

**SUCESSÃO MICROBIANA E  
CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA  
MICROBIOTA ASSOCIADA AOS FRUTOS E  
GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) DO  
MUNICÍPIO DE LAVRAS- MG.**

**CRISTINA FERREIRA SILVA**

**2004**

58355

049875

**CRISTINA FERREIRA SILVA**

**SUCESSÃO MICROBIANA E CARACTERIZAÇÃO  
ENZIMÁTICA DA MICROBIOTA ASSOCIADA AOS FRUTOS E  
GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) DO MUNICÍPIO DE LAVRAS- MG**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós - Graduação "Strictu Sensu" em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de "Doutor".

**Orientadora**

**Profa. Rosane Freitas Schwan**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2004**

lc:49793

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Cristina Ferreira

Sucessão microbiana e caracterização enzimática da microbiota associada aos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.) do município de Lavras-MG / Cristina Ferreira Silva. – Lavras : UFLA, 2004.

156 p. : il.

Orientadora: Rosane Freitas Schwan.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Café. 2. Sucessão ecológica. 3. Bactéria. 4. Enzima. 5. Fungo. 6. Levedura.  
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.7394

**CRISTINA FERREIRA SILVA**

**SUCESSÃO MICROBIANA E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA  
MICROBIOTA ASSOCIADA AOS FRUTOS E GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea  
arabica* L.) DO MUNICÍPIO DE LAVRAS- MG**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós - Graduação "Strictu Sensu" em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de "Doutor".

**APROVADA em 1 de março de 2004**

**Prof. Eustáquio Souza Dias**

**UFLA**

**Dr<sup>a</sup> Sara Maria Chalfoun**

**EPAMIG**

**Profa. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada**

**UEM**

**Prof. Dr. Hilário Antonio de Castro**

**UFLA**

**Profa. Rosane Freitas Schwan  
UFLA  
(Orientadora)**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL**

**AOS MEUS PAIS  
AOS MEUS IRMÃOS CHRIS E JOÃO  
À MINHA SOBRINHA DÉBORAH  
A MINHA FAMÍLIA E AMIGOS**

**DEDICO**

A ELABORAÇÃO DESTA TESE REQUEREU DE MIM E DE PESSOAS  
QUE AMO MUITO UMA GRANDE DEDICAÇÃO.  
PORÉM, MAIS QUE POR ESTA TESE, GOSTARIA DE SER LEMBRADA  
COMO UMA PESSOA QUE PÔDE AJUDAR ALGUÉM A SEGUIR  
ADIANTE, ANIMAR ALGUÉM COM UMA CANÇÃO, MOSTRAR A  
ALGUÉM O CAMINHO CERTO E DIVULGAR A MENSAGEM QUE O  
**SENHOR DEIXOU.**

SE PUDE FAZER ALGUMA DESTAS COISAS, FOI GRAÇAS AO AMOR,  
PACIÊNCIA E COMPANHERISMO DOS MEUS "MENINOS" . ENTÃO, É A  
ELES QUE OFEREÇO ESTE TRABALHO:

MEU MARIDO LUÍS E



MEUS FILHOS ANDRÉ E EMMANUEL.



## **AGRADECIMENTOS**

A você, meu amor, Luís, pelo amor incondicional e paciente. Você sabe o quanto é importante para mim.

Aos meus meninos, pela alegria do reencontro no final do dia.

Agradeço sem conseguir dizer o quanto ao meu pai, Paulo, pela imensa força, confiança, exemplo e amor a mim dedicado durante todo este tempo de estudo.

Agradeço muitíssimo a minha mãe Celina pela extraordinária presteza em ajudar com meus filhos nos momentos em que precisei me ausentar.

A minha querida amiga-orientadora, Rosane. Agradeço o apoio, o carinho, a compreensão e a amizade por estes sete anos de convivência. Mais uma vez, muuuuuuuuito obrigado!

A minha família, pela compreensão da ausência durante estes quatro anos.

A minha irmã, Chris, e ao meu irmão, João, que mesmo a distância são..... meus melhores irmãos.

Aos membros da banca de Qualificação, Dra Kátia Regina Schwan-Estrada, Dra. Sara Maria Chalfoun e Dr. Eustáquio Souza Dias, pela preciosa cooperação e sugestões.

Agradeço de coração, em muito especial, a minha amiga Aramália, pela ajuda com os numerosos Gram, pela amizade e pelos sorrisos todos os dias.

Agradeço a Luana Botelho pela grande paciência e dedicação com as “minhas enzimas” ao amigo Júlio pelo cuidado na purificação das “minhas leveduras”.

**Agradeço aos mais que colegas de laboratório de Microbiologia do DBI, meus amigos (por ordem alfabética): Cássia, Cidinha, Cláudia Labory, Evânia, Fernanda, Ivani, Magda, Marisa, Mirian, Pascoal, Raquel, Rogério e Silvia.**

**Muito obrigado a todos os funcionários do Departamento de Biologia, em especial. a Dona Erundina, Rosangela, Rafaela e Zélia.**

**Agradeço ao Departamento de Ciência dos Alimentos na pessoa da Dra. Cristina Bressan, pela concessão da quota de bolsa de estudos da CAPES.**

**Agradeço aos funcionários da Biblioteca Central, DRCA, PRPG, APG.**

**Agradeço o apoio financeiro concedido pela CAPES, FAPEMIG e CNPq.**



## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1 Introdução Geral .....	01
1 Introdução.....	02
2 Referencial teórico.....	04
2.1 Fungos filamentosos.....	07
2.1.1 Micotoxinas.....	12
2.2 Leveduras e bactérias.....	18
2.3 Sucessão ecológica e interação microbiana.....	23
2.4 Enzimas microbinas: celulasas, xilanases e pectinases.....	27
3 Objetivos específicos.....	34
4 Referências bibliográficas.....	35
CAPÍTULO 2 Sucessão ecológica e interação microbiana em frutos e grãos de café natural.....	45
Resumo.....	46
Abstract.....	47
1 Introdução.....	48
2 Material e métodos.....	50
2.1 Amostragem.....	50
2.2 Contagem e isolamento de microrganismos.....	50
2.3 Identificação das espécies microbianas.....	51
2.4 Identificação de ácidos orgânicos inerentes dos frutos e grãos de café e produzidos por microrganismos.....	55
3 Resultados e discussão.....	56
4 Conclusões.....	81
5 Referências bibliográficas.....	82
CAPÍTULO 3 Caracterização enzimática do complexo celulolítico, hemicelulolítico e pectinolítico da microbiota epifítica de frutos e grãos de café natural.....	89
Resumo.....	90
Abstract.....	91
1 Introdução.....	92
2 Material e métodos.....	94
2.1 Microrganismos.....	94
2.2 Caracterização enzimática de fungos filamentosos, bactérias e leveduras.....	94

2.2.1 Atividade de exo $\beta$ - 1,4 glucanase (EC 3.2.1.91).....	94
2.2.2 Atividade de endo $\beta$ - 1,4 glucanase (EC 3.2.1.4).....	95
2.2.3 Atividade de $\beta$ glicosidase (EC 3.2.1.21).....	96
2.2.4 Determinação da atividade xilanolítica.....	96
2.2.5 Dosagem de proteínas totais.....	97
2.2.6 Determinação da atividade de poligalacturonase (PG).....	97
2.2.7 Determinação da atividade de pectina liase (PL).....	98
2.2.8 Determinação da atividade de proteases.....	98
3 Resultados e discussão.....	99
4 Conclusões.....	122
5 Referências bibliográficas.....	124
<b>CAPÍTULO 4 Incidência de <i>Aspergillus</i> produtores de micotoxinas em frutos e grãos de café (<i>Coffea arabica</i> L).....</b>	<b>129</b>
Resumo.....	130
Abstract.....	131
1 Introdução.....	132
2 Material e métodos.....	136
2.1 Amostras.....	136
2.2 Isolamento e identificação dos fungos.....	136
2.3 Avaliação do Potencial Toxigênico por “Plug” Agar.....	137
3 Resultados e discussão.....	138
4 Conclusões.....	147
5 Referências bibliográficas.....	148
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>152</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>155</b>

## RESUMO

SILVA, Cristina Ferreira. **Sucessão microbiana e caracterização enzimática da microbiota associada aos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.).** Lavras: UFLA, 2004. 156p. (Tese- Doutorado em Ciência dos Alimentos).

O café é um produto agrícola importante para o comércio exportador brasileiro uma vez que o Brasil é o principal produtor desta *commodite*. Vários trabalhos sugerem que a interferência dos microrganismos podem afetar a qualidade do café comprometendo-a e, portanto sua comercialização. Este trabalho teve como objetivo o conhecimento da sucessão ecológica dos microrganismos naturalmente presentes nos frutos e grãos de café processados via seca relacionando fatores bióticos e abióticos que favoreçam ou inibam a colonização, e também o conhecimento do potencial enzimático de bactérias, leveduras e fungos. Os frutos maduros de café apresentaram 67,45% de umidade ao início do processo de fermentação/secagem, e neste momento a população microbiana foi predominantemente de bactérias. Com a perda de umidade no decorrer da secagem bactérias co-existiram com leveduras e fungos, sendo estes predominantes no armazenamento. Espécies de bactérias e leveduras podem interferir na colonização de fungos e conseqüentemente na produção de toxinas. Dentre os fungos, *Aspergillus dimorphicus* uma espécie fúngica isolada pela primeira vez em grãos de café apresentou atividade celulolítica e hemicelulolítica. *Fusarium semitectum* apresentou atividade pectinolítica. As bactérias não apresentaram atividade de poligalacturonase (PG) e apresentaram de pectina liase (PL). As leveduras encontradas apresentaram atividade de PG e PL. Bactérias produtoras de PL e leveduras podem ser as responsáveis pela degradação da polpa e mucilagem em frutos de café natural. A grande diversidade de microrganismos nos frutos aponta para possíveis interações microbianas (competição por substrato, inibição de crescimento e excreção de metabólitos) que se confirmadas poderiam ser utilizadas como alternativas tecnológicas para incremento da qualidade (sensorial e sanitária) da bebida de café.

---

Comitê orientador: Dr<sup>a</sup> Rosane Freitas Schwan- UFLA (Orientador), Dr Eustáquio Souza Dias- UFLA

## ABSTRACT

SILVA, Cristina Ferreira. **Microbial succession and enzymatic characterization of the microbiota associated of fruits and coffee beans (*Coffea arabica* L.)** Lavras: UFLA, 2004. 156p. (Thesis Doctor' degree in Food Science).

Coffee beans is an important agricultural product for the trade Brazilian exporter being Brazil the major producing and exporting of this *commodite*. Several works suggest that the interference of the microorganisms might affect the quality of the coffee compromising it and, therefore its commercialization. The main aim of this work was to establish the ecological succession of the microorganisms naturally presents in the fruits and coffee beans processed and relate the microbial succession with biotic and abiotics factors which favor or inhibit the colonization, and also know the enzymatic potential of bacteria, yeasts and fungi. The coffee beans presented 67,45% of humidity at the beginning of the fermentation/drying process, and at this time the microbial population was predominantly of bacteria. With the decreased of the humidity during the fermentation process bacteria population co-existed with yeasts and fungi, being these last microorganisms predominant ones during the storage. Species of bacteria and yeasts might interfere in the colonization of fungi and consequently in the production of toxins. Among the fungi, *Aspergillus dimorphicus* a species fungal isolated for the first time in coffee beans, presented cellulolytic and hemicellulolytic activity. *Fusarium semitectum* showed high pectinolytic activity. The isolates of bacteria analyzed did not show any polygalacturonase activity (PG), but they presented activity of pectin lyase (PL). The yeasts identified presented activity of PG and PL. Bacteria producing of PL and yeasts may be the responsible for the degradation of the pulp and mucilage in fruits of natural coffee. The great diversity of microorganisms in the fruits appears to form a possible microbial interactions (competition for substratum, growth inhibition and metabolites excretion) which could be used as technological alternatives for increment of the quality (sensorial and sanitary) of the coffee beverage.

---

Guidance Committee: Ds Rosane Freitas Schwan – UFLA, (Major Professor),  
Ds Eustáquio Souza Dias – UFLA

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO GERAL**

# 1 INTRODUÇÃO

O café é um dos produtos agrícolas que têm seu valor de mercado diretamente relacionado com a qualidade, dimensionada por vários fatores, que incluem desde a seleção das variedades de *Coffea arabica* até o método de preparar a bebida do café. Durante o processamento dos frutos de café a microbiota natural e contaminante pode influenciar na qualidade final do produto. Bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos já foram isolados da polpa e dos grãos de café *Coffea arabica* e *C. canephora* em países produtores como Brasil, Índia, Havai, Congo, Argentina, Colômbia, Costa Rica, Etiópia e México. Dos grupos microbianos presentes na polpa de café, os fungos filamentosos têm recebido maior destaque por se acreditar que este grupo interfira na qualidade e segurança (micotoxinas) da bebida de café produzida.

No entanto, estudos realizados no Brasil nos anos de 1998 e 1999 apontaram que leveduras e bactérias podem estar interferindo na perda de qualidade de cafés *Coffea arabica* processados por via seca (atualmente denominados cafés naturais). Este tipo de processamento é executado em grande parte da produção cafeeira brasileira, o que favorece a contaminação e proliferação de microrganismos exterior e interiormente aos frutos e grãos de café. A contaminação microbiana acontece nos frutos ainda na árvore, durante a colheita, na secagem, no beneficiamento e no armazenamento dos grãos verdes. Durante as fases de maturação e processamento ocorrem mudanças químicas e físicas nos grãos de café que podem ser fatores que determinam a seleção de grupos ou espécies microbianas que colonizam a polpa, mucilagem e/ou semente.

Este trabalho foi dividido em capítulos que expressam o estudo realizado com frutos e grãos de café natural seguindo a seguinte ordem:

**Capítulo 1-** Referencial teórico-revisão de literatura a respeito dos microrganismos já identificados em frutos e grãos de café, o possível papel que cada espécie ou grupo microbiano exerce na fermentação dos frutos de café, aspectos ecológicos de espécies microbianas, espécies de fungos toxigênicos e micotoxinas, além da importância da presença de enzimas celulolíticas, xilanolíticas e pectinolíticas na fermentação dos frutos de café.

**Capítulo 2-** Sucessão ecológica e interação microbiana em frutos e grãos de café natural-ênfoca a relação entre as condições microclimáticas dos frutos e grãos de café e a presença de microrganismos em cada etapa de secagem, beneficiamento e armazenamento dos grãos e as possíveis interações microbianas.

**Capítulo 3-** Caracterização enzimática do complexo celulolítico, hemicelulolítico e pectinolítico da microbiota epifítica de frutos e grãos de café natural, incluindo a quantificação de exoenzimas microbianas importantes para a fermentação do café natural.

**Capítulo 4-** Incidência de *Aspergillus* produtores de micotoxinas em frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.) - cita as espécies potencialmente toxigênicas e suas micotoxinas e esclarece que o café não é um bom substrato para a produção de toxinas.

Tendo em vista a carência de estudos da microbiota de frutos e grãos de café preparados através do processo natural, tornaram-se principais objetivos deste trabalho o estabelecimento de uma possível sucessão ecológica e de interações microbianas em frutos de café durante o processo de secagem em terreiro e nos grãos verdes após o beneficiamento e durante o armazenamento, além do conhecimento do potencial enzimático da microbiota isolada dos frutos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

A cultura do café vem sendo explorada comercialmente há mais de dois séculos (Brando, 1999), desde que essa cultura foi trazida da Etiópia e instalada no Vale do Paraíba. A cultura do café é típica de regiões intertropicais, pois necessita de clima quente e úmido ([www.ciagri.usp.br](http://www.ciagri.usp.br)); constitui a cultura permanente mais difundida na faixa tropical, que mais riquezas gerou e que ainda vem contribuindo decisivamente para elevar o nível social de suas populações rurais (Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1987).

A cafeicultura brasileira possibilita a geração de aproximadamente 4,4 milhões de empregos diretos e indiretos na sua cadeia produtiva e arrecadações de impostos importantes para a economia local produtora ao contribuir com 32,41% da exportação mundial (Cafeicultura-[www.revistacafeicultura.com.br](http://www.revistacafeicultura.com.br)). Para que haja a continuidade de lavouras cafeeiras, é necessário produzir e produzir bem, o que significa aumentar a produtividade e melhorar a qualidade.

O Brasil é o principal país produtor e exportador de café, seguido por Colômbia, Vietnã, Indonésia e Costa do Marfim, entre outros (Cafeicultura-[www.revistacafeicultura.com.br](http://www.revistacafeicultura.com.br)). No entanto, o produto brasileiro sofreu queda nas exportações, entre 1961 e 1995, devido ao ingresso de outros países produtores no mercado (acima citados) e o ingresso de cafés robusta no mercado consumidor (Matiello, 2001).

Os frutos de café, após serem colhidos, podem ser processados por via seca ou úmida, tendo como resultado cafés naturais, despulpados e descascados. O tipo de processamento interfere nas características organolépticas da bebida de café. Cafés naturais geralmente fornecem bebidas com acidez moderada, encorpadas e doces devido ao deslocamento de compostos da polpa e mucilagem



para o grão. Já cafés despulpados e descascados fornecem bebidas mais suaves, com maior acidez (Brando, 1999; Vilella et al., 2002).

A grande maioria dos produtores brasileiros utiliza o processamento via seca dos frutos; no entanto, têm em seu produto uma desvalorização comercial em benefício dos cafés despulpados e descascados. Tal desvalorização não é justificável, uma vez que, se a lavoura é bem conduzida e os frutos de café durante e após a colheita forem bem processados, estes se apresentam com características organolépticas desejáveis ao consumidor (acidez, corpo, adstringência). A busca pela valorização dos cafés naturais deve ser entendida como primordial para cafeicultura brasileira, uma vez que a obtenção de cafés de boa qualidade neste tipo de processamento exige maiores cuidados no manuseio dos frutos pós-colheita.

A qualidade e a segurança da bebida de café são conseguidas nos dois tipos de processamento (seco e úmido) se forem utilizadas boas práticas agrícolas dos tratos culturais até o armazenamento dos grãos verdes (Brando, 1999).

Estudos sobre a ecologia de grãos armazenados já foram realizados para milho e trigo (Sinha, 1979) e alguns dados de fatores abióticos e bióticos podem ser extrapolados, mesmo que teoricamente, para grãos de café, já que cada estudo de sucessão é único dependendo do substrato e do ambiente (Frankland, 1998). A contaminação microbiana é influenciada principalmente por variáveis químicas, físicas, bióticas e pela interferência do homem. Dentre estas variáveis, o clima parece ser o que mais afeta a possibilidade de colonização dos grãos. Diretamente afeta a qualidade da semente e indiretamente, influencia as condições da colheita e estocagem. A substituição da população microbiana (sucessão) é influenciada pela brusca redução do nível de umidade do ambiente intragranular devido ao processo de secagem (Sinha, 1979).

O café (despolpado ou natural), assim como outros vegetais, apresenta uma microbiota epifítica que pode iniciar a fermentação (Nout & Rombouts, 1992). Esta microbiota é diversa, apresentando leveduras, fungos filamentosos e bactérias (Silva et al., 2000), que encontrando condições favoráveis para se desenvolverem, infectam os frutos e grãos. Estes microrganismos, em seu desenvolvimento, podem produzir enzimas que, agindo sobre os componentes da mucilagem, principalmente os açúcares, podem induzir a formação de álcoois e ácidos, como, por exemplo, ácido acético, láctico, butírico e outros ácidos carboxílicos superiores. A produção de ácido butírico e propiônico durante o processamento do café prejudica a qualidade final da bebida (Amorim & Amorim, 1977) devido ao sabor de cebola (Monaco, 1961). Estes compostos são produzidos em condições favoráveis de anaerobiose quando os grãos são amontoados. Esta produção de ácido butírico talvez esteja mais relacionada com bactérias e leveduras do que com fungos filamentosos, os quais, em geral, são aeróbicos (Bitancourt, 1957). Outros ácidos presentes no café, como málico e cítrico, são responsáveis por uma acidez desejável, pois proporcionam sabor ácido característico e desejável ao produto (Sivetz, 1963).

Um sério problema ligado aos cafés naturais é a contaminação variada pelos microrganismos. Como a secagem se processa mais lentamente em virtude das camadas do pericarpo do fruto, este fica úmido por mais tempo, aumentando o período durante o qual os microrganismos podem se desenvolver. Um outro fator que agrava essa situação é que as camadas do pericarpo dos frutos constituem um meio muito mais favorável ao desenvolvimento dos microrganismos do que o pergaminho dos grãos despolpados, devido ao alto conteúdo de açúcares, tornando a proteção do café contra tal risco mais difícil.

## 2.1 Fungos filamentosos

A microbiota dos cafés despulpado e natural é bastante variada e sua atuação pode estar diretamente relacionada a alguns sabores e aromas que alteram as características peculiares do produto (Bitancourt, 1957). O grupo de microrganismos mais citado na literatura, quanto à relação entre microrganismos e qualidade da bebida de café, é o de fungos filamentosos, havendo ainda poucos trabalhos sobre fungos leveduriformes e bactérias. Bitancourt (1957), analisando cafés em diferentes fases do preparo, no cafezal e no terreiro de secagem, isolou fungos filamentosos, sendo os mais abundantes: *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, *Colletotrichum coffeanum* (Zinn) Noack, *Fusarium* sp. e bolores verdes (*Penicillium* spp.). Também foram identificados: *Aspergillus niger* v. Tiegh, no café seco no terreiro, e *Cladosporium*, que foi encontrado até o estádio seco no pé e não no terreiro durante a secagem, como normalmente ocorre com outros fungos.

Trabalhos realizados no Brasil por Carvalho et al. (1989) e Meirelles (1990) demonstraram uma elevada taxa de contaminação microbiana nos cafés de pior qualidade (classificados como Rio e Riado). Foi também constatado que, nestes cafés, a umidade dos grãos beneficiados se achava em teores superiores a 10%, valor este, segundo Moreau (1979), favorável ao desenvolvimento de *Aspergillus flavus*, produtor de aflatoxinas, e *A. niger*. Partindo da hipótese de serem os microrganismos responsáveis pela origem dos cafés duros, Krug (1940a) comparou fungos filamentosos isolados de café cereja, seco no pé e seco no chão, mostrando 0% de fungos para o cereja, 15% para o seco no pé e 21% para o seco no chão. Krug (1940b) verificou uma relação entre microrganismos e sabor da bebida. Foi observado que os cafés que apresentam qualidade inferior de bebida apresentaram uma colonização microbiana de fungos filamentosos mais intensa, principalmente referente à contaminação por espécies do gênero *Fusarium*. Em pesquisa sobre a diversidade microbiana em café natural da

região Sul de Minas Gerais, Silva et al. (2000) observaram a ocorrência de fungos filamentosos desde o estágio cereja até frutos secos no terreiro e constataram que bebida classificada como Riada apresentou maiores incidências de fungos do que de bactérias. Cafés classificados como Mole apresentaram contaminação fúngica de 9,28%, sendo 3,38% de *Fusarium* sp; cafés Apenas Mole apresentaram um total de 23,40%, sendo 11,04% de *Fusarium* sp; café Duro, 44,9%, sendo 23% de *Fusarium* sp, e cafés Rio, um total de 54,5% de microrganismos, sendo 34,5% de *Fusarium* sp. Ainda neste trabalho ficou estabelecido que cafés de bebida de pior qualidade (Riada) apresentaram maiores contaminações de leveduras e cafés classificados como Estritamente Mole apresentaram maior colonização por bactérias.

Carvalho et al. (1989), estudando a relação entre classificação do café pela prova de xícara e composição físico-química, química e microbiota presente no grão beneficiado, concluíram que as amostras de café classificadas como de bebida Mole e Dura apresentaram índices de contaminação de *Fusarium roseum*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus flavus* acentuadamente menores que os cafés classificados como de bebida Riada e Rio. Por outro lado, apresentaram índices igualmente elevados dos fungos *Fusarium* sp e *Penicillium* sp. O fungo do gênero *Cladosporium* predominou nos cafés classificados como de bebida Mole e Dura, ou seja, a presença dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* em frutos e grãos associa-se a cafés de qualidade inferior à daqueles em que *Cladosporium* foi isolado.

A colonização dos frutos e grãos de café pelos microrganismos pode ser associada a insetos, principalmente as pragas. A broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) é considerada a principal praga do cafeeiro, atacando os frutos em qualquer estágio de maturação, desde verdes até maduros ou secos, causando perda de peso no café beneficiado, perda de qualidade na classificação por tipo, apodrecimento de sementes em frutos broqueados e outros (Souza & Reis,

1997). Vega & Mercadier (1998) observaram que a broca-do-café funcionou como vetor para a proliferação de fungos toxigênicos como *Aspergillus ochraceus*.

Assim, dentro do programa de “Análise dos Perigos em Pontos Críticos de Controle”, o combate às pragas que atingem principalmente os frutos torna-se fator essencial para a melhoria ou manutenção da qualidade (sensorial e sanitária) da bebida de café.

Os principais gêneros relatados de fungos filamentosos isolados de grãos de café nos diferentes estádios de maturação, processamento e beneficiamento são: *Alternaria* (Mislivec et al., 1983), *Aspergillus* (Bitancourt, 1957; Wosiacki, 1977; Mislivec et al., 1983; Daivasikamani & Kanan, 1986; Carvalho et al., 1989; Meirelles, 1990; Amorim & Melo, 1991; Alves, 1996; Silva et al., 2000; Batista et al., 2001), *Cercospora* (Alves, 1996), *Colletotrichum* (Bitancourt, 1957; Teixeira et al., 1977; Wosiacki, 1977), *Epicoccum* (Bitancourt, 1957; Teixeira et al., 1977), *Fusarium* (Krug, 1940; Bitancourt, 1957; Gordon, 1960; Teixeira et al., 1977; Wosiacki, 1977; Carvalho et al., 1989; Meirelles, 1990; Chalfoun et al., 1992; Roussos et al., 1995; Alves, 1996; Silva et al., 2000), *Mucor* (Daivasikamani & Kanan, 1986; Alves, 1996), *Penicillium* (Bitancourt, 1957; Calle, 1957; Wosiacki, 1977; Teixeira et al., 1977; Mislivec et al., 1983; Daivasikamani & Kanan, 1986; Carvalho et al., 1989; Meirelles, 1990; Chalfoun et al., 1992; Roussos, 1995; Alves, 1996; Silva et al., 2000; Batista et al., 2001) *Phoma* (Alves, 1996), *Phomopsis* (Bitancourt, 1957), *Trichoderma* (Daivasikamani & Kanan, 1986; Roussos et al., 1995).

A importância da identificação de espécies de fungos filamentosos em frutos de café, a fim de se conhecerem a biologia e ecologia de cada espécie, foi salientada no trabalho de Silva et al. (2000), que isolaram e identificaram *Penicillium crustosum*, *P. restrictum*, *P. implicatum*, *P. citrinum*, *Fusarium*

*stilboides*, *F. semitectum* e *Aspergillus niger* da superfície de frutos de café coletados em quatorze cidades da região Sul de Minas Gerais.

A incidência destes fungos filamentosos parece indicar um estabelecimento de sucessão ecológica nos frutos de café, já que o isolamento destes microrganismos foi realizado em frutos em diferentes estádios de maturação e, conseqüentemente, diferentes teores de umidade. Isolados do gênero *Penicillium* foram obtidos principalmente de frutos cereja; já *Aspergillus* foi isolado em frutos com menores teores de umidade devido ao processo de secagem, como por exemplo, frutos secos no pé e no terreiro de secagem. *Fusarium semitectum* e *F. stilboides* foram isolados de frutos cereja, passa, secos no pé ou em terreiro, sendo justificado sua ampla incidência devido ao ataque destes patógenos aos frutos imaturos e cerejas (Booth, 1971).

Batista et al. (2001) trabalharam também na região Sul de Minas Gerais, com a identificação de espécies toxigênicas de *Aspergillus* em grãos armazenados, entre os quais mereceram destaque as espécies *A. ochraceus*, *A. flavus*, *A. sulphureus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *A. sydowii*, *A. ostianus* e seus teleomorfos *Eurotium amstelodami* e *E. chevalieri*, por sua alta incidência nos grãos e possível capacidade de produção de micotoxinas.

Alguns trabalhos de pesquisa que visaram à detecção de micotoxinas em grãos beneficiados de café e relataram as espécies de fungos filamentosos que provavelmente estariam relacionados com a produção de substâncias toxigênicas estão descritos na Tabela 1.

**TABELA 1** Espécies de fungos filamentosos potencialmente toxigênicos

AUTORES	ESPÉCIES
Mislivec et al. (1983)	<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>A. tamarisii</i> ; <i>A. ochraceus</i> ; <i>A. wentii</i> ; <i>A. versicolor</i> ; <i>Cladosporium herbarum</i> ; <i>Fusarium stilboides</i> ; <i>Penicillium chrysogenum</i> ; <i>P. viridicatum</i> ; <i>P. islandicum</i>
Abdel- Hafez & El Maghraby (1992)	<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>A. fumigatus</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>A. parasiticus</i> ; <i>A. sydowii</i> ; <i>A. tamarisii</i> ; <i>A. terreus</i> ; <i>Cladosporium cladosporioides</i> ; <i>C. herbarum</i> ; <i>C. macrocarpum</i> ; <i>Fusarium oxysporum</i> ; <i>Penicillium albidum</i> ; <i>P. brevicompactum</i> ; <i>P. chrysogenum</i> ; <i>P. citrinum</i> ; <i>P. cyclopium</i> ; <i>P. funiculosum</i> ; <i>P. jensenii</i>
Liardon et al. (1992)	<i>Aspergillus fumigatus</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>Fusarium graminearum</i> ; <i>Penicillium granulatum</i>
Batista et al. (2001)	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. sydowii</i> , <i>A. ostianus</i> , <i>Eurotium amstelodami</i> e <i>E. chevalieri</i>

A preocupação sobre a qualidade e segurança do café brasileiro é respaldada pelos limites máximos de ingestão permitidos, impostos pelos países consumidores de café. Atualmente o maior risco para a segurança do café concentra-se na presença de Ocratoxina A (Chalfoun & Batista, 2002).

A importância que se tem dado à incidência de fungos filamentosos potencialmente produtores de toxinas deve ser cautelosa. Batista (2000), em trabalho com grãos beneficiados da região Sul de Minas Gerais, detectou a presença de fungos toxigênicos em 45% das amostras analisadas, mas em nenhuma destas amostras foi detectada a Ocratoxina A. Esta constatação indicou que a presença de fungos potencialmente toxigênicos não é indicativo da contaminação de grãos de café por micotoxinas. Em 12,5% das amostras contaminadas pela Ocratoxina A, a análise quantitativa revelou que os níveis encontrados representaram 6,12% do consumo diário permitido pelo JECFA (Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives), mostrando que os grãos de café de boa qualidade não são os responsáveis pela maior fonte desta toxina na dieta humana

### **2.1.1 Micotoxinas**

Somente nos últimos trinta anos relacionou-se a contaminação dos alimentos com a presença de toxinas, conhecidas como micotoxinas. As micotoxinas são metabólitos secundários, assim como os antibióticos, e parecem não estar envolvidas com o crescimento dos fungos. Apresentam grande variedade na estrutura química, tanto quanto os vários sintomas relacionados a elas (Pitt, 2000).

Estas toxinas causaram grande mortalidade, provocando lesões nefrotóxicas, hepatóxicas, teratogênicas e talvez carcinogênicas (Pitt, 2000). Além disso, as micotoxinas podem assumir papéis de cocarcinogênicas juntamente com vírus da hepatite B. As micotoxinas apresentam quatro tipos



básicos de toxicidade: aguda, crônica, mutagênica e teratogênica. O efeito mais comum é a desordem das funções renais e hepáticas, podendo levar o indivíduo à morte (Scussel, 1998).

A maioria dos casos de detecção das micotoxinas acontece em cereais, como milho, soja, trigo e amendoim, os quais são bons substratos para o desenvolvimento de fungos e produção destas toxinas (Scussel, 1998). Assim, o hábito alimentar influi no maior número de casos de toxinfecções alimentares causados por alimentos contaminados. É o que acontece em países da Europa, onde o hábito do consumo de cereais é elevado se comparado com outros continentes.

Conseqüentemente, há crescente número de países europeus estabelecendo limites máximos toleráveis de ingestão diária de toxinas para alguns alimentos, incluindo o café. Há uma tendência de maior exigência com os produtos que importam em relação aos que produzem. Por isso, é cada vez mais necessário o estabelecimento de normas técnicas, durante a produção dos grãos, que visem à melhoria da qualidade sensorial do café brasileiro, como também a segurança microbiológica e química do nosso café.

De acordo com Mantle & Chow (2000), grãos de café não são bons substratos para a produção de ocratoxinas devido à sua composição química. Esta observação também foi relatada por Bucheli & Taniwaki (2002) que constataram que o teor de umidade dos grãos durante o armazenamento inferiores a 14%, equivalendo a  $a_w$  de 0,8, reduziram a produção de ocratoxina. Soliman (2002) relatou a inibição da produção de aflatoxina em meio de cultura sintético contendo níveis de 1 e 2 % de cafeína, pois este composto interferiu também no crescimento micelial nos primeiros quinze dias de colonização.

É importante ressaltar que a presença do fungo toxigênico não indica a produção da toxina, como foi constatado por Batista et al. (2001). A atividade de água necessária para o *Aspergillus ochraceus* colonizar o substrato varia de 0,77

a 0,8, que é diferente do teor de água exigido para produção da toxina, que não ocorre a aw inferior a 0,83. Isto explica que a presença do fungo não significa a contaminação dos grãos pelas micotoxinas (Pitt et al., 2000). Em se tratando de um metabólito secundário, as micotoxinas serão ativamente produzidas durante a fase estacionária e parecem estar associadas a alguma diferenciação morfológica (Moss, 1996).

