

# EFEITO DA CAFEÍNA E DO ÁCIDO CAFEICO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS E SÍNTESE DE MICOTOXINAS EM CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

Sára Maria CHALFOUN<sup>1</sup>; Marcelo Cláudio PEREIRA<sup>2</sup>; Carlos José PIMENTA<sup>3</sup>; Caroline Lima ANGÉLICO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Engº Agrº, Dra. Pesquisadora/EPAMIG/CTS, Lavras-MG, Caixa Postal, 176, E-mail: chalfoun@ufla.br; <sup>2</sup>Doutorando – Ciência dos Alimentos, UFLA, Lavras-MG, E-mail: marcelo.claudio@posgrad.ufla.br; <sup>3</sup>Professor – Departamento Ciência dos Alimentos, UFLA, Lavras-MG, E-mail: carlos\_pimenta@ufla.br; <sup>4</sup>Mestranda - Departamento Ciência dos Alimentos, UFLA, Lavras-MG, E-mail: caroline@navinet.com.br

## Resumo:

Os efeitos de diferentes concentrações (0,0%; 0,5%; 0,8%, 1,0% e 2,0%) de cafeína e de diferentes concentrações de ácido cafeico (0,0%; 0,25%; 0,5%, 0,75% e 1,0%) foram determinados sobre o crescimento micelial, produção de ocratoxina A e aflatoxinas dos fungos *Aspergillus ochraceus* e *A. parasiticus* isolados de grãos de café. Os resultados confirmaram a ação inibitória parcial (dose dependente) da cafeína sobre o crescimento micelial do fungo *A. ochraceus* e inibição total da síntese de OTA nas concentrações de 1,5% e 2,0% e elevada redução da síntese nas concentrações 0,5% e 0,8%. A cafeína inibiu totalmente o crescimento micelial do fungo *A. parasiticus*, o que explica a ausência do problema de aflatoxinas no café. O ácido cafeico teve pequeno efeito sobre o crescimento micelial e esporulação do fungo *A. ochraceus*, mas não inibiu a síntese de OTA, o crescimento micelial e a esporulação do fungo *A. parasiticus*, mas inibiu totalmente a síntese de aflatoxina B1 nas concentrações de 0,5%; 0,75% e 1,0%. Ao contrário da afirmação de alguns autores, a descafeinação, como um processo industrial, não aumenta o risco potencial de contaminação por fungos toxigênicos e micotoxinas dos frutos e grãos desde que os pontos críticos para que tais eventos ocorram encontram-se durante os períodos de cultivo e pós colheita do café. Por outro lado, o cultivo de híbridos, naturalmente contendo baixos níveis de cafeína, pode aumentar a susceptibilidade do café a contaminação por fungos toxigênicos e micotoxinas, considerando o relevante papel inibidor exercido por este alcalóide como demonstrado no presente trabalho.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L.; cafeína, ácido cafeico; ocratoxina A; aflatoxina B1.

## CAFFEINE AND CAFFEIC ACID EFFECT ON THE FUNGI DEVELOPMENT AND MYCOTOXINS SYNTHESIS IN COFFEE (*Coffea arabica* L.)

### Abstract:

The effects of different concentrations (0,0%, 0,5%, 0,8%, 1,0% and 2,0%) of caffeine and caffeic acid (0,0%, 0,5%, 0,75% and 1,0%) were determined on mycelial growth, on ochratoxin A (OTA) and aflatoxins production of the fungi *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus* isolated from coffee beans. The results confirmed the partial inhibitory action (dose-related) of caffeine on mycelial growth of the fungus *A. ochraceus* and entire inhibition of OTA synthesis in the concentrations of 1,5% and high synthesis inhibition in the concentrations 1,5% and 2,0% and high synthesis inhibition in the concentrations of 0,5% and 0,8%. Caffeine entirely inhibited the mycelial growth of the fungus *A. parasiticus*, fact that explains the absence of the aflatoxins problem in coffee. The caffeic acid had a little effect on mycelial growth and sporulation of the fungus *A. parasiticus*, but entirely inhibited the synthesis of aflatoxin B1 in the concentrations of 0,5%; 0,75% and 1,0%. Against to the affirmation of some authors, coffee decaffeination as a industrial process didn't increase the fungi and mycotoxins potential risk of fruits and beans contamination since the critical points to this events occurrence are at the coffee cultivation and after harvesting periods of the culture. By the other side, the cultivation of hybrids naturally containing low caffeine rates can increase the susceptibility to toxigenic fungi and mycotoxins contamination, considering the relevant inhibition hole played by this alkaloid as demonstrated by the present work.

