



APROVEITAMENTO DE BORRA DE CAFÉ PARA PRODUÇÃO DE AROMA DE COCO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Felipe Rivera Miguel

Projeto de Final de Curso

Orientadores

Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc.
Cláudia Moraes de Rezende, D.Sc.
Elisabete Barbosa de Paula Barros, D.Sc.

Agosto de 2013

APROVEITAMENTO DE BORRA DE CAFÉ PARA PRODUÇÃO DE AROMA DE COCO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Felipe Rivera Miguel

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Químico Industrial.

Aprovado por:

Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.

Eduardo Henrique Miranda Walter, D.Sc.

Daniela Scherner Ferreira

Orientado por:

Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc.

Cláudia Moraes de Rezende, D.Sc.

Elisabete Barbosa de Paula Barros, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
Agosto de 2013

Miguel, Felipe Rivera.

Aproveitamento de borra de café para produção de aroma de coco por fermentação em estado sólido/Felipe Rivera Miguel. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2013.

x, 68 f.; il.

(Projeto Final de Curso) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2013

Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite e Cláudia Moraes de Rezende e Elisabete Barbosa de Paula Barros

1. Borra de café. 2. Aroma de coco. 3. Fermentação em estado sólido. 4. Projeto Final de Curso (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Selma Gomes Ferreira Leite e Cláudia Moraes de Rezende e Elisabete Barbosa de Paula Barros. I. Título.

"Podes dizer-me, por favor, que caminho devo seguir para sair daqui?
Isso depende muito de para onde queres ir – respondeu o gato.
Preocupa-me pouco aonde ir – disse Alice.
Nesse caso, pouco importa o caminho que sigas – replicou o gato."

Lewis Carroll

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida que me inspira a ser cada dia melhor.

À minha mãe Luisa, por todo esforço realizado na minha criação, sempre incentivando o meu interesse pelo estudo e grande responsável pelo que sou hoje. Dedico este trabalho e todas as conquistas da minha vida à você!

À minha família que, embora pequena, ocupa um espaço gigante no meu coração. Em especial, à Dona Lola e tia Teresa, por todo apoio.

Ao Gabriel, mais que companheiro, pela compreensão, companhia, carinho e apoio, principalmente por ouvir meus desabafos e me fazer esquecer todas as preocupações no decorrer deste trabalho.

Às professoras orientadoras Cláudia e Selma, por abrirem prontamente as portas de seus laboratórios. Pela orientação, carinho, paciência e principalmente por sempre me deixarem livre para tomar minhas próprias decisões.

A Bete, *best friend*, pela orientação, por ter percebido em mim um potencial que eu não conhecia e também por sempre ter uma palavra de incentivo nos momentos em que tudo parecia dar errado.

A Alci, não apenas por ter fornecido a borra de café e viabilizado as análises físico-químicas, mas por sempre estar disposta a me ajudar com um enorme sorriso no rosto.

A todos os colegas do Laboratório de Análise de Aromas (626-A) e do Laboratório de Microbiologia (E-113) pelo companheirismo do dia-a-dia. Em especial às queridas Andrea Alves e Manu Pessanha.

À querida Daniela Ferreira, pela participação na banca examinadora mesmo com a agenda lotada, pelo valioso conhecimento transmitido nos papos durante o estágio, pela paciência e por ser uma profissional inspiradora.

Aos amigos da graduação, pela ajuda com materiais, pelos papos do corredor, pelas trocas de idéias, pelas risadas, pelas palavras de incentivo, enfim, por terem proporcionado a alegria em meio à rotina tão difícil.

Aos amigos de fora da graduação, por compreenderem a minha ausência e por sempre terem torcido pela minha vitória.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Químico Industrial.

APROVEITAMENTO DE BORRA DE CAFÉ PARA PRODUÇÃO DE AROMA DE COCO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Felipe Rivera Miguel

Agosto, 2013

Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc.

Cláudia Moraes de Rezende, D.Sc.

Elisabete Barbosa de Paula Barros, D.Sc.

A borra de café é o resíduo sólido obtido da extração dos grãos de café torrados com água. Esse resíduo é caracterizado por alto teor de umidade, acidez, carga orgânica e apresenta compostos característicos como cafeína, taninos e polifenóis. Diversos estudos com borra de café apontam o resíduo como potencial fonte de óleo vegetal para a produção de biodiesel sem citar o aproveitamento do resíduo sólido desengordurado. A fermentação em estado sólido (FES) oferece uma alternativa para a valorização de resíduos sólidos agroindustriais e pode, dentre muitas aplicações, ser utilizada para a produção de aromas. Os aromas são responsáveis por aumentar a aceitação dos alimentos pelos consumidores. Quando produzidos por métodos biotecnológicos, os aromas recebem a classificação de natural. A substância 6-pentil- α -pirona (6-PP) é uma lactona com aroma característico de coco, aprovada para uso em alimentos. Esta substância é produzida naturalmente por fungos do gênero *Trichoderma* em cultivos líquidos e sólidos. Este trabalho teve como objetivo a avaliação da borra de café desengordurada como suporte sólido para a produção de 6-PP por FES pelo fungo filamentoso *Trichoderma harzianum*. O óleo da borra foi previamente extraído com etanol. A caracterização química indicou que a borra desengordurada é composta de (em % m/m): umidade (8,82), cinzas (1,79), proteínas (12,82), lipídios (2,98), fibras (56,62) e carboidratos totais (73,70). O suporte sólido para a fermentação foi impregnado com uma solução nutritiva contendo glicose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , KH_2PO_4 , KCl , CaCl_2 , FeSO_4 e ZnSO_4 . A cinética de produção de aroma indicou a produção máxima de $3,40 \pm 0,36$ mg 6-PP/g massa seca (MS) no quinto dia de fermentação, decaindo nos dias posteriores. Um planejamento experimental de Plackett-Burman foi utilizado para estudar os componentes da solução nutritiva; a umidade inicial; sacarose, como fonte alternativa de carbono; e extrato de levedura, como complemento nutricional. Os resultados indicaram que para aumentar a produção de 6-PP a solução nutritiva deve conter glicose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 , FeSO_4 e extrato de levedura. A umidade inicial do meio foi fator mais significativo para a produção do aroma.

Palavras-chave: Borra de café, aroma de coco, fermentação em estado sólido

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

6-PP	6-pentil- α -pirona
ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
a_w	Atividade de água
C/N	Relação carbono/nitrogênio
CG	Cromatógrafo gasoso
CV	Coefficiente de variação
EM	Espectrômetro de massas
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDN	Fibra em detergente neutro
FES	Fermentação em estado sólido
FEMA	<i>Flavor and Extract Manufacturers Association</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FS	Fermentação em submerso
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
ICO	<i>International Coffee Organization</i>
m/z	Relação massa/carga do espectro de massas
M^+	Íon molecular
MS	Massa seca
PDA	<i>Potato-dextrose-agar</i>
PDMS	Polidimetilsiloxano
R^2	Coefficiente de determinação
SPME	Microextração em fase sólida

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Produção mundial de café no período de 2007 a 2012, p. 14

Tabela 2 Exportação mundial de café no período de 2006 a 2011, p.14

Tabela 3 Substâncias aromatizantes e seus respectivos microrganismos produtores, p. 30

Tabela 4 Composição química da solução nutriente utilizada durante a cinética de produção de 6-PP, p. 39

Tabela 5 Valores dos níveis definidos para as variáveis experimentais estudadas no planejamento de Plackett-Burman, p. 41

Tabela 6 Composição química e pH da borra de café expresso, p. 44

Tabela 7 Corridas experimentais e valores da variável de resposta para o planejamento de Plackett-Burman, p. 53

Tabela 8 Resultados da análise de regressão do planejamento de Plackett-Burman (variáveis normalizadas), p. 55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Eco gumelo, produto que permite que o consumidor cultive fungos comestíveis em casa. a) *Pleurotus ostreatus* b) *Pleurotus citrinopileatus*, p. 20
- Figura 2** Estrutura da 6-pentil- α -pirona (6-PP), p. 32
- Figura 3** *Trichoderma harzianum* 4040 após 7 dias de crescimento, p. 39
- Figura 4** Frascos contendo a borra de café inoculados por *Trichoderma harzianum* 4040 para determinação da cinética de produção de 6-PP, p. 40
- Figura 5** Aparato para microextração em fase sólida por *headspace* de 6-PP, p. 42
- Figura 6** Distribuição granulométrica da borra de café expresso, p. 47
- Figura 7** Curva de calibração para quantificação 6-PP por FES em borra de café expresso, p. 48
- Figura 8** Cromatograma obtido da extração por SPME em *headspace* da borra de café impregnada com solução padrão de 6-PP na concentração de 200 mg/L, p. 48
- Figura 9** Cromatograma obtido da extração em *headspace* do meio fermentado após 5 dias, p. 49
- Figura 10** Espectro de massa referente ao pico com tempo de retenção de 15 minutos do cromatograma obtido da extração por SPME em *headspace* da borra de café impregnada com solução padrão de 6-PP na concentração de 200 mg/L, p. 49
- Figura 11** Espectro de massa referente ao pico com tempo de retenção de 15 minutos do cromatograma obtido da extração em *headspace* do meio fermentado após 5 dias, p. 50
- Figura 12** Perfil cinético de produção de 6-PP por FES, p. 50
- Figura 13** Evolução do teor de umidade durante a FES, p. 52
- Figura 14** Diagrama de Pareto normalizado obtido para a variável de resposta [6-PP], p. 54
- Figura 15** Correlação entre os valores previstos e observados no planejamento de Plackett-Burman, p. 57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1	O mercado mundial de café	13
2.2	O consumo de café	15
2.2.1	O café expresso	16
2.3	A borra de café	17
2.3.1	Reutilização da borra de café	18
2.4	Fermentação em estado sólido (FES)	20
2.4.1	Características fundamentais da FES	21
2.4.2	Aspectos da engenharia bioquímica aplicados à FES	23
2.4.2.1	Umidade e atividade de água	23
2.4.2.2	Temperatura e transferência de calor	24
2.4.2.3	Transferência de massa e difusão enzimática	25
2.4.2.4	Estimativa de biomassa e cinética de crescimento	27
2.5	A utilização de aromas na indústria de alimentos	27
2.6	A produção de aromas por microrganismos	29
2.7	Produção de 6-pentil-α-pirona por <i>Trichoderma</i> spp.	31
3	METODOLOGIA	36
3.1	Coleta da borra de café e armazenamento	36
3.2	Extração do óleo da borra de café	36
3.3	Caracterização físico-química da borra de café	36
3.3.1	Umidade	37
3.3.2	Cinzas	37
3.3.3	Proteínas	37
3.3.4	Lipídios	37
3.3.5	Fibras	37
3.3.6	Carboidratos	37
3.3.7	pH	38
3.3.8	Granulometria	38
3.4	Microrganismo e forma de conservação	38
3.5	Obtenção do inóculo	39

3.6	Determinação da cinética de produção de 6-PP em FES	39
3.7	Seleção dos componentes da solução nutriente	40
3.8	Extração da amostra para quantificação de 6-PP	41
3.9	Análise da amostra por CG-EM	42
3.10	Identificação de 6-PP	43
3.11	Construção da curva de calibração para quantificação de 6-PP	43
3.12	Determinação do teor de massa seca e concentração de 6-PP	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	Caracterização físico-química da borra de café	44
4.2	Produção de 6-PP por FES	47
4.2.1	Construção da curva de calibração	47
4.2.2	Cinética de produção de 6-PP	48
4.2.3	Teor de umidade durante a FES	51
4.3	Seleção dos componentes da solução nutritiva	52
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	58
5.1	Conclusões	58
5.2	Sugestões para trabalhos posteriores	59
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

O consumo de café foi adotado como um hábito universal e hoje faz parte do cotidiano das pessoas, estando em grande parte relacionado a momentos sociais de interação com familiares, amigos e colegas de trabalho.

Nas últimas décadas, o aumento da informação e conhecimento tem modificado a forma como o café é consumido. O consumidor atual é exigente e preza pela boa qualidade dos grãos e da bebida, o que contribui para aumentar a procura por cafés especiais.

Dentre os cafés especiais, o café expresso figura como um dos principais responsáveis pelo crescimento e consolidação deste novo segmento de mercado. A expansão acelerada do número de cafeterias nos grandes centros urbanos foi um dos principais fatores que contribuíram para a ampliação do consumo e aceitação deste tipo de café.

O aumento do consumo de cafés, no entanto, é responsável pela geração de grandes volumes de borra, o resíduo obtido da infusão dos grãos. Este resíduo é caracterizado por elevada carga orgânica, umidade e acidez, além da presença de compostos característicos como cafeína, taninos e polifenóis, o que torna a sua disposição em aterros sanitários uma fonte de poluição ambiental.

A utilização do óleo extraído da borra de café demonstrou ser de grande interesse para a produção de biodiesel, entretanto, este tipo de procedimento não diminuiu o volume de resíduo sólido gerado, que ainda é rico em macronutrientes, principalmente de material celulósico e hemicelulósico.

A fermentação em estado sólido (FES) tem sido relatada como um processo biotecnológico adequado para o tratamento e utilização de resíduos provenientes da agroindústria, pois permite a valorização destes resíduos para a produção de compostos de alto valor agregado, dentre eles, os aromas.

Os seres humanos são fortemente influenciados pelas características sensoriais de sabor, odor e textura dos alimentos. Assim sendo, a utilização de aromas pela indústria de alimentos é, em boa parte, responsável por garantir a aceitação do produto final. Embora muitos aromas sintetizados quimicamente estejam disponíveis a custos muito inferiores aos dos aromas naturais, existe uma tendência atual a se evitar o consumo de produtos rotulados como sintéticos.

A aplicação dos conhecimentos da biotecnologia na indústria de aromas é considerada, então, uma alternativa economicamente interessante, uma vez que as legislações de diversos países consideram os substâncias aromatizantes de origem microbiana como naturais.

Dentre os aromas produzidos por microrganismos, destaca-se a 6-pentil- α -pirona (6-PP), uma lactona com aroma característico de coco, de grande interesse para a indústria de alimentos, conhecida também por suas propriedades de fungicida. Esta substância tem seu uso aprovado em alimentos pela agência norte americana *Food and Drug Administration* (FDA).

A 6-PP foi identificada como constituinte volátil biossintetizado em maior quantidade por fungos do gênero *Trichoderma*, comumente isolados de solos. Desde então, diversos estudos foram realizados visando à bioprodução desta substância, em cultivos líquido e sólido, sendo este relatado por proporcionar maiores rendimentos da substância.

À vista disso, o presente trabalho tem como objetivo a avaliação da borra de café desengordurada como suporte sólido para a produção de 6-PP por FES pelo fungo filamentosso *Trichoderma harzianum*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O mercado mundial de café

O cultivo, processamento, comércio, transporte e marketing do café consistem em uma gigantesca cadeia constituída de produtores, intermediários, exportadores, importadores, torrefadores e varejistas até chegar ao consumidor final. Esta cadeia movimenta cerca de 20 milhões de famílias, em 50 países, que trabalham diretamente no cultivo de café. Estima-se que 11 milhões de hectares de terras agrícolas do mundo sejam dedicadas ao cultivo de café (GLOBAL EXCHANGE, 2013).

As principais espécies de interesse econômico são a arábica (*Coffea arabica*) e a robusta (*Coffea canephora*). O café arábica, considerado de melhor qualidade, corresponde à aproximadamente 70% da produção mundial de café, sendo 80% proveniente da América Latina. Já o café robusta, de qualidade inferior, é cultivado principalmente na África e Ásia (GLOBAL EXCHANGE, 2013).

No comércio mundial, o café é uma das *commodities* mais valiosas, ocupando por muitos anos a segunda posição como fonte de divisas para os países produtores, atrás apenas do petróleo. Para os países em desenvolvimento, por exemplo, as exportações de café somam mais de 50% das receitas em moeda estrangeira (ICO, 2013a).

Embora a produção de café tenha se disseminado em muitos países do mundo, os cinco maiores países produtores detêm cerca de 70% de toda a produção mundial. Brasil, Vietnã e Indonésia são, respectivamente, o primeiro, segundo e terceiro maiores países produtores de café, contribuindo, juntos, com mais de 50% da produção mundial. A Tabela 1 mostra dados da produção mundial de café dos últimos seis anos.

As exportações de café apresentaram um aumento percentual de aproximadamente 13% nos últimos cinco anos. A Tabela 2 mostra os principais países exportadores. O Brasil, além de maior produtor, ocupa também a posição de maior exportador mundial de café, com 32% de participação de mercado em 2011.

Tabela 1 Produção mundial de café no período de 2007 a 2012.

