

ANA LUIZA DA SILVA CURCINO

APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE RESÍDUOS DOMÉSTICOS DE CAFÉ



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2025

Trabalho realizado no
Departamento de Microbiologia
Geral, do Instituto de Microbiologia
Paulo de Góes, UFRJ, sob a
orientação do(a) Professor(a) Mateus
Gomes Godoy e coorientação de
Lucas Souza de Carvalho

CIP - Catalogação na Publicação

d975a da Silva Curcino, Ana Luiza
Aproveitamento biotecnológico de resíduos
domésticos de café / Ana Luiza da Silva Curcino. --
Rio de Janeiro, 2025.
61 f.

Orientador: Mateus Gomes de Godoy.
Coorientador: Lucas Souza de Carvalho.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2025.

1. Cultivo em Estado Sólido. 2. Resíduo de café.
3. Cafeína. 4. Café. 5. Penicillium sp.. I. Gomes de
Godoy, Mateus, orient. II. Souza de Carvalho, Lucas
, coorient. III. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO(A): ANA LUIZA DA SILVA CURCINO

DRE: 122092854

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Ana Maria Mazotto de Almeida (Presidente)
Prof. Ana Cristina de Araujo Collaço
Prof. Sabrini Natali da Silva Ávila
Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius (Suplente)

Título da Monografia: "Aproveitamento Biotecnológico de resíduos domésticos de café".

Local: Sala da Pós-graduação II (Sala Vermelha), IMPG, CCS.

Data e hora de início: 09 de Dezembro de 2025 às 9:30 horas.

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 9 de dezembro de 2025.

NOTA:

Banca Examinadora:

<u>10</u>	<u>Ana Maria M de Almeida</u> Prof. Ana Maria Mazotto de Almeida (Presidente)
<u>10</u>	<u>Ana Cristina de Araujo Collaço</u> Prof. Ana Cristina de Araujo Collaço
<u>10</u>	<u>Sabrini Ávila</u> Prof. Sabrini Natali da Silva Ávila
	_____ Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius (Suplente)
Aluno(a):	<u>Ana Luiza da Silva Curcino</u> Ana Luiza da Silva Curcino
Orientador(a) (e coorientador):	<u>Mateus Gomes de Godoy e Lucas Souza de Carvalho</u> Prof. Mateus Gomes de Godoy e Lucas Souza de Carvalho
Coordenadora de TCC:	<u>Marinella Silva Laport</u> Profa. Marinella Silva Laport

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me conceder sabedoria, saúde e resiliência na minha vida.

À minha mãe, Eliane Nascimento, pelos sacrifícios que fez por mim, para que este momento pudesse se tornar realidade. Obrigada por todo suporte financeiro e por acreditar em mim.

Ao meu namorado Jhonata Gouveia, pelo seu companheirismo, que me ajudou muito emocionalmente, sempre me incentivando a continuar e tornando os momentos difíceis mais leves. Obrigada por ser meu conforto.

Ao meu padrasto, Obadias, por todo suporte financeiro, incentivo meus estudos, cuidado e por acreditar em mim.

Aos meus amigos Nicolli Oliveira e Pedro Andrade por todos esses anos que estiveram do meu lado, sempre tornando tudo mais divertido e mais fácil.

As minhas amigas que fiz na graduação, Gleice Bispo e Paula Pollig e que vou levar para vida. Foram a melhor parte da graduação, que me ajudaram muito, aguentaram todos os momentos de desespero das semanas de prova e seminários, mas no final sempre estávamos rindo de tudo.

O meu admirado orientador Dr. Mateus Godoy, por me dar a oportunidade de trabalhar no seu laboratório, pelos ensinamentos, paciência e incentivo que foram essenciais para meu crescimento profissional e para que o projeto pudesse acontecer.

Aos meus co-orientadores, os doutorandos Lucas Carvalho e Thiago Silva, pelos ensinamentos práticos e teóricos, pela orientação, paciência e por compartilharem comigo conhecimento necessário para realização deste trabalho.

Toda equipe Godoy, Kaio Cezar, Eduardo Palmier, Ana Beatriz Peixe, Matheus Saavedra, e Isabella Campelo, pelo suporte durante os trabalhos experimentais e escritos durante a minha iniciação científica, e toda ajuda durante a minha graduação.

Toda equipe do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana (LABEM), Igor Juliano Souza, Millena Salles, Lucas Oliveira, Victoria Pereira, Daniela Villarinho e Gonçalo Carvalho e Ana Clara Bigão, e aos professores Diogo Jurelevicius e Caio Rachid, pesquisadores muito capacitados que estavam sempre abertos a ajudar e ensinar, de forma prestativa e receptiva, além de tornarem os dias de trabalho mais animados e divertidos.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, e especialmente ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG). Agradeço por me proporcionar uma educação de qualidade e desafios enriquecedores, permitindo o meu crescimento pessoal e profissional.

À FAPERJ por todo aporte financeiro durante a minha iniciação científica, contribuindo para a conclusão deste projeto.

RESUMO

ANA LUIZA DA SILVA CURCINO

APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE RESÍDUOS DOMÉSTICOS DE CAFÉ

Orientador: Mateus Gomes de Godoy

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O fruto do café tornou-se um produto de alto valor agregado e é amplamente comercializado, especialmente em países como Brasil, Vietnã e Colômbia, principais exportadores. Apesar de sua relevância econômica, a cadeia produtiva do café enfrenta o desafio de gerar grandes volumes de resíduos, já que apenas os grãos são aproveitados e o restante da biomassa é descartado. A borra e outros subprodutos do fruto são ricos em proteínas, celulose e ácidos graxos, tendo potencial para uso em rações animais, mas seu aproveitamento é limitado pela presença de cafeína e pela baixa biodegradabilidade. Métodos químicos para remover cafeína não são adequados quando o destino é a alimentação animal, tornando os microrganismos uma alternativa para degradar essa molécula. Assim, pode-se usar o cultivo em estado sólido (CES), tendo a borra como matriz e fonte de carbono. No trabalho, foram testados três fungos filamentosos: *Aspergillus awamori* IOC 3914, *Trichoderma harzianum* IOC 4127 e *Penicillium citrinum*. Os fungos foram submetidos a uma CES usando 75% de borra de café e 25% de película prateada, com inóculo de 1×10^7 esporos por grama, umidade inicial de 70% e incubação a 30 °C por 7 dias. Depois disso, os sólidos bioprocessados passaram por extração aquosa da cafeína, que foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Entre as espécies testadas, somente *P. citrinum* demonstrou capacidade expressiva de degradação, removendo mais de 90% da cafeína presente. Com base nesse desempenho, foi conduzido um estudo cinético (N=3) sob as mesmas condições experimentais, com coletas a cada 24 horas durante sete dias. A análise cromatográfica indicou que *P. citrinum* reduziu os níveis de cafeína para valores inferiores ao limite de detecção ($<0,005$ mg/g.m.s.), alcançando 99,21% de degradação em 48 horas. A partir da cinética, foi avaliado o pH, proteínas solúveis (PS) e crescimento fúngico. Os dados mostraram que o pH manteve-se relativamente estável entre 5 e 6. A umidade permaneceu acima de 60% até 72h. Observou-se aumento da PS em 48h, seguido de diminuição progressiva. Paralelamente, o crescimento fúngico apresentou dois picos, no 3º e no 7º dia, coincidindo com a queda da cafeína e PS, respectivamente. Uma nova cinética foi realizada até 48h, com um ponto adicional de 36h e foi testado quanto a interferência da umidade. Observou-se que em 36h tem-se 98,53% de

degradação, e permanece eficiente até 60% de umidade, e variáveis como o pH permanecem estáveis, entre 5 e 6 em todas as umidades testadas. No crescimento fúngico, a umidade de 55%, que apresentou uma maior biomassa fúngica, demonstrou menor degradação da cafeína dos resíduos, enquanto as umidades elevadas apresentaram menor crescimento celular e melhor detoxificação. Assim, *P. citrinum* demonstrou elevada eficiência na detoxificação dos resíduos de café, promovendo mais de 98% de degradação da cafeína em 36 horas com boa estabilidade. Esses resultados evidenciam o potencial biotecnológico do fungo para o tratamento e reaproveitamento desses resíduos, bem como para uma futura aplicação na produção de bioprodutos de maior valor agregado.

Palavras-Chave: Cultivo em estado sólido; Resíduo de café; Cafeína; Café; *Penicillium* sp.

ABSTRACT**ANA LUIZA DA SILVA CURCINO****BIOTECHNOLOGICAL USE OF DOMESTIC COFFEE WASTE****Orientador: Mateus Gomes de Godoy**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Coffee beans have become a high-value-added product and are widely traded, especially in countries like Brazil, Vietnam, and Colombia, the main exporters. Despite their economic relevance, the coffee production chain faces the challenge of generating large volumes of waste, since only the beans are used and the remaining biomass is discarded. Coffee grounds and other byproducts of the fruit are rich in proteins, cellulose, and fatty acids, having potential for use in animal feed, but their use is limited by the presence of caffeine and low biodegradability. Chemical methods for removing caffeine are not suitable when the destination is animal feed, making microorganisms an alternative to degrade this molecule. Thus, solid-state culture (SSC) can be used, with coffee grounds as a matrix and carbon source. In this work, three filamentous fungi were tested: *Aspergillus awamori* IOC 3914, *Trichoderma harzianum* IOC 4127, and *Penicillium citrinum*. The fungi were subjected to CES using 75% coffee grounds and 25% coffee husk film, with an inoculum of 1×10^7 spores per gram, initial moisture content of 70%, and incubation at 30 °C for 7 days. Afterward, the bioprocessed solids underwent aqueous extraction of caffeine, which was quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC). Among the species tested, only *P. citrinum* demonstrated significant degradation capacity, removing more than 90% of the caffeine present. Based on this performance, a kinetic study (N=3) was conducted under the same experimental conditions, with collections every 24 hours for seven days. Chromatographic analysis indicated that *P. citrinum* reduced caffeine levels to values below the detection limit (<0.005 mg/g.d.m.), achieving 99.21% degradation in 48 hours. Based on the kinetics, pH, soluble proteins (SP), and fungal growth were evaluated. The data showed that the pH remained relatively stable between 5 and 6. Humidity remained above 60% for up to 72 hours. An increase in SP was observed at 48 hours, followed by a progressive decrease. Simultaneously, fungal growth showed two peaks, on the 3rd and 7th day, coinciding with the decrease in caffeine and SP, respectively. A new kinetic analysis was performed up to 48 hours, with an additional 36-hour point, and the interference of humidity was tested. It was observed that 98.53% degradation occurred at 36 hours, and it remains efficient up to 60% humidity. Variables such as pH remain stable, between 5 and 6, at all humidities tested. In fungal growth, the 55% moisture content, which showed the highest fungal

biomass, demonstrated less caffeine degradation from the residues, while higher moisture levels showed less cell growth and better detoxification. Thus, *P. citrinum* demonstrated high efficiency in detoxifying coffee residues, promoting over 98% caffeine degradation in 36 hours with good stability. These results highlight the biotechnological potential of the fungus for the treatment and reuse of these residues, as well as for future application in the production of higher value-added bioproducts.

Keywords: Solid-state cultivation; Coffee residue; Caffeine; Coffee; *Penicillium* sp.

RESUMO PARA LEIGOS

ANA LUIZA DA SILVA CURCINO

APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE RESÍDUOS DOMÉSTICOS DE CAFÉ

Orientador: Mateus Gomes de Godoy

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O fruto do café tornou-se um produto de alto valor agregado e é amplamente comercializado, especialmente em países como Brasil, Vietnã e Colômbia. Apesar disso, a cadeia produtiva gera grandes volumes de resíduos, pois apenas os grãos são aproveitados e o restante é descartado. A borra e outros subprodutos do fruto possuem nutrientes importantes como proteínas, celulose e ácidos graxos e poderiam ser usados em rações animais. Porém, isso ainda é difícil, porque esses resíduos contêm cafeína e têm baixa biodegradabilidade, demorando para se decompor naturalmente. Os métodos químicos que existem para remover a cafeína não são bons para quando se quer usar o material como alimento animal, pois podem deixar substâncias químicas indesejadas. Por isso, uma alternativa mais natural é usar microrganismos capazes de degradar a cafeína. Para isso, o trabalho vai usar um método chamado cultivo em estado sólido (CES). Nele, o fungo cresce sobre uma matriz sólida, que é sua fonte de nutrientes, no caso, a própria borra de café e a película prateada de café. No estudo, foram testados três fungos filamentosos: *Aspergillus awamori*, *Trichoderma harzianum* e *Penicillium citrinum*. Depois, o material fermentado passou por uma extração aquosa para medir a quantidade de cafeína por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Entre os fungos testados, apenas *P. citrinum* conseguiu remover mais de 90% da cafeína. A partir desse resultado, foi feito um estudo mais detalhado, repetido três vezes, nas mesmas condições, com coletas a cada 24 horas por sete dias. No resultado observou-se que *P. citrinum* conseguiu remover praticamente toda a cafeína já nas primeiras 48 horas, atingindo mais de 99% de degradação. Foram analisados outros fatores, como o pH, que se manteve estável entre 5 e 6. A umidade do material permaneceu acima de 60% nas primeiras 72 horas. Também foi observado que a quantidade de proteínas solúveis aumentou até 48 horas e depois foi diminuindo. O crescimento do fungo apresentou dois picos: um no 3º dia e outro no 7º dia, coincidindo com mudanças na quantidade de cafeína e proteínas. Uma nova análise foi feita até 48 horas, incluindo um ponto extra em 36 horas e testando diferentes níveis de umidade. Nessa etapa, viu-se que em 36 horas o fungo já removeu cerca de 98% da cafeína. As umidades mais altas favorecem a degradação, enquanto a umidade mais baixa (55%), embora gerasse mais crescimento do fungo, não resultou em melhor remoção da cafeína. No geral, *P. citrinum* demonstrou alta eficiência para detoxificar os resíduos do café, removendo praticamente

toda a cafeína em 36h, com estabilidade e sem grandes variações de pH. Esses resultados mostram que esse fungo tem potencial biotecnológico para o tratamento e reaproveitamento dos resíduos do café e pode futuramente ser usado para produzir bioprodutos de maior valor agregado.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de componentes presentes na borra e película prateada de café

Tabela 2: Resultado do teste de inibição das amostras de 72 horas de cultivo em BDA *P. citrinum* Ve1. N=3

Tabela 3: Resultado da purificação do extrato de cafeína tratado por CES com *P. citrinum*, em 7 dias de cultivo.
Linhas com a mesma letra são iguais pelo teste *tukey* ($P < 0,05$). N=3

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura anatômica do fruto do cafeeiro (*Coffea* spp.), com destaque para suas principais camadas: exocarpo (casca), mesocarpo (polpa), endocarpo (conhecido como pergaminho) e a semente (grão de café). Fonte: Harsono, S. *et al*, 2021.

Figura 2: Gráfico da produção de café arábica e conilon no Brasil nos últimos quatro anos. Fonte: Conab

Figura 3: Fluxograma do processo de obtenção do grão de café por via seca ou via úmida. Adaptado de Clarke e Macrae, 1985

Figura 4: Resíduos da indústria do café. (A) Casca de café seco. (B) Película prateada de café. Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5: Polpa de café liberada no processamento úmido do grão de café. Fonte: A Colheita Foto Royalty Free, Gravuras, Imagens e Banco de fotografias. Image 96478069

Figura 6: Estrutura química da cafeína. (Tagliari *et al.*, 2003 apud Carvalho, 2024)

Figura 7: Estrutura química representativa de um tanino hidrolisável. Fonte: Souza *et al.*, 2015

Figura 8: Processo de desmetilação da cafeína. (Tagliari *et al.*, 2003 apud Carvalho, 2024)

Figura 9: Quantificação da cafeína dos extratos da CES com *Aspergillus awamori* IOC 3914, *Trichoderma harzianum* IOC 4127 e *Penicillium citrinum* Ve1, por sete dias, em mistura de borra:película prateada 75:25, e amostra Controle inoculado. Colunas com a mesma letra são iguais pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). $N=3$

Figura 10: Quantificação da cafeína dos extratos da CES com *Penicillium citrinum* VE1, a cada 24 horas por sete dias, por CLAE. $N=3$

Figura 11: (A) Cromatograma da citrinina em CLAE (Hackbart, 2009). (B) Cromatograma do cultivado de 7 dias com *Penicillium citrinum* Ve1, a 330 nm.

