



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CARLA LIEGI LONARDONI OLIVEIRA-PEITL

**DIVERSIDADE DE MICROFLORA ASSOCIADA AOS
GRÃOS DE CAFÉS DE BOA QUALIDADE NO
SUBTRÓPICO**

Londrina
2016

CARLA LIEGI LONARDONI OLIVEIRA-PEITL

**DIVERSIDADE DE MICROFLORA ASSOCIADA AOS
GRÃOS DE CAFÉS DE BOA QUALIDADE NO
SUBTRÓPICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, com área de concentração em Fitotecnia, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Édison Miglioranza.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Oliveira-Peittl, Carla Liegi Lonardoni.

Diversidade de microflora associada aos grãos de cafés de boa qualidade no subtropical / Carla Liegi Lonardoni Oliveira-Peittl. - Londrina, 2016.
96 f.

Orientador: Édison Miglioranza.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Coffea arabica L. - Tese. 2. Análise microbiológica - Tese. 3. Qualidade de bebida - Tese. 4. Bactérias - Tese. I. Miglioranza, Édison. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CARLA LIEGI LONARDONI OLIVEIRA-PEITL

**DIVERSIDADE DE MICROFLORA ASSOCIADA AOS GRÃOS DE
CAFÉS DE BOA QUALIDADE NO SUBTRÓPICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, com área de concentração em Fitotecnia, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador. Dr. Édison Miglioranza
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr. André Luiz Martinez de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Débora Cristina Santiago
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Gisele Silva de Aquino
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Josemeyre Bonifácio da Silva
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr. Adilson Luiz Seifert
Universidade Estadual de Londrina – UEL
Suplente

Pós-Doutoranda Débora Mello da Silva
Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR
Suplente

Londrina, 22 de janeiro de 2016.

Dedico esse trabalho à Deus e meus filhos Huly e Hugo.

OLIVEIRA-PEITL, Carla Liegi Lonardoni. **Diversidade de microflora associada aos grãos de cafés de boa qualidade no subtropical.** 2016. 96 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

RESUMO

O trabalho buscou identificar a influência das características do ambiente de cultivo, o manejo de colheita e da pós-colheita e da microflora associada aos atributos de qualidade de bebida de amostras de cafés e, a partir do isolamento de bactérias provenientes das amostras de café natural e cereja descascado, realizar a caracterização morfológica e determinar a diversidade genética dos isolados pelo uso da técnica PCR-RFLP. Para isso foi aplicado um questionário aos produtores finalistas do concurso 'Café Qualidade Paraná 2011' e os dados foram correlacionados com a avaliação microbiológica realizada dos grãos de café. Houve correlação significativa e positiva entre todos os atributos da qualidade da bebida e as altitudes do local de produção das amostras. Nas análises microbiológicas foram observados mais de dez espécies diferentes de fungos, e a presença de bactérias. Ao correlacionar a colonização de cada amostra com os atributos da bebida dos cafés verificou-se correlações baixas ou inexistentes para a maioria dos microrganismos. Porém, *Penicillium sp.* se correlacionou negativamente com a característica bebida limpa, doçura, corpo, sabor e balanço, enquanto *Alternaria sp.* apresentou correlação negativa com o balanço da bebida dos cafés. As bactérias se correlacionaram positivamente com a acidez dos cafés. Através das mesmas amostras, foi realizado então o isolamento de bactérias epifíticas e endofíticas através de enriquecimento em meio líquido Mineral Salt Medium com café, posteriormente a solução foi plaqueada em meios semi-sólidos MSM+C e Nutriente Ágar. Foi observado grande diversidade de bactérias isoladas. As bactérias foram avaliadas morfológicamente segundo a forma, elevação, borda, superfície, cor e tamanho das colônias. Posteriormente, foram realizadas a extração de DNA genômico bacteriano, à amplificação do gene 16S rDNA por meio da técnica de PCR e o uso da técnica de RFLP. Foi observada grande diversidade fenotípica e genotípica entre as bactérias epifíticas e endofíticas isoladas de grãos de *Coffea arabica* L., sendo isolados 331 bactérias do meio de cultura NA e 308 do meio de cultura MSM+C. Com relação a caracterização morfológica, as formas mais encontradas foram as puntiformes e circulares, a elevação plana e convexa, a borda das colônias do tipo inteira, a superfície lisa, a coloração branca com tamanhos de colônias que variaram de 2 a 8 mm. Os maiores índices de diversidade de bactérias, foram provenientes de amostras onde foi realizada a secagem do café em terreiro, em que o café não foi lavado e não foi realizada colheita seletiva. A partir das médias dos valores de altitude e os caracteres de qualidade de bebida, para os seis grupos definidos a partir do dendrograma do meio de cultura NA observou-se que o grupo que possui altitude de 707 metros apresentou os maiores valores quanto as características de bebida do café. Com os resultados obtidos através da técnica PCR-RFLP os perfis de restrição apresentaram grande variabilidade. O grande número de fragmentos obtidos, em cada amostra no dendrograma, reflete a diversidade da comunidade microbiana existente em decorrência das diferentes formas de secagem do grão e das diferentes regiões onde *C. arabica* foi cultivado.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L. Análise microbiológica. Qualidade de bebida. Endonucleases de restrição. Bactérias.

OLIVEIRA-PEITL, Carla Liegi Lonardoni. **Microflora diversity associated with good quality coffee beans in subtropics**. 2016. 96 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

ABSTRACT

The study aimed to identify the influence of the characteristics of the growing environment, management of harvest and post-harvest and microflora associated with the quality attributes of samples of drinking coffee and from the isolation of bacteria from the natural coffee samples and cherry peeled perform morphological and molecular technique using PCR-RFLP. For it was applied a questionnaire to the producers of the contest finalists 'Coffee Quality Paraná 2011' and the data were correlated with the microbiological assessment carried out of the coffee beans. There has been significant and positive correlation between all cup quality attributes and the altitudes of the local production of the samples. Microbiological analyzes were observed over ten different species of fungi, was also observed that the presence of bacteria. By correlating the contamination of each sample with the attributes of the coffee drink it has been found low or no correlations for most microorganisms. However *Penicillium* sp. correlated negatively with the characteristic clean drink, sweetness, body, flavor and balance, while *Alternaria* sp. also negatively correlated with the balance of the drink of coffee. It was also found that bacteria were positively correlated with the acidity of coffee. By the same samples was then performed and the isolation of endophytic epiphytic bacteria by enrichment in liquid Mineral Salt Medium with coffee, then the solution was plated on semisolid media MSM+C and Nutrient Agar. After growth has been great diversity of bacterial isolates observed. The bacteria were evaluated morphologically in the form, elevation, edge, surface, color and size of the colonies. Subsequently they were performed bacterial genomic DNA extraction, amplification of 16S rDNA by means of PCR and the use of the RFLP technique. Great phenotypic and genotypic diversity was observed among the epiphytic and endophytic bacteria isolated from *Coffea arabica* beans L. Being isolated 331 bacteria from the culture medium NA and 308 of MSM+C culture medium. Concerning the morphological characterization, the most frequent forms were punctiform, circular, flat and convex elevation, the edge of the entire colonies type, smooth, white colonies stained with sizes ranging from 2 to 8 mm. The higher levels of diversity in bacteria were obtained from samples where drying was performed on ground coffee, wherein the coffee has not been washed and selective collection was not performed. From the average of the altitude values and beverage quality traits for the six groups defined from the dendrogram culture medium NA it noted that the group having altitude of 707 meters had the highest values and the characteristics of coffee drink. With the results obtained by PCR-RFLP technique the restriction profiles showed great variability. The large number of fragments obtained in each sample in the dendrogram reflects the diversity of existing microbial community as a result of different forms of grain drying and the different regions where *C. arabica* was grown.

Key-words: *Coffea arabica* L. Microbiological analysis. Quality drink. Restriction endonucleases. Bacteria.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade oferecida para realização desse curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

Ao meu querido orientador Dr. Édison Miglioranza, pela inestimável orientação, pelos ensinamentos na realização dos trabalhos, pelas sábias conversas, apoio constante e pela amizade.

Ao professor Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves pela valiosa colaboração nas diversas fases desse trabalho, desde a sua concepção até a redação final.

Ao professor Dr. André Luiz Martinez de Oliveira pelos ensinamentos, disponibilização de materiais e espaço físico para o desenvolvimento das fases do trabalho.

Aos professores Dr. Claudemir Zucareli e Dra. Adriane Marinho por ministrarem as disciplinas mais didáticas e práticas que fiz em minha vida.

Ao Stefan Mateus Ropke Rieper pelas execuções dos trabalhos referentes a avaliação fitopatológica e aplicação de questionário aos produtores.

À professora Dra. Inês Cristina Batista Fonseca pelas análises estatísticas do artigo 1.

Ao Msc. Romeu Gair pela concessão das amostras do concurso 'Café Qualidade Paraná 2011' utilizadas nas duas fases do trabalho.

Ao grupo de degustadores oficiais que realizaram a análise sensorial da bebida de café para o concurso 'Café Qualidade Paraná 2011'.

Às professoras Dra. Débora Cristina Santiago, Dra. Gisele Silva de Aquino e Dra. Josemeyre Bonifácio da Silva pelas participações em banca examinadora e pelas sugestões e contribuições ao trabalho final.

À minha família pelo constante apoio, pelos conselhos e orações.

Ao meu amor Douglas Peitl, por antes de tudo ser meu amigo, pelo carinho cedido, pelo incentivo, ensinamentos e ajuda nos trabalhos práticos.

Ao Departamento de Agronomia, aos professores e funcionários pela oportunidade de ampliar os conhecimentos.

À secretária de Pós-Graduação Weda Aparecida Westin, a qual teve influência direta no incentivo para realização desse curso e pela amizade.

As minhas queridas amigas Fumiko e Raylenne que mesmo longe sempre me apoiaram nos momentos mais diversos.

Aos meus amigos Renata, Jaime, Karine e Adriély por fazer essa etapa ser mais alegre.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica, Monica, Karina, Kamila e Clério pelas colaborações e troca de experiências.

Aos colegas do laboratório de Fitopatologia Ciro, Luiz Henrique, Giovanni, Luann, Elise e Risa pela agradável convivência e troca de conhecimento.

A todas as demais pessoas que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta etapa.

“Observei o conjunto da obra de Deus e percebi que o homem não consegue descobrir tudo o que acontece debaixo do Sol. Por mais que o homem se afadigue em pesquisar, não chega a compreendê-la. E mesmo que o sábio diga que a conhece, nem por isso é capaz de entendê-la.” (Eclesiastes 8. 17)

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.3.1 –	Mapeamento das principais regiões brasileiras produtoras de café.....	27
Figura 4.4.2.1 –	Classificação que as colônias bacterianas podem apresentar de acordo com a forma.....	56
Figura 4.4.2.2 –	Classificação que as colônias bacterianas podem apresentar de acordo com a elevação.....	56
Figura 4.4.2.3 –	Classificação que as colônias bacterianas podem apresentar de acordo com a borda da colônia	56
Figura 4.4.2.4 –	Classificação que as colônias bacterianas podem apresentar de acordo com o aspectos da superfície da colônia	56
Figura 4.5.1.1 –	Gráficos representando o número de isolados obtidos nos meios de cultura NA e MSM+C, de acordo com as características das colônias: forma (a), elevação (b), borda (c), superfície (d), coloração (e) e tamanho (f) provenientes de nove amostras de café do concurso ‘Café Qualidade Paraná 2011’. Londrina, 2015.....	62
Figura 4.5.1.2 –	Agrupamento hierárquico UPGMA de 331 isolados provenientes do meio NA de nove amostras de café do concurso ‘Café Qualidade Paraná 2011’, com base em suas características morfológicas. Londrina, 2015.....	64
Figura 4.5.1.3 –	Agrupamento hierárquico UPGMA de 308 isolados provenientes do meio MSM+C de nove amostras de café do concurso ‘Café Qualidade Paraná 2011’, com base em suas características morfológicas. Londrina, 2015.....	65
Figura 4.5.2.1 –	Análise de reação em cadeia da polimerase do gene 16S RNAr de isolados bacterianos de grãos de café escolhidos aleatoriamente. M: marcador universal de peso molecular; 7-80: amostras dos isolados bacterianos. Londrina, 2015	70

Figura 4.5.2.2 – Dendrograma de similaridade de perfil do gene 16S RNAr digerido com enzimas de restrição *EcoRI*+*RsaI*, *DdeI* e *MspI* de 69 isolados bacterianos de amostras do concurso ‘Café Qualidade Paraná 2011’, com base no agrupamento hierárquico UPGMA, utilizando a distância de Jaccard, após análise de agrupamento baseada na presença/ausência dos fragmentos de restrição. Londrina, 2015.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.5.1 –	Classificação dos cafés finalistas do concurso ‘Café Qualidade Paraná 2011’ e nota de seus respectivos atributos de qualidade de bebida. Londrina, 2015.....	44
Tabela 3.5.2 –	Características agronômicas dos cafezais e manejo da colheita dos cafés finalistas do concurso ‘Café Qualidade Paraná 2011’. Londrina, 2015.....	45
Tabela 3.5.3 –	Correlação entre altitude e atributos da qualidade da bebida dos cafés finalistas do concurso ‘Café Qualidade Paraná 2011’. Londrina, 2015.....	46
Tabela 3.5.4 –	Infecção nas amostras pelos microrganismos e nível de infecção das amostras em %. Londrina, 2015.....	47
Tabela 3.5.5 –	Correlação entre os atributos da bebida dos cafés finalistas e contaminação microbiológica. Londrina, 2015.....	48
Tabela 4.4.5.1 –	Sítios de corte das enzimas de restrição e suas respectivas cepas padrão. Londrina, 2015.....	60
Tabela 4.5.1.1 –	Índices de diversidade de Shannon-Wiener (H') e Simpson's (SD) para os isolados do meio de cultura NA e MSM+C, provenientes de nove amostras de café do concurso ‘Café Qualidade Paraná 2011’. Londrina, 2015.....	66
Tabela 4.5.1.2 –	Médias dos valores de altitude e parâmetros de qualidade de bebida, para os seis grupos definidos a partir do dendrograma do meio de cultura NA, de 331 isolados provenientes de nove amostras de café do concurso ‘Café Qualidade Paraná 2011’. Londrina, 2015.....	67
Tabela 4.5.1.3 –	Médias dos valores de altitude e parâmetros de qualidade de bebida, para os sete grupos definidos a partir do dendrograma do meio de cultura MSM+C, de 308 isolados provenientes de nove amostras de café do concurso ‘Café Qualidade Paraná 2011’. Londrina, 2015.....	68

Tabela 4.5.1.4 – Coeficientes de correlação entre os caracteres de qualidade de bebida e os índices de diversidade de Shannon-Wiener (H') e Simpson's (SD) para nove amostras do concurso 'Café Qualidade Paraná 2011'. Londrina, 2015.....	68
Tabela 4.5.1.5 – Coeficientes de correlações canônicas e pares canônicos estimados entre os caracteres relacionados ao Índice de Diversidade de Shannon-Wiener (Grupo I) e caracteres relacionados a qualidade de bebida de nove amostras do concurso 'Café Qualidade Paraná 2011' (Grupo II). Londrina, 2015.....	69

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ACI	Acidez
ALTI	Altitude
AMSC	Associação dos Produtores de Cafés Especiais da Alta Mogiana
AMUNOP	Associação dos Municípios do Norte do Paraná
AMUNORPI	Associação dos Municípios do Norte Pioneiro
APROCAM	Associação dos Produtores de Café da Mantiqueira
BAL	Balanço
BEL	Bebida limpa
BSCA	Brazil Specialty Coffee Association
CARAC	Características
CCCC	Código Comum para a Comunidade Cafeeira
CCCRJ	Centro do Comércio de Café do Rio de Janeiro
CD	Café Cereja Descascado
CETCAF	Centro de Desenvolvimento Tecnológico do Café
CIAGRO	Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
COR	Corpo
CV	Coefficiente de variação
DEC	Desclassificado
DOÇ	Doçura
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMATER	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
GOSR	Gosto remanescente
H'	Índice de diversidade de Shannon-Wiener
H' NA	Índice de diversidade de Shannon-Wiener para bactérias cultivadas em meio de cultura com nutriente ágar
H' MSM+C	Índice de diversidade de Shannon-Wiener para bactérias cultivadas em meio de cultura com mineral salt médium com café
IAC	Instituto Agrônomo de Campinas
IAPAR	Instituto Agrônomo do Paraná
IBC	Instituto Brasileiro do Café
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária

INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ML	Café Microlote
MSM+C	Mineral Salt Medium com café
N	Café Natural
NA	Nutriente Ágar
NS	Não significativo
Pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ou a reação em cadeia da polimerase
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ou polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
SAB	Sabor
SCAA	<i>Specialty Coffee Association of America</i>
SEAB	Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná
SEAGRI	Secretaria de Estado da Agricultura e Pecuária
SD	Índice de diversidade de Simpson's
SD NA	Índice de diversidade de Simpson's para bactérias cultivadas em meio de cultura com nutriente ágar
SD MSM+C	Índice de diversidade de Simpson's para bactérias cultivadas em meio de cultura mineral salt medium com café
UEL	Universidade Estadual de Londrina
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	CENTRO DE ORIGEM, DISPERSÃO GEOGRÁFICA E DIVERSIFICAÇÃO DE <i>COFFEA</i> SPP.....	22
2.2	TAXONOMIA E ASPECTOS BOTÂNICOS DE <i>COFFEA ARABICA</i> L.....	23
2.3	CAFEICULTURA BRASILEIRA.....	25
2.3.1	Cafeicultura Paranaense.....	28
2.3.1.1	Concurso ‘café qualidade paraná’.....	30
2.4	QUALIDADE DE BEBIDA DO CAFÉ.....	32
2.4.1	Microrganismos na Fermentação e Qualidade de Bebida.....	34
2.4.1.1	Bactérias e sua influência na qualidade de bebida.....	36
3	ARTIGO A: AMBIENTE DE PRODUÇÃO, MANEJO DE COLHEITA, PÓS-COLHEITA, MICROFLORA ASSOCIADA AOS GRÃOS E ATRIBUTOS DA QUALIDADE DE BEBIDA DE CAFÉS	38
3.1	RESUMO.....	38
3.2	ABSTRACT.....	39
3.3	INTRODUÇÃO.....	40
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.4.1	Avaliação da Qualidade de Bebida.....	41
3.4.2	Caracterização das Amostras de Café.....	42
3.4.3	Análise Microbiológica dos Grãos.....	42
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.6	CONCLUSÕES.....	48

4	ARTIGO B: DIVERSIDADE FENOTÍPICA E GENÉTICA DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AOS GRÃOS DE CAFÉS DE BOA QUALIDADE NO ESTADO DO PARANÁ	50
4.1	RESUMO	50
4.2	ABSTRACT	51
4.3	INTRODUÇÃO.....	52
4.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.4.1	Isolamento Bacteriano	54
4.4.2	Caracterização Morfológica dos Isolados	56
4.4.3	Extração do DNA Microbiano.....	57
4.4.4	Amplificação do Gene 16S rDNA.....	58
4.4.5	Uso da Técnica de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição	59
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.5.1	Caracterização Morfológica	61
4.5.2	Caracterização por PCR-RFLP	62
4.6	CONCLUSÕES.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

O café é a maior *commodity* agrícola mundial, com exceção da água é a bebida mais consumida do planeta. No contexto internacional o Brasil é o maior produtor, exportador e o segundo maior consumidor de café. Portanto, é notória a importância que essa rubiácea possui em nível internacional e nacional, atuando no setor econômico e social, estando altamente relacionada com a fixação do homem no campo por meio da agricultura familiar, na obtenção de divisas externas, arrecadação de impostos e na geração de empregos em todo o setor cafeeiro tanto no campo como nas indústrias e nos estabelecimentos comerciais ligados ao agronegócio cafeeiro.

No cenário atual brasileiro, o estado do Paraná é o quinto produtor de café arábica (*Coffea arabica* L.), sendo que em meados de 1960 era responsável por cerca de 50% da produção nacional, o que representava 28% da safra mundial. Entretanto, devido a ocorrência de geadas, a falta de implantação de tecnologias nos cafezais, o desestímulo do produtor devido ao baixo valor agregado do produto, e a concorrência de outras culturas com maior retorno econômico, levou a erradicação massiva de cafezais, afetando definitivamente a produção. Com recursos limitados, de maneira geral os cafeicultores não se preocuparam com a qualidade do produto colhido e o conseqüente alijamento dos mercados dos cafés especiais.

Nesse contexto, foi estruturado em 1999 por diversos órgãos estaduais do Paraná o programa/concurso 'Café Qualidade Paraná', com o objetivo de motivar e conscientizar o produtor paranaense do potencial da cafeicultura na região, no que se refere à tecnologia de produção, incentivando e motivando a produtividade relacionada a qualidade superior do produto, agregando dessa forma valor no momento da comercialização.

Além da implantação de tecnologias nos cafezais paranaenses, buscando melhorar a qualidade de bebida, existem diversos fatores que podem estar relacionados com a produtividade/qualidade dos cafés, como os fatores edafoclimáticos regionais (clima, solo, altitude), as características biológicas (fatores genéticos, fenologia, composição química dos grãos, influência da microflora nas diversas fases da cadeia produtiva), as características agrônômicas (cultivar, adubação, agroquímicos, irrigação), os fatores pré e pós-colheita (controle de

plantas daninhas, colheita no pano, colheita seletiva, secagem, processamento, armazenamento, torrefação) e as características da classificação sensorial de bebida. Dentre eles, podemos citar especialmente os métodos de processamento e secagem, os quais estão relacionados com a infestação dos grãos por alta biodiversidade de microrganismos, como fungos, bactérias e leveduras, atuando na decomposição da camada mucilaginosa e polpa no momento do preparo e secagem. Essa incidência de microrganismos pode estar relacionada ou ser a causa das diferenças de qualidade de bebida entre as principais regiões produtoras do Brasil.

As bactérias são conhecidas por atuarem naturalmente nos processos fermentativos, agindo na degradação da mucilagem de cafés cereja, sendo em alguns casos o grupo mais abundante dentre os microrganismos. Elas também possuem um papel importante na produção de metabólitos que podem interferir nas propriedades organolépticas da bebida de café, afetando a qualidade da bebida. Para o aprofundamento de estudos desse sistema biológico, são importantes a utilização de ferramentas da biologia molecular com relação a estudos de população para avaliar a biodiversidade de bactérias epifíticas e endofíticas existentes em frutos e grãos, principalmente com relação a descrição das espécies, obtendo-se grupos de gêneros de bactérias que podem estar envolvidas nos processos de fermentação em café.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi 1) identificar a influência das características do ambiente de cultivo, o manejo de colheita e pós-colheita e da microflora associada aos atributos de qualidade de bebida das dezenove amostras de cafés finalistas da fase estadual do concurso 'Café Qualidade Paraná', edição de 2011; 2) realizar o isolamento bacteriano, a caracterização morfológica e a utilização da técnica molecular PCR-RFLP de bactérias provenientes das amostras de café natural e cereja descascado, finalistas do concurso 'Café Qualidade Paraná' edição 2011.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CENTRO DE ORIGEM, DISPERSÃO GEOGRÁFICA E DIVERSIFICAÇÃO DE *COFFEA* SPP.

O gênero *Coffea* apresenta 103 espécies, sendo 41 da África, 59 de Madagascar e três das Ilhas Mascarenhas (DAVIES et al., 2006). De modo geral, ocorrem espontaneamente ao longo da região tropical central da África, como planta de sub-bosque. A espécie *Coffea arabica* L. que é a de maior importância econômica, apresenta ocorrência geográfica natural numa região restrita, marginal às demais espécies, localizada no sudoeste da Etiópia (SYLVAIN, 1955), no Planalto Boma do Sudão (THOMAS, 1942) e Monte Marsabit do Quênia (ANTHONY et al., 1987; BERTHAUD; CHARRIER, 1988), entre 1.000 e 3.000 metros de altitude (CARVALHO, 1946).

A primeira menção escrita sobre café foi feita no século X por Razes, um médico árabe (SMITH, 1985), mas o cafeeiro só começou a ser explorado a cerca de 1.500 anos atrás, no sudoeste da Etiópia (LEJEUNE, 1958). Plantas de café arábica podem ter sido introduzidas ao Iêmen, já no ano 575 (WELLMAN, 1961) ou apenas de três a quatro séculos atrás (ESKES, 1989).

