



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA
Rodovia Sul Goiana, km 01, Zona Rural – Rio Verde - GO
CEP: 75.901-970. Fones: (64) 3620-5643. Fax: (64) 3620-5640

**Extratos vegetais de *Pterodon Pubescens* Benth. e *Cochlospermum regium* (Mart. Ex Schrank)
Pilg.: Composição química e sua bioatividade**

Mestrando: Jaciel Gonçalves dos Santos
Orientadora: Dr^a. Cassia Cristina Fernandes
Coorientador: Dr. Jáliston Júlio Lopes Alves
Dr. Mayker Lazaro Dantas Miranda

RIO VERDE – GO
Julho – 2024



INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO
Campus Rio Verde - GO

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA
Rodovia Sul Goiana, km 01, Zona Rural – Rio Verde - GO
CEP: 75.901-970. Fones: (64) 3620-5643. Fax: (64) 3620-5640

**Extratos vegetais de *Pterodon Pubescens* Benth. e *Cochlospermum regium* (Mart. Ex Schrank)
Pilg.: Composição química e sua bioatividade**

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

- Tese (doutorado) Artigo científico
 Dissertação (mestrado) Capítulo de livro
 Monografia (especialização) Livro
 TCC (graduação) Trabalho apresentado em evento

Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor:

Jaciel Gonçalves dos Santos

Matrícula:

2022202310340002

Título do trabalho:

Extratos vegetais de *Pterodon Pubescens* Benth. e *Cochlospermum regium* (Mart. Ex Schrank)
Pilg.: Composição química e sua bioatividade

RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial: Não Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIIF Goiano: / /

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- Que obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde

Local

24/07/2024

Data

Documento assinado digitalmente

gov.br

JACIEL GONCALVES DOS SANTOS
Data: 01/09/2024 19:19:59-0300

Documento assinado digitalmente

Assinat

gov.br

CASSIA CRISTINA FERNANDES ALVES

Data: 03/09/2024 16:18:16-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

autorais

Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)

Ficha catalográfica



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Declaração nº 114/2024 - SREPG/CMPR/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

ATA Nº/ 112

BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ao vigésimo quarto dia do mês de julho do ano de dois mil e vinte e quatro, às 14h00 (quatorze horas), reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Prof. Dr. Jáliston Júlio Lopes Alves (coorientador), Prof.^a Dr.^a Ana Carolina Ribeiro Aguiar (avaliadora interna) e Prof. Dr. Claudemir Batalini (avaliador externo), sob a presidência do primeiro, em sessão pública realizada online via google meet, para procederem a avaliação da defesa de Dissertação, em nível de mestrado, da autoria de JACIEL GONÇALVES DOS SANTOS, discente do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca Examinadora, Prof. Dr. Jáliston Júlio Lopes Alves, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da Dissertação para, em 30 min., proceder à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se a avaliação da defesa. Tendo-se em vista as normas que regulamentam o Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, e procedida às correções recomendadas, a Dissertação foi APROVADA, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, na área de concentração Agroquímica, pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGAq da versão definitiva da Dissertação, com as devidas correções. Assim sendo, a defesa perderá a validade, se não cumprida essa condição, em até 60 (sessenta) dias da sua ocorrência. A Banca Examinadora recomendou a publicação dos artigos científicos oriundos dessa Dissertação em periódicos de circulação nacional e/ou internacional, após procedida as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades da pauta, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado, e para constar, eu, Viviane Proto Ferreira, secretária do PPGAq, lavrei a presente Ata, que, após lida e achada conforme, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em quatro vias de igual teor.

Prof. Dr. Jáliston Júlio Lopes Alves (Presidente)

Prof.^a Dr.^a Ana Carolina Ribeiro Aguiar (Avaliadora Interna)

Prof. Dr. Claudemir Batalini (Avaliador externo)

Documento assinado eletronicamente por:

- Claudemir Batalini, Claudemir Batalini - Professor Avaliador de Banca - Ufmt (33004540000100), em 25/07/2024 14:44:43.
- Ana Carolina Ribeiro Aguiar, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 24/07/2024 17:09:54.
- Jaliston Julio Lopes Alves, TECNICO EM AGROPECUARIA, em 24/07/2024 16:07:32.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 23/07/2024. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 616162

Código de Autenticação: 730a7ead14



INSTITUTO FEDERAL GOIANO

Ca

**mpus Rio Verde Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, 01, Zona Rural,
RIO VERDE / GO, CEP 75901-970**

(64) 3624-1000

“I’m gonna be stronger
Know that I’ve tried my”
Gloria M. Estefan

Agradecimentos

Quero agradecer a Deus, por me dar forças, sabedoria e dedicação para correr atrás desse sonho que até outrora estava engavetado. Foram inúmeras vezes que pensei em parar e desistir porque esta realidade estava fora do meu alcance.

Gostaria de agradecer aos meus familiares que acreditaram neste sonho auxiliaram e ajudaram a superar momentos difíceis; ao tentar citar o nome de todos os familiares poderia acabar esquecendo um ou outro, mas não poderia jamais deixar de agradecer aos meus tios Enoc Alves dos Santos e Patrícia dos Santos Alves, sem vocês eu não teria chegado aonde cheguei.

A minha orientadora Cassia Cristina Fernandes por me orientar, pela confiança, força, atenção e por todo conhecimento adquirido ao longo desses anos. Aos meus coorientadores Dr. Jáliston Júlio e Dr. Mayker Lazaro, pelo apoio e ensinamentos.

Ao meu coorientador Dr. Jáliston Júlio por ter aberto as portas da Central Multiusuário de Análises e o Laboratório de Química de Materiais Energéticos Renováveis e Aplicáveis (QUÍMERA). Agradeço ao apoio, paciência e ensinamentos durante esse tempo no qual pudemos trabalhar juntos. Através do seu trabalho tive a oportunidade de conhecer o Dr. Douglas Gontijo e Dr. Francisco Neto, que contribuíram imensamente na execução desse projeto.

Quero agradecer ao Professor Dr. Claudemir Batalini, por ter aberto as portas do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Sínteses Orgânica (LAPQUÍM) – UFMT – Campus Universitário do Araguaia, para que eu pudesse realizar uma parte das pesquisas; aos colegas que conheci e trabalhei no LAPQUÍM.

Aos colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LPQN) e QUIMERA- IF Goiano – Campus Rio Verde, que tive o privilégio de conhecer e trabalhar. Ao Alex Santos Macedo, à Viviane Araújo e Lidiane Moreira, por todo apoio e ensinamentos no decorrer desses anos.

Existem pessoas que conheci que se tornaram imprescindível em minha vida, obrigado Amanda, Lara e Jonas, por me ouvirem, ajudarem tanto nos experimentos, principalmente pelos momentos sociais. Obrigado Amanda pelos momentos bons e por cuidar de mim nos momentos difíceis, os almoços e jantares que teve em sua casa, muito obrigado por tudo.

A todos os professores do Instituto Federal Goiano que corroboraram com meu crescimento e desenvolvimento profissional e pessoal, um agradecimento especial aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. A Central Multiusuário de

Análises pela realização dos experimentos e a Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Biografia do autor

Jaciel Gonçalves dos Santos, filho de Rute Alves dos Santos Souza e Lourival Gonçalves de Souza, nascido em 01 de abril de 1996 na cidade de Aragarças – GO. Graduou-se em Licenciatura em Química pela Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Universitário do Araguaia em março de 2018, iniciou na graduação em Agronomia na Universidade Federal de Mato Grosso em março de 2018. Possui especialização em Ciências da Natureza, suas Tecnologias e o Mundo do Trabalho (2023) pela Universidade Federal do Piauí. Em agosto de 2022 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, nível Mestrado, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, sob a orientação da Dr^a Cassia Cristina Fernandes e coorientação do Dr. Jáliston Júlio Lopes Alves e Dr. Mayker Lazaro Dantas Miranda, na linha de pesquisa Agroquímica Orgânica.

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão da literatura	2
2.1. Gênero <i>Pterodon</i>	2
2.1.1 <i>Pterodon pubescens</i>	2
2.2. Gênero <i>Cochlospermum</i>	3
2.2.1 <i>Cochlospermum regium</i>	4
2.3. Metabólitos secundários.....	6
2.4. Extrato vegetal	8
2.5. Periodontite	9
2.6. Atividade citotóxica	10
2.7. Gênero <i>Helminthosporium</i>	11
2.7.1 <i>Bipolaris oryzae</i>	11
2.8. <i>Xanthomonas citri</i>	12
3. Referências	14
4. Objetivos.....	24
4.1. Objetivos gerais	24
4.2. Específicos.....	24
Capítulo I: Compostos voláteis do extrato hexânico de sementes de <i>Pterodon pubescens</i> Benth e seu significativo potencial <i>in vitro</i> significativo contra diferentes cepas bacterianas	2
1. Introdução	27
2. Materiais e métodos.....	27
2.1. Material vegetal	27
2.2. Preparação do extrato hexânico das sementes de <i>P. pubescens</i> (HE-PP).....	28
2.3. Identificação química do extrato hexânico das sementes de <i>P. pubescens</i> (HE-PP).....	28
2.4. Ensaio antiperiodontopatogênico	29
2.5. Ensaio antimicobacteriano.....	29
2.6. Ensaio anti- <i>Xanthomonas citri</i>	30
2.7. Avaliação citotóxica contra células humanas	31
3. Resultados e discussão.....	31
4. Conclusões	36
5. Referências	38

Capítulo II: <i>Cochlospermum regium</i> (Mart. Ex Schrank) Pilg.: perfil fitoquímico e atividade antifúngica em <i>Bipolaris oryzae</i> cepa BRM 67786 (Embrapa)	42
1. Introdução	44
2. Materiais e Métodos	45
2.1. Material vegetal	45
2.2. Preparação dos extratos	45
2.3. Análises químicas	46
2.3.1 Determinação de compostos fenólicos por espectroscopia UV-Visível	46
2.3.2 Espectrometria de Massas de Alta Resolução	47
2.4. Fungitoxicidade	47
2.4.1 Preparo do inóculo	47
2.4.2 Atividade antifúngica	47
2.5. Estatística.....	48
3. Resultados e Discussões	48
4. Conclusão	59
5. Referência.....	60
5. Conclusão Geral	63
Apêndice.....	64

Índice das Figuras

Figura 1: Faixa de clima tropical em que foram identificadas plantas do gênero <i>Cochlospermum</i> em cada continente	3
Figura 2: Arbusto de <i>Cochlospermum regium</i> (A). Galho de <i>C. regium</i> com folhas palminérvea com margem serrilhada (B). Galho de <i>C. regium</i> com flor pentâmera amarela no ápice do galho (C).....	5
Figura 3: Fluxograma simplificado da rota biossintética de metabolitos secundários	7
Figura 4: Curva de calibração de padrão de ácido gálico para a determinação do conteúdo fenólico total dos extratos hidrometanólico acidificado das folhas de <i>C. regium</i> através de UV-vis.	49
Figura 5 Curva de calibração padrão de catequina para a determinação de flavonoides dos extratos hidrometanólico acidificado das folhas de <i>C. regium</i> através de UV-vis	50
Figura 6: Curva de calibração padrão de epicatequina para a determinação de proantocianidinas dos extratos hidrometanólico acidificado das folhas de <i>C. regium</i> através de UV-vis	50

