

## EFEITO DA CAFEÍNA SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DE FUNGOS ASSOCIADOS AO CAFÉ E PRODUÇÃO DE TOXINAS

CHALFOUN, S.M.<sup>1</sup>; PEREIRA, M.C.<sup>2</sup>; BATISTA, L.R.<sup>3</sup> e ANGÉLICO, C.L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>EPAMIG/EcoCentro, Lavras-MG; <sup>2</sup>Bolsista CBNP&D/Café; <sup>3</sup>UFLA, Lavras-MG; <chalfoun@ufla.br>

**RESUMO:** O efeito de diferentes concentrações (0,0%, 0,5%, 0,8%, 1,0% e 2,0%) de cafeína (1,3,7-trimethylxantina) sobre o crescimento micelial, a esporulação e a produção de toxinas (aflatoxinas e ocratoxina) por dois isolados toxigênicos dos fungos *Aspergillus ochraceus* (EcoCentro 1161T01-01) e *Aspergillus flavus* (EcoCentro 1011T02-01) foi determinado. Verificou-se elevada correlação entre as concentrações testadas de cafeína e inibição do desenvolvimento dos fungos (crescimento micelial e esporulação) e produção de toxinas. A ação inibidora da cafeína sobre os fungos testados e sobre a síntese de toxinas indicou que este componente do café exerce atividade biológica contra uma variedade de fungos, inclusive os toxigênicos, e sobre a produção de toxinas.

**Palavras-chave:** *Coffea arabica* L., cafeína, fungo, toxina.

## EFFECT OF CAFFEINE ON MYCELIAL GROWTH OF FUNGI ASSOCIATED WITH COFFEE AND TOXIN PRODUCTION

**ABSTRACT:** The effect of different concentrations (0,0%; 0,5%; 0,8%; 1,0% and 2,0%) of caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) on the micelial growth, sporulation and toxin production (aflatoxins and ochratoxin) by two toxigenic fungi isolates *Aspergillus ochraceus* (EcoCentro 1161T01-01) and *Aspergillus flavus* (EcoCentro 1011T02-01), was determined. It was observed a high correlation between the different caffeine concentrations tested and fungi development (mycelial growth and sporulation) and inhibition of toxin production. The inhibitory action of caffeine on the tested fungi and on toxin production indicated that this coffee compound has a biological activity against a variety of fungi including the toxigenic ones and on mycotoxins production.

**Key words:** *Coffea arabica* L., caffeine, fungal, toxin.

## INTRODUÇÃO

Recentemente, a preocupação quanto à presença de micotoxinas tem conduzido a determinação de níveis desses compostos nos alimentos, devido aos efeitos deletérios exercidos por estes metabólitos sobre a saúde humana e animal. Embora alguns fungos com potencial toxigênico encontrem-se associados a frutos e grãos de café em diferentes fases de cultivo, preparo e armazenamento, os níveis de micotoxinas detectados em amostras analisadas têm sido muito baixos. Uma das razões para esses baixos níveis de contaminação tem sido o efeito inibidor da cafeína sobre o desenvolvimento de fungos toxigênicos e sobre a produção de micotoxinas (Buchanan et al., 1983b). Devem-se considerar ainda as possibilidades de que, embora a cafeína possa inibir a produção de aflatoxina, ocratoxina e o crescimento dos fungos, os dois processos podem não estar diretamente relacionados (Buchanan et al., 1983a) e de que existe uma relação entre a esporulação de alguns fungos e produção de toxinas, em razão de os dois fenômenos estarem associados (Guzmán-de-Pena & Ruiz-Herrera, 1997). Considerando que a atividade inibidora da cafeína sobre desenvolvimento dos fungos e a produção de metabólitos parece ser altamente específica, justificase testar isolados de fungos associados ao café obtidos em diferentes regiões ou locais, visando determinar o desenvolvimento e a produção de micotoxinas quando expostos a diferentes concentrações de cafeína.

## MATERIAL E MÉTODOS

Culturas puras dos fungos *Aspergillus ochraceus* (EcoCentro1161T01-01) e *Aspergillus flavus* (EcoCentro 1011T02-01) foram obtidas partindo-se de grãos de café beneficiados, provenientes de lavouras localizadas na região Sul do Estado de Minas Gerais.

