma dessas espécies são surpreendentes. Até o momento, cerca de 200 espécies de abelhas já foram cariotipadas, com números cromossômicos variando de $n = 3$ a $n = 28$, e tamanhos de genomas haploides nucleares estão disponíveis para aproximadamente 70 espécies com uma variação de $1C = 0,19$ pg a $1C = 1,38$ pg. O banco de dados Bee Chromosome foi estabelecido (www.bees.ufop.br) para depositar o conhecimento citogenético de Apidae reunindo todas as informações citogenéticas publicadas sobre abelhas (CUNHA et al, 2021).

Durante as análises cariotípicas de várias espécies de abelhas, Kerr (1972a, b) registrou o cromossomo haploide com número de $n = 15$ cromossomos nas espécies *Frieseomelitta varia*, *F. doederleini* e *F. ghilianii*. Estes diferem dos números de cromossomos determinados para outros gêneros menos relacionados, como $n = 9$ para *Melipona*, e $n = 17$, comum a vários outros gêneros de abelhas sem ferrão. No entanto, grupos intimamente relacionados com *Frieseomelitta* como gênero *Duckeola* também mostraram $n = 15$ cromossomos (KERR, 1972 a, b; SANTOS et al. 2018).

Em *Himenópteros* (formigas, abelhas e vespas), sociais e solitários, a partenogênese faz parte do ciclo de vida dessas espécies, no qual os machos se desenvolvem a partir de ovos não fertilizados, ou seja, via Partenogênese Arrenótoca (quando os óvulos desenvolvem apenas machos) (NORMARK 2003; KOOL et al., 2017). As fêmeas se desenvolvem a partir de ovos fertilizados e, portanto, são diploides (GERBER; KLOSTERMEYER, 1970). Em Telitoquia (quando o ovulo desenvolve apenas em fêmeas) e haplodiploidia confere aos machos a herdabilidade de um único conjunto de cromossomos de sua mãe, enquanto as fêmeas são diploides e herdam um conjunto de cromossomos de cada

genitor) geralmente coincidem em *Hymenoptera* e são frequentemente considerados sinônimos (CROZIER, 1975).

Deve-se mencionar que em *Hymenoptera* a Partenogênese Telitoque, isto é, a produção de filhas diploides de ovos não fertilizados, foi documentado em alguns táxons, incluindo *Cynipidae*, *Tenthredinidae*, *Aphelinidae*, *Ichneumonidae*, *Apidae* e *Formicidae* (revisado em Slobodchikoff e Daly, 1971; Suomalainen et al, 1987). A Partenogênese Telitoque é incomum no reino animal e sua ocorrência só fora relatada em cerca de 1500 espécies de *Hymenoptera* (WHITE, 1984).

Com o advento de marcadores genéticos moleculares altamente informativos para organismos não-modelos, tornou-se agora claro que a Partenogênese Telitoque, em combinação com haplodiploidia e eusociabilidade, resultou em vários resultados evolutivos peculiares específicos para os *Hymenoptera* eussociais. Por exemplo, as rainhas de algumas espécies podem colher simultaneamente os benefícios da clonalidade e da reprodução sexual, produzindo filhas rainhas partenogeneticamente e operárias sexualmente (FOURNIER et al, 2005; PEARCY et al., 2004; PEARCY; GOODISMANE; KELLER, 2011).

Não obstante, é preciso ponderar que em muitos *Hymenoptera* Eussociais, o desenvolvimento da fêmea depende da heterozigosidade em um ou mais loci determinantes de sexo. Isso restringe a evolução da telitoquia a mecanismos que preservam a heterozigosidade, pelo menos nos loci envolvidos na determinação do sexo. Em abelhas melíferas, e possivelmente em outros *Hymenoptera* Eussociais, a Partenogênese Telitoque em vez disso tenha um núcleo base genético (RABELING et al, 2013).

Conforme supracitado, as abelhas são insetos com inúmeras particularidades em seu comportamento, onde a grande maioria ainda carece de estudos mais específicos. Ainda sobre essas particularidades, ressalta-se que as abelhas têm uma relação de expectativa de vida/fertilidade diferente da maioria de outras espécies de insetos. Para essa maioria, quanto mais responsável pela fertilização, menor é a expectativa de vida do indivíduo. Já as abelhas se comportam de forma contrária, as operárias, que não tem responsabilidade de reprodução, tem um ciclo de vida de 3 a 6 semanas, enquanto as rainhas, que se dedicam quase que exclusivamente à reprodução, vivem por até 3 anos. Essa

condição ainda é pouco elucidada, principalmente por algo que chama atenção, que é o fato de ambas – operárias e rainhas – se desenvolverem de um mesmo genoma (PAGE; PENG, 2001).

Algumas espécies de abelhas são conhecidas e caracterizadas pelo tropismo e predileção pelo pólen de plantas específicas (MURRAY et al, 2009). Contudo a busca de pólen pelas abelhas não se dá a esmo, sendo classificadas em Monoléticas, Oligoléticas e Poliléticas (ROBERTSON, 1925).

As abelhas classificadas como Monoléticas coletam pólen de uma espécie específica de planta especificamente. As Oligoléticas coletam de duas espécies ou mais, porém de um mesmo gênero e as Poliléticas, que coletam pólen de mais de quatro gêneros de até duas famílias diferentes de plantas. Ultimamente essa classificação e conceituação foram trabalhados e atualizados por outros autores, que propuseram nova classificação, por exemplo uma em que as Mesoléticas coletam pólen de mais que quatro gêneros de plantas pertencentes a até três famílias diferentes, enquanto as Poliléticas coletariam em plantas de inúmeros gêneros e pelo menos quatro famílias diferentes (MULLER; KUHLMANN, 2008).

Além de características morfológicas das abelhas, o comportamento as diferencia e dá razão à diversos estudos sobre as espécies. O conceito de eussociabilidade dentro de espécies animais diz respeito, principalmente, a complexos tipos de comportamento, a tomada de decisão, por exemplo, dentro da comunidade ao formarem colmeias é um grupo de indivíduos da mesma espécie agindo de maneira sinérgica. Insetos Eussociais, como as abelhas configuram como exemplo perfeito desses sistemas complexos, contando com a divisão do trabalho entre unidades especializadas. Cada indivíduo depende do bem-estar e do desempenho efetivo do outro para sobreviver e, juntas, contribuem à dinâmica da colônia estruturada.

O número médio de abelhas em uma colmeia hígida varia de 5.000 a 65.000 e normalmente consiste em três tipos de castas adultas: a rainha, as operárias e as abelhas machos, conhecidas como zangões (ROUBIK, 2021). Os meliponíneos e as abelhas melíferas (*A. mellifera*) constituem o grupo das abelhas Eussociais avançadas, que se caracterizam por formarem ninhos perenes, com uma única fêmea fértil e ativa (a rainha), numerosas operárias que cuidam do ninho e machos reprodutivos (MICHENER, 1974).

A abelha rainha é a única fêmea ativamente fértil na colmeia e pode postular 2 mil ovos por dia, chegando a produzir 250.000 ovos por ano. As operárias é o maior número de indivíduos da colmeia. Essa classe é composta inteiramente de fêmeas estéreis, e serve como a coluna vertebral da colônia. Dois dias após sua metamorfose a abelha rainha realiza voos de reconhecimento e, em há cerca de sete dias realiza voos nupciais por quatro dias, onde é fertilizada por entre 10 e 17 Zangões. Ela coleta até 5 milhões de espermatozoides em sua Espermateca para produzir óvulos ao longo de sua vida (WENSELEERS et al., 2011).

Os Zangões, por sua vez, são responsáveis por fertilizar rainhas virgens durante seu voo nupcial e morrem rapidamente após o acasalamento. Nos meliponíneos após a cópula, a genitália do macho fica presa à da fêmea, obstruindo sua abertura genital, sendo removida após alguns dias. Esse mecanismo impede um novo acasalamento. Esse mecanismo garante variação genética suficiente na colmeia, preservando a diversidade genotípica, e possibilita seleção de características favoráveis ao longo de gerações. (PAXTON, 2005; CORTOPASSI-LAURINO, 2007; SANTOS et al., 2014).

A rainha postula ovos nas células apiárias e a emergência da larva se dá aproximadamente três dias após. As células de cria são fechadas com o alimento e ovo. Assim, o desenvolvimento ocorre todo nesta célula (ovo, larva, pré-pupa, pupa e adulto). De quatro a nove dias posteriores há a abertura das células e as fases de pupa e metamorfose para fase adulta compreende um processo que perdura de 10 a 23 dias. Dentro da colmeia, as tarefas são destinadas para as abelhas operárias de acordo com o estágio de vida do indivíduo. Enquanto isso segue um padrão relativamente flexível, as abelhas progredem de tarefas internas para aquelas fora da colmeia (VENTURIERI, 2008; ROUBIK, 2006; MICHENER, 2013).

O Polietismo etário, a mudança de função e atividade de trabalho desempenhado pelo indivíduo dentro da colônia, é robustamente bem estabelecido em várias espécies de abelhas Eussociais. Contudo, para que os padrões de desenvolvimento desse Polietismo temporal sejam robustos, o comportamento das abelhas operárias em várias espécies é flexível e pode ser acelerado, atrasado ou revertido em resposta às necessidades da colmeia. Fatores sociais, endócrinos,

neuroquímicos e genéticos implicam no controle do comportamento das abelhas operárias, embora a idade seja a variante preponderante (ROBINSON; 2002).

As abelhas mais jovens geralmente começam com a limpeza e tampagem das células (operárias do 1° ao 5° dia de vida – Faxineira). Daí em diante as abelhas operárias seguem, progressivamente, com o processo de amadurecimento e adequação das tarefas desempenhadas: 5° ao 10° dia de vida são chamadas operárias Nutrizes que se caracterizam por portarem glândulas hipofaríngeas bem desenvolvidas. Do 11° ao 20° dia de vida, são as Cerígenas, nesta fase produzem cera nas suas glândulas e manipulam cerume raspando as células de cria, constroem células de cria, participam no processo de postura e aprovisionam os alvéolos de cria. Entre o 18° ao 21° dia de vida são chamadas de Guardas e por fim, as operárias com mais de 21 dias, são classificadas como Forrageiras quando são responsáveis por atividades externas e saem para o campo em busca de pólen, néctar, barro, resina e água. Caso a rainha morra, a falta prolongada de sinais da rainha faz com que as castas falhem em realizar suas funções específicas e, eventualmente, leva à morte do colônia se ela não conseguir criar uma nova rainha. (SAKAGAMI, 1982; KERR et al., 1996).

Nas abelhas sociais, interações complexas entre a rainha, as operárias e a ninhada em desenvolvimento determinam a dieta larval e ambiente, que por sua vez influenciam o desenvolvimento e o tamanho final dos indivíduos. Em provisionadores progressivos, cuidando de adultos controlam dinamicamente a dieta larval e o horário de alimentação. A manifestação mais icônica do controle relacionado à dieta sobre o desenvolvimento em insetos sociais é o caso da geleia real pura de abelhas (*A. mellifera*), que determina se uma larva se desenvolve em uma rainha (maior) ou em uma operária.

A geleia real contém proteínas conhecidas como 'Major Royal Jelly Proteins (MRJPs), bem como moléculas bioativas adicionais que são produzidas nas glândulas hipofaríngeas de perárias e afetam os processos regulatórios que controlam o desenvolvimento larval. A MRJP-3 atua como uma proteína extracelular de ligação ao RNA que facilita a transferência de RNAs de operárias para larvas.

Tanto a rainha quanto as operárias podem controlar a dieta larval e a qualidade do cuidado, e isso pode ser influenciado por interações entre essas partes e com a ninhada. Por exemplo, em colônias de abelhas, tamanho do grupo

e feromônios da rainha afetam a decisão das operárias nutrizas de alimentar com geleia as larvas da fêmea como rainha ou como operária. As abelhas secretam feromônios específicos da casta para se comunicar.

A abelha rainha produz uma mistura complexa de feromônios auxiliando trabalhadores e zangões, conhecidos como rainha sinais. Por meio dessa comunicação química, ela regula mecanismos fisiológicos e comportamentais para manter condições estáveis dentro da colmeia, reforçam hierarquia e preservar a harmonia social. Isso envolve, por exemplo, regular as atividades das operárias e suprimindo a criação de novas rainhas. A exclusiva função dos feromônios da rainha cessa com a dinâmica degenerativa que se segue à sua morte acidental.

Fatores ambientais e sociais atuam em parte no Hormônio Juvenil (HJ) e nos ecdisteróides, que são os principais reguladores hormonais do tamanho do corpo e da determinação da casta em abelhas. Análises comparativas de transcriptomas de diferentes indivíduos, de diferentes espécies de abelhas correlacionaram dois genes que podem ser peças chave no processo de envelhecimento das abelhas, o gene da Vitelogenina (Vg), e o gene do Hormônio Juvenil (HJ) (KORB et al, 2021).

Mudanças alimentares e fisiológicas das abelhas operárias acompanham um padrão de decaimento de Vg e aumento de HJ. Esse padrão é chamado de modelo repressor duplo, onde altos níveis de Vg em operárias jovens é inibida e a síntese de HJ mantém níveis homeostáticos (ADAM et al, 2005). Durante a transição de abelha operária nutriz para operária forrageiras, que faz a cobertura em busca de alimento, há uma inversão nessa relação Vg/HJ, os níveis de HJ voltam a aumentar, enquanto a expressão de Vg é inibida (ELEKONICH et al, 2003), esse ciclo de controle e influenciado pela Vg e HJ responde alguns questionamentos sobre essa transição das abelhas operárias cuidadoras viajantes. Mas muito ainda necessita ser elucidado, principalmente pelo próprio comportamento de Vg e HJ nas diferentes espécies, dentro das abelhas por exemplo, HJ funciona como um hormônio gonadotrófico para o gênero *Bombus*, mas não em *Apis* (SHPIGLER et al, 2020).

A determinação da casta parece ser regulada, pelo menos em parte, por fatores epigenéticos, mas ainda não se sabe como essa regulação é conservada entre as espécies. A capacidade de algumas espécies de fazer a transição da casta não reprodutiva para a casta reprodutiva, estendendo uma vida útil várias vezes

maior do que a de um trabalhador normal é um fenômeno que demanda melhor elucidção do ponto de vista molecular. O fato é que mecanismos epigenéticos parecem regular a determinação de castas, envelhecimento, reprodução, comportamento e outras categorias em insetos Eussociais. (SIEBER et al, 2021).

Os mecanismos epigenéticos envolvem a modificação de histonas, como a adição de grupo acetil, grupo metil, grupo fosfato ou proteína ubiquitina conforme aponta Bannister (2011) bem como a adição de grupos laterais ao DNA, como na metilação, o processo de adição de um grupo metil a um nucleotídeo citosina (KLOSE, 2006). Essas modificações controlam a expressão gênica condensando e relaxando a cromatina, um complexo de DNA e proteínas histonas, alterando assim a acessibilidade dos genes para transcrição. Os RNAs não codificantes (ncRNAs), por exemplo, também desempenham papéis proeminentes no controle regulatório epigenético e na alteração da expressão gênica (CHUANG, 2007);

2.9 Os microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs não codificantes de 20 a 35 nucleotídeos de comprimento, endógenos, de fita simples, que desempenham patente influência na regulação gênica, envolvendo várias classes de pequenos RNAs, suas vias de processamento e sua atuação a nível celular em diferentes organismos eucariontes. (FOURACRE; POETHIG, 2016; KANG et al., 2014; WEN et al., 2014).

Esses pequenos RNAs podem ser divididos em categorias principais de acordo com sua origem, modo de processamento e associação com proteínas efetoras: os pequenos RNAs de interferência (siRNAs), pequenos RNAs de interferência com repetições associadas (rasiRNAs), pequenos RNAs de interferência que atuam em “trans” (tasiRNAs), pequenos RNAs de interferência anti senso naturais (natsiRNAs), RNAs que interagem com a proteína PIWI (piRNAs) e microRNAs (miRNAs). (ZHU et al., 2018; TREIBER et al., 2019).

Os siRNAs podem ser ainda dissociados em diferentes subcategorias, como siRNAs heterocromáticos (hc-siRNAs), siRNAs (phasiRNAs) e siRNAs ativados epigeneticamente (easiRNAs) (BORGES; MARTIENSSEN, 2015; ZHANG et al, 2016). Vale pôr em evidência que essas dessemelhantes categorias de pequenos

RNAs os diferenciam em processamento, tamanho e função celular (AXTELL, 2013; FOURACRE; POETHIG, 2016; WEN et al., 2014).

De acordo com sua localização no genoma, os miRNAs são classificados como intragênicos ou intergênicos. Os miRNAs intergênicos são localizados entre dois genes codificadores de proteínas e são transcritos como unidades independentes, enquanto os miRNAs intragênicos estão localizados em genes codificantes ou não codificantes e podem ainda ser subdivididos em relação a sua posição no gene (presente no íntron ou no éxon) e são transcritos a partir do íntron de seu gene hospedeiro (MILLAR; WATERHOUSE, 2005; BUDAK; AKPINAR, 2015).

Os principais representantes das classes de pequenos RNAs são os miRNAs, se destacando pelas suas diversas funções na regulação da expressão de RNAs mensageiros (RNAm) a nível celular entre a maioria dos eucariontes. Essa regulação pode ocorrer a partir da inibição do processo de tradução, por degradação do RNAm ou por silenciamento do gene, seja por complementaridade do alvo, ou sinalizando modificações no DNA em regiões específicas do genoma, influenciando o processo de expressão gênica em diferentes organismos (GOMES et al., 2009; RAO et al., 2009).

Os miRNAs, predominantemente, reprimem genes alvo de forma pós-transcricional. Eles medeiam o silenciamento de genes guiando as proteínas Argonautas (AGO) para os locais alvo na região 3' (UTR) não traduzida do miRNAs. Os AGOs constituem uma grande família de proteínas que usam pequenos ácidos nucleicos de fita simples como guias como sequências complementares em RNA ou DNA direcionados para silenciamento.

O AGO carregado com miRNA forma o módulo de direcionamento do complexo silenciador induzido por miRNA (miRISC), que promove a repressão e degradação da tradução de mRNAs alvo.

A biogênese de miRNA é um evento com várias etapas, até que o mesmo esteja apto a desempenhar sua função. Em sua via de processamento, atuam diferentes proteínas capazes de suscitar um miRNA específico com mecanismo de ação refinado e especificidade na regulação ao nível de genoma e/ou transcriptoma (AXTELL, 2013; DHIR; PROUDFOOT, 2013; KIM; HAN; SIOMI, 2009; LUCAS; RAIKHEL, 2012).

O processamento do miRNA, em animais, ocorre primeiramente no núcleo a partir da transcrição realizada pela RNA polimerase II (Pol II) no núcleo, resultando em um longo miRNA primário (pri-miRNA). A priori o transcrito de miRNA se dobra em uma estrutura de hairpin, sendo essa sua estrutura primária (pri-miRNA); em seguida há a primeira fase processiva onde o pri-miRNA sofre ação de uma RNase III (DROSHA), formando um miRNA precursor (pre-miRNA). Os pri-miRNA são clivados por um complexo que envolve a enzima RNase III de cadeia dupla (DROSHA) e a proteína de ligação DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8 protein) (RUBY et al., 2007). A DROSHA contém dois domínios de RNase III, cada qual cliva uma fita do RNA sintetizando o pré-miRNA com aproximadamente 70 pares de bases (pb). O pré-miRNA é exportado para o citoplasma pela HASTY (HST), homóloga da proteína Exportina-5 (XPO5), proteína presente dos animais, onde, então, é clivado pela DCL1 (BARTEL, 2004; BRODERSEN; VOINET, 2006; WAHID et al., 2010).

Considerava-se que essa molécula inicial, o pri-miRNAs, não possuía a capacidade de codificar nenhuma proteína. Entretanto, demonstrou-se que alguns pri-miRNAs codificam peptídeos que aumentam a produção de seus miRNAs (LAURESSERGUES et al., 2015)

O pré-miRNA possui uma estrutura secundária característica, formando um grampo (hairpin) a partir de uma complementaridade imperfeita, contendo de 200-300 nucleotídeos de comprimento. No citoplasma novamente as enzimas DCL1 e HYL1 atuam, clivando o pré-miRNA na extremidade que possui o hairpin, formando um miRNA/miRNA fita dupla, sendo, em seguida, metilado por uma metiltransferase HUA ENHANCER (HEN1), estabilizando a molécula e impedindo a sua uridilação e degradação posterior pelas exonucleases SDN (small RNA degrading nuclease) (BUDAK; AKPINAR, 2015; LI et al., 2005; YANG et al., 2006; KIDNER; MARTIENSSEN, 2005; WINTER et al., 2009).

Em plantas, o processo de geração dos miRNAs maduros, as enzimas RIBONUCLEASE III (RNase III), DICER-LIKE 1 (DCL1), associadas a outras enzimas, SERRATE (SE) e HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1), clivam o pri-miRNA, gerando o precursor de miRNA (pré-miRNA) (AXTELL; WESTHOLM; LAI, 2011; BUDAK; AKPINAR, 2015; JONES-RHOADES; KAPOOR et al., 2008; WAHID et al., 2010; WATERHOUSE; HELLENS, 2015).

O miRNA fita dupla (duplex de miRNA) metilado é, na sequência, carregado por um complexo de enzimas liderado pela ARGONAUTA (AGO), momento em que ocorre o desanelamento da fita dupla, sendo uma fita degradada e a outra direcionada, junto ao complexo RISC (do inglês, RNA induced silencing complex). Dentro do complexo RISC o duplex de miRNA é separado e apenas uma das fitas será dita como o miRNA maduro e irá desempenhar sua função uma vez que apenas uma fita se prestará ao reconhecimento específico de RNAm alvo, com a finalidade de regular a expressão gênica: por inibição da tradução ou degradação do RNAm (CHELOUFI et al, 2010; AXTELL, 2013; KAPOOR et al., 2008; PETERS; MEISTER, 2007; WINTER et al., 2009).

Postula-se, mais recentemente, evidências de que os miRNAs não se originam apenas de genes de miRNA, mas também são processados a partir de outros RNAs não codificantes, como snoRNAs e tRNAs (STAVAST, 2019).

Através de sua função de controle de expressão gênica, os miRNAs já têm sido citados como importantes reguladores de diversas funções em abelhas, como a diferenciação de castas (ASHBY et al, 2016). Liu et al, em 2019, descreveram um padrão de expressão gênica comparando abelhas macho, rainha e operárias, onde 19 miRNAs tiveram uma notória diferença no padrão de expressão. Já Chen et al, 2017, conseguiram estreitar a relação de miRNAs influenciando na postura de ovos e na ativação dos ovários, onde 81 miRNAs apresentaram diferentes expressões em rainhas virgens e rainhas já em postura de ovos, e 17 miRNAs com diferentes expressões em condições de inibição de postura de ovos e postura de ovos normal.

Em insetos em geral, miRNAs tem mostrado uma estreita relação de controle de Vg, logo, alterando a maturação de oócitos e a fertilidade. A ausência do miRNA-184 em *Drosophila* levou a perda de produção de ovos (IOVINO et al, 2009). O silenciamento de Vg em abelhas forrageiras promove alterações nos perfis de microRNAs do cérebro e corpo gorduroso. As abelhas que sofreram o silenciamento de Vg por RNAi apresentaram aumento na expressão de microRNAs que têm como alvo transcritos de enzimas que degradam HJ, como HJ esterase e HJ epóxido hidrolase. Ou seja, o silenciamento de Vg culmina na ativação de microRNAs que, provavelmente, promovem o aumento dos títulos de HJ (NUNES et al., 2013).

Estudo comparativo da expressão de miRNAs de cérebros em 12 genomas de 6 diferentes espécies de abelhas, eussociais e solitárias, demonstrou um contexto em que aproximadamente 35% dos miRNAs identificados eram espécie específicos. Além disso, o miRNA-305 foi identificado apenas nas espécies sociais, estando ausente nas solitárias (KAPHEIM et al, 2020). Outro estudo também caracterizou a atuação dos miRNAs no cérebro de abelhas *A. mellifera* correlacionando expressão dos mesmos quanto ao comportamento social e funções que desempenham na colmeia. Os microRNAs miR-31a, let-7, miR-279 e miR-275 estavam ativados no cérebro das abelhas jovens em comparação com as forrageiras, enquanto miR-13b, miR-133, miR-210, miR-278 e miR-92a estavam ativados em cérebros de forrageiras, se comparados a cérebros de abelhas jovens (LIU et al., 2012b).

Os MicroRNAs participam ainda da determinação de castas a partir da alimentação larval ao compor a geleia real. A geleia real é uma substância produzida nas glândulas mandibulares e hipofaringeanas de operárias jovens de abelhas do gênero *Apis* e oferecida como alimento para as larvas em desenvolvimento. demonstraram que a geleia real de duas espécies, *A. mellifera* e *A. cerana*, possuem microRNAs, mas com repertório e nível de expressão bem distintos. A geleia real de *A. mellifera* é mais rica que a de *A. cerana* tanto em relação ao número de famílias de microRNAs presentes quanto à abundância, sendo os mais expressos: bantam, miR-184, miR-14 e miR-252. Esse estudo destaca ainda que alguns microRNAs encontrados na geleia real (como let-7, miR-34, miR-375) também foram detectados no leite materno humano (SHI et al, 2012).

No entanto, várias partes destes genomas de diversas espécies de abelhas que atualmente já se encontram sequenciados e depositados em bancos de dados públicos necessitam ser profundamente estudados e anotados, diversas estratégias computacionais e experimentais têm sido utilizadas para identificação de miRNAs e as proteínas de seu processamento em vários organismos (HUANG et al., 2011; LI et al., 2010; ZHANG et al., 2005).

Nesse sentido, os métodos computacionais têm sido bastante utilizados na identificação de genes uma vez que alguns transcritos são expressos apenas em determinadas condições, em células específicas, ou são pouco expressos, sendo impossível sua identificação *in vitro*. Assim, as técnicas *in silico* auxiliam no

processo de descoberta de novos miRNAs, utilizando todas as informações contidas no genoma e/ou transcriptoma independentemente da amostragem. Além disso, esses métodos são úteis para a predição de precursores de miRNA e seus alvos. Contudo, muitos genes de miRNAs e seus alvos ainda não foram identificados em vários organismos, (LI et al., 2010; SRIVASTAVA et al., 2014; ZHANG et al., 2005). Diante disso, o estudo do genoma e transcriptoma de plantas e animais tem se tornado uma ferramenta muito poderosa para auxiliar na elucidação de processos biológicos bem como suas atuações a nível celular (AMBROS et al., 2003; SRIVASTAVA et al., 2014; ZHANG et al., 2005; ZHOU et al., 2008).

REFERÊNCIAS

- AFLITOS, S. et al. Exploring genetic variation in the tomato (*Solanum section Lycopersicon*) clade by whole-genome sequencing. **Plant Journal**, [s.l.], v. 80, n. 1, p. 136–148, 2014.
- AGRAWAL, N. et al. RNA Interference : Biology , Mechanism , and Applications. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 67, n. 4, p. 656–685, 2003.
- ALBA, A. E.; ELVIRA-MATELOT, E.; VAUCHERET, H. Gene silencing in plants: a diversity of pathways. **Biochimica et biophysica acta**, [s.l.], v. 1829, n. 12, p. 1300–1308, dez. 2013. DOI 10.1016/j.bbagr.2013.10.005.
- ALSEEKH, S. et al. Resolution by recombination: Breaking up *Solanum pennellii* introgressions. **Trends in Plant Science**, [s.l.], v. 18, n. 10, p. 536–538, 2013.
- AMBROS, V. et al. A uniform system for microRNA annotation A uniform system for microRNA annotation. **RNA - A Publication of the RNA Society**, [s.l.], v. 9, p. 277–279, 2003.
- AMBROS, V. MicroRNA pathways in flies and worms: Growth, death, fat, stress, and timing. **Cell**, [s.l.], v. 113, n. 6, p. 673–676, 2003.
- AMDAM, G.V. et al. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Exp. Gerontol.* 40, 939e947. 2005.
- AMDAM G.V., IHLE, K.E., PAGE, R.E. Regulation of honey bee (*Apis mellifera*) life histories by vitellogenin. In: PFAFF, D. et al. (eds.) **Hormones, brain and behavior**, 2. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2009.
- ARCILA-PULGARÍN, M.; OROZCO-CASTAÑO, F. Estudio morfológico del desarrollo del embrión em café. **Cenicafé**, Colombia, v. 38, p. 62-63, 1987.
- ASHBY, R et al. MicroRNAs in Honey Bee Caste Determination. *Sci Rep* 6, 18794. 2016.
- ÁVILA, S. **Caracterização do resíduo da torrefação e trituração do café**. 2017, 54 p. Monografia (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2017.
- AXTELL, M. J. Classification and comparison of small RNAs from plants. **Annual review of plant biology**, [s.l.], v. 64, p. 137–59, jan. 2013.
- AXTELL, M. J.; WESTHOLM, J. O.; LAI, E. C. Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. **Genome Biology**, [s.l.], v. 12, n. 4, p. 221, 2011.
- BAI, Y.; LINDHOUT, P. Domestication and breeding of tomatoes: What have we

gained and what can we gain in the future? **Annals of Botany**, [s.l.], v. 100, n. 5, p. 1085–1094, 2007.

BAICHOO, Z.; JAUFEEERALLY-FAKIM, Y. Identification and analysis of differentially expressed genes in Solanum lines in response to challenge with a Ralstonia solanacearum phylotype I strain. **Plant Gene**, [s.l.], v. 8, p. 1–8, 2016.

BARTEL, D. P. MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function Genomics : The miRNA Genes. **Cell**, [s.l.], v. 116, p. 281–297, 2004.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, [s.l.], v. 136, n. 2, p. 215–233, 2009.

BAUCHET, G.; CAUSSE, M. Genetic Diversity in Tomato (Solanum lycopersicum) and Its Wild Relatives. In ÇALIŞKAN, M. **Genetic diversity in plants**. França: IntechOpen, 2012, p. 133–162.

BEDINGER, P. A. et al. Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: Opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. **Sexual Plant Reproduction**, [s.l.], v. 24, n. 3, p. 171–187, 2011.

BENTWICH, I. Prediction and validation of microRNAs and their targets. **FEBS letters**, [s.l.], v. 579, n. 26, p. 5904–10, 31 out. 2005.

BERTHAUD, J.; CJARRIER, A. Genetic Resources of Coffeac. *In*: CLARK, R.; MACRAE, R. **Coffee: agronomy**. Paris: Elsevier Applied Science Publishers, 1988, p. 1-42.

BOLGER, A. et al. The genome of the stress-tolerant wild tomato species Solanum pennellii. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 46, n. 9, p. 1034–1038, 2014.

BÖNDEL, K. B.; NOSENKO, T.; STEPHAN, W. Signatures of natural selection in abiotic stress-responsive genes of Solanum Chilense. **Royal Society Open Science**, [s.l.], v. 5, n. 1, 2018.

BORRELLA, I.; MATAIX, C.; CARRASCO-GALLEGO, R. Smallholder farmers in the speciality coffee industry: opportunities, constraints and the businesses that are making it possible. **IDS bulletin**, v. 46, n. 3, p. 29-44, 2015.

BRANDO, C. Harvesting and Green Coffee Processing. *In*: Wintgens, J. (org.). **Coffe: growing, processing, sustainable production**. [s.l.]: Wiley. E-book. 2004, p. 604-715. DOI <https://doi.org/10.1002/9783527619627>.

BRODERSEN, P.; VOINET, O. The diversity of RNA silencing pathways in plants. **Trends in genetics :TIG**, [s.l.], v. 22, n. 5, p. 268–80, maio 2006.

BREED, M. D. and Stiller, T. M. Honey bee, Apis mellifera, nestmate discrimination: hydrocarbon effects and the evolutionary implications of comb choice. *Anim. Behav.* 43, 875-883. 1992.

BREED, M. D. Nestmate recognition in honey bees. *Anim. Behav.* 31, 86-91. 1983.

BREED, M. D., Butler, L. and Stiller, T. M. Kin discrimination by worker honey bees in genetically mixed groups. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 82, 3058-3061. 1985.

BREED, M. D.; WILLIAMS, K. R.; FEWELL, J. H. Comb wax mediates the acquisition of nest-mate recognition cues in honey bees. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 8766-8769. 1988.

BREED, M. et al. Comb wax effects on the ontogeny of honey bee nestmate recognition. *Anim. Behav.* V. 55, p. 13-20. 1998.

BUDAK, H.; AKPINAR, B. A. Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins. *Functional & integrative genomics*, [s.l.], v. 15, n. 5, p. 523–31, 2015.

CAGLIANI *et al.* Quantification of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. robusta in roasted and ground coffee blends. *Talanta*, [s.l.], v. 106, p. 169-171, mar. 2013. DOI <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.003>.

CALDERÓN E.; GUAMBI, D. **Guía técnica para producción y postcosecha del café Árabe**. 1. ed. Portoviejo: Conefac, 2014.

CAMARGO, A. M. et al. Desenvolvimento do sistema agroindustrial de tomate. *Informações Econômicas*, São Paulo, v. 36, n. 6, p. 53–65, jul. 2006.

CAMARGO, J.; PEDRO, S. Meliponini Lepeletier, 1836. In: MOURE, J. S. et al. (eds) **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia, p. 272-278, 2007.

CAMPOS, M. L. et al. Small and remarkable: The Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. *Plant Signal Behav*, [s.l.], v. 5, n. 3, p. 267–270, 2010.

CARDOSO, T. C. et al. Genome-wide identification and *in silico* characterisation of microRNAs, their targets and processing pathway genes in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Biology*, v. 18, n. 2, p. 206-219, ago. 2015. DOI doi: 10.1111/plb.12377.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, [s.l.], v. 136, n. 4, p. 642–655, fev. 2009.

CARVALHO, C. R. F. **Sustentabilidade e análise econômica da Tomaticultura De Cambuci-Rj**. 2014, 110 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuárias, Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos Goyatacazes, 2014.

CARVALHO, L. P.; ARGYROU, A.; BLANCHARD, J. S. Slow-onset Feedback Inhibition : Inhibition of Mycobacterium tuberculosis a-Isopropylmalate Synthase by L -Leucine. *J. AM. CHEM. SOC*, [s.l.], v. 127, p. 10004–10005, 2005.

CDD, N.-C. D. D. **Conserved Protein Domain Family lipoyl_domain**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi>>. Acesso em: 20 set. 2016.

CHADE, J. (2012, Abr. 18). **Tudo que cabe na xícara**. O Estado de S. Paulo. Recuperado de <http://www.estadao.com.br/noticias/geral,tudo-oque-cabe-na-xicara-imp-,4939>

CHELOUFI, S. et al. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. **Nature**, v.465, p. 584–589. 2010.

CHEN, X. MicroRNA Metabolism in Plants. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 320, p. 117–136, 2008.

CHEN, X. et al. Integration of lncRNA–miRNA–mRNA reveals novel insights into oviposition regulation in honey bees. **PeerJ**, n. 5:e3881. 2017.

CLEVES, R. Ecological Processing of Coffee and Use of Byproducts. *In*: Wintgens, J. (org.). **Coffe**: growing, processing, sustainable production. [s.l.]: Wiley. E-book. 2004, p. 716-730. DOI <https://doi.org/10.1002/9783527619627>.

CORTOPASSI-LAURINO, M. Drone congregations in Meliponini: what do they tell us? **Bioscience Journal**, [s.l.], v. 23, n. 1, p. 153-160, 2007.

DAVIS, A. *et al.* An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal**, [s.l.], v. 152, n. 4, dez. 2006, p. 465-512. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x>.

DARWIN, S. C. **The systematics and genetics of tomatoes on the Galápagos Islands (Solanum, Solanaceae)**. 2009. 261 p. Tese (Doutorado em Filosofia) – Departamento de Genética, Evolução e Meio Ambiente. University College London, Londres, 2009.

DARWIN, S. C.; KNAPP, S.; PERALTA, I. E. Taxonomy of tomatoes in the galápagos islands: Native and introduced species of solarium section lycopersicon (solanaceae). **Systematics and Biodiversity**, v. 1, n. 1, p. 29–53, 2003.

DANFORTH, B.N. Evolution of sociality in a primitively eusocial lineage of bees. **PNAS**, v.99, n.1, p. 286–290. 2002.

D'ETTORRE, P. et al. Wax combs mediate nestmate recognition by guard honeybees. **Anim. Behav.** v. 71, 773-779. 2006.

DHIR, A.; PROUDFOOT, N. J. Feed backwards model for microRNA processing and splicing in plants. **EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION: EMBO Reports**, v. 14, n. 7, p. 581–582, jul. 2013.

DOENCH, J. G.; PETERSEN, C. P.; SHARP, P. A. siRNAs can function as miRNAs. **Genes & development**, v. 17, n. 4, p. 438–442, 15 fev. 2003.

EIGENBRODE, S. D. et al. Topical Toxicity of Tomato Sesquiterpenes to the Beet Armyworm and the Role of These Compounds in Resistance Derived from an Accession of *Lycopersicon-Hirsutum* F. Typicum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 807–810, 1994.

ELEKONICH, M. M. et al. Larval juvenile hormone treatment affects pre-adult development, but not adult age at onset of foraging in worker honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Insect Physiology**, v. 49, p.359–366, 2003.

ENGELS, W. et al. Elsevier Science Publishers B.V. **Biomedical Division**, Netherlands, *Advances in invertebrate reproduction* 5, 1990, pp. 495-502.

ERCOLANO, M. R. et al. Genetic and genomic approaches for R-gene mediated disease resistance in tomato: Retrospects and prospects. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 6, p. 973–985, 2012.

FABBRI, A. et al. Numerical modeling of heat and mass transfer during coffee roasting process. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 105, p. 264-269, jul. 2011.

FADAI, N. *et al.* A heat and mass transfer study of coffee bean roasting international journal of heat and mass transfer. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, [s.l.], v. 104, p. 787-799, jan. 2017.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food outlook: biannual report on global food markets**. Rome: FAO, 2018. Disponível em: <https://www.fao.org/policy-support/tools-and-publications/resources-details/en/c/1169716/>. Acesso em: 5 jun. 2020.

FARAH, A., SANTOS T. The coffee plant and beans: an introduction. *In: PREEDY, V. (ed.), Coffee in health and disease prevention*. [s.l.]: Academic Press, 2014, p. 73-81

FERNANDEZ-POZO, N. et al. The Sol Genomics Network (SGN)-from genotype to phenotype to breeding. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. 1036–1041, 2015.

FOURACRE, J. P.; POETHIG, R. S. The role of small RNAs in vegetative shoot development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 29, p. 64–72, 2016.

FOURNIER, D. *et al.* Clonal reproduction by males and females in the little fire ant. **Nature Publishing Group**, [s.l.], v. 435, n. 35, p. 1230-1234, jun. 2005. DOI 10.1038/nature03705.

FREITAS, J. A. DE et al. Relações entre acilaçúcares, tricoma glandular e resistência do tomateiro à mosca branca. **Acta Scientiarum**, v. 24, p. 1313–1316, 2002.

GANDHI, M. **Guía para la innovación de la caficultura**: de lo convencional a lo orgánico. San Salvador: Catholic Relief Services CAFE Livelihoods, 2010.

GAPPER, N. E.; MCQUINN, R. P.; GIOVANNONI, J. J. Molecular and genetic regulation of fruit ripening. **Plant Molecular Biology**, v. 82, n. 6, p. 575–591, 2013.

GENTILE, A. G.; WEBB, R. E.; STONER, A. K. Lycopersicon and Solanum spp. resistant to the carmine and the two-spotted spider mite. **Journal of Economic Entomology**, v. 62, p. 834–836, 1969.

GERSZBERG, A.; HNATUSZKO-KONKA, K. Tomato (*Solanum Lycopersicum*) in the service of biotechnology. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, p. 881–902, 2015.

GEYER, K. K. et al. The anti-fecundity effect of 5-azacytidine (5-AzaC) on *Schistosoma mansoni* is linked to dis-regulated transcription, translation and stem cell activities. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 2, p. 213–222, 2018.

GHOSH, B. N.; GACANJA, W. A study of the shape and size of wet parchment coffee beans. **Journal of Agricultural Engineering Research**, Oxford, v.15, n. 2, p. 91-99, 1970.

GIOVANNONI, J. J. Genetic regulation of fruit development and ripening. **The Plant cell**, v. 16, p. 170–180, 2004.

GOFFREDA, J. C. et al. Aphid deterrence by glucose esters in glandular trichome exudate of the wild tomato, *Lycopersicon pennellii*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, n. 7, p. 2135–2147, 1989.

GOFFREDA, J. C.; STEFFENS, J. C.; MUTSCHLER, M. A. Association of Epicuticular Sugars with Aphid Resistance in Hybrids with Wild Tomato. **J. AMER. Soc. HORT. SCI.**, v. 115, n. 1, p. 161–165, 1990.

GOMES, M. S. et al. Preliminary analysis of miRNA pathway in *Schistosoma mansoni*. **Parasitology international**, v. 58, n. 1, p. 61–68, mar. 2009.

GONÇALVES, M. I. F. et al. Variation of 2-Tridecanone level in tomato plant leaflets and resistance to two mite species (*Tetranychus* sp.). **Euphytica**, v. 104, p. 33–38, 1998.

GONÇALVES NETO, Á. C. et al. Resistência à traça-do-tomateiro em plantas com altos teores de acilaçúcares nas folhas. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 203–208, 2010.

GORTON, L. **The Ecology of Solitary Bees**. Journal of agricultural Science. 1958.

GRANDILLO, S. et al. From Solanum sect. Lycopersicon. In: **Wild crop relatives: genomic and breeding resources**. [s.l.: s.n.]. v. 1p. 6718737.

GROH, C.; ROSSLER, W. Caste-specific postembryonic development of primary and secondary olfactory centers in the female honeybee brain. **National Library of Medicine**, [s.l.], v. 37, n. 6, p. 459-468, nov. 2008. DOI 10.1016/j.asd.2008.04.001.

GUIMARÃES, E. R.; CASTRO, L. G.; ANDRADE, H. C. C. de A terceira onda do café em Minas Gerais. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, Lavras, v. 18, n. 3, p. 214-227, 2016.

GURARIE, D. et al. The human-snail transmission environment shapes long term schistosomiasis control outcomes: Implications for improving the accuracy of predictive modeling. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 5, p. 1–19, 2018.