Países	Produção (em mil de sacas de 60 kg)					
	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Brasil	36.070	45.992	39.470	48.095	43.484	50.826
Vietnã	16.405	18.438	17.825	19.467	24.058	22.000
Indonésia	4.474	9.612	11.380	9.129	8.620	10.950
Colômbia	12.516	8.664	8.098	8.523	7.653	8.000
Etiópia	5.967	4.949	6.931	7.500	6.008	6.500
Honduras	3.640	3.351	3.403	4.280	5.705	5.400
Índia	4.319	3.950	4.794	5.033	5.233	5.258
México	4.150	4.651	4.109	3.994	4.546	5.160
Peru	3.063	3.872	3.286	4.069	5.581	4.750
Guatemala	4.100	3.785	3.835	3.950	3.840	3.500
Uganda	3.449	3.290	2.845	3.203	2.817	3.000
Costa do Marfim	2.317	2.397	1.795	982	1.906	2.000
Costa Rica	1.771	1.287	1.304	1.392	1.462	1.616
Nicarágua	1.905	1.445	1.871	1.669	1.774	1.530
El Salvador	1.505	1.450	1.075	1.850	1.163	1.420
Outros países	10.926	11.355	10.567	10.299	10.522	12.100
Total	116.612	128.523	122.599	133.470	134.401	144.061

Fonte: ICO (2013a).

Tabela 2 Exportação mundial de café no período de 2006 a 2011.

Países	Exportação (em mil de sacas de 60 kg)					
	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Brasil	27.978	28.398	29.728	30.481	33.494	33.610
Vietnã	13.905	17.936	16.101	17.052	14.229	17.675
Colômbia	10.945	11.300	11.085	7.894	7.822	7.733
Indonésia	5.280	4.149	5.741	7.907	5.489	6.159
Índia	3.578	3.319	3.377	3.007	4.395	5.840
Peru	3.881	2.879	3.778	3.074	3.817	4.697
Honduras	2.898	3.312	3.259	3.084	3.349	3.947
Guatemala	3.312	3.726	3.778	3.493	3.468	3.697
México	2.570	2.912	2.448	2.838	2.498	2.895
Etiópia	2.925	2.604	2.852	1.851	3.324	2.675
El Salvador	1.293	1.210	1.438	1.309	1.082	1.826
Nicarágua	1.445	1.259	1.625	1.374	1.712	1.468
Costa do Marfim	1.751	2.196	1.490	1.807	1.916	807
Outros países	10.348	11.167	10.791	10.994	10.053	11.494
Total	92.109	96.367	97.446	96.165	96.648	104.523

Fonte: ABIC (2013).

Em 2012, o café somou 6,7% de todas as exportações agrícolas do Brasil. Como principais destinos para o café verde, encontram-se a Alemanha, Estados Unidos da América (EUA), Itália e Japão. Para o café solúvel, os principais destinos são EUA, Itália, Argentina e Japão. Por fim, para o café torrado e moído, EUA, Itália, Argentina e Japão estão entre os principais destinos (MAPA, 2013).

2.2 O consumo de café

O café tem sido consumido há mais de 1.000 anos e atualmente é a bebida mais consumida no mundo, depois da água, atingindo valores anuais de consumo de mais de 600 bilhões de xícaras (ICO, 2013a; MUSSATO et al., 2011b).

O consumo de café foi adotado como um hábito universal e faz parte do cotidiano das pessoas, sendo possível observá-lo em praticamente todos os lares e instituições públicas ao redor do mundo (ENCARNAÇÃO & LIMA, 2003). De acordo com Zylbersztajn, Farina e Santos (1993), o café não apresenta concorrência direta com nenhum outro tipo de produto e, para seus consumidores, é considerado um produto insubstituível.

As motivações para o consumo são muitas, mas em geral, pesquisas apontam que o café é identificado pelo consumidor como grande integrador social, estando além de necessidades fisiológicas, relacionado a momentos de interação com familiares, amigos e colegas de trabalho. Além disso, pesquisadores e especialistas da área de saúde concentram cada vez mais esforços e iniciativas para incentivar o consumo de café e esclarecer antigas questões polêmicas relacionando o consumo de café e cafeína à saúde humana (ARRUDA et al., 2009)

De acordo com as estatísticas levantadas pela *International Coffee Organization* (ICO, 2013a), o consumo mundial de café cresceu significativamente nos últimos dez anos, com taxas médias de crescimento anual de 2,3% desde o ano de 2001. Ademais, o mercado apresenta tendências de crescimento também para os próximos anos, mesmo com a crise econômica presente em grandes mercados como a Europa Ocidental e a América do Norte.

No Brasil, de acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC, 2013), o consumo em 2012 foi de 20,33 milhões de sacas, contabilizando um aumento de 3,09% em relação aos 19,72 milhões de sacas do ano anterior. O consumo *per capita* brasileiro registrou um aumento de 2,10% em relação ao ano anterior, atingindo o recorde histórico de 4,98 kg de

café torrado/habitante/ano. Este valor é superior ao consumo de países como EUA, Itália e França.

Em suma, o cenário atual mostra que, embora seja notado apenas um ligeiro aumento de consumo nos grandes mercados importadores, o aumento do consumo mundial tem sido alavancado pelos mercados emergentes e o pelo crescimento do consumo doméstico em países exportadores.

É importante ressaltar que o aumento do consumo tem sido promovido em diversos países através de programas estratégicos como o *International Coffee Agreement* (2007), da ICO, que tem como objetivo fortalecer o mercado global de café e promover sua expansão, de forma sustentável, beneficiando todos os participantes do setor. No Brasil, programas de qualidade como o Selo de Pureza (1989) e, posteriormente, o Programa de Qualidade do Café (2004), ambos promovidos pela ABIC, impulsionaram o consumo nacional através do estímulo ao consumo de cafés de qualidade superior e com maior valor agregado (ABIC, 2013).

O resultado de sucesso desses programas tornou o Brasil exemplo para países produtores que desejam aumentar seu consumo doméstico, resultando, inclusive, na criação do manual *Step-by-step Guide to Promote Coffee Consumption in Producing Countries*, pela ICO, no qual são dadas as diretrizes e motivações para que os países desenvolvam seus próprios mercados (THE COFFEE GUIDE, 2013; ICO, 2013b).

2.2.1 O café expresso

Nas últimas décadas, a forma de consumir café vem se modificando significativamente. O consumidor hoje preza pela boa qualidade dos grãos e da bebida, buscando cafés diferenciados e contribuindo, assim, para o fortalecimento de novos segmentos de café (SAES, 2003 *apud* NASSIF et al., 2005).

Além da diferenciação, nota-se a busca por formas mais práticas de preparo da bebida para consumo imediato, como por exemplo, os cafés em sachês, as cápsulas, o café expresso e os serviços de preparo em coadores e filtros de xícaras únicas (ABIC, 2013).

Neste cenário de mudanças, as indústrias têm sido forçadas a aperfeiçoar continuamente seus serviços, disponibilizando uma série de cafés torrados especiais para atender às novas demandas do mercado (VEGRO et al., 2001).

Os cafés diferenciados englobam, principalmente, os tipos gourmet, expresso, orgânico, ecológico, descafeinado, aromatizado e *cappuccino*. Dentre os cafés especiais, o

café expresso é um dos principais responsáveis pelo crescimento e consolidação deste novo segmento de mercado (SAMPAIO & SAMPAIO, 2000).

O café expresso é resultado da infusão obtida pela passagem de água quente, em temperaturas que variam de 83-90°C, pelos grãos de café torrado e moído, sob pressão de 9 ou mais atmosferas. A maior parte dos cafés expressos é constituída de *blends* de diferentes tipos de café, combinados de forma a se obter as características desejadas na bebida final. A infusão resulta em uma bebida encorpada, com intenso sabor e aroma e com uma camada superior de espuma densa de cor marrom-clara. A utilização de água pressurizada é responsável por acentuar aspectos de sabor e aroma, fornecendo à bebida um perfil sensorial único, que não é obtido quando o café é preparado da maneira tradicional (THE COFFEE GUIDE, 2013; ILLY, 2013).

Um dos grandes fatores que contribuíram para a ampliação do consumo e aceitação do café expresso foi a expansão acelerada do número de cafeterias nos grandes centros urbanos. As cafeterias são locais especializados no preparo de café, reconhecidos pelo consumidor pela alta qualidade do produto oferecido e pelo ambiente propício a momentos de interação social e descontração (VEGRO et al., 2001; NASSIF et al., 2005).

Por outro lado, o lançamento de cafés em cápsulas, juntamente com o aumento da eficiência das máquinas caseiras de expresso, reinventaram a forma como o café é consumido nos lares, e também têm sido responsáveis pelo aumento do consumo de café expresso (ABIC, 2013).

No cenário brasileiro, por exemplo, estimava-se a existência de 60 mil máquinas de café no ano de 2001, enquanto no ano de 2012 esse número encontrava-se em mais de 850 mil máquinas. Embora visível o crescimento na última década, há muito espaço para o crescimento deste segmento no Brasil, que ainda se encontra longe dos padrões europeus e americanos de consumo (ZAPAROLLI, 2001; ABIC, 2013; MARKCAFE, 2013).

2.3 A borra de café

A borra de café é o resíduo sólido obtido da extração dos grãos de café torrados com água quente ou vapor. Esta pode ser obtida como resíduo industrial, durante o processamento dos grãos para a produção de café solúvel (instantâneo), ou como resíduo pós-consumo, proveniente do preparo caseiro da bebida.

Estima-se que 50% do processamento mundial de café seja para a produção de café solúvel e, somente neste processo, são geradas 6 milhões de toneladas de borra por ano (TOKIMOTO et al., 2005).

Embora os dados da geração de borra doméstica não sejam de fácil obtenção e nenhuma estimativa tenha sido encontrada para ilustrar este trabalho, não se pode negligenciar que o preparo de café em lares, bares, restaurantes e empresas gera grandes quantidades de resíduo.

A composição química da borra obtida industrialmente varia ligeiramente em relação à borra pós-consumo. Todavia, ambas apresentam altos teores de umidade, acidez e carga orgânica. A matéria orgânica é constituída principalmente de carboidratos na forma de celulose e hemicelulose, lipídios e proteínas e demanda uma grande quantidade de oxigênio para ser biodegradada (NOGUEIRA & COSTA, 1996).

A borra também contém cafeína, polifenóis e taninos característicos dos grãos de café. Esses compostos atuam como fatores antifisiológicos e antinutricionais para algumas espécies de animais, vegetais e microbianas, podendo restringir a sua biodegradabilidade e causar poluição de corpos d'água e águas subterrâneas (GOKULAKRISHNAN et al., 2005; PANDEY et al., 2000; HARRISON, 1971).

Em razão das características de biodegradabilidade e da presença de compostos solúveis em água, que alterariam o padrão de potabilidade, a borra é classificada pela norma¹ NBR 10004:2004, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), como “Resíduos Classe II A – Não perigosos e Não inertes” (ABNT, 2004).

2.3.1 Reutilização da borra de café

O posicionamento social, na atualidade, demonstra maior conscientização quanto à sustentabilidade na forma de produção e comercialização de produtos no mercado. A tendência atual visa à diminuição dos impactos ambientais causados pelas atividades de todos os setores da economia, bem como as atividades cotidianas (SCHENINI, 2011).

A disposição da borra de café em aterros sanitários ainda é a principal forma de se destinar resíduo (MUSSATO et al., 2011b). Entretanto, essa forma de disposição final não se mostra apropriada, tendo em vista a característica altamente poluidora da borra, atrelada à

¹ A norma ABNT NBR 10004:2004 classifica os resíduos sólidos quanto aos seus riscos potenciais ao meio ambiente e à saúde pública, para que possam ser gerenciados adequadamente.

demanda atual pela diminuição dos impactos ambientais. Ademais, pode significar perda econômica de um material orgânico complexo e passivo de aproveitamento.

A busca de novas alternativas, visando à reutilização racional da borra e de outros resíduos, já faz parte do contexto gerencial de grandes indústrias, que não mais consideram seus resíduos como “lixo”. Algumas indústrias de café solúvel, por exemplo, queimam a borra em caldeiras adaptadas para geração de energia para a própria planta industrial, uma vez que o resíduo apresenta alto poder calorífico (MUSSATO et al., 2011b; SILVA et al., 1998).

Os primeiros relatos de aplicações alternativas para a borra visavam utilizar o material diretamente como fertilizante, entretanto, sua utilização requeria a suplementação de outros nutrientes e, por isso, foi considerada inviável economicamente (PFLUGER, 1975; GOPALAKISHNNA & NATARAJAN, 1974; TANGO, 1971).

A possibilidade de se enriquecer a capacidade fertilizante da borra de café através de processo de compostagem foi estudada por Nogueira e Costa (1996), que mostraram ser positiva a associação da borra a outros resíduos vegetais.

Devido ao elevado teor de óleo da borra, estudos mostram que este resíduo pode ser utilizado como fonte de óleo vegetal para a produção de biodiesel (AL-HAMAMRE et al., 2012; CAETANO, SILVA & MATA, 2012). Além disso, após a extração do óleo, o resíduo ainda pode ser utilizado para produção de combustível em *pellets* (KONDAMUDI, MAHAPATRA & MISRA, 2008). Choi et al. (2012) demonstraram também a possibilidade de produção de etanol a partir da borra, sem a necessidade de extração prévia do óleo.

A utilização da borra para produção de metanol e acetona, materiais de embalagem, resinas trocadoras de íons, filtros de cigarro, carreadores de inseticidas/pesticidas e adsorvente para remoção de corantes catiônicos também foram propostas, entretanto, existe uma grande barreira tecnológica ao desenvolvimento desses processos, uma vez que demandam tempo e investimentos elevados. Assim sendo, a queima para geração de energia, é a aplicação considerada mais viável economicamente (SILVA et al., 1998; MUSSATO et al., 2011b).

Embora a borra seja rica em material celulósico e hemicelulósico, poucos estudos no campo da tecnologia de fermentações foram realizados. A borra foi utilizada como substrato para a produção dos cogumelos comestíveis *Pleurotus ostreatus* (FAN, PANDEY & SOCCOL, 2001) e *Flammulina velutipes* (FAN et. al, 2000) por fermentação em estado sólido.

Atualmente, a técnica já está bem desenvolvida e inclusive foi lançada recentemente no mercado uma linha de produtos inovadores, chamados Eco Gumelo (Figura 1a) e Eco Gumelo *citrus* (Figura 1b), em que o consumidor pode cultivar seus próprios cogumelos

comestíveis em casa. Este produto utiliza a borra de café e água como substratos para o crescimento do fungo (GUMELO, 2013).



Figura 1 Eco gumelo, produto que permite que o consumidor cultive fungos comestíveis em casa. a) *Pleurotus ostreatus* b) *Pleurotus citrinopileatus*. Fonte: <http://pt.gumelo.com/>.

2.4 Fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) é o processo fermentativo caracterizado pelo crescimento e metabolismo dos microrganismos em suportes sólidos com baixa ou nenhuma concentração de água livre. O suporte sólido pode ser inerte, apenas servindo de apoio mecânico para o microrganismo, ou pode também atuar como fonte de nutrientes (SINGHANIA et al., 2009; MAZZUTTI et al., 2006).

De acordo com Pandey (2003), a FES vem ganhando atenção de pesquisadores e indústrias nas três últimas décadas, principalmente por algumas de suas vantagens práticas e econômicas em relação à fermentação em submerso (FS)². Dentre elas é possível citar a maior produtividade volumétrica, o maior rendimento de alguns produtos, a menor geração de efluentes e a possibilidade de reaproveitamento de resíduos agroindustriais como substratos.

É interessante salientar que o desenvolvimento de processos utilizando resíduos da agroindústria para a FES foi a área que mais despertou o interesse dos pesquisadores ao redor do mundo. A FES agrega valor a um resíduo de baixo custo e, ao mesmo tempo, favorece a redução dos impactos ambientais decorrentes do manejo inadequado desses resíduos (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003).

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo e, conseqüentemente, a geração de resíduos sólidos dessa atividade ocorre em grande quantidade. Esses resíduos

² A fermentação em submerso (FS) é um processo fermentativo que ocorre em meio líquido, onde as fontes de nutrientes estão geralmente solubilizadas.

podem causar sérios problemas ambientais quando acumulados ao longo de anos ou dispostos de forma inadequada. Nesse cenário, desde 1986, pesquisas têm sido conduzidas para incentivar a utilização mais eficiente desses resíduos como matérias-primas para bioprocessos. Dentre os resíduos estudados estão: os bagaços de mandioca, açaí, cana de açúcar e maçã; polpas de café, beterraba e frutas; cascas de café, arroz e banana; farelos de trigo, milho e arroz; sabugo de milho; tortas oleosas; etc (SINGHANIA, SOCCOL & PANDEY, 2008; COUTO & SANROMÁN, 2006; SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003).

O acelerado surgimento de inovações biotecnológicas, principalmente nos campos da tecnologia de fermentações e enzimas, possibilitou o desenvolvimento de diversos bioprocessos e ampliou consideravelmente o número de aplicações para a FES.

Atualmente, a FES pode ser utilizada na biorremediação e biodegradação de compostos perigosos, na desintoxicação de resíduos agroindustriais, na biotransformação de compostos químicos, no enriquecimento nutricional de culturas agrícolas e seus resíduos, no biopolpeamento de papel e na produção de diversos compostos de alto valor agregado incluindo antibióticos, alcalóides, fatores de crescimento de plantas, enzimas, ácidos orgânicos, biopesticidas, biossurfactantes, gomas, bioetanol, pigmentos, compostos de aroma, etc (PANDEY, SOCCOL & LARROCHE, 2007; PRABHAKAR et al., 2005; LONSANE et al., 1992).