Figura 12: (A) Espectro da citrinina em CLAE a 330nm (Hackbart, 2009). (B) Espectro de detecção da citrinina em CLAE com arranjo de diodos a 330nm do cultivo de 7 dias com *Penicillium citrinum* em resíduos de café.

Figura 13 : Gráfico de quantificação de glicosamina em mg/g, e proteínas solúveis em mg/g.m.s, ao longo do cultivo de sete dias com *Penicillium citrinum* Ve1. $N=3$

Figura 14: Gráfico de pH ao longo de sete dias de cultivo com *Penicillium citrinum* Ve1. $N=2$

Figura 15: Influência da umidade no processo de degradação da cafeína em cultivo sólido com borra de café e película prateada(75:25) de café utilizando *Penicillium citrinum* Ve1. Colunas com a mesma letra são iguais pelo teste Tukey ($P < 0,05$). O teste foi realizado individualmente para cada umidade. $N=3$

Figura 16: Teor de glicosamina dos cultivos de até trinta e seis horas (36h) do cultivo sólido com *Penicillium citrinum* Ve1 em diferentes umidades. Colunas com a mesma letra são iguais pelo teste Tukey ($P < 0,05$). O teste foi realizado individualmente para cada umidade $N=3$.

Figura 17: Interferência da umidade no pH do meio de cultivo sólido com *Penicillium citrinum* Ve1, até 36 horas. Colunas com a mesma letra são iguais pelo teste Tukey ($P < 0,05$). O teste foi realizado individualmente para cada umidade. $N=3$

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O fruto do café e sua cadeia produtiva	1
1.1.1 Indústria do café.....	2
1.1.2. Subprodutos do processamento do café.....	5
1.2 Compostos tóxicos limitantes dos resíduos de café	6
1.2.1 Cafeína	6
1.2.2 Taninos.....	7
1.3 Potencial nutricional e uso na alimentação animal.....	8
1.4 Estratégias biotecnológicas de detoxificação de resíduos	10
1.5 Cultivo em estado sólido	10
1.6 Fungos Filamentosos.....	11
1.7 Mecanismo enzimático de degradação da cafeína	12
1.8 Micotoxinas.....	13
1.9 Outras aplicações dos resíduos de café	14
1.10 Desafios ambientais e economia circular	15
2 JUSTIFICATIVA.....	17
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Preparo do pré-inóculo para CES.....	20
4.2 Inóculo para CES.....	20
4.3 Teste de Inibição em Placa.....	20
4.4 Borra de café.....	20
4.5 Cultivo em estado sólido.....	21
4.6 Extração da cafeína.....	21
4.7 Purificação da cafeína.....	21
4.8 Cinética de degradação	22
4.9 Detecção de Citrinina	22
4.10 Teste de indução de citrinina	23

	xv
4.11	Medição de pH..... 23
4.12	Medida de umidade..... 23
4.13	Quantificação do crescimento celular 24
4.14	Quantificação de proteínas..... 24
5	RESULTADOS..... 25
5.1	Teste de inibição em placa 25
5.2	Quantificação da Cafeína 26
5.3	Purificação da Cafeína 26
5.4	Cinética de Degradação da Cafeína 27
5.5	Detecção de Citrinina 28
5.6	Crescimento Fúngico e Proteínas solúveis..... 29
5.7	Avaliação do pH ao longo do cultivo..... 30
5.8	Efeito da umidade na degradação da cafeína 31
5.9	Efeito da umidade no crescimento fúngico 32
5.10	Avaliação do pH em diferentes condições de umidade 33
6	DISCUSSÃO 35
7	CONCLUSÃO 40
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CES - Cultivo em Estado Sólido
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
BDA - Meio Ágar Batata Dextrose
IOC - Instituto Oswaldo Cruz
PS - Proteínas solúveis
PC - Película prateada
de café BC - Borra de
café
G.M.S - Grama de massa seca

1 INTRODUÇÃO

1.1 O fruto do café e sua cadeia produtiva

O café é um fruto de plantas do gênero *Coffea*, o qual possui diversas espécies, sendo as principais *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, pelo alto interesse econômico. No Brasil, o café arábica corresponde a 79% da área total de produção, e a robusta (canephora) a 21% do total (Almeida, S. 2024).

A espécie *C. arabica* apresenta resistência a climas instáveis e possíveis interferências na qualidade do solo e, devido a isso, seu plantio é bem-sucedido. É o principal café produzido no Brasil, cultivado em altas altitudes em temperatura de 18°C e 22°C. Produz raízes mais curtas comparado ao robusta, que tem uma absorção nutricional maior. As duas espécies têm diferenças também no teor de cafeína, sendo a robusta com maior porcentagem, e em outros componentes como polissacarídeos, o arábica tem maior teor (Almeida, S. 2024).

Independente da espécie, a estrutura do fruto é parecida, com variações apenas na coloração e formato da semente. O fruto é constituído de exocarpo, mesocarpo, endocarpo e tegumento (FIGURA 1). O mesocarpo trata-se da polpa do fruto, o endocarpo é o pergaminho, o tegumento é a película prateada que envolve o grão, e o exocarpo é a casca externa do café (Almeida, S. 2024).

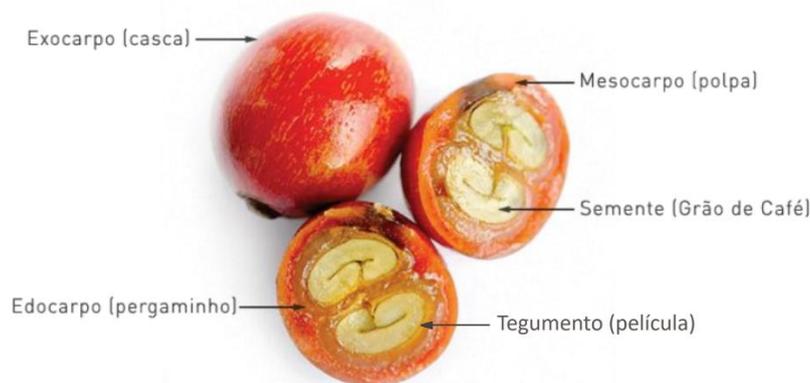


Figura 1: Estrutura anatômica do fruto do cafeeiro (*Coffea* spp.), com destaque para suas principais camadas: exocarpo (casca), mesocarpo (polpa), endocarpo (conhecido como pergaminho) e a semente (grão de café). Fonte: Harsono, S. *et al*, 2021.

1.1.1 Indústria do café

O café é um produto amplamente comercializado em todo o mundo, com sua indústria concentrada em países como Brasil, Vietnã, Indonésia e Colômbia, responsáveis pela produção de mais de 175 milhões de sacas anuais de 60 kg e os maiores exportadores globais (EMBRAPA, 2024). No entanto, apenas o grão de café, que corresponde a cerca de 50% a 55% do peso seco do fruto, é comercializado, gerando subprodutos durante o processamento. Apesar de possuírem alto valor nutricional, esses subprodutos, que representam a outra metade do fruto, são majoritariamente descartados e permanecem inexplorados (Galanakis, 2017).

O Brasil é o maior produtor de café, produzindo mais de 55,7 milhões de sacas de 60kg ao ano (FIGURA 2) (CONAB, 2025). No ano de 2024 foram consumidos em todo o país 21,9 milhões de sacas de 60 kg de café (ABIC, 2025). Regionalmente, o Sudeste fica responsável por 41,7% do total nacional, as regiões como Nordeste fica com 26,9%, o Sul apresenta 14,6%, região Norte com 8,8%, e Centro-Oeste com 8% (Ferreira e Cavaton, 2024). Estes dados indicam que a maior parte da produção de resíduos industriais está concentrada nas principais capitais do país. Porém, para o ano de 2025 é previsto uma queda de 4,4% na produção de café, comparado com os dois anos anteriores, devido a baixa bienalidade (Peduzzi, 2025).

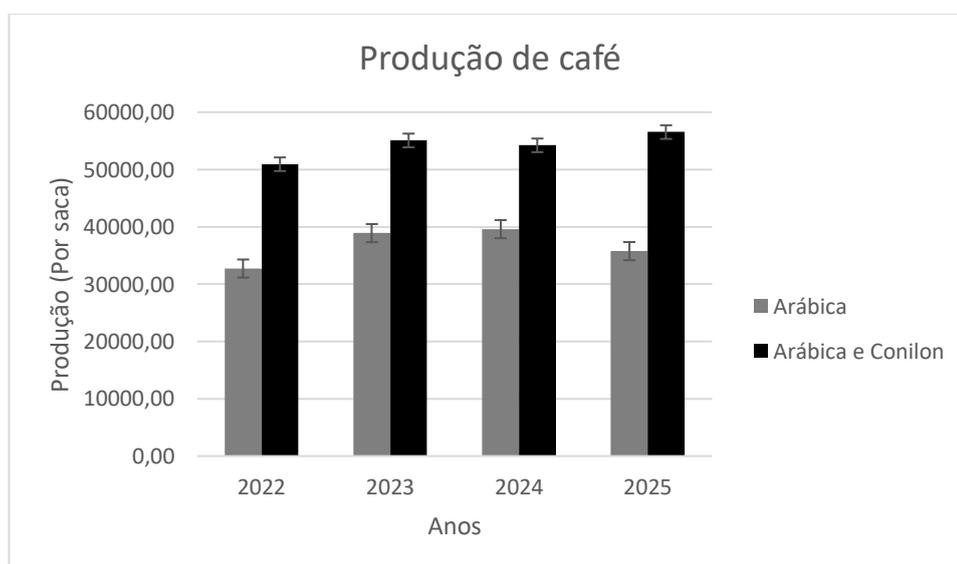


Figura 2: Gráfico da produção de café arábica e conilon no Brasil nos últimos quatro anos. Fonte: Conab

Para o estado do Rio de Janeiro os dados indicam que são produzidas mais de 300 mil

sacas de café ao ano, sendo 70% da produção de café do tipo arábica, e se concentra na região Noroeste do estado (SEBRAE, 2023). No local, existem cerca de 1.150 cafeicultores, e 81% dos produtores são familiares. Os municípios que se destacam na produção são Varre-Sai, Porciúncula, Natividade e Bom Jesus do Itabapoana, que exibem um dos maiores registros de produção cafeeira do Rio de Janeiro, com um total de 20.146 toneladas no ano de 2023 (IBGE, 2023). O consumo de café no Rio de Janeiro é de aproximadamente 1,6 milhões de sacas, o que equivale a 10,28% do consumo nacional (CCCRJ, 2023).

O processamento do café pode ser por via seca ou úmida, sendo que cada método gera diferentes quantidades de subprodutos.

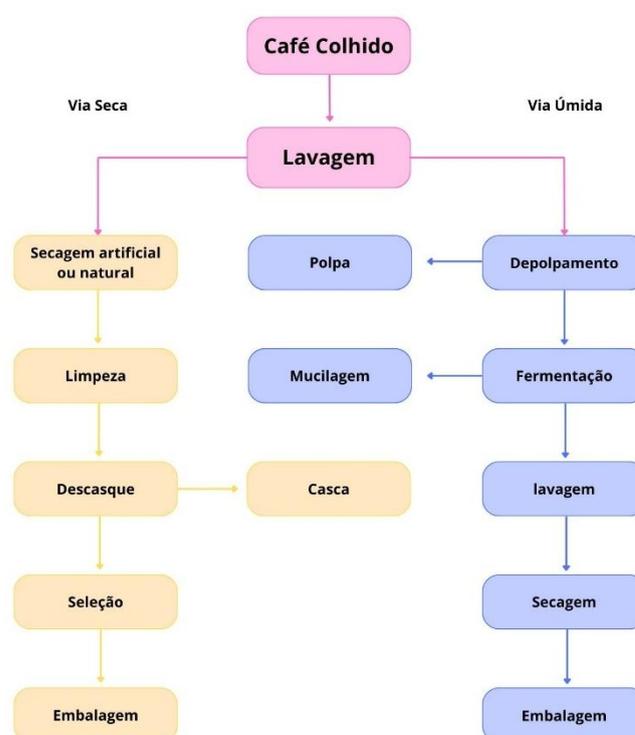


Figura 3: Fluxograma do processo de obtenção do grão de café por via seca ou via úmida. Fonte: Adaptado de Queiroga *et al.*, 2021

No método seco (FIGURA 3), o fruto é disposto em um hectare de terra para secar ao sol por aproximadamente 1 mês, ou em pré-secadores, até atingir a umidade entre 10 a 12%. Em seguida, são limpos e descascados de forma mecânica, gerando o grão de café verde, e a casca de café, que é um dos resíduos gerados por esse método. Para obtenção de 1 tonelada de café, obtém-se cerca de 1 tonelada de casca (FIGURA 4A). Após o descasque, o grão vai para torrefação, onde ocorre o desprendimento da película prateada (FIGURA 4B), uma camada que

recobre o grão. Nesse processo, é liberado 7 kg por tonelada de película prateada. Ao fim, os grãos são selecionados e embalados (Carvalho, 2024).

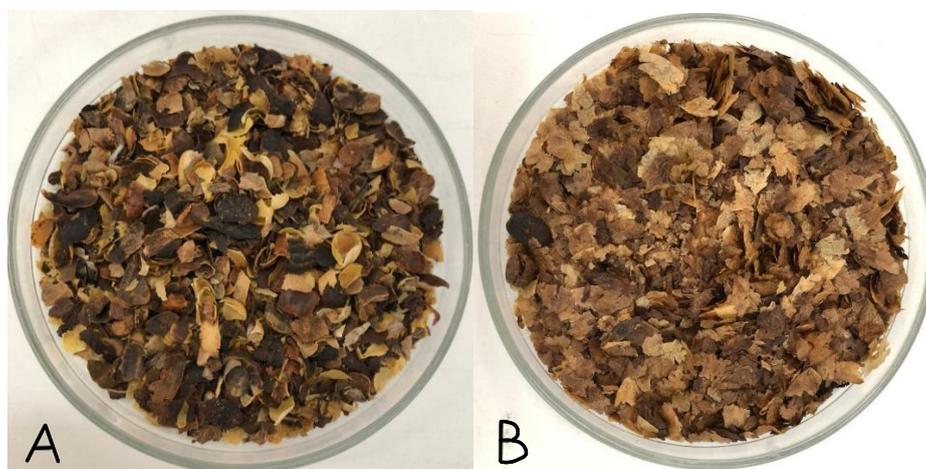


Figura 4: Resíduos da indústria do café. (A) Casca de café seco. (B) Película prateada de café. Fonte: Arquivo pessoal.

Outra forma de processamento é o úmido (FIGURA 3), o qual é aplicado principalmente para o processamento de espécies *C. arabica*. Primeiramente, o fruto é descascado de forma mecânica para remover a casca e a polpa (FIGURA 5), e desse processo é gerado 0,16 toneladas de casca, e 2 toneladas de polpa, já que nessa etapa ocorre também o despulpamento. Os grãos permanecem com a mucilagem, uma textura viscosa, a qual é removida durante o processo de fermentação. Em seguida, os grãos são lavados, secos e torrados, gerando 0,9 toneladas de película prateada (Galanakis, 2017). Esses são os principais resíduos industriais gerados no processo de obtenção do pó de café, que se trata do produto vendido e usado para o preparo da bebida de café.

A escolha da via de processamento está relacionada com o clima do país. No Brasil, a via seca é mais utilizada devido ao clima seco. Na Colômbia, um dos países exportadores, a via úmida prevalece (Pereira, 2019).



Figura 5: Polpa de café liberada no processamento úmido do grão de café. Fonte: < A Polpa E A Pele Externa Do Grão De Café Foram Removidas Após A Colheita Foto Royalty Free, Gravuras, Imagens e Banco de fotografias. Imagem 96478069>

1.1.2. Subprodutos do processamento do café

A indústria do café gera resíduos em grandes quantidades, em diferentes etapas do processamento, e eles representam diferentes percentuais do fruto. A polpa do café representa aproximadamente 28% do fruto do café com base no peso seco. Esse resíduo pode ser utilizado como matéria-prima para a cultura de fungos e fonte de bebidas refrescantes e alcoólicas (Galanakis, 2017).