HAAPALAINEN, M. Biology and epidemics of Candidatus Liberibacter species, psyllid-transmitted plant-pathogenic bacteria. **Annals of Applied Biology**, v. 165, n. 2, p. 172–198, 2014.

HALAL, S. **Composição, processamento e qualidade do café**. 2008, 47 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química de Alimentos) – Faculdade de Ciências Domésticas, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

HAMOM, P *et al.* Coffea Genome Organization and Evolution. In: PREEDY, V. (org.) **Coffee in Health and Disease Prevention**. [s.l.]: Academic Press, 2015, p. 29-37.

HARTMANN, J. “Starbucks and the third wave”. *Coffee - Philosophy for Everyone: Grounds for Debate*, Wiley-Blackwell, p. 166-183, 2011.

HAWTHORNE, D. J. et al. Trichome-borne and artificially applied acylsugars of wild tomato deter feeding and oviposition of the leafminer *Liriomyza trifolii*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 65, n. 1, p. 65–73, 1992.

HEWLETT, S. E., WAREHAM, D. M., BARRON, A. B. Honey bee (*Apis mellifera*) sociability and nestmate affiliation are dependent on the social environment experienced post-eclosion. **J Exp Biol**. v. 221, n. 3, fev. 2018.

HOEVEN, R. S. et al. Biosynthesis and Elongation of Short- and Medium-Chain-Length Fatty Acids. **Plant Physiology**, v. 122, n. January, p. 275–282, 2000.

HUANG, Y. et al. The discovery approaches and detection methods of microRNAs. **Molecular biology reports**, v. 38, n. 6, p. 4125–4135, ago. 2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Ibge, p. 89, 2020

ICO – International Coffee Organization. Londres. Disponível em: <https://www.ico.org/>. Acesso em: 5 jun. 2023.

IOVINO, N.; PANE, A.; GAUL, U. miR-184 Has Multiple Roles in Drosophila Female Germline Development. **Developmental Cell**, v. 17, 2009.

JANSEN, G. A. **Coffee roastmagis-art-science physical and chemical reactions**. Munich: Corporate Media GmbH, 2006. 72 p.

JONES-RHOADES, M. W.; BARTEL, D. P.; BARTEL, B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. **Annual review of plant biology**, v. 57, p. 19–53, jan. 2006.

JUVIK, J. A. et al. Resistance among accessions of the genera *Lycopersicon* and *Solanum* to four of the main insect pests of tomato in Israel. **Phytoparasitica**, v. 10, n. 3, p. 145–156, 1982.

KAMAKURA, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. **Nature**, [s.l.], v. 473, p. 478-483, abr. 2011. DOI 10.1038/nature10093.

KAMENETZKY, L. et al. Genomic Analysis of Wild Tomato Introgressions Determining Metabolism- and Yield-Associated Traits. **Plant Physiology**, v. 152, n. 4, p. 1772–1786, 2010.

KANDRA, G.; SEVERSON, R.; WAGNER, G. J. Modified branched-chain amino acid pathways give rise to acyl acids of sucrose esters exuded from tobacco leaf trichomes. **Eur J Biochem**, v. 188, n. 2, p. 385–391, 1990.

KANG, Z. et al. Small RNA regulators in bacteria: Powerful tools for metabolic engineering and synthetic biology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 8, p. 3413–3424, 2014.

KAPHEIM, M.K., et al. Brain microRNAs among social and solitary bees. **Royal Society Open Science**, V. 7, n.7, 2020.

KAPOOR, M. et al. Genome-wide identification, organization and phylogenetic analysis of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA Polymerase gene families and their expression analysis during reproductive development and stress in rice. **BMC genomics**, v. 9, p. 451, jan. 2008.

KARKUTE, S. G. et al. Genome wide expression analysis of WRKY genes in tomato (*Solanum lycopersicum*) under drought stress. **Plant Gene**, v. 13, p. 8–17, 2018.

KERR, W.; CARVALHO, G.; NASCIMENTO, V. **Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte: Acangaú, 1996.

KEMSLEY, E.; RUAULT, S.; WILSON, R. Discrimination between *Coffea arabica* and *Coffea canephora* variant robusta beans using infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 54, n. 3, p. 321-326, jan. 1995. DOI [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00030-M](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00030-M).

KIDNER, C. A.; MARTIENSSEN, R. A. The developmental role of microRNA in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 8, n. 1, p. 38–44, fev. 2005.

KIM, H.-J. et al. In silico identification and characterization of microRNAs and their putative target genes in Solanaceae plants. **Genome**, v. 54, p. 91–98, 2011.

KIM, J. et al. Striking Natural Diversity in Glandular Trichome Acylsugar Composition Is Shaped by Variation at the Acyltransferase2 Locus in the Wild Tomato. **Plant Physiology**, v. 160, p. 1854–1870, 2012.

KIM, V. N. Sorting Out Small RNAs. **Cell**, v. 133, n. 1, p. 25–26, 2008.

KIM, V. N.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 10, n. 2, p. 126–139, fev. 2009.

KIMURA, S.; SINHA, N. Tomato (*Solanum lycopersicum*): A model fruit-bearing crop. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 3, n. 11, 2008.

KLATT, B.K. et al. Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. **Proc. R. Soc. B**.2812013244020132440.

KOBAYASHI, M. et al. Genome-wide analysis of intraspecific dna polymorphism in “micro-tom”, a model cultivar of tomato (*solanum lycopersicum*). **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 2, p. 445–454, 2014.

KOON, N.; SQUIRE, C. J.; BAKER, E. N. Crystal structure of LeuA from *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme in leucine biosynthesis. **PNAS**, v. 101, n. 22, p. 8295–8300, 2004.

KORB, J. et al. Comparative transcriptomic analysis of the mechanisms underpinning ageing and fecundity in social insects. **Phil. Trans. R. Soc. B** 376: 20190728. 2021.

KRAKER, J. DE; GERSHENZON, J. From Amino Acid to Glucosinolate Biosynthesis : Protein Sequence Changes in the Evolution of Methylthioalkylmalate Synthase in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 23, p. 38–53, 2011.

KROUMOVA, A. B.; WAGNER, Æ. G. J. Different elongation pathways in the biosynthesis of acyl groups of trichome exudate sugar esters from various solanaceous plants. **Planta**, p. 1013–1021, 2003.

KUCĚRA, L. et al. Study of composition of espresso coffee prepared from various roast degrees of *Coffea arabica* L. coffee beans. **Food Chem.**, v. 199, p.727–735, 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.12.080

LANDAU, E. *et al.* **Dinâmica da produção agropecuária e da paisagem natural no Brasil nas últimas décadas**: produtos de origem vegetal. Brasília: Embrapa, 2020.

LANG, Q. et al. Microarray-based identification of tomato microRNAs and time course analysis of their response to Cucumber mosaic virus infection. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 12, n. 2, p. 116–25, 2011.

LAURESSERGUES, D. et al. Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. **Nature**, v. 520, p. 90–93, 2015.

LECKIE, B. M.; HALITSCHKE, R. Quantitative trait loci regulating the fatty acid profile of acylsugars in tomato. **Mol Breeding**, v. 716, p. 1201–1213, 2014.

LEE, Y. S. et al. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. **Cell**, v. 117, n. 1, p. 69–81, 2004.

LEME, P. H. M. V. **Os pilares da qualidade**: o processo de implementação do programa de qualidade do café (PQC) no mercado de café torrado e moído do Brasil. 2007. 110 p. Dissertação (Mestrado em Administração) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

LEWIS, F. A., RICHARDS, C. S., KNIGHT, M., COOPER, L. A., & CLARK, B. *Schistosoma mansoni*: Analysis of an Unusual Infection Phenotype in the Intermediate Host Snail *Biomphalaria glabrata*. **Experimental parasitology**, v. 77, p. 349–361, 1993.

LI, A.; MAO, L. Evolution of plant microRNA gene families. **Cell research**, v. 17, n. 3, p. 212–8, mar. 2007.

LI, J. et al. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. **Current Biology**, v. 15, n. 16, p. 1501–1507, 2005.

LI, L. et al. Computational approaches for microRNA studies: a review. **Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society**, v. 21, n. 1–2, p. 1–12, fev. 2010.

LIU, W., WANG, X. Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data. **Genome Biol**, v. 20, n.18. 2019.

LUCA, S. et al. Characterization of the effects of different roasting conditions on coffee samples of different geographical origins by HPLC-DAD, NIR and chemometrics. **Microchemical Journal**, v. 129, p. 348–361, 2016. DOI: 10.1016/j.microc.2016.07.021

LUCAS, K., RAIKHEL, A.S. Insect microRNAs: biogenesis, expression profiling and biological functions. **Insect Biochem Mol Biol.** v. 43, n.1, p. 24-38, jan. 2013.

LUKYANENKO, A. N. Disease Resistance in Tomato. **Monographs on Theoretical and Applied Genetics**, v. 18, p. 99–119, 1991.

MALAVOLTA, E. **História do café no Brasil**: agronomia, agricultura e comercialização. São Paulo: Ceres, 2000. 464 p.

MALUF, W.; BARBOSA, L.; SANTA-CECÍLIA, L. C. 2-Tridecanone-mediated mechanisms of resistance to the South American tomato pinworm *Scrobipalpaloides absoluta*. **HortScience**, v. 31, n. 4, p. 599, 1997.

MALUF, W. R.; CAMPOS, G. A.; CARDOSO, M. G. Relationships between trichome types and spider mite (*Tetranychus evansi*) repellence in tomatoes with respect to foliar zingiberene contents. **Euphytica**, [s.l.], v. 121, n. 1, p. 73–80, 2001.

MALLORY, A. C.; VAUCHERET, H. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. **Nature genetics**, v. 38, n. June, p. 31–37, 2006.

MANZO, J. " Third-Wave" Coffeehouses as Venues for Sociality: On Encounters between Employees and Customers. **Qualitative Report**, v. 20, n. 6, 2015.

MAPA – Ministério Da Agricultura E Pecuária. **Café no Brasil e Ementário do café**, Brasília, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira>. Acesso em: 21 fev. 2022.

MARQUETI, I. *et al.* Partial least square with discriminant analysis and near infrared spectroscopy for evaluation of geographic and genotypic origin of arabica coffee. **Computers and Electronics in Agriculture**, [s.l.], v. 121, p. 313-319, fev. 2016. DOI <https://doi.org/10.1016/j.compag.2015.12.018>.

MARTÍNEZ, J. P. *et al.* Effects of saline water on water status, yield and fruit quality of wild (*solanum chilense*) and domesticated (*solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) tomatoes. **Experimental Agriculture**, [s.l.], v. 48, n. 4, p. 573–586, 2012.

MASUDA, H; OLIVEIRA, P. L. Characterization of vitellin and vitellogenin from *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochem**, v. 15, p. 543-550. 1985.

MCDANIEL, T. *et al.* Novel resistance mechanisms of a wild tomato against the glasshouse whitefly. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 36, n. 1, p. 1–11, 2016.

MCDOWELL, E. T. *et al.* Comparative Functional Genomic Analysis of *Solanum Glandular Trichome Types 1* [W][OA]. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 155, p. 524–539, jan. 2011.

MCGOVERN, R. J. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. **Crop Protection**, [s.l.], v. 73, p. 78-92, jul. 2015. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.021>.

MCMANUS, D. P. et al. Schistosomiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 1–19, 2018.

MELO, W. L. B. **A importância da informação sobre o grau de torra do café e suas características organolépticas da bebida**. São Carlos: EMBRAPA, 2004. 4 p. (Comunicado Técnico, 58).

MICHENER, C. The Meliponini. In: VIT, P.; PEDRO, S.; ROUBIK, D. (orgs.). **Pot-Honey: um legacy of stingless bees**. New York: Springer, p. 3-17, 2013.

MICHENER, C. D. **The Social Behaviour of Bees**. Cambridge, Massachusetts, USA: Harvard University Press, 1974.

MITTOVA, V.; VOLOKITA, M.; GUY, M. Antioxidative Systems and Stress Tolerance: Insight from Wild and Cultivated Tomato Species. **Signaling and Communication in Plants**, [s.l.], v. 23, n. 1, 2015.

MOAZED, D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. **Nature**, [s.l.], v. 457, n. 7228, p. 413–420, 22 jan. 2009.

MOHAMMED, K. et al. A Multivariate Analysis on the Assessment of Risk Factors Associated with Infections and Transmission of Schistosomiasis Haematobium in Some Selected Areas of North-Western, Nigeria. **Journal of Medical and Bioengineering**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 7–11, 2015.

MONTEIRO, C. S. et al. Qualidade Nutricional E Antioxidante Do Tomate “ Tipo Italiano ”. **Alim. Nutr.**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 25–31, 2008.

MOONEY, B. P.; MIERNYK, J. A.; RANDALL, D. D. The complex fate of α -ketoacids. **Annu. Rev. Plant Biol.**, [s.l.], v. 53, p. 357–375, 2002.

MOUAHID, G. et al. Transplantation of schistosome sporocysts between host snails: A video guide. **Wellcome Open Research**, [s.l.], v. 3, p. 1–8, 2018. DOI <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.13488.1>.

MUINHOS, R. **Desenvolvendo um perfil de torra**. Buena Vista Café, 01 de janeiro de 2018b. Disponível em: <https://buenavistacafe.com.br/blog/2018/01/01/desenvolvendo-um-perfil-de-torra/>. Acesso em 01 de ago. de 2022.

MÜLLER, A.; KUHLMANN, M. Pollen hosts of western palaeartic bees of the genus *Colletes* (Hymenoptera: Colletidae): the Asteraceae paradox. **Biological Journal of the Linnean Society**, [s.l.], v. 95, n. 4, p. 719-733, dez. 2008. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2008.01113.x>.

MURRAY, T.; KUHLMANN, M.; POTTS, S. Conservation ecology of bees: populations, species and communities. **Apidologie**, [s.l.], v. 40, p. 211-236, fev. 2009. DOI <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2009015>.

MURTHY, P.; NAIDU, M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - a review. **Resources, Conservation and Recycling**, [s.l.], v. 66, p. 45-58, set. 2012.

MUSSATO, S. *et al.* Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. **Food Bioprocess Technol**, [s.l.], v. 4, p. 661-672, mar. 2011. DOI 10.1007/s11947-011-0565-z.

NAIKA, S. *et al.* **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização**. Wageningen: Agromisa, 2006.

NASCIMENTO, P. **Estudo da composição química, atividade antioxidante e potencial odorífico de um café conillon, em diferentes graus de torrefação e análise comparativa com café arábica**. 2006, 103 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

NING, J. *et al.* A Feedback-Insensitive Isopropylmalate Synthase Affects Acylsugar Composition in Cultivated and Wild Tomato. **Plant Physiol**, v. 169, p. 1821–1835, 2015.

NELWAN, M. L. Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control. **Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental**, v. 91, n. 24, p. 5–9, 2019.

NOSENKO, T. *et al.* Adaptation to low temperatures in the wild tomato species *Solanum chilense*. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 25, n. 12, p. 2853–2869, 2016.

NOWICKI, M. *et al.* Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: An overview of pathology and resistance breeding. **Plant Disease**, [s.l.], v. 96, n. 1, 2012.

NUNES, F.M.F. *et al.* The gene vitellogenin affects microRNA regulation in honey bee (*Apis mellifera*) fat body and brain. **J Exp Biol**, v. 216, n. 19, p. 3724–3732, out. 2013.

NUÑES, N. *et al.* High-performance liquid chromatography with fluorescence detection fingerprints as chemical descriptors to authenticate the origin, variety and roasting degree of coffee by multivariate chemometric methods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s.l.], v. 101, n. 1, p. 65-71, jan. 2021. DOI <https://doi.org/10.1002/jsfa.10615>.

OLIVEIRA, F.; RICHERS, B.. As abelhas nativas “sem ferrão” (Hymenoptera, Anthophila, Meliponini) e sua importância para a conservação ambiental. In: NASCIMENTO, A. *et al.*, (orgs.). **Sociobiodiversidade da Reserva de**

Desenvolvimento Sustentável Amanã (1998-2018): 20 anos de pesquisa.
Manaus: IDSM, p. 352, 2019.

PAGE, R; PENG, C. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. **National Library of Medicine**, [s.l.], v. 36, n. 4, p. 695-711, abr. 2001. DOI 10.1016/s0531-5565(00)00236-9.

PAXTON, R. Male mating behaviour and mating systems of bees: an overview. **Apidologie**, [s.l.], v. 36, p. 145-156, 2005.

PEARCY, M. *et al.* Conditional use of sex and parthenogenesis for worker and queen production in ants. **Science**, [s.l.], v. 306, n. 5702, p. 1780-1783, dez. 2004. DOI <https://doi.org/10.1126/science.1105453>.

PEARCY, M; GOODISMANE, M; KELLER, L. Sib mating without inbreeding in the longhorn crazy ant. **The Royal Society Publishing**, [s.l.], v. 278, n. 1718, fev. 2011. DOI <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2562>.

PERALTA, I. E.; SPOONER, D. M.; KNAPP, S. Taxonomy of tomatoes: a revision of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*) and their outgroup relatives in sections *Juglandifolia* and *Lycopersicoides*. **Systematic Botany Monographs**, [s.l.], v. 84, p. 1-186, 2008.

PERALTA, I. E.; KNAPP, S.; SPOONER, D. M. New Species of Wild Tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: *Solanaceae*) from Northern Peru. **Systematic Botany**, [s.l.], v. 30, n. 2, p. 424-434, 2005.

PEREZ-FONS, L. *et al.* A genome-wide metabolomic resource for tomato fruit from *Solanum pennellii*. **Scientific reports**, [s.l.], v. 24, n. 4. p. 3859, jan 2014. DOI 10.1038/srep03859.

PETERS, L.; MEISTER, G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. **Molecular Cell**, [s.l.], v. 26, n. 5, p. 611-623, jun. 2007.

PIRES, C.S.S *et al.* Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.51, n.5, p.422-442, maio 2016.

POISSON, L. *et al.* New insight into the role of sucrose in the generation of α -diketones upon coffee roasting. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 66, p. 2422-2431, 2017.

QU, Z. *et al.* Juvenile hormone and sesquiterpenoids in arthropods: Biosynthesis, signaling, and role of MicroRNA. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 184, p. 69-76, 2018.

RABELING, C; KRONAUER, D. Thelytokous parthenogenesis in eusocial Hymenoptera. **National Library of Medicine**, [s.l.], v. 58, n. 1, p. 273-292, out. 2005. DOI 10.1146/annurev-ento-120811-153710.

- RATNIEKS, F. L. W. Wax combs mediate nestmate recognition by guard honeybees. **Anim. Behav**, v. 71, p. 773-779. 2006.
- RAO, D. D. et al. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 61, n. 9, p. 746–59, jul. 2009.
- RAZALI, R. et al. The Genome Sequence of the Wild Tomato *Solanum pimpinellifolium* Provides Insights Into Salinity Tolerance. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 9, p. 1–21, out. 2018.
- RESENDE, J. T. et al. Acylsugars in tomato leaflets confer resistance to the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta* Meyr. **Scientia Agricola**, [s.l.], v. 63, n. 1, p. 20–25, 2006.
- RICHARDS, C. S. Genetics of Molluscan Vector of Schistosomiasis. **Nature**, [s.l.], v. 228, p. 726–734, 1970.
- RICHARDS, C. S.; SHADE, P. C. The genetic variation of compatibility in *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*. **Journal of Parasitology**, [s.l.], v. 73, n. 6, p. 1146–1151, 1987.
- RICK, C. M.; TANKSLEY, S. D. Genetic variation in *Solanum pennellii*: Comparisons with two other sympatric tomato species. **Plant Systematics and Evolution**, [s.l.], v. 139, n. 1–2, p. 11–45, 1981.
- RISIKAT, S. A.; AYOADE, A. A. Correlation analysis between the prevalence of schistosoma haematobium and water conditions : A Case Study among the School Pupils in Southwestern Nigeria. **International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 160–165, 2012.
- ROBERTSON, C. Heterotrophic Bees. **Ecology**, [s.l.], v. 6, n. 4, p. 412-436, out. 1925. DOI <https://doi.org/10.2307/1929107>.
- ROBINSON, G. Genomics and integrative analyses of division of labor in honeybee colonies. **National Library of Medicine**, [s.l.], v. 6, n. S160, p. 160-172, dez, 2002. DOI 10.1086/342901.
- RODARTE, M. P. **Análise sensorial, química e perfil de constituintes voláteis de cafés especiais**. 2008. 163 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- RONEN, G. et al. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. **Plant Journal**, v. 17, n. 4, p. 341–351, 1999.
- ROUBIK D., VERGARA C. Geographic distribution of bees: a history and an update. In FAO. **Good Bee Keeping Practices for Sustainable Apiculture**.

Rome: Food Agric. Organ. U. N, p. 11–14, 2021.

RUBY, J. G. et al. Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. **Genome Research**, v. 17, n. 12, p. 1850–1864, 2007.

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

SAKAGAMI, S. Stingless bees. *In*: HERMANN H. (ed.). **Social Insects**. v. 3. New York: Academic Press, p. 361-423, 1982.

SANTOS, C. et al. Sites congregation sites and sleeping roost of male stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, [s.l.], v. 61, n. 1, p. 115-118, 2014.

SANZ, C. *et al.* Profiles of volatile compounds and sensory analysis of three blends of coffee: influence of different proportions of Arabica and Robusta and influence of roasting coffee with sugar. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s.l.], v. 82, n. 8, p. 840-847, jun. 2002. DOI <https://doi.org/10.1002/jsfa.1110>.

SATO, S.; TABATA, S.; HIRAKAWA, H. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature**, v. 485, n. 7400, p. 635–641, 2012. DOI 10.1038/nature11119.

SCA - Specialty Coffee Association Of America, 2020. DISPONÍVEL EM: <http://www.scaa.org>. Acesso: 14 fev. 2021

SCHILMILLER, A. L. et al. Functionally Divergent Alleles and Duplicated Loci Encoding an Acyltransferase Contribute to Acylsugar Metabolite Diversity in *Solanum Trichomes*. **The Plant Cell**, v. 27, p. 1002–1017, 2015.

SCHILMILLER, A. L.; CHARBONNEAU, A. L.; LAST, R. L. Identification of a BAHD acetyltransferase that produces protective acyl sugars in tomato trichomes. **PNAS**, v. 109, n. 40, p. 16377–16382, 2012.

SHAPIRO, J. A.; STEFFENS, J. C.; MUTSCHLER, M. A. Acylsugars of the Wild Tomato *Lycopersicon pennellii* in relation to geographic distribution of the species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22, n. 6, 1994.

SHUJA, A. et al. Intestinal Schistosomiasis: A Rare Cause of Abdominal Pain and Weight loss. **Cureus**, v. 10, n. 1, p. 1–4, 2018.

SILVA, E. **Coffee (*Coffea arábica* cv. Rubi) seed germination: mechanism and regulation**. 2002, 105p. Tese (Doutorado) – Wageningen University, Wageningen, 2002. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/40172310_Coffee_Coffea_arabica_cv_Rubi_seed_Rgermination_mechanism_and_regulation. Acesso em: 12/10/2021.

SILVA, V. D. *et al.* Resistência a artrópodos-pragas em genótipos de tomateiro ricos em zingibereno e/ou acilaçucares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 9, p. 1262-1269, set. 2009.

SIOMI, M. C.; SIOMI, H. Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. **Nucleic acids symposium series (2004)**, v. 105, n. 52, p. 59–60, 2008.

SLOCOMBE, S. P. *et al.* Transcriptomic and Reverse Genetic Analyses of Branched-Chain Fatty Acid and Acyl Sugar Production in *Solanum pennellii* and *Nicotiana benthamiana* 1 [W] [OA]. **Plant Physiology**, v. 148, p. 1830–1846, dez. 2008.

SOMPORN, C *et al.* Effects of roasting degree on radical scavenging activity, phenolics and volatile compounds of Arabica coffee beans (*Coffea arabica* L. cv. Catimor). **Food Sci. Technol.**, v. 46, p. 2287–2296, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2011.02748.x.

SPOONER, D.; PERALTA, I. E.; KNAPP, S. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes. **Taxon**, v. 54, n. 1, p. 43–61, 2005.

SRIVASTAVA, P. K. *et al.* A comparison of performance of plant miRNA target prediction tools and the characterization of features for genome-wide target prediction. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 348, jan. 2014.

STAM, R. *et al.* The de Novo Reference Genome and Transcriptome Assemblies of the Wild Tomato Species *Solanum chilense* Highlights Birth and Death of NLR Genes Between Tomato Species. **G3**, v. 9, p. 3933–3941, 2019.

STAM, R.; SCHEIKL, D.; TELLIER, A. The wild tomato species *Solanum chilense* shows variation in pathogen resistance between geographically distinct populations. **PeerJ**, v. 2017, n. 1, 2017.

STEPHENSON, L. The impact of schistosomiasis on human nutrition. **Parasitology**, v. 107, n. S1, p. S107–S123, 1993.

STEVENS, M. A.; RICK C. M. Genetics and Breeding. **Science**, New York, v. 37, n. 954, p. 35–100, 1986.

STRICKLER, S. R. *et al.* Comparative genomics and phylogenetic discordance of cultivated tomato and close wild relatives. **PeerJ**, v. 3, n. 793, p. 1–19, 2015.

SØVIK, E.; BLOCH, G.; BEM-SHAHAR, Y. Function and evolution of microRNAs in eusocial Hymenoptera. **Frontiers in Genetics**, [s.l.], v. 6, n. 193, p. 1-11, maio 2015. DOI <https://doi.org/10.3389%2Ffgene.2015.00193>.

SUSANTA K.; BEHURA. Insect microRNAs: Structure, function and evolution. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, 2007.

SZATHMÁRY, E., SMITH, J. The major evolutionary transitions. **Nature**, n. 374, p. 227–232, 1995.

TABAEIZADEH, Z. et al. Transgenic tomato plants expressing a *Lycopersicon chilense* chitinase gene demonstrate improved resistance to *Verticillium dahliae* race 2. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 2, p. 197–202, 1999.

TAYLOR, N. L. et al. Lipoic Acid-Dependent Oxidative Catabolism of α -Keto Acids in Mitochondria Provides Evidence for Branched-Chain Amino Acid Catabolism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 134, p. 838–848, 2004.

TOBE, S.S., BENDENA, W.G. The regulation of juvenile hormone production in arthropods: functional and evolutionary perspectives. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 897, p. 300–310, 1999.

VAN ZWEDEN, J. S.; D'ETTORRE, P. Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons. In **Insect hydrocarbons Biology, Biochemistry and Chemical Ecology** (ed. G. J. Blomquist and A.G. Bagnères), pp. 222-243. 2010.

VANENGELSDORP, D. et al. **Colony collapse disorder: a descriptive study**. PLoS One. 2009.

VENTURIERI, G. **Criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2008.

VIDIGAL, J. A.; VENTURA, A. The biological functions of miRNAs: Lessons from in vivo studies. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 3, p. 137–147, 2015.

VERLAAN, M. G. et al. The Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Genes Ty-1 and Ty-3 Are Allelic and Code for DFDGD-Class RNA-Dependent RNA Polymerases. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 3, 2013.

VIANA, M. et al. The effects of subcurative praziquantel treatment on life-history traits and trade-offs in drug-resistant *Schistosoma mansoni*. **Evolutionary Applications**, v. 11, n. 4, p. 488–500, 2018.

VIEIRA, L. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 95-108, mar. 2006. DOI <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100008>.

VIGNOLI, J. A. et al. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. **Food Res. Int.**, v. 61, p.279–285, 2014. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.06.006

XIA, H. et al. Nucleotide diversity patterns of local adaptation at drought-related candidate genes in wild tomatoes. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 19, p. 4144–4154, 2010.

WAHID, F. et al. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1803, n. 11, p. 1231–1243, nov. 2010.

WALTERS, D. S.; STEFFENS, J. C. Branched Chain Amino Acid Metabolism in the Biosynthesis of Lycopersicon penneiii Glucose Esters. **Plant Physiol**, v. 93, p. 1544–1551, 1990.

WARD, A.; WEBSTER, M. **Mechanisms: Social Recognition and Social Organisation**. 10.1007/978-3-319-28585-6_2. 2016.

WATERHOUSE, P. M.; HELLENS, R. P. Plant biology: Coding in non-coding RNAs. **Nature**, v. 520, n. 7545, p. 41–42, 2015.

WEN, J. et al. Diversity of miRNAs, siRNAs, and piRNAs across 25 Drosophila cell lines. **Genome Research**, v. 24, n. 7, p. 1236–1250, 2014.

WENSELEERS, T. et al. Intraspecific queen parasitism in a highly eusocial bee. **Biology Letters**, [s.l.], v. 7, p. 173-176, 2011.

WILBAUX. R. **Agricultural engineering**. Rome: FAO, 1963.

WILLIAMS, W. G. et al. 2-Tridecanone: A Naturally Occurring Insecticide from the Wild Tomato Lycopersicon hirsutum f. glabratum. **Science**, v. 207, n. 22, 1980.

WINTER, J. et al. Many roads to maturity : microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 228–234, 2009.

WOODARD, S.H. et al. Genes involved in convergent evolution of eusociality in bees. **PNAS**, v. 108, n. 18, p. 7472-7477, maio 2011.

YANG, Z. et al. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 2, p. 667–675, 2006.

YOUNG, N. D. et al. Whole-genome sequence of Schistosoma haematobium. **Nature Genetics**, v. 44, n. 2, p. 221–225, 2012.

ZHANG, B. H. et al. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. **Cell Research**, v. 15, p. 336–360, maio 2005.

ZHOU, M. et al. Genome-wide analysis of clustering patterns and flanking characteristics for plant microRNA genes. **The FEBS journal**, v. 278, n. 6, p. 929–

40, abr. 2011a.

ZHOU, S. et al. Identification of salt-induced changes in leaf and root proteomes of the wild tomato, *solanum chilense*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 136, n. 4, p. 288–302, 2011b.

ZHOU, X. et al. Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1779, n. 11, p. 780–788, nov. 2008.

3 CAPÍTULO II – UNVEILING THE WORLD OF BEE MICRORNAS: COMPUTATIONAL IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PATHWAY GENES, CONSERVED MICRORNAS, AND THEIR TARGETS.

*Artigo Original de pesquisa publicado na revista: International Journal of Tropical Insect Science (Manuscript Number: JTIS-D-22-00853R1).

ABSTRACT:

MicroRNAs (miRNAs) are noncoding RNA sequences that play a crucial role in the control and regulation of post-transcriptional gene expression. In this study, we conducted a comprehensive genome-wide computational prediction of miRNAs to enhance our understanding of their observation and function in eight bee species. As an initial step, we employed genome scanning techniques to predict hundreds of conserved miRNAs in the target species. Using an optimized algorithm, we successfully identified miRNA precursors within the genomes of *Apis mellifera*, *Bombus impatiens*, *Duforea novaengliae*, *Eufrisea mexicana*, *Habropoda laboriosa*, *Lasioglossum albipes*, *Megachile rotundata*. Subsequently, a detailed structural analysis was performed on a selected subset of these miRNAs. Furthermore, we extensively investigated the key proteins involved in the miRNA biogenesis pathway, namely Argonaute, Dicer, and Drosha, by comparing them with orthologs in the subject bee species. Our analysis focused on verifying the conservation levels of active site amino acid residues, key domains, and conducting phylogenetic analyses. Among the various functional proteins in bees, Vitellogenin (Vg) emerged as particularly significant due to its role in embryo development and its function as a nutritional reserve in nonmammalian vertebrates. Seven potential miRNAs were identified that implicated in the regulation of not only provide valuable insights into the biology of miRNAs in bees but also pave the way for further investigation in this field.

Keywords: Bioinformatics; In-Silico Analysis; Micrnas, Bees.

1 Introduction

Bees are one of the most diverse groups of insects, encompassing more than 20.000 of species in Hymenoptera Order, and worldly distributed (Orr et al., 2021). In order, they are the most abundant group of pollinators in agriculture, as they visit more than 90% of the 107 main agricultural crops (Klein et al., 2007). This contribution is due a natural characteristic of this insects, once this is the way they look for food. Considering this phenomenon, bees has an important impact in worldwide economics, fruits and seeds are produced with better quantity and/or quality when properly pollinated, strawberries are an excellent example, studies involving this fruits showed increase in the shelf-life, and better quality of the fruits after the harvest (Klatt et al., 2013). Aside the economic interest, pollination contributes to the maintenance and genetic variability of native plant populations that support biodiversity and ecosystem functions, ensuring a reliable and diversified supply of fruits, seeds, honey, among others (Costanza et al., 2017). Divided into castes such as workers and queen, bees are haplodiploid organisms. Haploid individuals are male and diploid individuals are female; therefore, females are derived from fertilized eggs and males from unfertilized eggs (Bull, 1987; Cook, 1993; Dzierzon, 1845). Bees has a myriad of behaviors that make this species particularly curious, as example, in *Apis mellifera*, the difference in the quality of food offered to young larvae triggers specific developmental pathways, producing female phenotypes: queens or workers (MacEdo et al., 2016). Other future that intriguing specialists and motivate researchers is the social evolution in bees. Eusociality is an important trait that remarks the increase in complexity and guides individual to group-level of relationships (Rubin et al., 2019). Some particularities are hallmarks of eusociality evolution, including individual to caste-based behavior, nest organization with division of labor, caste determination and cooperative brood-care (Holland & Bloch, 2020; Rubin et al., 2019). Changes in gene expression have been describe as a cornerstone in Eusociality evolution (Rubin et al., 2019), but changes in the way that genomes respond to environmental alterations and modifies patterns of gene regulation have been conquers stage in this discussion (Kapheim et al., 2020).

miRNAs are non-coding RNAs of approximately 22 nucleotides, involved in controlling the gene expression at the post-transcriptional level (W. Liu & Wang, 2019). This control is exercised by the miRNA sequence pairing with the mRNA, degrading it or causing steric hinderance, impeding its transcription (Lucas & Raikhel, 2013). The study of miRNAs begins with the genes and proteins involved in the biogenesis pathway, that encompasses several steps. Canonical pathway starts with the miRNA gene being transcribe by a RNA Polymerase III, in the nucleus, the miRNA transcript folds into a hairpin structure, which is its primary structure, the primary miRNA. The first processive phase starts and the primary miRNA is cleaved by Drosha (DRSH), forming the miRNA precursor (Han et al., 2004). DRSH is a nuclear enzyme that has a dsRNA (double-stranded RNA) binding domain and two RNase III domains, each one involved in the cleavage of the pri-miRNA arms (Y. Lee et al., 2003). The Hairpin cleavage performed by DRSH alongside DGCR8 in the miRNA needs to be a precise process because it defines the terminus of the miRNA (Han et al., 2006) producing a precursor of miRNA, pre-miRNA. The precursor is exported to the cytoplasm where other RNase III acts. Protein Dicer (DCR) cleaves near the terminal portion of the loop to release the miRNA from this structure, forming a miRNA miRNA duplex. This miRNA duplex is incorporated into a protein complex called RISC (RNA induced silencing complex), in which the Argonaute protein is one of the main components. AGO recognizes the 3' end of the attached small RNA, and binds the target mRNA for cleavage (Y. Wang et al., 2008). Within the RISC complex the miRNA duplex is dissociated and only one of the strands is used as the mature miRNA (Cheloufi et al., 2010).

Since the first publication describing the discover of miRNAs (R. C. Lee et al., 1993), this molecule have been tirelessly studied. Specifically in bees, miRNAs have already been quoted as important regulators of various behaviorssuch as the variety of functions performed by workers through their lifespan (Ashby et al., 2016), so on, evidence indicates that miRNAs are also involved in the regulation of insect metamorphosis and wing development (Belles, 2017; Lozano et al., 2015). Several families of miRNAs, as bantam, miR-184 and miR-315, have been described as key in the modulation of tissue patterns, cell differentiation, ovarian development and caste determination in bees (Ashby et al., 2016; MacEdo et al., 2016). Once oviposition is an important feature in queens, miR-92 was founded in differentially

expression profiles when compared with workers, and then described as involved in neural functions (Chen & Shi, 2020). Novel investigations have described new conditions in plant-bee interaction, where plant miRNAs are transported to animals through endosomes and vesicular bodies, what can result in alterations in the genetic post-transcriptional regulation in bees (Gharehdaghi et al., 2021). Within all bee genome, we have an important gene involved in development, called Vitellogenin (Vtg). This gene encode for Vitellogenin (Vg) family protein, a group of polypeptides that are precursors of yolk proteins, an important source of energy in embryo development for oviparous and ovoviviparous vertebrates (Carducci et al., 2019). In *Apis mellifera*, Vg is known by protect queens against oxidative stress, resulting in a prolonged lifespan (Ihle et al., 2015).

In this analysis, we investigated eight distinct bee genomes and transcriptomes, namely *Apis mellifera*, *Bombus impatiens*, *Dufourea novaeangliae*, *Eufriesea mexicana*, *Habropoda laboriosa*, *Lasioglossum albipes*, *Melipona quadrifasciata*, and *Megachile rotundata*. The primary objectives of our study were to identify and characterize, using in silico methods, proteins involved in the miRNA pathway, including both precursor and mature miRNAs. Additionally, we explored the potential targeting of Vitellogenin, but exclusively in *A. mellifera*. Our comprehensive analysis successfully identified representative sequences of the pathway proteins in all species examined. Furthermore, our algorithm effectively retrieved a substantial number of miRNAs for each species, yielding the following counts of precursor sequences: 329, 226, 207, 163, 221, 197, 200, and 210 respectively. The data generated from our study holds immense potential to unveil new avenues for investigating the significance of miRNAs in bee biology. Moreover, it represents a significant stride towards comprehending the similarities and 8 differences in the behavior and evolutionary patterns of these species.

2 Material and methods

2.1 miRNA pathway: Gene prediction and proteins characterization

To improve our understanding of the miRNA pathway in bees, orthologs of the proteins involved in miRNA pathway need to be identified in bees. Suchlike, we

retrieved in the Beebase database (<https://hymenoptera.elsiklab.missouri.edu/beebase>), the predicted proteomes correspond to the versions: *Apis mellifera* – 4.5, *Bombus impatiens* – 1.0, *Megachile rotundata* – 1.1, *Dufourea novaeangliae* – 1.1, *Eufriesea Mexicana* – 1.1, *Habropoda laboriosa* – 1.2, *Lasioglossum albipes* – 5.42 and *Melipona quadrifasciata* – 1.1. Therefore, we proceeded identifying and selecting by mining bee sequences using the basic local alignment search tool BLAST (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), BLASTp algorithm with non-redundant database, and adopting *A. mellifera* and *D. melanogaster* as model organisms.

2.2 Multiple alignment for active site analysis, domain conservation, and phylogenetic analysis of miRNA pathway proteins

Our protocol to protein characterization is based in the observation of some attributes that is considered as requisite for protein performs their function. In our case, we observe by comparison the level of conservation from our putative proteins sequences versus orthologs, the conservation of amino acids residues in the active site, the presence of characteristics domains, and the clade organization in the phylogenetic analysis. Due to their importance in the miRNA pathway, we selected the proteins Argonaute, Dicer and Drosha, to accomplish this items. Dicer and Drosha were conducted in the same arrangement because both of them are part of the same family of proteins, sharing the same active site in RNase III domains. Analyses of protein families, domains and active sites were performed using PFAM online tool (v 31.0) (<http://pfam.xfam.org/>) and Conserved Domains Database (CDD) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>). The protein sequences of bees and orthologs species were used to perform multiple sequence alignments using ClustalX (v 2.1) (<http://www.clustal.org/>) with default settings (available at <http://www.clustal.org/clustal2/>) (Larkin et al., 2007). Objecting a better visualization of sequence conservation in active site analysis, sequence logos were generated using WebLogo 2.8.2 (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

Besides model organisms selected to orthology comparisons, in phylogenetic analysis is interesting increase the number of species selected, with de proposition

to offer representative of major phylum animal kingdom. Phylogenetic trees were inferred using the Neighbor-Joining method and sequence divergence were estimated using the Jones – Taylor – Thornton model (Saitou & Nei, 1987). Statistical the reliability of internal branches was evaluated using 2000 bootstrap replicates. The molecular Phylogenetic analyzes were conducted using MEGA X 12 software (Tamura et al., 2011).

2.3 Prediction and characterization of both precursor and mature miRNAs

The core of this paper is the mining of putative miRNAs sequences, precursors and matures, enable the characterization of new miRNAs for sequences undescribed in literature, and the corroboration of those already described. Proceeding from, genome of all eight species was retrieved from Beebase, utilizing the latest version of each one provided by the Ten Bees Project (Kapheim et al., 2015). A robust algorithm stablished by de Souza Gomes et al (2011) was applied to predict precursors and mature miRNAs. This tool considers the optimum conditions that is expected in a sequence to show potential hairpin formation or precursor miRNA similarities. The algorithm selects sequences that covers some filters indispensable to predict putative miRNA precursors, they are GC content, MFE and different levels of homology (miRNAs previously described to closer species, with protein-coding regions, repetitive regions, and non-coding RNAs).

The sequences that were selected by the algorithm advanced in our analysis with the prediction of thermodynamics features and secondary structure, where it was used RNAFold (Vienna RNA Package) (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) (Lorenz et al., 2011) and a homemade Perl script. We followed the protocol proposed by de Souza Gomes (2011), where the script was described for first time.

2.4 miRNA alignment and phylogenetic analysis

In the same way of the proteins, miRNAs demand a level of sequence conservation 34 imperative for mRNA complementation. Is this case, we observe through alignment the seed 35 region nucleotides composition, that must show a

hundred percent of conservation. pre-miRNA sequences from bees and orthologs were submitted to a multiple sequence alignment into ClustalX2 software (Larkin et al., 2007), following the parameters, 22.50 of gap opening and 0.83 of gap extension. pre-miRNA sequences from bees and orthologs were used to conduct phylogenetic analysis, as a matter of orthologs selection, some miRNAs showed the possibility of being phylum specific, or even bee specific, what reduce the embracing of the tree. Using the MEGAX software (Kumar et al., 2018) and Neighbor-Joining method with the parameters adjusted: Bootstrap method was applied, a consensus tree with 5000 replications, and Kimura 2 parameters as substitution model in the evolutionary distance calculation (Saitou & Nei, 1987).

