

Atividade fungistática “in vitro” de cafeína em fungos associados com grãos de café

Simone Fujii¹, Fernanda Garcia Algarte Assunção¹, Marta Hiromi Taniwaki², Maria Brígida dos Santos Scholz³, Raul Jorge Hernan Castro Gómez¹ e Elisa Yoko Hirooka^{1*}

¹Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, C.P. 6001, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. ²Instituto de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 139, 13073-001, Campinas, São Paulo, Brasil. ³Instituto Agronômico do Paraná C.P. 481, 86001-970, Londrina, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: elisahirooka@hotmail.com; hirooka@uel.br

RESUMO. O efeito de cafeína sobre o crescimento micelial de fungos isolados de café foi avaliado, visando analisar a participação do composto no controle de qualidade neste substrato. Os fungos foram cultivados em ágar contendo café descafeinado e cafeína (0 a 1,0 %) e o efeito fungistático avaliado, medindo o diâmetro de colônia fúngica. A degradação de cafeína por fungos em meio líquido foi analisada, quantificando cafeína residual por CLAE. A cafeína apresentou antibiose proporcional à dose, com inibição de 52,8 a 100% de *Aspergillus flavus*, 9,4 a 72,5% de *Fusarium semitectum*, 8,8 a 66,8% de *Penicillium* sp., 5,3 a 54,1% de *Fusarium* sp., 4,6 a 39% de *A. niger* e 4,7 a 37% de *A. ochraceus*. Verificou-se redução da atividade inibitória, provavelmente, decorrente da degradação de cafeína pelos fungos. Não obstante, deve-se considerar o efeito fungistático de cafeína, demonstrada pela atividade biológica capaz de contribuir na fitossanidade e qualidade do café.

Palavras-chave: cafeína, café, agente fungistático, fungos, inibição, *Coffea arabica*.

ABSTRACT. Fungistatic activity of caffeine “in vitro” in fungi associated with coffee grains. The effect of caffeine on mycelia growth of fungi isolated from coffee was evaluated. The fungi were cultivated in decaffeinated coffee agar media added with caffeine at 0 to 1,0 %, and fungistatic effect was expressed by the size of colony diameter. The caffeine degradation by fungal activity in liquid medium was evaluated by HPLC. The antibiosis was proportional to dose, and the inhibition of growth was of 52,8 to 100% of *Aspergillus flavus*, 9,4 to 72,5% of *Fusarium semitectum*, 8,8 to 66,8% of *Penicillium* sp., 5,3 to 54,1% of *Fusarium* sp., 4,6 to 39% of *A. niger* and 4,7 to 37% of *A. ochraceus*. The inhibitory activity declined, probably due to its degradation by the fungal activity. Therefore, the fungistatic effect of caffeine may contribute for coffee quality and sanity.

Key words: caffeine, coffee, fungistatic agent, fungi, inhibition, *Coffea arabica*.

Introdução

A freqüente contaminação fúngica e conseqüente risco da produção de micotoxinas em café (*Coffea arabica*), com ênfase a ocratoxina A, aliados a exigente busca por qualidade estimulam a pesquisa sobre controle de fitopatógenos fúngicos (Taniwaki *et al.*, 2003; Batista *et al.*, 2003).

Os métodos disponíveis, outrora restritos a fungicidas químicos (Leroux, 2003), vêm expandindo para introdução de biocontroladores (Franceschini *et al.*, 2001; Dorner *et al.*, 2003) e modificação genética de matéria prima (Munkvold *et al.*, 1999; Ripoll *et al.*, 2003). Por outro lado, a conscientização sobre risco à saúde e ecossistema, associado ao alto custo técnico, incentivam a procura direcionada a compostos bioativos inerentes de planta, capazes de desencadear efeito inibitório sobre microrganismos,

onde a cafeína destaca-se entre fungistáticos promissores (Daffre *et al.*, 2001; Brand *et al.*, 2002).

