



Avaliação da atividade antifúngica da casca de *Syzygium cumini*

Evaluation of the antifungal activity of Syzygium cumini bark

Rafaela da Costa Binhara*, Flávio Dias Ferreira†, Mellide Zanchettin‡

RESUMO

Fungicidas sintéticos são utilizados como medidas de controle a fungos filamentosos, entretanto, devido a crescente resistência a estes compostos e possíveis danos à saúde dos consumidores, é necessária a busca por alternativas mais seguras. O *Syzygium cumini* é uma planta com grandes volumes desperdiçados anualmente devido à alta perecibilidade. Neste sentido, extratos de *Syzygium cumini* poderia ser uma alternativa ao uso de tais compostos? O objetivo deste estudo foi a avaliação da ação antifúngica da casca de jabolão frente a *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*. Os frutos foram coletados, a casca foi separada da polpa, liofilizada e moída para obtenção da farinha de casca de jabolão. A farinha foi submetida ao processo de extração sólido-líquido para obtenção de 19 extratos de diferentes solventes. As concentrações testadas foram de 50000 a 195 µg/mL para extrato aquoso, 500000 a 1953 µg/mL para extrato concentrado e 100000 a 390 µg/mL para o extrato hidroalcolólico e extratos brutos. A atividade antifúngica foi realizada por meio da concentração inibitória e fungicida mínima pelo método de microdiluição em caldo. Nenhum dos extratos obtidos apresentaram atividade antifúngica nas concentrações testadas, além disso, foi observado um aumento no crescimento fúngico na presença de alguns extratos sugerindo presença de aleloquímicos.

Palavras-chave: Atividade antifúngica, Extratos naturais, Fungos filamentosos, *Syzygium cumini*.

ABSTRACT

Synthetic fungicides are used as control measures for filamentous fungi, however, due to the increasing resistance to these compounds and possible harm to consumer health, it is necessary to search for safer alternatives. *Syzygium cumini* is a plant with large volumes wasted annually due to its high perishability. In this sense, *Syzygium cumini* extracts could be an alternative to the use of such compounds? The aim of this study was to evaluate the antifungal action of jabolão bark against *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. The fruits were collected, the peel was separated from the pulp, lyophilized and ground to obtain jabolão peel flour. The flour was subjected to a solid-liquid extraction process to obtain 19 extracts of different solvents. The concentrations tested were 50000 to 195 µg/mL for aqueous extract, 500000 to 1953 µg/mL for concentrated extract and 100000 to 390 µg/mL for hydroalcoholic extract and crude extracts. The antifungal activity was performed through the minimal inhibitory and fungicidal concentration by the broth microdilution method. None of the extracts obtained showed antifungal activity at the concentrations tested, in addition, an increase in fungal growth was observed in the presence of some extracts suggesting the presence of allelochemicals.

Keywords: Antifungal activity, Natural extracts, Filamentous fungi, *Syzygium cumini*

1 INTRODUÇÃO

A segurança de alimentos é uma prioridade global devido à alta incidência de microrganismos, dentre eles os fungos ganham destaque pelo risco a saúde humana e animal, além de grandes perdas econômicas. (DAVIES et al., 2021; CLEMENTE et al., 2016; HU et al., 2021).

* Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil; rafaelabinhara@gmail.com

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Medianeira; flavioferreira@utfpr.edu.br

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Medianeira, Medianeira, Paraná, Brasil; zanchettinmellide@gmail.com



Aspergillus flavus é um fungo filamentosos deteriorante de alimentos, principalmente milho, amendoim e soja (HU et al., 2021; EINLOFT, 2016). Esse microrganismo é sintetizador de aflatoxinas, metabólitos secundários denominados micotoxinas, que desencadeiam neoplasias hepáticas tanto em humanos quanto em animais (HU et al., 2021). *Fusarium verticillioides* é um fungo cosmopolita e fitopatogênico, amplamente difundido geograficamente que pode atingir diversas culturas distintas, como milho, beterraba, aveia e algodão. Este fungo é o patógeno mais comum que causa podridão das espigas de milho, o que acarreta em uma redução significativa no rendimento de grãos e na qualidade (FALLAHI et al., 2021). Outra importante preocupação relacionada com esse fungo é que são sintetizadores de fumonisinas, micotoxinas altamente perigosas que ameaçam à saúde humana e animal (KAMLE et al., 2019).

