



MARIANA LINO DE SOUZA

**BIOCONTROL AND MECHANISMS OF YEASTS
ON OCHRATOXIN A – PRODUCING FUNGI
IN COFFEE BERRIES**

**LAVRAS – MG
2018**

MARIANA LINO DE SOUZA

**BIOCONTROL AND MECHANISMS OF YEASTS ON OCHRATOXIN A –
PRODUCING FUNGI IN COFFEE BERRIES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutora.

Prof.^a Dr.^a. Cristina Ferreira Silva e Batista - UFLA
Orientadora

Prof. Dr. Luís Roberto Batista - UFLA
Coorientador

**LAVRAS – MG
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Souza, Mariana Lino de.

Biocontrol and mechanisms of yeasts on ochratoxin A -
producing fungi in coffee berries / Mariana Lino de Souza. - 2018.
82 p. : il.

Orientador(a): Cristina Ferreira Silva e Batista.

Coorientador(a): Luís Roberto Batista.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Yeast post-harvest control. 2. *Coffea arabica*. 3. *Aspergillus*.
I. Batista, Cristina Ferreira Silva e. II. Batista, Luís Roberto. III.
Título.

MARIANA LINO DE SOUZA

**BIOCONTROL AND MECHANISMS OF YEASTS ON OCHRATOXIN A –
PRODUCING FUNGI IN COFFEE BERRIES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutora.

Aprovada em 20 de março de 2018.

Prof. Dr. Flávio Henrique Medeiros de Vasconcelos	UFLA
Prof. ^a Dr. ^a Kátia Regina Freitas Schwan- Estrada	UEM
Dr. Leonardo de Figueiredo Vilela	UFLA
Prof. Dr. Luís Roberto Batista	UFLA

Prof.^a Dr.^a Cristina Ferreira Silva e Batista - UFLA
Orientadora

**LAVRAS – MG
2018**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João e Angela, que sempre proporcionaram a suas filhas a possibilidade de obter uma educação mais aprimorada.

As minhas irmãs, Roseli, Marli e Eliana pelo carinho e por estar ao meu lado.

Ao Braylan, pelo companheirismo, paciência, conselhos. Obrigada por sempre apoiar minhas decisões e estar ao meu lado mesmo havendo certa distância.

As alunas que estagiaram no laboratório de microbiologia ambiental e industrial e me auxiliaram na separação dos cafés, Erica e Francielli e, na etapa de inoculação em terreiro, Larissa Pimenta.

A Iara da Fitopatologia por disponibilizar materiais sobre Kit de detecção de Ocratoxina A (OTA); a Dra. Fabiana Passamani pela ajuda nos testes de OTA; a técnica Aneti e a prof. Suzan K. V. Bertolucci por proporcionar a utilização do equipamento de ELISA, no Horto de Plantas Mediciniais, da UFLA.

Ao prof. Dr. Eduardo Alves, o Dr. Silvino e as técnicas Elisa e Aline pelo auxílio com as análises de microscopia eletrônica de varredura, no laboratório LME, do departamento de Fitopatologia.

A Dra. Suzana Reis pela doação dos cafés (2015) e ao prof. Dr. Gladyston Rodrigues Carvalho (EPAMIG-UFLA) pela doação dos 200 Kg de cafés (2016).

A Dra. Suzana Reis e Dra. Luciana Ribeiro pela explicação, na etapa de padronização dos inóculos, a serem pulverizados nos cafés, na etapa de campo.

Ao Polo do Café pelo espaço concedido para secar os cafés, ao Maurício pelo empréstimo da chave e todo o auxílio nesta etapa; Alexandre e Kelvin por ajudar em alguns dias a cobrir os cafés no final da tarde.

Ao laboratório de Processamento de Produtos Agrícolas, sob a responsabilidade do prof. Dr. Borém, pelo empréstimo das grades de sombrite para a secagem dos cafés, em 2015; por permitir o uso da estufa para aferir o teor de água nos grãos de café (2015 e 2016); uso do moinho para triturar as amostras de café e o auxílio da técnica Ana Paula e a aluna Cláudia.

Ao Dr. Gustavo Magno por ter me auxiliado na busca dos cafés para o experimento de 2015, e ajuda para rodar dados estatísticos, experimento *in vitro*. A Dra. Kelly Cristina, Dra. Angélica Cristina e Ms. Daiane Bonaldi por me aconselharem em algumas etapas do experimento para detecção de enzima.

Ao Dr. Leonardo Vilela pelo auxílio na etapa da realização dos testes de análise de compostos orgânicos voláteis. A Dra. Maria Gabriela pelo auxílio em relação à parte do uso do Maldi-tof e outras etapas moleculares.

Ao Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela doação das espécies de leveduras sensíveis padrão, utilizadas no teste *killer*.

À Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola (CCMA) e à Coleção de Culturas do Departamento de Ciências dos Alimentos (CCDCA), pelo fornecimento, respectivamente, das cepas de leveduras e isolados de fungos ocratoxigênicos.

A Dra. Josiane Pires e a Dra. Nádia Batista pelo auxílio nas análises de qPCR.

Ao professor Dr. Luís Roberto, pelos ensinamentos transmitidos e conselhos.

À professora Dra. Cristina F. S. Batista, agradeço pelos ensinamentos, pela dedicação em me orientar, pela paciência em todos os momentos, por transmitir seus conhecimentos e pelo exemplo que passa como professora e pesquisadora.

A todos os membros das bancas (projeto; qualificação; defesa final) pelas contribuições para este trabalho.

À Universidade Federal de Lavras, o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola (PPGMA) e seus professores pelos conhecimentos transmitidos. Aos Departamentos de: Biologia, Ciências dos Alimentos (Laboratório de Micotoxinas e Micologia) e aos laboratórios: Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME); Laboratório de Microbiologia Industrial e Ambiental (MAI); Laboratório de Enzimas e Cromatografia da Microbiologia; Horto de Plantas Medicinais; Laboratório de Processamento de Produtos Agrícolas. Agradeço a todos pelo apoio durante a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da Bolsa de Estudos.

A todos os funcionários do Departamento de Biologia da UFLA, em especial a Cidinha, Ivani, Paulinho, Jaja e Rose, pelos serviços prestados.

Aos núcleos de estudos: Núcleo de Estudos em Fermentações (NEFER); Núcleo de Estudos em Taxonomia Polifásica de *Aspergillus* e *Penicillium* (NETAX) e Núcleo de Estudos em Microbiologia Ambiental e Industrial (NEMAI), pelas oportunidades de aprendizado, crescimento pessoal e profissional.

A todos que, contribuíram diretamente ou indiretamente, para a concretização deste trabalho.

Muito Obrigada!

*“É exatamente disso que a vida é feita, de momentos.
Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para nosso próprio aprendizado.
Nunca esquecendo o mais importante: nada nessa vida é por acaso.
Absolutamente nada.
Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível.
A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”*

Chico Xavier

RESUMO

As leveduras podem ser aplicadas em diferentes processos biotecnológicos na indústria, produção de alimentos, ou no campo, no biocontrole de fungos toxigênicos. Esses podem produzir substâncias, como a ocratoxina A (OTA), que é tóxica aos seres humanos e animais. O biocontrole pode ser aplicado na etapa de pós-colheita utilizando leveduras produtoras de compostos orgânicos voláteis (COV), por não deixarem resíduos nos alimentos. Este estudo teve como objetivos avaliar os possíveis mecanismos de biocontrole, de 32 isolados dos gêneros *Candida*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Wickerhamomyces*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces*. Os testes *in vitro* avaliaram produção de toxina *killer*; produção de COV e crescimento micelial de *Aspergillus carbonarius* CCDCA 10608 e *A. ochraceus* CCDCA 10612 em co-cultivo com leveduras em placas bipartidas; efeito fungistático ou fungicida; produção de β -1,3-glucanase; produção de substâncias com ação antagonista obtidos de extratos *cell-free*. Os testes *in vivo*, em frutos de café (*Coffea arabica*) Catuaí vermelho, processados via seca, foram realizados inoculando cepas de *S. cerevisiae* CCMA (0159; 1302) e avaliando o biocontrole frente aos isolados CCDCA (10608; 10612). Avaliou-se a presença de OTA na casca e grão de café do tempo inicial e final, através de ensaio imunoenzimático (ELISA). A formação de um biofilme e a interação levedura e fungo, na superfície dos frutos de café, foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O comportamento dinâmico da inoculação de *S. cerevisiae* CCMA1302 e *A. carbonarius*, durante o processo fermentativo, foi avaliado pela técnica de PCR em tempo real. As leveduras apresentaram mais de um mecanismo de biocotrole. *S. cerevisiae* CCMA (0159; 1299; 1302) apresentaram produção de COV, toxina *killer* e β -1,3-glucanase. No teste *killer* onze isolados foram produtores de toxina. Em relação à produção de COV, oito tiveram efeito inibitório sobre *A. ochraceus* CCDCA10612 e sete sobre *A. carbonarius* CCDCA10608. Não houve produção de esporos por *A. carbonarius* em co-cultivo com *S. cerevisiae* CCMA 1306 e o crescimento micelial foi inibido em 65%. *A. ochraceus* apresentou inibição do crescimento micelial na presença das cepas de *S. cerevisiae* CCMA 1313 (69,83%) e CCMA 1306 (79,88%). *S. cerevisiae* CCMA 1302 foi a melhor produtora de β -1,3-glucanase em 120 horas. Nos testes utilizando o sobrenadante *cell-free* não foi observado ação antagonista e, portanto os fungos desenvolveram-se normalmente. As leveduras avaliadas apresentaram ação fungistática. Em café foi detectada OTA em 17 (24,28%) das amostras analisadas, em concentrações que variaram de 0,04 a 10,11 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. A formação de biofilmes, pelas cepas CCMA (0159; 1302), na casca do café, foi observada pela MEV, essas foram antagonistas no desenvolvimento e produção da OTA, devido à competição por espaço e nutrientes. Houve diminuição da população de *A. carbonarius* na presença da levedura CCMA 1302, no tempo inicial da fermentação (6,2 log esporos/g) e no final (5,7 log esporos/g). Assim, resultados positivos foram obtidos tanto nos testes *in vitro* quanto nos *in vivo*. A maioria das cepas de *S. cerevisiae* apresentaram os melhores resultados dos testes *in vitro*. *S. cerevisiae* CCMA 1302 é uma candidata a agente de biocontrole de fungos ocratoxigênicos em frutos de café.

Palavras-chave: *Aspergillus*. *Coffea arabica*. Controle biológico. Compostos orgânicos voláteis. Levedura, controle pós-colheita.

ABSTRACT

Yeasts can be applied in different biotechnological processes in industry, food production, or in the field as the biocontrol of toxigenic fungi. Fungi produce substances such as ochratoxin A (OTA), which is toxic to humans and animals. Biocontrol can be applied in the post-harvest stage using volatile organic compound (VOC) yeasts, as they do not leave residues in food. This study aimed to evaluate the possible biocontrol mechanisms of 32 isolates of *Candida*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Wickerhamomyces*, *Rhodotorula* and *Saccharomyces*. *In vitro* tests evaluated were killer toxin production; VOC production and mycelial growth of *Aspergillus carbonarius* CCDCA 10608 and *A. ochraceus* CCDCA 10612 in co-cultivation with yeasts; fungistatic or fungicidal effect; β -1,3-glucanase production; production of antagonistic substances obtained from *cell-free* extracts. *In vivo* tests on dried red coffee (*Coffea arabica*) Catuaí fruits were carried out by inoculating *S. cerevisiae* CCMA strains (0159; 1302) and evaluating the biocontrol against CCDCA isolates (10608; 10612). The presence of OTA in the husk and coffee bean of the initial and final time was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The formation of a biofilm and the interaction of yeast and fungus, on the surface of coffee fruits, were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The dynamic behavior of the inoculation of *S. cerevisiae* CCMA1302 and *A. carbonarius* during the fermentation process was evaluated by the real time PCR technique. Yeasts had more than one biocotrole mechanism. *S. cerevisiae* CCMA (0159; 1299; 1302) showed production of VOC, killer toxin and β -1,3-glucanase. In the killer test, eleven isolated were killer positive. In relation to the production of VOCs, eight compounds had an inhibitory effect on *A. ochraceus* CCDCA10612 and seven on *A. carbonarius* CCDCA10608. There was no spore production by *A. carbonarius* in co-cultivation with *S. cerevisiae* CCMA 1306 and mycelial growth was inhibited in the rate to 65%. *A. ochraceus* showed inhibition of mycelial growth in the presence of *S. cerevisiae* strains CCMA 1313 (69.83%) and CCMA 1306 (79.88%). *S. cerevisiae* CCMA 1302 was the best producer of β -1,3-glucanase in 120 hours. In the tests using the *cell-free* supernatant no antagonistic action was observed and therefore the fungi developed normally. The yeasts evaluated presented fungistatic action. In coffee, OTA was detected in 17 (24.28%) of the analyzed samples at concentrations ranging from 0.04 to 10.11 $\mu\text{g} / \text{kg}$. The formation of biofilms by the yeasts strains (0159; 1302) in the coffee husk was observed by scanning electron microscopy, these were antagonists in the development and production of OTA due to the competition for space and nutrients. There was a decrease in the population of *A. carbonarius* in the presence of yeast CCMA 1302, at the initial fermentation time (6.2 log spores / g) and at the end (5.7 log spores / g). Thus, positive results were obtained both in *in vitro* and *in vivo* tests. Most strains of *S. cerevisiae* showed the best *in vitro* test results. *S. cerevisiae* CCMA 1302 is a candidate for biocontrol agent of ochratoxigenic fungi in coffee fruits.

Keywords: *Aspergillus*. *Coffea arabica*. Biological control. Volatiles organic compounds. Yeast, post-harvest control

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL - Bactérias do Ácido Lático

DBC - Delineamento em Blocos Casualizados

CCDA - Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciências dos Alimentos

CCMA - Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola

CECAFE - Conselho dos Exportadores de Café do Brasil

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

COV- Compostos Orgânicos Voláteis

DO - Densidade Óptica

ELISA - Técnica de Ensaio Imunoenzimático

FAO - Organização Mundial de Alimentos e Organização Mundial da Saúde

GC-MS- Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa

HS- SPM - Microextração em Fase Sólida

PPC - Preparado de Parede Celular

MAI- Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEA- Meio Ágar Extrato de Malte

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

OTA – Ocratoxina A

OTB - Ocratoxina B

OTC - Ocratoxina C

4-OH OTA - 4-hidroxiocratoxina A

OT α - Ocratoxina α

qPCR - PRC quantitativo em tempo real

RI - Índice de Retenção

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	12
1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	Café.....	15
2.1.1	Produção brasileira de café.....	15
2.1.2	Fruto do cafeeiro e sua composição química.....	16
2.1.3	Processamento do café.....	18
2.1.3.1	Processamento via seca.....	18
2.1.3.2	Processamento via semi-seca.....	20
2.1.3.3	Processamento via úmida.....	20
2.1.4	Diversidade microbiana presente no café.....	21
2.2	Micotoxinas.....	24
2.2.1	Ocratoxina A (OTA).....	25
2.3	Segurança alimentar.....	28
2.4	Biocontrole.....	30
2.4.1	Biocontrole com leveduras	31
2.5	Microscopia eletrônica de varredura como ferramenta para pesquisas .	37
2.6	Cromatografia gasosa para detecção de compostos voláteis produzidos por microrganismos.....	39
2.7	PCR Quantitativa (qPCR).....	40
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
	REFERÊNCIAS.....	37
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO.....	57
	Biocontrol and mechanisms of yeasts on ochratoxin A - producing fungi in coffee berries.....	58

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a cafeicultura possibilita a geração de muitos empregos, além da arrecadação de impostos que são importantes para a economia nacional. Assim, para o Brasil continuar como maior exportador de café, é necessário investir na produtividade e qualidade realizando melhorias, na colheita, processamento e armazenamento para evitar a contaminação dos grãos de cafés com fungos toxigênicos.

Diversos fungos filamentosos podem fazer parte da microbiota natural do café. Os gêneros *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* são os mais encontrados (BATISTA et al., 2009; CHALFOUN, 2010; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008).

A incidência de alguns desses fungos filamentosos em cafés podem promover a redução de qualidade sensorial e ser um risco para a saúde. Além disso, em países importadores e exportadores a qualidade pode estar associada à presença de micotoxinas.

Dentre as micotoxinas presentes em grãos de café, a Ocratoxina A (OTA) é a de maior relevância e representa um risco mais imediato ao consumo do produto. Essa micotoxina é estável ao calor, permanecendo intacta durante a maioria das operações de processamento de alimentos e, portanto, pode estar presente nos produtos finais (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007).

A OTA tem efeitos carcinogênicos, nefrotóxicos, teratogênicos e imunotóxicos em animais e, acredita-se que esteja relacionada com tumores no trato urinário dos seres humanos. Como resultado, a International Agency for research on Cancer, desde 1993 classificou a OTA como um possível agente carcinogênico em humanos (IARC, 1993). Assim, a prevenção da contaminação por fungos produtores de toxinas deve iniciar no campo, na plantação das lavouras e, permanecer na etapa de processamento e armazenamento através da adoção de boas práticas agrícolas.

Em café o principal gênero produtor de OTA é *Aspergillus*, cuja presença pode ser detectada desde a lavoura até o momento da produção da bebida final (BATISTA et al., 2003; CULLIAO; BARCELO, 2015). Deste modo deve se ter o máximo de controle sobre os fatores que favorecem o desenvolvimento desses fungos, como temperatura, umidade e pH bem como a adição de produtos de controle (químico ou biológico).

O biocontrole consiste em um método alternativo e menos prejudicial ao meio ambiente do que aqueles utilizando produtos químicos. Esse pode ser realizado utilizando microrganismos como fungos, bactérias e leveduras.

As leveduras têm características que as tornam promissoras para a utilização como agentes de biocontrole, como não produção de esporos alergênicos e toxigênicos, dessa forma não apresentam riscos ao consumidor; exigem nutrientes simples, podendo inclusive ser utilizados resíduos industriais, como por exemplo, o bagaço de cana, como fonte de carbono, para compor o substrato onde haverá o crescimento desses microrganismos.

As leveduras podem apresentar alguns mecanismos de biocontrole como competição por nutrientes e espaço que podem inibir o crescimento de outros microrganismos presentes no mesmo ambiente ou alimento; podem produzir compostos voláteis capazes de afetar a germinação de esporos e crescimento de fungos filamentosos; a capacidade de sintetizar enzimas líticas que degradam a parede celular de patógenos; produção de toxinas *killer* (CUNHA et al., 2018; FERRAZ et al., 2016; GRZEGORCZYK et al., 2017; KLEIN; KUPPER, 2018; LIMA et al., 2013; ZHOU et al., 2016).

As espécies *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis* e *Pichia guilliermondii*, por apresentarem atividade pectinolítica, produção de ácidos orgânicos e compostos aromáticos voláteis foram utilizadas como culturas *startes* em cafés, resultando na produção de café de alta qualidade e obtendo bebidas com aroma especial de caramelo, ervas e frutas (EVANGELISTA et al., 2014 a; EVANGELISTA et al., 2014 b; SILVA et al., 2013). MARTINEZ et al. (2017) relataram que as espécies *S. cerevisiae* (CCMA 0543), *C. parapsilosis* (CCMA 0544) e *Torulaspora (T.) delbrueckii* (CCMA 0684) modificaram o comportamento da microbiota durante o processamento e produziram cafés de qualidade.

Diante do exposto, os objetivos neste estudo foram:

- a) Analisar a capacidade de 32 cepas de leveduras pertencentes aos gêneros: *Candida*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Wickerhamomyces*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces*: quanto à produção de toxina *killer*; produção de compostos voláteis capazes de inibir o crescimento micelial de *Aspergillus carbonarius* e *A. ochraceus*;
- b) Avaliar o efeito fungicida ou fungistático de leveduras em relação aos fungos *Aspergillus carbonarius* e *A. ochraceus*;
- c) Avaliar o efeito de um sobrenadante *cell-free*, obtido do cultivo de leveduras sobre os fungos filamentosos toxigênicos;

- d) Quantificar β -1,3-glucanase produzida por leveduras do gênero *Saccharomyces*, utilizando um preparado de parede celular de fungos filamentosos toxigênicos, como fonte de carbono;
- e) Avaliar qualitativamente os compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por *Aspergillus carbonarius*, *A. ochraceus*, *Rhodotorula mucilaginosa* e diferentes cepas de *S.cerevisiae*, por cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS);
- f) Avaliar por microscopia eletrônica de varredura (MEV) a presença e a possível interação entre leveduras promissoras e fungos toxigênicos que foram inoculados no fruto de café e processados por via seca;
- g) Quantificar OTA, em grãos e casca de cafés tratados com leveduras, pela técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA);
- h) Quantificar, através de PRC em tempo real (qPCR), a população microbiana de *A. carbonarius* e *S. cerevisiae*, inóculados nos frutos de café, fermentados e processados por via seca.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Café

2.1.1 Produção brasileira de café

O café foi introduzido no Brasil desde o século XVIII, hoje consiste em uma das commodities agrícolas mais importantes do país e tornou-se um dos produtos mais exportados. O gênero *Coffea*, possui duas espécies que apresentam destaques no cenário da produção mundial, *Coffea arabica*, descrita como café arábica e que representa 80% da produção brasileira e *Coffea canephora*, conhecida como café robusta ou café conilon (BRASIL, 2017).

A produção de café arábica se concentra em Minas Gerais e São Paulo, enquanto que o produto conilon está mais presente nos estados: Espírito Santo, seguido por Rondônia e Bahia (BRASIL, 2018). Na tabela 1 está representado um comparativo da produção em 2017 e da estimativa de produção de cafés em 2018, para a região sudeste do país. O estado de Minas Gerais contem as seguintes microrregiões: Sul de Minas (Sul e Centro-Oeste); Cerrado Mineiro (Triângulo, Alto Paranaíba e Noroeste); Zona da Mata Mineira (Zona da Mata, Rio Doce e Central) e Norte de Minas (Norte, Jequitinhonha e Mucuri) (BRASIL, 2018).

Tabela 1 - Café total (arábica e conilon) - Comparativo de produção - Safras 2017 e 2018 - para a região sudeste, destacando Minas Gerais.

Região/Estado	Produção (mil/ sacas)				
	Safra 2017	Safra 2018		Var.%	
	(A)	(B)		(B/A)	
		Superior	Inferior	Superior	Inferior
Sudeste	38.071,1	46.879,7	50.492,7	23,1	32,6
MG	24.445,3	29.093,5	30.632,9	19,0	25,3
Sul e Centro-Oeste	13.684,2	15.553,9	16.376,8	13,7	19,7
Triângulo, Alto Paranaíba e Noroeste	3.658,3	5.873,9	6.184,7	60,6	69,1
Zona da Mata, Rio Doce e Central	6.481,1	6.907,5	7.273,0	6,6	12,2
Norte, Jequitinhonha e Mucuri	621,7	758,2	798,4	22,0	28,4

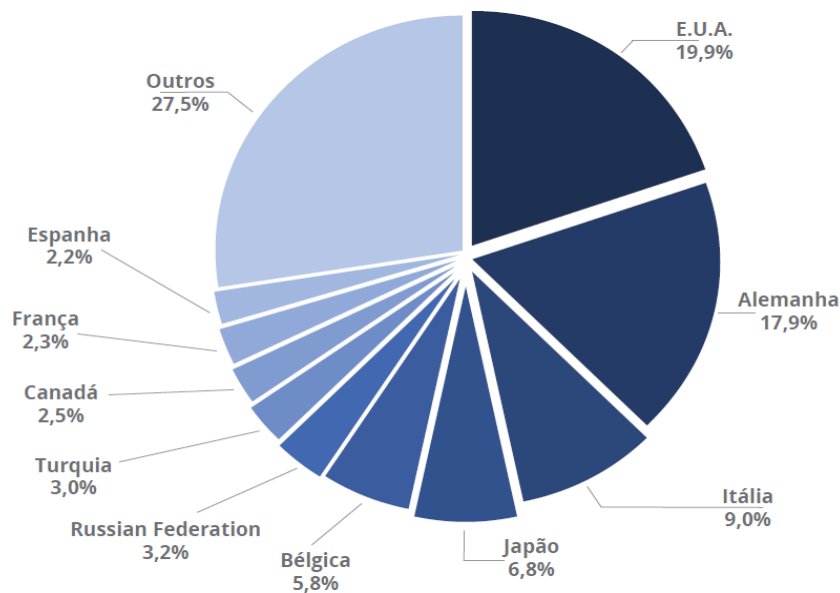
Fonte: modificado de Conab (BRASIL, 2018).

Nota: Estimativa em janeiro /2018.

De acordo com levantamento feito pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) (BRASIL, 2018) a cultura de café (arábica e conilon) tem grande relevância, sendo que a área total plantada no país totaliza 2,2 milhões hectares, apesar disso, foram considerados 0,2% menor do que o ano de 2017. A área plantada de café arábica no Brasil totalizou 1,78 milhão de hectares, correspondendo assim a 81% da área existente com lavouras de café com destaque para Minas Gerais, onde se concentra a maior área com a plantação de café arábica, correspondendo a 68,8% da área ocupada em âmbito nacional.

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café na safra 2017, produziu 44,97 milhões de sacas beneficiadas (BRASIL, 2017). Na figura 1 são mostrados os principais países importadores de café brasileiro em relação a 2017, de acordo com o Conselho dos Exportadores de Café do Brasil (CECAFE, 2018).

Figura 1 - Principais países importadores de café em relação ao período de janeiro a dezembro de 2017.



Fonte: (CECAFE, 2018).

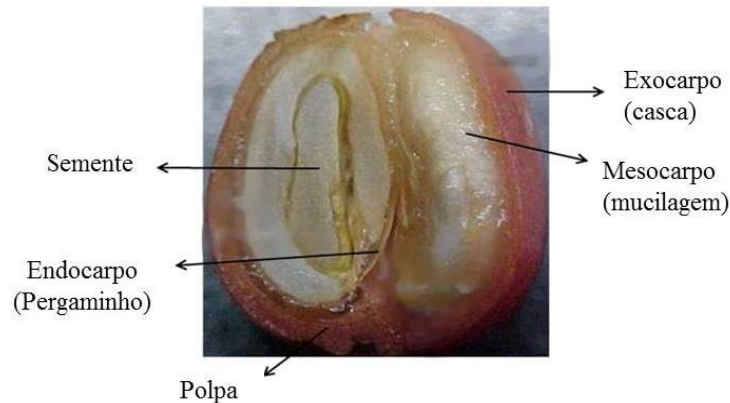
Nota: Relatório mensal Dezembro, 2017.

