



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE TECNOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS

RHAYANNE FREITAS DE QUEIROZ NASCIMENTO

**FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO CAFÉ (*Coffea arabica*) POR FUNGOS
FILAMENTOSOS DA CAATINGA**

SUMÉ-PB

2015

RHAYANNE FREITAS DE QUEIROZ NASCIMENTO

**FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO CAFÉ (*Coffea arabica*) POR FUNGOS
FILAMENTOSOS DA CAATINGA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Jean César de Farias Queiroz

SUMÉ-PB

2015

N244f Nascimento, Rhayanne Freitas de Queiroz.
Fermentação em estado sólido do café (*Coffea arabica*) por
fungos filamentosos da caatinga. / Rhayanne Freitas de Queiroz
Nascimento. - Sumé - PB: [s.n], 2015.

50 f.

Orientador: Prof. Dr. Jean César de Farias Queiroz.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro
de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Bacharel
em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Biotecnologia. 2. Fermentação. 3. Fungos. I. Título.

CDU: 60 (043.3)

RHAYANNE FREITAS DE QUEIROZ NASCIMENTO

FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO CAFÉ(*Coffea arabica*) POR FUNGOS
FILAMENTOSOS DA CAATINGA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA

Jean César F. Queiroz Nota (10,0)
Orientador
Prof. Dr. Jean César de Farias Queiroz

Glauciane D. Coelho Nota (10,0)
Examinador 01
Prof.ª Dr.ª Glauciane Danusa Coelho

Ilza Maria do Nascimento Brasileiro Nota (10,0)
Examinador 02
Prof.ª Dr.ª Ilza Maria do Nascimento Brasileiro

Nota final (média) Nota (10,0)

Aprovado em 19 de Março de 2015.

Aos meus pais, Sônia e Luciano,
que me deram força e sempre me
guiaram e apoiaram nas minhas
escolhas, acreditando em mim e em
meus sonhos, investindo em minha
educação sem olhar para as dificuldades.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, disposição e alegria de viver e sabedoria para a concretização dessa conquista.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, incentivo, carinho e paciência. Minha querida e estimada mãe, Sônia, só posso agradecer-lhe pela vida que me deu, és meu exemplo de vida. Ao meu pai, Luciano, todo o incentivo e dedicação que me proporciona. Tudo que conquistei e irei conquistar é graças a vocês e para vocês.

A meu irmão Douglas, por todos os nossos momentos de descontração e estresse infinito.

A mãe Edite e tio João, por todo amor, cuidado, carinho e atenção.

A toda minha família Freitas Queiroz pelo grande amor, paciência, apoio, incentivo, carinho, conselhos e pelas alegrias compartilhadas ainda que a distância. Em especial ao Tio Neném, Tia Dijane, Tia Dijanete e Tia Deda, agradeço de coração, pela confiança e estímulo que contribuíram muito para minha formação pessoal.

As minhas tias, Edlene e Fatinha, tias que meu coração adotou, agradeço por sempre se fazerem presente em cada momento da minha vida, por todo o incentivo, altas gargalhadas e amor incondicional.

A minha Dayse, por esta amizade linda e duradoura, por todo o companheirismo, paciência e amor incondicional.

As minhas engenheiras gatas, Bruna, Dayse, Jucilene, Mila, Raíssa, Rayza e Renally pela paciência, conversas, conselhos, risadas, viagens e pela boa companhia. Vocês tornaram esta etapa da minha jornada mais que especial. Amo cada uma de vocês.

Ao meu G11, “Biotec Pioneira”, Bruna, Dayse, Felipe, Jucilene, Marreiro, Mila, Leandro, Raíssa, Rayza e Renally, pela amizade e companheirismo. Não consigo imaginar como teria sido a graduação sem vocês ao meu lado. Amo vocês.

A meu eterno 3º A, por sempre torcerem por mim. Tenho um enorme carinho.

As minhas queridíssimas Nena, Teresinha e Sandra, por terem sido as melhores professoras de ensino médio, e hoje são estimadas amigas que comemoram cada pequena conquista minha.

Ao meu coordenador de TCC Jean Queiroz, a quem tenho profunda admiração, pela orientação, oportunidades concedidas e enorme paciência em meus constantes momentos de estresse. Foi mais do que um professor, um amigo presente em todos os momentos, que contribuiu não só para minha formação acadêmica, mas também formação pessoal.

A professora Glauciane Danusa, por sempre compartilhar ciência e ensinar a importância da inteligência emocional.

Aos técnicos do laboratório, Adriano e Paloma, pelo apoio na realização das atividades no laboratório e Cristiano, porteiro do laboratório, pelo carisma.

Ao especialista em café Jerri Santo da empresa São Braz, pela atenção e amostras concedidas para a execução deste estudo.

A Jadson Bezerra e a professora Cristina Motta da Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio e ajuda no processo de identificação dos espécimes fúngicos.

A Ana Clara, por todo seu carisma e ajuda no momento que mais precisei para a execução desse trabalho.

A todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica.

A coordenadora de curso Fabiana Pimentel, por todo aprendizado e conselhos.

A Universidade Federal de Campina Grande, ao Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido e à Central de Laboratórios que permitiram a realização deste trabalho.

A algumas pessoas que não foram mencionadas, mas que são especiais pelo simples fato de que em algum momento ao longo dessa jornada nossos caminhos se cruzaram, e que de alguma forma contribuíram para minha formação, seja acadêmica ou pessoal.

“E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida.”

William Shakespeare

*“Todos os nossos sonhos podem se realizar, se
tivermos a coragem de persegui-los.”*

Walt Disney

RESUMO

A aplicação de microrganismos isolados do bioma caatinga em processos fermentativos é de extrema valia para a inovação tecnológica e desenvolvimento dos mais variados produtos biotecnológicos. Este estudo teve como objetivo principal selecionar fungos filamentosos, provenientes do bioma caatinga armazenados em forma de coleção no Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, na fermentação de grãos de café (*Coffea arabica*), a fim de agregar valor ao produto final. Nesta pesquisa vinte e dois fungos filamentosos foram avaliados em relação ao desempenho destes ao serem submetidos a um processo fermentativo tendo a presença exclusiva do café como substrato. No total, cinco isolados fúngicos (22,72%) foram capazes de realizar a fermentação em café moído, 77,28% dos isolados fúngicos avaliados demonstram não serem capazes a realizar o processo fermentativo. Os isolados fúngicos que foram capazes de realizar a fermentação em café moído foram submetidos ao processo fermentativo em grãos de café, apenas os isolados fúngicos denominados CDSA60 e CDSA71 executaram a fermentação. Os isolados fúngicos denominados CDSA02, CDSA06 e CDSA54 demonstram não serem aptos a realizar o processo fermentativo em grãos de café. Utilizando a técnica de microcultivo e técnicas moleculares foi possível a identificação dos isolados CDSA06 como *Aspergillus parasiticus*, CDSA54 como *Aspergillus flavus*, CDSA60 e CDSA71 como *Aspergillus fumigatus*. Diante do exposto é possível afirmar que os fungos filamentosos do Bioma Caatinga possuem potencial para serem aplicados processos fermentativos.

PALAVRAS-CHAVE: Fermentação em estado sólido. Biotecnologia. Fungos filamentosos.

ABSTRACT

The application of microorganisms isolated from caatinga in fermentative processes is extremely important for technological innovation and development of various biotechnological products. This study aimed to select filamentous fungi from caatinga biome, stored in collection form in Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido from Universidade Federal de Campina Grande, in fermentation process of coffee beans (*Coffea arabica*) in order to add value to the final product. In this study, 22 filamentous fungi were evaluated in relation to the performance of these when subjected to a fermentation process having the exclusive coffee presence as substrate. In total 5 isolates (22.72%) were able to do the fermentation process in ground coffee, 77.28% of isolates demonstrate not to be able to do the fermentation process. Those isolates that were capable of doing the fermentation in ground coffee were submitted to the fermentation process in coffee beans, only those denominated CDSA60 and CDSA71 did the fermentation process. Those denominated CDSA02, CDSA06 and CDSA54 demonstrate not be able to do the fermentation process in coffee beans. Using the microculture technique and molecular techniques has allowed the identification of those denominated CDSA06 as *Aspergillus parasiticus*, CDSA54 as, *Aspergillus flavus*, CDSA60 and CDSA71 as *Aspergillus fumigatus*. Based on the facts stated above it is possible to say that Caatinga's filamentous fungi have the potential to be applied in fermentation processes.

KEYWORDS: Fermentation. Biotechnology. Filamentous fungi.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Mapa do Brasil com destaque no bioma caatinga, único bioma exclusivamente brasileiro..... 18
- Figura 2** – Técnica de Microcultivo para análise de fungos filamentosos. 24
- Figura 3** – Pequenos frascos plásticos contendo água destiladas e as colônias puras dos isolados de interesse. 25
- Figura 4** – (A) extração dos esporos fúngicos dos isolados que apresentaram crescimento em meio BDA e em (B) inoculação do café moído pela suspensão dos esporos. Em (C) frasco de vidro contendo café moído ao início do processo fermentativo, e em (D) frasco de vidro contendo café moído ao fim do processo fermentativo..... 27
- Figura 5** – (A) frasco de vidro contendo café moído fermentado por isolado fúngico da Coleção de Fungos da Caatinga do CDSA/UFCG utilizado como inóculo para fermentação dos grãos de café e em (B) Elermeyers contendo a presença restrita de grãos de café umedecidos com água destilada ao início do processo fermentativo. 29
- Figura 6** – Grãos de café fermentados pelo isolado CDSA60 da Coleção de Fungos da Caatinga do CDSA/UFCG. Em (A) grãos fermentados após 48 horas, (B) grãos fermentados após 96 horas, (C) grãos fermentados após 144 horas e em (D) grãos fermentados após 192 horas. 31
- Figura 7** – Grãos de café fermentados pelo isolado CDSA71 da Coleção de Fungos da Caatinga do CDSA/UFCG. Em (A) grãos fermentados após 48 horas, (B) grãos fermentados após 96 horas, (C) grãos fermentados após 144 horas e em (D) grãos fermentados após 192 horas. 32
- Figura 8** – Isolado CDSA06 identificado como pertencente ao gênero *Aspergillus*, espécie *A. parasiticus*. Em (A) crescimento fúngico após 96 horas de cultivo em meio BDA e em (B) Estruturas fúngicas com aumento de 40x após 96 horas de cultivo em meio BDA..... 34
- Figura 9** – Isolado CDSA54 identificado como pertencente ao gênero *Aspergillus*, espécie *A. flavus*. Em (A) crescimento fúngico após 72 horas de cultivo em meio BDA e em (B) Estruturas fúngicas com aumento de 40x após 72 horas de cultivo em meio BDA..... 34
- Figura 10** – Isolado CDSA60 identificado como pertencente ao gênero *Aspergillus*, espécie *A. fumigatus*. Em (A) crescimento fúngico após 72 horas de cultivo em meio BDA e em (B) Estruturas fúngicas com aumento de 40x após 72 horas de cultivo em meio BDA..... 35
- Figura 11** – Isolado CDSA71 identificado como pertencente ao gênero *Aspergillus*, espécie *A. fumigatus*. Em (A) crescimento fúngico após 96 horas de cultivo em meio BDA e em (B) Estruturas fúngicas com aumento de 40x após 96 horas de cultivo em meio BDA..... 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação sensorial da bebida de café arabica.	13
Tabela 2 - Composição do meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA).	21
Tabela 3 - Composição do meio de cultura com presença exclusiva de café.....	22
Tabela 4 -Composição do meio de cultura para realização da fermentação em grãos de café	23
Tabela 5 - Cultivo dos isolados fúngicos em meio BDA para esporulação.....	26
Tabela 6 – Suspensão de esporos dos isolados fúngicos inoculadas em presença exclusiva de café moído.	28
Tabela 7 – Culturas inoculadas em presença restrita de grãos de café umedecidos autoclavado	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDA	Batata Dextrose Ágar
BSCA	Brazil Specialty Coffee Association
CDSA	Centro de Desenvolvimento do Semiárido
FES	Fermentação em Estado Sólido
MMA	Ministério do Meio Ambiente
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVO GERAL.....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	10
3.1 A HISTÓRIA DO CAFÉ.....	10
3.2 CAFÉ NO BRASIL E NO MUNDO.....	12
3.2.1 A cafeína como inibidor do crescimento fúngico	15
3.3 O BIOMA CAATINGA	16
3.4 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	19
4 METODOLOGIA	21
4.1 AMOSTRAGEM.....	21
4.2 MATERIAL BIOLÓGICO.....	21
4.2.1 Cultivo dos isolados fúngicos em meio BDA para esporulação	21
4.2.2. Determinação da concentração da suspensão de esporos	22
4.3 SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA COLEÇÃO DE FUNGOS DA CAATINGA CDSA/UFCG APTOS A REALIZAR A FERMENTAÇÃO EM CAFÉ	22
4.4 PROCESSO FERMENTATIVO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA COLEÇÃO DE FUNGOS DA CAATINGA CDSA/UFCG EM GRÃOS DE <i>Coffea arabica</i>	23
4.5 SECAGEM DOS GRÃOS DE CAFÉ FERMENTADOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS.....	23
4.6.1 Técnica de Microcultivo	24
4.4.2 Técnicas moleculares	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 CULTIVO E SELEÇÃO DOS ISOLADOS CAPAZES DE REALIZAREM A FERMENTAÇÃO	26
5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS FERMENTADORES DE CAFÉ	32
6 CONCLUSÕES	36
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1 INTRODUÇÃO

O café (*Coffea arabica*) é uma das bebidas mais populares em todo o mundo e sua importância para o Brasil já data da época do império. Em 1727 a cultura cafeeira é estabelecida no Brasil, com as primeiras exportações ocorrendo em meados de 1731 e em 1850 a produção brasileira de café atingiu 40% da produção mundial. O café constitui ainda hoje um importante gerador de divisas, segundo o Conselho dos Exportadores de Café do Brasil (CeCafé) o Brasil exportou 33,97 milhões de sacas de 60 quilos de café na safra 2013/2014 (julho de 2013 a junho de 2014), representando aumento de 9,9% em comparação com o período anterior (30,91 milhões de sacas).