A cafeína (1,3,7 trimetilxantina) constitui componente natural em café, com atividade fungistática e efeito antimicotoxigênico simultâneo (Buchanan *et al.*, 1983). A possibilidade advém do fato, que metilxantinas consiste em grupo de compostos capazes de conferir propriedades defensivas naturais a plantas contra microrganismos. A inibição por cafeína foi constatada no crescimento de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., inclusive produtores de ocratoxina (Buchanan *et al.*, 1981, 1983; Brand *et al.*, 2002; Chalfoun *et al.*, 2000), embora a aplicabilidade como agente de controle sobre produção de micotoxinas ainda seja questionável (Roussos *et al.*, 1994; Hakil *et al.*, 1999).

Considerando a importância de cafeicultura na

economia brasileira (Taniwaki *et al.*, 2003; Batista *et al.*, 2003) e implicações de ocratoxina à saúde humana (Grosso *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2003), o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de cafeína como contribuinte natural na qualidade e sanidade de café sobre o crescimento micelial de fungos isolados deste substrato, analisando susceptibilidade à degradação fúngica.

Material e métodos

Os fungos *Aspergillus ochraceus* toxigênico, *Penicillium* sp., *A. niger*, *A. flavus*, *Fusarium semitectum* e *Fusarium* sp. foram isolados de grãos de café em estágio de maturação passa em Londrina, Estado do Paraná (23°15' - 23°20'S / 51°00' - 51°20'W) (Grigoli, 2001).

O estudo do efeito de cafeína no crescimento fúngico foi realizado em placas de Petri contendo meio básico (5% de café solúvel descafeinado - comercial em ágar bacteriológico a 2%) suplementado com 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0% (p/v) de cafeína (Merck®) (Chalfoun *et al.*, 2000 modificado por Fujii, 2002). O ensaio consistiu de duas repetições realizadas em 5 séries (0 a 1,0% de cafeína), sendo cada série constituída de ensaio para 6 isolados fúngicos e efetuada em triplicata (total de 2x90 placas). No centro de cada placa foi colocado um disco de papel de filtro (Whatman nº1) com diâmetro de 5mm, onde os fungos foram inoculados. O inóculo (15 µL) consistiu de 10⁶ esporos (cultivo de 5 dias) em suspensão aquosa de Tween 80 a 0,1% e as placas incubadas a 25°C. O diâmetro da colônia foi medido em intervalos de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias.

O ensaio de degradação de cafeína pela atividade fúngica foi realizado em meios líquidos, sendo meio A de composição complexa (2% extrato de levedura, 6% sacarose e 0,2% de cafeína) (Tsubouchi *et al.*, 1985, modificado por Fujii, 2002) e meio B de composição definida (0,13% de KH₂PO₄; 0,012% Na₂HPO₄; 0,03% MgSO₄.7H₂O; 0,03% CaCl₂.2H₂O; 0,5% sacarose e 0,12% cafeína) (Roussos *et al.*, 1995), constituindo de duas repetições em duplicata. O ensaio (total de 56 frascos) constituiu de duas séries de experiências, isto é, meio A (28 frascos) e meio B (28 frascos). Cada série consistiu de 4 frascos destinados ao controle negativo (sem inóculo) e 24 frascos inoculados com 10⁶ esporos de cada fungo (6

diferentes isolados fúngicos). Os cultivos foram incubados a 25°C sem agitação e interrompidos no 10º e 30º dia de incubação, para proceder extração e análise de cafeína residual (não degradada) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