Os três gêneros mais associados à contaminação de alimentos são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Este último coloniza e produz toxinas antes ou imediatamente após a colheita, diferentemente de *Aspergillus* e *Penicillium*, que são mais encontrados em alimentos durante o processo de secagem e armazenamento, sendo detectado uma invasão interna nos grãos de café (Pitt et al., 2000; Mislivec et al., 1983). Estes gêneros produzem as cinco principais micotoxinas que afetam a saúde humana e animal: as aflatoxinas (comumente encontradas em amendoim, milho, nozes, ervilha), as ocratoxinas (milho, feijão, café, arroz, superfície de presuntos e pimentões), a fumonisina (milho), os tricotecenos (milho, ração animal) e a zearalenona (sorgo, trigo, rações a base de milho), sendo a aflatoxina e a Ocratoxina A as mais encontradas em café (Scussel, 1998).

As aflatoxinas e as ocratoxinas são as toxinas mais estudadas, tanto quanto ao grau de toxicidade quanto às melhores condições de produção pelos fungos (Scussel, 1998; Pitt et al., 2000). São detectadas com certa facilidade em grãos armazenados, nos quais podem ter ocorrido falhas no processamento (alto conteúdo de umidade nos grãos; injúrias dos grãos, temperatura e umidades inadequadas de armazenamento; embalagens permeáveis, etc), facilitando o crescimento e produção das toxinas pelos fungos de armazenamento, principalmente dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Scussel, 1998; Silva Jr, 1997).

As aflatoxinas apresentam efeito tanto agudo quanto crônico, principalmente no fígado (cirrose), além da indução de tumores e efeitos teratogênicos. Naturalmente há quatro tipos ( B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> ), que podem ser diferenciadas em cromatografia de camada delgada após revelação sob luz UV (Scussel, 1998). A dose letal de aflatoxina para humanos encontra-se na faixa de 10-20 mg, que pode ser mais crítica em indivíduo com baixa resistência imunológica e carências nutricionais (Pitt, 2000). A contaminação humana pode ocorrer diretamente, com a ingestão do alimento contaminado, ou indiretamente, através da ingestão de ovos, carnes e leites contaminados pela ingestão de ração contaminada pelos animais (Scussel, 1998).

Os principais fungos produtores desta toxina são *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, tendo a primeira espécie ampla distribuição geográfica (Pitt et al., 2000), os quais são facilmente isolados de amendoim, milho e semente de algodão (Pitt, 2000), em frutos secos (Samson et al., 2000), em grãos de café beneficiados (Batista et al., 2001; Batista , 2000) e em frutos de café natural durante o período de secagem (com 29,97% de umidade) e armazenados (Silva et al., 2003) da região Sul de Minas Gerais. Nestes trabalhos realizados com grãos de café da região produtora de Minas Gerais, constatou-se a produção de aflatoxinas nos meios de cultura que induzem a produção de toxinas, não podendo, no entanto, estes resultados serem extrapolados para a presença da toxina nos grãos de café.

A micotoxina mais comum em grãos de café, mas em pequenas quantidades, é a Ocratoxina A. Aflatoxinas e esterigmatocistina são as menos freqüentes em café (Naidu, 1996). A reduzida freqüência de aflatoxinas em café reforça a idéia de que esta micotoxina não representa perigo de micotoxicose oriunda de grãos de café.

A ocratoxina têm tido grande atenção mundial devido ao perigo atribuído a ela na saúde animal e humana (Pitt et al., 2000), principalmente a

Ocratoxina A (OTA), metabólico de certos fungos, principalmente dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Originalmente a OTA foi descrita como um metabólito de *A. ochraceus* isolado de frutos e vegetação secos e grãos de café verdes (Pitt, 2000; Heilmann et al., 1999; Scussel, 1998; Mislivec et al., 1983). Sabe-se hoje que esta toxina também pode ser produzida e excretada por *P. verrucosum* e *A. carbonariu*, que também podem ser fonte de OTA em café.

Esta toxina atua principalmente nos rins, causando nefropatia, além de um ataque secundário no fígado (Scussel, 1998). Por ser solúvel em gordura, ela se acumula nas células de gordura de animais e a contaminação no homem pode ser feita pela ingestão da carne deste animal. Outras fontes de ocratoxina são o milho e o trigo, detectando-se valores de 35µg /kg no sangue humano de europeus (Pitt, 2000).

O café faz parte da dieta humana em vários países do mundo e têm sido encontrados nestes grãos níveis de 0.2- 109 µg /kg de OTA (Taniwaki et al., 2003). Sabe-se que a torração dos grãos destrói parte da concentração desta toxina, chegando à eliminação de 84% (Blanc et al., 1998), assim, parece que o café não é a principal fonte de OTA na dieta humana.

Espécies do gênero *Fusarium* são os principais responsáveis pela presença de fumonisinas, zearalenona e tricotecenos nos alimentos e rações (Scussel, 1998). Não há relato da detecção destas toxinas nos grãos de café.

A qualidade e a segurança do café são duas características que necessariamente estão correlacionadas, sendo que a segurança alimentar é a primeira condição para que o café possa ser comercializado e a qualidade irá acrescentar valores e tornar o produto mais competitivo (Chalfoun & Batista, 2002). A presença de fungos filamentosos, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, parece coincidir com a queda da qualidade do café. Poisson et al. (1976) e Liardon et al. (1989) relatam a alta incidência de fungos na superfície dos grãos crus em bebidas classificadas como "Rio" (pior

qualidade). O ataque nos frutos pelos fungos afeta o metabolismo da planta, induzindo a produção de compostos fenólicos (Amorim et al., 1973). A injúria permite o contato entre a polifenoloxidase e os ácidos clorogênicos, oxidando-os. Esta reação química modifica a composição química original do café e, em consequência, as propriedades organolépticas das infusões preparadas com este tipo de café (Amorim, 1978 citado por Pimenta et al., 1997).

Pelos estudos até hoje realizados, fica evidente que o crescimento de fungos e a produção de toxinas são o resultado da interação do fungo-hospedeiro e ambiente. A combinação apropriada destes fatores determina a quantidade de colonização do substrato e o tipo e a quantidade de micotoxina produzida (Pitt et al., 2000).

Deste modo, deve-se estabelecer, no cultivo, na colheita e na fase pós-colheita dos frutos de café, programas de Boas Práticas Culturais (BPM's) e Boas Práticas de Manejo (BPM's) como pré-requisitos para a implantação de técnicas de prevenção da contaminação e desenvolvimento dos fungos. Tal prevenção pode ser realizado através da implantação de um sistema de gestão de qualidade, o APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle).

Em se tratando da cultura do café, os pontos críticos (estes definidos como locais ou situações onde podem estar os perigos de contaminação, sobrevivência e multiplicação dos microrganismos) ainda estão sendo estabelecidos; no entanto, deve-se considerar o tipo de processamento dos frutos de café. Le Bars & Le Bars (1999) inferiram sobre três possíveis períodos para a infecção pelos fungos e toxigênese. O primeiro período refere-se à lavoura. No campo devem-se evitar injúrias nos frutos (mecânica ou biológicas), que provocam lesões e permitem o acesso ao interior dos grãos pelos fungos toxigênicos.

O segundo período parece ser o mais crítico, que é o período da colheita. A maturidade dos frutos na colheita determina o risco de lesões e as

conseqüentes contaminações pelos microrganismos. O período após a colheita até a chegada dos frutos no terreiro de secagem deve ser o mais breve possível e a secagem deve ser eficaz para minimizar os efeitos da temperatura, tempo de duração e umidade, podendo ser executado até uma redução do conteúdo de umidade a 20 % até se obter um grau de umidade seguro para o armazenamento.

O terceiro e último período compreende a estocagem dos grãos. Neste período o equilíbrio entre a umidade relativa do ambiente e o conteúdo de água interfere na inibição ou favorecimento do desenvolvimento fúngico. Este equilíbrio deve ser considerado para cada espécie fúngica.

## **2.2 Leveduras e bactérias**

Diferentemente dos fungos filamentosos, leveduras e bactérias só foram isoladas de frutos de café natural a partir de 1958, com o trabalho de Vaugh. Neste experimento, o autor relata a prevalência de bactérias sobre as leveduras. A maioria dos trabalhos sobre a microbiota do café enfatizando o isolamento, identificação e papel de bactérias e leveduras trata de cafés processados via úmida (despolpados), como descrito nos trabalhos de Van Pee & Castelein (1971) e Agate & Bhat (1966).

A presença de leveduras durante o processamento via úmida de café foi constatada por alguns autores (Daivasikamani & Kannan, 1986; Van Pee & Castelein, 1971) em cafés robusta. Roussos et al. (1995), quantificando microrganismos em cafés processados via úmida e seca, observaram a ausência de leveduras nos cafés despolpados. Entretanto, poucos autores referem-se à contribuição destes microrganismos na qualidade do café e outros nem mesmo identificaram os isolados quanto à espécie.

Bitancourt (1957) verificou que no café seco do terreiro, 55% dos frutos apresentaram populações de leveduras. Agate & Bhat (1966) isolaram leveduras

produtoras de pectinases durante a fermentação de café processado via úmida e identificaram *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* sp, *Saccharomyces marxianus* [*Kluyveromyces marxianus* (EC Hansen) van der Walt (1971)], *S. bayanus*, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* e atribuíram a ação das pectinases sobre a pectina da polpa do café à atividade microbiana leveduriforme. Van Pee & Castelein (1971) identificaram leveduras do gênero *Candida*, sendo *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* na superfície e mucilagem dos grãos; *C. parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis famata* [*Candida famata* (Harrison) S.A. Meyer & Yarrow (Yarrow and Meyer 1978)], *Saccharomyces marxianus* [*Kluyveromyces marxianus* (EC Hansen) van der Walt (1971)], *Candida tropicalis*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Candida pelliculosa* na superfície dos grãos. Em 1972, Van Pee & Castelein isolaram microrganismos durante o amadurecimento e beneficiamento de café no Congo e encontraram uma microbiota variada, com grande porcentagem de Enterobacteriaceae e algumas leveduras. Daivasikamani & Kannan (1986) citaram a ocorrência de leveduras de coloração rosa em cafés robusta até o quinto dia de incubação.

Segundo Avallone et al. (2001a), as leveduras presentes podem ser as responsáveis pela produção de etanol quando cafés despulpados são super fermentados, mas não atribuem às leveduras a responsabilidade pela degradação da mucilagem de frutos de café. Esta conclusão foi baseada na incapacidade de crescimento das leveduras em meio sintético contendo somente pectina como fonte de carbono. É importante salientar que leveduras não utilizam pectina como fonte de carbono, comprometendo a conclusão dos autores sobre a não participação de leveduras na degradação da mucilagem.

Silva et al. (2000) identificaram 24 espécies de leveduras epifíticas de frutos de café processados via seca do total de 107 isolados. Os gêneros *Pichia*, *Cândida* e *Arxula* foram os mais encontrados, com tendência a aparecerem em frutos secos e fermentados. As espécies identificadas por Silva et al. (2000) da

superfície dos frutos de café foram *Arxula adenivorans*, *Blastobotrys proliferans*, *Candida auringiensis*, *C. glucosophila*, *C. incommunis*, *C. paludigena*, *C. schatarii*, *C. vartiovaarae*, *Citeromyces matritensis*, *Geotrichum fermentans*, *Pichia acaciae*, *P. anomala*, *P. ciferii*, *P. jadinii*, *P. lynferdii*; *P. ofunaensis*, *P. sydowiorum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycopsis fermentans*, *S. fibuligera*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Sporopachydermia cereana*, *Trichosporonoides oedocephales* e *Williopsis saturnus* var. *sargentensis*. Estas leveduras são frequentemente isoladas de solo, frutos e dejetos de insetos, mas a associação com a maturação e processamento do café ainda não foi esclarecida.

Um estudo da decomposição natural do resíduo de café e da polpa, de origem do processamento via úmida, que são materiais muito comuns com os do processamento seco, originou isolados identificados como *Rhodotorula*, *Candida* e *Saccharomyces* (Blandón et al., 1998).

Tendo como base trabalhos mais recentes (Avallone et al., 2001a; Avallone et al., 2001b), verifica-se que o papel das leveduras ainda é contraditório, mesmo no processamento via úmida, e ainda não há qualquer inferência sobre o papel destes microrganismos na fermentação do café natural.

Assim como as leveduras, a microbiota bacteriana está presente nos frutos de café, sem, no entanto, conhecermos sua ação fermentativa na qualidade da bebida de café natural.

Em amostras de café da Colômbia e México, Pederson & Breed (1946) isolaram fungos e bactérias dos tipos cocos e bastonetes microaerofílicos, como *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* e *Streptococcus faecalis*, as quais estariam atuando na lise da mucilagem, porém não no seu desprendimento.

Frank et al. (1965) encontraram, em seus isolados, domínio de bactérias e de poucas leveduras, não identificadas, porém, segundo os autores, as



bactérias não seriam capazes de degradar a mucilagem dos grãos. Agate & Bhat (1966) isolaram bactérias de cafés despulpados, identificadas como *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Proteus*, porém não avaliaram a capacidade pectinolítica destas bactérias. Vaughn et al. (1958) isolaram *Erwinia dissolvens* de café natural (reclassificada atualmente como *Enterobacter dissolvens* (Rosen) por Brenner et al. (1986), segundo The Prokaryotes (Balows et al., 1992)) e demonstraram a capacidade pectinolítica de degradação da mucilagem dos grãos de café por esta bactéria.

No entanto, Rose (1982) e Agate & Bhat (1966) afirmaram que bactérias predominantes no café são pectinolíticas, Gram negativas, não formadoras de esporos e fermentadoras de lactose. Jones & Jones (1984) argumentaram que caracterizar as bactérias predominantes pela fermentação de lactose torna os dados confusos, pois este dissacarídeo não está presente na composição química dos grãos de café. Avallone et al. (2001a) detectaram, em meio de pectina, bactérias Gram negativas, *Erwinia* e *Klebsiella*, que foram caracterizadas pela baixa capacidade pectinolítica.

Roussos et al. (1995) encontraram elevadas contagens de bactérias, em torno de 94 a 98% da população total, tanto nos cafés despulpados quanto nos naturais. A justificativa da maior presença de bactérias em relação a leveduras e fungos filamentosos é a exposição da polpa à atmosfera durante o período de secagem. Bactérias lácticas só foram isoladas em cafés despulpados e foram totalmente ausentes em café natural. A microbiota isolada por estes autores foi capaz de crescer melhor em meio contendo celulose do que em meios seletivos contendo amido, pectinas e polpa de café. O meio contendo polpa de café apresentou o menor crescimento da microbiota, talvez pela presença de componentes da polpa que inibem o crescimento microbiano. Avallone et al. (2002) constataram que durante a fermentação por via úmida de frutos de café houve um predomínio de bactérias, *Erwinia herbicola* e *Klebsiella pneumoniae*,

produtoras de pectato liase, e portanto não capazes de de-esterificar a pectina da mucilagem dos frutos de café; bactérias produtoras de poligalacturonase foram raramente isoladas. Os autores concluíram, assim, que a degradação da mucilagem em fermentação do café via úmida ocorreu em consequência da baixa do pH durante o processo. Em café natural, a presença de bactérias Gram negativas e positivas foi detectada e identificada por Silva et al. (2000). Os gêneros mais incidentes foram *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Lactobacillus* e *Bacillus*, os quais não apresentaram atividade pectinolítica.

Avallone et al. (2001a) concluíram que, em cafés despulpados, a fermentação da polpa e, conseqüentemente, utilização de açúcares simples foram realizadas pela microbiota total (leveduras, Enterobacteriaceas) e não por microrganismos pectinolíticos, como, por exemplo, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter dissolvens* e *E. herbicola*, que apresentaram produção de pectato liase incapaz de despolimerizar a pectina altamente metilada presente na polpa de café. Durante o consumo de açúcares simples, baixos níveis de ácidos orgânicos e etanol foram produzidos, destacando-se principalmente o ácido láctico. Decréscimo na produção de ácido láctico também foi observado quando há fermentação prolongada dos frutos de café (Lopez et al., 1989).

Variações na microbiota e sua interferência na degradação da polpa e mucilagem e qualidade da bebida de café podem estar associadas à composição diferente do mesocarpo (mucilagem) e ao tipo de processamento dos frutos de café. As diferenças no tipo de pectinases produzidas pelos organismos podem afetar o grau de despolimerização dos componentes da pectina, que poderiam, então, influenciar a seleção do grupo de microrganismos dominante (Jones & Jones, 1984). É, portanto, necessário o conhecimento da microbiota epifítica e endofítica dos frutos e grãos de café, assim como o acompanhamento das

alterações na composição química dos frutos durante a fermentação, tanto nos cafés naturais quanto despolpados.

Todos os trabalhos realizados sobre a composição e fermentação do café enfocam que a composição química da polpa e da mucilagem é ideal para a colonização por fungos, bactérias e leveduras. Para os cafés despolpados há maior número de trabalhos do que para cafés naturais, com o objetivo de conhecimento do papel de cada microrganismo na qualidade e segurança desta *commodite*. No entanto, há aparente contradição referente aos trabalhos realizados antes de 2001 e os publicados por Avallone e colaboradores. Anteriormente acreditava-se na degradação da pectina por bactérias e leveduras em cafés despolpados. Porém, a análise microscópica realizada por Avallone et al. (2001a) revelou que o tecido da mucilagem permanece intacto após a fermentação, assim como as substâncias pécticas da parede celular, pois a pectato liase excretada pelos microrganismos é incapaz de degradar a pectina altamente metilada. O conteúdo de açúcares simples presentes na polpa e mucilagem permite o crescimento dos microrganismos, sem, no entanto, ser necessária a utilização das substâncias pécticas. A degradação da mucilagem se daria pela queda no valor do pH resultante de produtos metabólitos microbianos.

### **2.3 Sucessão ecológica e interação microbiana**

A sucessão ecológica pode ser definida como sendo uma mudança direcionada na composição, abundância relativa e espacial de espécies que compreendem uma comunidade. Em se tratando de sucessão fúngica, é mais precisamente definida como sendo a ocupação seqüencial do mesmo local por micélios de diferentes fungos ou de diferentes associações de fungos (Frankland, 1998).

A fermentação em substrato sólido é realizada por microrganismos naturalmente presentes ou a ele inseridos. Em fermentação natural a microbiota

presente altera as características organolépticas e nutricionais, além de proporcionar a inibição da produção de compostos tóxicos como aflatoxinas, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono e etanol (Giraffa, in press).

A fermentação de frutos de café pelo processamento natural consiste de uma fermentação em estado sólido sem o acréscimo de microrganismos. Assim, a compreensão das sucessivas colonizações por bactérias, leveduras e fungos filamentosos é importante, uma vez que a microbiota de produtos agrícolas brutos é imprevisível (Giraffa, in press).

Sinhá (1979) afirmou que a microbiota de grãos faz parte de um ecossistema classificado como imaturo devido à forte instabilidade com distúrbio ambiental, alta flutuação nos indivíduos e espécies, com o controle populacional realizado principalmente por fatores abióticos.

Para a colonização dos substratos, dois fatores extrínsecos contribuem para o crescimento de microrganismos, a temperatura e a atividade de água (Moss, 2000). As condições atmosféricas locais e o grau de umidade dos frutos de café durante o período de secagem influem no tempo de permanência destes nos terreiros de secagem e, conseqüentemente, na maior ou menor exposição dos frutos a microrganismos.

Em literatura já há a descrição de fatores bióticos (lesões pré-colheita, ácaros, broca-do-café) e abióticos (injúrias causadas pelo insolação, frio) que influenciam o estabelecimento de grupos de microrganismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos) em frutos e grãos de café durante todo o processo do café natural.

O substrato café apresenta alta diversidade de espécies microbianas (Silva et al., 2000); acredita-se que durante o processo de secagem dos frutos de café (isto é, fermentação) haja mudanças na estrutura física dos frutos. Isto afetaria a colonização pelos microrganismos, a qual estaria dependente, também, das condições atmosféricas locais (umidade, temperatura), da genética de cada

espécie microbiana, capaz de secretar enzimas extracelulares, de sintetizar compostos que possam lhes conferir proteção contra a ação antimicrobiana de espécies antagonicas ou de se desenvolver sobre um substrato em constantes alterações, como mudança de pH, teor de açúcares e umidade.

Segundo Frankland (1998), cada sucessão microbiana é única porque depende da planta e do ambiente. Em frutos de café não foi estabelecida uma sucessão ecológica exata em relação a leveduras e bactérias, mas a partir de isolamentos de bactérias, leveduras e fungos filamentosos realizados por Silva et al. (2000) foi constatada a presença de bactérias no estádio cereja a seco em terreiro, enquanto leveduras foram isoladas nos estádios de passa a seco em terreiro e fungos filamentosos apresentaram distribuição de cereja a seco em terreiro.

A maioria dos trabalhos com enfoque na interação microbiana tem relacionado somente interações entre espécies de fungos filamentosos, pois estes microrganismos colonizam grãos comercializados para a alimentação humana e animal.

Em frutos e grãos de café, assim como para outros grãos comercialmente armazenados (por exemplo, milho), as interações fúngicas estão associadas principalmente à capacidade de colonização, que é influenciada pelas variações de atividade de água e temperatura (Magan & Lacey, 1988). *Cladosporium* e *Fusarium* geralmente estão associados a frutos de café com maiores teores de umidade, ou seja, frutos cereja no pé ou frutos recém colhidos (Chalfoun & Carvalho, 1989). Espécies xerofílicas, como as dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, estariam associadas a frutos com atividade de água inferior a 0,8, e principalmente a grãos verdes de café armazenados (Chalfoun & Carvalho, 1989) gerando preocupações com a produção de micotoxinas, se umidade e temperatura seguras de armazenamento não forem controladas.

Quanto às interações envolvendo bactérias e leveduras, enfoca-se o potencial antagônico (Fleet, 1999) que estes microrganismos podem exercer sobre o crescimento de outros microrganismos, principalmente de fungos e produção de toxinas ou como controle biológico de pragas. Além disso, a formação de compostos antimicrobianos ou de enzimas inibitórias em resposta a uma infecção pode também inibir a invasão de microrganismos (Dennis, 1987).

A interação comensal também ocorre com frequência nos alimentos, como, por exemplo, a degradação de polímeros por algumas espécies para produzir substratos simples para o crescimento de outras espécies, produção de vitaminas, etc (Fleet, 1999).

Petersson & Schnürer (1998), estudando a possibilidade do uso de leveduras como biocontrole do crescimento fúngico em grãos com alto teor de umidade, observaram que a presença das leveduras *Pichia anomala* e *P. guilliermondii* inibiam o crescimento de *Penicillium roquefortii* em grãos armazenados em condições inadequadas de umidade. *P. guilliermondii* também é capaz de inibir o crescimento fúngico em frutos cítricos, grãos de soja, tomates e maçãs. A capacidade de inibição do crescimento fúngico por leveduras é dependente do substrato, pois a eficiência da inibição é consequência da forte adaptação ao substrato, que pode ser caracterizado pela presença de compostos antifúngicos, cascas, microrganismos competitivos e nutrientes disponíveis (Petersson & Schnürer, 1998).

*Debaryomyces hansenii* também apresenta atividade antifúngica e está sendo estudada como possível controle biológico a fim de evitar a degradação de frutos e grãos estocados (Payne & Bruce, 2001). A ação antagônica de leveduras parece se referir à competição por nutrientes, uma vez que o crescimento leveduriforme é mais rápido que o crescimento de fungos filamentosos.

Cristancho & Leguizamón (1995) realizaram estudos com *Bacillus thuringiensis* a fim de observar o possível efeito protetor desta bactéria nas

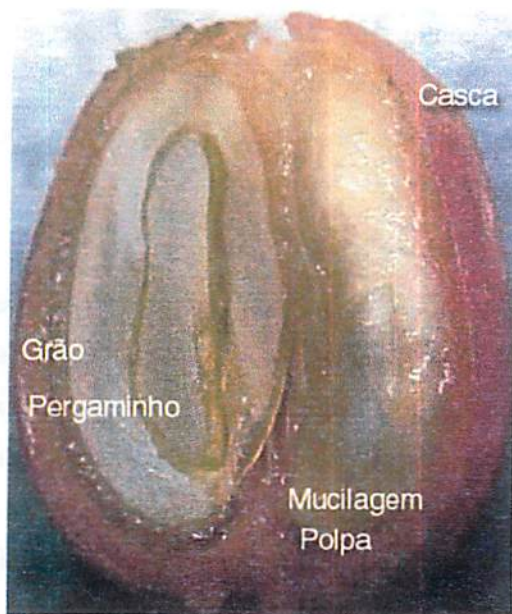
folhas de café contra *Hemileia vastatrix*. Observaram uma redução da severidade da lesão devido à influência desta bactéria na germinação dos uredinósporos ou devido à baixa adesão destes uredinósporos sobre a superfície do hospedeiro.

#### **2.4 Enzimas microbianas: celulasas, xilanases e pectinases**

A presença de enzimas nos grãos de café pode servir como parâmetro para determinação da qualidade da bebida (peroxidases, proteases, glicosidases, lipases e polifenoloxidase), como afirmam Amorim & Teixeira (1975), Amorim et al. (1976) e Pimenta et al. (1997).

Outras enzimas de origem microbiana, principalmente as celulasas e pectinases, podem atuar sobre a polpa e mucilagem dos frutos de café degradando-os, podendo, assim, favorecer ou prejudicar o processamento e a qualidade da bebida. Portanto, a caracterização enzimática dos microrganismos presentes pode ajudar a inferir sobre o papel deles no processo de fermentação dos frutos de café.

Os frutos de café são classificados, botanicamente, como sendo drupas consistindo de um exocarpo (casca), um mesocarpo externo (polpa), um mesocarpo interno (mucilagem), um endocarpo fibroso (pergaminho) e a semente (Avallone et al., 2001b), como ilustra a Figura 1.



**FIGURA 1** Fruto de café no estágio cereja em corte longitudinal sendo possível visualizar casca, polpa, mucilagem, pergaminho e grão.

O exocarpo apresenta um baixo valor nutricional devido à presença de substâncias tóxicas como cafeína (1,2%), taninos (6,3%) e polifenóis (Brand et al., 2000). A polpa de café é o primeiro produto que se obtém no processamento (por via úmida) e representa cerca de 29% do peso do fruto inteiro, sendo composta de 76% de água, 10% de proteína, 21% de fibras, 8% de cinzas e 4% de extrato livre de nitrogênio, estes representados por taninos, substâncias pécicas (6 a 8% segundo Peñaloza et al., 1985), açúcares redutores (glicose representando 12%) e não redutores, cafeína, ácido clorogênico, ácido cafêico, celulose, lignina hemicelulose, aminoácidos (geralmente não enxofrados) e minerais como potássio, cálcio, ferro, sódio, magnésio e outros. Estes valores sofrem alterações de acordo com a variedade de café, a localidade e as práticas agrícolas (Elias, 1978). A mucilagem dos frutos de café está localizada entre a



polpa e o pergaminho do grão e representa 5 % do peso seco. A mucilagem é um sistema de hidrogel composto de água, ácido pécico com pequenas quantidades de arabinose, galactose, xilose e rannose (Amorim & Amorim, 1977), açúcares redutores e ácidos orgânicos (Elias, 1978).

A mucilagem também apresenta enzimas hidrolíticas e oxidativas como as pectinesterases, poligalacturonases,  $\alpha$  galacturonases, peroxidases e polifenoloxidasas (Wong, 1995; Amorim & Amorim, 1977; Amorim & Melo, 1991).

O pergaminho envolve a semente do café (grão verde) e representa 12 % do peso seco, sendo composto de 7,6 % de água, 92,8 % de matéria seca, 0,39 % de nitrogênio, 18,9 % de extrato livre de nitrogênio, 150 mg de cálcio e 28 mg de fósforo (Elias, 1978).

Os grãos verdes não torrados podem ser compostos de cerca de 60 % de carboidratos, 14 % de proteínas, aproximadamente 13 % de lipídios e pequenas quantidades de ácidos não voláteis, trigonelina e cafeína. Diferenças genéticas, tempo de colheita, grau de maturidade dos frutos e localização geográfica podem alterar a composição química dos grãos (Jones & Jones, 1984).

### **Celulases e xilanases**

A parede celular da casca do fruto de café é composta por celulose e hemicelulose, as quais também estão presentes na polpa e mucilagem (Elias, 1978). A celulose é um polímero de glicose com regiões altamente complexas, regiões cristalinas e regiões amorfas. Amplamente encontrada na natureza, sua degradação representa uma perspectiva ecológica, uma aplicação industrial ou uma fonte para crescimento microbiano (Goyal et al., 1991). Para tal degradação são necessárias enzimas específicas como as endoglucanases (1,4- beta- D- glucano 4- glucanohidrolase), celobiohidrolase (1,4- beta- D- glucano

celobiohidrolase) ou exoglucanase e as  $\beta$  glicosidases (beta -D- glicosideo glicohidrolase) (Wong, 1995).

Os fungos filamentosos podem secretar todo o sistema celulolítico (endo, exo glucanase e glicosidases) num sistema conhecido como completo como acontece nas espécies *Trichoderma reesei*, *T. koningii*, *T. viride*, *Fusarium solani*, *Penicillium pinophilum* e *P. funiculosum*. Ao contrário, a maioria das bactérias sintetizam somente endoglucanases e  $\beta$  glicosidases (Wong, 1995).

A ação das enzimas celulolíticas fúngicas necessita de sinergismo principalmente entre endo glucanase e celobiohidrolases (Wong, 1995; Goyal et al., 1991). É neste sinergismo que se alcançará o maior grau de degradação do polímero (Wong, 1995). O ataque inicial do polímero de celulose acontece pela ação das endo glucanases, seguida da ação combinada de endo e celobiohidrolases com a hidrólise final à glicose mediante a ação das glicosidases (Goyal et al., 1991).

As endoglucanases são responsáveis pela clivagem das ligações glicosídicas  $\beta$  1,4, atuando em celulose cristalina e em celulosas substituídas como a carboximetilcelulose. As celobiohidrolases liberam celobiose a partir da porção final não redutora de celulosas não substituídas. As  $\beta$  glicosidases atuam sobre as celobiose liberando monômeros de glicose (Goldman, 1988; Wong, 1995).

A degradação da porção hemicelulolítica da parede celular é realizada pela endo  $\beta$  1,4 xilanases (EC 3.2.1.8), que atua nas ligações  $\beta$ -D-xilanopiranosil da xilana formando xilooligossacarídeos.

Nos frutos de café processados via úmida os microrganismos que ali se instalam não utilizam polímeros como as moléculas de celulose e pectina, e sim açúcares simples como a glicose, frutose e sacarose (Avallone et al., 2001a). Este fato pode ser devido à ausência de pectina liase ou ao reduzido tempo de fermentação dos cafés despulpados.

Nos cafés naturais não se conhece o potencial celulolítico e /ou pectinolítico dos microrganismos epifíticos; no entanto, Sakiyama et al. (2001) isolaram e caracterizaram pectina liase produzida pela bactéria endofítica *Paenibacillus amylolyticus*. Wosiacki (1977) afirma que o caráter fitopatogênico de certos microrganismos está freqüentemente associado à capacidade de degradar polissacarídeos estruturais como as celuloses, hemiceluloses e substâncias pécicas. Sabe-se que fungos filamentosos, principalmente do gênero *Aspergillus* (*Aspergillus niger*, *A. wentii* e *A. foetidus*), são produtores de pectinases e celulasas (Fogarty, 1994). É conhecido o alto grau de contaminação dos grãos de café por fungos filamentosos em vários estádios de processamento e beneficiamento. Para que haja a colonização dos tecidos por estes microrganismos é necessária a desintegração da parede celular mediante o ataque de celulasas e xilanases (Silva et al., 1999). Os fungos filamentosos poderiam ser os responsáveis pela degradação da parede celular por produzirem celulasas secretadas extracelularmente (Wong, 1995). No entanto, não parece ser este grupo microbiano o responsável pela fermentação dos cafés naturais, já que no início do processo de secagem, momento em que a polpa e mucilagem estão presentes, há um grande predomínio em número de bactérias e leveduras (Silva et al. - dados não publicados), tendo as espécies de *Aspergillus* maior incidência durante o armazenamento. Há exceções de frutos já colonizados por fungos ainda na planta, devido às condições climáticas e tratos culturais inadequados.

### **Pectinases**

A mucilagem dos grãos de café apresenta em sua composição pectinas e outros compostos que podem ser substratos de enzimas da própria mucilagem ou para ação de enzimas microbianas. A despolimerização da pectina é geralmente associada com o amadurecimento dos frutos (Wong, 1995).

A rápida degradação da mucilagem é importante para a preservação da qualidade da bebida de café, pois é um meio rico para o desenvolvimento de microrganismos que, através de seus metabólitos, podem depreciar a qualidade da infusão (Carvalho & Chalfoun, 1985). Para tal degradação, é necessária a ação de enzimas pectinolíticas. Jones & Jones (1984) afirmam que as enzimas da mucilagem não são capazes de degradá-la na ausência de microrganismos; porém, Avallone et al. (2001b) observaram a presença da pectinametilesterase na mucilagem de frutos de café. O controle da fermentação para degradação da mucilagem em cafés despulpados, no entanto, não é um procedimento simples, pois fermentações prolongadas deterioram a qualidade da bebida (Jones & Jones, 1984). Boccas et al. (1994) afirmaram que algumas indústrias preferem acrescentar aos grãos enzimas pécticas comerciais para hidrólise da mucilagem. Estas enzimas são produzidas em escala industrial por microrganismos selecionados.