2.1.2 Fruto do cafeeiro e sua composição química

O fruto de cafeeiro (figura 2) é uma drupa elipsóide, formada pelo exocarpo (casca), mesocarpo (mucilagem) e o endocarpo coriáceo (pergaminho), contendo dois lóculos e duas sementes envolvidas separadamente pelo pergaminho. Estas sementes têm formato, plano-convexas, elípticas ou ovais, contendo um sulco longitudinal na face plana (BORÉM et al.,

2008). As sementes de café são constituídas de embrião, endosperma, película prateada ou espermoderma e endocarpo (SILVA et al., 2003; BORÉM et al., 2008).

Figura 2 - Corte longitudinal com as estruturas do fruto do café no estágio cereja (fase madura: vermelho) mostrando a casca, polpa, mucilagem, pergaminho, e semente. A película prateada fica entre o pergaminho e a semente.



Fonte: SILVA (2015).

Endocarpo (pergaminho) é a parte anatômica que recobre a semente ou grão de café, fica imediatamente após a camada mucilaginoso e representa aproximadamente 12% do grão de café em base seca. Sua composição consiste em matéria seca (92,8%); ácidos graxos (0,6%); nitrogênio (0,39%); cinzas (0,5%); extrato livre de nitrogênio (18,9%); umidade (7,6%), cálcio (150 mg) e magnésio (28 mg) (BRESSANI; ESTRADA; JARQUIM, 1972).

Mesocarpo encontra-se entre o grão de café e a casca constituindo aproximadamente 5% do peso seco do fruto, sua espessura pode variar entre 0,5 a 2 mm e está fortemente aderida ao endocarpo. Essa espessura pode alterar dependendo da variedade, do estágio de amadurecimento e das condições de cultivo (BRESSANI; ESTRADA; JARQUIM, 1972; MENCHÚ; ROLZ, 1973). Fisicamente o mesocarpo é um sistema coloidal líquido, um hidrogel insolúvel. Quimicamente constitui-se por água, pectinas, açúcares e ácidos orgânicos. A camada polissacarídica da mucilagem é um ótimo ambiente para o desenvolvimento de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (AMORIM, 1968).

Exocarpo é constituído de carboidratos solúveis, com predominância de hemicelulose e celulose, que juntamente com outros compostos (ceras, ligninas), funcionam como barreira protetora contra as injúrias e outras adversidades do meio, como as altas temperaturas e umidade e atuam como regulador da perda de água durante o processo de secagem (ILLY; VIANI, 1995).

A qualidade do café, sabor e aroma característico das bebidas é influenciada pela composição de açúcares, proteínas, ácidos graxos, compostos voláteis e fenólicos (ácido clorogênico). O aroma ocorre devido à presença de compostos voláteis (aldeídos, cetonas e ésteres metílicos) que são formados durante a torrefação e ficam retidos nos grãos torrados (PIMENTA, 2003).

2.1.3 Processamento do café

A etapa de processamento do café tem como propósito separar os grãos das demais camadas externas, que são constituídas por casca, mucilagem e pergaminho. Esta etapa possibilita a redução do conteúdo de água de 65% para o teor seguro de transporte e armazenagem sem o risco de ocorrer uma deterioração microbiana (umidade entre 10% e 12%). Esse processamento pós-colheita deve ser realizado imediatamente após a colheita com o objetivo de prevenir fermentações indesejáveis que podem produzir diferentes ácidos, como: acético, láctico, butírico e propiônico, que comprometem a qualidade do café (CHALFOUN; CARVALHO, 2000; NASCIMENTO et al., 2008; SILVA, 2015).

Após a colheita, o tipo de processamento é variável entre os produtores, com o objetivo de adaptarem-se às diferentes condições de produção, baseados nos aspectos climáticos regionais, tecnológicos e econômicos. De acordo com Pereira et al. (2003), além do tradicional preparo por via seca, que ainda é muito utilizado pela maioria dos produtores, tem-se empregado o processamento por via úmida e semi-seca.

Ainda em relação à escolha do tipo de processamento este irá depender da uniformidade de maturação dos frutos, das condições climáticas locais na época da colheita, e da disponibilidade de água no local de produção (SCHWAN et al., 2012).

2.1.3.1 Processamento via seca

Após o recebimento do café colhido, este passa por um processo de limpeza, separando impurezas, como folhas, paus, pedras, terra e, além disso, selecionado nos seus diversos estágios de maturação (verde, cereja, coco e passa). Esta limpeza, geralmente, é feita com a realização da lavagem do café, utilizando-se lavadores de alvenaria ou metálicos pré-fabricados. Posteriormente, o café passa pela etapa de secagem em terreiros ou secadores (CAMPOS; PRADO; PERREIRA, 2010).

Durante o processamento natural, conhecido como via seca, os frutos de café são espalhados em terreiros, podendo ser diretamente no solo, em concreto ou asfalto, formando camadas de 10 cm de espessura. Essas camadas de frutos de café que estão espalhadas quando está aproximando do período da noite são amontoados e todas as manhãs são espalhados novamente. Durante o tempo de 10-25 dias de secagem ao sol, ocorre a fermentação microbiana natural que influencia na qualidade final do produto (SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008). A figura 3 apresenta um esquema do processamento por via seca.

Figura 3 - Etapas do processamento por via seca.



Os cafés naturais são mais encorpados e menos ácidos do que os cafés processados usando o método de via úmida. A secagem e armazenamento do fruto de café são importantes para a preservação da qualidade sensorial e sanitária (SCHWAN et al., 2012).

Em geral, café robusta e café arábica são cultivados no Brasil, Etiópia, Haiti, Indonésia e Paraguai e são processadas utilizando o método seco ou natural (SCHWAN et al., 2014).

2.1.3.2 Processamento via semi-seca

O processamento semi-seco consiste em uma variação do processamento via úmida, sendo um processo intermediário entre a via seca e a úmida. Neste tipo de processamento, os frutos são despulpados mecanicamente e o processo de fermentação ocorre diretamente no terreiro e sem a utilização de tanques de fermentação, resultando nos cafés cerejas despulpados (DUARTE et al., 2010; VILELA et al., 2010). Os cafés verdes produzidos através de processamento semi-seco são geralmente utilizados nas misturas de café expresso (DUARTE et al., 2010).

2.1.3.3 Processamento via úmida

O processamento por via úmida, dependendo do procedimento de processamento que é utilizado pode dar origem aos cafés descascados, despulpados e desmucilados. Este método é utilizado na Colômbia, Quênia, Havaí e em países da América Central. Na via úmida ocorrem as seguintes etapas: primeiramente a colheita seletiva dos frutos no estágio de maturação máxima (cereja), seguido por despulpagem mecânica (desmucilação) e a fermentação em tanques de água e subsequente secagem em pátios (SCHWAN et al. 2014).

Segundo Toledo et al. (2002) este processamento possuem vantagens, pois ocorre uma diminuição considerável no espaço do terreiro e do tempo necessário para secagem, trazendo até 60% de economia em espaço em tulha, terreiro, secador e silos. O monitoramento adequado da lavagem, desmucilagem, secagem e armazenamento do produto fazem parte do processo de melhoramento da bebida.

No processamento úmido o fim da fermentação é determinado por percepções táteis sobre o fruto. Quando os frutos ainda estão escorregadios, há evidências da presença de mucilagem, indicando que a fermentação ainda continua ocorrendo (SCHWAN et al. 2014). Essa forma de percepção tátil é subjetiva e pode falhar, portanto, Jackels e Jackels (2005)

propuseram a medição periódica do valor de pH para controlar o tempo de fermentação, quando se tem valores de pH 4,6 indica total liberação de mucilagem e o fim da fermentação.

2.1.4 Diversidade microbiana presentes no café

A microbiota presente no café depende de uma série de fatores como umidade, temperatura e outros fatores ambientais da região de cultivo, além disso, depende da variedade do café e da maneira que ocorreu o processamento (BATISTA et al., 2009; SILVA et al., 2003).

Os cafés do tipo natural estão expostos a uma grande diversidade de microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, sendo que esses quando encontram as condições favoráveis ao seu desenvolvimento, podem infectar os frutos e os grãos de café (BATISTA et al., 2009; SILVA et al., 2003).

A sucessão microbiana, no decorrer do processamento seco, ocorre da seguinte maneira: as bactérias predominam no início do processo; após 72 horas, tem-se a presença de populações de leveduras e bactérias e ambas atingem valores semelhantes (média de 10^6 UFC/g); depois de 192 horas de fermentação ocorre o domínio pelas leveduras (VILELA et al., 2010).

Silva et al. (2000) observaram que em todas as etapas do processamento de cafés por via seca são encontrados uma grande diversidade de microrganismos como as bactérias Gram-negativas e também Gram-positivas, além de leveduras pertencentes aos gêneros *Pichia*, *Candida*, *Arxula* e *Saccharomycopsis*, e fungos filamentosos como os dos gêneros *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*.

Segundo Silva et al. (2008) algumas dessas espécies de bactérias encontradas em fruto de café natural, são provenientes de diferentes ambientes como do solo, ferramentas agrícolas, ar e água.

No café natural, obtido através do processamento por via seco, há relatos da presença de bactérias tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas (Tabela 2); principalmente nos primeiros dias de fermentação, sendo a média da população em torno de 10^6 - 10^9 UFC/g (SCHWAN; SILVA; BATISTA, 2012).

Tabela 2 - Espécies de bactérias identificadas em café natural durante o período de fermentação no processamento a seco.

Referência	País	Bactéria
Silva et al. (2000, 2008b) Sakiyama et al. (2001) Vaughn (1958)	Brasil	Gram-positiva: <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. macerans</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. stearothermophilus</i> , <i>B. laterosporus</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Brochothrix</i> , <i>Dermabacter</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Acinetobacter</i> sp., <i>B. polymyxa</i> , <i>Kurthia</i> , <i>Paenibacillus amylolyticus</i> Gram-negativa: <i>Aeromonas</i> , <i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Serratia rubidea</i> , <i>S. plymutica</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Tatumella ptyseos</i> , <i>Flavobacteriu</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Chromobacterium</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Cedecea</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Shigella</i> , <i>Providencia mirabilis</i>
De Bruyne et al. (2007)	Etiopia	<i>Leuconostoc</i>
Van Pee and Castelein (1972)	Congo	<i>Erwinia dissolvens</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>Klebsiella</i>

Fonte: SCHWAN et al. (2012).

Em café natural geralmente a população de leveduras é menor do que a bacteriana, com valores médios de 10^4 UFC/mL, seu predomínio ocorre quando se dá a redução da atividade de água (a_w de 0,6) durante o período de secagem. As leveduras presentes podem estar relacionadas com o processo fermentativo e com o controle do crescimento de fungos filamentosos (SCHWAN; SILVA; BATISTA, 2012).

Segundo Silva et al. (2000; 2008) os gêneros de leveduras mais encontrados em frutos fermentados e secos são *Pichia*, *Candida* e *Arxula*. Uma diversidade de espécies de leveduras, presentes na superfície de cafés, foram identificadas por Silva et al. (2000, 2008) dentre elas estão *Arxula adenivorans*, *Blastobotrys proliferans*, *Candida aurangiensis*, *C. glucosophila*, *C. incommunis*, *C. membranifaciens*, *C. paludigena*, *C. schatarii*, *C. saitoana*, *C. fermentati*, *C. vartiovaarae*, *Citeromyces matritensis*, *Debaryomyces polymorphus*, *D. hansenii*, *Geotrichum fermentans*, *Pichia guilliermondii*, *P. acaciae*, *P. anomala*, *P. burtonii*, *P. ciferii*, *P. jadinii*, *Pichia lynferdii*, *P. ofunaensis*, *P. sydowiorium*, *P. subpelliculosa*, *Saccharomyces cerevisiae*,

Saccharomycopsis fermentans, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Sporopachydermia cereana*, *Stephanoascus smithiae*, *Trichosporonoides oedocephales* e *Williopsis saturnus* var. *sargentensis*.

Em estudos realizados por Silva et al. (2008) foi observado que no decorrer do processamento seco a presença de fungos filamentosos é menor que de bactérias e leveduras. Os fungos filamentosos presentes em cafés já foram encontrados em diferentes estádios de maturação, processamento e beneficiamento. Alguns gêneros já relatados que foram isolados de grãos de café são: *Alternaria* (MISLIVEC; BRUCE; GIBSON, 1983), *Aspergillus* (AMORIM; MELLO, 1991; BATISTA et al., 2003, 2009; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; SILVA et al., 2000), *Cladosporium* (BATISTA et al., 2003, 2009; SILVA et al., 2000), *Fusarium* (AMORIM; MELLO, 1991; BATISTA et al., 2003, 2009; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; SILVA et al., 2000) e *Penicillium* (BATISTA et al., 2003, 2009; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; SILVA et al., 2000).

Batista e Chalfoun (2007) realizaram estudos com grãos de café secos em terreiro de terra, cimento e asfalto, e confirmaram a presença de espécies de fungos toxigênicos que foram identificados como produtores de Ocratoxina A (OTA) dentre eles *Aspergillus ochraceus*, *A. sclerotiorum* e *A. sulphureus*. Sendo que os maiores índices de contaminação com OTA foram encontrados nos cafés do tipo varrição, boia e mistura seca em terreiro de terra. A partir dos dados concluíram que o terreiro de terra aumenta o risco de contaminação com OTA em grãos de café.

Em cafés de sistemas de cultivo orgânico e convencional do sul de Minas Gerais as principais espécies encontradas como produtoras de OTA foram *Aspergillus auricoumus*, *A. ochraceus*, *A. ostianus*, *A. niger* e *A. niger* agregado. A espécie *Aspergillus ochraceus* correspondeu a 89,55% da produção de OTA, porém não houve diferença significativa em relação à presença de *A. ochraceus* entre os sistemas de cultivo sendo o risco de contaminação semelhante para ambos (REZENDE et al., 2013).

2.2 Micotoxinas

As micotoxinas são produtos naturais de baixo peso molecular, tóxicas ao homem e animais, mesmo em baixas concentrações e são produzidas por algumas espécies de fungos filamentosos. Algumas dessas toxinas permanecem localizadas no micélio fúngico enquanto que a maior parte é secretada no substrato (COPETTI et al., 2012). Em pequenas concentrações essas são tóxicas para os vertebrados e outros animais e, apesar de todas as

micotoxinas serem de origem fúngica, nem todos os compostos tóxicos produzidos pelos fungos são considerados micotoxinas (BENNET; KLICH, 2003).

A Ocratoxina A (OTA) é uma molécula estável ao calor, permanecendo intacta durante a maioria das operações de processamento de alimentos e, portanto, pode estar presente nos produtos finais (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007).

Essa micotoxina ocorre em diversos gêneros alimentícios e bebidas, incluindo, cevada, trigo, centeio, milho, cerveja, arroz, feijão, grãos de café (verde e torrado), amendoim, soja, carne suína e aves, castanha-do-Brasil, pão, nozes, frutas secas, suco de maçã, condimentos, uva e derivados, e outros substratos naturais como solo e vegetais (ABRUNHOSA; SERRA; VENÂNCIO, 2002; ASTORECA et al., 2009; BATISTA et al., 2009; CECI et al., 2007; DUARTE; PENA; LINO, 2010; LASRAM et al., 2010; PERRONE et al., 2007; VARGA; SAMSON, 2008).

O crescimento fúngico e a produção de micotoxinas dependem de uma complexa interação entre diversos fatores, como, temperatura, atividade de água (a_w), pH, fatores nutricionais, tipos de substratos, pelos procedimentos realizados durante a colheita, armazenamento e transporte dos produtos, dentre outros (ANLI; ALKIS, 2010; GARCIA et al., 2011; LASRAM et al., 2010; PALACIOS-CABRERA et al., 2004; PATERSON; LIMA, 2010; PASSAMANI et al., 2014; PETZINGER; WEIDENBACH, 2002; ROMANI et al., 2000).

As principais espécies produtoras de Ocratoxina A (OTA) em alimentos são do gênero *Aspergillus*, pertencentes às seções *Circumdati* e *Nigri* (PITT et al., 2000). Em grãos e frutos de café, as principais espécies potencialmente ocratoxigênicas do gênero *Aspergillus* são *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* (BATISTA et al., 2003; GILBERT; ANKLAM, 2002; MORELLO et al., 2007; TANIWAKI et al., 2003).

Os fungos da Seção *Nigri* possuem esporos de coloração preta conferindo proteção à luz solar e a radiação UV, fornecendo assim uma vantagem competitiva em regiões de clima quente (PITT; HOCKING, 1997).

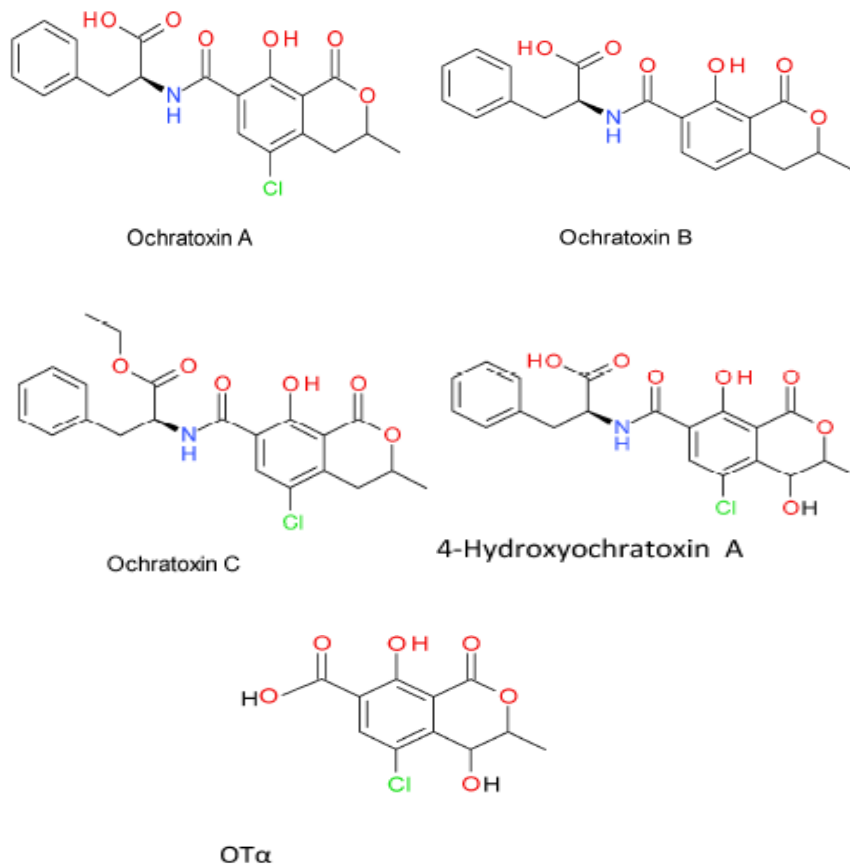
A principal micotoxina estudada em café é a ocratoxina A, e sua presença tem sido atribuída principalmente ao fungo *A. ochraceus* e espécies relacionadas, *A. carbonarius* e raramente por *A. niger* (BATISTA et al., 2009; PARDO et al., 2004; URBANO et al., 2001). Esses estudos são importantes visto que o mercado mundial está cada vez mais preocupado em ofertar produtos de qualidade aos seus consumidores.

2.2.1 Ocratoxina A (OTA)

Alguns fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, que frequentemente contaminam o café e uma ampla variedade de cereais, são produtores de OTA. Essa micotoxina é um metabólito secundário e sua produção ocorre na fase exponencial tardia, ou no início da fase estacionária de crescimento (LARSEN et al., 2001; MOSS, 1996).

Entre as ocratoxinas e análogos que compõe esses metabólitos secundários existem: Ocratoxina A (OTA), Ocratoxina B (OTB), Ocratoxina C (OTC), 4-hidroxiocratoxina A (4-OH OTA) e Ocratoxina α (OT α) (Figura 4). Essas micotoxinas são constituídas de 2 grupamentos: di-hidroxiisocumarina ligada através do seu grupo 7-carboxi à amida do grupamento L- β -fenilalanina (essa ligação é muito estável em relação à hidrólise e à temperatura), com exceção da OTA em que o grupamento fenilalanina está ausente (RINGOT et al., 2006).

Figura 4 - Estruturas de Ocratoxina A (OTA), Ocratoxina B (OTB), Ocratoxina C (OTC), 4-hidroxiocratoxina A (4-OH OTA) e Ocratoxina α (OT α).



Fonte: ANLI; ALKIS (2010).

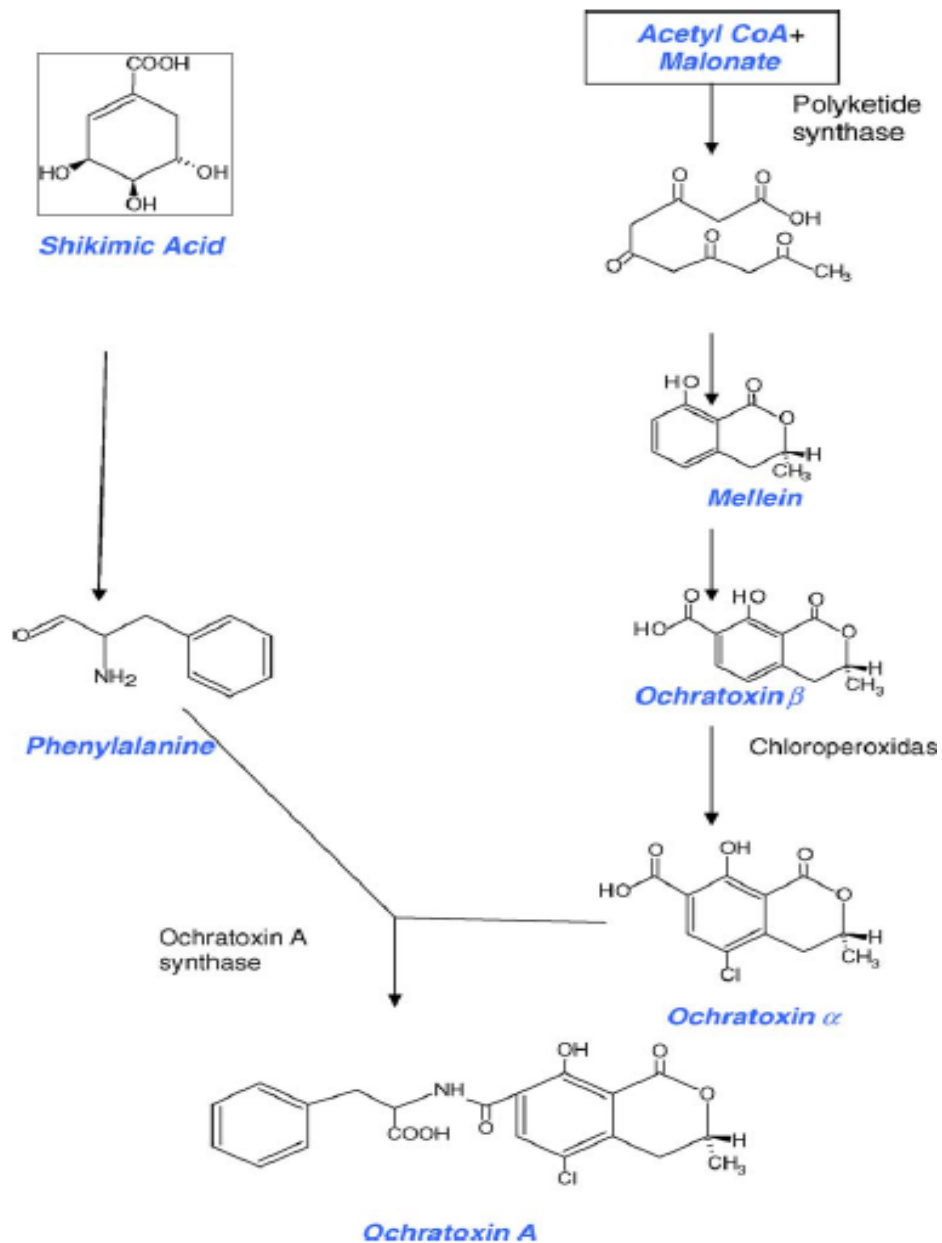
A estrutura da OTA é caracterizada quimicamente por ser um derivado isocumarínico ligado através do seu grupo 7-carboxílico a L-β-fenilalanina por um grupo amida (Figura 4). Dentre as ocratoxinas a OTA é considerada a mais tóxica, devido à presença do átomo de cloro na posição C5, exercendo um efeito direto na dissociação do grupo hidroxil fenólico na OTA e ocratoxina C, promovendo um efeito tóxico à molécula (BELLÍ et al., 2002).

Ocratoxina A é um composto branco cristalino cujo nome químico é R-N-[(5-clo-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopiran-7-il)carbonil] L-fenilalanina. Sabe-se que essa é pouco solúvel em água, mas solúvel em solução aquosa de bicarbonato de sódio. Sua fórmula empírica é C₂₀H₁₈O₆NCl e o seu peso molecular é de 403,82 g mol⁻¹ (ANLI; ALKIS, 2010). O máximo de fluorescência ocorre a 467 nm em metal 96% e a 428 nm em etanol absoluto (RINGOT et al., 2006).

Dentro desse grupo das diferentes ocratoxinas, a OTA é a mais tóxica, sendo considerada como uma substância hepatotóxica, nefrotóxica (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009), genotóxica (TOZLOVANU et al., 2006), mutagênica (PALMA et al., 2007), teratogênica e imunossupressora em vários animais, podendo causar tumores no fígado e nos rins. Desde 1993 a IARC classificou a OTA como possível carcinogêneo em seres humanos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER- IARC, 1993). A OTA pode ser produzida por *A. carbonarius* em uvas e vinhos (TERRA, 2013) e por *A. ochraceus*, em grãos de café (REZENDE et al., 2013).

O primeiro passo da síntese de policetídeo de isocumarina consiste da condensação de uma unidade de acetato para quatro unidades de malonato. Sendo a policetídeo sintetase a enzima envolvida nesta etapa. As condições que permitem a expressão desta enzima pelos genes de fungos produtores ocorrem somente durante o início da produção da micotoxina (Figura 5). Quando formado, na sequência, o policetídeo é modificado pela formação de um anel de lactona (síntese de mellein, isocumarina com propriedades similares as da OTA) e a adição de um grupo carboxílico, formando ocratoxina β. A seguir um átomo de cloro responsável pelo seu caráter tóxico, é incorporado à molécula pela ação da cloroperoxidase, sintetizando a ocratoxina α. Na última etapa, a enzima ocratoxina A sintetase catalisa a ligação entre a OTα com a fenilalanina (ANLI; BAYRAM, 2009; EDWARDS; O'CALLAGHAN; DOBSON, 2002; HARRIS; MANTLE, 2001; RINGOT et al., 2006).