Key words: *Coffea arabica* L.; caffeine, caffeic acid; ochratoxin A; aflatoxin B1.

### Introdução

Os alimentos utilizados para o consumo humano e animal são hoje alvos de crescente preocupação no que se refere à qualidade microbiológica, principalmente em relação aos fungos toxigênicos e seus metabólitos, como as micotoxinas cuja ação deletéria sobre a saúde humana e animal é comprovada.

A ocratoxina A (OTA) tornou-se um problema de saúde pública mundial desde que foi associada com a nefropatia dos Balkans (Krogh et al.;1977). Vários trabalhos têm sido desenvolvidos visando documentar a ocorrência de OTA em alimentos para o homem e em rações.

A OTA em café tem sido associada principalmente com a presença de espécies de fungos do gênero *Aspergillus* pertencentes à Seção *Circumdati* e a Seção *Nigri*. Segundo Bucheli e Taniwaki (2002) *Aspergillus ochraceus* e *A. carbonarius* são os mais potentes produtores de OTA em café.

Aflatoxinas são metabólitos secundários sintetizados por fungos, principalmente *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Tais toxinas são responsáveis por graves intoxicações e tem se mostrado carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas a diversas espécies animais, inclusive o homem. Considerando-se que fungos da Seção Flavi entre eles *A. flavus* e *A. parasiticus* fazem parte da microbiota associada a grãos de café (Batista, 2005), é natural que se indague sobre o motivo de não detecção de aflatoxinas.

No entanto, deve-se considerar que o desenvolvimento de fungos toxigênicos e a produção de metabólitos tóxicos depende entre outros fatores, da composição química do substrato. Dessa forma, levantamentos efetuados sobre amostras de café quanto à presença de micotoxinas, demonstram que a frequência de contaminação é extremamente baixa e quando a toxina é encontrada, o nível de contaminação é baixo (Levi, 1980; Batista, 2000; 2005).

O efeito inibitório da cafeína sobre o crescimento do fungo *A. parasiticus* e síntese de aflatoxina B1 e B2 foram verificados por Buchanan e Fletcher (1978) e confirmados por Nartowicz, Buchanan e Segal (1979). Em ambos os trabalhos levantaram a hipótese de que a descafeinação poderia aumentar os riscos de contaminação com aflatoxinas. Estas pesquisas também caracterizaram a produção de aflatoxina em meio microbiológico suplementado com cafeína e commodities que contem cafeína, indicando que o meio suplementado com a cafeína é válido. Assumindo que o modelo também fosse válido para ocratoxina A (OTA) e testando a ação da cafeína sobre a produção de (OTA), os autores sugeriram que grãos de café e cacau (particularmente aquelas variedades apresentando  $\geq 2$  mg cafeína/g) podem ser relativamente resistentes à contaminação por OTA. No caso do cacau, o conteúdo de cafeína tem provado ser um bom índice para avaliar o grau de exposição ao risco de contaminação por micotoxinas entre cultivares.

Considerando-se os baixos níveis de ocratoxina A detectados em café (Batista, 2005) e a não detecção de aflatoxinas como indicadores de que vários componentes químicos do café são, definitivamente, potenciais inibidores do desenvolvimento e esporulação dos fungos e síntese de micotoxinas, desenvolveu-se o presente estudo visando contribuir para a consolidação do conceito de que o café é um substrato desfavorável para o desenvolvimento de microrganismos e síntese de micotoxinas.

## Material e Métodos

Com base no potencial toxigênico foram selecionados dois isolados considerados altamente produtores de ocratoxina A e aflatoxinas, respectivamente os fungos *Aspergillus ochraceus* e *A. parasiticus*.

O crescimento micelial dos fungos foi estudado utilizando-se placas de Petri contendo BDA (batata-dextrose-ágar) suplementado com cafeína nas concentrações de 0,0; 0,8; 1,0 e 2,0% e ácido cafeico 0,0; 0,25; 0,50; 0,75; e 1,0%.

Cada placa foi inoculada com um disco de micélio de 0,5 cm de diâmetro e mantida em incubadora com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Os tratamentos foram efetuados em duas repetições sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri.

Após 7, 14 e 21 dias as culturas foram avaliadas de acordo com o crescimento micelial, esporulação e aos 5 dias após o cultivo do fungo em meio YES foi avaliada a produção de ocratoxina A, através do método semi-quantitativo de Plug Agar (Filtenborg & Frisvad, 1980) e quanto à produção de aflatoxinas através do método Coconut Agar Media (Lin & Dianese, 1976).