A detecção de cafeína foi realizada conforme Naik e Nagalakshmi (1997). A cultura fúngica obtida (20mL) no meio A e B foi filtrada em papel filtro (Whatman nº 5) e diluída em água para 100 mL. As minicolumnas de pré-limpeza (Sep-Pak C18 Classic, Waters®) foram condicionadas com 2mL de metanol (Merck®), aplicando-se a seguir 2mL de amostra com passagem de ar. A cafeína residual foi eluída com 6mL de clorofórmio (Merck®) e o eluato evaporado em banho - maria a 80°C sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi dissolvido em 25mL de fase móvel e um volume de 20 µL do extrato foi injetado no sistema isocrático de fase reversa, constituído de coluna Nucleosil 100 C18 (250mm x 4mm, Merck, Alemanha), bomba Shimadzu (LC-10AD) e detector UV-visível a 276nm. A fase móvel consistiu de acetonitrila:água (20:80, v/v) sob fluxo de 1,0mL/min. A detecção e quantificação de cafeína residual na cultura foi determinada utilizando curva padrão confeccionada com concentrações de padrão de cafeína (Merck®) na faixa de 0,25 µg/mL a 30ng/µL. A eficiência da técnica quanto a recuperação de cafeína foi avaliada procedendo extração e quantificação de cafeína em meios A e B sem crescimento fúngico, seguido de comparação com teor de cafeína exatamente adicionado aos meios (0,2% e 0,12%).

A ação inibitória de diferentes concentrações de cafeína no decorrer do tempo de cultivo foi analisada procedendo à medida de diâmetro de colônia (cm) e comparada com cultura controle (sem cafeína), obtendo-se as porcentagens de inibição. A tendência de desenvolvimento fúngico com doses crescentes de cafeína e o perfil do efeito fungistático de cafeína no decorrer de cultivo foram analisados pela regressão quadrática no programa Statística versão 5,0.

Resultados e discussão

A adição de 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0% de cafeína no meio básico causou redução no crescimento micelial (diâmetro de colônia) em todos os fungos testados, em relação ao controle negativo (sem cafeína) exibindo assim efeito fungistático (Figuras 1 e 2).