Figura 5 - Biossíntese da Ocratoxina A.



Fonte: RINGOT et al. (2006).

Estudos sobre os aspectos moleculares da biossíntese da OTA paralelamente com estudos de genômica, proteômica e transcriptômica têm fornecido novas informações para melhor definir os principais passos moleculares da biossíntese de micotoxinas. Geralmente, no cluster de biossíntese de metabólitos secundários contém fatores de transcrição específicos do cluster (GALLO; FERRARA; PERRRONE, 2017).

Em fungos da espécie *A. Carbonarius*, no agrupamento OTA, entre os genes AcOTAp450 e AcOTAhal, foi identificado o gene AcOTAbZIP, que codifica um fator básico

de transcrição de zíper de leucina. Seu perfil de expressão mostrou correlação com o perfil de expressão de outros genes OTA e com a cinética de acúmulo de OTA (FERRERA et al., 2016). Muitos bZIPs fúngicos foram caracterizados como fatores de transcrição de resposta ao estresse, respondendo a uma variedade de estresses ambientais e ligando-os à produção de metabólitos secundários. Entre estes, um fator de transcrição bZIP, Aoyap1, foi encontrado em *A. ochraceus* para mediar a percepção do sinal na regulação da síntese de OTA sob estresse oxidativo (GALLO; FERRARA; PERRRONE, 2017; REVERBERI, et al., 2012).

Estudos em relação a deleção dos genes de fatores de transcrição *veA* e *laeA*, mostram 87,5% de redução na produção de conídios de cultivos no escuro. *A. carbonarius* apresentou redução na produção de conídios e uma ligeira diferença no crescimento vegetativo. A produção de OTA mostrou uma variação drástica que variou de 68,5 a 99,4 % em mutantes nulos de *veA* e *laeA*, se comparados a estirpes selvagens. Os genes *veA* e *laeA* têm participação importante na regulação da produção de conídios e biossíntese de OTA, em resposta à luz em *A. carbonarius* (CRESPO-SEMPERE et al., 2013). Recentemente, foi relatado que o gene *laeA* possui um efeito regulador na produção de ácido cítrico e enzimas celulolíticas em *A. carbonarius* (LINDE et al., 2016).

Os esporos fúngicos são geralmente inativados por vários processos físicos, químicos ou alterações ambientais a que são expostos. No entanto, as micotoxinas são compostos estáveis, não sendo completamente destruídas durante a maioria das operações de processamento de alimentos, assim à sua presença em produtos acabados pode acontecer (COPETTI et al., 2012).

2.3 Segurança alimentar

Sendo o café uma commodity consumida mundialmente sua produção ocorre de forma fiscalizada, principalmente, por órgãos certificadores que buscam a qualidade num sistema socioeconômico sustentável, assim, correlacionam o produto, a origem e a forma de produção. A qualidade do produto final depende de diversos fatores que se estendem desde o local de plantio até o seu preparo para o consumo. Nesse percurso, estão envolvidos as etapas de processamento, secagem, armazenamento e beneficiamento (BORÉM et al., 2008; CORADI et al., 2008; MARQUES et al., 2008; SAATH et al., 2010; SILVA et al., 2000).

O café para que ele possa ser comercializado deve apresentar uma boa qualidade. Essa qualidade depende de vários outros fatores como a boa aparência, sabor, aroma, valor

nutricional e, principalmente, segurança do ponto de vista toxicológico (CHALFOUN; BATISTA, 2002).

Os fungos produtores de micotoxinas estão presentes nos ambientes das lavouras, no preparo e no armazenamento do café e sua relação com a qualidade e a segurança do produto final depende das condições ambientais, do manejo da cultura e do processamento pós-colheita (BATISTA et al., 2003). Campos et al. (2009) observaram que o café com permanência prolongada no solo teve elevada ocorrência de *A. ochraceus* e elevados níveis de micotoxinas, sendo respectivamente 49,42 e 30,39 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de OTA, no Cerrado Mineiro e Baiano, assim o tempo de permanência pode interferir na qualidade final do café colhido.

Batista e Chalfoun (2007) encontraram níveis de OTA maiores que 20 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ em café de varrição, mostrando o impacto negativo da utilização de cafés provenientes dessa forma de colheita.

Segundo Chalfoun e Batista (2006), os cafés tipo cereja, cereja descascado, cereja despulpado, verde e coco mostraram se com uma contaminação de OTA de até 5,0 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, em sua grande maioria e as frações de café boia e, principalmente, varrição, apresentam índices de contaminação por OTA acima de 5,0 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$.

A OTA pode estar presente em diversos produtos consumidos pelos seres vivos e devido a esta ocorrência a exposição do consumidor a essa micotoxina está aumentando. Diante dessas ocorrências está cada vez mais comum à implementação de regulamentações que impõe limites à presença de algumas micotoxinas em diversos produtos agrícolas. No entanto, esses limites variam de país para país devido a diferentes percepções quanto aos níveis de segurança para a saúde e em relação aos interesses econômicos (DOHLMAN, 2003).

Em relação a essa questão da segurança alimentar vários países adotam e estabelecem os limites máximos de OTA que podem ocorrer em alimentos como cereais e outros produtos. No Brasil, a concentração de OTA em café torrado (moído ou em grão) e solúvel é de 10 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, estabelecida pela Resolução- RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 (ANVISA, 2011). Os limites foram baseados em resultados obtidos a partir de critérios estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*, uma coletânea de orientações e recomendações sobre a segurança de alimentos reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A União Europeia também introduziu limites de OTA para o café, como 5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de café torrado e 10 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de café solúvel (LEONG et al., 2007).

2.4 Biocontrole

O controle biológico, conhecido também como biocontrole, é tradicionalmente definido e considerado como o controle do crescimento de um microrganismo por outro microrganismo. Um microrganismo pode interagir com outro, criando condições desfavoráveis ao desenvolvimento destes, sendo essa forma de interação denominada de antagonismo (BETTIOL, 1991).

O controle biológico consiste na redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença causada por um patógeno ou parasita, nos seus estados de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizado naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas (BAKER; COOK, 1974).

O conceito de controle biológico foi alterado e passou a incluir o uso de organismos naturais ou modificados, de genes ou seus produtos para reduzir o efeito indesejável de organismos (pragas, doenças e plantas invasoras) e para favorecer o desenvolvimento de organismos desejáveis com culturas, árvores, animais e microrganismos e insetos benéficos (NAS, 1987).

O conceito de controle biológico é totalmente compatível com o de agricultura sustentável, pois se baseia no uso de recursos naturais para obter uma produção agrícola com reduzido impacto ambiental (SPADARO; GULLINO, 2004). De uma forma resumida, o controle biológico é considerado como o controle do crescimento de uma população por ação de um ou mais antagonistas (PIMENTA, 2009).

Os principais mecanismos envolvidos no biocontrole são: antibiose, competição por espaço e nutrientes, hiperparasitismo e indução de resistência. Esses mecanismos de ação já foram relatados em Bettiol (1991), Castoria et al., (1997), Chan; Tian, (2005), Janisiewicz; Tworkoski; Sharer (2000), Liu et al., (2013), Spadaro et al., (2002) e Sharma et al., (2009).

O aperfeiçoamento das técnicas de biocontrole e da prática de uso de metabólitos produzidos por microrganismos tem ganhado destaque. Esses metabólitos podem ser empregados em vários campos, além de serem formas alternativas sustentáveis para o seguimento dos agroquímicos (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010).

A espécie *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vdries foi considerada, um potencial agente antagonista contra fungos prejudiciais para a qualidade do café. Possui como mecanismo de ação a competição. A utilização dos extratos obtidos a partir do cultivo dela demonstrou controle sobre a esporulação e a germinação de esporos de alguns fungos que

podem ser produtores de micotoxinas como *Aspergillus ochraceus*, *A.niger*, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. (CHALFOUN, 2010).

2.4.1 Biocontrole com leveduras

As leveduras apresentam diversas características que as tornam promissoras para a utilização como agentes de biocontrole, tais como: não produzem esporos alergênicos e não produzem toxinas como os fungos filamentosos (QING; SHIPING, 2000); apresentam altas taxas reprodutivas e não sintetizam antibióticos como as bactérias (DROBY; CHALUTZ, 1994); exigem nutrientes simples, podendo, inclusive, ser utilizados resíduos de indústrias como fonte de carbono (FREDLUND et al., 2002); não apresentam riscos ao consumidor (PASSOTH et al., 2006); são relativamente fáceis de cultivar e aplicar, além de serem seguras para aplicar no ambiente (PIMENTA et al., 2009).

As leveduras das espécies *Pichia anomala* e *Saccharomyces cerevisiae* são utilizadas na indústria e são reconhecidas como seguras. Segundo Walker (2011) o gênero *Pichia* é reconhecido pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (European Food Safety Authority - EFSA) como “Qualified Presumption of Safety (QSP)”. As leveduras do gênero *Saccharomyces* são classificadas pela Agência Norte-americana de Medicamentos e Produtos Alimentares (Food and Drug Administration - FDA) como sendo “Generally Recognised As Safe” (GRAS) (FDA, 2018).

As leveduras podem apresentar diferentes mecanismos que são capazes de controlar o desenvolvimento de fungos filamentosos, dentre esses mecanismos estão à competição por espaço e nutriente, capacidade de colonizar os ferimentos de frutos formando uma camada de biofilme, produção de compostos solúveis e os voláteis, produção de enzimas hidrolíticas, e a produção de toxinas *killer* (GRZEGORCZYK et al., 2017; LUTZ et al., 2013; MEDINA-CÓRDOVA et al., 2016; NUNEZ et al., 2015).

A atividade *killer* corresponde à produção de toxinas extracelulares de composição glicoproteica ou glicolipídica, que podem atingir diretamente a parede celular do microrganismo alvo, ocasionando a morte do mesmo. Essas toxinas podem ter ação fungicida ou fungistática sobre outras leveduras e/ou fungos filamentosos (BELDA et al., 2017; GOLUBEV, 2006).

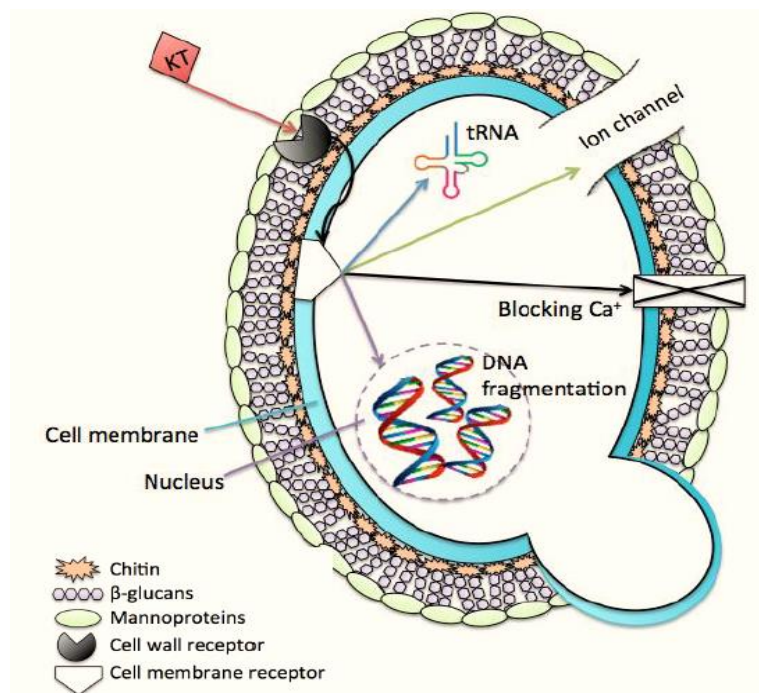
Em relação à atividade *killer* para que ocorra a ação desse mecanismo em organismos que sejam susceptíveis devem existir na parede celular (quitina, β -glucanas, nanoproteínas) da célula sensível alguns receptores que terão uma interação com a toxina, ou até mesmo, a

existência de receptor na membrana plasmática que irá facilitar a absorção (MAGLIANI et al., 1997; SCHMITT; BREINIG, 2006). Posteriormente, podem atingir um efeito letal por diferentes vias biológicas, induzir alterações na permeabilidade da membrana formando um canal iônico, o que acarretaria no vazamento descontrolado de prótons, íons de potássio, aminoácidos e moléculas de ATP o que causam a morte celular (MARQUINA et al., 2002).

O fenômeno *killer* está presente em *Pichia membranifaciens* e ocorre devido a duas proteínas a PMKT e a PMKT2. Essas proteínas de baixo peso molecular se ligam a receptores primários localizados na estrutura da parede celular de células de levedura sensíveis. Sendo que PMKT se liga a cadeia linear de β (1-6) glucanas e PMKT2 a manoproteínas. A morte de células sensíveis por PMKT ocorre por movimentos iônicos através da membrana plasmática e uma acidificação do pH intracelular desencadeando um desequilíbrio da osmolaridade. A morte celular pode se dar durante a fase S quando ocorrem altas concentrações de PMKT2 e pode ocorrer a mortalidade induzida quando há baixas doses de PMKT2 e de PMKT, concluindo assim a natureza apoptótica em relação a essas proteínas *killer* (BELDA et al., 2017).

A presença de toxinas *killer* podem liberar sinais que resultarão na inibição da síntese de DNA causando um efeito letal (LIU et al., 2015). A Figura 6 ilustra vários mecanismos de ação que essas toxinas *killer* podem apresentar.

Figura 6 - Esquema de diferentes modos de ação de toxinas *killer*



Fonte: LIU et al., (2015).

Alguns autores acreditam que há relação entre atacar o tRNA e a morte da célula. Isso ocorre em *Kluyveromyces lactis* que apresenta produção de toxina *killer* e causa a morte de *Saccharomyces cerevisiae* (FROHLOFF et al., 2001; JABLONOWSKI; SCHAFFRATH, 2007; JABLONOWSKI et al., 2006). Outra forma de atuação seria através do bloqueio de absorção de cálcio o que levaria a inibição do crescimento e da divisão celular (LIU et al., 2015).

As leveduras como *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces* spp., *Pichia anomala*, *P. guilliermondii* e *S. cerevisiae* foram avaliadas quanto à sua capacidade de limitar o crescimento e a produção de micotoxinas em alimentos como café, uvas, feijão, cereais, amendoim e produtos lácteos (BJÖRNBERG; SCHNURER, 1993; BLEVE et al.; 2006; LIU; TSAO, 2009; MASOUD; KALTOFT, 2006; PASTER et al., 1993; PETERSSON; S. et al., 1999; PRADO et al., 2011; SOMAI; BELEWA, 2011; VELMOUROUGANE et al., 2011). A maioria desses estudos foi realizada avaliando-se a eficácia da levedura como um agente de controle biológico, mas outros estudos têm-se centrado em avaliar os efeitos antagônicos contra *A. ochraceus* (BLEVE et al., 2006; MASOUD; JAKOBSEN, 2005; MASOUD; KALTOFT 2006).

Masoud e Kaltoft (2006) fizeram testes com *Pichia anomala*, *P. kluyveri* e *Hanseniaspora uvarum*, em relação ao desenvolvimento de *A. ochraceus* e a produção de OTA em meio ágar café e em meio ágar extrato de malte (MEA). Essas leveduras impediram a síntese de OTA quando cultivadas no MEA e reduziram o crescimento do fungo. No meio ágar café *Pichia anomala* e *P. kluyveri* foram capazes de reduzir o crescimento de *A. ochraceus* e evitar a produção de OTA.

Ramos et al. (2010) testaram o efeito antagônico das espécies *D. hansenii* (UFLACF 889 e UFLACF 847) e *P. anomala* (UFLACF 710 e UFLACF 951) sobre três fungos filamentosos (*Aspergillus ochraceus*, *A. parasiticus* e *Penicillium roqueforti*), os microrganismos foram co-cultivados em meio MEA. As leveduras inibiram a esporulação, mas não interferiram no crescimento micelial. Outro resultado observado foi que, utilizando diferentes concentrações celulares das leveduras, eles obtiveram diferentes graus de inibição, trazendo a ideia de que concentração celular inicial do microrganismo antagonista parece ser um dos fatores que interfere no grau de inibição.

Os microrganismos produzem uma grande diversidade de metabólitos secundários, sendo alguns desses voláteis. Os compostos orgânicos voláteis (COV) são em sua grande maioria substâncias de baixa polaridade que facilmente entram na fase gasosa através da

vaporização a 0,01 kPa e temperatura próxima de 20 °C, apresentando, deste modo, baixa solubilidade em água e alta pressão de vapor (PAGANS; FONT; SÁNCHEZ, 2006).

Os fungos produzem distintas misturas de compostos orgânicos voláteis, sendo o perfil específico produzido por cada espécie ou consórcio microbiano seguramente dependente de diferentes fatores como pH, umidade, temperatura, nutrientes e idade da cultura (BENNETT; INAMDAR, 2013).

Zhu et al. (2015) obtiveram cinco estirpes de leveduras, *Candida zemplinina* M3, *P. kluyveri* M117, *Metschnikowia aff. fructicola* M179 e *S. cerevisiae* M114 e C297 capazes de inibir o crescimento e a produção de OTA por *A. carbonarius* e *A. ochraceus*, isolados de uvas, quando cultivados em meio com agar e meio preparado com extrato de uva. Esse efeito de inibição, segundo os autores foi possivelmente devido à competição por espaço e nutrientes de fungos e leveduras ou devido à produção de metabólito(s) antifúngico pela levedura quando em co-cultivo.

As leveduras como *Hanseniaspora uvarum*, *P. anomala* e *P. kluyveri*, predominantes e isoladas de cafés, foram relatadas como capazes de produzirem compostos orgânicos voláteis (VOC), sendo principalmente, ésteres e álcoois, como acetato de etila, acetato de isobutil, 2-fenil acetato de etila, propionato de etila e álcool isoamílico. O composto 2-fenil acetato de etila apresentou melhor inibição tanto do crescimento quanto da produção de OTA por *A. ochraceus* (MASOUD; POLL; JAKOBSEN, 2005).

P. anomala WRL-076 foi considerada uma levedura para biocontrole de *A. flavus*, em nozes, na Califórnia. O composto volátil de 2-fenil-etanol (2-PE) foi capaz de afetar a germinação de esporos, o crescimento e a expressão de genes envolvidos na síntese de aflatoxina de *A. flavus* (HUA et al., 2014).

Os agentes de biocontrole podem sintetizar enzimas líticas (proteases, quitinases e glucanases) que atuam de forma sinérgica na degradação da parede celular de patógenos (VITERBO et al., 2002). *Candida guilliermondii* e *C. oleophila* foram capazes de expressar altos níveis de β -1,3-exoglucanase e quitinase no controle de *Botrytis cinerea* em tomate (SALIGKARIA; GRAVANIS; EPTONA, 2002).

Saccharomyces cerevisiae, conhecidas como produtoras da proteína *killer*, isoladas do vinho, foram avaliadas no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, um agente da antracnose pré-colheita de uva. Essas leveduras produziram compostos antifúngicos, inibiram a germinação de conídios de *C. gloeosporioides* e produziram β -1,3-glucanase e quitinase. O isolado GA8 reduziu 69,7% da doença para *C. gloeosporioides* em bagas de uva. Os isolados antagonistas de *S. cerevisiae* podem representar importantes agentes de controle biológico da

antracnose da uva causada por *C. gloeosporioides*, responsáveis pelas perdas econômicas na viticultura (LIU et al., 2018).

As leveduras possuem potencial para o controle de infecções fungicas pós-colheita, sendo utilizadas para o controle de podridões de frutas. Consiste em uma alternativa promissora por se tratar de microrganismos não toxigênicos. Essas são encontradas naturalmente na superfície de frutos e já ocorre um grande número de aplicações em alimentos, tornando-se mais aceitáveis pelos consumidores (FIALHO et al., 2010; DUARTE, et al., 2016).

Na tabela 3 são apresentadas algumas leveduras antagonistas que têm sido identificadas e utilizadas em frutos e vegetais para controle de doenças de pós-colheita, sendo especificada a espécie de levedura e o patógeno que foi capaz de controlar.

Tabela 3 - Espécies de leveduras utilizadas como antagonistas no controle de patógenos de pós-colheita.

Referências	Leveduras	Patógenos controlados e alimento
Wittig et al. (1997) Barkai-Golan (2003)	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Monilinia laxa</i> banana e uva
Tian et al. (2002) Saligkarias et al. (2002) Lahlali et al. (2011)	<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Botrytis cinerea</i> nectarina, pêssego e tomate <i>Penicillium italicum</i> Laranjas
Lahlali et al. (2005) Lassois et al. (2008)	<i>Candida oleophila</i>	<i>P. italicum</i> e <i>P. digitatum</i> citros <i>Colletotrichum musae</i> Banana
Morales et al. (2008) Torres at al. (2006)	<i>Candida sake</i>	<i>Penicillium expansum</i> maçã e pêra
Mandal et al. (2007)	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i> Pêssego
Saravanakumar et al. (2008)	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Alternaria alternata</i> , <i>B. cinerea</i> e <i>P. expansum</i> em maçã
Zhang et al. (2009)	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>B. cinerea</i> e <i>P. expansum</i> Maçã

Fonte: Baseada em SHARMA et al., (2009)

Segundo Masih e Paul (2002) *Pichia membranifaciens* estirpe FY-101, isolado da casca de uva, foi antagonista a *B. cinerea*, agente causal da doença mofo cinzento da videira. Quando co-cultivados em meio sólido, bem como em meios líquidos, a levedura provocou a inibição de *B. cinerea*. A secreção de β -1,3-glucanases por *P. membranifaciens* é um dos possíveis mecanismos relacionados com este antagonismo.

Medina-Córdova et al. (2016) relataram que *Debaryomyces hansenii* BCS003 pode ser considerado um potencial agente de biocontrole contra os fungos *Mucor circinelloides*, *Aspergillus* sp., *Fusarium proliferatum* e *F. subglutinans* em grãos de milho. Provavelmente devido aos efeitos sinérgicos de fatores como a competição por nutrientes e espaço, bem como a produção de compostos difusíveis e voláteis e, inibição por sobrenadantes livres de células.

As leveduras *Debaryomyces hansenii* (MI1a e KI2a) e *Wickerhamomyces anomalus* BS91 apresentaram alguns mecanismos que foram responsáveis pela atividade antagonista frente aos fungos fitopatogênicos *Monilinia fructigena* e *Monilinia fructicola* que são encontrados em ameixa e pêssago. Dentre os mecanismos citaram a competição por nutrientes e espaço, micoparasitismo, secreção de compostos antifúngicos (toxinas *killer*, enzimas, COVs e antibióticos) e formação de biofilmes (GRZEGORCZYK et al., 2017). Além disso, *W. Anomalus* BS91 quando aplicada juntamente com extrato de casca de romã ou metanol com extrato de casca de romã foram eficientes para controlar o crescimento de *Penicillium digitatum*, na etapa de pós-colheita, em laranjas (KHARCHOUFI et al., 2018).

As espécies *W. anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* e *S. cerevisiae*, quando aplicadas na etapa de pós-colheita em frutos de morangos, foram capazes de controlar *Botrytis cinerea*, devido a produção de compostos orgânicos voláteis, sendo o acetato de etila o principal composto avaliado (ORO et al., 2018).

Souza et al. (2017) realizaram um screening com 32 isolados de leveduras obtidos de fermentações de cacau e café, pertencentes aos gêneros: *Pichia*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces*. Essas leveduras foram utilizadas nas concentrações de 10^4 e 10^7 células/mL, para observar o efeito antagônico sobre *Aspergillus carbonarius* e *A. ochraceus*, ambos na concentração de 10^5 esporos/mL. Os melhores resultados de inibição do crescimento micelial e produção de esporos foram obtidos quando utilizaram as leveduras na maior concentração celular, sendo os melhores resultados obtidos com os gêneros *Pichia* e *Saccharomyces*.

As estirpes de levedura dos gêneros *Pichia*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces*, são consideradas como culturas que melhoram a qualidade da bebida de café.

Conseqüentemente, elas podem ser inoculadas e agirem no controle biológico de fungos ocratoxigênicos. As condições de crescimento para fungos ocratoxigênicos e essas leveduras são muito semelhantes, bem como a incidência no café, de modo que as leveduras são apropriadas para o uso do biocontrole diretamente em condições de campo (SOUZA et al., 2017).

2.5 Microscopia eletrônica de varredura como ferramenta para pesquisas

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido utilizada em diferentes campos de pesquisas, como na avaliação de células de um determinado alimento durante etapas de processamento e na observação de interações de microrganismo presentes em diferentes substratos. Neste trabalho, esta técnica foi utilizada para avaliar grãos de café inoculados com leveduras e fungos toxigênicos e permitiu observar a capacidade desses microrganismos de colonizar os frutos de café, além de ter ocorrido à formação de biofilmes por *Saccharomyces cerevisiae* e, conseqüentemente, uma competição por espaço.

A aparência tridimensional da imagem, obtida da superfície de amostras não seccionadas, através da MEV é resultado direto da grande profundidade de campo. Os elétrons apenas “varrem” a superfície externa do material, não atravessando a amostra. A imagem é formada a partir da amostra quando a mesma é atingida pelo feixe de elétrons. Os elétrons secundários são captados e, após passagem por um amplificador, são transformados em imagem visível em um monitor (MELO, 2002).

Pesquisas realizadas com o objetivo de se melhorar a qualidade de produtos aumentaram o uso de técnicas que se utilizam da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Borém et al. (2013) avaliaram alterações na estrutura de grãos de café processados por via seca e úmida. A observação dos grãos de café em MEV mostrou que a temperatura de secagem de 50/40°C dos cafés despulpados apresentou resultados semelhantes aos cafés secados em terreiro, com pequena contração das células, sem sinais evidentes de ruptura. Com a secagem de 40/60°C observou-se mais dano às estruturas das células, independentemente do tipo de processamento. Os cafés preparados por via seca apresentaram maior desestruturação dos componentes celulares do que os cafés despulpados, bem como maior tempo de exposição desses cafés ao processo de secagem.

Borém, Marques e Alves (2008) utilizando MEV observaram que os grãos secados a 40 °C não apresentaram danos ultraestruturais nas membranas. Entretanto, aqueles secos a 60

°C observou-se pontos de rompimento nas membranas, sendo confirmado por um maior extravasamento de solutos.

Durante uma investigação da presença de OTA em café verde brasileiro destinado a exportação, diferenças morfológicas entre grãos sadios e defeituosos foram observados em Microscopia Ótica e esses não demonstraram susceptibilidade à invasão fúngica entre os defeituosos. A MEV foi empregada para analisar 15 grãos e assim desses que foram observados que apenas um (preto) revelou presença de fungos e esporos (GOLLÜCKE; TANIWAKI; TAVARES, 2004).