O Brasil é o segundo maior consumidor de café e é um dos principais produtos geradores de receita no Brasil, impulsionando os setores de atividades industriais e agrícolas, e um dos principais produtos de exportação. Seu consumo tanto no Brasil como também no mundo vem a cada dia crescendo, decorrente da melhoria contínua da qualidade do café e consolidação do mercado de cafés tipo Gourmet ou Especiais (SIMÕES; FARONI; QUEIROZ, 2008; DURANTE, 2009; EXPOCAFÉ, 2014).

O mercado nacional e internacional vem buscando mais do que apenas parâmetros quantitativos em sua produção, visto que o consumidor está buscando por produtos de excelência. O conceito de cafés especiais está intimamente ligado ao prazer proporcionado pela bebida, que destacam-se por algum atributo associado ao produto, ao processo de produção ou a serviço a ele relacionado, como por exemplo o café indonésio *Kopi Luwak*, que é proveniente da fermentação dos grãos de café no sistema gastrointestinal de um mamífero, processo este que agrega valor ao produto (CAFEICULTURA, 2007).

Há séculos o homem faz uso da tecnologia de processos fermentativos para o desenvolvimento de produtos. Fermentação é uma técnica biológica de conversão de substratos por vários microrganismos, como bactérias e fungos, nos qual são liberados componentes como metabólitos secundários, que vão desde a antibióticos a peptídeos, enzimas e entre outros, que agregam valor ao produto (FERREIRA, *et al*, 2011). Na Ásia, vários alimentos são produzidos a partir de técnicas fermentativas, onde grãos de soja são fermentados por fungos filamentosos, gerando um produto final enriquecido.

A biota da caatinga é mais diversa que qualquer outro bioma no mundo, e é inteiramente restrita ao território nacional Brasileiro. Suas condições de clima e solo são únicas, possui cerca de 734.000 km² que em quase toda sua extensão caracteriza-se por apresentar clima quente e semiárido, com menos de 1.000 mm de chuva por ano, valor este

variável e em intervalos de dez a vinte anos ocorre o fenômeno da “seca” devido à queda do total de chuva para menos da metade (MMA, 2003). Apesar destas peculiaridades, a caatinga é a menos estudada e protegida. Um bioma tão peculiar e de características únicas, como a caatinga, traz inúmeras perspectivas e possibilidades de desenvolvimentos de pesquisas científicas, para conservação e descobertas científicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é selecionar fungos filamentosos, provenientes do bioma caatinga armazenados em forma de coleção no Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, na fermentação de grãos de café (*Coffea arabica*), a fim de agregar valor ao produto final.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar fungos filamentosos da Coleção de Fungos da Caatinga do CDSA, aptos a realizar fermentação em estado sólido em grão de *Coffea arabica*;
- Avaliar a diferença do melhor processo fermentativo dos grãos de café de modo controlado por fungos filamentosos;
- Identificar os fungos de interesse.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 A HISTÓRIA DO CAFÉ

A Abissínia, atual Etiópia, além de ser apontada como possível berço da humanidade é muito provavelmente também berço do café. Apesar de o nome café ser originário da Arábia, esta não é uma planta nativa deste país, mas sim da Abissínia, onde é encontrada na sua forma cultivada e selvagem, afirma Crawford (1852). Mas existem muitas lendas com relação à origem do café, sendo a mais conhecida a Lenda de Kaldi.

De acordo com Martins (2008), a Lenda de Kaldi é considerada a primeira referência alusiva ao café, registrada em manuscritos do Iêmen, do ano de 575 d.C. Kaldi era um pastor de cabras da Etiópia que certo dia, observou os animais que mastigavam as folhas e frutos de uma determinada planta tornavam-se mais rápidos, ágeis e mostravam-se com maior resistência ao subir as montanhas e percorrer quilômetros de subidas íngremes. Este pastor então experimentou os tais frutos e confirmou o mérito estimulante da planta e a notícia se disseminou pela região, provocando de imediato seu consumo, na forma macerada ou a misturada em banha para refeição, e em suco fermentado, além disso, suas folhas também eram mastigadas ou utilizadas no preparo de chá.

Certamente a descoberta da bebida resultou no cultivo da planta na Etiópia, mas foram os árabes que dominaram as técnicas de produção e elaboração do produto, quando o café foi levado para a Península Arábica, o chamando de *qahwa*, uma palavra árabe para vinho, a partir da qual a palavra *café* surgiu, descreve Crawford (1852). Ukers em seu livro intitulado *All About Coffee* (1922), relata que os árabes eram ciumentosos e extremamente protetores da descoberta da nova indústria lucrativa, e por um determinado tempo impediram com sucesso que este se espalhasse por outros países, não permitindo que seus preciosos frutos deixassem seu país a menos que estes, primeiro tenham sido mergulhados em água fervente ou ressecados, a fim de destruir seus poderes de germinação. Contudo, com milhares de peregrinos viajando todos os anos não foi possível controlar todos os meios e rotas de transporte, e a cultura do cultivo de café espalhou-se para o Egito e partes do império turco, a Arábia foi perdendo o monopólio de sua comercialização de grãos de café.

Enquanto a bebida continuava a ganhar popularidade durante o século dezesseis, também ganhou a reputação de bebida fermentada causadora de problemas, e alguns governantes da Meca decidiram que assim como o vinho, o café deveria ser banido e assim as casas de café foram fechadas até que um sultão do Cairo, um habitual apreciador de café, revertesse o decreto. O café providencia uma intelectual estimulação, sensação prazerosa, um

aumento de energia sem efeitos nocivos aparentes. As casas de café permitiam as pessoas se reunirem para conversas, entretenimento, trabalho, poesias e entre outras situações, continua Ukers (1922).

Da Turquia, o café foi percorrendo seu caminho pela Europa, alemães, franceses e italianos buscavam maneiras de desenvolver o plantio em seus territórios, mas apenas em 1616 os holandeses, que naquela época dominavam o comércio marítimo do mundo, conseguiram transportar uma árvore para a Holanda, que passou a ser uma bebida habitual dos costumes europeus. Em 1699, outra planta foi transportada para a Holanda e estes começaram os plantios experimentais, encorajando outros povos a fazerem o mesmo. O mercado consumidor cresceu na Europa, o que proporcionou uma expansão do plantio do café por territórios africanos e no Novo Mundo, descreve Pendergrast (2010).

Segundo Ukers (1922), dos jardins de Amsterdã plantas foram enviadas para a colônia holandesa do Suriname e plantadores entraram na cultura do café em 1718. Dez anos depois da cultura no Suriname a planta foi introduzida pelos ingleses a Jamaica, e os franceses a introduziram na ilha Martinica, ao norte a Guiana pelo oficial da marinha francesa, Gabriel Mathieu de Clieu, o executor da introdução do café na América Central. A planta chegou ao Brasil por meio de Francisco de Melo Palheta que no Pará introduziu as primeiras sementes e plantas que procediam da família *Coffea arabica*, no ano de 1727.

Palheta foi o primeiro cafeicultor do Brasil, com parte das plantas e sementes que trouxe formou seu cafezal no Pará, que chegou a possuir mais de mil pés. Em decorrência das condições climáticas do Brasil a planta se adaptou e desenvolveu-se bem e o cultivo de café se espalhou rapidamente para outros estados brasileiros. No Maranhão, o grão cresceu razoavelmente bem e em 1731 houve o despacho desses grãos para Lisboa, Portugal, e a primeira exportação de café do Brasil, o começo da economia do “ouro verde” no Brasil, narra Martins (2008).

Embora Palheta tenha incorporado o café no Pará, em 1760 João Alberto de Castelo Branco ciente da propagação do consumo do café no mundo, mandou vir de Belém para o Rio de Janeiro algumas mudas da *Coffea arabica*, estas se desenvolveram muito melhor no clima moderado das montanhas que ficam envolta do Rio de Janeiro. Em grande parte do século dezoito o cultivo do café limitou-se a pequenas plantações ao Norte e nordeste do país, onde os solos não eram os mais adequados e os produtores desconheciam sua forma de cultivo, mesmo assim o produto foi subindo em nossa balança comercial e a planta foi se disseminando gradativamente a partir de 1830, iniciando seu curso para o sul, onde se tinha notícia de que pequenas lavouras de café em significado econômico se alternavam com as

outras lavouras pulverizadas pelo território, iniciando um novo ciclo econômico no país e foi por meio do café que o Brasil se apresentou ao mundo, continua Martins (2008).

O café foi a grande riqueza do Brasil por quase um século, riqueza esta, que agilizou o desenvolvimento do país e o inseriu no comércio internacional. A cultura cafeeira ocupou vales e montanhas, criando cidades e centros urbanos, onde ferrovias substituíram o transporte animal permitindo o escoamento da produção, além disso, a grande quantidade de imigrantes consolidou a amplificação da classe média, a diversificação de investimentos, diz Pendergrast (2010). Desde então, o café e o povo brasileiro passam a ser inseparáveis.

3.2 CAFÉ NO BRASIL E NO MUNDO

O cultivo de café foi introduzido no Brasil no Pará em 1727, com sementes provenientes da Guiana Francesa, se espalhando por outros estados brasileiros (CRAWFORD, 1852). A importância da cultura cafeeira brasileira é notória e seu ápice foi no final dos anos vinte do século XX, onde 16 % do Produto Interno Bruto brasileiro foram decorrentes da participação do café. As duas espécies cultivadas no Brasil são o *Coffea arabica* (café arábica), adaptado a condições de clima tropical de altitude e apresenta maior valorização em função da melhor qualidade resultando em bebidas de maior valor, e o *Coffea canephora* (café robusta), produz maior rendimento industrial visto que possui uma maior concentração de sólidos solúveis (GUARÇONI, 1995). A classificação do café verde é de suma importância para a comercialização do café, pois esta determina a qualidade do café, e seu preço é baseado em parâmetros qualitativos (NEVES, 2009).

O café é atualmente a segunda maior *commodity* mundial em valor de mercado, atrás somente do petróleo, e dentre as atuais commodities agrícolas, é uma das mais antigas mercadorias comercializadas no mundo, cultivado em 50 países e consumido em dezenas de outras nações (FREDERICO, 2013). *Commodity* termo em língua inglesa que significa mercadoria, principalmente primários ou semielaborados, geralmente agrícolas ou minerais, que são mundialmente padronizados, com preços cotados e negociados pelas principais bolsas de mercadorias (MARQUES, 2013).

Segundo o Conselho dos Exportadores de Café do Brasil (CeCafé) o Brasil exportou 33,97 milhões de sacas de 60 quilos de café na safra 2013/2014 (julho de 2013 a junho de 2014), representando aumento de 9,9% em comparação com o período anterior (30,91 milhões de sacas), logo em seguida tem-se o Vietnã com a produção de 17,09 milhões de sacas de 60 quilos de café. O Brasil nos últimos anos vem se mantendo como o maior produtor mundial de café e o segundo maior mercado consumidor, mas apesar destes fatos, o

país ainda está atrás dos países europeus, como a Itália e Alemanha, que são os maiores exportadores de café industrializado, e a Alemanha é a maior compradora de café verde brasileiro, onde esta agrega valor ao produto e vende para países europeus, asiáticos, africanos e para a América do Norte, segundo o Sindicato da Indústria de Café do Estado de Minas Gerais (SindiCafé-MG).

Fatores ambientais da região de cultivo, como, umidade, temperatura, população microbiana do solo, a variedade do café cultivado, o tipo de processamento irá influenciar na biodiversidade microbiana presente nos grãos de café (VILELA, 2011). Os fungos filamentosos que se encontram associados aos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.) brasileiros pertencem principalmente aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Fusarium*, e estão presentes durante todo o ciclo produtivo e podem sob condições específicas, causar perdas de qualidade produzindo odores e sabores desagradáveis (FERREIRA, *et al.*, 2011).

Tabela 1 - Classificação sensorial da bebida de café arábica.

CLASSIFICAÇÃO	DESCRIÇÃO
Estritamente mole	Todos os requisitos da bebida mole mais acentuados
Mole	Aroma e sabor, agradável, brando e adocicado
Apenas mole	Sabor levemente doce e suave, mas sem adstringência ou aspereza de paladar
Dura	Sabor acre, adstringente e áspero, mas sem sabores estranhos
Riado	Leve sabor típico de iodofórmio
Rio	Sabor típico e acentuado de iodofórmio
Rio zona	Aroma e sabor muito acentuado, assemelhado ao iodofórmio ou ao ácido fênico

Fonte: LIMA FILHO, *et al.*, 2013; SILVA, 2009.

Em função das diferentes características dos grãos em relação ao aspecto e número de defeitos, aroma e gosto da bebida, que depende fatores que são influenciados pela genética, tipos de colheita e processamento, é necessária a classificação que definirá os preços do café no mercado interno e externo. As classificações são realizadas quanto a peneiras, por tipo e bebida (SILVA, 2009). A análise sensorial é o meio mais rápido, simples e direto de detectar as causas de defeitos na qualidade da bebida de café, essa caracterização pode ser realizada empregando técnicas sensoriais descritivas e quantitativas (LIMA FILHO, *et al.*, 2013). A

qualificação da bebida baseia-se no aroma, acidez, amargor, doçura, adstringência e corpo da bebida, os quais recebem conceitos de “fraco, médio ou forte” e “bom, regular ou ruim, e assim o padrão da bebida é definido, que estão apresentados na Tabela 1 (MENDES, 2005 *apud* LIMA FILHO, *et al.*, 2013).

