

## EFEITO COMBINADO ENTRE GERANIOL, CITRAL E EUGENOL: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

Larissa Pelisson Trento (PIC), Natália Santos Pretes, Ana Laura Castilho Franco, Miguel Machinski Junior, Juliana Cristina Castro (Orientador). E-mail: [jccastro2@uem.br](mailto:jccastro2@uem.br)

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

### Farmácia/Análise Toxicológica

**Palavras-chave:** Composto isolado; Segurança alimentar; Fungo deteriorante.

### RESUMO

A utilização de agrotóxicos é crescente e há muitos anos destaca-se com efeitos tóxicos para o meio ambiente, animais e humanos. A conscientização na manipulação e redução de seu uso por compostos de menor toxicidade se faz necessário, entretanto, esta substituição nem sempre é possível. Como alternativa, o uso de compostos naturais como os óleos essenciais é crescente e tem como objetivo substituir o uso de agrotóxicos por compostos tão efetivos quanto os produtos sintéticos. Desta forma, este projeto visa avaliar a bioatividade de compostos isolados e combinados como citral, eugenol e geraniol frente ao fungo pós-colheita *Alternaria alternata* visando a sua inibição *in vitro*. Para isto, inicialmente os compostos isolados foram avaliados quanto a sua pureza em cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), seguido da avaliação da bioatividade *in vitro*, com as seguintes técnicas: concentração inibitória mínima (CIM) e *Checkboard*. A caracterização dos compostos isolados por CG-EM confirmou a pureza dos mesmos, já a atividade antifúngica, a CIM apresentou atividade interessante para citral com 500 µg/mL, comparada aos demais compostos como geraniol e eugenol (1000 µg/mL para ambos) contra *A. alternata*. A associação dos compostos apresentou resultado indiferente. Logo, pode-se observar que o citral de forma isolada apresenta-se como um interessante composto com atividade antifúngica para possível substituição aos agrotóxicos. Entretanto, estudos com controle sintéticos e atividade antifúngica *in situ*, ainda estão em desenvolvimento para confirmar esta hipótese.

### INTRODUÇÃO

Geralmente, o uso de fungicidas na agricultura é na forma de agrotóxicos de modo preventivo, sendo avaliado as necessidades da região. A utilização de agrotóxicos de forma excessiva acometem problemas ambientais como a qualidade da água, o solo e dos próprios alimentos. Logo, vale salientar que sua aplicação oferece riscos tanto para quem manipula quanto para quem consome pela contaminação ou intoxicação indireto. Em contrapartida, o uso de compostos naturais com menor

toxicidade para a substituição de agrotóxicos é uma alternativa viável e que garante o controle de fungos micotoxigênicos e deteriorantes, como a *A. alternata*. Essa espécie causa manchas e necrose foliares, sendo o alvo principal hortaliças, frutas e grãos (MUNIZ *et al.*, 2018).

Entre os componentes naturais, compostos químicos derivados dos óleos essenciais é crescente e utilizado de forma homogênea em indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias. Os óleos essenciais estão em plantas como produto natural e possuem compostos aromáticos voláteis do metabolismo secundário. A presença de monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides e outros compostos voláteis são os responsáveis pelas propriedades terapêuticas, antifúngicas e antioxidantes. Na situação, o citral, eugenol e geraniol possuem propriedades antifúngicas e nessa sequência podem ser encontrados em tipos específicos de frutos, como limão, cravo-da-índia, óleo de rosas e outros. Desta forma, este projeto visa avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de compostos isolados e combinados como citral, eugenol e geraniol frente ao fungo pós-colheita *A. alternata*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Microrganismos*

A cepa de *A. alternata* foi obtida do banco de isolados do Laboratório de Toxicologia (LATOX) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), PR, BR. Foi cultivado em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) por 7 dias à 28°C para em incubadora Labstore 411 FDP para sua ativação e posterior testes.

### *Avaliação da pureza dos compostos isolados por Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)*

A avaliação da pureza dos compostos isolados foi realizada utilizando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM, DSQ Trace GC ultra, Thermo Scientific) com injetor automático (FOCUS GC – DSQ II, Thermo Electron Corp. ®). O CG-EM foi equipado com coluna capilar DB-5. Hélio foi usado como gás de arraste (1,0 mL min<sup>-1</sup>). A temperatura do injetor, fonte de íons e linha de transferência serão mantidas em 250, 270 e 280°C, respectivamente. Os componentes foram identificados analisando os tempos de retenção e espectro de fragmentação, confirmados por meio de uma mistura padrão de n-alcenos (C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Os componentes químicos foram confirmados segundo Adams (2007).