A película prateada é uma fina camada de celulose que está em contato direto com o grão de café, formando uma capa externa, e é obtida como subproduto do processo de torrefação, sendo fragmentado pela expansão do grão em decorrência do aquecimento, e representa 4,2% do fruto. Fora do Brasil, ela é usada como fertilizante de solo ou combustível. Trata-se de um dos principais subprodutos das indústrias cafeeiras, e uma parcela significativa desse resíduo ainda é descartada. Estima-se que para cada saco de café de 60 kg produzido, é gerado aproximadamente 2,5 kg de película prateada (Franca *et al.*, 2024). Considerando as milhões de sacas de café produzidas anualmente, o volume descartado torna-se expressivo e impacta negativamente o meio ambiente.

A borra de café é um subproduto da indústria cafeeira considerado resíduo doméstico, obtido no preparo do café com o pó de café torrado e moído comercializado. Entretanto esse resíduo também pode ser produzido na indústria e em restaurantes que comercializam a bebida. Estima-se que para cada tonelada de café, 650 kg de borra são produzidos (Latosinska, 2024).

Já a casca do café, representa cerca de 12% do peso seco do fruto do café, obtido durante o processamento a seco. Assim como a maior parte dos resíduos, tem uma grande quantidade de compostos antinutricionais, como cafeína e taninos (Galanakis, 2017).

1.2 Compostos tóxicos limitantes dos resíduos de café

Os resíduos de café apresentam um percentual considerável de substâncias naturais do fruto, inofensivo para humanos, mas para os animais podem oferecer reações adversas (Galanakis, 2017). Compostos como taninos e cafeína podem oferecer riscos a natureza, como prejudicar a germinação de plantas e contaminação de organismos aquáticos (Tanti *et al.*, 2016) e aos animais, já que os mesmos apresentam um baixo limiar de toxicidade para essas substâncias, gerando alterações fisiológicas indesejadas (Vieira, *et al.*, 2020; Baracchini, *et al.*, 2024).

1.2.1 Cafeína

A cafeína é um alcalóide do grupo das xantinas, e seu nome químico é 1,3,7-trimetilxantina (FIGURA 6). Em humanos o limiar de toxicidade da cafeína é alto (superdose entre 500 e 600 mg/dia), e em doses terapêuticas gera benefícios pelo consumo, como aumento da capacidade de concentração e diminuição do cansaço (Freddo, 2020), e por isso esse composto pode ser consumido em bebidas, alimentos e na forma de comprimidos, devido a esses benefícios. No entanto, em animais, o consumo gera alterações fisiológicas, diminuindo o apetite desses animais e deixando-os agitados (Pires, *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2006).

Dentre os solventes que podem ser usados, a água destilada é a melhor opção, pois é purificada e principalmente segura, sendo uma forma de extração sem prejudicar o valor nutricional do resíduo (Galanakis, 2017). A cafeína é extraída com melhor resultado utilizando solventes orgânicos, porém, esse método é inviável em situações que visem a utilização final do resíduo para alimentação (Galanakis, 2017).

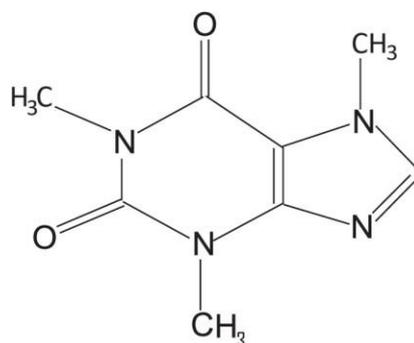


Figura 6: Estrutura química da cafeína. Adaptado de: De Maria e Moreira, 2006

1.2.2 Taninos

O tanino (FIGURA 7) é um composto fenólico que está presente na maior parte dos vegetais, principalmente em gimnospermas e angiospermas (Battestin *et al.*, 2004). Ele fica abrigado nas raízes, no lenho, na casca, nas folhas, nos frutos, nas sementes e na seiva. No fruto do café, o seu teor varia de acordo com o resíduo. Esses taninos nos subprodutos têm a capacidade de se ligar e formar complexos com a cafeína, e assim, reter parte dela no resíduo, e em um processo de detoxificação, esse composto pode mascarar a quantidade real de cafeína presente (Wanyika *et al.*, 2010). Os taninos são compostos solúveis em água, que se destacam por sua capacidade de formar complexos com outros componentes, como íons metálicos. Essa propriedade está diretamente relacionada à sua toxicidade, pois a maior parte das enzimas que participam dos processos metabólicos utilizam íons metálicos para reações enzimáticas essenciais para o sistema biológico, e sua ingestão poderia gerar distúrbios metabólicos nos animais (Battestin *et al.*, 2004).

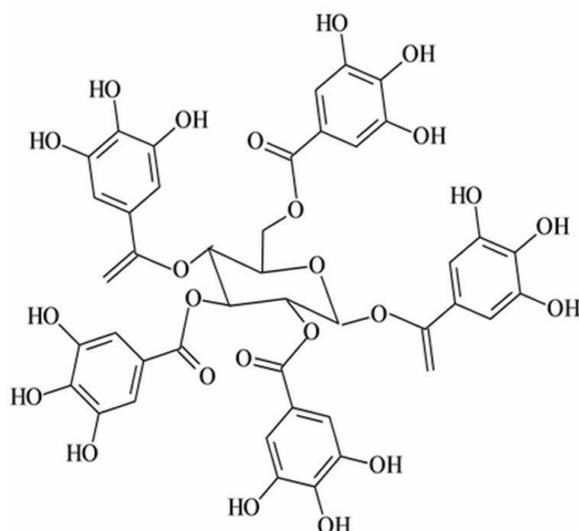


Figura 7: Estrutura química representativa de um tanino hidrolisável. Fonte: Souza *et al.*, 2015

1.3 Potencial nutricional e uso na alimentação animal

O principal resíduo utilizado no presente projeto é a borra de café doméstica, obtida no preparo do café com o pó de café torrado e moído, após o tratamento com água quente ou vapor. Anualmente mais de 6 milhões de toneladas de borra de café são gerados, sendo que para 1 kg de café solúvel produzido pode-se obter 2 kg de borra. Das 6 milhões de toneladas, 50% são da borra gerada no preparo do café solúvel industrial (Sarghini, et al., 2021). A principal diferença entre elas, além da forma de obtenção, é a riqueza de compostos, sendo a borra de café doméstica mais rica em compostos químicos, comparado a borra de café das indústrias de café solúvel. Isso ocorre pois na produção de café solúvel, a extração é mais intensa para maiores rendimentos (Galanakis, 2017). Ainda que a borra de café doméstico seja reaproveitada em alguns processos domésticos, como para exterminar pulgas de animais de estimação, caracóis de jardins e como esfoliante para a pele, sua maior parte é descartada (Galanakis, 2017). Porém, esse resíduo possui um valor nutricional com grandes quantidades de compostos bioativos, como ácidos graxos, aminoácidos, compostos fenólicos, minerais e polissacarídeos (TABELA 1), possibilitando diversas aplicações. Uma delas é sua utilização para substituir até 20% da alimentação de animais ruminantes. No trabalho de Rocha, *et al.*, 2006, onde foi testado a substituição de até 26% da ração vacas em lactação por cascas de café, notou-se a redução de custos com alimentação animal, além da maior produção de leite por esses animais. Isso ocorre devido à presença de quantidade considerável de proteínas, antioxidantes

e carboidratos na forma de celulose e hemicelulose, promovendo um enriquecimento na alimentação desses animais, barateando os custos com rações e suplementos, além de promover uma utilização para esses resíduos (Rocha *et al.*, 2006). Porém, com a ausência de tratamento, alguns dos efeitos colaterais da cafeína, como a redução do apetite, prejudicou a introdução do resíduo como alimento, e isso ressalta a importância do tratamento antes da administração do resíduo como suplemento animal.

TABELA 1: Lista de componentes presentes na borra e película prateada de café.

Componentes	Película prateada de café (%) (Ballesteros <i>et al.</i>, 2014)	Borra de café (%) (Ballesteros <i>et al.</i>, 2014)
Manose	1,77	19,07
Galactose	3,76	16,43
Celulose	23,77	12,40
Hemicelulose	16,68	39,10
Lipídeos	3,78	2,29
Fibras totais	54,11	60,46
Proteínas	18,69	14-17,5
Cafeína	0,8-1,4	1-2
Taninos	0,5	1,2-1,5

Outro resíduo utilizado no projeto de detoxificação é a película prateada do café, uma fina camada que envolve o grão de café e está em contato direto com ele, sendo liberada durante

o processo de torrefação. Trata-se de um dos principais subprodutos das indústrias cafeeiras. A película prateada contém proteínas, fibras alimentares, celulose e hemicelulose (TABELA 1), além de açúcares como xilose e galactose, características que a tornam um potencial complemento para rações animais, contribuindo para a dieta de ruminantes. No entanto, assim como a borra de café apresenta um teor de cafeína alto quando pensado no seu uso como suplemento alimentar.

1.4 Estratégias biotecnológicas de detoxificação de resíduos

A destinação dos resíduos para alimentação animal já é empregada também para outros resíduos industriais, e para maior parte é usado o tratamento biológico por meio de fermentações. Grandes indústrias como as produtoras de café, cana de açúcar, soja, mandioca e frutas produzem muitos resíduos na forma de casca, palha e farelo de arroz; palha e farelo de trigo; bagaço de cana; folha de mandioca; bagaço de laranja e torta de mamona (Woiciechowski, *et al.*, 2013; Amorim, 2016). A maior parte deles apresenta um valor nutricional com alta quantidade de carboidratos na forma de celulose e hemicelulose, além de fibras e proteínas (Woiciechowski, *et al.*, 2013; Amorim, 2016). Normalmente, os resíduos submetidos a processos mediados por microrganismos podem receber um adicional de nutrientes, como proteínas, dando as características necessárias para servir como complemento de rações animais (Zhao *et al.*, 2017).

1.5 Cultivo em estado sólido

Em virtude da demanda de um método sustentável de detoxificação dos resíduos de café, o método de cultivo em estado sólido (CES), também conhecido como fermentação em estado sólido (FES) foi escolhido para o tratamento, e trata-se de um método onde há o cultivo de microrganismos em matéria-prima sólida na ausência de água livre circulante, que é mantida aderida somente a matriz sólida (Battestin *et al.*, 2004). Para que o processo ocorra de maneira eficiente, diversos fatores devem ser claramente definidos durante o cultivo. Entre esses fatores, destacam-se: o microrganismo utilizado, que deve ser capaz de produzir enzimas que permitam a utilização da matéria-prima utilizada como fonte de nutrientes para seu metabolismo e multiplicação; a temperatura, que deve estar próxima à ideal para o crescimento do microrganismo, a fim de não comprometer a atividade enzimática; a umidade, que facilita a

difusão de nutrientes e o crescimento do microrganismo; a aeração, que mantém condições aeróbias adequadas, removendo o dióxido de carbono gerado e o calor metabólico; o pH, que é importante pois influencia na atividade enzimática; e o tamanho da partícula usada como matéria-prima (Teles e Hickert, 2025). A película prateada, por exemplo, ajuda a manter a aeração em leitos com resíduo finos (Battestin *et al.*, 2004). Esse método tem potencial para degradar cafeína dos resíduos industriais do café, e pode ser utilizado de forma comercial, pelo seu baixo custo, baixa manutenção, e alta eficiência na produção de enzimas de valor comercial (Brand *et al.*, 2000).

1.6 Fungos Filamentosos

Para o CES, são utilizados normalmente os fungos filamentosos, pois apresentam o melhor desempenho nesse método de cultivo. Esses microrganismos são eucariotos multicelulares, caracterizados por uma parede celular composta de quitina, glucana e manoproteínas, e uma membrana plasmática, sendo comumente conhecidos como bolores (Routier, F. H. *et al.*, 2022). Apresentam grande capacidade de adaptação a novos ambientes, devido à sua habilidade de produzir uma ampla variedade de enzimas, o que os torna importantes decompositores e degradadores na natureza (Routier, F. H. *et al.*, 2022). Por conta dessa capacidade, os fungos filamentosos são amplamente utilizados para processos sustentáveis de biotransformação (Santos, 2023). Diversos gêneros como *Aspergillus* e *Penicillium*, já foram descritos como eficazes na degradação da cafeína (Zhou *et al.*, 2018) e tem potencial para serem aplicados no CES dos resíduos utilizados neste trabalho.

O *Trichoderma harzianum* é um fungo filamentoso pertencente ao filo Ascomycota, à família *Hypocreaceae* e ao gênero *Trichoderma*. O seu uso comum é relacionado ao controle biológico. Normalmente é encontrado em ambientes úmidos, como florestas, terras agrícolas e pastagens, além de ser encontrado em diversos substratos, incluindo solo e resíduos vegetais em decomposição. Atualmente, é muito usado no controle de pragas em diversos cultivos, sendo aplicado em raízes de tomate, milho, soja, berinjela e abobrinha (Ding *et al.*, 2025; Bader *et al.*, 2020).

Outro representante do filo Ascomycota é o gênero *Penicillium*, de grande importância em vários setores, principalmente de alimentos, na biotecnologia e medicina. Além disso, são produtores de uma grande quantidade de metabólitos secundários, compostos antibacterianos,

antifúngicos e imunossupressores (Araújo,2023). Geralmente são encontrados em habitats com diferentes características, mas normalmente são vistos em maior número em temperaturas acima de 50°C e alta salinização. É um importante causador de mofo pós-colheita principalmente em frutas cítricas, associado a espécie *Penicillium citrinum*. Além disso, é o responsável pela produção do antibiótico Penicilina (Araújo, 2023).

O *Aspergillus awamori* é um fungo também do filo Ascomycota, conhecido como um microrganismo probiótico. É classificado como microrganismo GRAS, que indica que ele é seguro e eficiente para o consumo. Sua ingestão por animais modula enzimas digestivas, melhora a digestibilidade dos nutrientes. Também é responsável pela produção de vários compostos bioativos com propriedades naturais antioxidantes e anti-inflamatórias, como ácido p-cumárico, ácido gálico e ácido ascórbico. Na indústria é usado para produção de ácido cítrico (Abd-Ellatief, *et al.*, 2024)

1.7 Mecanismo enzimático de degradação da cafeína

A molécula de cafeína possui, em sua estrutura, quatro átomos de nitrogênio, dos quais apenas um está disponível para ser utilizado como fonte de nitrogênio no metabolismo fúngico. Os demais átomos de nitrogênio encontram-se ligados a grupamentos metil, o que impede sua utilização direta pelos fungos (FIGURA 8).

Fungos filamentosos são microrganismos capazes de se adaptar a uma ampla diversidade de ambientes, destacando-se por sua elevada capacidade de síntese enzimática, uma vez que são, em sua maioria, organismos decompositores. Em razão disso, ao serem submetidos a cafeína, alguns desses fungos conseguem produzir uma enzima intracelular denominada N-demetilase, dependente de NADPH, que possui a capacidade de quebrar a ligação entre o nitrogênio e o grupo metil, liberando esses grupamentos (Dash & Gummadi, 2006).

Esse processo ocorre de forma sucessiva, resultando na transformação da cafeína em teofilina (1,3-Dimetilxantina), posteriormente em 3-metilxantina e, por fim, em xantina (FIGURA 8), que não apresenta risco ao consumo por animais, pois é metabolizada pela via das purinas, diferente da cafeína (Mock & Summers, 2024).

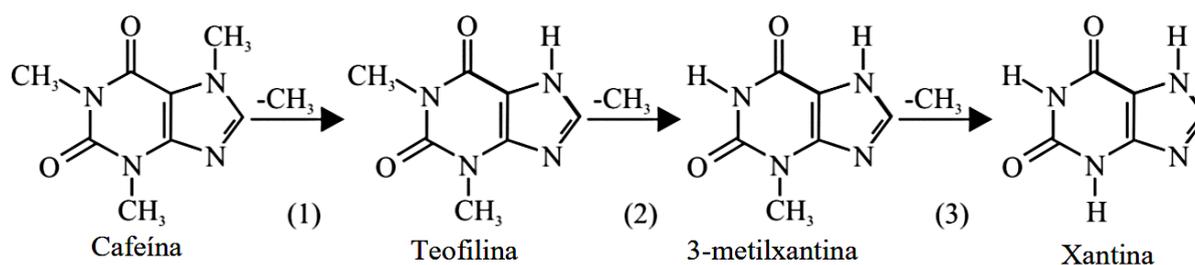


Figura 8: Processo de demetilação da cafeína. (Tagliari *et al.*, 2003 apud Carvalho, 2024)

1.8 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários sintetizados por fungos filamentosos sob determinadas condições de cultivo e armazenamento, geralmente em resposta a estresses ambientais. Esses compostos desempenham papel ecológico como agentes de defesa, inclusive com atividade antibacteriana (Embrapa, 2015).