2.5 miRNA target prediction

Putative gene targets prediction could work as a complementation in miRNAs study. Put miRNAs and their putative targets in the same picture can provide a broad idea of structure and function of this molecules. Here, we proceed in two steps. Firstly, putative gene targets were searched in *A. mellifera*, considering 3' UTR from a GFF data retrieved from BeeBase. The sequences were analyzed based in Free Energy and Conservation, been analysing in miRanda software (John et al., 2004), therefore, an analysis comprising the most consistent options considering the miRNA:mRNA energy of hybridization was performed in RNAhybrid software (Krüger & Rehmsmeier, 2006). Secondly, we had focused to identify a putative representative of Vg gene in *A. mellifera*. Through a search in NCBI data base, we used the protein NP_001011578.1 vitellogenin precursor *Apis mellifera* as ortholog to locate Vg candidate in predicted transcriptome in *A. mellifera*. Following, we returned to GFF data and determined what miRNA have that gene as putative target. In detailed, we used the miRanda software version 3.3a, applying the parameters: gap opening penalty of -2, a gap extension penalty of -8; match with minimum score threshold 80, target duplex with maximum threshold free energy -15 kcal/mol. About RNAhybrid, we handled with the version 2.1.2, with de parameters default.

2.6 Statistical analysis

Basic descriptive analyses followed by normality tests (Kolmogorov-Smirnov) were performed and it was verified that the MFE, MFEI and AMFE variables have a non-normal behavior. Therefore, the comparison between the species of these variables was made based on the differences between the medians by the Kruskal-Wallis method between independent samples. In this case, the Kruskal-Wallis test with $\alpha = 0.05$ determinate if one or more of groups are significantly different (Journal et al., 2017; Kruskal & Wallis, 1952).

3 Results and Discussion

3.1 miRNA biogenesis pathway in bee

The identification of nine proteins involved in the miRNA pathway was successfully accomplished in this study. These proteins include DROSHA, DICER, ARGONAUTE, RANBP21, PASHA, TUDOR, FMR1, VIG2, and LOQUACIOUS. Among them, two families of proteins, namely Argonaute and RNase III proteins (DICER and DROSHA), were selected for further analysis due to their pivotal roles in miRNA processing and maturation. We assessed the putative proteins based on their size, conservation and distribution of domains, as well as their homology to *D. melanogaster*. Complete details of the identified proteins can be found in the Supplementary data I – Table I. For the three highlighted proteins, we provided more specific information, including domain composition and the positions of amino acid residues, which can be found in the Supplementary data II – tables I to III.

3.1.1 ARGONAUTE

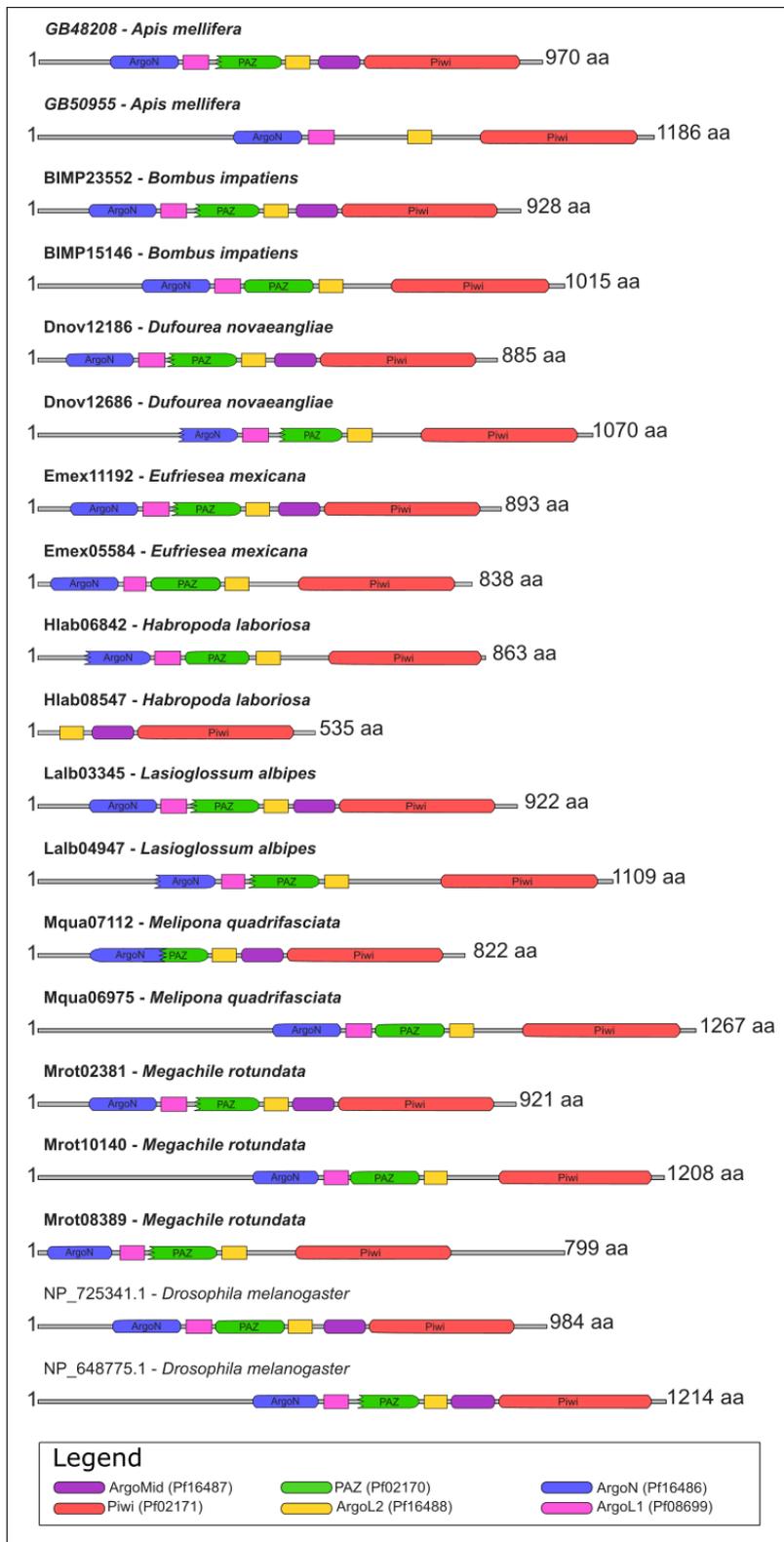
The ARGONAUTE family of proteins is a large family of proteins of about 95 kDa that have two important subfamilies, AGO and PIWI. These subfamilies play important roles in non coding RNA pathways. AGO proteins constitute the main protein of the RISC complex in miRNA and small interference RNA (siRNA). In turn, PIWI proteins are responsible for the RISC complex in RNAs that interact with the PIWI pathway (piRNA) (Carmell et al., 2002; Hutvagner & Simard, 2008).

The ARGONAUTE subfamilies show two highly conserved domains known as the PIWI and PAZ domains, both found in most organisms. The PIWI domain has a catalytic site responsible for cleavage of target messenger RNA (mRNA). This active site was composed of three amino acid residues: DDH (Aspartate, Aspartate and Histidine) or DDD (three Aspartates) (Kawamata et al., 2009; Kiriakidou et al., 2007).

The PAZ domain is positioned at the N-terminal end of the protein, while the C-terminal region presents the PIWI domain. The arrangement of the domains is strategic, since it has the ability to position the small RNA in its target gene (Y. Wang et al., 2008).

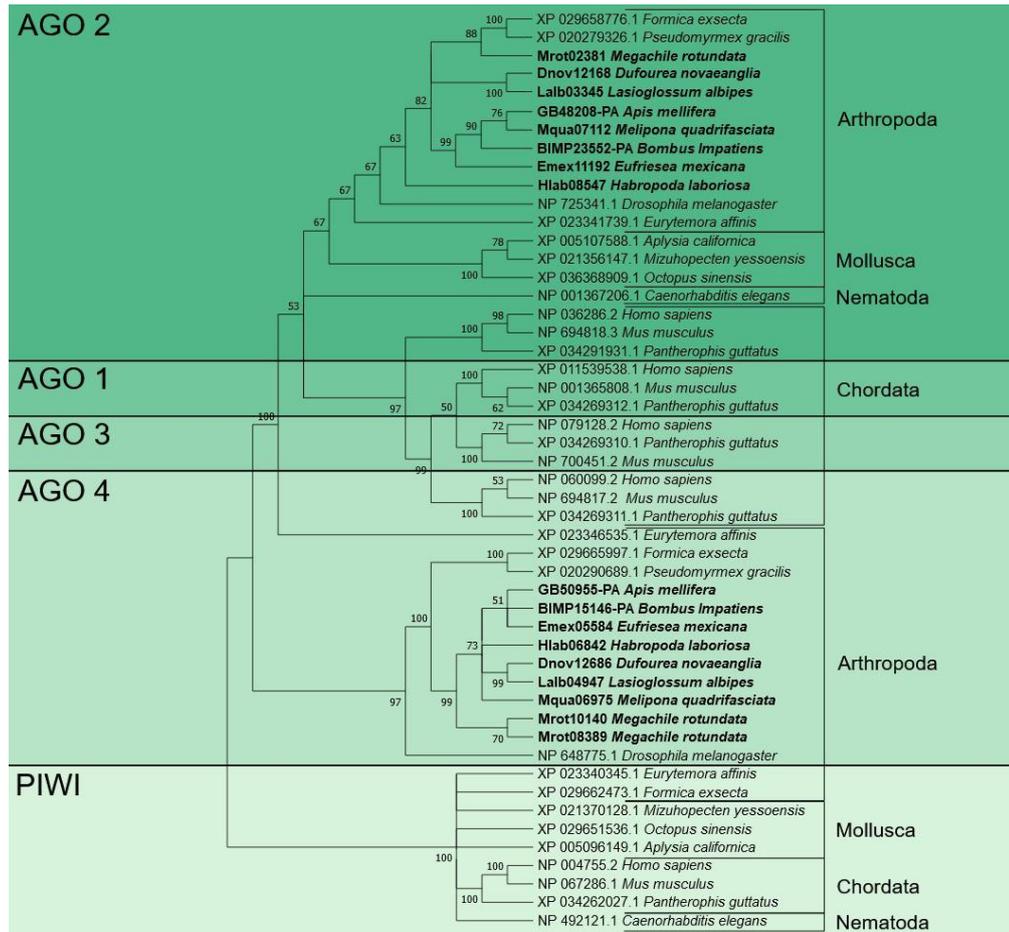
In the analysis, seventeen proteins were analyzed and identified as putative Argonaute proteins, GB48208, GB50955, BIMP23552, BIMP15146, Dnov12168, Dnov12686, Emex11192, Emex05584, Hlab06842, Hlab08547, Lalb_03345, Lalb_04947, Mqua07112, Mqua06975, Mrot02381, Mrot10140 and Mrot08389. Six conserved domains were identified in these proteins, Piwi, Mid domain of argonaute, N-terminal domain of argonaute, PAZ, Argonaute linker 1 and Argonaute linker 2 (Fig. 1, and Supplementary Data II, Table III). Although all of them presented the PIWI domain, three of them did not display the PAZ domain, GB50955, Hlab08547, Mrot10140.

Figure 1 - Conserved domains found in ARGONAUTE proteins of studied species versus the model organism *Drosophila melanogaster*.



The phylogenetic analysis of Argonaute was made simultaneously with Piwi. All seventeen bee proteins clustered within arthropods clade on the Argonaute clade (Fig.3), and PIWI proteins were organized in an exclusive root, as proposed by literature (G. H. Wang et al., 2013; Wynant et al., 2015).

Figure 3 - Phylogenetic analysis of ARGONAUTE proteins found in the bees and their orthologs.



3.1.2 Drosha and Dicer proteins

Our protocol revealed sixteen proteins identified as putative DCR: GB48923, GB44595, BIMP24576, BIMP15231, Dnov01654, Dnov12532, Emex00397, Emex09608, Hlab00411, Hlab03512, Lab_01265, Lab_01487 Mqua02257, Mqua14519, Mrot05715 and Mrot13039, eight putative DRSH: GB49096, BIMP25827, Dnov10175, Emex08506, Hlab12928, Lab_00686, Mqua07049 and Mrot00920.

Structurally speaking, both DRSH and DCR share the same essential domains designer, Riboc I and Riboc II domains, that are indispensable for protein action once the active site for this protein is located in these domains. About other domains, DCR show a more complex structure, with PAZ, Dicer dimerization, Type III restriction enzyme subunit and Helicase conserved C terminal, meanwhile, DRSH just present an extra dsRBD domain (MacRae & Doudna, 2007) As a matter of fact, our putative proteins showed a high conservation between bee species, presenting all major domains as described (Supp Data F.I and T-I). The active site in DRSH and DCR comprises the following catalytic residues EDDE: glutamic acid (E), aspartate (D) (Nicholson, 2014). In our data, DRSH showed a change in the Riboc I, presenting the sequence ENDE of amino acid residues. Such modification is unusual, but has been describe before (Partin et al., 2020). Aside the subjects Emex00397 and Hlab03512, the putative proteins showed a hundred percent of conservation in the remain amino acid residues (Supp Data F.II).

The phylogenetic analysis of DRSH/DCR putative proteins displayed the evolutionary relationship with their orthologs and paralogues. All eight bee putative proteins clustered within arthropods clade on both cases (Supp Data F.III), follow a pattern before considered by other authors (Wynant et al., 2015).

3.2 Genome-wide scanning of miRNA in bee

3.2.1 Mature miRNA and their precursors in bee

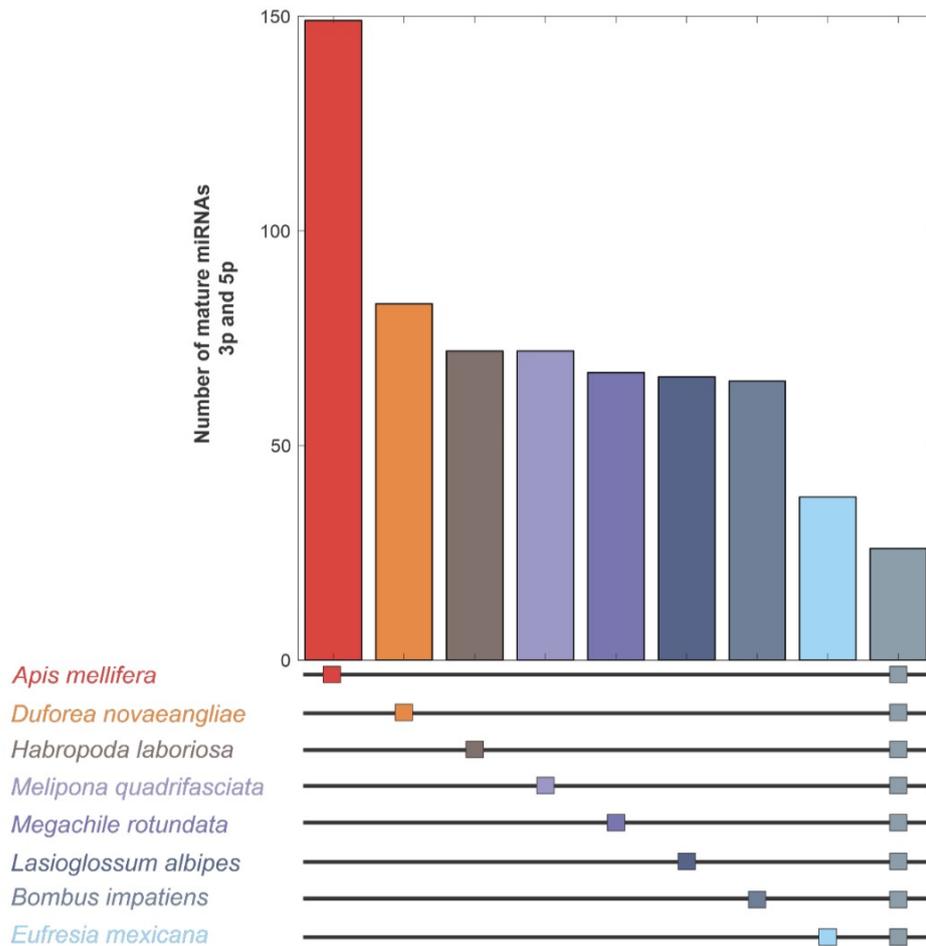
To show that miRNA processing machinery is well conserved in bees, we sought to identify mature and precursor miRNA sequences, in addition to predicting and defining the nature of their putative target genes using public available databases on the genome of the species studied. Our results suggest that, in general, miRNAs demonstrated similar evolutionary patterns among the eight species studied and their orthologs.

Applying an optimized algorithm, 432 sequences of mature miRNAs (3p and 5p) with 329 precursor miRNAs in the genome of *A. mellifera* were identified. In *B. impatiens*, 321 sequences of mature miRNAs and 226 precursor miRNAs were established. For the species *D. novaengliae*, 288 mature miRNAs and 207 precursor

miRNAs were identified; In *Eufrisea mexicana*, 235 mature miRNAs and 163 precursor miRNAs were determined; *H. laboriosa* revealed 298 mature miRNAs and 221 precursor miRNAs. For the bee *L. albipes*, 275 sequences of mature miRNAs and 197 precursor miRNAs were identified. In *M. rotundata* 309 mature miRNAs and 210 precursor miRNAs. Finally, in the genome of the *M. quadrifasciata species*, 282 mature miRNAs and 200 precursor miRNAs were characterized (Supp data T-III, Tables I - VIII).

In the middle of the 329 precursor miRNAs in the genome of *A. mellifera* identified in our study, 124 were identified for the first time; from these new sequences described in *A. mellifera* such mir-1187 family (*ame-mir-1187-1*, *ame-mir-1187-1*, *ame-mir-1187-3*, *ame-mir1187-4*), mir-1277 family (*ame-mir-1277-1*, *ame-mir-1277-2* and *ame-mir-1277-3*), mir-466i family (*ame-mir-466i-1*, *ame-mir-466i-2*, *ame-mir-466i-3*, *ame-mir-466i-4* and *ame-mir-466i-5*) among others. We have two major importance distributions considering the miRNAs among the species. It is interesting compare the miRNAs that were represent only in one specie, and the contrary, miRNAs that appeared in all the eight species, once this comparison can guide future studies focusing on specie specific miRNAs or Order specific (Fig. 4, Supplementary data IV - 33 Table I and II).

Figure 4 – miRNAs distribution among species. This representation is considering the number of miRNAs exclusively represented in one specie, and those represented in all eight species.



Some studies have been made focusing the identification of different miRNAs in different stages and biological process in bees. Olfactory learning conditions is an important tool in bees' behavior. Odor-conditioning is a part of learning and memory, and it is involved in the capacity of workers to localize and to transmit the information of the localization of food (Menzel, 1993). miR-184, miR-276, miR-87 and miR-124 were discovered as some of the miRNAs involved in this pattern and function in *A. mellifera* (Performance et al., 2023). In concordance, our analysis we located miR-184 and miR-87 in all eight species, while miR-276 were founded in *A. mellifera*, *B. impatiens*, *E. mexicana*, *H. laboriosa* and *M. quadrifasciata* and miR-124 in *A. mellifera*, *B. impatiens*, *D. novaeangliae*, *E. mexicana* and *M. rotundata*.

Worker bees has some biological functions and structures of organs that varies in according with their age. For example, is expected that the olfactory organ has their high development in oldest forager individual. In the case of hypopharyngeal glandes, that are an organ responsible for royal jelly secretion, we have the contrary, once feeding is a nurse activity. In a recent work comparing this organ in three stages of workers, where ame-miR-263a, a novel miR124 and novel-miR-3785 were related as possible influence in hypopharyngeal development (Qin et al., 2022). In our analysis, miR-263a were not founded only in *H. laboriosa* and *M. quadrifasciata*, and miR-3785 were not founded in *E. mexicana* and *M. quadrifasciata*.

Another point that calls for attention in bee behavior, is caste differentiation once workers and queen have different attributions. Caste differentiation is, in some way, correlated with eusociality, and miRNAs have been described as active in both cases. miRNAs are closely related with eusociality evolution by their gene regulation (Kapheim et al., 2020). In an investigative work of Kapheim and others, they provided an initial landscape of the differences in expression of genes in social and solitary bees. One of the information specially presented, is the pattern of expression of miR-305. In their work, they realized that this miRNA was expressed only in the brains of social bees (Kapheim et al., 2020). But this same miRNA has been correlated with caste determination in *A. mellifera*, what could justified the presence of miR-305 in social and solitary bees (Meunier et al., 2013). Our data showed the presence of miR-305 in all eight species, and we believe that this could enrich this discussion, by the description of this miRNA as new e some of the species.

Yet again, caste determination is under pressure of countless biological processes. In larval development, larvae has the capacity of food storage through hexamerins, proteins produced in the fat body and secreted to hemolymph, and then distributed along tissues during all non-feeding period of metamorphosis (Tian et al., 2021). Female larvae caste determination is closely related with nutrition, mostly in a period named queen-dependent, where queen-worker caste will be defined (Collins et al., 2021). microRNAs are correlated with expression patterns in hexamerins genes, specifically miR-34, miR-210 and miR-317, where expression of hexamerins genes have been described higher in workers larvae than in queens,

while the quoted miRNAs follow the opposite (Vieira et al., 2021). miR-210 showed in all eight bees in our analysis, miR 34 only in *M. quadrifasciata* and miR-317 only with the exception of *M. rotundata*. Once more, our results can provide more information and support in further studies about larval caste determination, a subject that remains poorly elucidated.

3.2.2 MFE, MFEI and AMFE analysis

All identified miRNAs were analyzed for their structural and thermodynamic characteristics. The miRNA precursors of the eight species studied showed an MFE, AMFE and MFEI with means (Sup data T-V). The studied bees exhibited a MFE with an average of -33.568 kcal/mol. MFE is an important feature used to distinguish miRNA precursors and, therefore, used to distinguishing real and pseudo sequences. A miRNA precursor molecule is stable and can generate mature miRNA with an MFE value of -20 kcal/mol. (Zhao et al., 2010). Li et al (2013) systematically analyzed, using bioinformatics tools, characteristics of pre-miRNAs in 24 insect species and established an average MFE of - 33.07 kcal/mol for these species. Individually, they demonstrated MFE in these insects, such as *A. mellifera* (MFE: - 35.94±9.84 kcal/mol), *Culex quinquefasciatus* (MFE: - 34.25±7.51 kcal/mol) and *Drosophila melanogaster* (MFE: -33±10.99 kcal/mol) corroborating our results.

In a matter of miRNAs characterization, MFEI is a parameter suggested for potential precursors of miRNAs, a quantitative value capable to differentiate them from other non-coding RNAs like mRNA, tRNAs or rRNAs. Proposed by B. H. Zhang et al (2006), they developed this term, minimum free energy index (MFEI), to detect different types of RNA in plants, showing that RNA sequences with average greater than 0.85 kcal/mol are more likely to be real microRNA. In our study, we obtained an average value of 0.81 kcal/mol to MFEI, same that J. Li et al (2013) already proposed, and literature already pointed that to Arthropoda Phylum, this value varies 0.87± 0.17 (B. Zhang et al., 2009), supporting our result as well.

A statistical analysis was applied to this data, aiming ascertain if the parameters MFE, AMFE and MFEI, was divergent among our species. According to the data, the results from Kruskal-Wallis test not indicate that one or more groups are significantly different for any of the parameters, considering the following p-

value, MFE p-value = 0.286 > 0.05, AMFE p-value = 0.201 > 0.05 and MFEI p-value = 0.113 > 0.05 (Supp data F.IV).

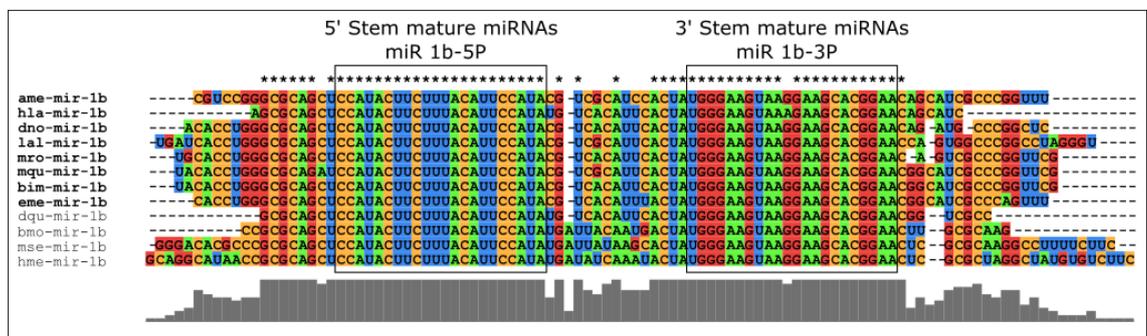
3.2.3 miRNAs characterization

Some miRNAs have been hardest studied due to their pivotal role in essential biological process. Based in such importance and relevance, among the miRNA families described above, four miRNAs, mir-1b, mir-2b, mir-283 and mir-927, stood out for further and detailed characterization. For each of them, the conservation of their sequences and phylogenetic distributions was analyzed. Critically, the targets of miRNAs were also sought to identify the biological processes in which these new miRNAs were involved.

3.2.3.1 miR-1b

Eight mir-1b precursors were identified along with seventeen mature miRNAs, distributed across the eight species of bee. miR-1b is a member of the miR-1 family and its sequence is highly homologous to miR-1 (Y. pu Liu et al., 2018). The align comprising miR-1b with their orthologs, demonstrated a high conservation between miR-1b sequences found in the bees and their orthologs (Fig. 5), further evidenced by the secondary structure analysis, which also showed a great conservation between the bee miRNAs and their orthologs (Fig. 6).

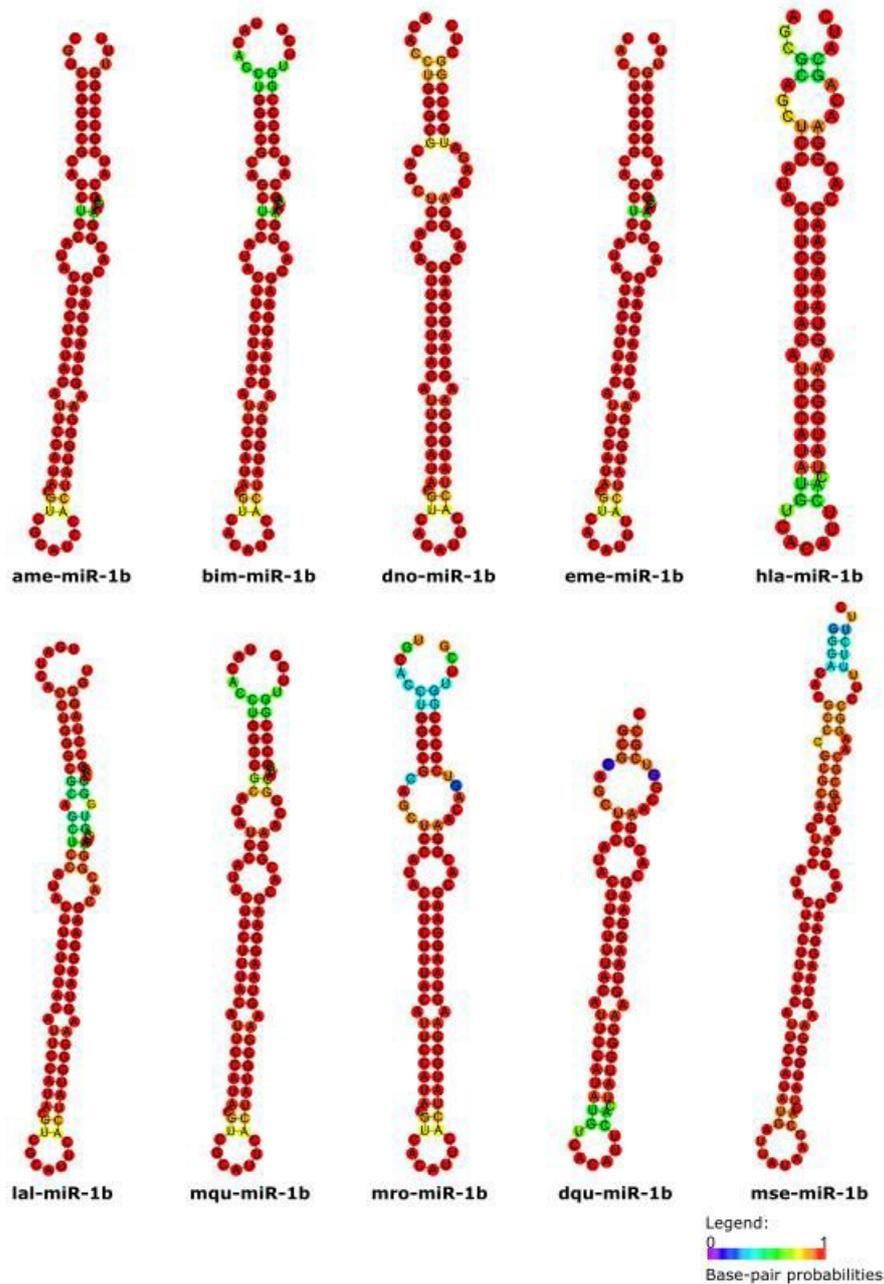
Figure 5 - Alignment of *miR-1b* with their orthologs



The phylogenetic analysis generated a tree divided in three well-defined clades, which were identified as Arthropoda, Chordata and Nematoda. All sequences were grouped according to the distribution found in the animal tree of life, with the bees being mostly close to each other within the arthropod clade (Fig. 7).

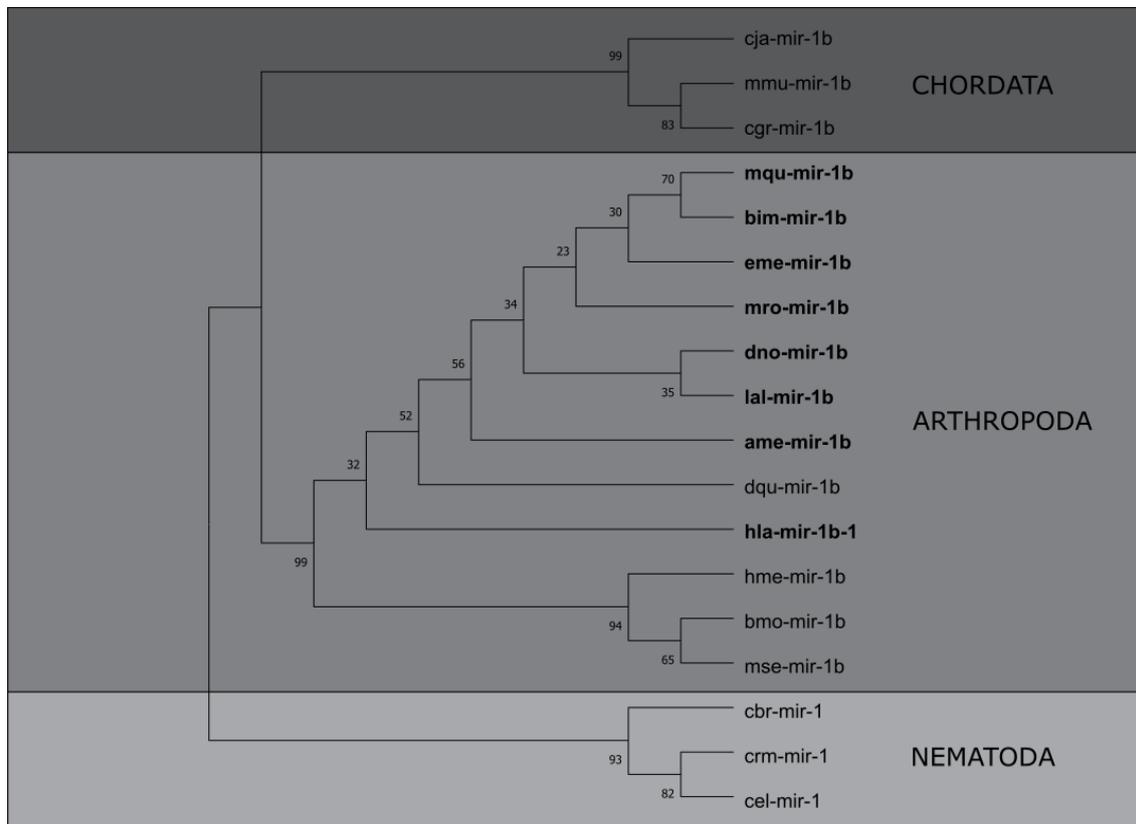
The presence of miR-1b has been reported in other arthropods, such as *Manduca sexta* (X. Zhang et al., 2014), *Bombyx mori* (S. Liu et al., 2010) and *Dinoponera quadriceps* (Patalano et al., 2015), corroborating with the sequences identified in the bees.

Figure 6 - Secondary structure of the *miR-1b* showing a great conservation between bee miRNAs and their orthologues



The molecular mechanisms of miR-1b in bees have not yet been properly investigated. However, a study on bee ovaries reported that miR-1 is associated with ovarian activation in bees, being highly expressed in this organ under certain reproductive conditions (MacEdo et al., 2016).

Figure 7 - Phylogenetic tree performed to *miR-1b* precursors identified in the bees and their orthologs



3.2.3.2 *mir-2b* family

miR-2 family is one of the most important family of miRNAs distributed, specifically, among invertebrates (Marco et al., 2012). Their presence in such clades give this family an important variation of functions, and the number of genes is variable in according to each species, the largest distribution is in *D. melanogaster*, where we have 8 members of this family: *mir-2a1*, *mir-2a-2*, *mir-2b-1*, *mir-2b-2*, *mir-2c*, *mir-13a*, *mir-13b-1* and *mir-13b-2* (Ruby et al., 2007). In *S. haematobium* were found 5 precursors of this family (Cardoso et al., 2020). Using our 30 pipeline, representatives of miR-2 family were found in all eight bee species, totaling 48 precursors and 75 mature miRNAs. MacEdo et al (2016) also reported 6 precursors in *A. mellifera*, corroborating with our results, notwithstanding all the others are being presented for the first time. Until this date, miRBase provided 42 representatives for miR-2 in different species, where only *A. mellifera* is related.

The predicted miR-2 family were confronted against those in miRBase, based in general structure and thermodynamic features. *A. mellifera* was used as model, once it is the most studied among the subjective species. Commonly, miRNAs belonging to the same family present themselves in form of clusters, being at most 10 kb distant to each other. Although miR-71 clusters itself with miR-2 (De Souza Gomes et al., 2013), the target of our analysis was miR-2b, therefore, only miR-71 secondary structure is present in order to represent the miR-71/2 cluster. The genomic localization of miR-2 family representatives and miR-71 showed that the majority of our species corroborate with this information, only *E. mexicana* showed two different clusterizations between miR-2b/13a and miR-13b-2/71, in *H. laboriosa* miR-13 was not found, and for *L. albipes* miR-71 was not found, therefore, for those species the cluster was not complete (Supp data T-VI - Table II). To mir-71/2 cluster organization, the conservation can be seen through the secondary structure, even in the species which the cluster is not complete (Supp data F.VA, VB and VC). It was possible to observe a hundred percent of nucleotide conservation in the seed region, from the 2 - 8 nt, in both 3p and 5p (Supp data F.VI). In the phylogenetic analysis we can perceive that the clades organization are in according to the tree of life, and obey the structuring proposed by authors (Ma et al., 2021; Marco et al., 2012) (Supp data F.VII, F.VIII and F.IX).

Due to their large distribution in invertebrates, important studies have been published linking miR-2 family to countless functions. In *A. aegypti*, miR-2b was introduced as one of the mechanisms involved in the defense against virus infection, like *Chikungunya virus* (Dubey et al., 2017). *Plutella xylostella* is a pest that causes catastrophic damage to cruciferous plants, this occurs because *P. xylostella* has evolved, over time, resistance to synthetic chemical insecticides of any class. In a recent study, Etebari et al (2018), showed that mir-2b-3p is involved in cytochrome P450 regulation (CYP9F2;), which is one of the mechanisms used by *P. xylostella* in insecticide resistance. Similarly, Hong et al (2014) showed different pattern in mir-2b-3p and miR-13 expression in a comparison between both deltamethrin susceptible and resistant *Culex pipiens pallens*.

Ling and collaborators proposed the importance of miR-2 in normal wing development. They demonstrated that miR-2 has *fng* and *awd* genes as targets, and alterations in miR-2, like over expression, produced unnaturally aberrant wings

in adults (Ling et al., 2015), in *A. mellifera*, the same pattern has been proposed, where ame-miR-2b is one of the most expressed in the wing discs metamorphosis (Soares et al., 2021).

The last few years, the community had been noticed about colony losses of honeybees around the world. There are a lot of possible explanations to this phenomenon, one of them is the infection of colonies by different microorganisms as bacteria, viruses and parasites. *Nosema* is a microsporidian parasite, responsible for the infection of young adult bees, that can disable those infected from producing food or royal jelly. Honeybees have microRNAs as apparatus against infection. In *N. ceranae* infection, there are significant modifications in the pattern of miRNA expression, guiding to a differential expression of key miRNAs, among them miR-2b. They are correlated with pathways such as oxidative phosphorylation, glycan degradation and biosynthesis of antibiotics (Huang et al., 2015). Following this route, it was tested genetic variants that gives honeybees subspecies some level of resistance to *Nosema* infection. One of the microsatellite loci evaluated is located in the chromosome 1.1 region, the same position as *miR-2b* (Ostroverkhova, 2020). miR-2 family is predicted to participate in immune system activation in *A. mellifera* through up-regulation of ame-miR-2 and ame-miR-13a in response to bacteria Gram-negative *Serratia marcescens* (Lourenço et al., 2013).

3.2.3.3 miR-283

In the analysis, the *miRNA-283* family was identified in all bee species. There were eight precursors and sixteen mature miRNAs. Only ame-miR-283 was already described, being available on miRbase. *A. mellifera* miRNA was used as a model to analyze the others, comparing their sequence, structure and thermodynamic features. All of them presented high conservation compared to their ortholog, in both primary and secondary structures analysis (Supp data F-X and XI), important to draw attention for the 3p and 5p seed region of the miRNA, where we got 100% of nucleotide conservation. The phylogenetic tree is divided in three clades: Lepidoptera, Branchiopoda, Diptera and Hymenoptera. In the analysis of *miR-283* relationship with their orthologs and paralogues, all eight bee *miR-283* gathered

within the Hymenoptera clade, being mostly close to each other, according to precedent studies (Ma et al., 2021) (Supp data F-XII).

The *miR-283* family was found in several other organisms belonging to the superorder Endopterygota, including *D. melanogaster* (Stark et al., 2007), *Daphnia pulex* (Wheeler et al., 2009) and *Tribolium castaneum* (Marco et al., 2010). In other studies, *miR-283* was also identified on nematode phylum, *Brugia malayi* (Poole et al., 2014).

A. mellifera have a well characterized age-related division of labor (DOL), where, initially, newborn bees assume nursing functions and change it during their lifetime, until they become foragers at 3 weeks old (Greenberg et al., 2012). This DOL provides an excellent condition to study the role of genes in natural behavioral plasticity. Based on that, Behura & Whitfield (2010) observed and compared patterns of gene expressions in the brains of honeybees: young nurse, young forager, old nurse and old forager. The results showed that specific miRNA genes, including *miR-283*, are coordinately up-regulated in the late stages of honeybee life, because of the high expression in the old forager bee in relation to other groups. Implying that behavioral maturation, switching from nursing to foraging activity, is influenced by regulatory pathways.

miR-283 is a huge candidate for caste differentiation and age indicative in *A. mellifera*. This miRNA show-up among the most differentially expressed between workers and queens, been inversely proportional, with an increase of expression in queen larvae and a decrease in worker larvae, considering the same period of development (Guo et al., 2016), information corroborated in other study where was compared differentially expressed genes in nurse bees and forager, and *ame-miR-283* was founded as downregulated in this situation (Shi et al., 2021). Keeping the correlation between age and behavior, nourishment is other point that must be considered in this considerations. Martelli (2022) demonstrated the influence of nutrition in different biological stages in bees, mostly in behavior maturation, pointing out a downregulation of *miR-283* in workers bees with pollen-deprived diet in their first seven days of life.

3.2.3.4 *miR-927*

Nineteen miRNA precursors for *miR-927* family were identified and thirty-seven mature miRNAs distributed in the eight species. The miRNAs from bees of this family showed high conservation in relation to their orthologs, both for the analysis of primary and secondary structures (Supp data F-XIII and F-XIV).

The tree generated from the phylogenetic analysis of the *miR-927* family showed a distribution in three well-defined clades (Diptera, Lepidoptera and Hymenoptera). The Hymenoptera clade was composed of the superfamilies: Pteromalidae, Vespidae, Apidea and Halictidae. In addition, there was a correct grouping between all precursor sequences of this family with their respective orthologs species. This distribution showed similarity with the tree of life, where bees remained alongside other Hymenoptors (Supp data F-XV).

In other studies, *miR-927* (ame-mir-927a) was also identified in the bee *A. mellifera*, corroborating the sequences identified in this study (Greenberg et al., 2012; MacEdo et al., 2016; Weaver et al., 2007). The *miR-927* family sequences were found in several organisms belonging to the Superorder Endopterygota, including the organisms: *Drosophila virilis* (Ninova et al., 2014), *Bactrocera dorsalis* (Calla & Geib, 2015), *Polistes canadenses* and *Dinoponera quadriceps* (Patalano et al., 2015). In other studies, *miR-927* was also identified in mosquito vectors: *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (S. Li et al., 2009; Skalsky et al., 2010).

The cellular processes with which *miR-927* is related are gradually being elucidated. He et al (2020) demonstrated the property of *miR-927* in the regulation of development and metamorphosis of insects in *D. melanogaster* since these miRNAs decreased the expression of the Kruppel homolog1 gene (Kr-h1). The authors further reported that *miR-927* expression was repressed by JH thus demonstrating that miRNA mechanisms that regulate insect development and metamorphosis via Kr-h1 targeting are conserved and helping to understand the interaction between JH / miRNAs / Kr-h1.

JH mechanism of action is to inhibit metamorphosis in insects until the larvae reach an appropriate size and its production decreases with the simultaneous increase in the body and morphological changes that are completed from the final

stage of pupa to adult (Belles, 2019). The JH primary response gene, Kr-h1, is an important ant metamorphic factor in several species of hemimetabolous and holometabolous insects. The transcriptional regulation of KR-H1 by JH is via direct binding of the JH receptor, MET/GCE and the JH response element (Ebox or E-box like motif) within the promoter of Kr-h1. Therefore, if JH is required for larval maintenance, the same is true for Kr-h1 (Kayukawa et al., 2014).