### *Concentração Inibitória Mínima (CIM)*

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos compostos foram determinadas pelo método de Microdiluição M38-A (CLSI, 2008) com o inóculo de 10 µL de uma solução de 10<sup>5</sup> conídios mL<sup>-1</sup>, usando meio RPMI 1640 com L-Glutamina sem bicarbonato, tamponado com MOPS 0,165M (Ácido Morfolina Propanossulfônico). Os compostos foram eluídos em Tween 80 a 1% e avaliados na concentração de

3,91 até 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As placas foram incubadas à 28°C por 72 horas. A CIM foi definida como a menor concentração do composto que inibiu o crescimento visual do fungo.

### Checkboard

O teste de *Checkboard* foi avaliado pela combinação da atividade *in vitro* dos compostos isolados para obter a concentração inibitória fracionada (CIF). O índice do CIF foi definido pelo CIM dos compostos sozinhos e combinados. Um índice CIF  $\leq 0,5$  é considerado Sinergismo; índice CIF  $> 4$  é considerado Antagonismo; e entre 0,5 e 4 é considerado indiferente. A técnica foi proposta conforme descrito por Odds, (2003).

## RESULTADO E DISCUSSÃO

Conforme avaliado por CG-EM (Tabela 01), foi possível confirmar a pureza dos compostos analisados para posterior atividade antifúngica isolado e associado.

**Tabela 01.** Compostos isolados e avaliados por CG-EM.

Compostos Isolados	TR (min)	IKA	%
Geraniol	5.18	908.56	100
Eugenol	5.96	935.27	100
Citral	5.04	903.77	60.46
Citral	5.30	912.67	39.53

Fonte: Autor, (2024).

Para a avaliação antifúngica, as CIMs para geraniol, eugenol e citral foram 1000, 1000 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 02).

**Tabela 02.** Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos isolados avaliados.

Compostos Isolados	MIC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
Geraniol	1000
Eugenol	1000
Citral	500

**Fonte:** Autor, (2024).

Entre os compostos avaliados, estudos demonstraram que a atividade do composto eugenol apresenta significativa atividade antifúngica frente aos demais compostos, citral e geraniol. Entretanto, não foi observado esta ação neste estudo. Conforme Castro *et al.* (2020), a forte atividade antifúngica óleos essenciais de cravo e palmarosa estão associadas aos seus compostos majoritários, eugenol e geraniol, respectivamente. Resultados estes que confirmam a inibição destes compostos frente ao fungo *A. alternata*. Já para o *cheakboard*, todas as combinações dos compostos isolados demonstraram CIM > 1000 µg mL<sup>-1</sup>, valores estes superiores aos valores de CIM encontrados. Estes resultados sugerem que a combinação dos compostos isolados é indiferente, uma vez que os valores são superiores aos encontrados inicialmente.

## CONCLUSÃO

Os compostos avaliados apresentaram alta pureza, conforme confirmação por CG-EM. Frente a atividade antifúngica, o teste de CIM apresentou atividade interessante para citral com 500 µg/mL, comparada aos demais compostos como geraniol e eugenol contra *A. alternata*. A associação dos compostos apresentou resultado indiferente, ou seja, não apresentou sinergismo quando testados em conjunto. Logo, pode-se observar que o citral de forma isolada apresenta-se como um interessante composto com atividade antifúngica para possível substituição aos agrotóxicos. Entretanto, estudos com controle sintético e atividade antifúngica *in situ* ainda estão em desenvolvimento para confirmar esta hipótese.

## REFERÊNCIAS

CASTRO, J. C., PANTE, G. C., CENTENARO, B. M., ALMEIDA, R. T. R. D., PILAU, E. J., DIAS FILHO, B. P., ABREU FILHO, B.A, MACHINSKI JUNIOR, M. Antifungal and antimycotoxigenic effects of *Zingiber officinale*, *Cinnamomum zeylanicum* and *Cymbopogon martinii* essential oils against *Fusarium verticillioides*. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v.37, n.9, p.1531-1541, 2020.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2008. **Reference method for broth dilution antifungals susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi: approved standard**. Second ed. M38-A2. Wayne, PA.

MUNIZ, P. H. P. C.; OLIVEIRA, J. B. de; PEIXOTO, G. H. S.; RODRIGUES, F.; CARVALHO, D. D. C. Caracterização morfológica de *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl. ocorrente em solanáceas. **Agropecuária Técnica**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 43–49, 2018.