Pesquisa sobre a imobilização de fungos filamentosos com potencial para uso agroindustrial fez-se a visualização dos grânulos de alginato de sódio com fungos através da MEV. Essa técnica permitiu observar a disposição das hifas e esporos, além de possibilitar a visualização da superfície e do interior dos grânulos. Através dos resultados concluíram que a imobilização é um método seguro no qual o micélio fúngico permanece no interior do grânulo, facilitando o transporte, o armazenamento e a aplicação de microrganismos (ELIZEI et al., 2014).

Outros campos de pesquisas fazem o uso da MEV para observar o comportamento de microrganismos que podem ser antagonistas. Segundo Melo et al. (2006) uma linhagem de *Aspergillus terreus* mostrou forte atividade parasítica contra *Sclerotinia sclerotiorum*. Quando visto em MEV, o antagonista mostrou-se capaz de romper e lisar a parede celular e assim penetrar no interior do escleródio, onde se estabelece no tecido medular. Assim as interações entre o patógeno e o antagonista revelaram que *A. terreus* esporulou sobre os escleródios e foi capaz de realizar o controle do patógeno.

Os microrganismos *Pseudomonas fluorescens* PB27, *Bacillus cereus* B1 e *Bacillus thuringiensis* K1 apresentaram efeitos antagonistas, através da produção de enzimas quitinolíticas contra o fungo *Aspergillus flavus*. Através da MEV conseguiram observar que essas enzimas induziram inúmeras alterações morfológicas ultraestruturais em *A. flavus* inibindo assim a germinação de esporos em 20% e do crescimento micelial em 25% (AKOÇAK et al., 2015).

Pereira et al. (2009) observaram a interação *Colletotrichum gloeosporioides* em café (*Coffea arabica* L.), e relataram que ferimentos em hipocótilos de cafeeiro induzem os processos de adesão, germinação e diferenciação de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de folhas e ramos de cafeeiros.

Medina-córdova et al. (2016) relataram atividade antagonista de *Debaryomyces hansenii* BCS003 contra *Mucor circinelloides* e *Fusarium subglutinans* inoculados em grãos

de milho (*Zea mays* L.). Esse antagonismo possivelmente foi por competição por espaço e nutrientes, produção de compostos extracelulares solúveis ou produção de compostos voláteis.

2.6 Cromatografia gasosa para detecção de compostos orgânicos voláteis produzidos por microrganismos

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por microrganismos, com potencial de biocontrole, têm sido estudados de forma crescente devido à sua aplicabilidade na agricultura. Assim, os COVs fúngicos podem ser empregados, como uma estratégia de manejo, no controle de pragas e doenças em plantas, reduzindo o uso de fungicidas e obtendo um manejo ambientalmente mais saudável.

O estudo e detecção de novos COVs permitirá a produção de novos produtos para a exploração humana (MORATH; HUNG; BENNETT, 2012). Dessa forma, a cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS) permite a separação e apresenta uma detecção altamente sensível, sendo o principal método de detecção de COVs fúngicos (MATYSIK; HERBARTH; MUELLER, 2009).

A Cromatografia tem sido amplamente usada em microbiologia nas diferentes áreas. Um exemplo pode ser citado na detecção de sete compostos voláteis, sendo identificado três deles (álcool isoamílico, acetato de isoamilo e álcool fenetil) utilizando cromatografia gasosa com detector de massa acoplado (GC-MS) produzido por *Candida maltosa* NP9 obtida a partir de um queijo comercial iraniano capaz de inibir a germinação de esporos de *Aspergillus brasiliensis* quando cultivado em ágar YPD (ANDO, et al. 2012).

Compostos voláteis produzidos por *Bacillus pumilus* e *B.thuringiensis*, como 2-nonanona, β -benzeno e 2-decanona, foram identificados com GC-MS. Esses compostos inibiram completamente o crescimento do micélio de *Colletotrichum gloeosporioide*. Assim, essa duas espécies de *Bacillus* podem ser promissores para métodos de controle da antracnose em frutos colhidos (ZHENG, et al. 2013).

Pichia anomala estirpe WRL-076 foi considerada uma levedura para biocontrole de *Aspergillus flavus*, em nozes, na Califórnia. Utilizando o SPME-CG / EM (Microextração em Fase Sólida acoplada a Cromatografia Gasosa) foi identificado o composto volátil majoritário produzido por esta levedura, como sendo de 2-fenil-etanol (2-PE). Este composto inibiu a germinação de esporos e produção aflatoxina de *A.flavus* (HUA, et al. 2014).

2.7 PCR Quantitativa (qPCR)

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é uma técnica que permite detectar a persistência de populações de microrganismos que foram inoculados em alimentos, como por exemplo, em cafés. A qPCR, conhecida como reação em cadeia da polimerase quantitativa, permite monitorar o progresso da PCR ao longo dos ciclos. Nessa técnica os dados não serão coletados no final, mas sim no decorrer da reação. Deste modo, a diferença básica entre a reação de PCR qualitativa e a qPCR é que esta última ocorre em um sistema fechado sendo monitorada através de um programa computacional, que avalia a evolução da técnica por meio da detecção de fluorescência dos produtos amplificados a cada ciclo de amplificação (MACKAY et al., 2002).

Por ser uma técnica relativamente rápida e de alta sensibilidade e especificidade, a utilização da qPCR tem se tornado mais frequente, pois possibilita a detecção de sequências genômicas mesmo em amostras nas quais os microrganismos encontram-se em títulos muito baixos, inativados ou em amostras altamente diluídas (BHUDEVI; WEINSTOCK, 2001).

Utilizando a técnica de qPCR foi estudado a influência de duas bactérias diferentes do ácido láctico (BAL) (*Lactobacillus rhamnosus* RC007 e ou *L. plantarum* RC009) sobre a variabilidade das espécies de *Aspergillus* que se encontravam na silagem. Comparando-se a influência exercida por ambas BAL, observou-se que *L. rhamnosus* RC007 foi mais eficiente para inibir as três espécies de fungos testadas (*A. parasiticus*, *A. flavus* e *A. fumigatus*) cujas concentrações de DNA, determinadas por qPCR, oscilaram perto do valor inicial encontrados no milho da pré-ensilagem (DOGI et al., 2015).

Segundo Tannous et al. (2015) a ocorrência e propagação de fungos contaminantes em alimentos, e a dificuldade de remover suas toxinas resultantes é preocupante. Logo, são necessários métodos rápidos e precisos para a detecção precoce desses fungos toxigênicos em alimentos. Assim a PCR e qPCR são amplamente utilizadas.

Gil-Serna et al. (2009) desenvolveram um protocolo de qPCR para detectar *Aspergillus ochraceus* e *A. westerdijkiae*. A precisão da detecção e quantificação por qPCR foi avaliado com DNA genômico obtido de grãos de café e uvas artificiais contaminados com suspensões de esporos de concentrações conhecidas. Os autores observaram uma relação positiva entre o tempo de incubação e os valores de qPCR. Esse ensaio desenvolvido permitirá uma detecção e quantificação precisa e sensível desses fungos. Assim, essa técnica poderá ser utilizada para prever e o crescimento de fungos e produção de OTA, em cafés e uvas antes da etapa de colheita.

Ribeiro et al. (2017) inocularam *Saccharomyces cerevisiae* (CCMA 0200 e CCMA 0543 (anteriormente UFLA YCN727), em duas variedades de grãos de café (Ouro Amarelo e Mundo Novo) que foram processado por via semi-seca. Através do método de qPCR foi possível confirmar a persistência das populações durante o processo de fermentação semi-seca do café.

Martinez et al. (2017) avaliaram o comportamento de *S. cerevisiae* (CCMA 0543), *Candida parapsilosis* (CCMA 0544) e *Torulaspota delbrueckii* (CCMA 0684) utilizadas como culturas iniciais, em café processado semi-seco, através de inoculação direta e de balde. A população microbiana foi avaliada através de qPCR. O método do balde favoreceu a permanência dos microrganismos durante o processamento do café, especialmente o tratamento inoculado com *S. cerevisiae*.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo fermentativo do café ocorre devido à presença de uma microbiota diversa (bactérias, fungos e leveduras). A inoculação de leveduras, especialmente as cepas autóctones, durante a etapa de pós-colheita, pode auxiliar na inibição da produção de compostos indesejáveis, como a OTA, produzida por fungos toxigênicos. Além de contribuir na produção de um produto de qualidade e utilizar um método alternativo ao uso dos fungicidas sintéticos.

Pesquisadores já realizaram estudos relacionados com biocontrole utilizando bactérias, fungos e leveduras, porém a maioria executado em escala laboratorial, com todas as condições controladas. Desta forma, estudos realizados em campo são importantes, uma vez que é necessário um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nas interações entre agentes de biocontrole, os patógenos, as plantas e o ambiente.

Diante do exposto, nesta pesquisa foram avaliados os possíveis mecanismos de leveduras pertencentes aos gêneros *Candida*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Wickerhamomyces*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces* envolvidos no biocontrole, como produção de toxina *killer*, produção de β -1,3-glucanase, produção de compostos orgânicos voláteis, efeito fungicida ou fungistático.

Dentre as diversas técnicas de biologia molecular, o qPCR, é uma ferramenta importante que permite estimar e acompanhar o comportamento da população de leveduras e fungos toxigênicos, no decorrer da etapa de pós-colheita. Desta forma, pode-se inferir um comportamento de biocontrole, que ocorre mais próximo das condições naturais levando-se em conta que também foi realizado processamento do café, semelhante, ao que os produtores

de cafés realizam em suas fazendas. Através da qPCR é possível afirmar que as leveduras estavam presentes até o final do processamento.

Os resultados obtidos neste trabalho devem ser observados e considerados em outros estudos, como por exemplo, a formulação de biofungicidas, que possam ser aplicados em uma escala maior, na etapa de pós-colheita do café. Visto que, ainda não existe registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) nenhum produto formulado que possua como ingrediente ativo um microrganismo leveduriforme.

Até o presente momento, existe registrados no MAPA, nove fungicidas biológicos a base de *Trichoderma* e *Bacillus*; 17 agentes de controle biológico e 46 inseticidas microbiológicos, sendo que todos possuem como ingrediente ativo (biológico ou produto microbiológico) microrganismos como bactérias e fungos filamentosos.

Este trabalho é inovador, pois além desses testes laboratoriais (*in vitro*) foram realizados testes em condições de campo (*in vivo*), durante a etapa de processamento via seca dos cafés. As espécies de leveduras, como *S. cerevisiae*, já são relatadas e consideradas culturas *starters* na melhoria da qualidade do café. A diferença, neste trabalho, é que as cepas de *S. cerevisiae* CCMA 0159 e CCMA 1302 foram avaliadas quanto à capacidade de biocontrole de fungos ocratoxigênicos inoculadas diretamente no café.

REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of Ochratoxin A for food and feed de contamination. **Toxins**, New York, v. 2, n. 5, p. 1078-1099, May. 2010.
- ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 25, p. 7493-7496, July 2002.
- AKOÇAK, P. B.; CHUREY, J. J.; WOROBO, R. W. Antagonistic effect of chitinolytic *Pseudomonas* and *Bacillus* on growth of fungal hyphae and spores of aflatoxigenic *Aspergillus flavus*. **Food Bioscience**, v. 10, p. 48-58, 2015.
- AMORIM, H. V. Estado nutricional do cafeeiro e qualidade da bebida. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 43, n. 2, p. 93-102, 1968.
- AMORIM, H. V.; MELLO, M. Significance of enzymes in non alcoholic coffee beverage. In: FOX, P. F. (Ed.). **Food enzymology**. Amsterdam: Elsevier, 1991. v. 2, p. 189-209.
- ANDO, H. et al. Antifungal activities of volatile substances generated by yeast isolated from Iranian commercial cheese. **Food Control**, v. 26, n. 2, p. 472-478, 2012.
- ANLI, E.; BAYRAM, M. Ochratoxin A in wines. **Food Reviews International**, New York, v.25, n1, p.214-232, 2009.
- ANLI, E.; ALKIS, I. M. Ochratoxin A and brewing technology: a review. **Journal of Institute Brewing**, London, v. 116, n.1, p. 23-32, Jan.2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n. 7**, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em Alimentos. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 09. maio. 2018.
- ASTORECA, A. et al. Ecophysiological factor effect on growth rate, lag phase and Ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate strains on irradiated peanut seeds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n.2, p. 131-135, Feb. 2009.
- BAKER, F.K.; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco, Freeman and Company, 1974. 433p.
- BARKAI-GOLAN, R. **Postharvest Diseases of Fruit and Vegetables: Development and Control**. Elsevier Science. Amsterdam, The Netherlands, 2001.
- 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, n. 3, p. 804-813, 2007.
- BATISTA, L. R. et al. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Sept. 2003.

- BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 784- 790, Sept. 2009.
- BELDA, I. et al. The Biology of *Pichia membranifaciens* Killer Toxins. **Toxins**, v. 9, n. 4, p. 112, 2017.
- BELLÍ, N. et al. Review: ochratoxin A (OTA) in wines, musts and grapes juices: occurrence, regulations and methods of analysis. **Food Science and Technology International**, London, v. 8, n. 6, p. 325-335, Dec. 2002
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497-516, July 2003.
- BENNETT, J. W.; INAMDAR, A. A. Are some fungal volatile organic compounds (VOCs) mycotoxins? **Toxins**, New York, v. 7, n. 9, p. 3785-3804, 2013.
- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: ROMEIRO, R. da S. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1991. p. 1-5.
- BORÉM, F. M.; MARQUES, E. R.; ALVES, E. Ultrastructural analysis of drying damage in parchment Arabica coffee endosperm cells. **Biosystems engineering**, v. 99, n. 1, p. 62-66, 2008.
- BORÉM, F. M. et al., Qualidade do café natural e despulpado após secagem em terreiro e com altas temperaturas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1606-1615, set./out. 2008.
- BORÉM, F. M. et al., Microscopia eletrônica de varredura de grãos de café submetidos a diferentes formas de processamento e secagem. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 2, p. 227-237, abr./jun. 2013.
- BHUDEVI, B.; WEINSTOCK, D. Fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for detection and classification of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Microbiology**, v. 83, p. 1-10, 2001.
- BJORNBERG, A.; SCHNURER, J. Inhibition of the growth of grainstorage molds *in vitro* by the yeast *Pichia anomala* (Hansen) Kurtzman. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v. 39, n. 6, p. 623–628, 1993.
- BLEVE, G. et al. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 204-209, Apr. 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de café**: v. 4, n. 1- safra 2017 – Brasília: Conab, primeiro levantamento - Brasília, p.1-98, jan.2017. Disponível em: < http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/levantamento/conab_safra2017_n1.pdf >. Acesso em: 2. março. 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de café**: v.5, n.1 – safra 2018-

Brasília: Conab, primeiro levantamento – Brasília, p. 1-73, jan.2018.
<http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/levantamento/conab_safra2018_n1.pdf>.
Acesso em 7.fevereiro.2018.

BRESSANI, R.; ESTRADA, E.; JARQUIN, R. Pulpa y pergamino de café. I, Composición química y contenido de aminoácidos de la proteína de la pulpa. **Turrialba**, San José, v. 22, n. 3, p. 299-304, jul./set. 1972.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1-2, p. 140-146, Oct. 2007.

CAMPOS, C. M. M.; PRADO, A. C.; PEREIRA, E. L. Caracterização físicoquímica, bioquímica e energética da água residuária do café processado por via úmida. **Biociencia Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 4, p. 514-524, ago. 2010.

CAMPOS, R. S. et al. Fungos micotoxigênicos e ocratoxina A em cafés com permanência prolongada na planta e no solo, colhidos nas regiões do cerrado mineiro e baiano. **Coffee Science**, Lavras, v. 4, n. 2, p. 136-148, abr./jun. 2009.

CASTORIA, R. et al. Beta-1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against post-harvest diseases. **Post-harvest Biology and Technology**, The Netherlands, v. 12, n. 3, p. 293-300, 1997.

CECAFE. **Conselho dos Exportadores de Café do Brasil**. Relatório mensal dezembro 2017.p. 1-21. Disponível em:
<http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/informe_estatistico/CECAFE_Relatorio_Mensal_DEZEMBRO_2017.pdf>. Acesso em: 7.fevereiro.2018.

CECI, E. et al. Ochratoxin A detection by HPLC in target tissues of swine and cytological and histological analysis. **Food Chemistry**, v. 105, n.1, p. 364-368, 2007.

CHALFOUN, S. M. Biological control and bioactive microbial metabolites: a coffee quality perspective. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 5, p. 1071-1085, set./out. 2010.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. Incidência de Ocratoxina A em diferentes frações de grãos de café (*Coffea arabica* L.). **Coffee Science**, Lavras, v. 1, n. 1, p. 28-35, jan./mar. 2006.

_____.O papel dos microrganismos na qualidade e segurança do café. In: ENCONTRO SUL MINEIRO DE CAFEICULTURA, 8.; SIMPÓSIO DE PESQUISA CAFEIEIRA DO SUL DE MINAS, 3., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: EMATER/EPAMIG/UFLA, 2002. p. 200.

CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, V. D. Efeito de microrganismos na qualidade da bebida do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 1, p. 21-26, 2000.

CHAN, Z.; TIAN, S. Interaction of antagonistic yeasts against post-harvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. **Post-harvest Biology and Technology**, The Netherlands, v. 36, n. 2, p. 215-223, 2005.

CORADI, P. C.; BORÉM, F. M.; OLIVEIRA J. A. Qualidade do café natural e despulpado após diferentes tipos de secagem e armazenamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 181-188, 2008.

COPETTI, M. V. et al. The effect of cocoa fermentation and weak organic acids on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 155, n. 3, p. 158-164, 2012.

CRESPO-SEMPERE, A. et al. VeA e LaeA transcriptional factors regulate ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 166, n. 3, p. 479-486, 2013.

CULLIAO, A. G. L.; BARCELO, J. M. Fungal and mycotoxin contamination of coffee beans in Benguet province, Philippines. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 32, n. 2, p. 250-260, 2015.

CUNHA, T. et al. Antifungal activity and action mechanisms of yeasts isolates from citrus against *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, v.276, n.2, p. 20-27, 2018.

DE BRUYNE, K. et al. *Leuconostoc holzapfelii* sp. nov., isolated from Ethiopian coffee fermentation and assessment of sequence analysis of housekeeping genes for delineation of *Leuconostoc* species. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, n. 12, p. 2952-2959, 2007.

DOGI, C. A. et al. Efficacy of corn silage inoculants on the fermentation quality under farm conditions and their influence on *Aspergillus parasiticus*, *A. flavus* and *A. fumigatus* determined by q-PCR. **Food Additives & Contaminants: Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, p. 1, 2015.

DOHLMAN, E. Mycotoxin hazards and regulations: impacts on food and animal feed crop trade. In: BUZBY, J. C. (Ed.) **International trade and food safety: economic theory and case studies**. Oxford: Eletronic Report from the Economic Reserarch Service, Chap. 6, p. 97-108, 2003.

DUARTE, N. C. et al. Aplicação Pré-colheita de Leveduras para o Controle de Podridões Pós-colheita de Manga ‘Kent’. **Anais da XI Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido**, p. 67, 2016.

DUARTE, W. F. et al .Characterization of different fruitwinesmade from cacao, cupuassu, gabirola, jaboticaba and umbu. **LWT . Food Science and Technology**, London, v. 43, n.10, p. 1564–1572, Dec. 2010.

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. Review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 2, p. 187-198, Apr. 2010.

DROBY, S.; CHALUTZ, E. Mode of action of biocontrol agents for postharvest diseases. In: WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. **Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: theory and practice**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 63–75.

EDWARDS, S. G.; O'CALLAGHAN, J.; DOBSON, A. D. W. PCR-detection and quantification of mycotoxigenic fungi. **Mycological Research**, New York, v. 106, n. 9, p. 1005-1025, Nov. 2002.

ELIZEI, V. G. et al. Imobilização de fungos filamentosos com potencial para uso agroindustrial. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 2, p. 165-172, 2014.

EVANGELISTA, S.R. et al. Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. **Food Research International**, v.61, p. 183–195, 2014 a.

EVANGELISTA, S.R. et al. Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. **Food Microbiology**, v.44, p.87-95, 2014 b.

FERRAZ, L.P. et al. Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. **Microbiological Research** v.188-189, p. 72-79, 2016.

FERRARA, M. et al. Identification of a halogenase involved in the biosynthesis of ochratoxin A in *Aspergillus carbonarius*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 82, p.5631-5641, 2016.

FIALHO, M. B. et al. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 26, p. 925-932, 2010.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **As micotoxinas**, v. 7, p. 32–40, 2009.

FREDLUND, E. et al. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 395-402, Aug. 2002.

Food and Drug Administration (FDA). **Microorganisms and Microbial-Derived Ingredients Used in Food (Partial List)**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/MicroorganismsMicrobialDerivedIngredients/default.htm>>. Acesso em: 25.fevereiro.2018.

FROHLOFF, F. et al. *Saccharomyces cerevisiae* Elongator mutations confer resistance to the *Kluyveromyces lactis* zymocin. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 8, p. 1993-2003, 2001.

GALLO, A.; FERRARA, M.; PERRONE, G. Recent advances on the molecular aspects of ochratoxin A biosynthesis. **Current Opinion in Food Science**, v.17, p. 49-56, 2017.

GARCIA, D. et al. Is intraspecific variability of growth and mycotoxin production dependent on environmental conditions?: a study with *Aspergillus carbonarius* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, n. 3, p. 432-439, Jan. 2011.

GILBERT, J.; ANKLAM, E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 21, n. 6, p. 468-469, 2002.

- GIL-SERNA, J. et al. Discrimination of the main Ochratoxin A-producing species in *Aspergillus* section Circumdati by specific PCR assays. **International journal of food microbiology**, v. 136, n. 1, p. 83-87, 2009.
- GOLUBEV, W. I. Antagonistic interactions among yeasts. In: **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 197-219.
- GOLLÜCKE, A. P. B.; TANIWAKI, M. H.; TAVARES, D. Q. Investigação de ocratoxina A em café verde brasileiro destinado à exportação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 641-645, 2004.
- GRZEGORCZYK, M. et al. Postharvest biocontrol ability of *killer* yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. **Food microbiology**, v. 61, p. 93-101, 2017.
- HARRIS, J. P.; MANTLE, P. G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 58, n. 5, p. 709-716, Nov. 2001.
- HUA, S. S. T. et al. The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. **Mycotoxin research**, v. 30, n. 2, p. 71-78, 2014.
- ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso coffee: the chemistry of quality**. San Diego: Academic Press, 1995. 253 p.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon, 1993. 571 p.
- JABLONOWSKI, D. et al. tRNAGlu wobble uridine methylation by Trm9 identifies Elongator's key role for zymocin-induced cell death in yeast. **Molecular microbiology**, v. 59, n. 2, p. 677-688, 2006.
- JABLONOWSKI, D.; SCHAFFRATH, R. Zymocin, a composite chitinase and tRNase *killer* toxin from yeast **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n.6, p.1533-1537, 2007.
- JACKELS, S. C.; JACKELS, C. F. Characterization of the coffee mucilage fermentation process using chemical indicators: A field study in Nicaragua. **Journal of food science**, v. 70, n. 5, p. 321-325, 2005.
- JANISIEWICZ, W. J.; TWORKOSKI, T. J.; SHARER, C. Characterizing the mechanism of biological control of post-harvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 11, p. 1196-1200, 2000.
- KHARCHOUFI, S. et al. Edible coatings incorporating pomegranate peel extract and biocontrol yeast to reduce *Penicillium digitatum* postharvest decay of oranges. **Food Microbiology**, v.74, p.107-112, 2018.
- KLEIN, M.N.; KUPPER, K. C. Biofilm production by *Aureobasidium pullulans* improves biocontrol against sour rot in citrus. **Food Microbiology**, v.69, p.1-10, 2018.

- LAHLALI, R. et al. Efficacy assessment of *Pichia guilliermondii* strain Z1, a new biocontrol agent, against citrus blue mould in Morocco under the influence of temperature and relative humidity. **Biological Control**. v.56, p.217-224, 2011.
- LAHLALI, R.; SERRHINI, M. N.; JIJAKLI, M. H. Development of a biological control method against postharvest diseases of citrus fruit. **Communications on Agriculture and Applied Biological Sciences**. v.70, p.47-58, 2005.
- LASRAM, S. et al. Water activity and temperature effects on fungal growth and Ochratoxin A production by ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* isolated from Tunisian grapes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, n. 2, p. 89-97, Apr. 2010.
- LARSEN, T. O.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.8, p.3630-3635, 2001.
- LASSOIS, L.; De BELLAIRE, L.; JIJAKLI, M. H. Biological control of crown rot of bananas with *Pichia anomala* strain K and *Candida oleophila* strain O. **Biological Control**. v.45, p.410-418, 2008.
- LEONG, S. L. et al. Ochratoxin A production Aspergilli in vietnamese green coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 301-306, Sept. 2007.
- LINDE, T. et al. The global regulator LaeA controls production of citric acid and endoglucanases in *Aspergillus carbonarius*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.43, p.1139-1147, 2016.
- LIU, S.; TSAO, M. Biocontrol of dairy moulds by antagonistic dairy yeast *Debaryomyces hansenii* in yoghurt and cheese at elevated temperatures. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 852–855, Sept. 2009.
- LIU, GUANG-LEI et al. Yeast *killer* toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. **Critical reviews in biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 222-234, 2015.
- LIU, J. et al. Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. **International journal of food microbiology**, v. 167, n. 2, p. 153-160, 2013.
- LIU, Z. et al. Biocontrol ability of killer yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) isolated from wine against *Colletotrichum gloeosporioides* on grape. **Journal of Basic Microbiology**, v.58, p.60-67, 2018.
- LUTZ, M. C et al. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. **International journal of food microbiology**, v. 164, n. 2, p. 166-172, 2013.
- MACKAY, I. A., ARDEN, K. E., NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.