Given that the Kr-h1 protein is relatively well conserved among *Apis mellifera* bee species (Fussnecker & Grozinger, 2008; Grozinger et al., 2003) and the property of the interaction between JH and miR-927 in the regulation of insect development has been demonstrated by miR927 decreasing the expression of Kr-h1, there the need for further studies to determine the exact molecular interaction JH/miR-927/Kr-h1 in bees.

3.2.4 miRNA target genes of in *A. mellifera*

After the maturation pathway, miRNA is ready to effectively act in mRNA to suppress expression. The mechanism behind this is the complementarity of 3' UTR from mRNA and the seed region of miRNA. This information was a conclusion from an important work by Lee et al. (1993), where they identified transcripts from *lin-4* were complementary to 3' UTR from *lin-14* mRNA. The seed region is from the nucleotide 2 through 8, the complementarity is the type of Watson-Crick, and it is distinguished by the perfect match, with no gaps in the structure miRNA: mRNA alignment (Peterson et al., 2014).

Aside the alignment between the sequences, some other features are considered in miRNA target prediction. In our case, *miRanda* and *RNAhybrid* tools were used. *miRanda* measures the thermodynamic free energy (Gibbs free energy) properties and the conservation level in the species analyzed, meanwhile *RNAhybrid* calculates the better option energetically based in miRNA hybridization (John et al., 2004; Rehmsmeier et al., 2004; Xiao et al., 2009).

So, considering the particularities described above, we did a global target prediction, regarding all mature miRNAs against the 3' UTR data contained in the GFF file (Supplementary data VII - Table I). After global target prediction, the mining focused on Vg candidates returned protein Amel_4.5:GB52465-PA as putative Vg

in *A. mellifera*. We consider the importance of the protein Vitellogenin (Vg) in a range of biological process in bees and in insects as a whole. Vg, known as yolk protein, is a glycoprotein with approximately 180 kDa and is widely studied in honeybees (Seehuus et al., 2006). Vg is synthesized in fat tissues, reaching the oocytes by endocytosis through specific receptors (Agostini et al., 2021). Vg suffers a lot of chemical alterations as glycosylation and phosphorylation (Raikhel & Dhadialla, 1992), and is considered the most important protein in oocyte maturation in insects, making it crucial in oviparous reproduction, mainly because of their involvement in embryonic development (Carducci et al., 2019; Wu et al., 2021). In *A. mellifera*, Vg is considered critical for queens, as they are involved in egg maturation and exhibit antioxidant properties, contributing to their longer life-spans (Corona et al., 2007; Ihle et al., 2015). A peculiarity about Vg is, since it connected to fertility, it was expected only queens to be responsible for its production, but workers show levels of Vg as well. This occurs because Vg is related to pathogen recognition receptors, helps with transgenerational immunity and gustatory perceptions (Salmela et al., 2015; Y. Wang et al., 2012; S. Zhang et al., 2015), and is correlated with age evolution in workers, with higher titers being found in nurses and decreasing throughout it life (Nelson et al., 2007).

miRNAs were searched with probable action in Vg control. Seven potential miRNAs were related with Vg control, *ame-mir-1b-5p*, *ame-mir-283-5p*, *ame-mir-3774-3p*, *ame-mir467g-3p*, *ame-mir-8460-3p*, *ame-mir-927-5p* and *ame-mir-9896-5p*. The involvement of miRNAs in Vg controlling has already been thoroughly studied. This control is also mediated by JH, 20-Hydroxyecdysone (20E) and nutritional conditions, but mostly by miRNAs, which also affects the previous mediators (Wu et al., 2021). Some miRNAs have been correlated with Vg controlling, a review about miRNAs differentially expressed and suspected to play roles in reproduction process proposed the action of let-7, Ame-mir-1, Ame-mir-275, Ame-mir-316, Ame-mir-31a, Ame-mir-3718a and Ame-mir-92a (Chen et al., 2017). Furthermore, miR-34-5p was characterized having Vg mRNA as a target (Soares et al., 2021). These are the most recent works that aimed to reflect miRNAs that influence in different manners in Vg control. As showed, miRNAs cited above have been proposed for the first time with this purpose. We hope this data will enhance the search for miRNAs based on microRNA-Vg interactions.

4. Conclusions

Considering the global importance of bees, especially as pollinators agents, only the worldwide population rate and the need for a better understanding of the particularities of the interaction and molecular regulation of their physiology and metabolism in order to better point out strategies for the production and conservation of these species, our results expand the study of miRNAs in bee by providing a better understanding of their essential roles in the miRNA-based regulation processes in bee, their processing pathways and gene expression, as well as providing targets for future investigations. The results elucidated several aspects of miRNAs in these eight species.

Acknowledgements

To the members of the Laboratory of Bioinformatics and Molecular Analysis (LBAM - UFU) for providing computational structure and for helping with the data mining and the figure/table organization, and to the PhDs Carlos Ueira and Ana Bonetti (Laboratory of Genetics – UFU), two of the greatest references in bee research.

REFERENCES

- Agostini, J. C., Costa, C. P., Ferreira, J. T., Dias, A. C., Guerra, N. P., Simões, Z. L. P., & Lourenço, A. P. (2021). Vitellogenin of the solitary bees *Centris tarsata* and *Centris analis* (Hymenoptera: Apidae): cDNA structural analysis and gene expression. *Apidologie*, 52(1), 6 292–307. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00818-6>
- Ashby, R., Forêt, S., Searle, I., & Maleszka, R. (2016). MicroRNAs in Honey Bee Caste Determination. *Scientific Reports*, 6(January), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep18794>
- Behura, S. K., & Whitfield, C. W. (2010). Correlated expression patterns of microRNA genes with age-dependent behavioural changes in honeybee. *Insect Molecular Biology*, 19(4), 11 431–439. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01010.x>
- Belles, X. (2017). MicroRNAs and the Evolution of Insect Metamorphosis. *Annual Review of Entomology*, 62, 111–125. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-034925>
- Belles, X. (2019). The innovation of the final moult and the origin of insect metamorphosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1783). <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0415>
- Bull, J. J. (1987). Sex determining mechanisms: an evolutionary perspective. *Experientia*. 18 Supplementum, 55, 93–115. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-6273-8_4
- Calla, B., & Geib, S. M. (2015). MicroRNAs in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*: 20 Extending Drosophilid miRNA conservation to the Tephritidae. *BMC Genomics*, 16(1), 1–21 14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1835-3>
- Cardoso, T. C. de S., de Araújo, C. B., Portilho, L. G., Mendes, L. G. A., Alves, T. C., Silva, G. 23 C., Ribeiro, T. H. C., Gandolfi, P. E., Morais, E. R., do Amaral, L. R., & Gomes, M. de S. 24 (2020). Computational prediction and characterisation of miRNAs and their pathway 25 genes in human schistosomiasis caused by *Schistosoma haematobium*. *Memorias Do 26 Instituto Oswaldo Cruz*, 115(2), 1–15. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190378>
- Carducci, F., Biscotti, M. A., & Canapa, A. (2019). Vitellogenin gene family in vertebrates: evolution and functions. *European Zoological Journal*, 86(1), 233–240. <https://doi.org/10.1080/24750263.2019.1631398>
- Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q., & Hannon, G. J. (2002). The Argonaute family: Tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes and Development*, 16(21), 2733–2742. <https://doi.org/10.1101/gad.1026102>

Cheloufi, S., Dos Santos, C. O., Chong, M. M. W., & Hannon, G. J. (2010). A dicer independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, 465(7298), 584–589. <https://doi.org/10.1038/nature09092>

Chen, X., Ma, C., Chen, C., Lu, Q., Shi, W., Liu, Z., Wang, H., & Guo, H. (2017). Integration of lncRNA-miRNA-mRNA reveals novel insights into oviposition regulation in honey bees. *PeerJ*, 2017(10). <https://doi.org/10.7717/peerj.3881>

Chen, X., & Shi, W. (2020). Genome-wide characterization of coding and non-coding RNAs in the ovary of honeybee workers and queens. *Apidologie*, 51(5), 777–792. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00760-7>

Collins, D. H., Wirén, A., Labédan, M., Smith, M., Prince, D. C., Mohorianu, I., Dalmay, T., & Bourke, A. F. G. (2021). Gene expression during larval caste determination and differentiation in intermediately eusocial bumblebees, and a comparative analysis with advanced eusocial honeybees. *Molecular Ecology*, 30(3), 718–735. <https://doi.org/10.1111/mec.15752>

Cook, J. M. (1993). Sex determination in the hymenoptera: A review of models and evidence. *Heredity*, 71(4), 421–435. <https://doi.org/10.1038/hdy.1993.157>
Corona, M., Velarde, R. a, Remolina, S., Moran-lauter, A., Wang, Y., Hughes, K. a, & Robinson, G. E. (2007). and Queen Honey Bee Longevity. *Pnas*, 104(17), 7128–7133. <http://www.pnas.org/content/104/17/7128.short>

Costanza, R., de Groot, R., Braat, L., Kubiszewski, I., Fioramonti, L., Sutton, P., Farber, S., & Grasso, M. (2017). Twenty years of ecosystem services: How far have we come and how far do we still need to go? *Ecosystem Services*, 28, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.ecoser.2017.09.008>

De Souza Gomes, M., Donoghue, M. T. A., Muniyappa, M., Pereira, R. V., Guerra-Sá, R., & Spillane, C. (2013). Computational identification and evolutionary relationships of the MicroRNA gene cluster miR-71/2 in protostomes. *Journal of Molecular Evolution*, 76(6), 353–358. <https://doi.org/10.1007/s00239-013-9563-2>

de Souza Gomes, M., Muniyappa, M. K., Carvalho, S. G., Guerra-Sá, R., & Spillane, C. (2011). Genome-wide identification of novel microRNAs and their target genes in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Genomics*, 98(2), 96–111. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.05.007>

Dubey, S. K., Shrinet, J., Jain, J., Ali, S., & Sunil, S. (2017). *Aedes aegypti* microRNA miR-2b regulates ubiquitin-related modifier to control chikungunya virus replication. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18043-0>

Dzierzon, J. (1845). Gutachten über die von Hrn. Direktor Stöhr im ersten und zweiten Kapitel des Generalgutachtens aufgestellten Fragen. *Bienen-Zeitung*, 1(6), 109–113, 119–121.

Etebari, K., Afrad, M. H., Tang, B., Silva, R., Furlong, M. J., & Asgari, S. (2018). Involvement of microRNA miR-2b-3p in regulation of metabolic resistance to insecticides in *Plutella xylostella*. *Insect Molecular Biology*, 27(4), 478–491. <https://doi.org/10.1111/imb.12387>

Fussnecker, B., & Grozinger, C. (2008). Dissecting the role of Kr-h1 brain gene expression in foraging behavior in honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Molecular Biology*, 17(5), 515–522. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2008.00819.x>

Gharehdaghi, L., Bakhtiarizadeh, M. R., He, K., Harkinezhad, T., Tahmasbi, G., & Li, F. (2021). Diet-derived transmission of MicroRNAs from host plant into honey bee Midgut. *BMC Genomics*, 22(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07916-4>

Greenberg, J. K., Xia, J., Zhou, X., Thatcher, S. R., Gu, X., Ament, S. A., Newman, T. C., Green, P. J., Zhang, W., Robinson, G. E., & Ben-Shahar, Y. (2012). Behavioral plasticity in honey bees is associated with differences in brain microRNA transcriptome. *Genes, Brain and Behavior*, 11(6), 660–670. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00782.x>

Grozinger, C. M., Sharabash, N. M., Whitfield, C. W., & Robinson, G. E. (2003). Pheromonemediated gene expression in the honey bee brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 14519–14525. <https://doi.org/10.1073/pnas.2335884100>

Guo, X., Su, S., Geir, S., Li, W., Li, Z., Zhang, S., Chen, S., & Chen, R. (2016). Differential expression of miRNAs related to caste differentiation in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 47(4), 495–508. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0389-3>

Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Nam, J. W., Heo, I., Rhee, J. K., Sohn, S. Y., Cho, Y., Zhang, B. T., & Kim, V. N. (2006). Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell*, 125(5), 887–901. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.043>

Han, J., Lee, Y., Yeom, K., Kim, Y., Jin, H., & Kim, V. N. (2004). The Drosha – DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development*, 3016–3027. <https://doi.org/10.1101/gad.1262504.mic>

He, Q., Zhang, Y., & Dong, W. (2020). MicroRNA miR-927 targets the juvenile hormone primary response gene Krüppel homolog1 to control *Drosophila* developmental growth. *Insect Molecular Biology*, 29(6), 545–554. <https://doi.org/10.1111/imb.12662>

Holland, J. G., & Bloch, G. (2020). The complexity of social complexity: A quantitative multidimensional approach for studies of social organization. *American Naturalist*, 196(5), 525–540. <https://doi.org/10.1086/710957>

Hong, S., Guo, Q., Wang, W., Hu, S., Fang, F., Lv, Y., Yu, J., Zou, F., Lei, Z., Ma, K., Ma, L., Zhou, D., Sun, Y., Zhang, D., Shen, B., & Zhu, C. (2014). Identification

of differentially expressed microRNAs in *Culex pipiens* and their potential roles in pyrethroid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 55, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.10.007>

Huang, Q., Chen, Y., Wang, R. W., Schwarz, R. S., & Evans, J. D. (2015). Honey bee microRNAs respond to infection by the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Scientific Reports*, 5, 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep17494>

Hutvagner, G., & Simard, M. J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 22–32. <https://doi.org/10.1038/nrm2321>

Ihle, K. E., Fondrk, M. K., Page, R. E., & Amdam, G. V. (2015). Genotype effect on lifespan following vitellogenin knockdown. *Experimental Gerontology*, 61, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.12.007>

John, B., Enright, A. J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C., & Marks, D. S. (2004). Human microRNA targets. *PLoS Biology*, 2(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020363>

Journal, S., Statistical, A., & Mar, N. (2017). The Kolmogorov-Smirnov Test for Goodness of Fit Author (s): Frank J . Massey , Jr . Published by : Taylor & Francis , Ltd . on behalf of the American Statistical Association Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2280095>. 16 46(253), 68–78.

Kapheim, K. M., Jones, B. M., Søvik, E., Stolle, E., Waterhouse, R. M., Bloch, G., & BenShahar, Y. (2020). Brain microRNAs among social and solitary bees. *Royal Society Open Science*, 7(7), 1–11. <https://doi.org/10.1098/rsos.200517>

Kapheim, K. M., Pan, H., Li, C., Salzberg, S. L., Puiu, D., Magoc, T., Robertson, H. M., Hudson, M. E., Venkat, A., Fischman, B. J., Hernandez, A., Yandell, M., Ence, D., Holt, C., Yocum, G. D., Kemp, W. P., Bosch, J., Waterhouse, R. M., Zdobnov, E. M., ... Zhang, G. (2015). Genomic signatures of evolutionary transitions from solitary to group living. *Science*, 348(6239), 1139–1143. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4788>

Kawamata, T., Seitz, H., & Tomari, Y. (2009). Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nature Structural and Molecular Biology*, 16(9), 953–960. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1630>

Kayukawa, T., Murata, M., Kobayashi, I., Muramatsu, D., Okada, C., Uchino, K., Sezutsu, H., Kiuchi, M., Tamura, T., Hiruma, K., Ishikawa, Y., & Shinoda, T. (2014). Hormonal regulation and developmental role of Krüppel homolog 1, a repressor of metamorphosis, in the silkworm *Bombyx mori*. *Developmental Biology*, 388(1), 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.01.022>

Kiriakidou, M., Tan, G. S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P. T., & Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G Cap Binding-like Motif within Human Ago2

Represses Translation. *Cell*, 129(6), 1141–1151.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.016>

Klatt, B. K., Holzschuh, A., Westphal, C., Clough, Y., Smit, I., Pawelzik, E., & Tschardtke, T. (2013). Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1775). <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2440>

Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tschardtke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 303–313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>

Krüger, J., & Rehmsmeier, M. (2006). RNAhybrid: MicroRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Research*, 34(WEB. SERV. ISS.), 451–454. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl243>

Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), 583–621. <https://doi.org/10.1080/01621459.1952.10483441>

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–21 2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., 26 & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415–419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>

Li, J., Fan, W., You, Z., & Zhong, B. (2013). Bioinformatics analysis on structural features of microRNA precursors in insects. *European Journal of Entomology*, 110(1), 13–20. <https://doi.org/10.14411/eje.2013.002>

Li, S., Mead, E. A., Liang, S., & Tu, Z. (2009). Direct sequencing and expression analysis of a large number of miRNAs in *Aedes aegypti* and a multi-species survey of novel mosquito miRNAs. *BMC Genomics*, 10, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-581>

- Ling, L., Ge, X., Li, Z., Zeng, B., Xu, J., Chen, X., Shang, P., James, A. A., Huang, Y., & Tan, A. (2015). MiR-2 family targets *awd* and *fng* to regulate wing morphogenesis in *Bombyx mori*. *RNA Biology*, 12(7), 742–748. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1048957>
- Liu, S., Li, D., Li, Q., Zhao, P., Xiang, Z., & Xia, Q. (2010). MicroRNAs of *Bombyx mori* identified by Solexa sequencing. *BMC Genomics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-4216-11-148>
- Liu, W., & Wang, X. (2019). Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data. *Genome Biology*, 20(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1629-z>
- Liu, Y. pu, Xu, P., Guo, C. xia, Luo, Z. rong, Zhu, J., Mou, F. fang, Cai, H., Wang, C., Ye, X. chun, Shao, S. jin, & Guo, H. dong. (2018). miR-1b overexpression suppressed proliferation and migration of RSC96 and increased cell apoptosis. *Neuroscience Letters*, 687, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.09.041>
- Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner zu Siederdisen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F., & Hofacker, I. L. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26>
- Lourenço, A. P., Guidugli-Lazzarini, K. R., Freitas, F. C. P., Bitondi, M. M. G., & Simões, Z. L. P. (2013). Bacterial infection activates the immune system response and dysregulates microRNA expression in honey bees. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(5), 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.03.001>
- Lozano, J., Montañez, R., & Bellesa, X. (2015). MiR-2 family regulates insect metamorphosis by controlling the juvenile hormone signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(12), 3740–3745. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418522112>
- Lucas, K., & Raikhel, A. S. (2013). Insect MicroRNAs: Biogenesis, expression profiling and biological functions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(1), 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.10.009>
- Ma, X., He, K., Shi, Z., Li, M., Li, F., & Chen, X. X. (2021). Large-Scale Annotation and Evolution Analysis of MiRNA in Insects. *Genome Biology and Evolution*, 13(5), 1–15. <https://doi.org/10.1093/gbe/evab083>
- MacEdo, L. M. F., Nunes, F. M. F., Freitas, F. C. P., Pires, C. V., Tanaka, E. D., Martins, J. R., Piulachs, M. D., Cristino, A. S., Pinheiro, D. G., & Simões, Z. L. P. (2016). MicroRNA signatures characterizing caste-independent ovarian activity in queen and worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Molecular Biology*, 25(3), 216–226. <https://doi.org/10.1111/imb.12214>
- MacRae, I. J., & Doudna, J. A. (2007). Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*, 17(1), 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.12.002>

Mallory, A., & Vaucheret, H. (2015). *The Plant Cell*, 22(12), 3879–3889. Marco, A., Hooks, K. B., & Griffiths-Jones, S. (2012). Evolution and function of the extended miR-2 microRNA family. *RNA Biology*, 9(3), 242–248. <https://doi.org/10.4161/rna.19160>

Marco, A., Hui, J. H. L., Ronshaugen, M., & Griffiths-Jones, S. (2010). Functional shifts in insect microRNA evolution. *Genome Biology and Evolution*, 2(1), 686–696. <https://doi.org/10.1093/gbe/evq053>

Martelli, F., Falcon, T., Pinheiro, D. G., Simões, Z. L. P., & Nunes, F. M. F. (2022). Worker bees (*Apis mellifera*) deprived of pollen in the first week of adulthood exhibit signs of premature aging. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 146(July 2021). <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2022.103774>

Menzel, R. (1993). Associative learning in honey bees. *Apidologie*, 24(3), 157–168. <https://doi.org/10.1051/apido:19930301>

Meunier, J., Lemoine, F., Soumillon, M., Liechti, A., Weier, M., Guschanski, K., Hu, H., Khaitovich, P., & Kaessmann, H. (2013). Birth and expression evolution of mammalian microRNA genes. *Genome Research*, 23(1), 34–45. <https://doi.org/10.1101/gr.140269.112>

Nelson, C. M., Ihle, K. E., Fondrk, M. K., Page, R. E., & Amdam, G. V. (2007). The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biology*, 5(3), 0673–0677. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050062>

Nicholson, A. W. (2014). Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 5(1), 31–48. <https://doi.org/10.1002/wrna.1195> 22 Ninova, M., Ronshaugen, M., & Griffiths-Jones, S. (2014). Fast-evolving microRNAs are highly expressed in the early embryo of *Drosophila virilis*. *Rna*, 20(3), 360–372. <https://doi.org/10.1261/rna.041657.113>

Orr, M. C., Hughes, A. C., Chesters, D., Pickering, J., Zhu, C. D., & Ascher, J. S. (2021). Global Patterns and Drivers of Bee Distribution. *Current Biology*, 31(3), 451-458.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.10.053>

Ostroverkhova, N. V. (2021). Association between the microsatellite Ap243, AC117 and SV185 polymorphisms and *Nosema* disease in the dark forest bee *Apis mellifera mellifera*. *Veterinary Sciences*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/VETSCI8010002>

Partin, A. C., Zhang, K., Jeong, B. C., Herrell, E., Li, S., Chiu, W., & Nam, Y. (2020). Cryo32 EM Structures of Human Drosha and DGCR8 in Complex with Primary MicroRNA. *Molecular Cell*, 78(3), 411-422.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.02.016>

Patalano, S., Vlasova, A., Wyatt, C., Ewels, P., Camara, F., Ferreira, P. G., Asher, C. L., 35 Jurkowski, T. P., Segonds-Pichon, A., Bachman, M., González-Navarrete, I., Minoche, A. E., Krueger, F., Lowy, E., Marcet-Houben, M., Rodríguez-Ales, J. L., Nascimento, F. S., Balasubramanian, S., Gabaldon, T., ... Sumner, S. (2015). Molecular signatures of plastic phenotypes in two eusocial insect species with simple societies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(45), 13970–13975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515937112>

Performance, O., Apis, B., Huang, J., Wang, T., Qiu, Y., Hassanyar, A. K., Zhang, Z., Lin, Y., 7 Li, Z., & Su, S. (2023). Differential Brain Expression Patterns of microRNAs Related to. Peterson, S. M., Thompson, J. A., Ufkin, M. L., Sathyanarayana, P., Liaw, L., & Congdon, C. B. (2014). Common features of microRNA target prediction tools. *Frontiers in Genetics*, 5(FEB), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00023>

Poole, C. B., Gu, W., Kumar, S., Jin, J., Davis, P. J., Bauche, D., & McReynolds, L. A. (2014). Diversity and expression of microRNAs in the filarial parasite, *Brugia malayi*. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096498>

Qin, K., Cheng, F., Pan, L., & Wang, Z. (2022). Expression Profile of microRNAs during Development of the Hypopharyngeal Gland in Honey Bee, *Apis mellifera*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21). <https://doi.org/10.3390/ijms232112970>

Raikhel, A. S., & Dhadialla, T. S. (1992). Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annual Review of Entomology*, 37(1), 217–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.001245>

Rehmsmeier, M., Steffen, P., Höchsmann, M., & Giegerich, R. (2004). Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *Rna*, 10(10), 1507–1517. <https://doi.org/10.1261/rna.5248604>

Rubin, B. E. R., Jones, B. M., Hunt, B. G., & Kocher, S. D. (2019). Rate variation in the evolution of non-coding DNA associated with social evolution in bees. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1777). <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0247>

Ruby, J. G., Stark, A., Johnston, W. K., Kellis, M., Bartel, D. P., & Lai, E. C. (2007). Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome Research*, 17(12), 1850–1864. <https://doi.org/10.1101/gr.6597907>

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evo*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/citeulike-article-id:93683>

Salmela, H., Amdam, G. V., & Freitak, D. (2015). Transfer of Immunity from Mother to Offspring Is Mediated via Egg-Yolk Protein Vitellogenin. *PLoS Pathogens*, 11(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005015>

Seehuus, S. C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., & Amdam, G. V. (2006). Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(4), 962–967. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502681103>

Shi, T., Zhu, Y., Liu, P., Ye, L., Jiang, X., Cao, H., & Yu, L. (2021). Age and behavior dependent differential miRNAs expression in the hypopharyngeal glands of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insects*, 12(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/INSECTS12090764>

Skalsky, R. L., Vanlandingham, D. L., Scholle, F., Higgs, S., & Cullen, B. R. (2010). Identification of microRNAs expressed in two mosquito vectors, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus*. *BMC Genomics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-119>

Soares, M. P. M., Pinheiro, D. G., de Paula Freitas, F. C., Simões, Z. L. P., & Bitondi, M. M. G. (2021). Transcriptome dynamics during metamorphosis of imaginal discs into wings and thoracic dorsum in *Apis mellifera* castes. *BMC Genomics*, 22(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08040-z>

Stark, A., Kheradpour, P., Parts, L., Brennecke, J., Hodges, E., Hannon, G. J., & Kellis, M. (2007). Systematic discovery and characterization of fly microRNAs using 12 *Drosophila* genomes. *Genome Research*, 17(12), 1865–1879. <https://doi.org/10.1101/gr.6593807>

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 20 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>

Tian, Y., Qu, Y., Dong, K., He, S., Jie, W., & Huang, J. (2021). Characterization and Developmental Expression Patterns of Four Hexamerin Genes in the Bumble Bee, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Science*, 21(5). <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab078>

Vieira, J., Freitas, F. C. P., Cristino, A. S., Moda, L. M. R., Martins, J. R., Bitondi, M. M. G., Simões, Z. L. P., & Barchuk, A. R. (2021). miRNA-34 and miRNA-210 target hexamerin genes enhancing their differential expression during early brain development of honeybee (*Apis mellifera*) castes. *Insect Molecular Biology*, 30(6), 594–604. <https://doi.org/10.1111/imb.12728>

Wang, G. H., Jiang, L., Zhu, L., Cheng, T. C., Niu, W. H., Yan, Y. F., & Xia, Q. Y. (2013). Characterization of Argonaute family members in the silkworm, *Bombyx*

mori. *Insect Science*, 20(1), 78–91. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2012.01555.x>

Wang, Y., Brent, C. S., Fennern, E., & Amdam, G. V. (2012). Gustatory perception and fat body energy metabolism are jointly affected by vitellogenin and juvenile hormone in honey bees. *PLoS Genetics*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002779>

Wang, Y., Sheng, G., Juranek, S., Tuschl, T., & Patel, D. J. (2008). Structure of the guide strand-containing argonaute silencing complex. *Nature*, 456(7219), 209–213. <https://doi.org/10.1038/nature07315>

Weaver, D. B., Anzola, J. M., Evans, J. D., Reid, J. G., Reese, J. T., Childs, K. L., Zdobnov, E. M., Samanta, M. P., Miller, J., & Elisk, C. G. (2007). Computational and transcriptional evidence for microRNAs in the honey bee genome. *Genome Biology*, 8(6). <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-6-r97>

Wheeler, B. M., Heimberg, A. M., Moy, V. N., Sperling, E. A., Holstein, T. W., Heber, S., & Peterson, K. J. (2009). The deep evolution of metazoan microRNAs. *Evolution and Development*, 11(1), 50–68. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2008.00302.x>

Wu, Z., Yang, L., He, Q., & Zhou, S. (2021). Regulatory Mechanisms of Vitellogenesis in Insects. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(January), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.593613>

Wynant, N., Santos, D., Subramanyam, S. H., Verlinden, H., & Vanden Broeck, J. (2015). Droscha, Dicer-1 and Argonaute-1 in the desert locust: Phylogenetic analyses, transcript profiling and regulation during phase transition and feeding. *Journal of Insect Physiology*, 75, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.02.010>

Xiao, F., Zuo, Z., Cai, G., Kang, S., Gao, X., & Li, T. (2009). miRecords: An integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1), 105–110. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn851>

Zhang, B. H., Pan, X. P., Cox, S. B., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2006). Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(2), 246–254. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5467-7>

Zhang, B., Stellwag, E. J., & Pan, X. (2009). Large-scale genome analysis reveals unique of microRNAs. *Gene*, 443(1–2), 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.04.0>

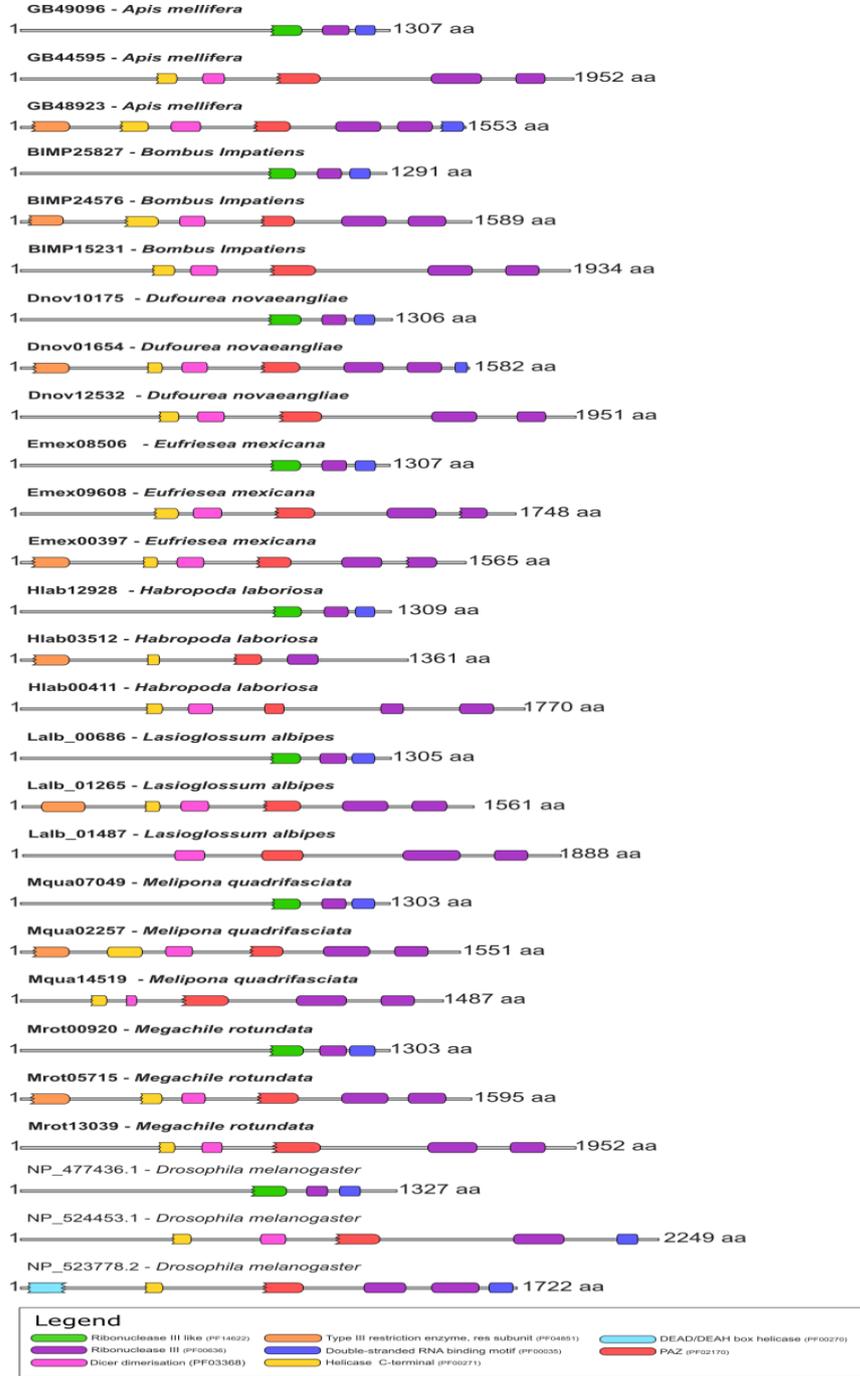
Zhang, S., Dong, Y., & Cui, P. (2015). Vitellogenin is an immunocompetent molecule for mother and offspring in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 46(2), 710–715. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.08.011>

Zhang, X., Zheng, Y., Jagadeeswaran, G., Ren, R., Sunkar, R., & Jiang, H. (2014). Identification of conserved and novel microRNAs in *Manduca sexta* and their possible roles in the expression regulation of immunity-related genes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 47(1), 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.01.008>

Zhao, D., Wang, Y., Luo, D., Shi, X., Wang, L., Xu, D., Yu, J., & Liang, Y. (2010). PMirP: A pre-microRNA prediction method based on structure-sequence hybrid features. *Artificial Intelligence in Medicine*, 49(2), 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.artmed.2010.03.004>

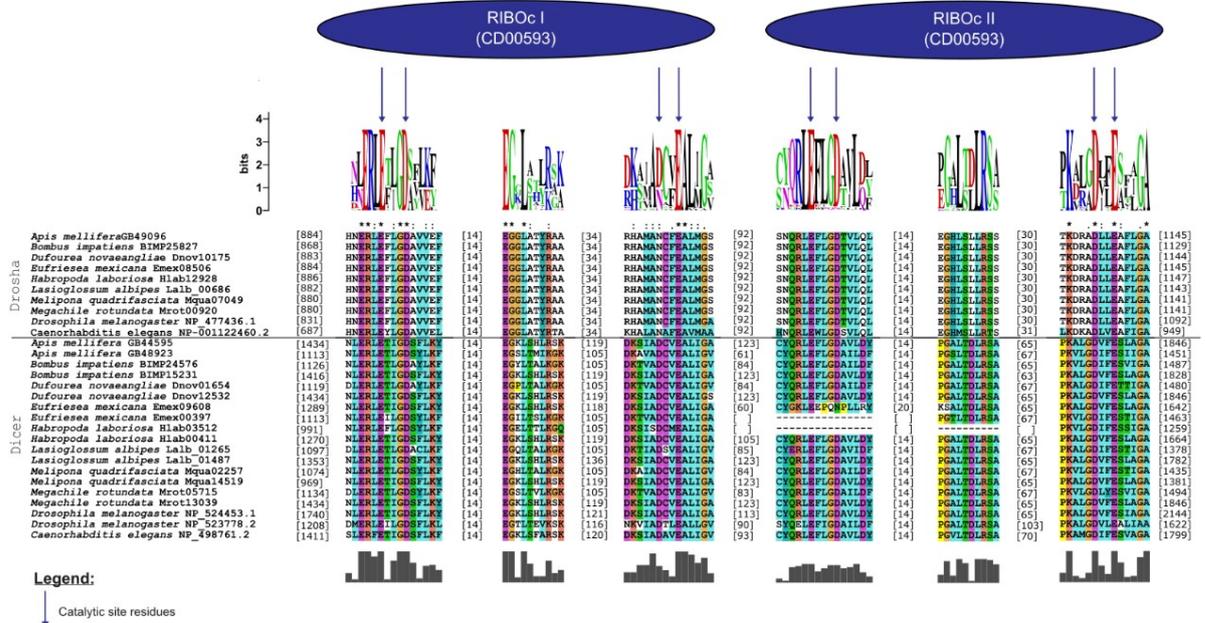
SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary Figure S1.



Conserved domains founded in RNase III (DICER and DROSHA) 5 proteins of studied species versus the model organism *Drosophila melanogaster*.

Supplementary Figure S2



Analysis of RNase III (Riboc I and II) conserved domains of DICER and DROSHA proteins found in the bees and their orthologues.

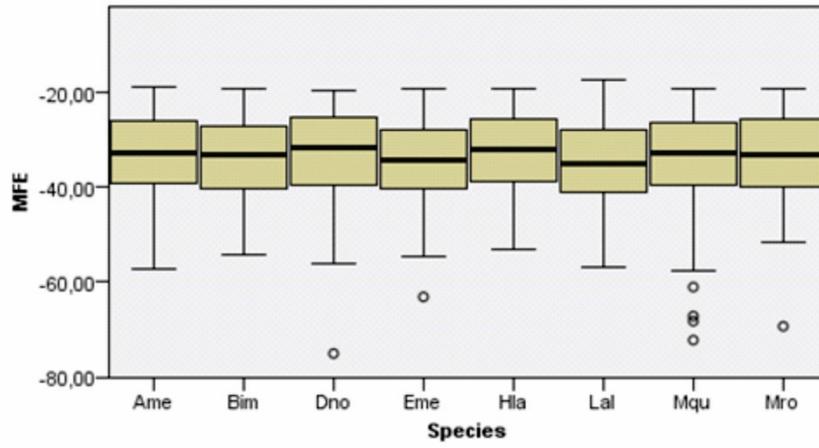
Supplementary Figure S3.



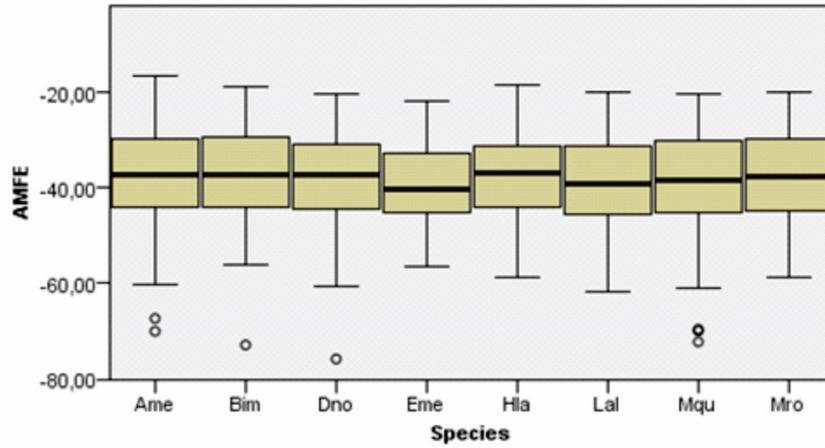
Phylogenetic analysis of DICER and DROSHA proteins found in the bees and their orthologues

Supplementary Figure S4.

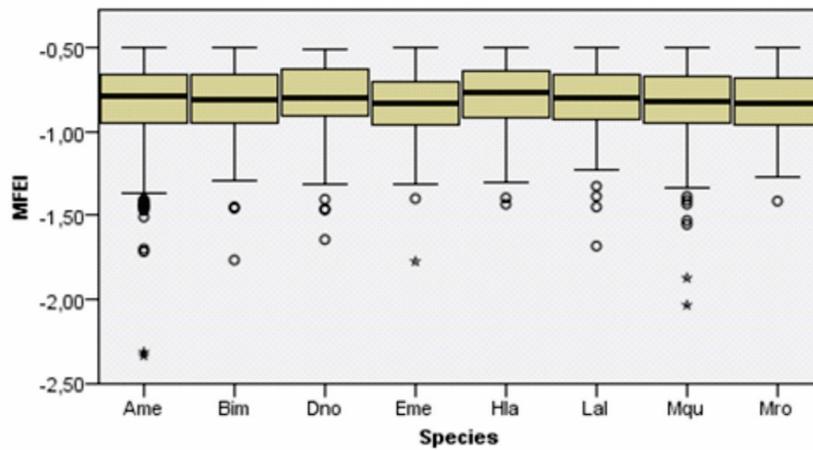
A



B

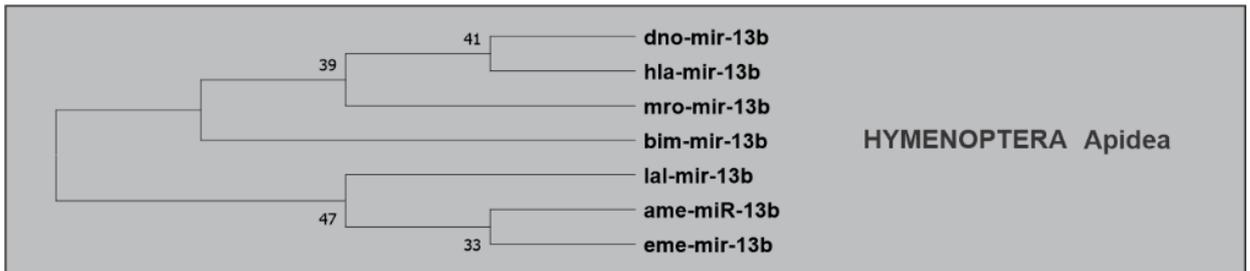


C



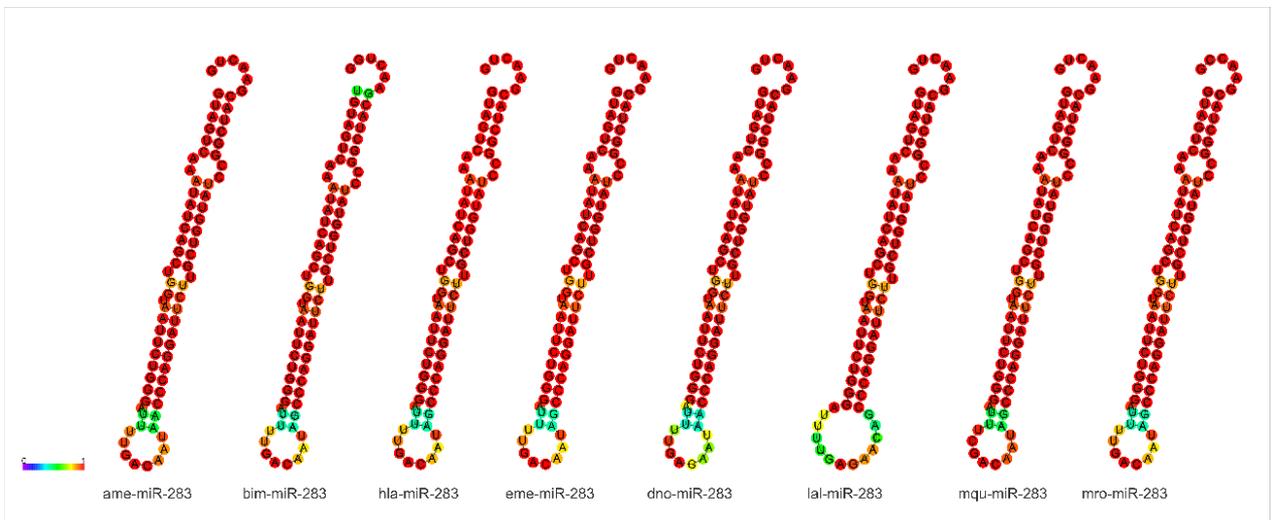
Statistical analysis of pre-miRNAs MFE, AMFE and MFEI parameters in the eight subject species.