2.4.1 Características fundamentais da FES

Os meios de cultivo sólidos apresentam alta viscosidade, em virtude da fase líquida limitada, o que dificulta uma boa mistura. Dessa forma, a principal característica destes meios é a alta heterogeneidade em relação ao crescimento microbiano e à concentração de solutos. Essa característica se opõe à FS, na qual o meio líquido permite uma melhor dispersão de oxigênio, biomassa e solutos (nutrientes e metabólitos), além da maior eficiência nas trocas de calor (GERVAIS & MOLIN, 2003).

A escolha de uma cepa apropriada é um dos principais fatores relacionados ao bom desempenho do processo. Em adição, é importante que a cepa seja capaz de produzir o produto final como único produto ou que o produto final contenha apenas traços de outros produtos do metabolismo microbiano (PANDEY, LARROCHE & SOCCOL, 2007).

Diferentes tipos de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos são capazes de crescer em substratos sólidos úmidos, seja isoladamente ou em culturas mistas. Entretanto, o baixo teor de umidade do meio pode ser um fator limitante, ou até mesmo

excludente, para algumas cepas menos adaptáveis (SINGHANIA et al., 2009; PINTO, BRITO & ANDRADE, 2005; PRABHAKAR et al., 2005).

Assim, a esterilidade do processo se torna um fator menos crítico, em comparação com os processos em meio líquido, uma vez que o microrganismo na FES é capaz de crescer rapidamente nas condições de baixa umidade. Isso evita a competição por substrato com outros microrganismos, possibilitando até mesmo a condução de alguns processos em condições semi-estéreis (HÖLKER & LENZ, 2005).

Os fungos filamentosos são os microrganismos que melhor se adaptam à FES, sendo preferencialmente escolhidos para esse tipo de processo, pois crescem naturalmente em ambientes com pouca água e muitos sólidos. Esse comportamento ocorre, muito provavelmente, pela sua capacidade de diferenciação morfológica através do desenvolvimento de hifas aéreas, que favorecem a captação de oxigênio e outros nutrientes, bem como a produção de esporos. Além disso, os esporos produzidos nestas condições são mais estáveis, resistentes e exibem maior taxa de germinação. Enzimas e proteínas produzidas em cultivo sólido também são, em geral, mais estáveis em maiores faixas de temperatura e pH do que as produzidas em cultivo líquido (HÖLKER & LENZ, 2005; DURAND, 2003).

A seleção de um substrato sólido adequado é um fator chave para a FES e depende de uma série de fatores relacionados principalmente ao custo e a disponibilidade dos materiais. Na FES, o material sólido pode servir ao microrganismo apenas como suporte físico para o crescimento celular ou também servir como fonte de nutrientes (PANDEY, LARROCHE & SOCCOL, 2008).

Em relação aos resíduos sólidos, Pandey (2003) concluiu que existem duas grandes considerações a serem feitas para a escolha do substrato para um bioprocesso: a primeira é que existe um substrato específico que necessita ser agregado valor e disposto de maneira adequada; a segunda é que, para produzir um determinado produto a partir de um substrato específico, pode ser necessário realizar uma dupla triagem com diferentes substratos e microrganismos de forma a selecionar a combinação microrganismo/substrato mais adequada ao processo. É importante ressaltar que, caso o substrato não apresente os nutrientes nas concentrações requeridas para o desenvolvimento microbiano e produção do produto, os mesmos devem ser suplementados externamente ou ainda, o próprio substrato pode ser pré-tratado para que os nutrientes se tornem mais acessíveis aos microrganismos (PANDEY, LARROCHE & SOCCOL, 2008).

2.4.2 Aspectos da engenharia bioquímica aplicados à FES

O desenvolvimento de um processo de FES industrial envolve seu estudo inicial em biorreatores de escala laboratorial, como placas de petri, frascos Erlenmeyer e garrafas cilíndricas. Contudo, a intensa geração de calor, a heterogeneidade do sistema, a purificação dos produtos finais e a reprodutibilidade frequentemente insatisfatória tornam o escalonamento complexo. Alguns fenômenos estudados em escala laboratorial não são representativos em larga escala. A ampla variedade de substratos sólidos quanto à composição, tamanho, resistência mecânica, porosidade e capacidade de reter água, além da própria morfologia do microrganismo e a sua resistência mecânica à agitação, são fatores que podem afetar o planejamento do biorreator e a estratégia de controle dos parâmetros (DURAND, 2003; HOLKER e LENZ, 2005).

O aumento de escala na FES tem sido um fator limitante da aplicação industrial desde muito tempo, mas, com o advento da engenharia bioquímica, foi possível compreender melhor os principais aspectos que influenciam os fenômenos em larga escala. Como resultado, alguns biorreatores foram desenhados objetivando superar os problemas de escala e também, até certo ponto, o monitoramento *on-line* de vários parâmetros, bem como a transferência de calor e massa. Entretanto, ainda estão longe de atingir a sofisticação e desempenho dos biorreatores da FS (BHARGAV et al., 2008; SINGHANIA et al., 2009) .

2.4.2.1 Umidade e atividade de água

A umidade e a atividade de água³ (a_w) são parâmetros fundamentais durante o processo de FES, porque estão intimamente relacionadas às atividades biológicas dos microrganismos e às trocas de massa e soluto através das células microbianas (PANDEY, LARROCHE & SOCCOL, 2008).

A maioria das células viáveis possui um conteúdo de umidade que varia, em média, de 70 a 80% de seu peso. Esse fato torna claro que para ocorrer o crescimento microbiano, é necessário que exista água disponível no meio para a produção de novas células (RODRÍGUEZ-LEÓN et al., 2008).

A atividade de água é um parâmetro termodinâmico que permite uma melhor descrição do estado do sistema em relação à quantidade de água que se encontra efetivamente

³ A atividade de água (a_w) é formalmente definida como a razão entre a pressão de vapor da água no sistema e a pressão de vapor da água pura na mesma temperatura (SRINIVASAN, PARKIN & FENNEMA, 2010).

disponível, ou seja, que não está associada aos solutos e ao substrato sólido (SRINIVASAN, PARKIN & FENNEMA, 2010). Essa água disponível ocorre na forma de um filme líquido ao redor das células microbianas e das partículas do suporte, podendo ocorrer também em poros no interior das partículas sólidas.

A importância de tal parâmetro para o desenvolvimento microbiano está relacionada ao fato da transferência de solutos, gases dissolvidos e água, através da membrana celular, ocorrer no filme líquido que circunda as células, muito embora a difusão de gases possa ocorrer diretamente na fase gasosa (GERVAIS & MOLIN, 2003). Assim, o controle desse parâmetro pode ser utilizado com a intenção de modificar as atividades metabólicas de produção e excreção de substâncias por um microrganismo (SINGHANIA et al., 2009).

Durante o processo de FES é comum a variação do conteúdo de umidade do meio. Isso ocorre pela evaporação da água, pela hidrólise do substrato ou pela produção de água a partir do substrato. O ajuste da taxa de umidade pode ser realizado pelo controle do fluxo e da umidade relativa do ar que entra no processo ou por aspersão direta de água líquida sobre o substrato sólido, seguida de agitação (BELLON-MAUREL, ORLIAC & CHRISTEN, 2003; RAGHAVARAO, RANGANATHAN & KARANTH, 2003; PRABHAKAR et al., 2005).

2.4.2.2 Temperatura e transferência de calor

A atividade metabólica do microrganismo em condições aeróbias é responsável por gerar grande quantidade de calor. A baixa condutividade térmica do substrato e o baixo teor de umidade do meio são características que tornam a transferência e a remoção de calor muito lentas, fazendo com que o calor proveniente das reações bioquímicas se acumule no biorreator e cause um rápido aumento da temperatura (PANDEY, 2003; PRABHAKAR et al., 2005).

O aumento da temperatura, por sua vez, é indesejado na maioria dos processos biológicos – exceto aqueles em que o microrganismo tolera elevadas temperaturas – porque pode afetar a germinação de esporos, causar a desnaturação de proteínas e enzimas, alterar o comportamento de produção de um determinado metabólito, afetar a porosidade do meio e eventualmente ocasionar a morte celular. O aumento de temperatura é uma das maiores dificuldades encontradas no desenvolvimento da FES uma vez que o controle de temperatura nesse tipo de fermentação é muito mais complicado quando comparado com a FS (RODRÍGUEZ-LEÓN et al., 2008).

As características altamente heterogêneas do substrato sólido são responsáveis pelo aparecimento de zonas de temperaturas elevadas (podendo ultrapassar os 70°C), resultando

em gradientes de temperatura de até 20°C da temperatura de incubação (PRABHAKAR et al., 2005).

O controle da temperatura da FES pode ser realizado através da refrigeração das superfícies internas e/ou externas do biorreator. Todavia, esses métodos tradicionalmente empregados em processos em submerso não são tão efetivos para a remoção do calor gerado no substrato sólido. A principal forma de remover o calor gerado nesses processos baseia-se no princípio da diminuição da temperatura através da evaporação da umidade do meio (HÖLKER & LENZ, 2005).

A circulação forçada de ar úmido ou seco pode ser realizada sobre ou através do leito em sistemas agitados ou estáticos. A remoção de calor por evaporação resulta na diminuição da atividade de água do meio, o que pode interferir no processo fermentativo. Dessa forma, o resfriamento evaporativo deve ser acompanhado da adição de água e mistura contínua (RAGHAVARAO, RANGANATHAN & KARANTH, 2003; GERVAIS & MOLIN, 2003).

Os sistemas agitados, embora permitam uma melhor distribuição do calor e conseqüente redução dos gradientes de temperatura, podem ser uma restrição ao projeto do biorreator. A resistência das estruturas celulares à agitação mecânica deve ser levada em consideração, uma vez que muitos microrganismos são sensíveis às forças de cisalhamento. Isso se torna particularmente crítico quando o microrganismo utilizado é um fungo filamentosos, porque seus filamentos podem ser danificados durante a agitação (DURAND, 2003; BHARGAV et al., 2008; COUTO & SANROMÁN, 2006).

Bactérias e leveduras, por outro lado, são menos propensas a danos causados pela agitação mecânica, mas a agitação, em conjunto com a aeração, pode causar o carreamento de células na corrente de ar caso estas células não se encontrem ligadas fortemente à superfície do substrato (RODRÍGUEZ-LEÓN et al., 2008).

2.4.2.3 Transferência de massa e difusão enzimática

A transferência de massa na FES é um conjunto de fenômenos que ocorre em micro e macro escala dentro do biorreator. Na micro escala estão envolvidos os fenômenos de trocas gasosas e difusão de enzimas, nutrientes e metabólitos através das células microbianas. Na macro escala estão envolvidos parâmetros de controle do biorreator, de forma a garantir a eficiência dos processos da micro escala (MITCHELL, VON MEIEN & KRIEGER, 2003).

Na grande maioria dos processos de FES, as fontes de carbono e energia do substrato se encontram na forma macromolecular ou polimérica e, portanto, não podem ser

transportadas através da membrana celular. Dessa forma, o substrato necessita ser degradado e transformado em fragmentos solúveis de fácil assimilação pelas células. Isso ocorre a partir da ação de enzimas extracelulares liberadas pelos microrganismos no meio sólido (PRABHAKAR et al., 2005).

A taxa de difusão das enzimas pode ser afetada por impedimentos estéricos⁴, dependendo da porosidade e consistência da estrutura macromolecular do substrato. Quando a porosidade do meio é baixa, a degradação do substrato ocorre na superfície. Por vezes, a degradação do substrato é a etapa limitante do processo de FES (KNAPP & HOWELL, 1980; PRABHAKAR et al., 2005).

A formação de gradientes de concentração, resultantes do consumo de nutrientes entre as partículas do substrato sólido, em conjunto com as limitações de transferência de massa, podem ter um efeito negativo sobre a velocidade, eficiência e, conseqüentemente, custo do processo (MOO-YOUNG, MOREIRA & TENDERDY, 1983).

A limitação de oxigênio compromete o desempenho de processos aeróbios. Na FES empregando fungos, o micélio se desenvolve sobre a superfície sólida e nos poros vazios do interior do substrato. Nos espaços entre as partículas sólidas, o micélio encontra-se envolto por água e oxigênio e o consumo de oxigênio ocorre na interface entre as partículas de substrato e as hifas dos fungos. Portanto, a transferência de oxigênio depende da área da superfície interfacial gás-líquido e da espessura da camada composta pelos fungos e a água. De forma semelhante, a transferência de gás carbônico ocorre na mesma interface, porém, a liberação ocorre das hifas para o espaço entre as partículas sólidas (BHARGAV et al., 2008).

O tamanho das partículas do substrato é também um fator importante a ser considerado na seleção do processo, pois está intimamente relacionado à capacidade de trocas de calor e massa no biorreator. Além disso, a retenção de compostos voláteis na matriz também pode ser afetada pelo tamanho da partícula. De maneira geral, partículas pequenas apresentam maior área superficial, favorecendo o ataque microbiano ao substrato sólido, entretanto, partículas muito pequenas podem causar empacotamento do meio, afetando negativamente as taxas de transferência de massa e calor (RODRÍGUEZ-LEÓN et al., 2008).

A transferência de massa em macro escala é influenciada diretamente pelo tipo e desenho dos biorreatores. Dentre os fatores que influenciam a transferência de massa em macro escala encontram-se a taxa de transferência de oxigênio e gás carbônico, a taxa de transferência de água, a velocidade de agitação do substrato sólido, o teor de umidade, a

⁴ Em Química Orgânica, impedimento estérico é a interação de repulsão que ocorre quando átomos ou moléculas estão muito próximos e tentam ocupar o mesmo espaço (MCMURRY, 2009).

espessura da parede do biorreator e a temperatura do agente de resfriamento. Para garantir que o processo ocorra com a máxima taxa de transferência de massa é necessário trabalhar com o desenho ótimo e a seleção do biorreator mais adequado (DURAND, 2003; BHARGAV et al., 2008).

2.4.2.4 Estimativa de biomassa e cinética de crescimento

A estimativa da biomassa é fundamental nos estudos da cinética microbiana. Na FES, a determinação direta de biomassa é um desafio, uma vez que as células se encontram fortemente aderidas ao substrato e em conjunto com o meio heterogêneo, tornando a separação uma tarefa difícil. Para fungos filamentosos, a determinação de biomassa é ainda mais complicada porque o micélio tende a penetrar nas partículas do substrato sólido (PANDEY, LARROCHE & SOCCOL, 2008).

Frente às dificuldades, medidas indiretas de fatores envolvidos no processo têm sido utilizadas para determinar a biomassa. Dentre elas, o monitoramento de oxigênio consumido e gás carbônico produzido, referentes à respiração microbiana, é considerada uma das medidas mais adequadas. Alguns métodos indiretos envolvem a determinação de compostos bioquímicos, tais como DNA e proteínas (pelo método Kjeldahl), e, especificamente no caso dos fungos, as substâncias N-glicosamina e ergosterol (SINGHANIA et al., 2009; BELLON-MARUEL, ORLIAC & CHRISTEN, 2003).

2.5 A utilização de aromas na indústria de alimentos

Os seres humanos são fortemente influenciados pelas características sensoriais de sabor, odor e textura dos alimentos. Os alimentos que não atendem às expectativas de aroma são frequentemente rejeitados, uma vez que aromas considerados desagradáveis podem ser indicativos de deterioração. Portanto, a história da alimentação humana está intimamente ligada ao desenvolvimento, análise e aplicação de aromas (WILKES et al., 2000; ZIEGLER, 2007).

Na produção de alimentos, os aromas são utilizados com a função de caracterizar, melhorar, padronizar e/ou reconstituir o aroma e sabor dos produtos, além de serem utilizados também para mascarar aromas e sabores indesejáveis que possam se formar durante o processamento do alimento (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2008).

O termo aroma é usualmente aplicado em uma perspectiva mais ampla para indicar a sensação global produzida pelo consumo de um alimento. Esta sensação é resultado da percepção integrada de todos os sentidos, incluindo as sensações auditivas, visuais, táteis e gosto-olfativas; somadas às sensações subjetivas relacionadas a hábitos, padrões culturais e sensibilidade individual (SRINIVASAN, PARKIN & FENNEMA, 2010; GOMÉZ, 2008).

De acordo com a legislação brasileira, os aditivos aromatizantes, ou aromas, são substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e ou sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e ou sabor dos alimentos. Eles são classificados em naturais e sintéticos, os quais podem ser sintéticos idênticos aos naturais ou sintéticos artificiais (ANVISA, 2007).

A demanda por aromas pela indústria de alimentos tem crescido constantemente ao longo dos últimos 100 anos, como resultado das mudanças causadas pelo estilo de vida cada vez mais industrializado. Nos tempos pré-históricos, apenas ervas e especiarias eram empregadas para fins aromatizantes. Atualmente, um amplo espectro de substâncias aromatizantes está disponível, não apenas para uso doméstico, mas especialmente para a produção de alimentos em escala industrial (ZIEGLER, 2007).

Enquanto no passado a perda de aroma pela tecnologia empregada no processamento de alimentos era a principal razão da adição de aromas, o avanço tecnológico recente não conduziu à redução da demanda por estes aditivos (ZIEGLER, 2007).

