

# Atividade antifúngica, *in vitro*, do óleo de café verde

## *Antifungal activity, in vitro, of the green coffee oil*

Virgínia Guerra Elizei<sup>1\*</sup>, Sara Maria Chalfoun<sup>1</sup>, Deila Magna dos Santos Botelho<sup>1</sup>, Pedro Paulo Reis Rebelles<sup>2</sup>

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do contato direto e da fração volátil do óleo de café verde, testado nas concentrações de 500, 1.000, 1.500 e 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , sobre o crescimento micelial e a esporulação dos fungos *Penicillium roqueforti* e *Rhizopus stolonifer*. O óleo essencial de cravo-da-índia na concentração de 800  $\mu\text{L L}^{-1}$  foi utilizado para comparação. Nas concentrações de 1.500 e 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , o óleo de café verde em contato direto proporcionou redução da esporulação do fungo *R. stolonifer*, sendo estatisticamente semelhante ao óleo de cravo-da-índia. Na fração volátil do óleo de café verde, observou-se redução significativa da esporulação de *P. roqueforti* e *R. stolonifer* na concentração de 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . O óleo de café verde, em contato direto ou por volatilização, reduziu significativamente o crescimento micelial e a esporulação de ambos os fungos em comparação com a testemunha.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Penicillium roqueforti*; *Rhizopus stolonifer*; óleo de cravo-da-índia.

**ABSTRACT:** The objective of this study was to evaluate the effect of direct contact and volatile fraction of from green coffee oil, tested at concentrations of 500, 1,000, 1,500 and 2,000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , on mycelial growth and sporulation of *Penicillium roqueforti* and *Rhizopus stolonifer*. The essential oil of clove at a concentration of 800  $\mu\text{L L}^{-1}$  was used for comparison. At concentrations of 1,500 and 2,000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , the green coffee oil in direct contact caused a reduction of sporulation for *R. stolonifer*, similar to clove oil. In the volatile fraction of the green coffee oil, there was a significant reduction in sporulation of *P. roqueforti* and *R. stolonifer* at a concentration of 2,000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . The green coffee oil, in direct contact or by volatilization, significantly reduced the mycelial growth and sporulation of both fungi compared to the control.

**KEYWORDS:** *Penicillium roqueforti*; *Rhizopus stolonifer*; oil clove.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras (UFLA) – Lavras (MG), Brasil.

<sup>2</sup>Empresa de Testes de Produtos Fitossanitários em Agricultura CROTEST – Lavras (MG), Brasil.

\*Autor correspondente: vi.elizei@gmail.com

Recebido em: 27/11/2013. Aceito em: 03/11/2015

O fungo *Penicillium roqueforti*, comumente encontrado em silagem e grãos, pode produzir diversas micotoxinas, como roquefortina C, isofumigaclavina A e B, toxina PR e ácido micofenólico, que podem causar tanto perdas econômicas quanto afetar a saúde humana (CHITARRA *et al.*, 2003). Adicionalmente, o fungo *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb: Fr). Vuill, agente causal da podridão pós-colheita em diversos legumes e frutas (STEVENS *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2007), também é responsável por expressivas perdas econômicas no setor agrícola. Os tratamentos comumente utilizados para controle de fungos em alimentos são os tratamentos térmicos ou químicos (SAMSON *et al.*, 1995; PITT; HOCHING, 1997). Com isso, a procura por novos agentes antimicrobianos, a partir de plantas, é intensa devido à resistência dos microrganismos diante de produtos sintéticos (ARAÚJO, 2005).

O uso intensivo de agroquímicos para controlar doenças em plantas e frutos vem causando prejuízos ao meio ambiente e selecionando espécies de fungos com resistência a fungicidas. Isso justifica, portanto, a busca por métodos alternativos de controle, no qual se incluem o controle biológico e a indução de resistência em plantas pelo uso de extratos vegetais e óleos essenciais, entre outros (STANGARLIN *et al.*, 1999; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005).

Diversos estudos têm comprovado o efeito de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais quanto a sua capacidade de controlar doenças em plantas, tanto por sua atividade antimicrobiana direta quanto indireta (CHAO; YOUNG, 2000; FIORI *et al.*, 2000; BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004).

O óleo de café verde é constituído por triacilgliceróis (75%), matéria insaponificável (13,54%) e ceras (0,24%) (WAGEMAKER *et al.*, 2012). Esse óleo possui propriedades cosméticas (SPEER; KOLLING-SPEER, 2006), com efeitos antioxidantes e antimicrobianos avaliados em formulações cosméticas (WAGEMAKER *et al.*, 2012). Contudo, estudos da atividade antimicrobiana desse óleo em fungos de importância agrícola são escassos. Dessa forma, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* do óleo de café verde em dois métodos de aplicação (efeito volátil e contato direto) sobre o crescimento micelial e a esporulação dos fungos *P. roqueforti* e *R. stolonifer*.

As sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.), cultivar Mundo Novo 376-4, utilizadas para obtenção do óleo de café foram obtidas na Fazenda Experimental de Três Pontas (MG) pertencente à Empresa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG). O óleo essencial de café verde foi obtido por prensagem hidráulica e foi filtrado por membranas Millipore®. As concentrações testadas foram de 0, 500, 1.000, 1.500 e 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . O óleo essencial de cravo-da-índia na concentração de 800  $\mu\text{L L}^{-1}$  foi usado como tratamento padrão, uma vez que sua eficácia foi comprovada no controle de *Penicillium* spp. (SOUZA *et al.*, 2004).

Para a avaliação do efeito de contato, as diluições do óleo foram feitas diretamente em 100 mL de meio de cultura BDA. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de suspensão de esporos, de cada fungo estudado, padronizada para a concentração de  $10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ , foi adicionada ao meio de cultura, sendo a mistura homogeneizada e posteriormente vertida em placas de Petri de 9 cm de diâmetro.

O teste de princípios ativos voláteis às diluições do óleo de café verde foi realizado em álcool etílico hidratado de cereais nas concentrações de 500, 1.000, 1.500 e 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Foram utilizados discos de papel de filtro esterilizados (5 mm de diâmetro), os quais foram embebidos nas soluções de óleo de café verde diluído nas concentrações citadas e colocados na tampa das placas de Petri. Posteriormente, as placas foram vedadas utilizando filme plástico para impedir que os princípios voláteis dos óleos fossem perdidos. O álcool de cereais, utilizado na diluição do óleo, foi testado como controle negativo. As placas de ambos os experimentos foram incubadas em estufa BOD a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas pelo período de 7 dias.

Para a avaliação do crescimento micelial (cm/dia), foram realizadas medições do diâmetro das colônias, em dois eixos perpendiculares entre si, aos sete dias após a instalação do experimento.

A quantificação da esporulação dos fungos, também realizada aos 7 dias após a instalação do experimento, foi realizada com a raspagem das colônias com pincel (15 mL de água destilada esterilizada/placa), filtragem em gaze esterilizada e quantificação dos conídios obtidos utilizando câmara de Neubauer.

O experimento para verificar o efeito de contato direto do óleo de café verde foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com 6 tratamentos (óleo de café verde nas concentrações de 0, 500, 1.000, 1.500 e 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  e óleo essencial de cravo-da-índia na concentração de 800  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) e 4 repetições, sendo cada placa de Petri considerada uma unidade experimental. Para avaliação do efeito da fração volátil do óleo, o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 7 tratamentos (óleo de café verde nas concentrações de 0, 500, 1.000, 1.500 e 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , óleo essencial de cravo-da-índia na concentração de 800  $\mu\text{L L}^{-1}$  e álcool de cereais) e 4 repetições. As análises foram feitas usando o pacote estatístico Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados — Sisvar, e as medias foram comparadas pelo teste Scott & Knott a 5% de significância.

Não se observou efeito de contato direto do óleo de café verde sobre a inibição do desenvolvimento micelial de ambos os fungos testados. Contudo, a ação do óleo reduziu significativamente a esporulação tanto do fungo *P. roqueforti* quanto do fungo *R. stolonifer* (Figs. 1A e 1B). O óleo de cravo-da-índia na concentração de 800  $\mu\text{L L}^{-1}$  apresentou redução de 95% na esporulação do fungo *P. roqueforti*, sendo o tratamento