No final do século XVII, os holandeses da Companhia das Índias Ocidentais começaram a estabelecer plantios comerciais de cafeeiros na Indonésia. Em 1710, uma única planta foi introduzida no Jardim Botânico de Amsterdã provinda de Java (CRAMER, 1913; CHEVALIER; DAGRON, 1928; CARVALHO, 1946). Algumas mudas obtidas desse cafeeiro foram levadas para o Suriname em 1714 de onde, em 1720, um francês chamado Morgues conseguiu sementes e cultivou na Guiana Francesa, onde a cultura prosperou rapidamente ao redor de Caiena (CHEVALIER; DAGRON, 1928).

Todas essas introduções constituem a base genética de origem da maioria das cultivares de arábica comercialmente cultivadas em todo o mundo, sendo a primeira descrita como *C. arabica* 'Typica' Cramer. A segunda, descrita como *C. arabica* 'Bourbon' (B. Rodr.) Choussy, foi originada a partir de cafeeiros introduzidos a partir de Moca (Iêmen) para a Ilha Bourbon, atualmente chamada de Ilha Reunião, em 1715 ou 1718 (HAARER, 1956). Essas duas cultivares constituem a base genética de todas as cultivares usadas comercialmente no Brasil e outros

países que cultivam *C. arabica* (KRUG; MENDES; CARVALHO, 1938; CARVALHO; FAZUOLI, 1993).

No Brasil o cafeeiro foi introduzido em 1727 pelo sargento-mor Francisco de Mello Palheta, que trouxe cinco mudas e uma pequena quantidade de sementes da Guiana Francesa, estabelecendo uma pequena lavoura no Pará (IBC, 1981; ORMOND; PAULA; FAVERET FILHO, 1999). Posteriormente, a planta foi levada para o Maranhão, seguindo para as regiões Sudeste e Sul (AMARAL, 1925), sendo que em 1825, o suprimento mundial era feito pela Américas Central e do Sul, e o Brasil passou a ser o maior exportador desse produto (FERRÃO et al., 2007). É interessante ressaltar que o ciclo do café foi implantado no Brasil, após os ciclos do ouro e da cana-de-açúcar, explorando terras virgens e usando mão-de-obra escrava e posteriormente a de colonos imigrantes (MOREIRA, 2009).

O cafeeiro arábica é cultivado em muitas partes do mundo, nas Américas Central e do Sul, na África, na Ásia e na Ocenia (FAOSTAT, 2014). Aproximadamente 70% do café comercializado no mundo provêm de cultivares de *C. arabica* L., reconhecida pela qualidade potencial de sua bebida, enquanto que 30% provêm de *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner, utilizado para compor *blends* (MATIELLO et al., 2002; MONDEGO et al., 2011). O agronegócio café é uma atividade das mais importantes e ainda muito promissora. Atualmente o setor econômico mundial chega a movimentar em torno de 90 bilhões de dólares por ano, e o setor social, é responsável por empregar cerca de 500 milhões de pessoas, da produção ao consumo final (SILVA, 2007; SILVEIRA et al., 2013).

2.2 TAXONOMIA E ASPECTOS BOTÂNICOS DE *COFFEA ARABICA* L.

A primeira descrição botânica de café foi realizada em 1713 por A. de Jussieu, o qual estudou uma única planta originada do Jardim Botânico de Amsterdã, o qual denominou a planta como *Jasminum arabicanum*. Posteriormente, Linnaeus classificou e separou o gênero *Coffea*, dando a denominação atual para a espécie *Coffea arabica* (CHARRIER; BERTHAUD, 1985).

O cafeeiro pertence ao gênero *Coffea* (família *Rubiaceae*, subfamília *Cinchonoideae*, tribo *Coffeae*), o qual compreende 103 espécies (BERTHAUD; CHARRIER, 1988; DAVIES et al., 2006). O grupo foi dividido por Bridson (1982) em dois gêneros, *Psilanthus* Hook. f. e *Coffea*. Considerando a classificação

taxonômica atual de *Coffea arabica* L., essa pertence a classe Dicotyledonea; ordem Rubiales; família Rubiaceae; gênero *Coffea*; seção *Eucoffea*; subseção *Erithrocoffea* (CHEVALIER, 1942).

Na literatura são citadas muitas espécies de cafeeiros pertencentes ao gênero *Coffea*, sendo a produção comercial da cultura no mundo quase exclusivamente (cerca de 99%) relacionada a duas espécies, *C. arabica* e *C. canephora* (AGUIAR, 2001). Campa et al. (2004) cita que *C. arabica* é considerada a espécie preferida do gênero *Coffea* devido a melhor qualidade de bebida.

As demais espécies como *C. liberica*, *C. racemosa*, *C. eugenoides*, *C. congensis*, *C. stenophylla* e *C. salvatrix*, entre outras, são de grande importância nos programas de hibridação e de melhoramento genético, pela transferência de alelos responsáveis por características agrônomicas desejáveis, relacionadas principalmente a tolerância a seca e a resistência à pragas e doenças, para as cultivares mais utilizadas (CARVALHO, 1946; KRUG; CARVALHO; MENDES, 1951).

Com relação aos aspectos botânicos e morfofisiológicos, *C. arabica* L. é descrito como sendo um arbusto perene com altura variável e copa cilíndrica, raiz profunda, apenas um caule cilíndrico (ramo ortotrópico) composto por ramos plagiotrópicos. As folhas são verde escura brilhantes na face adaxial, oblongo-elípticas, sendo sua flor de corola branca, aromática, com frutos vermelhos ou amarelos (elipsóides ou oblongos) (MELO; SOUZA, 2011; SILVA, 2011).

A espécie *C. arabica* L. é tetraplóide, apresentando $2n = 44$ cromossomos (GELETA et al., 2012), autógama (MURTHY e NAIDU, 2012), reproduzindo-se predominantemente por autofecundação. As demais espécies são diplóides e auto-incompatíveis. *C. arabica* quando comparada a *C. canephora*, é descrita como uma planta menor, com menos vigor e seus grãos possuem metade do teor de cafeína, apresentando bebida de qualidade superior (DAMATTA et al., 2007).

As cultivares brasileiras são provenientes da base genética do Typica (MELLO AYRES, 1954; DEDECCA, 1957), Bourbon (KRUG; ANTUNES FILHO, 1950), Sumatra e do cruzamento com híbridos interespecíficos de *C. arabica* e *C. canephora* resistentes à ferrugem, conhecido com Híbrido de Timor. A variedade Caturra, a qual é resultante da mutação do Typica para porte baixo (KRUG; MENDES; CARVALHO, 1949; CARVALHO; MONACO, 1972; CARVALHO et al., 1984), a Maragogipe (KRUG; CARVALHO, 1942), a Mundo Novo

(CARVALHO; FAZUOLI, MAZZAFERA, 1988) e Catuaí (CARVALHO; MONACO; FAZUOLI, 1979), juntamente com algumas mutações ocorridas na Typica e o cruzamento com híbridos são a base na composição genética das principais cultivares usadas atualmente.

2.3 CAFEICULTURA BRASILEIRA

O café no Brasil destaca-se econômica e socialmente desde a chegada das primeiras mudas, vindas da Guiana Francesa, em meados do século XVIII (BRASIL, 2014). Diante de sua rápida adaptação aos fatores edafoclimáticos do país, o produto adquiriu importância na história e no mercado, sustentando o Império e na República, até hoje gerando divisas significativas para a economia do Brasil (MARTINS, 2008), transformando-se em um dos principais itens de exportação até os dias atuais. O café é um produto agropecuário de *commodity* que na comercialização mundial fica atrás somente do petróleo (CCCC, 2008).

O Brasil é o maior produtor e exportador e segundo maior consumidor mundial de café (KAWASAKI, 2009), sendo responsável por, aproximadamente, 25% da produção mundial (COVRE et al., 2013; ICO, 2013; SCALON et al., 2011). Produto de exportação, a cultura do café movimenta mundialmente, por ano, cerca de 35 bilhões de dólares. Conforme relata Siqueira (2005), em termos de importação, a Comunidade Econômica Européia é o principal importador mundial de café desde 1967. Já os Estados Unidos é o país que mais consome este produto, chegando a responder por 27,2% das importações mundiais (FASSIO; SILVA, 2007). Nesse âmbito, a cadeia produtiva do café apresenta grande importância não só aos países produtores, mas também aos países importadores, processadores e consumidores (LOUREIRO; LOTADE, 2005).

De acordo com dados fornecidos pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2014) a área cultivada no país totaliza 2.267.577,8 hectares de café, sendo que desse total 341.504,4 hectares (15,06%) estão em formação e 1.926.073,4 hectares (84,94%) estão em produção, contabilizando em torno de 5,67 bilhões de pés de café. São cerca de 290 mil produtores envolvidos, boa parte em pequenas propriedades rurais, distribuídas em 1.900 municípios brasileiros (BRASIL, 2014).

Dentre os principais estados produtores na safra 2012/2013 estão Minas Gerais, que produz mais de 50% da produção nacional, São Paulo (4.010,1 sacas beneficiadas), Bahia (1.803,3), Paraná (1.650,0) e Rondônia (1.357,0) (Figura 2.3.1). Somadas as espécies *C. arabica* e *C. canephora*, o país deverá produzir na safra 2015/2016 cerca de 2,6 milhões de toneladas, ou seja, 43,9 milhões de sacas de 60 kg de café em grãos beneficiados (IBGE, 2015). No país o *C. arabica* representa 72,4% da produção total, enquanto o *C. canephora* fica com 27,6% (CONAB, 2014).

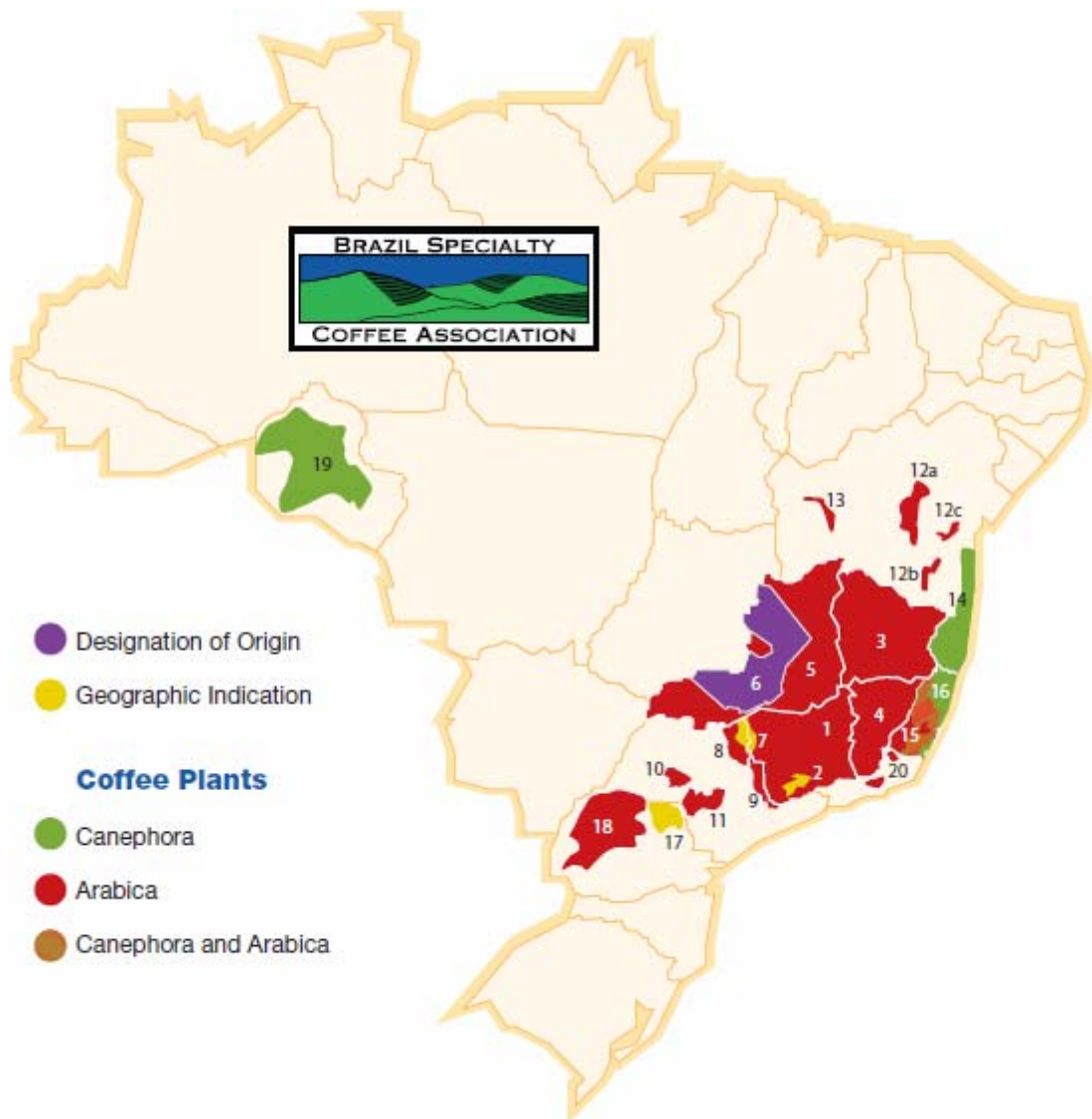
No ranking de produção, independente da espécie, o primeiro e segundo estados produtores de café no país são: Minas Gerais com a espécie *C. arabica* L., predominando em 98% no estado, totalizando 1.245.710 hectares de área plantada, sendo responsável por cerca de 52% da produção de café no país; e o Espírito Santo, maior produtor da espécie *C. canephora*, com a segunda maior área plantada, totalizando 488.583 hectares (cerca de 27% da produção brasileira), 310.088 ha com *C. canephora* (CONAB, 2014).

A cafeicultura, como atividade do setor agropecuário, desempenha função de vital relevância para o desenvolvimento social e econômico do Brasil. Fassio e Silva (2007) ressaltaram que é notório o destaque de todo o sistema agroindustrial do café em termos de uso de mão-de-obra e fixação do homem ao campo, geração de emprego nos setores à montante e à jusante da produção primária, bem como em termos de obtenção de divisas externas e arrecadação de impostos.

Nesse contexto, a cultura do café emprega direta ou indiretamente cerca de oito milhões de trabalhadores no País, proporcionando renda, acesso à saúde e à educação a suas famílias (BRASIL, 2014; EMBRAPA, 2005). Silveira et al. (2013) citaram que a agricultura familiar é responsável por 38% da produção de café no Brasil, concentrada nos seis principais estados produtores.

Os fatores que influenciam na produtividade dos cafezais, no Brasil, são principalmente econômicos conjunturais, climáticos (efeito da temperatura, restrição hídrica, geadas e veranicos) e referentes ao manejo da cultura (CONAB, 2014). Dessa forma, Genari (1999) citou que a realidade da cafeicultura brasileira indica que a agroindústria nacional tem capacidade de abastecer os mercados, interno e externo, com produtos de qualidade.

Figura 2.3.1. Mapeamento das principais regiões brasileiras produtoras de café. **Minas Gerais** (Sources: IMA, APROCAM, INPI, EMATER-MG, Federação dos Cafeicultores do Cerrado), 1. Sul de Minas, 2. Mantiqueira de Minas (Geographic Indication), 3. Chapada de Minas, 4. Matas de Minas (Montanhas de Minas), 5. Cerrado de Minas, 6. Cerrado Mineiro (Designation of Origin); **São Paulo e Minas Gerais** (Sources: INPI, AMSC), 7. Alta Mogiana (Geographic Indication); **São Paulo** (Sources: Câmara Setorial do Café, IAC, CIIAGRO), 8. Mogiana, 9. Média Mogiana, 10. Marília e Garça, 11. Ourinhos e Avaré; **Bahia** (Source: SEAGRI), 12. Planalto Baiano: a. Chapada Diamantina, b. Planalto de Vitória da Conquista, c. Serra de Itiruçu/Brejões, 13. Cerrado Baiano, 14. Atlântico Baiano; **Espírito Santo** (Source: CETCAF), 15. Montanhas do Espírito Santo, 16. Conilon Capixaba; **Paraná** (Sources: EMATER-PR, INPI, AMUNOP, AMUNORPI), 17. Norte Pioneiro do Paraná (Geographic Indication), 18. Paraná; **Rondônia** (Source: EMATER-RO), 19. Rondônia; **Rio de Janeiro** (Source: CCCRJ), 20. Rio de Janeiro.



FONTE: BSCA (2014) (Sources: MAPA, CONAB e Embrapa Café).

O Brasil apresenta notável diversidade no cinturão cafeeiro, tanto nos modelos tecnológicos, como na qualidade (KAWASAKI, 2009). Devido essas características distintas nas diferentes regiões cafeeiras, obteve-se o registro de Denominação de Origem e de Indicação Geográfica para duas regiões produtoras.

Segundo INPI (2014) as Denominações de Origem e as Indicações Geográficas são modalidades de propriedade industrial distinta. Para que determinado produto possa ser protegido como Denominação de Origem é necessário haver uma maior ligação entre o produto e a região de origem, mas também, às condições naturais, existindo assim, uma interdependência direta entre os fatores naturais e humanos e o produto. As Indicações Geográficas, por sua vez, apresentam requisitos menos exigentes, bastando que a reputação ou uma determinada qualidade, ou uma característica, possam ser atribuídas à origem geográfica, sem influência dos fatores naturais e humanos, devendo-se ocorrer, pelo menos, a produção, transformação ou a elaboração do produto (INPI, 2014).

Na Figura 2.3.1 podemos observar que a região do Cerrado Mineiro possui o registro de Denominação de Origem, esse título foi reconhecido pelo INPI, pois as qualidades e características distintas do produto que é o resultado da influência do meio geográfico, incluindo fatores naturais e humanos foram seletivos na produção de cafés de qualidade superior.

As regiões de Mantiqueira de Minas, Alta Mogiana e o Norte Pioneiro do Paraná (Figura 2.3.1) possuem o registro de Indicação Geográfica, o que atribui identidade própria ao produto ao garantir a origem, os processos de produção e algumas características sensoriais do café produzido nessas regiões, de acordo com as normas estabelecidas para a concessão dos selos de qualidade.

2.3.1 Cafeicultura Paranaense

Há registros datados de 1856, da primeira muda de café plantada no Paraná, no município de Jataizinho, antiga São Pedro de Alcântara, sendo posteriormente implantado o primeiro plantio comercial com cerca de 4.000 pés de café em Tomazina, localizada no Norte Pioneiro, em 1884 pelo Major Tomaz Pereira da Silva (POZZOBON, 2006).

Os primeiros cafezais paranaenses foram cultivados por pioneiros mineiros e paulistas, que chegaram a região através do Rio Itararé, durante a

segunda metade do século XIX, sendo que o cultivo do café poderia não ser o objetivo principal desses pioneiros (BALHANA, 1969). Cancian (1981) defende que a implantação da cafeicultura paranaense foi uma continuação da “marcha para o oeste” da cafeicultura paulista.

Oliveira (2009), mencionou que a princípio, o café invadiu o Norte Pioneiro (Velho), mais precisamente a região de Wenceslau Braz e Jacarezinho, sendo que a partir da segunda metade da década de 1920, expandiu-se para a região algodoeira de Assai. Dessa forma, a cultura do café no Estado foi inserida em meados do século XIX, e teve sua expansão até cerca de 1960, quando o Paraná chegou a cultivar 1,8 milhões de hectares, isso representava aproximadamente, 40% da área cultivada e 50% da produção nacional, correspondendo a 28% da safra mundial (NAGAMATO, 2001). Hoje esse número totaliza uma área cultivada de 58.040 hectares, sendo 23.705 hectares de áreas em formação e 34.335 hectares de áreas em produção (CONAB, 2014).

Essa drástica redução do parque cafeeiro paranaense, ocorreu principalmente devido a severa geada de 1975, e a falta de implantação de tecnologias nos cafezais, obrigando muitos cafeicultores tradicionais a migrarem para outras regiões produtoras do Brasil, ou a se dedicarem a outras culturas, como por exemplo, a soja, o milho e o trigo, o qual apresentam menores riscos de perdas com as geadas.

Tradicionalmente, a espécie cafeeira cultivada no estado do Paraná é a *C. arabica* L. (café arábica) por apresentar boa adaptação na região e melhor qualidade de bebida (ANDRADE et al., 2012). O Paraná é o 5º estado no ranking da produção nacional de café arábica, com 1.650 mil sacas colhidas na safra de 2013 (CONAB, 2014). A área plantada de café no Estado está situada em latitudes próximas ou maiores que a do Trópico de Capricórnio (DAL MOLIN et al., 2008), localizada em grande maioria no norte do estado, onde se destacam duas regiões distintas, a região compreendida por Cornélio Procópio, também chamada de Norte Novo, e o polo de Jacarezinho, denominado de Norte Velho (BLISKA et al., 2009) ou Norte Pioneiro do Paraná, região com denominação de Indicação Geográfica (Geographic Indication).

Dentre as regiões produtoras no estado podemos destacar: Apucarana, Campo Mourão, Cornélio Procópio, Ivaiporã, Toledo, Londrina, Maringá, Paranavaí, Santo Antônio da Platina e Umuarama. Sendo interessante ressaltar, que

em Londrina e Cornélio Procópio estão localizadas as duas maiores indústrias exportadoras de café solúvel do País, a Companhia Cacique de Café Solúvel e a Companhia Iguaçu de Café Solúvel.

A região cafeeira paranaense está localizada em altitudes entre 400 e 1000 metros acima do nível do mar (GAIR, 2012), numa área de transição climática (CARAMORI et al., 2007), com condições térmicas distintas e que apresenta grande diversidade de classes de solo. Tais condições, interferem na formação e maturação dos frutos devido as diferentes durações dos ciclos, alterando, dessa forma, as características intrínsecas do grão, possibilitando assim a obtenção dos mais variados tipos de cafés, com potencial para a exploração de cafés especiais (ANDROCIOLI et al., 2003; CARAMORI et al., 2007).

Silveira et al. (2013) descreveram que a cafeicultura é considerada ainda uma atividade agrícola muito importante no Paraná, pois entra no sistema de diversificação de culturas nas propriedades rurais familiares.

2.3.1.1 Concurso 'Café Qualidade Paraná'

Devido a maior probabilidade de chuvas na época de colheita, o café produzido no Paraná tem, historicamente, sido considerado como de qualidade inferior, quando comparado com outras regiões do Brasil, prejudicando a comercialização e a rentabilidade da cafeicultura no Estado (DAL MOLIN et al., 2003).

Dal Molin et al. (2003; 2008) citaram que essas atribuições devem-se a vários fatores envolvidos, como por exemplo, a falta de planos consistentes para a recuperação do parque cafeeiro após as geadas; a queda no nível tecnológico e de investimentos; o uso inadequado de cultivares para cada região; o sistema de colheita efetuado, predominantemente pela derriça no chão, obtendo-se frutos em diferentes estágios de desenvolvimento; a comercialização, com a prática de venda de café em coco e por quilo/renda, além da maneira tradicionalista do cafeicultor tratar a cultura.

Dentro dessa realidade, foi estruturado em 1999 o programa/concurso 'Café Qualidade Paraná', o qual foi instituído pelo Governo do Paraná (Resolução Estadual SEAB nº 194/96 de 12/09/96), no ano de 2000 (ano da 1ª edição). O programa é organizado pela Secretaria de Estado da Agricultura e do

Abastecimento do Paraná (SEAB) e tem a Câmara Setorial do Café do Estado do Paraná como órgão coordenador (VOIGT-GAIR; MIGLIORANZA; FONSECA, 2013), sendo executado pela Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER/Paraná) e o Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR).

O objetivo do programa/concurso é de motivar e conscientizar o produtor paranaense do potencial da cafeicultura, no que se refere à tecnologia de produção (produtividade/qualidade), incentivando a organização dos produtores, a valorização, a melhor visibilidade na comercialização do produto, melhorando dessa forma a imagem e a qualidade do café paranaense (DAL MOLIN et al., 2003; VOIGT-GAIR; MIGLIORANZA; FONSECA, 2013; VOIGT-GAIR, 2011).