Substâncias pécticas são substâncias heterogêneas na estrutura química e tamanho molecular. A estrutura química básica das substâncias pécticas é  $\alpha$ -D-galacturonanas ou  $\alpha$ -D-galacturonoglicanos em cadeias lineares de 1,4-  $\alpha$ -D-galactopiranosilurônico. O polímero contém vários graus de esterificação com grupos carboxílicos e metoxílicos (Wong, 1995).

As enzimas pécticas podem ser classificadas de acordo com seu modo de ação, sendo que a poligalacturonase (PG) catalisa a quebra das ligações glicosídicas  $\alpha$  1,4. As exo PG (exo- poli- 1,4  $\alpha$ -D galacturonohidrolase - EC. 3.2.1.67) atacam as porções finais não redutoras, enquanto as endo PG (endo- poli  $\alpha$ -D- glicanohidrolase- EC 3.2.1.15) atacam a molécula aleatoriamente; a pectinesterase (pectina pectilhidrolase- EC 3.1.1.11) catalisa a desmetoxilação do polímero, a pectato liase (endo e exo -poli 1,4  $\alpha$ -D- galactoronideo liase) catalisa a clivagem de grupos desmetoxilados via  $\beta$  eliminação e a pectina liase catalisa a clivagem de unidades de galacturonato esterificados (Wong, 1995).

A pectina esterase, PE (EC 3.1.1.11) é a única enzima pectica própria da mucilagem atuando na desmetoxilação do polímero (Elias, 1978). A ação de microrganismos na mucilagem parece ser restrita a bactérias, segundo Jones & Jones (1984), os quais não encontraram isolados fúngicos capazes de produzir pectinases. Entretanto, Boccas et al. (1994) trabalharam com a produção de pectinases em polpa de café em fermentação sólida com cepas de fungos selvagem com alta potencialidade de produção. Van Pee & Castelein (1972) observaram que somente *Erwinia dissolvens* (reclassificada atualmente como *Klebsiella*) foi capaz de produzir exo poligalacturonases e nenhuma produção de polimetilgalacturonase e polimetilesterase foi observada. Alguns anos depois, Jones & Jones (1984) relataram que bactérias isoladas do café só produziam enzimas que atuavam em pectinas com baixo grau de metoxilação ou em ácidos poligalacturônicos. No entanto, a pectina presente na mucilagem dos frutos é altamente metoxilada (Avallone, 2001b).

Agate & Bhat (1966), trabalhando com cafés robusta na Índia, isolaram leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*, verificando a ação destas leveduras na degradação da mucilagem, sendo também identificadas as leveduras *Saccharomyces marxianus* (renomeada de *Kluyveromyces marxianus* (E.C. Hansen) van der Walt (1971)), *S. bayanus* e *S. cerevisiae* var. *ellipsoideu*, as quais apresentaram alta capacidade pectinolítica.

### 3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a biodiversidade microbiana, ou seja, isolar, caracterizar e identificar bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos presentes em frutos de café natural e grãos beneficiados e armazenados em embalagens de aniação e semipermeável em condições de câmara fria (3 °C e 59% UR).
- Correlacionar as espécies microbianas identificadas durante a secagem e armazenamento com as condições microambientais dos frutos e grãos para o estabelecimento da sucessão microbiana, estabelecer possíveis interações entre bactérias, leveduras e fungos filamentosos e também analisar a produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos durante o período de secagem/fermentação.
- Caracterizar cada espécie microbiana proveniente do café natural quanto à produção de enzimas pectinolíticas, celulolíticas e xilanolíticas.
- Avaliar o potencial toxigênico de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAFEZ, A. I. I.; EL- MAGHRABY, O. M. O. Fungal flora and aflatoxin associated with cocoa, roasted coffee and tea powders in Egypt. *Cryptogamie, Mycologie*, Paris, v. 13, n. 1, p. 31-45, Mar. 1992.

AGATE, A. D.; BHAT, J. V. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of coffee robusta cherries. *Applied Microbiology*, New York, v. 14, n. 2, p. 256-260, Mar. 1966.

ALVES, E. População fúngica associada ao café (*Coffea arabica* L.) beneficiado e as fases pré e pós colheita- relação com a bebida e local de cultivo. 1996. 48 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

AMORIM, H. V.; AMORIM, V. L. Coffee enzymes and coffee quality. In: ORY, R. L.; ANGELO, A. J. St. (Ed.). *Enzymes in food and beverage processing*. Washington: American Chemical Society, 1977. n. 47, p. 27-55.

AMORIM, H. V.; MELLO, M. Significance of enzymes in non alcoholic coffee beverage. In: FOX, P. F. (Ed). *Food enzymology*. Amsterdam: Elsevier, 1991. v. 2, p 189-209.

AMORIM, H. V.; SMUCKER, R.; PFISTER, R. Some physical aspects of Brazilian green coffee beans and the quality of the beverage. *Turrialba*, San José, v. 26, n. 1, p. 24-27, ene./mar. 1976.

AMORIM, H. V.; TEIXEIRA, A. A. Transformações bioquímicas, químicas e físicas do grão de café verde e qualidade da bebida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 3., 1975, Curitiba. *Resumos...* Rio de Janeiro: MIC/TBC, 1975. p. 21-23.

AMORIM, H. V.; TEIXEIRA, A. A.; MORALES, R. S.; REIS, A. J.; PIMENTEL GOMES, F.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre a alimentação mineral do cafeeiro XXVII. Efeito da adubação N, P, e K no teor de macro e micro nutrientes do fruto na qualidade da bebida do café. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"* Piracicaba, v. 30, p. 323-333, dez. 1973.

AVALLONE, S.; BRILLOUET, J. M.; GUYOT, B.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J. P. Involvement of pectolytic microorganisms in coffee fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*, Oxford, v. 37, n. 2, p. 191, Feb. 2002.

AVALLONE, S.; GUYOT, B.; BRILLOUET, J-M.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J-P. Microbiological and biochemistry study of coffee fermentation. *Current Microbiology*, New York, v. 42, n. 4, p. 252-256, Apr. 2001a.

AVALLONE, S.; GUIRAUD, J. P.; GUYOT, B.; OLGUIN, E.; BRILLOUET, J-M.; Fate of mucilage cell wall polysaccharides during coffee. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, Washington, v. 49, n. 11, p. 5556-5559, Apr. 2001b.

BALOWS, A.; TRUPER, H. G.; DWORKIN, M.; SCHLEIFER, K. H. (Ed.). *The prokaryotes*. Berlin: Springer verlag, 1992. 4126 p.

BATISTA, L. R. Identificação, potencial toxigênico e produção de micotoxinas de fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica* L.). 2000. 188p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G. Identificação de espécies toxigênicas de *Aspergillus* associadas aos grãos de café armazenados. *Revista Brasileira de Armazenamento*, Viçosa, n. 3, p. 11-16, 2001. Especial café.

BITANCOURT, A. A. As fermentações e podridões da cereja de café. *Boletim da Superintendência dos Serviços do Café*, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 7-14, jan. 1957.

BLANC, M.; PITTET, A.; MUÑOZ-BOX, R.; VIANI, R. Behavior of Ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, Washington, v. 46, n. 2, p. 673-675, Fev, 1998.

BLANDÓN-CASTANO, G.; RODRÍGUEZ-VALENCIA, N.; DÁVILA-ARIAS, M. T. Caracterización microbiológica y fisico-química de los productos del beneficio del café en proceso de compostaje. *Cenicafé*, Chinchiná, v. 49, n. 3, p. 169-185, July/sept. 1998.

BOCCAS, F.; ROUSSOS, S.; GUTIERREZ, M.; SERRANO, L.; VINIEGRA, G. G. Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation



system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. *Journal Food Science Technology*, Missouri, v. 31, n. 1, p. 22-26, Jan./Feb. 1994.

BOOTH, C. *The genus Fusarium* Surrey: Commonwealth mycological Institute, 1971. p. 237

BRAND, D.; KAWATA, F.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S.; SANTOS, M. C. R. dos.; SOCCOL, C. R. Detoxificação biológica da casca de café por fungos filamentosos em fermentação no estado sólido. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEIEIRA, 3., 2000, Londrina. *Anais...* Londrina: IAPAR/IRD, 1999. p. 401-403.

BRANDO, C. H. J. Cereja descascado, desmucilado, fermentado, despulpado ou lavado? CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 25., 1999, Franca. *Trabalhos Apresentados...* Rio de Janeiro: MAA/ PROCAFÉ, 1999. p. 342-346.

BUCHELI, P.; TANIWAKI, M. H. Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. *Food Additives and Contaminants*, Abingdon, v. 19, n. 7, p. 655-665, July 2002.

CALLE V., H. Activadores bioquímicos para la fermentación del café. In : *Seminarios. Cenicafé*, Chinchina, v. 8, n. 3, p. 94-101, mar. 1957.

CARVALHO, V. D.; CHALFOUN, S. M. Aspectos qualitativos do café. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 79-92, jun. 1985.

CARVALHO, V. D.; CHALFOUN, S. M.; CHAGAS, S. J. de R. Relação entre classificação de café pela bebida e composição físico-química, química e microflora do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS 15., 1989, Maringá. *Resumos...* Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989. p. 25-26.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. O papel dos microrganismos na qualidade e segurança do café. In: ENCONTRO SUL MINEIRO DE CAFEICULTURA, 8., 2002, Lavras. *Trabalhos apresentados...* Lavras: UFLA, [2002]. p. 200-201.

CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. D. de Efeito de microrganismos na qualidade da bebida de café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 21-26, 1997.

CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. L de; AZEVEDO, P. J. de; CARVALHO, V. D. de. Efeitos de tratamento com fungicidas, aplicados na fase pré colheita, sobre a qualidade do café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 18., 1992, Araxá. Resumos... Rio de Janeiro: MARA/ PROCAFÉ, 1992. p. 63-65.

CRISTANCHO, A., M. A.; LEGUIZAMÓN C. J. E. Efecto protector de la bacteria *Bacillus thuringiensis* en plantas de café contra el desarrollo de *Hemileia vastatrix* Berck. Y Br. **Cenicafé**, Chinchina, v. 46, n. 3, p. 140-151, jul./sept. 1995.

DAIVASIKAMANI, S.; KANNAN, N. Studies on Post- Harvest Mycoflora of Coffee Cherry Os Robusta. Brief note. **Journal Coffee Research**, Balehonnur, v. 16, n. 3/4, p. 102-106, 1986.

DENNIS, C. Microbiology of fruits and vegetables. In: NORRIS, J. R.; PETTIPHER, G. L. (Ed.). **Essays in agricultural and food microbiology**. 1987. p. 227-260.

ELIAS, L. G. Composición química de la pulpa de café y otros subproductos. In: BRAHAM, J. E.; BRESSAN, R. (Ed.). **Pulpa de café: composición, tecnología y utilización**. Panamá: Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, 1978. p. 19-29.

FLEET, G. H. Microorganisms in food ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 1/2, p. 101-117, Sept. 1999.

FOGARTY, W. M. Enzymes of the Genus *Aspergillus*. In: SMITH, J. E. (Ed.). **Aspergillus**. New York: Plenum Press, 1994. p. 177-217.

FRANK, H. A.; LUM, N. A.; DELA CRUZ, A. S. Bacteria responsible for mucilage layer decomposition in Kona coffee cherries. **Applied Microbiology**, New York, v. 13, n. 2, p. 201-207, 1965.

FRANKLAND, J. C. Fungal Succession- unravelling the unpredictable. **Mycological Research**, New York, v. 102, n. 1, p. 1-15, Jan. 1998.

GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, in press.

GOLDMAN, G. H. Estudos genéticos e produção de celulase em *Aspergillus niger*. 1988. 153 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba, SP.

GORDON, W. L. The taxonomy and habitats of *Fusarium* species from tropical and temperate regions. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 38, n. 3, p. 643-658, Mar. 1960.

GOYAL, A.; GHOSH, B.; EVELEIGH, D. Characteristics of fungal cellulases. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 27-50, 1991.

HEILMANN, W.; REHFELDT, A. G.; ROTZOLL, F. Behavior and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. **European Food Research Technology**, New York, v. 209, n. 3/4, p. 297-300, 1999.

INSTITUTO CAMPINEIRO DE ENSINO AGRÍCOLA. **Cultura do café**. Campinas, 1987. 84 p. 1987.

JONES, K. L.; JONES, S. E. Fermentations involved in the production of cocoa, coffee and tea. **Progress Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 19, p. 411-56, 1984.

KRUG, H. P. Cafés duros. **Revista do Instituto do Café**, São Paulo, v. 25, n. 159, p. 636-638, maio 1940a.

KRUG, H. P. Cafés Duros III. Relação entre a porcentagem de microrganismos e qualidade do café. **Revista do Instituto do Café**, São Paulo, v. 27, n. 163, p. 1827- 1831, set. 1940b.

LE BARS, J.; LE BARS, P. Mycotoxigenesis in Grain Application to Mycotoxin Prevention in Coffee. In: **Seminário Internacional sobre Biotecnologia na Agroindústria Cafeeira**, 3., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR/ IRD, 1999. p. 435-445.

LIARDON, R.; BRAENDLIN, N.; SPADONE, J. C. Biogenesis of Rio flavour impact compound: 2,4,6- trichloroanisole. In: **Quartozieme colloque scientifique international sur le café**. San Francisco, 14-19 Juil. Paris France; Association Scientifique Internationale du Café, 1992.

LIARDON, R.; SAPADONE, J. C.; BRAENDLIN, N.; DENTAN, E. Multidisciplinary study of Rio flavour in Brazilian green coffee. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON THE CHEMISTRY OF COFFEE, 13., 1989, Paipa. **Proceedings....** Paipa: ASIC, 1989. p. 117-126.

LOPEZ, C. I.; BAUTISTA, E.; MORENO, E.; DENTAN, E. Factors related to the formation of "overfermented coffee beans" during the wet processing method and storage of coffee. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON THE CHEMISTRY OF COFFEE, 13., 1989, Paipa. **Proceedings....** Paipa: ASIC, 1989.

MAGAN, N.; LACEY, J. Ecological determinants of mould growth in stored grain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 245-256, Dec. 1988.

MANTLE, P. G.; CHOW, A. M. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 105-109, May 2000.

MATIELLO, J. B. Tipos de cafeicultura no Brasil. In: Anuário Estatístico do café- 2000 – 2001. Rio de Janeiro, 2001. p. 38-42.

MEIRELLES, A. M. A. Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais. 1990. 71 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MISLIVEC, P. B.; BRUCE, V. R.; GIBSON, R. Incidence of Toxigenic and other Molds in Green Coffee Beans. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 46, n. 11, p. 969-73, Nov. 1983.

MONACO, L. C. Armazenamento do café. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, São Paulo, v. 36, n. 417, p. 15-16, nov. 1961.

MOREAU, C. **Moulds, toxins and Food**. New York: John Wiley, 1979. 477 p

MOSS, M. O. The environmental factors controlling mycotoxin formation. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. (Ed.). **Mycotoxins and animal foods**. New York: CRC Press, 2000. Cap. 2, p. 37-116.

MOSS, M. O. Mycotoxins. *Mycological research*, New York, v. 100, n. 5, p. 513-523, May 1996.

NAIDU, R. Mycotoxins in coffee. *Indian coffee*, New Delhi, v. 60, n. 8, p. 9-11, Aug. 1996.

NOUT, M. J. R.; ROMBOUITS, F. M. Fermentative preservation of plant foods. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, Oxford, v. 73, p. 136S-147S, 1992.

PAYNE, C.; BRUCE, A. The yeast *Debaryomyces hansenii* as a short term biological control agent against fungal spoilage of sawn *Pinus sylvestris* Timber. *Biological Control*, San Diego, v. 22, n. 1, p. 22-28, Sept. 2001

PEÑALOZA, W.; MOLINA, M. R.; BRENES, R. G.; BRESSANI, R. Solid-State Fermentation: na alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 49, n. 2, p. 388-393, Feb. 1985.

PERDERSON, C. S.; BREED, R. S. Fermentation of coffee. *Food Research*, Oxford, v. 11, n. 2, p. 99, 1946.

PETERSSON, S.; SCHNURER, J. *Pichia anomala* as a biocontrol agent of *Penicillium roquefortii* in high moisture wheat, rye, barley, and oats stored under airtight conditions. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, v. 44, n. 5, p. 471-476, May 1998.

PIMENTA, C. J.; CHAGAS, S. J. de R.; COSTA, L. Polifenoloxidase, lixiviação de potássio e qualidade de bebida de café colhido em quatro estádios de maturação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 32, n. 2, p. 171-177, fev. 1997.

PITT, J. I. Toxicogenic fungi: which are important? *Medical Mycology*, v. 38, Supplement I, p. 17-22, 2000.

PITT, J. I.; BASÍLICLO, J. C.; ABARCA, M. L.; LÓPEZ, C. Mycotoxins and toxicogenic fungi. *Medical Mycology*, Oxford, v. 38, p. 41-46, 2000. Supplement I

POISSON, J.; CAHAGNIER, B.; MULTON, J. L.; HAHN, D.; CORTE DOS SANTOS, A. Microflora of coffee: method of counting and influence on organoleptic properties. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM

ON THE CHEMISTRY OF COFFEE, 1976, Paipa. **Proceedings....** Paipa: ASIC, 1976. 1976. p. 311-321.

ROSE, A. H. (Ed). **Fermented foods: economic microbiology - coffee fermentations**, Oxford: Academic Press, 1982. p. 259-273.

ROUSSOS, S.; ANGELES AQUIÁHUATL, M.; TREJO-HERNÁNDEZ, M. R.; GAIME PERRAUD, I.; FAVELA, E.; RAMAKRISHNA, M.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. **Biotechnological management of coffee pulp- isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 42, n. 5, p. 756-762, Jan. 1995.

SAKIYAMA, C. C. H.; PAULA, E. M.; PEREIRA, P. C.; BORGES, A. C.; SILVA, D. O. **Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 117-121, Aug. 2001.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food and airborne fungi**. 6. ed. Utrecht: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, 2000. 387 p.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em Alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144 p.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F. **Incidência de *Aspergillus* produtores de micotoxinas em frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.). Revista Brasileira de Armazenamento, Viçosa, n. 7, p. 30-36, 2003. Especial.**

SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. **Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* L in Brazil. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, 60, n. 2/3, p. 251-260, Sept. 2000**

SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; STANGARLIN, J. R.; DIAS, E. S. **Determinação da atividade enzimática em fungos filamentosos isolados de grãos de café da região Sul de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador. Resumos... Salvador: SBM, 1999. p. 271.**

SILVA Jr. E. A. da **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 2. ed. Varela, 1997. 383 p.

SINHA, R. N. Ecology of microflora in stored grain. **Annales de Technologie Agricole**, Paris, v. 28, n. 2, p. 191-209, 1979.

SIVETZ, M. **Coffee processing technology**. Westport, Connecticut: AVIC, 1963. v. 2.

SOLIMAN, K. M. Incidence, level, and behavior of aflatoxins during coffee bean roasting and decaffeination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 25, p. 7477-7481, Dec. 2002.

SOUZA, J. C.; REIS, P. R. **Broca-do-café: Histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos, monitoramento e controle**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1997. (EPAMIG. Boletim Técnico, n. 50).

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; TEIXEIRA, A. A.; IAMANAKA, B. T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173-179, Apr. 2003.

TEIXEIRA, A. A.; SILVEIRA, A. P. da; ARRUDA, H. V. de; MARIOTTO, P. R.; FIGUEIREDO, P. Influência de diversos fungicidas aplicados a alto e baixo volumes na qualidade da bebida do café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 5., 1977, Guarapari. Resumos. . . Rio de Janeiro: IBC-GERCA, [1977]. p. 89-90.

VAN DER WALT, J. P. New combinations in the genera *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Lodderomyces* and *Wignea*. **Bothalia**, Pretoria, v. 10, p. 417-418, 1971.

VAN PEE, W.; CASTELEIN, J. M. Study of the pectinolytic microflora, particularly the Enterobacteriaceae, from fermenting coffee in the Congo. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 37, n. 2, p. 171-174, Mar./Apr. 1972.

VAN PEE, W.; CASTELEIN, J. M. The yeasts flora of fermenting robusta coffee. **East African Agricultural and Forestry Journal**, Nairobi, v. 26; n. 3, p. 308-310, Jan. 1971.

VAUGHN, R. H.; CAMARGO, R. DE; FALLANGE, H.; MELLO AYRES, G.; SERGEDELLO, A. Observations on the microbiology of the coffee

fermentation in Brazil. **Food Technology**, Chicago, v. 12, n. 4, p. 12-57, Apr. 1958. Supplement.

VEGA, F. E.; MERCADIER, G. Insects, coffee and ochratoxin A. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 81, n. 4, p 543-544, Dec. 1998.

VILLELA, T. C.; PEREIRA, R. G. F. A.; ABRAHÃO, A. A.; FURTADO, E. F. Composição química de grãos de café natural, despulpado, desmucilado e descascado II: Torração média. In: ENCONTRO SUL MINEIRO DE CAFEICULTURA, 8., 2002, Lavras. **Trabalhos apresentados...** Lavras: UFLA, [2002]. p. 43-48.

WONG, D. W. S. Cellulolytics Enzymes. In: \_\_\_\_\_. **Food enzymes - structure and mechanism**. New York: Chapman & Hall, 1995. p. 85-114.

WOSIACKI, G. **Enzimas pectinolíticas de *Fusarium oxysporum* Schlecht EX. Fr. isolado de frutos de café**. 1977. 73 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de Campinas, Campinas, SP.



## **CAPÍTULO 2**

### **SUCESSÃO ECOLÓGICA E INTERAÇÃO MICROBIANA EM FRUTOS E GRÃOS DE CAFÉ NATURAL**

## RESUMO

SILVA, C. F. Sucessão ecológica microbiana em frutos e grãos de café natural. In: \_\_\_\_\_. **Sucessão microbiana e caracterização enzimática da microbiota associada aos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.) do município de Lavras- MG. 2004. p. 45-87. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.**

Os frutos e grãos de café natural apresentam uma microbiota epifítica abundante e diversificada. O objetivo deste trabalho foi conhecer a ordem de colonização dos frutos pela microbiota naturalmente presente no café e possíveis interações entre os microrganismos. Frutos cereja foram coletados manualmente em uma fazenda no município de Lavras- MG e processados via seca. A intervalos regulares de 48 horas, amostras dos frutos foram coletadas durante a fermentação/secagem durante 22 dias, e em 40, 132 e 136 dias de armazenamento em embalagem de aniação e semipermeável. O isolamento e a identificação de bactérias, leveduras e fungos filamentosos foram realizados seguindo-se procedimentos padrões. Foram identificados 693 microrganismos sendo 275 bactérias, 263 fungos filamentosos e 155 leveduras. Foram identificadas bactérias Gram positivas e Gram negativas, sendo o gênero *Bacillus* representando 80% das espécies bacterianas. *Aspergillus* foi o gênero mais abundante com 42,6% do total de isolados de fungos. Espécies de *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium* foram também identificados nas amostras coletadas. Dos isolados leveduriformes 42,6% pertenceram ao gênero *Debaryomyces*, mas identificou-se também espécies de *Pichia*, *Candida* e *Saccharomyces*. Bactérias foram predominantes em frutos com teores elevados de umidade (67,45%), sendo seguidos pelos isolados de leveduras durante a secagem dos frutos. Durante o armazenamento houve predomínio de fungos filamentosos principalmente do gênero *Aspergillus*. Assim, concluiu-se que, a umidade dos frutos e grãos de café é um dos fatores que seleciona e direciona a colonização pela microbiota epifítica naturalmente presente.

**Capítulo submetido: International Journal of Food Microbiology**

---

Comitê orientador: Dr<sup>a</sup> Rosane Freitas Schwan- UFLA (Orientador), Dr Eustáquio Souza Dias- UFLA

## ABSTRACT

SILVA, C. F. Microbial ecological succession in fruits and natural coffee beans. In: \_\_\_\_\_. **Microbial succession and enzymatic characterization of the microbial associated of fruits and coffee beans (*Coffea arabica* L.) of the municipal district of Lavras – MG. 2004. p. 45-87. Thesis (Doctorate in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.**

The epiphytic microbiota present in the fruits and natural coffee beans is abundant epiphytic and diversified. The main objective of this work was to find out the order of colonization of the fruits which are naturally present the coffee and also observe possible interactions among the microorganisms. Fruits cherry were collected manually in a farm in the municipal district of Lavras - MG. Samples were taken at regular intervals of 48 hours, during the fermentation/drying period for 22 days. Samples were also collected in 40, 132 and 136 days of storage in plastic and semi permeable jute bags. The isolation and identification of bacteria, yeasts and fungi were done following standard procedures. It was identified 693 microorganisms being 275 bacteria, 263 fungi and 155 yeasts. Were identified bacterias positive Gram and negative Gram, being the genus *Bacillus* representing 80% of the bacterial species *Aspergillus* was the most abundant genus showing 42,6% of the total isolated of fungi. species of *Penicillium*, *Fusarium* and *Cladosporium* were also identified. Of the yeasts isolated 42,6% belonged to the genus *Debaryomyces*, but species of *Pichia*, *Candida* and *Saccharomyces* were also present. Bacteria were predominant in fruits with high humidity (67,45%), being followed by yeasts during the drying period of the fruits. During the storage there was prevalence of fungi mainly species belonging to the genus *Aspergillus*. It was possible to conclude that the humidity of the fruits and coffee beans is one of the factors that selects and addresses the natural colonization of coffee beans by epiphytic microorganisms.

**Submitted chapter: International Journal of Food Microbiology**

---

**Guidance committee: Ds Rosane Freitas Schwan - UFLA (Major Professor), Ds Eustáquio Souza Dias - UFLA**

## 1 INTRODUÇÃO

Na superfície dos frutos e grãos de café existe a presença de uma microbiota abundante e diversificada (Silva et al., 2000). A composição química dos frutos, como proteínas, açúcares e minerais, e sua alta umidade favorecem o rápido crescimento de microrganismos (Roussos et al., 1995). Em cafés naturais (processamento seco), espécies de fungos que colonizam e produzem toxina são mais estudadas a fim de se evitarem as condições ambientais favoráveis para, principalmente, a produção de micotoxinas.

No entanto, Silva et al. (2000) observaram que os frutos de café em vários estádios de maturação e processamento comportam uma grande diversidade microbiana referente não somente a fungos filamentosos, mas também a bactérias e leveduras. Em cafés processados via úmida a análise da microbiota comprovou a participação de bactérias e leveduras com capacidade pectinolítica atuando na degradação da mucilagem (Van Pee & Castelein, 1972; Agate & Bhat; 1966, Frank et al., 1965).

Em cafés naturais, a ação de microrganismos atuando na fermentação da polpa e mucilagem ainda não está totalmente esclarecida, fato que poderia alterar a qualidade do produto através da aceleração do processo de secagem ou da excreção de metabólitos para o grão de café.

Durante o processo de fermentação/secagem dos frutos de café, com as mudanças na estrutura e composição química dos frutos, é estabelecida uma sucessão de microrganismos, cuja colonização estaria dependente das condições atmosféricas locais (umidade, temperatura), dos frutos e da genética de cada espécie microbiana capaz de secretar enzimas extracelulares ou de síntese de compostos que possam lhes conferir proteção contra a ação antimicrobiana de espécies antagônicas.

O conhecimento da dinâmica de uma sucessão microbiana em frutos e grãos de café poderá ser um instrumento para possíveis intervenções nos procedimentos agrícolas nas plantações de café desde que esteja totalmente esclarecida, para tanto, foi objeto de estudo deste trabalho.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem

Foi coletado um lote correspondente a uma saca de sessenta litros de café, em cultivo não adensado, no estádio cereja de maturação da espécie *Coffea arabica* var. Acaiaá, de forma aleatória, na plantação e no pé de café, em uma fazenda no município de Lavras-MG, com altitude de 750 a 800 m. Os grãos foram processados por via seca, permanecendo em terreiro de cimento até se obter a umidade ideal de beneficiamento (11%). Os frutos foram beneficiados e porções com mesmo peso foram divididas em sacos de aniagem e sacos semipermeáveis (sacos plásticos de poliestireno) e armazenadas em Câmara fria a 3 °C, a 59% U.R. até 136 dias.

### 2.2 Contagem e isolamento de microrganismos

Durante o período de secagem foram coletadas amostras diárias de grãos de café, escolhidos aleatoriamente, em número de duzentos (200) frutos, do lote inicial, e então colocados, assepticamente, em Erlenmeyers com 1,8 litro de água peptonada estéril (1% de peptona e 5% de NaCl, esterilizada a 121°C/ 15 min), nos quais foram agitados durante vinte (20) minutos, em agitador orbital Tecnal - TE 140 em 80 rpm. A partir do extrato obtido, foram preparadas diluições decimais de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ .

Para a determinação da contagem total de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, foi tomado 0,1 mL de cada diluição, em triplicata, o qual foi espalhado com alça de Drigalsky no meio WL (DIFCO). Foi utilizado o meio "Eosine Methylene Blue" (MERCK) para detecção prévia de *Escherichia coli* ou Enterobacteriaceae, MRS (OXOID), acrescido de nistatina para contagem de

bactérias lácticas, e o meio DG18 para crescimento de fungos filamentosos e leveduras. As placas foram incubadas a 28 °C e a contagem total de bactérias foi realizada após 24-48 horas de incubação. Para a contagem e morfologia de fungos filamentosos, as placas foram incubadas por 168 horas.

A partir da contagem total foi escolhida, para morfologia de colônia, uma placa de cada meio e diluição cuja contagem estivesse entre 30 e 300 colônias. O número de isolados a serem selecionados para identificação, foi determinado calculando-se a raiz quadrada do número total de isolados, contados conforme mencionado no Bacteriological Manual for Foods (FDA, 1972). A morfologia de colônia incluiu as seguintes características observadas: tamanho da colônia (análise comparativa com outras colônias presentes naquele meio), forma, elevação, cor e bordo.

Os isolados foram purificados e as leveduras, separadas de bactérias por exame microscópico. Das culturas puras de bactérias foram realizados testes de coloração diferencial de Gram (técnica formulada por Christian Gram (1884) e descrita em Pelczar et al., 1996), teste de produção da enzima catalase e de motilidade.

Todos os isolados bacterianos foram transferidos para criotubos contendo YEPG líquido e acrescidos de glicerol para uma concentração final de 20%. Leveduras foram preservadas como descritos para bactérias e fungos filamentosos em meios SNA ou MEA, dependendo do gênero do fungo.

## **2.3 Identificação das espécies microbianas**

### **Identificação de bactérias**

Os isolados bacterianos foram repicados para placas com meio PCA (triptona 0,5%; extrato de levedura 0,25%; glicose 0,1%; ágar 1,5%) e incubados a 28 °C por 24 horas. A partir deste tempo, os isolados foram submetidos a testes de coloração de Gram e catalase. Os isolados separados nos dois grupos (Gram

positivos e Gram negativos) foram submetidos à realização de testes específicos para a identificação das espécies.

### **Identificação de bactérias Gram negativas**

Estes isolados foram identificados através de Kits do Sistema Bac-Tray I, II e III (Difco). Inicialmente realizou-se o teste para detectar a presença da enzima oxidase utilizando teste comercial Bactident Oxidase-1.13300 - (MERCK). O teste de oxidase consiste na confirmação ou não desta enzima nos microrganismos.

Isolados Gram e catalase negativos foram inoculados no sistema Bac-Tray I e II e os Gram negativos e oxidase positivos, nos kits do sistema Bac-Tray III. Cada Kit Bac-Tray consiste de dez diferentes substratos contidos em um suporte de poliestireno descartável. As provas do sistema Bac-Tray I consistem de hidrólise da  $\beta$  galactosidase, dehidrolação da arginina, descarboxilação da lisina, descarboxilação da ornitina, produção de  $H_2S$ , presença de urease, produção de acetoina (VP), desaminação da fenilalanina, produção de indol e utilização de citrato. As reações do sistema Bac Tray II foram: utilização do malonato, utilização de ramnose, adonitol, arabinose, inositol e sorbitol, sacarose, manitol e rafinose com produção de ácido.

Reações de tolerância a cetrimida, utilização de acetamida, elevação do pH por malonato citrato, utilização de maltose, hidrólise da esculina, controle de intensidade de cor para o teste de arginina, dehidrolação da arginina, hidrólise da uréia e metabolização do triptofano resultando em indol estão presentes no sistema Bac-Tray III.

Para inoculação nas galerias do suporte foi realizada uma suspensão da cultura bacteriana com 24 horas de incubação, em 3 mL de água destilada estéril, tomando-se o cuidado de inocular pouco material para evitar turvação do



meio. As galerias do Bac-Tray foram incubadas por 18- 24 horas a uma temperatura de 28 °C. A identificação das espécies foi realizada pela soma dos resultados positivos, conforme o manual do fabricante (DIFCO). Tendo-se o código, determina-se a espécie por meio da análise de um software.

### **Identificação de bactérias Gram positivas**

Os isolados de bactérias Gram positivas foram submetidos a um tratamento térmico (80 °C/ 10 min ou fervura por 1 minuto) para induzir a esporulação. Prepararam-se então lâminas e, por exame microscópico, foram separadas as bactérias formadoras de esporos das não formadoras.