Na agricultura, os principais gêneros de fungos associados à produção de micotoxinas são *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* (Embrapa, 2015).

O *Aspergillus* spp. é conhecido por produzir as aflatoxinas B1 e B2, que atingem grãos de milho e amendoim e são produzidas principalmente pelas espécies *A. Flavus* e *A. parasiticus*. Essa micotoxina já provocou diversos óbitos por ingestão de grãos contaminados, isso porque esse metabólito é metabolizado pelo fígado, produzindo substâncias reativas que formam interações com guaninas, afetando a síntese proteica da célula e danos macromoleculares (Prestes *et al.*, 2019).

Outro metabólito secundário que afeta grãos são as fumonisinas, produzidas por fungos do gênero *Fusarium* spp. As mais importantes são os tipos FB1 e FB2, pois são as mais encontradas causando toxicidade, sendo a FB1 mais encontrada em alimentos. Ela causa efeitos tóxicos em animais, podendo levá-los a morte. Essa micotoxina está associada a efeitos carcinogênicos relacionados a câncer de esôfago (Prestes *et al.*, 2019).

Dentre as micotoxinas produzidas por espécies do gênero *Penicillium*, destaca-se a citrinina, sintetizada por *Penicillium citrinum*, frequentemente detectada como contaminante em especiarias e alimentos cítricos (Zhang *et al.*, 2021). Esta micotoxina também é muito associada a contaminação em alimentos de origem vegetal e grãos armazenados, como milho, trigo, centeio, arroz, milho, cevada e aveia, além de amêndoas, amendoins, avelãs (Kamle *et*

al., 2022), causando perdas para produtores desses alimentos.

A citrinina é um policetídeo de fórmula molecular $C_{13}H_{14}O_5$, apresentando coloração amarelo-limão em pH 4,6 e vermelho-cereja em pH 9,9. Trata-se de um composto insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos polares, como etanol, metanol e acetonitrila. Apresenta espectro de absorção na região do ultravioleta entre 250 e 321 nm, com variações de acordo com o solvente utilizado (Kamle M. *et al.*, 2022).

Esta micotoxina representa um risco toxicológico relevante à saúde humana e animal, uma vez que possui efeitos nefrotóxicos e genotóxicos comprovados (Kamle M. *et al.*, 2022).

Diante disso, a implementação de protocolos sensíveis e específicos para sua detecção em alimentos é essencial para garantir a segurança alimentar e a saúde dos humanos e animais.

1.9 Outras aplicações dos resíduos de café

Os resíduos gerados ao longo da cadeia produtiva do café apresentam amplo potencial de reaproveitamento em diferentes setores, contribuindo para a redução de impactos ambientais e a promoção de soluções sustentáveis. Dentre as aplicações mais consolidadas, destacam-se as aplicadas nas áreas da agricultura, produção de energia e biotecnologia.

A borra do café, por exemplo, é utilizada na agricultura para o controle de ervas daninhas como *Urochloa decumbens* (Assunção e Andrade, 2024), e auxilia na adubação de milho, melhorando a disponibilidade de potássio (Souza *et al.* 2023). Outro uso é como fonte energética, utilizando a borra de café seca, aumentando seu poder calorífico em caldeiras e gerando energia. Além disso, pode ser usada para produção de biodiesel, extraíndo o seu óleo vegetal e realizando a transesterificação dos triglicerídeos presentes, tornando um combustível mais limpo (Abramovay, 2024). O resíduo em si pode ser usado também para geração de carvão ativado, por possuir uma alta quantidade de carbono e gerar poucas cinzas. Dessa forma, na forma de carvão, possui alta capacidade adsorvente, podendo ser usado para limpeza de efluentes que tenham sido contaminados com compostos tóxicos, promovendo a descontaminação ambiental, como por exemplo a remoção de corantes alimentícios de efluentes, como abordado no trabalho de Abramovay, 2024, onde ele apresentou resultados satisfatórios na remoção do corante utilizando o carvão ativado de borra de caf. Outro teste de aplicação pode ser para tentativa de descontaminação de efluentes com corante sintético azo,

grande contaminante de efluente que é usado pela indústria têxtil e alimentícia (Zafar; Bukhari; Rehman, 2022).

Algumas pesquisas visam hoje em dia utilizar resíduos para produção de biogás, buscando os que apresentam altas concentrações de carbono. Os resíduos como a película prateada, casca e até mesmo a borra de café podem ser usados para produção de biogás, pela alta concentração de estruturas como celulose e hemicelulose na composição, que no processo de fermentação são convertidas em monômeros nas etapas iniciais da produção do biogás (Czekala *et al.*, 2023; Almeida, 2024).

A polpa do café, oriunda do processamento úmido, é utilizada como matéria-prima para o cultivo de fungos de interesse biotecnológico, além de ser explorada na formulação de bebidas refrescantes e alcoólicas (Galanakis, 2017).

Entretanto, a presença de compostos potencialmente tóxicos, como a cafeína e taninos, ainda representa um desafio para ampliação das aplicações desses resíduos. Atualmente suas aplicações se limitam a agricultura e bioenergia (Albarracin, 2025), como para produção de etanol de 2ª geração (Dos Santos *et al.*, 2024).

Na área de alimentos, esses resíduos são usados como aditivos para panificação, como embalagens biodegradáveis, emulsificante ou estabilizantes, ingredientes prebióticos etc. (Souza, 2025)

1.10 Desafios ambientais e economia circular

No ano de 2012 aconteceu o Rio+20 onde representantes de todo mundo debateram sobre estratégias para amenizar os problemas ambientais em todo mundo, até 2030. A busca por alternativas sustentáveis de redução de resíduos tóxicos foi uma das pautas abordadas (MRE, 2022), e em 2023, foi o tema central da COP28 devido à busca pela substituição de combustíveis fósseis (Barker e Saragoça, 2023). Com o crescimento populacional, a demanda por recursos aumentou, levando a elevada industrialização de alimentos e outros recursos. Todas essas indústrias descartam rejeitos do processo de fabricação diariamente, e o acúmulo de resíduos industriais virou um problema, visto que não são descartados corretamente, e frequentemente contaminam rios e solos onde depositados. A Lei N° 12.305 de 2010, regulamentada em 2022 no Brasil, estabelece regras de gerenciamento e descarte de resíduos sólidos, tanto para indústria como para comunidade. No entanto, a lei decretada não impede o

descarte indevido dos resíduos sólidos e rejeitos industriais (IBAMA, 2023).

Portanto, a busca por alternativas de uso desses resíduos aumentou significativamente, levantando a pauta de uma economia circular, baseada no reaproveitamento desses resíduos em diversos setores, como na agropecuária, no setor energético e alimentício, utilizando biotecnologia, na tentativa de diminuir a quantidade deles na natureza e mitigar o impacto ambiental causado. O termo visa três princípios: eliminar o desperdício e a poluição desde o início, manter produtos e materiais em uso e regenerar sistemas naturais (National, G. 2022).

Esses princípios estão alinhados aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) propostos pela Organização das Nações Unidas (ONU), que estabelecem 17 metas voltadas à promoção do desenvolvimento global em diversas áreas prioritárias. Quando adequadamente implementada, a economia circular pode contribuir significativamente para o cumprimento de pelo menos cinco desses objetivos: erradicação da fome e promoção da agricultura sustentável (ODS 2); desenvolvimento de cidades e comunidades sustentáveis (ODS 11); estímulo ao consumo e à produção responsáveis (ODS 12); combate às mudanças climáticas (ODS 13); e preservação da vida aquática (ODS 14).

2 JUSTIFICATIVA

A grande quantidade de subprodutos gerados pela indústria cafeeira representa um dos principais desafios ambientais associados a essa cadeia produtiva. Os resíduos mais comuns da indústria do café (casca, polpa, película prateada e borra de café) são frequentemente descartados de forma inadequada especialmente em corpos d'água, juntos com os efluentes utilizados no processamento úmido do grão. A borra de café, por exemplo, 650kg de borra são gerados para cada tonelada de café produzido, e a maior parte é descartada em aterros sanitários e esgotos após o uso doméstico e em cafeterias. A Película prateada gerada na torrefação é descartada em solos, e são posteriormente levados pela chuva, e estimasse que para cada saca de 60 kg de café produzida, são gerados cerca de 2,5 kg de película prateada. Pensando que a indústria cafeeira é a segunda maior do mundo, e que sua produção anual está na casa dos milhões de toneladas, o volume residual descartado no meio ambiente é extremamente expressivo. Esse descarte irregular provoca sérios impactos ambientais, como a contaminação de rios e lagos, comprometendo a qualidade da água e afetando a fauna e flora aquáticas.

Esse problema se intensifica em virtude da composição química desses resíduos, que apresentam alta concentração de poluentes orgânicos, como taninos, cafeína e polifenóis. Essas substâncias possuem efeitos tóxicos sobre organismos aquáticos, além de contribuir para o aumento da carga orgânica nos ecossistemas, o que pode desencadear processos de eutrofização e redução do oxigênio dissolvido na água.

Diante desse cenário, uma solução sustentável em destaque é o uso da biotecnologia como ferramenta. Considerando o teor significativo de nutrientes nos resíduos do café, é possível utilizá-los como matéria-prima para o cultivo de microrganismos com capacidade adaptativa para degradar ou, ao menos, reduzir substancialmente a carga de poluentes. Os fungos têm demonstrado eficiência na degradação de compostos tóxicos presentes nesses resíduos, transformando-os em produtos de interesse industrial.

Essa estratégia não apenas contribui para a mitigação dos impactos ambientais provocados pelo descarte inadequado, como também possibilita a valorização dos subprodutos do café. Por meio da bioconversão, é possível desenvolver novos produtos com valor agregado, tais como biofertilizantes, ração animal e biocombustíveis. Tal abordagem insere-se no contexto da economia circular e dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), ao promover o reaproveitamento de resíduos e incentivar práticas sustentáveis dentro da cadeia produtiva cafeeira.

Dessa forma, os resíduos da indústria do café, tradicionalmente vistos como passivos ambientais, podem ser ressignificados como recursos estratégicos para a geração de produtos sustentáveis, contribuindo para o equilíbrio ambiental e o desenvolvimento socioeconômico regional.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de fungos filamentosos na eliminação da cafeína dos resíduos da indústria cafeeira, especialmente a borra e película prateada de café, por meio do cultivo em estado sólido.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a detoxificação dos resíduos da indústria cafeeira, como a borra e a película prateada de café, por diferentes espécies de fungos filamentosos: *Aspergillus awamori* IOC3914; *Trichoderma harzianum* IOC4127; *Penicillium citrinum* Ve1.
- Determinar a influência de parâmetros operacionais - umidade e tempo de incubação – sobre a eficiência da detoxificação;
- Avaliar o impacto da CES no teor de proteínas dos resíduos de café e a sua possível produção.
- Verificar a presença de micotoxinas, especialmente citrinina, nas amostras cultivadas com *Penicillium citrinum* Ve1.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparo do pré-inóculo para CES

Os fungos selecionados por um trabalho anterior do grupo (Carvalho, 2024), sendo eles *Aspergillus awamori* IOC 3914 e *Trichoderma harzianum* IOC 4127, além de um *Penicillium citrinum* Ve1 isolado dos resíduos de café. Os fungos foram cultivados em tubos de ensaio com tampa, em meio ágar batata dextrose (BDA), a 30°C. Após 7 dias, o preparo do pré-inóculo foi realizado em Erlenmeyer de 500ml, com 60 ml de meio BDA, em cada um, autoclavados. Os frascos com os fungos selecionados foram incubados em estufa por 7 dias, a 30°C.

4.2 Inóculo para CES

Foi adicionado ao Erlenmeyer com o fungo crescido, 30 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7, 1% de Tween 80 e pérolas de vidro. Em seguida, com uma alça de Drigalski foi realizada a raspagem dos esporos e contagem em câmara de Neubauer, com auxílio de um microscópio óptico (Freire et al., 1997).

4.3 Teste de Inibição em Placa

Para avaliar a tolerância do fungo *Penicillium citrinum* Ve1 a cafeína, foi realizado um teste de inibição em placa de acordo com o protocolo descrito no trabalho de Carvalho, 2024, que consiste no preparo de placas contendo meio BDA com adição de 0g/L; 0,15g/L; 1,5g/L e 15g/L de cafeína. Em seguida, o fungo foi inoculado em triplicata e incubado em estufa a 30°C. Os diâmetros das colônias foram medidos após 72 horas de crescimento.

4.4 Borra de café

A borra de café utilizada foi obtida no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana (LABEM). O resíduo foi submetido à autoclavagem por 30 minutos para fins de esterilização. Em seguida, o material foi distribuído em bandejas e colocado em estufa a 60 °C até a sua umidade atingir, no mínimo, 3%. Após o processo de secagem, a borra de café foi acondicionada em sacos, selados a vácuo e devidamente identificados.

4.5 Cultivo em estado sólido

Para o cultivo em estado sólido (CES), foi utilizada borra de café seca, e película prateada de café, na proporção 75:25. A película prateada serve para evitar a compactação do leito e melhorar a aeração, utilizando o próprio resíduo. O meio de cultivo de resíduo esterilizado recebeu 1×10^7 esporos/g.m.s, a partir da suspensão obtida da maneira citada anteriormente, e adicionado água suficiente para atingir 70% de umidade inicial. Por fim, o leito foi misturado com auxílio de um bastão de vidro, para homogeneizar o conteúdo adicionado. As triplicatas de cada ensaio foram mantidas em câmara climática por até 7 dias, a 30°C, com umidade relativa do ar controlada a 80%.

4.6 Extração da cafeína

Para a extração de cafeína, foi adicionado 20 ml de água destilada em ebulição em 2,0g do resíduo fermentado. A mistura foi mantida em agitação por 5 minutos a 200 rpm em um agitador magnético. Essas amostras foram filtradas em filtro de papel qualitativo (80g/m^2) para remoção dos sólidos grossos. Por último, as amostras passaram por um segundo filtro, de $0,22 \mu\text{m}$, e foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Todas as quantificações foram realizadas utilizando aparelho de CLAE (HPLC - Agilent Technologies 1260 Infinity II, CA, EUA) e coluna C-18 (Agilent ZORBAX Eclipse Plus $4.6 \times 250 \text{mm}$ $5 \mu\text{m}$) a 25°C. As condições cromatográficas estão descritas abaixo:

- Fluxo: 0,4 mL/min
- Detector: Arranjo de Diodos a 273 nm
- Volume de injeção: 5 μL .
- Fase móvel: água acidificada com ácido acético 0,1% e acetonitrila 100% (90:10) (v/v)
- Tempo de corrida: 45 minutos (Vandepoosele et al., 2021).

4.7 Purificação da cafeína

A precipitação de taninos é importante para ter precisão no resultado da quantificação de cafeína. Dessa forma, foram utilizados 5 ml do extrato obtido anteriormente (4.5), e transferidos para um balão volumétrico, para realização de um teste de purificação para verificar o percentual de cafeína retida aos taninos, e a sua interferência na quantificação. Ao

balão foi adicionado 166 µl de acetato de chumbo 570g/L. Depois, a solução foi avolumada com água destilada até completar 10 ml. A solução é mantida por 15 minutos decantando, e depois filtrada em filtro de papel. Essa etapa foi realizada somente para os fungos que apresentaram degradação significativa da cafeína (Carvalho, 2024).

4.8 Cinética de degradação

Visando avaliar a cinética de degradação da cafeína no resíduo utilizado, foi realizado, com o fungo que apresentou melhor desempenho na etapa de degradação, o experimento de cultivo sólido descrito no tópico (4.4). Deste modo, cultivo e as condições são as mesmas já citadas anteriormente. As triplicatas foram mantidas em câmara climática, e cada uma foi retirada de acordo com o tempo estabelecido, durante 7 dias, a 30° C. Ao fim, essas amostras passaram pela análise de concentração de cafeína e umidade de cada amostra.