## Resultados e Discussão

Os efeitos da cafeína e ácido cafeico sobre o crescimento micelial, esporulação e síntese de ocratoxina A e aflatoxinas pelos fungos *A. ochraceus* e *A. parasiticus* encontram-se representados nas Tabelas 1 a 8.

A cafeína (Tabelas 1 e 2) apresentou um efeito positivo sobre a inibição do fungo *A. ochraceus* desde o início do crescimento micelial, proporcional às concentrações testadas durante o período estudado.

Com relação à esporulação, observou-se uma interação com a dose testada a partir de 14 dias de avaliação sendo que aos 21 dias a partir da concentração de 0,8%, observou-se os mais elevados níveis de inibição, portanto próximo aos valores médios de cafeína presentes em (*Coffea arabica* L).

Tabela 1 - Efeito de diferentes concentrações de cafeína sobre o desenvolvimento micelial do fungo *A. ochraceus* e produção de ocratoxina A, em diferentes períodos de avaliação. EPAMIG, Lavras, MG, 2005.

Concentrações de Cafeína (%)	Dias		
	7	14	21
0,0	5,00 eA	8,10 eB	9,00 eC
0,5	2,45 dA	4,15 dB	6,05 dC
0,8	2,15 cA	3,60 cB	4,90 cC
1,5	1,70 bA	2,95 bB	4,15 bC
2,0	1,10 aA	2,60 aB	3,80 aC

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup> Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Efeito de diferentes concentrações de cafeína sobre a esporulação do fungo *A. ochraceus* em diferentes períodos de avaliação. EPAMIG, Lavras, MG, 2005.

Concentrações de Cafeína (%)	Dias		
	7	14	21
0,0	2396,00 10 <sup>4</sup> bA	825,00 10 <sup>5</sup> cB	962,50 10 <sup>5</sup> cC
0,5	716,25 10 <sup>4</sup> aA	231,80 10 <sup>5</sup> bB	733,00 10 <sup>5</sup> bC
0,8	418,75 10 <sup>4</sup> aA	222,12 10 <sup>5</sup> bB	242,12 10 <sup>5</sup> aB
1,5	398,75 10 <sup>4</sup> aA	83,10 10 <sup>5</sup> aA	195,60 10 <sup>5</sup> aB
2,0	223,75 10 <sup>4</sup> aA	76,80 10 <sup>5</sup> aA	165,60 10 <sup>5</sup> aA

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup> Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Com relação à produção de OTA (Tabela 3), observou-se que a síntese foi totalmente inibida (ND) nos meios complementados com 1,5% e 2% de cafeína, ocorreu em baixa intensidade nas concentrações de 0,5 e 0,8% (+) quando comparados à testemunha (+++) e padrão de OTA (+++).

Tabela 3- Produção de ocratoxina A (OTA) e aflatoxinas em meios suplementados com diferentes concentrações de cafeína. EPAMIG, Lavras, 2005.

Concentrações de cafeína (%)	<sup>1</sup> Ocratoxina A	<sup>2</sup> Aflatoxinas
0,0	+++	ND
0,5	+	ND
0,8	+	ND
1,5	ND	ND
2,0	ND	ND
Padrão de OTA	+++	-

<sup>1</sup> Determinação pelo método de Plug Agar (Frisvard e Filtenborg, 1980)

<sup>2</sup> Determinação pelo método de Coconut Agar Media (Lin & Dianese, 1976)

Trabalhos de melhoramento que vêm sendo realizados através de cruzamentos interespecíficos visando à obtenção de híbridos que se caracterizam por apresentar grãos com reduzidos teores de cafeína, contrariam a demanda mundial por alimentos seguros já que em consequência da redução desse alcalóide eleva-se a susceptibilidade dos frutos e grãos à contaminação por fungos toxigênicos e micotoxinas.

Por outro lado, contrariamente ao que afirmam alguns autores como Buchanan Fletcher (1978) e Nartowicz, Buchanan e Segal (1979), o processo industrial de descafeinação não aumentaria o risco potencial de contaminação por micotoxinas, já que ocorre como uma etapa do processamento posterior à fase de maior exposição dos grãos ao risco de contaminação por fungos toxigênicos e síntese de micotoxinas.

Considerando-se que existe uma faixa de consumidores que prefere o café descafeinado, a sua extração como etapa adicional do processamento continua a ser portanto, a medida preferencial de controle do teor deste alcalóide no produto final.

O ácido cafeico (Tabelas 4 e 5) não afetou o crescimento micelial de *A. ochraceus* na fase inicial de desenvolvimento do fungo. Observou-se uma tendência de redução do crescimento micelial nas avaliações efetuadas aos 14 e 21 dias, mas não relacionadas com as concentrações testadas e os efeitos foram pequenos quando comparados com aqueles obtidos pela suplementação do meio com cafeína.