- MAGLIANI, W. et al. Yeast killer systems. **Clinical microbiology reviews**, v. 10, n. 3, p. 369-400, 1997.
- MANDAL, G.; SINGH, D.; SHARMA, R. R. Effect of hot water treatment and biocontrol agent (*Debaromyces hansenii*) on shelf life of peach. **Indian Journal of Horticulture**. v.64, p.25-28, 2007.
- MARQUES, E. R. et al. Eficácia do teste de acidez graxa na avaliação da qualidade do café arábica (*Coffea arabica* L.) submetidos a diferentes períodos de temperatura e pré-secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 32, n. 5, p. 1557-1562, Set./Out. 2008.
- MARQUINA, D.; SANTOS, A.; PEINADO, J. Biology of *killer* yeasts. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 65-71, 2002.
- MARTINEZ et al. Different inoculation methods for semi-dry processed coffee using yeasts as starter cultures. **Food Research International**, v.102, p.333-340, 2017.
- MASIH, E.I.; PAUL, B. Secretion of β -1,3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. **Current Microbiology**, New York, v. 44, n. 6, p. 391-395, June 2002.
- MASOUD, W.; JAKOBSEN, M. The combined effects of pH, NaCl and temperature on growth of cheese ripening cultures of *Debaryomyces hansenii* and *coryneform* bacteria. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 1, p. 69-77, Jan. 2005.
- MASOUD, W.; KALTOFT, H. C. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 2, p. 229-234, Feb. 2006.
- MATYSIK, S.; HERBARTH, O.; MUELLER, A. Determination of microbial volatile organic compounds (MVOCs) by passive sampling onto charcoal sorbents. **Chemosphere**, v. 76, n. 1, p. 114-119, 2009.
- MEDINA-CÓRDOVA, N. et al. Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). **Biological Control**, v. 97, p. 70-79, 2016.
- MELO, R. C. N. **Células princípios básicos e práticos**. Juiz de Fora: Ed. UFJF, 2002. 144 p.
- MELO, I. S.; FAULL, J. L.; NASCIMENTO, R. S. Antagonism of *Aspergillus terreus* to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 417-419, 2006.
- MENCHÚ, J. F.; ROLZ, C. Coffee fermentation technology. **Cafe Cacao Tea**, Paris, v. 17, n. 1, p. 53-61, 1973.
- MISLIVEC, P. B.; BRUCE, V. R.; GIBSON, R. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 46, n.1, p. 969-973, Feb. 1983.

- MORALES, H. et al. Effect of biocontrol agents *Candida sake* and *Pantoea agglomerans* on *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. **International Journal of Food Microbiology**. v.122, p. 61-67, 2008.
- MORATH, S. U.; HUNG, R.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 73-83, 2012.
- MORELLO, L. G. et al. Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee 102 beans based on selective amplification of beta-tubulin gene by using real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 3, p. 270-276, 2007.
- MOSS, M.O. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, London, v.13, p.5-9, 1996.Suplemento
- NAS-USA National Academy of Science. Research Briefing: Report of the Panel on Biological Control in Managed Ecosystems. Washington, CD: National Academy Press, 1987. 206p.
- NASCIMENTO, L. C. do et al. Ozônio e ultra-som: processos alternativos para o tratamento do café despulpado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 282-294, mar./abr. 2008.
- NÚÑEZ, F. et al. Selection and evaluation of *Debaryomyces hansenii* isolates as potential bioprotective agents against toxigenic *penicillia* in dry-fermented sausages. **Food microbiology**, v. 46, p. 114-120, 2015.
- ORO, L. et al. Volatile organic compounds from *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* inhibit growth of decay causing fungi and control postharvest diseases of strawberries. **International Journal of Food Microbiology**, v.256, p.18-22, 2018.
- PAGANS, E.; FONT, X.; SÁNCHEZ, A. Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: abatement by biofiltration. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 131, n. 1, p. 179-186, 2006.
- PALACIOS-CABRERA, H. A. et al. Effect of equilibrium Relative Humidity on Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in Raw Coffee Beans. **Brazilian Journal of Food Technology**. V.7, p. 111-114, 2004.
- PALMA, N. et al. Ochratoxin A-induced mutagenesis in mammalian cells is consistent with the production of oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 20, n. 7, p. 1031-1037, 2007.
- PARDO, E. et al. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxina A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, v. 10, n.1, p. 45-49, Feb. 2004.

- PASSAMANI, F. R. F. et al. Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from brazilian grapes. **Journal Food Protection**, v.77, p.1947-1952, 2014.
- PASSOTH, V. et al. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 6, n.1, p. 3-13, Jan. 2006.
- PASTER N. et al. Evaluation of the potential of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent against *Aspergillus flavus* and fungi of stored soya beans. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 10, p.1201–1206, Oct. 1993.
- PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food? **Food Research International**, Dublin, v. 43, n. 7, p. 1902-1914, Aug. 2010.
- PEREIRA, I. S. et al. Estudos histopatológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides* cafeeiro. **Bragantia**, v. 68, n. 1, p. 117-123, 2009.
- PEREIRA, R. G. F. A. et al., Classificação da bebida do café cereja despulpado, desmucilado, descascado e natural. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003, Porto Seguro. **Resumos...** Porto Seguro-BA: EMBRAPA/EMPRAPACAFÉ/MAPA, 2003. p. 163.
- PERRONE, G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Micology**, Wageningen, v. 59, n. 1, p. 53-66, Feb. 2007.
- PETZINGER, E.; WEIDENBACH, A. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. **Livestock Production Science**, v. 76, n.3, p. 245-250, Sept.2002.
- PETERSSON, S. et al. Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonistic yeast *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, n. 8, p. 1003-1006, Aug. 1999.
- PIMENTA, C. J. **Qualidade do café**. Lavras: UFLA, 2003. 297 p.
- PIMENTA, R. S. et al. Utilization of yeasts in biological control programs. In: **Yeast biotechnology: diversity and applications**. Springer Netherlands, 2009. p. 199-214.
- PITT, J. ABARCA, M.L.; BASÍLICO, J.C.; LÓPEZ, C. Mycotoxins and toxigenic fungi. **Medical Mycology**, v. 38, n. s1, p. 41-46, 2000.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, p.593, 1997.
- PRADO, G. et al. Reduction of aflatoxin B1 in stored peanuts (*Arachis hypogaea L.*) using *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 74, n. 6, p. 1003–1006, June 2011.
- QING, F.; SHIPING, T. Postharvest biological control of *Rhizopus* rot of nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*. **Plant Disease**, v. 84, n. 11, p. 1212-1216, 2000.

- RAMOS, D. M. B. et al. Inibição *in vitro* de fungos toxigênicos por *Pichia* sp. e *Debaryomyces* sp. Isoladas de frutos de café (*Coffea arabica*). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, p. 397-402, 2010.
- REVERBERI, M. et al. Aoyap1 regulates OTA synthesis by controlling cell redox balance in *Aspergillus ochraceus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.95, p.1293-1304, 2012.
- REZENDE, E. F. et al. Ochratoxigenic fungi associated with green coffee beans (*Coffea arabica* L.) in conventional and organic cultivation in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p.377-384, 2013.
- RIBEIRO, L. S. et al. Behavior of yeast inoculated during semi-dry coffee fermentation and the effect on chemical and sensorial properties of the final beverage. **Food Research International**, v. 92, p. 26-32, 2017.
- RINGOT, D. et al. Toxicokinetics and toxicodynamics A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 159, n. 1, p. 18-46, Jan. 2006.
- ROMANI, S. et al. Screening on the occurrence of ochratoxin A in Green coffee beans of different origins and types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n.8, p. 3616-3619, July 2000.
- SAATH, R. et al. Microscopia eletrônica de varredura do endosperma de café (*Coffea arábica* L.) durante o processo de secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 196-203, jan./fev. 2010.
- SAKIYAMA, C. C. H. et al. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters in applied microbiology**, v. 33, n. 2, p. 117-121, 2001.
- SALIGKARIAS, I. D.; GRAVANIS, F. T.; EPTON, H. A. S. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I - 182: II. A study on mode of action. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 25, n. 2, p. 151 - 161, Oct. 2002.
- SARAVANAKUMAR, D. et al. *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* e *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. **Postharvest Biology and Technology**, v.49, p.121-128, 2008.
- SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. Yeast viral *killer* toxins: lethality and self-protection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 212-221, 2006.
- SCHWAN, R.F.; SILVA, C.F.; BATISTA, L.R. Coffee Fermentation, cap. 42. In: HUI, Y. H.; EVRANUZ, E. Özgül (Ed.). **Handbook of Plant-based fermented food and beverage technology**. CRC Press, 2012, p. 667- 689.
- SCHWAN, R.F.; et al. Coffee, cap. 17. In: BAMFORTH, C. W.; WARD, R. E. (Ed.) **The Oxford Handbook of FOOD FERMENTATIONS**, OXFORD UNIVERSITY PRESS, 2014, p.695-716.

SHARMA, R. R.; SINGH, DINESH; SINGH, RAJBIR. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological control**, v. 50, n. 3, p. 205-221, 2009.

SILVA, C. F. Microbial Activity During Coffee Fermentation, cap. 11. In: SCHWAN, F. R.; FLEET, H. G. (Ed.). **Cocoa and coffee fermentations** (Fermented Foods and Beverages), Boca Raton: CRC, 2015, p.397-429.

SILVA, C. F. et al. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. 251-260, Apr. 2000.

SILVA, C. F. et al. 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, C. F. et al. Sucession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 951-957, Feb. 2008.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F. Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea Arabica*) beans. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 521-526, Jan./Feb. 2008.

SILVA, C.F., et al. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. **World Journal Microbiol Biotechno**, v.29, p.235-247, 2013.

SOMAI, B. M.; BELEWA, V. Aqueous extract of *Tulbaghia violacea* inhibit germination of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus conidia*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 74, n. 6, p. 1007-1011, June 2011.

SOUZA, M. L. et al. Use of wild yeast as a biocontrol agent against toxigenic fungi in different condition media. **Acta Scientiarum-agronomy**, Maringá, v. 39, n. 3, p. 349-358, July-Sept., 2017.

SPADARO, D.; GULLINO, M. L. State of art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 91, n. 2, p. 185-194, 2004.

SPADARO, D. et al Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. **Postharvest Biology and Technology**, v.24, n.2, p.123-134, 2002.

TANIWAKI, M. H. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173-179, Apr. 2003.

TANNOUS, J. et al. Development of a real-time PCR assay for *Penicillium expansum* quantification and patulin estimation in apples. **Food Microbiology**, v. 50, p. 28-37, 2015.

- TERRA, M. F. et al. Detection of ochratoxin A in tropical wine and grape juice from Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 93, n. 4, p. 890–894, Mar. 2013.
- TIAN, S. P. et al. Effect of biocontrol antagonists applied in combination with calcium on the control of postharvest diseases in different fruit. **Bulletin-OILB/SROP**, v.25, p.193-196, 2002.
- TOLEDO FILHO, J. A et al. **Preparo pós-colheita do café**. 5. ed. atual. Campinas: CATI, 2002. 103 p. (CATI. Boletim Técnico, n 193).
- TORRES, R. et al. Efficacy of *Candida sake* CPA-1 formulation for controlling *Penicillium expansum* decay on pome fruit from different Mediterranean regions. **Journal of Food Protection**, v.69, p.2703-2711, 2006.
- TOZLOVANU, M. et al. Genotoxicity of the hydroquinone metabolite of ochratoxin A: structure-activity relationships for covalent DNA ad- duction. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 19, p. 1241–1247, 2006.
- URBANO, G. R. et al. Occurrence of ochratoxin A: producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 8, p. 1226- 1230, Aug. 2001.
- VAN, P.W.; CASTELEIN, J. M. Study of the pectinolytic microflora, particularly the Enterobacteriaceae, from fermenting coffee in the Congo. **Journal of food science**, v. 37, n. 1, p. 171-174, 1972.
- VARGA, J.; SAMSON, R. A. **Aspergillus in the genomic era**. Netherlands: Wageningen Academic, p.336, 2008.
- VAUGHN, R. H. et al Observations on the microbiology of the coffee fermentation in Brazil. **Food Technology**, 12 (Suppl.), p.12–57, 1958.
- VELMOUROUGANE, K. et al. Management of *Aspergillus ochraceus* and ochratoxin- A contamination in coffee during on-farm processing through commercial yeast inoculation. **Biological Control**, Orlando, v. 57, n.3, p. 215–221, June 2011.
- VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 8, p. 1128-1135, Dec. 2010.
- VITERBO, A. et al. Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). **Current Genetics**, New York, v. 42, n. 2, p. 114–122, Nov. 2002.
- ZHANG, H. et al. Biocontrol of major postharvest pathogens on apple usisng *Rhodotorula glutinis* and its effects on postharvest quality parameters. **International Journal of Food Microbiology**. v.126, p.167-171, 2009.
- ZHENG, M. et al. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. **Biological Control**, v. 65, n. 2, p. 200-206, 2013.

ZHOU, Y., ZHANG, L.; ZENG, K., Efficacy of *Pichia membranaefaciens* combined with chitosan against *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits and possible modes of action. **Biological Control**, v.96, p.39-47, 2016.

ZHU, C. et al. Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in vitro and in vivo through antagonistic yeasts. **Food Control**, v. 50, p. 125-132, 2015.

WALKER, G. M. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 25-34, 2011.

WITTIG, H. P. P.; JOHNSON, K. B.; PSCHEIDT, J. W. Effect of epiphytic fungi on brown rot blossom blight and latent infections in sweet cherry. **Plant Disease**, v. 81, n. 4, p. 383-387, 1997.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO**ARTIGO 1****Biocontrol and mechanisms of yeasts
on ochratoxin A – producing fungi in coffee berries**

Versão preliminar a ser submetida ao periódico *World Mycotoxin Journal*,
preparada de acordo com suas normas de publicação.

1 **Biocontrol and mechanisms of yeasts**
2 **on ochratoxin A – producing fungi in coffee berries**

3
4
5 **M. L. Souza¹, L. R. Batista² and C. F. Silva^{1*}**

6
7 ¹*Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil;*

8 ²*Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, 372000-000,*
9 *Lavras, MG, Brasil; cristinafsb@dbi.ufla.br*

10
11 **Abstract**

12
13 The biocontrol can be applied in the stage of post-harvest, using yeast, because no residues in
14 food. In this study, we investigated the mechanisms of biocontrol of genera *Candida*,
15 *Meyerozyma*, *Pichia*, *Wickerhamomyces*, *Rhodotorula* and *Saccharomyces*. *In vivo* evaluated
16 the biocontrol of *S.cerevisiae* strains forward to *Aspergillus carbonarius* and *A. ochraceus*, in
17 relation to the persistence of these fungi and production of ochratoxin A (OTA) in fruits of
18 coffee, Catuaí Vermelho, by dry process. The strains of *S. cerevisiae* CCMA (0159; 1299;
19 1302) showed production of volatile organic compounds (VOCs), killer toxin and β -1,3-
20 glucanase. In the test killer, 11 of the 32 isolates had the phenotype. In relation to the VOCs
21 production eight compounds strains showed inhibitory effect on *A. ochraceus* CCDCA10612
22 and seven on *A. carbonarius* CCDCA10608. There was no production of spores per *A.*
23 *carbonarius* in co-cultivation with *S. cerevisiae* CCMA 1306 and the mycelial growth was
24 inhibited (65%). The mycelial growth of *A. ochraceus* was inhibited by VOC of *S.cerevisiae*
25 CCMA 1313 (69.83%) and CCMA 1306 (79.88%). *S. cerevisiae* CCMA 1302 was the best
26 producer of β -1,3-glucanase using prepared of the cell wall (CWP) of *A. carbonarius* (0.325
27 μg glucose/min.) and *S. cerevisiae* CCMA 1299, CWP of *A. ochraceus* (0.263 μg
28 glucose/min). OTA in coffee was detected in 17 samples (28%), at concentrations ranging
29 from 0.04 to 10.11 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The formation of biofilms by *S. cerevisiae* CCMA (0159;
30 1302), was observed by scanning electron microscopy, these were the antagonists on growth
31 and production of OTA. The population of *A. carbonarius* (0.5 log spores/g) was reduced in
32 the presence of *S. cerevisiae* CCMA 1302 in the end of the processing time. *S. cerevisiae*
33 CCMA 1302 is a candidate for biological control agent over ocratoxigenic fungi, in coffee
34 beans.

35
36 **Keywords:** *Aspergillus*, *Coffee arabica*, biological control, volatile organic compounds,
37 Yeast, post-harvest control.

38
39 **1. Introduction**

40
41 Coffee is one of the agricultural products of greatest generation of wealth. Brazil is the
42 largest producer and exporter of coffee, with production of 44.97 million bags benefited in
43 2017 (BRASIL, 2017). The main producers of cafés, in Brazil, Minas Gerais, São Paulo,
44 Espírito Santo, Rondônia and Bahia (Brazil, 2018).

45 Several filamentous fungi are part of the microbiota of coffee and may be producers of
46 ochratoxin A (OTA). The main genera found in Brazilian coffees are *Aspergillus*, *Penicillium*,
47 *Cladosporium* and *Fusarium* (Batista *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2008).
48 The genus *Aspergillus*, producer of OTA, can be detected since the crop, after the processing
49 step and even at the time of production of final drink (Batista *et al.*, 2003; Culliao and

50 Barcelo, 2015). *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. sclerotiorum*, *A. niger*, *A. westerdijkiae* and
51 *A. sulphureus*, are some of the species found in cafés and potential producers of OTA (Batista
52 and Chalfoun, 2007; Gil-Serna *et al.*, 2009; Paterson *et al.*, 2014; Rezende *et al.*, 2013).

53 Estimates showed that 25% of all agricultural products in the world are contaminated
54 by mycotoxins (World Food Organization and the World Health Organization - FAO, 2004).
55 These mycotoxins pose a risk to health (Rezende *et al.*, 2013) and among them, the OTA has
56 proven carcinogenic effects, nephrotoxic, teratogenic, immunotoxic in animals, and it is
57 believed that is associated with tumors in the urinary tract of human beings (Chiotta *et al.*,
58 2009; Duarte *et al.*, 2010; Sorrenti *et al.*, 2013). Therefore, strategies to inhibit the production
59 are essential for food security for the consumer.

60 Some species of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Rhodotorula*
61 *mucilaginosa*, isolated from fruits of coffee and cocoa, were able to inhibit or reduce the
62 mycelial growth and sporulation, OTA production when co-cultured *in vitro* with *A.*
63 *carbonarius* and *A. ochraceus* (Souza *et al.*, 2017). The yeasts can be considered agents of
64 biological control and may have different mechanisms of action, among them, competition for
65 space and nutrients, antibiosis and parasitism tillage (Liu *et al.*, 2013; Spadaro *et al.*, 2002;
66 Sharma *et al.*, 2009); production of volatile organic compounds (VOC) (Ando *et al.*, 2012;
67 Grzegorzczuk *et al.*, 2017; Medina-córdova *et al.*, 2016; Núñez *et al.*, 2015); killer toxins
68 (Belda *et al.*, 2017; Grzegorzczuk *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2015; Perez *et al.*, 2016; Platina *et*
69 *al.*, 2012) and production of lytic enzymes (proteases, chitinases and glucanases)
70 (Grzegorzczuk *et al.*, 2017; Heling *et al.*, 2015; Saligkaria *et al.*, 2002; Viterbo *et al.*, 2002;
71 Zhou *et al.*, 2016).

72 Some countries establish the ceilings of OTA which may occur in foods such as
73 cereals and other products. In Brazil, in particular, for roasted coffee (ground or in grain) and
74 soluble this limit is 10 µg/kg (ANVISA, 2011). European countries have limits of OTA in
75 food and beverages, in the European Union for roasted coffee, the limit is 5 µg/kg and soluble
76 coffee is of 10 µg/kg (Leong *et al.*, 2007; EU, European Commission, 2010).

77 In this study, different *in vitro* tests were carried out to assess the possible mechanisms
78 of action of yeasts on ocratoxigênicos fungi belonging to the genus *Aspergillus*. Among them
79 were analyzed: production of toxin killer; production of VOC and inhibition of mycelial
80 growth of *A. carbonarius* CCDCA10608 and *A. ochraceus* CCDCA10612 in split plates;
81 fungistatic effect or fungicide; VOCs; production of the enzyme β-1,3-glucanase; production
82 of substances with antagonist action obtained from plant extracts free of yeast cells. In
83 addition, strains with antagonist effect were evaluated in fruits of coffee newly harvested and
84 subjected to processing via dry.

85

86 2. Materials and Methods

87

88 Microorganisms

89

90 *Aspergillus carbonarius* CCDCA 10608 and *A. ochraceus* CCDCA 10612, isolates,
91 respectively, grape juice and coffee, belongs to the collection of culture of microorganisms
92 from the Department of Food Sciences (CCDCA), Federal University of Lavras. The Isolates
93 preserved on filter paper discs at - 80°C were reactivated in MEA (Malt extract agar) (g/l; 20g
94 malt extract, 1g bacteriological peptone, 20g glucose and 20g agar) and incubated at 25 °C/
95 five to seven days. *In vitro* tests were used 32 yeast isolates with potential antagonists (Souza
96 *et al.*, 2017). The strains are *Candida guilliermondii* CCMA (1296, 1297, 1298, 1307, 1308);
97 *C. krusei* CCMA 1316; *C. parapsilosis* CCMA (1292, 1293, 1295, 1301, 1304, 1312, 1314);
98 *Meyerozyma caribbica* CCMA 1294; *Pichia guilliermondii* CCMA 0164; *P. kluyveri* CCMA

99 (0166, 0167, 0168, 0169); *Rhodotorula mucilaginosa* CCMA (1305; 1310); *Saccharomyces*
 100 *cerevisiae* CCMA (0159, 1299, 1302, 1306, 1313, 1315, 1317) e *Wickerhamomyces anomalus*
 101 CCMA (1300, 1303, 1309, 1311) and belong to the Collection of Culture of Agricultural
 102 Microbiology (CCMA), the Department of Biology, Federal University of Lavras. The
 103 isolates preserved at -80 °C were reactivated in YEPG (g/l; 10g yeast extract, 20g peptone,
 104 10g glucose and 15g agar) and incubated for 24 h/28 °C. In the *in vivo* tests, the fruits of
 105 coffee, were used for the strains of *S. cerevisiae* CCMA CCMA 0159 and 1302.

106

107 **Assessment of the mechanisms of control of yeasts on *Aspergillus***

108

109 *Production of toxin killer*

110

111 The 32 yeast isolates were evaluated, which *S. cerevisiae* CCMA CCMA 0159 and
 112 1302 were used as positive control. All tests were carried out in relation to two strains of
 113 yeasts sensitive pattern, *S. cerevisiae* NCYC 1006 and *Candida glabrata* Y55 ATCC 90525.
 114 The yeasts were cultivated in YEPG, 24h/28°C and standardized (10^8 cells/ml) using a
 115 Neubauer chamber. With the aid of a "swab", 100µl of the lineage was spread on agar-
 116 YEPGMB according to Lima *et al.* (2013). The isolates were inoculated per microgota tests
 117 on each of the plates corresponding to a lineage and incubated 72h/25°C. All tests were
 118 performed in triplicate. The presence of the factor *killer* was established in accordance with
 119 Young (1987).

120

121 *Production of volatile organic compounds (VOCs)*

122

123 The tests were performed with 32 yeast isolates (10^8 cells/ml), and two isolates of
 124 fungi (10^6 spores/ml), in ceramic split polystyrene, containing half MEA. On one side of the
 125 card spread 50 µl of the suspension of yeast with swab, and in another, a microgota central (5
 126 µl) of the spore suspension. The positive control was inoculated only the fungus. The plates
 127 were sealed and kept at 25°C / 7 days. The fungal isolates were evaluated in two to seven
 128 days, held diametrically opposing measurements from the center of inoculation, and in the
 129 positive control was considered as 100% of the mycelial growth. The trials were carried out in
 130 triplicate. The inhibitory activity (AI) was performed according to Medina-córdova *et al.*
 131 (2016), using the equation 1:

132

$$133 \text{ AI (\%)} = [(C - T) / C] \times 100 \text{ (equation 1)}$$

134

135 Where C (control) was the mean diameter of the colonies of fungi of the positive
 136 control and T (treatments) average diameter of the colonies of fungi in plaques of co-
 137 cultivation.

138

139 *Fungicidal or fungistatic effect*

140

141 The fungal isolates that showed lower mycelial growth, in previous test were
 142 evaluated to identify whether the effect of VOCs would or fungistatic. The transfer of a disc
 143 of mycelium (5 mm), and control of fungi, were made for a new board of MEA and incubated
 144 7 days/25°C. The trials were carried out in triplicate. Were considered as fungistatic effect
 145 fungi able to grow and esporular again.

146

147

148 *Identification of volatile organic compounds (VOCs) by GC-MS*

149
150 Of the 32 strains of yeasts, eight were evaluated in relation to the profile of VOCs, *S.*
151 *cerevisiae* CCMA (0159, 1299, 1302, 1306, 1313, 1315 and 1317) and *R. mucilaginosa*
152 CCMA 1305 (10^8 cells/ml), *A. carbonarius* CCDCA 10608 and *A. ochraceus* CCDCA 10612
153 (10^6 spores/ml), so that the treatments were: vials with yeast isolates, vials with fungal
154 isolates and vials with co-cultivation. The vials of 15 ml with septum were prepared
155 containing 2 ml of MEA. All cultures were incubated for seven days/25°C. The analyzes of
156 the VOCs were according to the methodology of Fialho *et al.* (2010) with some
157 modifications. A fiber of HS-SPME (supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) coated with
158 DIVINYLBENZENE/carboxen/POLYDIMETHYLSILOXANE (DVB/CAR/PDMS) 50/30
159 μm was used to remove the VOC. The vials were kept for 5 min at 38°C and after expõs the
160 SPME fiber through the head space, during 15 min and held- if the analysis. The
161 chromatograph GC-MS (Shimadzu, Model GCMS-QP2010) was fitted with a fused silica
162 capillary column model Rtx[®]-5MS (Restek, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) and the stationary
163 phase (5% diphenyl, 95% DIMETHYLPOLYSILOXANE). The injector was operated in
164 "splitless" mode and using helium gas as a drag. The temperature of the injector and detector
165 were maintained at 250 °C. The temperature of the oven GC was programd in the following
166 way: 40 °C for 5 min, 3°C/min up to 100 ° C, then there was an increase of 20 °C/min to 250
167 °C, ending by 10 min/250°C. The range of detection in the mass spectrometer remained
168 between 35 and 350 m/z. Volatile compounds were identified by comparing their spectra of
169 pasta with the NIST Library 11. A series of alkanes (C₁₀-C₄₀) was used to calculate the
170 retention index (RI) for each congener and were compared with IR data found in the
171 literature.

172 173 *Evaluation of the activity of β -1,3-glucanase*

174
175 *A. carbonarius* CCDCA10608 and *A. ochraceus* CCDCA10612 grown in the midst
176 of MEA, for 7 days/25°C were used for the preparation of the cell wall (CWP) according to
177 methodology described by Saligkarias *et al.* (2002). *S. cerevisiae* CCMA 0159, 1299 and
178 1302 were selected in agreement with results obtained by Souza *et al.* (2017), for having good
179 results from inhibition of mycelial growth of fungal isolates. These isolates were inoculated in
180 50 ml of YEPG, 24h/28 °C/120 rpm. Subsequently, 1 ml (10^7 cells/ml) was transferred to
181 erlemeyers with 150 ml of YNB (g/l; 6.7 g YNB; 2.0 g glucose and 0.5g CWP), incubated for
182 7 days/5 °C/120 rpm. The experiment was carried out in triplicate. Samplings were performed
183 in 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hours. The samples were centrifuged at 2.000 g /5
184 min /4 °C and the supernatant collected and stored in a freezer. The determination of the
185 activity of β -1,3-glucanase was assessed according to the methodology described by Heling *et*
186 *al.*, (2015).