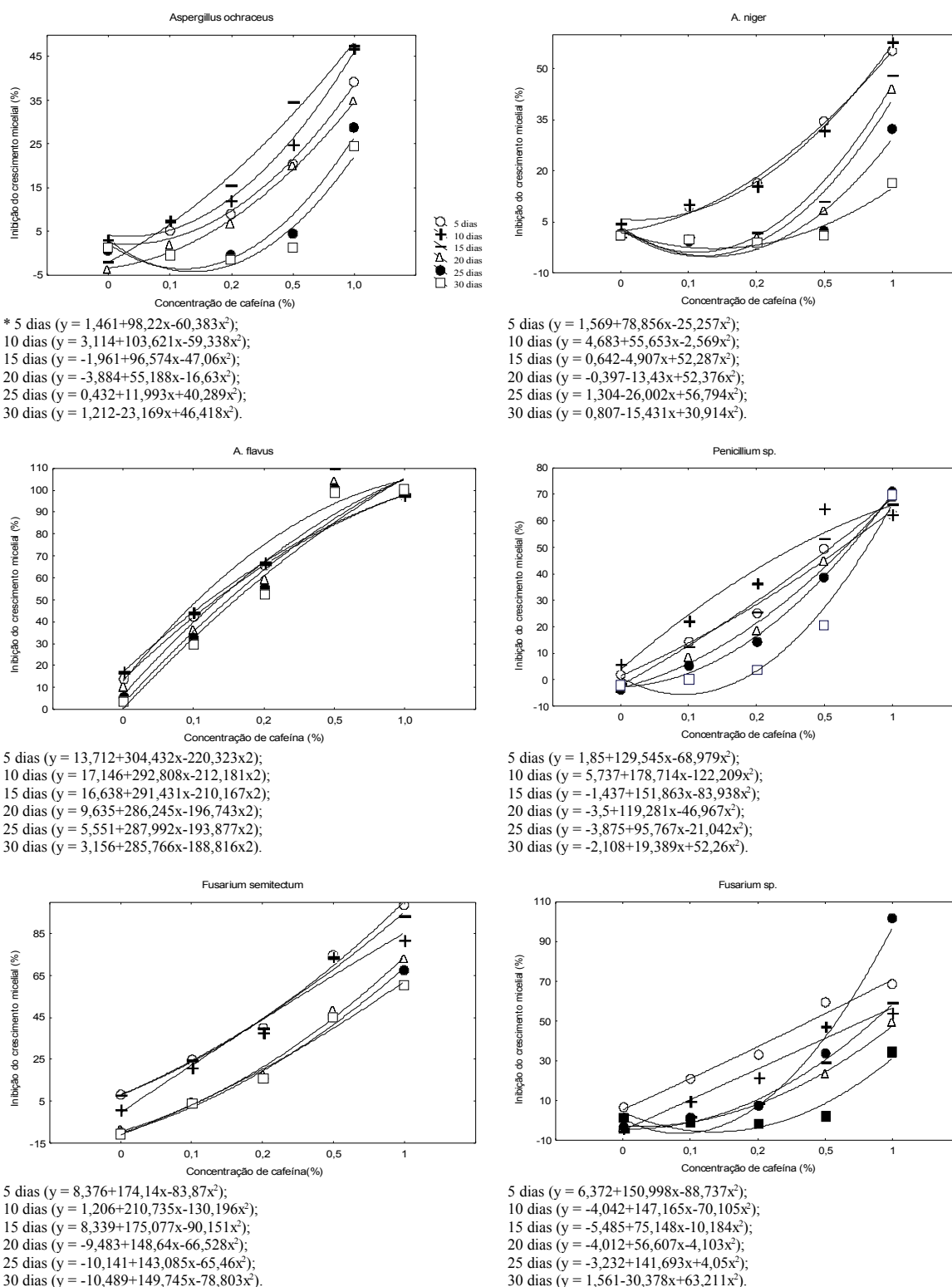


Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de cafeína na inibição do crescimento micelial de fungos associados ao café (* Modelos matemáticos referentes às distintas doses de cafeína).

