

## **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS VEGETAIS CONTRA O FUNGO *Aspergillus ochraceus* WILHELM. EM *Coffea arabica* L.**

Luciana P.Souza<sup>1</sup>, Sara M. Chalfoun<sup>2</sup>, Denilson F. Oliveira<sup>3</sup>, Deila Magna dos Santos Botelho<sup>4</sup>, Douglas A. Carvalho<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Mestranda-Departamento de Biologia-UFLA, [lusouzabermejo@gmail.com](mailto:lusouzabermejo@gmail.com)

<sup>2</sup> Pesquisadora, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais-EPAMIG, [chalfoun@ufla.br](mailto:chalfoun@ufla.br)

<sup>3</sup> Prof. Departamento de Química – UFLA, [denilson@ufla.br](mailto:denilson@ufla.br)

<sup>4</sup> Bolsista CBP&D/Café, [deilmagna@hotmail.com](mailto:deilmagna@hotmail.com)

<sup>5</sup> Prof. Departamento de Biologia-UFLA, [douglasc@ufla.br](mailto:douglasc@ufla.br)

**RESUMO:** A contaminação de grãos de café pelo fungo *Aspergillus ochraceus* Wilhelm. potencialmente produtor de ocratoxina A (OTA), além de constituir-se em um problema de saúde pública, pode vir a constituir-se em uma barreira não tarifária para as exportações, já que o limite de aceitação da presença de OTA é de 5ppb. Uma das possíveis formas de controlar tal problema consiste no uso de defensivos alternativos, não prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente. Logo, objetivou-se neste trabalho identificar espécies vegetais potencialmente úteis para emprego no desenvolvimento de métodos para o controle de *A. ochraceus*. Foram testados 150 extratos vegetais sendo que vinte e nove deles se mostraram com potencial para o desenvolvimento de métodos de controle do fungo *Aspergillus ochraceus* em uma primeira etapa. Em seguida, tais extratos foram submetidos a testes em meio de cultura líquido CYB (Czapeck Yeast Extract sem Agar) para se determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de cada um deles. Observou-se que duas espécies, das famílias Lauraceae e Poaceae, apresentaram CIM de 2003 ppm; uma espécie da família Punicaceae apresentou CIM de 4006 ppm; e todas as outras tiveram CIM igual ou superior a 8012 ppm. Na terceira etapa, os extratos vegetais apresentando CIM igual ou inferior a 8012 ppm foram submetidos a teste com grãos de café inoculados com o fungo. Observou-se que plantas da família Rutaceae apresentam potencial para o desenvolvimento de métodos de controle do fungo *Aspergillus ochraceus* em grãos de café.

**Palavras-chave:** Extrato vegetal, *Aspergillus ochraceus*, café, segurança alimentar.

## **EVALUATION OF THE ACTIVITY ANTIFÚNGICA OF EXTRACTS OF PLANTS AGAINST THE FUNGUS *Aspergillus ochraceus* WILHELM. IN *Coffea arabica* L.**

**ABSTRACT:** The contamination of grains of coffee for the fungus *Aspergillus ochraceus* potentially producing Wilhelm. of ocratoxina A (OTA), besides setting itself up as a problem of public health, can come to be constituted in a barrier not tariff for the exports, since the limit of acceptance of the presence of OTA is of 5ppb. One of the possible forms of controlling such a problem consists of the use of alternative protections, not damaging to the human health and to the environment. Soon, potentially useful vegetable sorts aimed in this work to identify for job in the development of methods for the control of *A. ochraceus*. 150 vegetable extracts were tested being what twenty nine of them showed off with potential for the development of methods of control of the fungus *Aspergillus ochraceus* in a first stage. Next, such extracts were subjected to tests in environment of culture liquid CYB (Czapeck Yeast Extract without Agar) to determine the inhibitory least concentration (CIM) of each one of them. It pointed out to itself that two sorts, of the families Lauraceae and Poaceae, presented CIM of 2003 ppm; a sort of the family Punicaceae presented CIM of 4006 ppm; and all others had CIM equal or superior to 8012 ppm. In the third stage, the vegetable extracts when equal or inferior CIM is presenting to 8012 ppm were subjected to test with grains of coffee inoculated with the fungus. It noticed to itself which plants of the family Rutaceae present potential for the development of methods of control of the fungus *Aspergillus ochraceus* in grains of coffee.