187 188 *Effect of cell-free supernatants on the growth of fungi of the genus Aspergillus* 189 *ocratoxigênicos*

190
191 *A. ochraceus* CCDCA10612 and *A. carbonarius* CCDCA10608 were grown in MEA,
192 the 25 °C/7 days. Was subsequently prepared a suspension of spores (10^6 spores/ml) to be
193 used in the test for the evaluation of production of antimicrobial substance by isolates of
194 yeasts: *M. carribica* CCMA 1294; *C. krusei* CCMA 1316; *C. parapsolisis* (CCMA: 1295 e
195 1304); *C. guilliermondii* (CCMA: 1296, 1298, 1297 e 1307); *S. cerevisiae* (CCMA: 0159,
196 1299, 1302, 1306, 1313 e 1317); *W. anomalus* (CCMA: 1300 e 1303); *R. mucilaginosa*

197 (CCMA: 1305 e 1310). These isolates were selected because they were able to inhibit above
198 75% of the mycelial growth of fungal isolates, according to Souza *et al.* (2017).

199 The yeasts were reactivated in 1 ml of YEPG, by 24h/28 °C. Subsequently were
200 transferred to 100 ml of YEPG, incubated at 28 °C/150 rpm until you get 10⁸ cells/ml. The
201 cultures of yeasts were centrifuged at 9.000g/10 min /4 °C. Subsequently, three ml of
202 supernatant were collected and filtered in Milipore membrane of 0.22 µm pore diameter and
203 stored for subsequent analysis. An aliquot of 100µl of the spore suspension (10⁶ spores/ml) of
204 *A. ochraceus* CCDCA10612 and *A. carbonarius* CCDCA10608 were scattered about the
205 MEA. Later, in the center of the plate, became a well with an approximate diameter of 5 mm.
206 In each well was applied 100µl of supernatant. How control was performed the spreading of
207 the spore suspension and in the pit was added 100µl of sterile distilled water. The plates were
208 left at rest in the laminar flow chamber for 3 hours to allow the spread of the sample in solid
209 medium, and then were incubated for seven days/25°C. The assays were performed in
210 triplicate. The antimicrobial activity was evaluated by measuring the inhibition halos in
211 millimeters.

212

213 ***In vivo* tests in fruits of coffee cherries processed via drought**

214

215 The fruits of coffee (*Coffea arabica* L.), variety Catuaí Vermelho, the cherry stage,
216 were obtained from nearby farms of Lavras, Minas Gerais, Brazil, 822-1259 m above sea
217 level, in 2015 (June and July) and 2016 (July). The fruits were processed using the dry
218 method through direct drying in the terreiros until the fruits reach from 11 to 12% moisture
219 (Silva *et al.*, 2013). During the drying stage, 2015, the average temperature was 16°C (T_{min}:
220 9.2 °C - T_{max}: 25.1 °C) and relative humidity ranging from 68.8 - 82.5%. In 2016, average
221 temperature of 18.2°C (T_{min}: 11.3 °C - T_{max}: 29 °C) and relative humidity ranging from 54
222 77.8%, data obtained from the main weather station, located on the campus of the Federal
223 University of Lavras.

224 *S. cerevisiae* CCMA 0159 and CCMA 1302, *killer* toxin-producing, β-1,3- glucanase
225 and vocs were used as starters and crops were grown as previously described. The inoculation
226 was made by spraying to obtain 10⁹ cells/g in the fruits of coffee. The isolates *A. carbonarius*
227 CCDCA 10608 and *A. ochraceus* CCDCA 10612, producers of OTA were cultured as
228 previously described and the spray on fruit of cafes staying at a concentration of 10⁵ spores/g.

229 The experiments were carried out in a semi-pilot scale (1kg of coffee) with and
230 without disinfection. The disinfection was performed to evaluate interaction yeast and fungus-
231 fruit, by scanning electron microscopy (SEM). The coffee fruits were submitted to a
232 superficial disinfection using alcohol 70%/1 min., followed by immersion in sodium
233 hypochlorite to 1%/30 sec. and washed three times with distilled water. In addition,
234 experiments were performed on a pilot scale (10 Kg of coffee). The treatments were: control -
235 without inoculation (semi-pilot and pilot); *S. cerevisiae* CCMA 0159 (semi-pilot and pilot); *S.*
236 *cerevisiae* CCMA 1302 (semi- pilot and pilot); *A. carbonarius* CCDCA 10608 (semi-pilot
237 and pilot); *A. ochraceus* CCDCA 10612 (semi-pilot); *S. cerevisiae* CCMA 0159 and *A.*
238 *carbonarius* CCDCA 10608 (semi-pilot and pilot); *S. cerevisiae* CCMA 0159 and *A.*
239 *ochraceus* CCDCA 10612 (semi-pilot); *S. cerevisiae* CCMA 1302 and *A. carbonarius*
240 CCDCA 10608 (semi-pilot and pilot); *S. cerevisiae* CCMA 1302 and *A. ochraceus* CCDCA
241 semi- 10612 (pilot). These treatments were processed by dry directly on sieves in the
242 courtyard of drying, simulating what occurs in coffee farms. All treatments were performed
243 under natural environmental conditions, in triplicate. The samples (2 grams; semi-pilot scale)
244 or (20 grams; pilot scale) were collected every 4 days and stored in sterile plastic bags,

245 transferred to the Laboratory of Environmental Microbiology and Industrial (MAI) at the
246 Federal University of Lavras (UFLA) for future analyzes.

247 During the period of drying, semi-pilot scale, the determination of the water activity of
248 coffee beans was monitored by brand *Aqualab Pawkit* Decagon portable model and by the
249 direct method in the oven, until it reaches to 11-12% moisture. For the pilot scale monitoring
250 was performed by the direct method in greenhouse, this step was performed in the Laboratory
251 of Processing of Agricultural Products, Engineering Department, Federal University of
252 Lavras. To achieve 11-12% moisture the fruits of coffees were removed from the terreiro of
253 drying and kept in a shed for storage of grains per five days later realizadou the beneficiation
254 and they were kept in paper bags, and stored in cardboard box, sheltered from light and the
255 ambient temperature.

256

257 **Analysis of ochratoxin A in grains and coffee husk**

258

259 Samples of coffee fruits, 25g of each treatment were collected in the times zero, 10,
260 and 15 days and frozen in freezer until the next stage of preparation. Treatments analyzed:
261 semi-pilot scale - all except those inoculated only with the yeasts; pilot scale- all treatments.
262 The samples were benefited by hand, the husks stored in separate plastic bags of grain.
263 Subsequently, the samples were crushed in moinho da brand IKA A11 BASIC, with liquid
264 nitrogen. For the extraction of OTA added to 25 ml of methanol solution 70% in five grams of
265 each sample (only shell or coffee beans). The mixture was shaken in vortex for 3 min. It
266 filtered with Whatman N^o. 1 filter in place protected from direct light. Three ml of filtered
267 sample were stored in vials, until the time of use of the KIT for detection of botulinum. The
268 detection of OTA was performed using the technique of immunoassay ("enzyme linked
269 immunosorbent assay") (ELISA) using the kit AgraQuant[®] Total Ochratoxin Assay 2/40
270 (Romer Labs[®]) according to manufacturer's recommendations. The optical density (OD) was
271 measured in an ELISA reader, mark RCHISTO TECAN- Infinite M200 Pro Series, the 450
272 nm and compared to the standards. The calculation of the results was with the aid of the
273 spreadsheet[®] Log/Logit. The results were only considered valid if the $R^2 \geq 0.985$.

274

275 **DNA extraction of coffee beans and qPCR**

276

277 The total DNA extraction was performed according to methodology described by
278 Ribeiro *et al.* (2017). The treatments were: control; fruit inoculated with *A. carbonarius*
279 CCDCA10608; fruit inoculated with *S. cerevisiae* CCMA 1302; of the times zero, 192 and
280 360 hours. The kit Soil DNA isolation kit (Norgen biotek Corporation) was used according to
281 the manufacturer's instructions. For each treatment were performed three repetitions and two
282 biological techniques. The qPCR was performed in the system of rotor-Gene Q (Quiagen,
283 Hombrechtikon, ZH, Switzerland). The specific primers used for *S. cerevisiae* were
284 previously described by Díaz *et al.* (2013) (SC-5fw 5'-AGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAG-
285 3' and SC-3bw 5'-TGAAATGCGAGATTCCCCT-3') and for the isolate of *A. carbonarius*
286 were described according to Atoui *et al.* (2007) (Ac12RL_OTAF 5'-
287 AATATATCGACTATCTGGACGAGCG-3' and Ac12RL_OTAR 5'-
288 CCCTCTAGCGTCTCCCGAAG-3'). The specificities were confirmed by the search in Gen
289 Bank using the BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

290

291 *Reaction of qPCR for S. cerevisiae*

292

293 Each reaction consisted of 7.5µl 2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix
294 (Qiagen, Stockach, Konstanz, Germany), initiator 0.8µM of each primer (Invitrogen, São

295 Paulo, SP, Brazil) (SC-5fw and SC-3bw), 1 µl of DNA of *S. cerevisiae* CCMA1302, for the
 296 volume of 15 µl. For the standard curve the yeast was cultivated in YEPG agar for 24 h/28 °C
 297 and the concentration of cells standardized by counting in a Neubauer chamber. The DNA
 298 was extracted using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and diluted in series
 299 (1:10) 10¹⁰- 10⁹ up to 10 cells/ml. Each point of the calibration curve was analyzed in
 300 triplicate. The volume of DNA samples, in each reaction, was determined in accordance with
 301 the reading on nanodrope (ng/µl) (data not shown), and considered the value of the original
 302 DNA of *S. cerevisiae* (20.3 ng/µl) obtained from the concentration of 10¹⁰ cells/ml. The
 303 conditions in the equipment of qPCR were performed according to Ribeiro *et al.* (2017).

304

305 *Reaction of qPCR for A.carbonarius*

306

307 Each reaction was carried out as previously described by modifying the specific
 308 primers, 1.0µM of each primer scraper (Integrated DNA Technologies [R&D])
 309 (Ac12RL_OTAF and Ac12RL_OTAR). For the standard curve, the fungus was growing in
 310 the midst of MEA, 4 days/25°C. The spores were standardized in a Neubauer chamber. The
 311 DNA was extracted using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and diluted in
 312 series (1:10) 10⁹-10⁸ to 10³ spores/ml. Each point of the calibration curve was analisado in
 313 triplicate. The volume of DNA samples, in each reaction, was determined in accordance with
 314 the reading on nanodrope (ng/µl) (data not presented) and considered the value of the original
 315 DNA of *A. carbonarius* (8.0 ng/µl) obtained from the concentration of 10⁹ spores/ml. The
 316 conditions in the equipment of qPCR were performed according to Digtã *et al.* (2016).

317

318 **Scanning Electron Microscopy (SEM)**

319

320 The treatments evaluated were related to experiments in semi-pilot scale (with and without
 321 disinfection) and pilot (without disinfection) (Table 1), with the samples of coffee fruits collected with
 322 two, 10 and 15 days of processing, in triplicate.

323

324 **Table 1.** Treatments evaluated by SEM.

Treatments (fruits of coffee inoculated)	Semi-pilot			Pilot		
	With and Without disinfection			Without disinfection		
	Time (days)			Time (days)		
	2	10	15	2	10	15
Control - without inoculation	x	x	x	x	-	x
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0159	-	-	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1302	-	-	-	-	-	-
<i>A. carbonarius</i> CCDCA 10608	-	-	-	x	x	x
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0159 and <i>A. carbonarius</i> CCDCA 10608	x	x	x	x	x	x
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1302 and <i>A. carbonarius</i> CCDCA 10608	-	x	x	x	x	x
<i>A. ochraceus</i> CCDCA 10612	-	-	-	nr	nr	nr
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0159 and <i>A. ochraceus</i> CCDCA 10612	-	x	-	nr	nr	nr
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1302 and <i>A. ochraceus</i> CCDCA 10612	-	x	-	nr	nr	nr

325

(x) analyzed samples; (-) samples not analyzed; (nr) experiment has not been carried out.

326

327 The preparation of the samples to be analyzed was according to the methodology
 328 described by Alves and Perina (2012), with modifications. The samples were cut
 329 longitudinally, immersed in modified Karnovsky solution fixativa (Paraformaldeido
 330 glutaraldehyde 2.5%, 2.0%, 0.05 M cacodylate buffer, pH 7.2), packaged in tubes eppendorfs

331 (1.5 ml) and stored in refrigerator is the time of preparation. These were washed with
 332 cacodylate buffer, three times and immersed for 10 min, then dehydrated in series of acetone
 333 (25%, 50%, 75%, 90%) for 10 min at each concentration of 100%, this step was performed
 334 three times, and finally the acetone was discarded and the samples cut into smaller pieces and
 335 dried in a critical point. The specimens obtained were mounted on "stubs" and prepared three
 336 pieces directed to the outside of the shell upwards and a piece with the inner part exposed
 337 upwards. Later were covered with gold and observed under SEM LEO EVO 40 Xvp. The
 338 generated images were recorded digitally, the variable increases, the working conditions of 20
 339 kv and distance work ranging from 5.5-9.5 mm.

340

341 **Statistical analyzes**

342

343 The experiments in split plates were conducted in randomized complete block design
 344 (DBC), with factorial arrangement (2x32), and two strains of filamentous fungi (10^6
 345 spores/ml), in the presence of 32 yeast isolates (10^8 cells/ml), in triplicate. The results of the
 346 mycelial growth, with seven days of incubation, were submitted to the Dunnet test, using the
 347 alternative hypothesis bilaterally with $p < 0.05$. The results of qPCR were analyzed in
 348 Microsoft Excel using the analysis of variance and the treatments were compared using Tukey
 349 test with $p < 0.05$, being the data analyzed by SISVAR software (version 5.6) (Ferreira,
 350 2014).

351

352 **3. Results**

353

354 **Evaluation of the production of toxin *killer***

355

356 Of 32 yeast isolates evaluated, 34% were producers of toxin *killer*, being all strains of
 357 the genus *Saccharomyces* phenotype producing *killer* at 20 and 25°C. Another genre producer
 358 was *Wickerhamomyces* (Table 2). The strains of *S. cerevisiae* CCMA CCMA 0159 and 0132
 359 used in *in vivo* tests, both presented the phenotype *killer*, in three temperatures when co-
 360 cultured with the two standard sensitive yeast *S. cerevisiae* NCYC 1006 and *Candida*
 361 *glabrata* Y55 ATCC 90525.

362

363 **Table 2.** Strains of yeast *killer* toxin-producing, at temperatures: 20, 25 and 30 °C.

Yeasts evaluated	Yeasts are sensitive					
	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006			<i>C. glabrata</i> Y55 ATCC 90525		
	20 °C	25 °C	30°C	20 °C	25 °C	30°C
<i>S.cerevisiae</i> CCMA 0159	+	+	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1299	+	+	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1302	+	+	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1306	+	+	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1313	+	+	-	+	+	-
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1315	+	+	+	+	+	-
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1317	+	+	+	+	+	+
<i>W. anomalus</i> CCMA 1300	-	+	-	-	+	-
<i>W. anomalus</i> CCMA 1303	+	-	-	+	-	-
<i>W. anomalus</i> CCMA 1309	-	+	-	-	+	-
<i>W. anomalus</i> CCMA 1311	+	+	-	+	+	-

364 + = *killer* positive, presence of a zone of inhibition; - = negative *killer*, no zone of inhibition.

365

366

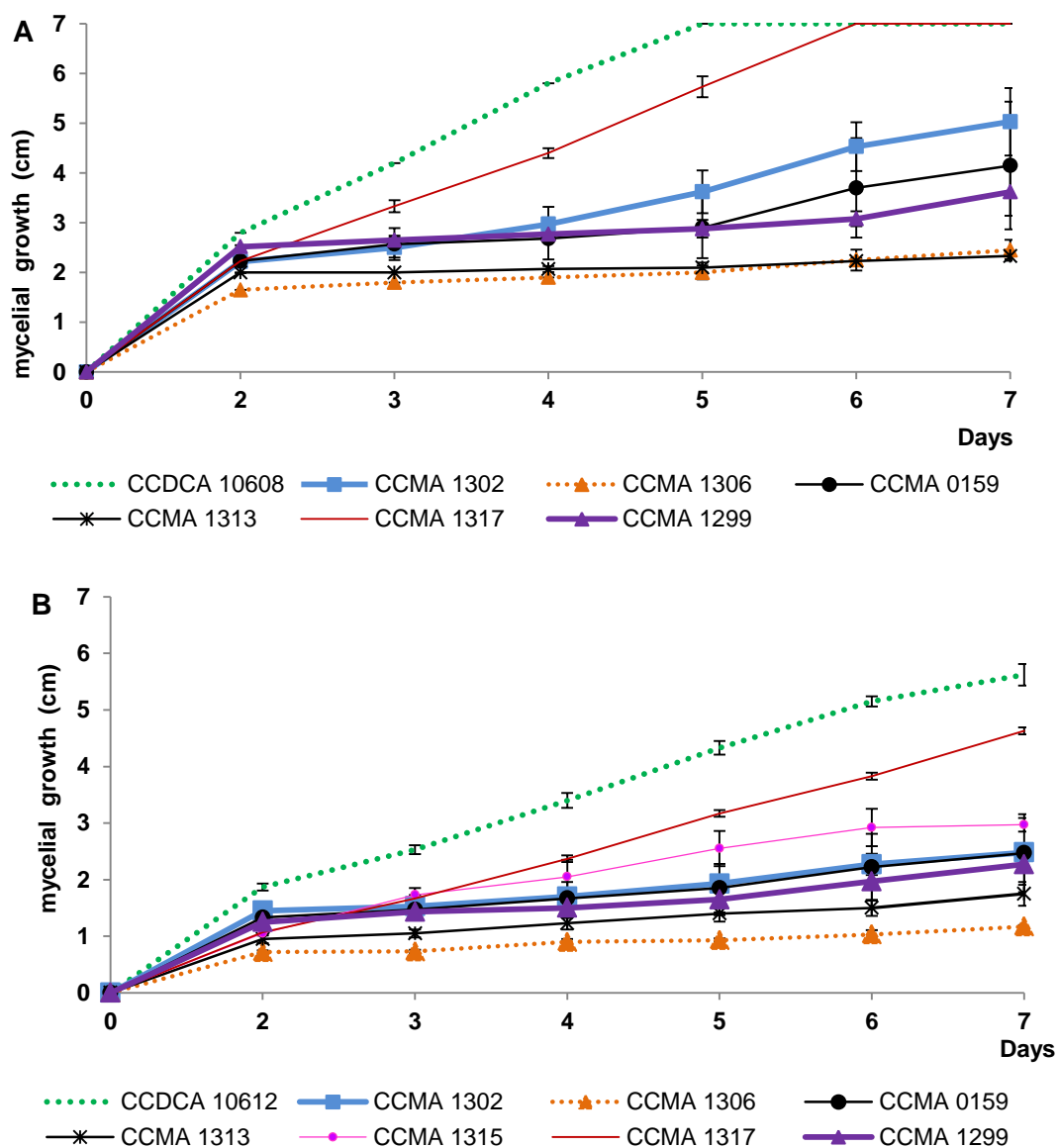
367

368 *In vitro* assays for the evaluation of production of volatile organic compounds (VOCs)

369

370 Of the 32 isolates of yeasts, five interfered in the mycelial growth of both *A.*
 371 *carbonarius* and *A. ochraceus* (Figure 1) and were statistically significant, according to the
 372 *Dunnett* test (Table S1). There was a decrease in the mycelial growth of *A. carbonarius*
 373 CCDCA 10608 (control) (7 cm) when compared with the co-cultivated with different strains
 374 of *S. cerevisiae*. The percentages of inhibition of mycelial growth compared to strains of *S.*
 375 *cerevisiae* were CCMA 1302 (28.14%); CCMA 0159 (40.71%); CCMA 1299 (48.29%);
 376 CCMA 1306 (65%) e CCMA 1313 (66.67%) (Figure 1A).

377



378

379

380

381

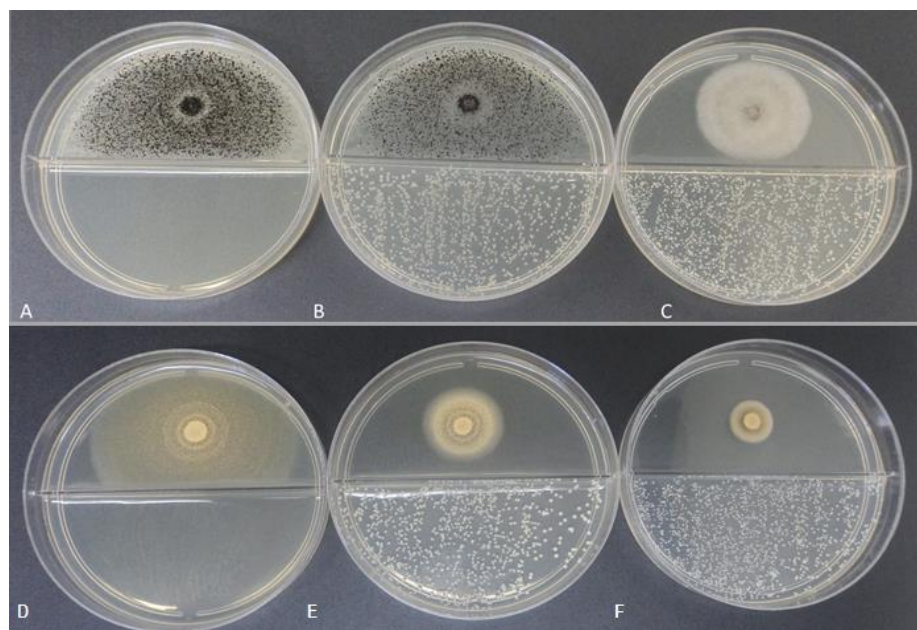
382 **Figure 1:** mycelial growth (cm) of *A. carbonarius* CCDCA 10608 (A) and *A. ochraceus* CCDCA
 383 10612 (B), grown in malt extract agar medium (MEA), at 25°C, during seven days, control and co-
 384 cultivation with strains of *S. cerevisiae*. The vertical bars represent the standard deviation of the mean
 385 of three replicates for each strain. These yeasts showed significant results, in accordance with the
 386 *Dunnett* test, with $p < 0.05\%$.

387

388 In relation to the fungus *A. ochraceus* CCDCA 10612 compared to *A. carbonarius* the
 389 inhibition of mycelial growth when co-cultivated with the same isolates of *S. cerevisiae* were

390 higher as can be observed in Figure 1B. The following respectively the strain of *S. cerevisiae*
 391 and the percentage of inhibition: CCMA 1302 (55.87%); CCMA 0159 (56.05%); CCMA
 392 1299 (59.82%); CCMA 1306 (79.88%); CCMA 1313 (69.83%); CCMA 1315 (47.25%);
 393 CCMA 1317 (20.11%).

394 The VOCs produced by different strains exhibited antifungal activity with different
 395 efficiency. Thus, 21.87% of the yeasts are potential producers of some type of VOC capable
 396 of inhibiting *A. ochraceus* and 18.75% on *A. carbonarius*. The yeasts were more efficient in
 397 the inhibition of *A. ochraceus* (79.88%) than *A. carbonarius* (66.67%). Some strains were
 398 able to inhibit or decrease the production of spores (Figure 2).
 399



400 **Figure 2.** *In vitro* antagonism by yeasts of the genus *Pichia* and *Saccharomyces* front of the
 401 *Aspergillus carbonarius* CCDCA10608 and *A. ochraceus* CCDCA 10612, in Petri plates split. **A)** *A.*
 402 *carbonarius* (control); **B)** *A. carbonarius* and *P. kluyveri* CCMA 0166; **C)** *A. carbonarius* and *S.*
 403 *cerevisiae* CCMA 1306; **D)** *A. ochraceus* (Control); **E)** *A. ochraceus* and *S. cerevisiae* CCMA 1313;
 404 **F)** *A. ochraceus* and *S. cerevisiae* CCMA 1306.

405

406 *Fungicidal or fungistatic effect*

407

408 *Candida parapsolis* CCMA 1292 e CCMA1304; *C. guilliermondii* CCMA 1296;
 409 CCMA 1297; CCMA 1298; CCMA 1307; *C. krusei* CCMA 1316; *Meyerozyma caribicca*
 410 CCMA 1294; *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0159; CCMA 1299; CCMA 1302; CCMA
 411 1306; CCMA 1313 e CCMA 1317); *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 1300 and CCMA
 412 1303 and *Rhodotorula mucilaginosa* CCMA 1305 all showed fungistatic effect on *A.*
 413 *carbonarius* CCDCA 10608 and *A. ochraceus* CCDCA10612; because the fungi grew and
 414 esporularam, similar to the control, when they were transferred from the split plate for a new
 415 card containing means of MEA.

416

417 **Evaluation of the production of volatile organic compounds (VOCs) by HS-SPME**

418

419 Volatile compounds were detected 58 different, being alcohols (8); esters (22); ketones
 420 (5); aromatic (2); (4) acids, aldehydes (4); furan (1) and other compounds (13). Alcohols,
 421 esters and aromatic compound styrene were detected in most samples evaluated. Tooth the

422 compounds found some are already reported as antifungal function as the alcohols (2-methyl-
423 1-butanol; 3-methyl-1-butanol), the esters (1-butanol, 3-methyl-, acetate and ethyl octanoate)
424 and 2-nonanone belonging to the group of ketones.

425

426 Production of β -1,3-glucanase

427

428 In relation to the activity of β -1,3-glucanase using as a source of carbon the CWP of *A.*
429 *carbonarius* CCDCA 10608 the higher activity was detected in the extract of *S. cerevisiae*
430 CCMA 1302, with 120 hours (0.325 μg of glucose/min.); followed by *S. cerevisiae* CCMA
431 1299, with higher production at 96 h (0.238 μg of glucose/min). When they were grown these
432 yeasts using as CWP of *A. ochraceus* CCDCA10612, in the midst of ynb, with the strain *S.*
433 *cerevisiae* CCMA 1299 and *S. cerevisiae* CCMA 1302, the largest production was
434 respectively, μg of glucose/min., 0.263 and 0.186. For the isolate *S. cerevisiae* CCMA 0159,
435 24 and 48 h the activity of β -1,3-glucanase was 0.157 (μg of glucose/min).