Para a identificação das espécies, foram realizados testes bioquímicos e de motilidade de acordo com as recomendações propostas no "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (Holt et al., 1994). Bactérias Gram positivas esporuladas foram submetidas a teste de manitol, Voges- Proskauer, crescimento em anaerobiose, crescimento em NaCl, degradação do amido, gelatina e caseína. Bactérias Gram positivas não esporuladas foram identificadas segundo os resultados dos testes de redução de nitrato a nitrito; motilidade a 22 °C; fermentação de carboidratos (glicose, lactose, sacarose, maltose, salicina, manitol, trealose e xilose); reação de Voges- Proskauer e liquefação da gelatina a 22 °C.

Todos os isolados foram inoculados nos meios específicos a partir de repiques com 24 horas de incubação.

### **Identificação de fungos leveduriformes**

Os fungos leveduriformes foram identificados com base em testes bioquímicos e chaves dicotômicas propostas por Barnett et al. (2000).

As colônias de leveduras repicadas em meio DG18 e incubadas a 28°C, por 24 horas, foram transferidas para tubos eppendorf com água destilada estéril

para esgotamento das reservas energéticas das células leveduriformes.

Estas suspensões, após 24 horas, foram transferidas para uma placa de mármore estéril com 20 perfurações. Como num sistema de carimbo, as colônias foram inoculadas em placas contendo os meios para testes de assimilação de carboidratos (glicose, galactose, sacarose, maltose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, melicitose, sorbose, inulina, amido solúvel, xilose, L e D arabinose, D- ribose, L- ramnose, glicerol, eritritol, ribitol, galactitol, manitol, glucitol, salicina, L-K-d- glucanal, succinato de sódio, citrato de sódio, inositol, metanol, etanol e ácido quínico) e nitrogênio (nitrato e nitrito de sódio, lisina, etilamina, glucosamina) resistência a cicloheximida (0,01% e 0,1%), crescimento em meio sem vitamina e teste de osmolaridade (50% e 60 % de glicose e 10% e 16% de NaCl). Testes de fermentação em meio líquido contendo D-glicose, sacarose, maltose e D-galactose, melibiose, melicitose, celobiose, rafinose, D-xilose e metil  $\alpha$ -D-glucosídeo e crescimento a 30, 35, 37, 40 e 42 °C, em tubos de ensaio, também foram realizados.

As placas inoculadas com meio de cultura para os testes de assimilação foram incubadas à temperatura de 28 °C e a leitura dos resultados foi realizada em intervalos de 7 a 21 dias. Os resultados foram analisados comparando-se o crescimento das colônias com controle positivo e negativo. Valores numéricos foram atribuídos ao crescimento microbiano, sendo 0 - colônia igual ao controle negativo; 1 - colônia igual ao controle positivo; 2 - colônia apresentando o dobro do tamanho da colônia no controle positivo; e 3 - o triplo ou maior que o tamanho da colônia comparado ao controle positivo.

As leituras dos testes de fermentação de carboidratos em meio líquido e crescimento a diferentes temperaturas foram realizadas após 24, 48 e 72 horas e após 7, 14 e 21 dias de incubação. Os dados obtidos da fermentação de carboidratos foram referentes à produção de ácido e à quantificação da produção de CO<sub>2</sub> (pelo deslocamento do meio líquido nos tubos de Dühran).

## **Identificação de fungos filamentosos.**

Para identificação dos gêneros de fungos filamentosos foram comparadas características em microscopia e morfologia de colônias segundo Booth (1971), Nelson et al. (1983), Barnett & Hunter (1987), Pitt & Hocking (1997).

## **2.4 Identificação de ácidos orgânicos inerentes dos frutos e grãos de café e produzidos por microrganismos.**

A análise de ácidos orgânicos em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) foi realizada em amostras de frutos coletadas durante o período de secagem em terreiro até a umidade dos frutos equivaler a 19,78%, o que corresponde a 0,82 de atividade de água ( $a_w$ ). De cada dia coletado as amostras foram separadas em polpa + mucilagem e grãos.

Analisaram-se os seguintes ácidos: acético, láctico, málico, butírico, propiônico, cítrico, oxálico, succínico e tartárico.

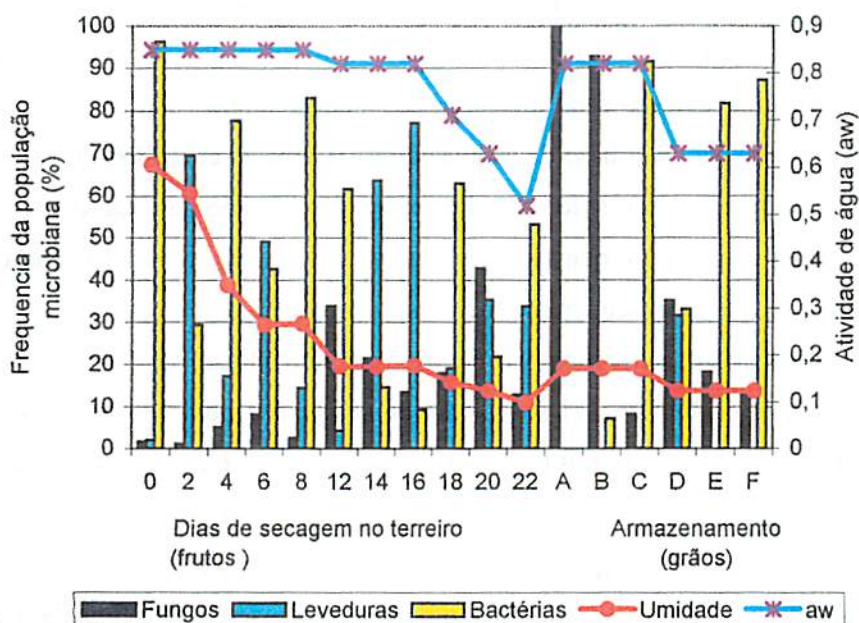
As condições para análise de ácidos foram as seguintes: 2 g de amostra foram misturadas com água e agitada durante 30 minutos. Após, a solução foi diluída em 10 mL de água destilada, filtrada e analisada em coluna C610H com aplicação de 20  $\mu$ L, tendo como fase móvel água destilada com 1% de ácido fosfórico em fluxo de 0,6 mL/min a 40 °C. A detecção foi conduzida em UV a 210 nm (Jham et al., 2002).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os frutos de café, assim como outros alimentos, apresentam alterações na estrutura e composição química, que interferirão na colonização pelas espécies microbianas. Estas diferenças nos frutos de café podem estar relacionadas com o longo período de secagem (15-25 dias) a que os frutos foram submetidos.

Do total de 940 isolados, 693 foram identificados quanto à espécie, correspondendo a 73,7%. Do total de isolados calculou-se a frequência dos grupos microbianos isolados dos frutos e grãos de café (Figura 1). Também na Figura 1 podem ser encontrados os valores da variação do teor de umidade dos frutos e a atividade de água ( $a_w$ ) correspondente.

A diversidade microbiana da superfície de frutos de café já havia sido pesquisada por Silva et al. (2000), na região Sul de Minas Gerais, desde frutos cereja até secos em terreiro. Os autores, entretanto, não descreveram uma sucessão ecológica nos frutos de café devido à origem mista de suas amostras. Nesta pesquisa realizada e aqui descrita, as amostras foram tomadas de um mesmo lote de frutos, sendo possível observar uma sucessão ecológica microbiana. Esta sucessão foi muito diversificada em número de indivíduos e espécies, influenciadas principalmente pelo teor de umidade dos frutos e grãos, conforme observado na Figura 1. As diferentes condições de umidade e composição química dos frutos e grãos de café também podem influenciar na competição pelo substrato e, portanto, na colonização destes pelos microrganismos.



**FIGURA 1** Frequência dos isolados de bactérias, leveduras e fungos filamentosos isolados de frutos e grãos de café natural durante o processamento via seca e armazenamento. A linha em vermelho representa a umidade dos frutos em cada dia de permanência em terreiro e durante o armazenamento e a linha azul representa a atividade de água correspondente à umidade. As letras A, B e C representam grãos armazenados em embalagem de anigagem aos 40, 87 e 132 dias de armazenamento, respectivamente. As letras D, E e F representam grãos de cafés armazenados em embalagem semipermeável aos 40, 84 e 136 dias de armazenamento, respectivamente, em câmara fria a 3 °C a 59% UR.

Liardon et al. (1989) estudaram fatores bioquímicos e microbiológicos que poderiam comprometer a qualidade da bebida de café. Observam que a população microbiana presente na superfície dos frutos de café foi superior em relação à microbiota presente nos grãos verdes e igualmente superior à

população endofítica, sendo assim importante o estabelecimento da população epifítica dos frutos e grãos de café, uma vez e compostos excretados pelos microrganismos durante seus metabolismos podem migrar para a semente, a qual é utilizada para a infusão da bebida de café (Carvalho et al., 1997).

Os frutos maduros de café apresentaram, no início da secagem (tempo 0), umidade de 67,45%, que representa atividade de água de 0,85 (Figura 1). Observou-se que nos seis primeiros dias de secagem dos frutos de café no terreiro houve perdas significativas de umidade, obtendo-se, até o 6º dia, perda de 38% de umidade. Do 12º ao 16º dia de secagem a perda de umidade não ultrapassou 0,23%, tendo, nos tempos seguintes, 18º, 20º e 22º dias de secagem, os valores de 15,78; 13,74 e 11%, respectivamente. No 22º dia de secagem obteve-se a umidade segura para o armazenamento (11% de umidade e equivalendo a  $a_w$  de 0,52). A umidade do grão pode ser correlacionada a  $a_w$ , sendo esta um dos fatores que podem afetar o grau de colonização e a espécie microbiana colonizadora (Magan & Lacey, 1984).

Os grãos de café foram acondicionados a 3 °C e 59% UR, em embalagem de aniagem (material usado para armazenagem dos grãos de café nos armazéns) e em embalagem semipermeável. Esta condição propiciou uma reidratação dos grãos de café, principalmente os grãos armazenados em sacos de aniagem em que se constatou um aumento de 8% na umidade, tendo-se, assim, as mesmas condições de umidade daquelas obtidas do 12º ao 16º dia de secagem dos frutos. Os grãos de café acondicionados em embalagem semipermeável sofreram acréscimo de 2% de umidade se comparados ao valor obtido no 20º dia de secagem dos frutos. A caracterização química e física dos grãos armazenados está na Tabela 1.

Apesar de os valores de umidade durante o armazenamento coincidirem com certos dias de secagem, este fato não tornou o substrato igualitário em condições físicas e químicas durante a secagem e armazenamento. Isto porque

durante a secagem, os frutos de café estão sendo secos íntegros, ou seja, casca, polpa e semente, diferentemente do ocorrido durante o armazenamento, em que o substrato resumiu-se ao grão de café, ou seja, o café verde.

A microbiota predominante dos frutos de café da árvore (tempo 0) foi de bactérias, com 96,3% do total de microrganismos (bactérias, fungos filamentosos e leveduras) amostrados. Maior população bacteriana também foi observada no 4º, 8º, 12º, 18º e 22º dias de secagem dos frutos de café. Durante o armazenamento, bactérias predominaram no 132º dia em grãos acondicionados em embalagem de aniagem (Figura 1, letra C) e no 84º e 136º dias de grãos acondicionados em embalagem semipermeável (Figura 1, letras E e F, respectivamente).

Roussos et al. (1995) trabalharam com quatro diferentes amostras de café (café despulpado com presença de água; despulpado sem água, polpa liofilizada e casca de café obtido pelo processo seco) quanto a população microbiana presente nestas amostras. Na amostra de casca de café obtida pelo processamento seco a contagem de bactérias foi de 94,3% da microbiota total, dado muito semelhante ao encontrado neste trabalho, que também utilizou o processamento seco, tendo contagem de bactérias de 96,3% do total de isolados microbianos. Todas as espécies de plantas em habitat natural estão associadas a uma microbiota bacteriana epifítica. O tamanho da população bacteriana epifítica parece estar relacionada com o crescimento sazonal da planta, sendo diminuído em porções imaturas da mesma. As bactérias epifíticas podem ser fitopatogênicas, mas podem estabelecer uma relação comensal com a planta sem o desenvolvimento da doença (Lindow & Andersen, 1996).

**TABELA 1** Características químicas e físicas dos grãos de café armazenado em embalagem de aniagem e semipermeável.

<b>Características</b>	<b>Grãos armazenados em sacos de aniagem</b>	<b>Grãos armazenados em embalagem semipermeável</b>
Umidade (%)	19,05	13,73
Acidez (mL NaOH 0,1N)	200	250
Polifenoxidase (U/g/min)	68,69	89,36
Peroxidase (U/g/min)	133,55	123,33
Compostos fenólicos (%)	6,901	7,685
Açúcares redutores (%)	0,360	0,408
Açúcares totais (%)	1,54	1,68
Sacarose (%)	1,12	1,21
Pectina solúvel (mg/10 g)	899,09	737
Pectina total (mg/100 g)	881,22	640,09
Solubilização (%)	81,97	72,64
FDA (%)	29	27,2
Lignina (%)	9,6	7,4
Celulose (%)	19,40	19,80



No 2º, 6º, 14º e 16º dias de secagem houve predominância de leveduras em relação a bactérias, sendo que neste último ocorreu a maior diferença, 68%. Durante o armazenamento a população leveduriforme foi detectada em grãos armazenados em embalagem semipermeável aos 40 dias de armazenamento (Figura 1, letra D) e em embalagem de aniagem aos 132 dias de armazenamento (1 isolado, valor não registrado na Figura 1 igual a 0,1%).

Os fungos filamentosos foram detectados em frutos da árvore, em todos os dias de secagem dos frutos em terreiro e durante as condições de armazenamento (embalagem, temperatura e umidade). Porém, foram significativamente predominantes em grãos de café acondicionados em embalagem de aniagem no 40º e 87º dias (Figura 1, letras A e B, respectivamente).

A contagem de leveduras no trabalho desenvolvido por Roussos et al. (1995) foi considerada desprezível, o que difere deste trabalho, cuja contagem foi inferior à de fungos filamentosos e bactérias, mas em valor de 22,4% dos isolados totais. A contagem de leveduras foi maior em relação à de bactérias somente nos dias de secagem nos quais a  $a_w$  permaneceu entre 0,82 e 0,85. A maioria das leveduras cresce nesta faixa de água disponível (0,8-0,9), segundo Sinha (1979). Fungos filamentosos foram isolados no trabalho de Roussos et al. (1995) com contagens semelhantes em todas as amostras, com exceção de amostras de casca de café em que houve um aumento de 5,2% em relação às outras amostras.

Ahmad & Magan (2002), estudando as diferenças da população microbiana entre cafés *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, constataram que bactérias foram isoladas em todas as amostras analisadas a partir de diluições seriadas em meios de cultura sintéticos. Fungos filamentosos foram isolados nas duas espécies de café, porém em poucas amostras. Antes da colheita os fungos podem estar presentes em baixos níveis, que serão acrescidos durante a colheita,

secagem e estocagem dos grãos (Magan & Lacey, 1988). Este fato foi constatado neste trabalho, em que a partir do 14º dia de secagem houve um incremento da população fúngica. Na literatura ainda não há descrição de fatores bióticos e abióticos que influenciam o estabelecimento de grupos de microrganismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos) em frutos e grãos de café durante todo o processo do café natural.

A população microbiana presente nos frutos e grãos de café foi variável em número e espécie. Sinhá (1979) descreveu que os grãos são caracterizados como ecossistemas imaturos devido às grandes flutuações de indivíduos e espécies. As bactérias geralmente requerem alta atividade de água para crescerem ( $> 0,9$ ), enquanto os fungos filamentosos podem se desenvolver em ambientes mais secos ( $a_w$  entre 0,7-0,8), tendo as leveduras ocupação intermediária (0,8-0,9) entre estes dois grupos (Hahn-Hagerdal, 1986; Sinhá, 1979). As diferenças na população microbiana encontrada em trabalhos com café natural são justificáveis devido ao tempo de exposição e superfície (terreiro de secagem) em que os frutos são submetidos às condições atmosféricas durante o período de secagem. O tempo de exposição é variável, pois em cada localidade produtora de café as condições climáticas durante a secagem podem ser diferentes.

Até o quarto dia de secagem foram identificadas 9 diferentes espécies de bactérias, 7 espécies de leveduras e 16 espécies diferentes de fungos filamentosos. Dentre as espécies de bactérias encontram-se aquelas identificadas como Gram negativas, principalmente *Enterobacteriaceae*, e as Gram positivas, principalmente *Bacillus*. A maior diversidade de espécies de fungos no 4º dia de secagem também refletiu na predominância em número de isolados destes microrganismos (Tabela 2). Do 6º ao 12º dia de secagem (Tabela 2) foram identificadas 15 diferentes espécies de bactérias, 11 espécies de leveduras e 10 espécies diferentes de fungos filamentosos. Nove espécies de bactérias Gram

negativas foram isoladas e identificadas no 8º dia de secagem, tendo estas espécies um isolado. Opostamente, neste dia foram identificadas somente 3 espécies de *Bacillus*, sendo *Bacillus subtilis* identificado 35 vezes. O decréscimo de espécies de fungos filamentosos, em relação aos primeiros quatro dias de secagem, foi reflexo principalmente da redução de diferentes espécies dos gêneros *Penicillium* e *Fusarium*. O aumento de 4 espécies de leveduras foi representado por somente 1 ou 2 isolados (Tabela 2).

Durante o período de secagem, ocorrida entre os dias 14º ao 18º, identificaram-se 8 diferentes espécies de bactérias, 10 espécies de leveduras e 17 espécies de fungos filamentosos (Tabela 2). A maior variabilidade de espécies de fungos não representou predominância em número de isolados destes microrganismos. Entre os isolados bacterianos foram identificadas 4 espécies de Gram negativas e número igual ao de Gram positivas. Dos isolados de leveduras, 59% representaram espécies do gênero *Debaryomyces* (Tabela 2).

Nos quatro dias finais de permanência dos frutos no terreiro (20º e 22º dias de secagem) apresentados na Tabela 2, foram identificadas 6 espécies de bactérias, 10 de leveduras e 15 de fungos filamentosos. As espécies de fungos filamentosos foram representadas pelos gêneros *Penicillium*, *Fusarium* e *Aspergillus*. Os isolados bacterianos em igual número de espécies foram identificados de Gram positivas e negativas, porém com predomínio em número de isolados de Gram positivas. Dentre as leveduras, o maior número de isolados pertenceu à espécie do gênero *Debaryomyces*.

**TABELA 2** Espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos isolados da superfície de frutos de café durante o período de secagem do processamento natural. Entre parênteses o número de isolados identificados.

TEMPO AMOSTRADO	ESPÉCIES DE BACTÉRIAS	ESPÉCIES DE LEVEDURAS	ESPÉCIES DE FUNGOS
0 dia	<i>Klebsiella oxytora</i> <i>K. ozanae</i> <i>Bacillus subtilis</i> (6) <i>B. macerans</i> <i>B. cereus</i>	<i>Zygoascus helenicus</i> (2) <i>Candida saitoana</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (7) <i>Fusarium lateritium</i> (4) <i>F. solani</i> (4) <i>F. illudens</i> (2) <i>F. moniliforme</i> (sim. <i>verticillioides</i> ) (2) <i>F. nivale</i> <i>Pestalotia sp</i> (3) <i>Paecilomyces sp</i> <i>Penicillium minioluteum</i> (3) <i>P. roquefortii</i> <i>P. solitum</i> <i>P. funiculosum</i> (2) <i>P. brevicompactum</i> (2) <i>P. chrysogenum</i>
2° dia	<i>Acinetobacter sp</i> <i>B. cereus</i> <i>B. polymyxa</i> (2) <i>B. macerans</i> (2) <i>B. subtilis</i> (5)	<i>P. guilliermondii</i> <i>S. smithiae</i> <i>C. fermentati</i> <i>D. polymorphus</i> (2)	<i>C. cladosporioides</i> (3) <i>Paecilomyces sp</i> <i>P. minioluteum</i> <i>P. crustosum</i>
4° dia	<i>B. anthracis</i> <i>B. subtilis</i> (8) <i>B. polymyxa</i> <i>Arthrobacter sp</i> <i>B. macerans</i> (2) <i>B. cereus</i> (3)	<i>C. fermentati</i> (2) <i>P. guilliermondii</i> (3) <i>D. hansenii</i> (5)	<i>C. cladosporioides</i> (2) <i>F. solani</i> (2)

...continua...

TABELA 2, cont.

TEMPO AMOSTRADO	ESPÉCIES DE BACTÉRIAS	ESPÉCIES DE LEVEDURAS	ESPÉCIES DE FUNGOS
6° dia	<i>B. anthracis</i> <i>B. subtilis</i> (9) <i>B. polymuxa</i>	<i>Arcula adenivorans</i> <i>Pichia holstii</i> <i>P. guilliermondii</i> (7) <i>D. hansenii</i> (5) <i>D. anomala</i> <i>C. membranifaciens</i> <i>C. saitoana</i>	<i>C. cladosporioides</i> <i>F. solani</i> (2) <i>P. purpurogenum</i> (2)
8° dia	<i>Providencia alcalifaciens</i> <i>Acinetobacter</i> sp <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Yersinia pestis</i> <i>Pseudomonas paucimolbilis</i> <i>E. sakasaki</i> <i>E. cloacae</i> <i>B. subtilis</i> (35) <i>B. cereus</i> (2) <i>B. macerans</i>	<i>P. guilliermondii</i> (6) <i>P. anomala</i> (2) <i>P. burtonii</i> <i>D. hansenii</i> <i>C. membranifaciens</i>	<i>C. cladosporioides</i> (5) <i>Aspergillus flavus</i> <i>F. illudens</i> <i>Pestalotia</i> sp
12° dia	<i>B. subtilis</i> (16) <i>B. cereus</i> (2) <i>Arthrobacter</i> sp	<i>Citeromyces matritensis</i> <i>D. polymorphus</i>	<i>C. cladosporioides</i> <i>A. flavus</i> <i>Paecilomyces</i> (2) <i>P. fellutanum</i> <i>P. corylophilum</i> (2) <i>P. solitum</i>

...continua...

TABELA 2, cont.

TEMPO AMOSTRADO	ESPÉCIES DE BACTÉRIAS	ESPÉCIES DE LEVEDURAS	ESPÉCIES DE FUNGOS
14° dia	<i>B. subtilis</i> (11) <i>B. cereus</i> <i>B. megaterium</i> <i>B. macerans</i>	<i>P. guilliermondii</i> (8) <i>P. anomala</i> (2) <i>P. burtonii</i> <i>D. hansenii</i> (10) <i>D. polymorphus</i> (2) <i>S. smithiae</i> (2)	<i>A. flavus</i> <i>P. roquefortii</i> <i>P. expansum</i> <i>P. citrinum</i> <i>P. janthinelum</i> <i>P. fellutanum</i> <i>P. brevicompactum</i> (9) <i>P. chrysogenum</i> (2)
16° dia	<i>Tatumella ptyseos</i> <i>Serratia plymutica</i> <i>B. subtilis</i> (5) <i>B. cereus</i> (2)	<i>P. guilliermondii</i> (5) <i>P. anomala</i> (3) <i>P. sydowiorum</i> <i>D. hansenii</i> (36) <i>A. adeninivorans</i> <i>S. smithiae</i> (5)	<i>F. solani</i> (3) <i>F. illudens</i> (2) <i>F. xylarioides</i> (2) <i>F. stilboides</i> <i>F. concolor</i> <i>F. equiseti</i> <i>P. solitum</i>
18° dia	<i>S. rubidea</i> <i>T. ptyseos</i> <i>S. plymutica</i> (2) <i>B. subtilis</i> (7) <i>B. cereus</i> (7) <i>B. megaterium</i> (3) <i>B. macerans</i> <i>B. polymyxa</i>	<i>P. anomala</i> <i>P. sydowiorum</i> (2) <i>P. subpelliculosa</i> <i>D. hansenii</i> <i>A. adeninivorans</i> <i>Saccharomyces kluyveri</i>	<i>C. cladosporioides</i> (2) <i>A. flavus</i> <i>P. roquefortii</i> (6) <i>P. citrinum</i> <i>P. brevicompactum</i> <i>P. crustosum</i>
20° dia	<i>E. agglomerans</i> <i>P. putrefaciens</i> <i>Serratia rubidea</i> <i>B. subtilis</i> (7) <i>B. cereus</i> (4) <i>B. megaterium</i>	<i>D. hansenii</i> (6) <i>A. adeninivorans</i> (2) <i>P. guilliermondii</i> (2) <i>S. kluyveri</i> <i>S. cerevisiae</i>	<i>A. ochraceus</i> (12) <i>A. flavus</i> (3) <i>F. xylarioides</i> <i>F. trincictum</i> <i>P. brevicompactum</i> (12) <i>P. roquefortii</i> (2) <i>P. aurantiogriseum</i> <i>P. waksmanii</i> <i>P. citrinum</i> <i>P. minioluteum</i> <i>P. solitum</i>
22° dia	<i>B. subtilis</i> <i>B. cereus</i> (3) <i>B. megaterium</i> (3)	<i>Klyveromyces lactis</i> <i>P. anomala</i> <i>P. jadinii</i> <i>P. holstii</i> <i>D. bruxellensis</i>	<i>A. flavus</i> (5) <i>A. niger</i> (20) <i>A. tamarii</i> <i>A. sydowii</i> <i>F. lateritium</i> <i>P. aurantiogriseum</i>

Espécies com um isolado não foram grafados entre parenteses.

Durante o armazenamento de grãos verdes em embalagem de aniação (Tabela 3), observou-se maior variabilidade de espécies ocorridas no 132º dia, sendo identificadas 14 espécies de bactérias, 1 espécie de levedura e 10 espécies de fungos filamentosos, com predomínio em número de isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Dos grãos verdes armazenados em embalagem semipermeável foi observada uma maior variabilidade de espécies na população bacteriana (11 espécies). Três diferentes espécies de leveduras e 8 de fungos filamentosos foram identificadas nesta condição de armazenamento (Tabela 3).

De todo o exposto presumiu-se que a maior variabilidade de espécies ocorreu entre o 6º e 18º dia de secagem, cujas condições de umidade dos frutos estavam entre 29,35 e 15,78%.

De todos isolados bacterianos (275 isolados) identificados, houve predominância em número de bactérias Gram positivas esporuladas pertencentes ao gênero *Bacillus* (80,4%), sendo este gênero encontrado durante todo o processamento seco e no armazenamento (Tabelas 2 e 3). Este gênero é caracterizado pela sua frequência em solos, com particularidade de esporulação que promove a sobrevivência das células em condições adversas. Algumas espécies de *Bacillus* são capazes de produzir uma série de enzimas extracelulares que degradam compostos complexos como as celulases e pectinas (Coughlan & Mayer, 1991). Estes dois polímeros encontram-se presentes na casca, polpa e mucilagem dos frutos de café, podendo, portanto, ser atacados por estas enzimas microbianas. No entanto, a utilização de polissacarídeos pode ser feita por microrganismos primários e secundários. Algumas espécies de *Bacillus* excretam somente endoglucanase, assumindo papel primário na utilização da celulose, pois não apresentam a  $\beta$ -glicosidase capaz de reverter a celobiose (proveniente da degradação de celulose) em glicose (Coughlan & Mayer, 1991).

Portanto, apesar da capacidade celulolítica do gênero *Bacillus*, seu crescimento pode ter sido sustentado por açúcares simples,

**TABELA 3** Espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos isolados da superfície de grãos beneficiados de café natural durante o período de armazenamento em câmara fria (3 °C/59% UR). Entre parênteses o número de isolados identificados.

TEMPO	BACTÉRIAS	LEVEDURAS	FUNGOS
40 dias (armazenamento em embalagem semipermeável)	<i>Bacillus subtilis</i> (6) <i>B. cereus</i> (3) <i>B. megaterium</i> (3)	<i>Pichia anomala</i> (2) <i>Debaryomyces</i> . <i>Hansenii</i> <i>Stephanosascus</i> . <i>Smithiae</i>	<i>Aspergillus flavus</i> (6) <i>Penicillium citrinum</i> (2) <i>P. corylophilum</i> <i>P. chrysogenum</i> <i>P. roquefortii</i>
40 dias (armazenamento em aniagem)			<i>A. flavus</i>
84 dias (semipermeável)	<i>B. subtilis</i> (3) <i>B. megaterium</i> (5) <i>B. cereus</i> <i>Tatumella pyseos</i>		<i>A. flavus</i> (2) <i>P. brevicompactum</i> <i>P. viridicatum</i> <i>P. citrinum</i> <i>Cladosporium</i> . <i>cladosporioides</i> (5) <i>F. concolor</i> <i>P. roquefortii</i> <i>P. citrinum</i> <i>P. solitum</i>
87 dias (aniagem)	<i>B. subtilis</i>		
132 dias (aniagem)	<i>Kurthia</i> sp <i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Pseudomonas. paucimobilis</i> <i>Serratia rubidea</i> (6) <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Providencia rettigeri</i> (2) <i>Cedecea lapagei</i> <i>B. anthracis</i> (4) <i>B. fastidiosus</i> <i>B. subtilis</i> (10) <i>B. cereus</i> (10) <i>B. megaterium</i> (6) <i>B. macerans</i>	<i>S. smithiae</i>	<i>C. cladosporioides</i> (2) <i>A. flavus</i> (21) <i>A. niger</i> (13) <i>A. foetidus</i> <i>A. dimorphicus</i> (2) <i>Fusarium. lateritium</i> <i>P. citrinum</i> <i>P. implicatum</i> <i>P. crustosum</i> <i>P. waksmanii</i>

...continua...



TABELA 3, cont.

136 dias (semipermeável)	<i>Kurthia</i> sp) <i>T. tyseos</i> <i>Serratia rubidea</i> <i>S. plymutica</i> <i>Acinetobacter</i> (2) <i>Providencia mirabilis</i> <i>B. anthracis</i> <i>B. subtilis</i> (4) <i>B. cereus</i> (2) <i>B. megaterium</i> <i>B. macerans</i>	<i>A. flavus</i> (11) <i>A. niger</i> (9) <i>F. lateritium</i> <i>P. citrinum</i> (2)
-----------------------------	---	--

---

Espécies com um isolado não foram grafadas entre parênteses.

como glicose, xilose, arabinose e sacarose, assim como também para o crescimento leveduriforme. A capacidade celulolítica de *Bacillus* poderia contribuir para a despolimerização dos complexos celulolíticos, tornando os frutos de café, durante a fermentação, capazes de suprir as necessidades de fonte de carbono da intensa carga microbiana naturalmente presente, incluindo bactérias, leveduras e fungos.

Das espécies celulolíticas de *Bacillus* encontradas destacaram-se *B. cereus*, *B. polymyxa* e *B. subtilis*. Das bactérias Gram positivas, o gênero *Arthrobacter*, também identificado neste trabalho, é capaz de degradar a celulose (Coughlan & Mayer, 1991).

A espécie *Bacillus subtilis* apresentou-se sempre superior em número às demais espécies deste gênero (134 isolados identificados) e foi encontrada em todos os dias de secagem e durante o armazenamento. No 8º dia de secagem foram identificados 35 isolados, o que representa 26,1 % do total de isolados desta espécie (Tabela 2). Esta espécie é conhecida pela sua capacidade de produção de quitinase, característica importante para o controle do crescimento fúngico, uma vez que todos os fungos apresentam quitina na sua parede-celular (Frändberg & Schnürer, 1998). As demais espécies são: *B. cereus* (45 isolados),

*B. megaterium* (23 isolados), *B. macerans* (10), *B. anthracis* (7), *B. polymyxa* (5) e *B. fastidiosus* (1) (Tabelas 2 e 3).

*Bacillus cereus* foi isolado desde frutos na árvore de café até o armazenamento (Tabelas 1 e 2). Durante o período de secagem, o número máximo de isolados identificados desta espécie foi de 7 isolados no 18º dia de secagem, tendo sua incidência máxima (10 isolados) no 132º dia de armazenamento em embalagem de aniagem. Opostamente a *B. cereus*, *B. megaterium* foi isolado somente a partir do 14º dia de secagem, com número máximo de isolados identificados (6) durante os 132 dias de armazenamento em embalagem de aniagem (Tabelas 2 e 3).

*B. macerans*, *B. anthracis*, *B. polymyxa* e *B. fastidiosus* apresentaram ampla distribuição durante o processamento seco e durante o armazenamento, com exceção dos dias 12º, 16º, 20º e 22º de secagem, quando nenhuma destas espécies foi isolada (Tabelas 2 e 3).

Bactérias Gram positivas não esporuladas representaram 5 isolados, sendo 3 pertencente ao gênero *Kurthia* e 2 pertencentes ao gênero *Arthrobacter*, os quais foram isolados e identificados somente no 4º e no 12º dias de secagem (Tabela 2), *Kurthia* foi isolado no 132º e no 136º dias de armazenamento (Tabela 3).

Bactérias Gram negativas representaram 19% do total de isolados bacterianos, sendo identificadas durante os dias 0 (frutos na árvore), 2, 8, 16, 18 e 20 de secagem, 84 e 136 dias de armazenamento em embalagem semipermeável e 132 dias em embalagem de aniagem (Tabelas 1 e 2). As bactérias Gram negativas apresentaram maior diversidade de espécies, porém com reduzido número e tempos amostrados. Diferentemente das bactérias Gram positivas, as Gram negativas necessitam de valores elevados de atividade de água ( $a_w$ ) para o seu crescimento, normalmente na faixa de 0,9- 1 (Sinha, 1979). Estas bactérias podem ser fitopatogênicas, mas, podem se desenvolver em

regime comensal sem danos à planta hospedeira, principalmente espécies de *Pseudomonas* (Lindow & Andersen, 1996). Este gênero apresenta a vantagem de ser capaz de degradar cafeína, um composto presente nos frutos de café (Yamaoka-Yano & Mazzafera, 1998) que inibe o desenvolvimento de microrganismos, e também são bactérias capazes de inibir a produção de toxinas (Hasan, 1996). A interação entre bactérias, crescimento de fungos e produção de toxinas também foi observada em *Acetobacter aceti*, estimulando, e em *Brevibacterium*, inibindo a produção de aflatoxina (Moss, 2000).