**Key words:** Vegetable extract, *Aspergillus ochraceus*, coffee, food safety.

## INTRODUÇÃO

Com o surgimento de fitopatógenos resistentes a substâncias químicas, utilizadas indiscriminadamente por produtores, pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de identificar formas alternativas de controle de pragas e doenças reduzindo os impactos ambientais e os riscos de intoxicação humana, causados pelo atual modelo de produção agrícola. A qualidade do café pode ser alterada por diversos fatores; dentre estes, a presença de microrganismos nas fases pré e pós-colheita tem importância fundamental no processo de degradação de componentes dos frutos, principalmente açúcares, afetando negativamente a qualidade final do produto. Uma das alternativas viáveis para impedir esse problema é a prevenção da contaminação dos grãos por fungos, durante o processo de produção, pois os frutos estão expostos a uma diversidade de microrganismos, tais como leveduras, fungos, bactérias, que encontrando condições favoráveis para se desenvolver, infectam os grãos. Entre os organismos que compõem a microbiota do café, os fungos filamentosos representam o grupo que pode causar maior dano comprometendo, conseqüentemente, sua qualidade. (Souza & Carvalho, 1997)

A ocorrência da ocratoxina A (OTA) em grãos de café tem gerado grande preocupação no mercado consumidor, em conseqüência de seu potencial hepatotóxico, nefrotóxico, teratogênico e carcinogênico (Sturder-Rhor et al., 1995), podendo comprometer, além da saúde do consumidor, a comercialização do produto. Dentre os microrganismos causadores de tais problemas, destaca-se aqui o fungo *Aspergillus ochraceus* Wilhelm., que é considerado um dos principais responsáveis pela presença de micotoxinas em alimentos. Como medida alternativa de controle de defesa, os extratos vegetais vêm sendo utilizados em estudos visando à redução do uso de fungicidas e com resultados promissores no controle de vários fitopatógenos.

Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto, obtidos a partir de plantas medicinais da flora nativa, têm indicado o potencial das mesmas no controle de doenças do cafeeiro, por sua ação fungitóxica direta inibindo o crescimento micelial e germinação de esporos dos fungos (Schwan-Estrada et al., 2003). Tendo em vista o exposto acima e com o objetivo de desenvolver novos fungicidas de origem vegetal, buscou-se neste trabalho verificar a influência de extratos vegetais no controle de *Aspergillus ochraceus* em *Coffea arabica*.

## MATERIAL E MÉTODOS

A primeira etapa do trabalho consistiu na extração das plantas coletadas no sul do Estado de Minas Gerais com metanol. Após remoção do solvente sob pressão reduzida, os extratos obtidos foram dissolvidos em solução aquosa de Tween 80 a 1% e colocados em contato com esporos de *A. ochraceus*. A suspensão resultante foi adicionada a meio de cultura sólido CYA (Czapek Yeast Extract Agar) e, após 48 h, consideraram-se ativos os extratos que impediram o desenvolvimento do fungo. O experimento foi realizado com três repetições, empregando-se solução de Tween 80 e o fungicida cloreto de benzalcônio como testemunha negativa e positiva, respectivamente. Em uma segunda etapa, tais extratos foram submetidos a testes em meio de cultura líquido CYB (Czapeck Yeast Extract sem Agar) para se determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de cada um deles. Soluções dos extratos em DMSO foram diluídas com o meio de cultura e colocadas em contato com esporos do fungo, em cavidades de placas de polipropileno contendo 96 cavidades de aproximadamente 0,3 mL. Os testes foram feitos em duplicata, empregando-se cloreto de benzalcônio e DMSO como testemunha positiva e negativa, respectivamente. Após 48 h a 25°C, com fotoperíodo de 12 h, consideram-se inibitórias as concentrações de extratos cujas cavidades da placa não apresentaram qualquer desenvolvimento do fungo.

Na terceira etapa, os extratos vegetais apresentando CIM igual ou inferior a 8012 ppm foram submetidos a teste com grãos de café inoculados com o fungo. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com 19 tratamentos e três repetições. Foram testados 17 extratos e duas testemunhas, uma negativa- fungo *Aspergillus ochraceus* e uma positiva- o fungicida Cloreto de benzalcônio- registrado para controle de *A. ochraceus* aplicado na dosagem recomendada pelo fabricante.

Foram selecionados 75 grãos de café da cultivar Mundo Novo. Antes da aplicação dos tratamentos realizou-se desinfestação superficial dos mesmos: os grãos foram imersos em álcool 70% durante um minuto; posteriormente foram transferidos para solução de hipoclorito de sódio a 1% por 30 segundos, sendo posteriormente lavados em água destilada esterilizada por três vezes.