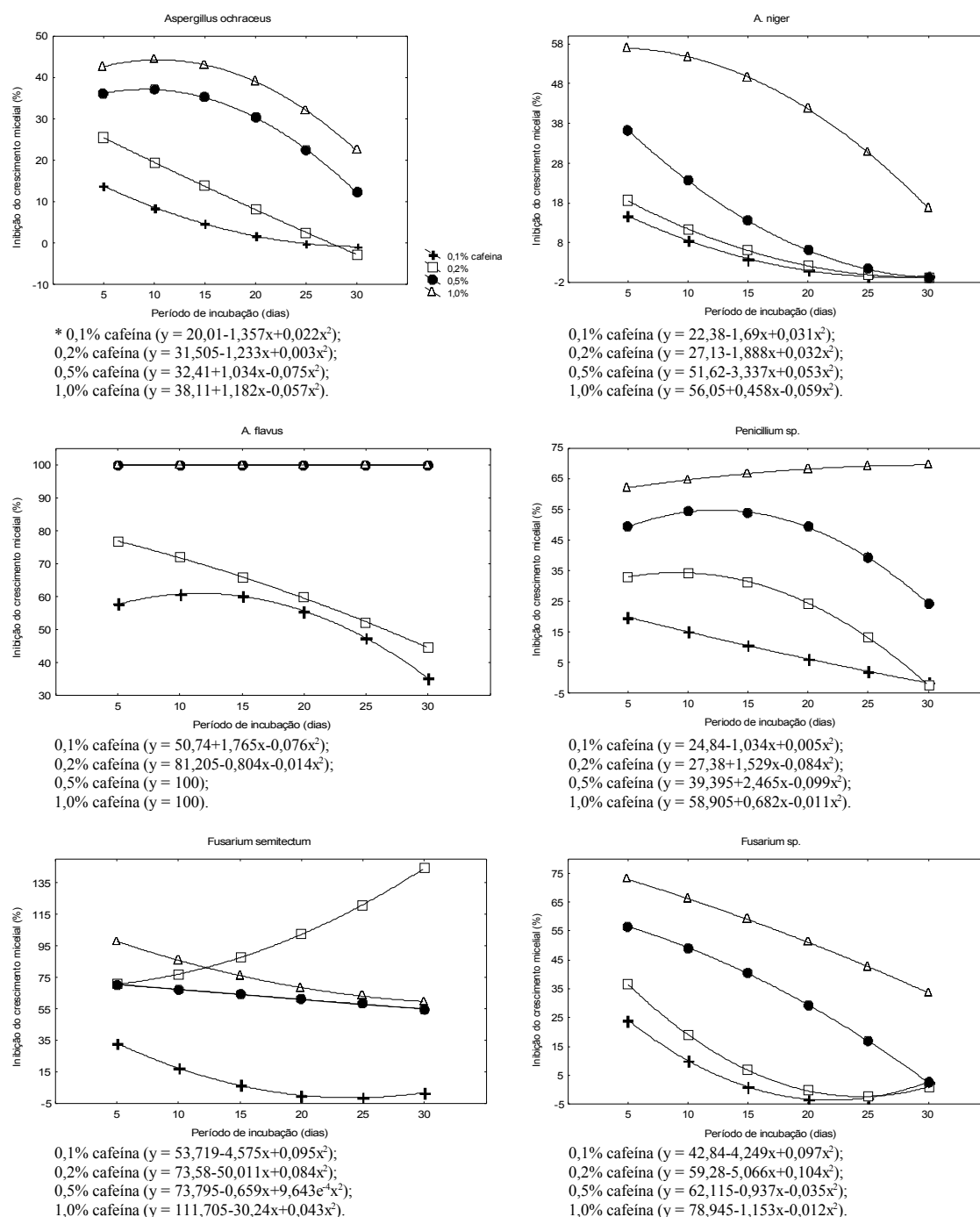


Figura 2. Tendência de inibição por cafeína durante o cultivo de fungos associados ao café (* modelos matemáticos referentes às distintas doses de cafeína).

A Figura 1 mostra aumento de potencial inibitório com doses crescentes de cafeína no decorrer do cultivo (5 a 30 dias) e embora os diferentes isolados fúngicos tenham mostrado diferentes perfis de inibição, a relação entre efeito inibitório e concentração de cafeína apresentou uma tendência de aumento ($P < 0,05$), analisada pela regressão quadrática, com maior inibição em altas doses de cafeína nos diferentes tempos de

cultivo. Considerando a concentração de 0,1 a 1,0% de cafeína e tempo de incubação de 5 a 30 dias, o maior efeito inibitório ocorreu sobre *A. flavus* (65,9 a 100%), seguido de *F. semitectum* (30,3 a 100%), *Fusarium* sp. (26,8 a 73,2%), *Penicillium* sp. (14,6 a 70,6%), *A. niger* (17,6 a 61,2%) e *A. ochraceus* (14,5 a 47,3%). Os dados demonstraram que a cafeína reduziu ($P < 0,05$) o crescimento fúngico, sustentando a hipótese de agente

fungistático em café, cujo potencial é dependente da dose. Buchanan *et al.* (1981) evidenciaram redução de 0 a 75% e 0 a 80% no peso seco de massa micelial de *A.ochraceus* e *A.flavus*, respectivamente, nas concentrações de cafeína correspondentes a 0,1 a 0,4%, sendo a ação inibitória proporcional à dose. Chalfoun *et al.* (2000) também observaram diminuição de crescimento micelial com proporcionalidade do efeito sobre *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. nas concentrações de cafeína a 0,5; 0,8; 1,0 e 2,0%.

A cafeína apresenta diferentes efeitos biológicos, sugerindo que a inibição no crescimento micelial esteja associada à alteração no metabolismo bioquímico de purinas (nucleosídeos ou nucleotídeos) (Buchanan *et al.*, 1983). A ação provavelmente decorre da similaridade estrutural entre purinas e cafeína, que consistem de compostos cíclicos nitrogenados, cuja inibição competitiva reduziria a síntese de ácidos nucleicos, afetando o desenvolvimento fúngico.

A Figura 2 apresenta a influência de diferentes tempos de cultivo na ação fungistática de doses de cafeína. A tendência geral foi caracterizada por curva obtida pela regressão quadrática, com inibição fúngica inicial máxima, seguida de redução no efeito fungistático e perfis diferenciados para concentrações de cafeína. Embora o tempo de cultivo repercuta no potencial inibitório da cafeína, a intensidade desta influência depende da dose do composto.