4.9 Detecção de Citrinina

Alguns fungos selecionados para teste de degradação são descritos como produtores de micotoxinas na literatura, sendo necessário implementar um ensaio de detecção de micotoxinas. Dos selecionados, o que produz uma micotoxina é o *Penicillium citrinum*, podendo interferir no metabolismo dos animais. Portanto, é necessário realizar a extração da citrinina, liberada por esse fungo, de acordo com o protocolo de Sadhasivam (2021), adaptado para resíduos de café. Logo, em um tubo tipo falcon, pesa-se 0,5 g de resíduo fermentado, e adiciona-se 2 mL de metanol. A mistura foi agitada em vórtex por 5 minutos, e posteriormente submetida a um agitador orbital a 250 rpm por 30 minutos. Ao fim desse período, uma alíquota dessa amostra foi transferida para microtubos de 2 ml e centrifugadas a 6.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de 0,22 µm, transferido para um frasco de injeção de vidro e armazenado a -20 °C até a análise por CLAE, nas condições descritas por Hackbart (2009). A citrinina é uma micotoxina que apresenta solubilidade em metanol e por isso é utilizado idealmente para extração desse composto. Além disso, ela absorve comprimentos de onda de 254 nm a 330 nm, o que permite sua leitura por um detector de arranjo de diodos. A quantificação foi realizada utilizando aparelho CLAE (HPLC - Agilent Technologies 1260 Infinity II, CA, EUA) e coluna C-18 (Agilent ZORBAX Eclipse Plus 4,6x250mm 5 µm) a 25°C. As condições cromatográficas estão descritas abaixo:

- Fluxo: 1 mL/min
- Detector: Arranjo de Diodos a 254 nm
- Volume de injeção: 20 µL.
- Fase móvel: água purificada acidificada com ácido fosfórico pH 3 e acetonitrila 100% (50:50) (v/v)
- Tempo de corrida: 20 minutos (Hackbart, 2009).

4.10 Teste de indução de citrinina

Na tentativa de obter uma amostra que contenha citrinina, e para confirmar se o fungo consegue produzir a micotoxina, foi realizado um ensaio de indução de citrinina com o *Penicillium citrinum* Ve1. O ensaio foi conduzido de acordo com Gu e colaboradores (2021) adaptado. Inicialmente foi preparado 50 mL de meio líquido com 40 g/L de levedura e 160 g/L de sacarose. O meio foi autoclavado e em seguida foi inoculado o fungo. As amostras foram mantidas em agitador orbital a 150 rpm, 30°C por 6 dias. Para extração, a amostra foi filtrada e em seguida foi avolumada com metanol até o volume inicial do meio. Posteriormente, a amostra foi agitada por 20 minutos, seguida de centrifugação 10 000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi separado e filtrado de papel. Para análise por CLAE foi usado o método de Zheng *et al.*, 2009.

4.11 Medição de pH

Para determinação do pH, foram pesados 0,5 g do material cultivado e adicionados 5 mL de água destilada, e misturado vigorosamente. Após 10 minutos, os tubos falcon são centrifugados por 5 minutos a 3.400 G. Por fim, foi realizada a medida do pH do sobrenadante em pHmetro. Para cada amostra foi feita uma duplicata (Amorim, G. *et al.*, 2016).

4.12 Medida de umidade

O teor de umidade do resíduo cultivado foi medido usando as amostras após CES, retirando 1g de amostra com auxílio de uma espátula, para análise em balança de umidade (Ohaus MP25), a 105°C.

4.13 Quantificação do crescimento celular

Tendo em vista que não é possível medir diretamente o crescimento do fungo é feita a medição de concentração de N-acetilglucosamina, monômero da parede de quitina. Para isso, primeiramente, é pesado 0,5g de amostra cultivada e adicionado 5 mL de HCl 6N, deixando em banho de água fervente por 120 minutos. Após esse tempo, a amostra foi resfriada e filtrada em filtro de papel, e 2 mL do filtrado foram transferidos para um balão volumétrico de 10 ml, adicionando-se 20 µl de solução alcoólica de fenolftaleína 0,5% (m/v). São adicionados a essa solução NaOH 6 N, para neutralização, até que a coloração fique de tonalidade rosa. Posteriormente, foi realizada a titulação reversa com KHSO₄ 1%, até a coloração voltar à cor original. O volume do balão volumétrico foi completado com água destilada. Após esta etapa, foi adicionado 1 ml de solução de acetilacetona em Na₂CO₃ 0,5 N (1:50) à 1 mL da solução, colocando a mistura em banho de água fervente por 20 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 6 ml de etanol e, em seguida, 1 ml de reagente de Erlich. Os tubos foram então incubados a 65°C por 10 minutos e a absorbância lida a 530 nm contra um branco, no qual foi adicionada água destilada ao invés de amostra (Aidoo, Henry e Wood, 1981).

4.14 Quantificação de proteínas

A extração proteica foi realizada adicionando 5 mL de tampão fosfato 0,1M pH 7, para cada 1g de material cultivado. O processo de extração foi conduzido em um agitador rotatório a 35°C e 200 rpm por 20 minutos. Posteriormente, foi transferido 2 mL do extrato para tubos, e centrifugado a 11000 g, 4°C por 15 minutos. Em seguida, foi realizada uma diluição de 1:100, em tampão fosfato 0,1M pH 7. Para quantificar, foi utilizado o Qubit Protein Assay kit (Invitrogen, Oregon, EUA), que permite dosar a proteína por meio de fluorímetros, que identificam a molécula alvo após serem corados com corantes fluorescentes, permitindo sua detecção por fluorescência.

5 RESULTADOS

5.1 Teste de inibição em placa

O teste de inibição é essencial para avaliar se o fungo conseguirá se desenvolver e manter sua viabilidade no sólido de resíduos de café. Como a matéria-prima tem uma quantidade considerável de cafeína, o teste foi realizado com diferentes concentrações de cafeína, e através do diâmetro de colônia foi avaliado seu nível de tolerância.

TABELA 2: Resultado do teste de inibição das amostras de 72 horas de cultivo em BDA com *P. Citrinum* Ve1. E comparação com os resultados da literatura. N=3

Fungos filamentosos	Concentração de cafeína (g/L)	Inibição média (%)
<i>Penicillium citrinum</i> Ve1	0,15g/L	-14,0%
	1,5g/L	0,0%
	15g/L	36,8%
<i>Aspergillus awamori</i> IOC3914*	0,15g/L	9,35%
	1,5g/L	70,50%
	15g/L	73,38%
<i>Trichoderma harzianum</i> IOC4127*	0,15g/L	0%
	1,5g/L	57,62%
	15g/L	79%

* Fungos testados no trabalho de Carvalho, 2024.

Na TABELA 2 é possível observar que até 1,5g/L de cafeína não ocorre a inibição do fungo *Penicillium citrinum* Ve1, apresentando total tolerância ao composto. Quando a quantidade de cafeína é aumentada para 15g/L, ocorre um aumento no percentual de inibição, mas não tão expressivo, e talvez, em um tempo mais longo de cultivo, o fungo conseguiria crescer normalmente.

Comparando com os resultados dos fungos testados no Trabalho de Carvalho (2024), os fungos *Aspergillus awamori* IOC3914 e *Trichoderma harzianum* IOC4127, que no trabalho apresentou o menor percentual de inibição, com 70% em 15 g/L, foi inferior ao do *Penicillium citrinum* Ve1 testado neste trabalho, que o maior percentual de inibição foi 36,8%.

5.2 Quantificação da Cafeína

A partir dos resultados do teste de inibição obtidos neste trabalho, e no de Carvalho, 2024, foi realizada a CES com os três fungos selecionados. A quantificação da cafeína dos extratos obtidos do cultivo em estado sólido foram realizados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. O gráfico a seguir (FIGURA 9) apresenta os valores de cafeína obtidos após 7 dias de fermentação utilizando mistura de 75:25 de borra de café: película prateada de café para cada uma das espécies de fungos testadas.

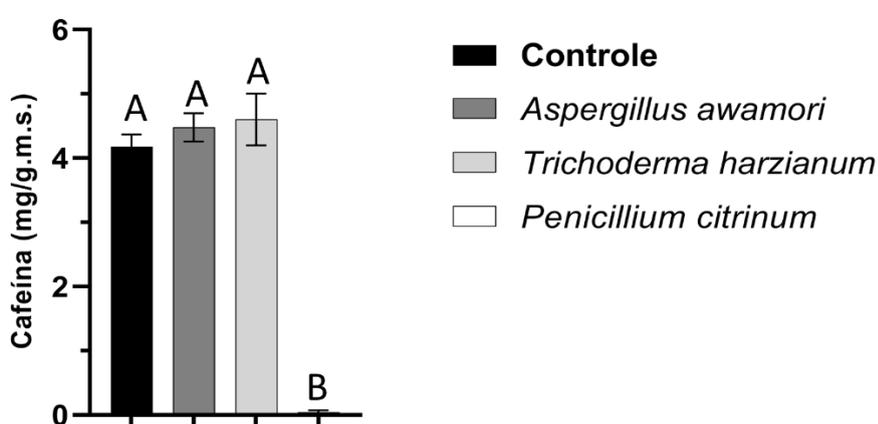


Figura 9: Quantificação da cafeína dos extratos da CES com *Aspergillus awamori* IOC 3914, *Trichoderma harzianum* IOC 4127 e *Penicillium citrinum* Ve1, por sete dias, em mistura de borra: película prateada 75:25, e amostra Controle inoculado. Colunas com a mesma letra são iguais pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). N=3

Os fungos *Aspergillus awamori* IOC 3914 e *Trichoderma harzianum* IOC 4127 mantiveram valores de cafeína próximos do controle, indicando que ambos não apresentaram capacidade de degradar a cafeína nas condições do cultivo as quais foram submetidas.

O fungo *Penicillium citrinum* Ve1, por sua vez, apresentou baixa quantidade de cafeína em relação ao controle, indicando um percentual de degradação de mais de 98%, no cultivo sólido com resíduos de café.

5.3 Purificação da Cafeína

Após os resultados alcançados com o fungo *Penicillium citrinum* Ve1, foi realizada uma etapa adicional de purificação do extrato de cafeína para analisar a possível interferência dos taninos na quantificação anterior, já que esse composto forma complexos com a cafeína e prejudicar sua extração e detecção.

TABELA 3: Resultado da purificação do extrato de cafeína após a CES com *P. citrinum*, em 7 dias de cultivo. Linhas com a mesma letra são iguais pelo teste de *Tukey* ($P < 0,05$). N=3

Amostra	Cafeína (mg/g.m.s)	Desvio Padrão	Degradação (%)
Controle	4,29 ^a	–	–
Não purificado	0,05 ^b	0,05	98,66
Purificado	0,09 ^b	0,04	97,79

Segundo a TABELA 3, o percentual de degradação do extrato purificado e do não purificado não apresentaram diferenças estatísticas consideráveis, concluindo que o teor de taninos presentes nos resíduos não é suficiente para interferir na quantificação da cafeína do leite após a CES ou que a cafeína associada aos taninos também é degradada.

5.4 Cinética de Degradação da Cafeína

Com a confirmação de que o fungo *Penicillium citrinum* Ve1 é capaz de degradar a cafeína de forma eficiente, realizou-se uma cinética de degradação visando determinar o tempo necessário para a detoxificação dos resíduos de café e, assim, estabelecer um período adequado de tratamento (FIGURA 10).

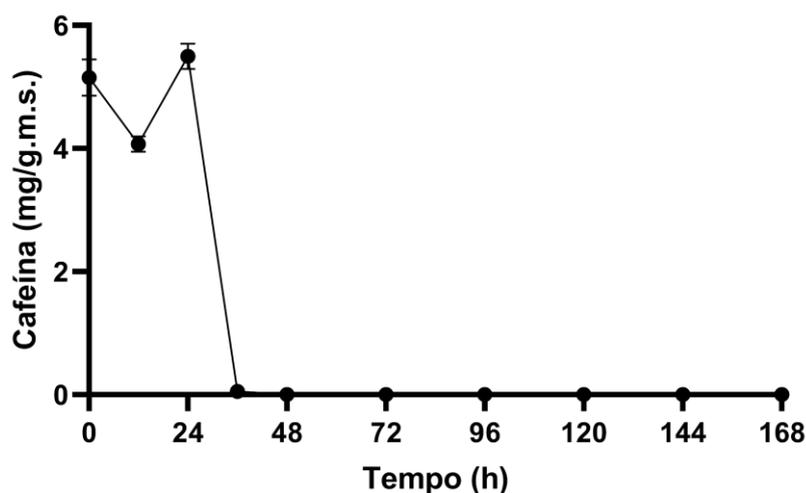


Figura 10: Quantificação da cafeína dos extratos da CES com borra e película prateada de café (75:25) com *Penicillium citrinum* VE1, a cada 24 horas por sete dias, por CLAE. N=3.

Embora o fungo não tenha apresentado degradação nas primeiras 24 horas, é possível

observar que, em 36 horas de cultivo, o fungo foi capaz de degradar 98% da cafeína presente nos resíduos, realizando uma rápida detoxificação, descartando a necessidade de um longo período de tratamento. Em 48 horas a quantidade de cafeína é ainda mais reduzida, indo para abaixo de 0,05 mg/g.m.s. configurando uma degradação de 99,11% (FIGURA 10). A partir deste ensaio ficou estabelecido o tempo de tratamento de 36 horas.

5.5 Detecção de Citrinina

Alguns gêneros fúngicos são conhecidos por produzir micotoxinas na tentativa de se defender de outros microrganismos ou em situações de estresse. *Penicillium citrinum* enquadra-se nesse grupo, o que torna essencial a adoção de um protocolo de detecção para evitar essas substâncias em um produto que será usado como alimento. Dessa forma, o protocolo buscava detectar a micotoxina citrinina produzida por esta espécie fúngica, explorando a sua solubilidade em metanol. A análise do extrato foi feita por CLAE, com um detector de arranjo de diodos, e os resultados constam na FIGURA 11.

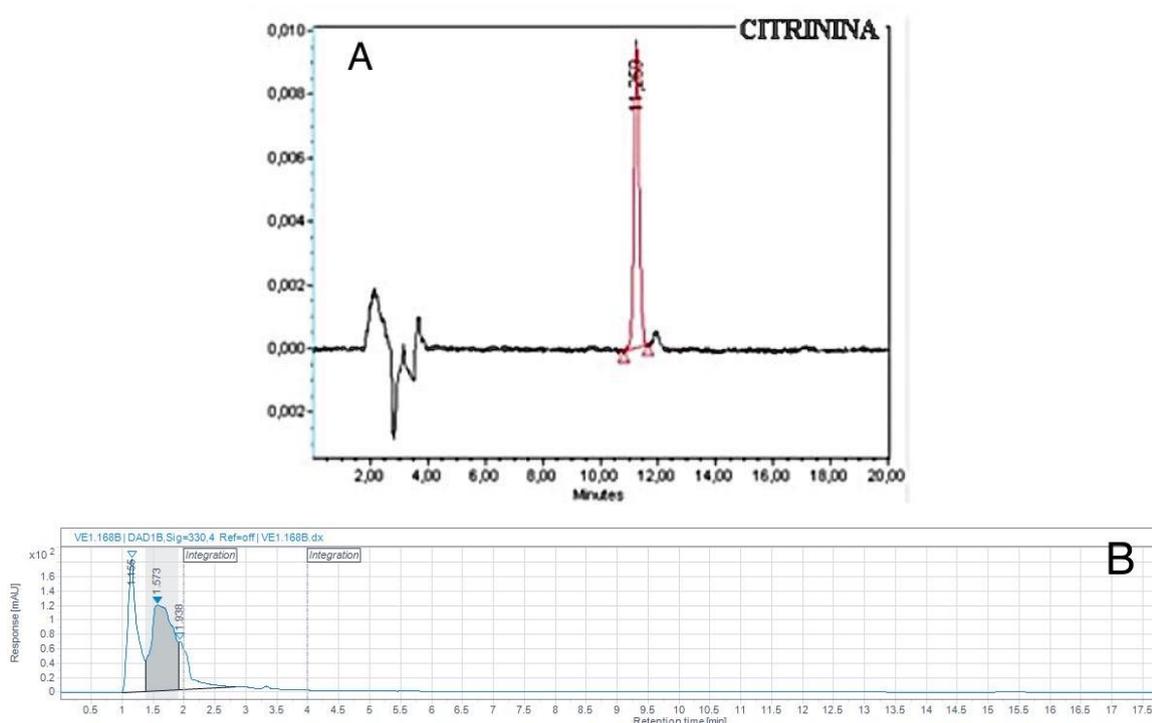


Figura 11: (A) Cromatograma da citrinina em CLAE (Hackbart, 2009). (B) Cromatograma do cultivado de 7 dias com *Penicillium citrinum* Ve1, a 330 nm.