Supplementary Figure S5-A.



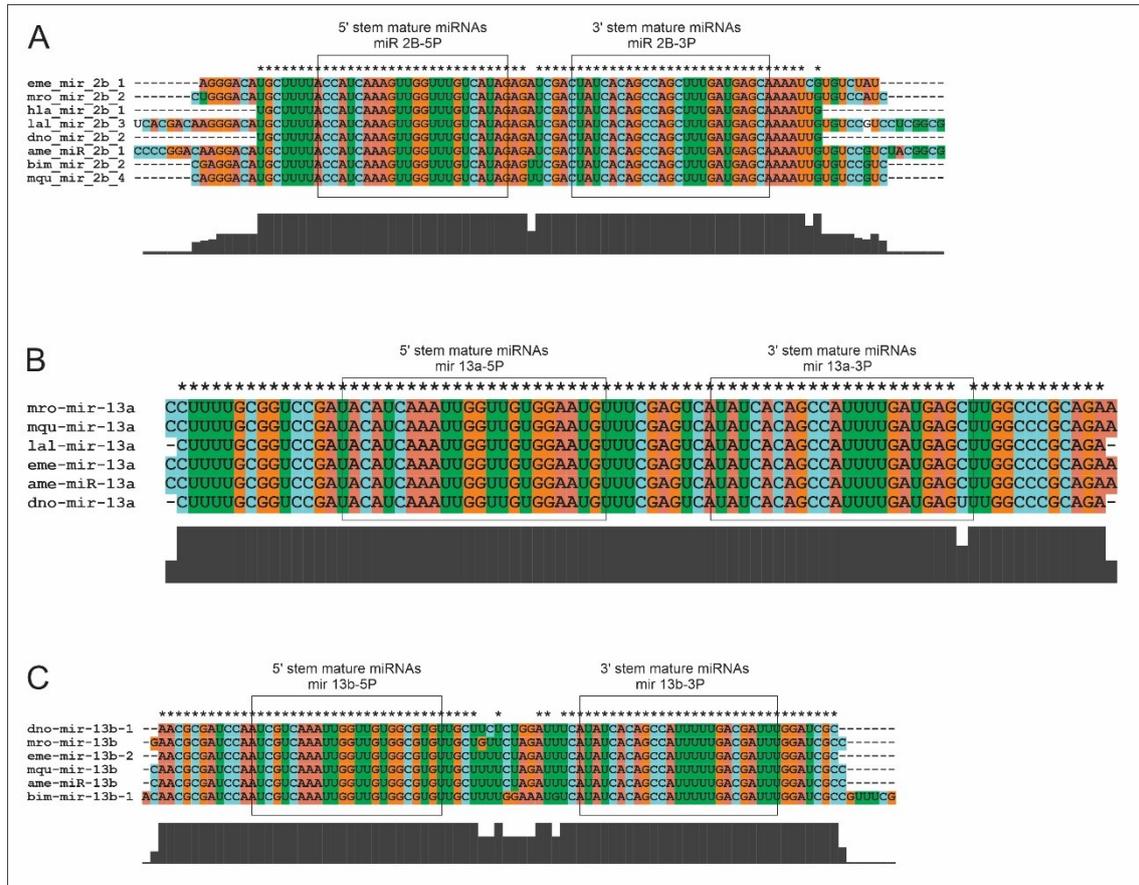
Alignment of *miR-2b* precursors; ame: *Apis mellifera*; bim: *Bombus impatiens*; dno: *Duforea novaeangliae*; eme: *Eufresia mexicana*; hla: *Habropoda laboriosa*; lal: *Lasioglossum albipes*; mqu: *Melipona quadrifasciata* and mro: *Megachile rotundata*;

Supplementary Figure S5-B



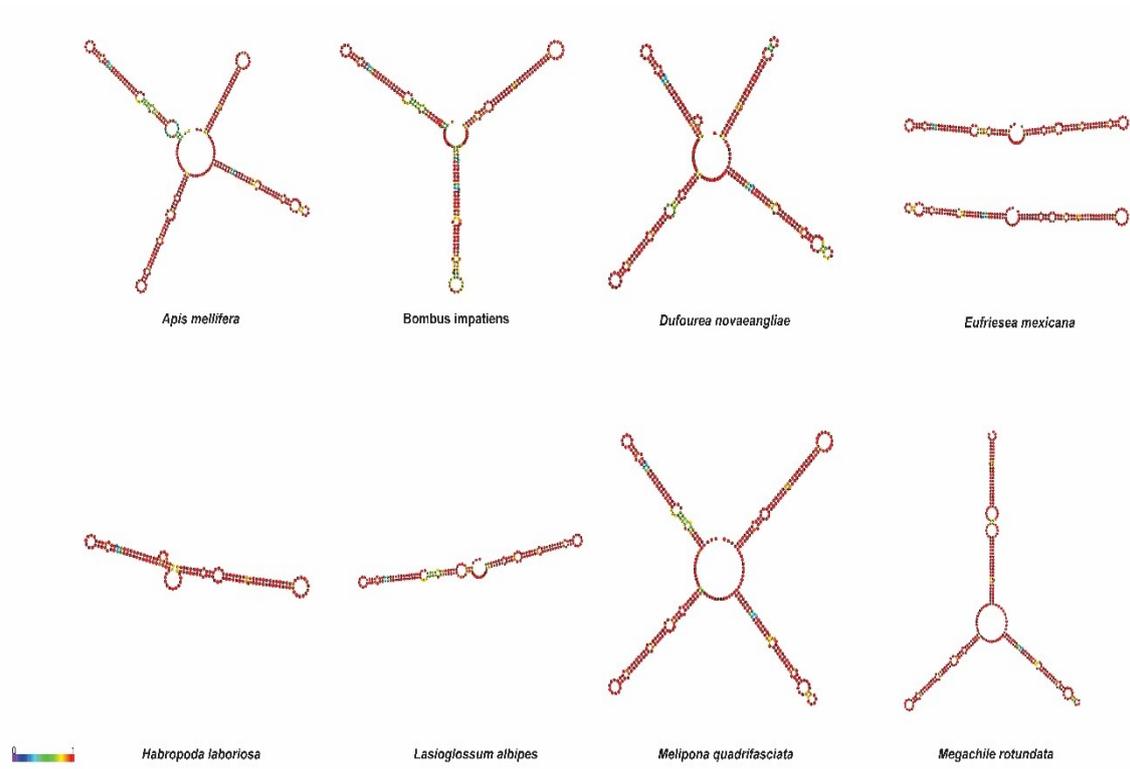
Alignment of *miR-13a* precursors; ame: *Apis mellifera*; dno: *Duforea novaeangliae*; eme: *Eufresia mexicana*; lal: *Lasioglossum albipes*; mqu: *Melipona quadrifasciata* and mro: *Megachile rotundata*;

Supplementary Figure S5-C



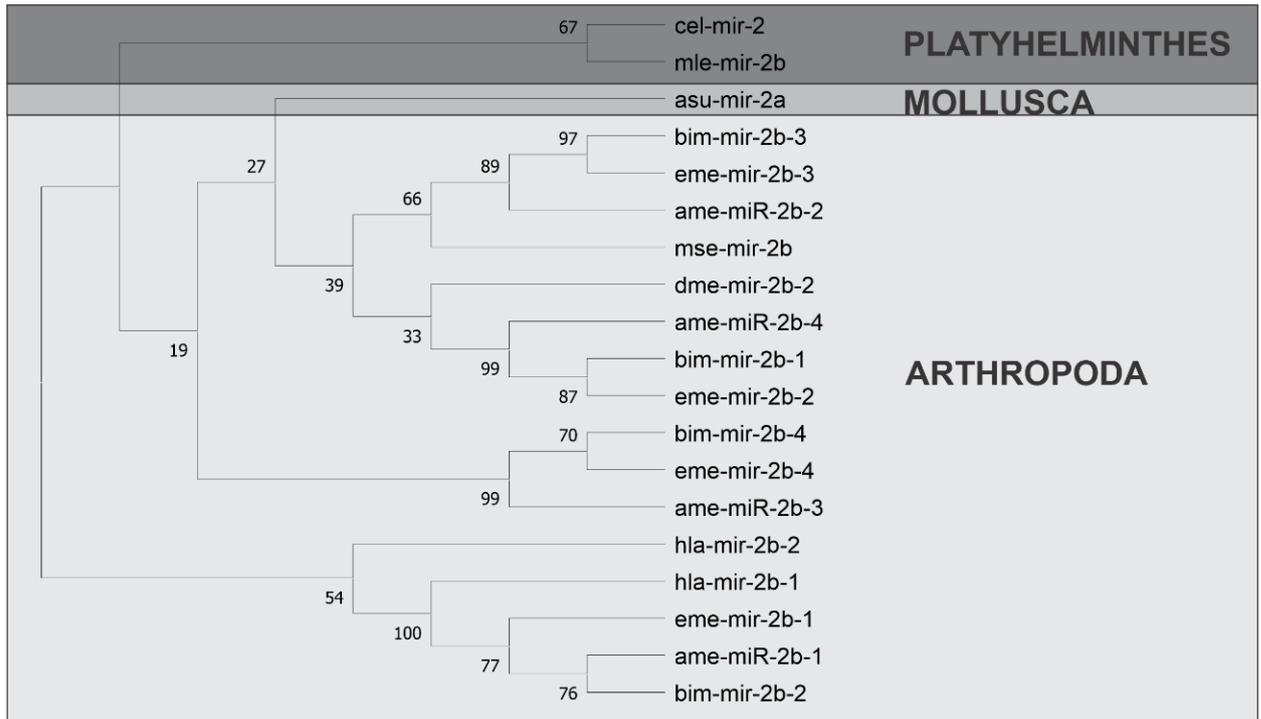
Alignment of *miR-13b* precursors; ame: *Apis mellifera*; bim: *Bombus impatiens*; dno: *Duforea novaeangliae*; eme: *Eufresia mexicana*; mqu: *Melipona quadrifasciata* and mro: *Megachile rotundata*;

Supplementary Figure S6



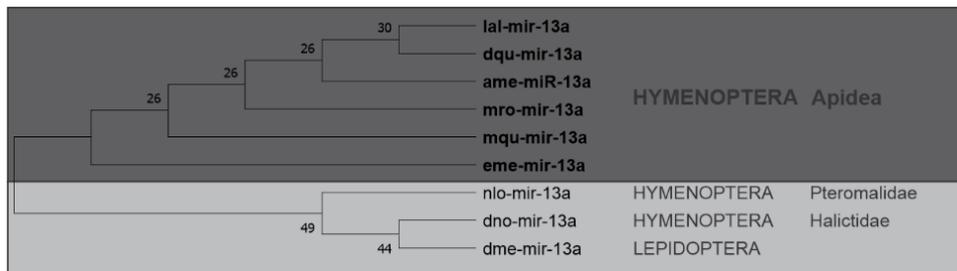
Secondary structure of cluster *mir-2b/13* pre-miRNA

Supplementary Figure S7



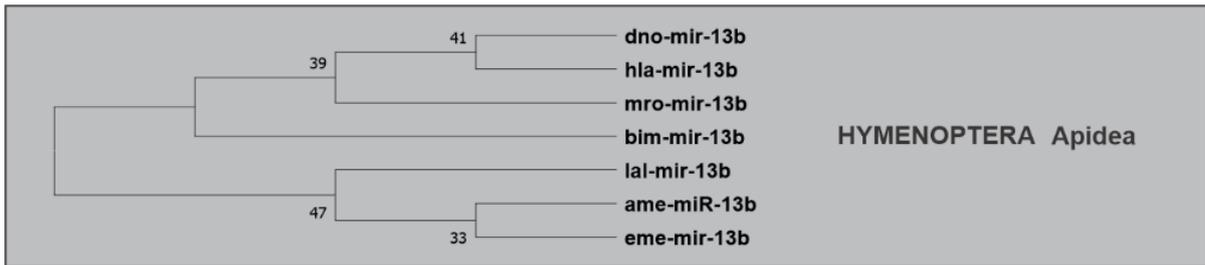
Phylogenetic tree performed to *miR-2b* precursors identified in the bees and their orthologs; cel: *Caenorhabditis elegans*; ame: *Apis mellifera*; bim: *Bombus impatiens*; eme: *Eufresia mexicana*; mle: *Melibe leonina*; asu: *Ascaris suum*; mse: *Manduca sexta*; dme: *Drosophila melanogaster*; hla: *Habropoda laboriosa*.

Supplementary Figure S8



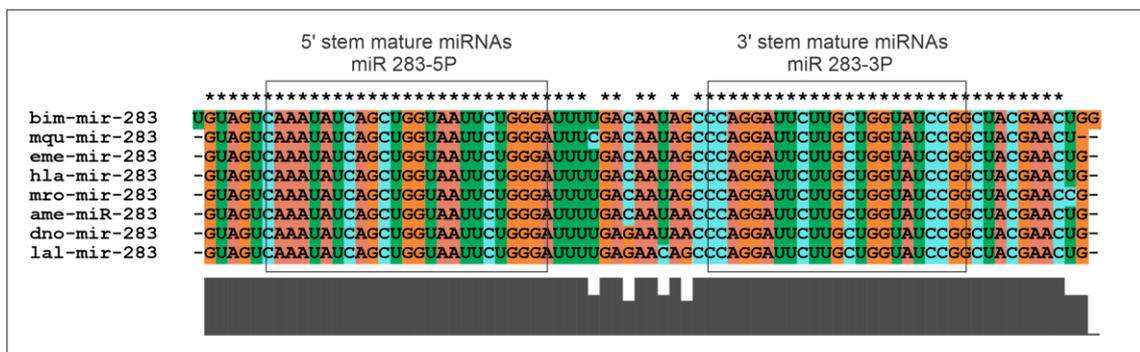
Phylogenetic tree performed to *miR-13a* precursors identified in the bees and their orthologs; lal: *Lasioglossum albipes*; dqu: *Dinoponera quadriceps*; ame: *Apis mellifera*; mro: *Megachile rotundata*; mqu: *Melipona quadrifasciata*; eme: *Eufresia mexicana*; nlo: *Nasonia longicornis*; dno: *Duforea novaeangliae*; dme: *Drosophila melanogaster*.

Supplementary Figure S9.



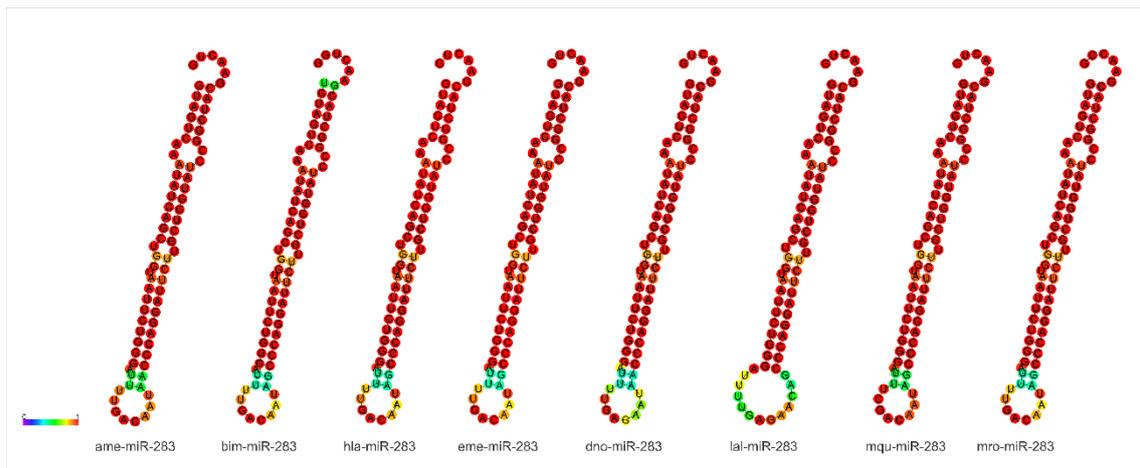
Phylogenetic tree performed to *miR-13b* precursors identified in the bees and their orthologs; dno: *Duforea novaeangliae*; hla: *Habropoda laboriosa*; mro: *Megachile rotundata*; bim: *Bombus impatiens*; lal: *Lasioglossum albipes*; ame: *Apis mellifera*; eme: *Eufresia mexicana*;

Supplementary Figure S10.



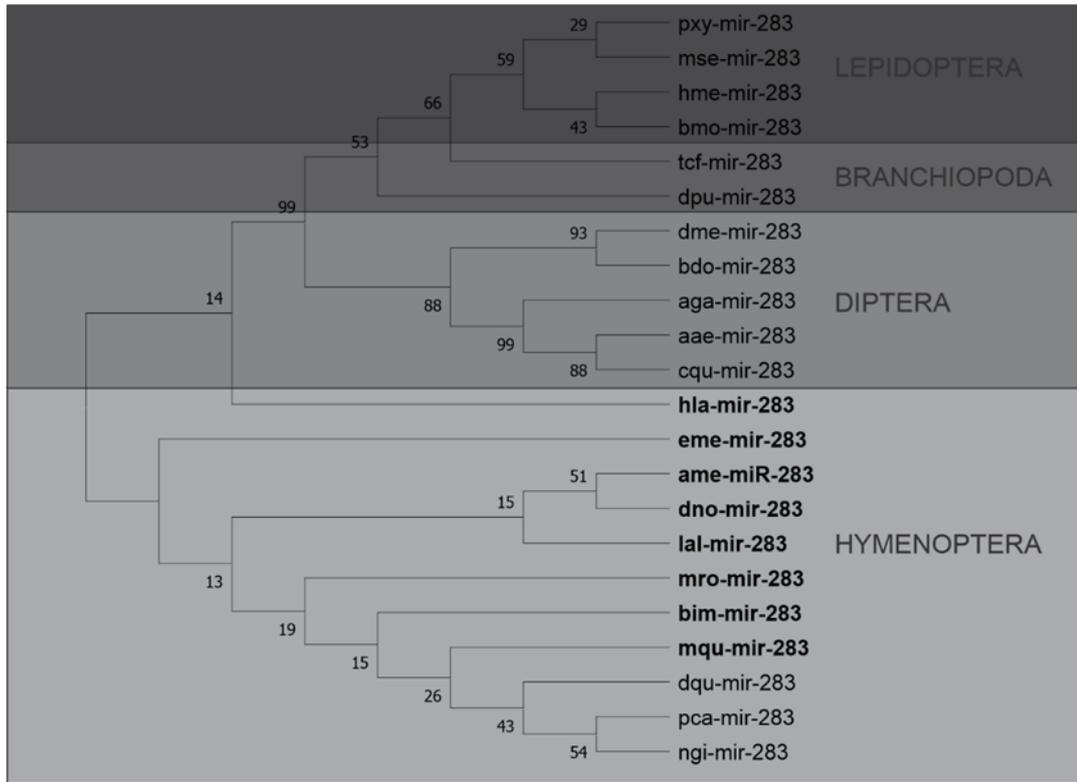
Alignment of *miR-283* precursors; ame: *Apis mellifera*; bim: *Bombus impatiens*; dno: *Duforea novaeangliae*; eme: *Eufresia mexicana*; hla: *Habropoda laboriosa*; lal: *Lasioglossum albipes*; mqu: *Melipona quadrifasciata* and mro: *Megachile rotundata*.

Supplementary Figure S11



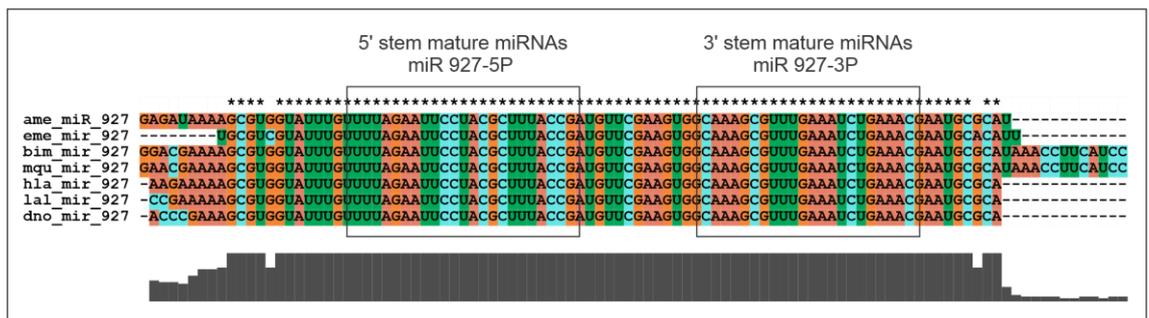
Secondary structure of the *mir-283* pre-miRNA; ame: *Apis mellifera*; bim: *Bombus impatiens*; dno: *Duforea novaeangliae*; eme: *Eufresia mexicana*; hla: *Habropoda laboriosa*; lal: *Lasioglossum albipes*; mqu: *Melipona quadrifasciata* and mro: *Megachile rotundata*;

Supplementary Figure S12



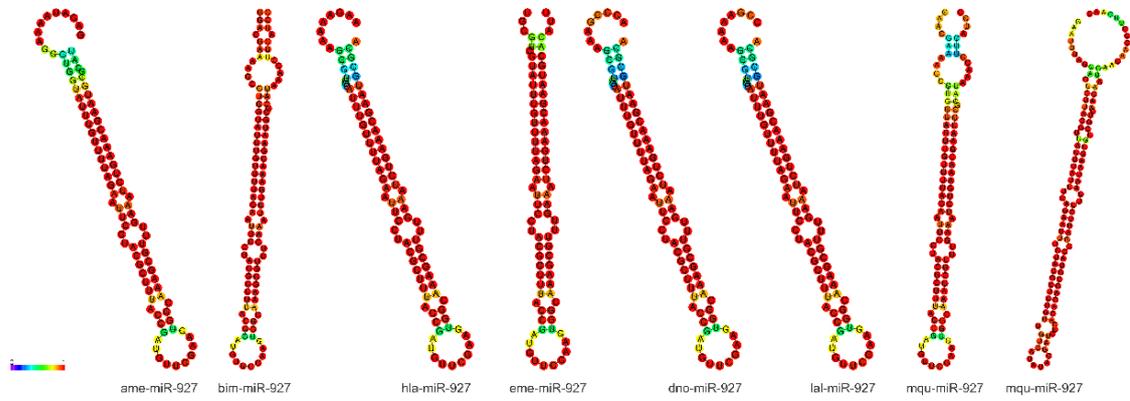
Phylogenetic tree performed to *miR-283* precursors identified in the bees and their orthologs; ame: *Apis mellifera*; bim: *Bombus impatiens*; dno: *Duforea novaeangliae*; eme: *Eufresia mexicana*; hla: *Habropoda laboriosa*; lal: *Lasioglossu albipes*; mqu: *Melipona quadrifasciata*; mro: *Megachile rotundata*; pxy: *Plutella xylostella*; mse: *Manduca sexta*; hme: *Heliconius melpomene*; bmo: *Bombyx mori*; tcf: *Triops cancriformis*; dpu: *Daphnia pulex*; dme: *Drosophila melanogaster*; bdo: *Bactrocera dorsalis*; aga: *Anopheles gambiae*; aae: *Aedes aegypti*; cqu: *Culex quinquefasciatus*; dqu: *Dinoponera quadriceps*; pca: *Polistes canadensis* and ngi: *Nasonia giraulti*.

Supplementary Figure S13



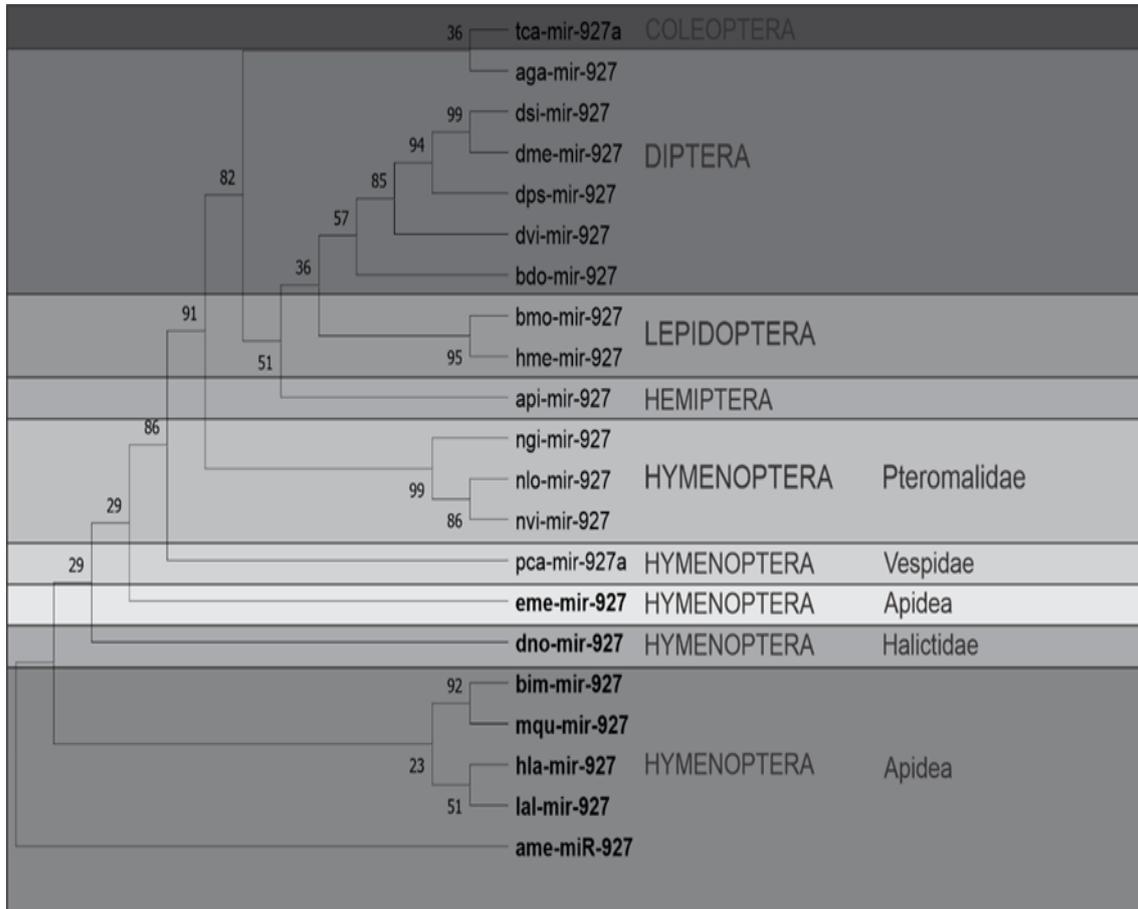
Alignment of *miR-927* precursors; ame: *Apis mellifera*; bim: *Bombus impatiens*; dno: *Duforea novaeangliae*; eme: *Eufresia mexicana*; hla: *Habropoda laboriosa*; lal: *Lasioglossum albipes* and mqu: *Melipona quadrifasciata*.

Supplementary Figure S14



Secondary structure of the *mir-927* pre-miRNA; ame: *Apis mellifera*; bim: *Bombus impatiens*; dno: *Duforea novaeangliae*; eme: *Eufresia mexicana*; hla: *Habropoda laboriosa*; lal: *Lasioglossum albipes*; mqu: *Melipona quadrifasciata* and dno: *Duforea novaeangliae*.

Supplementary Figure S15



Phylogenetic tree performed to miR-927 precursors identified in the bees; *tca*: *Tribolium castaneum*; *aga*: *Anopheles gambiae*; *dsi*: *Drosophila simulans*; *dme*: *Drosophila melanogaster*; *dps*: *Drosophila pseudoobscura*; *dvi*: *Drosophila virilis*; *bdo*: *Bactrocera dorsalis*; *bmo*: *Bombyx mori*; *hme*: *Heliconius melpomene*; *api* *ngi*: *Nasonia giraulti*; *nlo*: *Nasonia longicornis*; *nvi*: *Nasonia vitripennis*; *pca*: *Polistes canadenses*; *eme*: *Eufresia mexicana*; *dno*: *Duforea novaeangliae*; *bim*: *Bombus impatiens*; *mqu*: *Melipona quadrifasciata*; *hla*: *Habropoda laboriosa*. *lal*: *Lasioglossum albipes*; *ame*: *Apis mellifera*.

SUPPLEMENTARY DATA (arquivo anexo)

4 CAPÍTULO III - DIFERENTES ESTÁGIOS DE FERMENTAÇÃO DO CAFÉ (COFFEA ARÁBICA L. CV. CATIGUÁ MG2): IMPACTOS DO PROCESSAMENTO PÓS-COLHEITA NA QUALIDADE DO GRÃO BENEFICIADO

**Artigo de pesquisa original – Sofrerá alterações e consolidação para se enquadrar ao corpo editorial da revista a que será submetido após avaliação e convalidação da banca examinadora.*

RESUMO

O café é um produto no qual a qualidade sensorial está diretamente relacionada ao valor comercial no mercado final, então, aprimorar tal qualidade pode significar aumento da renda do cafeicultor e de toda a região na qual este produto foi produzido. Produtividade e qualidade de bebida de cultivares de *Coffea arabica* L. na região do Cerrado Mineiro é uma região de importante cultivo do cafeeiro. O uso de variedades adequadas é de fundamental importância para o sucesso de qualquer atividade agrícola. Nesse estudo avaliou-se o cultivar resistente a Ferrugem (*Coffea Arabica* L. cv. Catigua' MG2). No experimento utilizou-se o fruto do café Cereja e Cereja Descascado, com processamento de fermentações em anaerobiose induzida em estado sólido (FES), sem a adição de água, e submerso, com adição de 30% do volume de água, nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas para todos os experimentos a fim de avaliar a etapa de fermentação com relação às variáveis tempo e temperatura, e obtendo de dados como respostas pH da massa fermentativa, umidade do fruto (durante o processo), teor de açúcares e ácidos orgânicos (HPLC) e qualidade sensorial avaliada pela metodologia da Associação de Cafés Especiais (*Specialty Coffee Association* – SCA). Café cereja apresenta cerca de duas vezes mais Brix do que o café CD. Para os Ácidos Lático e Acético foi observado aumento acentuado das concentrações para todos os tratamentos. O Ácido cítrico, Ácidos Málico e Succínico decaem gradualmente ao longo do tempo. Os atributos sensoriais definidos pelos *Q-graders* o café submetido com processamento em estado sólido teve melhor performance.

Palavras-Chave: *Coffea Arabica* L. Ácidos Orgânicos. Açúcares Totais. Análise Sensorial.

1 Introdução

O café é uma das bebidas mais consumidas e comercializadas no mundo e seu consumo tende a aumentar (YEOH; NG, 2022). Comercialmente o café representa a segunda *commodity* global mais comercializada e valorizada no mercado depois do petróleo (ICO, 2023). Para o ano cafeeiro 2022/23, estima-se que a produção mundial de café (Arábica e Robusta) seja de 10.368 milhões de toneladas, um aumento de 396,0 milhões de toneladas em relação ao ano anterior, e seu consumo esperado é presumido em 10.074 milhões de toneladas impulsionadas pela demanda da União Europeia, Estados Unidos e Brasil (CONAB, 2023).

Os consumidores de café estão exigindo cada vez mais grãos de café artesanais, com foco na qualidade havendo, assim, um incremento no mercado de cafés especiais, caracterizados por sua maior qualidade da xícara (LIMA et al. 2020). As mudanças nos gostos e preferência dos consumidores moldaram o mercado de café e alavancaram o nicho dos cafés especiais e o estabelecimento dos preços do café no mercado que passa a considerar o valor agregado do produto (MAGALHÃES JUNIOR et al., 2021; GALARZA, FIGUEIROA, 2022).

De acordo com *Specialty Coffee Association* (SCA), o termo café especial é uma denominação imputada a uma bebida que tem uma qualidade superior aos disponíveis a preços de commodities (MARTINEZ et al., 2021). Esses café se destacam, sobretudo, pela qualidade sensorial e os atributos de fragrância/aroma, uniformidade, ausência de defeitos, doçura, sabor, acidez, corpo, retrogosto, equilíbrio, defeitos e nota final devem estar em conformidade com metodologias padronizadas pela SCA. O método consiste em uma análise sensorial realizada por *Q-graders* certificados, usando amostras de café torrado sendo o único teste reconhecido atualmente para definir o café especial por pesquisadores do mercado internacional e da fermentação do café (LINGLE 2011; CARDOSO et al, 2021; SCA, 2018). Além da qualidade intrínseca, os cafés especiais devem ter rastreabilidade certificada e respeitar critérios de sustentabilidade incluindo a otimização das condições ambientais, sociais e econômicas, em todas as etapas de produção (GIOMO e BORÉM, 2011).

No entanto o processamento do café começa logo após a colheita dos grãos de café e o objetivo é converter os frutos cerejas de café em grãos verdes (WU et al., 2022). Os seus atributos aromáticos e de sabor são diretamente influenciados pelos métodos de processamento pós-colheita. (MAGALHÃES JUNIOR *et al.*, 2021; GALARZA, FIGUEIROA, 2022). Atentos à influência dessa etapa, os produtores de café vêm buscando novas práticas pós-colheita, visando aumentar a qualidade de seus cafés e diferenciação sensorial para atender o mercado (BRESSANI et al., 2021; MARTINEZ et al., 2021). O método de processamento via úmida consiste principalmente na retirada de diferentes partes do fruto do café, como exocarpo (polpa) e mesocarpo (mucilagem), para obtenção do endosperma (grão verde), que é recoberto pelo endocarpo (pergaminho) (ELHALIS et al, 2023, HAILE; KANG, 2019).

Processos de manejo no pós-colheita evoluíram ao longo dos anos. A utilização da fermentação anaeróbica autoinduzida (SIAF) é uma nova tecnologia utilizada para fermentar cafés nos quais a anaerobiose se forma gradativamente através metabolismo microbiano (MOTA et al., 2022; CASSIMIRO et al., 2022). Essa estratégia melhora o desempenho fermentativo de microrganismos durante o processamento natural, despulpado e úmido. Por conseguinte, a produção de compostos voláteis e não voláteis é intensificada pelas inúmeras reações microbiológicas não se limitam apenas à produção de etanol ou ácido lático a partir do consumo de glicose, mas também envolve a degradação de aminoácidos, polissacarídeos, produção de outros ácidos, diminuição e/ou aumento de compostos fenólicos, diminuição do teor de cafeína dentre outros.

O processo contribui para a formação de sabores, novos perfis sensoriais e aumenta a nota final em cafés processados, aromas nas bebidas de café e uniformidade do produto. Todavia, por se tratar de um processo complexo que envolve grande diversidade de microrganismos e enzimas precisa ser bem compreendido e dominado pelos produtores (BRESSANI et al., 2021; ELHALIS et al., 2020; CARDOSO et al, 2021).

Métodos e técnicas indicando e padronizando a fermentação do café já foram patenteada ultimamente e aspectos múltiplos são apontados por essas técnicas como o desenvolvimento de equipamentos para uso na fermentação induzida de frutos de café sob diferentes condições de disponibilidade de oxigênio,

temperatura, agitação e uso de microrganismos inoculantes (PALINI E ALVES, 2022; SOCCOL et al., 2022). Os grãos beneficiados são submetidos à secagem solar ou mecânica até atingir umidade entre 10% e 12% (café em pergaminho seco). Tornando o grão mais estáveis e adequados para armazenamento, transporte e processo de torrefação, moagem e preparo da bebida (BASTIAN et al., 2021).

Cultivares do Programa de Melhoramento Genético da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) o Catiguá MG2, Catiguá MG1 e a descendência H419-6-2-5-3 (todas derivadas do cruzamento com Híbrido de Timor) foram avaliados segundo critérios da SCA para avaliação de cafés especiais e todos apresentaram pontuações acima 90 pontos em pelo menos uma amostra, indicando seu grande potencial para a produção de cafés especiais (Pereira et al., 2008). O café *Coffea arabica* L. cv. Catiguá MG2 (Híbrido de Timor UFV 440-10 x Catuaí Amarelo IAC 86) foi desenvolvido para ser resistente à Ferrugem (*Hemileia vastatrix*), e sua planta apresenta características peculiares por ser uma árvore de pequeno porte, ramos plagiotrópicos apresentam internódios curtos, com ramificação secundária abundante e folhas novas de cor bronze claro; os frutos graúdos e de cor vermelha quando maduros e principalmente pela alta qualidade de xícara que tem sido recomendada para a produção de cafés especiais (Oliveira; Pereira 2014).

Neste contexto, buscou-se avaliar detalhadamente os diferentes protocolos para a condução da etapa de fermentação do café cultivar *Coffea arabica* L. cv. Catiguá MG2, que ainda é pouco estudada, na região do Cerrado Mineiro. Observando a fermentação como uma etapa influenciada por variáveis como: tratamento do café (natural e descascado), disponibilidade de oxigênio, adição de água, pH e tempo de fermentação. Para tanto analisou-se a composição química do fruto, produção de ácidos orgânicos e o consumo de açúcares. Além disso, correlacionou-se essas variáveis aplicadas à fermentação na qualidade sensorial final da bebida na xícara com base no protocolo SCA. Este estudo poderá contribuir para o melhor entendimento e conhecimento da influência do processo fermentativo na qualidade da produção de cafés resistentes a Ferrugem; promover melhores condições de controle do processo e, conseqüentemente, maior reprodutibilidade dos resultados.

2 Materiais e métodos

2.1 Fermentação induzida de cafés e delineamento dos experimentos

Foi utilizado o cultivar *Coffea arabica* L. cv. Catiguá MG2, produzido na fazenda Santiago, de propriedade do produtor rural Elmiro Alves do Nascimento, localizada no Município de Presidente Olegário, região do Alto Paranaíba com latitude 18° 53' 45, altitude 1150 m e longitude de 46° 31'84, no estado de Minas Gerais, Brasil. As amostras de café foram colhidas de forma mecanizada na safra de 2021/2022 e utilizados frutos cerejas e cerejas descascados (CD). Após a colheita, parcela dos frutos colhidos submetidos a lavagem foram descascados, seguindo os protocolos da fazenda, para a obtenção do café CD (MESQUITA, 2016).

As amostras foram divididas em grupos experimentais conforme seu tempo de fermentação que variaram em 0, 24, 48, 72 e 96 horas, cada um desses grupos foi composto por 4 amostras com processamentos: Cereja seco, Cereja submerso, CD submerso e CD seco. Não houve adição de inóculo microbiológico nos experimentos.

O modelo de biorreator utilizado no experimento foi o de bombona plástica de polipropileno atóxica, de 200 litros de capacidade. Para o experimento do cultivar Catiguá MG2, foram utilizados um total de 20 bombonas. Todas as bombonas foram previamente higienizadas com água e Ácido Peracético 0,3% (NASCIMENTO et al, 2015).

Todas as fermentações ocorreram em anaerobiose induzida – SIAF. Para as fermentações com os frutos do café Cereja e CD com processamento via úmida (submerso), os cafés foram transferidos para os biorreatores, contendo 60 litros de água (30% do volume) e 200 litros de café (Figura 1). Para as fermentações com os frutos do café Cereja e CD com processamento seco (fermentação em estado sólido FES), os frutos do café também foram transferidos para os biorreatores de 200 litros sem adição de água.

Figura 1 - Modelo de biorreator utilizado no experimento (observa-se acoplamento de Airlock tipo S com vedação e sistema de aquisição de dados - UFU) na fazenda Santiago, município de Presidente Olegário – MG, Brasil.



Fonte: O autor (2022)

Todas as bombonas foram hermeticamente fechadas e equipadas com um Airlock tipo S com vedação para troca gasosa e monitoradas a cada 24 horas até 96 horas de fermentação, onde no término do tempo estabelecido para cada experimento, e após a coleta das amostras e o registro dos dados, os frutos do café foram lavados para interromper o processo fermentativo, e posteriormente, encaminhado aos terreiros suspensos (Figura 2) localizados na propriedade, onde foi submetido ao processo de secagem natural, até os grãos atingirem teor de 11% de umidade.

Figura 2: Secagem natural dos grãos de café por radiação solar em terreiro suspenso na fazenda Santiago, município de Presidente Olegário – MG, Brasil.



Fonte: O autor (2022).

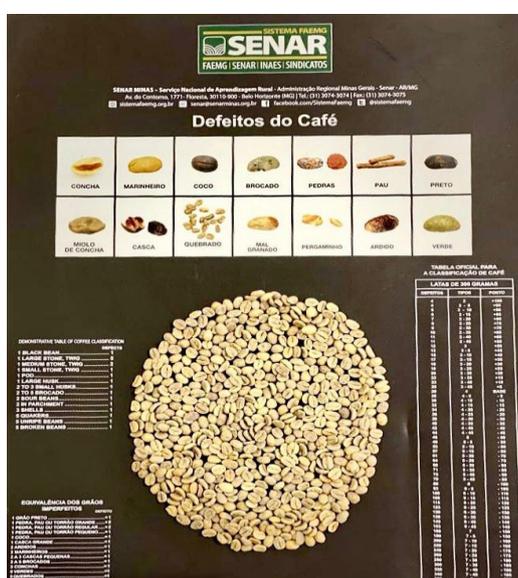
Nos experimentos foram acoplados um sistema de aquisição de dados, desenvolvido na UFU, campus Patos de Minas, para a coleta e armazenamento de dados de temperatura e pH ao longo do processo de fermentação, que foram armazenados em um cartão mini SD, e também um dispositivo para coleta da temperatura ambiente, onde se encontrava os biorreatores.

No tempo zero (início do processo de fermentação) e a cada 24 horas, nos biorreatores, foram realizadas, com 5 repetições, as aferições de % BRIX utilizando-se de um refratômetro digital óptico modelo MA888 da Akso®, oxigênio dissolvidos utilizado um medidor modelo SX716 da Akso® e temperatura e pH, utilizando um medidor de pH para semissólidos, modelo pH In da Akso®.

Para controle, amostras de Catiguá MG2 Cereja e CD, equivalentes ao volume de um biorreator, foram encaminhadas no primeiro dia, direto para o terreiro suspenso, para, para secagem natural, denominado testemunha.