Desde a década de 1990, os consumidores tornaram-se bastante exigentes em relação aos alimentos que consomem. Nunca antes o consumidor foi tão consciente da relação entre saúde e nutrição, ao mesmo tempo em que buscam melhores sabores e maior praticidade, aliados a preços acessíveis (ABDERHALDEN, 1991; ZIEGLER, 2007).

Neste contexto, embora muitos aromas sintetizados quimicamente estejam disponíveis a custos muito inferiores ao de aromas naturais, a utilização dos termos “sintético” ou “artificial” tem um impacto negativo na imagem dos produtos. Dessa forma, eles tendem a ser evitados uma vez que o consumidor costuma suspeitar que sejam tóxicos ou danosos à saúde (RAMOS, 2006).

Devido ao elevado custo de produção de aromas naturais, a aplicação dos conhecimentos da biotecnologia na indústria de aromas é considerada uma alternativa economicamente interessante (LOMASCOLO et al., 1999).

As legislações de diversos países como EUA, Europa e Brasil, bem como o *Codex Alimentarius* consideram como substâncias aromatizantes naturais aquelas obtidas de células

vivas ou parte delas, incluindo os microrganismos empregados na indústria de alimentos e suas enzimas (CODEX ALIMENTARIUS, 2008; ANVISA, 2007).

2.6 A produção de aromas por microrganismos

Tradicionalmente, a atividade enzimática e a cultura de microrganismos são empregadas na produção de alimentos de forma a aprimorar ou modificar as características de sabor dos produtos. Alimentos como vinhos, cervejas, queijos, iogurtes e outros produtos fermentados são exemplos de produtos resultantes da ação de microrganismos (KRINGS & BERGER, 1998).

O desenvolvimento de bioprocessos para a produção de aromas é impulsionado por algumas vantagens, como a independência da agricultura e dos fatores que podem influenciar no plantio, bem como a preservação de reservas naturais, uma vez que as principais fontes de aromas naturais são os óleos essenciais extraídos de espécies vegetais; a possibilidade de produção em escala industrial, criando uma fonte de produto com características bem definidas; a condução das reações de biossíntese e bioconversão em condições brandas; e a possibilidade de utilização de matérias primas de baixo custo e fácil aquisição (LUERCE, 2002; KRINGS & BERGER, 1998; JANSSENS et al., 1992).

A utilização de microrganismos é empregada na produção anual de milhares de toneladas de substâncias aromatizantes não voláteis como ácidos orgânicos, nucleotídeos e aminoácidos. Em relação aos compostos voláteis, numerosos estudos mostraram que a fermentação enzimática e de microrganismos cultivados em submerso podem resultar em misturas complexas compostas, por exemplo, de terpenos, ésteres alifáticos, fenilpropanóides e lactonas (FERON, BONNARME & DURAND, 1996).

A Tabela 3 ilustra alguns exemplos de substâncias aromatizantes produzidas por microrganismos.

Tabela 3 Substâncias aromatizantes e seus respectivos microrganismos produtores.

Substância	Microrganismo
Fungos filamentosos	
Vanilina	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>
4-Metoxibenzaldeído	<i>Ischnoderma benzoinum</i>
4-(4-Hidroxifenil)-2-butanona	<i>Nidula niveo-tomentosa</i>
Salicilato de metila	<i>Phellinus</i> spp.
Benzoato de metila, benzoato de etila	<i>Polyporus tuberaster</i> , <i>Phellinus</i> spp.
2-Feniletanol	<i>Ascoidea hylecoeti</i>
1-Octen-3-ol, 1-octen-3-ona	<i>Lentinus edoles</i> , <i>Grifola frondosa</i> , <i>Pleurotus pulmonarius</i>
Citronelol	<i>Mycena pura</i>
Geosmina	<i>Chaetomium globosum</i>
Linalool	<i>Wolfiporia cocos</i>
Linalool, citronelol, geraniol, α -terpineol	<i>Ceratocystis fimbriata</i>
Cumarinas	<i>Pleurotus euosmus</i>
Metil-cetonas	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Aureobasidium pullulans</i>
Pirazinas	<i>Aspergillus</i> spp.
4-Decalactona	<i>Ceratocystis moniliformis</i>
6-pentil- α -pirona	<i>Trichoderma viride</i> , <i>T. harzianum</i>
Leveduras	
Acetato de etila	<i>Hansenula anomala</i>
Furaneol	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
Citronelol, geraniol, linalool	<i>Kluyveromyces lactis</i>
4-Decalactona	<i>Sporobolomyces odoratus</i> , <i>S. roseus</i>
Lactonas macrolíticas	<i>Torulopsis bombicola</i>
Feniletanol e ésteres	<i>Kluyveromyces</i> spp.
Bactérias	
Diacetil	<i>Lactobacillus lactis</i>
Ácidos graxos de cadeia curta	<i>Aerobacter aceti</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i> , <i>Propionobacterium</i> spp., <i>Clostridium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp.
Metil-cetonas	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
Geosmina	<i>Streptomyces citreus</i>
Pirazinas	<i>Bacillus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
Borneol, isoborneol	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>

Fonte: KRINGS & BERGER (1998); JANSSENS et al. (1992).

Embora existam muitos bioprocessos descritos na literatura, a maioria ainda não pode ser aplicada para a produção industrial de aromas. A principal razão é o baixo rendimento dos processos, uma vez que a concentração dos compostos de aroma no meio fermentado é muito baixa, onerando de forma significativa os processos de recuperação do produto (*downstream*). Por outro lado, este fato pode ser compensado pelo preço das substâncias aromáticas, que podem atingir valores até 100 vezes superiores aos mesmos compostos sintetizados quimicamente (SOCCOL et al., 2008).

Um bom exemplo é a γ -decalactona, principal substância responsável pelo aroma de pêssego, cujo preço da substância sintética, em 1992, era de US\$ 150/kg, enquanto a mesma substância, de origem natural, custava US\$ 6000/kg. Além disso, o processo de bioconversão de óleo de rícino em γ -decalactona pela levedura *Yarrowia lipolytica*, iniciado pela BASF, permitiu que o preço da lactona natural diminuísse de US\$ 20000/kg na década de 1980, para US\$ 1200/kg em 1995. Desta forma, é possível inferir que o valor de mercado do composto aromatizante e a variação de seu preço irão tornar ou não um bioprocessos vantajoso (CHIAPPINI, 2008; FERON, BONNARME & DURAND, 1996; JANSSENS et al., 1992).

O objetivo das pesquisas atuais em biotecnologia é a produção de processos de baixo custo e rendimentos elevados. Para tanto, é necessário o entendimento e controle das vias metabólicas de interesse, bem como o desenvolvimento de técnicas alternativas de produção. Dentre elas, destacam-se a fermentação em estado sólido, a imobilização de células e a utilização de organismos geneticamente modificados (SOCCOL et al., 2008).

A FES figura neste contexto como uma alternativa de baixo custo, que pode ajudar a superar as limitações da produção biotecnológica de aromas e também ampliar o espectro de compostos passíveis de serem produzidos por bioprocessos (PANDEY et al., 2001).

Diversos estudos de produção de aroma por FES já foram realizados, principalmente utilizando resíduos agroindustriais tropicais como os bagaços de mandioca, açaí, cana de açúcar e maçã; cascas de café e coco verde; e farelo de palma. Embora os resultados destes estudos tenham demonstrado a capacidade de produção de uma grande variedade de substâncias aromatizantes, a aplicação industrial da FES na produção de aromas isolados é ainda incipiente, devido à dificuldade de extração e purificação dos compostos (SOCCOL et al., 2008).

Ressalta-se que a FES é amplamente utilizada na produção de alimentos fermentados, contribuindo para a formação das características de aroma e sabor dos produtos, incluindo os queijos maturados, como o *roquefort*; as carnes fermentadas, como o salame e o pepperoni; e os temperos orientais como *koji*, *tempeh* e missô (CHISTRY, 1999; RAIMBAULT, 1998).

2.7 Produção de 6-pentil- α -pirona por *Trichoderma* spp.

Lactonas são compostos com propriedades aromatizantes encontrados naturalmente em uma grande variedade de produtos alimentícios. A presença de lactonas já foi identificada em frutas, produtos fermentados, produtos lácteos, café, tabaco, carnes cozidas e outros, o que por si só, explica a importância desses compostos nas indústrias de aromas e alimentos (DUFOSSÉ, LATRASSE & SPINLER, 1994).

A capacidade de produção de lactonas por rotas biotecnológicas foi descoberta na década de 1960, a partir da investigação do catabolismo de hidroxiácidos por diferentes microrganismos (LONGO & SANROMÁN, 2006).

As vias metabólicas de biossíntese, no entanto, não se encontram bem estabelecidas até o presente momento. Estudos indicam que essas moléculas são formadas a partir de sucessivas β -oxidações de hidroxiácidos, ou de seus precursores lipídicos, resultando em um carbono hidroxilado nas posições C4 (γ) ou C5 (δ). Desta forma, γ - e δ - lactonas podem então ser formadas pela esterificação interna (lactonização) das hidroxilas em C4 ou C5 com o grupo carboxílico da mesma molécula. A biossíntese de lactonas pode ocorrer também a partir da redução de ceto-ácidos aos correspondentes hidroxi-ácidos ou por uma via alternativa que envolve o metabolismo do aminoácido ácido glutâmico (OKUI et al., 1963 *apud* BONNARME et al., 1997; SERRANO-CARREÓN et al., 1993).

Dentre as δ -lactonas de interesse industrial destaca-se a 6-pentil- α -pirona (6-PP, Figura 2), uma lactona com aroma característico de coco conhecida também por suas propriedades de fungicida em espécies como *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Armillaria mellea*, *Penicillium expansum* e *Fusarium graminearum*, e que também afeta o crescimento de espécies de *Trichoderma* (DAOUBI et al., 2009; LONGO & SANROMÁN, 2006).

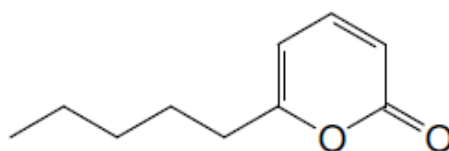


Figura 2 Estrutura da 6-pentil- α -pirona (6-PP).

O uso desta substância é aprovado pela agência norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) e é reconhecida pelo *status* FEMA GRAS (*Generally Recognized As Safe*), o que justifica seu uso em alimentos⁵.

Os métodos para síntese química desta molécula envolvem muitas etapas, condições de alta temperatura e a utilização de reagentes, solventes e catalisadores tóxicos. Por esses motivos, a substância apresenta alto valor agregado e seu fornecimento é extremamente limitado (ANDRIAMIALISOA et al., 2004; RAMOS, 2006).

A 6-PP foi identificada como constituinte volátil biossintetizado em maior quantidade por fungos do gênero *Trichoderma*, comumente isolados de solos (COLLINS & HALIM, 1972). Desde então, diversos estudos foram realizados visando à produção desta substância por processos fermentativos, uma vez que ocorrem em condições brandas e permitem a utilização do termo natural (SARHY-BAGNON et al., 2000).

Diversos fatores influenciam na produção da 6-PP. Young e Lim (1986) estudaram o efeito da suplementação de diferentes fontes de carbono na produção da 6-PP por *T. viride* em cultivos líquidos e sólidos. Os resultados indicaram que em cultivos sólidos, o glicerol foi a melhor fonte de carbono, seguida por glicose e sacarose, enquanto no cultivo líquido as melhores fontes foram frutose, galactose e glicose.

A relação carbono/nitrogênio (C/N) foi investigada em meio líquido por Serrano-Carreón et al. (1992). O estudo mostrou que altas relações C/N favorecem a biossíntese da 6-PP, enquanto baixas relações favorecem o crescimento da biomassa. O acúmulo de lipídios nas células de *T. harzianum* nos meios em que houve maior produção da lactona levaram os autores a comparar oleato de metila, linoleato de metila e ricinoleato de metila como fontes de carbono. A produção máxima ocorreu quando ricinoleato de metila foi utilizado.

Um estudo posterior realizado por Serrano-Carreón et al. (1993) investigou a influência de ácidos graxos na produção da 6-PP, aplicando ácido linoleico e mevalonato de sódio marcados com ¹⁴C. Os resultados obtidos permitiram que os autores propusessem uma via de biossíntese hipotética a partir do ácido linoleico. Entretanto, um maior rendimento da 6-PP foi obtido na investigação de Whitaker et al. (1998), na qual a única fonte de carbono

⁵ O status GRAS indica que a aplicação da substância é reconhecidamente segura em virtude de seu histórico de uso. A FEMA (*Flavor and Extract Manufacturers Association*) consiste de um painel independente de especialistas que são responsáveis por estabelecer os procedimentos que auxiliam na decisão do status GRAS e aplicam estes procedimentos para avaliar a segurança de substâncias utilizadas na manufatura de aromas nos EUA. A FDA reconhece o trabalho da FEMA e incorpora informações deste painel de especialistas na avaliação de segurança de aromas de sua base de dados. No Brasil, a ANVISA reconhece tanto a FEMA quando a FDA como referências para a utilização de substâncias aromatizantes.

disponível era glicose marcada com ^{14}C . Isso permitiu que os autores concluíssem que podem ocorrer outras vias metabólicas para a produção de lactonas insaturadas.

A cepa de *Trichoderma* também parece influenciar a produção da 6-PP. Bonnarme et al. (1997) investigaram 108 cepas diferentes do fungo, sendo algumas isoladas de fontes naturais e outras pertencentes à coleções de cultura. Dentre as cepas estudadas, apenas nove foram capazes de produzir o aroma em quantidades superiores a 1 mg/L.

Concentrações baixas da 6-PP em meios líquidos quando ainda existia quantidade significativa de carbono no meio levaram Prapulla et al. (1992) a sugerirem que a presença do metabólito pode causar uma possível inibição no metabolismo do fungo. Bonnarme et al. (1997) realizaram testes de inibição de crescimento radial de *T. viride* em placas de Petri contendo meio ágar-batata-dextrose. Concentrações de 6-PP acima de 300 mg/L inibiram totalmente o crescimento do fungo. Já Sarhy-Bagnon et al. (2000) relataram inibição do produto em níveis de 90-100 mg/L em cultivo líquido da mesma espécie de *Trichoderma*.

Métodos para a remoção da 6-PP do meio de cultivo foram estudados visando a diminuição do efeito inibitório causado pela substância. O adsorvente Amberlite XAD-2 foi adicionado no início do cultivo por Prapulla et al. (1992), que conseguiram aumentar a produção de 90-100 mg/L para 248 mg/L.

Uma técnica de extração *in situ* foi aplicada na recuperação da 6-PP por Rito-Palomares et al. (2000). Os autores empregaram como agente extrativo o polietilenoglicol-sulfato capaz de formar um sistema bifásico com o meio de cultivo. Os resultados preliminares foram satisfatórios e as vantagens em seu uso seriam a biocompatibilidade, o fácil escalonamento e o baixo custo.

Outra técnica utilizada para a recuperação *in situ* da 6-PP foi desenvolvida por Oda, Isshiki e Ohashi (2009) e consistia no cultivo em meio líquido do fungo *T. atroviride*, imobilizado em microsferas de poliacrilonitrila. Em seguida, dimetil silicone era adicionado como agente extrativo formando uma fase extrativa na superfície do líquido. Os autores relatam o acúmulo de 7 g/L da 6-PP na fase orgânica após 4 semanas.

A substituição do cultivo líquido pelo cultivo sólido demonstrou ser mais eficaz para a produção da 6-PP, provavelmente pela redução do efeito inibitório da substância. Estudos comparativos realizados por Kalyani, Prapulla e Karanth (2000) e Sarhy-Bagnon et. al (2000), mostraram que o cultivo em estado sólido de *T. harzianum* levou a maiores rendimentos quando comparados ao cultivo em submerso.

Embora a FES aplicada à produção da 6-PP apresente bons resultados, poucos trabalhos descrevem métodos de recuperação do produto do meio sólido, o que ainda limita a produção industrial de compostos por esta técnica. Penha (2011) aplicou o processo de microencapsulamento em gel de alginato de sódio e capsul[®], entretanto, os resultados preliminares mostraram que o aprisionamento da substância nas cápsulas foi baixo, provavelmente devido às características altamente heterogêneas do meio de cultivo.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta da borra de café e armazenamento

A borra de café utilizada neste trabalho foi proveniente do preparo de café expresso a partir de um *blend* de cafés arábica e robusta. A borra foi coletada úmida em uma cafeteria da cidade do Rio de Janeiro e previamente armazenada em freezer, a -18°C , até o momento de sua utilização.

3.2 Extração do óleo da borra de café

A extração do óleo da borra foi realizada com a intenção de simular um processo de aproveitamento do óleo. A borra foi previamente seca em estufa a 80°C por 48h, de modo a aumentar a eficiência da extração (adaptado de LAGO & FREITAS, 2006).

A extração do óleo foi conduzida em frascos Erlenmeyer utilizando-se etanol absoluto (Tedia Company, Inc.) na proporção de 1:6 m/v de borra para etanol. Os frascos foram mantidos em banho-maria com agitação recíproca, do tipo Dubnoff, a 60°C e 150 rpm, durante 1 hora.