No cromatograma de referência da metodologia aplicada para detecção (FIGURA 11 A), pode-se observar que o tempo de retenção da citrinina encontra-se em aproximadamente 11,25

minutos. Comparando com o cromatograma gerado neste trabalho (FIGURA 11 B), não foi observada nenhuma detecção após os 4 minutos de corrida, mostrando que não foi possível detectar a citrinina presente no resíduo.

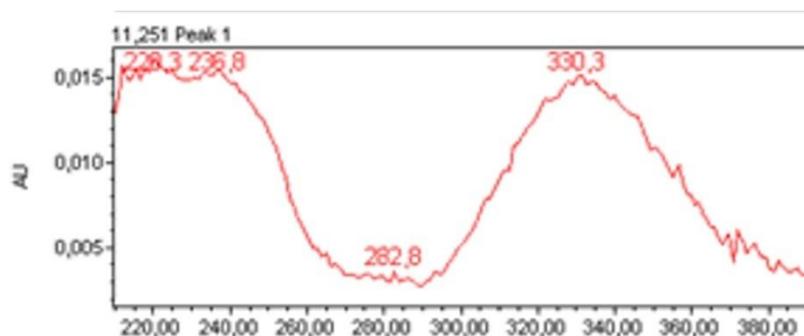


Figura 12: Espectro de absorção da citrinina em CLAE a 330nm (Hackbart, 2009)

Na FIGURA 12, é possível observar o espectro do comprimento de onda da citrinina. Segundo Hackbart, 2009, a citrinina absorve nos comprimentos de onda de 254 nm a 330 nm. No espectro de referência podemos observar o pico no comprimento de onda a 330nm, no entanto, na análise realizada em uma amostra de sete dias de CES com *P. citrinum* nos resíduos de café, não foi possível gerar espectro de absorção, pois não apresentou pico em nenhum dos comprimentos de onda sugeridos, indicando a não detecção, ou ausência da citrinina nos fermentados. Da mesma forma, não foi obtido pico no cromatograma e espectro de absorção para as amostras do teste de indução de citrinina (4.10), impossibilitando a confirmação da produção da micotoxina pelo fungo usado no trabalho.

5.6 Crescimento Fúngico e Proteínas solúveis

A partir dessa cinética de degradação foram analisados diferentes parâmetros do cultivo, sendo um deles a quantidade de proteínas solúveis ao longo do cultivo. Em paralelo, o crescimento celular foi medido de maneira indireta através do componente presente na estrutura fúngica chamada N-acetilglucosamina. Os parâmetros foram analisados no mesmo gráfico como mostrado na FIGURA 13.

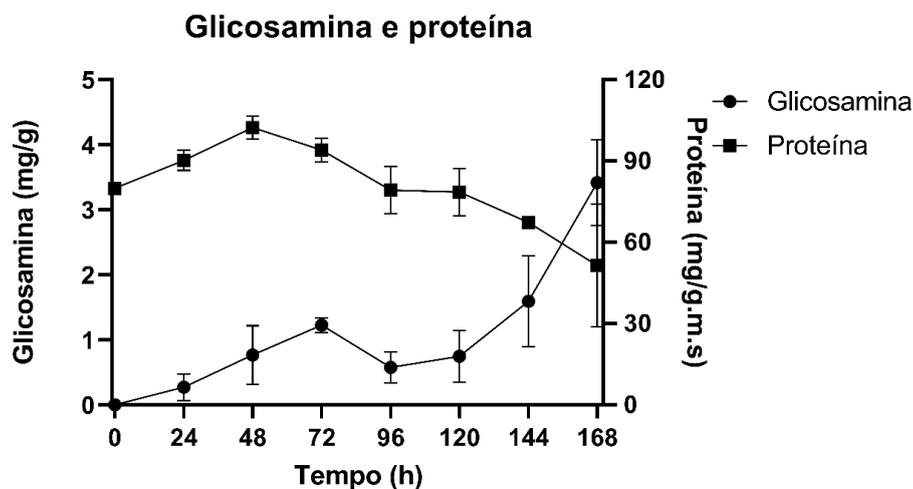


Figura 13: Quantificação de glicosamina em mg/g, e proteínas solúveis em mg/g.m.s, ao longo de CES com borra e película prateada de café (75:25) por sete dias com *Penicillium citrinum* Ve1. N=3

Houve um aumento na quantidade de proteínas solúveis em 48 horas de cultivo, que diminui gradativamente conforme o cultivo é mantido, o que desfavorece o possível incremento proteico do resíduo.

Com relação a glicosamina, o aumento da massa fúngica só é observado após 48 horas, quando toda a cafeína já não está presente no resíduo. Observa-se também que, o aumento de massa fúngica está relacionada à diminuição da quantidade de proteínas em 144 horas de cultivo, mostrando um possível uso dessa proteína pelo fungo como estratégia de sobrevivência.

Cabe destacar que o crescimento do fungo e degradação ocorrem somente após a degradação de cafeína, conforma demonstrado na FIGURA 10, indicando influência da cafeína no crescimento fúngico. (Colocar a parte do consumo da proteína)

5.7 Avaliação do pH ao longo do cultivo

O pH é uma variável importante em processos fermentativos, pois influencia diretamente no desempenho das enzimas, que possuem um pH ótimo de atuação, e atuam como protagonistas do processo de detoxificação.

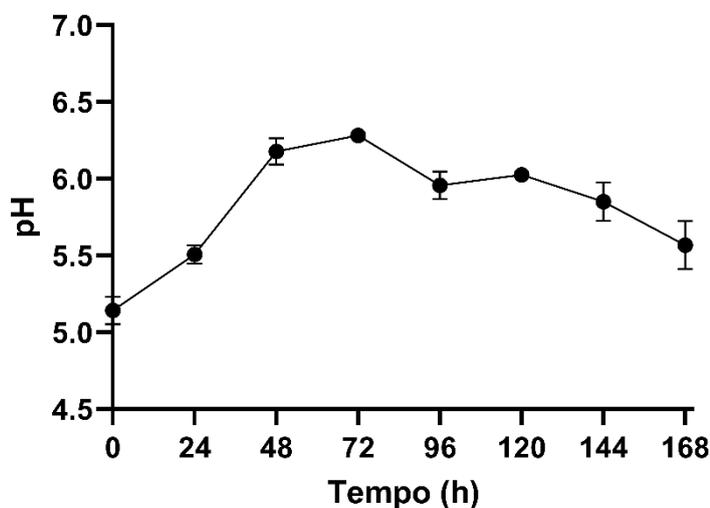


Figura 14: Perfil de pH ao longo de sete dias de CES com borra e película prateada de café (75:25) com *Penicillium citrinum* Ve1. N=2

Na FIGURA 14 é possível observar que o pH não varia de forma considerável ao longo do cultivo, ficando entre 5 e 6,5, sinalizando que não ocorreu a produção de substâncias que pudessem alcalinizar ou acidificar o meio e prejudicar reações essenciais para o tratamento ou limitar o metabolismo do próprio fungo filamentoso, como pode ocorrer em alguns processos fermentativos pelos próprios microrganismos.

5.8 Efeito da umidade na degradação da cafeína

A água é essencial para o metabolismo do microrganismo no cultivo em estado sólido, afetando diretamente o seu desempenho, por também interferir na atividade enzimática. Logo, para analisar o desempenho do fungo a menores quantidades de água, foi realizado uma nova cinética de degradação, em três umidades diferentes, que foram 55%, 60% e 65% e comparado com o cultivo anterior em 70% de umidade.

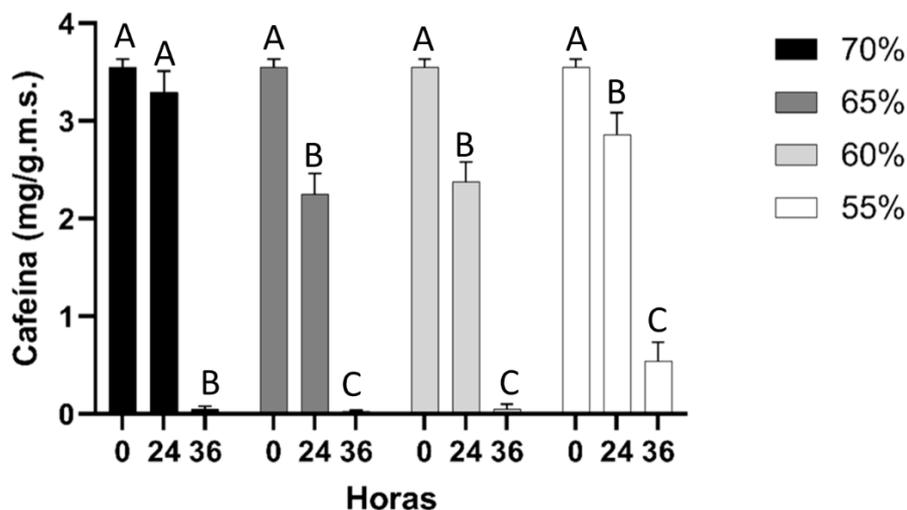


Figura 15: Influência da umidade no processo de degradação da cafeína em cultivo sólido com borra de café e película prateada (75:25) de café utilizando *Penicillium citrinum* Ve1. Colunas com a mesma letra são iguais pelo teste *Tukey* ($P < 0,05$). O teste foi realizado individualmente para cada umidade. $N=3$

Na FIGURA 15 é possível observar que a eficiência da degradação da cafeína não está só em 70%, que é a condição inicial de cultivo, mas se estende até a umidade 60%, ampliando a faixa de atividade ótima e possibilitando o uso de uma menor quantidade de água. Já em 55% de umidade não ocorreu uma boa degradação, quando comparado com o resultado das outras umidades. Ainda assim, a quantidade de cafeína ficou abaixo de 1 mg/g.m.s. Do ponto de vista econômico, a menor umidade economiza água estéril e diminui a massa total de fermentado, reduzindo o custo de transporte ou de posterior secagem.

5.9 Efeito da umidade no crescimento fúngico

O crescimento fúngico é importante para realização das reações de transformação dos componentes do resíduo e enriquecimento proteico. Por conta disso, foi realizada a avaliação do crescimento celular do ponto de 36 horas, melhor tempo encontrado para degradação de 98% de cafeína, e entender a influência da umidade no aumento da biomassa fúngica.

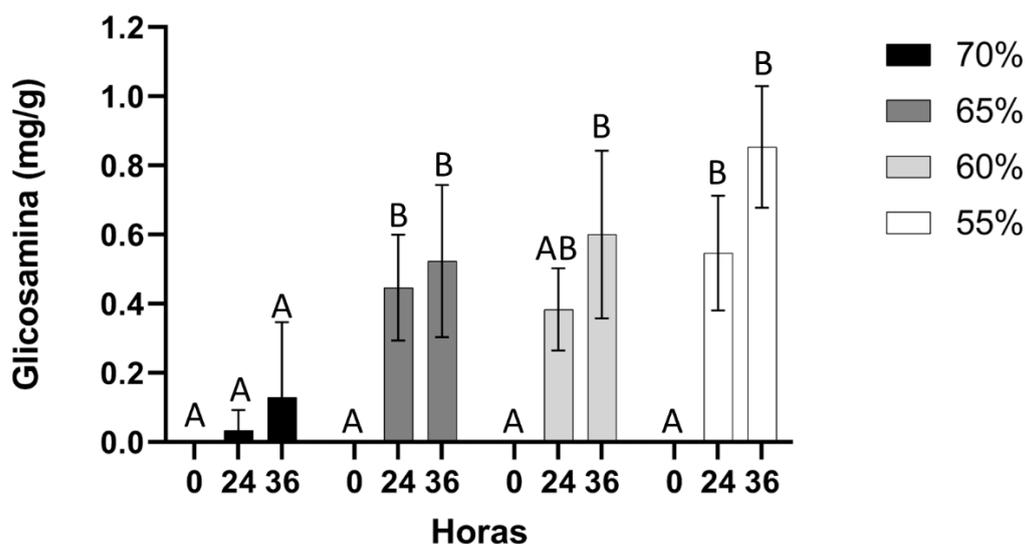


Figura 16: Teor de glicosamina dos cultivos de até trinta e seis horas (36h) do cultivo sólido com *Penicillium citrinum* Ve1 em diferentes umidades. Colunas com a mesma letra são iguais pelo teste *Tukey* ($P < 0,05$). O teste foi realizado individualmente para cada umidade $N=3$.

Observa-se uma diferença no cultivo de 24 horas da amostra de 70% para as outras três umidades testadas (FIGURA 16), que apresentaram melhor crescimento celular em menor quantidade de água. O mesmo aplica-se para as amostras de 36 horas, onde em 55% umidade obteve-se uma maior biomassa fúngica. Comparando com a FIGURA 15, a maior quantidade das células fúngicas não tem ligação direta com a degradação da cafeína, já que o cultivo em 55% umidade apresentou o menor percentual de degradação da cafeína.

5.10 Avaliação do pH em diferentes condições de umidade

A quantidade de água no cultivo pode influenciar outras variáveis importantes para o metabolismo fúngico como o pH. Por conta disso, a dosagem do pH foi feita para cada cultivo em diferentes umidades e os resultados estão expressos no gráfico a seguir (FIGURA 17).

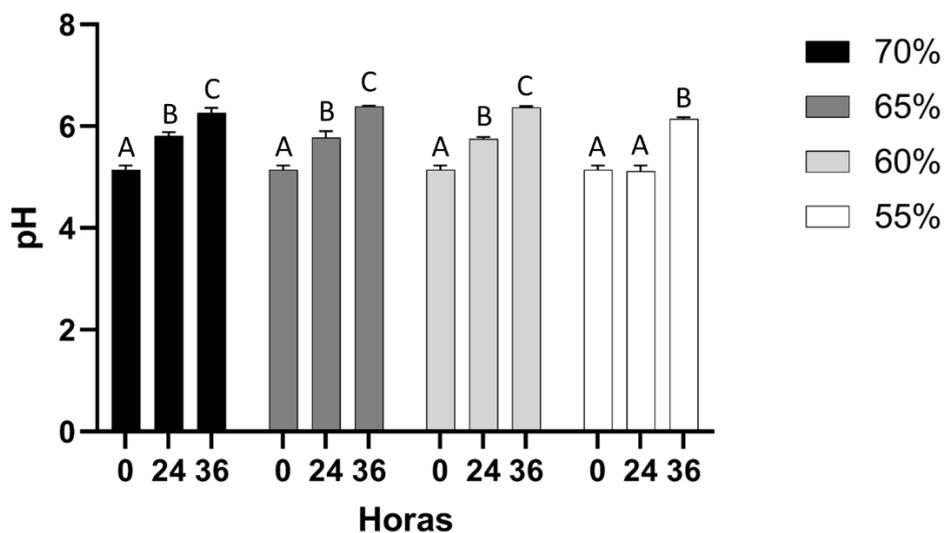


Figura 17: Interferência da umidade no pH do meio de cultivo sólido com *Penicillium citrinum* Ve1, até 36 horas. Colunas com a mesma letra são iguais pelo teste *Tukey* ($P < 0,05$). O teste foi realizado individualmente para cada umidade. N=3

É possível observar que o pH não é afetado pela mudança de umidade da CES, sem mudança significativa, mantendo-se entre 5.0 e 6.5. A solidez deste parâmetro diante das variações indica que as enzimas importantes para o processo não sofrem variação na sua atividade.

6 DISCUSSÃO

A cafeína é um composto cujo limiar de toxicidade varia de acordo com o organismo ao qual é administrado. O ensaio de seleção de fungos tem como objetivo analisar essa toxicidade em fungos filamentosos, considerando que a cafeína tende a inibir tanto o crescimento quanto o metabolismo fúngico, processos essenciais para a produção de enzimas e para a própria eliminação do composto (Chalfoun et al., 2007).