Novos padrões de consumo têm sido observados no mercado cafeeiro, onde os produtos têm se diferenciado com base em parâmetros de qualidade que atendem ao novo mercado consumidor exigente, o que tem mobilizado os produtores a mudarem a estratégia de produção, buscando aprimorar o café *commodity* por origem, qualidade e/ou sustentabilidade, que alcançasse um maior preço pela qualidade (LEÃO; PAULA, 2010; TEIXEIRA, 2011). Souza (2006) e Ampessan (2009) relatam que o termo qualidade assume uma ampla variedade de conceitos, e os novos parâmetros dos cafés diferenciados, chamados de *specialty*, nos quais suas características vão além da qualidade final da bebida, como descrevem Zylbersztajn e Farina (2001):

O conceito de cafés especiais está intimamente ligado ao prazer proporcionado pela bebida. Tais cafés destacam-se por algum atributo associado ao produto, ao processo de produção ou a serviço a ele relacionado. Diferenciam-se por características como qualidade superior da bebida, aspectos dos grãos, forma de colheita, tipo de preparo, história, origem dos plantios, variedades raras e quantidades limitadas, entre outras. Podem também incluir parâmetros de diferenciação que se relacionam à sustentabilidade econômica, ambiental e social da produção (p. 15)

Em 1991 foi fundada no Brasil por um grupo de produtores a *Brazil Specialty Coffee Association* (BSCA), com o intuito de promover cafés de alta qualidade, que possuem um sistema rigoroso para seus associados. Esta é uma das instituições mais importantes no que se refere a melhoria da imagem do café brasileiro no mercado internacional, e segundo a BSCA, esta tem por objetivo a busca por meio de pesquisas e técnicas de controle de qualidade elevar os padrões de excelência dos cafés brasileiros no mercado interno e externo. Ainda segundo a BSCA, este segmento representa 12% do mercado internacional da bebida, e o valor de venda atual para alguns cafés diferenciados tem um sobrepreço que varia entre 30% e 40% a mais em relação ao café cultivado de modo convencional, e os principais mercados consumidores dos cafés especiais brasileiros são o Japão, Estados Unidos, União Europeia, Coreia e Austrália também consomem cada vez mais cafés especiais brasileiros.

Considerado o café mais caro e raro do mundo o *Kopi Luwak* ou *Civet Coffee*, originário da Indonésia, tem os grãos processados pelo sistema gastrointestinal do animal, um mamífero parecido com um gato, que promove uma fermentação que dura em torno de dez

horas e depois os grãos são excretados em forma de cachos e depois lavados, torrados e moídos, resultando em um café de aroma intenso e sabor suave, um quilo deste café custa em média 750 euros, de acordo com a Academia do Café (2011). Segundo o pesquisador Massimo Marcone (2004), da Universidade de Guelph, Canadá, com este processo fermentativo único, as proteínas responsáveis pelo amargor caem em números e ganham em sabor exótico.

No Brasil há um café semelhante ao *Kopi Luwak*, o café do jacu ou *Jacu Bird Coffee*, descoberto na Fazenda Camocim, no Espírito Santo, que assim como o café indonésio, passa por um processo fermentativo diferente, os grãos são fermentados pelo sistema digestivo da *Penelope purpurascens*, conhecido popularmente por jacu, que come os melhores grãos e o sabor único resultante da ação de bactérias e enzimas que atribuem ao café um sabor menos amargo que o dos cafés comuns, e 250 gramas deste, podem custar em torno R\$ 100 (RIBEIRO, 2008; CAFEICULTURA, 2009).

O barista e torrefador de café Léo Moço, surpreendeu a todos quando conquistou o primeiro lugar no 13º Campeonato Brasileiro de Barista, com um café de sabor único conseguido por meio da fermentação induzida por uma levedura utilizada na fabricação de cervejas. Esta fermentação resultou em um café complexo, com notas frutadas e acidez acentuada (LEMENTY, 2013). Sendo assim, fungos filamentos provenientes de um ambiente peculiar e pouco explorado, como o Bioma caatinga, trazem a perspectiva de que ao realizarem um processo fermentativo em grãos de *Coffea arabica*, o produto resultante possa possuir características únicas que agreguem valor ao produto, o tornando comercialmente competitivo no segmento de cafés especiais.

3.2.1 A cafeína como inibidor do crescimento fúngico

A cafeína demonstrou ser um inibidor do crescimento microbiano fúngico, e esta inibição é possivelmente em parte devido a uma alteração do metabolismo ou função das purinas (nucleosídeos ou nucleotídeos) (BUCHANAN; HOOVER; JONES, 1983). Fujii e colaboradores (2004) propõem que em decorrência da natureza estrutural similar entre purinas e cafeínas, dos quais a inibição competitiva reduziria a síntese de ácidos nucleicos, afetando consequentemente o crescimento micelial fúngico.

Buchanan, Tice e Marino (1982) em seu estudo com *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174, verificaram que houve uma maior inibição de 98% da produtividade de ocratoxina A do que sobre desenvolvimento do crescimento do fungo. Chalfoun e colaboradores (2001) sujeitaram dois isolados toxigênicos, o *Aspergillus ochraceus* (EcoCentro 1161T01-01) e o

Aspergillus flavus (EcoCentro 1011T02-01) a diferentes concentrações de cafeína e constataram que com relação ao crescimento micelial e a esporulação, os dois isolados sofreram decréscimos significativos pelas diferentes concentrações de cafeína, e sensível redução na síntese de toxinas quando submetidos à presença de doses crescentes de cafeína de 1% e 2%, que usualmente estão presentes em cafeeiros das espécies arábica e robusta.

Fujii e colaboradores (2004) avaliaram o efeito de diferentes doses de cafeína sobre o crescimento micelial de fungos isolados de café, e constataram que a cafeína apresentou antibiose proporcional à dose e que a atenuação da atividade inibitória, provavelmente, é resultante da degradação de cafeína pelos fungos. Ao ser submetido a diferentes concentrações de cafeína houve a ação inibitória parcial da cafeína sobre o desenvolvimento micelial e esporulação do *Aspergillus ochraceus*, e a síntese de Ocratoxina A foi inibida totalmente nas concentrações acima de 1%. Além disso, a cafeína inibiu totalmente o crescimento micelial e esporulação do potencialmente produtor de Aflatoxinas, o fungo *Aspergillus parasiticus* (CHALFOUN, *et al.*, 2007).

Em seu trabalho com extratos de polpa de café, Roussos e colaboradores (1994) verificaram a ausência de degradação de cafeína provavelmente devido a disponibilidade alternativa de proteínas solúveis que atuaram como fonte de nitrogênio alternativas. Proteínas, enzimas, peptídeos e aminoácidos livres, substâncias que desempenham papel importante no aperfeiçoamento do sabor e do aroma do café, atuam como fontes de nitrogênio alternativas para o desenvolvimento fúngico (FRANÇA *et al.*, 2001 *apud* FUJII; ONO; HIROOKA, 2002).

Apesar da confirmação do efeito inibidor da cafeína, após o período da máxima inibição há uma redução do efeito aliado à propensão do crescimento micelial (BUCHANAN; FLETCHER, 1978; BUCHANAN; TICE; MARINO, 1982; BUCHANAN; HOOVER; JONES, 1983). Evento que pode ser outorgado à degradação da cafeína, uma vez que ocorra o esgotamento das outras fontes alternativas de nitrogênio, há a indução de vias capazes de metabolizar a cafeína visando obter fonte de nitrogênio necessária ao desenvolvimento micelial (ROUSSOS *et al.*, 1994; HAKIL *et al.*, 1998).

3.3 O BIOMA CAATINGA

O bioma caatinga possui cerca de 734.000 km² que em quase toda sua extensão caracteriza-se por apresentar clima quente e semiárido, com menos de 1.000 mm de chuva por ano, valor este variável e em intervalos de dez a vinte anos ocorre o fenômeno da “seca” devido à queda do total de chuva para menos da metade. O Ministério do Meio Ambiente

(2002) identificou 57 áreas prioritárias para conservação da biodiversidade nesse Bioma, áreas estas que incluem os estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais, sendo 27 destas classificadas como de Extrema Importância Biológica.

Cheia de mistérios, a começar pelo nome de origem Tupi-Guarani, derivada de *caa* (mato, vegetação) e *tinga* (branco) que significa “floresta branca”, descrevendo bem o comportamento da vegetação na estação seca, quando as folhas caem e apenas os troncos brancos e brilhosos das árvores permanecem na paisagem seca (BRANCO, 2003). Os solos da região semiárida são formados por tipos muito diferentes, que vão dos solos rasos e pedregosos aos solos arenosos e profundos que dão lugar às caatingas de areia e a grandes vazios demográficos, podem ser de alta ou baixa fertilidade. Apesar de suas condições severas, o bioma caatinga apresenta uma surpreendente diversidade de ambientes (VELLOSO, *et al.*, 2002).

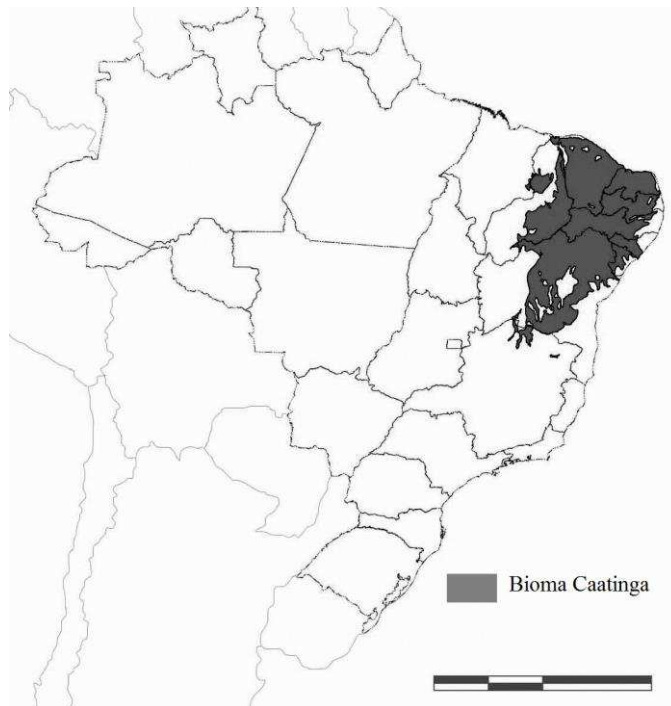
A biota da caatinga é mais diversa que qualquer outro bioma no mundo, o qual esteja exposto às mesmas condições de clima e de solo (MMA, 2003). Possui uma formação vegetal com árvores e arbustos que, os quais geralmente perdem suas folhas na seca, muitas cactáceas, que possuem estruturas de armazenamento de água, formando uma paisagem formada por árvores recobertas por espinhos e cortiça. Apesar de ser extremamente diversificada, a Caatinga é um dos biomas brasileiros menos conhecido botanicamente (SILVA, *et al.*, 2003).

A caatinga é a única região natural brasileira nos quais seus limites estão inteiramente restritos ao território nacional (Figura 1), também é a menos estudada e protegida, que continua passando por um extenso processo de alteração e deterioração devido à exploração insustentável de seus recursos, causando a perda de espécies únicas e levando a formação de grandes núcleos de desertificação em várias partes da região (LEAL, *et al.*, 2003). Segundo Kiill (2013) caatinga é o terceiro bioma brasileiro mais modificado, com 45,3% da área total provavelmente alterada, ocasionando uma redução na biodiversidade de organismos do solo e, conseqüentemente, causando impacto nas atividades essenciais para o bom funcionamento do ecossistema (ARAÚJO, 2008).

Desde a antiguidade a exploração metabólica e genética dos microrganismos destinando-se a obtenção de produtos biotecnológicos, como a produção de alimento, antibióticos e até mesmo o tratamento de resíduos (CANHOS; MANFIO, 2001). Ambientes como a caatinga podem representar potencial biotecnológico, mas a diversidade microbiana desse bioma ainda é pouco explorada (GARCIA, 2011). Devido às condições inóspitas da

caatinga é possível encontrar microrganismos com características peculiares, uma vez que estes são adaptados a essas condições, e que podem ser de interesse em vários processos biotecnológicos (SIMÕES, 2006).

Figura 1 – Mapa do Brasil com destaque no bioma caatinga, único bioma exclusivamente brasileiro.



Fonte: World Wildlife Fund Brasil.

Os fungos estão entre os principais responsáveis pela ciclagem de nutrientes, principalmente em ecossistemas florestais, atuando como decompositores e produtores de metabólicos (MAIA *et al.*, 2005). Estes microrganismos são cada vez mais de interesse industrial, por produzirem diversas substâncias de interesse econômico, tais como, enzimas, antibióticos, entre outros (BRAGA; DESTÉFANO; MESSIAS, 1999). A busca por isolados fúngicos capazes de serem utilizados em processos biotecnológicos seja de interesse agrícola ou industrial, atualmente tem voltado sua investigação em biomas como a caatinga (SILVA; LINS, 2008).

Devido a características tão peculiares do bioma baatinga, faz-se necessário incentivo para desenvolvimento de pesquisas que tenham como foco a preservação e valorização deste ambiente, pois esta possui inúmeras possibilidades para descoberta de novas espécies de microrganismos com potencial biotecnológico.

3.4 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Nos últimos tempos, os grandes avanços na química e engenharia química resultaram na produção e comercialização de diferentes produtos, mas devido ao progresso no campo da biotecnologia e bioquímica, a produção de compostos bioativos e alimentos utilizando materiais biológicos, como os microrganismos e enzimas, são hoje, alternativas mais atraentes. Estes agentes biológicos possuem alta seletividade, melhores condições operacionais, vasta gama de substratos, principalmente aqueles derivados de resíduos agroindustriais (MANPREET, 2005).