Voigt-Gair, Miglioranza e Fonseca (2013) verificaram que no recebimento das amostras as mesmas são padronizadas e caracterizadas segundo o lote do café inscrito, utilizando a seguinte denominação: categoria (N) café natural (coco) por via seca, no qual o fruto se mantém intacto durante o processo de secagem que pode ser feito em terreiros fixos, suspensos ou em secadores e categoria (CD) café cereja descascado ou despulpado, preparado por via semi-úmida, no qual a casca é retirada e o grão com pergaminho vai para a secagem juntamente com a substância mucilaginosa do mesocarpo.

A comissão avaliadora recebe as amostras selecionadas nas etapas regionais, inicia o preparo para a etapa estadual, no qual as amostras são codificadas e faz-se verificação da classificação por tipo, peneira e umidade, garantindo que a amostra esteja dentro do regulamento (VOIGT-GAIR, 2011). Vencida esta fase as amostras são novamente codificadas e torradas, posteriormente, 8-10 g deste material são triturados e colocados em recipientes de vidro com volume aproximado de 100 mL para a preparação da 'prova de xícara', que é feita com no mínimo cinco xícaras e três provadores treinados (VOIGT-GAIR; MIGLIORANZA; FONSECA, 2013; VOIGT-GAIR, 2011). As amostras recebem notas de 0 a 8 para cada atributo sensorial, em uma escala de pontos de acordo com a BSCA (BSCA, 2014).

A 'prova de xícara' é a análise sensorial que permite avaliar, através das sensações humanas, pelo olfato, gustação e sensação na boca, as características de aroma, gosto e corpo da bebida do café. A empresa que edita os protocolos de análise sensorial de café é a Specialty Coffee Association of America

(SCAA), a qual padroniza a metodologia para a 'Prova de Xícara' (SCAA, 2010; VOIGT-GAIR, 2011).

A análise sensorial dos atributos da bebida de café é realizada em três estágios: olfação, degustação e sensação na boca, no qual os experientes provadores avaliam os lotes mediante a escala de pontos da Associação Brasileira de Cafés Especiais (BSCA), nos quesitos: bebida limpa, doçura, acidez, corpo, sabor, gosto remanescente, balanço e geral, sendo todas as percepções colocadas em forma de notas na 'folha de prova' (VOIGT-GAIR; MIGLIORANZA; FONSECA, 2013; VOIGT-GAIR, 2011; BSCA, 2014).

Atualmente, o 'Café Qualidade Paraná' é citado como um programa que atende as mais variadas tendências de consumo, e que é resultado do novo modelo tecnológico que mudou radicalmente a forma de produzir café no Estado (ARAÚJO; BESSA, 2012).

2.4 QUALIDADE DE BEBIDA DO CAFÉ

O café é uma das bebidas mais populares e das mais consumidas no mundo, atrás somente da água (FERIA-MORALES, 2002). Uma característica interessante é o fato da bebida de café ser consumida, basicamente, devido aos efeitos fisiológicos e psicológicos relacionados à presença de cafeína e, principalmente, pelo prazer e satisfação que seu aroma e sabor são capazes de proporcionar aos apreciadores dessa bebida (GROSCH, 2001).

O segmento de cafés de qualidade diferenciada apresenta crescimento anual de 12%, muito superior quando comparado com 1,5% dos cafés commodities (ILLY, 2006). Dentre os conceitos que englobam a qualidade do café podemos citar as características físicas, químicas e sensoriais dos grãos até as preocupações ambientais e sociais.

A qualidade e propriedades funcionais da bebida do café estão relacionadas com vários compostos químicos de interesse (KITZBERGER et al., 2013; MURTHY; NAIDU, 2012). A composição química dos frutos verdes de café é um dos indicadores utilizados para a avaliação da qualidade da bebida, pois os ácidos clorogênicos, a cafeína, a trigonelina, os aminoácidos e os polifenóis são considerados os principais constituintes que influenciam na qualidade da bebida, embora a participação de todos esses compostos ainda não estejam completamente

esclarecidas (KOSHIRO et al., 2006; SANTOS, 2008). Bona (2008) cita que a composição química dos grãos de café é bastante complexa, sendo que essa complexidade é aumentada durante o processo de torrefação em elevadas temperaturas.

A constituição genética do cafeeiro e a provável interação com o ambiente exercem papel importante nos atributos de qualidade de bebida (PEREIRA et al., 2010). Decazy et al. (2003) ao avaliarem cafés (*C. arabica*) de regiões produtoras distintas em Honduras, consideraram como fatores no estudo a composição química dos grãos, as características agrônômicas, os fatores edafoclimáticos, os parâmetros de torrefação, juntamente com a classificação sensorial da bebida. Os resultados evidenciaram que os cafés de melhor qualidade foram aqueles obtidos principalmente nas altitudes acima de 1.000 metros e onde os índices pluviométricos anuais permaneceram abaixo de 1.500 mm.

As diferenças na composição química de qualidade e aceitabilidade da bebida de café estão relacionados com as condições agrônômicas e ambientais (fatores genéticos, altitude, temperatura, demanda hídrica, tipos e níveis de fertilização, a maturação dos grãos), de colheita e pós-colheita, processo de torrefação, moagem e o preparo da infusão (ARCILA; VALÊNCIA, 1975; KITZBERGER et al., 2013; LEROY et al., 2006). Murthy, Basavaraj e Naidu (2001) observaram que os frutos verdes, imaturos e 'passados' afetaram a qualidade final da bebida, enquanto Favarin et al. (2004) citaram que cuidados com a colheita e o manejo pós-colheita são fundamentais para se obter café de qualidade superior.

No Brasil, a qualidade do café é determinada por meio de três classificações principais: 1) tamanho ou peneira dos grãos; 2) número de defeitos ou tipo e 3) qualidade da bebida (MAPA, 2003; JUNIOR et al., 2003).

A determinação da qualidade da bebida é considerada o parâmetro mais importante no caso do café (FERIA-MORALLES, 2002). Conhecida como análise sensorial, é realizada segundo o sabor, corpo e o aroma (entres outras características) que o café apresenta na 'prova de xícara', sendo realizada por provadores treinados para diferenciar os cafés, segundo seus sentidos (BSCA, 2014). Malta et al. (2008) descreveram que a classificação do café pela bebida é um trabalho que exige conhecimento, prática, aptidão sensorial e boa memória, afim de se perceber com precisão as variações que ocorrem na qualidade.

Lazzarini e Moraes (1958) em um dos trabalhos pioneiros já associavam negativamente a influência de grãos deteriorados na qualidade da bebida de café. Pereira (2008) cita que aquelas de melhor qualidade são obtidas ao se processar o fruto no estágio de maturação cereja, nesse estágio de maturação o fruto se encontra com a composição química adequada para obtenção de cafés de qualidade superior. A qualidade da bebida determina o valor do lote para a comercialização, a valorização do produto com qualidade superior no mercado é estimada em até 40% (GENARI, 1999).

O estudo das interações da atividade microbiana e o seus efetivos controles, contribui para a melhoria da qualidade da bebida. A condição de excelência é uma exigência da cafeicultura nacional, para atender as demandas dos mercados interno e externo. Nesse contexto, a regionalização da qualidade do produto, como estratégia de 'marketing', deve ser consolidada em bases precisas e científicas (GENARI, 1999).

De acordo com a Tabela Oficial de Classificação pela Bebida, o café é classificado e comercializado em sete categorias pela 'prova de xícara': 'estritamente mole', 'mole', 'apenas mole', 'dura', 'riado', 'rio' e 'rio zona', sendo que os quatro primeiros são considerados bebidas finas e os três últimos como cafés de menor qualidade (POLTRONIERI; MARTINEZ; CECOM, 2011; MAPA, 2003). Este é o método de determinação mais utilizado no País (MAPA, 2003).

Dentre todos os componentes envolvidos na expressão final da qualidade do café, a importante participação de microrganismos na produção de compostos precursores, que irão resultar em compostos relacionados com o aroma e o gosto no café processado deve ser considerada. Pois esses compostos são os responsáveis por conduzirem processos fermentativos, determinantes de qualidade, relacionados à produção de componentes de *flavour*, como por exemplo, em produtos como vinho, vinagre, cerveja, vegetais fermentados e produtos lácteos e cárneos (LONGO; SANROMÁN, 2006; SANTOS, 2008).

2.4.1 Microrganismos na Fermentação e Qualidade de Bebida

A biodiversidade microbiana presente nos frutos de café e grãos depende de vários fatores, dentre eles a cultivar de café, o método de processamento pré e pós-colheita, os fatores ambientais da região em que são

cultivados, como a altitude, umidade, temperatura, e a população de microrganismos existentes no solo (BATISTA et al., 2003; 2009; VILELA, 2011).

Trabalhos pioneiros realizados por Agate e Bhat (1966) e Van Pee e Castelein (1971), observaram grande número de leveduras atuando na fermentação de frutos de *C. canephora*. Resultados obtidos por Frank, Lum e Dela Cruz (1965), mostraram predominância de bactérias responsáveis pela decomposição da camada de mucilagem de *C. arabica*. Krug (1940; 1941), reporta a ocorrência de microrganismos indesejáveis dos frutos de café, especialmente fungos filamentosos. Enquanto Arunga (1982) relatou os gêneros *Bacillus*, *Erwinia*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* como de importância na fermentação do café.

A polpa de café e sua mucilagem são substratos naturais para o crescimento de microrganismos como as leveduras, as bactérias e os fungos filamentosos que, encontrando condições favoráveis para se desenvolver infectam os frutos e os grãos (SILVA et al., 2013). Tais microrganismos também podem ser aplicados no processamento dos frutos do cafeeiro (RODARTE et al., 2011). Vilela et al. (2010) citaram que os microrganismos estão presentes naturalmente em todas as fases de pré e pós-colheita do café, podendo influenciar na qualidade do produto final. Segundo Taniwaki et al. (2003), a infestação dos grãos de café por microrganismos pode ocorrer nas fases de processamento, principalmente durante a lavagem, fermentação e secagem. A secagem é uma das rotas de infestação por microrganismos, desse modo, o tipo de terreiro usado na secagem é importante na composição da microbiota associada aos grãos de café.

As associações microbianas envolvidas na fermentação de café têm demonstrado serem capazes de degradar os componentes da polpa e mucilagem do fruto, induzindo as transformações bioquímicas necessárias para a fermentação natural. Dessa forma, o conhecimento das espécies microbianas dominantes presentes no café é relevante para todo o processamento da cultura (SILVA et al., 2008; VILELA et al., 2010).

Os fungos se encontram associados aos frutos de cafeeiros durante todo o ciclo produtivo. Vários trabalhos comprovam e buscam compreender a associação existente nos fungos que estão presentes em frutos ou grãos de café (BATISTA et al., 2009; FERREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2000). Estudos também mostraram a incidência de fungos toxigênicos nos frutos de café, os quais liberam micotoxinas, principalmente a ocratoxina A, que podem ser prejudiciais à saúde

humana (BATISTA; CHALFOUN; PRADO, 2001; BATISTA et al., 2003; GOLLUCKE, TANIWAKI e TAVARES, 2004). Alves e Castro (1998) descreveram que a incidência de fungos em café pode estar relacionada ou ser a causa para as diferenças de qualidade de bebida entre as principais regiões produtoras do Brasil.

Silva et al. (2000) avaliando a presença de microrganismos em frutos no estágio cereja, citaram a presença de leveduras, as quais apresentaram características fermentativas, estando dessa forma normalmente relacionadas com o processo de maturação e fermentação dos grãos de café.

Além do café, estudos realizados por Wang et al. (2008), utilizaram microrganismos individuais na fermentação de chás preto e verde, afim de encontrar o microrganismo que possui o melhor efeito sobre o aumento do teor de cafeína.

2.4.1.1 Bactérias e sua influência na qualidade de bebida de café

A presença de bactérias nos frutos e grãos de café e sua atuação no processo fermentativo foi estudada em trabalhos pioneiros realizados por Pederson e Breed, (1946) os quais isolaram *Leuconostoc mesenteroides* e duas espécies de *Lactobacillus* e *Streptococcus faecalis*, porém esses autores descartavam o possível envolvimento das bactérias com a decomposição da camada mucilaginosa dos grãos. Vaughn et al. (1958) isolaram bactérias do grupo coliforme e espécies pectinolíticas de *Bacillus* em café brasileiro e comprovaram que o número destes microrganismos aumentou significativamente durante a fermentação, de uma população inicial de 10^2 - 10^3 UFC/g para 10^9 UFC/g, após 24 horas de fermentação.

Estudos realizados por Pee e Castelein (1972) demonstraram que bactérias isoladas de café natural fermentado não apresentaram a capacidade de degradar substâncias pécnicas. Enquanto Frank, Lum e Dela Cruz (1965) concluíram que *Erwinia dissolvens* foi a principal responsável pela degradação da mucilagem de cafés cereja.

Estudos de diversidade de microrganismos em frutos de café cereja, relataram que na fase de secagem, as bactérias são o grupo mais abundante nos frutos, seguindo-se dos fungos filamentosos e das leveduras (SAKIYAMA, 2001; SILVA et al., 2000). Alguns trabalhos publicados já comprovaram a presença de grandes quantidades de bactérias epifíticas e endofíticas de ocorrência natural em vários estádios de desenvolvimento em frutos de café (AVALLONE et al., 2001;

GENARI, 1999; RODARTE et al., 2011; SANTOS, 2008; SILVA et al., 2000; SILVA et al., 2008; VILELA et al., 2010).

Alguns microrganismos epifíticos e endofíticos de ocorrência natural em frutos de café (como as bactérias) desempenham um papel importante na produção de metabólitos secundários que interferem positiva ou negativamente na qualidade da bebida (SANTOS, 2008). As bactérias habitam naturalmente os tecidos de plantas saudáveis, incluindo seus frutos (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997), principalmente os maduros, os quais se constituem em excelente meio que favorece o crescimento do microrganismo, devido a presença de compostos como açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos, trigonelinas, entre outros.

Jimenez-Salgado et al. (1997) estudando o isolamento de microrganismos endofíticos em café, observaram a ocorrência de bactérias diazotróficas nos frutos e caracterizaram os isolados como pertencentes à espécie *Acetobacter diazotrophicus*.

Genari (1999) observando as características de crescimento e produção de pectinases por *Klebsiella oxytoca* isolada de frutos de café relatou que a presença desse microrganismo na planta, bem como o efeito de suas atividades, pode vir a contribuir para o desenvolvimento da melhoria da qualidade da bebida do café. Enquanto Vega et al. (2005) avaliando a diversidade de bactérias endofíticas isoladas de folhas, ramos, frutos e raízes de café, concluiu que 44% dos isolados foram obtidos a partir dos frutos, sendo que, dos 87 diferentes isolados cultiváveis, houve predomínio dos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Stenotrophomonas*.

Estudos realizados nos últimos 15 anos resultaram no isolamento de bactérias dos gêneros *Aeromonas*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* (SILVA et al., 2000), e das espécies *Erwinia herbicola*, *Klebsiella pneumoniae* e *Lactobacillus brevis* (AVALLONE et al., 2001; 2002); *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. macerans*, *B. polymyxa* e *B. megaterium* (SILVA et al., 2008); *Enterobacter agglomerans* e *Lactobacillus plantarum* (VILELA et al., 2010).

Pesquisas relataram a diversidade existente de microrganismos associados aos frutos de *C. arabica*. Dessa forma, avaliações complementares das espécies de interesse que possam sintetizar ou transformar compostos responsáveis pelo sabor e aroma na bebida, que apresentem valor para produção comercial de cafés de qualidade superior, são de fundamental importância para a cadeia

produtiva da rubiácea no Brasil. Além disso, o fato do Brasil ter reduzido consideravelmente o número de exportações para países que tem investido em cafés que apresentem qualidade superior na bebida, justifica os estudos pela melhoria do produto.

3 ARTIGO A

AMBIENTE DE PRODUÇÃO, MANEJO DE COLHEITA, PÓS-COLHEITA, MICROFLORA ASSOCIADA AOS GRÃOS E ATRIBUTOS DA QUALIDADE DE BEBIDA DE CAFÉS

3.1 RESUMO

Resumo: A incidência de microrganismos nas fases de pré e pós-colheita dos grãos de café, também, estão relacionadas à qualidade de bebida. Dessa forma, o trabalho buscou identificar a influência das características do ambiente de cultivo, o manejo de colheita e pós-colheita e da microflora associada aos atributos de qualidade de bebida de amostras de cafés. Para isso foi aplicado um questionário aos produtores finalistas do concurso 'Café Qualidade Paraná' e os dados foram correlacionados com a avaliação microbiológica realizada nos grãos de café. Para a classificação no concurso, o café natural recebeu menor nota que o cereja descascado e micro lote. Houve correlação significativa e positiva entre todos os atributos da qualidade da bebida e as altitudes do local de produção das amostras. Nas análises microbiológicas foram observados os seguintes fungos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus flavus*, *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp., *Aspergillus glaucus* e *Aspergillus candidus*, observou-se também a presença de bactérias. Ao correlacionar a contaminação de cada amostra com os atributos da bebida dos cafés verificou-se correlações baixas ou inexistentes para a maioria dos microrganismos. Porém, *Penicillium* sp. se correlacionou negativamente com a característica bebida limpa, doçura, corpo, sabor e balanço, enquanto *Alternaria* sp. se correlacionou, também, negativamente com o balanço da bebida dos cafés. Verificou-se que as bactérias se correlacionaram positivamente com a acidez na bebida.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L. Análise microbiológica. Qualidade de bebida.

PRODUCTION ENVIRONMENT, CROP MANAGEMENT, POST-HARVEST, THE ASSOCIATED MICROFLORA GRAINS AND QUALITY COFFEE DRINK

3.2 ABSTRACT

Abstract: The incidence of microorganisms in the pre and post-harvest grains are also related to the quality of drinking. Thus, the study sought to identify the influence of the characteristics of the growing environment, management of harvest and post-harvest and microflora associated with the attributes of quality coffee drink samples. For it was applied a questionnaire to producers finalists of the competition Coffee Quality Parana and the data were correlated with the microbiological assessment carried out of the coffee beans. For classification in the contest, the natural coffee received smaller note than the peeled and micro batch cherry. There has been significant and positive correlation between all cup quality attributes and the altitudes of the local production of the samples. Microbiological analysis the following fungi were observed: *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus flavus*, *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp., *Aspergillus glaucus* and *Aspergillus candidus*, observed if also the presence of bacteria. By correlating the contamination of each sample with the attributes of the coffee drink it has been found low or no correlations for most microorganisms. However *Penicillium* sp. correlated negatively with the characteristic clean drink, sweetness, body, flavor and balance, while *Alternaria* sp. also negatively correlated with the balance of the drink of coffee. It was also found that bacteria were positively correlated with the acidity in drink.

Keywords: *Coffea arabica* L. Microbiological analysis. Quality drink.

3.3 INTRODUÇÃO

Brasil, maior e mais importante país produtor de café do mundo, apresenta notável diversidade no cinturão cafeeiro, tanto nos modelos tecnológicos, como na qualidade (KAWASAKI, 2009). O café produzido no estado do Paraná tem sido considerado de baixa qualidade quando comparado com outras regiões do Brasil, prejudicando a comercialização e a rentabilidade da cafeicultura no estado (DAL MOLIN et al., 2003).

Essa situação está relacionada a fatores como a falta de planos consistentes para a recuperação da área cafeeira após as geadas; a queda no nível tecnológico e de investimentos; o uso inadequado de cultivares para cada região; o sistema de colheita e pós-colheita efetuado; a comercialização, além da maneira tradicionalista do cafeicultor tratar a cultura (LEROY et al., 2006; DAL MOLIN et al., 2008).

Nesse contexto, o programa/concurso 'Café Qualidade Paraná' foi implantado em 2000, com o objetivo de motivar e conscientizar o produtor paranaense do potencial da cafeicultura no que se refere à tecnologia de produção, incentivando a organização, a valorização, a melhor visibilidade na comercialização do produto, melhorando assim a imagem e a qualidade do café paranaense (DAL MOLIN et al., 2003; VOIGT-GAIR; MIGLIORANZA; FONSECA, 2013).

No concurso, as amostras recebidas são padronizadas e caracterizadas segundo as categorias: natural (N), cereja descascado (CD) e microlote (ML). As mesmas são classificadas por tipo, peneira e umidade e, posteriormente, são analisadas sensorialmente pela 'prova de xícara', segundo metodologia da Specialty Coffee Association of America (SCAA, 2010).

A relação existente entre o ciclo fenológico, as fases de maturação e florescimento, as características da região, e as condições edafoclimáticas onde é cultivado *Coffea arabica* L. (BARDIN-CAMPAROTO; CAMARGO; MORAES, 2012) pode estar altamente associada com a qualidade de bebida produzida.

A incidência de microrganismos nas fases de pré e pós-colheita, também, estão relacionadas à qualidade de bebida do grão, pois os frutos sempre estão expostos a uma grande diversidade, a exemplo de leveduras, fungos e bactérias, que sob condições favoráveis se desenvolvem e infectam os grãos (SCHMIDT; MIGLIORANZA; HOMECHIN, 2010). Trabalhos pioneiros foram

publicados por Camargo (1936), o qual correlacionou o gosto 'ruim' do café com a população microbiana presente nos grãos, e Krug (1941) o qual destacou que, as piores bebidas são as provenientes de frutos com maiores percentuais de microrganismos, principalmente fungos, podendo ser encontrados mesmo no interior dos grãos.

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi investigar a influência das características do ambiente de cultivo, do manejo de colheita e pós-colheita e da microflora associada aos atributos de qualidade de bebida das 19 amostras de cafés finalistas da fase estadual do concurso 'Café Qualidade Paraná', edição de 2011.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi constituído de três etapas principais: 1) a avaliação da qualidade da bebida dos cafés classificados para a fase estadual do concurso 'Café Qualidade Paraná 2011', 2) o levantamento das condições de cultivo e pós-colheita e, 3) a análise microbiológica dos grãos crus das amostras classificadas para a fase final do concurso.

3.4.1 Avaliação da Qualidade de Bebida

Inicialmente, para o concurso 'Café Qualidade Paraná 2011', foram realizadas etapas regionais para seleção das melhores amostras. As quais foram classificadas para a etapa estadual, para que as premiações não se concentrassem em uma ou poucas regiões produtoras do Estado. São três as categorias avaliadas no concurso, na primeira concorrem os produtores que produzem café Natural (N), por via seca, no qual o fruto se mantém intacto durante o processo de secagem que pode ser em terreiros fixos, suspensos ou em secadores; na segunda, os cafés do tipo Cereja Descascado/Despolpado (CD) o qual é preparado por via úmida, ou seja, é retirada a casca e somente o grão com pergaminho e a mucilagem vai para a secagem (BRASIL, 2003); e na terceira os cafés de Micro Lote (ML), produzidos por pequenos agricultores, tanto do tipo N quanto CD. As amostras são então classificadas por tipo, peneira e umidade.

No ano de 2011, 19 amostras totais de cafés foram selecionados para a etapa final que ocorreu no Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR) no dia 25

de outubro de 2011. Na etapa final foram premiados os cafés do primeiro ao quarto lugar de cada categoria.

As avaliações foram realizadas por no mínimo três degustadores oficiais, através de análise sensorial denominada 'prova de xícara' segundo metodologia da Specialty Coffee Association of America - SCAA (SCAA, 2010). Os atributos avaliados foram: bebida limpa, doçura, acidez, corpo, sabor, gosto remanescente, balanço e geral. Cada um dos atributos recebeu uma nota até oito, somam-se os valores de todos as características, acrescentando-se 36 para obter a nota final do café, utilizando para isso a folha de prova oficial da Associação Brasileira de Cafés Especiais – BSCA.

3.4.2 Caracterização das Amostras de Café

Para a caracterização edafoclimática, de cultivo e de colheita foi aplicado um questionário aos 19 produtores finalistas do concurso. As questões abordadas foram: 1) Município que se localiza a propriedade; 2) Cultivar do café utilizado para o concurso; 3) Altitude média do talhão de café; 4) Tipo de solo; 5) Realização ou não da análise química do solo e/ou foliar; 6) Idade do cafezal; 7) Tipo de secagem; 8) O café passou por separação no tanque de lavagem; 9) A colheita foi realizada no pano; 10) A colheita foi seletiva.