Após a extração, a borra foi filtrada sob pressão reduzida e o etanol residual foi evaporado em estufa a 80°C por 48h. O etanol foi recuperado da mistura etanol/óleo em evaporador rotativo.

A borra desengordurada e seca foi armazenada a temperatura ambiente em frascos de polipropileno. Este material foi utilizado como suporte sólido nos experimentos de fermentação.

3.3 Caracterização físico-química da borra de café

A borra desengordurada foi submetida à caracterização físico-química e as análises foram realizadas conforme os itens a seguir:

3.3.1 Umidade

O teor de umidade foi determinado em triplicata por secagem direta em estufa, a 105°C, até peso constante (IAL, 2005).

3.3.2 Cinzas

O teor de cinzas foi determinado em duplicata por incineração direta em mufla, a 550°C, até peso constante (IAL, 2005).

3.3.3 Proteínas

O teor de proteínas foi determinado em duplicata pelo método Kjeldahl modificado. O fator conversão para proteína total utilizado foi 6,25 (AOAC, 2010).

3.3.4 Lipídios

O teor de lipídios foi determinado em duplicata por extração direta em Soxhlet com éter de petróleo (AOAC, 2010). Para fins de comparação, o teor de lipídios foi determinado para a borra seca, antes do processo de extração do óleo.

3.3.5 Fibras

O teor de fibras foi determinado em duplicata pelo método alternativo em solução de detergente neutro (SOUZA et al., 1999).

3.3.6 Carboidratos

O teor de carboidratos foi estimado através de cálculo, conforme orientado pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2003), de acordo com a equação:

$$\text{Carboidratos totais (g/100 g)} = 100 \text{ g} - (\text{somatório das quantidades de umidade, cinzas, proteínas e lipídios, em g})$$

3.3.7 pH

O pH foi determinado em triplicata utilizando-se a metodologia de Öhlinger et al. (1996). Uma parte em massa do meio sólido foi misturada com 2,5 partes em volume de uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) a 0,01 mol/L. O sistema foi mantido sob agitação constante a temperatura ambiente por 2 horas.

Em seguida, o sistema foi mantido em repouso por 10 minutos, para decantação dos sólidos, e mediu-se o pH do sobrenadante.

3.3.8 Granulometria

A determinação da granulometria da borra foi realizada em um agitador de peneiras RX-29-10 (W.S. Tyler), equipado com um conjunto de 7 peneiras arredondadas, com malhas na faixa de 75 μm a 850 μm .

Uma amostra de 50 g da borra foi agitada por 15 minutos na velocidade máxima. Posteriormente, as quantidades retidas em cada peneira foram pesadas e expressas em porcentagem.

3.4 Microrganismo e forma de conservação

A cepa utilizada neste trabalho foi a *Trichoderma harzianum* 4040 da coleção de culturas do Departamento de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

O microrganismo foi cultivado em tubos de ensaio contendo meio *potato-dextrose-agar* (PDA) (Himedia Labs), enriquecido com sulfato de magnésio (MgSO_4) 0,02% m/v e carbonato de cálcio (CaCO_3) 0,02% m/v, conforme proposto por Martins (2003). Os tubos foram mantidos a 28°C em estufa bacteriológica por sete dias (Figura 3).

As culturas foram armazenadas a 4°C com repiques realizados mensalmente.



Figura 3 *Trichoderma harzianum* 4040 após 7 dias de crescimento.

3.5 Obtenção do inóculo

O microrganismo foi cultivado em tubos de ensaio conforme descrito no item 3.4. Os esporos provenientes do cultivo foram suspensos em solução estéril de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% m/v. Os esporos foram quantificados em triplicata por contagem em câmara de Neubauer.

3.6 Determinação da cinética de produção de 6-PP em FES

A FES foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 6 g da borra de café desengordurada impregnados com 18 mL de uma solução nutriente cuja composição se encontra na Tabela 4.

Tabela 4 Composição química da solução nutriente utilizada durante a cinética de produção de 6-PP.

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	30,0
Cloreto de potássio, KCl	5,0
Sulfato de magnésio heptahidratado, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,0
Fosfato de potássio monobásico, KH_2PO_4	1,0
Sulfato de amônio, $(NH_4)_2SO_4$	0,94
Sulfato ferroso heptahidratado, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01
Cloreto de cálcio dihidratado, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,008
Sulfato de zinco heptahidratado, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,001

A composição inicial do meio é semelhante à utilizada por Martins (2003) e Ramos (2006) e foi adotada neste trabalho para os experimentos de cinética de produção de aroma.

O suporte sólido e a solução nutriente foram autoclavados, separadamente, a 121°C por 20 minutos. Os frascos foram inoculados em condições assépticas com a suspensão de esporos, em quantidade suficiente para atingir a concentração de $5,7 \times 10^6$ esporos/g de resíduo. Em seguida, os frascos foram fechados com rolha de algodão e incubados a 28°C em estufa bacteriológica (Figura 4).



Figura 4 Frascos contendo a borra de café inoculados com *Trichoderma harzianum* 4040 para determinação da cinética de produção de 6-PP.

Amostras do material fermentado foram coletadas de cada frasco após 3, 5, 7 e 9 dias de cultivo para extração e quantificação de 6-PP, determinação de pH e umidade. A determinação de pH e umidade foi realizada também imediatamente após o inóculo, definido como dia 0. Foram preparados 3 frascos para cada dia estudado totalizando, então, 15 frascos.

3.7 Seleção dos componentes da solução nutriente

O planejamento de Placket-Burman foi utilizado para estudar os efeitos dos componentes da solução nutriente, da umidade inicial, da sacarose como fonte alternativa de carbono e do extrato de levedura como complemento nutricional. Foram realizados experimentos nas mesmas condições de cultivo do item 3.6, entretanto, variando-se a composição da solução nutriente bem como a quantidade de solução impregnada no suporte sólido, de acordo com os níveis definidos no domínio experimental apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 Valores dos níveis definidos para as variáveis estudadas no planejamento de Plackett-Burman

Variável independente	Nível inferior (-1)	Ponto central (0)	Nível superior (+1)
Umidade	1:1	1:2	1:3
Glicose, g/L	0	15,0	30,0
Sacarose, g/L	0	7,5	15,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ , g/L	0	0,47	0,94
MgSO ₄ .7H ₂ O, g/L	0	2,5	5,0
KH ₂ PO ₄ , g/L	0	0,5	1,0
KCl, g/L	0	2,5	5,0
CaCl ₂ .2H ₂ O, g/L	0	0,004	0,008
FeSO ₄ .7H ₂ O, g/L	0	0,005	0,01
ZnSO ₄ .7H ₂ O, g/L	0	0,0005	0,001
Extrato de levedura, g/L	0	0,5	1,0

Foram avaliados os efeitos de 11 variáveis em 12 experimentos aleatórios acrescidos de 3 pontos centrais. O fator de resposta utilizado na avaliação foi a concentração de 6-PP após 5 dias de fermentação. Os resultados foram analisados utilizando o *software* Statistica 7.0 (StatSoft Inc.).

3.8 Extração da amostra para quantificação de 6-PP

A extração dos componentes voláteis do meio fermentado foi realizada por microextração em fase sólida (SPME)⁶. A extração foi realizada em *headspace* utilizando fibra revestida por polidimetilsiloxano (PDMS), com 100 µm de espessura, suportada em seringa para injeção manual (Supelco) em cromatógrafo gasoso (CG).

Cerca de 0,5 g do material fermentado foi acondicionado em *vial* de vidro com capacidade de 40 mL. Foram adicionados de 15 mL de solução de NaCl a 25% m/v, para promover uma maior liberação dos voláteis. Em seguida, o *vial* foi vedado com septo de teflon/silicone (Supelco). O septo foi perfurado pela seringa e o sistema foi imerso em banho-maria, na temperatura de 80°C, sob agitação magnética constante (Figura 5).

⁶ Do inglês *Solid Phase Microextraction*.



Figura 5 Aparato para microextração em fase sólida por *headspace* de 6-PP.

Após 2 minutos de incubação, a fibra foi exposta ao *headspace* e a extração ocorreu por 30 minutos. Imediatamente após a extração, foi realizada a dessorção térmica dos compostos voláteis adsorvidos na fibra por 5 minutos, na temperatura de 240 °C, diretamente no injetor do CG.

3.9 Análise da amostra por CG-EM

A separação e análise dos analitos do *headspace* adsorvidos na fibra foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). O cromatógrafo gasoso (Agilent 6850) foi equipado com uma coluna DB5-MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 1 µm de espessura de fase, Agilent) e o detector consistiu de um espectrômetro de massas (Agilent 5975C) com ionização por impacto de elétrons (70eV, resolução de massas de 50-400 Daltons).

As temperaturas do injetor e detector foram respectivamente, 240°C e 250°C. A temperatura da coluna foi mantida a 40°C nos primeiros 4 minutos e em seguida elevada, a uma taxa de 20°C/minuto, até 120°C, tendo sido mantida constante por 2 minutos e então aquecida até 210°C, a uma taxa de 10 °C/min, tendo sido mantida constante por 5 minutos. O gás de arraste foi Hélio a 99,999% de pureza e sua vazção foi mantida constante a 1,0 mL/minuto. Durante todas as análises foi empregado o modo *split* 1:10.

3.10 Identificação de 6-PP

A identificação de 6-PP foi realizada pela comparação dos espectros de massa obtidos dos cromatogramas do meio fermentado e de uma solução padrão de 6-PP na concentração 200 mg/L, ambos utilizando a mesma condição de extração e análise descritos anteriormente.

3.11 Construção da curva de calibração para quantificação de 6-PP

A quantificação de 6-PP foi realizada através de curva de calibração. A curva de calibração foi construída nas mesmas condições de análise descritas anteriormente.

Amostras de 0,5 g do suporte sólido foram acondicionadas em *vials* de 40 mL e impregnadas com 0,5 mL de soluções de 6-PP com 96,0% de pureza (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.).

Foram utilizadas soluções de concentrações de 5, 10, 25, 50, 100, 150, 230, 500 e 730 mg/L. As soluções foram preparadas pela dissolução do padrão da lactona em água contendo 1% v/v de etanol absoluto e mantidas sob refrigeração até o momento das análises. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mg 6-PP/g massa seca (MS).

3.12 Determinação do teor de massa seca e concentração de 6-PP

Para cada experimento de quantificação, uma amostra de cerca de 0,5 g de material fermentado foi mantido a 60°C por 24h para a determinação do teor de massa seca (%MS), quantidade de massa seca (MS) e concentração de 6-PP de acordo com as equações abaixo (RAMOS, 2006).

$$\%MS = \frac{\text{Massa seca} \times 100}{\text{Massa úmida}}$$

$$MS = \frac{\text{Massa úmida} \times \%MS}{100}$$

$$[6\text{-PP}] = \frac{\text{Área do cromatograma} \times 10^{-3}}{\text{Coeficiente angular da curva padrão} \times MS}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química da borra de café

A Tabela 6 mostra os resultados da análise química da borra de café utilizada como suporte sólido para os experimentos de fermentação. Todos os parâmetros, exceto umidade, foram calculados em base seca (% m/m) e estão apresentados como a média. O pH foi expresso como $\log[H^+]$.

Tabela 6 Composição química e pH da borra de café expresso.

Parâmetro	Composição (% m/m)
Umidade	8,82
Cinzas	1,79
Proteínas	12,82
Lipídios	2,98
Fibras	56,52
Carboidratos totais	73,70
pH	5,10

O teor de cinzas é usualmente utilizado para indicar a quantidade de material inorgânico presente em uma dada amostra. O valor encontrado para cinzas na borra foi de 1,79%, similar aos valores de 1,43% encontrado por Caetano et al. (2012) e de 1,6% por Mussato et al. (2011a).

Alguns elementos, além do nitrogênio, carbono e oxigênio, são necessários em menores quantidades por microrganismos e por isso são denominados de micronutrientes. Em geral, para os fungos, os micronutrientes estão envolvidos em algumas funções fisiológicas importantes como a síntese de vitaminas, a atividade enzimática, balanço iônico e também no metabolismo de adenosina trifosfato (ATP) e de carboidratos (GRIFFIN, 1994).

Neste trabalho, não foi avaliada a composição química das cinzas, entretanto, o que se tem na literatura são valores de (em mg/kg): potássio (3549,0), fósforo (1475,1), magnésio (1293,3), cálcio (777,4), alumínio (279,3), ferro (118,7), manganês (40,1), cobre (32,3) e zinco (15,1) (MUSSATO et al., 2011a). De acordo com Arya e Rao (2007), o potássio é o principal constituinte das cinzas de grãos de café e, embora a maior parte dos minerais seja extraída facilmente durante o preparo do café, é possível perceber que as cinzas da borra ainda apresentam o potássio como elemento mais abundante, seguido de fósforo e magnésio.

O teor de proteínas encontrado na borra foi de 12,82%. Esse valor é semelhante aos valores de 10-12%, 12,2%, 13,3% e 13,6% encontrados, respectivamente por, Adams e Dougans (1985), Tango (1971), Caetano et al. (2012) e Mussato et al. (2011a). Os valores descritos na literatura para proteínas variam entre 4,9% e 15%, sendo a faixa entre 10% e 14% a mais comumente descrita. A ampla faixa observada para os valores de proteína podem estar relacionados a fatores como o método de preparo da bebida (CRUZ et al., 2012) e o método de análise de proteínas (MUSSATO et al., 2011a).

Neste trabalho não se avaliou o perfil de aminoácidos presentes na borra, entretanto, a literatura relata a composição de aminoácidos presentes em borra de café desengordurada da seguinte maneira (em mg/100 g): ácido aspártico (10–137), ácido glutâmico (618–987), serina (46–85), histidina (7–378), glicina (131–567), treonina (18–160), alanina (260–388), arginina (8–13), tirosina (152–288), cistina (281–362), valina (324–488), metionina (53–136), fenilalanina (29–477), isoleucina (275–377), leucina (567–779), lisina (100–164) e prolina (169–338) (LAGO, ANTONIASSI & FREITAS, 2001).

A análise do teor de lipídios na borra foi realizada antes e depois da extração do material com etanol. A análise antes da extração foi realizada para fins de comparação com a literatura, de forma a caracterizar melhor a borra obtida da cafeteria.

O teor de lipídios encontrado antes da extração do óleo com etanol foi de 14,2%. Este valor é semelhante aos valores de 13,9% e 12,95% encontrados, respectivamente, por Gopalakrishna Kao e Natarajan (1974) e Passos e Coimbra (2013). Novamente, a faixa para lipídios na literatura é ampla, variando entre 7,9% e 29,2%. Após a extração do óleo, o teor obtido foi de 2,98%, muito abaixo do valor inicial, como esperado.

A análise de fibras foi realizada para fibra em detergente neutro (FDN). A FDN corresponde à parede celular vegetal, composta, basicamente de celulose, hemicelulose e lignina (SOUZA et al., 1999).

O teor de fibras encontrado para a borra desengordurada foi de 56,52%, o que mostra que mais da metade do resíduo é composto desse material. Esse valor é semelhante ao descrito por Lago, Antoniassi e Freitas (2001), que encontraram teores de fibra bruta na faixa de 39-53% para a borra desengordurada. Além disso, é importante ressaltar que os valores descritos para fibra bruta na literatura variam de 19% a 44% para borra não submetida à extração de óleo. Assim, o aumento do teor de fibras no resíduo após a extração aumenta o interesse em sua aplicação em bioprocessos envolvendo degradação de materiais lignocelulósicos.

Fungos do gênero *Trichoderma* apresentam alta capacidade de decomposição de celulose e lignocelulose, sendo o *T. harzianum*, uma das espécies mais aplicadas em estudos de degradação de resíduos e efluentes (BUCHERT et al., 1993; HADDADIN et al., 2009).

Os carboidratos são os constituintes majoritários dos grãos de café (ARYA & RAO, 2007) e, mesmo após o preparo da bebida, continuam sendo majoritários na borra. O teor de carboidratos totais estimado neste trabalho foi de 73,70% e inclui o teor de fibras já discutido anteriormente. Esse valor foi muito superior aos valores de 45,3% e 65,9%, encontrados pela análise de monossacarídeos residuais, provenientes da hidrólise ácida da borra de café (COUTO et al., 2009; PASSOS & COIMBRA, 2013).

A diferença observada pode estar relacionada ao método de cálculo de carboidratos por diferença que, embora seja amplamente utilizado, principalmente pela indústria de alimentos, apresenta um erro associado, pois durante o cálculo, considera-se que, excluindo-se proteínas, lipídeos, umidade e cinzas, todo o restante do material é constituído de carboidratos. Assim, desconsidera outras substâncias que podem estar presentes em quantidades significantes. Por exemplo, sabe-se que os grãos de café torrados apresentam quantidade elevada de melanoidinas⁷ provenientes do processo de torrefação, em quantidades que variam de 25% a 37% m/m, dependendo do tempo e temperatura do processo (PÉREZ-HERNÁNDEZ et al., 2012).