Fermentação é uma técnica biológica de conversão de substratos complexos em componentes simples por vários microrganismos, como bactérias e fungos. Durante este processo metabólico são liberados diversos componentes adicionais além daqueles produtos usuais da fermentação, como dióxido de carbono e álcool. Estes compostos são chamados de metabólitos secundários, que vão desde a antibióticos a peptídeos, enzimas e entre outros (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012). Boa parte da indústria biotecnológica depende do processo fermentativo submerso, em que os microrganismos desenvolvem-se em meio líquido, mas algumas biotransformações podem ser realizadas em um diferente processo fermentativo, conhecido como fermentação em estado sólido. A fermentação em estado sólido vem-se mostrando uma melhor opção que a fermentação submersa, devido a importantes aplicações em produção enzimática, biopesticidas, componentes aromáticos, e outros compostos bioativos (MANPREET, 2005).

Fermentação em estado sólido (FES) é definida como o processo fermentativo no qual microrganismos desenvolvem-se em uma matriz sólida na ausência ou quase ausência de água livre, entretanto, o substrato deve possuir umidade suficiente para suportar o desenvolvimento do metabolismo dos microrganismos, e a matriz sólida pode ser a fonte de nutrientes ou simplesmente o suporte contendo os nutrientes que permitem a propagação do microrganismo (PANDEY, *et al.*, 1999; SINGHANIA, *et al.*, 2009). O objetivo da FES é proporcionar um contato firme entre o fungo ou bactéria com a matriz para alcançar uma maior concentração de nutrientes provenientes do substrato para a realização da fermentação (BHARGAV, *et al.*, 2008).

A FES se favorece por ser um processo industrial limpo, gerando baixos níveis de água residual, reduzido teor de água e economia de energia em processos de recuperação. Além disso, os meios de cultura são simples, geralmente resíduos de produtos agrícolas que podem conter todos os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo,

geralmente o único componente necessário a ser adicionado ao meio é água e seu custo de esterilização é baixo devido ao baixo nível de água utilizado para aquecimento. O espaço ocupado pelo equipamento para realização do processo fermentativo é pequeno, seu custo é baixo e pouca demanda de energia. Mas a FES apresenta algumas desvantagens, como, os tipos de microrganismos utilizados são limitados devido as condições do processo, substratos com granulometria elevada dificulta a transferência de oxigênio entre as partículas, e apesar de sua simplicidade de operação a heterogeneidade da matriz dificulta o controle de crescimento microbiano (SANTOS, *et al.*, 2006).

A tecnologia do processo fermentativo em matrizes sólidas vem sendo utilizada há vários séculos, como por exemplo: *Tempeh* que tem sua origem secular na Ásia, produto produzido a partir da fermentação de grãos de soja pelo fungo *Rhizopus oligosporus*; *koji*, molho de soja que envolve o cultivo de *Aspergillus oryzae* em grãos de soja; *ang-kak*, arroz fermentado pelo *Monascus purpureus*. Além disso, nas últimas décadas tem crescido o interesse na tecnologia da FES e novos produtos vem sendo desenvolvidos como: enzimas, como as amilases, proteases, pectinases, entre outras; pigmentos; aromas e compostos aromáticos; antibióticos. E estudos utilizando microrganismos em processos de FES para mediação de procedimentos como biorremediação (MITCHELL, *et al.*, 2000; PRABHAKAR, *et al.*, 2005; FERNANDES, 2007; GALEMBECK; BARBOSA; SOUSA, 2009; ROSSI, *et al.*, 2009;).

4 METODOLOGIA

Os experimentos efetuados para a realização deste estudo foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido/Universidade federal de Campina Grande (CDSA/UFCG).

4.1 AMOSTRAGEM

As amostras de café foram cedidas pela empresa São Braz, os grãos são do tipo Arábica cultivados em solo arenoso com altitude entre 900 e 1.000 metros e com temperatura média anual bastante amena (20 °C), na região Mogiana, interior do estado de São Paulo. Os grãos são da safra 2013/2014, peneiras 16/17/18 mm de diâmetro, utilizados para uma bebida mole/dura.

4.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Para realização das atividades, foram utilizados os fungos isolados de folhas de plantas e do solo do bioma caatinga, os quais estão depositados na Coleção de Fungos da Caatinga do CDSA/UFCG, na cidade de Sumé – PB. Atualmente a referida coleção conta com 117 isolados.

4.2.1 Cultivo dos isolados fúngicos em meio BDA para esporulação

Os isolados da Coleção de Fungos da Caatinga do CDSA/UFCG foram mantidos em placas de *Petri* contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (Tabela 2), à temperatura de 37 °C. Para a preparação deste meio de cultura, batatas foram cortadas em pequenos pedaços e fervidas em água destilada, durante 10 minutos, contados a partir do início da ebulição. O material foi coado e acrescido de Dextrose e Ágar. O volume ajustado pra 1 L e esterilizado em autoclave, por 20 minutos, a 121 °C (GAVA, 2002).

Tabela 2 - Composição do meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA).

COMPONENTE	QUANTIDADE
Batata	200 g
Dextrose	20 g
Ágar	20 g
Água Destilada	q.s.p. 1 L

Após a esporulação dos isolados da Coleção de Fungos da Caatinga do CDSA/UFCG, a extração dos esporos foi feita através da adição de 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%) e uma gota de detergente, em cada placa de Petri.

4.2.2. Determinação da concentração da suspensão de esporos

Para a determinação da concentração da suspensão de esporos dos isolados utilizou-se uma câmara de Neubauer espelhada e um microscópio óptico. Considerou-se para contagem 16 quadrados que possuem 25 quadrículas com área de 0,0025 mm² e profundidade de 0,1 mm para cada quadrícula, com volume total de 0,01 m³ ou 0,1 µL. Colocou-se a suspensão de esporos, com auxílio de uma micropipeta estéril, entre a câmara Neubauer e a lamínula, previamente esterilizadas com álcool 70%. Realizou-se a contagem de esporos em microscópio óptico utilizando a objetivas de 100 vezes e ocular de 10 vezes, para a leitura contando o número de esporos em 5 subquadrantes, os 4 dos cantos e o subquadrante central. O cálculo da concentração de esporos na suspensão foi realizado de acordo com a Equação 1.

$$\frac{\text{Esporos}}{\text{mL}} = (\text{número médio de esporos contados em } c) \times (2,5 \times 10^5) \quad (1)$$

4.3 SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA COLEÇÃO DE FUNGOS DA CAATINGA CDSA/UFCG APTOS A REALIZAR A FERMENTAÇÃO EM CAFÉ

Inoculou-se 1 mL da suspensão de esporos, em pequenos frascos de vidro que continham meio de cultura com presença exclusiva de café, incubados à temperatura de 37 °C entre 96 á 144 horas, variando de acordo com a velocidade específica de crescimento (μ) de cada espécime. A composição do meio de cultura com presença exclusiva de café utilizado para a seleção de fungos filamentosos aptos a realizar a fermentação em café esta apresentada na Tabela 3. Para a preparação deste meio de cultura, grãos de *Coffea arabica* (café) foram moídos em um Moinho de Facas (Micro Moinho) com peneira de 1 mm de diâmetro e acrescido apenas de água destilada e esterilizado em autoclave, por 60 minutos, a 121°C.

Tabela 3 - Composição do meio de cultura com presença exclusiva de café

COMPONENTE	QUANTIDADE
Grãos de café moídos	5 g
Água Destilada	6 mL

O café moído fermentado por fungos filamentosos da Coleção de Fungos da Caatinga do CDSA/UFCG foram utilizados como inóculo para a realização da fermentação dos grãos de *Coffea arabica*.

4.4 PROCESSO FERMENTATIVO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA COLEÇÃO DE FUNGOS DA CAATINGA CDSA/UFCG EM GRÃOS DE *Coffea arabica*

Grãos de *Coffea arabica* depositados em *Elermeyers* foram inoculados com café moído fermentado por fungos filamentosos e incubados à temperatura de 37 °C por 48, 96, 144 e 192 horas. O meio de cultivo continha a presença restrita de grãos de café umedecidos com água destilada, esterilizado em autoclave, por 60 minutos, a 121 °C. A composição do meio de cultura para realização da fermentação em estado sólido esta descrita na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição do meio de cultura para realização da fermentação em grãos de café

COMPONENTE	QUANTIDADE
Grãos de café	100 g
Água Destilada	43 mL
Café moído fermentado	10 g

4.5 SECAGEM DOS GRÃOS DE CAFÉ FERMENTADOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Segundo Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a Resolução – CNNPA nº 12, de 1978 relata que o percentual de água encontrado na amostra do produto, grãos de café, deve ser de no máximo 11% p/p. Sendo assim, grãos café fermentado foram medidas por gravimetria em balança de precisão e levadas para estufa de secagem a 50°C, por 24 horas. As amostras foram resfriadas até a temperatura próxima a ambiente, antes da nova medida por gravimetria. A umidade (U) é determinada pela Equação 2 (base úmida %b.u) (Association of Official Analytical Chemists, 1990), e depois armazenados em sacos plásticos com fecho hermético

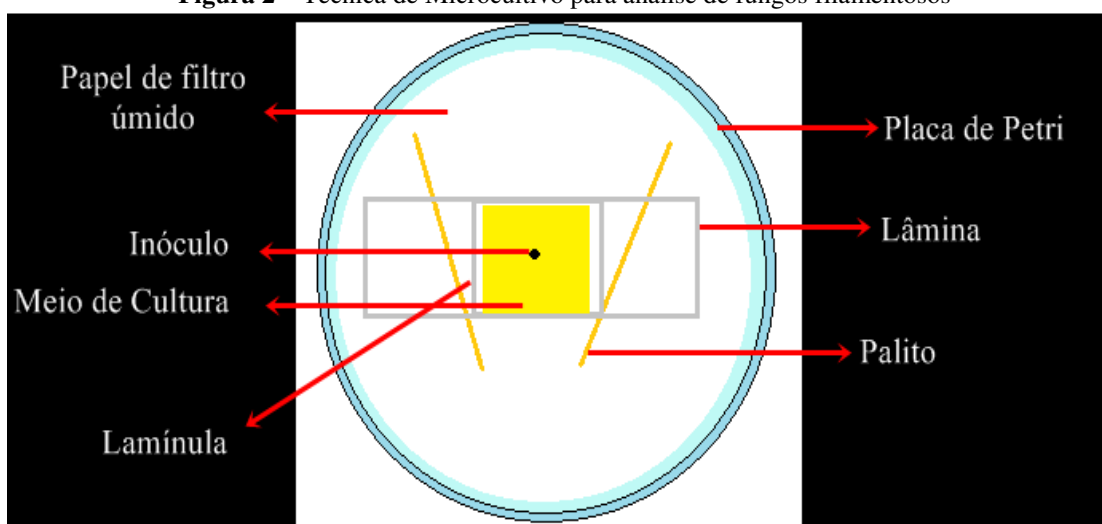
$$U(\%b.u) = \frac{(massa\ inicial - massa\ final) \times 100}{(massa\ inicial)} \quad (2)$$

4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

4.6.1 Técnica de Microcultivo

A técnica de microcultivo, baseada na Agência de Vigilância Sanitária (2004), foi utilizada para identificação dos isolados que foram capazes a realizarem a fermentação de grãos de *Coffea arabica*. Em uma lâmina para microscopia esterilizada, foi adicionado aproximadamente 1 mL de meio BDA (Tabela 2), no qual foi inoculado o isolado de interesse, e em seguida coberto por uma lamínula também esterilizada, na qual três de seus lados foram selados com base para as unhas. Este conjunto foi inserido em uma placa de *Petri* contendo papel de filtro umedecido com água destilada esterilizada e dois palitos de madeira esterilizados, como suporte (Figura 2). Em seguida, o material foi incubado a 34°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), com acompanhamento do crescimento por 96 horas em microscópio óptico e comparação das imagens obtidas com literatura especializada.

Figura 2 – Técnica de Microcultivo para análise de fungos filamentosos



Fonte: SOUSA, 2014.

4.4.2 Técnicas moleculares

A identificação dos isolados por meio de técnicas moleculares foi realizada pela professora Cristina Motta e Jadson Bezerra da Micoteca URM do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. As colônias puras do fungo de interesse foram cultivadas em meio BDA e depois colocadas em um pequeno frasco previamente esterilizado, contendo água destilada esterilizada, sendo posteriormente selado e enviado para o procedimento de identificação (Figura 3).

Figura 3 – Pequenos frascos plásticos contendo água destiladas e as colônias puras dos isolados de interesse.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CULTIVO E SELEÇÃO DOS ISOLADOS CAPAZES DE REALIZAREM A FERMENTAÇÃO

No presente trabalho, escolhidos de forma aleatória, fez-se a reativação de vinte e cinco isolados fúngicos da Coleção de Fungos da Caatinga do CDSA/UFCG. Os isolados fúngicos foram cultivados em BDA, uma vez que este é o meio de cultura mais comumente utilizado, por possibilitar o crescimento de micélio de uma vasta gama de fungos, além de sua formulação ser simples (ALBERT; PANDYA; PADHIAR, 2012).

Podemos observar pela Tabela 5, dos vinte e cinco isolados três não apresentaram crescimento em meio de cultura BDA. Rodrigues e colaboradores (1992) relatam que a dificuldade de algumas culturas crescerem após longos períodos de armazenamento em crescimento reduzido pode ser devido ao tipo de armazenamento e conservação dos isolados fúngicos.

Tabela 5 - Cultivo dos isolados fúngicos em meio BDA para esporulação.