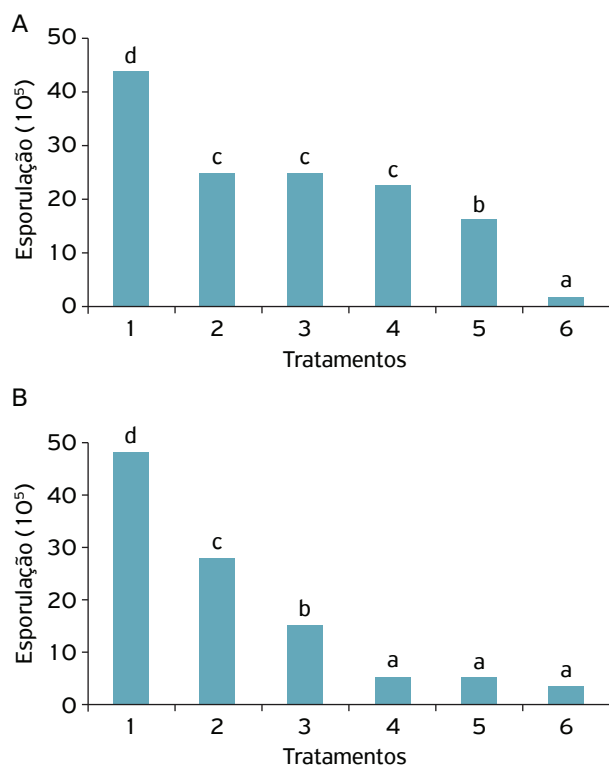
mais eficaz. A concentração de 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo de café foi a mais efetiva, dentre as concentrações testadas, apresentando redução na esporulação de 63%, quando comparada ao tratamento controle (Fig. 1A). As demais concentrações testadas diferiram somente do tratamento controle.

A esporulação do fungo *R. stolonifer* foi significativamente reduzida nos tratamentos com a aplicação do óleo de café verde nas concentrações de 1.500 e 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  e óleo de cravo-da-índia, sendo os tratamentos mais eficazes (Fig. 1B). COSTA *et al.* (2011) constataram que o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou atividade fungicida na concentração de 0,15% sobre o crescimento de *R. solani*, *F. oxysporum* e *F. solani*. A avaliação microscópica dos micélio dos fungos evidenciou diversas alterações morfológicas, como presença de vacúolos, desorganização dos conteúdos celulares, diminuição na nitidez da parede celular, intensa fragmentação e menor turgência das hifas.

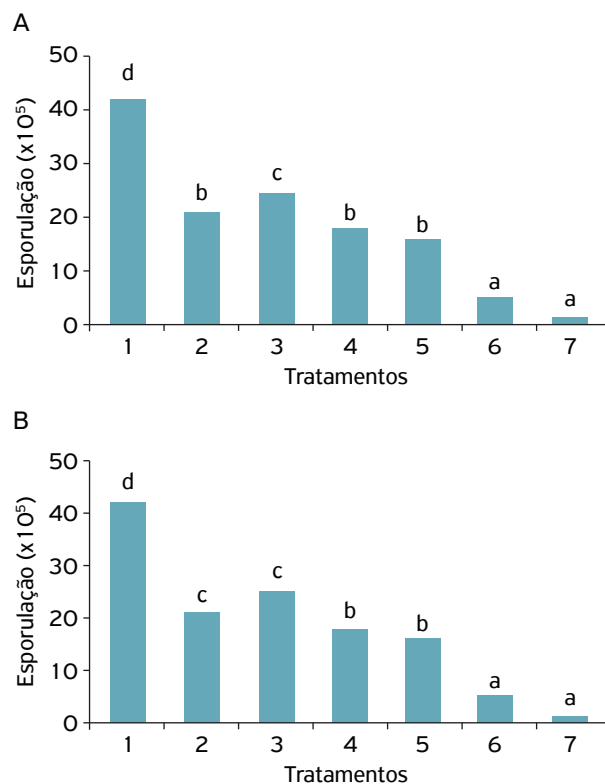
Com relação ao efeito da fração volátil do óleo de café verde, observou-se que, assim como efeito de contato direto, somente a esporulação foi influenciada pela aplicação dos

óleos. Para o fungo *P. roqueforti*, observou-se redução da variável estudada somente para a maior concentração testada de óleo de café verde, 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , não diferindo do óleo de cravo-da-índia (Fig. 2A). As concentrações de 1.000 e 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$  apresentaram efeito semelhante ao controle negativo (álcool de cereais). Assim como observado para o fungo *P. roqueforti*, o óleo de café verde na concentração de 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  reduziu significativamente a esporulação do fungo *R. stolonifer*, sendo semelhante à aplicação do óleo de cravo-da-índia (Fig. 2B).

Durante a extração do óleo de café verde, compostos fenólicos possivelmente foram extraídos juntamente. Os ácidos clorogênicos e compostos relacionados são os principais componentes da fração fenólica dos grãos de café verde, alcançando teores de até 14% (em massa de matéria seca) (FARAH; DONANGELO, 2006). Nas plantas, os ácidos clorogênicos e outros compostos fenólicos participam de uma série de funções biológicas, como na resistência a pragas e doenças, resposta à seca e proteção contra a radiação solar (MONDOLOTT *et al.*, 2006).