As maneiras de controle comumente usadas para esses microrganismos são fungicidas sintéticos, dada a crescente incidência de resistência aos fungicidas e à relação com possíveis danos à saúde dos consumidores torna-se imprescindível a busca de alternativas mais seguras (DAVIES et al., 2021). Uma alternativa ao uso, são extratos naturais a base de plantas, que indicam uma solução promissora para evitar possíveis efeitos colaterais, formas de resistência e aumentar a eficácia dos produtos antimicrobianos, pois podem apresentar efeito antifúngico, conforme apresentado por El-Samawaty et al. (2021) e Tshabalala et al. (2021).

Syzygium cumini é uma planta da família *Myrtaceae*, originária da Ásia tropical, especialmente na Índia é comumente conhecido como “Jambolão” (SINGH et al., 2016). O *Syzygium cumini* possui uma composição química complexa, rica em diferentes compostos químicos com propriedades nutricionais e valor biológico, destacando-se principalmente os compostos fenólicos (SABINO; BRITO; SILVA JÚNIOR, 2018). Apesar de seu potencial bioativo, poucos estudos são realizados sobre essa fruta no Brasil e grandes volumes de jambolão são desperdiçados anualmente devido à sua alta perecibilidade (ARAUJO, 2014). Essa premissa possibilita a investigação do extrato de casca de jambolão como antifúngico natural. Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito antimicrobiana do extrato de casca de *Syzygium cumini* frente a *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*.

2 MÉTODO

2.1 Matéria prima

Os frutos de jambolão foram coletados entre fevereiro e março de 2021 na cidade de Medianeira, Paraná, Brasil (25° 17' 42" S 54° 05' 38" O). Os frutos foram higienizados e as cascas foram separadas manualmente do fruto. Posteriormente as cascas foram secas através do método de liofilização e moídas em um moinho de facas, obtendo-se a farinha da casca de jambolão.

2.2 Preparação de extratos a partir de farinha de casca de jambolão

A farinha da casca de jambolão foi submetida ao processo de extração sólido-líquido em banho termostático a 40 °C, utilizando solução hidroetanólica 50% (v/v), razão sólido:líquido de 1:10, sob agitação mecânica (200 rpm) durante uma hora (GARCÍA, 2019). Após a extração, os sólidos suspensos foram removidos por filtração a vácuo. Foram obtidos um extrato hidroetanólico 50%, um extrato aquoso e um extrato concentrado. O extrato hidroetanólico 50% foi obtido logo após o processo de filtração. Para a obtenção de um extrato aquoso foi necessário a remoção do etanol utilizando um evaporador rotativo a vácuo a 50 °C e agitação de 40 rpm até aproximadamente a metade do volume inicial do extrato. Para a obtenção do extrato



concentrado realizou a concentração em evaporador rotativo com os mesmos parâmetros utilizados anteriormente, entretanto a rotaevaporação perdurou mais tempo (1 hora).

Para a extração usando outros solventes (extratos brutos), a farinha da casca de jambolão foi sujeita ao processo de extração sólido-líquido e a filtração a vácuo semelhante ao realizado anteriormente, entretanto a temperatura de extração foi de 30 °C e razão sólido:líquido de 2:10. Foram preparados um solvente com água pura e 15 extratos brutos utilizando diferentes solventes em diferentes concentrações, sendo eles acetona, metanol e etanol nas concentrações de 40, 50, 60, 70 e 80% (SANTOS; SANTANA, 2019).