ISOLADO AVALIADO	CRESCIMENTO EM MEIO BDA
CDSA02, CDSA06, CDSA09, CDSA12, CDSA20, CDSA23, CDSA24, CDSA43, CDSA50, CDSA54, CDSA60, CDSA66, CDSA68, CDSA70, CDSA71, CDSA101, CDSA104, CDSA108, CDSA109, CDSA110, CDSA112, CDSA114	+
CDSA74, CDSA111, CDSA64	-

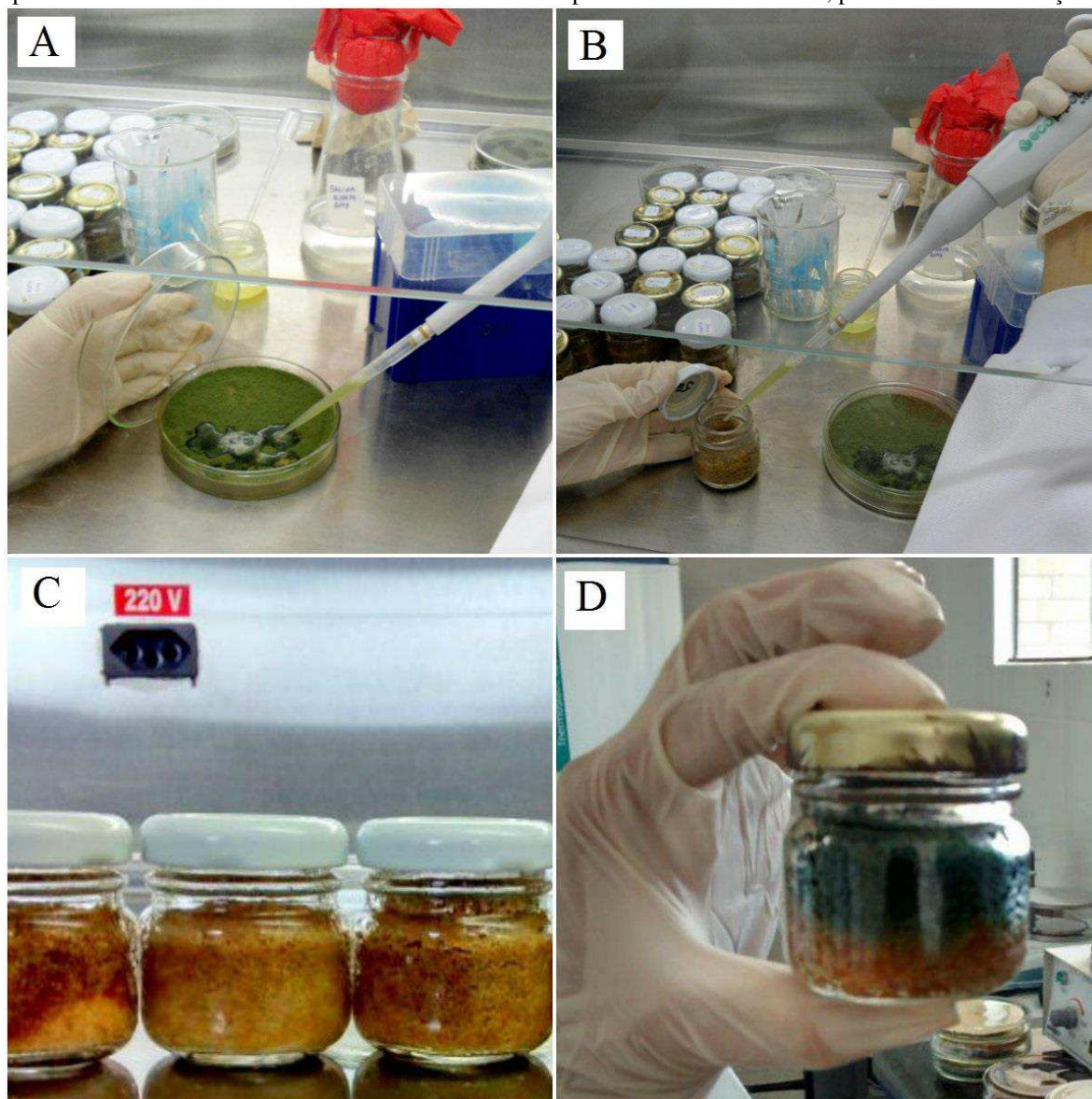
Legenda: Símbolos convencionais utilizados:

+: houve crescimento microbiano

-: não houve crescimento microbiano

A seleção dos microrganismos capazes de realizar o processo fermentativo em grãos de *Coffea arabica*, café, foi realizada a partir do desempenho destes ao serem submetidos à FES tendo o café moído como substrato. A inoculação dos isolados fúngicos em café moído foi procedido por meio da extração dos esporos dos vinte e dois isolados que apresentaram crescimento em meio BDA. Em cada placa de Petri foi feita a adição de 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%) e uma gota de detergente (Figura 4A) para retirada dos esporos. Em cada pote de vidro contendo café moído foi adicionado de 1 mL de suspensão de esporos na concentração de $1,71 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹ (Figura 4B), que foram incubados à temperatura de 37 °C entre 96 e 144 horas, variando de acordo com a velocidade específica de crescimento (μ) de cada espécime (Figura 4C; 2D).

Figura 4 – (A) extração dos esporos fúngicos dos isolados que apresentaram crescimento em meio BDA e em (B) inoculação do café moído pela suspensão dos esporos. Em (C) frasco de vidro contendo café moído ao início do processo fermentativo, e em (D) frasco de vidro contendo café moído ao fim do processo fermentativo. Todo processo foi realizado no fluxo laminar e com materiais previamente esterilizados, para evitar contaminação.



A partir dos resultados apresentados na Tabela 6, observa-se que dentre os vinte e dois isolados que apresentaram crescimento no meio de cultura BDA quando submetidos ao meio com presença exclusiva de café, apenas cinco (22,72%) foram capazes de realizar a fermentação. Os demais isolados (77,28%) demonstram não serem aptos a realizar a FES, uma vez que as características físicas e químicas dos substratos influenciam o crescimento micelial fúngico (DONINI *et al.*, 2006; SALES-CAMPOS *et al.*, 2008). O meio BDA apresenta grande riqueza nutricional (PANDEY; SHARMA, 2010) e, segundo Flamente (2001), os grãos de café verde são compostos por: glicídios, ligninas, lipídeos, proteínas, cinzas, compostos não-voláteis ácidos, trigonelina e cafeína. E o fato de microrganismos

crecerem em um substrato e não em outro está ligado a metabólitos específicos (SILVA; TEIXEIRA, 2012). Borzani e colaboradores (2001) relatam que espécies que originalmente crescem tanto em meio completo, rico de nutrientes, como em meios com quantidades mínimas de nutrientes, podem apresentar mutantes que perderam a capacidade de sintetizar algum componente do meio completo que não existe no meio mínimo.

Tabela 6 – Suspensão de esporos dos isolados fúngicos inoculadas em presença exclusiva de café moído.

ISOLADO AVALIADO	CRESCIMENTO EM MEIO DE CAFÉ MOÍDO
CDSA02, CDSA06, CDSA54, CDSA60, CDSA71	+
CDSA09, CDSA12, CDSA20, CDSA23, CDSA24, CDSA43, CDSA50, CDSA66, CDSA68, CDSA70, CDSA101, CDSA104, CDSA108, CDSA109, CDSA110, CDSA112, CDSA114	-

Legenda: Símbolos convencionais utilizados:

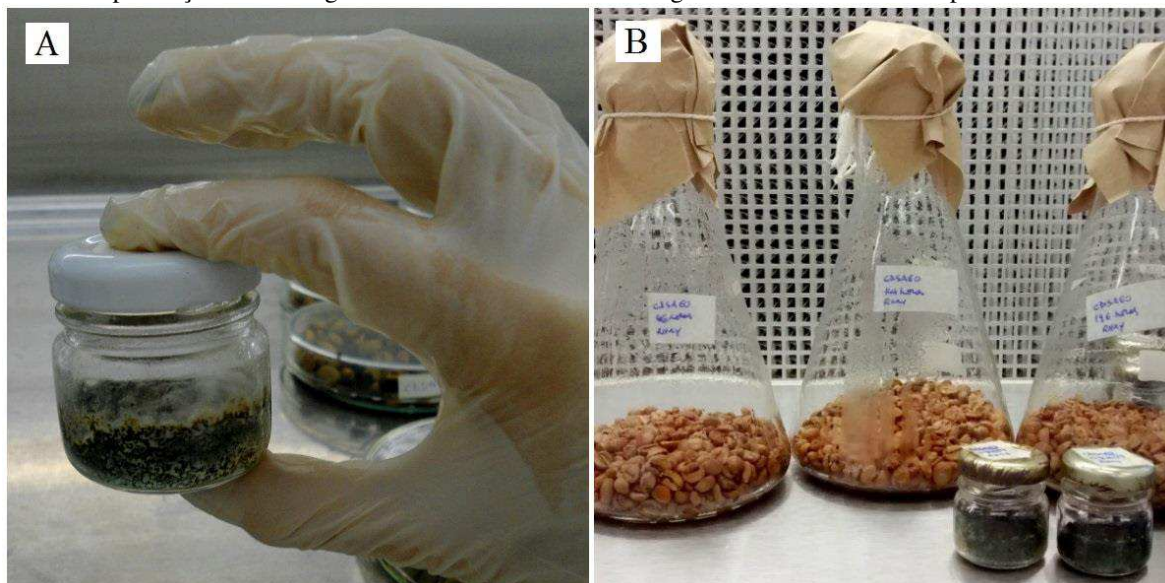
+: houve crescimento microbiano

-: não houve crescimento microbiano

A cafeína é outro provável fator que ocasionou a inibição do crescimento microbiano dos isolados utilizados neste estudo, uma vez que vários estudos demonstraram que a cafeína pode exercer efeito fungistático e antimicotoxigênico, principalmente em espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, caracterizando-se pela atividade pouco significativa no desenvolvimento fúngico inicial de 5 dias. Já na fase estacionária (10 dias) ocorre elevação no grau de inibição. (BUCHANAN; FLETCHER, 1978; BUCHANAN; TICE; MARINO, 1982; BUCHANAN; HARRY; GEALT, 1983;).

Os cinco isolados que se mostraram aptos a realizar o processo fermentativo em café moído (Tabela 6), foram avaliados para a fermentação em grãos de café. Café moído fermentado pelos isolados foi utilizado como inóculo para execução da fermentação dos grãos de café (Figura 5A). Cada *Elermeyer* contendo a presença restrita de grãos de café umedecidos com água destilada, esterilizado em autoclave (Figura 5B), foi inoculado com café moído fermentado por fungos filamentosos, e submetidos a quatro períodos de incubação.

Figura 5 - (A) frasco de vidro contendo café moído fermentado por isolado fúngico da Coleção de Fungos da Caatinga do CDSA/UFCG utilizado como inóculo para fermentação dos grãos de café e em (B) *Erlenmeyers* contendo a presença restrita de grãos de café umedecidos com água destilada ao início do processo fermentativo.



A partir dos resultados apresentados na Tabela 7, observa-se que apesar dos microrganismos terem sido capazes de realizar a FES em café moído apenas os isolados fúngicos denominados CDSA60 e CDSA71 demonstraram-se eficazes no procedimento fermentativo em grãos de *Coffea arabica*. Segundo Pinto (2005), uma das características da FES é o tipo de substrato, que são extremamente heterogêneos, pois são utilizados não só como suporte, mas também como fonte de carbono e energia. Esta heterogeneidade refere-se às variações na estrutura química de cada uma das moléculas presentes e à proporção entre os diferentes componentes.

A inibição do crescimento em grãos de café dos isolados fúngicos denominados CDSA02, CDSA06 e CDSA54 ocorreu provavelmente em decorrência ao tamanho das partículas do substrato, uma vez que estes apresentaram crescimento em café moído com partículas de 1 mm de diâmetro, mas não em grãos de café que possuem entre 16 e 18 mm de diâmetro. Segundo Mitchell e colaboradores (2000), o tamanho da partícula e forma é extremamente importante, pois eles afetam a relação da área superficial e o volume da partícula, o tamanho e a forma dos espaços vazios entre as partículas, que pode favorecer ou desfavorecer o acesso aos nutrientes e disponibilização de oxigênio. Sendo assim a fragmentação dos grãos de café poderá ser uma possibilidade para que estes isolados possam ter uma maior acessibilidade ao substrato e assim realizar o processo fermentativo.

Tabela 7 - Culturas inoculadas em presença restrita de grãos de café umedecidos autoclavados.

ISOLADO AVALIADO	CRESCIMENTO EM GRÃOS DE CAFÉ
CDSA60, CDSA71	+
CDSA02, CDSA06, CDSA54	-

Legenda: Símbolos convencionais utilizados:

+: houve crescimento microbiano

-: não houve crescimento microbiano

Substratos de partículas pequenas possuem maior área superficial para a o crescimento dos microrganismos, mas estas podem resultar em aglomeração do substrato, interferindo na utilização do oxigênio pelos microrganismos e pode resultar em pouco crescimento. As partículas grandes fornecem menos área superficial, mas o espaço entre as interpartículas são maiores e conseqüentemente a transferência de oxigênio é melhor (SIMÕES, 2006; ROCHA, 2010). Os fungos filamentosos têm como característica a capacidade de penetrar nos espaços inter e intraglanulares dos substratos por meios mecânicos ou enzimáticos (RAIMBAULT, 1998; SCHMIDELL, *et al.*, 2001; MANPREET, *et al.*, 2005; SIMÕES, 2006).