Índice das Tabelas

Tabela 1: Classe de compostos identificados em <i>Pterodon pubescens</i>	2
Tabela 2: Compostos identificados de folhas e xilopódio de <i>Cochlospermum regium</i>	5
Tabela 3: Atividades citotóxica realizada com diferentes linhagens de células tumorais utilizando extrato vegetal e compostos isolados de extratos vegetais derivados de <i>Pterodon pubescens</i>	10
Tabela 4: Composição química do extrato hexânico das sementes de <i>Pterodon pubescens</i> (HE-PP)	32
Tabela 5: Concentração inibitória mínima do extrato hexânico das sementes de <i>P. pubescens</i> (HE-PP) contra bactérias periodontopatogênicas. Cepas de controle técnico: <i>Bacteroides fragilis</i> (ATCC 25285) - Metronidazol: 1,47±0,07 µg/mL e <i>bacteroides thetaiotaomicron</i> (ATCC 29741) - Metronidazol: 1,47±0,07 µg/mL.	34
Tabela 6: Atividade anti- <i>Xanthomonas citri</i> do extrato hexânico de sementes de <i>P. pubescens</i> - HE-PP (os valores de MIC são expressos como µg/mL)	34
Tabela 7: Atividade antimicobacteriana do extrato hexânico das sementes de <i>P. pubescens</i> - HE-PP (os valores de MIC são expressos como µg/mL)	35
Tabela 8: Valores de IC ₅₀ e Índice de Seletividade (S.I.) obtidos contra diferentes linhagens celulares após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de extrato hexânico de sementes de <i>P. pubescens</i> (HE-PP).	36
Tabela 9: Valores da massa e fator de rendimento dos extratos hidrometanólico acidificado das folhas de <i>C. regium</i> utilizando três técnicas de extração: maceração, ultrassom e maceração + ultrassom	48
Tabela 10: Quantificação de compostos fenólicos totais encontrados nos extratos hidrometanólico acidificados das folhas de <i>Cochlospermum regium</i> utilizando espectroscopia de UV-vis, quantificação de fenóis totais µg.mg ⁻¹ equivalente ao ácido gálico/ g de extrato analisado em 760 nm, quantificação de flavonoides µg/mg ⁻¹ equivalente a quercetina/g de extrato analisado em 420 nm; quantificação de proantocianidinas, µg.mg ⁻¹ equivalente a epicatequina/ g de extrato analisado em 500 nm.	51
Tabela 11: Dados cromatográficos da Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS) e tentativa de identificação dos principais compostos nos extratos hidrometanólico acidificado das folhas de <i>Cochlospermum regium</i>	53
Tabela 12: Atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos extratos metanólicos acidificados nos sete primeiros dias	58

Tabela 13: Atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos extratos metanólicos acidificados aos quatorze dias	58
---	----

RESUMO

SANTOS, J. G. Extratos vegetais de *Pterodon Pubescens* Benth. e *Cochlospermum regium* (Mart. Ex Schrank) Pilg.: Composição química e sua bioatividade. 2024. Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, como parte das exigências da Pós-Graduação em Agroquímica para a obtenção do título de Mestre em Agroquímica.

Os produtos destinados para o controle fitossanitário de pragas e doenças, fabricados a partir de ativos sintéticos, são responsáveis por graves danos ambientais, pela quantidade de compostos tóxicos que são retidos no solo, contaminam as águas e acumulam ao longo da cadeia trófica. Uma alternativa para mitigar os impactos futuros causados pelo contínuo uso destes produtos, ocorre partir da substituição dos ativos sintéticos, por compostos ativos presentes em plantas. Os metabólitos secundários de *Pterodon pubescens* (Naftaleno, Cariofileno, Vouacapano e Espatuleno) com importante atividade antimicrobiana e *Cochlospermum regium*, (ácido gálico Luteolina-C-hexosídeo, Apigenina-C-hexose e ácido quínico), foram utilizados para o controle de fungo fitopatogênicos como *Sclerotinia sclerotiorum*. Foram preparados extratos hexânicos dos frutos de *P. pubescens* (HE-PP) e extrato hidrometanólico acidificado das folhas de *C. regium*, os compostos voláteis do HE-PP foram identificados através de Cromatografia Gasosa (GC) e os compostos dos extratos de *C. regium* foram identificados por Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS). Para o extrato de HE-PP, obtido através de maceração, foram realizados ensaios para atividade antibacteriana, micobacteriana e citotóxica, a partir do extrato de *C. regium*, obtidos utilizando três técnicas de extração, sendo: ultrassom, maceração e maceração + ultrassom, foi determinada a atividade antifúngica em *Bipolaris oryzae*. Os ensaios a avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* do HE-PP foram realizados em: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis*, *Actinomyces naeslundii*, *Peptostreptococcus anaerobius* e *Xanthomonas citri*, avaliação antimicobacteriana do HE-PP *in vitro* foi realizado em: *Mycobacterium avium* e *M. tuberculosis*, a avaliação da atividade citotóxica *in vitro* do HE-PP foram testadas com as linhas de células humanas: GM07492A (Fibroblasto humano) HeLa (Adenocarcinoma cervical humano), MCF-7 (Adenocarcinoma de mama humano) e U-251MG (Glioblastoma humano). Foram realizados testes para determinar a fungitoxicidade dos extratos de *C. regium* frente ao fungo *Bipolaris oryzae in vitro* e verificar se o método de extração influencia na inibição. Os compostos majoritários encontrados no HE-PP foram *E*- cariofileno, vouacapano, *E*- geranilgeraniol e dehidroabietol, nos extratos de *C.*

regium identificou-se: ácido gálico, apigenina-C-hexose, luteolina-C-hexosídeo, digaloil hexose e 1,2,3,4,6-Pentagaloil hexose. Os valores de MIC (Concentração mínima inibitória) do HE-PP para as bactérias foram: *A. actinomycetemcomitans* (50 µg/mL), *P. gingivalis* (12,5 µg/mL), *P. nigrescens* (25 µg/mL), *F. nucleatum* (12,05 µg/mL), *B. fragilis* (12,5 µg/mL), *A. naeslundii* (12,5 µg/mL), *P. anaerobius* (12,5 µg/mL) e *X. citri* (100 µg/mL), contra as cepas de micobactérias *M. avium* e *M. tuberculosis* o valor de MIC foram 125 µg/mL para ambas micobactérias, o HE-PP apresenta citotoxicidade seletiva para HeLa (IC₅₀ = 53,47 µg/mL). Os extratos de *C. regium* mostraram ser eficientes ao inibir o crescimento dos halos miceliais do fungo *B. oryzae in vitro*, a concentração de 500 µg. mL⁻¹ mostrou melhor capacidade de inibição do halo micelial do fungo após 14 dias de análise.

Palavras-chave: Agroquímica, mancha parda, sucupira branca, algodãozinho do cerrado, metabolismo vegetal, fitoquímica.

ABSTRACT

SANTOS, J. G. Plant extract of *Pterodon Pubescens* Benth. and *Cochlospermum regium* (Mart. Ex Schrank) Pilg.: Chemical composition and its bioactivity. 2024. Dissertation presented to the Instituto Federal Goiano - *Campus* Rio Verde - GO, as part of the requirements of the Postgraduate Program in Agrochemistry for the degree of Master in Agrochemistry.

Products used to control pests and diseases, made from synthetic active ingredients, are responsible for serious environmental damage due to the amount of toxic compounds that are retained in the soil, contaminating water and being accumulate along the trophic chain. One alternative for mitigating the future impacts caused by the continued use of these products is to replace synthetic active ingredients with active compounds found in plants. The secondary metabolites of *Pterodon pubescens* (naphthalene, caryophyllene, vouacapane and spatulene) with significant antimicrobial activity and *Cochlospermum regium* (gallic acid, luteolin-C-hexoside, apigenin-C-hexose and quinic acid) were used to control phytopathogenic fungi such as *Sclerotinia sclerotiorum*. Hexanolic extracts of the fruits of *P. pubescens* (HE-PP) and acidified hydromethanolic extract of the leaves of *C. regium* were prepared, then the volatile compounds of HE-PP were identified by Gas Chromatography (GC) and the compounds of the *C. regium* extracts were identified by High Resolution Mass Spectrometry (HRMS). For the HE-PP extract, obtained through maceration, tests were carried out for antibacterial, mycobacterial and cytotoxic activity. From the *C. regium* extract, obtained using three extraction techniques: ultrasound, maceration and maceration + ultrasound, the antifungal activity on *Bipolaris oryzae* was determined. The tests to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of HE-PP were carried out on: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis*, *Actinomyces naeshlundii*, *Peptostrptococcus anaerobius* and *Xanthomonas citri*, while antimycobacterial evaluation of HE-PP *in vitro* was performed on: *Mycobacterium avium* and *M. tuberculosis*, the evaluation of the *in vitro* cytotoxic activity of HE-PP was tested with human cell lines: GM07492A (Human fibroblast) HeLa (Human cervical adenocarcinoma), MCF-7 (Human breast adenocarcinoma) and U-251MG (Human glioblastoma). Tests were carried out to determine the fungitoxicity of *C. regium* extracts against the fungus *Bipolaris oryzae in vitro* and to see if the extraction method influenced inhibition. The majority compounds found in HE-PP were *E*-caryophyllene, vouacapane, *E*-geranylgeraniol and dehydroabietol, while the extracts of *C. regium* identified gallic acid, apigenin-C-hexose, luteolin-C-hexoside, digaloyl

hexose and 1,2,3,4,6-pentagaloyl hexose. The MIC (Minimum Inhibitory Concentration) values of HE-PP for the bacteria were: *A. actinomycetemcomitans* (50 µg/mL), *P. gingivalis* (12.5 µg/mL), *P. nigrescens* (25 µg/mL), *F. nucleatum* (12.05 µg/mL), *B. fragilis* (12.5 µg/mL), *A. naeslundii* (12.5 µg/mL), *P. anaerobius* (12.5 µg/mL) and *X. citri* (100 µg/mL), against the mycobacterial strains *M. avium* and *M. tuberculosis* the MIC value was 125 µg/mL for both mycobacteria, HE-PP shows selective cytotoxicity for HeLa ($IC_{50} = 53.47$ µg/mL). The extracts of *C. regium* proved to be efficient in inhibiting the growth of the mycelial halos of the fungus *B. oryzae in vitro*, the concentration of 500 µg. mL⁻¹ showing the best capacity for inhibiting the mycelial halo of the fungus after 14 days of analysis.

Keywords: Agrochemicals, brown spot, white sucupira, cerrado cotton, plant metabolism, phytochemistry.