O resultado da distribuição granulométrica das partículas da borra de café encontra-se ilustrado na Figura 6. Aproximadamente 52% do material ficou retido nas peneiras de malhas maiores (abertura de 350 µm ou mais) e cerca de 48% da borra de café ficou retida nas peneiras de malhas mais finas (aberturas de 250 µm ou menores) e no fundo. O maior percentual de borra de café (35,77 %) ficou retido em peneira de 350 µm.

⁷ Melanoidinas são complexos poliméricos heterogêneos, de coloração marrom e de alta massa molar, formados pela reação entre açúcares e aminoácidos (Reação de Maillard) em altas temperaturas e baixa atividade de água.

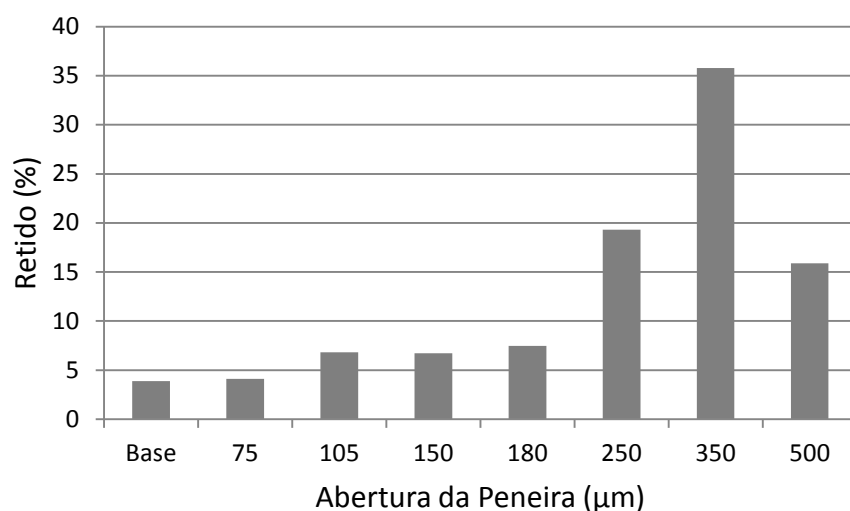


Figura 6 Distribuição granulométrica da borra de café expresso.

4.2 Produção de 6-PP por FES

4.2.1 Construção da curva de calibração

A curva de calibração (Figura 7) foi construída por regressão linear, utilizando somente os pontos cujos coeficientes de variação⁸ foram inferiores a 15%. Tendo em vista que a massa de sólidos varia entre os experimentos, escolheu-se a curva relacionando a massa de 6-PP na amostra, em detrimento de um gráfico em função da concentração, conforme proposto por RAMOS (2006).

O valor elevado do coeficiente de determinação (R^2) observado indica um bom ajuste da equação linear aos dados experimentais. Portanto, a curva-padrão gerada foi utilizada para os cálculos de concentração de 6-PP durante o restante dos experimentos.

⁸ “O coeficiente de variação (CV) é uma medida de dispersão empregada para estimar a precisão de experimentos e representa o desvio-padrão expresso como porcentagem da média. Como medida de dispersão, a principal qualidade do CV é a capacidade de comparar resultados de diferentes trabalhos que envolvem a mesma variável-resposta, permitindo quantificar a precisão das pesquisas (MOHALLEM et al., 2008).”

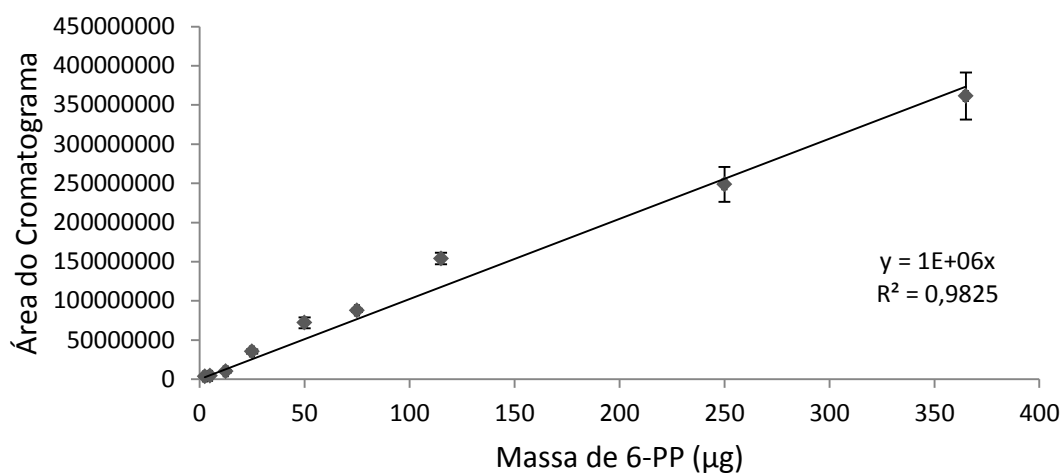


Figura 7 Curva de calibração para quantificação 6-PP por FES em borra de café expresso.

4.2.2 Cinética de produção de 6-PP

Os cromatogramas obtidos da extração por SPME em *headspace*, da borra de café impregnada com solução de 200 mg/L de 6-PP (Figura 8) e do meio fermentado após 5 dias (Figura 9), mostram um pico majoritário com tempo de retenção de 15 minutos.

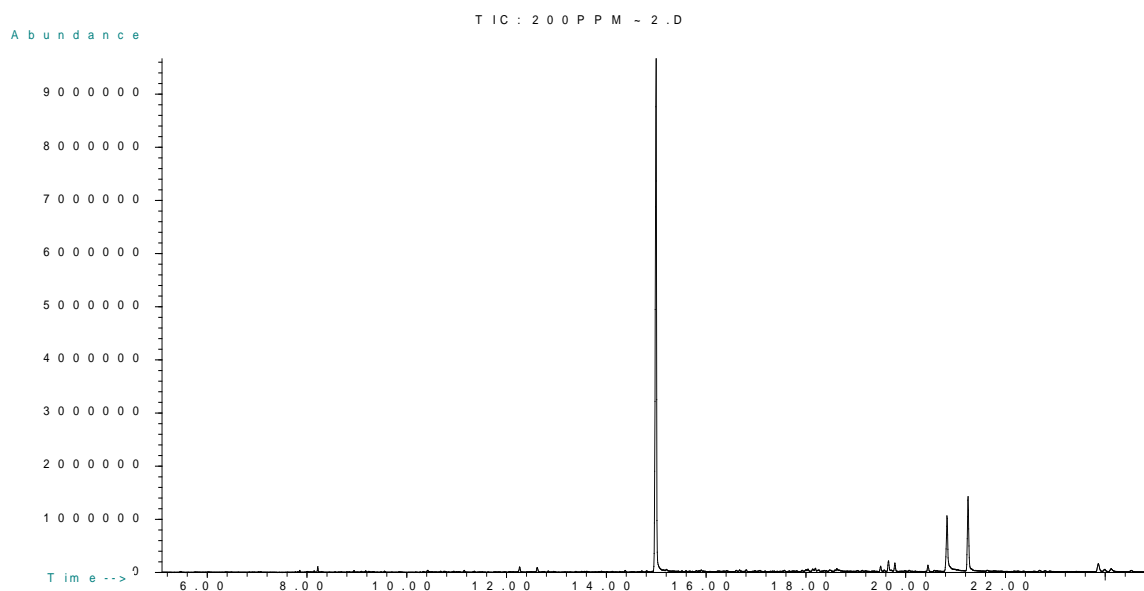


Figura 8 Cromatograma obtido da extração por SPME em *headspace* da borra de café impregnada com solução padrão de 6-PP na concentração de 200 mg/L.

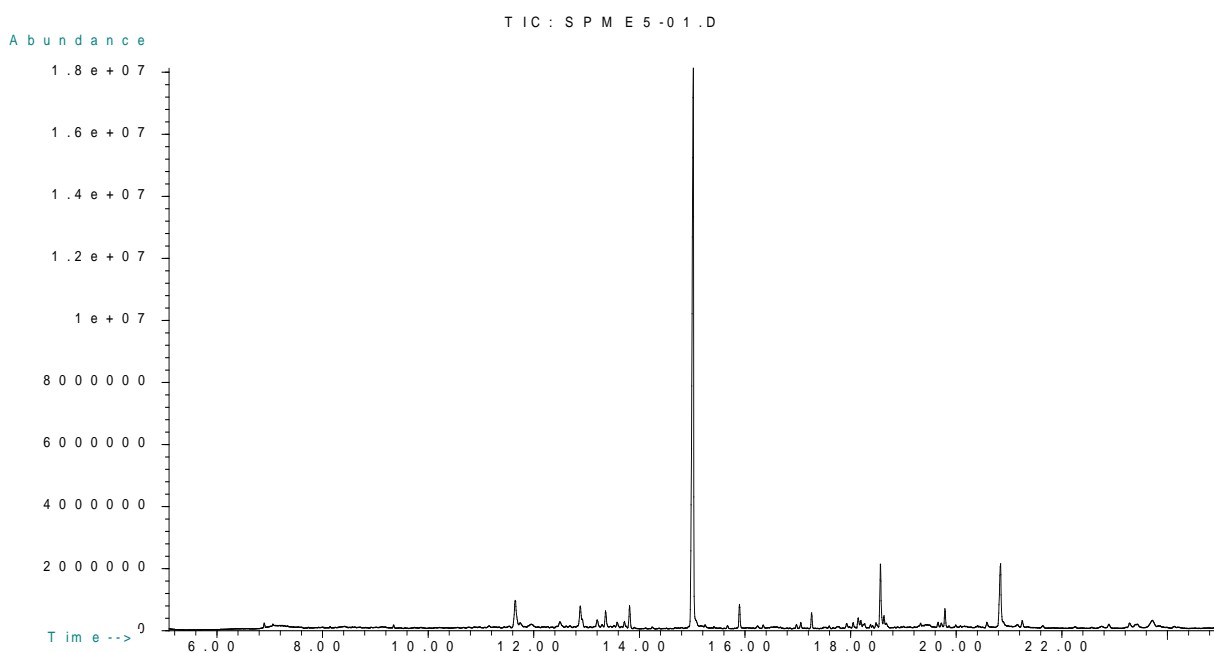


Figura 9 Cromatograma obtido da extração em *headspace* do meio fermentado após 5 dias.

Para confirmar a produção de 6-PP durante a fermentação em estado sólido, foi realizada a comparação dos espectros de massa obtidos do pico majoritário de cada cromatograma (Figuras 10 e 11, respectivamente), onde foi possível observar a presença dos picos característicos da 6-PP. O pico com relação massa/carga (m/z) 166, correspondente ao íon molecular (M^+) e m/z 95, correspondente à fragmentação do grupamento pentil do anel.

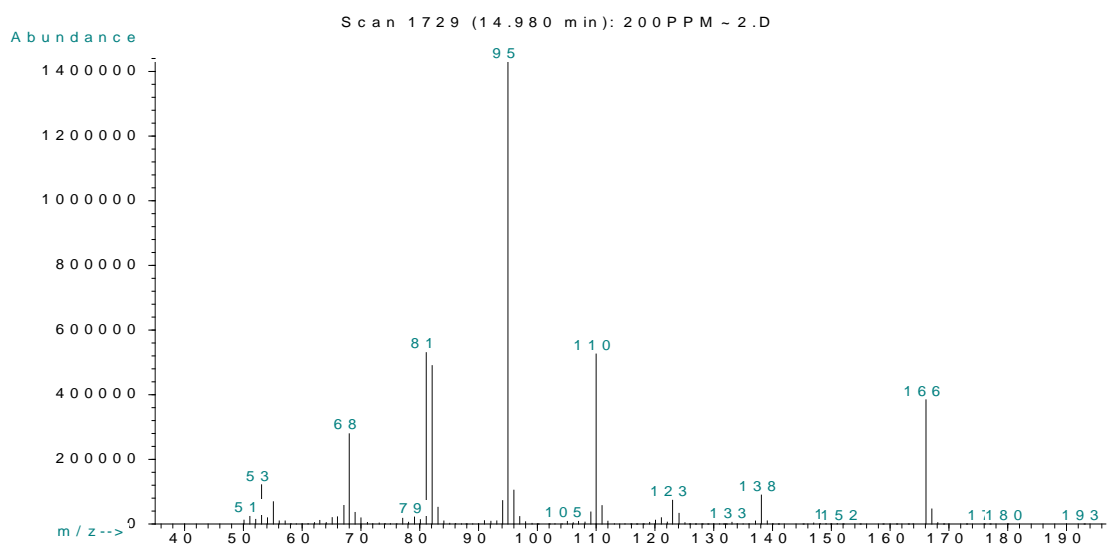


Figura 10 Espectro de massa referente ao pico com tempo de retenção de 15 minutos do cromatograma obtido da extração por SPME em *headspace* da borra de café impregnada com solução padrão de 6-PP na concentração de 200 mg/L.

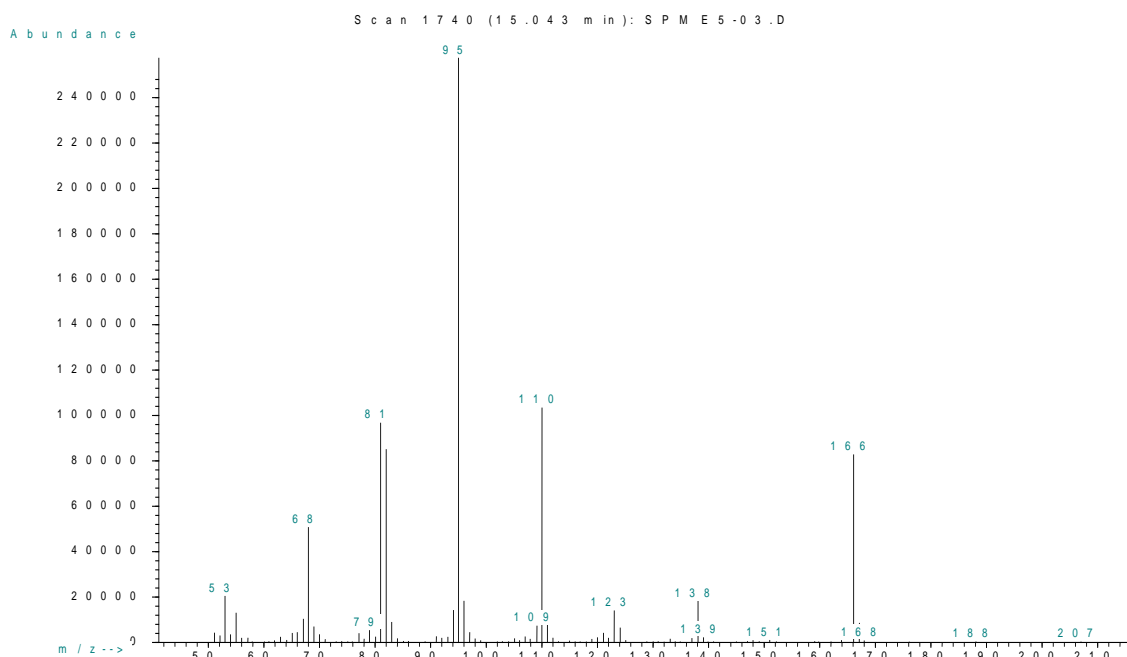


Figura 11 Espectro de massa referente ao pico com tempo de retenção de 15 minutos do cromatograma obtido da extração em *headspace* do meio fermentado após 5 dias.

O perfil cinético de produção de 6-PP por FES (Figura 12), utilizando como suporte sólido o resíduo da extração de óleo de borra de café, permitiu definir o tempo necessário, em dias, para atingir a produção máxima da substância, dentro das condições estudadas.

A concentração máxima de 6-PP foi $3,4 \pm 0,36$ mg/g MS (o que corresponde a aproximadamente 1,03 g/L em base úmida), observada no quinto dia de fermentação. Esta concentração decaiu ao longo dos dias até atingir o valor de $0,44 \pm 0,06$ mg/g MS, no nono dia, quando os experimentos foram finalizados.

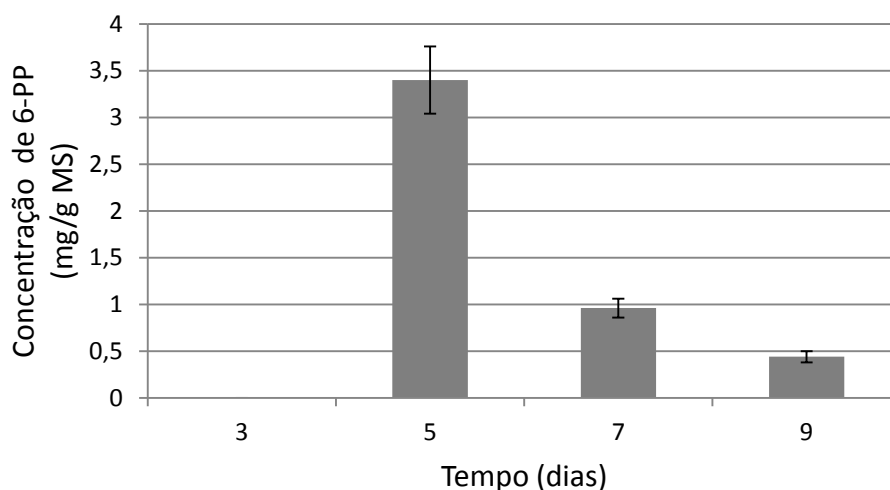


Figura 12 Perfil cinético de produção de 6-PP por FES.