3.4.3 Análise Microbiológica dos Grãos

A avaliação microbiológica dos grãos verdes foi realizada no Laboratório de Fitopatologia de Universidade Estadual de Londrina, nos meses de junho e julho de 2012. Foi utilizado o método do blotter test (papel de filtro), que consistiu na incubação dos frutos beneficiados em caixas plásticas tipo Gerbox[®], contendo uma folha de papel de filtro esterilizada e umedecida com água destilada e esterilizada, incubadas por sete dias, sob condições de temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) em regime alternado de luz (12/12 horas).

Foram avaliadas dez repetições para cada amostra com vinte grãos de café cada, escolhidos aleatoriamente. As avaliações foram realizadas no sétimo dia da incubação com observação dos microrganismos presentes desenvolvidos

sobre os grãos, sob microscópio estereoscópico e a identificação com base na visualização das estruturas vegetativas, reprodutivas e colônias.

Nos casos duvidosos foram preparadas lâminas para observação ao microscópio ótico baseada na classificação descrita por Barnett e Hunter (1972). Adotado esse procedimento, foi anotada a quantidade de grãos contaminados com cada gênero de fungo identificado e/ou bactéria e, posteriormente, os números foram transformados para percentuais de contaminação.

Para verificar a influência do cultivo, manejo na colheita e da infecção por microrganismos nos atributos de bebida dos cafés foi realizada a Análise de Correlação de Spearman com nível de significância de 5%.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3.5.1, são apresentados os resultados da ‘prova da xícara’ dos cafés finalistas do concurso ‘Café Qualidade Paraná 2011’. Pode-se verificar que os valores dos atributos são semelhantes, pois todos os participantes foram vencedores nas etapas regionais, inclusive entre as três categorias, assim não se verifica variações expressivas. A maior e a menor nota foram atribuídas a cafés da categoria ML, sendo 85,9 e 72,7 respectivamente.

Dentre as classificações por categoria, sempre o ML obteve as maiores notas e o N as mais baixas, isso se repete quase que invariavelmente para os oito atributos avaliados. Esse fator pode estar relacionado a secagem natural ser realizada pela exposição do café ao sol em terreiros, onde pode ocorrer maior contaminação por microrganismos e fermentação, afetando a qualidade final da bebida de café.

Comparando as categorias ML e N, dentro da mesma classificação, observa-se que do primeiro ao quarto classificados a categoria N teve a nota reduzida pela doçura, acidez, sabor e geral. A partir do terceiro classificado, além destes quatro atributos, a bebida limpa e o gosto remanescente, também, contribuem para reduzir a nota da categoria N. No caso dos classificados em quarto lugar, além dos seis atributos citados anteriormente, foram os atributos corpo e balanço os responsáveis pela diminuição da nota da categoria N em relação à ML (Tabela 3.5.1).

Tabela 3.5.1 – Classificação dos cafés finalistas do concurso ‘Café Qualidade Paraná 2011’ e nota de seus respectivos atributos de qualidade de bebida. Londrina, 2015

Amostras finalistas	Tipo	Nota	Bebida limpa	Doçura	Acidez	Corpo	Sabor	Gosto			Classificação
								remanescente	Balanço	Geral	
01	N	84,1	6,8	5,8	6,0	5,9	5,9	5,9	5,8	4,8	1
02	CD	84,8	6,2	6,2	6,3	5,8	6,3	6,0	5,8	6,1	1
03	ML	85,9	6,8	6,3	6,2	5,8	6,3	5,8	6,0	6,6	1
04	N	82,4	6,0	5,9	5,8	5,8	5,5	5,7	5,8	6,1	2
05	CD	82,8	5,8	6,0	6,3	5,5	5,8	5,7	5,8	5,8	2
06	ML	83,5	6,0	6,2	6,0	5,8	5,8	5,7	5,8	6,2	2
07	N	79,2	5,3	5,2	5,3	5,7	5,3	5,3	5,5	5,5	3
08	CD	79,8	5,5	5,7	5,3	5,2	5,5	5,3	5,7	5,7	3
09	ML	83,4	6,3	6,2	6,3	5,7	5,8	5,5	5,5	6,1	3
10	N	74,3	5,0	4,8	4,7	4,8	4,8	4,7	4,7	4,8	4
11	CD	81,5	5,7	5,5	5,5	5,3	5,3	5,3	5,3	5,6	4
12	ML	82,3	5,8	6,0	5,8	6,0	5,8	5,6	5,7	5,8	4
13	ML	79,8	5,7	5,5	5,3	5,5	5,2	5,2	5,8	6,2	Desc.
14	ML	78,7	5,4	5,5	5,6	5,3	5,3	5,1	5,2	5,3	Desc.
15	ML	72,7	4,5	4,4	4,7	4,8	4,5	4,5	4,7	4,7	Desc.
16	ML	78,2	5,4	5,3	5,1	5,3	5,1	5,1	5,6	5,4	Desc.
17	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Desc.
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Desc.
19	CD	85,7	6,3	6,4	6,3	6,2	6,0	6,0	6,0	7,0	Desc.

Legenda: N (natural); CD (cereja descascado); ML (microlote); Desc. (Desclassificado).

Pelos resultados obtidos, pode-se observar que não existe uma cultivar que se destaque como produtora de café de melhor qualidade entre as demais. Dessa forma, a constituição genética do cafeeiro e a provável interação com o ambiente exercem papel importante nos atributos de qualidade da bebida. Assim, para que a comparação de qualidade seja melhor realizada deve ser utilizada uma mesma cultivar com o fito de minimizar a influência genética (PEREIRA et al., 2010; GAIR, 2012).

As altitudes nas quais foram produzidas as amostras classificadas para a fase estadual do concurso variaram consideravelmente, de 480 à 1200 metros acima do nível do mar (Tabela 3.5.2). Sedyama et al. (2001) não recomendaram o plantio de café arábica em altitude inferior a 500 m ou superior a 1200 m, devido as condições de temperatura que podem ser desfavoráveis. Cafés com melhor qualidade de bebida ocorrem preferencialmente em altitudes mais elevadas (BARBOSA et al., 2011).

Tabela 3.5.2 – Características agronômicas dos cafezais e manejo da colheita dos cafés finalistas do concurso ‘Café Qualidade Paraná 2011’. Londrina, 2015

Amostras finalistas	Município	Cultivar	Altitude	Tipo de solo	Análise química
01	Mandaguari	IPR-106	740	Argisolo	Solo
02	Congonhinhas	IAPAR-59	720	Argisolo	Solo e folha
03	Mandaguari	Obatã	880	Argisolo	Solo e folha
04	Grandes Rios	Catuaí verm.	670	Argisolo	Solo
05	Apucarana	Tupi	800	Argisolo	Solo e folha
06	Londrina	Tupi	1200	Argisolo	Solo e folha
07	Apucarana	Obatã	829	Argisolo	Solo
08	Cambé	Sarchimor am.	670	Argisolo	Solo
09	Santo Antônio da Platina	IAPAR-59	620	Argisolo	Solo
10	Rolândia	Catuaí	600	Argisolo	Solo
11	Grandes Rios	MN e Acaiá	650	Argisolo	Solo
12	Cornélio Procópio	IAPAR-59	660	Argisolo	Solo
13	Jandaia do Sul	IPR-98	700	Argisolo	Solo
14	Grandes Rios	Catuaí e MN	650	Argisolo	Solo
15	Cianorte	MN	500	Arenoso	Solo e folha
16	Jesuítas	IAPAR-59	480	Argisolo	NI
17	Carlópolis	MN e Catuaí	560	Misto	Solo
18	Jesuítas	Tupi 88	500	Argisolo	Solo
19	Curiúva	MN	900	Argisolo	Solo e folha

Amostras finalistas	Idade (anos)	Secagem	Separado lavador	Colheita no pano	Tipo de colheita
01	03	Terreiro	Sim	Sim	Derrixa
02	10	Secador	Sim	Sim	Derrixa
03	03	T. suspenso	Não	Sim	Derrixa
04	05	Terreiro/Secador	Não	Sim	Derrixa
05	05	Secador	Sim	Sim	Derrixa
06	04	Terreiro	Sim	Sim	À dedo
07	04	Terreiro/Secador	Sim	Sim	Derrixa
08	07	T. suspenso	Sim	Sim	À dedo
09	04	Terreiro	Sim	Sim	À dedo
10	12	Terreiro	Não	Sim	Derrixa
11	15-40	T. suspenso/Secador	Sim	Sim	Derrixa
12	10	Terreiro	Não	Sim	Derrixa
13	2-3	T. suspenso	Não	Sim	À dedo
14	15-40	T. suspenso/Secador	Sim	Sim	Derrixa
15	02	T. suspenso/Estufa	Sim	Não	À dedo
16	05	T. suspenso	Não	Sim	Derrixa
17	07	Terreiro	Sim	Sim	Derrixa
18	10	T. suspenso/Estufa	Não	Sim	À dedo
19	12	Terreiro/Secador	Sim	Sim	À dedo

Legenda: MN (Mundo Novo); verm. (vermelho); am. (amarelo); NI (não informado); T. (terreiro).

Das 19 amostras de café classificadas, 17 são originadas de lavouras implantadas em solo de textura argilosa. A idade do cafezal é, em geral, baixa com poucos cafezais com mais de dez anos de implantação, invariavelmente os cafezais com mais de 10 anos usam as cultivares Mundo Novo, Catuaí ou Acaiá, que são suscetíveis à ferrugem do cafeeiro. Todos os produtores, exceto um que não informou, possuem a análise do solo de suas lavouras e seis deles fazem a análise foliar para equilibrar a adubação da lavoura (Tabela 3.5.2).

É interessante notar que, das seis melhores notas obtidas para a qualidade da bebida, quatro provem de lavouras onde, além da análise do solo é feita a análise foliar. Outra característica determinante dos cafeicultores classificados é que 18 dos 19 fazem a colheita no pano.

A análise de correlação de Spearman evidenciou que existe correlação positiva e significativa entre os atributos de qualidade da bebida e a altitudes do local de produção das amostras (Tabela 3.5.3). Estudo realizado por Laviola et al. (2007) mostraram de forma sintética que a elevação do local de cultivo do cafeeiro influencia a alocação de fotoassimilados em frutos e folhas e, que na altitude de 720 m, há antecipação no acúmulo de amido, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e açúcares não redutores em frutos de cafeeiro quando comparados à mesma cultivar estabelecida a 900 metros de altitude. Resultados contrários foram obtidos por Joët et al. (2009) os quais julgaram ser improvável haver uma correlação entre sabor e aroma de café a uma elevada altitude.

Tabela 3.5.3 – Correlação entre altitude e atributos da qualidade da bebida dos cafés finalistas do concurso ‘Café Qualidade Paraná 2011’. Londrina, 2015

Altitude	Nota	Bebida limpa	Doçura	Acidez	Corpo	Sabor	Gosto remanescente	Balanço
Correlação (%)	72,292**	56,837*	64,641**	58,051*	67,789**	68,409**	76,188**	78,496**
Significância	0,0016	0,0216	0,0068	0,0184	0,0039	0,0035	0,0006	0,0003

Legenda: * (p<0,05); ** (p<0,01).

Nas análises microbiológicas foram observados os seguintes fungos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus flavus*, *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp., *Aspergillus glaucus* e *Aspergillus candidus*, e a presença de bactérias e mucor (Tabela 3.5.4). Resultados semelhantes foram encontrados por Schmidt, Miglioranza e Homechin (2010) os quais verificaram maiores percentuais de *Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus flavus* em grãos de café originados de solos basálticos no Paraná, enquanto Silva et al. (2008), ao avaliarem *C. arabica* ‘Acaia’, cultivado no estado de Minas Gerais, observaram nos grãos uma quantidade de *Aspergillus* sp. superior aos dos gêneros *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. e *Cladosporium* sp.

Tabela 3.5.4 – Infecção nas amostras pelos microrganismos e nível de infecção das amostras em porcentagem. Londrina, 2015

Amostras finalistas	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Aspergillus flavus</i>
01	85,0	16,0	22,5	19,0	65,5	1,5	0,0
02	29,5	27,0	46,5	32,0	13,5	3,5	1,5
03	100,0	16,5	12,0	5,0	94,5	0,5	1,5
04	87,0	4,5	21,5	27,0	68,0	2,0	0,5
05	13,0	14,0	54,0	47,0	31,5	1,5	1,0
06	43,0	10,0	11,0	12,0	68,5	3,5	0,0
07	75,5	6,0	18,0	20,0	41,5	3,5	0,5
08	49,0	20,0	32,0	55,0	69,5	5,5	0,5
09	65,0	21,5	23,5	16,0	59,0	3,0	2,5
10	46,5	67,0	100,0	61,0	69,0	3,5	0,0
11	73,0	12,0	77,5	7,5	67,0	1,0	0,5
12	94,5	31,0	19,0	13,5	82,0	1,5	4,5
13	100,0	0,5	92,5	0,5	0,0	0,0	0,0
14	43,5	10,5	47,0	43,5	83,5	2,5	1,5
15	16,5	35,5	76,0	99,5	92,5	0,5	1,0
16	100,0	1,5	35,5	0,0	47,5	0,0	1,0
17	93,5	8,5	20,0	15,5	57,5	0,5	1,5
18	100,0	7,5	6,0	6,0	72,0	0,0	3,5

Amostras finalistas	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Aspergillus glaucus</i>	<i>Aspergillus candidus</i>	Bactérias	Mucor
01	1,0	0,0	2,5	1,5	0,0	0,0
02	1,5	0,0	12,5	0,0	15,5	6,0
03	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0
04	0,0	1,0	0,0	0,0	1,5	0,5
05	1,0	1,5	0,0	0,0	25,0	10,0
06	0,0	1,0	0,0	0,0	4,0	8,0
07	1,5	0,5	2,0	3,0	0,5	1,0
08	5,0	5,5	2,5	8,5	0,0	0,0
09	1,0	1,5	0,5	0,0	3,5	1,0
10	13,5	6,0	1,5	0,0	0,0	0,0
11	0,0	0,0	11,0	0,5	3,0	0,0
12	3,5	2,0	3,5	6,5	0,0	0,0
13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,5
14	4,0	0,0	1,0	3,0	2,5	0,0
15	26,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
16	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17	1,5	2,5	0,0	10,5	1,0	0,0
18	0,0	0,5	0,5	0,0	0,0	15,0

A contaminação microbiológica de cada amostra com os atributos de qualidade sensoriais apresentou correlação negativa e significativa para a maioria dos microrganismos. Porém *Penicillium* sp. se correlacionou negativamente com a nota bebida limpa, doce, corpo, sabor e balanço, enquanto *Alternaria* sp. se correlacionou também negativamente com o balanço da bebida dos cafés (Tabela 3.5.5). *Penicillium* sp. está altamente associado em grãos de café beneficiados (BATISTA; CHALFOUN, 2007), isso ocorre pelo fato de estarem adaptados a ambientes com baixa umidade e poderem crescer em qualquer matéria orgânica que

contenha grau de umidade em equilíbrio com a umidade do ambiente, entre 65 e 90% (PASIN; ALMEIDA; ABREU, 2009).

Tabela 3.5.5 – Correlação entre os atributos da bebida dos cafés finalistas e contaminação microbiológica. Londrina, 2015

Correlação (%)	Nota	Bebida limpa	Doçura	Acidez	Corpo	Sabor	Balanço
<i>Penicillium</i> sp.	-51,565	-58,251	-59,964		-59,023	-50,374	-48,788
Significância	0,0341	0,0141	0,0110		0,0126	0,0392	0,047
<i>Alternaria</i> sp.							-50,71
Significância							0,0377
Bactéria				60,018			
Significância				0,0109			

Assim pode-se considerar que *Penicillium* sp. e *Alternaria* sp. são indesejáveis em cafés de alta qualidade. Desse modo, medidas de precaução na colheita, processamento, transporte e estocagem devem ser realizados para reduzir a infecção por estes microrganismos (BATISTA et al., 2009). Alves et al. (2013) citaram que o processo de secagem é uma etapa fundamental para evitar o ataque de microrganismos e de fermentações que irão comprometer a qualidade do café.

A contaminação por bactéria se correlacionou positivamente com a acidez dos cafés. Contudo, não é possível afirmar que os demais microrganismos avaliados não prejudicaram a qualidade de bebida dos cafés, pois foram avaliados apenas cafés finalistas do concurso estadual, sendo que se houvesse algum prejuízo mais grave à bebida por contaminação microbiológica a amostra não atingiria a fase final do concurso.

3.6 CONCLUSÕES

A altitude do cafezal possui influência com os atributos avaliados da qualidade da bebida.

Houve alta incidência de *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium* sp. em todas as amostras avaliadas.

Penicillium sp. prejudica a qualidade das características bebida limpa, doçura, corpo, sabor e balanço.

Alternaria sp. prejudica o balanço da bebida.

As bactérias aumentam a acidez da bebida, justificando futuros estudos para a elucidação da interação entre esses dois fatores.

4 ARTIGO B

DIVERSIDADE FENOTÍPICA E GENÉTICA DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AOS GRÃOS DE CAFÉS DE BOA QUALIDADE EM REGIÃO SUBTROPICAL ÚMIDA

4.1 RESUMO

Resumo: As bactérias são conhecidas por atuarem naturalmente nos processos fermentativos, agindo na degradação da mucilagem de cafés cereja. O objetivo do trabalho foi realizar a caracterização morfológica e a utilização da técnica molecular PCR-RFLP em bactérias provenientes das amostras de café natural e cereja descascado, do concurso 'Café Qualidade Paraná' edição 2011. Para o isolamento bacteriano, grãos de café moídos foram colocados para enriquecimento em meio líquido Mineral Salt Medium com café por sete dias em shaker de bancada, posteriormente a solução foi plaqueada em meios sólidos MSM + C e Nutriente Ágar. Após crescimento foi observada grande diversidade de bactérias isoladas, onde as mesmas foram repassadas para placas de Petri isoladas. As bactérias foram avaliadas morfológicamente pelas características fenotípicas, segundo a forma, elevação, borda, superfície, cor e tamanho das colônias. Posteriormente, foram realizadas a extração de DNA genômico bacteriano, a amplificação do gene 16S rDNA por meio da técnica de PCR e o uso da técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição, com quatro endonucleases de restrição. Foi observada grande diversidade fenotípica e genotípica entre as bactérias epifíticas e endofíticas isoladas de grãos de *Coffea arabica* L. Sendo isoladas 331 bactérias do meio de cultura NA e 308 do meio de cultura MSM+C. Com relação a caracterização morfológica, as formas mais encontradas foram as puntiformes e circulares, a elevação plana e convexa, a borda das colônias do tipo inteira, a superfície lisa, a coloração branca com tamanhos de colônias que variaram de 2 a 8 mm. Os maiores índices de diversidade Shannon-Wiener e Simpson's foram provenientes de amostras onde foi realizada a secagem do café em terreiro, em que o café não foi lavado e não foi realizada colheita seletiva. A partir das médias dos valores de altitude e os caracteres de qualidade de bebida, para os seis grupos definidos a partir do dendrograma do meio de cultura NA, observou-se que o grupo proveniente de áreas com altitude de 707 metros apresentou os maiores valores quanto às características de bebida do café. Com os resultados obtidos através da técnica PCR-RFLP os perfis de restrição apresentaram grande diversidade. O grande número de fragmentos obtidos, em cada amostra no dendrograma, reflete a diversidade da comunidade microbiana existente em decorrência das diferentes formas de secagem do grão e dos diferentes locais onde *C. arabica* foi cultivado.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. PCR-RFLP. Bactérias. Qualidade de bebida.

PHENOTYPIC DIVERSITY AND GENETICS OF BACTERIA ASSOCIATED WITH GOOD QUALITY COFFEE BEANS IN HUMID SUBTROPICAL REGION

4.2 ABSTRACT

Abstract: Bacteria are known to act naturally in fermentation processes acting in the degradation of mucilage coffee cherries. The aim of the study was the morphological characterization and the use of molecular technique PCR-RFLP in bacteria from samples of natural coffee and pulped, the contest 'Coffee Quality Parana' edition 2011. For bacterial isolation ground coffee beans were placed to enrichment in liquid medium Mineral Salt Medium with coffee for seven days in a bench shaker, then the solution was plated on semi-solid media MSM+C and Nutrient Agar. After growth was observed diversity of isolated bacteria, where they were transferred to single petri dishes. The bacteria were evaluated morphologically by phenotypic characteristics, according to the form, elevation, edge, surface, color and size of the colonies. Subsequently they were performed bacterial genomic DNA extraction, amplification of 16S rDNA by means of PCR and the use of restriction fragment length polymorphism technique with four restriction endonucleases. Great phenotypic and genotypic diversity was observed among the epiphytic and endophytic bacteria isolated from *Coffea arabica* beans L. Being isolated 331 bacteria from the culture medium NA and 308 of MSM+C culture medium. Concerning the morphological characterization, the most frequent forms were punctiform, circular, flat and convex elevation, the edge of the entire colonies type, smooth, white colonies stained with sizes ranging from 2 to 8 mm. The highest Shannon-Wiener's and Simpson diversity index, were obtained from samples where the drying was performed on ground coffee, wherein the coffee has not been washed and selective collection was not performed. From the average of the altitude values and beverage quality traits for the six groups defined from the dendrogram culture medium NA it noted that the group having altitude of 707 meters had the highest values and the characteristics of coffee drink. With the results obtained by PCR-RFLP technique the restriction profiles showed great variability. The large number of fragments obtained in each sample in the dendrogram reflects the diversity of existing microbial community as a result of different forms of grain drying and the different places where *C. arabica* was grown.

Keywords: *Coffea arabica*. PCR-RFLP. Bacteria. Quality drink.

4.3 INTRODUÇÃO

Os microrganismos estão naturalmente presentes em todas as fases dos processamentos de pré e pós-colheita do café e podem influenciar na qualidade da bebida, alterando os aromas e sabores particulares (VILELA et al., 2010). Rodarte et al. (2011) citaram que a polpa de café e a mucilagem são substratos naturais para o crescimento de microrganismos. Essa microbiota epifítica e endofítica encontrada desempenha papel de importância devido à produção de metabólitos secundários (SPECIAN et al., 2014). A biodiversidade microbiana presente nos frutos e grãos de *Coffea arabica* e *C. canephora* depende de fatores como a variedade, o método de processamento, fatores ambientais e da região onde a lavoura foi conduzida (BATISTA et al., 2009).

Estudos de diversidade de microrganismos em frutos de café cereja, relataram que na fase de secagem, bactérias, fungos filamentosos e leveduras podem ser facilmente isolados (SAKIYAMA, 2001; SILVA et al., 2000). Dessa forma, as bactérias são conhecidas por atuarem, naturalmente, nos processos fermentativos, agindo na degradação da mucilagem de cafés cereja, sendo em alguns casos o grupo mais abundante dentre os microrganismos (VILELA, 2011).

Alguns trabalhos publicados já comprovaram a presença de grandes quantidades de bactérias epifíticas e endofíticas de ocorrência natural em vários estádios de desenvolvimento em frutos de café (AVALLONE et al., 2001; GENARI, 1999; RODARTE et al., 2011; SANTOS, 2008; SILVA et al., 2000; SILVA et al., 2008; VILELA et al., 2010). Tendo sido isoladas as bactérias ácido-láticas *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* (PEDERSON e BREED, 1946; VAUGHN et al., 1958), as pectolíticas *Erwinia dissolvens*, *E. herbicola* e *Klebsiella pneumoniae* (AVALLONE et al., 2002; VAN PEE e CASTELEIN, 1972), *Paenibacillus amylolyticus* (SAKIYAMA, 2001), *Klebsiella oxytoca* (VIANA et al., 1997), gênero *Burkholderia* (SANTOS; CRISTALES; MELLADO, 2001) bactérias gram-negativa dos gêneros *Serratia*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* e gram-positiva do gênero *Bacillus* (SILVA et al., 2008), entre *Bacillus subtilis* 333, *Tatumella ptyseos* e *B. megaterium* 817 (RODARTE et al., 2011). Também foram isoladas espécies de leveduras como *Pichia kluyveri* e *Pichia anomala* (MASOUD et al., 2004).

Existem crescentes preocupações com a eficácia nas técnicas de identificação microbiana, porém podem ser utilizadas uma combinação de técnicas morfológicas, bioquímicas e moleculares baseadas em biologia molecular para a correta caracterização dos isolados (VILELA et al., 2010). Técnicas baseadas na utilização de marcadores moleculares vem sendo disseminadas para os estudos de diversidade genética em um grande número de microrganismos (STRALIOTTO e RUMJANEK, 1999). Dessa forma, a atividade e identificação da microbiota pode ser melhor estudada com o uso de técnicas e métodos moleculares disponíveis, com vista também à melhoria do padrão de qualidade de bebida do café.