1. Introdução Geral

O uso indiscriminado de produtos químicos sintéticos no agronegócio é questão latente no Brasil (Santos; Santos, 2023). Esses produtos podem ser estáveis no ambiente, bioacumulando nas cadeias tróficas, levando toxicidade ao ser humano (Mostafalou; Abdollahi, 2017). Nesse sentido, o uso desmoderado de compostos químicos sintéticos podem contribuir com a degradação dos solos e águas (Dalenogare, 2022).

A agricultura alternativa, com a diminuição de agroquímicos sintéticos vem ganhando espaço nos meios de cultivo (Carvalho, 2021). Santos *et al.*, (2013) corroboram com a utilização de plantas para o controle de insetos, fungos, nematoides e herbicida; evitando a contaminação das plantas e do solo por meio de metabolitos secundários tais como flavonoides, terpenos e compostos fenólicos.

A sucupira branca (*Pterodon pubescens*) é uma espécie amplamente distribuída no Cerrado (Brito *et al.*, 2023). O óleo extraído do fruto dessa espécie apresenta propriedade medicinais com ação analgésicas, anti-inflamatórias, antitumorais, antimicrobianas etc. (Bavaresco *et al.*, 2016), o extrato de suas folhas apresenta ação nematicida para os nematoides *Meloidogyne javanica* (Silva *et al.* 2022).

O algodãozinho do cerrado (*Cochlospermum regium*) é uma planta nativa do Brasil encontrada principalmente nas áreas de Cerrado, na medicina popular é muito utilizada para infecções ginecológicas, úlceras, gastrite etc. (Oliveira *et al.*, 2020). O óleo essencial extraído das folhas de *C. regium* vêm sendo estudado para utilização na agricultura sendo capaz de inibir fungos pós-colheita como o *Rhizopus stolonifer* (Nascimento, 2021).

2. Revisão da literatura

2.1. Gênero *Pterodon*

A família Fabaceae é composta por três subfamílias: Faboideae (Papilionoideae), Caesalpinioideae e Mimosoideae. A subfamília Faboideae é subdivida na tribo Pterodon que é composto por duas famílias: *Pterodon emarginatus* Vogel e *Pterodon pubescens* Benth, tendo como sinônima as espécies *Pterodon abruptus* Benth., *Pterodon appariciori* Pedersoli e *Pterodon polygalaeflorus* (Santos *et al.*, 2010). O gênero *Pterodon* pode ser distinguido por apresentar características marcantes, como fruto em formato de criptosâmara com glândulas de óleo no epicarpo, folhas com raque marginada, semente lisa com rafe aparentem hilo na posição lateral coberto por um arilo e embrião liso (Leite *et al.*, 2014).

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2023), denomina *P. pubescens* como sucupira-branca e *P. emarginatus* como sucupira lisa. Estudos com o gênero *Pterodon* têm sido relacionados principalmente ao potencial medicinal do óleo extraído de sementes. Em *P. pubescens*, o óleo apresentou atividade anti-*Trypanosoma* cruz (Albernaz, 2020).

2.1.1 *Pterodon pubescens*

Pterodon pubescens Benth, pertencente à família Fabaceae, popularmente conhecida como sucupira branca, é amplamente utilizada na medicina popular por suas atividades anti-inflamatórias, antirreumáticas, leishimanicida e antiproliferativa (Albernaz, 2020). Os frutos de *P. pubescens* apresentam derivados de vouacapano e geranilgeraniol que estão relacionados com as propriedades farmacológicas (Silva Santos *et al.*, 2016; Oliveira, 2018).

Os estudos fitoquímicos de *P. pubescens* são extensos pela grande quantidade de metabólitos secundários encontrados em todas as partes dessa planta, metabólitos estes que apresentam propriedades biológicas (Santos; Fernandes; Miranda, 2023). Análises fitoquímicas revelam a presença de metabolitos, como: alcaloides e terpenoides no córtex do caule (Batalini *et al.*, 2020). Alguns dos compostos já isolados e identificados presentes em *P. pubescens* estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1: Classe de compostos identificados em *Pterodon pubescens*.

Classe de compostos	Órgão utilizado para extração	Referência
Alcaloides, saponinas, glicosídeos e esteroides	Casca	Bustamante <i>et al.</i> , 2010

Esteroides, sesquiterpenos, isoflavonas e saponinas	Folhas	Negri <i>et al.</i> , 2014; Santos <i>et al.</i> , 2010
Isoflavonas e triterpenos	Madeira	Braz-Filho <i>et al.</i> , 1971; Marques <i>et al.</i> , 1998
Isoflavonas, sesquiterpenos e diterpenos	Óleo do fruto	Pinto <i>et al.</i> , 2013; Santos <i>et al.</i> , 2023

2.2 Gênero *Cochlospermum*

O gênero *Cochlospermum* pertence à família Bixaceae; compreendendo 17 espécies divididas em dois gêneros: *Cochlospermum* e *Amoreuxia* (Domingos, 2022). O gênero *Cochlospermum* compreende 13 espécies distribuídas no mundo, principalmente nas áreas tropicais (Figura 1) (Guadarrama; Rios, 2018); seis espécies no continente Africano, quatro espécies no continente americano, duas espécies na Oceania e uma espécie na Ásia (Pedroso *et al.*, 2019).



Figura 01: Faixa de clima tropical onde foram identificadas plantas do gênero *Cochlospermum* em cada continente.

Fonte: Kubitzki, 2002

A nível mundial as plantas do gênero *Cochlospermum* não tem valor econômico, entretanto há diversos estudos apontando o potencial que algumas espécies pertencentes a este gênero possam ter valor econômico para a obtenção de produtos farmacológicos/ medicinais (sínteses de nanopartículas de ouro com ação antiproliferativa contra a linhagem celular B16F10), ornamentais, alimentação, obtenção de corante, fibras e óleo (Domingos, 2022).

As espécies *C. vitifolium* e *C. regium* encontram-se no continente americano entre o Brasil e o México, e *C. regium* demonstra atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Ribeiro *et al.*, 2017), as espécies *C. religiosum* e *C.*

gossypium são procedentes da Índia (Domingos, 2022), o *C. gillivraei* da Austrália tem sido utilizado na medicina popular e como fonte alimentícia por causa das atividades biológicas e anticarcinogênica (Kalaighana Selvi *et al.*, 2017).

As espécies *C. angolense*, *C. planchonii* e *C. tinctorium* são endêmicas do continente africano; essas espécies despertaram interesse científico pelas propriedades hepatoprotetora e o uso para o tratamento de malária. Devido à presença de compostos fenólicos, flavonoides e ácidos orgânicos nas plantas do gênero *Cochlospermum*, elas são utilizadas para tratamento de doenças (Domingos, 2022).

2.2.1 *Cochlospermum regium*

Cochlospermum regium (Figura 2) é um arbusto perene da família Bixaceae (Arunachalam *et al.*, 2019), conhecido popularmente como: “algodãozinho-do-campo”, “algodão-cravo”, “algodão do mato”, “algodoeiro-do-campo”, “algodãozinho-do-cerrado”, “butuá-de-corvo”, “periquiteira-do-campo”, “pocotê”, “algodão-bravo”, “periquiteira” e “butuá”; é uma planta que tem ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada nos biomas Caatinga, Pantanal, campos da Amazonia e Cerrado (WFO, 2023).

As plantas de *C. regium* são classificadas como arbusto que podem chegar a dois metros de altura, com xilopódio resistente e profundo, caule ferrugíneo e nodoso, folhas palminérvea com margem foliar variando entre crenada e serrilhada, alternas, longo peciolada, consistência coriácea e parte adaxial pubescente. As flores são amareladas, pentâmeras, dispostas em panículas localizadas no ápice dos galhos; as sementes são espiraladas e ortodoxas (Arunachalam *et al.*, 2019).

C. regium é uma planta resistente às queimadas e ao pastejo, nascendo principalmente em solos arenoso; todas as suas partes são utilizadas na medicina popular: xilopódio, caule, folhas, flor e sementes (Lemes *et al.*, 2017). O *C. regium* é classificado como fitoterápico pela grande quantidade de compostos químicos pertencentes as classes de fenóis e flavonoides encontrados em todas as partes da planta (Nascimento, 2022).

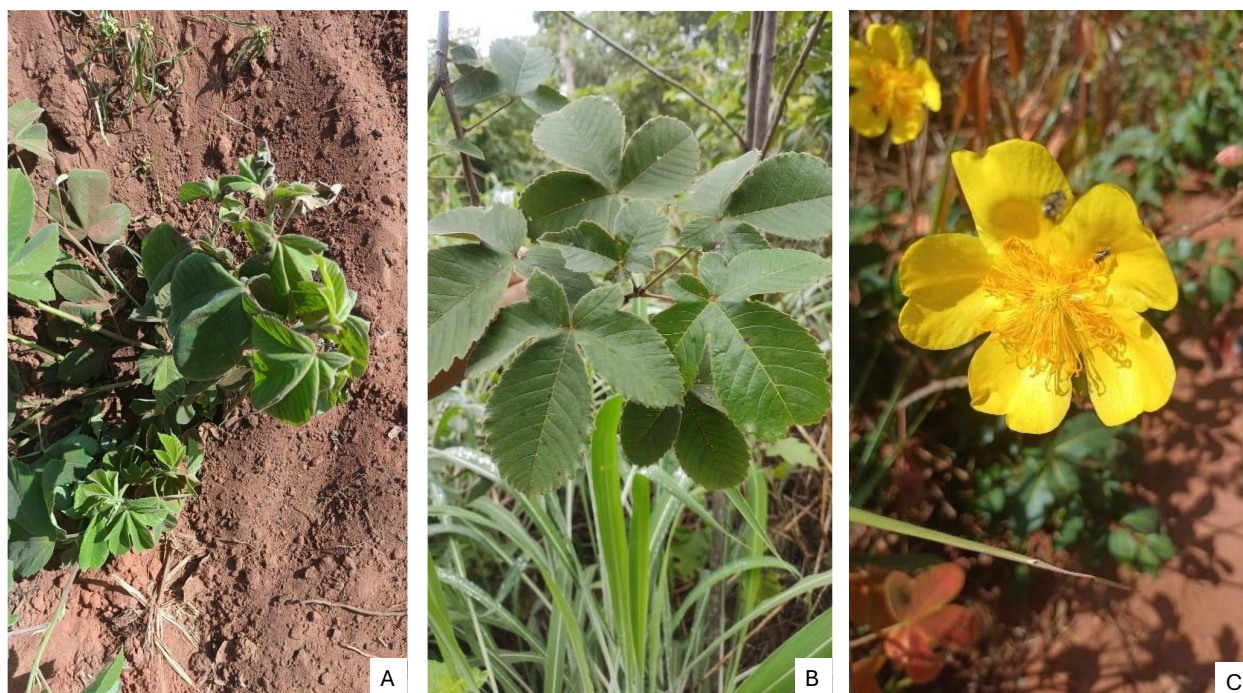


Figura 2: Arbusto de *Cochlospermum regium*(A). Galho de *C. regium* com folhas palminérvea com margem serrilhada (B). Galho de *C. regium* com flor pentâmera amarela no ápice do galho (C).