2.3 Preparação do inóculo

Os isolados de *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* foram obtidos do laboratório de toxicologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), e armazenados em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), sob refrigeração a temperatura de 8 °C. A esporulação foi realizada através do cultivo do isolado em meio BDA para *Aspergillus flavus* e em meio ágar sabouraud dextrosado (SDA) para *Fusarium verticillioides*. A suspensão conidial foi preparada a partir de uma cultura de 7 dias, adicionando solução salina (0.9%) estéril e realizando a raspagem da superfície para liberar os conídios do micélio fúngico. Realizou a contagem do inóculo utilizando em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para 10⁵ conídios/mL.

2.4 Determinação da atividade antifúngica pelo método de microdiluição em caldo

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi utilizado o protocolo CLSI M38-A2 (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2002) com algumas modificações. Os extratos foram diluídos em meio de cultura RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute – 1640) com L-glutamina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) sem bicarbonato, tamponado com 0.165 M de ácido 3-[N-morfolino]-Propanosulfônico (MOPS) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA). Diluições seriadas dos extratos foram realizadas utilizando uma placa de 96 poços contendo o meio preparado, de modo a atingir as concentrações de 50000 a 195 µg/mL para o extrato aquoso, 500000 a 1953 µg/mL para o extrato concentrado e 100000 a 390 µg/mL para os extratos brutos e hidroalcolico. Posteriormente adicionou 5 µL da suspensão de 10⁵ de conídios/mL e incubou a 28 °C por 72 horas. O controle de crescimento foi composto pelo meio de cultura com a suspensão de conídios sem a presença do extrato, o branco com a solução solvente no lugar do extrato e o controle negativo com apenas o meio de cultura.

A concentração fungicida mínima (CFM) foi realizada em uma placa contendo meio BDA ou SDA. Foram adicionados 10 µL da CIM, duas concentrações acima e duas abaixo, mais o controle positivo, o branco e o controle negativo e incubado por 72 horas a 28 °C. Tanto a CIM quanto a CFM foram definidas como a menor concentração em que não houve crescimento fúngico visual. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3 RESULTADOS

Foram testados o efeito antifúngico de 19 extratos diferentes obtidos a partir de farinha de casca de jambolão. Nenhum dos extratos avaliados apresentou atividade antifúngica frente ao *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* nas maiores concentrações testadas (0,05 g/mL para extrato aquoso, 0,1 g/mL para hidroetanólico, 0,5 g/mL extrato concentrado e 0,1 g/mL para extratos brutos). A atividade antifúngica do extrato aquoso e metanólico de caules de *Juniperus procera* frente ao *Aspergillus flavus*, foi avaliada por



Abdelghany et al. (2020) por meio da metodologia de difusão em disco, os autores observaram que o extrato metanólico teve alta atividade antifúngica frente ao fungo, enquanto o extrato aquoso não apresentou atividade antifúngica. Os autores ainda observaram que a concentração mais baixa de extrato aquoso de *Juniperus procera* (30 mg/mL) estimulou o crescimento de *Aspergillus flavus*, sugerindo que esse fato acontece devido a alguns aleloquímicos presentes nos extratos o que pode aumentar o crescimento do fungo. Estes relatos corroboram com resultados achados pois observou-se um aumento na concentração fúngica nos extratos aquosos de jambolão. No presente estudo não foi avaliado o potencial alelopático, entretanto, Mairesse et al. (2007) descreve a presença de aleloquímicos nos extratos aquosos de jambolão. Este favorecimento no crescimento de fungos também foi relatado por Venturoso et al. (2011) onde constataram que o extrato de nim favoreceu o crescimento de *Fusarium solani*. Além disso, o mesmo autor avaliou 10 extratos frente a *Aspergillus flavus* e observou que seis deles (Cavalinha, Jabuticaba, Melão, Eucalipto, Nim e Arruda) não apresentaram efeito antifúngico.