Após os processos realizados nos experimentos, os grãos de café foram beneficiados e selecionados pelo método de granulometria utilizando peneira de crivo arredondado com tamanho acima da 16. Após beneficiamento, os grãos foram separados dos possíveis defeitos existentes (grãos verdes, pretos, ardidos, concha e brocados, dentre outros) de acordo com a metodologia da Classificação Oficial Brasileira (COB) com auxílio cartolina preta com tabela de defeitos e tipos (Figura 3).

Figura 3 - Cartolina preta com tabela de defeitos e tipos para classificação dos grãos beneficiados



Fonte: O autor (2023)

2.2 Caracterização dos grãos.

As amostras de café *in natura* para safra estudada 2021/2022, foram caracterizadas em termos de umidade, teor de cinzas, proteína, lipídeos, acidez titulável total e sólidos solúveis, sendo todos determinados de acordo com a metodologia descrita pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995). Todas as análises foram realizadas em triplicata. As amostras de 150 g de café cereja e cereja descascado (safra 2021/2022) foram congeladas a - 80°C em ultrafreezer, em seguida liofilizadas durante 48h em liofilizador (Liotop, modelo L101) a 214 µHg e temperatura de - 60°C. Após liofilização, as amostras foram moídas em moinho de facas (SO-LAB) em granulometria fina de 20 mesh,

embalados e armazenados em ultrafreezer (-80°C) até o momento das análises (PEREIRA et al, 2018). Todos os procedimentos analíticos foram realizados nos Laboratórios didáticos de Engenharia de Alimentos da UFU campus Patos de Minas.

2.3 Determinação de umidade

A determinação do teor da umidade do resíduo foi realizada segundo metodologia proposta pela AOAC (1995) que consiste em pesar de 3 a 5 g de amostra em cadinhos, previamente secos e tarados, e submetidos à secagem em estufa a 105°C durante 24 horas ou até massa constante. Após a retirada da estufa os cadinhos foram resfriados a temperatura ambiente em dessecador e pesados em balança analítica. O resultado foi expresso em porcentagem (m/m).

2.4 Determinação do teor de cinzas

O método empregado foi o da incineração em mufla, no qual toda a matéria orgânica fora queimada. Para isso, cada amostra proveniente da análise de umidade, que já estava em um cadinho de porcelana, com massa previamente estabelecida, foi inserida e permaneceu na mufla a 550°C, por um período de 6 horas. A diferença entre a massa da amostra final e a massa do cadinho forneceu a massa das cinzas da amostra (AOAC,1995). O resultado foi expresso em porcentagem relacionado a massa seca do café.

2.5 Determinação de ácidos orgânicos, álcoois e açúcares

Os ácidos orgânicos (málico, láctico, acético, butírico, propiônico, cítrico e succínico), álcoois (glicerol, etanol) e açúcares (sacarose, frutose e glicose) foram analisados utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) do Laboratório didático da Engenharia de Alimentos. As amostras extraídas dos frutos ao longo das fermentações foram filtradas em filtro de acetato de celulose de 0,22 µm e injetadas no sistema cromatográfico (HPLC) de marca Shimadzu, modelo LC-20A Prominence, coluna SUPELCOGEL C-610H (30 mm × 7,8 mm). A

fase móvel utilizada foi uma solução aquosa de ácido fosfórico a 0,1%, vazão do eluente de 0,5 mL/min, temperatura do forno de 32 °C, duração de 35 min e volume de injeção de 20,0 µL. A concentração de açúcares e etanol foram determinadas por índice de refração e os ácidos foram detectados usando um detector de arranjo de fotodiodos (PDA) a 210 nm (LOPES., 2017). Os resultados foram processados usando o software LC-Solutions a partir de suas respectivas curvas de calibração.

2.6 Torra do café

Foram torrados cerca de 3kg de cada amostra de café verde em torrador Atilia GOLDEN PLUS 10. A temperatura de torra foi mantida entre 187°- 195 °C, durante o tempo de aproximadamente 10 minutos, dependendo da umidade inicial de cada amostra. Durante a torra foram mensuradas as seguintes variáveis: tempo de seca, temperatura da carga (°C), pressão do gás (mbar), fluxo de ar (rpm), velocidade de giro (rpm), temperatura ambiente (°C), *turner point* (°C), peso inicial e final (Kg) e o rendimento. Os parâmetros pressão de gás, fluxo de ar e velocidade foram fixados para manter o padrão da torra determinado e monitorados simultaneamente e armazenados em um computador conectado ao torrador através do software Artisan. Desse modo a pressão de gás utilizada em todas as amostras foi de 6 mbar, o fluxo de ar 1500 rpm e a velocidade de giro em 60 rpm.

A cor dos grãos torrados foi obtida através de leitura direta das amostras utilizando-se colorímetro Minolta L, no qual os parâmetros L*, a* e b* foram avaliados, onde "L*" é a luminosidade, associada ao grau de escurecimento do material em estudo, varia de 0-preto a 100-branco; "a*" referente ao eixo verde-vermelho, sendo "-a*" cor verde e "+a*" vermelho; e "b*" referente ao eixo azul-amarelo, sendo "-b*" cor azul e "+b*" cor amarela, segundo o sistema CIE (CIE, 2017).

Para cada amostra realizou-se a calibração do equipamento utilizando uma placa branca com valores determinados correspondentes a cada parâmetro. As cores das amostras foram expressas no sistema CIE L*, a*, b*. Todas as amostras foram analisadas 10 vezes para evitar erros. Para a realização da análise de cor seguindo os protocolos da SCA, utilizou-se os discos do Sistema Agrtron, este é composto por 8 discos onde cada um possui um número de referência que

corresponde a um grau de torra do café. Atribui-se a referência de número 25 ao café com torra mais escura e 95 ao café com torra mais clara.

2.7 Análise sensorial dos cafés fermentados da safra 2021/2022

As amostras de cafés fermentados foram preparadas de acordo com a metodologia da *Specialty Coffee Association* (SCA). Foram torrados, com intensidade de torra definido por uma curva de torra padrão, classificada como média, para poder ser comparados entre si. Um painel de cinco especialistas em café treinados, com *Q-Grader Coffee Certificate*, avaliaram as amostras. A metodologia aplicada para avaliar o café foi conduzida segundo os padrões SCA, que avaliam dez atributos sensoriais: aroma, doçura, geral, sabor, corpo, uniformidade, balanço, limpeza, acidez e finalização (SCA, 2015). Estas análises foram realizadas por cinco *Q-graders* de Patos de Minas e região. As análises sensoriais para qualificação de cafés especiais, foram conduzidas observando parâmetros qualitativos da bebida por meio de provação dos avaliadores credenciados (*Q-grader*), empregando o protocolo da SCA (SCA, 2015), A partir de uma escala de 16 (dezesseis) unidades que representam os níveis de qualidade com intervalos de 0,25 (um quarto de ponto) entre valores numéricos compreendidos entre “6 - Bom” e “9 - Excepcional”, e após o somatório das notas corresponde à classificação final da bebida de cada amostra, as que receberam notas acima de 80 pontos foram classificados como cafés especiais (GIOMO, 2009; SCA, 2015; PAIVA, 2010).

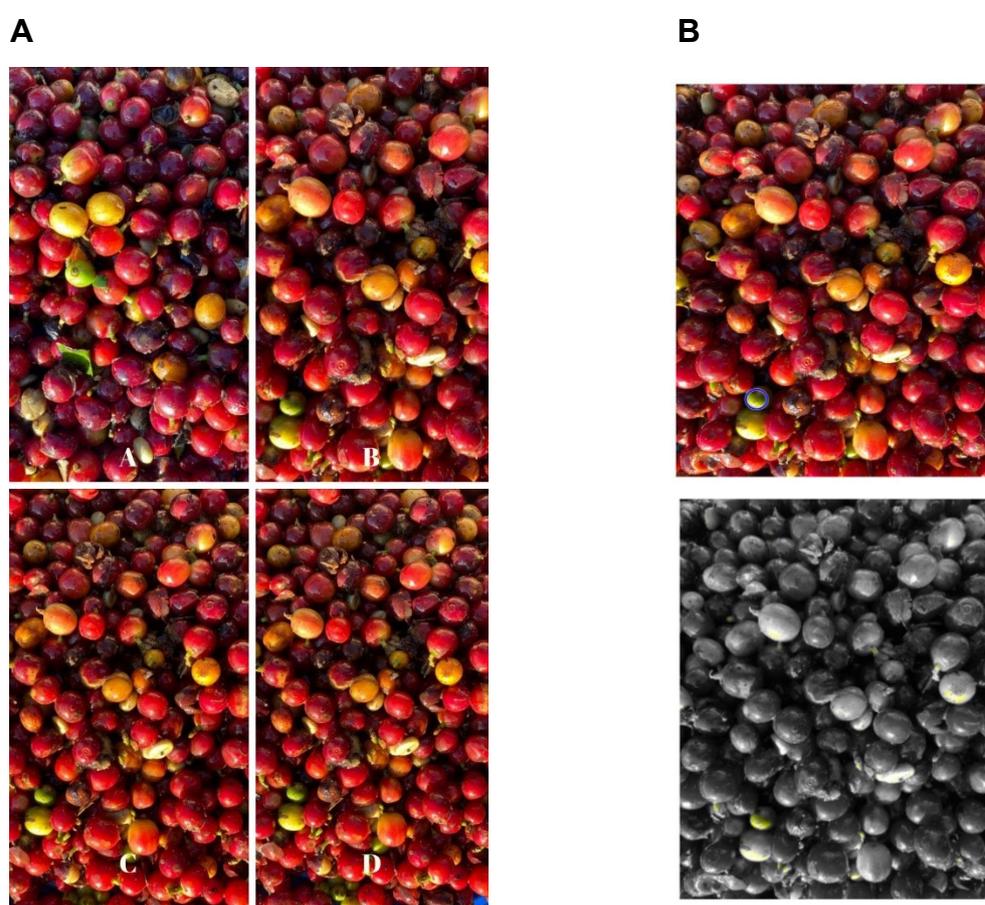
2.8 Determinação da porcentagem dos grãos verdes

Para a determinação dos frutos verdes foi realizado um processamento de imagem que permitiu obter a porcentagem de frutos verdes presentes nas amostras, utilizando o software *Scilab*.

O número de frutos imaturos foi determinado por meio de técnicas de processamento de imagens utilizando Python, a biblioteca OpenCV e o compilador Visual Studio Code. Para cada pixel da imagem, foi realizada uma análise espectral com o objetivo de identificar a predominância da cor verde e, em seguida, a

segmentação por pixel. Foram aplicados filtros digitais para identificar os frutos de café, e aqueles com predominância da cor verde foram identificados como frutos imaturos. Por fim, foi calculada a porcentagem de frutos imaturos levando-se em conta o número total de frutos presentes na imagem. Foram tiradas fotos da massa total de café em diferentes posições e a porcentagem final foi calculada pela média dos cinco tratamentos de imagem.

Figura 4 - Amostragens do café *Coffea arabica* L. cv. Catiguá MG2 na fazenda Santiago, município de Presidente Olegário – MG, Brasil.



Fonte: O autor (2022)

Fonte: Pedro L. L. Bertarini/FEELT-UFU

A - Amostragens em quadruplicada do café *Coffea arabica* L. cv. Catiguá MG2 cereja *in natura* recém colhido na fazenda Santiago, município de Presidente Olegário – MG, Brasil. B - Técnicas de processamento de imagens utilizando Python, a biblioteca OpenCV e o compilador Visual Studio Code

2.9 Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), composto por 18 tratamentos e 3 repetições. O experimento não foi conduzido em esquema fatorial devido a algumas intercorrências durante a condução. Dessa forma, o efeito dos tratamentos e o tempo de fermentação foram analisados de forma isolada.

Primeiramente os dados foram submetidos ao teste de Grubbs para verificar a presença de outliers. Em seguida, os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett foram empregados para verificar a normalidade dos resíduos dos dados e a homogeneidade das variâncias. Uma vez que não foi constatada normalidade, os dados foram transformados $(x + 0,5)^{0,5}$ para que o princípio de normalidade fosse atendido. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para identificar se havia diferença entre os tratamentos e o teste de agrupamento de Scott-Knott para identificar quais grupos eram distintos. A correção de Pearson foi empregada para determinar o grau de associação entre as variáveis do estudo. Por último, a análise de regressão foi empregada para verificar a influência do tempo fermentação sobre as variáveis. Os dados foram analisados no software MiniTab versão 19.2020.1 e em todo o estudo adotou-se o nível de significância de 5%.

Outra análise utilizada foi o Boxplot é uma ferramenta gráfica que representa a distribuição de dados de um conjunto. De acordo com BUSSAB e MORETTIN (2010), o BoxPlot nos dá uma ideia da posição, dispersão, assimetria, caudas e dados discrepantes (outliers), onde analisando o gráfico como um todo, nota-se a distribuição de dados e o intervalo e variabilidade das observações.

O Boxplot se mostra um gráfico simples e poderoso que resume a distribuição de variáveis contínuas por meio de cinco estatísticas: o limite mínimo ($LI = Q1 - (1,5) \cdot (Q3 - Q1)$), a extremidade inferior da caixa que se refere ao primeiro quartil (Q1), correspondendo 25% das medidas, indicando que 25% dos dados vão estar abaixo dele, a mediana que é a linha que corta a caixa, dividindo os dados em 50% para baixo e 50% para cima, e é o valor principal do BoxPlot; a extremidade superior da caixa referente ao terceiro quartil (Q3), que corresponde a 75% das medidas, indicando que 25% dos dados vão ser encontrados depois dele; e o limite máximo ($LS = Q3 + (1,5) \cdot (Q3 - Q1)$). O comprimento vertical da caixa é o intervalo

interquartil (Q1 a Q3), indicando a região que contém 50% de os dados, onde observamos que se a mediana for no meio da caixa, os dados devem ser simétricos (HEUMANN, SCHOMAKER e SHALABH, 2016).

3. Resultado e Discussão

3.1. Análise multivariada baseada em composição química

Os resultados dos parâmetros açúcares, ácidos orgânicos, álcoois, umidade e cinzas avaliados na cultivar *Coffea arabica* L. cv. Catiguá MG2 cru, nas distintas etapas experimentais de fermentação estão contidos na Tabela 1. Por outro lado, a Tabela 1 apresenta a comparação dos grupos de tratamentos pelo teste de Scott-Knott para as variáveis do estudo, ambas a 5% de significância.

Tabela 1 – Comparação dos grupos de tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Tratamentos	Ácido cítrico (mg/g café)	Ácido málico (mg/g café)	Ácido succínico (mg/g café)	Ácido láctico (mg/g café)
0hCD	1.200 c	1.991 d	0.823 c	1.385 f
0hCEREJA	1.552 a	3.227 a	1.053 a	1.909 f
24hCDSECO	1.040 d	0.978 g	0.725 d	4.578 d
24hCEREJASECO	1.277 c	2.775 b	0.806 c	4.462 d
24hCEREJASUB	1.172 c	2.301 c	0.791 c	3.496 e
48hCDSECO	1.087 d	0.906 g	0.707 d	6.059 c
48hCDSUB	1.244 c	0.999 g	0.707 d	6.107 c
48hCEREJASECO	0.866 e	1.416 f	0.743 d	5.052 d
48hCEREJASUB	0.842 e	1.112 g	0.738 d	5.124 d
72hCDSECO	1.357 b	1.100 g	0.707 d	7.116 b
72hCDSUB	1.362 b	1.086 g	0.707 d	6.419 c
72hCEREJASECO	1.057 d	1.681 e	0.972 b	6.827 b
72hCEREJASUB	0.926 e	1.032 g	0.756 d	8.388 a
96hCDSECO	1.205 c	0.976 g	0.707 d	7.525 b
96hCDSUB	1.047 d	0.957 g	0.707 d	8.626 a
96hCEREJASECO	0.878 e	1.340 f	0.764 d	9.129 a
96hCEREJASUB	0.935 e	0.973 g	0.714 d	8.899 a
CV (%)	8.72	7.63	4.55	10.08

Tratamentos	Ácido acético (mg/g café)	Sacarose (mg/g café)	Glicose (mg/g café)	Frutose (mg/g café)
0hCD	1.251 d	5.465 a	4.423 b	5.561 b
0hCEREJA	1.721 d	5.392 a	4.950 b	6.290 b
24hCDSECO	1.528 d	1.660 c	1.676 d	2.751 d
24hCEREJASECO	1.643 d	3.730 b	6.551 a	8.596 a
24hCEREJASUB	1.590 d	3.915 b	5.145 b	6.785 b
48hCDSECO	1.471 d	2.167 c	1.124 d	1.906 d
48hCDSUB	1.447 d	2.816 c	1.274 d	1.924 d
48hCEREJASECO	1.674 d	1.019 c	3.462 c	4.850 b
48hCEREJASUB	1.742 d	1.277 c	2.073 d	3.712 c
72hCDSECO	1.640 d	3.045 c	1.500 d	2.062 d
72hCDSUB	1.559 d	2.598 c	1.681 d	2.141 d
72hCEREJASECO	2.264 c	1.832 c	4.296 b	6.668 b
72hCEREJASUB	2.402 b	1.865 c	1.853 d	4.293 c
96hCDSECO	1.767 d	2.929 c	1.155 d	1.640 d
96hCDSUB	2.061 c	2.434 c	1.114 d	1.600 d
96hCEREJASECO	2.584 b	0.877 c	3.093 c	5.836 b
96hCEREJASUB	2.270 c	1.671 c	1.505 d	3.846 c
CV (%)	9.74	39.86	30.32	27.34

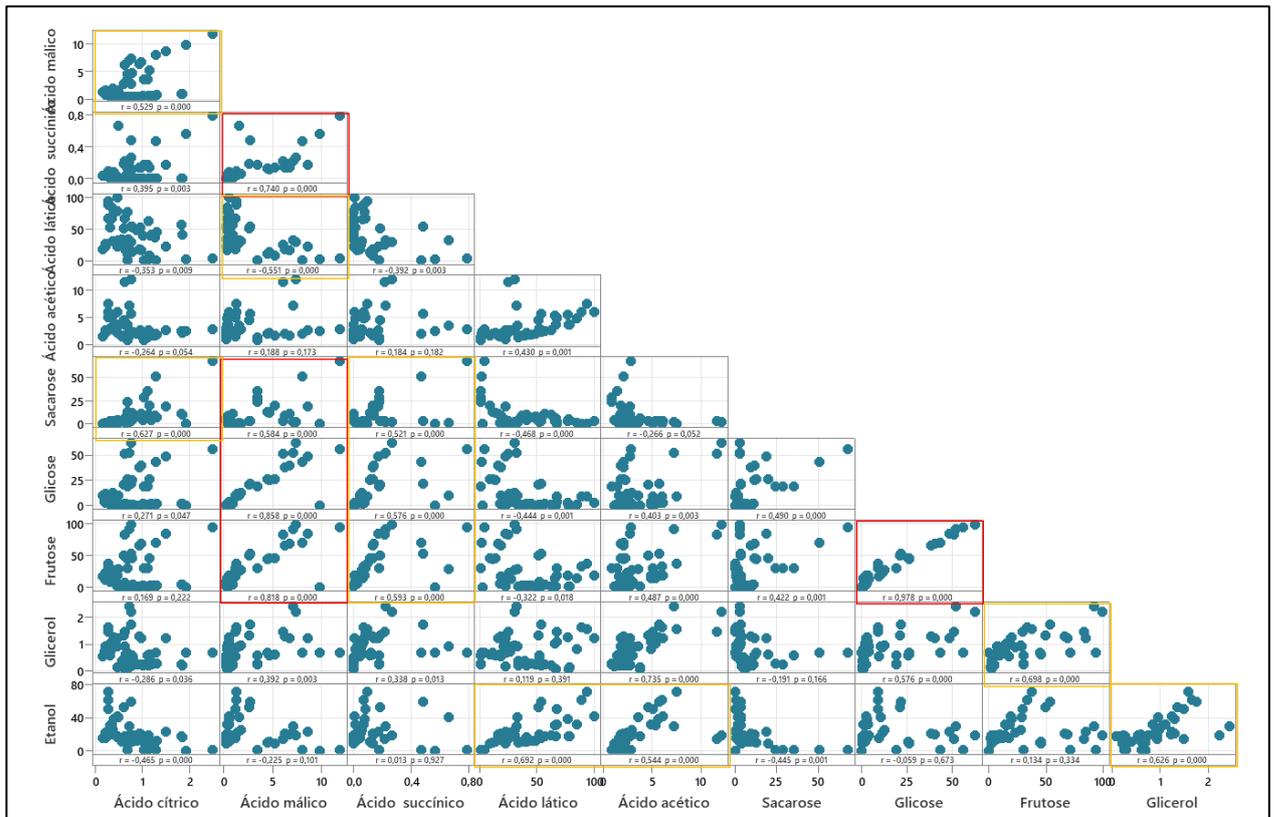
Tratamentos	Glicerol (mg/g café)	Etanol (mg/g café)	Umidade (%)	Cinzas (% em base seca)
0hCD	0.939 e	1.018 e	7.935 b	2.242 a
0hCEREJA	1.093 d	1.111 e	8.241 a	1.951 d
24hCDSECO	1.152 c	3.853 d	8.212 a	2.269 a
24hCEREJASECO	1.324 b	4.661 c	8.484 a	2.154 b
24hCEREJASUB	1.070 d	3.164 d	8.155 a	2.127 b
48hCDSECO	0.936 e	3.591 d	8.122 a	2.276 a
48hCDSUB	0.897 e	3.293 d	8.400 a	2.221 b
48hCEREJASECO	1.142 c	4.588 c	7.601 c	1.943 d
48hCEREJASUB	1.136 c	4.245 c	7.745 c	1.919 d
72hCDSECO	0.884 e	3.791 d	8.290 a	2.341 a
72hCDSUB	0.860 e	3.668 d	8.420 a	2.211 b
72hCEREJASECO	1.361 b	7.189 a	8.017 b	2.081 c
72hCEREJASUB	1.282 c	5.861 b	8.038 a	2.114 b
96hCDSECO	0.862 e	4.188 c	8.306 a	2.335 a
96hCDSUB	0.782 e	4.241 c	8.497 a	2.197 b
96hCEREJASECO	1.438 b	7.909 a	8.278 a	2.155 b
96hCEREJASUB	1.178 c	5.637 b	8.123 a	2.144 b
CV (%)	7.17	11.47	2.22	2.53

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de significância. Dados transformados $(x + 0,5)^{0,5}$.

Os compostos químicos do café cru são utilizados em diversas reações, que ocorrem durante e após a torração, atuando como precursores de substâncias responsáveis pelo sabor e cor dos grãos (LOPES, 2000). A presença de vários constituintes químicos voláteis, como ácidos orgânicos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, compostos fenólicos, entre outros compostos químicos presentes no café, definirá as características físicas e sensoriais do café, incrementando o seu valor como produto (RODRIGUES, S. D. et al. 2020).

A Figura 5 mostra o resultado da correlação de Pearson, destacando as correlações altas e moderadas. Na Figura 5 temos uma alta correlação positiva ($r > 0,70$) entre o ácido málico e o ácido succínico, glicose, frutose e sacarose e uma altíssima correlação positiva ($r = 0,978$) já esperada entre glicose e frutose.

Figura 5 - Resultado da correlação de Pearson para as variáveis do estudo a 5% de significância.



Contornos em vermelho indicam alta correlação positiva ($r > 0,70$); em amarelo correlações médias.

Observa-se ainda, na Figura 5, correlações médias, onde o ácido succínico apresentou correlações positivas superiores a $r = 0,544$ com os açúcares glicose, sacarose e frutose.

Foi constatada correlações que variaram de $r = 0,544$ a $0,692$ entre o etanol e os ácidos láctico, acético e glicerol. Nessa classe de correlações moderadas positivas tivemos também frutose e glicerol ($r = 0,698$) e ácido cítrico e ácido málico e sacarose ($r = 0,529$ e $0,627$, respectivamente).

Na classe de correlações moderadas negativas foi constatado apenas ácido málico e ácido láctico ($r = -0,551$). As correlações $r < 0,500$ são baixas, e não foram consideradas para o estudo em questão.

Além disso, a análise de regressão foi empregada para determinar a influência do tempo de fermentação sobre os frutos para cada tratamento. A Tabela 2 representa as principais informações da análise de regressão para todas as variáveis do experimento. É possível observar a equação da reta, o coeficiente de determinação e o p valor para os efeitos linear e quadrático. As Figuras 6, 7 e 8 foram construídas com base nas informações significativas da Tabela 2. Não foi realizado análise de regressão para o tratamento CD submerso, pois o mesmo não apresentava pontos suficientes para construção da curva ao longo do tempo.

Tabela 2 – Equação da reta, o coeficiente de determinação (r^2) e o p valor para os efeitos linear e quadrático para os parâmetros do estudo.

Tipo de café	Efeito linear			Efeito quadrático		
	y	r^2	p	y	r^2	p
Ácido cítrico						
Cereja seco	$-0.006451x + 1.432781$	72.49	<0.0001	$0.000097x^2 - 0.15791x + 1.544865$	85.79	0.0083
CD seco	$0.001345x + 1.110521$	17.95	0.1126	$0.000030x^2 - 0.001553x + 1.145298$	25.24	0.2936
Cereja submerso	$-0.002579x + 1.222759$	32.35	0.0026	$0.000146x^2 - 0.020089x + 1.543009$	80.06	0.0008
Ácido málico						
Cereja seco	$-0.020218x + 3.053186$	80.42	<0.0001	$0.000229x^2 - 0.042190x + 3.316841$	88.73	0.0012
CD seco	$-0.007980x + 1.571949$	44.53	<0.0001	$0.000254x^2 - 0.032384x + 1.864791$	80.97	<0.0001
Cereja submerso	$-0.016942x + 2.370383$	68.69	<0.0001	$0.000489x^2 - 0.075637x + 3.779078$	95.07	<0.0001
Ácido succínico						
Cereja seco	$0.949184x - 0.001729$	23.34	0.0066	$0.000046x^2 - 0.006143x + 1.002155$	36.65	0.0275
CD seco	$-0.001044x + 0.784056$	61.27	<0.0001	$0.000027x^2 - 0.003600x + 0.814724$	93.40	<0.0001
Cereja submerso	$-0.000878x + 0.802595$	71.92	<0.0001	$0.000004x^2 - 0.001407x + 0.815304$	72.76	0.1104

Tipo de café	Efeito linear			Efeito quadrático		
	y	r ²	p	y	r ²	p
Glicose						
Cereja seco	-0.302517x + 37.332133	63.38	0.0156	0.000134x ² - 0.315350x + 37.486133	63.39	0.9716
CD seco	-0.028037x + 3.315041	58.54	<0.0001	0.000715x ² - 0.096655x + 4.138464	89.23	<0.0001
Cereja submerso	-0.046641x + 5.435474	73.19	<0.0001	0.001181x ² - 0.188366x + 8.836873	94.81	<0.0001
Frutose						
Cereja seco	-0.012068x + 7.009129	11.03	0.4993	-0.000076x ² - 0.004746 + 6.921266	11.38	0.9024
CD seco	-0.035581x + 4.484731	70.38	<0.0001	0.000722x ² - 0.104930x + 5.316924	93.78	<0.0001
Cereja submerso	-0.034726x + 6.732646	55.38	<0.0001	0.001129x ² - 0.170210x + 9.984247	82.36	0.0002
Glicerol						
Cereja seco	0.003001x + 1.125916	59.71	0.0007	0.000013x ² + 0.001765x + 1.140750	60.60	0.5688
CD seco	-0.001716x + 1.035302	32.35	0.0102	-0.00038x ² + 0.001945x + 0.991372	45.24	0.0744
Cereja submerso	0.001899x + 1.050779	43.94	0.5950	-0.000076x ² + 0.010973x + 0.832997	76.05	0.0975
Etanol						
Cereja seco	0.067229x + 1.844910	90.66	<0.0001	-0.000375x ² + 0.103213x + 1.413108	92.94	0.0231
CD seco	0.026117x + 2.0218531	59.59	<0.0001	-0.000535x ² + 0.077463x + 1.405388	79.87	0.0004
Cereja submerso	0.03906x + 2.493263	83.81	0.0003	-0.000591x ² + 0.0107792x + 0.79201	93.71	0.6840
Umidade						
Cereja seco	-0.0016559x + 8.201955	3.51	0.3418	0.000167x ² - 0.017656x + 8.393920	32.09	0.0174
CD seco	0.003421x + 8.008474	72.84	0.0003	-0.0000332x ² + 0.006587x + 7.97048	78.31	0.1771
Cereja submerso	0.000761x + 7.966812	1.61	0.7876	0.000212x ² - 0.24694x + 8.577751	59.12	0.1342
Cinzas						
Cereja seco	0.001399x + 1.989184	25.79	0.0058	0.000011x ² + 0.000330x + 2.002010	27.11	0.4480
CD seco	0.001081x + 2.240524	88.43	0.0242	-0.00001x ² + 0.001173x + 2.239415	88.49	0.9478
Cereja submerso	0.000993x + 2.015358	8.63	0.2286	0.000103x ² - 0.011325x + 2.310981	51.14	0.0201
Ácido láctico						
Cereja seco	0.775358x - 1.912933	91.88	<0.0001	0.00693x ² + 0.103985x + 6.143543	97.91	0.0121
CD seco	0.061703x + 2.350267	89.42	<0.0001	-0.000723x ² + 0.000723x + 1.517595	99.32	0.0012
Cereja submerso	0.080318x + 1.633978	93.24	<0.0001	-0.000519x ² + 0.142586x + 0.139548	95.03	0.2080
Ácido acético						
Cereja seco	0.009722x + 1.54546	76.12	0.0001	0.000169x ² - 0.0006522x + 1.699467	94.71	0.0093
CD seco	0.004802x + 1.297005	86.97	0.0006	-0.000008x ² + 0.005542x + 1.288124	87.15	0.8272
Cereja submerso	0.011052x + 1.332840	76.23	0.0005	-0.000131x ² + 0.026753x + 0.956024	81.15	0.1960
Sacarose						
Cereja seco	-0.045421x + 4.739689	78.88	0.0093	0.000619x ² - 0.104850x + 5.452832	90.69	0.2419
CD seco	-0.15373x + 3.780967	16.00	0.0001	0.000957x ² - 0.107266x + 4.883675	66.02	<0.0001
Cereja submerso	-0.025420x + 3.697836	45.29	0.0001	0.001047x ² - 0.151051x + 6.712977	80.70	0.0001

3.2 Influência do tempo e temperatura no consumo de açúcares

As concentrações iniciais de açúcares são informações que possibilita inferir o consumo e geração de mono e dissacarídeos no transcurso do processo fermentativo. A frutose é o açúcar com maior concentração inicial, apresentou média de 5.561 mg/g, seguida da média de Glicose 4.423 mg/g e Sacarose com teor médio de 5.465 mg/g (Tabela 1). Os valores iniciais nos frutos 0hCD e 0hCEREJA apresentaram maiores teores médios de açúcares nos frutos, é possível observar um decréscimo significativo das concentrações do açúcar com o passar do tempo.

No final do processo de fermentação, os principais açúcares observados neste trabalho foram frutose, glicose e sacarose, e a glicose e sacarose foi encontrado em concentrações mais baixas. Por meio da análise de regressão observa-se que os teores de sacarose, glicose e frutose reduziram gradualmente ao longo do tempo de fermentação (Tabela 2).

Os açúcares totais nos grãos crus são representados pelos açúcares redutores, principalmente Glicose e Frutose, e pelos não redutores, sendo a Sacarose predominante (ROGERS et al., 1999). Os resultados dos açúcares redutores estão de acordo com os encontrados na literatura, que são de 0,1% a 1,0% (ILLY; VIANI, 1998). A concentração e a presença de açúcares, em especial Sacarose, Frutose e Glicose, estão relacionadas principalmente ao estágio de maturação do fruto. A sacarose aumenta à medida que o café amadurece, enquanto que a frutose e a glicose diminuem (KITZBERGER, 2012). Nos resultados da correlação de Pearson observou-se uma altíssima correlação positiva ($r = 0,978$) já esperada entre Glicose e Frutose (Figura 5).

Os açúcares presentes na mucilagem, quando na presença de microrganismos ou sob anaerobiose são fermentados, produzindo álcool, que é desdobrado em ácido acético, lático, propiônico e butírico. A partir dos dois últimos, já foram observados prejuízos na qualidade da bebida do café (PIMENTA; VILELA, 2003). No processo fermentativo do café, ocorre uma redução nos açúcares devido à atividade metabólica dos microrganismos, formando metabólitos, como ácidos,

álcoois, entre outros (DE BRUYN et al., 2016; MARTINEZ et al., 2017; ELHALIS et al., 2020). Durante a torração, os açúcares presentes no café participam das reações de Maillard e de caramelização, formando compostos voláteis e não voláteis que podem conferir à bebida sabores e aromas desejáveis ou não. Os cafés com maiores concentrações de açúcares nos grãos crus apresentam maior potencialidade para o desenvolvimento das reações de Maillard e de caramelização (ILLY; VIANI, 1998; FIGUEIREDO, 2013).

Os resultados médios da concentração de açúcar mostraram que os menores valores encontrados no experimento foram com tempos de fermentação mais elevados. Elhalis et al. (2020b) relataram em seus trabalhos que a Sacarose e os monossacarídeos Frutose e Glicose foram praticamente degradado ao final da fermentação, que foi conduzida por 24 h à temperatura ambiente (entre 10 e 30°C), essa redução no teor de açúcares também foi observada em outros estudos, como em De Bruyn et al. (2017) e Martinez et al. (2017).

No entanto, vislumbra-se no experimento, que ainda havia presença de açúcar no processo de fermentação final; em algumas circunstâncias até concentrações ainda altas inferindo-se que os açúcares não estavam plenamente degradados. A presença e até o aumento de glicose e frutose no final da processo fermentativo foi explicado por Ribeiro e cols. (2017) como sendo provenientes de reações reações enzimáticas ou hidrolíticas que se dão no processo fermentativo, que degradam os polissacarídeos pectinolíticos, através atividades das enzimas Poligalacturonase e pectinase, produzidas principalmente por leveduras processo fermentativo (MASSOUD; JESPERSEN, 2006).

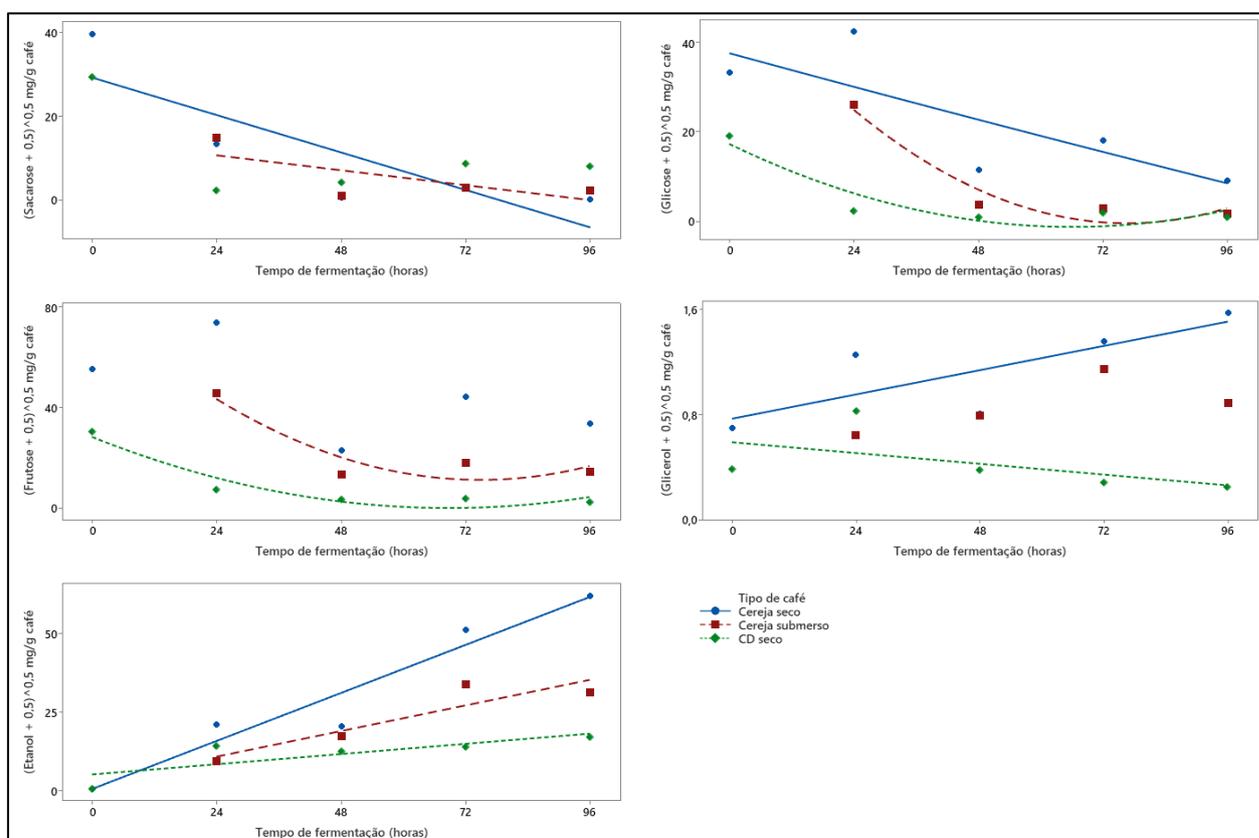
De Bruyn et al. (2017) observaram em seu estudo que apesar da concentração de sacarose e monossacarídeos decaírem, glicose e frutose apresentaram picos durante processo de fermentação, corroborando também a hipótese de que esses açúcares são ambos substrato e metabólitos das reações bioquímicas que ocorreram no processo fermentação. Assim, o processo de fermentação do café é dinâmico na cinética de consumo e geração de açúcar uma vez que os microrganismos metabolizam os monossacarídeos antes da hidrólise dos polissacarídeos (AVALLONE et al. 2001). Por esse motivo a atividade microbiana e o tempo de fermentação determinam a concentração final de açúcares, como glicose e frutose (HAILE et al. 2019).

3.3 Influência do tempo e temperatura na produção de Álcoois

Os tratamentos utilizando os frutos cerejas apresentaram maiores níveis de Glicerol, enquanto os tratamentos com CD apresentam níveis mais baixos independente do tempo (Figura 6-D). A análise de regressão demonstra que as concentrações de Etanol e Glicerol aumentaram por influência do tempo de fermentação sobre os tratamentos.

Os índices baixos de Glicerol nos cafés em tratamentos com CD pode ser explicado pelo seu processo, que retira o exocarpo e mesocarpo parcialmente, redução do teor de polissacarídeos. Esse fato poderia comprometer a formação de Glicerol uma vez que ele é um metabólito da degradação do açúcar pelas leveduras. A presença de Glicerol é ínfima em grãos descascados mecanicamente sem fermentação (ELHALIS et al., 2020a; ELHALIS et al., 2020b).

Figura 6 - Gráficos de regressão para em função do tempo de fermentação para diferentes tipos de açúcares e álcoois



A = Sacarose; B = Glicose; C = Frutose; D = Glicerol; E = Etanol.

No tratamento Cereja-Seco, por sua vez, as concentrações médias de Glicerol são crescente com passar do tempo e atinge mensuração altas no final do processo de fermentação do café. O Glicerol é um metabólito importante para formação de qualidade do café, pois tem sabor doce e sensação de suavidade na boca (SWIEGERS et al., 2005).

Quanto aos níveis de Etanol os tratamentos 96hCEREJA-SECO e 72hCEREJA-SECO apresentaram os maiores teores, enquanto 0hCEREJA e 0hCD os menores níveis. Portanto, observou-se que o aumento do tempo e da temperatura influenciaram no aumento da produção de Etanol, no final das fermentações as concentrações máximas foram obtidas (Figura 6-E).

Durante o processo de fermentação do café, os açúcares que são metabolizados produzem álcoois no meio. O Etanol liberado tem uma ação benéfica porque adere na superfície do grão e inibe crescimento microbiano indesejável favorecendo um controle biológico (Carvalho et al., 2010). Alguns microrganismos, todavia, são ativados por essa ambiência de alta concentração de etanol, como as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, ativando diferentes genes reguladores de estresse induz uma via de resposta de glicerol e o acumula como um soluto compatível (BABAZADEH et al., 2017; ELHALIS et al., 2020). O Etanol produzido pelas leveduras estimula o crescimento de bactérias ácido acéticas que oxidam o Etanol ao Ácido Acético. Este ácido é importante para inibir o grão, semente, e desencadear o metabolismo endógeno do grão que gera os precursores do sabor (Fleet. 2007). Na correlação de Pearson foi constatada correlações que variaram de $r = 0,544$ a $0,692$ entre o Etanol e os ácidos láctico, acético e glicerol. (Figura 6).

3.4 Influência do tempo e da temperatura na produção de ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos detectados nas fermentações e controle foram os ácidos cítrico, málico, succínico e acético e láctico (Tabela 1). Já os ácidos, propiônico e butírico não foram detectados nas análises.

Por meio da análise de regressão é possível perceber que o comportamento dos teores de ácido cítrico decaiu gradualmente ao longo do tempo para os tratamentos Cereja seco e Cereja submerso. Algo semelhante foi observado para os ácidos málico e succínico para os tratamentos Cereja seco, Cereja submerso e

CD seco. Para os ácidos láctico e acético foi observado aumento acentuado das concentrações para todos os tratamentos (Figura 7, Tabela 2).

Como pode-se observar na Tabela 1, os ácidos acético e láctico foram os principais ácidos encontrados em HPLC, com índices mais elevados em grande parte do tempo de tratamento quanto comparado aos demais. Análise igual à encontrada por outros autores em análise de ácidos orgânicos em café (BRESSANI et al., 2018; PEREIRA et al., 2015; CARVALHO NETO et al., 2018; EVANGELISTA et al., 2014b e EVANGELISTA et al., 2015).

Na Tabela 1 pode-se vislumbrar que o fruto in natura 0hCEREJA apresentou maiores teores de ácido cítrico, málico e succínico quando comparado aos demais tratamentos. Os teores de ácido cítrico parecem estar relacionado ao tipo de café (CEREJA ou CD), uma vez que os tratamentos CEREJA apresentaram menores teores.