Fonte: Santos, J. G. (2024).

Na região do Cerrado o algodãozinho é decíduo, apresentando distinção entre a fase vegetativa e reprodutiva de acordo com as estações do ano presente nas áreas do Cerrado; o estado vegetativo corresponde a época de chuva e florescendo na época da seca. A época de florescimento pode durar 165 dias, acontecendo entre maio e outubro tendo pouca diferença entre a época de florescimento das plantas em cada bioma (da Silva *et al.*, 2020).

Relatos na literatura sobre o efeito bactericida de *C. regium* podem estar relacionados a presença de flavonoides triacilbenzenos e derivados do ácido gálico; a constituição básica do óleo essencial do xilopódio e folhas contém sesquiterpenos tendo o β -copaen-4- α -ol e viridiflorol como constituintes majoritários, alguns dos compostos já isolados e identificados presentes em *C. regium* estão dispostos na Tabela 2 (Nascimento, 2022; de Paula Magalhães, 2022).

Tabela 2: Compostos identificados de folhas e xilopódio de *Cochlospermum regium*.

Composto	Órgão utilizado para extração	Referência
Mirceno, Bicyclogermacreno, Germacreno D e Epatulenol	Óleo essencial das folhas	Nascimento, 2022

β -copaen-4- α -ol e viridiflorol	Óleo essencial das folhas	Inacio <i>et al.</i> , 2013
β -selineno, elemeno, trans-cariofileno, α -pineno, α -humuleno, aromadendrina, α -selineno e δ -cadineno	Óleo essencial do xilopódio	Brum <i>et al.</i> , 1997, Honda <i>et al.</i> , 1997
Aromadendrina, ácido elágico, ácido gálico, galato de etila, dihidrokaempferol, dihidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo, dihidrokaempferol-3-O- β -(6'' galoiI) -glicopiranosídeo, dihidrokaempferol, pinoresinol, excelsine, triacilbenzenos cochlospermina A e B.	Extrato hidroetanólico do xilopódio	Solon <i>et al.</i> , 2012
Canferol, naringenina, aromadendrina e 1-hidroxitetradecanona-3.	Extratos do xilopódio	Siqueira <i>et al.</i> , 1994, Ritto, 1996
Dihidrokanferol-3-O- β -glucopiranosida	Xilopódio	Lima et al., 1996
β -bisabolenol, Copaeno-4- α -ol < β >, Viridiflorol, Longiborneol,	Óleo essencial do xilopódio	de Paula Magalhães, 2022

2.3. Metabólitos secundários

Metabolismo é definido como o conjunto total das transformações das moléculas orgânicas catalisadas por enzimas, que ocorre em células vivas, suprindo o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo a continuidade (Reis; Schmiele, 2019). As plantas produzem diversidade de metabólitos estrutural e funcionalmente diversas e desempenham papéis diferentes no crescimento e desenvolvimento da planta e na resposta das plantas às condições ambientais (Pacheco; Alves, 2020).

Os metabólitos secundários geralmente são produzidos após o crescimento da planta e possuem muitas estruturas químicas e atividades biológica distintas, sendo restritos há algumas famílias e grupos taxonômicos, sendo características estruturais particulares decorrentes da fotossíntese (Verma; Shukla, 2015). Está diversidade metabólica é devido à modificação química que acontece nos esqueletos de carbono básicos dos metabólitos (Barreto *et al.*, 2020).

A partir da fotossíntese é formado o esqueleto básico de carbono (Ciclo das Pentoses fosfato), iniciando as principais vias metabólicas: via do ácido chiquímico e via do acetato

(acetil-CoA) (Figura 3) (Barreto *et al.*, 2020). A partir da via do ácido chiquímico ocorrem as principais biossínteses dos fenóis (Taiz *et al.*, 2017). Os compostos fenólicos são moléculas heterogêneas que incluem mais de 10,000 compostos com grande diversidade estrutural (Barreto *et al.*, 2020).

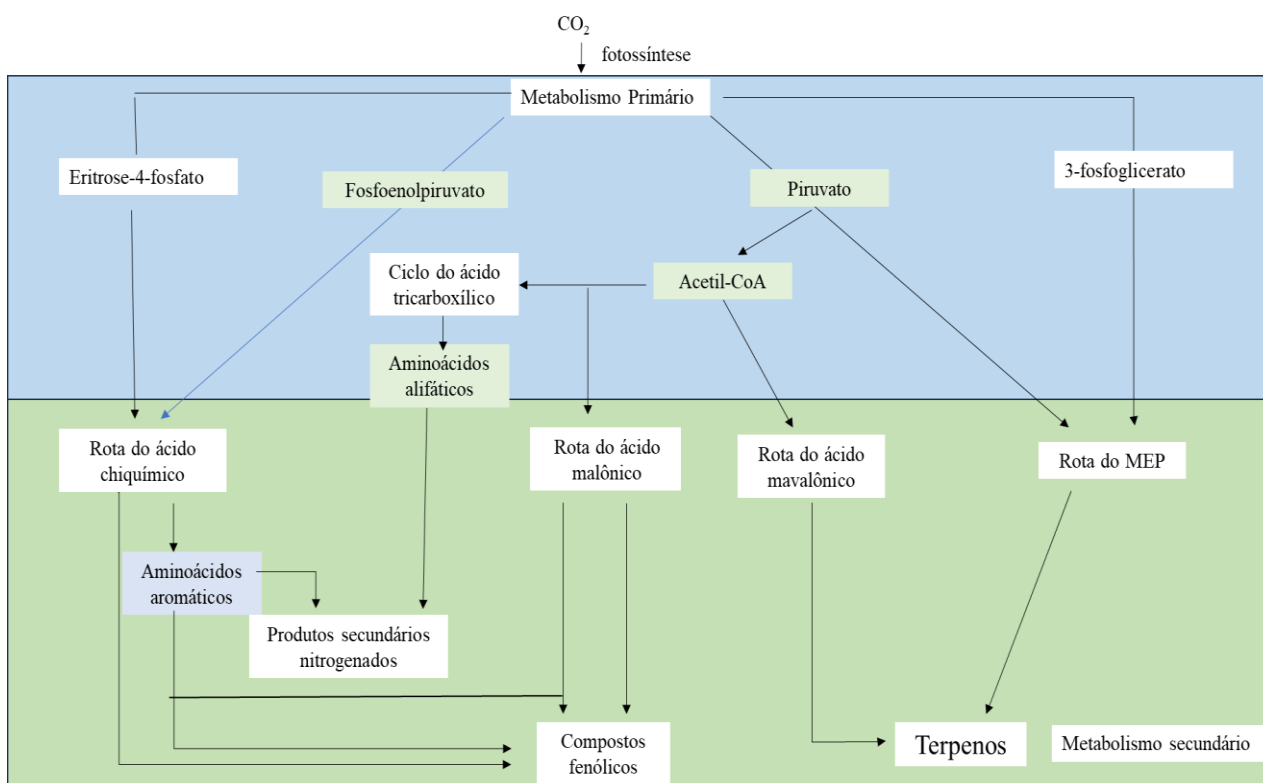


Figura 3: Fluxograma simplificado da rota biossintética de metabolitos secundários.

Fonte: Adaptado Taiz e Zeiger, (2017).

Os compostos fenólicos são vitais para a planta, estando relacionado com a resposta de defesa da planta à ataques e herbivoria, além disso, nas plantas atuam como agente antipatogênico, auxilia na pigmentação e são responsáveis pela atividade antioxidante (Barreto *et al.*, 2020). Os compostos fenólicos são originados a partir das diversas formas de combinações das variedades de estruturas dos compostos fenólicos, são classificados de acordo com a constituição de suas cadeias carbônicas (Barreto *et al.*, 2020).

Taninos são polímeros fenólicos com propriedades de defesa vegetal, assim como ligninas (Taiz *et al.*, 2017). Os taninos aumentam o estoque de nutrientes para o próximo período de vegetação, por liberar substância amarga ao paladar dos animais (Martins, 2012). São classificados de acordo com a estrutura química em hidrolisáveis e condensados; os hidrolisáveis são ésteres de ácido gálico e elágico glicosilados, sintetizados via rota do chiquimato (Simões *et al.*, 2017).

2.4. Extrato vegetal

Com a finalidade de extrair os metabólitos secundários das plantas prepara-se extratos vegetais, ou seja, retirar da planta as substâncias desejadas. Para preparar o extrato deve-se levar em consideração as características físicas e químicas do material vegetal, a polaridade do solvente utilizado e quais as classes de metabólitos que deseja extrair (Leal; Mendonça, 2022).

Existem inúmeras formas de realizar extratos vegetais, esses métodos podem ser divididos em métodos clássicos, como: extração a frio e extração a quente e métodos alternativos como: ultrassom e fluido supercrítico (Chuyen *et al.*, 2018). Cada técnica de extração apresenta vantagens e desvantagens ao mesmo tempo, como: alto consumo de solventes, degradação térmica, longo tempo de extração e degradação de compostos alvos (Leal, Mendonça., 2022).

Os métodos tradicionais de extração (extração por solvente, maceração [estática e dinâmica] e extração por Soxhlet) em geral necessitam de longos tempos de processo e utilizam quantidades elevadas de solventes (Chuyen *et al.*, 2018). O ultrassom é compreendido como ondas de alta frequência (>20 kHz) acima do limiar da audição humana (Manzoor *et al.*, 2019; Zia *et al.*, 2019). O uso dessas ondas na extração surgiu como técnica promissora que atende aos critérios exigidos de um processo de baixo custo e de mínimo impacto ambiental.

A melhoria nos processos de extração por ultrassom deve-se ao efeito mecânico de agitação e cavitação; quando ondas de ultrassom se propagam através de sequência de compressões e rarefações são induzidas, causando alteração de pressão na matriz. Essa variação da pressão causa a formação de bolhas de cavitação, que crescem até se tornarem estáveis e entrarem em colapso (Xie *et al.*, 2015).

A expansão e colapsos da bolha geram altas pressões e temperaturas que resultam em turbulência e fortes efeitos de micro *streaming*. Esses efeitos coletivamente causam a ruptura da membrana celular e ocorre a penetração do solvente na matriz. Os efeitos mecânicos causam redução do tamanho da partícula, permitindo maior penetração de solvente, levando ao aumento da área de superfície de contato entre as fases líquida e sólida (Xie *et al.*, 2015). Como resultado, os compostos extrativos alvo difunde-se rapidamente da matriz para o solvente com aumento da transferência de massa através da membrana (Toma *et al.*, 2001).

2.5. Periodontite

A periodontite é definida como uma doença crônica de caráter inflamatório e multifatorial resultante do desequilíbrio na homeostase entre a microbiota subgingival e a defesa do hospedeiro, que possui como característica a destruição progressiva da inserção dental (Kwon, Lamster, Levin, 2021).