Bactérias Gram negativas foram predominantemente Enterobacteriaceas, sendo os gêneros mais incidentes *Serratia*, *Acinetobacter* e *Tatumella*. Estas bactérias apresentaram maior diversidade de espécies em relação às bactérias Gram positivas, porém com menor incidência de isolados. As espécies identificadas foram: *Serratia rubideae* (9 isolados), *S. plymutica* (4), *Acinetobacter* sp (5), *Tatumella ptyseos* (4), *Enterobacter agglomerans* (3), *E. cloacae* (1), *E. aerogenes* (1), *E. sakasaki* (1), *Pseudomonas paucimobilis* (2), *P. putrefaciens* (1), *Providencia rettgeri* (2), *P. alcalifaciens* (1), *P. mirabilis* (1), *Klebsiella oxytoca* (1), *K. ozanae* (1), *Shigella dysenteriae* (1), *Yersinia pseudotuberculosis* (1), *Y. pestis* (1) e *Cedecea lapagei* (1) (Tabelas 2 e 3).

Espécies como *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae* e isolados do gênero *Klebsiella*, que foram isoladas neste trabalho de café natural, também foram identificadas em cafés robusta oriundos do Congo e processados via úmida (Van Pee & Castelein, 1972) e em polpa fresca de *Coffea arabica* na Colômbia, além dos gêneros *Serratia* e *Pseudomonas* (Blandón et al., 1999). No trabalho com café robusta (Van Pee & Castelein, 1972), visava-se a identificação de bactérias Gram negativas pectinolíticas, mas somente a espécie identificada como *Enterobacter dissolvens* foi capaz de quebrar as substâncias pécnicas. Em nosso trabalho testou-se a capacidade de utilização de ácido poligalacturônico e pectina pelos isolados (dados mostrados no Capítulo 3). Nenhum isolado foi

produtor de poligalacturonase, sendo, no entanto, os isolados identificados como *Tatumella ptyseos*, *Pseudomonas putrefaciens*, *Enterobacter aerogenes*, *Acinetobacter* sp e *Providencia mirabilis* produtores de pectina liase. Tendo a pectina da mucilagem do café alto teor de metilação (60-70%), estas bactérias poderiam atuar na degradação da mucilagem dos frutos de café natural, porém apresentaram baixo grau de colonização, sendo, portanto, necessário prover condições adequadas ao seu desenvolvimento, principalmente no que se refere ao teor de água disponível, o que se torna um desafio, uma vez que com a permanência dos frutos em terreiro acontecem perdas significativas de umidade dos frutos.

A análise de ácidos orgânicos nos frutos de café revelou a presença de ácido acético no segundo e oitavo dias de secagem dos frutos em terreiro. Bactérias e leveduras podem ser responsáveis pela produção deste ácido; no entanto, das leveduras identificadas nestes dias de secagem, nenhuma é capaz de produzir ácido acético, portanto a identificação deste composto é de origem bacteriana, possivelmente de *Bacillus* (Barnett et al., 2000). Também no oitavo dia foi detectada a presença de ácido láctico, que é um isômero do ácido acético.

Estes dois ácidos acima citados podem ser oriundos do desdobramento do álcool produzido pela ação microbiana. Ao se iniciar a produção de ácido butírico e propiônico, começam a haver prejuízos na qualidade do café (Amorim & Amorim, 1977) devido ao sabor de cebola (Monaco, 1961). Estes compostos são produzidos em condições favoráveis de anaerobiose quando os grãos são amontoados. Ácido propiônico foi detectado em frutos da árvore e no segundo e quarto dias de secagem, portanto não é produto de frutos amontoados ou má condução do processamento. Demais dados da análise de ácidos orgânicos encontram-se na Tabela 4.

Das espécies de fungos identificadas neste trabalho, muitas já foram isoladas e identificadas em frutos e grãos de café (Bitancourt, 1957; Wosiacki,

1977; Mislivec et al., 1983; Daivasikamani & Kanan, 1986; Carvalho et al., 1989; Meirelles, 1990; Amorim & Melo, 1991; Alves, 1996; Silva et al., 2000; Batista et al., 2001).

Foram identificados 263 isolados de fungos filamentosos, sendo 28 isolados de *Cladosporium*, 34 isolados de *Fusarium*, 81 isolados de *Penicillium*, 112 isolados de *Aspergillus*, 4 isolados de *Pestalotia* e 4 isolados de *Paecilomyces*.

*Cladosporium cladosporioides* foi a espécie fúngica mais encontrada (7 isolados) em frutos da árvore (tempo 0), sendo ainda detectado nos dias 6, 8 e 18 de secagem (Tabela 2) e no 87º dia de armazenamento em embalagem de aniagem (Tabela 3), havendo neste dia de armazenamento, 5 isolados. Nos dias de secagem em que foi amostrado, o número máximo de isolados obtidos foi dois (Tabela 2). Em frutos recém colhidos houve maior diversidade de espécies de fungos filamentosos que são naturais dos frutos ou contaminações ocorridas durante a colheita. Nestes frutos recém colhidos a ocorrência de *Cladosporium cladosporioides* é justificada por este fungo ser natural dos frutos de café (Pereira, 2002), pois frutos de café no estágio cereja de maturação apresentam valor de atividade de água de aproximadamente 0,85, ideal para o desenvolvimento desta espécie (Samson et al., 2000), além da sua capacidade de degradação da celulose, característica importante para o início da fermentação dos frutos de café naturais. A incidência de *Cladosporium* durante o período de secagem dos frutos no terreiro pode ser justificada pela associação deste fungo com a broca do café (*Hypothenemus hampei*) (Pérez et al., 2003), que ataca os frutos desde o estágio verde até o seco (Souza & Reis, 1997). Foi observado que durante o processo de secagem, a incidência de *Cladosporium* foi sucedida por outras espécies.

**TABELA 4** Identificação de ácidos orgânicos inerentes aos frutos e grãos de café e produzidos por microrganismos.

TEMPO	AMOSTRAS	ÁCIDOS								
		<u>Acético</u>	<u>Butírico</u>	Cítrico	<u>Láctico</u>	Málico	Oxálico	<u>Propiônico</u>	Succínico	Tartárico
0	P+M	-	-	+	-	+	+	+	+	+
0	Grão	-	-	+	-	+	+	+	+	-
2	P+M	-	-	+	-	+	+	+	+	+
2	Grão	+	-	+	-	+	+	+	+	-
4	P+M	-	-	+	-	+	+	+	+	-
4	Grão	-	-	+	-	+	-	+	+	-
6	P+M	-	-	+	-	+	+	-	+	-
6	Grão	-	-	+	-	+	-	-	+	-
8	P+M	+	-	+	+	+	+	-	+	-
8	Grão	-	-	+	-	+	-	-	+	-
12	P+M	-	-	+	-	+	+	-	+	-
12	Grão	-	-	+	-	+	-	-	+	-
14	P+M	-	-	+	-	+	+	-	+	-
14	Grão	-	-	+	-	+	-	-	+	-
16	P+M	-	-	+	-	+	+	-	+	-

Tempo= Tempo em dias de secagem ; P+M = polpa + mucilagem dos frutos.

+ representa presença do ácido: - representa ausência do ácido.

Nomes sublinhados referem-se a ácidos produzidos por microrganismos.

Os fungos pertencentes ao gênero *Cladosporium* não são competitivos, tendo seu crescimento facilmente inibido pelo contato com hifas de outros fungos ou por metabólitos por eles secretados (Magan & Lacey, 1984). Assim, esta espécie sofre a competição por substrato com fungos capazes de tolerar menor atividade de água e que apresentam crescimento micelial mais rápido (Sautour et al., 2002). Foi observado que em temperatura ótima de crescimento, *C. cladosporioides* apresentou o menor crescimento micelial por dia (3 mm) em relação a *Aspergillus flavus*, por exemplo, que crescia 5,7 mm/dia (Sautour et al., 2002).

O gênero *Fusarium* foi isolado em frutos da árvore e durante a secagem nos dias 4°, 8°, 16°, 20° e 22° e durante o armazenamento em embalagem de aniagem (87° e 132° dias) e em embalagem semipermeável (136° dia). Foram identificados 32 isolados deste gênero pertencentes às espécies *F. solani* (9 isolados), *F. lateritium* (7), *F. illudens* (5), *F. xylarioides* (3), *F. concolor* (2), *F. moniliforme* (2), *F. nivale* (1), *F. stilboides* (1), *F. equiseti* (1) e *F. tricinctum* (1). *Fusarium* foi o gênero que apresentou o maior número de espécies patogênicas (*F. lateritium*, *F. solani*, *F. moniliforme*) em frutos no estágio cereja. Este gênero geralmente coloniza e produz toxinas antes ou imediatamente após a colheita dos frutos (Pitt et al., 2000), destacando-se as espécies aqui identificadas como *F. moniliforme* e *F. equiseti* (Mills, 1989). No entanto, não há relato de detecção de toxinas produzidas por *Fusarium* em grãos de café. Trabalhos visando a correlação entre qualidade de café e a incidência de fungos filamentosos apontam a associação entre deterioração da bebida de café e a presença de *Fusarium* (Silva et al., 2000; Carvalho et al., 1989; Krug, 1940).

Das espécies mais incidentes deste gênero, *Fusarium lateritium* e *F. solani* foram as espécies mais encontradas em frutos da árvore (4 isolados) após a incidência de *C. cladosporioides*; fato justificável, pois *Fusarium* necessita de  $a_w$  necessária para desenvolvimento entre 0,86 a 0,90 (Samson et al., 2000). *F.*

*lateritium* também foi isolado e identificado no 22º dia de secagem e no 132º e 136º dias de armazenamento, *F. solani* foi novamente identificado no 16º dia de secagem dos frutos de café (Tabelas 2 e 3) e *F. illudens* foi isolado em frutos na árvore (tempo 0) no 8º e 16º dias de secagem dos frutos em terreiro (Tabela 2).

Isolados do gênero *Penicillium* foram identificados em todos os dias de secagem, com exceção do 4º e 8º dias, assim como durante o armazenamento nos dois tipos de embalagens (Tabelas 2 e 3). Este gênero foi o que apresentou maior diversidade de espécies, sendo identificados 81 isolados das espécies: *P. brevicompactum* (25 isolados), *P. roquefortii* (12), *P. citrinum* (11), *P. solitum* (6), *P. minioluteum* (5), *P. chrysogenum* (4), *P. crustosum* (3), *P. fellutanum* (2), *P. corylophilum* (3), *P. aurantiogriseum* (2), *P. wakamanii* (2), *P. funiculosum* (1), *P. purpurogenum* (1), *P. janthinellum* (1), *P. expansum* (1), *P. viridicatum* (1) e *P. implicatum* (1). O gênero *Penicillium*, identificado em número reduzido imediatamente após a colheita, é mais comum em grãos armazenados, pois trata-se geralmente de espécies xerófilas (Pitt & Hocking, 1997).

*P. brevicompactum* foi isolado e identificado em frutos na árvore (2 isolados), no 14º dia (9), 18º dia (1), 20º dia de secagem (12) e durante o armazenamento em embalagem semipermeável no 84º dia (1) (Tabelas 2 e 3). No 20º dia de secagem os frutos apresentavam-se com 13,74% de umidade, o equivalente a 0,63 de atividade de água, valor abaixo do valor mínimo registrado em literatura (0,78). A segunda espécie de *Penicillium* mais abundante foi *P. roquefortii*, representando 14,8% do total de isolados deste gênero. Esta espécie foi isolada e identificada em frutos de café na árvore (1 isolado) no 14º dia de secagem (1), 18º dia de secagem (6) e 20º dia de secagem dos frutos (2) e com 1 isolado durante armazenamento aos 40 dias em embalagem semipermeável e aos 87 dias em embalagem de aniagem (1) (Tabela 3). Apesar de ser uma espécie isolada freqüentemente de produtos refrigerados, neste trabalho apresentou 1 isolado em cada embalagem usada no armazenamento a 3 °C.



*P. citrinum* foi isolado e identificado em frutos de café com umidade entre 19,49% e 13,74% (14, 18 e 20 dias de secagem) com 1 isolado cada dia. Durante o armazenamento foi encontrado em embalagem de aniagem (87º dia) com 1 isolado identificado em embalagem semipermeável no 40º dia (2 isolados), 84º (1) e 136º (2) dia de armazenamento.

Foram identificados 112 isolados do gênero *Aspergillus* pertencentes às espécies: *A. flavus* (53 isolados), *A. niger* (42), *A. ochraceus* (12), *A. tamarii* (1), *A. sydowii* (1), *A. foetidus* (1) e *A. dimorphicus* (2). Estes isolados foram detectados a partir do 8º dia de secagem dos frutos de café em terreiro, tendo maior incidência durante o armazenamento, representando 59,6% do total de isolados (Tabelas 2 e 3). *A. flavus*, a espécie mais incidente, apresentou-se mais comum durante o armazenamento em 132 e 136 dias nos dois tipos de embalagem, sendo possível notar maior número de isolados na embalagem de aniagem. Foi detectado a partir do 8º dia de secagem (1 isolado), como também no 12º (1), 14º (1), 18º (1), 20º (3) e 22º dia de secagem (5).

*Aspergillus niger* representou 37,5% do total de isolados de *Aspergillus* sendo encontrado somente no último dia de secagem dos frutos (22º dia) com 20 isolados e durante o armazenamento em embalagem de aniagem (132 dias) e semipermeável (136 dias) (Tabelas 2 e 3). *A. ochraceus* foi a espécie encontrada somente ao 20º dia de secagem, não sendo detectada em nenhum outro dia de secagem ou armazenamento dos grãos de café.

Foi observado, neste trabalho, que durante o período de secagem dos frutos em terreiro, há incidência de várias espécies de fungos filamentosos, porém em número reduzido, enquanto, no período de armazenamento, a diversidade de espécies fúngicas diminui e prevalecem espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, constantemente presentes em grãos armazenados. Espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são muito incidentes nos alimentos secos e/ou armazenados, sendo geralmente espécies xerófilas que aí encontram condições

favoráveis à colonização, como disponibilidade do substrato (antes altamente comprometido com a colonização de bactérias e leveduras que exigem maior  $a_w$  e apresentam reduzidos tempos de geração), temperatura e  $a_w$  suficientes para germinação dos esporos.

É possível também a maior incidência de fungos filamentosos durante o período de estocagem, quando o grão não apresenta mais defesa contra invasores microbianos. Com o aumento da idade dos grãos há perda de vigor e gradual morte, o que aumenta o crescimento de fungos saprófitas (Pettersson & Schnürer, 1998). O café para comercialização também é armazenado na forma de grãos, sendo, portanto, tão susceptível ao ataque fúngico como qualquer outro grão armazenado.

Além disso, a incidência de fungos pode ser comprometida pela atividade antifúngica de bactérias e leveduras. Frändberg & Schnürer (1998) observaram a atividade quitinolítica de bactérias Gram positivas e negativas sobre fungos do gênero *Penicillium*. Também em 1998, Pettersson & Schnürer observaram que a presença das leveduras *Pichia anomala* e *P. guilliermondii* inibiram o crescimento de *Penicillium roquefortii*. Estes microrganismos também foram identificados nos frutos de café em que se constatou, quando na presença destas leveduras, que *P. roquefortii* apresentava incidência baixa ou zero. No 18º dia de secagem quando a incidência deste fungo foi maior, a incidência de *P. anomala* restringiu-se a um isolado.

*Debaryomyces hansenii* também apresenta atividade antifúngica e até está sendo estudada como possível controle biológico a fim de se evitar a degradação de frutos e grãos estocados (Payne & Bruce, 2001). Em frutos de café a incidência de fungos em relação a esta levedura foi sempre inversamente proporcional, ou seja, quanto maior a incidência de *D. hansenii*, menor a de fungos e vice-versa. Outras leveduras identificadas não apresentam potencial antimicrobiano até então relatado em literatura, porém podem ser importantes

para a fermentação do café natural por apresentarem atividade de pectina liase, como as espécies *Pichia burtonii*, *Debaryomyces polymorphus*, *Arxula adenivorans*, *P. holstii* e *P. anomala*.

Além de fatores abióticos como temperatura e atividade de água, a interação microbiana pode ser regida pela carga genética dos microrganismos que compõem as comunidades durante o processo de maturação e secagem dos frutos. No início da fermentação dos frutos de café natural (início da secagem em terreiro) é possível que haja a utilização de açúcares simples como glicose, sacarose e frutose, diminuindo, assim, a quantidade destes açúcares para outros microrganismos. Polímeros complexos como a celulose e pectina podem passar a assumir o papel principal como fonte de carbono, sendo que a sua utilização depende do processo de despolimerização. Em relação às enzimas celulolíticas, sabe-se que se trata de um complexo enzimático (Wong, 1995) que na maioria das vezes não é sintetizado por uma só espécie. Assim, há uma cooperação entre microrganismos para degradar totalmente a celulose até moléculas de glicose.

Outros dois gêneros de fungos filamentosos foram isolados e identificados de frutos de café: *Pestalotia* e *Paecilomyces*. Os isolados destes fungos não foram identificados até espécie e foram encontrados no período inicial de secagem, quando os frutos tinham 67,45% e 60,63% de umidade (0 e 2 dias de secagem, respectivamente).

O terceiro grupo microbiano isolado e identificado de frutos e grãos de café foi o de leveduras. Estes microrganismos apresentaram menor incidência dentre os isolados (155 isolados identificados) e 21 diferentes espécies: *Debaryomyces hansenii* (66), *Pichia guilliermondii* (33), *Stephanoascus smithiae* (10), *Pichia anomala* (11), *Debaryomyces polymorphus* (5), *Arxula adenivorans* (5), *Pichia sydowiorum* (3), *Candida fermentati* (3), *Candida saitoana* (2), *Pichia holstii* (2), *Candida membranifaciens* (2), *Pichia burtonii* (2), *Saccharomyces kluyveri* (2), *Zygoascus hellenicus* (2), *Debaryomyces*

*anomala* (1), *Pichia subpelliculosa* (1), *Saccharomyces cerevisiae* (1), *Kluyveromyces lactis* (1), *Pichia jadinii* (1), *Dekkera bruxellensis* (1), *Citeromyces matritensis* (1) (Tabelas 2 e 3).

A espécie *Debaryomyces hansenii*, que representa 42,6 % do total de isolados de leveduras, só não foi isolada no 2º, 12º e 22º dias de secagem, apresentando, portanto, ampla distribuição durante o processamento dos frutos. Durante o armazenamento esta espécie foi isolada uma única vez aos 40 dias de armazenamento em embalagem semipermeável. *Pichia guilliermondii* representou 20,6% do total de isolados de leveduras, sendo isolado e identificada até o 8º dia de secagem e no 20º dia de secagem, não sendo detectada nos demais dias de secagem e nem durante o armazenamento em quaisquer das embalagens testadas. Estas duas espécies mais incidentes do grupo leveduriforme foram capazes de atuar em pectina contida em meio sintético, portanto, *in natura*, ou seja, nos frutos de café, estas leveduras poderiam atuar na despolimerização da pectina contida na mucilagem e polpa do café.

As demais espécies identificadas de leveduras foram isoladas em todos os dias de secagem dos frutos em terreiro, durante os 40 dias de armazenamento em embalagem semipermeável e aos 132 dias em embalagem de aniagem, sendo que as espécies *Saccharomyces cerevisiae*, *Dekkera bruxellensis*, *Saccharomyces kluyverii* e *Pichia subpelliculosa* foram isoladas a partir do 18º dia de secagem até o 22º dia de secagem no terreiro, não sendo detectadas durante o armazenamento.

## 4 CONCLUSÕES

A partir dos isolamentos da microbiota externa dos frutos e grãos de café, conclui-se que:

▶ Existe uma sucessão microbiana nestes substratos durante o período de secagem e armazenamento do café natural que pode ser influenciada pela umidade dos frutos e grãos, temperatura, competição pelo substrato, capacidade enzimática das espécies colonizadoras e atividade antimicrobiana.

▶ Ocorreu inicialmente o predomínio de isolados de bactérias (275), seguidos por fungos filamentosos (263) e leveduras (155). Opostamente, a ordem em número de espécies segue com predomínio de fungos filamentosos (36 espécies), seguidos de bactérias (28) e leveduras (21).

▶ Durante o armazenamento, grãos estocados em embalagem de aniagem apresentaram maior número de isolados de fungos filamentosos (55 isolados) comparados a grãos estocados em embalagem semipermeável (39 isolados). Números similares de bactérias e leveduras foram detectados nos dois tipos de embalagem para estocagem.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGATE, A. D.; BHAT, J. V. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of coffee robusta cherries. *Applied Microbiology*, New York, v. 14, n. 2, p. 256-260, Mar. 1966

AHMAD, R.; MAGAN, N.; Microfloral contamination and hydrolytic enzymes differences between monsooned and non-monsooned coffees. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 34, n. 4, p. 279-282, 2002.

ALVES, E. **População fúngica associada ao café (*Coffea arabica* L.) beneficiado e as fases pré e pós colheita- relação com a bebida e local de cultivo.** 1996. 48 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

AMORIM, H. V.; AMORIM, V. L. Coffee enzymes and coffee quality. In: ORY, R. L.; ANGELO, A. J. St. (Ed.). *Enzymes in food and beverage processing*, Washington: American Chemical Society, 1977. n. 47, p. 27-55.

AMORIM, H. V.; MELLO, M. Significance of enzymes in non alcoholic coffee beverage. In: FOX, P. F. (Ed.). *Food Enzymology*. Amsterdam: Elsevier, 1991. v. 2, p. 189-209.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4. ed. New York: Library Macmillan Company, 1987. 218 p.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. *Yeast- characteristics and identification*. 3. ed. 2000. 1139 p.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G. Identificação de espécies toxigênicas de *Aspergillus* associadas aos grãos de café armazenados. *Revista Brasileira de Armazenamento*, Viçosa, n. 3, p. 11-16, 2001. Especial Café.

BITANCOURT, A. A. As fermentações e podridões da cereja de café. *Boletim da Superintendência dos Serviços do Café*, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 7-14, jan. 1957.

BLANDÓN- CASTANO, G.; RODRÍGUEZ- VALENCIA, N.; DÁVILA-ARIAS, M. T. Caracterización microbiológica y fisico-química de los productos

del beneficio del café en proceso de compostaje. *Cenicafé, Chinchina*, v. 49, n. 3, p. 169-185, jul./sept. 1998.

BOOTH, C. *The genus Fusarium Surrey: Commonwealth mycological Institute*, 1971. p. 237

CARVALHO, V. D.; CHAGAS, S. J. R.; CHALFOUN, S. M. Fatores que afetam a qualidade do café. *Informe Agropecuário, Belo Horizonte*, v. 18, n. 187, p. 5-20, 1997

CARVALHO, V. D.; CHALFOUN, S. M.; CHAGAS, S. J. de R. Relação entre classificação de café pela bebida e composição físico-química, química e microflora do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS 15., 1989, Maringá. *Resumos...* Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989. p. 25-26.

COUGHLAN, M. P.; MAYER, F. The cellulose-decomposing bacteria and their enzymes systems. In: BALOWS, A.; TRUPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, w.; SCHLEIFER, K-H. *The Prokaryotes*. Berlin: Springer-Verlag, 1991. v. 1, Cap. 20, p. 460-516.

DAIVASIKAMANI, S.; KANNAN, N. Studies on Post-Harvest Mycoflora Of Coffee Cherry Os Robusta. Brief note. *Journal Coffee Research, Balehonnur*, v. 16, n. 3/4, p. 102-106, 1986.

FOOD DRUGS ADMINISTRATION - *Bacteriological Analytical Manual*. Washington: AOAC International, 1972.

FRÄNDBERG, E.; SCHNÜRER, J. Antifungal activity of chitinolytic bacteria isolated from airhigh stored cereal grain. *Canadian Journal of Microbiology, Ottawa*, v. 44, n. 2, p 121-127, Feb. 1998.

FRANK, H. A.; LUM, N. A.; DELA CRUZ, A. S. Bacteria responsible for mucilage layer decomposition in Kona coffee cherries. *Applied Microbiology, New York*, v. 13, n. 2, p. 201-207, 1965.

HAHN-HAGERDAL, B. Water activity: a possible external regulator in biotechnical processes. *Reviews. Enzyme Microbial Technology, Woburn*, v. 8, n. 6, p. 322-327, June 1986.

HASAN, H. A. H. Anti- toxigenic properties of coffee and tea. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON FUNGI, 1., 1996, Cairo. **Proceedings....** Cairo: Hopes & Challenges, 1996. v. 1, p. 75-78.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, Baltimore, 1994. 787 p.

JHAM, G. N.; FERNANDES, S. A.; GARCIA, C. V.; SILVA, A. A. da. Comparison of GC and HPLC for the Quantification of Organic Acids in Coffee. **Phytochemical Analysis, Sussex**, v. 13, n. 2, p. 99-104, Mar./Apr. 2002.

KRUG, H. P. Cafés Duros III. Relação entre a porcentagem de microrganismos e qualidade do café. **Revista do Instituto do Café, São Paulo**, v. 27, n. 163, p. 1827- 1831, set. 1940

LIARDON, R.; SAPADONE, J. C.; BRAENDLIN, N.; DENTAN, E. Multidisciplinary study of Rio flavour in Brazilian green coffee. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON THE CHEMISTRY OF COFFEE, 13., 1989, Paipa. **Proceedings....** Paipa: ASIC, 1989. p. 117-126.

LINDOW, S. E.; ANDERSEN, G. L. Influence of immigration on epiphytic bacterial populations on navel orange leaves. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 8, p. 2978-2987, Aug. 1996.

MAGAN, N.; LACEY, J. Ecological determinants of mould growth in stored grain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 245-256, Dec. 1988.

MAGAN, N.; LACEY, J. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. **Transactions British Mycological Society**, London, v. 82, n. 1, p. 83-93, Jan. 1984.

MEIRELLES, A. M. A. Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais. 1990. 71 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MILLS, J. T. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereals seeds. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 52, n. 10, p. 737-742, Oct. , 1989.



- MISLIVEC, P. B.; BRUCE, V. R.; GIBSON, R. Incidence of Toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 46, n. 11, p. 969-973, Nov. 1983.
- MONACO, L. C. Armazenamento do café. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, São Paulo, v. 36, n. 417, p. 15-16, nov. 1961.
- MOSS, M. O. The environmental factors controlling mycotoxin formation. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. (Ed.). **Mycotoxins and animal foods**. New York: CRC Press, 2000. Cap. 2, p. 37-116.
- NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium species - an Illustrated Manual for Identification**. EUA, 1983. 193 p.
- PAYNE, C.; BRUCE, A. The yeast *Debaryomyces hansenii* as a short term biological control agent against fungal spoilage of sawn *Pinus sylvestris* Timber. **Biological Control**, San Diego, v. 22, n. 1, p. 22-28, Sept. 2001.
- PELCZAR Jr, J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. 1996. v. 1, 524 p.
- PEREIRA, R. T. G. **Influência de *Cladosporium cladosporioides* na qualidade da bebida de café**. 2002. 42 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PÉREZ, J.; INFANTE, F.; VEGA, F. E.; HOLGUÍN, F.; MACÍAS, J.; VALLE, J.; NIETO, G.; PETERSON, S. W.; KURTZAN, C. P.; O'DONNELL, K. Mycobiota associated with the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) in Mexico. **Mycological Research**, New York, v. 107, n. 7, p. 879-887, July 2003.
- PETERSSON, S.; SCHNURER, J. *Pichia anomala* as a biocontrol agent of *Penicillium roquefortii* in high moisture wheat, rye, barley, and oats stored under airtight conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, n. 5, p. 471-476, May 1998.
- PITT, J. I.; BASÍLICLO, J. C.; ABARCA, M. L.; LÓPEZ, C. Mycotoxins and toxigenic fungi. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, p. 41-46, 2000. Supplement 1.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. Cambridge: Chapman e Hall, 1997. 593 p.

ROUSSOS, S.; ANGELES AQUIÁHUATL, M.; TREJO-HERNÁNDEZ, M. R.; GAIME PERRAUD, I.; FAVELA, E.; RAMAKRISHNA, M.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Biotechnological management of coffee pulp- isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. *Applied Microbiology Biotechnology*, Berlin, v. 42, n. 5, p. 756-762, Jan. 1995.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. *Introduction to food-borne fungi*. 4. ed. Wageningen: Centraalbureau Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 2000.

SAUTOUR, M.; MANSUR, C. S.; DIVIES, C.; BENSOUSSAN, M.; DANTIGNY, P.; Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Hampshire, v. 28, p. 311-315, 2002.

SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil, *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 60, n. 2/3, p. 251-260, Sept. 2000.

SINHA, R. N. Ecology of microflora in stored grain. *Annales de Technologie Agricole*, Paris, v. 28, n. 2, p. 191-209, 1979.

SOUZA, J. C.; REIS, P. R. *Broca-do-café: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos, monitoramento e controle*. Belo Horizonte: EPAMIG, 1997. (EPAMIG. Boletim Técnico, n. 50).

VAN PEE, W.; CASTELEIN, J. M. Study of the pectinolytic microflora, particularly the Enterobacteriaceae, from fermenting coffee in the Congo. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 37, n. 2, p. 171-174, Mar./Apr. 1972.

YAMAOKA-YANO, D. M.; MAZZAFERA, P. Degradation of caffeine by *Pseudomonas putida* isolated from soil under coffee cultivation. *Allelopathy Journal*, Hisar, n. 5, v. 1, p. 23-34, 1998.

WOSLACKI, G. *Enzimas pectinolíticas de Fusarium oxysporum Schlecht EX. Fr. isolado de frutos de café*. 1977. 73 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de Campinas, Campinas, SP.

**WONG, D. W. S. Cellulolytics Enzymes. In: \_\_\_\_\_. Food enzymes - structure and mechanism. Cambridge: Chapman & Hall, 1995. p. 85-114.**

## **CAPÍTULO 3**

### **CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DO COMPLEXO CELULOLÍTICO, HEMICELULOLÍTICO E PECTINOLÍTICO DA MICROBIOTA EPIFÍTICA DE FRUTOS E GRÃOS DE CAFÉ NATURAL**

## RESUMO

SILVA, C. F. Caracterização enzimática do complexo celulolítico, hemicelulolítico e pectinolítico da microbiota epifítica de frutos e grãos de café natural. In: \_\_\_\_\_. Sucessão microbiana e caracterização enzimática da microbiota associada a frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.) do município de Lavras- MG. 2004. p 89-127. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A intensa e diversificada microbiota presente na superfície dos frutos de café natural sugere a participação destes na fermentação/secagem durante o período de permanência dos frutos em terreiros de secagem. Durante o período de secagem ocorrem mudanças na composição química dos frutos oriundas de atividades enzimáticas de origem microbiana, principalmente enzimas do complexo celulolítico, hemicelulolítico e pectinolítico. A fim de se avaliar o potencial enzimático da microbiota epifítica procedeu-se a qualificação e ou quantificação de exoglucanase, endoglucanase,  $\beta$  glicosidase, xilanase, poligalacturonase (PG) e pectina liase (PL) de fungos, bactérias e leveduras. Dentre as espécies fúngicas destacou-se *Aspergillus dimorphicus* com maiores atividades de exo e endoglucanase (145,5 e 42,2  $\mu\text{g}$  glicose/min./mg proteína, respectivamente). *Fusarium semitectum* apresentou somente atividade pectinolítica. Nenhuma espécie das bactérias estudadas sintetizou PG, porém *Yersinia pseudotuberculosis*, *Enterobacter agglomerans*, *E. aerogenes*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas putrefaciens* e *Providencia mirabilis*, *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. polymyxa*, *B. cereus*, *B. macerans*, *B. megaterium* e *Kurthia* sintetizaram PL. Espécies de leveduras como *Pichia guilliermondii* e *Debaryomyces hansenii* que apresentaram alta incidência em frutos foram capazes de secretar PG e PL. Espécies de bactérias e leveduras apresentaram menor atividade celulolítica quando comparadas aos fungos filamentosos.

---

Comitê orientador: Dr<sup>a</sup> Rosane Freitas Schwan- UFLA (Orientador), Dr Eustáquio Souza Dias- UFLA.

## ABSTRACT

SILVA, C. F. Enzymatic characterization of the cellulolytic, hemicellulolytic and pectinolytic compounds of the epifitic microbial fruits and natural coffee beans. In: \_\_\_\_\_. **Microbial succession and enzymatic characterization of the microbial associated of fruits and coffee beans (*Coffea arabica* L.) of the municipal district of Lavras – MG. 2004. p. 89-127. Thesis (Doctorate in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.**

The intense and diversified microbial present in the surface of the fruits of natural coffee suggests the participation of these microorganisms in the fermentation/drying period of coffee beans. During the drying period several changes occur in the chemical composition of the fruits originating from of microbial enzymatic activities, mainly enzymes of the cellulolytic, hemicellulolytic and pectinolytic complex. In order to evaluate the enzymatic potential of the epiphytic microorganisms it was analysed teh enzymes, exoglucanase, endoglucanase,  $\beta$  glicosidase, xilanase, poligalacturonase (PG) and pectin liase (PL) produced by fungi, bacterias and yeasts. Among the fungi species *Aspergillus dimorphicus* showed higher activity of exo and endoglucanase (145.5 and 42.2  $\mu\text{g}$  glicose/min/mg protein, respectively). *Fusarium semitectum* presented only pectinolytic activity. None of the species studied synthesized PG, however *Yersinia pseudotuberculosis*, *Enterobacter agglomerans*, *E. aerogenes*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas putrefaciens* and *it Providencia mirabis*, *B. subtilis*, *B.anthraxis*, *B. polymyxa*, *B. cereus*, *B. macerans*, *B. megaterium* and *Kurthia* synthesized PL. Species of yeasts as *Pichia guilliermondii* and *Debaryomyces hansenii* that were presented at high incidence in the coffee fruits were capable to secrete PG and PL. Species of bacterias and yeasts presented smaller activity cellulolytic when compared to the fungi.