**Figura 1.** Efeito do óleo de café verde misturado ao meio de cultura (contato direto) na redução da esporulação de *Penicillium roqueforti* (A) e *Rhizopus stolonifer* (B). Tratamentos: 1) controle; 2) óleo de café verde (OC) 500  $\mu\text{L L}^{-1}$ ; 3) OC 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ; 4) OC 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$ ; 5) OC 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ; 6) óleo essencial de cravo-da-índia 800  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Letras distintas representam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



**Figura 2.** Efeito da fração volátil do óleo de café verde na redução da esporulação de *Penicillium roqueforti* (A) e *Rhizopus stolonifer* (B). Tratamentos: 1) controle; 2) álcool; 3) óleo de café verde (OC) 500  $\mu\text{L L}^{-1}$ ; 4) OC 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ; 5) OC 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$ ; 6) OC 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ; 7) óleo essencial de cravo-da-índia 800  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Letras distintas representam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

---

**REFERÊNCIAS**

- ARAÚJO, R.C.Z. *Embalagens ativas com ervas aromáticas e condimentos na conservação de pães artesanais*. 2005. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- BARA, M.T.F.; AMARAL, M.F.Z.J. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. *Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento*, v.2, p.5-8, 2005.
- BASTOS, C.N.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Efeito do óleo de Piper aduncum no controle em pós-colheita de Colletotrichum musae em banana. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, n.5, p.555-557, 2004.
- CHAO, S.C.; YOUNG, D.G. Screening for inhibitory activity of essential oils ou selected bacteria, fungi and viruses. *Journal Essentials Oil Research*, v.12, n.4, p.630-649, 2000.
- CHITARRA, G.S.; BREEUWER, P.; NOUT, M.J.; van AELST, A.C.; ROMBOUTS, F.M.; ABEE, T. An antifungal compound produced by Bacillus subtilis YM 10-20 inhibits germination of Penicillium roqueforti conidiospores. *Journal of Applied Microbiology*, v.94, p.159-166, 2003.
- COSTA, A.R.T.; AMARAL, M.F.Z.J.; MARTINS, P.M.; PAULA, J.A.M.; FIUZA, T.S.; TRESVENZOL, L.M.F.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Ação do óleo essencial de Syzygium aromaticum (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.13, n.2, p.240-245, 2011.
- FARAG, R.S.; DAW, Z.Y.; ABO-RAYA, S.H. Influence of Some Spice Essential Oils on Aspergillus Parasiticus Growth and Production of Aflatoxins in a Synthetic Medium. *Journal of Food Science*, v.54, n.1, p.54-74, 1989.
- FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v.18, p.1, p.23-36, 2006.
- FIORI, A.C.G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; VIDA, J.B.; SCAPIM, C.A.; CRUZ, M.E.S.; PASCHOLATI, S.F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against Didymella bryoniae. *Journal Phytopathology*, v.148, n.7-8, p.483-487, 2000.
- MONDOLOT, L.; LA FISCA, P.; BUATOIS, B.; TALANSIER, E.; DE KOCHKO, A.; CAMPA, C. Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during coffea canephora leaf development. *Annals of Botany*, v.98, p.33-40, 2006.
- PITT, J.I.; HOCHING, A.D. *Fungi and food spoilage*. London: Blackie Academic and Professional; 1997.
- SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. *Introduction to food-borne fungi*. Baarn, the Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 1995.
- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba: Fealq; 2005. p.125-132.
- SOUZA, S.M.C.; PEREIRA, M.C.; ANGÉLICO, C.L.; PIMENTA, C.J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. *Ciência e Agrotecnologia*, v.28, n.3, p.685-690, 2004.
- SPEER, K.; KOLLING-SPEER. The lipid fraction of the coffee bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v.18, n.1, p.201-216, 2006.
- STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biotecnologia Ciência @ Desenvolvimento*, v.2, n.11, p.16-24, 1999.
- STEVENS, C.; LIU, J.; KHAN, V.A.; LU, J.Y.; KABWE, M.K.; WILSON, C.L. The effects of low-dose ultraviolet light-C treatment on polygalacturonase activity, delay ripening and Rhizopus soft rot development of tomatoes. *Crop Protection*, v.23, p.551-555, 2004.
- WAGEMAKER, T.A.L.; FERNANDES, A.S.; CAMPOS, P.M.; RODRIGUES, L.M.; RIJO, P. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of green coffee oil in cosmetic formulations. *Biomedical and Biopharmaceutical Research Journal*, v.9, n.2, p.207-214, 2012.
- ZHANG, Y.; BAO, F.; HU, J.; LIANG, S.; ZHANG, Y.; DU, G.; ZHANG, C.; CHENG, Y. Antibacterial lignans and triterpenoids from Rostellularia procumbens. *Planta Medica*, v.73, n.15, p.1596-1599, 2007.