A periodontite é uma doença classificada de acordo com seu estágio, a classificação dos estágios está associada com a gravidade da doença, que tem como principais sintomas, gengivas com aspecto avermelhado ou arroxeadas, sangramento espontâneo e gengiva edemaciada. O agente etiológico primário desta doença é o biofilme bacteriano que acumula ao redor dos dentes, durante um período de, no mínimo, 21 dias, e penetra no interior do sulco gengival (Spezzia, 2018).

A etiologia da periodontite está relacionada ao acúmulo de biofilme periodontopatogênico, em que estão presentes as seguintes espécies de bactérias: *Bacteroides gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis* (Curtis, Diaz, Dyke, 2020).

F. nucleatum é uma bactéria anaeróbia oral gram-negativa, fusiforme, não formador de esporos; uma das espécies gram-negativas mais abundantes encontradas na cavidade oral humana (Nozawa, *et al.*, 2020). É um dos patobiontes que superam durante a disbiose que precede a doença periodontal (Nozawa, *et al.*, 2020), atuando juntamente com outras espécies bacterianas como a *P. gingivalis* (Hajishengallis *et al.*, 2011). *F. nucleatum* pode ser encontrada na superfície dorsal da língua e em biofilmes multiespécies na margem gengival do dente, e desempenha papel importante no desenvolvimento da placa dentária subgingival (Alon-Maimon, Mandelboim, Bachrach; 2022).

A. actinomycetemcomitans é uma bactéria anaeróbia facultativa gram-negativa não móvel da família Pasteurellaceae (Raja, Ummer, Dhivakar; 2014, Fine, Schreiner, Velusamy; 2020), conhecido por contribuir para a inflamação, destruição e reabsorção óssea do tecido gengival, expressando vários fatores de virulência, como toxina distensora citoletal (Cdt), leucotoxina A (LtxA) da família de toxinas bacterianas Repeats-In-Toxins (RTX) e colagenase (Ozuna *et al.*, 2022).

P. gingivalis é uma bactéria gram-negativa, anaeróbica em forma de bastonete, presente no epitélio oral subgingival (Mei *et al.*, 2020). *P. gingivalis* é responsável pela forma crônica da periodontite, podendo remodelar a comunidade bacteriana comensal para promover estado

de disbiose (Olsen, Lambris, Hajishengallis, 2017). Segundo Mei *et al.*, (2020) as estratégias de sobrevivência e patogenicidade de *P. gingivalis* dependem em grande parte, de diversos fatores de virulência, incluindo os próprios componentes estruturais (lipopolissacarídeos, fímbrias, proteínas de choque térmico) e componentes secretores (gengivas e vesículas de membrana externa).

O avanço da aplicação de produtos naturais na prevenção e na cura de doenças acarretou a utilização de distintos extratos de plantas em tratamentos odontológicos (Junior, Monteiro; 2020). Ademais, a utilização de extratos de plantas possui atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (Melo Aleluia *et al.*, 2020).

2.6. Atividade citotóxica

Estudos demonstram que os diterpenos do tipo vouacapano podem ser usados como modelo para desenvolver novos agentes anticancerígenos (De Omena *et al.*, 2006; Pimenta *et al.*, 2006). Estudos de atividades antiproliferativas em células tumorais de extratos brutos de sucupira também foram realizados (Euzébio *et al.*, 2009; Spindola *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2008). Euzébio *et al.*, (2009) corroboraram essas evidências mostrando que 6 α ,7 β -hidroxivouacapan-17 β -lactona inibiu o crescimento de células cancerígenas humanas. Pereira *et al.*, (2011) demonstraram que o metil 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato inibiu significativamente efeitos citotóxicos e antiproliferativos em células K562 (Tabela 3).

Tabela 3: Atividades citotóxica realizada com diferentes linhagens de células tumorais utilizando extrato vegetal e compostos isolados de extratos vegetais derivados de *Pterodon pubescens*.

Amostra	Atividade	Referência
Éster metílico de 6 α -hidroxi7 β -acetoxi-vouacapan-17 β oato isolado do extrato diclorometânico do fruto	Anticancerígena (células tumorais de próstata, PC-3)	Spindola <i>et al.</i> , 2009
6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β lactona isolado do extrato hexânico	Anticancerígena (células de câncer de ovário)	Euzébio <i>et al.</i> , 2009
6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β lactona isolado do extrato hexânico	Anticancerígena (células de leucemia eritromieloblástica, K562)	Euzébio <i>et al.</i> , 2009

Óleo obtido do extrato
hexânico do fruto

Antitumoral

Outuki *et al.*, 2018

2.7. Gênero *Helminthosporium*

A mancha parda é causada pelo fungo *B. oryzae* (Brenda de Haan) Shoemaker (1959), tendo como sinônimas: *Bipolaris zizaniae*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Drechslera oryzae*, *Drechslera zizaniae*, *Helminthosporium macrocarpum*, *Helminthosporium oryzae*, *Helminthosporium zizaniae*, *Luttrellia oryzae*, *Ophiobolus miyabeanus* e *Spondylocladium macrocarpum*. Pertence à família Pleosporaceae, ordem Pleosporales, classe Dothideomycetes e ao filo Ascomycota (Manamgoda *et al.*, 2014).

As espécies *Bipolaris* inicialmente foram incluídas no gênero *Helmisporium* (Link, 1809). Persson, (1822) mudou a grafia do gênero para *Helminthosporium*; Nisikado, (1929) separou as espécies gramínicas de *Helminthosporium* em dois subgêneros: *Eu-Helminthosporium* e *Cylindro-Helminthosporium* (Manamgoda *et al.*, 2014).

As espécies com conídios cilíndricos com germinação a partir de células terminais foram incluídas no subgênero *Eu-Helminthosporium* e as espécies com conídios cilíndricos com germinação a partir de células terminais foram agrupadas no subgênero *Cylindro-Helminthosporium*. Ito, (1930) elevou o subgênero *Cylindro-Helminthosporium* para gênero; enquanto Shoemaker, (1959) elevou *Eu-Helminthosporium* para gênero e propôs que *Bipolaris* possuía o estágio sexual em *Cochliobolus* (Drechsler, 1934; Hawksworth *et al.*, 2011; Turland *et al.*, 2017).

Houve inúmeras discussões na comunidade acadêmica em relação a nomenclatura desse fungo; apesar de *Cochliobolus* ser o nome mais antigo, o estágio assexual é comumente mais encontrado na natureza. Além de *Bipolaris* ser o nome habitualmente usado na literatura. Sendo assim o *Cochliobolus* é o homomorfo assexual e *Bipolaris* o agente causal da mancha parda; o estágio assexual tendo prioridade sobre o sexual (Rossman; Manamgoda; Hyde, 2013).

2.7.1. *Bipolaris oryzae*

O fungo o agente causador da mancha parda no arroz é o fungo *B. oryzae* sinônima *Cochliobolus miyabeanus*, *Helminthosporium oryzae* e *Drechslera oryzae*; sendo *Helminthosporium oryzae* é sua forma reprodutiva sexuada (Silva-Lobo *et al.*, 2023). O ciclo de vida dos fungos é dividido em duas fases; uma fase somática, caracterizada pela atividade

alimentar e outra fase reprodutiva que pode ser sexuada ou assexuada. Nos dois tipos de reprodução há a formação de muitos conídios (Molinaro *et al.*, 2009).

A mancha parda do arroz é uma doença de ocorrência endêmica no qual influencia diretamente a produção de arroz em todos os continentes. A importância econômica não ocorre apenas pelas lesões provocadas no limbo foliar, mas, sobretudo pelos danos causados pelos grãos e sementes. Quando a panícula é atacada apresenta baixo rendimento levando a perdas de até 75% da produção (Sobrinho *et al.*, 2023).

B. oryzae é um patógeno parasitário necrotrófico, caracterizado pela morte da célula do hospedeiro para extrair os nutrientes necessários para seu desenvolvimento. O patógeno utiliza como mecanismo de ataque enzimas de degradação da parede celular e toxinas. As toxinas atuam na supressão da defesa das plantas ou agindo em pontos específicos na célula do hospedeiro, inibindo o processo fotossintético, levando ao estresse oxidativo e a ocorrência da peroxidação lipídica (Dorneles *et al.*, 2019).

2.8. *Xanthomonas citri*

O gênero *Xanthomonas*; é um grupo bem estudado de bactérias gram-negativas pertencente à família *Xanthomonadaceae* (Nakayinga *et al.*, 2021). *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, o agente causal do cancro cítrico asiático. Um patógeno regulamentado de alta preocupação que ameaça a citricultura; frutas cítricas ocupam o primeiro lugar nas culturas de frutas no mundo (Robène *et al.*, 2020).

O cancro cítrico é uma doença bacteriana que afeta todas as variedades comerciais de citros. Espécies distintas de *Xanthomonas* de dois grupos filogenéticos são os agentes causadores do cancro cítrico. O grupo asiático, representado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é amplamente distribuído, possui ampla gama de hospedeiros e é responsável pelos sintomas mais graves de cancro. O grupo sul-americano possui gama de hospedeiros mais restrita e engloba duas cepas de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolli* (Martins *et al.*, 2020).

Este agente patológico bacteriano causa graves perdas econômicas diretas e indiretas pela redução do rendimento e da qualidade dos frutos (Robène *et al.*, 2020). Esses declínios são atribuídos principalmente aos sintomas causados pela doença, lesões necróticas marrons que aparece como resultado de hiperplasia perpetua, queda prematura dos frutos, morte dos galhos, desfolha e nanismo, podem afetar gravemente a produção geral dos frutos e a longevidade das plantas (Gottwald, Graham, Schubert; 2022).

O ciclo de vida de *Xanthomonas* tem dois estágios: epífito e endofítico (An *et al.*, 2020). O estágio endofítico começa quando as bactérias colonizam as superfícies de uma nova planta

usando ligantes de adesão, como polissacarídeos de superfície bacterianas (Petrocelli *et al.*, 2012), proteínas de adesão (Pradhan, Ranjan, Chatterjee; 2012) e pili tipo IV (Dunger *et al.*, 2014). Após a colonização, ocorre a formação de biofilme, que protege as bactérias dos fatores ambientais (Crossman, Dow; 2004). O estágio endofítico é caracterizado pela entrada bacteriana no tecido vegetal através de lesões ou estômatos e eventual movimento pelo sistema vascular. As bactérias reemergem nas superfícies das plantas quando a população atinge o limiar, a transmissão ocorre para novos hospedeiros e o ciclo de infecção se repete (An *et al.*, 2020).

Os bactericidas mais comuns usados para controlar o cancro cítrico são compostos à base de cobre, como: hidróxido de cobre, óxido cuproso e oxiclreto de cobre (Marin *et al.*, 2019). Entretanto os compostos à base de cobre apresentam riscos consideráveis para o meio ambiente, a utilização de bactericidas a longo prazo pode resultar em cepas resistentes ao cobre (Rabbee, Islam, Baek; 2022).

Cepas resistentes ao cobre foram descobertas pela primeira vez na Argentina em meados de 1990 (Behlau *et al.*, 2011). Várias alternativas potenciais estão disponíveis, como antibióticos (estreptomicina), há preocupação com a seleção de bactérias resistentes pelo uso excessivo desses antibióticos. No Brasil é proibido o uso de estreptomicina para o uso agrícola (Martins *et al.*, 2020).