Jiang et al. (2020) avaliou a atividade antifúngica de 163 extratos de ervas da medicina tradicional chinesa contra dez cepas de fungos, os extratos foram obtidos utilizando etanol 75% e a atividade antifúngica foi avaliada utilizando a metodologia de microdiluição em caldo. Os autores consideraram que dos 163 extratos avaliados 110 não demonstraram atividade antifúngica. Neste mesmo estudo, os autores relatam a necessidade de testar extratos obtidos de solventes com diferentes polaridades além do etanol, algo que tentou-se avaliar neste estudo, entretanto, observou-se que mesmo avaliando diferente extratos não foi possível alcançar os resultados esperados. Ainda, os mesmos autores descrevem a atividade antifúngica deve influência direta da parte vegetal utilizada para preparar o extrato. Neste sentido, sugere-se que a inatividade observada neste estudo não seja proveniente dos solventes utilizados para extração, mas da parte vegetal utilizada, portanto sugere-se novos estudos utilizando outras partes do *Syzygium cumini*. Corroborando com isto, Bocquet et al. (2018) avaliou a atividade antifúngica de diferentes partes do lúpulo (folhas, caules, rizomas e flores femininas), e o óleo essencial de lúpulo, contra *Zymoseptoria tritici*, por meio da metodologia de difusão em ágar com intuito de avaliar seu potencial para serem usados como fungicidas naturais. Entre todas as partes da planta testadas, apenas o extrato bruto das flores femininas e o óleo essencial apresentaram atividade antifúngica contra o patógeno. Silvestre et al. (2019) descreve que a diferença do efeito antimicrobiano de extratos pode também estar relacionado ao tempo de colheita de materiais vegetais, fatores bióticos e abióticos do cultivo do material vegetal e o microrganismo avaliado frente a esses extratos.

4 CONCLUSÃO

Os extratos de casca de *Syzygium cumini* não apresentaram atividade antifúngica frente ao *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* nas concentrações testadas, além disso, foi possível observar que alguns extratos estimularam o crescimento fúngico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela bolsa concedida e ao Departamento Acadêmico de Alimentos, Câmpus Medianeira por consentir o uso dos laboratórios e equipamentos.



REFERÊNCIAS

- ABDELGHANY, T. M.; HASSAN, M. M; EL-NAGGAR, M. A.; EL-MONGY, M. A. **GC/MS analysis of *Juniperus procera* extract and its activity with silver nanoparticles against *Aspergillus flavus* growth and aflatoxins production.** Biotechnology Reports, v. 27, Set 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.ez48.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC7327896/>. Acesso em: 9 set. 2021.
- ARAUJO, A. L. M. **Jambolão (*Syzygium cumini*) desidratado por liofilização e secagem em leito de jorro: avaliação do impacto do processo de secagem e caracterização do potencial funcional do produto final.** 2014. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/15857>. Acesso em: 9 set. 2021.
- BOCQUET, L.; RIVIÈRE, C.; DERMONT, C.; SAMAILLIE, J.; HILBERT, J. L.; HALAMA, P.; SIAH, A.; SAHPAZ, S. **Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*.** Industrial Crops and Products, v. 122, p. 290 - 297, Out, 2018. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0926669018304801?via%3Dihub>. Acesso em: 9 set. 2021.
- CLEMENTE, I.; AZNAR, M.; SILVA, F.; NERÍN, C. **Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria.** Innovative Food Science & Emerging Technologies, v. 36, p. 26 - 33, Ago 2016. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S146685641630100X?via%3Dihub>. Acesso em: 9 set. 2021.
- DAVIES, C. R.; WOHLGEMUTH, F.; YOUNG, T.; VIOLET, J.; DICKINSON, M.; SANDERS, J. W.; VALLIERES, C.; AVERY, S. V. **Evolving challenges and strategies for fungal control in the food supply chain.** Fungal Biology Reviews, v. 36, p. 15, Jun 2021. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1749461321000038?via%3Dihub>. Acesso em: 9 set. 2021.
- EINLOFT, T. C. **Biocontrole de *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* por *Bacillus spp.* isolados de plantas de milho.** Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/153322>. Acesso em: 9 set. 2021.
- EL-SAMAWATY, A. E-R. M. A.; EL-WAKIL, D. A.; ALAMERY, S.; MAHMOUD, M. M. H. **Potency of plant extracts against *Penicillium* species isolated from different seeds and fruits in Saudi Arabia.** Saudi Journal of Biological Sciences, v. 28, p. 3294 - 3302, Jul 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.ez48.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC8176084/>. Acesso em: 9 set. 2021.
- FALLAHI, M.; SOMMA, S.; JAVAN-NIKKHAH, M.; SAREMI, H.; STEA, C.; MASIELLO, M.; LOGRIECO, A. F.; MORETTI, A. **Genetic structure of *Fusarium verticillioides* populations from maize in Iran.** Fungal genetics and biology, v. 156, p. 103613, Jul 2021. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1087184521000979?via%3Dihub> Acesso em: 9 set. 2021.
- GARCÍA, Y. R. **Obtenção de um extrato concentrado a partir da casca de uva cv. Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.): caracterização química, bioacessibilidade e aplicação como corante.** Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,