O declínio da concentração após o quinto dia de fermentação pode estar relacionado ao acúmulo da 6-PP e a sua possível degradação como mecanismo de defesa do microrganismo aos seus efeitos tóxicos (GALINDO et al., 2004).

Outros autores estudaram a produção de 6-PP por FES utilizando a mesma cepa de *T. harzianum*. Ao empregar bagaço de cana-de-açúcar, Ladeira et al. (2010) e Penha (2011) encontraram, respectivamente, concentrações máximas de 0,254 mg/g MS e 0,093 mg/g MS, após 7 dias de FES. Calasans (2012) encontrou a concentração máxima de 1,65 mg/g MS após 9 dias de FES. Ramos et al. (2008), empregando pó da casca de coco verde, observaram uma concentração máxima de 0,8 mg/g MS após 7 dias de fermentação.

Sarhy-Bagnon et al. (2000), utilizando outra cepa de *T. harzianum*, encontraram a concentração máxima de 2,8 mg/g MS, após 10 dias de FES em bagaço de cana-de-açúcar.

A concentração máxima de aroma encontrada no quinto dia de fermentação é maior que o limite de inibição de 100 mg/L responsável pelo decréscimo da produção de 6-PP na fermentação em submerso (SERRANO-CARREÓN et al., 1992).

Em testes de inibição de crescimento em meio PDA, Bonnarme et al. (1997) encontraram um valor máximo de inibição de 300 mg/L onde nenhum crescimento do fungo foi notado. Calasans (2012), utilizando a mesma cepa de *T. harzianum* deste trabalho, observou efeitos inibitórios de crescimento em meio PDA entre 200 e 300 mg/L.

De acordo com Sarhy-Bagnon et al. (2000), um limite máximo de inibição encontrada durante a FES pode ser explicado pela lenta difusão da 6-PP no meio sólido heterogêneo. Neste trabalho, optou-se por utilizar a borra de café com granulometria variada, o que pode ter favorecido o acúmulo de 6-PP entre as partículas, com rendimentos superiores aos descritos na literatura para meios não otimizados.

Durante a fermentação, não se observou mudanças significativas de pH. O pH do meio aumentou de 4,7; nas condições iniciais, para 5,0; no nono dia. Este comportamento corrobora o descrito na literatura que a variação de pH durante a produção de 6-PP é suave para o cultivo em meio sólido enquanto variações acentuadas são comumente observadas para fermentações em submerso (SARHY-BAGNON et al., 2000).

4.2.3 Teor de umidade durante a FES

O resultado da análise de umidade do meio de cultivo durante a produção de 6-PP encontra-se ilustrado na Figura 13. A umidade inicial do processo era de 72% m/m e atingiu um valor máximo de 78% m/m no quinto dia de fermentação quando a produção de 6-PP

também atingiu seu valor máximo.

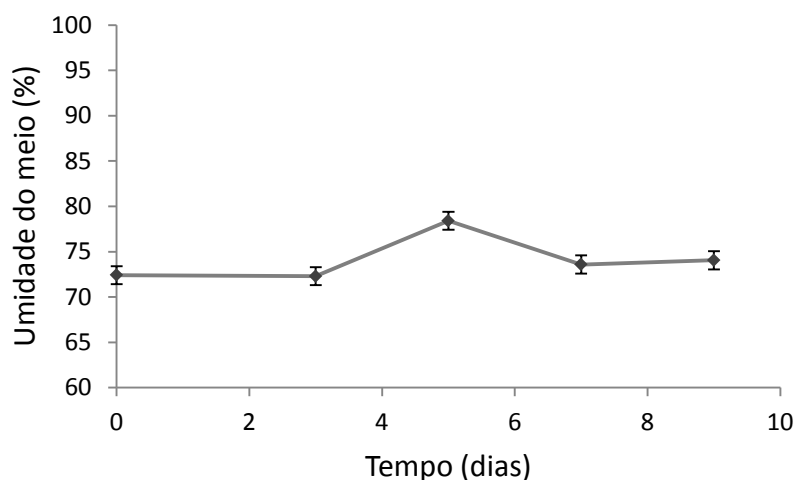


Figura 13 Evolução do teor de umidade durante a FES.

Esse comportamento é atípico em experimentos de FES e não foram encontrados relatos semelhantes na literatura pesquisada. Ao utilizarem a mesma cepa de *T. harzianum*, Ladeira et. al (2010) e Martins (2003) encontraram uma redução constante da umidade durante os dias estudados enquanto Penha (2011) e Calasans (2012) observaram pequenas alterações na umidade do meio, tendo esta permanecido praticamente constante nos dias estudados.

Gervais e Sarrete (1990), em seu trabalho com produção de aroma por *T. viride*, observaram um estado fisiológico particular do micélio e a produção máxima do aroma em 4,5 dias. Em trabalho posterior, Gervais (1990) concluiu que mudanças no teor de umidade do meio sólido podem ocasionar mudanças severas no acúmulo intracelular e excreção de compostos de aroma produzidos por fungos.

O aumento do teor de umidade pode ter sido resultado do estado fisiológico do fungo e da intensa atividade metabólica no quinto dia de fermentação, resultando em uma maior condensação de líquido pelas trocas de calor.

4.3 Seleção dos componentes da solução nutritiva

O planejamento experimental de Plackett-Burman é um método estatístico geralmente empregado na otimização de processos fermentativos. Esse planejamento permite avaliar o efeito de um grande número de variáveis físicas (pH, temperatura, aeração, umidade, etc) e

nutricionais (composição química do meio) envolvidas em processos biotecnológicos, em um número reduzido de experimentos.

Além disso, no planejamento de Plackett-Burman, o efeito de cada variável sobre o a variável resposta é estudado independentemente das possíveis interações entre essas variáveis. Dessa forma, o planejamento é considerado uma poderosa ferramenta para triagem de variáveis de processo (NAVEENA et al., 2005). Chauhan, Trivedi e Patel (2007), por exemplo, utilizaram este planejamento para selecionar os componentes do meio de cultura para produção de ácido lático por *Lactobacillus* spp.

O planejamento de Plackett-Burman foi conduzido com a intenção de estudar os efeitos dos compostos presentes na solução nutriente e da umidade inicial para a produção de 6-PP por FES. A variável resposta medida foi a concentração de 6-PP no quinto dia de FES (denominada [6-PP], em mg/g MS). Este dia foi escolhido com base no perfil cinético, por ser o dia de maior produção do aroma.

A Tabela 7 resume as corridas experimentais realizadas nos níveis indicados na Tabela 5 e os resultados obtidos para a variável de resposta. Para os nutrientes, o nível inferior (-1) definido foi de 0 g/L de forma a avaliar se o componente poderia ser retirados da solução nutritiva.

Tabela 7 Corridas experimentais e valores da variável de resposta para o planejamento de Plackett-Burman.

Corrida	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	[6-PP]
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	3,299
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	11,233
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	0,000
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	0,338
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	8,402
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0,199
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0,013
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	0,042
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	0,000
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	0,000
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	0,077
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,072
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,039
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,057
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,062

A – umidade, B – glicose, C – sacarose, D – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, E – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, F – KH_2PO_4 , G – KCl, H – $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, I – $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, J – $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K – extrato de levedura.

As corridas de números 13, 14 e 15 foram as replicatas do ponto central (nível 0). De acordo com Lundstedt et al. (1998), essas replicatas são necessárias para calcular os intervalos de confiança, bem como para verificar se a curvatura é um fator importante para o modelo, ou seja, se um modelo linear não se adequa bem ao sistema em questão.

A concentração de 6-PP nas condições estabelecidas pelo planejamento variou de 0 a 11,23 mg/g MS. A partir dos valores obtidos para a variável resposta, foi possível estimar o efeito de cada variável incluída no domínio experimental. A significância estatística dos efeitos estimados foi avaliada por análise de variância (ANOVA) para um intervalo de confiança de 95%.

Os resultados foram descritos por um modelo matemático linear que incluiu apenas as variáveis cujos valores de p foram inferiores a 0,05, de acordo com o diagrama de Pareto apresentado na Figura 14.

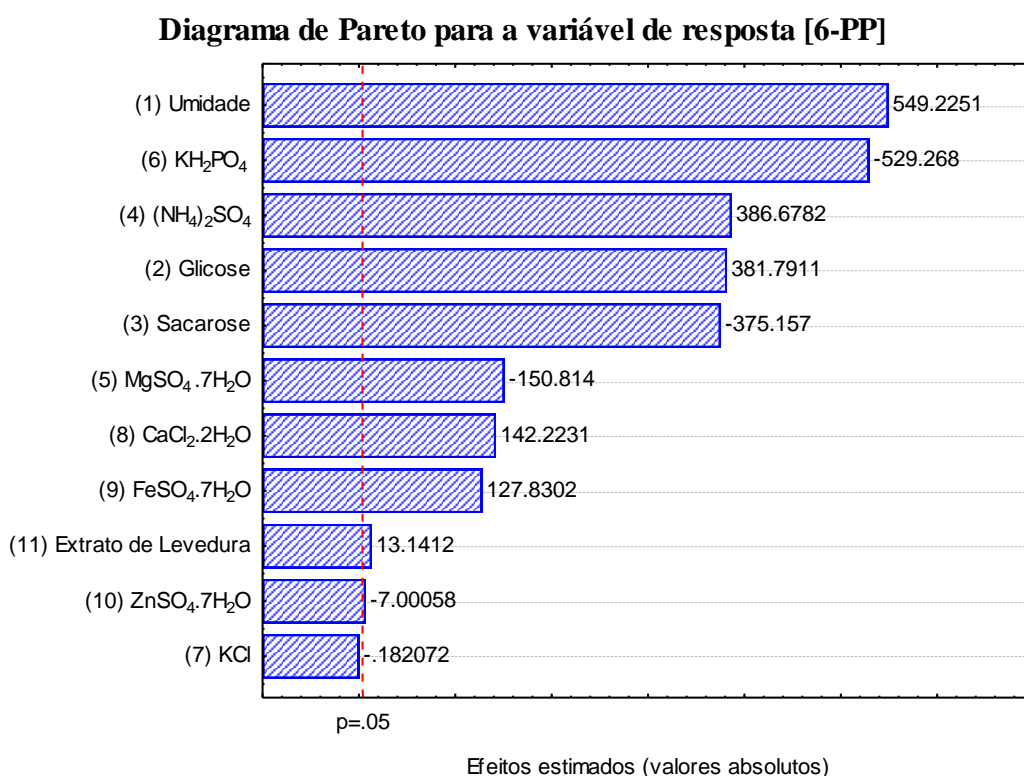


Figura 14 Diagrama de Pareto normalizado obtido para a variável de resposta [6-PP].

De acordo com o diagrama, apenas a variável KCl não foi significativa para a produção de 6-PP ($p > 0,05$) nas concentrações estudadas. Isso significa que este componente não faz parte da equação que descreve o modelo e assim, foi retirado da solução nutritiva. As outras variáveis, no entanto, foram consideradas significativas ($p < 0,05$) para a produção de 6-PP e permanecem na equação.

Os coeficientes da regressão, intervalos de confiança a 95%, desvios-padrão e valores de p associados às variáveis da equação experimental estão apresentados na Tabela 8. O modelo apresentou R^2 de 0,948 e, portanto, foi considerado adequado para representar os dados experimentais.

Nesse modelo, um coeficiente de regressão negativo indica que, embora a variável apresente um efeito significativo na produção de 6-PP, esse efeito é negativo e, para aumentar a produção do aroma (variável resposta), a variável deve ser utilizada no menor nível estudado (-1). Uma vez que o menor nível estudado foi 0 mg/L, os componentes cujos coeficientes foram negativos puderam ser removidos da solução nutritiva.

Tabela 8 Resultados da análise de regressão do planejamento de Plackett-Burman (variáveis normalizadas).

Fator	Coeficiente	Intervalo de confiança		Desvio padrão	p
		+ 95%	- 95%		
Interseção	1,58895	1,57537	1,60254	0,003158	0,000004
Umidade	1,93893	1,92374	1,95412	0,003530	0,000003
Glicose	1,34784	1,33265	1,36303	0,003530	0,000007
Sacarose	-1,32442	-1,33961	-1,30923	0,003530	0,000007
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,36509	1,34990	1,38028	0,003530	0,000007
MgSO ₄ .7H ₂ O	-0,53242	-0,54761	-0,51723	0,003530	0,000044
KH ₂ PO ₄	-1,86847	-1,88366	-1,85328	0,003530	0,000004
KCl	-0,00064	-0,01583	0,01455	0,003530	0,872310
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,50209	0,48690	0,51728	0,003530	0,000049
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,45128	0,43609	0,46647	0,003530	0,000061
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-0,02471	-0,03990	-0,00952	0,003530	0,019801
Extrato de Levedura	0,04639	0,03120	0,06158	0,003530	0,005741

As maiores concentrações de 6-PP foram observadas nos experimentos nos quais a umidade, a glicose e o sulfato de amônio foram utilizados simultaneamente no nível superior (+1), conforme pode ser observado pelos resultados das corridas 2 e 5 da Tabela 7. Isso sugere que a associação dessas três variáveis é positiva para aumentar a produção de 6-PP.

A corrida 10 da Tabela 7 corrobora essa tese, pois foi realizada sem a adição de fontes de carbono e nitrogênio. Foi possível avaliar que, muito embora o teor de umidade fosse elevado nessa corrida, o fungo não foi capaz de produzir o aroma a partir apenas dos nutrientes contidos na borra.

O fungo foi capaz de se desenvolver e produzir o aroma a partir dos nutrientes da borra quando a umidade do processo era baixa. A corrida 12 da tabela 7 foi conduzida com todos os nutrientes em seu nível inferior (-1). Isso mostra que mesmo em condições de

estresse ambiental o fungo foi capaz de se adaptar e produzir o aroma.

A sacarose foi avaliada como fonte de carbono, em alternativa à glicose, de forma a tentar reduzir o custo do meio líquido. Entretanto, não pareceu ser a fonte de carbono mais adequada ao processo. Esse fato experimental se reflete bem pelo coeficiente de regressão negativo obtido para a sacarose.

A glicose é um monossacarídeo e mais rapidamente assimilável pelo metabolismo do fungo quando comparada à sacarose. A sacarose é um dissacarídeo, composto de glicose e frutose, que necessita ser previamente hidrolisado para então ser assimilada pelo metabolismo do fungo. Assim, quando apenas sacarose esta disponível, o fungo provavelmente necessita de mais tempo para produzir o aroma, devido à necessidade de hidrolisar o substrato.

Dentre os sais adicionados no meio, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 e $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ apresentaram coeficientes de regressão negativos e puderam ser retirados da solução nutritiva. Os sais $(NH_4)_2SO_4$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ e $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, por outro lado, são necessários para a produção de 6-PP.

O extrato de levedura é proveniente da autólise ácida ou enzimática da parede celular das células de levedura (DAWSON, 2002). Em sua composição, apresenta teores elevados de proteínas, vitaminas e outros fatores de crescimento, além de conter também nucleotídeos e minerais, sendo utilizado com frequência na composição de meios de cultura de microrganismos (EURASYP, 2013). Os resultados do planejamento indicaram que este composto é marginalmente significativo nas concentrações estudadas, ou seja, possui um efeito positivo fraco na produção de 6-PP.

A correlação entre os valores previstos e observados pode ser visualizada na Figura 15 e serve para confirmar que o modelo proposto é eficaz ao descrever os dados experimentais.

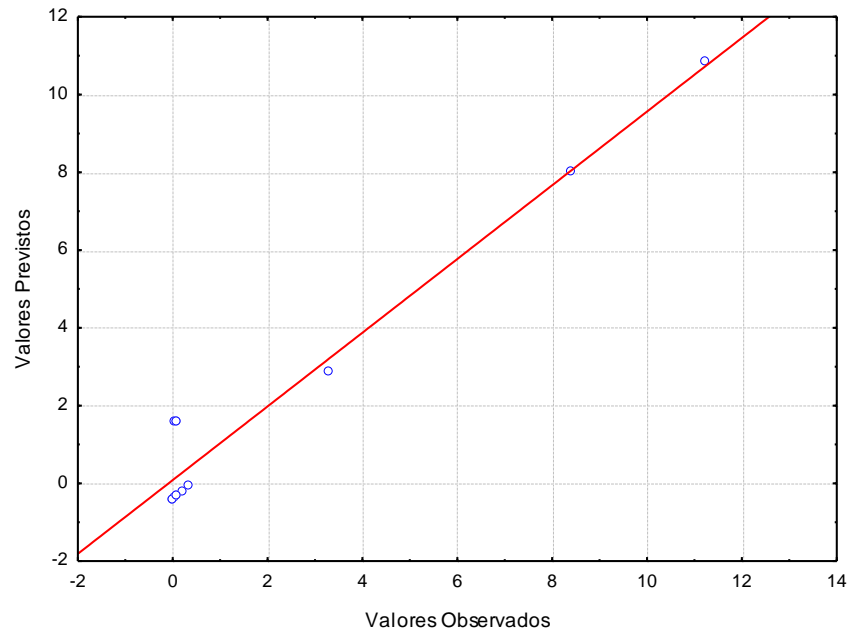


Figura 15 Correlação entre os valores previstos e observados no planejamento de Plackett-Burman.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

1. A substância 6-pentil- α -pirona foi produzida pela cepa *Trichoderma harzianum* 4040 por fermentação em estado sólido sobre a borra de café impregnada com uma solução nutriente. De acordo com o perfil cinético, o quinto dia foi o de maior produção do aroma, diferente de outros autores que relatam a produção máxima em períodos mais longos;

2. Além das substâncias presentes na borra de café, nenhuma outra substância foi identificada no *headspace* do meio fermentado após 5 dias, o que indica que nas condições estudadas a 6-pentil- α -pirona é o único composto volátil produzido pelo fungo;

3. O planejamento de Plackett-Burman permitiu reduzir o número de compostos adicionados na solução nutriente. Das oito substâncias adicionadas inicialmente, apenas glicose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 e FeSO_4 indicaram ter efeito positivo sobre a produção do aroma. Além disso, suplementação de extrato de levedura também se mostrou positiva no processo;

4. A utilização de sacarose como fonte alternativa de carbono, embora diminuísse o custo da solução nutriente, não mostrou ser eficiente para a produção da lactona nas condições estudadas;

5. O efeito da umidade na produção do aroma foi o fator mais significativo de acordo com o planejamento de Plackett-Burman.