---

Guidance committee: Ds Rosane Freitas Schwan - UFLA (Major Professor),Ds Eustáquio Souza Dias – UFLA.

## 1 INTRODUÇÃO

A maioria dos microrganismos obtém energia através do consumo do substrato por eles colonizado. Para tanto, substratos complexos, como pectinas e celulosas, sofrem hidrólise enzimática, tornando-se, assim, disponíveis ao metabolismo microbiano.

A polpa e mucilagem dos frutos de café constituem substratos para colonização de leveduras, bactérias e fungos filamentosos, que para utilizá-los como fonte de carbono necessitam de enzimas específicas. Celulases, pectinases e xilanases são, então, secretadas indutivamente e excretadas hidrolisando, respectivamente, celulose, pectinas e hemicelulosas, formando, com a despolimerização carboidratos assimiláveis ou fermentáveis como glicose, sacarose, celobioses, arabinoses, galactoses.

Algumas espécies de fungos filamentosos são conhecidas como bons produtores de celulases e usados industrialmente para produção comercial destas enzimas. Sendo a celulose o polímero orgânico mais abundante na natureza, sua degradação representa uma nova perspectiva ecológica (Goyal et al., 1991).

As celulases englobam enzimas hidrolíticas e oxidativas que degradam a celulose (Goyal et al., 1991). A molécula de celulose é constituída de monômeros de glicose em ligações  $\beta$ -1,4 e, apesar de aparentemente simples, a molécula de celulose apresenta regiões altamente complexas, que são as regiões cristalinas.

O ataque das enzimas celulolíticas acontece de modo específico e sinérgico (Wong, 1995). Endoglucanases (1,4-  $\beta$  D-glucano 4-glucanohidrolase) são as primeiras enzimas que atacam a molécula aleatoriamente nas ligações glicosídicas  $\beta$  1,4. A ação da exoglucanase (1,4,  $\beta$  D- glucano celobiohidrolase) segue a da endoglucanase, atuando nas porções

finais não redutoras da molécula. Nesta ação liberam-se celobioses, que serão substrato para  $\beta$  glicosidase ( $\beta$  D-glicosídeo glicohidrolase), liberando moléculas de glicose.

As xilanases atuam na degradação das paredes celulares vegetais que, além de celulose, são constituídas de hemiceluloses. Estas se constituem principalmente de xilanas em ligações  $\beta$  D-xilopiranosil.

As enzimas pécticas são amplamente usadas em indústrias de alimentos, como a de sucos, indústria têxtil, vinicultura, a de extração de óleo e a fermentação de cacau e café. O complexo pectinolítico envolve enzimas desmetoxilantes (pectina metil esterase) e despolimerizantes (pectina liase, poligalacturonase, pectato liase e protopectinases).

Assim, objetivou-se a caracterização enzimática dos isolados microbianos oriundos de frutos e grãos de café e a determinação da(s) espécie(s) com maior potencial para a fermentação dos frutos de café, assim a como potencialização do uso desta(s) espécie(s) na agroindústria e indústrias de alimentos ou químicas.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismos

Os isolados foram obtidos da superfície dos frutos e grãos de café amostrados na região Sul de Minas Gerais. Após a identificação das espécies, foi escolhido um isolado de cada espécie mais freqüente ou já isolada de frutos e grãos de café para a quantificação e/ou qualificação de produção de exo glucanase, endo glucanase,  $\beta$ -glicosidase e xilanase. As espécies testadas foram as seguintes: i) Fungos filamentosos: *Fusarium stilboides*, *F. semitectum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium implicatum*, *P. crustosum*, *P. citrinum*, *P. restrictum*, *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *A. flavus*, *A. dimorphicus*; ii) Leveduras: *Debaryomyces hansenii*, *Pichia guilliermondii*, *P. burtonii*; iii) Bactérias: *Bacillus cereus*, *B. anthracis*, *B. subtilis*, *B. fastidiosos*, *B. macerans*, *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *Arthrobacter* sp, *Kurthia* sp, *Klebsiella ozanae*, *Enterobacter cloacae*. Foi realizado o teste qualitativo de Poligalaturonase (PG) e Pectina liase (PL) em todas as espécies identificadas neste trabalho, exceto em *F. stilboides*, *P. implicatum*, *P. restrictum*, *Cladosporium cladosporioides* para PG e *P. restrictum* *Cladosporium cladosporioides* para PL. Os resultados positivos no teste qualitativo de PL foram confirmados pelo teste quantitativo para as espécies de fungos filamentosos.

### 2.2 Caracterização enzimática de fungos filamentosos, bactérias e leveduras

#### 2.2.1 Atividade de exo $\beta$ - 1,4 glucanase (EC 3.2.1.91)

Os isolados foram inoculados em Erlenmeyer contendo 200 mL de meio M<sub>3</sub>M líquido modificado (sacarose 1%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2%; MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O 0,1%; peptona 0,6%; extrato de levedura 0,6%), substituindo-se a sacarose pelo indutor

Avicel<sup>R</sup>. Os frascos ficaram sob agitação a 150 rpm a 30 °C durante 16 dias. Em intervalos de 2 dias foram retirados 10 mL do meio de cultivo, os quais foram considerados como fonte enzimática. As amostras ficaram congeladas para posterior dosagem da atividade enzimática. Os isolados de bactérias e leveduras foram cultivados em 5 mL do meio de cultura acima citado por 24 h.

A atividade de exo glucanase foi mensurada por método espectrofotométrico indireto, utilizando hidrazida do ácido p- hidroxibenzóico 1% (PAHBAH) para a dosagem de glicose liberada pela ação da enzima (Lever, 1972). Para a reação foram utilizados 50 µL da fonte enzimática e 450 µL de Avicel<sup>R</sup> 1% em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0) como substrato. Após 30 minutos de incubação a 50 °C, a reação foi paralisada com adição de 1,5 mL de hidrazida do ácido p- hidroxibenzóico 1% (PAHBAH). Em seguida, a mistura foi aquecida a 100 °C por 5 minutos e, logo após, resfriada em gelo.

A leitura da absorbância foi realizada a 410 nm contra branco (1,5 mL de PAHBAH + 0,5 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M). Para cada amostra foram realizadas 3 repetições. As leituras das amostras foram subtraídas do controle (mistura sem incubação prévia) e os resultados, plotados em curva padrão de glicose, representando a produção em atividade específica (µg glicose / min/ mg proteína).

### **2.2.2 Atividade de endo β- 1,4 glucanase (EC 3.2.1.4)**

Para determinação da atividade de endo β- 1,4 glucanase foi realizado o cultivo dos isolados como descrito no item anterior, tendo como indutor Carboximetilcelulose (CMC).

Para a reação foram utilizados 50 µL da fonte enzimática e 450 µL de Carboximetilcelulose 1% em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0) como substrato. A mistura foi incubada a 50 °C por 30 minutos e a reação foi paralisada com adição de 1,5 mL de hidrazida do ácido p- hidroxibenzóico 1%

(PAHBAH). Em seguida, a mistura foi aquecida a 100 °C por 5 minutos e, logo após, resfriada em gelo.

A leitura da absorbância foi realizada a 410 nm contra branco (1,5 mL de PAHBAH + 0,5 mL de tampão acetato de sódio 0,05M). As leituras das amostras foram subtraídas do controle (mistura sem incubação prévia) e os resultados, plotados em curva padrão de glicose, representando a produção em atividade específica,  $\mu\text{g}$  glicose / min/ mg proteína.

### 2.2.3 Atividade de $\beta$ glicosidase (EC 3.2.1.21)

Para quantificação da atividade enzimática de  $\beta$  glicosidase, foi utilizado como indutor Celobiose 1% nas mesmas condições de cultivo descritas anteriormente. A mistura da reação consistiu de 300  $\mu\text{L}$  de p-nitrofenil glucopiranosídeo, como substrato, e 200  $\mu\text{L}$  da fonte enzimática. A mistura da reação foi incubada a 50 °C por 30 minutos, sendo paralisada pela adição de 1 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M. Os resultados da atividade foram obtidos subtraindo-se os valores das absorbâncias das amostras e controle obtidos em leitura a 405 nm e plotando-se em curva padrão de p-nitrofenol. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de p- nF/ min/ mg proteína.

Foram testadas todas as espécies anteriormente citadas exceto, *F. semitectum*, *A. dimorphicus*, *A. ochraceus* e *A. flavus*.

### 2.2.4 Determinação da atividade xilanolítica

Para determinação de xilanase foram utilizados os mesmos procedimentos de cultivo e coleta descritos no item 2.2.1. O indutor utilizado foi Carboximetilcelulose 1%.

A atividade xilanolítica foi observada em mistura contendo 200  $\mu\text{L}$  do substrato (Xilana carboximetilada marcada com remazol brilhante azul - "CM-xylan- RBB") + 200  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio 0,05 M + 100  $\mu\text{L}$  da fonte

enzimática. Após a incubação da mistura a 30 °C por 60 minutos a reação foi paralisada pela adição de 1 mL de HCl 2 N e centrifugada a 10.000g (12.200 rpm) a 4 °C por 5 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Os resultados foram expressos em unidades de absorvância / h/ mg proteína, subtraindo-se os valores do controle (300 µL de tampão acetato 0,05 M + 200 µL de "Cm- xylan-RBB"+ 500 µL HCl 2 N).

### **2.2.5 Dosagem de proteínas totais**

A dosagem de proteínas foi obtida segundo o método de Bradford (1976), que consistiu em reação com 1200 µL de amostra e 300 µL de reagente de Bradford concentrado, acrescido sob agitação. Após 5 minutos procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. O aparelho foi calibrado com 1200 µL do meio M<sub>3</sub>M e 300 µL do reagente concentrado de Bradford. A concentração de proteínas foi expressa µg de proteína / 1200 µL e obtida pela plotagem em curva padrão de albumina de soro bovino (BSA)

### **2.2.6 Determinação da atividade de poligalacturonase (PG)**

A atividade de poligalacturonase foi determinada pelo método qualitativo verificado em placa com meio sintético MP5 (glicose 0,5%; ácido poligalacturônico 0,5%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5%; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,6%; extrato de levedura 0,1%; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2%; agar 1,5% e 1 mL das soluções, FeSO<sub>4</sub> 0,2g/200 mL; MgSO<sub>4</sub> 40g/200 mL; CaCl<sub>2</sub> 0,2 g/200 mL; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,002g/200 mL; MnSO<sub>4</sub> 0,002g/ mL; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,014g/ mL; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,01g/mL; MoO<sub>3</sub> 0,002g/mL, pH 5) (Marvin, 1984). A produção da enzima foi verificada pela formação de halos claros ao redor da colônia após a adição de solução Brometo de Cetil Trimetil Amônio a 1 % (Cetrimida).

### **2.2.7 Determinação da atividade de pectina liase (PL)**

Para o exame do teste qualitativo realizou-se o cultivo dos microrganismos em placa com meio sintético MP7. Este meio apresenta a mesma composição química do meio MP5, porém substituindo o ácido poligalacturônico por pectina e com ajuste de pH a 7. A produção da enzima foi verificada pela formação de halos claros ao redor da colônia após a adição de solução Brometo de Cetil Trimetil Amônio a 1 % (Cetrimida).

A quantificação da produção de PL foi determinada de acordo com o método de Albersheim (1966) citado por Sakiyama (2001), em que uma unidade de pectina liase foi definida como a quantidade de enzima que libera um nmol de uronídeos insaturados/minuto, nas condições de ensaio. O coeficiente de extinção molar para os produtos insaturados foi de  $5550 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **2.2.8 Determinação da atividade de proteases**

A cada cultivo dos isolados acima citados nos diferentes indutores, realizou-se a determinação da atividade de proteases. Os ensaios consistiram de 2 mL de caseína 2% em tampão Tris-HCl (pH 9) com 1 mL da fonte enzimática. Ao quais foram incubados a 37 °C por 1 hora. A reação foi paralisada com 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%; em que as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 6 minutos e o sobrenadante foi lido em espectrofotômetro a 280 nm. A unidade de atividade de proteases foi expressa em número de aminoácidos livres/min/mL.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

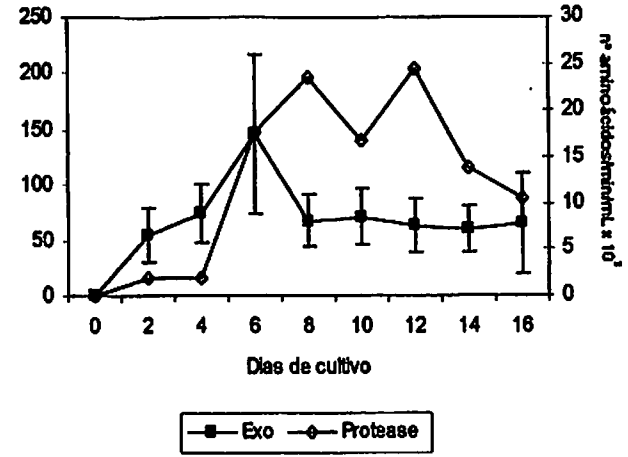
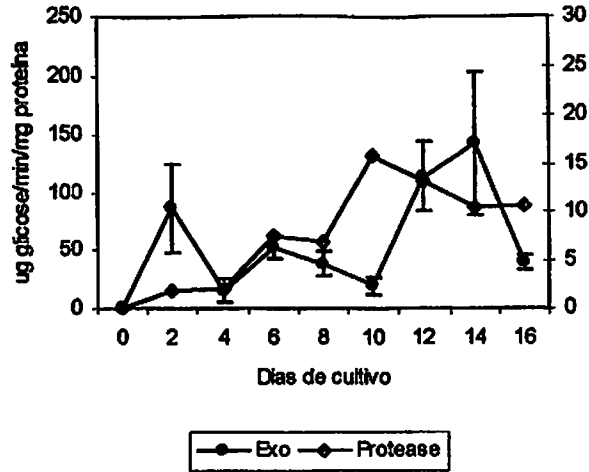
Sendo a celulose o mais abundante polímero do mundo, não é de se surpreender que a celulólise ocorra por diversas classes de fungos (Goyal et al., 1991). A produção e a utilização de enzimas celulolíticas são de grande interesse em pesquisas em tecnologia de fermentações que visam à otimização da sacarificação dos resíduos de celulose por diversos microrganismos (Tong & Rajendra, 1992). Para o processamento do café natural, a celulólise é importante porque diminui o período de secagem dos frutos nos terreiros, associada às enzimas pécnicas, além de ser uma forma alternativa como potencial biotecnológico para aproveitamento do resíduo de café, principalmente na compostagem (Blandón et al., 1999).

No processamento úmido de café foi observado que a adição de enzimas pécnicas aos grãos de café reduziu em até 73% o tempo de degradação da mucilagem (Jones & Jones, 1984). No processamento do café natural a seleção de microrganismos que acelerem o processo de degradação da polpa e mucilagem poderia incrementar a qualidade final da bebida, pois reduziria o tempo de exposição dos frutos de café a microrganismos deteriorativos.

Neste trabalho realizado com fungos isolados da superfície de frutos e grãos de café natural foi observado que a análise quantitativa de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e pectinolíticas revelou uma grande variação na produção pelos fungos testados com relação tanto às espécies quanto durante o período de cultivo. *Aspergillus dimorphicus* apresentou a maior produção de exo glucanase (145,5 µg glicose/min/mg proteína), semelhantemente a *A. flavus* (142 µg glicose/min/mg proteína) (Figura 1), tendo, opostamente, os fungos *Penicillium citrinum*, *P. restrictum*, *A. ochraceus* e *Fusarium semitectum* produção nula desta enzima, como mostra a Tabela 1.



A Figura 1 também apresenta a atividade de proteases quantificadas a partir dos cultivos de *A. flavus* e *A. dimorphicus*.



**FIGURA 1** (A) Atividade enzimática específica de exoglucanase e proteases de *Aspergillus flavus* e (B) *A. dimorphicus* durante os 16 dias de cultivo com 1% de celulose microcristalina como indutor. Atividade de exoglucanase foi determinada pelo método indireto proposto por Lever (1972) e expressa em  $\mu\text{g}$  glucose/min/mg proteína. Atividade de protease é expressa em número de aminoácidos livres/min/mL. As barras verticais indicam o desvio padrão.



**TABELA 1** Valores de atividades específicas máximas e mínimas de todos os fungos testados quanto à produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas.

FUNGOS	EXOGLUCANASE		ENDOGLUCANASE <sup>1</sup>		B GLICOSIDASE <sup>2</sup>		XILANASE <sup>3</sup>	
	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX
<i>A. flavus</i>	14,2	142	1,6	35,5	-	-	9	103,3
<i>A. niger</i>	0,44	0,61	1,25	6,3	0,5	10,8	109,8	894
<i>A. dimorphicus</i>	54,9	145,5	5,7	42,2	-	-	47,7	849,2
<i>A. ochraceus</i>	0	0	2,4	5,5	-	-	4,8	35,8
<i>F. semitectum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>F. stilboides</i>	0,7	4,2	1,8	3,2	2,2	5,8	56,5	135,1
<i>C. cladosporioides</i>	0,48	0,95	0,21	1,11	0,09	8,1	53	220,9
<i>P. implicatum</i>	0	3,61	0	0	0	2104,6	0	0
<i>P. crustosum</i>	0,17	0,7	1	4,6	0,15	0,71	42,7	68
<i>P. citrinum</i>	0	0	3,3	10,8	0	1027,4	0	556,6
<i>P. restrictum</i>	0	0	1,92	23,4	-	-	0	23,4

<sup>1</sup> Atividade específica=  $\mu\text{g}$  glicose/min/mg proteína; <sup>2</sup>  $\mu\text{g}$  pNF/min/mg proteína; <sup>3</sup> UA/h/mg proteína. Valores zero indicam atividade nula; (-) não analisado.

Os valores da atividade da exo glucanase de dois diferentes fungos do gênero *Aspergillus*, que apresentaram maiores atividades durante os 16 dias de cultivo, encontram-se na Figura 1. Os demais fungos testados apresentaram atividade entre 0,6 a 4,2 µg glicose/min/mg proteína (Tabela 1).

*Aspergillus flavus* apresentou maiores atividades de exoglucanase no 12º e 14º dias de cultivo, apresentando queda na atividade ao 16º dia de cultivo. *A. dimorphicus* apresentou um aumento progressivo da atividade enzimática até o 6º dia de cultivo. Após este tempo a atividade decresceu, atingindo níveis de 60 µg glicose/min/mg proteína, e permaneceu praticamente constante nos demais dias de cultivo. Durante todo o cultivo foram observadas oscilações na atividade de exo glucanase, sendo possível inferir que estas variações ocorreram possivelmente devido ao aumento do valor de pH no meio de cultivo (em média pH=8) e da presença de proteases existentes no meio de cultivo (meio de cultivo bruto, pois não houve processo de purificação das enzimas de interesse). Tong & Rajendra (1992), verificando atividade enzimática de *Aspergillus*, também observaram várias oscilações na produção de celulases até o 15º dia, ocorrendo uma queda na produção após este período.

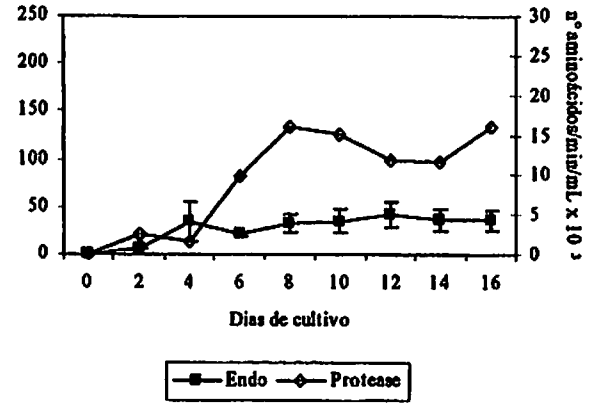
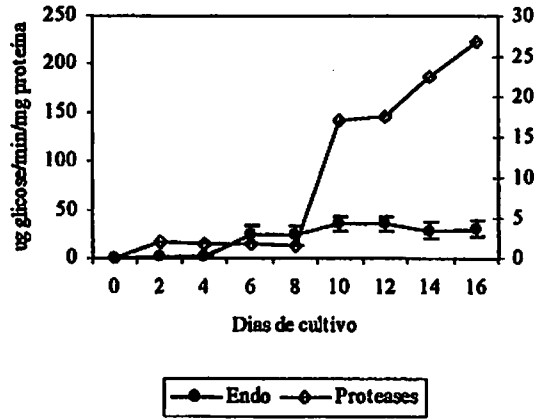
A baixa atividade celulolítica, apresentada pelos demais fungos testados, pode ser resultado de uma indução insuficiente pelos substratos durante o período de cultivo *in vitro* ou por serem estas enzimas que são ativadas a partir da indução por substratos liberados na degradação da parede celular por pectinases (Vidhyasekaran, 1997) ou por atuarem no processo final de infecção da planta (Isaac, 1992). Em relação à ineficiente indução da enzima, no caso do cultivo com celulose microcristalina, um substrato insolúvel, a indução ocorreu por meio de produtos de degradação de celulose solúvel, ou seja, a indução ocorre se há presença de celobiose formada pela ação de celulase a nível basal (Carrel & Canevascini, 1990).

Wong (1995) descreveu alguns fatores que podem interferir na atividade enzimática, relacionados à adsorção da enzima ao substrato, entre eles: pureza do substrato da celulose, grau de cristalinidade, mudanças no substrato durante a hidrólise, possível ligação não produtiva da enzima, inibição pelo produto final, e efeito da temperatura e pH. A falta de adsorção entre enzima e substrato reduz a despolimerização do substrato. Isto é perfeitamente possível de ter acontecido neste trabalho, pois a exoglucanase foi cultivada sob celulose microcristalina, portanto um substrato insolúvel e, assim, menos acessível ao ataque pela enzima. Tal problema pode ser resolvido através da interação sinérgica que ocorre entre endo e exo glucanase. Sabe-se que nem todos os fungos secretam estas duas enzimas, mas naturalmente a interação sinérgica entre endo e exoglucanase ocorre quando o ataque ao substrato celulolítico é feito com a associação simbiótica de dois ou mais fungos (Goyal et al., 1991). A capacidade dos microrganismos de sintetizar a exoglucanase é primordial para sua colonização em um substrato rico em celulose nativa. Em frutos maduros de café a polpa e a mucilagem apresentam celulose em torno de 27,65 e 17% (Elias, 1978), respectivamente, e no grão, em torno de 19% (Tabela 2). Em se tratando de *A. flavus*, que em algumas ocasiões pode ser considerado como patógeno (Vries & Visser, 2001), a secreção de exo enzimas, como as celulases, é uma das facetas para a virulência fúngica (Pascholati, 1995).

A atividade de endoglucanase foi mais expressiva em *A. flavus* e *A. dimorphicus* (35,5 e 42,2 µg glicose/min/mg proteína, respectivamente). *P. citrinum* apresentou máximo de atividade de 10,8 µg glicose/min/mg proteína no 10º dia de cultivo (Tabela 1). *P. implicatum* e *F. semitectum* apresentaram atividade nula para endoglucanase. Dos demais fungos foram observadas atividades entre 1,14 e 6,3 µg glicose/min/mg proteína (Tabela 1). As atividades de endo glucanase mais significativas de *A. flavus* e *A. dimorphicus* durante os 16 dias de cultivo encontram-se expostas na Figura 2.

**TABELA 2** Características químicas e físicas dos grãos de café armazenados em embalagem de anagem e semipermeável.

<b>Características</b>	<b>Grãos armazenados em sacos de anagem</b>	<b>Grãos armazenados em embalagem semipermeável</b>
Umidade (%)	19,05	13,73
Acidez (mL NaOH 0,1N)	200	250
Polifenoloxidase (U/g/min)	68,69	89,36
Peroxidase (U/g/min)	133,55	123,33
Compostos fenólicos (%)	6,901	7,685
Açúcares redutores (%)	0,360	0,408
Açúcares totais (%)	1,54	1,68
Sacarose (%)	1,12	1,21
Pectina solúvel (mg/10 g)	899,09	737
Pectina total (mg/100 g)	881,22	640,09
Solubilização (%)	81,97	72,64
FDA (%)	29	27,2
Lignina (%)	9,6	7,4
Celulose (%)	19,40	19,80



**FIGURA 2** (A) Atividade enzimática específica de endoglucanase e protease de *Aspergillus flavus* e (B) *A. dimorphicus* durante os 16 dias de cultivo com 1% de CMC como indutor. A atividade de endoglucanase foi determinada por método indireto proposto por Lever (1972) e expressa em  $\mu\text{g}$  glicose/min/mg proteína. Atividade de proteases expressa em número de aminoácidos livres/min/mL. As barras verticais indicam o desvio padrão.

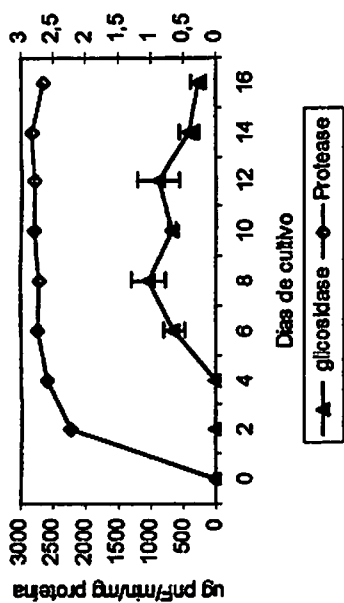
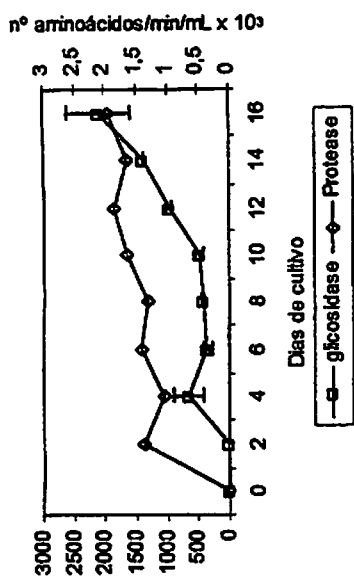
A atividade máxima de endoglucanase encontrada em *A. flavus* e *A. dimorphicus*, foi 4 vezes menor, em média, que a atividade de exoglucanase destes mesmos fungos (Figura 1). A maior atividade de exoglucanase pode ser explicada pela presença de endoglucanase no meio de cultivo contendo celulose microcristalina, já que endoglucanase também pode atuar aleatoriamente neste substrato (Wong, 1995). Baixa atividade de endoglucanase cultivada em CMC também já foi relatada em *Trichoderma reesei* (Goyal et al., 1991).

As duas espécies de *Aspergillus* acima relatadas foram isoladas dos grãos verdes armazenados e são espécies com características saprófitas, mas algumas vezes patogênicas, sendo justificável a maior capacidade celulolítica destas espécies.

As espécies de *Penicillium* (*P. crustosum*, *P. citrinum*, *P. implicatum* e *P. restrictum*) apresentaram atividade mínima de endoglucanase de 1 a 3,3 e máxima de 4,6 a 23,4  $\mu\text{g}$  glicose/min/mg proteína (Tabela 1). Apesar da baixa atividade de endoglucanase detectada aqui neste trabalho, *P. citrinum* é um fungo utilizado comercialmente na produção de celulasas (Coughlan, 1985 citado por Goldman, 1988). Fungos utilizados comercialmente para produção de enzimas, como, por exemplo, *Aspergillus niger* e *Penicillium citrinum*, são modificados geneticamente a fim de ser obter uma maior produção de enzimas.

A terceira enzima do complexo celulolítico analisado foi a  $\beta$  glicosidase, que atua na quebra de resíduos de celobiose e tem origem na atuação de exo e endoglucanase. A quantificação desta enzima foi realizada com os fungos *Fusarium stilboides*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium implicatum*, *P. crustosum*, *P. citrinum*, *P. restrictum* e *Aspergillus niger*. Os maiores produtores desta enzima foram as duas espécies do gênero *Penicillium* (*P. implicatum* e *P. citrinum*) (Figura 3). Esta enzima, em frutos de café, está relacionada com a perda de qualidade da bebida (Amorim & Teixeira, 1975), somando-se ao fato de relatos de perda de qualidade em cafés com alta infecção por *Penicillium*

(Liardon et al., 1989). Os demais fungos analisados tiveram máximo de atividade entre 0,71 e 10,8  $\mu\text{g pNF/ min/ mg proteína}$  (Tabela 1).

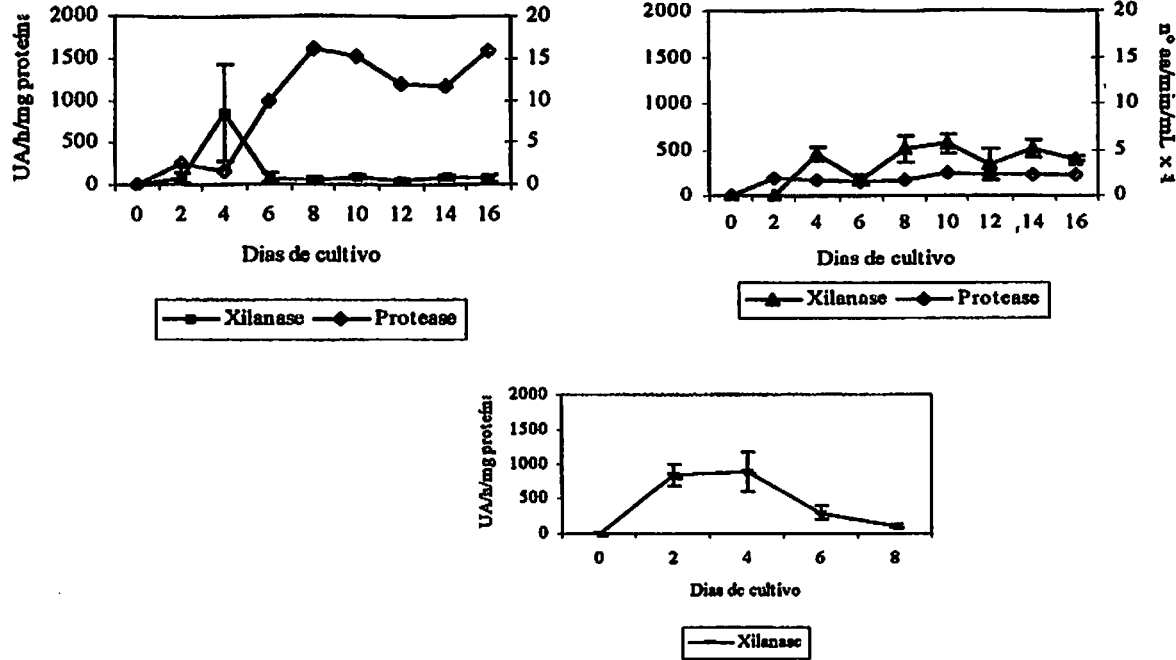


**FIGURA 3** (A) Atividade enzimática específica de  $\beta$  glicosidase e atividade de proteases de *Penicillium citrinum* e (B) *P. implicatum* durante os 16 dias de cultivo com 1% de celobiose como indutor. Atividade específica é expressa em  $\mu\text{g}$  de p nF/ min/ mg proteína. Atividade de proteases expressa em número de aminoácidos livres/min/mL. As barras verticais indicam o desvio padrão.



*Penicillium implicatum* iniciou a produção de  $\beta$  glicosidase no 2º dia de cultivo, com pico máximo de produção no 16º dia, enquanto *P. citrinum* apresentou uma fase adaptativa maior, começando a apresentar atividade de  $\beta$  glicosidase a partir do 6º dia de cultivo, tendo pico máximo ao 8º dia e posterior queda na atividade. Sabe-se que a  $\beta$  glicosidase pode ser inibida pelo seu próprio produto (glicose) e por altas concentrações de celobiose (Goldman, 1988). Menos de 50% das  $\beta$  glicosidases são excretadas no meio de cultivo, sendo que o restante permanece ligado a polissacarídeos da parede celular constituídos de manose, galactose, glicose e ácidos galacturônicos e glucônicos. Se essa ligação for eficiente, a atividade de  $\beta$  glicosidase poderia sofrer incremento de até 2 vezes (Wong, 1995).

*Aspergillus dimorphicus* foi também capaz de degradar a hemicelulose e apresentou a segunda maior atividade xilanolítica de todos os fungos, 849,2 UA/h/mg proteína no 4º dia de cultivo (Figura 4). A atividade xilanolítica (enzima hemicelulolítica) pode coincidir com a atividade de endo glucanase (Goldman, 1988). Os resultados observados com os três fungos testados com maior atividade desta enzima encontram-se expostos na Figura 4. *Penicillium implicatum*, *P. citrinum*, *P. restrictum* e *F. semitectum* apresentaram atividade xilanolítica nula. Para os demais fungos, os picos de atividade ficaram entre 23,4 a 220,9 UA/h/mg proteína (Tabela 1). Observou-se que os três fungos testados apresentaram maior pico de atividade no 4º dia de cultivo, sofrendo posterior queda no 6º dia, sendo a maior atividade detectada com *A. niger* (Figura 4). Segundo Dekker (1985), *A. niger* é bom produtor de celulases e xilanases, destacando-se alta atividade para endoglucanase e  $\beta$  glicosidase. Quanto à atividade destas enzimas celulolíticas, o isolado de *A. niger* aqui testado não apresentou atividade enzimática significativa, como mostra a Tabela 1.