436

437 Effect of cell-free supernatants on the growth of fungi of the genus *Aspergillus* 438 *ocratoxigênicos*

439

440 In all tests, the fungal isolates showed growth equal to control evidencing the absence
441 of extracellular metabolites with inhibitory effect.

442

443 Analysis of OTA in grains and coffee husk

444

445 The parameters obtained for the curve were $R^2 = 0.9974$ and Slope = - 0,9662. In the
446 detection of OTA in the samples of grains and coffee husk (Table 4), it was possible to
447 quantify the concentration of OTA. The highest concentration (10.11 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) was detected in
448 the control sample of coffee beans with 15 days of processing.

449

450 **Table 4.** Mean values of OTA ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) detected in samples of grains of cafes without inoculation
451 (control) and inoculated with fungi; fungi and yeasts; yeasts, in experiments in semi-pilot scale and
452 pilot.

453

Sample	Scale	The coffee beans		The coffee husk	
		Time of collection			
		0 Days	15 Days	0 Days	15 Days
Control	Semi -pilot	ND	10.11	-	-
	Pilot	ND	0.56	ND	0.04
<i>A. ochraceus</i> CCDCA 10612	Semi -pilot	ND	4.23	-	-
<i>A. carbonarius</i> CCDCA 10608	Semi -pilot	ND	ND	-	-
	Pilot	1.37	0.80	-	ND
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0159	Pilot	0.10	ND	ND	-
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1302	Pilot	ND	1.04		
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1302	Semi -pilot	0.13	0.12	-	-
<i>A. carbonarius</i> CCDCA 10608	Pilot	0.08	0.4	-	0.3
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1302	Semi -pilot	ND	0.76	-	-
<i>A. ochraceus</i> CCDCA10612		ND	0.76	-	-
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0159	Semi -pilot	ND	ND	-	-
<i>A. carbonarius</i> CCDCA 10608	Pilot	0.48	1.2	ND	ND
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0159	Semi -pilot	ND	0.33	-	-
<i>A. ochraceus</i> CCDCA10612		ND	0.33	-	-

454 ND – no detectable quantities of ochratoxin A (OTA); - = was not performed the test of OTA.

455 In relation to the coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus* CCDCA 10612,
 456 the concentration of OTA detected was 4.23 µg/Kg. *A. ochraceus* CCDCA 10612 showed a
 457 reduction of OTA, at the end of 15 days of processing, in semi-pilot scale (1Kg of fruits of
 458 coffees), when co-cultivated with the strains of *S. cerevisiae* CCMA 0159 (0.76µg/Kg) and *S.*
 459 *cerevisiae* CCMA 1302 (0.33µg/Kg) compared to the control (4.23µg/Kg). Showing the
 460 control of OTA in *A. ochraceus* CCDCA 10612. *A. carbonarius* CCDCA 10608 showed a
 461 reduction of OTA, at the end of 15 days of processing, on a pilot scale (10Kg of fruits of
 462 coffees), when co-cultivated with the strain of *S. cerevisiae* CCMA 1302 (0.33µg/Kg)
 463 compared to the control (0.80µg/Kg).

464 In relation to samples of coffee husk, only sample and control sample with inoculation
 465 of *S. cerevisiae* CCMA 1302 and *A. carbonarius* CCDCA 10608 was detected the production
 466 of OTA, but less than 0.5 µg/Kg. The concentrations of OTA when detected showed higher
 467 values in the coffee beans than in samples of bark.

468

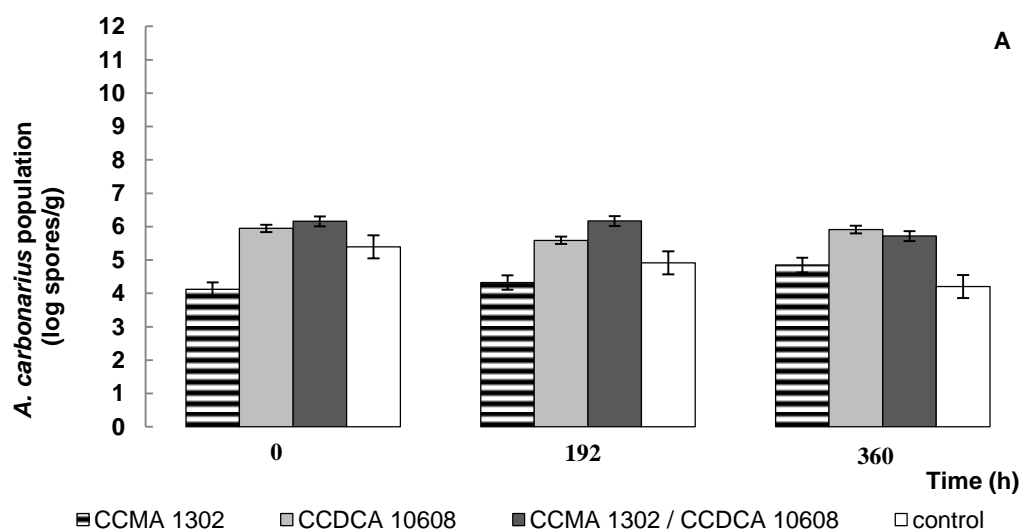
469 qPCR samples of coffees

470

471 Fermentation of cafes inoculated with yeast and fungi ocratoxigênicos, on a pilot scale
 472 (10 kg of fruits of coffees) were evaluated. The fermentation without inoculation were used as
 473 control to valiar the presence of microorganisms from the field. The other treatments were
 474 inoculated with *S. cerevisiae* CCMA 1302, *A. carbonarius* CCDCA 10608 and the co-
 475 cultivation of both. The dynamic behavior of the population of the filamentous fungus
 476 ocratoxigênico and *Saccharomyces* during alcoholic fermentation via drought of cafes was
 477 monitored by qPCR, and both showed different behaviors during the 360 hours of
 478 fermentation, as can be observed in Figure 3 A and 3B (Table S2).

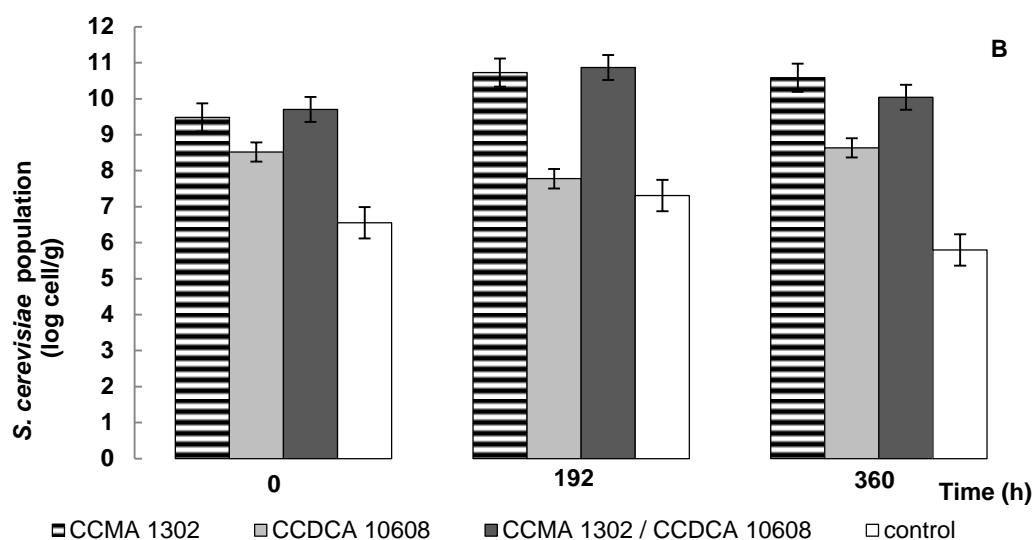
479 In relation to the standard curve of qPCR, for *S. cerevisiae* CCMA 1302, the
 480 parameters obtained were $R^2 = 0.996$, slope = - 3.349 and efficiency = 99%, and detection
 481 limit of 4log cells/g. In relation to the standard curve of *A. carbonarius* CCDCA 10608, the
 482 parameters were $R^2 = 0.995$, slope = - 3.317 and efficiency = 100%, and detection limit of
 483 5log spores/g.

484



485

486



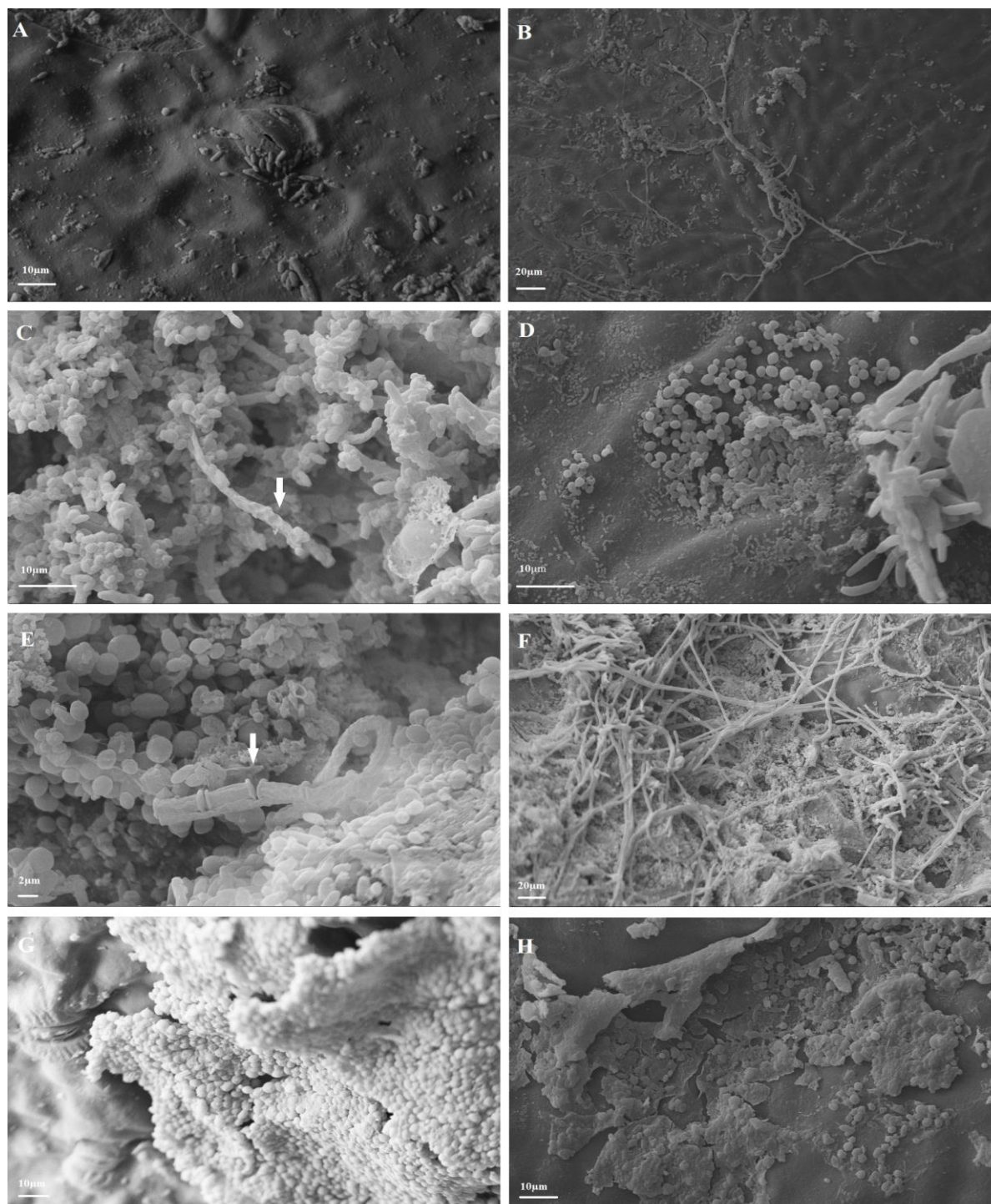
487
488
489 **Figure 3.** Dynamic behavior of *Aspergillus carbonarius* CCDCA 10608 (A) and *Saccharomyces*
490 *cerevisiae* CCMA 1302 (B) species evaluated by qPCR during 360 h of fermentation and drying of
491 fruits of cafes. The treatments are coffees inoculated: *S. cerevisiae* CCMA 1302 (▨); *A. carbonarius*
492 CCDCA 10608 (▩); co-inoculação - *S. cerevisiae* CCMA 1302 and *A. carbonarius* CCDCA 10608
493 (▤); control- without inoculation of the isolates studied (▫). The error bars represent the standard
494 deviation of the mean in relation to the log of spores/g (A) and log of cells/g (B).

495
496 The largest population of ocratoxigêncio fungus was detected at zero and 192 h (6.16
497 log spores/g), where there was a co-inoculation. The lowest detection was 4.11 log of spores/g
498 in the treatment inoculated with *S. cerevisiae*, at time zero (Figure 3A). In relation to the
499 population of *Saccharomyces* (Figure 3B), the largest population (10.87 log cells/g) was the
500 192 h, the treatment where there was the co-inoculation and the lowest (5.8 log cells/g) in
501 control, the 360 h. There was a decrease in the population of *A. carbonarius* (0.5 log spores/g)
502 in the presence of *S. cerevisiae* CCMA 1302, if compared with the beginning and end of the
503 processing.

504 505 Scanning Electron Microscopy (SEM)

506
507 In the eletromicrografia the shells of coffee beans, where there was inoculated none of
508 the microorganisms evaluated were detected microbial cells (Figure 4A). The growth of *A.*
509 *carbonarius* was observed even in the presence of the yeast inoculated. However, it is
510 possible to observe contact that can result in competition for space and nutrients (Figure 4C).
511 Several microbial cells were present in the bark of coffee showing a diversity of bacteria,
512 yeasts and fungi (Figure 4D). In Figure 4, and it is possible to observe the moment in what is
513 happening to the fragmentation of the Hypha, which may be a form of reproduction by
514 fragmentation. In figures 4G and 4H it is possible to observe the formation of a biofilm by *S.*
515 *cerevisiae* and his detachment from the bark of the fruit, with 15 days of processing,
516 presenting 11-12% moisture.

517



518
519

520 **Figure 4.** Eletromicrografias obtained from samples of carbonized cafes by SEM. The photos relate to
521 samples where there was co-inoculation, except in control. He was appointed the treatment, time of
522 collection, extension, scale of the experiment and evaluated. (A) Control, 2 days, laboratory, 700X,
523 external. (B) *S.cerevisiae* CCMA 1302 and *A. carbonarius*, 2 days 700X, pilot, external. (C) *S.*
524 *cerevisiae* CCMA 0159 and *A. carbonarius*, 2 days, pilot, 3000X, external. Where had yeast cells
525 adhered to the hypha (arrow). (D) *S. cerevisiae* CCMA 1302 and *A. carbonarius*, 2 days, 5000X, pilot,
526 external. (E) *S. cerevisiae* CCMA 1302 and *A. carbonarius*, 10 days, 5000X, pilot, internal market.
527 Fragmentation of the hypha (arrow). (F) *S. cerevisiae* CCMA0159 and *A. carbonarius*, 2 days 700X,
528 pilot, external. (G) *S. cerevisiae* CCMA 0159 and *A. ochraceus*, 10 days, 700X, laboratory. (H) *S.*
529 *cerevisiae* CCMA 1302 and *A. carbonarius*, 15 days, 2000X, pilot, external.

4. Discussion

It is still often the use of fungicides sintéticos, as one of the ways to control diseases caused by fungi of post-harvest in various fruits (Zhao *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2014), thus the use of yeasts would be an alternative to replace or reduce the use of chemicals in vegetables and fruits, in the control of postharvest fungal diseases (Liu *et al.*, 2013; Nally *et al.*, 2013; Spadaro *et al.*, 2013). In this way, the research by yeasts, aiming the biocontrol fungi ocratoxigênicos and avoid a possible production of OTA, in cafes and grapes, consists in a search for the scientific world and society, since it is an alternative to minimize the use of synthetic fungicides.

It is common for the toxigenic fungi are in the environment of the cultivation of coffee, in steps of preparation and storage of food (Batista *et al.*, 2003), this demonstrates that the control of these fungi, in the direction of prevention, often becomes difficult. Yeasts are microorganisms that may present mechanisms of biocontrol. Naturally in fruits of coffee is common the presence of epiphytic yeasts of the genus *Saccharomyces* (Bleve *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2013). The yeasts have been extensively studied by presenting characteristics that make it suitable to be used as agents of biological control (CBAs) in fruits (Liu *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2004). Various modes of actions used by CBA were reported by Spadaro and Droby (2016). However, studies about the forms of biocontrol both *in vitro* and *in vivo* are important in search of new CBA, aiming to reduce the use of synthetic fungicides applied in stages of pre and post-harvest of various fruits.

In this study, our main objectives were to evaluate the *in vitro* test the possible mechanisms that yeasts of the genus *Candida*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Wickerhamomyces*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces* may present and be related to the biocontrol, in addition to those described by Souza *et al.* (2017). It was evaluated in *in vivo* tests, the ability of biocontrol of strains of *S. cerevisiae* forward to ocratoxigênicos fungi, *A. carbonarius* and *A. ochraceus*, in relation to the persistence of these fungi and the production of OTA in fruits of cafes Catuaí Vermelho, during the stage of fermentation by drought.

The production of protein killer in the tests was detected for *W. anomalus* (four strains) and *S. cerevisiae* (7 strains). The majority of killer toxins are stable and active at pH values of 3-5.5 (Santos and Marquina, 2002). Different genres, such as *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* and *Wickerhamomyces* (Banjara *et al.*, 2016; Belda *et al.*, 2017; Criseo *et al.*, 1999; Grzegorzczuk *et al.*, 2017; Perez *et al.*, 2016; Platania *et al.*, 2012) have been reported as producing killer. However, *Candida*, *Meyerozyma*, *Pichia* and *Rhodotorula* had negative results, probably due to the pH used or these are not producing strains of this protein, in relations yeasts sensible defaults are used.

The antifungal proteins, such as killer and glucanases have been reported in studies of biocontrol due to mechanisms of action are known (Lima *et al.*, 2013; Platania *et al.*, 2012). This work was the production of β -1,3-glucanase by strains of *Saccharomyces*, using the CWP of *A. carbonarius* and *A. ochraceus*. Zhao *et al.* (2008) observed antagonism of *P. guilliermondii* front of the *Rhizopus nigricans*, in tomatoes during storage, due to the production of β -glucanases. Heling *et al.* (2015) applied *Saccharomyces boulardii*, *S.cerevisiae* and *Bacillus cereus* in strawberry, aiming at the control of *Mycosphaerella fragariae*. The isolated *S. cerevisiae* and *B. cereus* had results that were statistically similar to the results with synthetic fungicide. Haïssam (2011) observed the production of exo- β -1,3-glucanases by *P. anomala* (strain K) against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* in apples.

Another mechanism is the production of compounds excreted in the middle and detected by *cell-free*. In this study all fungal isolates grew, so according to the methodology

579 used, no antimicrobial action compared to *A. carbonarius* and *A. ochraceus*. Thus this is not
580 one of the biocontrol mechanisms of these strains of yeasts. Zhao *et al.* (2008), in the analysis
581 of the action of *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* in tomato, observed that the
582 culture supernatant of yeast filtered and autoclaved, did not interfere with the growth of the
583 fungus evaluated, indicating that the control is necessary for the action of the living cells of
584 yeast, and the competition mechanism responsible for the antagonism.

585 Núñez *et al.* (2015) observed that the 280 isolates of *Debaryomyces hansenii*
586 evaluated, 21 presented a reduction in the growth of *Penicillium verrucosum* (10-80%),
587 through the production of antifungal volatile compounds. In other *in vitro* tests of co-
588 cultivation, conducted by Souza *et al.* (2017), the yeasts were evaluated in direct contact with
589 the fungi in the culture medium, and the best results of inhibition of mycelial growth were
590 observed for *Aspergillus ochraceus*. Hua *et al.* (2014) observed that *Pichia anomala* WRL-
591 076 affect spore germination, growth and the role of genes that participate in the biosíntesis
592 of aflatoxin, *Aspergillus flavus*, due to the volatile compound 2-phenyl-ethanol. Ando *et al.*
593 (2012) observed that isoamyl acetate and isoamyl alcohol produced by *Candida maltosa* NP9
594 were able to inhibit the sporulation of fungi of the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*,
595 *Mucor*, *Botryotinia* and *Fusarium*.

596 This form of action of VOC could be one of the possible explanations, in relation to
597 the antagonism and decrease in the production of spores (Figure 2) *A. carbonarius* when co-
598 cultivated with *P. kluyveri* CCMA 0166 and the absence of spores in the presence of *S.*
599 *cerevisiae* CCMA 1306. Compounds belonging to the group of alcohol (ethanol; 2-methyl-1-
600 butanol; 3-methyl-1-butanol; phenylethyl alcohol); esters (1-butanol, 3-methyl-, ethyl acetate;
601 Octanoate) and ketone (2-nonanone), may be involved in the biocontrol fungi *in vitro* of *A.*
602 *carbonarius* and *A. ochraceus*.

603 There are reports of *S.cerevisiae* with capacity to produce VOCs that act in the control
604 of different fungi. Rezende *et al.* (2015) observed a total inhibition of *Colletotrichum*
605 *gloeosporioides* and *C. acutatum*, per 3-methyl-1-butanol and 2-methyl-1-butanol. Fialho *et*
606 *al.* (2011) evaluated the potential of a mixture of vocs produced by *S.cerevisiae*, formed by
607 alcohol (ethanol; 3-methyl 1-butanol; 2-methyl 1-butanol and feniletilalcohol) and esters (ethyl
608 acetate and ethyl octanoate) in the proportions found in the atmosphere naturally produced by
609 the yeast (Fialho *et al.*, 2010), against *Sclerotinia sclerotiorum in vitro*. The compounds 2-
610 methyl 1-butanol and 3-methyl 1-butanol were the most active, with complete inhibition of
611 mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum*, followed by ethyl acetate.

612 Toffano *et al.* (2017) demonstrated that the biological fumigation with *S.cerevisiae* or
613 fumigation with 3-methyl-1-butanol are promising alternatives to prevent the expression of
614 symptoms of citrus black spots, caused by *Phyllosticta citricarpa* in orange fruits, during
615 storage and shipment. In our analyzes, *in vitro*, *S. cerevisiae* CCMA 1306 (100%) inhibited
616 the spore production of *A. carbonarius* (Figure 2C), probably the inhibition is related to the
617 production of vocs, such as ethanol, ethyl acetate, 3-methyl-1-butanol and 2-methyl-1-
618 butanol. Parafati *et al.* (2015) evaluated different strains of *S. cerevisiae*, *W. anomalus*,
619 *Metschnikowia pulcherrima* and *Aureobasidium pullulans* and reported that VOC inhibited
620 *Botrytis cinerea in vitro* and reduced the presence of the fungus in grapes artificially
621 inoculated with the pathogen. The VOC can be related beyond the antagonist action with
622 several flavors in coffee and chocolate, pink, floral, vanilla, fruit, citrus (Illy, 2002).

623 The yeasts inoculated in the cafe were able to develop in the fruits with the formation
624 of a biofilm on coffee husk. In addition, through the MEV was not observed the presence of
625 spores in none of the samples. Thus, possibly the decrease of OTA in some of the treatments
626 may be due to this biocontrol. A reduction in the production of spores is a relevant factor,
627 because in addition they are structures that produce and accumulate toxins are agents of

628 dispersal of species (Guzmán-Peña de Herrera, 1997). The yeasts may have competed for
629 space and nutrients, interfering in the production of the toxin in some of the treatments, and
630 these results confirmed with analysis and quantification of OTA by ELISA.

631 Some studies show, through pictures obtained from SEM, yeasts with positive
632 performances as biocontroladoras. *Debaryomyces hansenii* BCS003 was an antagonist against
633 *Mucor circinelloides* and *Fusarium subglutinans* in maize grains, by competition for space
634 and nutrients, production of volatile compound or compounds soluble extracellular (Medina-
635 córdova *et al.*, 2016). *Pichia membranaefaciens* in combination with chitosan managed to
636 *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose on citrus fruits (Zhou *et al.*, 2016).
637 *P.anomala* and *P.kluyveri*, inhibited the production of OTA by *A.ochraceus* in malt extract
638 agar and agar coffee (Masoud *et al.*, 2005).

639 The application of *Pichia fermentans* LPBYB13, in coffee cherries, in laboratory
640 scale, artificially contaminated with *A. westerdijkiae* showed efficacy in reducing the OTA
641 Up to 88% (Pereira *et al.*, 2015). We observed that OTA was controlled in the fruits of coffee,
642 in semi-pilot scale, co-inoculated with *A. ochraceus* and *S. cerevisiae*, however *S. cerevisiae*
643 CCMA 1302 (0.33 µg/Kg) more efficient in the reduction of *S. cerevisiae* CCMA0159 (0.76
644 µg/Kg). Despite having been detected OTA in coffee, including the control of *A. ochraceus*
645 (4.23 µg/Kg), does not represent a risk to human health, as they would be within the tolerable
646 limit (10 µg/Kg) (ANVISA, 2011). Corroborating the data obtained in this study,
647 Velmourougane *et al.* (2011) applied yeast *S. cerevisiae* (commercial) during the processing
648 of coffees to assess the control of the species *A. niger* and *A. ochraceus* and reported a
649 reduction in the incidence of fungi and the contamination by OTA. In cases where there was
650 an increase in the production of toxin can be justified by the extresse caused by competition
651 among microorganisms, as occurred in the co-cultivation with *S. cerevisiae* CCMA 0159 (1.2
652 µg/Kg) if compared to control *A. carbonarius* (0.8 µg/Kg).

653 The technique of qPCR is used to monitor the behavior of starting cultures inoculated
654 in fermentative process of cocoa and coffee shops (Evangelista *et al.*, 2014; Martinez *et al.*,
655 2017; Menezes *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2017) and to evaluate *A. carbonarius* in grapes and
656 wines (Digtã *et al.*, 2016; González-Salgado *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2011) in
657 addition to being able to correlate DNA of *A. carbonarius* with contents of OTA (Atoui *et al.*,
658 2007; Mulè *et al.*, 2006).

659 Through the qPCR observes that *S. cerevisiae* and *A. carbonarius*, are part of the
660 natural microflora of coffee, because they were detected in the control and came from the
661 field, the harvesting stage or stage of fermentation and processing via drought in the terreiro.
662 We observed a decrease in the population of *A. carbonarius* (0.5log spores/g) in the presence
663 of *S.cerevisiae* CCMA 1302, if compared with the beginning and end of the processing. The
664 amount of OTA in samples of coffee beans co-cultivation *A. carbonarius* and *S. cerevisiae*
665 CCMA1302 (0.4 µg/Kg) was lower than in the control group *A. carbonarius* (0.80 µg/Kg).
666 Similar results were presented by Atoui *et al.* (2007) which drew a couple of specific primers
667 to monitor and quantify *A. carbonarius* in samples of grapes and obtained a positive
668 correlation between the DNA content of fungus and the concentration of OTA in samples of
669 grapes.