**Avaliação do crescimento micelial e da esporulação.** O crescimento micelial dos fungos foi estudado utilizando-se placas de Petri contendo o meio YES (Yeast Extract Sucrose agar) suplementado com cafeína nas concentrações de 0,0%, 0,5%, 0,8%, 1,0% e 2,0%. Os isolados foram plaqueados com palitos de madeira esterilizados em três pontos equidistantes e mantidos em incubadora com temperatura controlada a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Os tratamentos foram efetuados em três repetições, cada uma constituída de uma placa de Petri. Após 7, 14 e 21 dias, as culturas foram avaliadas de acordo com o crescimento micelial e a esporulação, através da medição das colônias em dois diâmetros ortogonais e da contagem dos esporos em câmara de Newbauer. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, constando de 10 tratamentos, constituídos de cinco doses de cafeína (0%, 0,5%, 0,8%, 1,0% e 2,0%) e três datas de observação (7, 14 e 21 dias), para crescimento micelial e esporulação. Os resultados médios obtidos foram comparados através da aplicação do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Avaliação da cafeína sobre a produção de ocratoxina A e aflatoxina através do teste de Plug Agar.** Foi avaliado o efeito da cafeína sobre a produção de aflatoxina e ocratoxina A em fungos isolados em meio de cultura YES, incubados por 7, 14 e 21 dias a 25-26°C. Com o auxílio de uma ponteira de pipeta automática, foi feito um corte circular de aproximadamente 25 mm dos micélios dos fungos, e estes micélios foram colocados sobre uma placa de CCD (Merk-Sílica Gel 60, 20x20) previamente ativada, um ao lado do outro, a 1,5 cm de distância. A seguir, foi feita a eluição em uma cuba de vidro contendo como fase móvel TEF – Tolueno, Acetato de Etila e Ácido fórmico 90% (50:40:10). Após a eluição, as placas foram secas em capela de fluxo. A confirmação foi feita em luz ultravioleta com  $\lambda$  366 nm, em cromatovisor CAMAG (UV-BETRACHTER). A intensidade da fluorescência foi expressa em símbolo (+) adotado subjetivamente; os que apresentaram a fluorescência mais intensa receberam a nota (+++); fluorescência mediana (++); menor fluorescência (+); e (ND) para os que não apresentaram a fluorescência característica da produção de ocratoxina A e aflatoxinas B1 e B2.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que, com relação ao crescimento micelial, conforme representado nas Tabelas 1 a 3, os isolados de *A. ochraceus* e *A. flavus* foram, de maneira geral, inibidos pelas diferentes concentrações de cafeína nos três períodos estudados: 7, 14 e 21 dias após a instalação do experimento. A esporulação dos fungos, de maneira semelhante ao crescimento micelial, sofreu significativos decréscimos nas concentrações testadas de cafeína, conforme demonstrado nas mesmas tabelas. Observa-se, ainda, elevada correlação entre os períodos estudados (7, 14 e 21 dias) e crescimento micelial e esporulação (Figuras 1 e 2). O tratamento testemunha (0% de cafeína) apresentou crescimento micelial elevado a partir da data de instalação do experimento, atingindo crescimento máximo 21 dias após para os dois fungos testados. Com relação aos tratamentos constituídos das diferentes concentrações de cafeína, observou-se tendência de maior crescimento micelial aos 21 dias, principalmente nas concentrações de 0,5% e 0,8% de cafeína, com um crescimento micelial menos elevado nas concentrações de 1% e 2% de cafeína. Esse comportamento foi semelhante tanto para o isolado de *A. ochraceus* como para o isolado de *A. flavus*. Com referência à esporulação (Figuras 1 e 2), observou-se, da mesma forma com relação ao crescimento micelial, elevada correlação entre os períodos estudados e a esporulação tanto para o isolado nº EcoCentro 1161T01-01 do fungo *A. ochraceus* quanto para o isolado nº EcoCentro 1011T02-01 *A. flavus*. Para o caso do isolado de *A. ochraceus*, observou-se que a testemunha apresentou elevado número de esporos a partir de 14 dias da inoculação, e o isolado de *A. flavus* apresentou elevado número de esporos já a partir dos sete dias da

instalação do experimento. Com relação às diferentes concentrações, observou-se, de forma semelhante à do crescimento micelial, redução no acréscimo da esporulação nas maiores concentrações testadas de cafeína (1,0% e 2,0%).