Técnicas de Biologia Molecular permitem a caracterização mais precisa das bactérias e estirpes, como a extração de DNA, PCR (SAIKI et al., 1988), RFLP (LAGUERRE; MAZURIER; AMARGER, 1992) e eletroforese (KRYNDUSHKIN et al., 2003). Essas técnicas levaram ao rápido acúmulo de dados nas última décadas, aumentando o conhecimento sobre a taxonomia de bactérias.

Uma das técnicas mais utilizadas na Micologia é a amplificação de rDNA pela Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), permitindo à amplificação de regiões específicas do genoma (RIBEIRO et al., 2009). Enquanto que na técnica RFLP o rDNA é digerido com enzimas de restrição, onde cada enzima reconhece sequências específicas de nucleotídeos, assim as diferenças na sequência de rDNA dos indivíduos resulta em fragmentos de tamanhos distintos, que são separados através de eletroforese em gel (CHRIST, 2007).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização morfológica e determinar a diversidade genética pela utilização da técnica molecular PCR-RFLP em bactérias provenientes das amostras de café natural e cereja descascado do concurso 'Café Qualidade Paraná', edição 2011.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no período de janeiro de 2014 a outubro de 2015, no Laboratório de Bioquímica Molecular, vinculado ao Departamento de Biotecnologia do Centro de Ciências Exatas e no Laboratório de Fitopatologia, vinculado ao Departamento de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias, ambos pertencentes a Universidade Estadual de Londrina – PR.

As nove amostras de sementes de café analisadas foram provenientes de sete regiões cafeeiras do estado do Paraná, próximas ao trópico de Capricórnio: Apucarana (23° 33' 03" S 51° 27' 39" W), Cambé (23° 16' 33" S 51° 16' 42" W), Congonhinhas (23° 33' 04" S 50° 33' 13" W), Curiúva (24° 01' 57" S 50° 27' 30" W), Grandes Rios (24° 08' 47" S 51° 30' 23" W), Mandaguari (23° 32' 51" S 51° 40' 15" W) e Rolândia (23° 18' 35" S 51° 22' 09" W).

Os municípios apresentam classificação climática segundo Köppen-Geiger Cfa, subtropical úmido. As amostras são provenientes das utilizadas no concurso 'Café Qualidade Paraná', edição de 2011, sendo usados no estudo os lotes finalistas na classificação dos cafés naturais e dos cafés cereja descascado.

4.4.1 Isolamento Bacteriano

As sementes dos cafés selecionados foram trituradas em moedor de café da Cadence[®], modelo MDR 301, por 2 minutos, posteriormente foram colocadas em recipientes plásticos esterilizados e conservadas, para serem usadas no enriquecimento do meio de cultivo para isolamento das bactérias.

No isolamento, foi utilizado meio de cultura enriquecido MSM (Mineral Salt Medium) + café. Na solução de MSM+C foram utilizados 2,4 g/L de fosfato dissódico (Na_2HPO_4) + 2,0 g/L de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) + 0,1 g/L de nitrato de amônio (NH_4NO_3) + 0,01 g/L de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) + 0,01 g/L de cloreto de cálcio (CaCl_2) + 10 g/L de café verde moído, contidos em Erlenmeyer de 250 mL. A solução foi ajustada para pH de 6,8, sendo esterilizada em autoclave vertical Phoenix Luferco[®]. Para o isolamento de bactérias nas diferentes amostras de café do concurso 'Café Qualidade Paraná 2011', foram adicionados 10 g/L de cada amostra previamente triturada ao meio de cultivo MSM+C esterilizado, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar. Foram realizadas três repetições por amostra. Posteriormente, as soluções foram incubadas em Shaker de bancada, durante o período de sete dias a 30°C com rotação de 100 rpm para o enriquecimento do meio de cultivo com os microrganismos endofíticos e epifíticos presentes nas diferentes amostras analisadas.

Ao final do período de incubação, alíquotas do meio MSM+C enriquecidas foram utilizadas para o isolamento de bactérias, como segue. Foram

empregados dois meios diferentes para o plaqueamento das suspensões, sendo eles: meio MSM + café verde e meio NA (Nutriente Ágar). Para o preparo do meio MSM + café foram utilizados 2,4 g/L de Na_2HPO_4 + 2,0 g/L de KH_2PO_4 + 0,1 g/L de NH_4NO_3 + 0,01 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0,01 g/L de CaCl_2 + 15 g/L de ágar + 10 g/L de café verde moído. O meio NA foi composto por 28 g/L de nutriente ágar Himedia[®]. Os meios foram esterilizados em autoclave vertical Phoenix Lufanco[®] e posteriormente vertidos em placas de Petri.

Previamente ao plaqueamento das amostras enriquecidas sobre os meios de cultivo MSM+C e NA, foi realizada uma diluição seriada das amostras (1:10, v/v) em solução salina esterilizada. Um volume de 9,0 mL de solução salina (8,5 g/L de cloreto de sódio) foi colocada em tubos de ensaio, sendo posteriormente esterilizados em autoclave vertical Phoenix Lufanco[®]. Uma alíquota de 1000 μL do meio enriquecido de cada amostra foi adicionado em cada tubo de solução salina agitando-se vigorosamente a solução, em seguida foram realizadas diluições seriadas das amostras, de 10^{-1} a 10^{-7} . Das suspensões 10^{-5} a 10^{-7} , 100 μL foi inoculado e espalhado com alça de Drigalsky em placas de Petri, contendo os meios de cultura sólidos (NA e MSM+C), com três repetições por diluição. As culturas foram mantidas sob incubação por 72 horas a 29°C, com fotoperíodo de 12 horas em BOD ELETROlab[®], observando-se diariamente a presença ou ausência de crescimento bacteriano pela formação de película próxima à superfície no meio.

Após crescimento foi observado grande diversidade das bactérias nas placas de Petri. Foram utilizadas então as diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , e com auxílio de palitos de madeira esterilizados as mesmas foram repassadas para placas de Petri com os meios MSM+C e NA sólidos, em quadrados de 1 cm^2 marcados com caneta permanente preta e mantidas sob incubação por 72 horas a 29° C, com fotoperíodo de 12 horas em BOD ELETROlab[®], para observação do crescimento das colônias.

Posteriormente, as bactérias foram isoladas em placas de Petri individualmente com os meios MSM+C e NA e mantidas sob incubação por 72 horas a 29° C, com fotoperíodo de 12 horas em BOD ELETROlab[®]. Em fluxo laminar foi retirada uma pequena quantidade de bactérias com auxílio de alça bacteriológica e colocadas em tubos microtubo plástico graduados de 1,5 mL com 50% de água destilada e 50% de glicerol, e mantidas em freezer a -10°C para conservação e posterior avaliações.

4.4.2 Caracterização Morfológica dos Isolados

As bactérias foram avaliadas morfológicamente pelas características fenotípicas, segundo a forma: puntiforme, circular e irregular (Figura 4.4.2.1); elevação: plana, lente, convexa, drop-like, umbanada e umbilicada (Figura 4.4.2.2); borda: inteira, ondulada, filamentosa, lobada, denteada e nenhuma (Figura 4.4.2.3); superfície: rugosa, lisa e papilosa (Figura 4.4.2.4); cor: branco, amarelo, marrom, rosa, verde, cinza, laranja e transparente e tamanho das colônias: < 2 mm, entre 2 a 8 mm e > 8 mm.

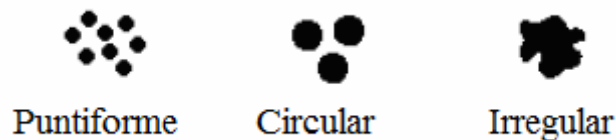


Figura 4.4.2.1 – Classificação que as colônias bacterianas podem apresentar de acordo com a forma

Fonte: COSTA JÚNIOR et al., 2010.



Figura 4.4.2.2 – Classificação que as colônias bacterianas podem apresentar de acordo com a elevação

Fonte: COSTA JÚNIOR et al., 2010.

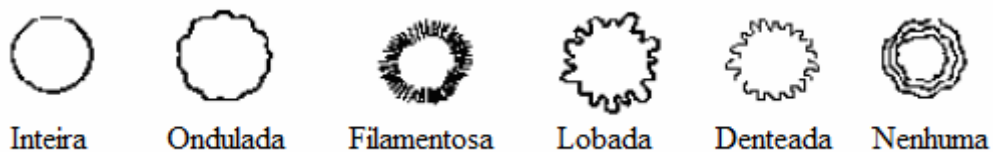


Figura 4.4.2.3 – Classificação que as colônias bacterianas podem apresentar de acordo com a borda da colônia

Fonte: COSTA JÚNIOR et al., 2010.

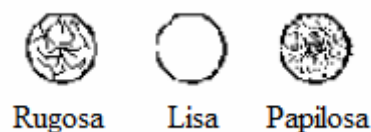


Figura 4.4.2.4 – Classificação que as colônias bacterianas podem apresentar de acordo com o aspectos da superfície da colônia

Fonte: COSTA JÚNIOR et al., 2010.

Os dados morfológicos dos isolados bacterianos, dos meios MSM+C e NA, foram submetidos à análise de agrupamento hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*) utilizando a distância de Jaccard. Também foram calculados os índices de diversidade Shannon-Wiener (H') (MAGURRAN, 1988) e Simpson's (SD) (SIMPSON, 1949). Sendo o primeiro índice obtido pela fórmula pela fórmula: $H' = - \sum (p_i) (\log_e p_i)$, onde $p_i = (n_i / N)$ é a probabilidade de que um indivíduo amostrado pertença a espécie i ; $n_i = n^\circ$ total de indivíduos da espécie i ; $N = n^\circ$ total de indivíduos amostrados na área; a equitabilidade (uniformidade) foi obtida segundo a fórmula: $E' = H' / \log_e S$, onde $S = n^\circ$ de espécies (OLIVEIRA e AMARAL, 2004), enquanto o segundo pela fórmula: $D = 1 - \sum (n_i (n_i - 1) / N(N-1))$, onde n é o número de indivíduos amostrados para a espécie i ; e N é o total de indivíduos amostrados em um levantamento (LIBANO e FELFILI, 2006). Posteriormente os índices foram correlacionados com os dados de qualidade do café por meio da correlação simples de Pearson e canônica. Todas as análises foram realizadas pelo programa computacional R.

4.4.3 Extração do DNA Microbiano

Para extração do DNA foram utilizadas as bactérias que apresentaram maiores variações nas características morfológicas segundo a matriz. Inicialmente, os trabalhos se iniciaram com um total de 120 isolados bacterianos. O procedimento consistiu em multiplicar as células bacterianas colocando 100 μ L da cultura criopreservada em tubos de ensaio no qual continham 5 mL de meio líquido DYGS, constituído por 2 g/L de glicose + 1,5 g/L de peptona bacteriológica + 2 g/L de extrato de levedura + 0,5 g/L de K_2HPO_4 + 0,5 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e incubadas em Shaker de bancada, durante o período de quatro dias a $\pm 30^\circ C$ com rotação de 180 rpm.

O protocolo base utilizado no trabalho foi descrito por Cheng e Jiang (2006). 1000 μ L da suspensão celular foi transferido para um microtubo plástico (1,5 mL Vol.), centrifugado a 12.000 rpm por 2 min e retirado o sobrenadante, deixando apenas o precipitado de células. As células foram adicionadas de 400 μ L de tampão STE (1,0 mL Tris HCl, 1M, pH 8,0 + 0,2 mL EDTA, 0,5 M, pH 8,0 + 2,0 mL NaCl 5M para volume final de 100 mL) sendo então re-suspendido em agitador tipo vortex. Novamente a suspensão foi centrifugada na mesma condição acima. O precipitado

de células foi re-suspendido em 200 μL de tampão TE (1,0 mL Tris HCl, 1M, pH 8,0 + 0,2 mL EDTA, 0,5 M, pH 8,0 para volume final de 100 mL) e agitado em vortex. Tris-fenol saturado (100 μL) foi adicionado a suspensão bacteriana contendo TE e agitou-se rigorosamente em vortex durante 1 min. Posteriormente, centrifugou-se a 16.000 rpm a 5 °C durante 5 min, a fim de separar a fase orgânica da fase aquosa. 160 μL da fase aquosa foi transferido para um novo microtubo plástico e adicionado 40 μL de tampão TE para obter um volume final de 200 μL . Foi adicionado 100 μL de clorofórmio e centrifugado a 16.000 rpm a 4 °C por cinco minutos. Os últimos três passos realizados (transferência de 160 μL , adição de 40 μL de TE e 100 μL de clorofórmio e centrifugação) foram repetidos cerca de três vezes ou até não se observar mais a interface branca de proteína que separa a fase aquosa da fase orgânica. Após as repetições dos processos, foi transferido 160 μL da fase aquosa superior para um novo tubo microtubo plástico e adicionado 40 μL de tampão TE e 5 μL de RNase (10 mg/ μL). Os tubos foram então incubados em banho-maria à 37 °C durante dez minutos para digerir o RNA. Foi adicionado então 100 μL de clorofórmio e centrifugado a 16.000 rpm por cinco minutos. Por fim, foram transferidos 150 μL da fase aquosa para um microtubo plástico limpo e armazenado a -20°C para posterior avaliações.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 0,8%, em uma cuba modelo LCH – 13x15 Loccus Biotecnologia® com uma alíquota de 5 μL de DNA adicionada de 2 μL de tampão de carregamento 6X (0,25% azul de bromofenol, 30% glicerol e TBE 0,5X) e 5 μL de marcador universal (100 ng/ μL) LGC Biotecnologia®, sendo conduzida em tampão TBE 0,5X, a 90 V por 1 hora. Os géis foram corados com brometo de etídeo 0,5 g/mL durante 30 minutos, e descorados em água Milli-Q (2 vezes / 30 minutos). O DNA foi visualizado sob luz UV e a imagem foi documentada em aparelho fotodocumentador Alphamager Mini Cell Biosciences® e analisada através do software Alphamager Mini®.

O DNA foi quantificado por espectrofotometria, usando o equipamento NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Fisher Scientific, EUA).

4.4.4 Amplificação do Gene 16S rDNA

Os DNAs extraídos e quantificados dos microrganismos foram amplificados pela reação de PCR com oligonucleotídeos iniciadores, específicos

para o gene 16S rRNA bacteriano sendo Y1, 5' - TGGCTCAGAACGAAC-GCT GGCGGC - 3' (localização em *Escherichia coli*: bases 8 a 27) e Y3, 5' - CTGACCCCACTTC-AGCATTGTTCCAT - 3', que amplificam praticamente toda a região do DNA (1.500 pares de bases, pb) que codifica o gene 16S rRNA (CHEN et al., 2000).

Nas condições para a reação de PCR foram utilizados: 37,3 µL de H₂O Milli Q estéril, 5 µL de tampão PCR 10X, 1 µL de DNTP (10mM), 2,2 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,5 µL do oligonucleotídeo iniciador P₁ (Y₁ - 20 pmol), 1,5 µL do oligonucleotídeo iniciador P₂ (Y₃ - 20 pmol), 0,5 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL⁻¹) e 1 µL de DNA molde com um volume final de 50 µL.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador, sendo descrito por Young et al. (1991), consistindo de: 1 ciclo inicial de desnaturação a 93°C por 5 minutos; 93°C por 45 segundos, 64°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos, totalizando 35 ciclos e um ciclo de extensão final de 72°C por 5 min. Ao final do programa as amostras permaneceram no aparelho a 4°C até serem retiradas.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,0%, em cuba modelo LCH – 13x15 Loccus Biotecnologia[®] com uma alíquota de 5 µL dos produtos de PCR adicionada de 2 µL de tampão de carregamento 6X (0,25% azul de bromofenol, 30% glicerol e TBE 0,5X) e 5 µL de marcador universal (100 ng/µL) LGC Biotecnologia[®], sendo conduzida em tampão TBE 0,5X, a 90 V por 1:30 h. Os géis foram corados com brometo de etídeo 0,5 g/mL durante 30 minutos, e descorados em água Milli-Q (2 vezes / 30 minutos), e posteriormente, fotografados utilizando o sistema digital. O DNA foi visualizado sob luz UV e a imagem foi documentada em aparelho fotodocumentador Alphamager Mini Cell Biosciences[®] analisada através do software Alphamager Mini[®].

4.4.5 Uso da Técnica de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição

Para o trabalho de RFLP, foram utilizados 5 µL do produto amplificado digeridos com as endonucleases de restrição *EcoRI*, *Ddel*, *MspI* e *RsaI* (Tabela 4.4.5.1). Onde *RsaI* e *EcoRI* foram aplicadas juntas sendo que o mix para cada amostra foi preparado com 0,5 µL de *RsaI* + 0,5 µL de *EcoRI* + 1 µL de 10X Buffer H + 3 µL de H₂O Milli Q Estéril. Para *Ddel* e *MspI* as amostras foram

preparadas de acordo com o designado pelo fabricante. Ao final da mistura, as reações foram centrifugadas por 15 segundos e colocadas em bancada 'over night'.

Tabela 4.4.5.1 – Sítios de corte das enzimas de restrição e suas respectivas cepas padrão

Enzimas	Sítios de corte	Cepa padrão
<i>EcoRI</i>	5' - ...G [↓] AATT C... - 3' 3' - ...C TTAA [↑] G... - 5'	<i>Escherichia coli</i> RY 13
<i>DdeI</i>	5' - ...C [↓] TNA G... - 3' 3' - ...G ANT [↑] C... - 5'	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
<i>MspI</i>	5' - ...C [↓] CGG... - 3' 3' - ...GGC [↑] C... - 5'	<i>Moraxella</i> sp.
<i>RsaI</i>	5' - ...GT [↓] AC... - 3' 3' - ...CA [↑] TG... - 5'	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,0%, com uma alíquota de 5 µL dos produtos de RFLP adicionada de 2 µL de tampão de carregamento 6X (0,25% azul de bromofenol, 30% glicerol e TBE 0,5X) e 5 µL de marcador universal (100 ng/µL) LGC Biotecnologia[®] sendo conduzida em tampão TBE 0,5X, a 90 V por 1:30 h. Os géis foram corados com brometo de etídeo 0,5 g/mL durante 30 minutos, e descorados em água Milli-Q (2 vezes / 30 minutos), e posteriormente, fotografados utilizando o sistema digital.

Um mapeamento dos sítios de restrição para cada enzima utilizada foi realizada com o intuito de individualizar e permitir a construção de uma matriz geral dos estados dos caracteres, sendo a presença ou ausência de sítios de restrição (AMORIM, 1997; CHAGAS JÚNIOR; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2009). Os resultados foram analisados pelo programa estatístico Genes e submetidos à análise de agrupamento hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*) utilizando a distância de Jaccard.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das nove amostras provenientes do concurso 'Café Qualidade Paraná 2011' e obtidos por métodos de processamento pós-colheita natural e cereja descascado, foram isoladas 331 bactérias no meio de cultura NA e 308 no meio de cultura MSM+C. Uma grande diversidade de bactérias foi obtida devido a utilização de dois meios de cultura, sendo que alguns meios são seletivos para determinados gêneros de bactérias.

Sakiyama et al. (2003) trabalhando com o meio de cultura NA, constataram a colonização epifítica e endofítica de frutos de café arábica por bactérias metilotróficas facultativas de pigmentação rósea. Trabalhos realizados por Sun et al. (2014) e Cycon, Wójcik e Piotrowska-Seget (2011), também, observaram o crescimento de bactérias isoladas de água e solo em meio de cultura MSM.

4.5.1 Caracterização Morfológica

A caracterização morfológica de isolados bacterianos fornecem importantes informações para questões de identificação e isolamento. Quanto a essa caracterização, foi observado que para a forma das bactérias para os meios de cultura NA e MSM+C, 54% e 24% foram puntiformes, 20% e 52% foram circulares e 25% e 24% foram irregulares, respectivamente (Figura 4.5.1.1 a).

Cunha et al. (2013) trabalhando com isolados bacterianos de *Brachiaria* sp. em meio de cultura DYGS, também, apresentaram maior percentagem de isolados com forma circular. Para a característica tipo de elevação as maiores percentagens foram observadas para o tipo plana 41% e 38%, e convexa 25% e 40% respectivamente (Figura 4.5.1.1 b).

A elevação na colônia é definida como uma diferença significativa entre a altura da colônia em relação ao nível do meio de cultura, quando exibida a presença de muco, essa é comumente associada a característica de elevação das colônias bacterianas (COSTA JÚNIOR et al., 2010).

Quanto à borda foi observado que 64% eram inteiras para NA e 58% para MSM+C, enquanto que para o tipo de borda lobada apenas 3% foram encontradas em NA e 0% para MSM+C (Figura 4.5.1.1 c).

Para o tipo de superfície das bactérias isoladas em NA, 22% eram rugosas, 70% eram lisas e 6% eram papilosas, enquanto que para MSM+C 10% eram rugosas, 77% eram lisas e 13% eram papilosas (Figura 4.5.1.1 d). Maior percentagem de isolados bacterianos com superfície das colônias lisas, também, foi encontrada em trabalho realizado por Cunha et al. (2013).

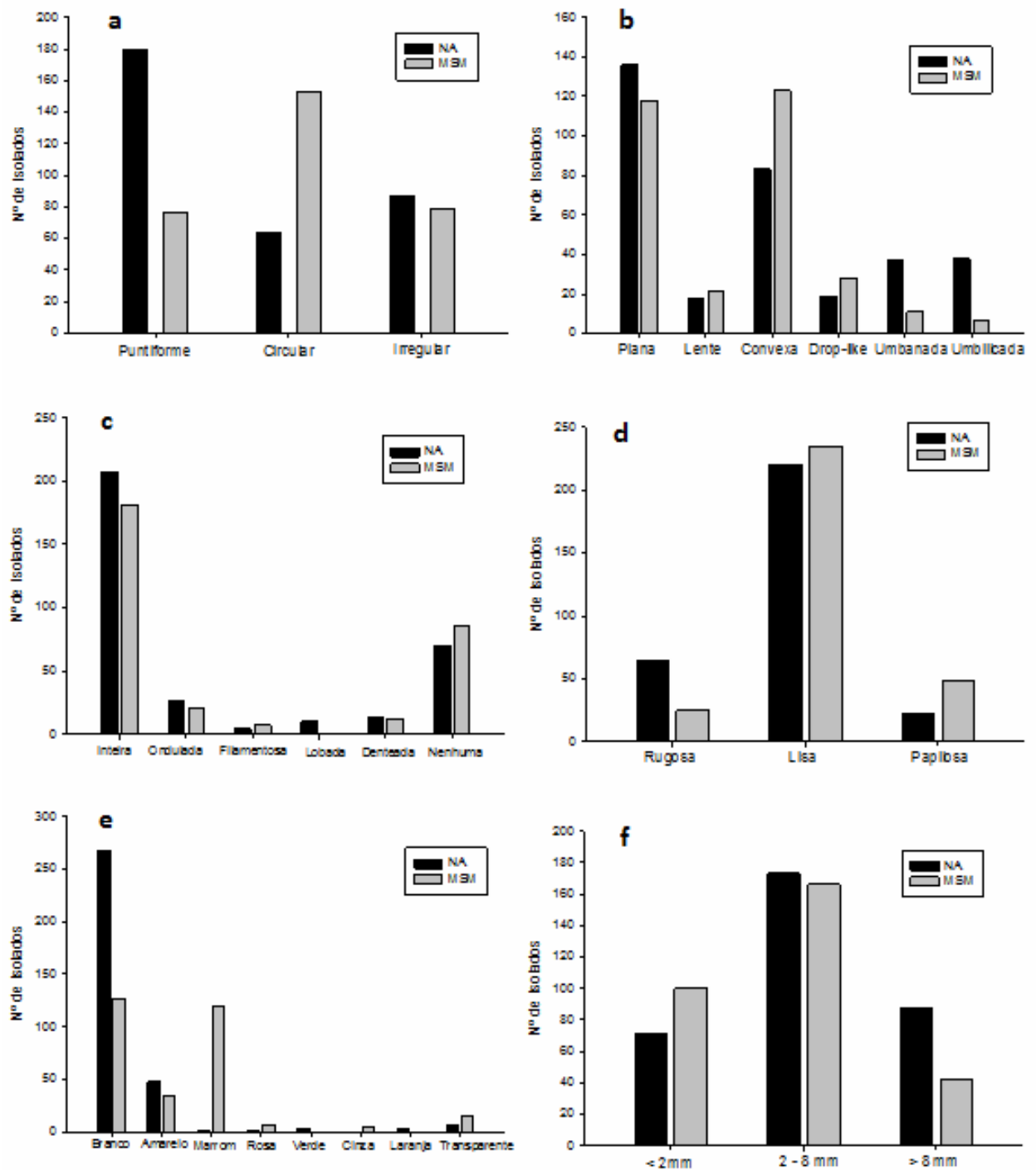


Figura 4.5.1.1 – Gráficos representando o número de isolados obtidos nos meios de cultura NA e MSM+C, de acordo com as características das colônias: forma (a), elevação (b), borda (c), superfície (d), coloração (e) e tamanho (f), provenientes de nove amostras de café do concurso 'Café Qualidade Paraná 2011'. Londrina, 2015
 NA: Nutriente Àgar; MSM: Mineral Salt Medium + café

Com relação a cor das bactérias inicialmente foram atribuídas cerca de 24 cores diferentes com diferenças apenas de tons, sendo uns mais claros enquanto outros mais escuros. Como o número de cores observados foi alto reduziu-se essa quantidade de cores para sete apenas para serem observadas resultados mais sucintos, três cores então foram as que prevaleceram nos resultados observados sendo, branca, amarelo e marrom.