3. Referências

- Albernaz, V. B. Citogenômica de *Pterodon pubescens* e citogenética comparativa com *P. emarginatus* (Leguminosae). 2020.
- Alon-Maimon, T., Mandelboim, O., Bachrach. *Fusobacterium nucleatum* and cancer. **Periodontology** 2000, v. 89, n. 1, p. 166-180, 2022.
- Aguilar-Guadarrama, A. B.; Rios, M. Y. Flavonoids, sterols and lignans from *Cochlospermum vitifolium* and their relationship with its liver activity. **Molecules**, 23(8), 1952; 2018.
- An, S. Q., Potnis, N., Dow, M., Vorhölter, F. J., He, Y. Q., Becker, A., Tang, J. L. Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. **FEMS microbiology reviews**, v. 44, n. 1, p. 1-32, 2020.
- Arunachalam, K.; Damazo, A. S.; Pavan, E.; Oliveira, D. M.; Figueiredo, F. F.; Machado, M. T.; Blogun, S. O.; Soares, I. M.; Barbosa, R. S.; Alvim, T. C.; Ascêncio, S. D.; Martins, D. T. O. *Cochlospermum regium* (Mart. Ex Schrank) Pilg.: Evaluation of chemical profile, gastroprotective activity mechanism of action of hydroethanolic extract of its Xylopodium in acute and chronic experimental models. **Journal Ethnopharmacology**, v.233, p.101-114, 2019.
- Batalini, C., Stocco, L. O., da Silva Fernandes, R. T., Junior, J. M. Avaliações fitoquímica, fitotóxica e antifúngica da entrecasca do caule de *Pterodon pubescens* Benth (sucupira branca). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 77589-77607, 2020.
- Barreto, S. F., de GASPI, F. O. G., de OLIVEIRA, C. F. Estudo químico das principais vias do metabolismo secundário vegetal: uma revisão bibliográfica. **Revista Científica da FHO| Uniararas**, v. 8, n. 1, p. 60-72, 2020.
- Bavaresco, O. S. A., de Paiva Pereira, I. C., Melo, C. D., Lobato, F., Falcai, A., Bomfim, M. R. Q. Utilização popular da *Pterodon* spp no tratamento de doenças reumáticas. **Revista de Investigação Biomédica**, v. 8, n. 1, p. 81-91, 2016.
- Behlau, F., Canteros, B. I., Minsavage, G. V., Jones, J. B., Graham, J. H. Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *Citrumelonis*. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4089-4096, 2011.

Braz-Filho, R., Gottlieb, O. R., Assunção, R. M. V. LEGUMINOSAE THE ISOFLAVONES OF *PTERODON* is native to the savannahs of Central and Southern Brazil. The fruits contain geranylgeraniol, all-trans (-)-14, 15-epoxygeranylgeraniol, 3 besides two additional diterpenes⁴ and alkaloids⁵. **The wood is su.** 10(1959), 1969-1970. 1971.

Brito, J. B. P., Antunes, A. M., Ferreira, R. D. S. B., de Campos Telles, M. P., Targueta, C. P., Soares, T. N. Complete Chloroplast Genomes of *Pterodon emarginatus* Vogel and *Pterodon pubescens* Benth: Comparative and Phylogenetic Analyses. **Current Genomics**, v. 24, n. 4, p. 236, 2023

Brum, R. L.; Honda, N. K.; Hess, S. C.; Cruz, A. B.; Moretto, E. Antibacterial activity of *Cochlospermum regium* essential oil. *Fitoterapia*, v.68, n.1, p.79, 1997. Coêlho, J. D. **Arroz: produção e mercado.** Caderno Setorial ETENE, Ano 6, n. 156, março 2021.

Bustamante, K. de G. L., Lima, A. D. F., Soares, M. L., Fiuza, T. de S., Tresvenzol, L. M. F., Bara, M. T. F., Pimenta, F. C., Paula, J. R. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) -Fabaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 12, 341–345, 2010.

Carvalho, R. D. S. Extratos vegetais na agricultura e no tratamento de sementes. 2021.

Crossman, L., Dow, J. M. Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. **Microbes and infection**, v. 6, n. 6, p. 623-629, 2004.

Curtis, M. A., Diaz, P. I., Van Dyke, T. E. The role of the microbiota in periodontal disease. **Periodontology** 2000, v. 83, n. 1, p. 14-25, 2020.

Dalenogare, T. F. Monitoramento de resíduos de agrotóxicos em recursos hídricos no Rio Grande do Sul—uma revisão bibliográfica. 2022.

De Lima, J. S.; dos Santos, E. L.; Della, A. P. Caracterização morfológica e ecologia de Briófitas. **Laboratório de Anatomia Vegetal**, 4.

De Paula Magalhães, R. H.; De Menezes Filho, A. C. P.; Ventura, M. V. A.; Batista-Ventura, H. R. F.; De Souza Castro, C. F.; Porfiro, C. A. Chemical profile and antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities on *Artemia salina* from the essential oil of leaves and xylopodium of *Cochlospermum regium*. **Scientific Electronic Archives**, v. 15, n. 1, 2022.

De Omena, M. C., Bento, E. S., De Paula, J. E., Sant' Ana, A. E. G. Larvicidal diterpenes from *Pterodon polygalaeflorus*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 6(2), 216–222. 2006.

Da Silva, D. B.; Vieira, R.; Camilo, J.; de Melo, L. A. M. P.; da Costa, L. C.; Alves, R. D. B. **Cultivo de algodãozinho [*Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. -Bixaceae], no Distrito Federal: Avaliação preliminar.** 2020.

Domingos, H. S. Obtenção y caracterización de las actividad bioquímica anticâncer de borututu (*Cochlospermum Angolense* Welw) para el diseño de nuevos alimentos bioactivos. 2022.

Dorneles, K. D. R.; Pazdiora, P. C.; Marquezin, D.; Rebhahn, I. G.; Morello, T. N.; Dallagnol, L. J. Componentes bioquímicos e epidemiológicos associados à resistência do arroz à mancha parda. **Summa Phytopathologica**, v. 45, p. 44-49, 2019.

Dunger, G., Guzzo, C. R., Andrade, M. O., Jones, J. B., Farah, C. S. *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* type IV pilus is required for twitching motility, biofilm development, and adherence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, n. 10, p. 1132-1147, 2014.

Euzébio, F. P. G., dos Santos, F. J. L., Piló-Veloso, D., Ruiz, A. L. T. G., de Carvalho, J. E., Ferreira-Alves, D. L., Fátima, Â. De. Effect of 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapane-17 β oic acid and its lactone derivatives on the growth of human cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, 37(3), 96–100. 2009.

Ferreira, N.; De Filippi, M. C. C.; da Conceição, E. C. **Bioprodutos contendo extratos vegetais padronizados de *Ruta graveolens* L. e *Rosmarinus officinalis* L. no controle da brusone e mancha-parda do arroz.** 2022.

Fine, D. H., Schreiner, H., Velusamy, S. K. Aggregatibacter, a low abundance pathobiont that influences biogeography, microbial dysbiosis, and host defense capabilities in periodontitis: the history of a bug, and localization of disease. **Pathogens**, v. 9, n. 3, p. 179, 2020.

Gottwald, T. R., Graham, J. H., Schubert, T. S. Citrus canker: the pathogen and its impact. **Plant health progress**, v. 3, n. 1, p. 15, 2002.

Hajishengallis, G., Liang, S., Payne, M. A., Hashim, A., Jotwani, R., Eskan, M. A., Curtis, M. A. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. **Cell host & microbe**, v. 10, n. 5, p. 497-506, 2011.

Hawksworth, D. L.; Crous, P. W.; Redhead, S. A.; Reynolds, D. R.; Samson, R. A.; Seifert, K. A.; Zhang, N. The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. **IMA fungus**, v. 2, p. 105-111, 2011.

Honda, N. K.; Brum, R. L.; Hess, S. C.; Cruz, A. B.; Moretto, E. Antibacterial activity of *Cochlospermum regium* essential oil. **Fitoterapia**, v. 68, n. 1, p. 79-79, 1997

Inácio, M. C. **Fatores ambientais e fenológicos na atividade antimicrobiana e produção de ativos em *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.** 2013.

Junior, J. I., Monteiro, Á. B. PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS ÚTEIS NA ODONTOLOGIA CLÍNICA: UMA REVISÃO MEDICINAL PLANTS AND HERBAL MEDICINES USEFUL IN CLINICAL DENTISTRY: A REVIEW. Revista da Faculdade de Odontologia da UFBA, v. 50, n. 1, p. 47-56, 2020.

Kalaighana Selvi, S.; Mahesh Kumar, J.; Sashidhar, R. B. Anti-proliferative activity of Gum kondagogu (*Cochlospermum Gossypium*)-gold nanoparticle constructs on B16F10 melanoma cells: An *in vitro* model. **Bioactive**. 2017.

Kwon, T., Lamster, I. B., Levin, L. Current concepts in the management of periodontitis. International dental Journal, v. 71, n. 6, p. 462-476, 2021.

Leal, C. M.; Mendonça, S. C. **Importância do conhecimento dos diferentes campos de atuação da química no desenvolvimento estudantil e profissional: da teoria para a prática** (2022).

Leite, V. G., Mansano, V. F., Teixeira, S. P. Floral ontogeny in *Dipterygeae* (Fabaceae) reveals new insights into one of the earliest branching tribes in papilionoid legumes. **Bot J Linn Soc** 174:529–550. 2014.

Lima, D. P. De; Castro, M. S. De A.; Mello, J. C. P. De.; Siqueira, J. M.; Kassab, N. M. A flavanone glycoside from *Cochlospermum regium*. **Fitoterapia**, Milano, v. 66, n. 6, p. 545-546, 1996.

- Manamgoda, D. S.; Rossman, A. Y.; Castlebury, L. A.; Crous, P. W.; Madrid, H.; Chukeatirote, E.; Hyde, K. D. The genus *bipolaris*. **Studies in mycology**, v. 79, n. 1, p. 221-288, 2014.
- Manzoor, M. F., Ahmad, N., Ahmed, Z., Siddique, R., Zeng, X. A., Rahaman, A., Muhammad Aadil, R., Wahab, A. Novel extraction techniques and pharmaceutical activities of luteolin and its derivatives. **Journal of Food Biochemistry**, 43(9), 1–19. 2019.
- Marin, T. G. S., Galvanin, A. L., Lanza, F. E., Behlau, F. Description of copper tolerant *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* and genotypic comparison with sensitive and resistant strains. **Plant Pathology**, v. 68, n. 6, p. 1088-1098, 2019.
- Martins, C. D. **Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie *Kielmeyera coriacea* mart. & zucc (Pau-santo) do cerrado.** 2012.
- Martins, P. M. M., de Oliveira Andrade, M., Benedetti, C. E., de Souza, A. A. *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*: host interaction and control strategies. **Tropical plant pathology**, v. 45, p. 213-236, 2020.
- Marques, D. D., Lacerda Machado, M. I., De Carvalho, M. G., Luiz, L. A., Braz-Filho, R. Isoflavonoids and triterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeiflorus*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 9(3), 295–301. 1998.
- Mei, F., Xie, M., Huang, X., Long, Y., Lu, X., Wang, X., Chen, L. Porphyromonas gingivalis and its systemic impact: Current status. *Pathogens*, v. 9, n. 11, p. 944, 2020.
- Melo Aleluia, C., de Cássia Procópio, V., Oliveira, M. T. G., Furtado, P. G. S., Giovannini, J. F. G., de Mendonça, S. M. S. Fitoterápicos na odontologia. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo*, v. 27, n. 2, p. 126-134, 2015.
- Molinaro, E. M., Caputo, L. F. G., Amendoeira, M. R. R. “**Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**, v. 4.” (2009).
- Mostafalou, S., Abdollahi, M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. **Archives of toxicology**, v. 91, n. 2, p. 549-599, 2017.