**Tabela 1** - Efeitos da cafeína sobre crescimento micelial (CM) e esporulação (E) de isolados dos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus flavus* aos 7 dias após a inoculação

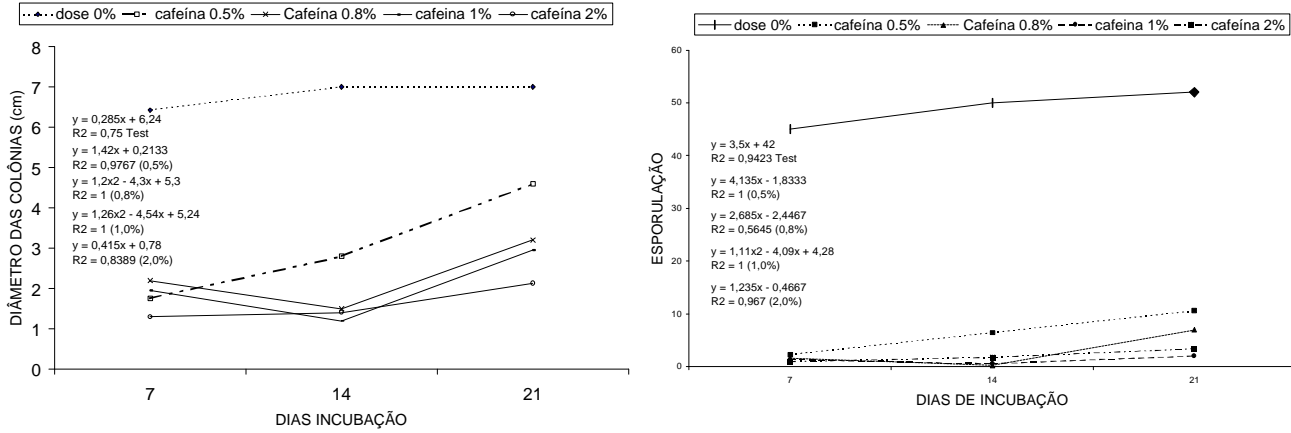
Concentração de cafeína (%)	<i>Aspergillus ochraceus</i>		<i>Aspergillus flavus</i>	
	CM	E	CM	E
0,0	28,0 a	4,3 a	6,4 a	52,0 a
0,5	1,7 ab	3,8 a	2,2 b	2,3 b
0,8	1,6 b	2,2 a	2,0 b	1,6 b
1,0	1,4 b	1,4 a	1,8 b	1,3 b
2,0	1,4 b	1,3 a	1,3 b	0,7 b
DMS Tukey, 5%	1,38	4,38	1,21	26,10
CV%	25,7	59,2	15,71	80,02

**Tabela 2** - Efeitos da cafeína sobre crescimento micelial (CM) e esporulação (E) de isolados dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* aos 14 dias após a inoculação

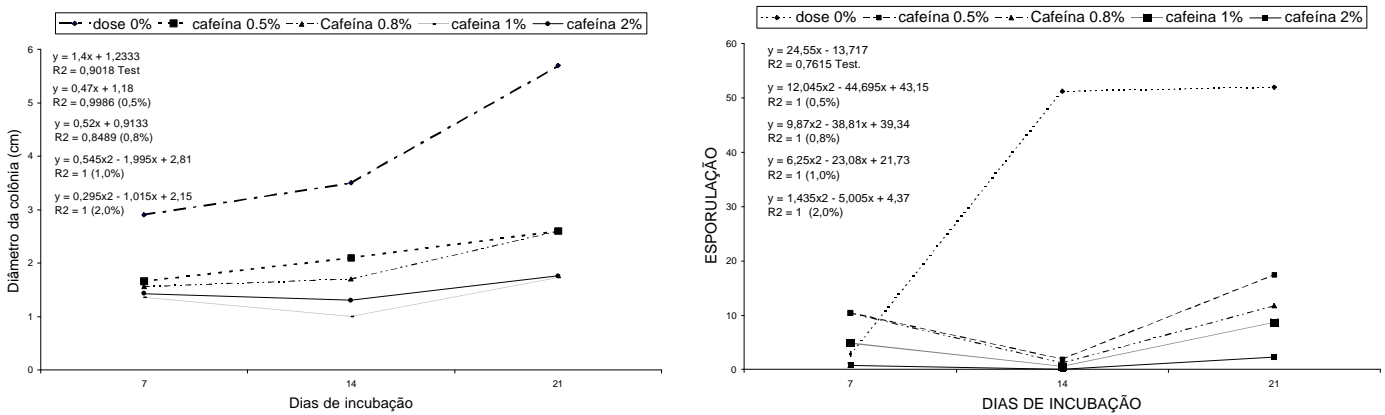
Concentração de cafeína (%)	<i>Aspergillus ochraceus</i>		<i>Aspergillus flavus</i>	
	CM	E	CM	E
0,0	3,6	51,3 a	6,4 a	52,0 a
0,5	2,2	2,0 b	2,2 b	2,3 b
0,8	1,7	0,8 b	2,0 b	1,6 b
1,0	1,3	0,2 b	1,8 b	1,3 b
2,0	1,0	0,1 b	1,3 b	0,7 b
DMS Tukey, 5%	1,29	4,38	1,21	26,10
CV%	53,81	61,10	15,71	80,02