Comparada à cultura controle (sem cafeína), a diminuição drástica na atividade inibitória de cafeína já ocorreu no 15º dia com 0,1 e 0,2% de cafeína, observando com estas doses a queda de inibição de 3,5 para 0% e 23,5 para 0% para *Fusarium* sp.; 21,2 para 0% e 42,4 para 16,5% (*F.semitectum*); 17,6 para 0% e 18,8 para 4,7% (*A. niger*); 84,6 para 7,1% e 51,2 para 25% (*Penicillium* sp.); 14,5 para 4,3% e 27,3 para 17,1% (*A. ochraceus*) e 65,9 para 52,9% e 70,6 para

56,5% (*A. flavus*). No final de 30º dia de incubação, estes grupos fúngicos retornaram à taxa de crescimento micelial compatível ao controle, principalmente nas concentrações inferiores de cafeína (0,1 a 0,2%) (Figura 2).

O decréscimo de ação fungistática (Figura 2) pode ser atribuído à degradação de cafeína pelos fungos, em função de sua assimilação como fonte de nitrogênio assim como fonte de carbono (Brand *et al.*, 2002; Hakil *et al.*, 1999; Roussos *et al.*, 1994), provavelmente pela via do β -cetoadipato, que constitui principal rota de degradação de compostos aromáticos (Harwood e Parales, 1996). Assim, a diminuição de cafeína por assimilação pelos fungos proporcionou crescimento micelial (Figura 2).

Para confirmar a provável capacidade de degradação de cafeína por fungos, sugerido no ensaio em meio básico sobre o crescimento (Figura 2), os isolados fúngicos foram cultivados em meios líquidos de composição complexa (meio A) e definida (meio B) e o teor de cafeína residual no sobrenadante foi determinado por CLAE (Tabela 1).

No meio A, as fontes de nitrogênio consistiram de cafeína (0,2%) e extrato de levedura (2,0%). Os dados da Tabela 1 indicaram preferência inicial de fungos pela assimilação de extrato de levedura, em relação à cafeína (10º dia de incubação), evidenciado por baixa porcentagem de degradação de cafeína por 4 fungos testados (*A. ochraceus*, *A. niger*, *A. flavus* e *Fusarium* sp.). O quadro gradativamente reverteu no 30º dia, sendo caracterizado por aumento de degradação, provavelmente devido ao esgotamento de extrato de levedura como fonte nitrogenada. No meio B, tendo a cafeína como única fonte nitrogenada (Tabela 1), foi constatado assimilação mais acentuada, com variação entre os fungos e degradação mais pronunciada em meio B em relação ao meio A

Tabela 1. Degradação de cafeína por atividade fúngica em meios de cultivo A (0,2% cafeína) e B (0,12% cafeína)^a.

Fungo	Cafeína ^b (% degradação)			
	Meio A		Meio B	
	10 dias	30 dias	10 dias	30 dias
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,031 $\pm$ 0 (3,1)	0,026 $\pm$ 0 (18,8)	0,019 $\pm$ 0 (9,5)	0,013 $\pm$ 0 (40,9)
<i>Penicillium</i> sp.	0,016 $\pm$ 0 (50,0)	0,015 $\pm$ 0 (53,1)	0,015 $\pm$ 0 (28,6)	0,002 $\pm$ 0 (90,0)
<i>A. niger</i>	0,032 $\pm$ 0 (0)	0,032 $\pm$ 0 (0)	0,021 $\pm$ 0 (0)	0,017 $\pm$ 0 (22,7)
<i>A. flavus</i>	0,032 $\pm$ 0 (0)	0,032 $\pm$ 0 (3,2)	0,021 $\pm$ 0 (0)	0,020 $\pm$ 0 (9,1)
<i>Fusarium</i> sp.	0,032 $\pm$ 0 (0)	0,005 $\pm$ 0 (84,4)	0,015 $\pm$ 0 (28,6)	0,015 $\pm$ 0 (31,8)
<i>F. semitectum</i>	0,026 $\pm$ 0 (18,8)	0,026 $\pm$ 0 (18,8)	0,021 $\pm$ 0 (0)	0,022 $\pm$ 0 (0)
Controle negativo ^c	0,032 $\pm$ 0	0,032 $\pm$ 0	0,021 $\pm$ 0	0,022 $\pm$ 0
Teor cafeína teórico (g) ^d	0,040	0,040	0,024	0,024
Recuperação ^e	80%	80%	87,5%	91,7%
Coeficiente de Variação	2,5%	2,5%	2,37%	1,98%