Nakayinga, R., Makumi, A., Tumuhaise, V., Tinzaara, W. *Xanthomonas* bacteriophages: a review of their biology and biocontrol applications in agriculture. **BMC microbiology**, v. 21, p. 1-20, 2021.

Nascimento, V. A. D. Desenvolvimento e avaliação de filmes biodegradáveis à base de fécula de mandioca incorporado com óleo essencial das folhas do *Cochlospermum regium* no armazenamento de morangos. 2022.

Negri, G., Mattei, R., Mendes, F. R. Antinociceptive activity of the HPLC- and Msstandardized hydroethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel leaves. **Phytotherapy**, 21(8–9), 1062–1069. 2014.

Nozawa, A., Oshima, H., Togawa, N., Nozaki, T., Murakami, S. Development of Oral Care Chip, a novel device for quantitative detection of the oral microbiota associated with periodontal disease. **PloS One**, v. 15, n. 2, p. e0229485, 2020.

Oliveira Galvão, F., da Silva Dantas, F. G., de Lima Santos, C. R., Marchioro, S. B., Cardoso, C. A. L., Wender, H., de Oliveira, K. M. P. *Cochlospermum regium* (Schrank) pilger leaf extract inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 261, p. 113167, 2020.

Oliveira, L. D. A. R. **Avaliação *in vitro* das atividades antimicrobiana e anti-inflamatória de vouacapanos de *Pterodon emarginatus* Vogel (FABACEAE).** 2018.

Olsen, I., Lambris, J. D., Hajishengallis, G. *Porphyromonas gingivalis* disturbs host–commensal homeostasis by changing complement function. **Journal of oral microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1340085, 2017.

Outuki, P. M., Kleinubing, S. A., Hoscheid, J., Montanha, M. C., da Silva, E. A., do Couto, R. O., Kimura, E., Cardoso, M. L. C. The incorporation of *Pterodon pubescens* fruit oil into optimized nanostructured lipid carriers improves its effectiveness in colorectal cancer. **Industrial. Crops and Products**. 719–730.2018.

Ozuna, H., Snider, I., Belibasakis, G. N., Oscarsson, J., Johansson, A., Uriarte, S. M. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and Filifactor alocis: Two exotoxin-producing oral pathogens. **Frontiers in oral health**, v. 3, p. 981343, 2022.

Pacheco, L. B.; Alves, V. A. Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**, v. 11, n. 1, 2020.

Pradhan, B. B., Ranjan, M., Chatterjee, S. XadM, a novel adhesin of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, exhibits similarity to Rhs family proteins and is required for optimum attachment, biofilm formation, and virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 9, p. 1157-1170, 2012.

Pedroso, T. F. de M.; Bonamigo, T. R.; da Silva, J.; Vasconcelos, P.; Ramon, M.; Félix, J. M.; Cardoso, C. A. L.; Souza, R. I. C.; dos Santos, A. C.; Volobuff, C. R. F.; Formagio, A. S. N.; Trichez, V. D. K. Chemical constituents of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. Root and its antioxidant, antidiabetic, antiglycation, and anticholinesterase effects in Wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 111, 1383–1392. 2019.

Pereira, M. F., Martino, T., Dalmau, S. R., Albano, R. M., Férézou, J.P., Costa, S. S., Coelho, M. G. P., Sabino, K. C. C. Terpenic subfraction of *Pterodon pubescens* induces apoptosis of K562 leukemic cells by modulating gene expression. **Oncology Reports**, 25(1), 215–221. 2011.

Petrocelli, S., Tondo, M. L., Daurelio, L. D., Orellano, E. G. Modifications of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* lipopolysaccharide affect the basal response and the virulence process during citrus canker. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40051, 2012.

Pimenta, A. T. A., Santiago, G. M. P., Arriaga, Â. M. C., Menezes, G. H. A., Bezerra, S. B. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeiflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(4), 501–505. 2006.

Pinto, F., Vigliano, M., Leal, N., Da Silva, G., Marques, P., Velozo, L., Sabino, K., Coelho, M. Phytochemical and pharmacological analysis of *pterodon polygalaeiflorus* extracts. *Pharmacol Online*, 3, 56–70. 2013.

Rabbee, M. F., Islam, N., & Baek, K. H. Biocontrol of citrus bacterial canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* by *Bacillus velezensis*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 4, p. 2363-2371, 2022.

Raja, M., Ummer, F., Dhivakar, C. P. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*—a tooth killer? **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 8, n. 8, p. ZE13, 2014.
Spezzia, S. Alterações periodontais na adolescência. **Periodontia**, p. 43-47, 2018.

Reis, A. F.; Schmiele, M. Características e potencialidades dos frutos do Cerrado na indústria de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. e 2017150, 2019.

Ribeiro, R. D.; Tasso M.; Loiola, M. I. B.; Al, E. Flora do Ceará, Brasil: Bixaceae. **Rodriguesia**, 68(4), 1313–1322; 2017.

Ritto, J. L. A. Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluído de algodãozinho-do-campo *Cochlospermum regium* (Mart. Et Schr.) Pilger. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1996.

Robène, I., Maillot-Lebon, V., Chabirand, A., Moreau, A., Becker, N., Moumène, A., Pruvost, O. Development and comparative validation of genomic-driven PCR-based assays to detect *Xanthomonas citri* pv. *Citri* in citrus plants. **BMC microbiology**, v. 20, p. 1-13, 2020.

Rodrigues, D. A.; Pereira, G. A. M.; Silva, A. A.; Santos, M. H.; Demuner, A. J.; Oliveira, P. M. Phytochemical Profile of Pasture Weeds from the Brazilian Cerrado. **Planta Daninha**, v. 37, 6, 2019.

Rossmann, A.Y.; Manamgoda, D.S.; Hyde, K.D. Proposal to conserve the name *Bipolaris* against *Cochliobolus* (Ascomycota: Pleosporales: Pleosporaceae). **Taxon**, v. 62, p. 1331-1332, 2013.

Santos, A. P., Zatta, D. T., Moraes, W. F., Bara, M. T. F., Ferri, P. H., Silva, M. D. R. R., Paula, J. R. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 891-896, 2010.

Santos, J. C. Santos, M. I. G. Consequências do uso de agrotóxicos na agricultura: Uma revisão bibliográfica. *Research, Society and Development*, v. 12, n. 10, p. e111121043556-e111121043556, 2023.

Santos, J. G., Fernandes, C. C., Miranda, M. L. D. As principais características de *P. pubescens* Benth. E *P. emarginatus* Vogel: uma revisão narrativa. Doi 10.37885/230713761

Santos, J. G., Fernandes, C. C., Silva, N. B., Calefi, G. G., Martins, C. H., Volpini, G. A., Miranda, M. L. Volatile compounds of hexane extract from *Pterodon pubescens* Benth seeds

and its significant in vitro potential against different bacterial strains. **Natural Product Research**, p. 1-6, 2023.

Santos, P., Prando, M., Morando, R., Pereira, G. V., Kronka, A. Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 17, 2013.

Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., de Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016.

Silva-Lobo, V. L.; FILIPPI, M. C. C.; RODRIGUES, F.; ROSADO, A. W. C. Mancha parda do arroz. In: Laercio Zambolim. (Org.). **Manejo Integrado de doenças agressivas visando a produtividade de grãos**. 01ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2023, v. 01, p. 02-521.

Silva Santos, É., Garcia, F. P., Outuki, P. M., Hoscheid, J., de Goes, P. R. N., Cardozo-Filho, L., Cardoso, M. L. C. Optimization of extraction method and evaluation of antileishmanial activity of oil and nanoemulsions of *Pterodon pubescens* benth. Fruit extracts. **Experimental Parasitology**, v. 170, p. 252-260, 2016.

Silva, R. V., Figueiredo, L. J., Ferreira, A. P. G., Guimarães, L. N., Guimarães, N. N., Gondim, J. P. E., Martins, G. A. Atividade nematocida do extrato de sucupira (*Pterodon emarginatus*) sobre eclosão de *Meloidogyne javanica*. **CIS-Conjecturas Inter Studies**, v. 22, n. 13, p. 534-546, 2022.

Siqueira, J. M.; Silva, R. F.; Resende, U.; Castro, M. S. A. Plantas comercializadas pelos raizeiros de Campo Grande/MS. In: XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. 1994. Resumos... Fortaleza: UFC, 1994.

Sólón, S.; Carollo, C. A.; Brandão, L. F. G.; Macedo, C. S.; Klein, A.; Diasjunior, C. A.; Siqueira, C. M. Phenolic derivatives and other chemical compounds from *Cochlospermum regium*. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1169-1172, 2012.

Sobrinho, C. A.; Pereira, J. A.; da Silva Lobo, V. L.; Santos, A. R. B. **Incidência de mancha-parda (*Bipolaris oryzae*) em arroz no estado do Piauí**. 2023.

Spindola, H. M., Carvalho, J. E. de, Ruiz, A. L. T. G., Rodrigues, R. A. F., Denny, C., Sousa, I. M., Tamashiro, J. Y., Foglio, M. A. Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth with

selective in vitro anticancer activity for prostate cell line. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 20, 569–575. 2009.

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., Murphy, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., Mason, T. J. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(2), 137–142. 2001.

Turland, N. J.; Wiersema, J. H.; Barrie, F. R.; Greuter, W.; Hawksworth, D. L.; Herendeen, P. S.; Smith, G.; TURLAND, Nick J. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (*Shenzhen Code*) adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China, July 2017. **Koeltz botanical books**, 2018.

Verma, N., Shukla, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, n. 4, p. 105-113, 2015.

Vieira, C. R., Marques, M. F., Soares, P. R., Matuda, L., de Oliveira, C. M. A., Kato, L., da Silva, C. C., Guillo, L. A. Antiproliferative activity of *Pterodon pubescens* Benth. seed oil and its active principle on human melanoma cells. *Phytomedicine*, 15(67), 528–532. 2008.

WFO. **The World Flora Online**, 2023. *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. Disponível em: <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000902560>. Acesso em: 20, outubro de 2023.