**Tabela 3** - Efeitos da cafeína sobre crescimento micelial (CM) e esporulação (E) de isolados dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus* aos 21 dias após a inoculação

Concentração de cafeína (%)	<i>Aspergillus ochraceus</i>		<i>Aspergillus flavus</i>	
	CM	E	CM	E
0,0	5,7 a	51,2 a	7,0 a	52,0 a
0,5	3,0 b	18,8 b	4,6 ab	10,6 b
0,8	2,6 b	6,2c	3,2 b	7,0 b
1,0	1,7 b	3,8 c	3,0 b	3,4 b
2,0	1,7 b	2,9 c	2,1 b	2,0 b
DMS Tukey, 5%	1,38	4,38	2,55	21,37
CV%	28,9	14,42	22,64	50,54



**Figura 1** - Efeito das concentrações de cafeína sobre crescimento micelial e esporulação do fungo *Aspergillus flavus* (EcoCentro1011T02-01).



**Figura 2** - Efeito das concentrações de cafeína sobre crescimento micelial e esporulação do fungo *Aspergillus ochraceus* (EcoCentro1161T01-01).

**Tabela 4** - Resultados da adição de diferentes concentrações (0,0%, 0,5%, 0,8%, 1,0% e 2,0%) de cafeína em meio de cultura YES sobre a produção de ocratoxina A e aflatoxinas B1 e B2 pela técnica de Plug Agar

DIAS	<i>Aspergillus ochraceus</i>					<i>Aspergillus flavus</i>				
	Ocratoxina A Teste	0,5	0,8	1,0	2,0	Aflatoxina B1 e B2 Teste	0,5	0,8	1,0	2,0
7	+	ND	ND	ND	ND	+++	++	++	+	ND
14	+	ND	ND	ND	ND	++	+	+	ND	ND
21	+	ND	ND	ND	ND	+++	+++	+++	+	+

No que se refere à produção de toxinas estimada pelo teste Plug Agar (Tabela 4), observa-se que os fungos apresentaram sensível redução na síntese de toxinas quando submetidos à presença de doses crescentes de cafeína; nas concentrações de 1% e 2% de cafeína, normalmente presentes em cafeeiros das espécies arábica e robusta, não foi observada a presença de *spots* fluorescentes correspondentes à presença das toxinas para o isolado do fungo *A. ochraceus* e em menor intensidade (+) para o isolado do fungo *A. flavus*.

Observou-se, ainda, indicação de um potencial mais elevado de produção de aflatoxina pelo isolado do fungo *A. flavus* revelado por uma fluorescência mais elevada (+++), em relação ao isolado de *A. ochraceus* (+), embora mesmo nessas condições a cafeína tenha efeito antiaflatoxigênico através da redução da produção de aflatoxinas, principalmente nas concentrações de 1% e 2% de cafeína. Quanto à ocratoxina A, todas as concentrações testadas de cafeína exerceram efeito inibidor total sobre a produção desta toxina. O maior potencial toxigênico do isolado de *A. flavus* e a maior esporulação do fungo concordam com a afirmativa de Guzmán-de-Peña e Ruiz-Herrera (1997), segundo os quais os dois fenômenos encontram-se associados.

## CONCLUSÕES

A ação inibidora da cafeína sobre o desenvolvimento dos fungos testados confirmou que este componente do café pode exercer uma atividade biológica contra uma variedade de fungos, inclusive os toxigênicos, e sobre a produção de micotoxinas.

A descafeinação do café pode permitir maior desenvolvimento dos fungos, aumentando o potencial de produção de metabólitos, entre eles as micotoxinas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUCHANAN, R.L., HARRY, M.A. & GEALT, M.A. Caffeine inhibition of steigmatocystin, citrinin, and patulin production, **Journal of Food Science**, 48: 1226-1228. 1983a.

BUCHANAN, R.L., HOOVER, D.G. & JONES, S.B. Caffeine inhibition of afltoxin production: Mode of action. **Applied Environmental Microbiology**, 46: 1193-1200. 1983 b.

GUZMÁN-de-PEÑA, D. & RUIZ-HERRERA, J. Relationship between aflatoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus parasiticus*. **Fungal Genetics and Biology**, 21: 198-205. 1997.