**FIGURA 4** (A) Atividade enzimática específica de xilanase e proteases de *A. dimorphicus*, (B) *Penicillium citrinum*, (C) *Aspergillus niger* durante os dias de cultivo com 1% de CMC como indutor. Atividade específica é expressa em unidades de absorvância / h/ mg proteína. Atividade de proteases expressa em número de aminoácidos livres/min/mL.

*Aspergillus niger* é citado em literatura como melhor produtor de  $\beta$  glicosidase que *Trichoderma reesei* (Wong, 1995), mas neste trabalho não apresentou produção significativa. Com exceção de *Aspergillus dimorphicus*, que apresentou alta atividade celulolítica e xilanolítica, os demais fungos testados apresentam atividade em uma ou outra enzima. A capacidade dos fungos de produzirem algumas, mas não todas as enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico, permite a protocooperação com outros fungos, fazendo com que o substrato colonizado possa ser degradado (Wong, 1995). *Fusarium semitectum* não apresentou atividade em nenhuma das enzimas acima citadas, portanto trata-se de uma espécie que somente colonizará um substrato de celulose após este ter sido degradado por outras espécies de microrganismos. Esta constatação permitiu inferir que a colonização do *Fusarium semitectum* é uma colonização secundária.

Grajek (1987) comparou a atividade de celulases e xilanases em fungos do gênero *Aspergillus* cultivados em meio líquido e em fermentações em estado sólido e concluiu que havia maior produção em meio sólido. O processamento dos frutos de café é caracterizado por uma fermentação em substrato sólido, portanto *in natura*, no qual pode estar havendo um incremento da atividade destas enzimas, facilitando o processamento dos frutos de café natural.

A quantificação de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas em bactérias e leveduras tem resultado expresso na Tabela 3. Observou-se que, igualmente a fungos filamentosos, nem todas as espécies de bactérias e leveduras são capazes de secretar todo o complexo celulolítico, no entanto, as espécies que conseguem fazê-lo apresentam menor atividade em uma das enzimas do complexo.

Comparando-se este aos resultados encontrados nos fungos, observou-se que a produção de celulases e xilanase por bactérias e leveduras foi menor. Por exemplo, a maior atividade de endoglucanase foi detectada em *Bacillus anthracis* (4,9  $\mu\text{g}$  glicose/min/mg proteína) e a maior atividade desta enzima

**TABELA 3** Atividade de enzimas do complexo celulolítico de espécies/gêneros de bactérias e leveduras isoladas de frutos e grãos de café.

ENZIMAS CELULOLÍTICAS			
ESPÉCIES	Exoglucanase <sup>1</sup>	Endoglucanase <sup>1</sup>	β glicosidase <sup>2</sup>
<b>BACTÉRIAS</b>			
<i>Bacillus cereus</i>	1,52	0,74	0
<i>B. subtilis</i>	0	0	2,79
<i>B. megaterium</i>	0,19	5	5,82
<i>B. anthracis</i>	1,19	4,9	2,43
<i>B. polymyxa</i>	0,47	0,54	7,1
<i>B. fastidiosus</i>	1,53	2,3	9,7
<i>B. macerans</i>	0	3,23	0
<i>Kurthia</i> sp	0,87	3,85	0
<i>Arthrobacter</i> sp	0,15	1,56	1,65
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0,78	0
<i>Klebsiella ozanae</i>	0,3	1,13	8,52
<b>LEVEDURAS</b>			
<i>Pichia burtonii</i>	0,52	0,62	10,65
<i>P. guilliermondii</i>	0,24	2	9,6
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0,79	0,83	4

<sup>1</sup> expressa µg glicose/min./mg proteína <sup>2</sup> µg p NF/min./mg proteína.

em fungos foi no valor de 42,2 µg glicose/min./mg proteína em *Aspergillus dimorphicus*. Goldman (1988), em seu trabalho de revisão bibliográfica, afirma que bactérias secretam enzimas celulolíticas duzentas vezes menos que fungos filamentosos, daí serem estes mais utilizados na produção de enzimas em escala industrial. A vantagem das enzimas de origem bacteriana é que elas geralmente

são termoestáveis (Bolobova & Klesov, 1990). Observa-se na Tabela 3, que a maior atividade dentre as enzimas testadas é a de  $\beta$  glicosidase. Esta enzima é responsável pela degradação de celobiose oriunda da ação de endo e exoglucanase; assim, ela atua na remoção de produto que inibiria a ação de endo e exoglucanase. Mesmo apresentando baixas atividades de endo e exoglucanase, caracterizando estas espécies de bactérias e leveduras como colonizadores secundários, bactérias e leveduras podem estar consorciadas a fungos que produzam estas enzimas (Coughlan & Mayer, 1991). Portanto, a partir destes resultados reforça-se a idéia de utilização de açúcares simples por bactérias e leveduras, principalmente no início do processo de secagem.

A produção de enzimas pécticas (poligalacturonase e pectina liase) também foi analisada neste trabalho. Para a fermentação/secagem de frutos de café natural, a presença de microrganismos capazes de degradar a polpa e mucilagem seria uma vantagem, pois seria possível reduzir o tempo de permanência dos frutos no terreiro. Dados sobre a capacidade pectinolítica de bactérias são mostrados na Tabela 4.

Avallone et al. (2001) isolaram e identificaram bactérias em café arábica despulpado e não observaram incremento da população de microrganismos pectinolíticos no decorrer do processo de fermentação, o que justifica porque açúcares simples presentes na mucilagem são os assimilados pelos microrganismos. Assim, Avallone et al. (2001) inferem que bactérias, durante a fermentação dos frutos despolpados, produzem ácidos, como acético e láctico, que abaixam o pH nos tanques de fermentação possibilitando o desprendimento da mucilagem. Portanto, sugerem que para acelerar o processo de fermentação em frutos de café despolpados seja melhor inocular microrganismos que produzem ácidos ao invés de pectinases (Avallone et al., 2002).

Provavelmente, em cafés naturais os colonizadores primários, neste caso bactérias, poderiam estar utilizando os açúcares simples para crescimento,

no entanto a carga microbiana em frutos de café natural é intensa (Silva et al., 2000).

**TABELA 4** Espécies de bactérias Gram negativas e Gram positivas isoladas de frutos de café natural avaliadas quanto à capacidade de produzir poligalacturonase (PG) e pectina liase (PL).

<b>ESPÉCIES BACTERIANAS</b>	<b>PG</b>	<b>PL</b>
<b>GRAM NEGATIVAS</b>		
<i>Klebsiella oxytora</i>	-	+
<i>K. ozanae</i>	-	-
<i>Acinetobacter</i> sp	-	+
<i>Providencia alcalifaciens</i>	-	-
<i>P. rettgeri</i>	-	-
<i>P. mirabilis</i>	-	+
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	+
<i>Y. pestis</i>	-	-
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	+
<i>E. sakasaki</i>	-	-
<i>E. cloacae</i>	-	-
<i>E. aerogenes</i>	-	+
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	-	-
<i>P. putrefaciens</i>	-	+
<i>Serratia rubideae</i>	-	-
<i>S. plymutica</i>	-	-
<i>Tatumella tyseos</i>	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	-
<i>Cedecea lapagei</i>	-	-
<b>GRAM POSITIVAS</b>		
<i>Bacillus subtilis</i>	-	+
<i>B. cereus</i>	-	+
<i>B. megaterium</i>	-	+
<i>B. macerans</i>	-	+
<i>B. anthracis</i>	-	+
<i>B. polymyxa</i>	-	+
<i>B. fastidiosus</i>	-	-
<i>Kurthia</i> sp	-	+
<i>Arthrobacter</i> sp	-	-

Portanto, a disponibilização de açúcares oriundos de polímeros é uma alternativa capaz de sustentar o crescimento microbiano durante toda a fase de fermentação/secagem.

A presença de bactérias com capacidade de produzir PL em cafés naturais pode ser uma vantagem, pois a polpa e mucilagem contendo pectina altamente metiladas serviriam de substrato para estas enzimas. Além disso, a decomposição da mucilagem em café natural também poderia ser acelerada pelo abaixamento de pH, uma vez que foi identificada a presença de ácidos acético e láctico em frutos de café durante o período de fermentação/secagem (dados mostrados no capítulo 2).

Leveduras apresentaram produção de PG somente em 3 espécies e de PL, em sete diferentes espécies. Estes dados são mostrados na Tabela 5. Espécies de leveduras pectinolíticas isoladas de café já haviam sido descritas por Agate & Bhat (1966). A presença de leveduras em cafés secos em coco no Brasil havia sido detectada por Vaughn et al. (1958); no entanto, estes autores afirmaram que a degradação de material pectico fica a cargo de bactérias, principalmente Gram negativas.

Todas as espécies fúngicas testadas apresentaram produção de poligalacturonase e de pectina liase. Espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são descritas como bons produtores de pectinases (Nedjma et al., 2001; Boccas et al., 1994). Apesar da ampla distribuição destes fungos em frutos de café natural, estes não seriam os responsáveis pela degradação da polpa e mucilagem, uma vez que, se efetuado o período de secagem sem a reidratação dos frutos, o grau de contaminação pelos fungos é reduzido. Neste trabalho, a presença de fungos durante todo o período de secagem foi devido à suspensão de esporos e hifas proporcionada durante o processamento das amostras em laboratório na fase de diluições e plaqueamento.

**TABELA 5** Espécies de leveduras isoladas de frutos de café natural avaliadas quanto à capacidade de produzir poligalacturonase (PG) e pectina liase (PL).

<b>ESPÉCIES</b>	<b>PG</b>	<b>PL</b>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	+
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	-	+
<i>Debaryomyces anomala</i>	-	-
<i>Pichia sydowiorum</i>	-	-
<i>Pichia anomala</i>	-	+
<i>Pichia holstii</i>	-	+
<i>Pichia burtonii</i>	+	+
<i>Pichia subpelliculosa</i>	-	-
<i>Pichia jadinii</i>	-	-
<i>Pichia guilliermondii</i>	+	+
<i>Stephanoascus smithiae</i>	-	-
<i>Arxula adeninivorans</i>	-	+
<i>Candida fermentati</i>	-	-
<i>Candida saitoana</i>	-	-
<i>Candida membranifaciens</i>	+	-
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-
<i>Zygoascus hellenicus</i>	-	-
<i>Kluyveromyces lactis</i>	-	-
<i>Dekkera bruxellensis</i>	-	-
<i>Citeromyces matritensis</i>	-	-



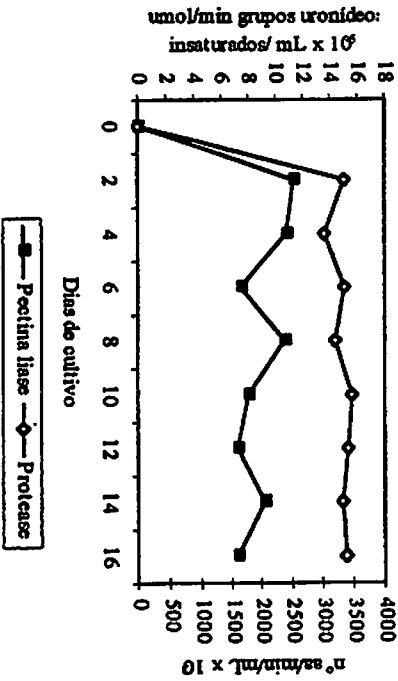
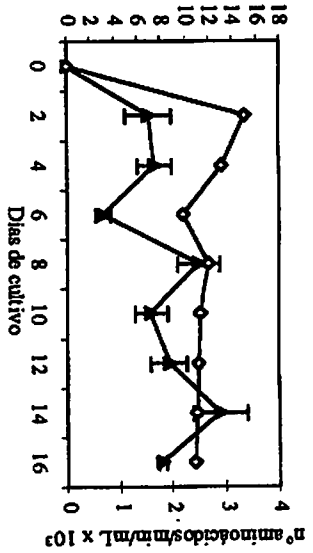
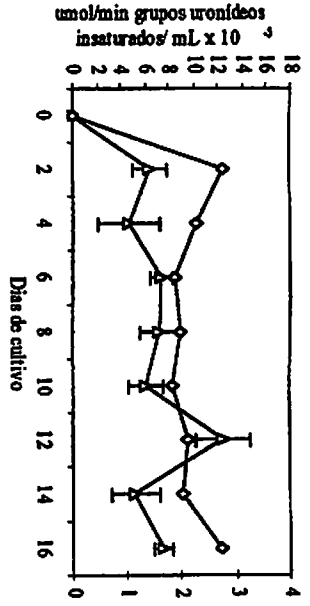
Quanto à atividade de Pectina Liase (PL), três fungos (*F. semitectum*, *P. citrinum* e *A. dimorphicus*) apresentaram maiores atividades e estão expostas na Figura 5. As atividades mínimas e máximas dos demais fungos ficaram entre 5 e 10  $\mu\text{mol/ min. de grupos uronídeos insaturados/mL} \times 10^{-5}$  e encontram-se na Tabela 6.

Pode ser observado, na Figura 5, que ocorreram oscilações na atividade de PL durante todo o período de cultivo.

Os principais fungos produtores desta enzima neste trabalho foram *P. citrinum*, *A. dimorphicus* e *F. semitectum*, fungos de gêneros caracterizados como bons produtores. Apesar do destaque destes fungos, a atividade máxima desta enzima foi baixa (12,4  $\mu\text{mol/ min. de grupos uronídeos insaturados/ mL} \times 10^{-5}$ ), como pode ser observado na Figura 5 e Tabela 6.

Trabalho realizado por Brumano et al. (1993) com *Penicillium griseoroseum* nas mesmas condições testadas com os fungos isolados de café indicou atividade de até 1  $\mu\text{mol/ min. de grupos uronídeos insaturados/ mL}$ . Nedjma et al. (2001) afirmam que o método usado para quantificar a atividade de PL é inapropriado porque não é suficientemente seletivo e sensível para diferenciar atividades de PG e PL. Estas enzimas apresentam a mesma ação sob o substrato, com o diferencial de PG atuar em pectinas com grau de metoxilação abaixo de 55%, enquanto PL atua em substratos altamente esterificados (Gainvors et al., 1994).

Gainvors et al. (1994) e Vries & Visser (2001) afirmaram que liases de bactérias como *Erwinia* e *Bacillus* preferem substratos não metilados, enquanto extraídas de fungos atuam exclusivamente entre dois resíduos galacturônicos metilados. Este dado é importante na degradação da polpa e mucilagem do café (substratos com alto teor de metilação, ou seja, 60 a 70%); os fungos testados foram isolados deste substrato natural.



**FIGURA 5** Atividade enzimática de Pectina Liase de (A) *F. semitectum*, (B) *P. citrinum* e (C) *A. dimorphicus*, nos 16 dias de cultivo com 1 % de pectina como indutor. Atividade é expressa em  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . de grupos uronídeos insaturados/  $\text{mL} \times 10^5$ . As barras verticais indicam o desvio padrão.

**TABELA 6** Valores de atividades enzimáticas máximas e mínimas de todos os fungos testados quanto à produção de Pectina Liase.

FUNGOS	PECTINA LIASE ( $\times 10^3$ )	
	MÍN.	MÁX.
<i>F. semitectum</i>	4,6	12,4
<i>P. implicatum</i>	5	8,42
<i>P. citrinum</i>	3	13
<i>A. flavus</i>	5,1	10,1
<i>A. ochraceus</i>	5	10,6
<i>A. dimorphicus</i>	7,1	11,3

Atividade enzimática=  $\mu\text{mol/ min. de grupos uronídeos insaturados/ mL}$

Assim sendo, esperava-se uma maior atividade de PL dos fungos testados. Porém, os ensaios aqui realizados foram conduzidos com indutores artificiais. Minussi et al. (1996) detectaram uma menor atividade com estes indutores do que em substratos naturais, possivelmente porque estes tenham nutrientes essenciais ao metabolismo microbiano. Este fator pode ser considerado como um inibidor ou um não facilitador da produção de Pectina liase por fungos isolados dos frutos de café.

No entanto, é importante ressaltar que, neste trabalho, o extrato enzimático analisado foi bruto, podendo, assim, ser acometido de interferentes químicos (quelagem), físicos (alteração de pH, temperatura) e biológicos (proteases) que atuam diminuindo a atividade ou até mesmo inibindo-a.

A partir de comparações feitas com a literatura, esperava-se que tanto a atividade de celulasas como a de xilanasas e pectinasas tivessem valores mais expressivos, no entanto, temos que considerar que isolados da mesma espécie podem responder às condições ambientais (pH, temperatura, indutores,

repressores, etc) de formas distintas devido à sua carga genética e a interferência de componentes do substrato natural (isto é, frutos de café) que pode promover a produção e incremento destas enzimas fúngicas.

## 4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos quanto à caracterização enzimática de isolados, concluiu-se que:

▶ A análise quantitativa de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e pectinolíticas revelou uma grande variação na produção pelos fungos testados, referente tanto às espécies quanto ao período de cultivo.

▶ Atividade enzimática *in vitro* foi baixa podendo a produção ter sido influenciada por fatores como baixo grau de indução, carência de fatores nutricionais para o bom crescimento fúngico ou a interferência do estado físico do substrato.

▶ *Aspergillus dimorphicus* foi o único dentre os fungos testados que apresentou atividade em todas as enzimas do complexo celulolítico, apresentando atividade máxima de exo e endoglucanase de 145 e 42  $\mu\text{g}$  glicose/min/mg proteína.

▶ *Fusarium semitectum* não apresentou atividade celulolítica e nem xilanolítica e apresentou atividade pectinolítica.

▶ Todas as espécies de fungos filamentosos testadas neste trabalho foram capazes de secretar PG e PL, esta, porém com baixa atividade (máxima de 12,8  $\mu\text{mol/ min. de grupos uronídeos insaturados/ mL} \times 10^{-5}$ ).

▶ A partir dos resultados obtidos com PL pressupõe-se que estes fungos testados não são os responsáveis pela degradação da mucilagem durante a fermentação dos frutos de café natural.

▶ Nenhuma espécie bacteriana secretou PG, porém observou-se que bactérias Gram negativas e positivas foram produtoras de PL. Leveduras foram capazes de secretar PG e PL sugerindo a participação destes microrganismos na fermentação dos frutos de café natural.

▶ Bactérias e leveduras apresentaram atividade celulolítica e pectinolítica inferiores à de fungos filamentosos, sugerindo a utilização de açúcares simples presentes na polpa e mucilagem por estes microrganismos.

▶ Os resultados obtidos demonstram a importância da diversidade de microrganismos, inclusive da diversidade genética quanto à produção enzimática, para que no conjunto possam atuar no processo de degradação da mucilagem, acelerando e conseqüentemente reduzindo o risco de comprometimento da qualidade.

## 5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGATE, A. D.; BHAT, J. V. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of coffee robusta cherries. *Applied Microbiology*, New York, v. 14, n. 2, p. 256-260, Mar. 1966.
- AMORIM, H. V.; TEIXEIRA, A. A. Transformações bioquímicas, químicas e físicas do grão de café verde e qualidade da bebida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIIRAS, 3., 1975 Curitiba. Resumos... Rio de Janeiro: MIC/TBC, 1975. p. 21-23.
- AVALLONE, S.; BRILLOUET, J-M; GUYOT, B.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J-P. Involvement of pectolytic microorganisms in coffee fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*, Oxford, v. 37, n. 2, p. 191, Feb. 2002.
- AVALLONE, S.; GUYOT, B.; BRILLOUET, J-M.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J-P. Microbiological and biochemistry study of coffee fermentation. *Current Microbiology*, New York, v. 42, n. 4, p. 252-256, Apr. 2001.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, Oxford, v. 18, n. 5, p. 355-383, Aug. 2000.
- BLANDÓN, C., G.; DÁVILA, A.; M. T.; RODRÍGUEZ V., N. Caracterización microbiológica y fisico-química de la pulpa de café sola y con mucilago, en proceso de lombricompostaje. *Cenicafé, chinchina*, v. 50, n. 1, p. 5-23, ene/mar. 1999.
- BOCCAS, F.; ROUSSOS, S.; GUTIERREZ, M.; SERRANO, L.; VINIEGRA, G. G. Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. *Journal Food Science Technology*, Mysore, v. 31, n. 1, p. 22-26, Jan./Feb. 1994.
- BOLOBOVA, A. V.; KLESOV, A. A. Comparasion of efficiency of microcrystalline cellulose hydrolysis using baterial and fimgal cellulases. *Applied Biochemical Microbiology*, New York, v. 26, n. 3, p. 253-258, 1990.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of

microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Analytical Biochemistry*, San Diego, v. 72, n. 1/2, p. 248-54, 1976.

BRUMANO, M. H. N.; COELHO, J. L. C.; ARAÚJO, E. F.; SILVA, D. O. Pectin lyase of *Penicillium griseoroseum* related to degumming of ramie. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 175-178, jul./set. 1993.

CARREL, F. L. Y.; CANEVASCINI, G. Effect of  $\beta$  glucosidase inhibitors on synthesis of cellulase and  $\beta$  glucosidase in *Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile*. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, v. 37, n. 6, p. 459-464, June 1990.

COUGHLAN, M. P.; MAYER, F. The cellulose-decomposing bacteria and their enzymes systems. In: BALOWS, A.; TRUPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K-H. (Ed.). *The Prokaryotes*. Berlin: Springer-Verlag, 1991. v. 1, Cap. 20, p. 460-516.

DEKKER, R. R. H. Biodegradation of cellulases. In: *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. New York: Academic Press, 1985. p. 505-533.

ELIAS, L. G. Composición química de la pulpa de café y otros subproductos. In: BRAHAM, J. E.; BRESSAN, R. (Ed). *Pulpa de café: composición, tecnología y utilización*. Panamá: Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, 1978. p. 19-29.

GAINVORS, A.; FREZIER, V.; LEMARESQUIER, H.; LEQUART, C.; AIGLE, M.; BELARBI, A. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, Sussex, v. 10, n. 10, p. 1311-1319, Oct. 1994.

GOLDMAN, G. H. Estudos genéticos e produção de celulase em *Aspergillus niger*. 1988. 153 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba, SP.

GOYAL, A.; GHOSH, B.; EVELEIGH, D. Characteristics of Fungal cellulases. *Bioresource Technology Essex*, Oxford, v. 36, n. 1, p. 37-50, 1991.

GRAJEK, W. Comparative studies on the production of cellulases by thermophilic fungi in submerged and solid- state fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*, New York, v. 26, n. 4, p. 126-129, Jan. 1987.



ISAAC, S. **Fungal – plant interactions**. London: Chapman & Hall, 1992.  
418 p.

JONES, K. L.; JONES, S. E. Fermentations involved in the production of cocoa, coffee and tea. **Progress Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 19, p. 411-56, 1984.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 47, p. 273-79, 1972.

LIARDON, R.; SAPADONE, J. C.; BRAENDLIN, N.; DENTAN, E. Multidisciplinary study of Rio flavour in Brazilian green coffee. In: **INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON THE CHEMISTRY OF COFFEE**, 13., 1989, Paipa. **Proceedings....** Paipa: ASIC, 1989. p. 117-126.

MARVIN, L. Speck, editor. **Compendicine of Methods for the Microbiological examination of foods**. Washington: American Public health Association, 1984.

MINUSSI, R. C.; COELHO, J. L. C.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; SILVA, D. O. Pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum*: effect of tea extract, caffeine, yeast extract, and pectin. **Biotechnology Letter**, London, v. 18, n. 11, p. 1283-1286, Nov. 1996.

NEDJMA, M.; HOFFMANN, N.; BELARBI, A. Selective and sensitive detection of pectin lyase activity using a colorimetric test: application to the screening of microorganisms possessing pectin lyase activity. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 291, n. 2, p. 290-296, Aug. 2001.

PASCHOLATI, S. F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3 ed. Campinas: Ed. Agronômica Ceres, 1995. 919 p.

SAKIYAMA, C. C. H.; PAULA, E. M.; PEREIRA, P. C.; BORGES, A. C.; SILVA, D. O. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 117-121, Aug. 2001.

SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea*

*arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 60, n. 2/3, p. 251-260, Sept. 2000.

TONG, C. C.; RAJENDRA, K. Effect of Carbon and Nitrogen Sources on the Growth and Production of Cellulase Enzymes of a newly Isolated *Aspergillus* sp. **Pertanika**, Selangor, v. 15, n. 1, p. 45-50, 1992.

VAUGHN, R. H.; CAMARGO, R. DE; FALLANGE, H.; MELLO AYRES, G.; SERGEDELLO, A. Observations on the microbiology of the coffee fermentation in Brazil. **Food Technology**, Chicago, v. 12, n. 4, p. 12-57, Apr. 1958. Supplement.

VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 65, n. 4, p. 497-522, Dec. 2001.

VIDHYASEKARAN, P. **Fungal pathogenesis in plants and crops- molecular biology and host defense mechanisms**. New York: Marcel Dekker, 1997. 553 p.

WONG, D. W. S. **Food enzymes-structure and mechanism**. New York: Chapman & Hall, 1995. 390 p.

## **CAPÍTULO 4**

### **INCIDÊNCIA DE *Aspergillus* PRODUTORES DE MICOTOXINAS EM FRUTOS E GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)**

## RESUMO

SILVA, C. F. Incidência de *Aspergillus* produtores de micotoxinas em frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.). In: \_\_\_\_\_. Sucessão microbiana e caracterização enzimática da microbiota epifítica de frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.) do município de Lavras – MG. 2004. p. 129-151. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A bebida de café é mundialmente consumida, sendo o Brasil o principal país produtor e exportador. Existe um rigoroso controle da qualidade dos grãos pelos países importadores, principalmente quanto à presença de fungos toxigênicos e micotoxinas. Algumas espécies de *Aspergillus* podem produzir micotoxinas nos alimentos que são metabólitos secundários tóxicos ao homem e animais mesmo em pequenas concentrações. Os objetivos deste trabalho foram de identificar as espécies de *Aspergillus* que estão associadas ao café e verificar se estas podem apresentar um risco para a segurança do produto. Foram identificadas espécies aflatoxigênicas e ocratoxigênicas pertencentes ao gênero *Aspergillus* em frutos de café secos naturalmente e, durante o armazenamento em sacos de anagem e semipermeável. Um total de 112 isolados foi identificado sendo sete diferentes espécies do gênero *Aspergillus* distribuídos em: *Aspergillus flavus* (53 isolados); *A. niger* (42); *A. ochraceus* (12); *A. dimorphicus* (2); *A. foetidius* (1); *A. iamarii* (1) e *A. sydowii* (1). O maior número de isolados foi notificado nos dois últimos dias de fermentação/secagem (20 e 22° dias), sendo as espécies incidentes *A. ochraceus* e *A. niger*, respectivamente. *Aspergillus flavus* foi isolado durante todo o período de secagem. Durante o armazenamento um maior número de espécies e de isolados foram observados nas amostras armazenadas em sacos de anagem, dos quais foram identificadas *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. dimorphicus*; *A. foetidius*. *Aspergillus flavus* foi notificado nas embalagens semipermeáveis. O potencial toxigênico dos fungos demonstrou que todos os isolados de *A. flavus* foram produtores de aflatoxinas B1 e B2, nenhum isolado de *A. niger* foi produtor de ocratoxina A, e 75% dos isolados de *A. ochraceus* foram produtores de ocratoxina A.

\*Publicado na REVISTA BRASILERIA DE ARMAZENAMENTO n° 7, p. 30-36, 2003. Especial café.

---

Comitê orientador: Dra. Rosane Freitas Schwan- UFLA (Orientadora), Dr. Eustáquio Souza Dias –UFLA.

## ABSTRACT

Silva, C. F. Incidence of *Aspergillus* producing of micotoxins in fruits and coffee beans (*Coffea arabica* L.). In: \_\_\_\_\_. **Microbial succession and enzymatic characterization of the epiphytic microbial of fruits and coffee beans (*Coffea arabica* L.) of the municipal district of Lavras – MG. 2004. p. 129-151. Thesis (Doctorate in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.**

Coffee beverage is consumed worldwide, Brazil being the main producing and exporting country. There is a rigorous quality control of bean quality by importing countries as far as the presence of toxigenic fungi and mycotoxins are concerned. Some species of *Aspergillus* may produce mycotoxins in foods, which are secondary metabolites toxic to man and animals even in small concentrations. The objectives of this work were to identify the *Aspergillus* species which are associated with coffee and verify if those may present a risk to the safety of the product. Afla and ocratoxigenic species belonging to the genus *Aspergillus* were identified in naturally dried coffee cherries and during the storage in jute and polystyrene bags. A total of 112 isolates were identified, seven being different species of the genus *Aspergillus* distributed in: *Aspergillus flavus* (53 isolates); *A. niger* (42); *A. ochraceus* (12); *A. dimorphicus* (2); *A. foetidus* (1); *A. tamarisii* (1) and *A. sydowii* (1). The greatest number of isolates was notified in the last two days of fermentation/drying (20<sup>th</sup> and 22<sup>nd</sup> days), the incident species being *A. ochraceus* and *A. niger*, respectively. *Aspergillus flavus* was isolated throughout the drying period. Over storage, a greater number of species and isolates were observed in the samples stored in jute bags, from which were identified: *A. flavus*, *A. niger*, *A. dimorphicus*; *A. foetidus*. *A. flavus* was notified in the polystyrene bags. The toxigenic potential of fungi showed that all the isolates of *A. flavus* were producers of aflatoxins B1 and B2, no isolate of *A. niger* was producer of ocratoxin A and 75% of the isolates of *A. ochraceus* were producers of ochratoxin A.

---

Guidance committee: Ds Rosane Freitas Schwan - UFLA (Major Professor), Ds Eustáquio Souza Dias - UFLA

## 1 INTRODUÇÃO

A bebida de café é mundialmente consumida, tanto pelos seus efeitos estimulantes físicos e mentais quanto pelos efeitos farmacológicos (Soliman, 2002). A cultura do café restringe-se à região intertropical do planeta, favorecendo, portanto, países como Brasil, que produz e exporta em grande quantidade os grãos verdes de café.

Seguido por países como Colômbia, Vietnã, Indonésia e México (Anuário Estatístico do Café, 2000-2001), o Brasil é o principal país exportador desta *commodite*. A qualidade deste produto influencia diretamente seu preço no mercado e é determinada pela interação de fatores como seleção da cultivar, composição química dos frutos, homogeneidade na maturação dos frutos colhidos, processamento pós-colheita, métodos de secagem e armazenamento (Carvalho et al., 1989; Puerta Q., 1998; Menon, 1989). Além desses aspectos, como todos produtos agrícolas, o café está sujeito à contaminação por microrganismos (Nout & Rombouts, 1992) em todas as fases do processamento, os quais encontram nos frutos e grãos, nutrientes necessários para seu desenvolvimento, como fonte de carbono e nitrogênio sob a forma de celulose, hemicelulose, pectinas, sacarose, glicose e frutose. A influência da microbiota na qualidade do café pode estar ligada à produção e excreção de metabólitos como, ácidos, álcoois, fenóis, enzimas e micotoxinas, que atuam sobre os grãos provocando alterações que irão repercutir no aroma, no sabor e na segurança do produto final.

Durante o processamento do café, a quantidade e diversidade dos microrganismos que colonizam os frutos nos seus vários estádios até o armazenamento não é uniforme, havendo em cada fase deste processo a predominância de um ou mais dos três grandes grupos de microrganismos –

bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Silva et al., 2000). Esta sucessão ecológica dos microrganismos é dependente da interação entre fatores intrínsecos, como composição química do substrato, atividade de água e pH, e fatores extrínsecos, como as condições ambientais (Smith & Cuero, 1986).

Países compradores de café estabelecem normas rígidas para a importação dos grãos, principalmente quanto ao nível máximo de contaminação dos grãos por micotoxinas. Uma vez que da composição da dieta de grande número de comunidades participam grupos de alimentos e bebidas que contribuem com parcelas muito mais significativas de ocratoxina A, justifica-se a preocupação com o café como uma fonte, embora seja a que menos contribui com a micotoxina na dieta.

As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos que quando ingeridas direta ou indiretamente causam intoxicações agudas ou crônicas (Soliman, 2002). Estas toxinas têm causado epidemias, matando centenas de milhares de pessoas no mundo e provocando lesões nefrotóxicas, hepatóxicas, teratogênica e talvez carcinogênica (Pitt, 2000). Além disso, as micotoxinas podem assumir papéis de co-carcinogênicas juntamente com vírus da hepatite B. As micotoxinas apresentam quatro tipos básicos de toxicidade: aguda, crônica, mutagênica e teratogênica. O efeito mais comum é a desordem das funções renais e hepáticas, podendo levar o indivíduo à morte (Scussel, 1998). Conseqüentemente os países importadores, principalmente europeus, têm estabelecido limites máximos toleráveis de ingestão diária de toxinas para alguns alimentos, incluindo o café.

O primeiro grupo de toxinas estudadas em alimentos foi o das aflatoxinas produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. A incidência de *Aspergillus* ou das aflatoxinas em café foi relatada por diversos autores (Batista et al., 2001; Abdel-Hafez & El Maghraby, 1992; Mislivec et al., 1983; Levi & Borker, 1968). Foi observado que a implantação de boas práticas

agrícolas na cultura do café pode restringir ou inibir a produção da toxina. Além disso, a presença do fungo toxigênico não indica, necessariamente, que os grãos de café estejam contaminados pela micotoxina (Batista et al., 2001). Vários trabalhos já foram realizados sobre a eliminação ou redução do teor de aflatoxina no grão de café através do calor obtido durante o processo de torração dos grãos verdes, indicando que é possível uma redução da toxina entre 42,2% a 55,9% (Soliman, 2002). As aflatoxinas e esterigmatocistinas são as toxinas menos freqüentes em café (Naidu, 1996). A reduzida freqüência de aflatoxinas em café reforça a idéia de que esta micotoxina não representa perigo de micotoxicose oriunda de grãos de café.