Conforme apresentado no FIGURA 9, os fungos *Aspergillus awamori* IOC 3914 e *Trichoderma harzianum* IOC 4127 não possuem capacidade de degradar a cafeína presente no resíduo. O resultado está de acordo com o trabalho de Carvalho, et al., 2024, em que é relatado a inibição de mais de 70% dos fungos *A. awamori* IOC 3914 e *T. harzianum* IOC 4127 em um meio com diferentes concentrações de cafeína, relatando a baixa tolerância dessas cepas e um mau crescimento em resíduos de café. Com isso, o efeito inibitório da cafeína permanece ao longo de todo o cultivo, impedindo o aumento da biomassa fúngica (TABELA 2). Por outro lado, o fungo *Penicillium citrinum* Ve1 apresentou alta tolerância ao composto nos testes realizados em placa em 72 h, com diferentes quantidades de cafeína, mostrados na TABELA 2. O inóculo adicionado no ponto inicial (tempo zero) do cultivo demonstrou capacidade de degradar a cafeína do resíduo, eliminando o agente inibidor (cafeína) e permitindo o crescimento ao longo do processo.

A elevada capacidade do fungo *Penicillium citrinum* Ve1 em degradar totalmente a cafeína em apenas 36 horas, conforme observado no ensaio de cinética de degradação (FIGURA 10), pode estar associada a uma provável produção de N-demetilases. São descritas duas vias de degradação de cafeína por microrganismos: a N-demetilação e a oxidação do carbono 8 (Mock e Summers, 2024). No caso dos fungos filamentosos, é descrita como a principal via a N-demetilação, que ocorre com a transformação da cafeína em teofilina, e posteriormente em xantina, conduzida pelas N-demetilases. Por serem enzimas intracelulares, sua dosagem é complexa, necessitando de cofatores $\text{NADH}^+/\text{NADPH}$ e mecanismos de lise celular (Peña-Lucio, et al., 2020; Dash e Gummadi, 2006). Por conta do conhecimento de ambas as vias e a dificuldade da dosagem da enzima e de compostos intermediários da reação, a rota de degradação da cafeína é interpretada de forma hipotética na literatura (Mock e Summers, 2024). No gráfico de glicosamina, observa-se que em 36 horas não houve aumento da biomassa fúngica, com valores celulares bastante reduzidos, o que confirma a hipótese de que a degradação ocorre

predominantemente pelo inóculo inicial de 1×10^7 esporos/g.m.s. O mesmo valor baixo de massa fúngica é observado para os cultivos com variação de umidade (FIGURA 16), onde em 36 horas de tratamento não possui uma grande quantidade de biomassa fúngica, sem diferença expressiva entre as umidades, e ainda assim, manteve-se a eficiência da degradação.

Na literatura, os taninos são descritos como compostos que apresentam afinidade pela cafeína, com tendência à formação de complexos estabilizados por interações hidrofóbicas (Ribeiro, Coelho & Barreto, 2012), além de uma possível ligação de hidrogênio entre o átomo de nitrogênio não metilado do anel imidazol da cafeína e o grupo hidroxila dos taninos (Ribeiro, Coelho & Barreto, 2012). Em razão dessa característica, e considerando a presença de taninos nos resíduos de café, levantou-se a hipótese de que parte da cafeína poderia permanecer retida nesses compostos mesmo após a fermentação, o que justificou a realização do ensaio de purificação. Ao tratar o extrato fermentado com acetato de chumbo, os íons Pb^{2+} ligam-se aos polifenóis presentes nos taninos, que, como descrito anteriormente (Seção 1.2.2), apresentam afinidade para formar complexos também com íons metálicos. O complexo Pb^{2+} -tanino resultante é insolúvel e precipita, liberando a cafeína para a fase aquosa, permitindo quantificar o percentual do composto anteriormente retido (Gonçalves *et al.*, 2021). Como demonstrado na TABELA 3, o percentual de cafeína complexado aos taninos foi pouco expressivo, não apresentando diferença significativa em relação ao extrato não precipitado. Outra hipótese é que durante o cultivo com *P. Citrinum*, a cafeína complexada também é degradada, mantendo valores de degradação superiores a 97%.

Com relação à dosagem de proteínas, a rápida degradação da cafeína em 36 horas explica o aumento posterior de proteínas solúveis (FIGURA 13). Bonilla *et al.* (2022) discutem que a produção eficiente de proteínas em cultivos fúngicos está associada à disponibilidade de nitrogênio e carboidratos no meio. A degradação da cafeína por demetilação libera os nitrogênios presentes na molécula, aumentando sua disponibilidade no meio e favorecendo a síntese proteica. Além disso, os carboidratos presentes no resíduo, somados aos carbonos derivados da metabolização da cafeína, atuam conjuntamente não apenas na síntese de proteínas, mas também no incremento da biomassa fúngica durante o cultivo como visto no gráfico de dosagem de glicosamina (FIGURA 13), onde a mesma só aumenta a partir de 72 horas de cultivo, após 100% da cafeína ser degradada dos resíduos.

Analisando o gráfico de proteínas (FIGURA 13), observa-se que ocorreu um aumento de proteínas solúveis no meio para fornecer um enriquecimento. No entanto, é importante avaliar a

composição das proteínas presentes nos resíduos antes e após a CES quanto ao seu conjunto de aminoácidos. Segundo Lago, Antoniassi e Freitas, 2001, resíduos de café como a borra, por exemplo, os aminoácidos mais comuns são ácidos glutâmicos e leucinas, mas ainda com um teor bem inferior ao grão que o deu origem. Para a película preteada, os aminoácidos predominantes de forma livre são ácido aspártico, arginina e ácido glutâmico (Machado *et al.*, 2020). Durante a fermentação esses aminoácidos podem ser utilizados pelo fungo, mas também pode ocorrer a síntese de novos aminoácidos, dessa forma alterando a qualidade da proteína do resíduo. Segundo a literatura, o *Penicillium citrinum* em fermentação com diferentes resíduos agrícolas costuma produzir de forma predominante os aminoácidos ácido aspártico, ácido glutâmico e alanina, que são aminoácidos não essenciais que desempenham diferentes funções no organismo (Ahmed *et al.*, 2025).

Um dos fatores que influenciam na eficácia do método de cultivo sólido é a umidade. Ao mesmo tempo, variações de umidade em CES são complexas visto que afeta diretamente a difusão de nutrientes, e a dispersão do fungo por toda a superfície e interior do resíduo (Teles e Hickert, 2025). Como o método já é ausente de água livre circulante, a diminuição da quantidade de água inicial pode afetar diretamente a detoxificação dos resíduos pela falta alcance de distribuição dos nutrientes necessários para o fungo realizar os processos químicos (Battestin *et al.*, 2004). Ainda assim, o *P. citrinum* apresentou uma degradação eficiente em condições reduzidas de umidade como 65%, 60% e 55%, com menos de 1 mg/g.m.s em apenas 36 horas de cultivo (FIGURA 15). Esse resultado indica que a faixa ótima para eficiência da degradação é ampla, com pouca diferença na quantidade, e é possível adaptar para o de menor custo.

O mesmo ocorre com relação ao pH. Nas primeiras condições de cultivo (FIGURA 14), o pH apresentou pouca variação ao longo do tratamento, permanecendo entre 5 e 6,5. O aumento ocorre somente até 72 horas de cultivo. O aumento do pH nos momentos iniciais da fermentação pode ter relação com a assimilação de ácidos orgânicos presentes nos resíduos industriais como a borra de café, reduzindo a acidez do meio (Maran, 2025; Perwez e Asheh, 2024). Ácidos como cítrico, málico, quínico, além de ácidos clorogênicos estão presentes em resíduos de borra de café, e podem ser consumidos como fonte de carbono durante o cultivo pelos fungos (Vargas-Sánchez *et al.*, 2023; Pyrzyńska, 2025). Além disso, compostos presentes no café com grupamentos amina e amida que sejam assimilados, até mesmo a cafeína, que possui ambos os grupamentos, pode provocar a alcalinização do meio de cultivo ao ser degradada (Perwez e Asheh, 2024). No entanto, essa variação não é alta como mostrado no gráfico (FIGURA 14), já

que a quantidade desses componentes não é expressiva, e após a metabolização desses componentes, o pH volta para faixa de 5,0 – 5,5. Como esse fator é importante para atividade enzimática do cultivo, é necessário avaliar se essa estabilidade permanece com mudança de valor de outras variáveis como a umidade. No GRÁFICO 17 observa-se uma baixa variação de pH entre os cultivos das umidades 70%, 65%, 60% e 55%, com o valor ficando novamente entre 5 e 6,5, mostrando que independente da umidade, a eficiência da degradação e a estabilidade do pH não são drasticamente afetados. Esse resultado é promissor pois mostra que dificilmente fatores externos que possam de alguma forma afetar as condições de tratamento vão ter efeitos significativos na eficiência da degradação. Ademais, mostra que essas variações de umidade não favoreceram a produção de metabólitos que inibem o crescimento do fungo e sua atividade, variando para pH mais ácido ou acima de 8, que desfavorece a atividade enzimática por *Penicillium citrinum*, que atua em faixas de pH entre 4,5 e 6,5 (Pimentel, 2014).

Ao mesmo tempo, variações de condições do cultivo também podem acarretar na produção de metabólitos indesejados. Para o *Penicillium citrinum*, é a produção indesejada de citrinina, que podem ocorrer em condições de estresse por fatores do ambiente ao qual ele é depositado. No trabalho de Silva, *et al.*, 2020, é relatado que as condições ótimas de produção de citrinina em grãos é em 30°C, pH abaixo de 5,5 e umidades altas na faixa de 70 a 80%. No mesmo trabalho, e no experimento de Orozco e Kilikian, 2008, foi visto que a diminuição da umidade e aumento do pH diminuíram a concentração de citrinina no meio ou não ocorreu a produção.

Analisando estes parâmetros, e vendo a similaridade das condições citadas com as do cultivo sólido para tratamento dos resíduos de café, o ensaio de detecção de citrinina foi aplicado. Como é possível analisar no cromatograma A (FIGURA 10), a citrinina quando presente tem um tempo de retenção em 11,25 minutos, o que não é visualizado no cromatograma B (FIGURA 10) referente ao cultivo de 7 dias com *Penicillium citrinum* Ve1 em resíduo de café, representando a não detecção ou ausência da molécula no meio de cultivo. Na análise do espectro de absorção de referência (FIGURA 12) o pico deve aparecer em 330 nm na presença de citrinina, porém não é detectado na análise em resíduos de café. Os resultados indicam que as condições de tratamento dos resíduos cafeeiros empregadas neste trabalho não favoreceram/induziram o fungo *Penicillium citrinum* a produzir micotoxinas, mesmo com as variáveis do cultivo sendo favoráveis segundo a literatura. Importante ressaltar que o experimento em questão foi realizado com ausência de uma amostra padrão de citrinina. Durante o trabalho foi realizado testes de indução de citrinina em cultivo submerso com *P. citrinum*, baseado no protocolo de Gu, S. *et al.*,

2021, na tentativa de obter um padrão para comparação com as amostras de CES, entretanto, não foi detectado por CLAE, indicando que fungo possivelmente não produziu a micotoxina ou não foi possível detectar. Logo, baseado nos testes preliminares apresentados, é provável que o fungo não produz micotoxina, sequer quando submetido a meios de indução. Todavia, testes genômicos são necessários para avaliar se existe a presença do gene responsável pela capacidade de produzir citrinina e em que condições ele é estimulado, bem como, ter acesso a uma cepa dessa espécie que seguramente produza para realizar os testes comparativos de detecção.

A estabilidade apresentada pelo *Penicillium citrinum* Ve1 diante das modificações do cultivo mostra que ele é um ótimo candidato para uso em produções industriais (Danner, Mach & Mach-Aigner, 2023). Outrossim, a não produção de metabólitos secundários tóxicos, como a citrinina, mesmo em condições propícias, indica que pode ser utilizado também para produção de ração animal e tratamentos de resíduos com foco na área alimentícia, sem causar malefícios a saúde animal (Frisvad *et al.*, 2018). Ele também pode ser usado para produção de outros bioprodutos. Um exemplo é a produção de enzimas celulolíticas como celulases, endoglucanases e exoglucanases, em diferentes faixas de pH, e pode servir como uma nova fonte de geração de enzimas importantes para a indústria de papel, têxtil e de biocombustíveis (Pimentel, 2014). Outro uso é para geração de substâncias antioxidantes, como ácidos orgânicos. No estudo de Eliopoulos, *et al.*, 2025, ele aborda que cepas de *Penicillium* foram promissoras na produção de ácido gálico através de tratamento de resíduos industriais por CES.

7 CONCLUSÃO

No presente projeto, foi possível determinar que os resíduos de café, especificamente a borra e a película prateada, podem ser tratados com o objetivo de remover compostos antinutricionais, em particular, a cafeína, por meio da ação do fungo *Penicillium citrinum* Ve1. Os resultados dos experimentos demonstraram que os fungos *Aspergillus awamori* IOC 3914 e *Trichoderma harzianum* IOC 4127 não apresentaram êxito na CES, uma vez que não foram capazes de degradar a cafeína.

Por outro lado, a cepa Ve1 de *Penicillium citrinum* foi capaz de degradar 98% da cafeína presente nos resíduos em apenas 36 horas, sob diferentes condições de umidade e sem variações significativas no pH do meio. Além disso, nas condições avaliadas, não foi detectada a presença de metabólitos secundários, como a citrinina, após a fermentação. Dessa forma, o tratamento proposto para esses resíduos mostrou-se eficaz e de baixo custo, tanto pelo curto tempo de processamento quanto pela ausência de necessidade de enriquecimento do meio.

Assim, *Penicillium citrinum* Ve1 demonstrou capacidade de detoxificar os resíduos e, simultaneamente, é possível que ofereça um incremento proteico da matéria-prima, tornando-a adequada para utilização como ração animal, além de apresentar potencial para aplicação na produção de bioprodutos de interesse econômico e tecnológico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aidoo, K. E., Hendry, R., & Wood, B. J. B. (1981). Estimation of fungal growth in a solid-state fermentation system. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 12(1), 6–9. <https://doi.org/10.1007/BF00508111>.
- Ahmed, M. G., Gouda, S. A., Donia, S., & Hassanein, N. M. (2025). Production of single cell protein by fungi from different food wastes. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 15(4), 5447-5462.
- Almeida, S. A. (2024) Película prateada: resíduo da indústria cafeeira como alternativa para geração de biogás. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Ambiental) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, Sorocaba, São Paulo, 38f.
- Abd-Ellatieff, H. A., Georg, K., Abourawash, A. R. A., Ghazy, E. W., Samak, D. H., & Goda, W. M. (2024). *Aspergillus awamori*: potential antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic activities in acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Inflammopharmacology*, 32(4), 2541-2553.
- Abic (2023). Associação Brasileira da Indústria de Café. Ministério da Agricultura e Pecuária. Relatório Novembro/2023 a Outubro/2024 . Disponível em <[Indicadores da Indústria de Café | 2024 - ABIC](#)> Acesso:
- Abramovay, J. G. P. (2024). Produção De Biodiesel E Carvão Ativado A Partir Da Borra De Café. *Revista Contemporânea*, 4(12), e7045-e7045. <https://ojs.revistacontemporanea.com/ojs/index.php/home/article/download/7045/5030/20498>
- Araújo, E. M. (2023). Avaliação da atividade biológica do eugenol frente cepas de *Penicillium citrinum*.
- Bader, A. N., Salerno, G. L., Covacevich, F., & Consolo, F. (2020). Bioformulación de *Trichoderma harzianum* en sustrato sólido y efectos de su aplicación sobre plantas de pimiento. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 119(1), 037.
- Battestin, V., MATSUDA, L. K., & MACEDO, G. A. (2008). Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 15(1), 63-72.
- Basílio, E. P. (2018). Caracterização da película prateada de café arábica, aplicação em bolo de chocolate e seus efeitos no teor de fibra alimentar, atividade antioxidante e atributos sensoriais.
- Barker, J., Saragoça, M. (2023) COP 28: oportunidades para o saneamento básico. JOTA, São Paulo, 4 dez. 2023. Disponível em <[COP 28: oportunidades para o saneamento básico](#)> Acesso em: 08 Abril 2025
- Bonilla Loaiza, A. M., Rodríguez-Jasso, R. M., Belmares, R., López-Badillo, C. M., Araújo, R. G., Aguilar, C. N., Chávez, M. L., Aguilar, M. A., & Ruiz, H. A. (2022). Fungal Proteins from *Sargassum* spp. Using Solid-State Fermentation as a Green Bioprocess Strategy. *Molecules*, 27(12), 3887. <https://doi.org/10.3390/molecules27123887>
- Carvalho, L. S. (2024) Estratégias de cultivo em estado sólido de resíduos da indústria do café. Rio de Janeiro, 2024. Dissertação Mestrado em Ciências Microbiologia, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro

Conab (2025) Companhia Nacional de Abastecimento. *Produção de café apresenta recuperação de 2,7% em 2025, estimada em 55,7 milhões de sacas*. 6 de maio 2025. Disponível em: <[Produção de café apresenta recuperação de 2,7% em 2025, estimada em 55,7 milhões de sacas — Companhia Nacional de Abastecimento](#)> Acesso em: 18 de maio 2025

Chalfoun, Sára Maria; Pereira, Marcelo Cláudio; Pimenta, Carlos José; Angélico, Caroline Lima. Efeito da cafeína e do ácido cafeico sobre o desenvolvimento de fungos e síntese de micotoxinas em café (*Coffea arabica* L.). In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil (5. : Águas de Lindóia, SP : 2007). Anais. Brasília, D.F. : Embrapa - Café, 2007. (1 CD-ROM), 5p.