Tabela 4 - Efeito de diferentes concentrações de ácido cafeico sobre o desenvolvimento micelial do fungo *A. ochraceus* e produção de ocratoxina A, em diferentes períodos de avaliação. EPAMIG, Lavras, MG, 2005.

Concentrações de ácido cafeico (%)	Dias		
	7	14	21
0,0	6,05 bA	7,95 bC	7,60 dB
0,5	4,40 aA	6,15 aB	6,40 aC
0,8	4,20 aA	5,95 aB	6,70 bC
1,5	4,30 aA	6,15 aB	6,95 cC
2,0	4,50 aA	6,35 aB	7,00 cC

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup> Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Tabela 5 - Efeito de diferentes concentrações do ácido cafeico sobre a esporulação do fungo *A. ochraceus* em diferentes períodos de avaliação. Lavras, MG, 2005.

Concentrações de ácido cafeico (%)	Dias		
	7	14	21
0,0	265,70 10 <sup>5</sup> aA	99,60 10 <sup>6</sup> aB	103,20 10 <sup>6</sup> bB
0,5	191,20 10 <sup>5</sup> aA	101,50 10 <sup>6</sup> aC	76,70 10 <sup>6</sup> aB
0,8	246,40 10 <sup>5</sup> aA	99,90 10 <sup>6</sup> aB	99,00 10 <sup>6</sup> bB
1,5	350,10 10 <sup>5</sup> aA	109,90 10 <sup>6</sup> aB	139,00 10 <sup>6</sup> cC
2,0	436,00 10 <sup>5</sup> aA	106,70 10 <sup>6</sup> aB	101,60 10 <sup>6</sup> bB

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup> Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Comportamento semelhante foi observado com relação à esporulação e com relação a produção de OTA, esta foi até estimulada em algumas concentrações de ácido cafeico conforme representado na Tabela 5.

Os resultados referentes aos efeitos de diferentes concentrações de cafeína sobre o crescimento micelial do fungo *A. parasiticus* demonstraram uma total inibição sobre o fungo impedindo conseqüentemente a expressão do potencial de produção de aflatoxinas pelo fungo.

Com relação aos efeitos da suplementação do meio com diferentes concentrações de ácido cafeico sobre o crescimento micelial e esporulação do fungo *A. parasiticus*, os resultados encontram-se representados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Efeito de diferentes concentrações de ácido cafeico sobre o desenvolvimento micelial do fungo *A. parasiticus* e produção de aflatoxinas, em diferentes períodos de avaliação. Lavras, MG, 2005.

Concentrações de Ácido cafeico (%)	Dias		
	7	14	21
0,0	7,65 dA	9,00 aB	9,00 aB
0,5	7,45 cA	9,00 aB	9,00 aB
0,8	7,30 bA	9,00 aB	9,00 aB
1,5	7,30 bA	9,00 aB	9,00 aB
2,0	7,00 cA	9,00 aB	9,00 aB

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup> Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Tabela 7 - Efeito de diferentes concentrações do ácido cafeico sobre a esporulação do fungo *A. parasiticus* em diferentes períodos de avaliação. Lavras, MG, 2005.

Concentrações de ácido cafeico (%)	Dias		
	7	14	21
0,0	100,50 10 <sup>6</sup> aA	163,90 10 <sup>6</sup> aB	147,40 10 <sup>6</sup> aB
0,5	108,80 10 <sup>6</sup> aA	138,80 10 <sup>6</sup> aA	205,10 10 <sup>6</sup> bB
0,8	121,20 10 <sup>6</sup> aA	146,20 10 <sup>6</sup> aA	120,00 10 <sup>6</sup> aA
1,5	97,70 10 <sup>6</sup> aA	149,60 10 <sup>6</sup> aA	649,00 10 <sup>6</sup> aA
2,0	77,80 10 <sup>6</sup> aA	147,70 10 <sup>6</sup> aB	164,80 10 <sup>6</sup> aB

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup> Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Verifica-se, que durante a fase inicial de crescimento do fungo ocorreu uma tendência de inibição, mas tal tendência não confirmou-se nos períodos subseqüentes da pesquisa, quando os efeitos do ácido cafeico sobre o crescimento micelial e esporulação do fungo foram nulos Tabela 7.

Com relação à síntese de aflatoxina B1 (Tabela 8) verificou-se que o ácido cafeico inibiu totalmente a síntese da micotoxina a partir da concentração de 0,5%, que é a concentração que normalmente ocorre em *Coffea arabica* L.