O tempo de atuação dos microrganismos nos grãos de café atribuirá características a bebida de café, sendo assim, os isolados CDSA60 (Figura 6) e CDSA71 (Figura 7) foram submetidos há quatro tempos fermentativos. A qualidade do café é decorrente de um conjunto de atributos físicos e físico-químicos que são responsáveis pelo sabor e aroma característicos das bebidas, ressaltando entre estes compostos voláteis, fenólicos, ácidos graxos, proteínas, açúcares, acidez, degradação da parede celular dos grãos resultando em alterações em seus constituintes e algumas enzimas, das quais a presença, teor e atividade conferem ao café sabor e aromas peculiares (LOPES, 2000). Segundo Pimenta e Vilela (2003) a boa ou a má qualidade da bebida é decorrente de fermentações e suas reações enzimáticas. Além disso, durante o processo de torração os grãos sofrem algumas reações químicas importantes conferindo ao café sabor e aroma peculiares (LOPES, 2000).

Observa-se pelas Figuras 6 e 7 o aumento progressivo miceliar fúngico sobre os grãos de café. Ao final de cada período de incubação os grãos foram levados para estufa de secagem para a retirada da umidade, uma vez que no início do processo fermentativo, de acordo com a Equação 2, a U (%b.u) do café moído e dos grãos foi de 50% e 44,44% respectivamente, após o processo de secagem a U (%b.u) dos grãos fermentados foi reduzida aos 11% exigidos pela ANVISA. Após o processo de retirada de umidade, os grãos fermentados foram armazenados

em sacos plásticos com fecho hermético, e levados para a análise sensorial, como demonstrado nas figuras 4 e 5.

Figura 6 – Grãos de café fermentados pelo isolado CDSA60 da Coleção de Fungos da Caatinga do CDSA/UFCG. Em (A) grãos fermentados após 48 horas, (B) grãos fermentados após 96 horas, (C) grãos fermentados após 144 horas e em (D) grãos fermentados após 192 horas.

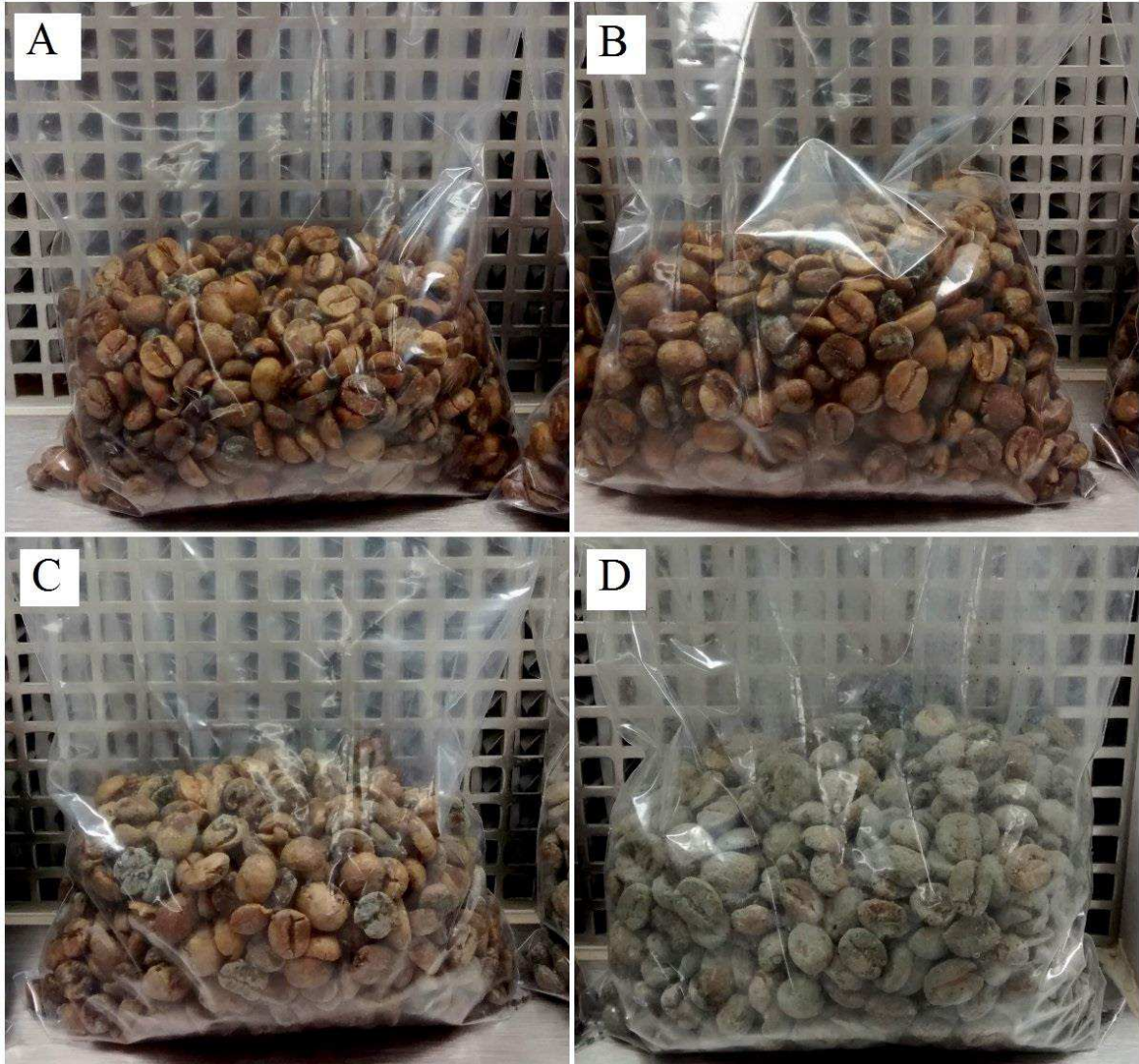
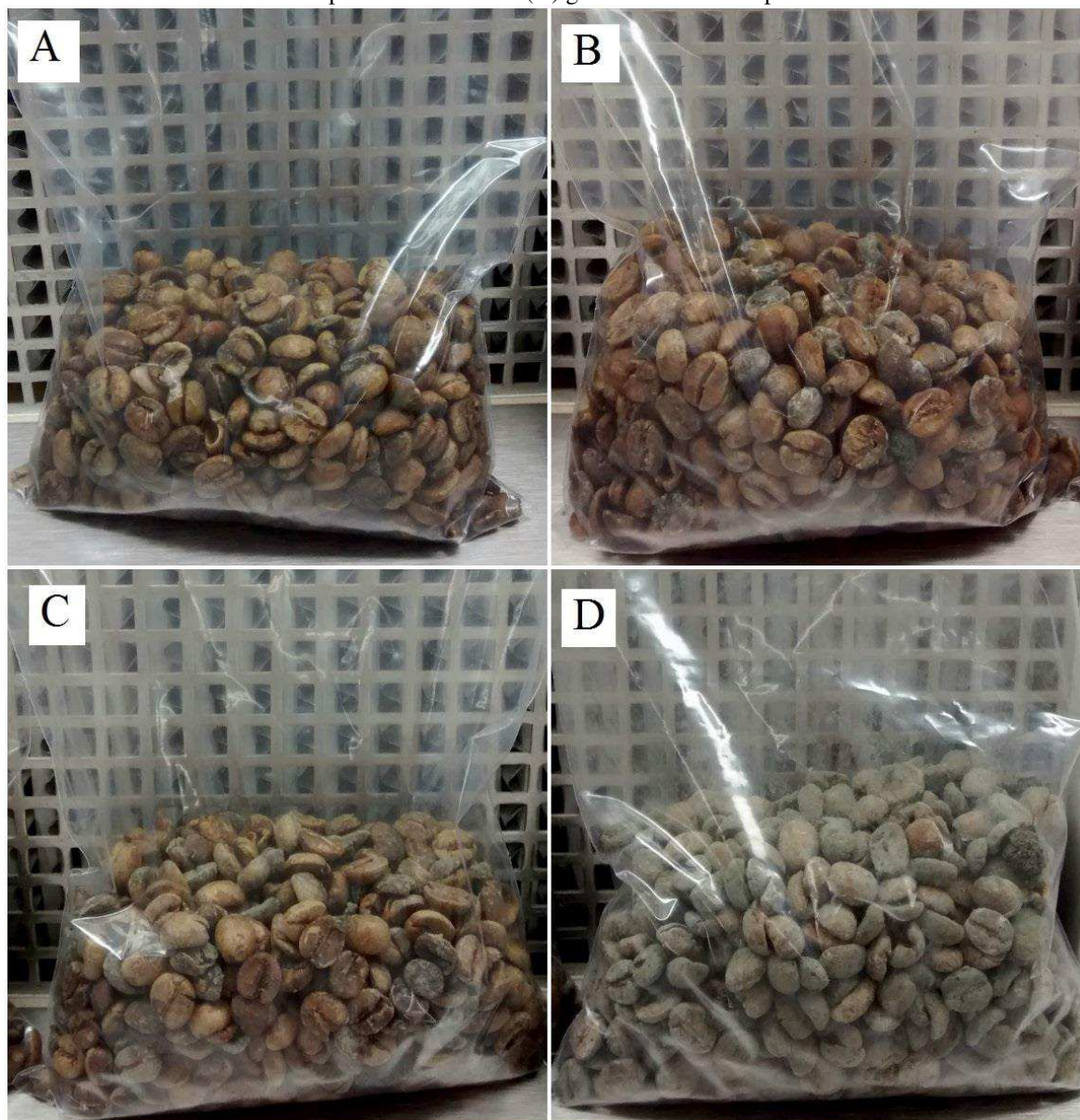


Figura 7 – Grãos de café fermentados pelo isolado CDSA71 da Coleção de Fungos da Caatinga do CDSA/UFCG. Em (A) grãos fermentados após 48 horas, (B) grãos fermentados após 96 horas, (C) grãos fermentados após 144 horas e em (D) grãos fermentados após 192 horas.



A aplicação de microrganismos isolados do bioma caatinga em processos fermentativos é de extrema valia para a inovação tecnológica, desenvolvimento dos mais variados produtos, e exploração da diversidade genética e metabólica dos microrganismos de forma sustentável.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS FERMENTADORES DE CAFÉ

Os isolados selecionados para a fermentação do café foram submetidos à identificação. A identificação dos isolados fermentadores de café (CDSA02, CDSA06, CDSA54, CDSA60 e CDSA71) foi realizada utilizando a técnica de microcultivo, na qual as características

morfológicas microscópicas dos isolados foram consideradas para sua identificação. O cultivo dos isolados em lâmina em meio BDA observados em microscópio óptico com aumento de 40x possibilitou o estudo das diferentes estruturas fúngicas e a disposição destas ao longo das hifas. Diante dos resultados obtidos, foi possível determinar a existência de apenas um gênero, o gênero *Aspergillus*. O isolado CDSA02 não apresentou crescimento nas lâminas, não sendo possível a identificação.

Para todos os isolados fúngicos foram observados estruturas como conidióforos retos, simples, terminando em uma globosa vesícula, apresentando fiálides no ápice sobreposta por conídios (BARNETT; HUNTER, 1998). As colônias apresentam uma ampla variação na coloração, com colorações em tons de verde, amarelo, cinza, marrons, preto e branco, sendo assim, uma característica macroscópica adotada para classificação (MONTEIRO, 2012).

De acordo com as características descritas anteriormente, determinou-se que os isolados CDSA06, CDSA54, CDSA60 e CDSA71 assemelham-se com espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*. E a diversidade morfológica observada entre os isolados citados, considerando-se a cor das colônias, pode indicar diversidade de espécies desse gênero. Por meio do uso de técnicas moleculares realizadas no Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, pela professora Cristina Motta e o Jadson Bezerra, foi possível as identificar das espécies dos isolados fúngicos denominados CDSA06, CDSA54, CDSA60 e CDSA71.

O fungo filamentosos denominado CDSA06 identificado como pertencente ao gênero *Aspergillus*, espécie *A. parasiticus* caracteriza-se por apresentar colônias de coloração verde a amarelo-olivas (Figura 8), tornando-se acinzentadas com a idade, e apresenta conídios esféricos e com paredes rugosas. O *Aspergillus parasiticus* é um potencial produtor de Aflatoxina e pode ser encontrado em muitos substratos, tais como amendoim, grãos de café, milho, sementes de algodão, sementes oleaginosas, trigo, girassol e sorgo (PITT; HOCKING, 1997 *apud* SILVA, 2012).

O fungo filamentosos denominado CDSA54 também foi identificado como sendo do gênero *Aspergillus*, espécie *A. flavus*. Assim como o *A. parasiticus* o *A. flavus* também caracteriza-se por apresentar colônias de coloração verde a amarelo-olivas, tornando-se acinzentadas com a idade (Figura 9). Morfologicamente possui cabeça conidial variável e produz conídios bastante variáveis em forma e tamanho, com paredes relativamente finas, podendo ser muito ou pouco rugosos (PITT; HOCKING, 1997 *apud* SILVA, 2012).

Figura 8 – Isolado CDSA06 identificado como pertencente ao gênero *Aspergillus*, espécie *A. parasiticus*. Em (A) crescimento fúngico após 96 horas de cultivo em meio BDA e em (B) Estruturas fúngicas com aumento de 40x após 96 horas de cultivo em meio BDA.