Os extratos testados foram dissolvidos em 120 mL de tween 80 a 1%. Os grãos foram imersos nos diferentes tratamentos por período de sete minutos. Decorrido o período, o excesso de líquido foi drenado e os grãos foram inoculados com suspensão de esporos de *A. ochraceus* na concentração de  $5,0 \times 10^3$  esporos mL<sup>-1</sup>.

Foram colocados 25 grãos por placa de Petri (15 cm de diâmetro) contendo meio de cultura BDA, totalizando três placas por tratamento. As placas foram incubadas em BOD a 23°C fotoperíodo 12 horas luz, 12 horas escuro por período de sete dias.

As avaliações foram realizadas de acordo com escala de notas, quais sejam:

1= 0 % do grão preenchido por esporos de *A. ochraceus*; 2 = de 1 a 50 % do grão preenchido por esporos de *A. ochraceus*; 3= de 51% a 100% do grão coberto por esporos de *A. ochraceus*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Testes “*in vitro*” para identificação de extratos ativos contra *Aspergillus ochraceus*.

De 150 extratos vegetais testados *in vitro*, 71 foram selecionados para repetição visando constatar efeito efetivo na redução da esporulação de *A. ochraceus*.

Dos 71 extratos testados, 17 foram ativos na redução da esporulação de *A. ochraceus*. Foram considerados promissores nesta etapa os extratos que apresentaram MIC equivalentes ou inferiores à 8012 ppm (Tabela 1).

**Tabela 1.** Mínima concentração inibitória (MIC) de extratos que se destacaram no controle de *A. ochraceus in vitro*

PLANTAS	ESPORULAÇÃO	CONCENTRAÇÃO (ppm)		
		8012	4006	2003
<i>Citrus aurantium</i>	N	X		
<i>Thymus vulgaris</i>	N	X		
<i>Jatropha curcas</i>	N	X		
<i>Achillea millefolium-</i>	N	X		
<i>Ficus carica</i>	N	X		
<i>Coffea arabica</i>	N	X		
<i>Zingiber officinale</i>	N	X		
<i>Plantago lanceolata</i>	N	X		
<i>Centella asiática</i>	N	X		
<i>Taraxacum officinale</i>	N	X		
<i>Ginkgo biloba</i>	N	X		
<i>Mimosa pudica</i>	N	X		
<i>Punica granatum</i>	N	X	X	
<i>Coix lacryma jobi</i>	N	X	X	X
<i>Momordica charantia</i>	N	X		
<i>Musa sapientum</i>	N	X		
<i>Laurus nobilis</i>	N	X	X	X
<i>Hypericum perforatum</i>	N	X		

N : Ausência de esporulação.

Dentre extratos ativos, observou-se que extratos provenientes de espécies como louro (*Laurus nobilis*), café (*Coffea arabica*), dormideira (*Mimosa pudica*) e figo (*Ficus carica*), gengibre (*Zingiber officinale*) destacaram-se e são exemplos de espécies com potencial fungitóxico observado em outros trabalhos (Fagan et al., 2007; Carvalho et al., 2007).

**Testes “in vivo” para identificar extratos ativos contra *Aspergillus ochraceus*.**

A severidade da testemunha positiva (Cloreto de benzalcônio) e extrato de laranja (*Citrus aurantium*) foi significativamente semelhante, com redução de 24,46% na severidade no tratamento em relação a testemunha negativa (Tabela 2). Já os tratamentos com extratos de dormideira (*Mimosa pudica*), louro (*Laurus nobilis*), bananeira (*Musa sapientum*), dente de leão (*Taraxacum officinale*) e figo (*Ficus carica*) apresentaram severidade similar à da testemunha negativa (fungo *A. ochraceus*). Os extratos gengibre (*Zingiber officinale*), transagem (*Plantago lanceolata*), melão de São Caetano (*Momordica charantia*), hipérico (*Hypericum perforatum*), romã (*Punica granatum*) e mertiolate (*Jatropha curcas*) apresentaram severidade superior a testemunha negativa indicando um possível efeito estimulatório destes extratos na esporulação de *A. ochraceus* in vivo.