5.2 Sugestões para trabalhos posteriores

1. Determinar a cinética de produção de aroma em espaços de tempo mais curtos e determinar também a cinética de consumo de glicose e formação de biomassa;
2. Realizar um novo planejamento experimental com as variáveis glicose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 , FeSO_4 e extrato de levedura para definir as concentrações ideais na solução nutritiva, a fim de otimizar a produção de 6-PP;
3. Realizar a fermentação com a borra de café sem remoção de óleo e avaliar se o óleo presente na borra influencia na produção de 6-PP;
4. Realizar a fermentação em escala piloto e definir as variáveis que influenciam a produção do aroma nesta escala;
5. Desenvolver uma metodologia extrativa viável em larga escala visando à aplicação do aroma em matrizes alimentícias.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDERHALDEN, H. The future of the flavors business. **Perfumer and Flavorist**, v. 16, n. 6, p. 31-34, 1991.

ADAMS, M. R.; DOUGANS, J. Waste Products. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. **Coffee. Volume 2: Technology**. Londres: Elsevier Applied Science Publishers, 1985. 291p.

AL-HAMAMRE, Z. et al. Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing. **Fuel**, v. 96, p. 70-76, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC n° 2 de 15 de janeiro de 2007. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 jan. 2007. Seção 1.

ANDRIAMIALISOA, Z. et al. Chemical synthesis of 6-pentyl-2H-pyran-2-one: a natural antifungal biosynthesized by *Trichoderma* spp. **Chemistry and Ecology**, v. 20, n. 1, p. 55-59, 2004.

ARRUDA, A. C. et al. Justificativas e motivações do consumo e não consumo de café. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 754-763, 2009.

ARYA, M.; RAO, L. J. M. An impression of coffee carbohydrates. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, p. 51-67, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE CAFÉ (ABIC). Disponível em <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#2304>>. Acesso em 03/04/2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Norma ABNT NBR 10004**, de 30 de novembro de 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 40 ed. Washington, EUA: 1995.

BHARGAV, S. et al. Solid-state fermentation: an overview. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 22 n. 1, p. 49-70, 2008.

BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 881-896, 2003.

BONNARME, P. et al. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma* sp. from vegetable oils. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 143-150, 1997.

CAETANO, N.S.; SILVA, F. M. V; MATA, T. M. Valorization of coffee grounds for biodiesel production. **Chemical Engineering Transactions**, v. 26, p. 267-272, 2012.

CALASANS, P. N. **Produção de aroma de coco por *Trichoderma harzianum* utilizando bagaço de cana**. 2012, 91f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Sergipe (UFS), 2012.

CHAUHAN, K.; TRIVEDI, U.; PATEL, K. C. Statistical screening of medium components by Plackett-Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 98-103, 2007.

CHIAPPINI, C. C. Aromas naturais produzidos por microrganismos. **Food Ingredients Brasil**, n. 4, p. 22-24, 2008.

CHISTI, Y. Fermentation (Industrial): Basic considerations. In: ROBINSON, R; BATT, C.; PATEL, P. **Encyclopedia of Food Microbiology**. Londres: Academic Press, 1999, p. 663-674.

CHOI, I. S. et al. Conversion of coffee residue waste into bioethanol with using popping pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 132-137, 2012.

CODEX ALIMENTARIUS. **Guidelines for the use of flavorings CX/CAC/GL 66-2008**, 2008.

COLLINS, R. P.; HALIM, A. F. Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 20, p. 437-438, 1972.

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry – a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2006.

COUTO, R. M. et al. Supercritical fluid extraction of lipids from spent coffee grounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, p. 159-166, 2009.

DAOUBI, M. et al. Hemisynthesis and absolute configuration of novel 6-pentyl-2H-pyran-2-one derivatives from *Trichoderma* spp. **Tetrahedron**, v. 6, p. 4834-4840, 2009.

DAWSON, K. Not just bread and beer: new applications for yeast and yeast products in human health In: LYONS, T. P.; JACQUES, K. A. **Proceedings of the 18th Annual Symposium**. Nottingham, Reino Unido: Alltech Biotechnology, 2002. p. 225-232.

DUFOSSÉ, L.; LATRASSE, A.; SPINLER, H. E. Importance des lactones dans les arômes alimentaires: structure, distribution, propriétés sensorielles. **Sciences des Aliments**, v. 14, n. 1, p. 17-50, 1994.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 113-125, 2003.

ENCARNAÇÃO, R. O.; LIMA, D. R. **Café e a saúde humana**. Brasília: Embrapa Café, 2003. 64p. (Embrapa Café, Documentos, 1).

EUROPEAN ASSOCIATION FOR SPECIALTY YEAST PRODUCTS (EURASYP). Disponível em <<http://www.yeastextract.info/>>. Acesso em 05/08/2013.

FAN, L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Production of *Flammulina velutipes* on coffee husk and coffee spent-ground. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 2, p. 205-212, 2001.

FERON, G.; BONNARME, P.; DURAND, A. Prospects for the microbial production of food flavours. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 9, p. 285-293, 1996.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Food energy: methods of analysis and conversion factors**. Roma, 2003. 93p. (FAO Food and Nutrition Papers, 77).

GALINDO, E. et al. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* cultured in unbaffled and baffled shake flasks. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 18, p. 1-8, 2004.

GERVAIS, P. Water activity: a fundamental parameter of aroma production by microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 72-75, 1990.

GERVAIS, P.; SARRETE, M. Influence of age of mycelium and water activity of the medium on aroma production by *Trichoderma viride* grown on solid substrate. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 69, p. 46-50, 1990.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 85-101, 2003.

GLOBAL EXCHANGE. Disponível em <<http://www.globalexchange.org/fairtrade/coffee/faq>>. Acesso em 05/04/2013.

GOKULAKRISHNAN, S. et al. Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 225-232, 2005.

GOMÉZ, N. D. **Separación de aromas em etapas del procesado de zumos de frutas y bebidas**. Tese (Doutorado). Universidad de Cantabria, 2008.

GOPALAKRISHNA KAO, N.; NATARAJAN, C. P. Utilization of coffee by products. **Indian Coffee**, v. 38, n. 1, p. 3-5, 1974.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. 2. ed. Nova York: John Wiley & Sons, Inc., 1994. 472p.

GUMELO. Disponível em <<http://pt.gumelo.com/>>. Acesso em 03/08/13.

HARRISON, A. F. The inhibitory effect of oak leaf litter tannins on the growth of fungi, in relation to litter decomposition. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 3, p. 167-172, 1971.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301-306, 2005.

ILLY. Disponível em <<http://www.illy.com/wps/wcm/connect/en/coffee/how-prepare-espresso>>. Acesso em 03/04/2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos Físico-Químicos para Análises de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1018p.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). Disponível em <http://www.ico.org/coffee_story.asp?section=About_Coffee>. Acesso em 03/04/2013a

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Annual Review 2011/2012**. Londres, Reino Unido: 2013b.

JANSSENS, L. et al. Production of flavours by microorganisms. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 195-215, 1992.

KALYANI, A.; PRAPULLA, S. G.; KARANTH, N. G. Study on the production of 6-pentyl- α -pyrone using two methods of fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 610-612, 2000.

KNAPP, J. S.; HOWELL, J. A. Solid substrate fermentation. In: **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**. v 4. Chichester, Inglaterra: Ellis Horwood Ltd., 1980.

KONDAMUDI, N.; MAHAPATRA, S. K.; MISRA, M. Spent coffee grounds as a versatile source of green energy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11757-11760, 2008.

KRINGS, U.; BERGER, R. G.; Biotechnological production of flavours and fragrances. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 1-8, 1998.

LADEIRA, N. C. et al. Optimization of 6-pentyl- α -pyrone production by solid state fermentation using sugarcane bagasse as residue. **BioResources**, vol. 5, n. 4, p. 2297-2306, 2010.

LAGO, R. C. A.; FREITAS, S. P. **Extração dos óleos de café verde e da borra com etanol comercial**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2006. 6p. (Embrapa Agroindústria de Alimentos, Comunicado Técnico, 92).

LAGO, R. C. A.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. C. Composição centesimal e de aminoácidos de café verde, torrado e de borra de café solúvel. In: II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. 2001, Vitória. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, 2001. p. 1473-1478. (Resumos expandidos).

LOMASCOLO, A. et al. Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 282-289, 1999.

LONGO, M. A.; SANROMÁN, M. A. Production of food aroma compounds. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 335-352, 2006.

LONSANE, B. K. et al. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 259-273, 1992.

LUERCE, R. F. **Produção de acetoina por *Bacillus polymyxa***. 2002. 70f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2002.

MARINS, J. M. Seminário sobre biomassa como energia na indústria, 1, Rio de Janeiro, 1980. **Anais...** p. 12.01-12.04.

MARTINS, P. S. O. **Avaliação da extração e da produção de aroma de coco por *Trichoderma harzianum***. 2003, 111p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), 2003.

MARTINS, L. et al. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresources Technology**, v. 99, p. 1417-1424, 2008.

MAZUTTI, M. et al. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 56-59, 2006.

MCMURRY, J. **Química orgânica**. São Paulo: Cengage Learning: 2009. Tradução da 6ª edição norte-americana.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe/saiba-mais>>. Acesso em 18/04/2013.

MITCHELL, D. A.; VON MEIEN, O. F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 137-147, 2003.

MOHALLEM, D. F. et al. Avaliação do coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos com frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 449-453, 2008.

MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A. R.; TENGEDY, R. P. Principle of solid-substrate fermentation. In: **Fungal Biotechnology – The filamentous fungi**, v. 4, Londres: Edward Arnold, 1983.

MUSSATO, S. I. et al. A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 368-374, 2011a.

MUSSATO, S. I. et al. Production, composition and application of coffee and its industrial residues. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 661-672, 2011b.

NASSIF, W. et al. Cafeteria e sua influência no consumo do café na cidade de São Paulo. **Revista Brasileira de Gestão de Negócios**, n. 19, 2005.

NAVEENA, B. J. et al. Selection of medium components by Plackett-Burman design for production of L(+)-lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 485-490, 2005.

NOGUEIRA, W. A.; COSTA, D. D. Variação da temperatura na compostagem de resíduos sólidos orgânicos. In: Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, 25, México, 1996. **Anais...** México: Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, 1996, p. 1-8. (Textos completos).

ODA, S.; ISSHIKI, K.; OHASHI, S. Production of 6-pentyl- α -pyrone with *Trichoderma atroviride* and its mutant in a novel extractive liquid-surface immobilization (Ext-LSI) system. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 625-630, 2009.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 153-162, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUÉZ-LEON, J. A. **Solid-state fermentation biotechnology: Fundamentals and applications**, 1 ed. Nova Deli: Asiatech Publishers Inc., 2001, 221p.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. Introduction. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Current developments in solid-state fermentation**. Nova York: Springer, 2008, 517p.

PASSOS, C. P.; COIMBRA, M. A. Microwave superheated water extraction of polysaccharides from spent coffee grounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 626-633, 2013.

PÉREZ-HERNÁNDEZ, L. M. et al. Phenolic characterization, melanoidins, and antioxidant activity of some commercial coffees from *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **Journal of Mexican Chemical Society**, v. 56, n.4, p. 430-435, 2012.

PFLUGER, R. A. **Solid Wastes: origin, collection, processing and disposal**. Toronto: Wiley Interscience Publishers, 1975, p. 365-376.

PINELO, M. et al. Effect of cellulases, solvent type and particle size distribution on the extraction of chlorogenic acid and other phenols from spent coffee grounds. **American Journal of Food Technology**, v. 2, n. 7, p. 641-651, 2007.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R. **Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e a valorização de resíduos agroindustriais tropicais**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2005. 5p. (Comunicado Técnico, 102).

PRABHAKAR, A. et al. An overview of engineering aspects of solid state fermentation. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 10-16, 2005.

PRAPULLA, S. G. et al. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma viride*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 7, p. 231-234, 1992.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 1998. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol1/issue3/full/9/9.pdf>>. Acesso em 07/08/2013.

RAMOS, A. S. **Otimização da produção de aroma de coco por fermentação em estado sólido**. 2006, 98f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), 2006.

RAMOS, A. S.; FIAUX, S. B.; LEITE, S. G. F. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 4, 2008.

RITO-PALOMARES, M. et al. Aroma compounds recovery from mycelial cultures in aqueous two-phase processes. **Journal of Chromatography B**, v. 743, p. 403-408, 2000.

RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A. et al. Factors affecting solid-state fermentation. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Current developments in solid-state fermentation**. Nova York: Springer, 2008, 517p.

RUEGGER, M. J.S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da estação ecológica de Juréia-Itatins. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

SAMPAIO, J. B. R.; SAMPAIO, A. C. S. **O Consumo de café expresso no Brasil**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2000. 14p. (Embrapa Cerrados, Documentos, n. 27).

SARHY-BAGNON, V. et al. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 1-2, p. 103-109, 2000.

SCHENINI, P. C. Gerenciamento de resíduos da agroindústria. In: II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais. 2011, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: 2011. p. 83-88. (Palestras).

SERRANO-CARREÓN, L. et al. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* from 18:n fatty acid methyl esters. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 11, p. 1019-1024, 1992.

SERRANO-CARREÓN, L. et al. Metabolism of linoleic acid or mevalonato and 6-pentyl- α -pyrone biosynthesis by *Trichoderma* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 2945-2950, 1993.

SILVA, M. A. et al. The use of biomass residues in the Brazilian soluble coffee industry. **Biomass and Bioenergy**, v. 14, n. 5/6, p. 457-467, 1998.

SINGHANIA, R. R.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Application of tropical agro-industrial residues as substrate for solid-station fermentation processes. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Current developments in solid-state fermentation**. Nova York: Springer, 2008, 517p.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SOARES, S. F. et al. Destinação da água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro. In: FERRÃO, R. G. et al. **Café conilon**. Vitória: Incaper, 2007. p. 519-529.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-218, 2003.

SOCCOL, C. R. et al. Production of aroma compounds. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Current developments in solid-state fermentation**. Nova York: Springer, 2008, 517p.

SOUZA, G. B. et al. **Método alternativo para a determinação de fibra em detergente neutro e detergente ácido**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 1999. 21p. (Embrapa Pecuária Sudeste, Boletim de Pesquisa, 4).

TANGO, J. S. Utilização industrial do café e dos seus subprodutos. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)**, São Paulo, v. 28, p. 49-73, 1971.

THE COFFEE GUIDE. Disponível em <<http://www.thecoffeeguide.org/coffee-guide/the-markets-for-coffee/Brazil/>>. Acesso em 03/04/13.

TOKIMOTO, T. et al. Removal of lead ions in drinking water by coffee grounds as vegetable biomass. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 281, p. 56-61, 2005.

VEGRO, C. L. R. et al. O consumo e o mercado de café expresso na cidade de São Paulo. In: II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. 2001, Vitória. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, 2001. p. 2280-2287. (Resumos expandidos).

WILKES, J. G. et al. Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 3-33, 2000.

WHITAKER, G. et al. Production of [¹⁴C]-6-pentyl-2-pyrone in liquid cultures of *Trichoderma harzianum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3747-3749, 1998.

YOUNG, F. M.; LIM, G. Effect of carbon source on aroma production by *Trichoderma viride*. **MIRCEN Journal**, v. 2, p. 483-488, 1986.

ZAPPAROLLI, D. Cafés Especiais Conquistam o Mercado. **Gazeta Mercantil Latino-Americana**. Negócios. p. 4. 2001.

ZIEGLER, H. (ed). **Flavourings**: production, composition, applications, regulations. 2 ed. Alemanha: Wiley-VCH, 2007. 828p.

ZYLBER SZTAJN, D.; FARINA, E. M. M. Q.; SANTOS, R. **O sistema agroindustrial do café**. Porto Alegre: Ortiz, 1993. 277 p.