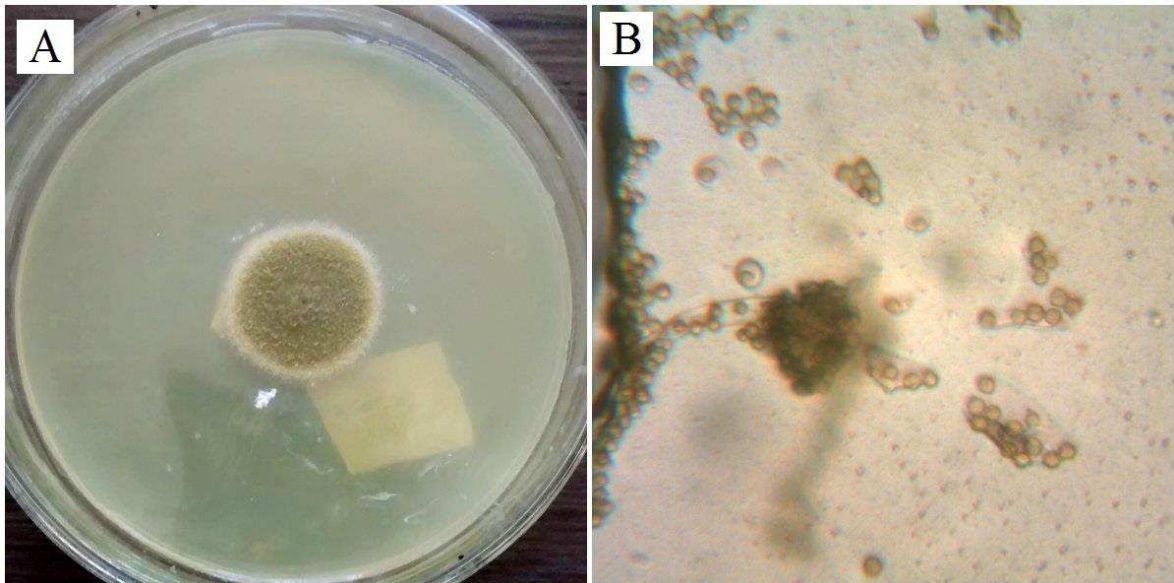
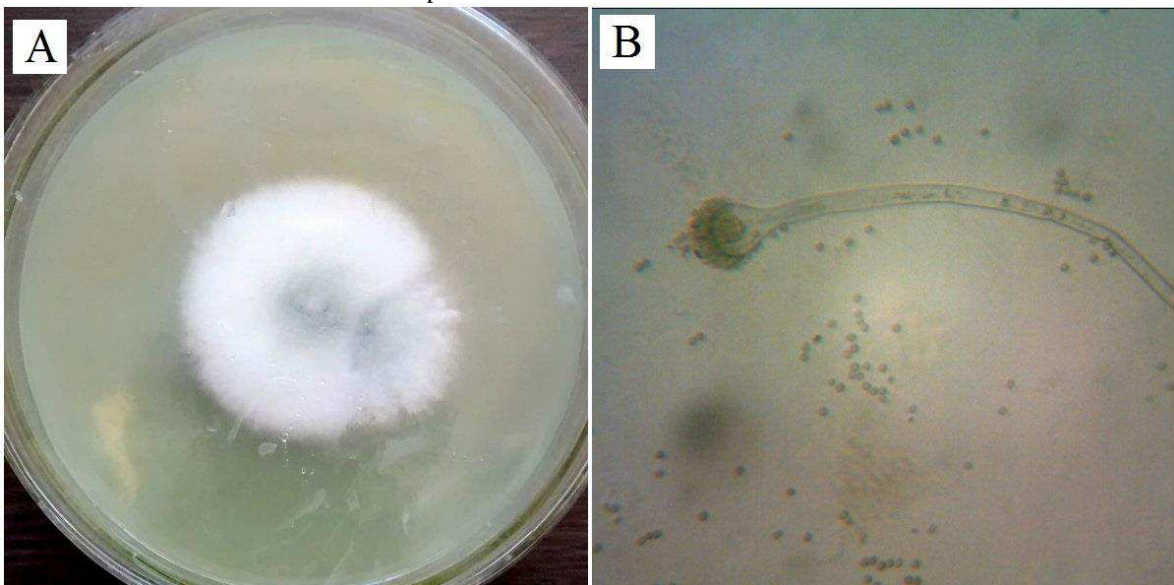


Figura 9 – Isolado CDSA54 identificado como pertencente ao gênero *Aspergillus*, espécie *A. flavus*. Em (A) crescimento fúngico após 72 horas de cultivo em meio BDA e em (B) Estruturas fúngicas com aumento de 40x após 72 horas de cultivo em meio BDA.



Os isolados fúngicos denominados CDSA60 (Figura 10) e CDSA71 (Figura 11) foram identificados como pertencentes ao gênero *Aspergillus* e espécie *A. fumigatus*. O *Aspergillus fumigatus* é um fungo saprófita que desempenha papel essencial no ciclo do carbono e do nitrogênio ambiental, seu nicho ecológico natural é o solo, desenvolvendo-se em restos orgânicos. Produz grande número de esporos que podem sobreviver a uma vasta gama de condições ambientais. Caracterizados por conídios de coloração verde e sua identificação é

baseada predominantemente sobre a morfologia dos conidióforos e os conídios (LATGÉ, 1999; ABAD, *et al.*, 2010).

Figura 10 – Isolado CDSA60 identificado como pertencente ao gênero *Aspergillus*, espécie *A. fumigatus*. Em (A) crescimento fúngico após 72 horas de cultivo em meio BDA e em (B) Estruturas fúngicas com aumento de 40x após 72 horas de cultivo em meio BDA.

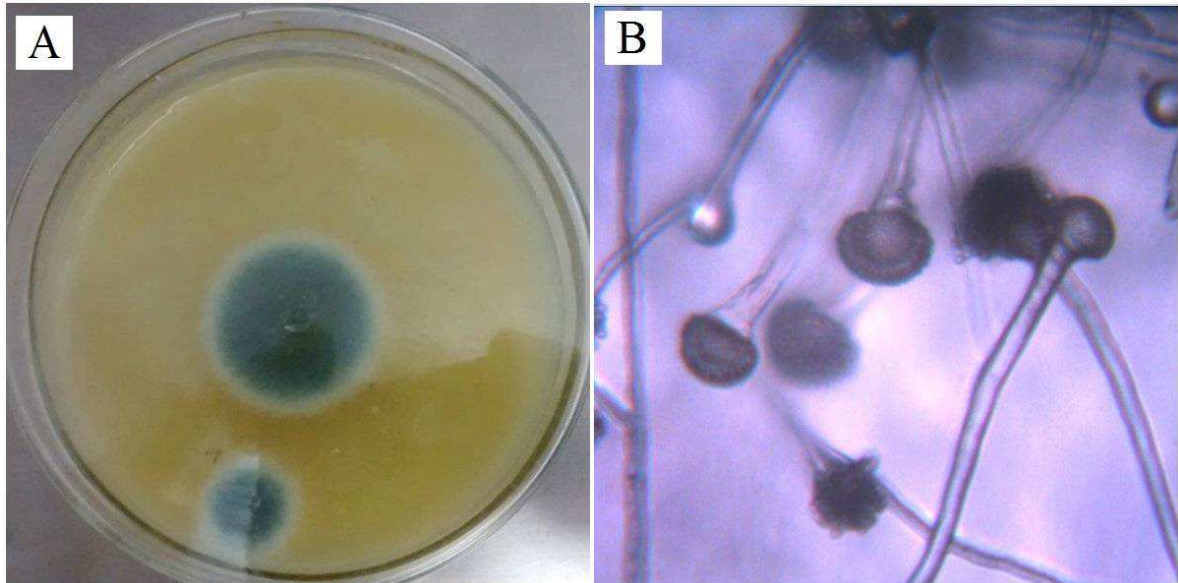
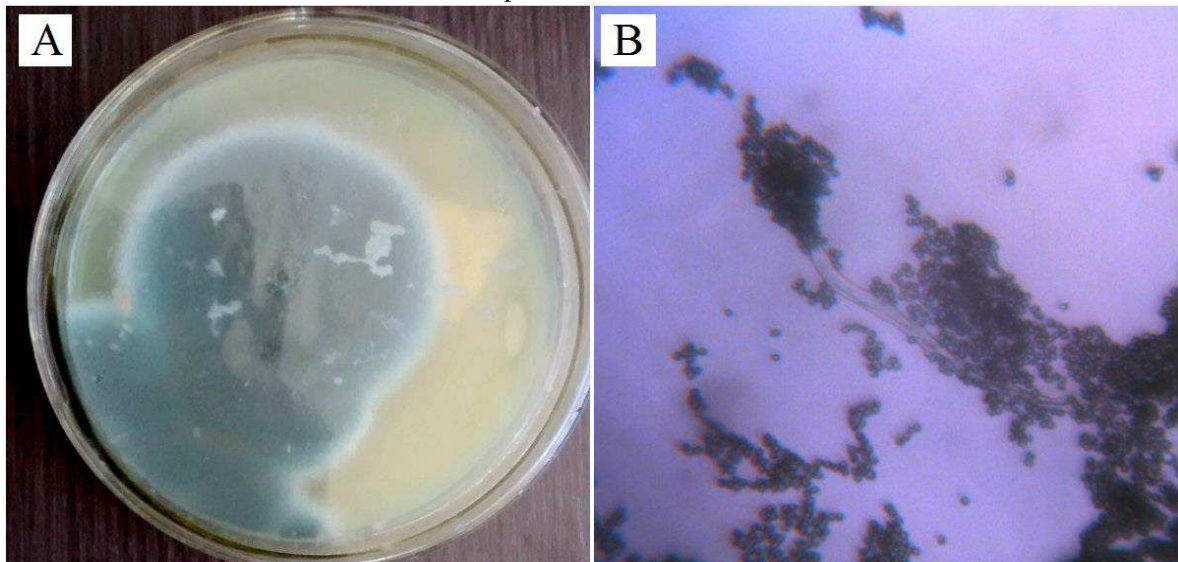


Figura 11 – Isolado CDSA71 identificado como pertencente ao gênero *Aspergillus*, espécie *A. fumigatus*. Em (A) crescimento fúngico após 96 horas de cultivo em meio BDA e em (B) Estruturas fúngicas com aumento de 40x após 96 horas de cultivo em meio BDA.



Autores como Buchanan, Harry e Gealt (1983) em seus estudos demonstraram o efeito fungistático da cafeína em algumas espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Os isolados fermentadores de café identificados como pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram capazes de resistir ao efeito inibitório da cafeína.

6 CONCLUSÕES

- Apenas 22,72% dos fungos testados foram capazes de crescer em café;
- Dentre os vinte e dois espécimes fúngicos avaliados, os denominados como CDSA02, CDSA06, CDSA54, CDSA60 e CDSA71, são capazes de realizar o processo fermentativo em café moído;
- O tamanho das partículas do substrato restringiu o desempenho dos isolados fúngicos denominados CDSA02, CDSA06 e CDSA54 no processo fermentativo dos grãos de café;
- Os fungos filamentosos que neste trabalho foram capazes de fermentar café foram identificados como sendo das espécies: *Aspergillus parasiticus* (CDSA06); *Aspergillus flavus* (CDSA54); *Aspergillus fumigatus* (CDSA60 e CDSA71);
- A partir deste estudo foi realizado o desenvolvimento de uma nova técnica para fermentação do café.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, A.; MOLINA, J. V. F.; BIKANDI, J.; RAMIREZ, A.; MARGARETO, J.; SENDINO, J.; HERNANDO, F. L.; PONTÓN, J.; GARAIZAR, J.; REMENTERIA, A. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. **Rev Iberoam Micol.** v. 27, n. 4. p155–182. 2010.
- ACADEMIA DO CAFÉ. Coffee Letter. 2011. Disponível em: < <http://www.academiadocafe.pt/>>. Acesso em: 24 de dezembro de 2014.
- AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica.** Módulo VII, 27 p, 2004.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Resolução – CNNPA nº 12, de 1978.** Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 03 de fevereiro de 2015.
- ALBERT, S.; PANDYA, B.; PADHIAR, A. Evaluation of colony characteristics and enzymatic activity of some fungi for potential use in co-culture for bio pulping. **Asian J. Biol. Life Sci.** v. 1. May-Aug 2012.
- AMPESSAN, F. **Avaliação de diferentes métodos de secagem do café (*Coffea arabica* L.) cereja descascado.** 2009. 116 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 2009.
- ARAÚJO, F. S. **Potencial de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares em seis sistemas de uso do solo, na região nordeste do semi-árido do Brasil.** 2008. 50 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2008.
- Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis.** 15. ed. Arlington, Virginia. 1990.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi.** The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 4. ed., 218 p., 1998.
- BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M.; JAVED, S. Solid-state Fermentation: An Overview, **Chem. Biochem. Eng. Q.** v. 22, n. 1. p 49–70. 2008.
- BRAGA, G. U. L.; DESTÉFANO, R. H. R.; MESSIAS, C. L. Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. **Revista de Microbiologia,** São Paulo, v. 30, n. 2, p. 107-113, 1999.
- BRANCO, S. M. **Caatinga: a paisagem e o homem sertanejo.** 2ª ed. São Paulo: Moderna, 2003. Ministério do Meio Ambiente - MMA. 2002. **Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira.** Brasília: Secretaria de Biodiversidade e Florestas. 404p.
- BRAZIL SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION – BSCA. Disponível em: < <http://bsca.com.br/>>. Acesso em: 24 de dezembro de 2014.
- BROZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial – vol. 1.** São Paulo: Blucher, 2001.

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

BUCHANAN, R.L.; HARRY, M.A; GEALT, M.A. Caffeine inhibition of steigmatocystin, citrinin, and patulin production. **Journal of Food Science**. v. 48, p. 1226-1228. 1983.

BUCHANAN, R.L.; TICE, G.; MARINO, D. Caffeine inhibition of ochratoxin A uroduction. **J. Food Sci.** v. 47. p. 319. 1982.

BUCHANAN, R. L.; HOOVER, D. G.; JONES, S. B. Caffeine Inhibition of Aflatoxin Production: Mode of Action. **Applied And Environmental Microbiology**, Nov. 1983, p. 1193-1200.

CAFEICULTURA. Café do Jacu, caro e exótico. **Revista Cafeicultura**, 2009. Disponível em: <<http://www.revistacafeicultura.com.br/>>. Acesso em: 24 de dezembro de 2014.