Charis Michel Galanakis. *Handbook of Coffee Processing By-Products*. [s.l.] Academic Press, 2017.

Danner, C., Mach, R. L., & Mach-Aigner, A. R. (2023). The phenomenon of strain degeneration in biotechnologically relevant fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(15), 4745-4758.

Dash, S. S., & Gummadi, S. N. (2006). Catabolic pathways and biotechnological applications of microbial caffeine degradation. *Biotechnology Letters*, 28(24), 1993–2002. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9196-2>
De Maria, C. A., & Moreira, R. F. (2007). Cafeína: revisão sobre métodos de análise. *Química Nova*, 30, 99-105.

Débora Brand, Ashok Pandey, Sevastianos Roussos, Carlos R Soccol, Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid-state fermentation system, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 27, Issues 1–2, 2000, Pages 127-133, ISSN 0141-0229. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00186-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00186-1). >

Ding, H., Li, X., Wang, S., Yang, Y., Chen, X., Chen, C., & Wang, H. (2025). *Trichoderma harzianum* for the control of agricultural pests: Potential, progress, applications and future prospects. *Revista Argentina de Microbiología*.

Domingos, Otávio Henrique. *Diagnosis of environmental impacts of the catchment area of the River Muzambo in Muzabinho-MG*. 2013. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Jose do Rosario Vellano, Alfenas, 2013.

dos Santos Vicente, M., Vicente, M., Antônio Vicente, M., & Madaleno, L. L. . (2024). RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS UTILIZADOS PARA FABRICAÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO. *Ciência & Tecnologia*, 16(1), e16116. <https://doi.org/10.52138/citec.v16i1.394>

Eliopoulos, C., Arapoglou, D., & Haroutounian, S. A. (2025). Bioconversion of Agro-Industrial Byproducts by Applying the Solid-State Fermentation Bioprocess to Increase Their Antioxidant Potency. *Antioxidants*, 14(8), 910.

Ferreira L. T., Cavaton T. F. (2024) Consumo interno dos Cafés do Brasil atinge 21,7 milhões de sacas no período acumulado de doze meses. EMBRAPA, 08 fev. 2024. Disponível em <[Artigo - Consumo interno dos Cafés do Brasil atinge 21,7 milhões de sacas no período acumulado de doze meses - Portal Embrapa](#)> Acesso em: Maio 2025

Ferreira L. T., Cavaton T. F. (2024) Produção dos Cafés do Brasil ocupa área de 1,9 milhão de hectares em 2024. EMBRAPA, 26 jun. 2024. Disponível em <[Artigo - Produção dos Cafés do Brasil ocupa área de 1,9 milhão de hectares em 2024 - Portal Embrapa](#)> Acesso em: Abril 2025

Ferreira L. T. (2023) Produção total de café no mundo deverá atingir volume físico equivalente a 174,3 milhões de sacas na safra 2023-2024. EMBRAPA, 17 ago. 2023. Disponível em: <[Produção total de café no mundo](#)>

deverá atingir volume físico equivalente a 174,3 milhões de sacas na safra 2023-2024 - Portal Embrapa
Acesso: Abril 2025

Franca, A.S.; Basílio, E.P.; Resende, L.M.; Fante, C.A.; Oliveira, L.S. Coffee Silverskin as a Potential Ingredient for Functional Foods: Recent Advances and a Case Study with Chocolate Cake. *Foods* 2024, 13, 3935. <https://doi.org/10.3390/foods13233935>

Freddo, Natália. Efeitos tóxicos do uso abusivo de metilfenidato associado à cafeína. 2020. 62 f. Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2020.

Freire, D. M., Teles, E. M., Bon, E. P., & Sant' Anna, G. L., Jr (1997). Produção de lipase por *Penicillium restrictum* em fermentador em escala de bancada: efeito da nutrição, agitação e aeração de carbono e nitrogênio. *Bioquímica aplicada e biotecnologia*, 63-65, 409–421. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2312-2_36

Frisvad, J. C., Møller, L. L., Larsen, T. O., Kumar, R., & Arnau, J. (2018). Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(22), 9481-9515.

G.M.G.M. Amorim, A.C.A.C. Oliveira, M.L.E.M.L.E. Gutarra, M.G.M.G. Godoy, D.M.G.D.M.G. Freire, Solid-state fermentation as a tool for methylxanthine reduction and simultaneous xylanase production in cocoa meal, *Biocat. Agric. Biotechnol.* 11 (2017) 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.05.009>.

Gonçalves, R. P., Maldaner, G., Mariño, P., & Menezes, A. P. (2021). Avaliação fitoquímica qualitativa das folhas da pitangueira (*eugenia uniflora* l.). *ANAIS CONGREGA MIC-ISBN 978-65-86471-05-2*, 17, 275-280.

Gu, S., Chen, Z., Wang, F. *et al.* Characterization and inhibition of four fungi producing citrinin in various culture media. *Biotechnol Lett* 43, 701–710 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03061-2>

Hackbart, H. C. D. S. (2009). Ocratoxina A e citrinina em arroz: um estudo de metodologia para determinação simultânea de ocorrência (Master's thesis).

Harsono, S. S., Wibowo, R. K. K., & Supriyanto, E. (2021). Energy balance and green house gas emission on smallholder Java coffee production at slopes Ijen Raung plateau of Indonesia. *Journal of Ecological Engineering*, 22(7), 271-283.

Hongyin Zhang, Joseph Ahima, Qiya Yang, Lina Zhao, Xiaoyun Zhang, Xiangfeng Zheng, A review on citrinin: Its occurrence, risk implications, analytical techniques, biosynthesis, physiochemical properties and control, *Food Research International*, Volume 141, 2021, 110075, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110075>.

Ibama (2023). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis. Política nacional de resíduos sólidos (Lei no 12.305/2010) de 02 de agosto de 2010. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007_2010/2010/lei/112305.htm. Acesso em: 08 Abril 2025

Kamle, M., Mahato, D. K., Gupta, A., Pandhi, S., Sharma, N., Sharma, B., Mishra, S., Arora, S., Selvakumar, R., Saurabh, V., Dhakane-Lad, J., Kumar, M., Barua, S., Kumar, A., Gamlath, S., & Kumar, P. (2022). Citrinin Mycotoxin Contamination in Food and Feed: Impact on Agriculture, Human Health, and Detection and Management Strategies, *Toxins* 14(2), 85. <https://doi.org/10.3390/toxins14020085>

Lago, Regina C. A.; Antoniassi, Rosemar; Freitas, Sidinéa Cordeiro de. Composição centesimal e de aminoácidos de café verde, torrado e de borra de café solúvel. In: Simpósio Brasileiro de Pesquisa dos Cafés

do Brasil (2. : 2001 : Vitória, ES). Anais. Brasília, D.F. : Embrapa Café, 2001. p. 1473-1478

Machado, S., Costa, A. S., Pimentel, F., Oliveira, M. B. P., & Alves, R. C. (2020). A study on the protein fraction of coffee silverskin: Protein/non-protein nitrogen and free and total amino acid profiles. *Food chemistry*, 326, 126940.

MARAN, Emanuelli Marchesan et al. Fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais: Aplicação para obtenção de biscoitos. 2025.

Mock, M. B., & Summers, R. M. (2024). Microbial metabolism of caffeine and potential applications in bioremediation. *Journal of Applied Microbiology*, 135(4). <https://doi.org/10.1093/jambio/lxae080>

National Geographic (2022) Economia circular: o que é e por que ela beneficia o meio

ambiente. National Geographic, Brasil, 25 Mai. 2022. Disponível em: <[Economia circular: o que é e por que ela beneficia o meio ambiente? | National Geographic](#)>. Acesso em: 08 Abril 2025

ONU, Organização das Nações Unidas. Disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br>>. Acesso em: 21/05/2025

Orozco, S. F. B., & Kilikian, B. V. (2008). Effect of pH on citrinin and red pigments production by *Monascus purpureus* CCT3802. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(2), 263-268.

Peduzzi, P. (2025) Conab estima queda na produção de café com 51,8 milhões de sacas. Agência Brasil, Brasília, 28 jan. 2025. Disponível em <[Conab estima queda na produção de café com 51,8 milhões de sacas este ano | Agência Brasil](#)>. Acesso em: 8 Mai. 2025.

Pyrzynska, K. Spent Coffee Grounds as a Source of Chlorogenic Acid. *Molecules* 2025, 30, 613. <https://doi.org/10.3390/molecules30030613>

Pereira, V. V., Oliveira, A. C. B. D., Barbosa, I. D. P., Pereira, A. A., & Sakiyama, N. S. (2019). Análise sensorial da bebida de genótipos de café arábica resistentes à ferrugem de acordo com o processamento pós-colheita.

Perwez, M., & Al Asheh, S. (2025). Valorization of agro-industrial waste through solid-state fermentation: Mini review. *Biotechnology Reports*, 45, e00873.

Pimentel, Pamela Suely Santa Rosa. Caracterização de Enzimas Celulolíticas Produzidas pelo fungo Filamentoso *Penicillium citrinum*. 2014. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

Queiroga, Vicente & Gomes, Josivanda & de Melo, Bruno & Albuquerque, Esther. (2021). CULTIVO DO CAFÉ (*Coffea arabica* L.) ORGÂNICO SOMBREADO PARA PRODUÇÃO DE GRÃOS DE ALTA QUALIDADE.

Ribeiro, B. D., Coelho, M. A. Z., & Barreto, D. W. (2012). Obtenção de extratos de guaraná ricos em cafeína por processo enzimático e adsorção de taninos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15, 261-270.

Rocha, F. C., Garcia, R., Freitas, A. W. D. P., Souza, A. L. D., Gobbi, K. F., Valadares Filho, S. D. C., ... & Rocha, G. C. (2006). Casca de café em dietas para vacas em lactação: consumo, digestibilidade, produção e composição de leite. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35, 2163-2171.

Routier, F. H., Doering, T. L., Cummings, R. D., & Aebi, M. (2022). Fungi. In A. Varki (Eds.) et. al., *Essentials of Glycobiology*. (4th ed., pp. 307–318). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453054/> doi: 10.1101/glycobiology.3e.023

Rocha, F.C.; Garcia, R.; Freitas, A.W.P.; Bernardino, F.S.; Valadares filho, S.C.; Rocha, G.C. Valor energético de dietas contendo diferentes níveis de casca de café para bovinos e ovinos. *Acta Science Animal Science*, v.28, p.81-87, 2006.

Sadhasivam, S.; Barda, O.; Zakin, V.; Reifen, R.; Sionov, E. Rapid Detection and Quantification of Patulin and Citrinin Contamination in Fruits. *Molecules* 2021, 26, 4545. <https://doi.org/10.3390/molecules26154545>.

Santos, I. G. C., Alexandrino, B., Canto, E. S. M., Varavallo, M. A., & dos Santos, T. T. (2023). Prospecção de linhagens fúngicas produtoras de enzimas hidrolíticas a partir de substratos agroindustriais usados em nutrição animal.

Sebrae (2023) Noroeste do Rio de Janeiro se destaca na produção de cafés especiais. SEBRAE, 11 jan. 2023. Disponível em <[Noroeste do Rio de Janeiro se destaca na produção de cafés especiais - Sebrae](#)>

Sidło, W.; Latosińska, J. Reuse of Spent Coffee Grounds: Alternative Applications, Challenges, and Prospects—A Review. *Appl. Sci.* 2025, 15, 137. <https://doi.org/10.3390/app15010137>

Silva, D. D. D., Costa, R. V. D., Cota, L. V., Lanza, F. E., Guimaraes, E. A., & Dagma Dionisia Da Silva, C. R. V. D. C. (2015). *Micotoxinas em cadeias produtivas do milho: Riscos à saúde animal e humana*. Disponível em: < <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1037807> >

Silveira, S. A., & Andrade, P. P. (2024). USO DA BORRA DE CAFÉ FRESCA NO DESENVOLVIMENTO DO GIRASSOL E CONTROLE DA BRACHIARIA. *Revista Agroveterinária Do Sul De Minas - ISSN: 2674-9661*, 6(1), 87–105. Recuperado de <<https://www.periodicos.unis.edu.br/agrovetsulminas/article/view/888>>

Silva, D. D. F. (2020) Aplicação da Fermentação em Estado Sólido com *Aspergillus niger* ATCC 1004 em Casca de Mandioca para Produção de Biogás.

Silva, L. J. G., Pereira, A. M. P. T., Pena, A., & Lino, C. M. (2021). Citrinin in Foods and Supplements: A Review of Occurrence and Analytical Methodologies. *Foods*, 10(1), 14. <https://doi.org/10.3390/foods10010014>

Souza, L. M. B. de, Lopes, G., Araújo, J. B. S., Favarato, L. F., & Guarçoni, R. C. (2023). Desempenho Agronômico E Avaliação Econômica De Composto Orgânico Que Contém Borra De Café Na Adubação Da Cultura Do Milho. *Incaper Em Revista*, 71–82. <https://doi.org/10.54682/ier.v.13e14.p71.82>

Souza, R. D., de Faria Pereira, S. M., dos Reis Nunes, C., de Oliveira, R. R., & de Oliveira, D. B. (2015). Atividade antioxidante, teor de taninos, fenóis, ácido ascórbico e açúcares em *Cereus fernambucensis*. *Revista Vértices*, 17(1), 183-201.

T.N. Asquith, L.G. Butler, Use of dye-labeled protein as spectrophotometric assay for protein precipitants such as tannin, *J. Chem. Ecol.* 11 (1985) 1535–1544. <https://doi.org/10.1007/BF01012199>.

Teles, A. S. (2025). Utilização da fermentação em estado sólido (fés) para a produção de enzimas: uma abordagem inovadora na valorização de resíduos agroindustriais.

Vargas Sánchez, R. D., Esqueda, M., Torres Martínez, B. D. M., Torrescano Urrutia, G. R., & Sánchez Escalante, A. (2023). Antioxidant activity of the aqueous extract from spent coffee grounds fermented with *Pleurotus ostreatus*. *Scientia fungorum*, 54.

Zhou, B., Ma, C., Wang, H., & Xia, T. (2018). Biodegradation of caffeine by whole cells of tea-derived fungi *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus niger* and optimization for caffeine degradation. *bmc microbiology*, 18, 1-10.

Wanyika, H., Gatebe, E., & Gitu, L. (2010). Determination of caffeine content of tea and instant coffee brands found in the Kenyan market. *African Journal of Food*.

Wojciech Czekala, Aleksandra Łukomska, Jakub Pulka, Wiktor, Bojarski, Patrycja Pochwatka, Alina Kowalczyk-Juśko, Anna Oniszczyk, Jacek Dach, Waste-to-energy: Biogas potential of waste from coffee production and consumption, *Energy*, Volume 276, 2023, 127604, ISSN 0360-5442.
<<https://doi.org/10.1016/j.energy.2023.127604>.>

Woiciechowski, A. L., Carvalho, J. D., Spier, M. R., & Soccol, C. (2013). Emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos alimentares. *Biotecnologia de Alimentos*, 1, 143-171.

Zhao, H.-M., Guo, X.-N., & Zhu, K.-X. (2017). Impact of solid-state fermentation on nutritional, physical and flavor properties of wheat bran. *Food Chemistry*, 217, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.062>

Zafar, S., Bukhari, D. A., & Rehman, A. (2022). Azo dyes degradation by microorganisms - An efficient and sustainable approach. *Saudi journal of biological sciences*, 29(12), 103437. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103437>