^a determinação por CLAE (Naik e Nagalakshmi, 1997); ^b teor de cafeína residual (gramas) em meios de cultivo após 10 e 30 dias de incubação (média $\pm$ desvio padrão em duplicata). A porcentagem de degradação de cafeína pelo fungo (cafeína residual/controle x 100 - 100) aparece entre parênteses; ^c teor de cafeína (g) recuperado de meio de cultivo sem inoculação fúngica; ^d teor de cafeína (g) adicionado ao meio de cultivo, referente a 0,2% para meio A e 0,12% meio B; ^e porcentagem de recuperação de cafeína do controle negativo pelo método de extração de cafeína e limpeza.

Neste contexto, a presença de fonte de nitrogênio adicional (extrato de levedura) ao meio de cultivo permitiu a disponibilidade de uma porcentagem de cafeína para exercer efeito inibitório. Interpolando a

situação para campo, os compostos nitrogenados naturais poupariam a degradação de cafeína, mantendo-a intacta para atuação como contribuinte na qualidade dos frutos de café. Resultados similares

foram obtidos por Hakil *et al.* (1999), que constataram inibição de assimilação de cafeína pelos fungos em substratos caracterizados por presença de fontes nitrogenadas simples.

O café contém proteínas, enzimas, peptídeos e aminoácidos livres que desempenham papel importante no desenvolvimento de sabor e aroma, atuando como fontes de nitrogênio para o desenvolvimento fúngico (França *et al.*, 2001). Roussos *et al.* (1994) constataram ausência de degradação de cafeína em extratos de polpa de café, possivelmente devido a disponibilidade alternativa de proteínas solúveis que atuaram como fonte de nitrogênio opcional.

A Tabela 1 também sugeriu a dependência da degradação de cafeína pela composição química de substrato e características inerentes aos fungos, uma vez que *Fusarium* spp. apresentou 84,4% de degradação no 30º dia (meio A) em relação a 31,8% (meio B) e *F. semitectum* apresentou 18,8% (meio A) com ausência de degradação em meio B. Considerando que *Fusarium* sp. tenha sido frequentemente isolado destas amostras de café analisadas, a capacidade de degradação de cafeína provavelmente está relacionada com a competição pela sobrevivência. A composição complexa (meio A ou polpa de café) forneceria substrato necessário à síntese de enzimas degradadoras, não ocorrendo o mesmo no meio B de composição restrita.

A contínua degradação de cafeína pela atividade fúngica pode significar redução no mecanismo intrínseco de defesa e qualidade. A contaminação pós-colheita na secagem e armazenamento constitui ponto crítico em café, que associada a condição inadequada de estocagem acarretaria produção de micotoxinas no substrato.

A pesquisa demonstrou atividade biológica de cafeína como agente antagonístico - fungistático, capaz de atuar no mecanismo intrínseco na defesa do café, inibindo espécimens fitopatogênicas/toxigênicas. A presença de outros compostos nitrogenados no café garantiria a disponibilidade de cafeína como agente fungistático, apontando-a entre possíveis fatores naturais de controle, capaz de contribuir na fitossanidade e qualidade do café.