**Tabela 2.** Eficiência de extratos de plantas na redução da severidade de *A.ochraceus* em grãos de café.

Tratamentos	Severidade (nota)
<i>Citrus aurantium</i>	1,42 a
Test. Positiva	1,45 a
<i>Mimosa pudica</i>	1,77 b
<i>Laurus nobilis</i>	1,78 b
<i>Musa sapientum</i>	1,82 b
Test. negativa	1,88 b
<i>Taraxacum officinale</i>	1,89 b
<i>Centella asiatica</i>	1,93 b
<i>Ficus carica</i>	1,98 b
<i>Thymus vulgaris</i>	2,06 c
<i>Coix lacryma jobi</i>	2,14 c
<i>Coffea arabica</i>	2,16 c
<i>Achillea millefolium</i>	2,29 c
<i>Zingiber officinale</i>	2,81 d
<i>Plantago lanceolata</i>	2,81 d
<i>Momordica charantia</i>	2,85 d
<i>Hypericum perforatum</i>	2,85 d
<i>Punica granatum</i>	2,86 d
<i>Jatropha curcas</i>	2,86 d

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

O efeito do extrato de *Citrus aurantium* na redução da severidade de *A. ochraceus* em frutos de café pode ser explicado pela presença de compostos fenólicos os quais são produtos de metabolismo secundário e podem apresentar ação fungitóxica (ação antimicrobiana direta) como eliciadora, ativando mecanismos de defesa nas plantas (ação antimicrobiana indireta). Os fenólicos presentes nos citrus incluem flavonóides, antocianinas, cumarinas entre outros.

E, extratos de laranja, além de apresentarem bons resultados no controle de doenças de plantas, também apresentam efeito no controle de insetos. De acordo com Siskos et al. (2007), extratos de albedo de frutos de *Citrus aurantium* foram efetivos no controle da mosca da oliveira (*Bactrocera oleae*) indicando a possível presença de

metabólicos secundários com atividade inseticida.

## CONCLUSÕES

Extratos obtidos de espécies vegetais das famílias Rutaceae (*Citrus aurantium*), Fabaceae (*Mimosa pudica*), Lauraceae (*Laurus nobilis*), Musaceae (*Musa sapientum*), Asteraceae (*Taraxacum officinale*), Apiaceae (*Centella asiatica*), Moraceae (*Ficus carica*), Poaceae (*Coix lacryma jobi*), Rubiaceae (*Coffea arabica*), Asteraceae (*Achillea millefolium*), Zingiberaceae (*Zingiber officinale*), Plantaginaceae (*Plantago lanceolata*), Cucurbitaceae (*Momordica charantia*), Hypericaceae (*Hypericum perforatum*), Punicaceae (*Punica granatum*) e Euphorbiaceae (*Jatropha curcas*) destacaram-se entre os extratos testados na inibição do desenvolvimento de *Aspergillus ochraceus in vitro*.

Observou-se que extratos da família Rutaceae (*Citrus aurantium*) apresentam potencial para o desenvolvimento de métodos de controle do fungo *Aspergillus ochraceus* em grãos de café.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, R.A.; LACERDA, J.T.de.; OLIVEIRA, E.F.de.; SANTOS, E.S.dos. Extratos de plantas medicinais como estratégia para controle de doenças fúngicas do inhame (*Dioscorea* sp.) no nordeste. Disponível em <<http://www.emepa.org.br/anais/volume1/av107.pdf>>. Acesso em 28/11/2007.

CHALFOUN, S.M.; CHAGAS, S.J.R.; CARVALHO, V.L.; SILVA, R.A.; PEREIRA, M.C. **Microflora associada a grãos beneficiados de café (*Coffea arabica* L.) com e sem desinfecção.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 23., 1997, Manhuaçu, (Anais...), Rio de Janeiro, MARA/PROCAFE/PNFC, P. 168-169. 1997.

FAGAN, C.; RAMIREZ, A.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.; CRUZ, M.E.S.da.; STANGARLIN, J.R. **Efeito do extrato bruto de *Laurus nobilis* e *Zingiber officinale* no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos.** Disponível em <<http://www.cca.uem.br/anu7000.htm>>. Acesso em: 28/11/2007.

SOUZA, S.M.C. de & CARVALHO, V.L. de **Efeito de microrganismos na qualidade da bebida de café.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, vol. 18, n. 187, p. 21-26. 1997.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. **Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas.** Fitopatologia Brasileira, v. 28, p. 54-56, 2003.

SISKOS, E. P.; KONSTANTOPOULOU, M. A.; MAZOMENOS, B. E.; JERVIS, M. **Insecticidal Activity of *Citrus aurantium* Fruit, Leaf, and Shoot Extracts Against Adult Olive Fruit Flies (Diptera: Tephritidae).** Journal of Economic Entomology, v. 100, n. 4, p. 1215-1220, 2007.

STUDER-ROHR, J.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. **The occurrence of ochratoxin A in coffee.** Food and chemical toxicology, Zurich, v. 33, n. 5, p. 341-355, May 1995.