A preocupação sobre a qualidade e segurança do café brasileiro é respaldada pelos limites máximos de ingestão permitidos, impostos pelos países consumidores de café. Atualmente, o maior risco para a segurança do café concentra-se na presença de Ocratoxina A (Chalfoun & Batista, 2002). Apesar de esta micotoxina ser a mais comum em grãos de café, ela tem sido detectada apenas em pequenas quantidades em cafés cultivados e preparados adequadamente (Chalfoun & Batista, 2002).

A ocratoxina tem tido grande atenção mundial devido ao potencial perigo atribuído a ela na saúde animal e humana (Pitt et al., 2000), principalmente a Ocratoxina A (OTA). Esta toxina pode ser produzida por espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Originalmente, a OTA foi descrita como um metabólito de *A. ochraceus* isolado de frutos e vegetais secos e grãos de café verdes (Pitt, 2000; Heilmann et al., 1999; Scussel, 1998; Mislivec et al., 1983). Atualmente, sabe-se que esta toxina também pode ser produzida e excretada por *P. verrucosum* e *A. carbonarius*, que também podem ser fonte de OTA em café (Batista et al., 2003).

Considerando a importância de fungos toxigênicos no café, o presente trabalho teve como objetivo a identificação e avaliação do potencial



aflatoxigênico e ocratoxigênico de espécies do gênero *Aspergillus* em frutos de café processados naturalmente, desde o primeiro dia de fermentação/secagem até o armazenamento dos grãos acondicionados em embalagens de aniagem e semipermeável.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras

As amostras de café (*Coffea arabica* L. var Acaia), constituídas inicialmente de 60 kg de frutos cereja, foram coletadas seletivamente ainda na árvore, em uma fazenda do município de Lavras-MG, localizada no Sul do estado de Minas Gerais, a 750 a 800 m de altitude. Os frutos foram secos em terreiro de cimento via processamento natural. Após a secagem, os frutos em coco foram beneficiados e os grãos, armazenados em câmara fria (3 °C – 59% de umidade relativa), em sacos de aniagem e semipermeáveis por um período de 136 dias.

### 2.2 Isolamento e identificação dos fungos

Durante o período de secagem, em intervalos de 48 h, e durante o armazenamento, após 40, 87, 132 e 136 dias, duzentos frutos ou grãos foram coletados assepticamente e transferidos para 1800 mL de água peptonada, de onde foram realizadas diluições seriadas para avaliação micológica em meio Dicloran Glicerol 18% (DG18). Após um período de 4 a 6 dias, as colônias características de fungos do gênero *Aspergillus* foram isoladas e purificadas em meio Malte Ágar (MA). A identificação taxonômica dos isolados de *Aspergillus* foi realizada de acordo com Christensen (1981) para espécies da seção *Circumdati*, Christensen (1982) para espécies da seção *Flavi*, Klich & Pitt (1988) para espécies da seção *Nigri* e Klich (1993) para espécies da seção *Versicolores*. As identificações foram comparadas com as de Raper & Fennell (1965), Klich & Pitt (1988), Samson et al. (2000) e Pitt & Hocking (1997). Os isolados foram inoculados em três pontos equidistantes na placa de Petri contendo meios de cultura padronizados nas seguintes condições: meios CYA (Czapek Yeast Agar) e MEA (Malt Extract Agar) 25 °C e CYA 37 °C, por um

período de 7-10 dias de incubação. Foram observadas as características classificadas como macroscópicas e microscópicas por Klich & Pitt (1988) após o período de incubação.

### 2.3 Avaliação do potencial toxigênico por “Plug” Agar

Os isolados identificados pertencentes ao gênero *Aspergillus* das Seções *Nigri* e *Circundati* foram testados quanto ao potencial ocratoxigênico e os isolados da Seção *Flavi* foram testados quanto ao potencial aflatoxigênico todos segundo a Técnica de Plug Agar descrita por Filtenborg & Frisvad (1980). Estes fungos foram inoculados em meio YES (Yeast Extract 2% - Sucrose 15%) e incubados por 5 dias a 25-26 °C (Filtenborg & Frisvad, 1980). Um corte circular de aproximadamente 25 mm do micélio do fungo com ágar foi colocado sobre uma placa de Cromatografia de Camada Delgada (Merck – Sílica Gel 60, 20x20) previamente ativada, contendo os padrões das micotoxinas (aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 ou ocratoxina A). O micélio foi retirado e após 15 minutos foi realizada a eluição em uma cuba de vidro contendo, como fase móvel, TEF - Tolueno, Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (50:40:10). Após a eluição, as placas foram secas em capela pelo fluxo. A confirmação foi feita em luz ultravioleta com  $\lambda$  366 nm em cromatovisor CAMAG (UV-BETRACHTER). O isolado produtor da micotoxina (aflatoxinas ou ocratoxina) apresentou um Rf (fator de retenção) e um “spot” de fluorescência semelhante ao do padrão da micotoxina testada.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De um total de cento e doze (112) isolados, foram identificadas sete diferentes espécies de *Aspergillus*. Foram encontradas as seguintes distribuições de espécies: *Aspergillus flavus* (53 isolados); *A. niger* (42); *A. ochraceus* (12); *A. dimorphicus* (2); *A. foetidius* (1); *A. tamarii* (1) e *A. sydowii* (1) (Tabelas 1 e 2).

A maioria das espécies encontradas é comum em solo e áreas cultivadas com cereais e já foram isoladas de frutos e grãos de café armazenados (Silva et al., 2000). A presença destes fungos em grãos armazenados é atribuída à capacidade de resistirem à menor atividade de água (Batista et al., 2003; Pitt & Hocking, 1997; Klich & Pitt, 1988; Christensen, 1982, 1981; Domsch et al., 1980).

O maior número de isolados fúngicos foi encontrado no 20º e 22º dias de secagem (Tabela 1), o que pode ter sido em consequência da diminuição da quantidade de água disponível para os microrganismos (atividade de água), restringindo a presença de outros grupos de microrganismos como bactérias e leveduras (dados expressos no Capítulo 2) e favorecendo o desenvolvimento dos fungos.

No vigésimo dia de secagem o teor de umidade dos grãos foi de 13,74%, o que representou uma atividade de água próximo de 0,67, no vigésimo segundo dia, com a umidade de 11%, a atividade de água foi de 0,53. Segundo Pitt & Hocking (1997), em valores de atividade de água abaixo de 0,60 não há crescimento microbiano. As espécies de *Aspergillus* xerofílicas, como *Aspergillus niger*, *A. flavus* e *A. ochraceus* são capazes de crescerem em atividade de água abaixo de 0,85 (Pitt & Hocking, 1997; ICMSF, 1996).

Dentre as sete espécies de *Aspergillus* encontradas, *A. niger* ocorreu em maior percentual, sendo esta ocorrência somente verificada no 22º dia de secagem, quando a umidade dos grãos estava em 11% (Tabela 1).

*A. flavus* foi a única espécie identificada desde o 8º dia de secagem. Esta espécie tem sido isolada de frutos de café por outros autores (Taniwaki et al., 1999), sendo mais comum em áreas cultivadas do que em áreas não cultivadas (Klich & Pitt, 1988).

Os 12 isolados de *A. ochraceus* e os 20 isolados de *A. niger* foram isolados no 20º e 22º dias de secagem, respectivamente (Tabela 1). Estas espécies foram anteriormente isoladas de frutos de café durante a secagem por Urbano et al. (2001), Silva et al. (2000) e Taniwaki et al. (1999).

**TABELA 2** Ocorrência de espécies de fungos do gênero *Aspergillus* durante o período de armazenamento em sacos de aniagem e semipermeável.

Tipo de embalagem Fungos	Armazenamento							
	40 dias		87 dias		132 dias		136 dias	
	An.	Sem.	An.	Sem.	An.	Sem.	An.	Sem.
<i>Aspergillus dimorphicus</i>					2			
<i>Aspergillus flavus</i>	1	6		2	21			11
<i>Aspergillus niger</i>					13			9
<i>Aspergillus foetidus</i>					1			
Total	1	6		2	37			20

An. - Aniagem, Sem. - semipermeável

Dentre as sete espécies de *Aspergillus* encontradas, *A. niger* ocorreu em maior percentual, sendo esta ocorrência somente verificada no 22º dia de secagem, quando a umidade dos grãos estava em 11% (Tabela 1).

*A. flavus* foi a única espécie identificada desde o 8º dia de secagem. Esta espécie tem sido isolada de frutos de café por outros autores (Taniwaki et al., 1999), sendo mais comum em áreas cultivadas do que em áreas não cultivadas (Klich & Pitt, 1988).

Os 12 isolados de *A. ochraceus* e os 20 isolados de *A. niger* foram isolados no 20º e 22º dias de secagem, respectivamente (Tabela 1). Estas espécies foram anteriormente isoladas de frutos de café durante a secagem por Urbano et al. (2001), Silva et al. (2000) e Taniwaki et al. (1999).

**TABELA 1** Espécies de fungos do gênero *Aspergillus* identificadas no decorrer de 22 dias de fermentação/secagem de café processado via seca.

Fungos	Fermentação/Secagem				
	08 dias (29,6%)	12 dias (19,5%)	14 dias (19,5%)	18 dias (15,8%)	22 dias (11,0%)
Dias de secagem (Umidade dos grãos)					
<i>Aspergillus flavus</i>	1	1	1	1	5
<i>Aspergillus niger</i>					20
<i>Aspergillus ochraceus</i>					12
<i>Aspergillus sydowii</i>					1
<i>Aspergillus tamarii</i>					1
Total	1	1	1	1	27



Durante o armazenamento do café, um maior número de espécies e de isolados foi observado nas amostras armazenadas em sacos de aniagem. As espécies identificadas foram *A. flavus*, *A. niger*, *A. dimorphicus* e *A. foetidius* (Tabela 2). Nos grãos de café armazenados em embalagem semipermeável, as espécies encontradas foram de *A. flavus* e *A. niger*. As embalagens semipermeáveis apresentam baixa permeabilidade e neste tipo de embalagem ocorreu menor alteração na umidade dos grãos; já a embalagem de aniagem é permeável e nas condições da câmara fria (3<sup>o</sup>C e 59% de Umidade Relativa) ocorreu reabsorção de umidade dos grãos, elevando-a para 19%.

Com exceção do *A. dimorphicus*, todas as demais espécies já foram isoladas de grãos de café armazenado (Batista et al., 2001; López-Garay et al., 1987; Mislivec et al., 1983).

As espécies identificadas neste estudo estão entre as mais comuns e versáteis espécies de fungos presentes em ambientes de armazenamento. Eles podem tolerar e crescer em diferentes condições ambientais, sendo difícil eliminá-las totalmente usando os métodos convencionais de secagem e armazenamento, uma vez que a contaminação com *Aspergillus* e micotoxinas pode ocorrer antes mesmo da colheita (Lacey, 1994).

**TABELA 2** Ocorrência de espécies de fungos do gênero *Aspergillus* durante o período de armazenamento em sacos de aniação e semipermeável.

Tipo de embalagem	Armazenamento							
	40 dias		87 dias		132 dias		136 dias	
	An.	Sem.	An.	Sem.	An.	Sem.	An.	Sem.
Fungos								
<i>Aspergillus dimorphicus</i>					2			
<i>Aspergillus flavus</i>	1	6		2	21		11	
<i>Aspergillus niger</i>					13		9	
<i>Aspergillus foetidus</i>					1			
Total	1	6		2	37		20	

An.-Aniagem, Sem.-semipermeável

Os resultados do potencial toxigênico das espécies de *Aspergillus* encontradas neste estudo podem ser observados na Tabela 3. Dos 53 isolados de *A. flavus*, 100% foram produtores de aflatoxinas B1 e B2, que são as principais micotoxinas produzidas por esta espécie. De acordo com a ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods, 1996), os isolados de *A. flavus* produziram somente as aflatoxinas B1 e B2, enquanto os isolados que produziram as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 foram identificados como *A. parasiticus* e *A. nomius*, sendo estas as únicas espécies produtoras destas aflatoxinas.

Embora algumas espécies da Seção *Nigri* tenham sido relatadas como potencialmente ocratoxigênicas (Bucheli et al., 2000; Bucheli et al., 1998), dos isolados de *A. niger* obtidos de grãos de café, no presente estudo, nenhum foi capaz de produzir ocratoxina A nas condições avaliadas. Segundo Pitt (2000), isolados desta espécie ocasionalmente podem ser produtores de ocratoxina A; entretanto, uma espécie muito próxima morfologicamente, *A. carbonarius*, é mais comumente produtora e uma fonte muito mais importante de ocratoxina A.

Dos 12 isolados de *A. ochraceus*, 75% foram produtores de ocratoxina A. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Batista et al. (2003), em que, dos 41 isolados testados, 27 (65,85%) foram produtores de ocratoxina A. O percentual de 25% dos isolados não produtores de ocratoxina A encontrado neste estudo está de acordo com os dados apresentados por Le Bars & Le Bars (1999), segundo os quais a porcentagem de isolados de *A. ochraceus* não ocratoxigênicos foi entre 20 e 75%.

Os resultados obtidos neste trabalho somam-se às demais pesquisas brasileiras que têm isolado *A. ochraceus* potencialmente ocratoxigênicos de frutos e grãos de café, porém não se pode afirmar com precisão o risco da presença de ocratoxina A no produto. Em estudos anteriores, Batista et al.

**(2003) e Urbano et al. (2001) relataram que a presença de fungos produtores de ocratoxina A no café não indica necessariamente a presença da toxina.**

**TABELA 3** Avaliação da produção de aflatoxinas e ocratoxina A por espécies de *Aspergillus* isoladas dos frutos e grãos de café.

<b>Espécie</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Número de isolados produtores de aflatoxina B1 e B2</b>	<b>Número de isolados produtores de ocratoxina A</b>
<i>Aspergillus flavus</i>	53	53 (100%)	Nt/Ota
<i>Aspergillus ochraceus</i>	12	Nt/Af	09 (75%)
<i>Aspergillus dimorphicus</i>	2	Nt/Af	00 (0,0%)
<i>Aspergillus niger</i>	42	Nt/Af	00 (0,0%)
<i>Aspergillus foetidus</i>	1	Nt/Af	00 (0,0%)

Nt/Af = Não testados para aflatoxinas, estas espécies não são consideradas produtoras de aflatoxinas.

Nt/Ota = Não testados para ocratoxina A, esta espécie não é considerada produtora de ocratoxina A.

Nas condições de armazenamento em câmara fria em embalagens de aniagem, foi observado que os grãos de café reabsorveram mais umidade (8 % a mais do que o inicial) do que as embalagens semipermeáveis. Este processo ocorreu devido ao equilíbrio entre a umidade do ambiente e a dos grãos embalados, favorecidos pela maior porosidade nas embalagens de aniagem. Apesar do alto teor de umidade nos grãos de café armazenados, a interação entre o teor de umidade e a temperatura não contribuiu para o desenvolvimento de espécies potencialmente toxigênicas, como *A. flavus* e *A. ochraceus*, uma vez que a atividade de água mínima para o *A. flavus* produzir as aflatoxinas é de 0,82, o que representa aproximadamente 18,4% da umidade do produto. Para o *A. ochraceus*, a atividade de água mínima para produzir a ocratoxina é de 0,85, o que representa aproximadamente 20% de umidade no grão de café (Le Bars & Le Bars, 1999; ICMSF, 1996; Kozakiewicz & Smith, 1994).

É interessante observar que apesar do isolamento destes fungos em condições de armazenamento em câmara fria, tanto as temperaturas para o desenvolvimento das espécies quanto para a produção das toxinas são, de modo geral, superiores à temperatura registrada na câmara fria (3 °C). A temperatura mínima de crescimento para o *A. flavus* está entre 6 e 10 °C e a temperatura ótima de crescimento, entre 25 e 37 °C, já para a produção de aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, a temperatura ótima está entre 16 e 31 °C. Para o *A. ochraceus*, a temperatura mínima de crescimento está entre 8 e 12 °C e a temperatura ótima de crescimento, entre 24 e 31 °C, enquanto, para a produção de ocratoxina A, a temperatura ótima é entre 25 e 31 °C (Le Bars & Le Bars, 1999; ICMSF, 1996; Kozakiewicz & Smith, 1994).

## 4 CONCLUSÕES

A partir da identificação de espécies de *Aspergillus* encontradas na superfície dos frutos e grãos de café natural durante a fermentação/secagem e armazenamento, concluiu-se que:

▶ Foram identificadas 7 espécies diferentes de *Aspergillus*: *A. flavus*; *A. niger*; *A. ochraceus*; *A. dimorphicus*; *A. foetidius*; *A. tamaritii* e *A. sydowii*;

▶ Exceto a espécie *A. dimorphicus*, todas as demais espécies já foram isoladas de grãos de café armazenado;

▶ *A. flavus* foi isolado a partir do 8º dia de secagem e no armazenamento;

▶ Todos os isolados de *A. flavus* foram produtores de aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>; 75 % dos isolados de *A. ochraceus* foram produtores de ocratoxina A e nenhum isolado de *A. niger* foi produtor de ocratoxina A.

▶ Os grãos armazenados em sacos de aniagem apresentaram um maior número de isolados e variedades de espécies de *Aspergillus* durante o armazenamento.

LEVI, C. P.; BORKER, E. Survey of green coffee for potential aflatoxin contamination. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry**, Gaithersburg, v. 51, n. 3, p. 600-602, 1968.

LÓPEZ-GARAY, C.; BATUTISTA ROMERO, E.; MORENO GONZÁLEZ, E. Microflora of the stored coffee and its influence on quality. In: **INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON THE CHEMISTRY OF COFFEE**, 12., 1987, Montreux. **Proceedings....** Montreux: ASIC, 1987. p. 758-770.

MENON, S. N. Quality improvement on the Estate and processing technology in coffee. **Indian Coffee**, New Delhi, v. 53, n. 12, p. 15-20, Dec. 1989.

MISLIVEC, P. B.; BRUCE, V. R.; GIBSON, R. Incidence of Toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 46, n. 11, p. 969-973, Nov. 1983.

NAIDU, R. Mycotoxins in coffee. **Indian Coffee**, New Delhi, v. 60, n. 8, p. 9-11, Aug. 1996.

NOUT, M. J. R.; ROMBOUTS, F. M. Fermentative preservation of plant foods. **Journal of Applied Bacteriology Symposium**, Oxford, v. 73, p. 136S-147S, 1992. Supplement.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important. **Medical Mycology**, Oxford, n. 38, p. 17-22, 2000. Supplement 1.

PITT, J. I.; BASÍLICLO, J. C.; ABARCA, M. L.; LÓPEZ, C. Mycotoxins and toxigenic fungi. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, p. 41-46, 2000. Supplement 1.,

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997.

PUERTA Q., G. I. Calidad en taza de las variedades de *Coffea arabica* L. cultivadas em Colômbia. **Centicafé, chinchina**, v. 49, n. 4, p. 265-278, oct./dic. 1998.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The Genus Aspergillus**. Baltimore: Williams and Wilkins Company, 1965.



## 4 CONCLUSÕES

A partir da identificação de espécies de *Aspergillus* encontradas na superfície dos frutos e grãos de café natural durante a fermentação/secagem e armazenamento, concluiu-se que:

▶ Foram identificadas 7 espécies diferentes de *Aspergillus*: *A. flavus*; *A. niger*; *A. ochraceus*; *A. dimorphicus*; *A. foetidus*; *A. tamarii* e *A. sydowii*;

▶ Exceto a espécie *A. dimorphicus*, todas as demais espécies já foram isoladas de grãos de café armazenado;

▶ *A. flavus* foi isolado a partir do 8º dia de secagem e no armazenamento;

▶ Todos os isolados de *A. flavus* foram produtores de aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>; 75 % dos isolados de *A. ochraceus* foram produtores de ocratoxina A e nenhum isolado de *A. niger* foi produtor de ocratoxina A.

▶ Os grãos armazenados em sacos de aniagem apresentaram um maior número de isolados e variedades de espécies de *Aspergillus* durante o armazenamento.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAFEZ, A. I. I.; EL- MAGHRABY, O. M. O. Fungal flora and aflatoxin associated with cocoa, roasted coffee and tea powders in Egypt. *Cryptogamie, Mycologie*, Paris, v. 13, n. 1, p. 31-45, Mar. 1992.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO CAFÉ. 6. ed 2000- 2001. 161 p.

BARS, L. L.; BARS, P. L. Mycotoxigenic in Grains Application to Mycotoxic Prevention in Coffee. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. *Anais...* Londrina: IAPAR/ IRD, 1999. p. 513.

BATISTA, L. R. , CHALFOUN, S. M. e PRADO, G. Identificação de espécies toxigênicas de *Aspergillus* associadas aos grãos de café armazenados. *Revista Brasileira de Armazenamento*, Viçosa, n. 3, p. 11-16, 2001. Especial-Café.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Aug. 2003.

BUCHELI, P.; KANCHANOMANI, C.; MEYER, I.; PITTET, A. Development of ochratoxin A during Robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 48, p. 1358-1362, 2000.

BUCHELI, P.; MEYER, I.; PITTET, A.; VUATAZ, G.; VIANI, R. Industrial storage of green robusta under tropical conditions and its impact on raw material quality and Ochratoxin A content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 46, n. 11, p. 4507-4511, Nov. 1998.

CARVALHO, V. D.; CHALFOUN, S. M.; CHAGAS, S. J. de R. Relação entre a classificação de café pela bebida e composição físico-química, química e microflora do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15., 1989, Maringá. *Resumos...* Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989. p. 25-26.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. O papel dos microrganismos na qualidade e segurança do café. In: ENCONTRO SUL MINEIRO DE

CAFEICULTURA, 8.; SIMPÓSIO DE PESQUISA CAFEIEIRA DO SUL DE MINAS, 3., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: EMATER/EPAMIG/UFLA, 2002. p. 200.

CHRISTENSEN, M. The *Aspergillus ochraceus* Group: two new species from western soils and a synoptic key, *Mycologia*, New York, v. 74, n. 2, p. 210-225, Mar./Apr. 1982.

CHRISTENSEN, M. A Synoptic key and evaluation of Species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia*, New York, v. 73, n. 6, p. 1056-1084, Nov./Dec. 1981.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T-H. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press, 1980. v. 1.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening- method for toxigenic moulds in pure cultures. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, London, v. 13, n. 3, p. 128-130, 1980.

HEILMANN, W.; REHFELDT, A. G.; ROTZOLL, F. Behavior and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. *European Food Research Technology*, New York, v. 209, n. 3/4, p. 297-300, 1999.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. Toxigenic fungi: *Aspergillus*. In: \_\_\_\_\_. **Microorganisms in foods: Characteristics of food pathogens**. London: Blakie Academic and Professional, 1996. p. 347-381.

KLICH, M. A. Morphological studies of *Aspergillus* Section *Versicolores* and related species. *Mycologia*, Lawrence, v. 85, n. 1, p. 100-107, Jan./Feb. 1993.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their Teleomorphs**. North Ryde, 1988.

KOZAKIEWICZ, Z.; SMITH, D. Physiology of *Aspergillus*. In: SMITH, J. E. (Ed.). **Biotechnology handbook 7 - *Aspergillus***. New York: Plenum Publishing Corporation, 1994. p. 1-18.

LACEY, J. *Aspergilli* in Feeds and Seeds. In: POWELL, K. A.; RENWICK, A.; PEBERDY, J. F. (Ed.). **The Genus *Aspergillus*: from taxonomy and genetics to industrial application**. 1994. 380 p.

- LEVI, C. P.; BORKER, E. Survey of green coffee for potential aflatoxin contamination. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry**, Gaithersburg, v. 51, n. 3, p. 600-602, 1968.
- LÓPEZ-GARAY, C.; BATUTISTA ROMERO, E.; MORENO GONZÁLEZ, E. Microflora of the stored coffee and its influence on quality. In: **INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON THE CHEMISTRY OF COFFEE**, 12., 1987, Montreux. **Proceedings....** Montreux: ASIC, 1987. p. 758-770.
- MENON, S. N. Quality improvement on the Estate and processing technology in coffee. **Indian Coffee**, New Delhi, v. 53, n. 12, p. 15-20, Dec. 1989.
- MISLIVEC, P. B.; BRUCE, V. R.; GIBSON, R. Incidence of Toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 46, n. 11, p. 969-973, Nov. 1983.
- NAIDU, R. Mycotoxins in coffee. **Indian Coffee**, New Delhi, v. 60, n. 8, p. 9-11, Aug. 1996.
- NOU, M. J. R.; ROMBOUTS, F. M. Fermentative preservation of plant foods. **Journal of Applied Bacteriology Symposium**, Oxford, v. 73, p. 136S-147S, 1992. Supplement.
- PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important. **Medical Mycology**, Oxford, n. 38, p. 17-22, 2000. Supplement 1.
- PITT, J. I.; BASÍLICLO, J. C.; ABARCA, M. L.; LÓPEZ, C. Mycotoxins and toxigenic fungi. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, p. 41-46, 2000. Supplement 1.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997.
- PUERTA Q., G. I. Calidad en taza de las variedades de *Coffea arabica* L. cultivadas em Colômbia. **Cenicafé, chinchina**, v. 49, n. 4, p. 265-278, oct./dic. 1998.
- RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The Genus Aspergillus**. Baltimore: Williams and Wilkins Company, 1965.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi**. 4. ed. Wageningen: Centraalbureau Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 2000.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144 p.

SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil, **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 60, n. 3/4, p. 251-260, Sept. 2000.

SMITH, J. E.; CUERO, R. G. Interaction between toxic and non-toxic fungi in gamma irradiation sterilized cereals. In: FLANNINGAN, B. (Ed.). **International Biodeterioration- Proceedings of the Spring Meeting of the Biodeterioration Society on Spoilage and Mycotoxins of Cereals and the Stored Products**. Arlington: CAB International, 1986. p. 49-54. Supplement 22.

SOLIMAN, K. M. Incidence, level, and behavior of aflatoxins during coffee bean roasting and decaffeination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 25, p. 7477-7481, Dec. 2002.

TANIWAKI, M. H.; BANHE, A. A.; IAMANAKA, B. T. Incidência de fungos em café. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 2000, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR/IRD, 1999. p. 487-492.

URBANO, G. R.; TANIWAKI, M. H.; LEITÃO, M. F. DE F.; VICENTINI, M. C. Occurrence of Ochratoxin A-Production Fungi in Raw Brazilian Coffee. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 8, p. 1226-1230, Aug. 2001.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os frutos de café após a colheita podem ser processados via seca ou úmida, fornecendo bebidas de café com características sensoriais diferentes. O processamento úmido é pouco realizado no Brasil sendo mais utilizado em países com clima úmido, como Colômbia a fim de se evitar a contaminação por microrganismos deteriorativos e acelerar o processo de secagem.

O processamento seco ou natural ainda predomina no Brasil. Especula-se que cafés processados via seca sempre fornecerão bebidas de inferior qualidade comparados àqueles processados via úmida. Este fato é incorreto. A bebida de café nesses dois tipos de processamento terão características sensoriais diferentes, porém boas para paladares de consumidores diferentes. Enquanto em cafés processados via úmida obtêm-se bebidas mais suaves, ter-se-ão cafés mais encorpados a partir de grãos processados via seca. Em qualquer tipo de processamento se houver má condução do cultivo e durante o período pós-colheita dos frutos a qualidade da bebida será comprometida.

Os cafés naturais apresentam maior probabilidade de fornecerem bebidas de inferior qualidade, exigindo cuidados especiais durante a colheita, secagem e armazenamento do café nesse tipo de processamento muitas vezes é negligenciado pelo produtor.

A diversidade microbiana nestes frutos de café é intensa e diferenciada no decorrer do processo de fermentação/secagem. A presença de açúcares facilmente assimiláveis pelos microrganismos presentes na polpa e mucilagem e a alta umidade dos frutos favorecem a colonização de microrganismos que podem interferir na qualidade. A colonização na superfície dos frutos é primeiramente feita por bactérias que serão sucedidas por leveduras e fungos filamentosos, quando há diminuição do teor de umidade.

O isolamento e identificação de espécies de bactérias, leveduras e fungos a partir dos frutos e grãos de café natural revelaram o grande potencial que estes microrganismos oferecem para a melhoria da qualidade dos cafés naturais, diferentemente de pesquisas recentes com a fermentação de café despulpado que indicam a não participação de microrganismos envolvidos na degradação da mucilagem. É possível que algumas espécies de bactérias e leveduras em cafés naturais atuem diretamente sobre a decomposição da polpa e mucilagem por possuírem enzimas pectinolíticas, podendo, portanto, e, portanto podem ser utilizadas como inóculos durante o período de secagem em terreiro como aceleradores da secagem, especialmente vantajosos em localidades com alta umidade relativa e baixa insolação no período de fermentação/secagem dos frutos de café.

Em cafés naturais a participação de microrganismos pode ir além da degradação da polpa e mucilagem. Algumas espécies de leveduras apresentam potencial no controle do crescimento de fungos potencialmente toxigênicos e produção de toxinas, principalmente a aflatoxina. Apesar de esta toxina ter sido descartada como risco para a saúde humana pela ingestão da bebida de café, pode-se testar a capacidade de redução ou inibição de toxinas de leveduras contra fungos produtores de ocratoxina A, pois esta é a principal micotoxina estudada em café.

Portanto, o estudo das interações microbianas ocorridas em frutos torna-se essencial para o estabelecimento de novas práticas na cultura do café que favoreçam o período de fermentação dos frutos, melhorando a qualidade do café através (1) da elaboração de inóculos que acelerem o período de fermentação dos frutos, como por exemplo, inóculos com microrganismo(s) com alta capacidade de produção enzimática, principalmente para regiões de clima adverso no período de secagem dos frutos; (2) inóculos que diminuam a produção de toxina por fungos potencialmente toxigênicos em frutos ainda na

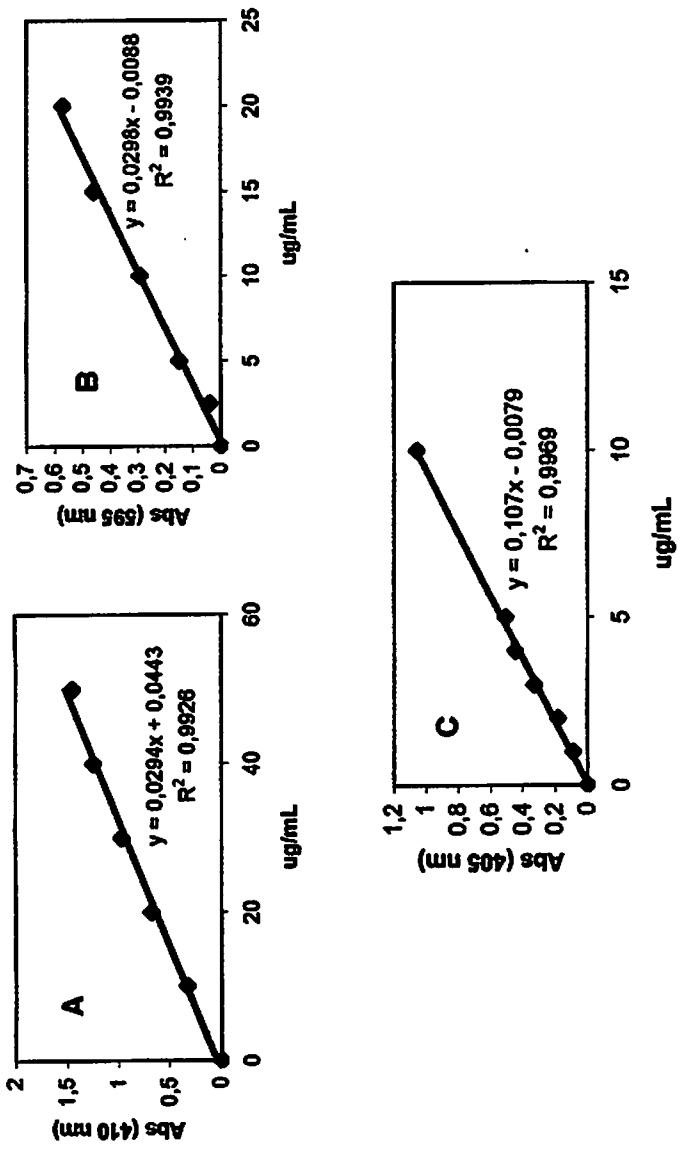
árvore ou que (3) compitam por nutrientes e espaço com os fungos potencialmente toxigênicos; e (4) inóculos de microrganismos que atuem como controle biológico de pragas do cafeeiro.

Por fim, consideramos que a microbiota presente na superfície de frutos de café durante o processamento natural pode atuar na degradação da polpa e mucilagem que, e através do conhecimento aqui adquirido do potencial enzimático e da capacidade de produção de ácidos, esta microbiota pode ser usada como potencializador da qualidade da bebida de café natural.



## ANEXOS

		Página
<b>ANEXO A</b>		
<b>FIGURA 1A</b>	Curvas padrão de glicose, Albumina de Soro Bovino e p-nitrofenol.....	156



**FIGURA 1A** Curvas padrões. (A) Glicose; (B) Albumina de Soro Bovino (BSA); (C) p-nitrofenol.