CAFEICULTURA. O Café mais raro e caro do Mundo - Kopi Luwak. **Revista Cafeicultura**, 2007. Disponível em: <<http://www.revistacafeicultura.com.br/>>. Acesso em: 24 de dezembro de 2014.

CANHOS, V.P.; MANFIO, G.P. **Recursos Microbiológicos para Biotecnologia**. 2001. Disponível em: <<http://www.faecpr.edu.br/>>. Acesso em: 20 fevereiro 2015.

CARNAÚBA, J. P.; SOBRAL, M. F.; AMORIM, E. P. R.; SILVA, J. C.; SANTOS, B.; FÉLIX, K. C. S. Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Scytalidium lignicola*. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.2, p.199-200, 2007.

CHALFOUN, S. M.; PEREIRA, M. C.; PIMENTA, C. J.; ANGÉLICO, C. L. Efeito da cafeína e do ácido cafeico sobre o desenvolvimento de fungos e síntese de micotoxinas em café (*Coffea arabica* L.). **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil** (5. : 2007 : Águas de Lindóia, SP). Anais. Brasília, D.F. : Embrapa Café, 2007.

CHALFOUN, S.M.; PEREIRA, M.C.; BATISTA, L.R.; ANGÉLICO, C.L. Efeito da cafeína sobre o crescimento micelial de fungos associados ao café e produção de toxinas. **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil** (2. : 2001 : Vitória, ES). Resumos. Brasília, D.F. : Embrapa Café, 2001. 181p. : il.

CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL – CeCafé. Disponível em: <<http://www.cecafe.com.br/>>. Acesso em: 23 de dezembro de 2014.

CRAWFORD, J. History of Coffee. **Journal of the Statistical Society of London**, v. 1 p.50-58. 1852.

DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Desenvolvimento in vitro de *Pleurotus* spp. sob a influência de diferentes substratos e dextrose. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 331-338, 2005.

DURANTE, A. D. **Qualidade do café colhido em diferentes estádios de maturação**. Trabalho de conclusão de curso. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais. 2009.

EXPOCAFÉ. Café em números. **5º Simpósio de Mecanização da Lavoura Cafeeira**. Disponível em: <<http://expocafe.com.br/>>. Acesso em: 24 de dezembro de 2014.

- FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2007. 131 p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. 2007.
- FERREIRA, A. N.; PACHECO, C. S. V.; TAVARES, I. M. de C.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido na biotransformação do resíduo do cajá. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 207-213, abr./jun. 2011.
- FERREIRA, G. F. P.; NOVAES, Q. S.; BATISTA, L. R.; SOUZA, S. E.; AZEVEDO, G. B.; SILVA, D. M. Fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica* L.) beneficiados no sudoeste da Bahia. **Summa Phytopathol.** Botucatu, v. 37, n. 3, p. 98-102, 2011.
- FLAMENT, I. **Coffee flavor chemistry**. Ed. Wiley. 2001.
- FRANÇA, A. S. et al. Evolução da composição do extrato de café durante o processo de torrefação. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Especial Café, Viçosa, n.2, p. 37-47, 2001 *apud* FUJII, S.; ONO, E. Y. S.; HIROOKA, E. Y. Ocratoxina A em café: controle e metodologia analítica com ênfase a inovação no contexto de segurança alimentar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 273-292, jul./dez. 2002.
- FREDERICO, S. Lógica das commodities, finanças e cafeicultura. **Boletim Campineiro de Geografia**, v. 3, n. 1, 2013.
- FUJII, S.; ASSUNÇÃO, F.G.A.; TANIWAKI, M.H.; SCHOLZ, M.B.S.; GOMES, R.J.H.C. & HIROOKA, E.Y. Atividade fungistática “in vitro” de cafeína em fungos associados com grãos de café. **Acta Scientiarum Agronomy** v. 26. P. 279-285. 2004.
- GALEMBECK, F.; BARBOSA, C. A. S.; SOUSA, R. A. Aproveitamento sustentável de biomassa e de recursos naturais na inovação química. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 571-581, 2009.
- GARCIA, A. K. **Avaliação da atividade lipolítica de fungos filamentosos da costa brasileira**. 2011. 55 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- GAVA, M. A. **Desempenho de diferentes meios de cultura utilizados na avaliação de fungos presentes em ambientes de produção de alimentos**. 2002. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz/USP. São Paulo, Brasil; 2002.
- GUARÇONI, R. C. **Efeito da temperatura de secagem e da percentagem de frutos verdes na qualidade do café conilon**. 1995. 50 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1995.
- HAKIL, M.; DENIS, S.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; AUGUR, C. Degradation and product analysis of caffeine and related dimethylxanthines by filamentous fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, n.5, p.355-359, 1998.
- KILL, L. H. P. Árvore do conhecimento bioma caatinga. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**, 2013. Disponível:< <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em: 08 de março de 2015.
- LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, n. 2, p. 310- 350, 1999.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. da. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife : Ed. Universitária da UFPE, 2003.822 p.

LEÃO, E. de A.; PAULA, N. M. de. A produção de cafés no Brasil e a emergência de novos padrões de competitividade. **XIII Encontro Regional de Economia – ANPEC Sul 2010**. 2010. Porto Alegre – RS.

LEMENTY, A. C. **Café fermentado com levedura usada na cerveja? Conheça a novidade do barista Léo Moço**. Colherada Cultural, 2013. Disponível em: < <http://colheradacultural.com.br/>>. Acesso em: 24 de dezembro de 2014.

LIMA FILHO, T.; LUCIA, S. M. D.; SARAIVA, S. H.; LEITE, S. T. Qualidade sensorial e físico-química dos cafés arábica e conilon. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.16; 2013.

LOPES, M. V. **Avaliação da qualidade de grãos crus e torrados de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L)**. 2000. 95 p. Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos. Lavras: 2000.

MAIA, L. C. *et al.* Ministério do Meio Ambiente. **Diversidade Biológica e Conservação da Floresta Atlântica ao Norte do Rio São Francisco**. Brasília, 2005. 106 p.

MANPREET, S. SAWRAJ, S., SACHIN, D., PANKAJ, S. AND BANERJEE, U.C. Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 1, n. 2. 2005, p. 1-9.

MARCONE, M. **New research explains structure, taste of Kopi Luwak coffee**. 2004. University Guelph. Disponível em:< <http://www.uoguelph.ca/>>. Acesso em: 24 de dezembro de 2014.

MARQUES, P. de F. B. **Os efeitos do País de Origem e Comércio Justo na criação de Valor de Marca e a sua influência na Intenção de Compra do Consumidor de Café em Portugal**. Tese Doutorado. Universidade Autônoma de Lisboa. 2013.

MARTINS, A. L. **História do Café**. São Paulo: Contexto, 2008. 316p.

MENDES, L. C. **Estudos para determinação das melhores formulações de blends de café arábica (*C. arabica*) com café robusta (*C. canephora* Conilon) para uso no setor de cafés torrados e moídos e de cafés espresso**. 186f. Tese Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2005. *apud* LIMA FILHO, T.; LUCIA, S. M. D.; SARAIVA, S. H.; LEITE, S. T. Qualidade sensorial e físico-química dos cafés arábica e conilon. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.16; 2013.

Ministério do Meio Ambiente - MMA. **Programa de revitalização da bacia hidrográfica do rio São Francisco**. Brasília, MMA. 2003. 134p.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-State Fermentation Bioreactors: fundamentals of design and operation**. Ed Springer. 2000.

MONTEIRO, M. C. P. **Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado**. 2012. 75 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Lavras, 2012.

NEVES, L. W. de A. **Fazer ou comprar: uma análise sob a perspectiva das teorias da economia dos custos de transações e da visão baseada nos recursos**. 2009. 176 p. Tese Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. 2009.

- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Science & Technology**. v. 77, n 1. 1999.
- PANDEY, R. R.; SHARMA, G. Influence of culture media on growth, colony character and sporulation of fungi isolated from decaying vegetable wastes. **Journal of Yeast and Fungal Research**. v. 1, n. 8, p. 157 - 164, October 2010.
- PENDERGRAST, M. **Uncommon Grounds: The History of Coffee and How It Transformed Our World**. 2nd ed. Basic Books, 2010. 480 p.
- PIMENTA, C. J.; VILELA, E. R. Composição microbiana e ocratoxina a no café (*Coffea arabica* L.) Submetido a diferentes tempos de espera antes da secagem. **Ciênc. agrotec.**, Lavras. v.27, n.6, p. 1315-1320, nov./dez., 2003.
- PINTO, G. A. S.; BRITO, E. D.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. **Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais**. Embrapa Agroindústria Tropical. 2005.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 3rd edition. Springer. 1997 *apud* SILVA, J. L. **Identificação Morfológica e Molecular de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* isolados de alimentos destinados a caprinos em lactação**. 2012. Dissertação de Mestrado. Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. 2012.
- PRABHAKAR, A.; KRISHNAIAH, K., JANAUN, J.; BONO, A. An overview of Engineering Aspects of Solid State Fermentation. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 1, n. 2. 2005, p.10-16.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**. v.1, n.3, Issue of August 15, 1998.
- RIBEIRO, J. H. O café do Jacu. **Revista Globo Rural**, 2008. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/>>. Acesso em: 24 de dezembro de 2014.
- ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. 2010. 161 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia. 2010.
- RODRIGUES, E. G.; LÍRIO, V. S.; LACAZ, C. S. Preservação de Fungos e Actinomicetos de Interesse Médico em Água Destilada. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 159-165, mar./abr. 1992.
- ROSSI, S. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; PEREIRA, B. M. P.; GAGO, F. D.; RIZZOLO, J. A.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MEDEIROS, A. B. P. Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. **Food Research International**, v. 42, p. 484-486, 2009.
- ROUSSOS, S.; HANNIBAL, L.; AQUIAHUATL, M.A.; HERNANDEZ; M. R. T.; MARAKIS, S. Caffeine degradation by *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation of coffee pulp: critical effect of additional inorganic and organic nitrogen sources. **Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.31, n.4, p.316-319, 1994.
- SALES-CAMPOS, C.; EIRA, A. F.; JESUS, M. A.; CAMPAGNOLLI, F.; ANDRADE, M. C. N. Crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* em resíduo de Simarouba amara. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 11, p. 1633-1635, 2008.

SANTOS, D. T. dos; SARROUH, B. F.; SANTOS, J. C. dos.; PÉREZ, V. H.; SILVA, S. S. da. Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia. **Revista Janus**, Lorena, ano 3, n. 4, 2º semestre de 2006.

SCHMIDELL, W.; BROZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial – vol. 2**. São Paulo: Blucher, 2001.

SILVA, A. C. **Formulações de blends de café arábica (*C.arabica*) para bebida de café expresso: percepção e expectativa sensorial**. 2009. 130 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará. 2009.

SILVA, J. L.; TEIXEIRA, R. N. V. Esporulação e crescimento micelial de *Fusarium solani* em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 6, n. 1, p. 47-52, janeiro-abril, 2012.

SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. **Biodiversidade da CAATINGA: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Ministério do Meio Ambiente. Universidade Federal de Pernambuco, Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da UFPE. EMBRAPA Semi-Árido. Brasília, 2003, p. 7- 44.

SILVA, N. A.; LINS, C. E. L. Fungos filamentosos em solo de caatinga: diversidade e atividade enzimática. *In: XVI Congresso de iniciação científica UFPE*, Pernambuco, 2008.

SIMÕES, M. L. G. **Produção de xilanase por fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga**. 2006. 151 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. 2006.

SIMÕES, R. de O.; FARONI, L. R. D.; QUEIROZ, D. M. de. Qualidade dos grãos de café (*Coffea arabica L.*) em coco processados por via seca. **Revista Caatinga**. v. 21, n. 2. 2008. p.139-146.

SINDICATO DA INDUSTRIA DE CAFÉ DO ESTADO DE MINAS GERAIS - SindiCafé-MG. Disponível em: <<http://sindicafe-mg.com.br>>. Acesso em: 23 de dezembro de 2014.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. 2009. p. 13–18.

SOUSA, J. P. **Prospecção de enzimas de interesse industrial (celulase e amilase) a partir de fungos isolados da caatinga, Semiárido Paraibano**. 2014. 50p. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Campina Grande. 2014.

SOUZA, M. C. M. de. **Cafés sustentáveis e de denominação de origem: a certificação de qualidade na diferenciação de cafés orgânicos, sombreados e solidários**. 2006. 192 p. Tese Doutorado. Universidade de São Paulo. 2006.

SUBRAMANIAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **I.J.S.N.**, v. 3, n. 3. 2012. p. 480-486.

TEIXEIRA, M. M. **Influência dos diferentes processos de pós-colheita na agregação de valor do café conilon**. 2011. 77 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo. 2011.

UKERS, W. H. **All About Coffee**. New York: Tea and Coffee Trade Journal Company, 1922. 796p.

VELLOSO, A. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; PAREYN, F. G. C. **Ecorregiões Propostas para o Bioma Caatinga**. Recife: Associação Plantas do Nordeste; Instituto de Conservação Ambiental The Nature Conservancy do Brasil, 2002. 76 p.

VILELA, D. M. **Seleção in vitro de culturas iniciadoras para fermentação de frutos de café (*Coffea arabica*) processados via seca e semi-seca**. 2011. 82 p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras. 2011.

World Wildlife Fund Brasil. Disponível em: < <http://www.wwf.org.br/>>. Acesso em: 30 de dezembro de 2014.

ZYLBERSZTAJN, D.; FARINA, E. M. M. Q. (Coords.) **Diagnóstico sobre o Sistema agroindustrial de cafés especiais e qualidade superior do estado de Minas Gerais**. Relatório Final ENSA/FEA/USP. São Paulo: SEBRAE-MG, 2001. 174p.