Referências

- BATISTA L.R. *et al.* Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v.85, n.3, p. 293-300, 2003.
- BRAND, D. *et al.* Relationship between coffee husk caffeine degradation and respiration of *Aspergillus* sp LPBx in solid-state fermentation. *Appl. Bioch. Biotech.*, Totowa, n.102, p.169-177, 2002.
- BUCHANAN, R. L. *et al.* Caffeine inhibition of ochratoxin A production. *J. Food Sci.*, Chicago, v.47, p.319-321, 1981.
- BUCHANAN, R. L. *et al.* Caffeine inhibition of aflatoxin: mode of action. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, DC, v.46, p.1193-1200, 1983.
- CHALFOUN, S. M. *et al.* Efeito da cafeína (1,3,7-trimethylxantina) sobre o crescimento micelial de fungos associados ao café. *Revista Brasileira de Armazenamento Especial.*, Viçosa, n.1, p.50-53, 2000.
- DAFFRE, S. *et al.* Peptídeos antibióticos. *Biotechn. Ciênc. Desenvolv.*, Brasília, n.3, p.48-56, 2001.
- DORNER, J. W. *et al.* Evaluation of biological control formulations to reduce aflatoxin contamination in peanuts. *Biol. Control*, San Diego, v.26, n.3, p.318-324, 2003.
- FRANÇA, A.S. *et al.* Evolução da composição do extrato de café durante o processo de torrefação. *Revista Brasileira de Armazenamento Especial.*, Especial Café, Viçosa, n.2, p.37-47, 2001.
- FRANCESCHINI, M. *et al.* Biotecnologia aplicada ao controle biológico. *Biotechn. Ciênc. Desenvolv.*, Brasília, n.23, p.32-37, 2001.
- FUJII, S. *Imunoensaio na detecção de ocratoxina A e efeito de cafeína sobre microbiota fúngica*. 2002. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002.
- GRIGOLI, A. A. *Fator biológico (microbiota-OTA) versus composição bromatológica no café (cultivares LAPAR-59, CATUAI, MUNDO NOVO)*. 2001. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2001.
- GROSSO, F. *et al.* New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. *Food Chem. Toxicol.*, Oxon, v.41, n.8, p.1133-1140, 2003.
- HAKIL, M. *et al.* Caffeine degradation in solid state fermentation by *Aspergillus tamarii*: effects of additional nitrogen sources. *Process Biochem.*, Oxon, v.35, p.103-109, 1999.
- HARWOOD, C.S.; PARALES, R.E. The β -ketoadipate pathway and the biology of self identity. *Annu. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, v.50, p.553-590, 1996.
- LEROUX, P. Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes: Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. *Comptes Rendus Biologies*, Paris, v.326, n.1, p.9-21, 2003.
- MÜLLER, G. *et al.* Effects of the mycotoxin ochratoxin A and some of its metabolites on the human cell line THP-1. *Toxicology*, Clare, v.184, n.1, p.69-82, 2003.
- MUNKVOLD, G. P. *et al.* Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and no transgenic hybrids. *Plant Dis.*, St. Paul, n.83, p.130-132, 1999.
- NAIK, J. P.; NAGALAKSHMI, S. Determination of caffeine in tea products by an improved high-performance liquid chromatography method. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, DC., v.45, p.3973-3975, 1997.
- RIPOLL, C. *et al.* Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. *Plant Sci.*, Clare, v.164, n.4, p.517-523, 2003.
- ROUSSOS, S. *et al.* Caffeine degradation by *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation of coffee pulp-

critical effect of additional inorganic and organic nitrogen sources. *J. Food Sci. Technol. Mysore*, Mysore, v.31, p.316-319, 1994

ROUSSOS, S. *et al.* Biotechnological management of coffee pulp-isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, New York, v.42, p.756-762, 1995.

TANIWAKI, M. H. *et al.* The source of ochratoxin A and

Brazilian coffee and its formation and relation to processing methods. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v.82, n.2, p.173-179, 2003.

TSUBOUCHI, H. *et al.* Caffeine degradation and increased ochratoxin A production by toxigenic strain of *Aspergillus ochraceus* isolated from green coffee beans. *Mycopathologia*, Dordrecht, v.90, p.181-186, 1985.

Received on September 15, 2003.

Accepted on August 19, 2004.