670 In natural coffee generally, the population of yeasts has its predominance when there
671 is a reduction of the water activity (a_w 0.6) during the drying period. The yeasts present may
672 be related to the fermentation process and with the control of the growth of filamentous fungi
673 (Schwan *et al.*, 2012). Through the qPCR it was possible to observe a predominance of *S.*
674 *cerevisiae* CCMA 1302 (log 10 cells/g) in both cafes inoculated with these strains as in co-
675 inoculated *S. cerevisiae* CCMA 1302 and *A. carbonarius* CCDCA 10608.

676 The positive results in relation to the production of toxin *killer*, β -1-3glucanase,
677 VOCs, lesser presence of OTA in coffee beans inoculated with *S. cerevisiae* CCMA 1302,
678 favor this isolated. Thus, *S. cerevisiae* CCMA 1302 is a strong candidate as a biocontrol
679 agent. In addition, *Saccharomyces cerevisiae* is classified by the U.S. Agency for Medicines
680 and food products (Food and Drug Administration (FDA, 2018) as being safe (Generally
681 Recognised The Safe - GRAS). Thus, cafés inoculated with *S. cerevisiae* for biocontrol of
682 ocratoxigênicos fungi have a greater acceptability of the population and the market.

683 Until the moment in the literature in relation to the implementation of yeasts in
684 coffees, on a pilot scale was published the work of Velmourougane *et al.* (2011) using a
685 commercial yeast *S. cerevisiae*, with characteristic antagonist in relation to *A. ochraceus*,
686 applied at 100 Kg of coffees. This work would be the first to report the application of *S.*
687 *cerevisiae*, using an autochthonous yeast isolated from coffee, and biocontrol capacity for *A.*
688 *ochraceus* and *A. carbonarius*, in relation to the production of OTA. This is the first time that
689 qPCR was used to evaluate the behavior of the population of *S. cerevisiae* as the two last
690 agent of *A. carbonarius*, during coffee processing by dry, under natural conditions.

691

692 **5. Conclusions**

693

694 The results of this study highlights the potential application of the strain of *S.*
695 *cerevisiae* CCMA 1302, a yeast autoctone isolated from coffee, as a possible biological
696 control agent for post-harvest protection of coffee fruits, aiming to reduce the production of
697 OTA by fungi of the genus *Aspergillus*, especially *A. ochraceus*, in addition to being able to
698 control *A. carbonarius*. This work presents a differential due to *in vivo* tests, in "pilot scale",
699 since the vast majority of work perform the tests in laboratory scales and *in vitro*. In addition
700 to having used the technique of qPCR to evaluate *Aspergillus carbonarius* in fruits of coffees,
701 aiming a biocontrol.

702

703 **Acknowledgments**

704

705 The authors thank the Brazilian agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
706 Nível Superior (CAPES), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
707 Tecnológico (CNPq), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
708 (FAPEMIG). Dr. Fabiana Reines Franca Passamani by help in analyzes of OTA. The
709 Department of Microbiology of the Institute of Biological Sciences, Federal University of
710 Minas Gerais (ICB-UFMG) for the donation of the isolates sensitive standard used in the test
711 killer. The collection of cultures of Agricultural Microbiology (CCMA) and the collection of
712 culture of microorganisms from the Department of Food Sciences (CCDCA) by providing,
713 respectively, of the strains of yeasts and fungi isolates of ocratoxigênicos. We are also
714 grateful to Prof. Dr. Gladyston Rodrigues Carvalho (EPAMIG - UFLA), farm Ouro Verde
715 and Dr. Susaza Evangelista Reis, farm Resfriado, both farms in the municipality of Lavras,
716 Minas Gerais, the donation of samples of coffees.

717

718

719

720

721

722

723

724

725

726 **References**

- 727
- 728 Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). Resolução RDC n. 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe
729 sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em Alimentos. Brasília, 2011. Disponível em:
730 <http://www.anvisa.gov.br>
- 731
- 732 Alves, E. and Perina, F.J. Apostila do curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura e microanálise de
733 raios-X. UFLA/FAEPE, Lavras, 2012, 63p.
- 734
- 735 Ando, H., Hatanaka, K., Ohata, I., Yamashita-Kitaguchi, Y., Kurata, A. and Kishimoto, N., 2012. Antifungal
736 activities of volatile substances generated by yeast isolated from Iranian commercial cheese. *Food Control* 26:
737 472-478.
- 738
- 739 Atoui, A., Mathieu, F. and Lebrihi, A., 2007. Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius*
740 quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR, *International Journal of Food*
741 *Microbiology* 115: 313–318.
- 742
- 743 Banjara, N., Nickerson, K. W., Suhr, M. J. and Hallen-Adams, H. E., 2016. Killer toxin from several food-
744 derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeasts. *International journal of*
745 *food microbiology* 222: 23-29.
- 746
- 747 Batista, L.R., Chalfoun, S.M., Silva, C.F., Cirillo, M., Varga, E.A. and Schwan, R.F., 2009. Ochratoxin A in
748 coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and 883 wet methods. *Food Control* 20: 784- 790.
- 749
- 750 Batista, L. R., Chalfoun, S.M., Prado, G., Schwan, R.F. and Wheals, A.E., 2003. Toxigenic fungi associated with
751 processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *International Journal of Food Microbiology* 85:293-300.
- 752
- 753 Batista, L. R. and Chalfoun, S. M., 2007. Incidência de ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea*
754 *arábica* L.): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. *Ciência e*
755 *Agrotecnologia* 31: 804-813
- 756
- 757 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Companhia Nacional de Abastecimento.
758 Acompanhamento da safra brasileira de café: v. 4, n. 1- safra 2017 – Brasília: Conab, primeiro levantamento -
759 Brasília, p.1-98, jan.2017. Disponível em:
760 http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/levantamento/conab_safra2017_n1.pdf
- 761
- 762 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Companhia Nacional de Abastecimento.
763 Acompanhamento da safra brasileira de café: v.5, n.1 – safra 2018- Brasília: Conab, primeiro levantamento –
764 Brasília, p. 1-73, jan.2018. Disponível em:
765 http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/levantamento/conab_safra2018_n1.pdf
- 766
- 767 Belda, I., Ruiz, J., Alonso, A., Marquina, D. and Santos, A., 2017. The Biology of *Pichia membranifaciens*
768 Killer Toxins. *Toxins* 9: 112.
- 769
- 770 Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., and Visconti, A., 2006. Isolation of epiphytic yeasts with potential
771 for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A.niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology*
772 108 : 204-209.
- 773
- 774 Chiotta, M. L., Ponsone, M.L., Combina, M., Torres, A.M. and Chulze, S. N., 2009. *Aspergillus* section *Nigri*
775 species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. *International Journal of Food*
776 *Microbiology* 136:137-141.
- 777
- 778 Commission Regulation (EU), 2010. No. 105/2010 of 5 February 2010 amending Regulation (EC) No.
779 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A. *Official*
780 *Journal of the European Union*, L35, pp. 7–8.
- 781
- 782 Criseo, G., Gallo, M. and Pernice, A., 1999. Killer activity at different pHs against *Cryptococcus neoformans*
783 var. *neoformans* serotype A by environmental yeast isolates. *Mycoses* 42:601-608.
- 784

- 785 Culliao, A. G. L. and Barcelo, J. M., 2015. Fungal and mycotoxin contamination of coffee beans in Benguet
786 province, Philippines. *Food Additives and Contaminants: Part A* 32 : 250-260
787
- 788 Diaz, C., Molina, A. M., Nahrung, J. and Fischer, R., 2013. Characterization and Dynamic Behavior of Wild
789 Yeast during Spontaneous Wine Fermentation in Steel Tanks and Amphorae. *BioMed Research International*,
790 1- 13 540:465.
791
- 792 Digutã, C. F., Calina, F.M and Cornea, P. A., 2016. Rapid detection of *Aspergillus carbonarius* in Romanian
793 vineyards. *Romanian Biotechnological Letters* 21: 11875-11880.
794 Duarte, S. C.; Pena, A. and Lino, C. M., 2010. Review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of
795 cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology* 27: 187-198
796
- 797 Duarte, W. F.; Amorim, J. C. and Schwan, R. F., 2013. The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeasts
798 with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. *Antonie van Leeuwenhoek* 103:
799 175-194.
800
- 801 Evangelista, S. R., Silva, C. F., Miguel, M. G. C. P., Cordeiro, C. S., Pinheiro, A. C. M., Duarte, W. F. and
802 Schwan, R. F., 2014. Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the
803 fermentation in dry process. *Food Research International* 61:183-195.
804
- 805 Ferreira, D. F., 2014. Sisvar: A guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e*
806 *Agrotecnologia* 38: 109–112
807
- 808 Ferreira, G. F. P., Novaes, Q. S.N., Batista, L.B., Souza, S.E., Azevedo, G. B. and Silva, D. M., 2011. Fungos
809 associados a grãos de café (*Coffea arabica* L.) beneficiados no sudoeste da Bahia. *Summa Phytopathologica*
810 37: 98-102.
811
- 812 Fialho, M.B., Toffano, L., Pedroso, M.P., Augusto, F. and Pascholati, S.F., 2010. Volatile organic compounds
813 produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the *in vitro* development of *Guignardia citricarpa*, the causal
814 agent of citrus black spot. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:925-932.
815
- 816 Fialho, M. B., Moraes, M. H. D., Tremocoldi, A. R., and Pascholati, S. F., 2011. Potential of antimicrobial
817 volatile organic compounds to control *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*
818 46: 137-142.
819
- 820 Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2004. Prevention and reduction of food and
821 feed contamination. Rome: World Health Organization.
822
- 823 Food and Drug Administration (FDA). Microorganisms and Microbial-Derived Ingredients Used in Food
824 (Partial List). Disponível em:
825 [https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/MicroorganismsMicrobialDerivedIngredients](https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/MicroorganismsMicrobialDerivedIngredients/default.htm)
826 [/default.htm](https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/MicroorganismsMicrobialDerivedIngredients/default.htm)
827
- 828 Gil-Serna, J., Vázquez, C., Sardiñas, N., González-Jaén, M. T. and Patiño, B., 2009. Discrimination of the main
829 Ochratoxin A-producing species in *Aspergillus* section *Circumdati* by specific PCR assays. *International*
830 *journal of food microbiology* 136: 83-87.
831
- 832 González-Salgado, A., Patino, B., Gil-Serna, J., Vazquez, C. and Gonzalez-Jaen, M.T., 2009. Specific detection
833 of *Aspergillus carbonarius* by SYBRsGreen and TaqMans quantitative PCR assays based on the multicopy
834 ITS2 region of the rRNA gene. *FEMS Microbiol Lett* 295:57–66.
835
- 836 Guzmán-de-Peña, D. and Ruiz-Herrera, J., 1997. Relationship between aflatoxin biosynthesis and sporulation in
837 *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genetics Biology*, 21: 198-205
838
- 839 Grzegorzczak, M., Żarowska, B., Restuccia, C. and Cirvilleri, G., 2017. Postharvest biocontrol ability of *killer*
840 yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food microbiology* 61: 93-101.
841
- 842 Haïssam, J. M., 2011. *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research and practical
843 applications. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99: 93-105.

- 844 Heling, A. L., Kuhn, O. J. and Stangarlin, J. R., 2015. Controle biológico de *Mycosphaerella fragariae* na
845 cultura do morangueiro. *Scientia Agraria Paranaensis* 14: 221-228.
846
- 847 Hua, S. S. T., Beck, J. J., Sarreal, S. B. L., and Gee, W., 2014. The major volatile compound 2-phenylethanol
848 from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of
849 *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin research* 30:71-78.
850
- 851 Illy, E. 2002. The complexity of coffee. *Scientific American*, pp.72-77.
852
- 853 Leong, S. L., Hien, L. T., An, T. V., Trang, N. T., Hocking, A.D. and Scott, E. S., 2007. Ochratoxin A
854 production Aspergilli in vietnamese green coffee beans. *Letters in Applied Microbiology* 45:301-306.
855
- 856 Lima, J. R., Gonçalves, L. R. B., Brandão, L. R., Rosa, C. A. and Viana, F. M. P., 2013. Isolation, identification,
857 and activity in vitro of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits.
858 *Journal of basic microbiology* 5: 590-599.
859
- 860 Lima, J.R., Gondim, D.M.F., Oliveira, J.T.A., Oliveira, F.S.A., Gonçalves, L.R.B. and Viana, F.M.P., 2013. Use
861 of *killer* yeasts in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biology and Technology*
862 83:58-64.
863
- 864 Liu, G.L., Chi, Z., Wang, G. Y., Wang, Z.P., Li, Y. and Chi, Z. M., 2015. Yeast *killer* toxins, molecular
865 mechanisms of their action and their applications. *Critical reviews in biotechnology* 35 : 222-234.
866
- 867 Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S. and Liu, Y., 2013. Review: utilization of antagonistic yeasts to
868 manage postharvest fungal diseases of fruit. *International journal of food microbiology* 167:153-160.
869
- 870 Martinez, S. J., Bressani, A.P.P., Miguel, M.G.D.C.P., Dias, D.R. and Schwan, R.F., 2017. Different inoculation
871 methods for semi-dry processed coffee using yeasts as starter cultures. *Food Research International* 102:333-
872 340.
873
- 874 Masoud, W.; Poll, L. and Jakobsen, M., 2005. Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant
875 during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by
876 *Aspergillus ochraceus*. *Yeast* 22:1133-1142.
877
- 878 Medina-Córdova, N., López-Aguilar, R., Ascencio, F., Castellanos, T., Campa-Córdova, A. I. and Angulo, C.,
879 2016. Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its
880 ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays L.*). *Biological Control* 97: 70-79.
881
- 882 Menezes, A. G. T., Batista, N. N., Ramos, C. L., Silva, A. R. D. A., Efraim, P., Pinheiro, A. C. M. and Schwan,
883 R. F., 2016. Investigation of chocolate produced from four different Brazilian varieties of cocoa (*Theobroma*
884 *cacao L.*) inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Research International* 81:83-90.
885
- 886 Mulè, G., Susca, A., Logrieco, A., Stea, G. and Visconti, A., 2006. Development of a quantitative real-time PCR
887 assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *International Journal of Food Microbiology* 111:
888 28-34.
889
- 890 Nally, M.C., Pesce, V.M., Maturano, Y.P., Toro, M.E., Combina, M., Castellanos de Figueroa, L.I. and Vazquez,
891 F., 2013. Biocontrol of fungi isolated from sour rot infected table grapes by *Saccharomyces* and other yeast
892 species. *Postharvest Biology and Technology* 86 :456-462.
893
- 894 Núñez, F., Lara, M.S., Peromingo, B., Delgado, J., Sánchez-Montero, L. and Andrade, M.J., 2015. Selection and
895 evaluation of *Debaryomyces hansenii* isolates as potential bioprotective agents against toxigenic *penicillia* in
896 dry-fermented sausages. *Food microbiology* 46: 114-120.
897
- 898 Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C. and Cirvilleri, G., 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-
899 isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing postharvest bunch rot of table grape. *Food Microbiol* 47:
900 85-92.
901

- 902 Paterson, R. R. M.; Lima, N. and Taniwaki, M. H., 2014. Coffee, mycotoxins and climate change. *Food research*
903 *international* 61:1-15.
904
- 905 Pereira, G. V. M., Beux, M., Pagnoncelli, M. G., Soccol, V.T., Rodrigues, C. and Soccol, C.R. 2015. Isolation,
906 selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungus
907 *Aspergillus westerdijkiae* on coffee beans. *Letters in Applied Microbiology* 62: 96-10.
908
- 909 Perez, M.F., Contreras, L., Garnica, N.M., Fernández-Zenoff, M.V., Farías, M.E., Sepulveda, M., Ramallo, J.
910 and Dib, J. R., 2016. Native *Killer* Yeasts as Biocontrol Agents of Postharvest Fungal Diseases in Lemons.
911 PLoS ONE. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165590>.
912
- 913 Platania, C., Restuccia, C., Muccilli, S. and Cirvilleri, G., 2012. Efficacy of killer yeasts in the biological control
914 of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). *Food microbiology* 30:219-225.
915
- 916 Rezende, E. F., Borges, J.G., Cirilo, M., Prado, G., Paiva, L. C. and Batista, L. R., 2013. Ochratoxigenic fungi
917 associated with green coffee beans (*Coffea arabica* L.) in conventional and organic cultivation in Brazil.
918 *Brazilian Journal of Microbiology* 44: 377-384.
919
- 920 Rezende, D.C., Fialho, M.B., Brand, S.C., Blumer, S. and Pascholati, S.F., 2015. Antimicrobial activity of
921 volatile organic compounds and their effect on lipid peroxidation and electrolyte loss in *Colletotrichum*
922 *gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum* mycelia. *African Journal of Microbiology Research* 9:1527-
923 1535.
924
- 925 Ribeiro, L.S., Miguel, M.G., Evangelista, S.R., Martins, P.M., van Mullem, J., Belizario, M.H. and Schwan,
926 R.F., 2017. Behavior of yeast inoculated during semi-dry coffee fermentation and the effect on chemical and
927 sensorial properties of the final beverage, *Food Research International* 92:26–32.
928
- 929 Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M. I., Justesen, A. M. and Córdoba, J. J., 2011. Quantification of
930 ochratoxin A-producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods,
931 *International Journal of Food Microbiology* 149:226–235.
932
- 933 Saligkarias, I. D., Gravanis, F. T. and Epton, H.A.S., 2002. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato
934 plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain
935 I-182: II. A study on mode of action. *Biological Control* 25:151-161.
936
- 937 Santos, A. and Marquina, D., 2004. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol
938 agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology* 150: 2527-2534.
939
- 940 Santos, A., Sánchez, A. and Marquina, D., 2004. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*.
941 *Microbiological Research* 159 : 331-338.
942
- 943 Schwan, R.F.; Silva; C.F. and Batista, L.R. Coffee Fermentation, 2012. In: Hui, Y. H.; Evranuz, E. Özgül (Ed.).
944 *Handbook of Plant-based fermented food and beverage technology*. CRC Press, cap. 42, pp. 667-689.
945
- 946 Spadaro, D. and Droby, S., 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the
947 importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science and*
948 *Technology* 47: 39-49.
949
- 950 Sharma, R. R., Singh, D. and Singh, R., 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables
951 by microbial antagonists: A review. *Biological control* 50: 205-221.
952
- 953 Silva, C. F., Batista, L. B. and Schwan, R. F. , 2008. Incidence and distribution of filamentous fungi during
954 fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. *Brazilian Journal of Microbiology* 39:
955 521-526.
956
- 957 Silva, C. F., Vilela, D. M., Cordeiro, C. S., Duarte, W. F., Dias, D. R. and Schwan, R. F., 2013. Evaluation of a
958 potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. *World Journal of Microbiology and*
959 *Biotechnology* 29: 235–247.
960

- 961 Sorrenti, V., Di Giacoma, C., Acquaviva, R., Barbagallo, I., Bognanno, M. and Galvano, F., 2013. Toxicity of
962 ochratoxin A and its modulation by antioxidants: A review. *Toxins* 5:1742-1766.
963
- 964 Souza, M. L., Passamani, F. R. F., Batista, L. R., Ávila, C. L. S., Duarte, W. F., Schwan, R. F. and Silva, C. F.,
965 2017. Use of wild yeasts as a biocontrol agent against toxigenic fungi and OTA production. *Acta Scientiarum-*
966 *agronomy* 39:349-358.
967
- 968 Spadaro, D., Lorè, A., Garibaldi, A. and Gullino M.L., 2013. A new strain of *Metschnikowia fructicola* for
969 postharvest control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on four cultivars of apple. *Postharvest*
970 *Biology and Technology* 75:1-8.
971
- 972 Spadaro, D., Vola, R., Piano, S. and Gullino, M.L., 2002. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of
973 the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and*
974 *Technology* 24:123-134.
975
- 976 Toffano, L., Fialho, M.B. and Pascholati, S.F., 2017. Potential of fumigation of orange fruits with volatile
977 organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* to control citrus black spot disease at postharvest.
978 *Biological Control* 108:77-82.
979
- 980 Velmourougane, K., Bhat, R., Gopinandhan, T. N. and Panneerselvam, P., 2011. Management of *Aspergillus*
981 *ochraceus* and Ochratoxin-A contamination in coffee during on-farm processing through commercial yeast
982 inoculation. *Biological Control* 57: 215-221.
983
- 984 Viterbo, A., Montero, M., Ramot, O., Friesem, D., Monte, E., Llobell, A. and Chet, I., 2002. Expression
985 regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Current Genetics*
986 42:114-122.
987
- 988 Young, T.K., 1987. Killer yeasts. In: Rose, A.H. and Harrison, J.D. (Ed.). *The Yeasts*. New York: Academic
989 Press, pp.131-164.
990
- 991 Zhao, Y., Tu, K., Shao, X., Jing, W. and SU, Z., 2008. Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against
992 *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 49:113-120.
993
- 994 Zhou, Y., Deng, L. and Zeng, K., 2014. Enhancement of biocontrol efficacy of *Pichia membranaefaciens* by hot
995 water treatment in postharvest diseases of citrus fruit. *Crop Protection* 63:89-96.
996
- 997 Zhou, Y., Zhang, L. and Zeng, K., 2016. Efficacy of *Pichia membranaefaciens* combined with chitosan against
998 *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits and possible modes of action. *Biological Control* 96:39-47.
999
- 1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016

1017 **Supplementary Material**

1018

1019 **Table S1.** Average of the mycelial growth of *A. carbonarius* CCDCA 10608 and *A.ochraceus*
 1020 CCDCA 10612, co-cultivated with yeast, in split, half board containing MEA, for seven days at 25°C.
 1021 In bold are represented the yeasts that were significant in accordance with the *Dunnett* test with $p <$
 1022 0.05%.

1023

Yeasts	<i>A. carbonarius</i> CCDCA 10608		<i>A. ochraceus</i> CCDCA 10612	
	Diameter (cm)	<i>p</i> - value	Diameter (cm)	<i>p</i> - value
<i>Candida guilliermondii</i> CCMA 1297	7.00	1.000	5.48	0.999
<i>C. guilliermondii</i> CCMA 1298	7.00	1.000	5.50	1.000
<i>C. guilliermondii</i> CCMA 1307	7.00	1.000	5.67	1.000
<i>C. guilliermondii</i> CCMA 1308	7.00	1.000	5.67	1.000
<i>Candida parapsilosis</i> CCMA 1292	7.00	1.000	5.57	1.000
<i>C. parapsolis</i> CCMA 1293	6.98	1.000	5.60	1.000
<i>C. parapsolis</i> CCMA 1295	7.00	1.000	6.00	0.431
<i>C. parapsilosis</i> CCMA 1301	7.00	1.000	5.08	0.172
<i>C. parapsilosis</i> CCMA 1304	6.88	0.999	5.37	0.988
<i>C. parapsilosis</i> CCMA 1312	7.00	1.000	5.67	1.000
<i>C. parapsilosis</i> CCMA 1314	7.00	1.000	5.17	0.385
<i>Candida guilliermondii</i> CCMA 1296	7.00	1.000	5.60	1.000
<i>Candida Krusei</i> CCMA 1316	7.00	1.000	5.63	1.000
<i>Meyerozyma caribbica</i> CCMA 1294	6.42	0.195	5.47	0.999
<i>Pichia guilliermondii</i> CCMA 0164	7.00	1.000	5.40	0.998
<i>Pichia kluyveri</i> CCMA 0165	7.00	1.000	4.63 *	0.000
<i>P. kluyveri</i> CCMA 0166	7.00	1.000	5.35	0.975
<i>P. kluyveri</i> CCMA 0167	7.00	1.000	5.28	0.824
<i>P. kluyveri</i> CCMA 0168	7.00	1.000	5.23	0.635
<i>P. kluyveri</i> CCMA 0169	7.00	1.000	5.17	0.407
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CCMA 1305	7.00	1.000	5.37	0.988
<i>R. mucilaginosa</i> CCMA 1310	7.00	1.000	5.48	0.999
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCMA 0159	4.15 *	0.000	2.47 *	0.000
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1299	3.62 *	0.000	2.27 *	0.000
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1302	5.03 *	0.000	2.48 *	0.000
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1306	2.45 *	0.000	1.17 *	0.000
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1313	2.33 *	0.000	1.75 *	0.000
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 1315	7.00	1.000	2.97 *	0.000
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> CCMA 1300	7.00	1.000	5.13	0.285
<i>W. anomalus</i> CCMA 1303	7.00	1.000	5.03	0.097
<i>W. anomalus</i> CCMA 1309	7.00	1.000	5.57	1.000
<i>W. anomalus</i> CCMA 1311	7.00	1.00	5.00	0.063

1024 *Average significant at $p < 0.05\%$ by *Dunnett* test.1025 *A. carbonarius* CCDCA 10608, the control on the seventh day had a diameter of 7.00cm.1026 *A. ochraceus* CCDCA 10612, the control on the seventh day had a diameter of 5.59cm.

1027 **Tables S2.** Population of *A. carbonarius* CCDCA 10608 (log spores/g) and population of *S. cerevisiae*
 1028 CCMA 1302 (log cells/g), during 360 hours of fermentation in the different treatments of coffee
 1029 processed via drought, data resulting from the analysis of qPCR.
 1030

Treatment (seeded)	Fermentation time (h)		
	0	192	360
	<i>A. carbonarius</i> population (log spores/g)		
CCMA 1302	4.11 cB	4.32 dB	4.84 bA
CCDCA10608	5.94 aA	5.59 bA	5.91 aA
CCMA 1302 and CCDCA10608	6.16 aA	6.16 aA	5.71 aB
^a Control	5.39 bA	4.91 cB	4.20 cC
	<i>S. cerevisiae</i> population (log cells/g)		
CCMA 1302	9.48 bC	10.72 aB	10.58 aA
CCDCA 10608	8.51 cB	7.77 cC	8.63 cA
CCMA 1302 and CCDCA10608	9.70 aB	9.06 bC	10.04 bA
^a Control	6.55 dB	7.30 dA	5.80 dC

1031 Values represent the averages of the results of qPCR in relation to population of *A. carbonarius* (log
 1032 spores/g) and the population of *S. cerevisiae*, the treatments in the coffees. The different letters in the
 1033 same column, and different letters on the same line, were significant with $p < 0.05$ by Tukey test. The
 1034 ^a control - without inoculation.