Tabela 8 - Produção de ocratoxina A (OTA) e aflatoxinas em meio contendo diferentes concentrações de ácido cafeico. Lavras-MG, 2005.

Concentrações de Ácido cafeico (%)	<sup>1</sup> Ocratoxina A	<sup>2</sup> Aflatoxina
0,25	+++	+
0,50	+++	0
0,75	+++	0
1,00	++	0
0,00	+	++
Padrão de aflatoxina B1	++	-

<sup>1</sup> Determinação pelo método de Plug Agar (Frisvard e Filtenborg, 1980)

<sup>2</sup> Determinação pelo método de Coconut Agar Media (Lin & Dianese, 1976)

## Conclusões

Os resultados justificam a inexistência do problema de aflatoxinas e os baixos níveis de OTA detectados em café, confirmando ser estes grãos substrato quimicamente adverso ao desenvolvimento dos fungos *A. ochraceus* e *A. parasiticus* potencialmente produtores dessas micotoxinas.

Confirmou-se a ação inibitória parcial (dose dependente) da cafeína sobre o desenvolvimento micelial e esporulação do fungo *Aspergillus ochraceus*.

A síntese de OTA foi inibida totalmente nas concentrações a 1,5% e 2,0% e muito reduzida nas concentrações de 0,5% e 0,8% de cafeína.

A cafeína inibiu totalmente o crescimento micelial e esporulação do fungo *Aspergillus parasiticus* potencialmente produtor de aflatoxinas.

O ácido cafeico teve pequeno efeito sobre o crescimento micelial e esporulação do fungo *A.ochraceus* e não inibiu a síntese de OTA, estimulando-as nas concentrações 0,25%; 0,50% e 0,75%.

O ácido cafeico não inibiu o crescimento micelial e esporulação do fungo *A. parasiticus*, mas inibiu totalmente a síntese de aflatoxina B1 a partir da concentração de 0,5% que normalmente ocorre em *Coffea arabica* L.

## Referências Bibliográficas

- BATISTA, L.R. **Identificação, potencial toxigênico e produção de micotoxinas de fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica* L.)**. 2000. 188p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BATISTA, L.R. **Incidência de fungos e ocratoxina A em grãos de café (*Coffea arabica* L.) submetidos aos métodos de pré-processamento via seca e via úmida**. 2005.231p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BUCHANAN, R.L.; HOOVER, D.G.; JONES, S.B. Caffeine inhibition of aflatoxin production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.46, n°5, p.1193-1200, May 1983.
- BUCHANAN, R.L.; TICE, G & MARINO, D. Caffeine inhibition of ochratoxin A production. **Journal of Food Science**, v.47, p.319-321, 1981.
- BUCHANAN,R.L. & FLETCHER,A.M. Methylxanthine inhibition of aflatoxin production. **Journal Food Science**, v.43, p.654-655, 1978.
- BUCHELI, P. & TANIWAKI, M. H. Research on the origin and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. **Food Additives and Contaminants**, 2002, v.19, n°7, p.655-665.
- CAVIN, C., HOLZHAUSER, D., SCHARF, G., CONSTABLE, A., HUBBER, W.W. E SCHILTER, B. Cafestol and Kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**. Vol.40, p. 1155-1163, 2002.
- CHALFOUN, S.M.; PEREIRA, M.C. & ANGÉLICO, C.L. Efeito da cafeína (1,3,7-trimethylxanthina) sobre o crescimento micelial de fungos associados ao café. **Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa-ESPECIAL-(1):50-53, 2000.
- FILTENBORG, O., FRISVAD, I.C. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, London, v.13, n.3, p. 128-130, 1980.
- FILTENBORG, O., FRISVAD, J.C; THRANE, U. Mould in food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.33, p.85-102, nov.1996. KROGH, P.; HALD, B.; PLESTINA, R.AND CEOVIC, S. Balkan (endemic) nephropathy and foodborne ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs, **Acta Pathologica Microbiol. Scandnavia**, Sect. (B) 85, p.238-240, 1977.
- LEVI, C. P. Mycotoxins in coffee. **Journal of the Association Official Analytical Chemistry**, Washigton, v.63, n.6, p.1282-1285, june 1980.
- LIN, M.T. & DIANESE, J.C. A coconut-Agar Medium- rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus spp*. **Phytopathology**, v. 66, p. 1466-1469, 1976.
- NARTOWICZ, BUCHANAN & SEGAL. Aflatoxin production in regular and decaffeinated coffee beans. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, n.2, p. 446-448, 1979.