2019. Disponível em:

<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1110708/1/TESEYINETHRUIZGARCIA2019.pdf>.

Acesso em: 9 set 2021.

HU, Z.; YUAN, K.; ZHOU, Q.; LU, C.; DU, L.; LIU, F. **Mechanism of antifungal activity of *Perilla frutescens* essential oil against *Aspergillus flavus* by transcriptomic analysis.** Food control, v. 123, p. 107703, Mai 2021. Disponível: <https://www.sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0956713520306198?via%3Dihub>. Acesso em: 9 set. 2021.

JIANG, B. C.; SHEN, J. Y.; WU, J.; LU, R. Y.; ZHENG, W.; DONG, J. X.; YAN, L.; JIN, Y. S. **In vitro antifungal activity of 163 extracts from traditional Chinese medicine herbs.** European Journal of Integrative Medicine, v. 39, Out 2020. Disponível: <https://www.sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1876382020313949?via%3Dihub>. Acesso em: 9 set. 2021.

KAMLE, M.; MAHATO, D. K.; DEVI, S.; LEE, K. E.; KANG, S. G.; KUMAR, P. **Fumonisin: Impact on Agriculture, Food, and Human Health and their Management Strategies.** Toxins, v. 11, p. 328, Jun 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/journal/toxins>. Acesso em: 9 set. 2021.

MAIRESSE, L. A. S.; COSTA, E. C.; FARIAS, J. R.; FIORIN, R. A. **Bioatividade de extratos vegetais sobre alface (*Lactuca sativa* L.).** Revista da FZVA, Uruguaiana, v. 14, n. 2, p. 1-12. 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi.** Approved Standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2002.

SABINO, L. B. S.; BRITO, E. S.; SILVA JÚNIOR, I. J. **Jambolan—*Syzygium jambolanum*.** Exotic Fruits, pp. 305-318, 2018.

SANTOS, T. R. J.; SANTANA, L. C. L. A. **Antimicrobial potential of exotic fruits residues.** South African journal of botany, v. 124, p. 338, Ago 2019. Disponível: <https://www.sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S025462991831456X?via%3Dihub>. Acesso em: 9 set. 2021.

SILVESTRE, W. P.; LIVINALI, N. F.; BALDASSO, C.; TESSARO, I. C. **Pervaporation in the separation of essential oil components: A review.** Trends in food science & technology, v. 93, p. 42, Nov. 2019.

SINGH, J. P.; KAUR, A.; SINGH, N.; NIM, L.; SHEVKANI, K.; KAUR, H.; ARORA, D. S. **In vitro antioxidant and antimicrobial properties of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit polyphenols.** LWT, v. ,65 p. 1025, Jan 2016.

TSHABALALA., R.; KABELINDE, A.; TCHATCHOUANG, C-D. K.; ATEBA, C. N.; MANGANYI. **Effect of Clove (*Syzygium aromaticum*) spice as microbial inhibitor of resistant bacteria and Organoleptic Quality of meat.** Saudi Journal of Biological Sciences, v. 28, p. 3855, Jul 2021.

VENTUROSO, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L. **Antifungal activity of plant extracts on the development of plant pathogens.** Summa Phytopathologica, v.37, n.1, p.18-23, 2011.