Dessa forma, para os meios de cultura NA e MSM+C temos 86% e 42% são brancas, 12% e 9% amarelas e 0,6% e 38% marrons, respectivamente (Figura 4.5.1.1 e). Observou-se, também, que houve cores encontradas em meio de cultura NA que não eram observadas em MSM+C, o contrário também foi observado.

Para o tamanho das colônias nos meios de cultura NA e MSM+C, foram encontrados 22% e 32% menores que 2 mm, respectivamente, 54% e 52% entre 2 e 8 mm, e 25% e 14% maiores que 8 mm (Figura 4.5.1.1 f).

As informações adquiridas pela caracterização morfológica são muito importantes no processos de seleção de isolados bacterianos, pois constituem etapa inicial para a identificação (CHAVES, 2013).

4.5.2 Caracterização por PCR-RFLP

O estudo de um grande número de representantes das populações de isolados bacterianos pode tornar-se viável com o agrupamento morfológico de indivíduos semelhantes (COSTA JÚNIOR et al., 2010). Os dendrogramas de similaridade estão representados nas Figuras 4.5.1.2 e 4.5.1.3.

O dendrograma gerado a partir dos dados morfológicos dos isolados bacterianos do meio NA, a uma distância genética de 0,5, mostrou seis grupos fenotípicos diferentes, enquanto que para o meio de cultura MSM+C a uma distância genética de 0,58 foram observados oito grupos fenotípicos distintos.

Figura 4.5.1.2 – Agrupamento hierárquico UPGMA de 331 isolados bacterianos provenientes do meio NA de nove amostras de café do concurso 'Café Qualidade Paraná 2011', com base em suas características morfológicas. Londrina, 2015

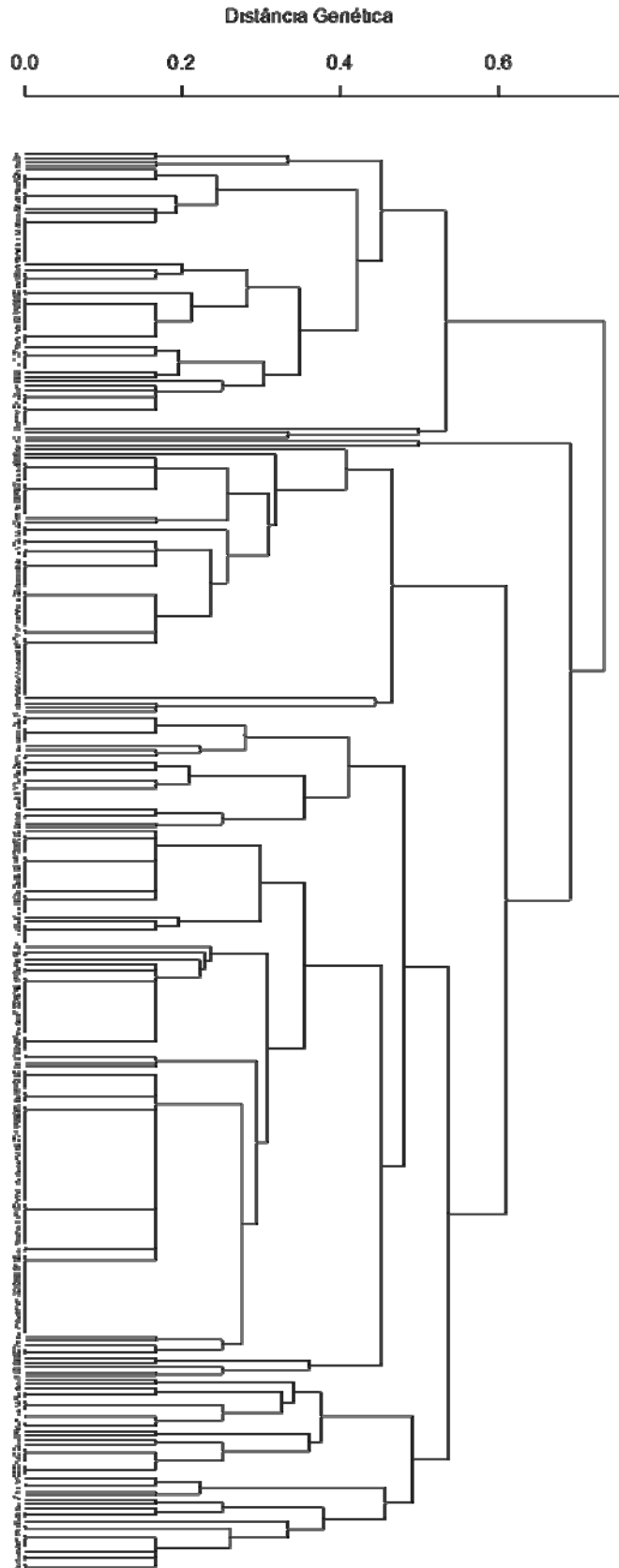
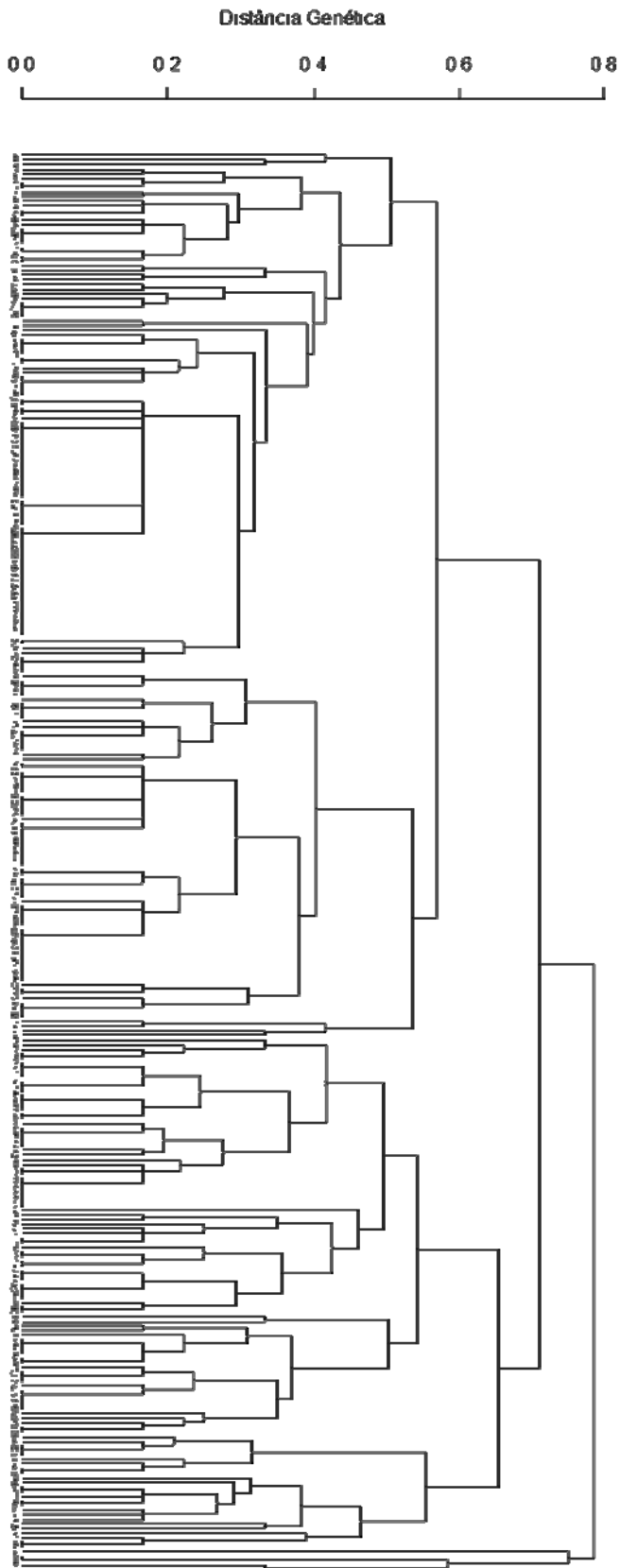


Figura 4.5.1.3 – Agrupamento hierárquico UPGMA de 308 isolados bacterianos provenientes do meio MSM+C de nove amostras de café do concurso 'Café Qualidade Paraná 2011', com base em suas características morfológicas. Londrina, 2015



Quanto aos índices de diversidade de Shannon-Wiener (H') e Simpson's (SD) para os isolados do meio de cultura NA e MSM+C, provenientes de nove amostras de café do concurso 'Café Qualidade Paraná 2011' (Tabela 4.5.1.1), foram ressaltados os maiores valores para a amostra 11F01, no meio NA com um índice de 3,51 para H' e 0,97 SD e no meio MSM+C com índice de 4,04 para H' e 0,98 para SD . No lote proveniente dessa amostra foi realizada a secagem em terreiro, em que o café não foi lavado e não foi realizada colheita seletiva.

Os menores valores foram observados na amostra 11F13, no meio NA com um índice de 2,18 para H' e 0,87 SD e no meio MSM+C com índice de 1,43 para H' e 0,72 para SD . Nesse lote o café foi proveniente de secagem em secador, sendo o café lavado e realizada colheita seletiva. Estes resultados sugerem que grãos de café provenientes desse processamento pós-colheita possuíram menores índices de diversidade de microrganismos presentes.

A microbiota envolvida no processamento "seco" é muito mais variadas e complexas do que aquelas encontradas durante a fermentação molhada, mas o efetivo papel de cada um dos grupos de microrganismos durante a fermentação de café não depende somente desse fator (SILVA et al., 2008).

Tabela 4.5.1.4 – Índices de diversidade de Shannon-Wiener (H') e Simpson's (SD) para os isolados do meio de cultura NA e MSM+C, provenientes de nove amostras de café do concurso 'Café Qualidade Paraná 2011'. Londrina, 2015

AMOSTRAS	MEIOS DE CULTURA			
	NA		MSM+C	
	H'	SD	H'	SD
11F01	3,51	0,97	4,04	0,98
11F05	2,52	0,91	3,37	0,96
11F07	2,49	0,88	3,00	0,94
11F09	2,85	0,93	2,10	0,86
11F11	2,94	0,92	2,64	0,92
11F12	3,13	0,94	2,71	0,91
11F13	2,18	0,87	1,43	0,72
11F15	2,90	0,93	1,99	0,83
11F17	2,95	0,94	2,98	0,94

NA: Nutriente Ágar; MSM+C: Mineral Salt Medium e café; H' : Índice de diversidade de Shannon-Wiener; SD : Índice de diversidade de Simpson's.

Para os seis grupos fenotípicos definidos a partir do dendrograma do meio de cultura NA, foram realizadas as médias de altitude e dos caracteres de qualidade de bebida das nove amostras de café. Nessa análise foi observado que

para altitude, o maior valor foi encontrado no grupo 1 dos isolados bacterianos, com uma média de 744 metros.

Para os caracteres de qualidade de bebida (Tabela 4.5.1.2), os maiores valores observados foram encontrados para bebida limpa no grupo 3 (5,90), para doçura no grupo 5 (5,68), para acidez no grupo 5 (5,67), para corpo no grupo 1 e 5 (5,51), para sabor no grupo 5 (5,50), para gosto remanescente no grupo 5 (5,48) e para balanço no grupo 5 (5,53). Notou-se que o grupo 5, o qual possui altitude média de 707 metros, foi o que apresentou os maiores valores quanto as características de bebida do café, excluindo apenas bebida limpa. A influência que a altitude exerce sobre as características químicas, físicas e sensoriais do café é um fator importante. Trabalhos publicados por Joet et al. (2009), Silva et al. (2004) e Dal Molin et al. (2008) buscaram uma relação da altitude do cafezal com boa qualidade de bebida. Gair (2012) concluiu em seu trabalho que cafés produzidos a partir de cafeeiros localizados em altitudes acima de 900 metros apresentaram melhor qualidade de bebida.

Tabela 4.5.1.5 – Médias dos valores de altitude e os caracteres de qualidade de bebida, para os seis grupos definidos a partir do dendrograma do meio de cultura NA, de isolados de nove amostras de café do concurso 'Café Qualidade Paraná 2011'. Londrina, 2015

CARACTERÍSTICAS	G1	G2	G3	G4	G5	G6
ALTI	744	683	675	696	707	742
BEL	5,57	5,50	5,90	5,77	5,78	5,56
DOÇ	5,46	5,43	5,30	5,49	5,68	5,44
ACI	5,50	5,50	5,35	5,48	5,67	5,47
COR	5,51	5,20	5,35	5,44	5,51	5,50
SAB	5,42	5,30	5,35	5,42	5,50	5,45
GOSR	5,37	5,23	5,30	5,38	5,48	5,37
BAL	5,46	5,26	5,25	5,43	5,53	5,46

ALTI: Altitude; BEL: Bebida limpa; DOÇ: Doçura; ACI: Acidez; COR: Corpo; SAB: Sabor; GOSR: Gosto remanescente; BAL: Balanço; G: Grupo.

A partir dos sete grupos fenotípicos definidos pelo dendrograma do meio de cultura MSM+C, foi observado que o grupo 7 (o qual possui dois isolados bacterianos) apresentou os maiores valores de média quanto a altitude e as características de qualidade de bebida, enquanto que os menores valores foram observados no grupo 5 (possui apenas um isolado) (Tabela 4.5.1.3).

Tabela 4.5.1.3 – Médias dos valores de altitude e parâmetros de qualidade de bebida, para os sete grupos definidos a partir do dendrograma do meio de cultura MSM+C, de 308 isolados provenientes de nove amostras de café do concurso 'Café Qualidade Paraná 2011'. Londrina, 2015

CARACTERÍSTICAS	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
ALTI	711	693	668	683	600	670	750
BEL	5,78	5,66	5,37	5,37	5,00	5,51	6,81
DOÇ	5,63	5,53	5,23	5,26	4,82	5,71	5,81
ACI	5,62	5,45	4,54	5,25	4,70	5,32	6,00
COR	5,47	5,37	5,20	5,24	4,80	5,20	5,90
SAB	5,55	5,47	5,18	5,26	4,80	5,50	5,91
GOSR	5,47	5,36	5,11	5,15	4,71	5,33	5,90
BAL	5,53	4,79	5,18	5,18	4,72	5,72	5,80

ALTI: Altitude; BL: Bebida limpa; DOÇ: Doçura; ACI: Acidez; COR: Corpo; SAB: Sabor; GOSR: Gosto remanescente; BAL: Balanço; G: Grupo.

Com relação aos coeficientes de correlação entre os caracteres de qualidade de bebida e os índices de diversidade de H' e SD para altitude este somente se correlacionou positivamente com a característica de qualidade de bebida corpo (0,78* a 1%), enquanto que para os índices de diversidade H' e SD nos meios de cultivo NA e MSM+C apresentaram correlação negativa a 1% (Figura 4.5.1.4).

Tabela 4.5.1.7 – Coeficientes de correlação entre os caracteres de qualidade de bebida e os índices de diversidade de Shannon-Wiener (H') e Simpson's (SD) para nove amostras do concurso 'Café Qualidade Paraná 2011'. Londrina, 2015

CARAC.	BEL	DOÇ	ACI	COR	SAB	GOSR	BAL	H' NA	H' MSM+C	DS NA	DS MSM+C
ALTI	0,44 ^{NS}	0,55 ^{NS}	0,63 ^{NS}	0,78*	0,58 ^{NS}	0,63 ^{NS}	0,66 ^{NS}	-0,67*	-0,72*	-0,72*	-0,70*
BEL	-	0,76*	0,80**	0,78*	0,81**	0,89**	0,74*	-0,66*	-0,69*	-0,46 ^{NS}	-0,37 ^{NS}
DOÇ	-	-	0,93**	0,76*	0,91**	0,92**	0,90**	-0,72*	-0,59 ^{NS}	-0,71*	-0,66*
ACI	-	-	-	0,79*	0,92**	0,95**	0,85**	-0,58 ^{NS}	-0,52 ^{NS}	-0,73*	-0,63 ^{NS}
COR	-	-	-	-	0,76*	0,89**	0,83**	-0,73*	-0,74*	-0,76*	-0,65 ^{NS}
SAB	-	-	-	-	-	0,94**	0,85**	-0,64 ^{NS}	-0,55 ^{NS}	-0,50 ^{NS}	-0,41 ^{NS}
GOSR	-	-	-	-	-	-	0,91**	-0,70*	-0,65 ^{NS}	-0,68*	-0,56 ^{NS}
BAL	-	-	-	-	-	-	-	-0,83**	-0,73*	-0,72*	-0,58 ^{NS}
H' NA	-	-	-	-	-	-	-	-	0,95**	0,57 ^{NS}	0,56 ^{NS}
H' MSM+C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,53 ^{NS}	0,53 ^{NS}
DS NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,93**

ALTI: Altitude; BL: Bebida limpa; DOÇ: Doçura; ACI: Acidez; COR: Corpo; SAB: Sabor; GOSR: Gosto remanescente; BAL: Balanço; H': Índice de diversidade de Shannon-Wiener; DS: Índice de diversidade de Simpson's.

Todas as características de qualidade de bebida apresentaram correlação positiva entre si, em 1% ou 5%. Todas as características de qualidade de bebida apresentaram correlação negativa com os índices de diversidade H' e SD

para os dois meios de cultura avaliados. Foram observadas correlações positivas para o índice de diversidade H' NA com H' MSM+C e para SD NA com SD MSM+C.

Na correlação canônica busca-se encontrar um pequeno número de combinações lineares, para cada um dos conjuntos, de modo a maximizar as correlações possíveis existentes nos dois grupos estudados. Para os coeficientes de correlações canônicas e pares canônicos estimados entre os caracteres relacionados aos índices nos dois meios de cultura e os caracteres relacionados a altitude e qualidade de bebida, foi possível observar relação positiva no grupo I para H' NA (0,21) e H' MSM+C (0,64) com bebida limpa no grupo 2 (0,21) no primeiro par canônico. E para o segundo par canônico também foi notada uma relação entre H' NA (1,12) no grupo I com doçura (0,40) no grupo II. Correlação positiva foi observada no 1° par canônico (0,91). Essas análises permitiram observar que os grupos considerados não são independentes e que as associações intergrupos são estabelecidas para algumas características.

Tabela 4.5.1.5 – Coeficientes de correlações canônicas e pares canônicos estimados entre os caracteres relacionados ao Índice de Diversidade de Shannon-Wiener (Grupo I) e caracteres relacionados a qualidade de bebida de nove amostras do concurso 'Café Qualidade Paraná 2011' (Grupo II). Londrina, 2015

GRUPO	CARACTERÍSTICAS	PAR CANÔNICO	
		1°	2°
I	H' NA	0,47	1,12
	H' MSM+C	0,64	-1,03
II	ALTI	-0,33	-0,66
	BEL	0,21	-1,9
	DOÇ	-0,56	0,40
	COR	-0,39	1,6
CORRELAÇÃO		0,91*	0,44 ^{NS}

H': Índice de diversidade de Shannon-Wiener; ALTI: Altitude; BEL: Bebida limpa; DOÇ: Doçura; COR: Corpo.

4.5.2 Caracterização por PCR-RFLP

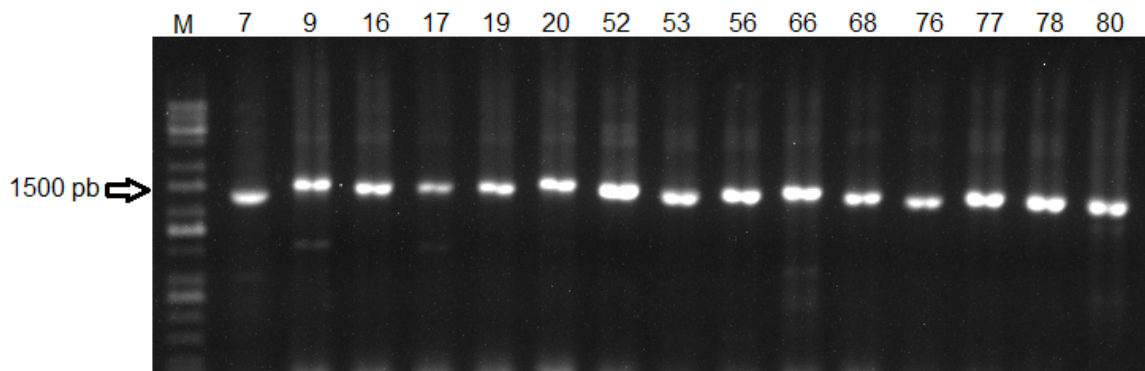
Dos 120 isolados bacterianos iniciais aos trabalhos, apenas 69 foram levados para a caracterização por PCR-RFLP. Isso ocorreu devido a não sobrevivência de alguns isolados durante o período de preservação, o que pode indicar a dependência de compostos presentes nos frutos de café e que não puderam ser fornecidos na formulação da suspensão do meio líquido MSM+C. O mesmo foi observado por Chaves (2013) em bactérias endofíticas. Nesse aspecto,

existem grandes quantidades de procariontes que não podem ser isolados devido a impossibilidade de cultivo *in vitro*, sendo um dos fatores, dentre vários, o desconhecimento das necessidades nutricionais desses microrganismos (ELBELTAGY et al., 2001). Outro fator que reduziu o número de isolados bacterianos nessa etapa foi a ausência de material genético suficiente para as extrações de DNA, resultando em géis de eletroforese sem a obtenção de fragmento esperado para prosseguir com as análises de PCR.

Para a quantificação de DNA realizada pelo NanoDrop[®], os valores variaram de 1,40 a 1,98 para o parâmetro analisado Abs_{260nm}/Abs_{280nm} , os quais são comprimentos de onda que absorvem os ácidos nucleicos, proteínas e fenóis e medem o grau de pureza do DNA e do RNA, no qual um valor próximo de 1,8 corresponde normalmente a uma amostra 'pura'.

O DNA genômico de 69 isolados bacterianos foi então extraído e submetido a reação de PCR com os pares de oligonucleotídeos iniciadores Y1 e Y3, no qual o produto dessa reação corresponde ao gene 16S rDNA quase completo (Figura 4.5.2.1). Do mesmo modo, Magnani (2005) trabalhando com isolados bacterianos endofíticos de cana-de-açúcar, utilizaram os oligonucleotídeos Y1 e Y3 para a reação de amplificação. Resultados obtidos por Reis Júnior et al. (2004) e Chaves (2013) mostraram que a amplificação por PCR gerou um fragmento único de aproximadamente 1.500 pb.