Por outro lado, os ácidos málico e succínico parecem estar relacionado com as horas de fermentação, onde nos períodos iniciais temos maiores concentrações dos compostos e com o passar do tempo essa concentração decaí significativamente (Figura 7-B e C)

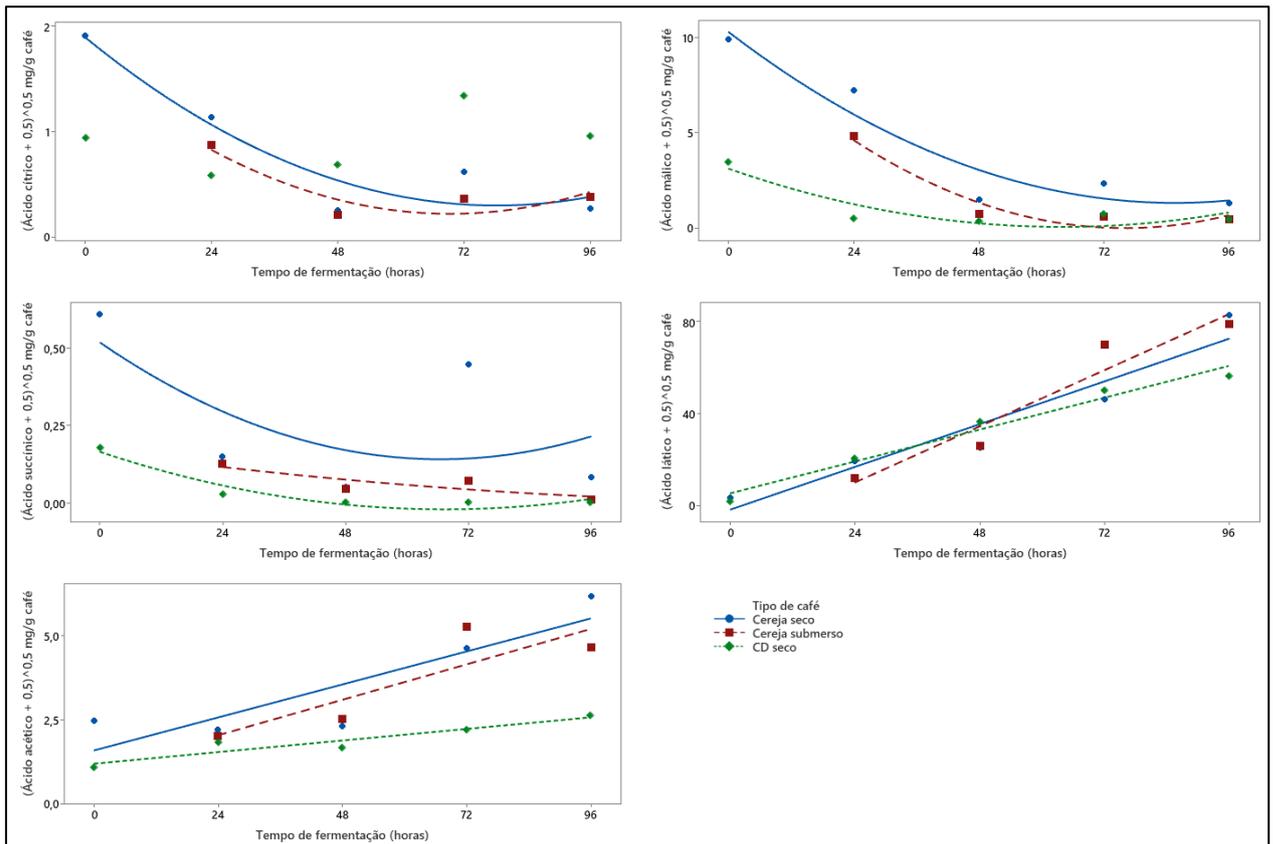
Menores teores de ácido láctico foram encontrados no fruto in natura (0hCD e 0hCEREJA), concomitante a isso com o passar do tempo de fermentação as concentrações do ácido elevam consideravelmente (Figura 7-D).

Menores teores de ácido láctico foram encontrados in natura no tempo 0 (0hCD e 0hCEREJA), concomitante a isso com o passar do tempo de fermentação as concentrações do ácido elevam consideravelmente. Vários ácidos orgânicos são produzidos durante a fermentação. O ácido láctico é um importante composto orgânico para a fermentação do café que contribui na acidificação da polpa não interferindo na qualidade do produto final (PEREIRA et al. 2017; CARDOSO et al., 2021). Carvalho Neto (et al. 2018), que o ácido láctico aumentou com o avanço da fermentação. Outros autores também encontraram essa cinética de produção para o ácido láctico durante a fermentação do café (MARTINEZ et al., 2017 e EVANGELISTA et al. 2015)

Concentrações de ácido málico diminui com desenvolvimento do processo de maturação. O ácido cítrico tem comportamento oposto, apresentando menores valores nos estágios iniciais do desenvolvimento do grão com um aumento durante

a maturação (KITZBERGER, 2012;). Segundo Rogers et al. (1999) o conteúdo de ácido cítrico em cafés está altamente associado com o nível de maturação dos grãos.

Figura 7. Gráficos de regressão para em função do tempo de fermentação para diferentes tipos de ácidos orgânicos.



A = Ácido cítrico; B = Ácido málico; C = Ácido succínico; D = Ácido láctico; E = Ácido acético.

Os ácidos orgânicos, na sua maioria, conferem brilho e vivacidade à bebida do café, justificando o fato de cafés com elevada acidez apresentarem diferencial de preço na comercialização (KITZBERGER, 2012; LINGLE, 2011). O grão verde possui ácidos orgânicos próprios presentes em sua composição, estes resultam em características sensoriais distintas como por exemplo, o ácido cítrico proporciona sabor limão, o ácido láctico um sabor amanteigado e o ácido málico proporciona sabor maçã. Sua abundancia no café depende de vários fatores como origem, espécies/cultivares, método de processamento e grau de torrefação, que pode conferir diferentes graus de acidez aos grãos de café. Não obstante altas

concentrações de ácido interferem significativamente na percepção de outros sabores comuns, em especial os doces. Nos estudos de fermentação do café é comum avaliar os ácidos presentes uma vez que eles influenciam diretamente na qualidade sensorial final da bebida (PEREIRA et al. 2017; CARDOSO et al., 2021). Assim sendo, o índice de acidez e o perfil de ácidos orgânicos em cafés podem servir como importantes ferramentas na avaliação da qualidade da bebida (PIMENTA, 2001).

O ácido propiônico pode ser responsável pelo odor característico de queijo. Outros autores ao avaliar ácidos orgânicos por HPLC também reportaram a não detecção de ácido propiônico (EVANGELISTA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017a; PEREIRA et al., 2015; ELHALIS et al., 2020). A alta geração de ácido butírico e acético e propiônico pode indicar fermentação excessiva, o que leva à redução da qualidade da bebida, e sabor ou cheiro desagradável quando presente em concentrações superiores a 1 mg/mL (CARDOSO et al., 2021). A não detecção desses ácidos em nossa avaliação pode sugerir que a fermentação das aliqutas avaliadas não se deu em demasia.

O ácido acético foi detectado na maioria dos tratamentos, com aumento acentuado para todos os tratamentos. Este ácido contribui para a acidez final da bebida, que é uma característica desejável por conferir sabores frutados ou ligeiramente frutados na bebida. (Evangelista et al., 2014).

As variações nas concentrações dos ácidos orgânicos encontrados no referido estudo, devem ser considerados e explicados uma vez que diversos fatores alteram os índices de ácidos no café. As condições ambientais; microbiota nativa do fruto; estresse oxidativo sofrido pelas leveduras; processo de metabolização dos açúcares; adaptação e crescimento das leveduras; os nutrientes e disponíveis no meio fermentativo, a disponibilidade de fontes de carbono; a via de metabolização escolhido pelas leveduras são fatores que devem ser sopesados (SHIMAZU & WATANABE, 1981 e MILAN & ORTEGA, 1988).

3.5 Determinação de umidade

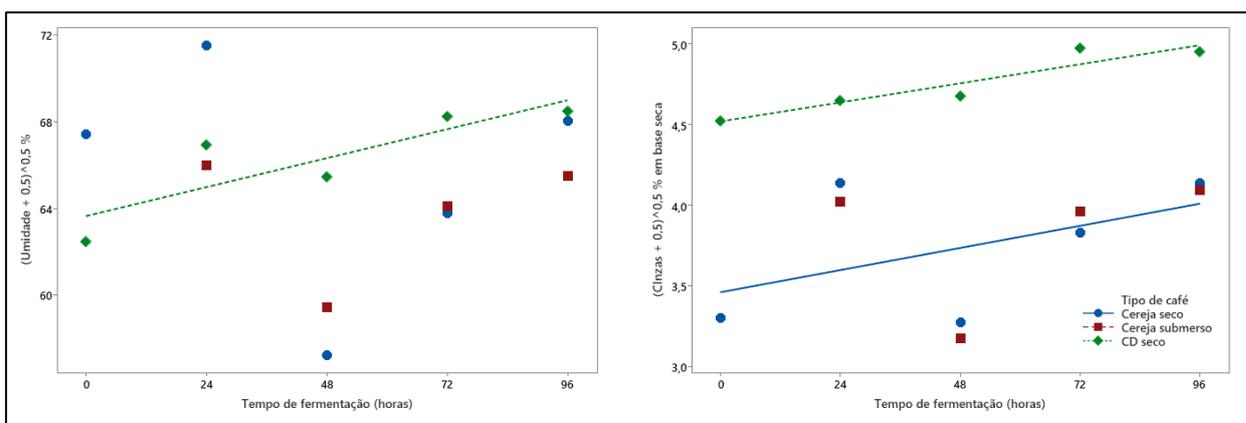
Quanto a umidade, não foram observados grandes diferenças significativas entre os tratamentos. Os tratamentos 48hCEREJA-SECO e 48hCEREJA-SUB

apresentaram menores valores de referência conforme observado na Tabela 1. O tratamento 96hCD-SUB obteve maior média de umidade (8.497 %) ao passo que no tratamento 48hCEREJA-SECO exibiu menor porcentagem (7.601%). Por meio da análise de regressão vislumbra-se que as concentrações de umidade e cinzas aumentaram por influência do tempo de fermentação sobre os tratamentos (Tabela 2; Figura 8)

A umidade do fruto íntegro quando colhido é em torno de 65% a 30% (b.u) (BOREM et al., 2008; MORGANO et al., 2008). O processamento do café objetiva a remoção da polpa/mucilagem e a diminuição do teor de umidade do fruto cereja do café, possibilitando a redução do seu conteúdo de água de 65% para um grau de umidade entre 10 e 12%. Essa umidade alta facilita a atividade enzimática dos microrganismos que alteram os metabólitos no grão por fermentações indesejáveis conforme Ribeiro *et al.* (2018)

A determinação de umidade do alimento é normalmente a primeira análise bromatológica a ser realizada na rotina analítica de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). Tendo em consideração que a presença de água livre nos alimentos pode ser o principal fator para os processos microbiológicos. A determinação de umidade é fundamental e é uma das medidas mais importantes e utilizadas para verificar padrões de identidade e qualidade em alimentos, além de auxiliar na tomada de decisão em várias etapas do processamento, como a escolha da embalagem, modelo de estocagem do produto, etc. (BOLZAN, 2013).

Figura 8 - Gráficos de regressão para em função do tempo de fermentação para umidade e cinzas.



A = Umidade; B = Cinzas.

3.6 Determinação do teor de cinzas

Os teores de cinzas encontrados pela análise de caracterização do fruto estão exibidos na Tabela 1. Observa-se, peculiarmente, que os frutos in natura 0hCEREJA e os tratamentos 48hCEREJA-SECO e 48hCEREJA-SUB foram os com os menores níveis de cinzas. O tratamento 72hCD-SECO obteve maior média de umidade 2.341%, por sua vez o tratamento 48hCEREJA-SUB apresentou menor porcentagem (1.919%) (Tabela 2; Figura 8).

A análise de cinzas é importante para informar a deficiência nutricional na lavoura de café e o aporte nutricional da lavoura deve ser muito bem estabelecido e mensurado para que a mesma possa desenvolver frutos com qualidade superior (MARTINEZ *et al.*, 2014).

O conteúdo de cinzas está relacionado ao teor de minerais da amostra. Na literatura, os teores encontrados de minerais para o café verde estão estabelecidos entre 3 a 5,4% (MUSSATO *et al.*, 2011). As cinzas de um alimento é um resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica, que é transformada em dióxido de carbono, água e dióxido de nitrogênio. Elas são estabelecidas principalmente de: potássio, sódio, magnésio e cálcio, pequena quantidade de ferro, cobre, manganês, zinco e alumínio e traços de iodo, flúor, argônio e outros elementos (CECCHI, 2003). Dentre os micronutrientes presentes no café o potássio é o que apresenta maior proporção de 1,54% (b.s) seguido do nitrogênio,

fósforo, magnésio, cálcio e enxofre. (BOREM *et al.*, 2008). A carência de potássio leva a uma “queima foliar”, que é a necrose marginal nas bordas das folhas mais velhas apresentando uma coloração castanha escura o que afeta a qualidade do fruto, gerando frutos pequenos, cochos e mal granados com menor resistência da planta à seca (MARTINEZ *et al.*, 2014; CRUZ *et al.*, 2015).

Ribeiro *et al.*, (2018) avaliou teores de cinzas em frutos cereja de base úmida de outras variedades de café e descreveu, respectivamente, teores de cinzas: variedade Ouro Amarelo (1,71%), Mundo Novo (1,77%) e para a variedade Catuaí Vermelho (1,58%). Pinheiro *et al.* (2021) relataram valores de cinzas, em base seca para espécie *C. canéfora* de 4,2% e para *C. arábica* de 4,4%.

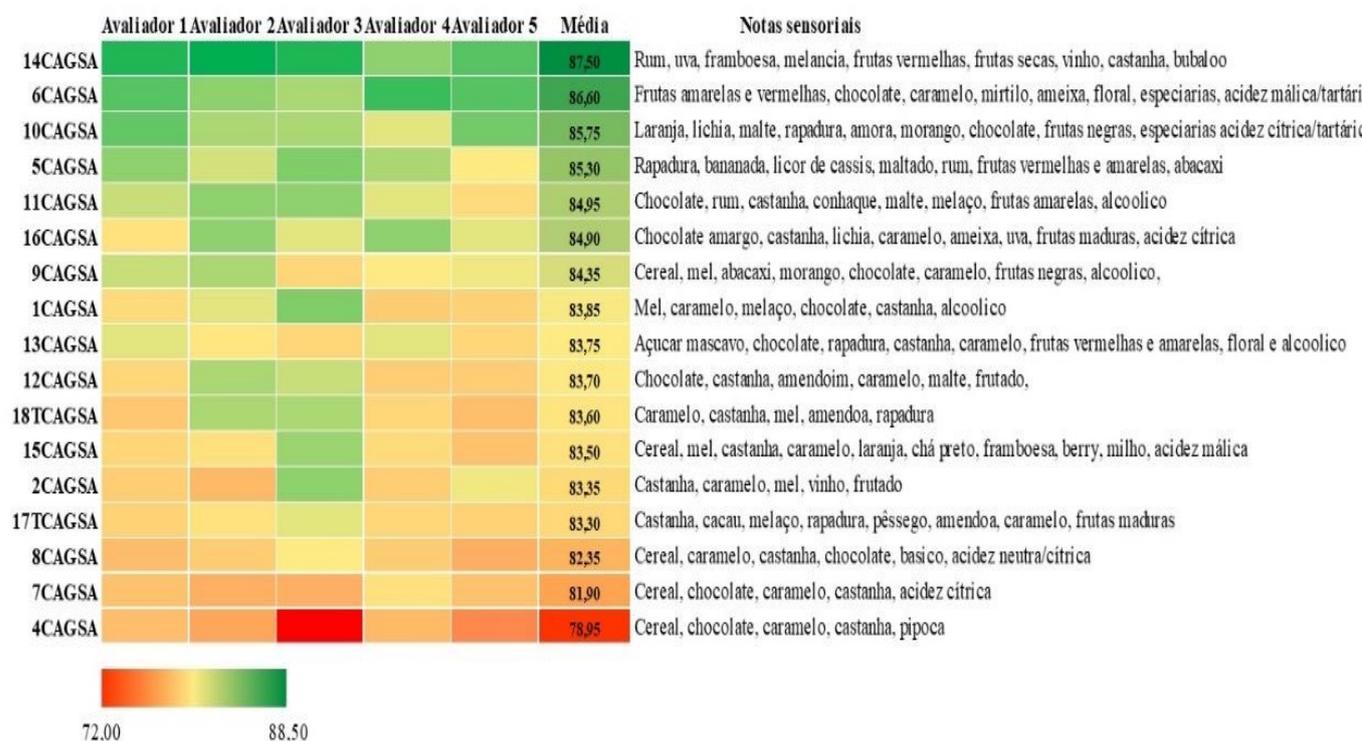
3.7 Características Sensoriais

Os resultados gerais da análise sensorial dos cafés fermentados estão dispostos na Figura 9. Conforme mostrado, houve pouca variação nas notas, que ficaram entre 78,95 e 87,50 para as amostras degustadas. Nas diferentes metodologias empregadas no experimento, sendo fruto cereja ou CD, no processamento seco ou submerso, com diferentes tempos de fermentação, visando a avaliação das influências destes experimentos na construção do perfil sensorial do café na prova de xícara, constatou-se pelas considerações dos *Q-Graders*, os atributos sensoriais mais prevalentes foram: caramelo, castanha, chocolate e cereal, mas atributos adicionais foram mencionados em outros descritores (Figura 9).

A Semana Internacional do Café promove, anualmente, o concurso *Coffee Of The Year* com o objetivo reunir os melhores cafés do Brasil e eleger os grandes destaques do ano. O concurso recebe as amostras de produtores de todo o Brasil que são torradas e provadas por profissionais *Q-Graders* licenciados pelo CQI (*Coffee Quality Institute*). Na segunda fase, as melhores amostras participam do evento e são provadas por compradores. Na edição do Concurso do ano 2021 o Café Catiguá MG2 da fazenda Santiago (município de Presidente Olegário – MG, Brasil) foi o campeão da edição com nota final 90+. Participou com café processado naturalmente e a notas sensoriais dos núcleos atribuídos pelos *Q-Graders* foram:

vinho, frutas tropicais, doce, cereja, cremoso, mel, uva passa, chocolate, vinho tinto, jabuticaba, refrescante, borbulhante framboesa, água tônica (SIC, 2021).

Figura 9 - Mapa de cores do experimento do Café Catiguá MG2 com a média das pontuação seguida pela análise sensorial de cada amostra estabelecida pelos Q-Graders licenciados pelo CQI (*Coffee Quality Institute*).



Reichel et al., (2023) analisou cultivares de *C. arabica* com diferentes níveis de resistência à Ferrugem, escores sensoriais finais e nuances de aroma e sabor da xícara de café. Os autores observaram que os cultivares com maiores escores sensoriais finais foram os cafés Arara e Catiguá MG2 . Os cafés com notas entre 80 e 84 são classificados como “muito bons”; os cafés com notas maiores entre 85 e 89 são classificados como “excelentes”. Os autores observaram nota de 85,4 para o Catiguá MG2 e na análise sensoriais apresentaram nuances como: caramelo, mel, melaço, açúcar mascavo, cana-de-açúcar em bruto, cítrico e frutado; além desses os termos frutas vermelhas, morango, vínico, especiarias, limão e floral foram observados apenas no Catiguá MG2.

O potencial de cultivares de *C. arabica* resistentes à Ferrugem para o mercado de cafés especiais a serem produzidos no estado de Minas Gerais foi

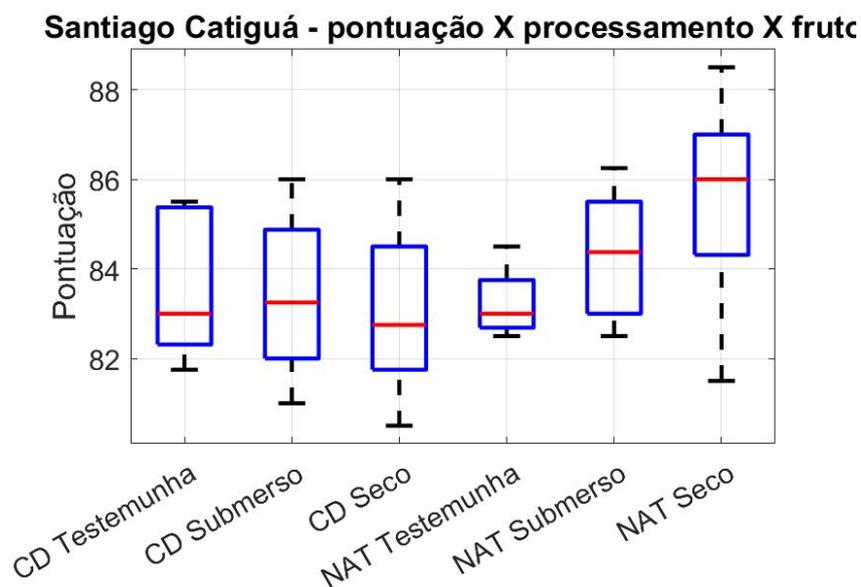
avaliado, ainda, por outros pesquisadores. Fassio et al. (2016) avaliaram cultivares de *C. arabica* com diferentes níveis de resistência à Ferrugem e averiguaram que as cultivares Araponga MG1, Catiguá MG2 e Catiguá MG1 eram as mais promissoras para a produção de cafés no estado. Carvalho e cols. (2016) similarmente evidenciaram o potencial das cultivares Araponga MG1 e Catiguá MG2 em Minas Gerais. Outros estudos demonstraram o potencial genético das qualidades sensoriais de genótipos de café resistentes à Ferrugem em Minas Gerais (Sobreira et al. 2016; Barbosa et al. 2019; Pereira et al. 2019).

3.8 Boxplot

Com os dados obtidos, foram elaborados, gráficos BoxPlot utilizando o software MATLAB®, explorando as correlações entre as pontuações obtidas pelos pareceres dos *Q-Graders* com os diferentes parâmetros avaliados no experimento.

Na Figura 10 analisa-se a relação de processamento do fruto de café Seco (FES) e Submerso com frutos Cereja (NAT) e CD no qual o CD seco a assimetria não se mostra presente em função da mediana mais próximo de Q1, e neste caso obteve-se em Q3, valor máximo de 86,0 com destaque para LS de aproximadamente 88,5 pontos. Com estes valores o experimento Cereja (NAT) Seco conseguiu os melhores resultados, com mediana de 86 pontos e um LS de aproximadamente 88,5 pontos. O tratamento CD seco apresentou resultados menos promissores com mediana aproximada de 83 pontos e Q1 abaixo de 82 pontos.

Figura 10 - Tipo de processamento fermentativo sendo em estado Seco ou Submerso e tipo de fruto Natural-Cereja ou CD do experimento com o Café Catiguá MG2

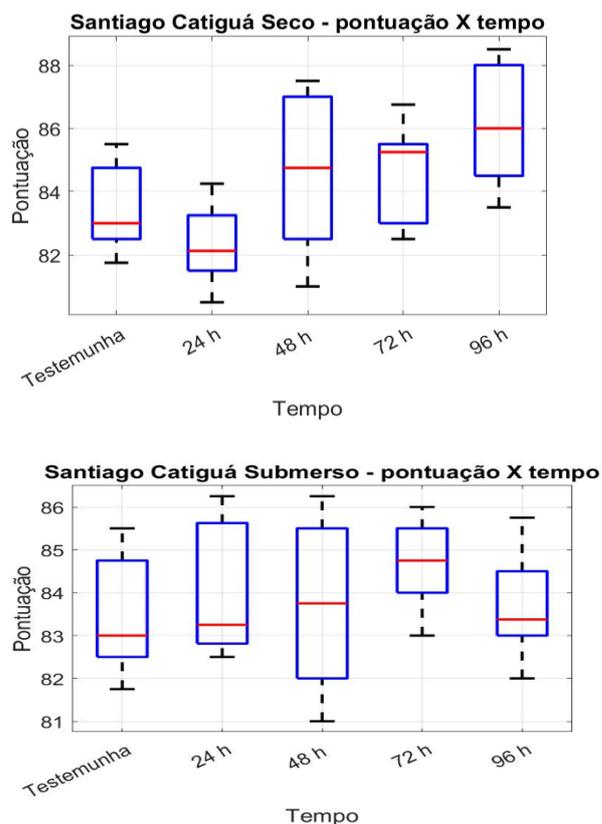


Na Figura 11 observa-se os experimentos realizados utilizando processos sem adição de água (seco) e com adição de água (submerso) são apresentados nas Figuras 11A e 11B. Os melhores resultados dos processos foram secos e alcançados com o tempo de 96 horas de fermentação com a caixa apresentando uma mediana 86,0 com LS de 88,5 pontos e Q3 em 88,0. Para os processos de frutos de cafés submerso (Figura 11B), o resultado que se mostrou melhor foi com o tempo de 72 horas, com a mediana de 84,75 pontos, Q3 com 85,5 pontos e um LS de 86,0 pontos.

Para o processamento Seco o tempo de 24 horas exibiu uma mediana de 82,0 pontos, valor que é aproximadamente o Q1 da testemunha, indicando que que 50,0% das notas em 24 mostram análogos ao intervalo interquartil da testemunha, apontando para este tempos que a fermentação teve pouca eficiência em crescer valor nas notas finais da bebida. Para os processos de frutos de cafés submersos mostrado na Figura 11B, os resultados encontrados constataam que, o tempo de 72 e 48 horas apresentar um melhor resultado, os tempos de 24 e 96 horas se mostraram bem semelhantes, com a mediada do tratamento testemunha. Nesta situação, o experimento submerso, para todos os tempos analisados, deu-se

variações pouco significativas nos valores médios das notas, mesmo, quando comparado à testemunha, todos os tempos do experimento submerso.

Figura 11 - Experimento do Café Catiguá MG2 com Fermentação de Frutos em estado sólido FES Seco (A) e Submerso (B) em diferentes tempos.

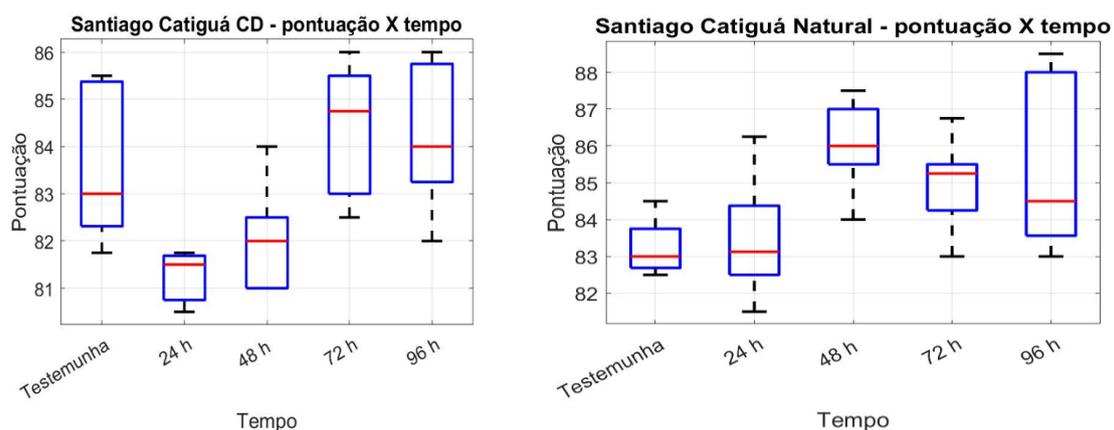


Os melhores resultados dos processos foram secos e alcançados com o tempo de 96 horas de fermentação com a caixa apresentando uma mediana 86,0 com LS de 88,5 pontos e Q3 em 88,0. Para os processos de frutos de cafés submerso (Figura 11B), o resultado que se mostrou melhor foi com o tempo de 72 horas, com a mediana de 84,75 pontos, Q3 com 85,5 pontos e um LS de 86,0 pontos.

Nos resultados do tipo de fruto Cereja (NAT) ou CD, nos diferentes tempos de fermentação, são apresentados nas Figuras 12A e 12B. Para os resultados do tipo de fruto CD (Figura 12A), o tempo de 72 horas, se mostrou melhor neste experimento, em relação aos demais tempos, com uma mediana de 84,75 com uma distribuição simétrica dos dados na caixa interquartil, e com um LS de 86 pontos.

Na Figura 12B, para o fruto Natural (Cereja), o resultado que se destaca é o com tempo de 48 horas, com uma mediana de 86 pontos, Q3 em 87,0 pontos e LS de 87,5 pontos. O Tratamento 96 horas apresentou uma caixa interquartil maior com Q3 em 88 pontos e LS em 88,5, todavia a mediana encontra-se em 84,5 pontos.

Figura 12: Experimento do Café Catiguá MG2 com processamento de frutos CD (A) e Natural-Cereja (B) em diferentes tempos de fermentação.



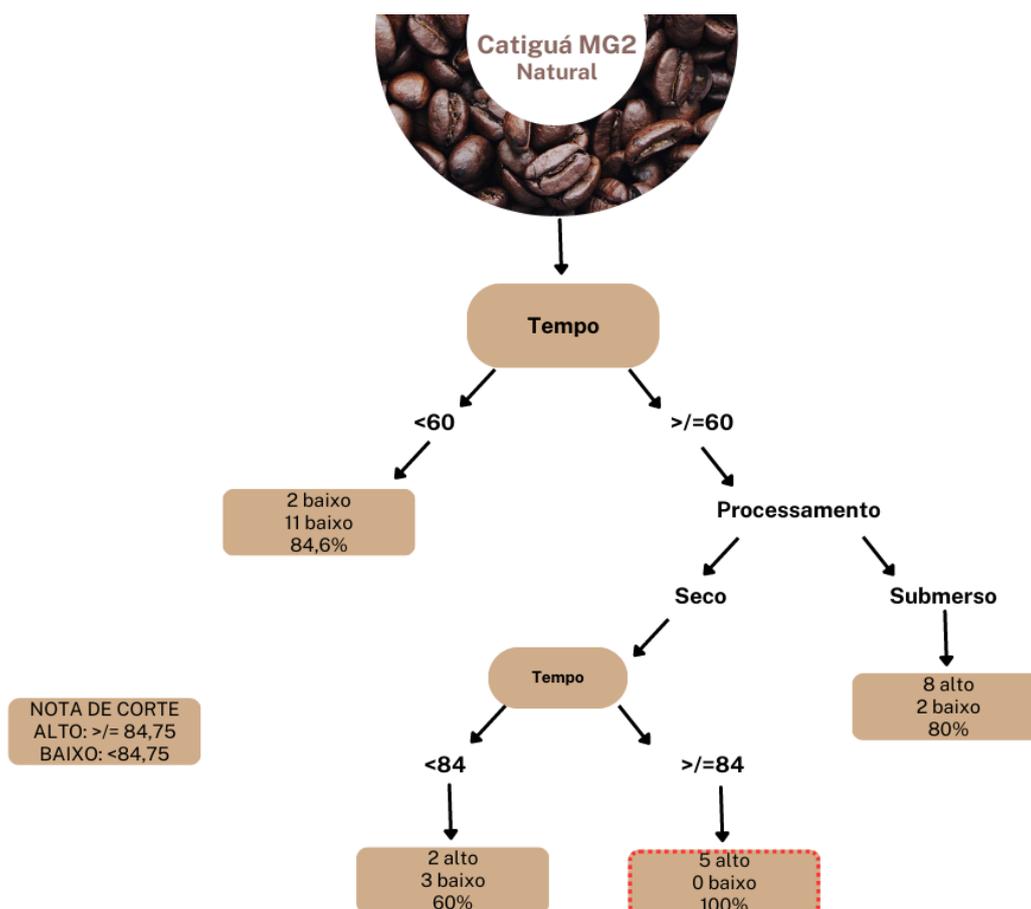
Para os processos de frutos de cafés Cereja (Figura 12B), vê-se que para o tempo de 24 horas, a mediana apresenta valor de 83,0 pontos muito próximo a mediana comparado com a testemunha; com Q3 não superior a 84,25 pontos, indicando que as notas para este tempo estão, em sua maioria, dentro do intervalo interquartil da testemunha, sugerindo que este tempo a fermentação agregou pouco valor à nota da bebida do café. Não se assemelha os tempos 48, 72 e 96 horas, onde a mediana é de no mínimo 84,25 e Q1 mínimo de 83,5 para esses 3 tratamentos; indicando que 50,0% dos valores da nota são superiores a da testemunha. Observa-se pelos gráficos possível melhoria na pontuação após as 24 horas do tempo do experimento fermentativo com fruto natural. O fruto CD (Figura 12A), o tempo 24 horas apresentou um Q3 inferior ao Q1 da testemunha; sugerindo que esse tratamento não atribuiu vantagem a pontuação do café; para o tempo 48 horas há um desempenho pouco melhor, mas também modesto. Os tratamentos 72 e 96 horas que exibiram médias superiores a da testemunha e também Q1.

3.9 Árvore de Decisão

Dentre os resultados das análises dos dados que compõe o trabalho, destaca-se abaixo, estruturas visuais de árvores de decisão (decision tree), elaborada por algoritmos de *machine learning* (MatLab®) com o objetivo de facilitar a visualização e compreensão das melhores metodologias encontradas nos experimentos para que no futuro possa facilitar uma tomada de decisão em qual processo utilizar.

Nas Figuras 13 e 14 que se seguem a avaliação abrangeu todas as categorias observadas no experimento (Cereja e CD, Seco e Submerso). Neste caso a nota de corte foi de Alto: $\geq 84,75$ e Baixo: $< 84,75$ pontos.

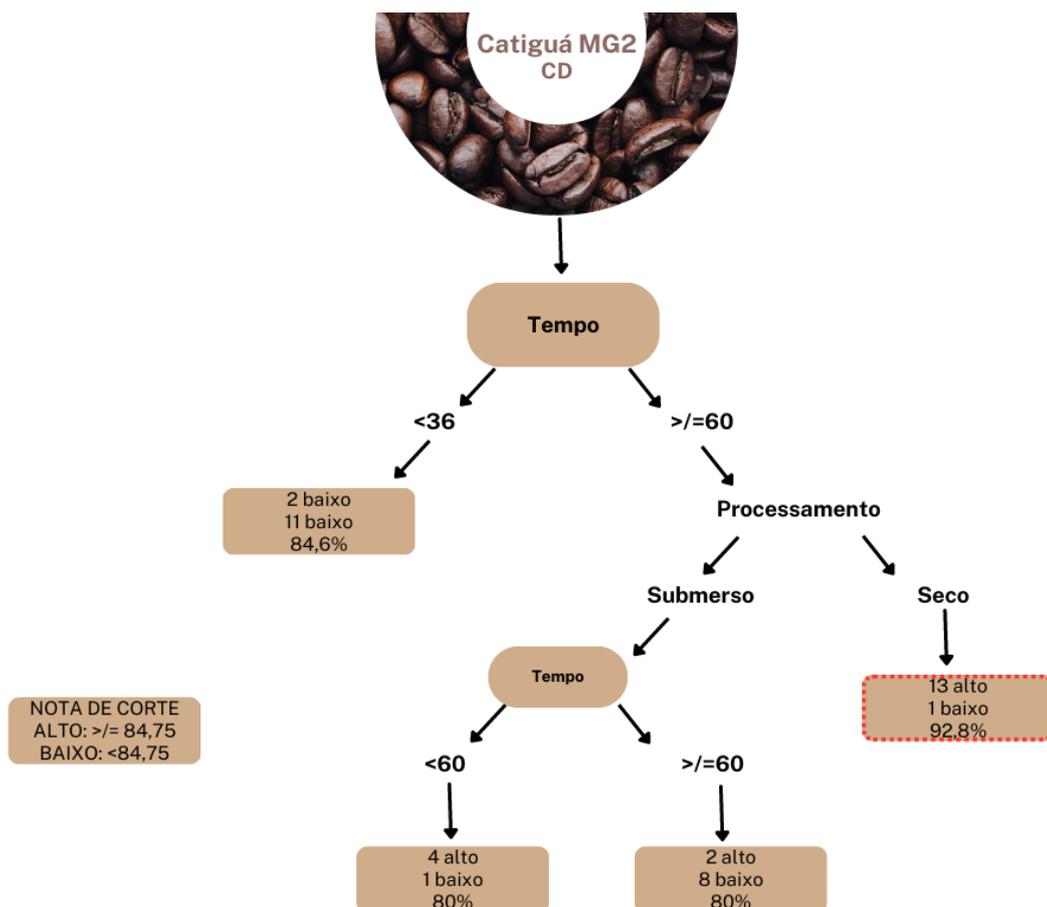
Figura 13 - Representação de uma Árvore de Decisão Para o Café Catiguá MG2, com Processamento Cereja (Natural).



Fonte: Pedro L. L. Bertarini/FEELT-UFU adaptado pelo autor.

Na Figura 13 verifica-se na análise com processamento Cereja (Natural), que dentre as escolhas relacionadas no primeiro nó (nó-raiz), a primeira variável considerada foi o Tempo, e que com base nas probabilidades temos que os melhores resultados foram obtidos com tempo ≥ 60 horas. No nó subsequente, diferentemente da anterior que considerada tempo, considera-se o tipo de processamento. Consta-se que o melhores resultados da avaliação sensorial da bebida foram as obtidas a partir do processo fermentativo seco. Dentro do tratamento seco, volta-se a um nó de variável tempo e vislumbra-se que os resultados melhores são superiores ≥ 84 horas com assertividade de 100%.

Figura 14 - Representação de Uma Árvore de Decisão Para o Café Catiguá MG2, com Processamento CD.



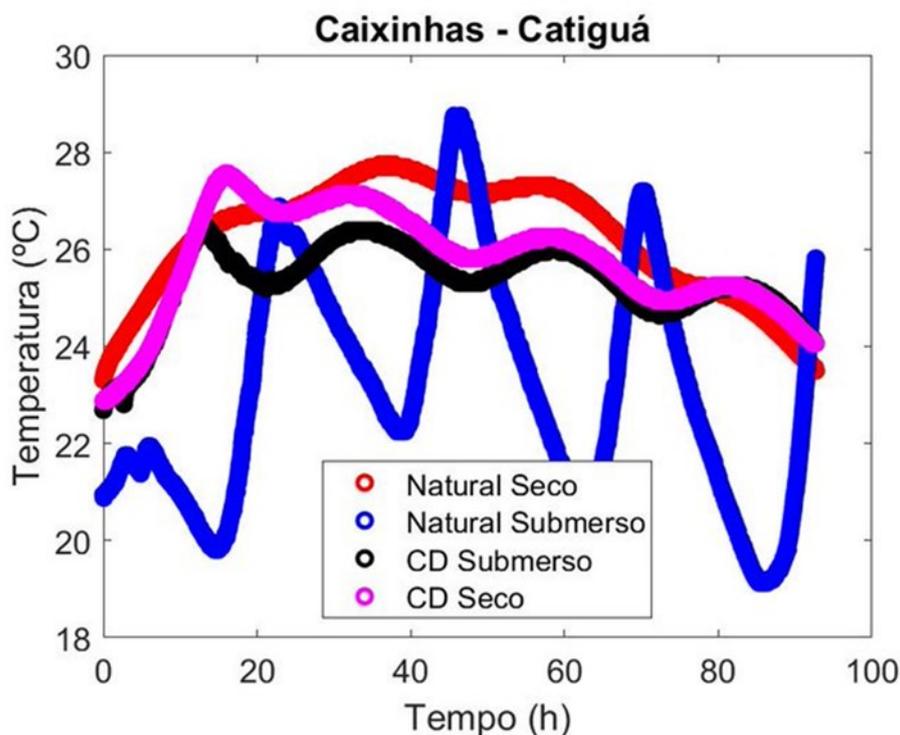
Fonte: Pedro L. L. Bertarini/FEELT-UFU adaptado pelo autor.

Na análise da Figura 14 para os cafés CD, nó (nó-raiz), a primeira variável considerada foi também o Tempo e os melhores resultados foram obtidos com tempo ≥ 60 horas. No nó ulterior considera-se o tipo de processamento e identifica-se que o café submetido a fermentação seca apresenta resultados preferíveis com assertividade de 92,8%.

3.10 Temperatura da massa de café nas fermentações

Na Figura 15 observa-se as variações de temperatura da massa de café nos processos de fermentação do fruto de café Seco e/ou Submerso com frutos Cereja e/ou CD. Os dados foram capturados por sistema de aquisição de dados desenvolvidos pela Faculdade de Engenharia Elétrica (FEELT) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) campus Patos de Minas e acoplados aos biorreatores herméticos.

Figura 15 - Variações da temperatura da massa de café nas fermentações com os frutos cereja (natural) e cereja descascado (CD).



Fonte: Pedro L. L. Bertarini/FEELT-UFU adaptado pelo autor.

Pode-se observar que as variações da temperatura interna dos biorreatores, para todos os modelos experimentais, permanecem numa faixa que atinge pontos extremos entre 10°C e 29,5°C. A massa de café Natural Submerso apresentou maior instabilidade térmica com variações mais bruscas. Natural seco, CD Seco e Submerso permanecem numa faixa mais estável em meio a 23°C e 28°C.

Ao considerar que prevalentemente os microrganismos fermentativos se desenvolvem em temperaturas ótimas entre 25°C e 40°C, e são classificados como mesófilos em algumas faixas de tempos os processos fermentativos do nosso experimento estiveram fora da faixa da temperatura ideal. No entanto, as temperaturas mínimas atingidas não foram tão baixas a ponto de inviabilizar ou maleficar totalmente o crescimento microbiológico, mas presumivelmente postergar em virtude da velocidade das reações que ocorreram de forma gradual e vagaroso. Por isso o processo fermentativo foi conduzido por 96 horas. Tempos superiores de fermentação podem, por conseguinte, ter contribuído com melhor pontuação na fermentação (Brioschi Junior et al. 2020).

Vale salientar que intercorrências técnicas no funcionamento dos sensores devem ser consideradas; por fenômenos como profundidade na qual o sensor foi instalado dentro do biorreator; pela melhor vedação dessa bombona; ou ainda, por um problema físico no sensor em questão.

3.11 BRIX

3.11.1 Tratamento Submerso:

Uma vez que os fatores tempo e tipo de café não apresentaram interações, ambos os fatores foram analisados de forma isolada. As tabelas 3 e 4 apresentam os resultados para comparação de média para os dois fatores.

Tabela 3 – Comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de significância para fonte de variação tempo.

Tempo	Brix (°Brix)
48 horas	5.26 b
72 horas	5.96 a

96 horas	5.46 b
CV (%)	4.82

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste de agrupamento de Tukey a 5% de significância.