Figura 4.5.2.1 – Análise de reação em cadeia da polimerase do gene 16S RNAr de isolados bacterianos de grãos de café escolhidos aleatoriamente. M: marcador universal de peso molecular; 7-80: amostras dos isolados bacterianos. Londrina, 2015



Os fragmentos amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* + *RsaI*, *DdeI* e *MspI*, os quais produziram número variável de

fragmentos nas diferentes amostras analisadas. As enzimas *EcoRI+RsaI*, produziram em média, seis fragmentos, esse número variou de dois a dez (desvio-padrão = 1,92). A enzima *DdeI* produziu em média cinco fragmentos, com variações entre dois a nove (desvio-padrão = 1,43). Enquanto que a endonuclease de restrição *MspI* teve uma média de cinco fragmentos, variando de dois a oito (desvio-padrão = 1,41). As enzimas *EcoRI+RsaI* juntas foram responsáveis por maior número de bandas polimórficas observadas, num total de 21 bandas diferentes em todas as amostras, enquanto a enzima *DdeI* com 17 bandas e *MspI* com 15. Desse modo, foi observado que com os resultados obtidos os perfis de restrição apresentaram grande variabilidade.

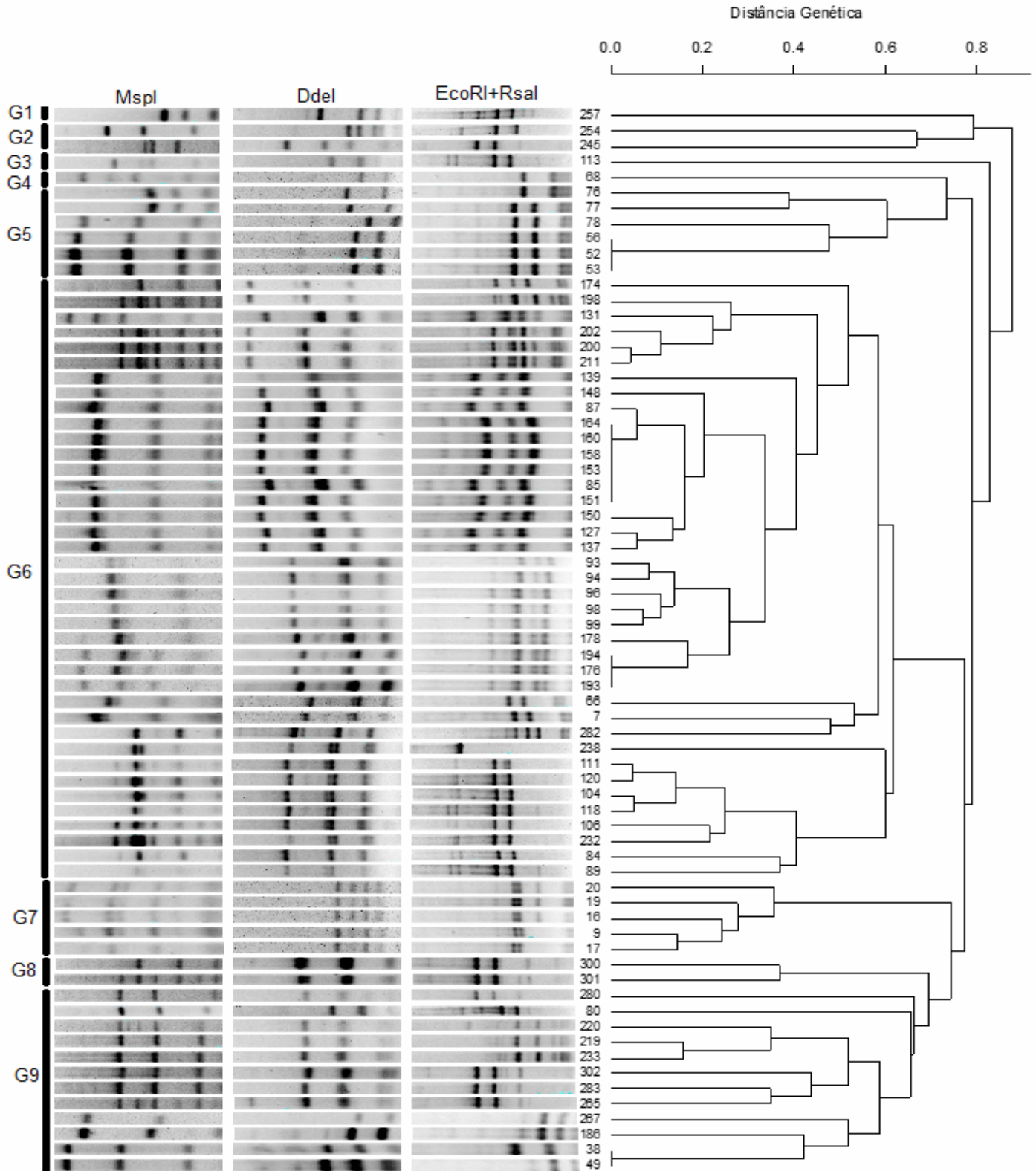
O dendrograma foi construído a partir do agrupamento hierárquico UPGMA dos 69 isolados bacterianos, calculados pela análise da matriz de dissimilaridade genética dos perfis de fragmentos de restrição da região 16S rDNA. Com uma distância genética de 0,7, ou 70% de similaridade pode-se observar os agrupamentos dos isolados em 9 grupos distintos (Figura 4.5.2.2).

Os grupos 1, 3 e 4 foram constituídos por um único isolado, 257, 113 e 68, respectivamente. Os grupos 2 e 8, por dois isolados. O grupo 5 se consistiu em seis isolados, nos quais três apresentaram semelhanças genéticas clonais (56, 52, 53). O grupo 6 foi o maior com um total de 39 isolados, sendo observado dois sub-grupos com semelhanças genéticas clonais (sub-grupo 1: seis isolados e sub-grupo 2: três isolados). O grupo 7 com cinco isolados e o grupo 9 com doze isolados.

De acordo com os grupos detectados a partir dos isolados bacterianos das amostras de café do concurso 'Café Qualidade Paraná 2011', evidencia-se que o grande número de fragmentos obtidos em cada amostra reflete a diversidade da comunidade microbiana existente em decorrência das diferentes formas de secagem do grão e das diferentes regiões onde *C. arabica* foi cultivado.

Não foi observado relações entre os agrupamentos genéticos dos isolados com suas regiões de origem, exceto no caso dos isolados bacterianos que apresentam semelhanças genéticas clonais do grupo 5, nos quais são provenientes da região de Rolândia – Paraná. Assim, não houve uma clara distinção sobre o efeito do local de coleta e a microbiota existente.

Figura 4.5.2.2 – Dendrograma de similaridade de perfil do gene 16S RNAr digerido com enzimas de restrição *EcoRI*+*RsaI*, *DdeI* e *MspI* de 69 isolados bacterianos de amostras do concurso 'Café Qualidade Paraná 2011', com base no agrupamento hierárquico UPGMA, utilizando a distância de Jaccard, após análise de agrupamento baseada na presença/ausência dos fragmentos de restrição. Londrina, 2015



Os ácidos nucleicos ribossomais (rRNA) são considerados biopolímeros adequados para estudos de diversidade, seus genes, o rDNA são universalmente distribuídos e é considerada a molécula com maior grau de conservação existente. Gostimsky et al. (2005) mostraram que a utilização de marcadores moleculares oferece novas possibilidades para o estudo da diversidade genética, porém poucos são os trabalhos realizados em *Coffea* afim de isolar e caracterizar fenotipicamente e geneticamente isolados bacterianos de interesse que possam atuar no processo de fermentação gerando cafés de alta qualidade.

Dos marcadores existentes, a técnica PCR-RFLP é muito utilizada em estudos taxonômicos, por ser simples e abranger diversas regiões do genoma (FERREIRA; SOUZA-CHIES, 2005; SPIER et al., 2008). Diversos trabalhos tem sido publicados utilizando-se essa técnica, dentre vários podemos citar a caracterização genética de rizóbio isolados de solos no Amazonas (CHAGAS JÚNIOR; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2009), a diversidade de bactérias diazotróficas de milho (ROESCH et al., 2007), a diversidade genética de *Begomovirus* sp. de plantas invasoras (ASSUNÇÃO et al., 2006), entre outros.

Dessa forma, estudos avaliando a diversidade de isolados bacterianos epifíticos e endofíticos de plantas e solos tem ganhado força nos últimos anos devido a importância dessa microbiota no meio ambiente e no uso juntamente na biotecnologia agrícola. Apesar do alto número de polimorfismos encontrado, a metodologia de PCR-RFLP é uma alternativa para aumentar o número de marcas polimórficas detectáveis e identificar marcadores funcionais dentro de uma população de isolados bacterianos.

Para esclarecer a posição taxonômica desses isolados, tornam-se necessários estudos genéticos mais aprofundados como o sequenciamento da região 16S rRNA.

4.6 CONCLUSÕES

Os cafés do concurso 'Café Qualidade Paraná 2011' tem grande diversidade fenotípica e genotípica entre as bactérias epifíticas e endofíticas isoladas.

O café seco em terreiro, sem separação dos grãos pelo lavador e com colheita realizada pela derrça tem maior índice de diversidade de Shannon-Wiener e Simpson's.

Os perfis de restrição apresentaram grande variabilidade genética.

As diferentes formas de secagem e os locais de cultivo tem influência sobre a diversidade da comunidade microbiana.

REFERÊNCIAS

- AGATE, A. D.; BHAT, J. V. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of coffee robusta cherries. **Applied Microbiology**, Maryland, v. 14, p. 256-260, 1966.
- AGUIAR, A. T. E. **Descritores para caracterização de cultivares de linhagens de café tipo Arábica**. 2001. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Pós-graduação do Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas. 2001.
- ALVES, E.; CASTRO, H. A. Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L.) nas fases de pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 24, n. 1, p. 4-7, 1998.
- ALVES, G. E.; ISQUIERDO, E. P.; BORÉM, F. M.; SIQUEIRA, V. C.; OLIVEIRA, P. D.; ANDRADE, E. T. Cinética de secagem de café natural para diferentes temperaturas e baixa umidade relativa. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 2, p. 238-247, 2013.
- AMARAL, A. P. **A cultura prática e racional do cafeeiro**. São Paulo, Secretaria da Agricultura, Comércio e Obras Públicas do Estado de São Paulo. 1925. 607p.
- AMORIM, D. S. **Elementos básicos de sistemática filogenética**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, 1997. 276 p.
- ANDRADE, G. A.; RICCE, W. S.; CARAMORI, P. H.; ZARO, G. C.; MEDINA, C. C. Zoneamento agroclimático de café robusta no Estado do Paraná e impactos das mudanças climáticas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 1381-1390, 2012. Disponível em: < <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewFile/7523/11237>>. Acesso em: 21 fev. 2014.
- ANDROCIOLOI, A.; LIMA, F. B.; TRENTO, E. J.; CARNEIRO, F.; CARAMORI, P. H.; SCHOLZ, M. B. S. Caracterização da qualidade de bebida dos cafés produzidos em diversas regiões do Paraná. In: SIMPÓSIO DA PESQUISA DE CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003, Porto Seguro. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, 2003. p. 256-257. Disponível em: < <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/10820/988>>. Acesso em: 06 abr. 2014.

ANTHONY, F.; BERTHAUD, J.; GUILLAUMET, J. L.; LOURD, M. Collecting wild *Coffea* species in Kenya and Tanzania. **Plant Genetic Resources News**, Cambridge, v. 69, p. 23-29, 1987.

ARCILA, J. P.; VALÊNCIA, G. A. Relación entre la actividad de la polifenol oxidasa (PFO) y las pruebas de catación como medidas de la calidad de la bebida del café. **Cenicafé**, Colômbia, v. 26, n. 2, p. 55-71, 1975.

ARAÚJO, L.; BESSA, F. **Iapar lança nova variedade de café resistente a nematoide**. Gerência de Transferência de Tecnologia da Embrapa Café. 2012. Disponível em: <<http://www.consorciopesquisacafe.com.br/index.php/imprensa/noticias/222-iapar-lanca-nova-variedade-de-cafe-resistente-a-nematoide>>. Acesso em: 08 ago. 2014.

ARUNGA, R. O. Coffee. **Economic Microbiology**, Amsterdam, v. 7, n. 2, p.259-279, 1982.

AVALLONE, S.; GUYOT, B.; BRILLOUET, J-M.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J-P. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. **Current Microbiology**, New York, v. 42, n. 4, p. 252-256, 2001. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s002840110213#page-1> >. Acesso em: 21 abr. 2014.

AVALLONE, S.; BRILLOUET, J. M.; GUYOT, B.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J. P. Involvement of pectinolytic microorganisms in coffee fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, Davis, v. 37, n. 2, p. 191-198, 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2621.2002.00556.x/epdf>>. Acesso em: 28/02/2014.

ASSUNÇÃO, I. P.; LISTIK, A. F.; BARROS, M. C. S.; AMORIN, E. P. R.; SILVA, S. J. C.; IZABEL, O. S.; RAMALHO-NETO, C. E.; LIMA, G. S. A. Diversidade genética de Begomovirus que infectam plantas invasoras na região nordeste. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 239-244, 2006.

BALHANA, A. P. **História do Paraná**. 4.v. Curitiba: Gráfica Editora Paraná, 1969.

BARBOSA, J. N.; BORÉM, F. M.; ALVES, H. M. R.; VOLPATO, M. M. L.; VIEIRA, T. G. C.; SOUZA, V. C. O. Distribuição espacial de cafés do estado de Minas Gerais e sua relação com a qualidade. **Coffee Science**, Lavras, v. 5, n. 3, p. 237-250, 2011.

BARDIN-CAMPAROTO, L.; CAMARGO, M. B. P.; MORAES, J. F. L. Época provável de maturação para diferentes cultivares de café arábica para o Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 4, p. 594-599, 2012.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3.ed. Minneapolis: Burgess Publishing, 1972. 241p.

BATISTA, L.R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de Ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.) bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, p. 804-813, 2007.

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

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, p. 293-300, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160502005391>>. Acesso em: 24 mar. 2014.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; SILVA, C. F.; CIRILLO, M.; VARGA, E. A.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F. Ocratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, p. 784-790, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713508002818>>. Acesso em: 24 mar. 2014.

BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. **Genetics resources of Coffea**. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (eds) Coffee, v. 4. Agronomy. Elsevier Applied Science, London, 1988, p. 1-42.

BLISKA, F. M. M.; MOURÃO, E. A. B.; AFONSO JÚNIOR, P. C.; VEGRO, C. L. R.; PEREIRA, S. P.; GIOMO, G. S. Dinâmica fitotécnica e socioeconômica da cafeicultura brasileira. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 39, n. 1, 2009. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/880363/1/DINAMICAFITOTECNICA.pdf>>. Acesso em: 08 mai. 2014.

BONA, E. **Integração de redes neurais artificiais ao nariz eletrônico: Avaliação aromática de café solúvel**. 2008. 165 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)

- Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2008. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/164/7/UEL_PPGCA_D_Bona,Evandro_2008.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2014.

BRASIL – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Café**. 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe/saiba-mais>>. Acesso em: 18 jun. 2014.

BRASIL – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 8, de 11 de Junho de 2003**. Aprova o regulamento técnico de identidade e de qualidade para a classificação do café beneficiado grão cru. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 13 jun. 2003, Seção I, p. 4. Disponível em: <http://www.abic.com.br/publique/media/CONS_leg_instnormativa08-03.pdf>. Acesso em: 2 nov. 2014.

BRIDSON, D. Studies in *Coffea* and *Psilanthus* (*Rubiaceae* subfam. *Cinchonoideae*) for Part 2 of 'Flora of Tropical East Africa': Rubiaceae. **Kew Bulletin**, London, v. 36, p. 817-859, 1982.

BSCA – Brazil Specialty Coffee Association. **Classificação por tipo e bebida**. 2014. Disponível em: <<http://bsca.com.br/classificacao-tipo-bebida.php>>. Acesso em: 02 abr. 2014.

CAMARGO, R. **Cultura cafeeira: visando qualidade**. São Paulo: s/ed., 1936.

CAMPA, C.; BALLESTER, J. F.; DOULBEAU, S.; DUSSERT, S.; HAMON, S.; NOIROT, M. Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species. **Food Chemistry**, Montpellier, v. 88, p. 39-44, 2004.

CANCIAN, N. A. **Cafeicultura paranaense: 1900/1970**. Curitiba: Grafipar, 1981.

CARVALHO, A. Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial a espécie arábica. **Separata dos boletins da superintendência de serviços de café**, Campinas, SP: IAC, dez. 1945 a abr. 1946.

CARVALHO, A.; FAZUOLI, L. C. O melhoramento de plantas no Instituto Agrônomo. In: FURLANI, A. M. C.; VIÉGAS, G. P. (Eds.). **Café**. Campinas, 1993, p. 29-76.

CARVALHO, A.; FILHO, H. P. N.; FAZUOLI, L. C.; COSTA, W. M. da. Genética de Coffea XXVI. Hereditariedade do porte reduzido do cultivar Caturra. **Bragantia**, Campinas v. 43, n. 2, p. 443-458, 1984. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/brag/v43n2/15.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2014.

CARVALHO, A.; MONACO, L. C. Transferência do fator Caturra para o cultivar Mundo Novo de *Coffea arabica* L. **Bragantia**, Campinas, v. 31, n. 31. p. 379-399, 1972. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/brag/v31nunico/31.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2014.

CARVALHO, A.; MONACO, L. C.; FAZUOLI, L. C. Melhoramento do cafeeiro: XL. Estudos de progênies e híbridos de café Catuaí. **Bragantia**, Campinas, v. 38, n. 22, p. 203-216, 1979. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/brag/v38n1/22.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2014.

CARVALHO, A.; FAZUOLI, L. C.; MAZZAFERA, P. Melhoramento do cafeeiro: XLII. Produtividade de progênies derivadas de hibridação dos cultivares laurina e mundo novo. **Bragantia**, Campinas, v. 47, n. 2, p. 213-222, 1988. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/brag/v47n2/06.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2014.

CARAMORI, P. H.; ANDRADE, G. A.; CAVIGLIONE, J. H.; RICCE, W. S. Zonas de maturação dos cultivares de café catuaí e mundo novo no estado do Paraná baseadas no acúmulo de graus-dia. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, 2007. Disponível em: < <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/10820/1849>>. Acesso em: 20 abr. 2014.

CCCC – CÓDIGO COMUM PARA A COMUNIDADE CAFEIEIRA. **Documents**. 2008. Disponível em: < <http://www.4c-coffeeassociation.org/#5>>. Acesso em: 07 mai. 2014.

CHAGAS JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização genética de rizóbio isolados de solos no Amazonas baseada na técnica PCR-RFLP. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n.4, p. 841-846, 2009.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: _____. Coffee. Springer US, 1985. p. 13-47

CHAVES, E. I. D. **Diversidade de bactérias endofíticas obtidas de solos do Oeste do Paraná usando milho e trigo como planta isca**. 2013. 130 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2013.

CHEN, L.S.; FIGUEREDO, A.; PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. **Applied Environmental Microbiology**, Maryland, v. 66, n. 11, p. 5099-5103, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92426/>>. Acesso em: 05 jun. 2015.

CHENG, H. R.; JIANG, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 1, p. 55-59, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16369876>>. Acesso em: 11 nov. 2015.

CHEVALIER, A.; DAGRON, M. **Recherches historiques sur les débuts de la culture du caféier en Amérique**. Communications et Actes de Académie des Sciences Coloniales, Paris. Annales d'histoire économique et sociale, v. 1, n. 4 p. 632-633. 1928. Disponível em: <http://www.persee.fr/web/revues/home/prescript/article/ahess_0003-441X_1929_num_1_4_1142_T1_0632_0000_3>. Acesso em: 02 ago. 2014

CHEVALIER, A. **Les caféiers du globe**. II. Iconographie des caféiers sauvages et cultivés et des Rubiacées prises pour des caféiers. In: Encycl. Biol. (Lechevalier, P., ed.), Paris, 1942, 36p.

CHRIST, R. E. R. **Classificação de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* usando uma rede neural ART2 com dados de eletroforese de genes ribossomais**. 2007. 74 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 2007.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Café, Segundo Levantamento**. Brasília, p.1-61, 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_05_20_08_49_17_boletim_maio-2014.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2014.

COVRE, A. M.; PARTELLI, F. L.; MAURI, A. L.; DIAS, M. A. Crescimento e desenvolvimento inicial de genótipos de café Conilon. **Revista Agro@ambiente Online**, Boa Vista, v. 7, n. 2, p. 193-202, 2013. Disponível em: <<http://revista.ufrb.br/index.php/agroambiente/article/view/944/1149>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

CRAMER, P. J. S. **Gevens over de variabiliteit van de in Nederlandsch-Indië verbouwde koYe-soorten**. Batavia. Uitgaande Dept Landbouw Mededeeling, n. 11, p. 1-696, 1913.

COSTA JÚNIOR, C. R.; SILVA, L. D. A.; OLIVEIRA, A. V.; SOUSA, C. A.; COUTINHO, A. E.; COSTA, A. L.; LIRA JÚNIOR, M. A. Isolamento e caracterização morfológica de bactérias em nódulos de leguminosas forrageiras. In: JEPEX, 10., 2010, Recife. **Anais...** Recife: UFRPE, 2010.

CUNHA, E. N.; CHALITA, P. B.; ZILLI, J. É.; SILVA, K. Avaliação da diversidade genotípica de bactérias diazotróficas isoladas de plantas de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola* no estado de Roraima. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 34., 2013, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: 2013.

CYCÓN, M.; WÓJCIK, M.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Biodegradation kinetics of the benzimidazole fungicide thiophanate-methyl by bacteria isolated from loamy sand Soil. **Biodegradation**, v. 22, p. 57 -583, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20976615>>. Acesso em: 20 out. 2015.

DAL MOLIN, R. N.; ANDREOTTI, M.; REIS, A. R.; FURLANI JÚNIOR, E.; BRAGA, C. G.; SCHOLZ, M. B. S. Caracterização física e sensorial do café produzido nas condições topoclimáticas de Jesuitas, Paraná. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 353-358, 2008. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/3513/2484>>. Acesso em: 04 mai. 2014.

DAL MOLIN, R. N.; DOMINGUES, R.; RIPOL, C.; TRENTO, E. J. Resultados da campanha “Café Qualidade Paraná” realizada no período entre 1999 e 2002. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003, Porto Seguro. **Resumos...** Brasília: Embrapa Café, 2003.

DAVIES, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D. M.; STOFFELEN, P. An annotated taxonomic conspectus of genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, Londres, v. 152, p. 465-512, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x/full>>. Acesso em: 07 mai. 2014.

DAMATTA, F. M.; RONCHI, C. P.; MAESTRI, M.; BARROS, R. S. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 19, n. 4, p. 485-510, 2007.

DECAZY, F.; AVELINO, J.; GUYOT, B.; PERRIOT, J-J.; PINEDA, C.; CILAS, C. Quality of different Honduran coffees in relation to several environments. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, p. 2356-2361, 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05772.x/pdf>>. Acesso em: 08 jun. 2014.

DEDECCA, D. M. Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. var. *typica* Cramer. **Bragantia**, Campinas, v. 16, n. 23 p. 315-366, 1957. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/brag/v16nunico/23.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2014.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, Maryland, v. 67, n. 11, p. 5285-5293, 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11679357>>. Acesso em: 08 jun. 2014.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Histórico**. 2005. Disponível em: <<http://www22.sede.embrapa.br/café/unidade.htm>>. Acesso em: 17 jun. 2014.

ESKES, A. B. Identification, description and collection of coffee types in P.D.R. Yemen. **IPGRI**, Rome, 1989.

FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Production/Crops**. 2014. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 01 ago. 2014.

FASSIO, L. H.; SILVA, A. E. S. Importância econ mica e social do café Conilon. In: FERR O, R. G.; FONSECA, A. F. A.; BRAGANÇA, S. M.; FERR O, M. A. G.; De MUNER, L. H. (Org.). **Café Conilon**. 1 ed. Vitória: Incaper, 2007. p. 1-702.

FAVARIN, J. L.; VILLELA, A. L. G.; MORAES, M. H. D.; CHAMMA, H. M. C. P.; COSTA, J. D.; DOURADO-NETO, D. Qualidade da bebida de café de frutos cereja submetidos a diferentes manejos pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 2, p.187-192, 2004. Disponível em: < <http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/6755/3811>>. Acesso em: 01 mar. 2014.

FAZUOLI, L. C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: RENA, A. B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, N.; YAMADA, J. (Eds). **Cultura do cafeeiro**: fatores que afetam a produtividade do cafeeiro. Piracicaba, SP: Potafos, 1986, p. 87-113.