Tabela 4 – Comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de significância para fonte de variação tipo de café.

Tipo de café	Brix (°Brix)
CD	4.51 b
Cereja	6.58 a
CV (%)	4.82

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste de agrupamento Tukey a 5% de significância.

De acordo com a tabela 3 pode-se inferir que o Brix se altera com o tempo, no início do tempo de fermentação esse se apresenta em teores mais baixos. No tempo intermediário de 72 horas esse se eleva, apresentando diferença estatística em comparação com os demais tempos. Entretanto, esse volta a diminuir com o passar do tempo de fermentação. Ao analisar o tipo de café é importante ressaltar que independente do tempo de fermentação o café Cereja apresenta cerca de 46% a de Brix quando comparado com o CD.

3.11.2 Tratamento Seco:

Uma vez que as fontes de variação apresentaram interação foi realizado o desdobramento dentro de cada nível dos fatores. A tabela 5 apresenta o desdobramento de café dentro de cada tempo.

Tabela 5 – Comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de significância para tipo de café dentro de cada nível do fator tempo para a variável Brix (°Brix).

Tempo	Tipo de café		CD	
	Cereja			
24 horas	18.28	a	5.08	b
48 horas	18.20	a	5.18	b
72 horas	15.22	a	5.62	b

96 horas	15.12	a	5.46	b
CV (%)	8.61			

Médias representadas por letras diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística pelo teste de agrupamento Tukey a 5% de significância.

Como na avaliação com o café submerso, na avaliação como café seco é notório observar que o café cereja apresenta teores muito mais elevados quando comparado com o café CD, sendo essa diferença ainda maior. Café cereja apresenta cerca de duas vezes mais Brix do que o café CD.

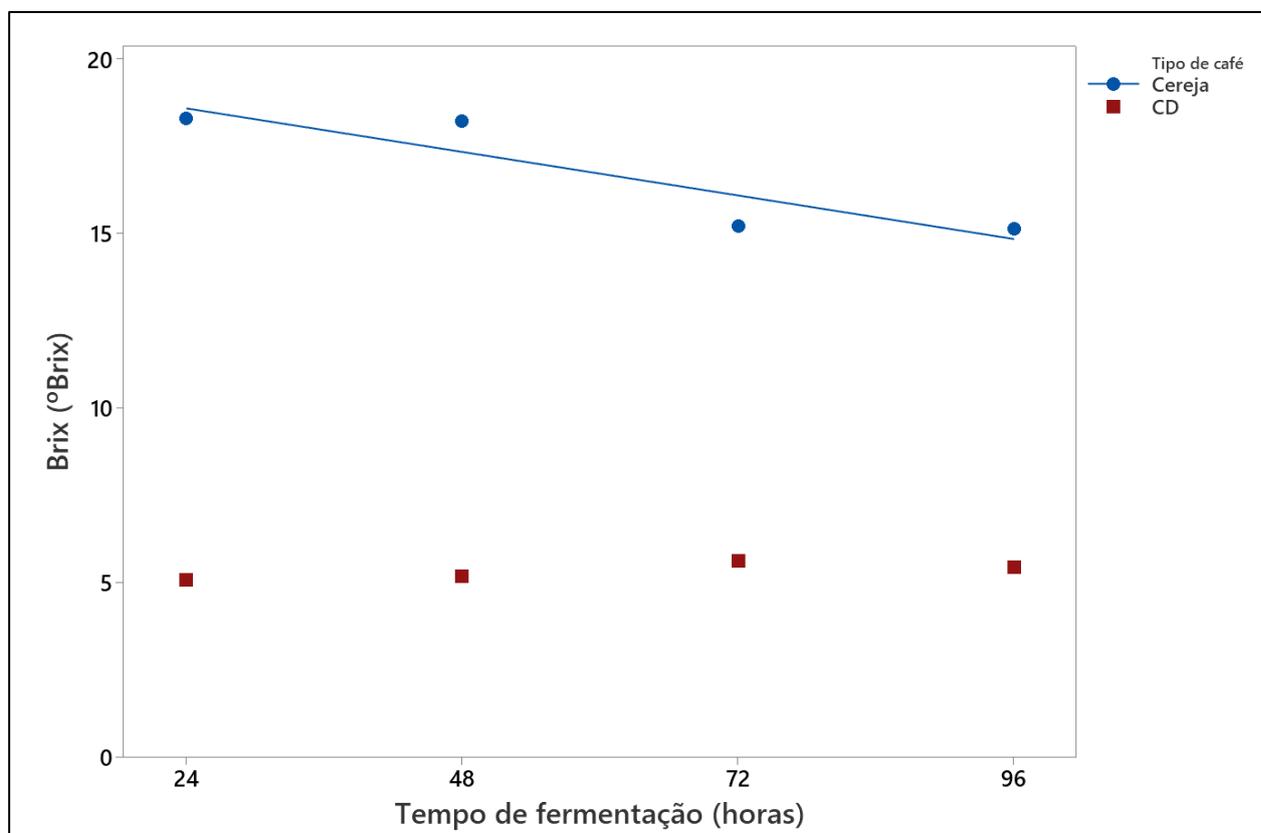
Para o desdobramento do tempo dentro de cada nível de café foi realizado a análise de regressão representada na figura 16. Sendo que a figura 16 foi construída com base nas informações da Tabela 6.

Tabela 6 – Equação da reta, o coeficiente de determinação (r^2) e o p valor para os efeitos linear e quadrático para Brix ($^{\circ}$ Brix).

Tipo de café	Efeito linear			Efeito quadrático		
	y	r^2 (%)	p	y	r^2 (%)	p
	Brix ($^{\circ}$Brix)					
CD	$0.006558x + 4.943$	67.30	0.4128	$-0.000115x^2 + 0.020412x + 4.610500$	76.91	0.759
Cereja	$-0.051917x + 19.82$	82.29	<0.0001*	$-0.000009x^2 - 0.050875x + 19.795$	82.91	0.9813

*informações dos modelos utilizados para construção do gráfico da figura 1.

Figura 16 – Gráficos de regressão para em função do tempo de fermentação para Brix (°Brix).



O efeito do modelo linear é o que melhor representa o café cereja com $r^2 = 82.39$ e p valor <0.0001 . Dessa forma, podemos afirmar que o teor de Brix para o tipo de café cereja diminui com o passar do tempo e para o café CD se mantém quase inalterável ao longo do tempo de fermentação. A maior estabilidade do Brix no café CD pode está correlacionado com a despulpagem; uma vez que a mucilagem contém grande quantidade de nutrientes.

Leroy et al. (2006) evidenciou a relação entre a qualidade da bebida do café e o nível de açúcares solúveis em grãos de café. Alves (2009) utilizou refratômetros para avaliar o estágio de maturidade dos frutos através do nível Brix e mostraram uma relação entre esses açúcares e as características sensoriais do café indicando que a metodologia pode ser uma estratégia oportuna para acompanhar o desenvolvimento e maturação dos frutos. Não obstante, altos valores de Brix não garantem bebida de alta qualidade, mas o contrário é também uma vez que apenas 5% dos cafés especiais analisados pertenciam

3.12 pH e temperatura

Os resultados de pH e temperatura ao longo de todo o processo fermentativo do café Arábica, variedade Catiguá MG2, realizado na Fazenda Santiago para processamento seco e submerso são descritos separadamente.

3.12.1 Seco:

Para temperatura os fatores tempo e tipo de café não apresentaram interações, ambos os fatores foram analisados de forma isolada. As tabelas 7 e 8 e figura 17 apresentam os resultados para comparação de média para os dois fatores e gráfico de regressão.

Tabela 7 – Comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de significância para fonte de variação tempo.

Tipo de café	Temperatura (°C)
CD	26.292 a
Cereja	25.292 a
CV (%)	6.00

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste de agrupamento de Tukey a 5% de significância.

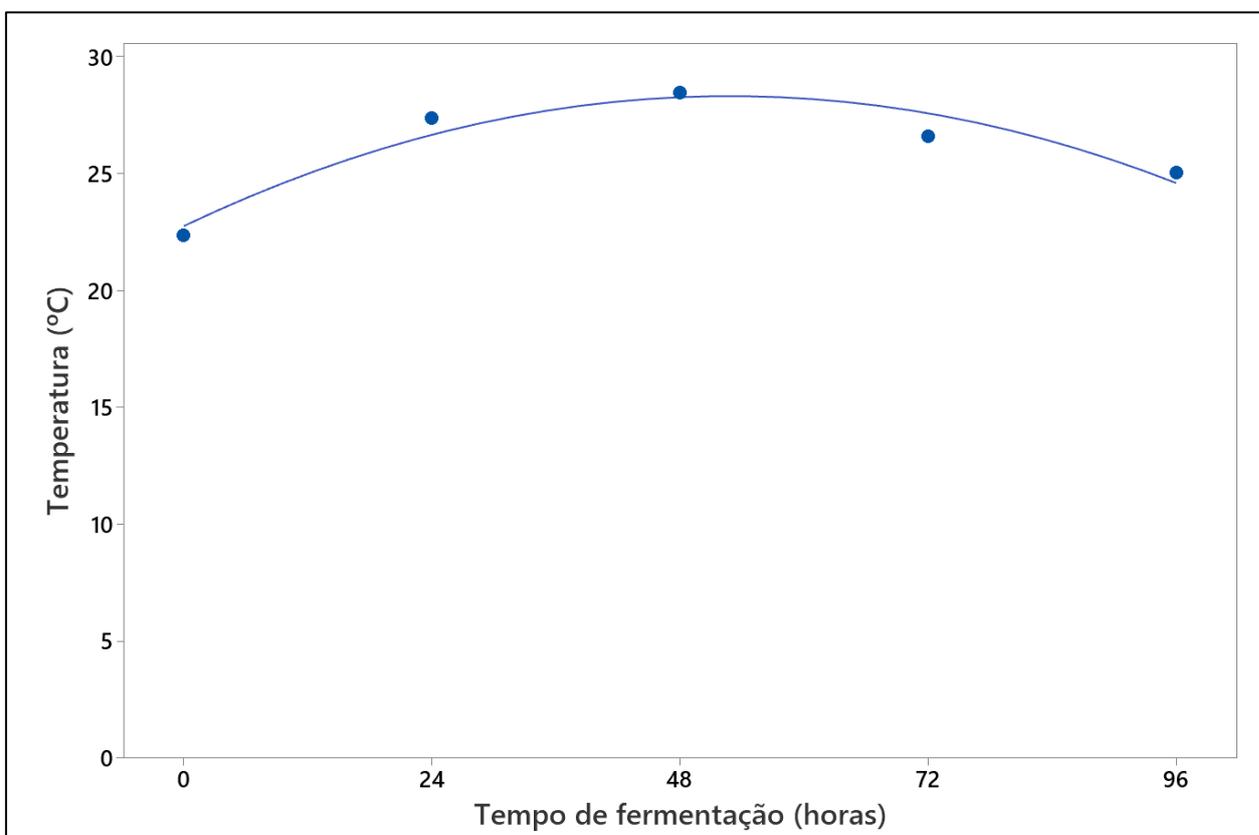
Não foi observado diferença estatística entre os dois tipos de café quando o fator tipo de café é analisado de forma isolada.

Tabela 8 – Equação da reta, o coeficiente de determinação (r^2) e o p valor para os efeitos linear e quadrático para temperatura (°C).

Tipo de café	Efeito linear			Efeito quadrático		
	y	r^2 (%)	p	y	r^2 (%)	p
	Temperatura (°C)					
Tempo	$0.019167x + 25.042$	9.46	0.0053	$-0.001992x^2 + 0.210357x + 22.747714$	91,79	<0.0001*

*informações dos modelos utilizados para construção do gráfico da figura 1.

Figura 17 – Gráfico de regressão para em função do tempo de fermentação para temperatura (°C).



O efeito do modelo quadrático é o que melhor representa a fonte de variação café com $r^2 = 91.79$ e p valor <0.0001 . Dessa forma, podemos afirmar que a temperatura se altera com o tempo, tendo seu pico por volta das 48 horas de fermentação. Vale ressaltar que esse modelo foi construído levando em consideração o fator temperatura isoladamente.

Para pH as fontes de variação apresentaram interação, dessa forma foi realizado o desdobramento dentro de cada nível dos fatores. A tabela 9 apresenta o desdobramento de café dentro de cada tempo.

Tabela 9 – Comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de significância para tipo de café dentro de cada nível do fator tempo para a variável pH.

Tempo	Tipo de café		CD	
	Cereja			
0 horas	4.776	b	5.214	a
24 horas	4.490	a	4.124	b
48 horas	4.318	a	4.066	b

72 horas	4.304	a	3.966	b
96 horas	4.204	a	4.030	b
CV (%)	1.27			

Médias representadas por letras diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística pelo teste de agrupamento Tukey a 5% de significância.

Com base nos dados da tabela 9, pode-se dizer que o café cereja apresenta menor pH que CD antes da fermentação começar. Mas, após a fermentação começar cereja apresenta pH mais elevado do que CD até o fim do processo.

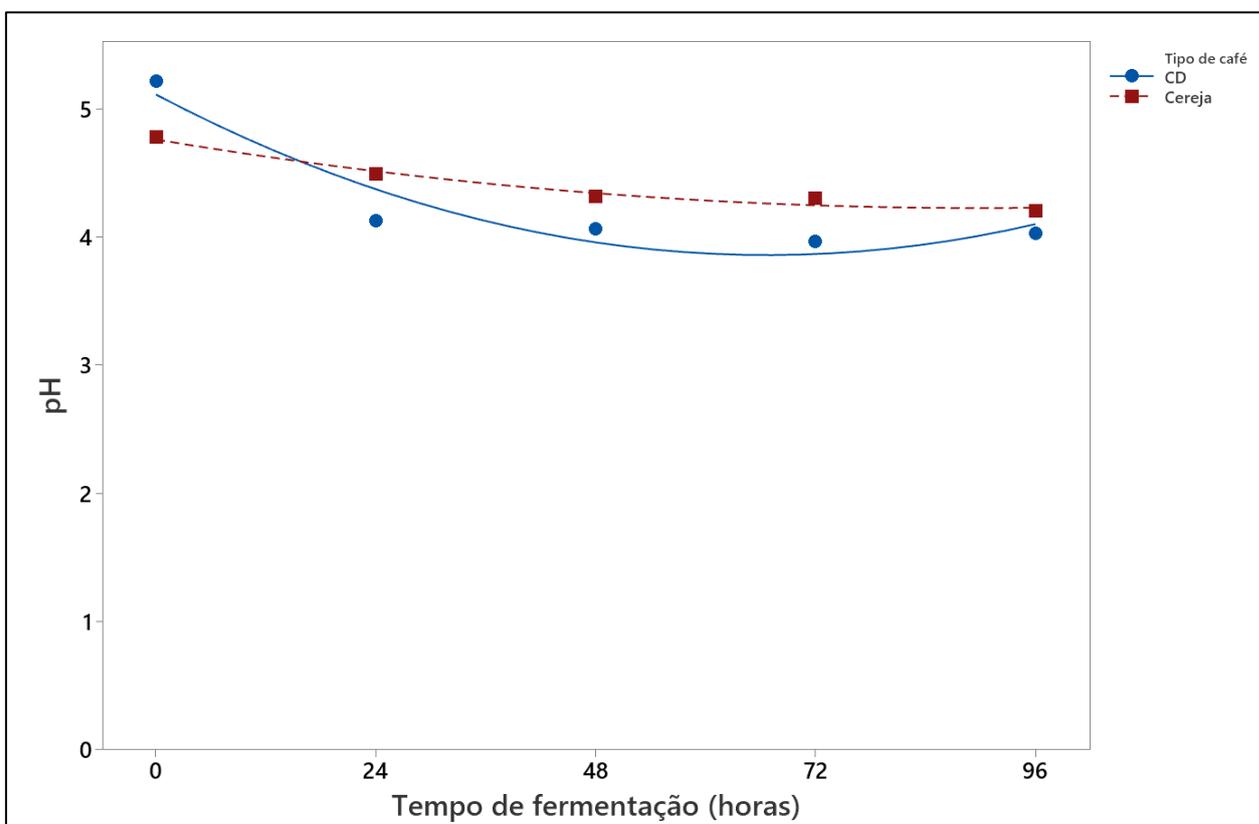
Para o desdobramento do tempo dentro de cada nível de café foi realizado a análise de regressão representada na figura 18. Sendo que a figura 18 foi construída com base nas informações da tabela 10.

Tabela 10 – Equação da reta, o coeficiente de determinação (r^2) e o p valor para os efeitos linear e quadrático para pH.

Tipo de café	Efeito linear			Efeito quadrático		
	y	r^2 (%)	p	y	r^2 (%)	p
pH						
CD	$-0.010525x + 4.7852$	57.82	<0.0001	$0.000281x^2 - 0.037501x + 5.108914$	91.05*	<0.0001
Cereja	$-0.005542x + 4.6844$	87.51	<0.0001*	$0.000066x^2 - 0.011851x + 4.760114$	97.43	<0.0001

*informações dos modelos utilizados para construção do gráfico da figura 2.

Figura 18 – Gráficos de regressão para em função do tempo de fermentação para pH.



O efeito do modelo linear é o que melhor representa o café cereja com $r^2 = 87.51$ e p valor <0.0001 e para CD foi o modelo quadrático com $r^2 = 91.05$ e p valor <0.0001 . Dessa forma, podemos afirmar que o pH para ambos tipo de cafés diminui com o passar do tempo e para o CD observamos uma tendência em aumento de pH se a fermentação persistisse por mais horas.

O decréscimo do pH no transcurso do processo fermentativo pode ser inferida pelas reações metabólicas da microbiota que se dão na presença de carboidratos, contribuindo para o aumento da temperatura da massa do café e reduzindo o pH devido à produção de ácidos orgânicos (ELHALIS *et al.*, 2020). Assim, as mudanças nos valores de pH e temperatura apresentam-se como variáveis importantes durante o processo de fermentação (MARTINS *et al.*, 2019).

3.12.2 Submerso:

Para temperatura os fatores tempo e tipo de café não apresentaram interações, ambos os fatores foram analisados de forma isolada. As tabelas 5 e 6 e figura 3 apresentam os resultados para comparação de média para os dois fatores e gráfico de regressão.

Tabela 11 – Comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de significância para fonte de variação tempo.

Tipo de café	Temperatura (°C)
CD	26.24 a
Cereja	28.07 a
CV (%)	6.00

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste de agrupamento de Tukey a 5% de significância.

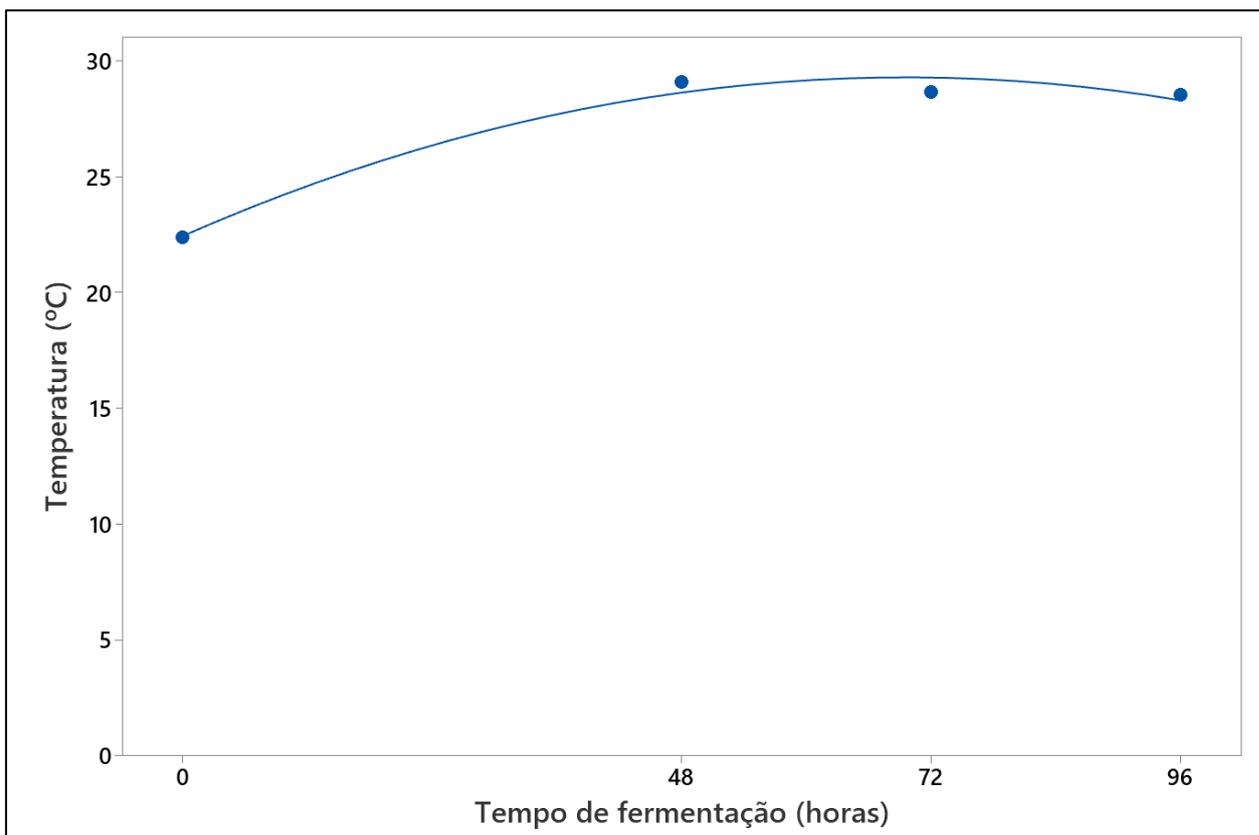
Não foi observado diferença estatística entre os dois tipos de café quando o fator tipo de café é analisado de forma isolada.

Tabela 12 – Equação da reta, o coeficiente de determinação (r^2) e o p valor para os efeitos linear e quadrático para temperatura (°C).

Tipo de café	Efeito linear			Efeito quadrático		
	y	r^2 (%)	p	y	r^2 (%)	p
Temperatura (°C)						
Tempo	$0.065833x + 23.60$	70.86	<0.0001	$-0.001414x^2 + 0.196742x + 22.436364$	97.92	<0.0001*

*informações dos modelos utilizados para construção do gráfico da figura 3.

Figura 19 – Gráfico de regressão para em função do tempo de fermentação para temperatura (°C).



O efeito do modelo quadrático é o que melhor representa a fonte de variação café com $r^2 = 97.92$ e p valor <0.0001 . Dessa forma, podemos afirmar que a temperatura se altera com o tempo, tendo seu pico por volta das 48 horas de fermentação.

Para pH as fontes de variação apresentaram interação, dessa forma foi realizado o desdobramento dentro de cada nível dos fatores. A tabela 7 apresenta o desdobramento de café dentro de cada tempo.

Tabela 13 – Comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de significância para tipo de café dentro de cada nível do fator tempo para a variável pH.

Tempo	Tipo de café		CD	
	Cereja			
0 horas	5.066	b	5.214	a
48 horas	4.050	a	3.988	b
72 horas	4.000	a	3.994	a
96 horas	3.916	b	4.054	a
CV (%)	1.10			

Médias representadas por letras diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística pelo teste de agrupamento Tukey a 5% de significância.

Com base nos dados da tabela 13, pode-se dizer o pH para ambos os tipos de café variam ao longo do período de fermentação, porém decaindo com o tempo de fermentação. Sendo que ao início e ao término da fermentação o CD apresentou maior pH.

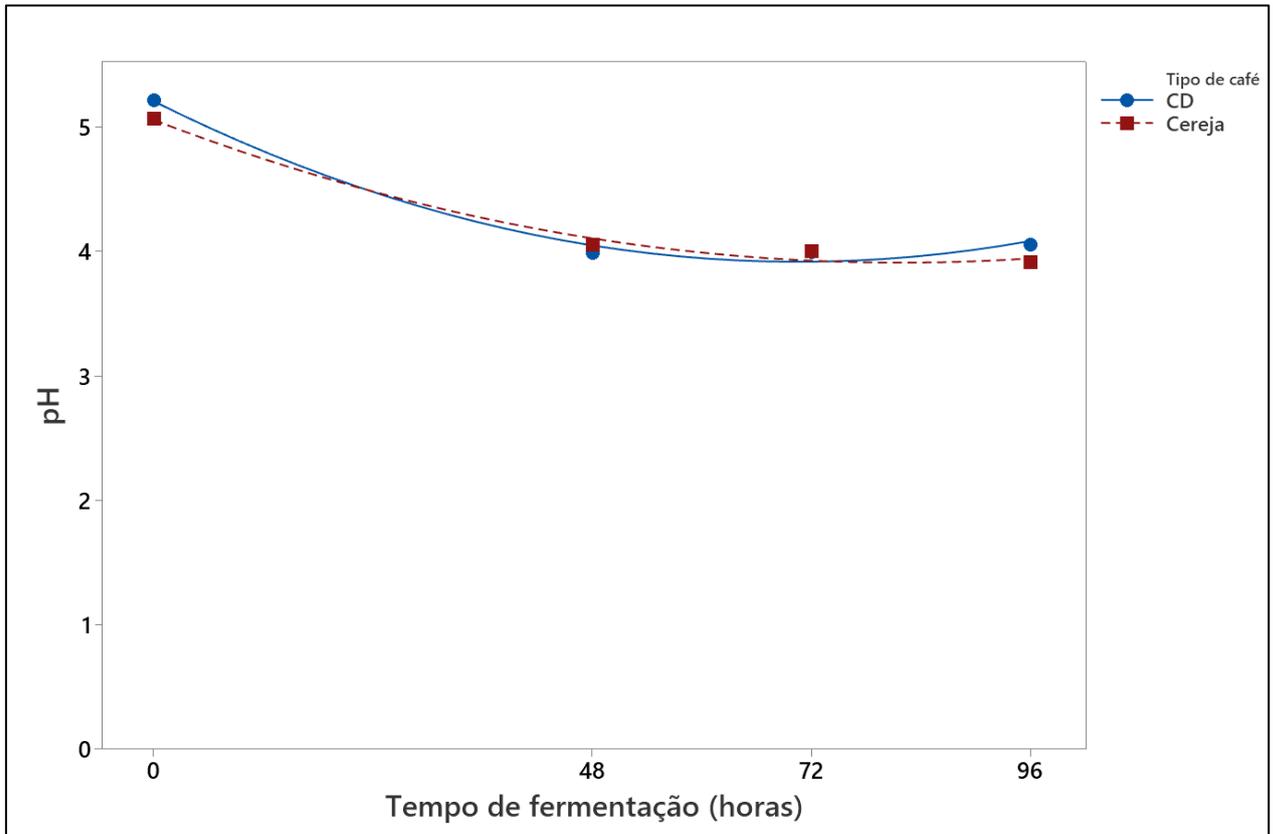
Para o desdobramento do tempo dentro de cada nível de café foi realizado a análise de regressão representada na figura 20. Sendo que a figura 20 foi construída com base nas informações da tabela 14.

Tabela 14 – Equação da reta, o coeficiente de determinação (r^2) e o p valor para os efeitos linear e quadrático para pH.

Tipo de café	Efeito linear			Efeito quadrático		
	y	r^2 (%)	p	y	r^2 (%)	p
pH						
CD	$-0.012564x + 4.990971$	73.24	<0.0001	$0.000259x^2 - 0.036555x + 5.204218$	99.03	<0.0001*
Cereja	$-0.012181x + 4.915771$	85.01	<0.0001	$0.000171x^2 - 0.028041x + 5.056745$	98.93	<0.0001*

*informações dos modelos utilizados para construção do gráfico da figura 4.

Figura 20 – Gráficos de regressão para em função do tempo de fermentação para pH.



O efeito do modelo quadrático foi o que melhor ajustou para ambos os tipos de café $r^2 = 99.03$ e 98.93 e p valor <0.0001 para CD e cereja respectivamente. Dessa forma, podemos afirmar que o pH para ambos os tipos de cafés decai com o passar do tempo e esse decaimento não é acentuado e com mais horas de fermentação esse pH indica tendência de incremento.

Cassimiro e colaboradores (2022) realizaram fermentação via úmida (SIAF) do café por 72 horas em biorreatores e também observaram que a temperatura aumentou durante o processo fermentativo enquanto os valores de pH foram reduzidos. Os achados dos autores evidenciaram que a temperatura da massa de café variou de $21,5^{\circ}\text{C}$ a 30°C do início ao final do processo fermentativo e os valores de pH do início ao final, variaram entre 5,7 e 4,22. Como resultados do estudo, o processo úmido realizado com frutos inteiros pelo método SIAF e cultura inicial resultou em cafés especiais e com alta doçura.

Martins *et al.* (2019) induziram a fermentação em frutos de café despulpados, das variedades Mundo Novo e Catuaí Vermelho e mostraram valores de temperatura dentro do tanque de fermentação de 15 a 21 °C (para ambas as variedades de café) e os valores de pH da água do tanque de fermentação variaram entre 4,9 e 4,24 para a variedade Catuaí e entre 5,25 e 4,36 para a variedade Mundo Novo. A diminuição do valor do pH era esperada devido ao metabolismo microbiano durante a fermentação, pela produção de ácidos. Após análise, sete ácidos orgânicos foram detectados (lático, acético, málico, cítrico, succínico, isobutírico e tartárico). Essa acidez presente no café está relacionada aos ácidos orgânicos, que influenciam no valor do pH fora dos grãos e diretamente na qualidade do café (MARTINS *et al.*, 2019).

Conclusão

Como apresentado pelo estudo a avaliação dos ácidos orgânicos no café submetidos a tempos e processamentos de fermentações distintos apresentaram o seguinte comportamento: o ácido cítrico decaiu gradualmente ao longo do tempo para os tratamentos Cereja seco e Cereja submerso. Algo semelhante foi observado para os ácidos málico e succínico para os tratamentos Cereja seco, Cereja submerso e CD seco. Para os ácidos lático e acético foi observado aumento acentuado das concentrações para todos os tratamentos.

A avaliação dos açúcares presentes no café teores de Sacarose, Glicose e Frutose reduziram gradualmente ao longo do tempo de fermentação. Ao passo que as concentrações de etanol, glicerol, umidade e cinzas aumentaram.

Nas análises do teor de Brix é notório observar que o café cereja apresenta teores muito mais elevados quando comparado com o café CD. Café cereja apresenta cerca de duas vezes mais Brix do que o café CD. Observou-se que o teor de Brix para o tipo de café cereja diminui com o passar do tempo e para o café CD se mantém quase inalterável ao longo do tempo de fermentação.

Na prova de xícara e atributos sensoriais definidos pelos *Q-graders* o café submetido com Processamento Cereja (Natural) obteve melhor resultado com tratamento seco ≥ 84 horas. Por sua vez os cafés processados em CD também performaram melhor em fermentação seca com tempo ≥ 60 horas.

Para avaliação do pH e Temperatura com fruto seco notou-se a temperatura se altera com o tempo, tendo seu pico por volta das 48 horas de fermentação. O café cereja apresenta menor pH que CD antes da fermentação começar. Mas, após a fermentação começar cereja apresenta pH mais elevado do que CD até o fim do processo. Dessa forma, podemos afirmar que o pH para ambos tipo de cafés diminui com o passar do tempo e para o CD observamos uma tendência em aumento de pH se a fermentação persistisse por mais horas.

A análise do pH e Temperatura com fruto submerso a temperatura se altera com o tempo, tendo seu pico também por volta das 48 horas de fermentação. O pH para ambos os tipos de café variam ao longo do período de fermentação, porém decaindo com o tempo de fermentação. Sendo que ao início e ao término da fermentação o CD apresentou maior pH. Dessa forma, podemos afirmar que o pH para ambos os tipos de cafés decai com o passar do tempo e esse decaimento ele não é acentuado e com mais horas de fermentação esse pH talvez possa vir a aumentar.

REFERÊNCIAS

ALVES, ENRIQUE ANASTÁCIO. Variabilidade espacial e temporal da qualidade do café cereja produzido na região das Serras de Minas. 135 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa. 2009.

BARBOSA, M. et al. Correlation between the composition of green Arabica coffee beans and the sensory quality of coffee brews. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 292, p. 275–280, 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.072>.

BASTIAN, F. et al. (2021). From Plantation to Cup: Changes in Bioactive Compounds during Coffee Processing. **Foods**, v. 10, n. 11, p. 2827, 2021. DOI: 10.3390/foods10112827.

BRIOSCHI JUNIOR, D et al. Microbial fermentation affects sensorial, chemical, and microbial profile of coffee under carbonic maceration. **Food Chemistry**, [s.l.] v. 342, p. 128296, 2021.

BRESSANI, A. P. P. et al. (2021). Influence of yeast inoculation on the quality of fermented coffee (*Coffea arabica* var. Mundo Novo) processed by natural and pulped natural processes. *International Journal of Food Microbiology*, 343. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109107>

BUSSAB, W.; MORETTIN, P. **Estatística Básica**. 6ª ed. São Paulo: Editora Saraiva, 2010.

CARDOSO, W. S., AGNOLETTI, B. Z., FREITAS, R.; PINHEIRO, F. A. (2021). Biochemical aspects of coffee fermentation. In L. L. Pereira, & T. R. Moreira (Eds.), *Quality Determinants In Coffee Production* (1st ed.,, pp. 149–208). Cham: Springer.

CARDOSO, W. S et al. Biochemical Aspects of Coffee Fermentation. In: Pereira, L. L.; Moreira, T. T. *Quality Determinants In Coffee Production* (org). Food Engineering Series - Published: 13 December 2021. cap 04. p. 149 - 208. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-54437-9>. Acesso em 02 de junho de 2023

CARVALHO, A. et al. Relationship between the sensory attributes and the quality of coffee in different environments. **African Journal of Agricultural Research**, [s.l.], v. 11, n.38, p. 3607–3614, 2016. DOI <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11545>.

CARVALHO, V. **Qualidade do café**. 1998. 53 p. Monografia (Curso de Especialização à distância: Cafeicultura empresarial: Produtividade e Qualidade) – Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

CASSIMIRO, Débora Mara et al. Coinoculation of lactic acid bacteria and yeasts increases the quality of wet fermented Arabica coffee. **International Journal of**

Food Microbiology, v. 369, p. 109627, 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109627>.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2ed., 2003.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de café, Brasília, DF, v. 10, n. 2 segundo levantamento, maio. 2023.

ELHALIS, H., COX, J., FRANK, D.; ZHAO, J. (2020). The role of wet fermentation in enhancing coffee flavor, aroma and sensory quality. *European Food Research and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03641-6>

ELHALIS, H.; COX, J.; ZHAO, J. Coffee Fermentation: Expedition from Traditional to Controlled Process and Perspectives for Industrialization. *Appl. Food Res.* **2023**, 3, 100253.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS – EPAMIG. **Novas cultivares de café desenvolvidas pelo programa de melhoramento genético da EPAMIG**: Lavras: EPAMIG, 2010. 3p.

FASSIO, L. et al. Sensory Description of Cultivars (*Coffea arabica* L.) Resistant to Rust and Its Correlation with Caffeine, Trigonelline, and Chlorogenic Acid Compounds. **Beverages**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 1–12, 2016. DOI <https://doi.org/10.3390/beverages2010001>.

GALARZA, G.; FIGUEROA, J. G. Volatile Compound Characterization of Coffee (*Coffea arabica*) Processed at Different Fermentation Times Using SPME–GC–MS. **Molecules**, v. 27, n. 6, p. 2004, 2022.

GIOMO, G. S.; BORÉM, F. M. Cafés especiais no Brasil: opção pela qualidade. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 32, n. 261, p. 9-18, mar./abr. 2011.

HAILE, M.; KANG, W.H. Isolation, Identification, and Characterization of Pectinolytic Yeasts for Starter Culture in Coffee Fermentation. *Microorganisms* **2019**, 7, 401.

HEUMANN, C.; SCHOMAKER, M.; SHALABH. *Introduction to Statistics and Data Analysis: With Exercises, Solutions and Applications in R*. Springer International Publishing, Year: 2016. DOI 10.1007/978-3-319-46162-5. Acesso em 05 de janeiro de 2023.

International Coffee Organization (ICO). Available online: <https://www.icocoffee.org/documents/cy2022-23/cmr-0223-e.pdf> (accessed on 24 maio 2023).

LEROY, T. et al. (2006). Genetics of coffee quality. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 229–242. doi:10.1590/S1677-04202006000100016.

LIMA, L.M., et al. Behavioral aspects of the coffee consumer in different countries: The case of Brazil. In de Almeida LF and Spers EE (eds) *Coffee Consumption and Industry Strategies in Brazil: A Volume in the Consumer Science and Strategic Marketing Series*. Woodhead Publishing, p. 321–341, 2020.

LINGLE, T.R. *The coffee cupper's handbook: a systematic guide to the sensory evaluation of coffee's flavor*. Long Beach, California, 66p., 2011.

LOPES, VERÔNICA DOS SANTOS, 2017- **Prospecção de biomassas lignocelulósicas para coprodução de etanol de segunda geração e biossurfactante empregando processos químicos e enzimáticos** / Verônica dos Santos Lopes. - 1988.

MAGALHÃES JÚNIOR, Antonio Irineudo et al. A critical techno-economic analysis of coffee processing utilizing a modern fermentation system: Implications for specialty coffee production. *Food and Bioproducts Processing*, v. 125, p. 14-21, 2021.

MARTINEZ, S. J. et al. (2021). Novel stainless steel tanks enhances coffee fermentation quality. *Food Research International*, 139 (April 2020), 109921 doi: 10.1016/j.foodres.2020.109921.

MARTINS, Pâmela Mynsen Machado *et al.* Production of coffee (*Coffea arabica*) inoculated with yeasts: impact on quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 99, n. 13, p. 5638-5645, 2019.

MENDONÇA, L. **Características químicas, físico-químicas e sensoriais de cultivares de Coffea arabica L.** 2004. 153p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

MESQUITA, C. M. et al. *Manual do café: colheita e preparo (Coffea arábica L.)*. Belo Horizonte: EMATER-MG, 2016. 56 págs. Disponível em <http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/livro_colheita_preparo.pdf> Acesso em 05 de julho de 2022.

MOTA, M. C. B et al. (2022). Impact of microbial self-induced anaerobiosis fermentation (SIAF) on coffee quality. *Food Bioscience*, 47, Article 101640. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101640>

NASCIMENTO, A. C. do et al. Estabilidade do ácido peracético no processo de desinfecção prévia à lavagem. *Revista Assoc. Paul. Cir. Dent.* São Paulo, v.69, n.4, Out./Dez. 2015. Disponível em <[http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-52762015000300010#:~:text=O%20%C3%A1cido%20perac%C3%A9tico%20\(acetil%20hidroper%C3%B3xido,faixa%20de%20temperatura%20\(0%20a](http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-52762015000300010#:~:text=O%20%C3%A1cido%20perac%C3%A9tico%20(acetil%20hidroper%C3%B3xido,faixa%20de%20temperatura%20(0%20a)> Acesso em 05 de junho de 2023.

Official Methods of Analysis - **AOAC**. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, md, 1995.

OLIVEIRA AC, Pereira AA (2014) Cafe´Point. Disponível em: http://www.cafepoint.com.br/radares-tecnicos/variedades-de-cafe/culti_vares-de-cafe-arabica-desenvolvidas-pela-epamig-47444n.aspx. Accessed em 17 junho 2023

PAIVA, E. F. F. **Avaliação sensorial de cafés especiais**: um enfoque multivariado. 2010. 100 f. Tese (Doutorado na área de concentração em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010. Disponível em: http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/2844/1/TESE_Avalia%C3%A7%C3%A3o%20sensorial%20de%20caf%C3%A9s%20especiais%20um%20enfoque%20multivariado.pdf Acesso em: 18 de dezembro de 2022.

PALINI, C. R.; ALVES, F. P. (2022). Disposição construtiva em cilindro rotativo para fermentação controlada de cafés cereja ou correlatos (Patent No. BR 202021015732-7 Y1). 12/07/2022.

PEREIRA, A.A. et al. Cup quality of new cultivars derived from híbrido de timor. In the Proceedings of the International Conference on Coffee Science, Campinas, Brazil, 14–19 September 2008; p. 143.

PEREIRA, D.R., et al. Morphoagronomic and sensory performance of coffee cultivars in initial stage of development in Cerrado mineiro. **Coffee Science**, [s.l.], v. 14, p. 193–205, 2019.

PEREIRA, PRISCILA VARGAS, 2018-Dinâmica microbiana e aspectos físicos e químicos de café conilon (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) cultivado em diferentes ambientes e processado por via natural. –1994

POLTRONIERI, Palmiro; ROSSI, Franca. Challenges in specialty coffee processing and quality assurance. **Challenges**, v. 7, n. 2, p. 19, 2016.

REICHEL, T et al. Potential of rust-resistant arabica coffee cultivars for specialty coffee production. **Bioscience Journal [online]**, [s.l.], v. 39, p. e39055, 2023. DOI 10.14393/BJ-v39n0a2023-66103.

SCAA - Protocols | Cupping Specialty Coffee: Published by the Specialty Coffee Association of America. **Published by the Specialty Coffee Association of America**. 2015. Disponível em: <<http://www.scaa.org/PDF/resources/cupping-protocols.pdf>> Acesso em: 10 out. 2021.

SOBREIRA, F. et al. Divergence among arabica coffee genotypes for sensory quality. **Australian Journal of Crop Science**, [s.l.], v. 10, n. 10, p. 1442–1448, 2016. DOI <https://doi.org/10.21475/ajcs.2016.10.10.p7430>.

SOCCOL, C. R et al. (2022). Processo para produção de cafés especiais através da utilização de culturas láticas durante o processamento pós-colheita (Patent No. BR 10 2016 011756 9 B1). 03/05/2022.

SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION. **SCA protocols cupping specialty coffee**. 2015. Disponível em: <http://scaa.org/PDF/resources/cupping-protocols.pdf>. Acesso em: 28 de maio de 2023

YEOH, L.; NG, K. S. Future Prospects of Spent Coffee Ground Valorisation Using a Biorefinery Approach. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 179, p. 106123, 1 abr. 2022.

WU, H., Gu, J., BK, A., Nawaz, M. A., Barrow, C. J., Dunshea, F. R., & Suleria, H. A. R. (2022). Effect of processing on bioaccessibility and bioavailability of bioactive compounds in coffee beans. *Food Bioscience*, 46, Article 101373. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101373>