FERR O, M. A. G.; FERR O, R. G.; FONSECA, A. F. A.; FILHO, A. C. V.; VOLPI, P. S. Origem, Dispersão Geográfica, Taxonomia e Diversidade Genética de *Coffea canephora*. In: FERR O, R. G.; FONSECA, A. F. A. da; BRAGANÇA, S. M.; FERR O, M. A. G.; De MUNER, L. H. (Org.). **Café Conilon**. 1 ed. Vitória: Incaper, 2007, p. 01-702.

FERREIRA, G. F. P.; NOVAES, Q. S.; BATISTA, L. R.; SOUZA, S. E.; AZEVEDO, G. B.; SILVA, D. M. Fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica* L.) beneficiados no sudoeste da Bahia. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n. 3, p. 98-102, 2011. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052011000300003>. Acesso em: 07 abr. 2014.

FERIA-MORALES, A. M. Examining the case of green coffee to illustrate the limitations of grading systems/expert tasters in sensory evaluation for quality control. **Food Quality and Preference**, Amsterdam, v. 13, p. 355-367, 2002.

FERREIRA T. F.; SOUZA-CHIES T. T. Genetic diversity among *Paspalum* L. species (Poaceae) belonging to the Notata and linearia groups based on fragment length polymorphism analyses. **Genetica**, v. 125, p. 133-140, 2005.

FRANK, H. A.; LUM, N. A.; DELA CRUZ, A. S. Bacteria responsible for mucilage layer decomposition in Kona coffee cherries. **Applied Microbiology**, Maryland, v. 13, p. 201-207, 1965. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1058221/pdf/applmicro00358-0079.pdf>>. Acesso em: 23 mai. 2014.

GAIR, R. **Efeito da altitude na qualidade da bebida do café**. 2012. 57f. Dissertação – (Mestrado em Agronomia) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012. Disponível em: <
<http://www.bibliotecadigital.uel.br/document/?view=vtls000180966>>. Acesso em: 07 ago. 2014.

GELETA, M.; HERRERA, I.; MONZÓN, A.; BRYNGELSSON, T. Genetic diversity of arabica coffee (*Coffea arabica* L.) in Nicaragua as estimated by simple sequence repeat markers. **The Scientific World Journal**, n. 939220, 11p. 2012. Disponível em: <
[http://www.researchgate.net/publication/225372445_Genetic_diversity_of_arabica_coffee_\(Coffea_arabica_L.\)_in_Nicaragua_as_estimated_by_simple_sequence_repeat_markers](http://www.researchgate.net/publication/225372445_Genetic_diversity_of_arabica_coffee_(Coffea_arabica_L.)_in_Nicaragua_as_estimated_by_simple_sequence_repeat_markers)>. Acesso em: 21 mar. 2014.

GENARI, R. **Características de crescimento e produção de pectinases por *Klebsiella oxytoca* isolada de frutos de café**. 1999. 90 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1999. Disponível em: <
<http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/10820/2864/150784f.pdf?...1>>. Acesso em: 29 mai. 2014.

GOLLUCKE, A. P. B.; TANIWAKI, M. H.; TAVARES, D. Q. Survey on ochratoxin A in Brazilian green coffee destined for exports. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 641-645, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v24n4/a27v24n4.pdf>>. Acesso em: 25 mar. 2014.

GOSTIMSKY, S. A.; KOKAEVA, Z. G.; KONOVALOV, F. A. Studying plant genome variation using molecular markers. **Roussian Journal of Genetics**, v. 41, n.4, p. 378-388, 2005.

GROSCH, W. Chemistry III: Volatile Compounds. In: CLARKE, R. J.; VITZTHUM, O. G. (ed.) **Coffee: Recent Developments**, London: Blackwell Science, cap. 3, p. 68-89, 2001.

HAARER, A. **Modern coffee production**. Leonard Hill, London, 1956.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. LSPA – Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, p. 1-83, 2015. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo/lspa_201501.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2015.

IBC – Instituto Brasileiro do Café / GERCA – Grupo Executivo de Racionalização da Cafeicultura. Cultura de Café no Brasil. **Manual de Recomendações**. Rio de Janeiro: setor de programação visual e gráfica, mar. 1981.

ICO – Internacional Coffee Organization. **Statistics on coffee - All exporting countries, total production, crop years 2010/11 to 2012/2013**. 2013. Disponível em: <<http://dev.ico.org/historical/2010-19/PDF/TOTPRODUCTION.pdf>>. Acesso em 18 jun. 2014.

ILLY, E. Universidade Illy do Café. **Notícias**. 2006 Disponível em: <<http://www.unilly.com.br/site/noticias.exibir.do?idNoticia=167>>. Acesso em: 09 abr. 2014.

INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial. **Diferença entre Denominação de Origem e Indicação Geográfica**. 2014. Disponível em: <<http://www.marcaspatentes.pt/index.php?section=695>>. Acesso em: 23 mai. 2014.

JIMENEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMIREZ, L. E.; TAPIA-HERNANDEZ, A.; MASCARUA-ESPARZA, M.A.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLEROMELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Maryland, v. 63, p. 3676-3683, 1997.

JOËT, T.; LAFFARGUE, A.; DESCROIX, F.; DOULBEAU, S.; BERTRAND, B.; KOCHKO, A.; DUSSERT, S. Influence of environmental factors, wet processing and their interactions on the biochemical composition of green Arabica coffee beans. **Food Chemistry**, v. 118, p. 693-701, 2009.

JUNIOR, C. D. C.; BORÉM, F. M.; PEREIRA, R. G. F. A.; SILVA, F. M. Influência de diferentes sistemas de colheita na qualidade do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, p. 1089-1096, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-70542003000500017&script=sci_arttext>. Acesso em: 05 jun. 2015.

KAWASAKI, P. A. C. Um raio-x da cafeicultura brasileira – Especial Café. **Agroanalysis - a revista de agronegócios da FGV**. São Paulo, v. 29, n. 10, 2009.

KITZBERGER, C. S. G.; SCHOLZ, M. B. S.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E.; SERA, T.; SILVA, J. B. G. D.; BENASSI, M. T. Diterpenes in green and roasted coffee of *Coffea arabica* cultivars growing in the same edapho-climatic conditions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 30, p. 52-57, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157513000197>>. Acesso em: 01 jul. 2014.

KOSHIRO, Y.; ZHENG, X-Q.; WANG, M-L.; NAGAI, C.; ASHIHARA, H. Changes in content and biosynthetic activity of caffeine and trigonelline during growth and ripening of *Coffea arabica* e *Coffea canephora* fruits. **Plant Science**, v. 171, p. 242-250, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945206000963>>. Acesso em: 09 jul. 2014.

KRUG, C. A.; MENDES, J. E. T.; CARVALHO, A. **Taxonomia de *Coffea arabica* L.:** Descrição das variedades e formas encontradas no Estado de São Paulo. Campinas: Instituto Agrônomo, 1938. 57 p. (Boletim Técnico, 62).

KRUG, C. A.; CARVALHO, A.; MENDES, J. E. T. Taxonomia de *Coffea arabica* L. III. *Coffea arabica* L. var. *anormalis*. **Bragantia**, Campinas, v. 10, n. 11, p. 335-343, 1951. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0006-87051950001100003&script=sci_arttext>. Acesso em: 05 abr. 2014.

KRUG, H. P. Café duros II. Um estudo sobre qualidade de cafés de varrição. **Revista do Instituto do Café**, São Paulo, v. 15, p. 1393-1396, 1940.

KRUG, H. P. Café duros III. Relação entre porcentagem de microorganismos e qualidade de café. **Revista do Instituto do Café**, São Paulo, v. 27, p. 1827-1831, 1941.

KRUG, C. A.; CARVALHO, A. Genética de *Coffea* VII – Hereditariedade dos caracteres de *Coffea arabica* L. var. *maragogipe* hort ex froehner. **Bragantia**, Campinas, v. 2, n. 6, p. 231-247, 1942. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v2n6/03.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2014.

KRUG, C. A.; MENDES, J. E. T.; CARVALHO, A. Taxonomia de *Coffea arabica* L.: *Coffea arabica* L. var. *Caturra* e sua forma *Xanthocarpa*. **Bragantia**, Campinas, v. 9, n. 9-12, 1949. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v9n9-12/01.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2014.

KRUG, C. A.; ANTUNES FILHO, H. Melhoramento do cafeeiro: III – Comparação entre progênies e híbridos da var. Bourbon. **Bragantia**, Campinas, v. 10, n. 11, p. 345-355, 1950. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v10n11/04.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2014.

KRYNDUSHKIN, D. S.; ALEXANDROV, I. M.; TER-AVANESYAN, M. D.; KUSHNIROV, V. V. [PSI+] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104". **Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 278, n. 49, p. 49636-49643, 2003. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/278/49/49636.long>>. Acesso em: 11 nov. 2015.

LAGUERRE, G.; MAZURIER, S. I.; AMARGER, N. Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 101, n. 1, p. 17-26, 1992.

LAVIOLA, B. G.; MARTINEZ, H. E. P.; SALOMÃO, L. C. C.; CRUZ, C. D.; MENDONÇA, S. M.; NETO, A. P. Alocação de fotoassimilados em folhas de cafeeiro cultivado em duas altitudes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 11, p. 1521-1530, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2007001100002>. Acesso em: 21 jun. 2015.

LAZZARINI, W.; MORAES, F. R. P. Influência dos grãos deteriorados (“tipo”) sobre a qualidade da “bebida” de café. **Bragantia**, Campinas, v. 17, n. 7, p. 109-118, 1958. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/brag/v17nunico/07.pdf>>. Acesso em: 26 abr. 2014.

LEJEUNE, J. B. H. **Rapport au Gouvernement Impérial d’Ethiopie sur la production caféière**. FAO, Rome, 1958.

LEROY, T.; RIBEYRE, F.; BERTRAND, B.; CHARMETANT, P.; DUFOUR, M. MONTAGNON, C.; MARRACCINI, P.; POT, D. Genetics of coffee quality. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 229-242, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-04202006000100016&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 08 mar. 2014.

LIBANO, A. M.; FELFILI, J. M. Mudanças temporais na composição florística e na diversidade de um cerrado *sensu stricto* do Brasil Central em um período de 18 anos (1985-2003). **Acta Botânica Brasileira**, Belo Horizonte, v. 20, n. 4, p. 927-936, 2006.

LONGO, M. A.; SANROMÁN, M. A. Production of food aroma compounds: Microbial and enzymatic methodologies. **Food Technology and Biotechnology**, Croatia, v. 44, p. 335-353, 2006. Disponível em: < <http://www.ftb.com.hr/images/pdfarticles/2006/July-September/44-335.pdf>>. Acesso em: 23 jun. 2014.

LOUREIRO, L. M.; LOTADE, J. Do fair trade and eco-labels in coffee wake up the consumer conscience? **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 53, p. 129-138, 2005.

MALTA, M. R.; PEREIRA, R. G. F. A.; CHAGAS, S. J. R.; FERREIRA, D. F. Qualidade sensorial do café de lavouras em conversão para o sistema de produção orgânico. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 3, p. 775-783, 2008.

MAGNANI, G. S. **Diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar**. 2005. 92 f. Dissertação (Pós-graduação em Ciências/Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005.

MAGURRAN, A. E. Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press, New Jersey, USA, 1988. 192p.

MATIELLO, J. B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A. W. R.; ALMEIDA, S. R.; FERNANDES, D. R.; **Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendações**. Rio de Janeiro: MAPA/PROCAFÉ, 2002. 387 p.

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Instrução Normativa N° 08, de 11 de Junho de 2003**. 2003. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=1840>>. Acesso em: 02 out. 2014.

MELO, B.; SOUZA, L. B. Biologia da reprodução de *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 6, n. 2, p. 1-7, 2011. Disponível em: <http://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/viewFile/444/pdf_139>. Acesso em: 11 mai. 2014.

MELLO AYRES, G. C. A ocorrência de plasmodesmas no endosperma de *Coffea arabica* L. var. *typica* Cramer. **Bragantina**, Campinas, v. 13, n. 23, p. 281-286, 1954. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v13nunico/23.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2014.

MONDEGO, J. M. C.; VIDAL, R. O.; CARAZZOLLE, M. F.; TOKUDA, E. K.; PARIZZI, L. P.; COSTA, G. G. L.; PEREIRA, L. F. P.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A.; VIEIRA, L. G. E.; PEREIRA, G. A. G. Na EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, n. 1, 30 p., 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1186%2F1471-2229-11-30#page-1>>. Acesso em: 24 mai. 2014.

MASOUD, W.; CESAR, L. B.; JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**, Malden, v. 21, p. 549-556, 2004. Disponível em: <<http://www.interscience.wiley.com/>>. Acesso em: 14 out. 2014.

MOREIRA, C. F. **Sustentabilidade de sistemas de produção de café sombreado orgânico e convencional**. 2009. 145 f. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/91/91131/tde-22052009-151446/en.php>>. Acesso em: 21 abr. 2014.

MULETA, D.; ASSEFA, F.; HJORT, K.; ROOS, S.; GRANHALL, U. Characterization of Rhizobacteria isolated from Wild *Coffea arabica* L. **Engineering in Life Sciences**, Hamburg, v. 9, n. 2, p. 100-108, 2009. Disponível em: < <http://www.els-journal.com>>. Acesso em: 14 out 2014.

MURTHY, P. S.; BASAVARAJ, K., NAIDU, R. Journey of Indian coffee quality. **Journal of Indian Coffee**, v. 3, p. 18-21, 2001.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition – A review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 66, p. 45-58, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921344912000894>>. Acesso em: 23 mai. 2014.

NAGAMATO, R. J. **Tratamento de compostos voláteis orgânicos do café pela técnica da incineração catalítica**. Curitiba, 2001. 114f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2001.

OLIVEIRA, S. C. A economia cafeeira no Paraná até a década de 1970. **Vitrine da Conjuntura**, Curitiba, v. 2, n. 4, 2009.

OLIVEIRA, A. N.; AMARAL, I. L. Florística e fitossociologia de uma floresta de vertente na Amazônia Central, Amazona, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 1, p. 21-34, 2004.

ORMOND, J. G. P.; PAULA, S. R. L. de; FAVERET FILHO, P. Café:(re) conquista dos mercados. **BNDES Setorial, Rio de Janeiro**, n. 10, p. 3-56, 1999.

PASIN, L. A. A. P.; ALMEIDA, J. R.; ABREU, M. S. Fungos associados a grãos de cinco cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Acta botânica brasílica**, Belo Horizonte, v. 23, n. 4, p. 1129-1132, 2009. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-33062009000400022&script=sci_arttext>. Acesso em: 03 jun. 2015.

PEE, W.; CASTELEIN, J. M. Study of the pectinolytic microflora, particularly the Enterobacteriaceae, from fermenting coffee in the Congo. **Journal of Food Science**, New York, v. 37, n. 1, p. 171-174, 1972.

PEDERSON, C. S.; BREED R. S. Fermentation of coffee. **Food Research International**, v. 11, p. 99-106, 1946.

PEREIRA, M. C. **Características químicas, físico-químicas e sensorial de genótipos de grãos de café (*Coffea arabica* L.)**. 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2008.

PEREIRA, M. C.; CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, G. R.; SAVIAN, T. V. Multivariate analysis of sensory characteristics of coffee grains (*Coffea arabica* L.) in the region of upper Paranaíba. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 635-641, 2010. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1807-86212010000400010&script=sci_arttext>. Acesso em: 08 jun. 2015.

POLTRONIERI, Y.; MARTINEZ, H. E. P.; CECON, P. R. Effect of zinc and its form of supply on production and quality of coffee beans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Malden, v. 91, p. 2431-2436, 2011.

POZZOBON, I. **A epopéia do café no Paraná**. Londrina: Grafmarke, 2006. 224p.

REIS JUNIOR, F. B.; da SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Intra-Specific Diversity study of the nitrogen fixing bacterium *Azospirillum amazonense* isolated from different *Brachiaria* species. **Symbiosis**, v. 36, n. 1, p. 41-56, 2004.

RIBEIRO, D. C.; BOGO, A.; DANTAS, A. C. M.; GOMES, E. A.; COELHO, C. M. M.; GUIDOLIN, A. F. Comparação das técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento de região ITS-rDNA para análise filogenética de isolados de *Colletotrichum* spp. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 8, n. 1, p.43-52, 2009. Disponível em: < <http://200.19.105.203/index.php/agroveterinaria/article/view/5312/3518>>. Acesso em: 03 out. 2014.

RODARTE, M. P.; DIAS, D. R.; VILELA, D. M.; SCHWAN, R. F. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 3, p. 457-464, 2011. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-86212011000300011>. Acesso em: 03 abr. 2014.

ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA, L. M. P.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; CAMARGO, F. A. O. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, p. 1367-1380, 2007. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832007000600015>. Acesso em: 10 jul. 2015.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science**, Cambridge, v. 239, p. 487-491, 1988.

SAKIYAMA, C. C. H. **Colonização de *Coffea arabica* L. por bactérias endofíticas promotoras de crescimento**. 2001. 72 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2001. Disponível em: <<http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/10820/3203/168924f.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

SAKIYAMA, C. C. H. MEZÊNCIO, J. M. S.; PEREIRA, P. C.; PITTA, O. P. L.; CAMPOS, M. R. C.; SILVA, D. O. Colonização epifítica e endofítica de frutos de *Coffea arabica* L. por bactérias metilotróficas facultativas de pigmentação rósea. Trabalho apresentado no Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil (3. : 2003 : Porto Seguro, BA). **Resumos**. Brasília, D.F. : Embrapa Café, 2003.

SANTOS, P. E. L.; CRISTALES, R. B.; MELLADO, J. C. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixer with wide environmental geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Maryland, v. 67, p. 2790-2798, 2001.

SANTOS, T. M. A. **Diversidade genética de bactérias endofíticas associadas a frutos de café (*Coffea arabica* L.)**. 2008. 112 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2008. Disponível em: <http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde_arquivos/36/TDE-2013-06-21T075108Z-4626/Publico/texto%20completo.pdf>. Acesso em: 13 mai. 2014.

SCAA – SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION OF AMERICA. **Bylaws**. 2010. Disponível em: <<http://www.scaa.org/PDF/SCAA%20By%20Laws%20-%20approved%20april%2019%202010.pdf>>. Acesso em: 08 jun. 2014.

SCALON, J. D.; AVELAR, M. B. L.; ALVES, G. F.; ZACARIAS, M. S. Spatial and temporal dynamics of coffee-leaf-miner and predatory wasps in organic coffee field in formation. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 4, p. 646-652, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782011000400016>. Acesso em: 26 mai. 2014.

SCHMIDT, C. A. P.; MIGLIORANZA, É.; HOMECHIN, M. Microflora associada aos grãos de café em coco e beneficiado produzidos no Paraná. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Curitiba, v. 4, n. 1, p. 10-18, 2010.

SEDIYAMA, G. C.; MELO JUNIOR, J. C. F.; SANTOS, A. R.; RIBEIRO, A.; COSTA, M. H.; HAMAKAWA, P. J.; COSTA, J. M. N.; COSTA, L. C. Zoneamento agroclimático do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) para o Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 9, p. 501-509, 2001.

SILVA, C. A. **Resposta do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) à lâminas de irrigação por gotejamento**. 2007. 66 f. Dissertação (Pós-Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia. 2007. 66 f.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; ABREU, L. M.; DIAS, E. S.; SCHWAN, R. F. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 8, p. 951-957, 2008.

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

SILVA, C. F.; VILELA, D. M.; CORDEIRO, C. S.; DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 29, p. 235-247, 2013.

SILVA, M. S. **Levantamento histórico, paisagístico e avaliação da percepção atual dos jardins do instituto central de ciências da Universidade de Brasília**. 2011. 188 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade de Brasília, Brasília. 2011.

SILVEIRA, D. N.; CARVALHO, C.; REETZ, E.; POLL, H. **Anuário Brasileiro do Café**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2013. 128 p. Disponível em: <http://www.grupogaz.com.br/tratadas/eo_edicao/8/2013/06/20130618_f48b0dc6a/flip/>. Acesso em: 02 mar. 2010.

SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. Microbiota presente em frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.) despulpado e natural: uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 37, n. 1, p. 22-28, 2003.

SILVA, R. F.; PEREIRA, R. G. F. A.; BORÉM, F. M.; MUNIZ, J. A. Qualidade do café-cereja descascado produzido na região sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 6, p. 1782-1787, 2009.

SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, 163, 1949. 1-688.

SIQUEIRA T. V. A cultura do café: 1961-2005. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 22, p. 205-270, 2005.

SMITH, R. F. A history of coffee. In: CLIFFORD, M. N.; WILLSON, K. C.(eds) **Coffee botany, biochemistry and production of beans and beverage**. London Sydney: Croom Helm, 1985. p. 1-12.

SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; FELBER, A. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. **Revista UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 16, n. 4, p. 345-351, 2014. Disponível em: <<http://www.pgsskroton.com.br/seer/index.php/biologicas/article/download/393/370>> Acesso em: 03 de outubro de 2015.

SPIER, F. F.; TACUÁTIA, L. O.; AGOSTINI, G.; EGGERS, L.; CHIES, T. T. S. Uso de marcadores PCR-RFLP como ferramenta na identificação de espécies da subfamília Iridoideae (Iridaceae) presentes no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto alegre, v. 6, n. 3, p. 159-165, 2008.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio. Seropédica/RJ, **Boletim Técnico**, Embrapa Agrobiologia, 58p. 1999.

SUN, J. Q.; XU, L.; ZHANG, Z.; LI, Y.; TANG, Y. Q.; WU, X. L. Diverse bacteria isolated from microtherm oil-production water. **Antonie van Leeuwenhoek**, v, 105, p. 401-411, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24318281>>. Acesso em: 20 out. 2015.

SYLVAIN, P. G. Some observations on *Coffea arabica* L.in Ethiopia. **Turrialba**, Costa Rica, v. 5, p. 37-53, 1955.

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

THOMAS, A. S. The wild arabica coffee on the Boma Plateau, Anglo–Egyptean Sudan. **Empire Journal of Experimental Agriculture**, Oxford, v. 10, p. 207-212, 1942.

VAN PEE, W.; CASTELEIN, J. M. The yeast flora of fermenting *robusta* coffee. **East African Agricultural and Forestry Journal**, Grahamstown, v. 36, p. 308-310, 1971.

VAUGHN, R. H.; CAMARGO, L.; FALANGHE, H.; MELLO-AYRES, G.; SERZEDELLO, A. Observations on the microbiology of the coffee fermentation in Brazil. **Food Technology**, v. 12, Suppl. 4, 1958.

VEGA, F. E.; PAVA-RIPOLL, M.; POSADA, F.; BUYER, J. S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, p. 371-380. 2005.

VIANA, S. C.; PEREIRA, A. A.; VANETTI, M. C. D.; BORGES, A. C. Método para se conservar a viabilidade de bactérias e leveduras do mesocarpo mucilaginoso de frutos de café. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19. 1997, Rio de Janeiro: **Resumos...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia. 1997. p.147.

VILELA, D. M. **Seleção in vitro de culturas iniciadoras para fermentação de frutos de café (*Coffea arabica* L.) processados via seca e semi-seca.** 2011. 80 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2011.

VILELA, D. M.; PEREIRA, G. V. M.; SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 1128-1135, 2010.

VOIGT-GAIR, L. **Fatores edafoclimáticos e atributos sensoriais de cafés dos concursos “Café Qualidade Paraná” (2004 a 2009).** 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2011. Disponível em: < <http://www.bibliotecadigital.uel.br/document/?view=vtls000163998>>. Acesso em: 02 mai. 2014.

VOIGT-GAIR, L.; MIGLIORANZA, É.; FONSECA, I. C. B. A dinâmica do concurso “Café Qualidade Paraná” na produção de cafés especiais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, suplemento 1, p. 3173-3180, 2013. Disponível em: < http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/10917/pdf_60>. Acesso em: 06 mai. 2014.

WANG, X.; WAN, X.; HU, S.; PAN, C. Study on the increase mechanism of the caffeine content during the fermentation of tea with microorganisms. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1086-1091, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607009429>>. Acesso em: 19 mai. 2014.

WELLMAN, F. L. **Coffee, botany, cultivation and utilization**. London: Leonard Hill Books, 1961.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, Maryland, n. 73, p. 2271-2277, 1991.