Xie, P. J., Huang, L. X., Zhang, C. H., You, F., Zhang, Y. L. Reduced pressure extraction of oleuropein from olive leaves (*Olea europaea* L.) with ultrasound assistance. **Food and Bioproducts** 29–38. 2015.

Zia, S., Khan, M. R., Zeng, X. A., Sehrish, Shabbir, M. A., Aadil, R. M. Combined effect of microwave and ultrasonication treatments on the quality and stability of sugarcane juice during cold storage. **International Journal of Food Science and Technology**, 54(8), 2563–2569. 2019.

4. Objetivos

4.1. Geral

Por meio deste trabalho objetivou-se preparar extratos vegetais de *Pterodon Pubescens Benth* e *Cochlospermum regium*, avaliar a composição química dos extratos além de determinar as bioatividades.

4.2. Específicos

- Preparar extrato hexânico dos frutos de *Pterodon Pubescens*;
- Determinar a composição química dos compostos voláteis presente no extrato hexânico por meio da Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-MS);
- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato hexânico dos frutos de *Pterodon pubescens* frente diversas cepas bacterianas.
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* com diferentes linhas de células humanas;
- Preparar extratos hidrometanólico acidificado das folhas de *Cochlospermum regium* a partir das técnicas de maceração, banho ultrassônico e pela combinação das técnicas de maceração e banho ultrassônico;
- Quantificar os compostos fenólicos: fenóis, flavonoides e proantocianidinas, presentes nos extratos de *Cochlospermum regium* por espectroscopia de Uv-visível;
- Identificar os compostos químicos presentes nos extratos hidrometanólico acidificado das folhas de *Cochlospermum regium* por meio de HRMS (Espectrometria de Massas de Alta Resolução);
- Determinar a fungitoxicidade dos extratos das folhas de *Cochlospermum regium* para a inibição de *Bipolaris oryzae* cepa BRM 67786 *in vitro*.

Capítulo I: Compostos voláteis do extrato hexânico de sementes de *Pterodon pubescens* Benth e o significativo potencial *in vitro* significativo contra diferentes cepas bacterianas

Volatile compounds of hexane extract from *Pterodon pubescens* Benth seeds and its significant in vitro potential against different bacterial strains

Disponível: <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2297405>

Artigo aceito: 11 de dezembro de 2023.

Artigo publicado na Revista: Natural Product Research

RESUMO

A *Pterodon pubescens* Benth (sucupira) é uma planta medicinal brasileira. Este trabalho tem como objetivo determinar a composição volátil e as atividades antibacterianas do extrato hexânico das sementes de *P. pubescens* (HE-PP). As atividades antibacterianas foram pesquisadas pelo método de microdiluição em caldo em placas de cultura de 96 poços e os valores de MIC foram expressos em µg/mL. O HE-PP foi ativo contra várias bactérias orais bactérias orais cujos valores de MIC variaram entre 12,5 µg/mL e 50 µg/mL e contra três cepas de micobactérias (MIC = 125 µg/mL e 500 µg/mL). Além disso, o HE-PP foi ativo contra a cepa *Xanthomonas citri* (MIC = 100 µg/mL). A atividade citotóxica do extrato foi avaliada em linhas celulares tumorais e não tumorais humanas. O HE-PP mostrou citotoxicidade seletiva para adenocarcinoma cervical (células HeLa - IC₅₀ = 53,47 µg/mL). Seus principais constituintes foram identificados por GC-MS e GC-FID: *E*-cariofileno, vouacapano, *E*-geranilgeraniol e dehidroabietol. Os resultados reforçam o potencial biológico do HE-PP contra amplo espectro de bactérias patogênicas e fitopatogênicas.

Palavras-chave: Cancro cítrico; doenças periodontais; tuberculose; sucupira branca; dehidroabietol.

ABSTRACT

Pterodon pubescens Benth is a Brazilian medicinal plant (*sucupira*, in Brazilian Portuguese). This paper aims to determine the volatile composition and antibacterial activities of hexane extract from *P. pubescens* seeds (HE-PP). Antibacterial activities were screened by the microdilution broth method in 96-well culture plates and MIC values were expressed as $\mu\text{g/mL}$. HE-PP was active against several oral bacteria whose MIC values ranged between 12.5 $\mu\text{g/mL}$ and 50 $\mu\text{g/mL}$ and against three mycobacterial strains (MIC = 125 $\mu\text{g/mL}$ and 500 $\mu\text{g/mL}$). In addition, HE-PP was active against *Xanthomonas citri* strain (MIC = 100 $\mu\text{g/mL}$). Cytotoxic activity of the extract was evaluated in human tumor and non-tumor cell lines. HE-PP showed selective cytotoxicity to cervical adenocarcinoma (HeLa cells – IC_{50} = 53.47 $\mu\text{g/mL}$). Its major constituents were identified by GC-MS and GC-FID: *E*-caryophyllene, vouacapane, *E*-geranylgeraniol and dehydroabietol. Results reinforce the biological potential of HE-PP against a broad spectrum of pathogenic and phytopathogenic bacteria.

Keywords: Citrus canker; periodontal diseases; tuberculosis; White sucupira; dehydroabietol.

1. Introdução

Pterodon pubescens Benth, uma espécie arbórea nativa do Brasil e típica do bioma Cerrado, atinge de cinco a dez metros de altura (Melo et al. 2022). É amplamente conhecida por sua natureza medicinal e pelos extratos das diferentes partes, que têm sido usadas para tratar reumatismo, dor de garganta e dor nas costas, além de ser agente tônico e purificador (Giarola et al. 2022). Estudos fitoquímicos atribuíram a ampla atividade farmacológica a importantes classes de compostos, como alcaloides, isoflavonas e principalmente diterpenos bioativos (Giarola et al. 2022). Na busca por potencial biológico novo e relevante das sementes de *P. pubescens*, este estudo apresenta uma triagem antibacteriana pioneira do extrato hexânico (HE-PP). Foram selecionadas bactérias patogênicas que causam periodontite e tuberculose. A bactéria fitopatogênica que causa o cancro cítrico (*Xanthomonas citri*) também foi incluída nos ensaios *in vitro*. Em primeiro lugar, a periodontite é uma inflamação que danifica o tecido entre os dentes e a mandíbula, levando ao sangramento da gengiva e ao mau hálito (Sedghi et al. 2021). Em segundo lugar, as infecções micobacterianas são doenças complexas que são ainda mais graves em indivíduos que sofrem de doenças inflamatórias imunomediadas (IMIDs). Elas podem causar tuberculose, infecções pulmonares por micobactérias não tuberculosas (NTM), outras doenças por NTM e infecções disseminadas (Gopalaswamy et al. 2020). Por fim, a *X. citri* causa o cancro cítrico, que danifica culturas economicamente importantes no mundo. Os sintomas típicos das plantas infectadas pela *X. citri* são a queda prematura das folhas, frutos com manchas marrons (lesões necróticas) e até mesmo a morte (Llorens et al. 2015).

Deve-se destacar que os extratos vegetais são alternativas naturais com atividades antibacterianas bem conhecidas no cuidado humano e nas relações com o meio ambiente quando são aplicados na agricultura (Proestos, 2020; Godleswska et al. 2021). Portanto, este estudo teve como objetivo determinar, pela primeira vez, o perfil antibacteriano *in vitro* do extrato hexânico das sementes de *P. pubescens* (HE-PP) (i) contra um espectro de bactérias (ii), seu potencial citotóxico em células tumorais e (iii) sua composição volátil por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) e cromatografia gasosa-deteção por ionização em chama (GC-FID).

2. Materiais e Métodos

2.1. Material vegetal

Trezentos gramas de sementes de *P. pubescens* (sucupira branca) foram coletados em 2 de novembro de 2022, na Unidade I da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Campus

Universitário do Araguaia (CUA), Pontal do Araguaia, estado de Mato Grosso (MT), Brasil (15°55'08.4 "S 52°16'42.9 "W). A identificação taxonômica foi realizada pela bióloga Maryland Sanchez Lacerda e uma exsicata (n° 1950) foi depositada no herbário pertencente à UFMT-CUA. As sementes foram lavadas com água destilada e secas em temperatura ambiente (25°C). Após a secagem completa, o material vegetal foi armazenado em um recipiente lacrado em local escuro e fresco. O acesso ao material botânico foi aprovado pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o código AEACDCA.

2.2. Preparação do extrato hexânico das sementes de *P. pubescens* (HE-PP)

A metodologia proposta por Batalini *et al.* (2020), com algumas modificações, foi usada para preparar o HE-PP. As sementes foram maceradas inteiras e submetidas ao processo de extração com o uso de 400 mL de hexano em temperatura ambiente. Todo o processo de extração com o solvente durou 15 dias. Em seguida, foi realizada uma filtragem para separar o material vegetal sólido do solvente, que foi recuperado por um evaporador rotativo a baixa pressão. Para garantir a secagem adequada do extrato bruto de hexano, ele foi colocado em estufa a 38°C por 48 horas, até atingir peso constante. O HE-PP foi armazenado em frascos âmbar e mantido em um refrigerador a 4°C até a análise.

2.3. Identificação química do extrato hexânico das sementes de *P. pubescens* (HE-PP)

O HE-PP foi dissolvido em éter etílico e analisado por cromatografia gasosa - detecção de ionização por chama (GC-FID) e cromatografia gasosa - espectrometria de massa (GC-MS) com o uso dos sistemas Shimadzu QP5000 Plus e GCMS2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A temperatura da coluna no GC-FID foi programada para aumentar de 60 a 240°C a 3°C/min e foi mantida a 240°C por 5 min; o gás de arraste foi H₂ a taxa de fluxo de 1,0 ml/min. O equipamento foi ajustado para operar no modo de injeção; o volume de injeção foi de 0,1 µL (razão de divisão de 1:10), enquanto as temperaturas do injetor e do detector foram de 240 e 280°C, respectivamente. As concentrações relativas dos componentes foram obtidas pela normalização das áreas de pico (%). As áreas relativas consistiram na média de análises GC-FID em triplicata. As condições de GC-MS e a identificação foram relatadas anteriormente (Souza *et al.*, 2021). A identificação dos componentes voláteis do HE-PP (Tabela 4) foi baseada em seus índices de retenção em uma coluna capilar Rtx-5MS (30 m X 0,25 mm; 0,250 µm) sob as mesmas condições operacionais usadas para GC em relação a uma série homóloga de n-alcenos (C8-C20). As estruturas foram combinadas por computador com Wiley 7, NIST 08 e

FFNSC 1.2 e seus padrões de fragmentação foram comparados com dados da literatura (Adams, 2007; Adams, 2001).

2.4. Ensaio antiperiodontopatogênico

Esse ensaio biológico foi orientado pela metodologia atual proposta por Silva *et al.* (2022). As seguintes cepas bacterianas periodontopatogênicas, da American Type Culture Collection (ATCC), foram empregadas para realizar ensaios de atividades antibacterianas e antibiofilme: *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Prevotella nigrescens* (ATCC 33563), *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43717), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) e *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 27337).

A atividade antibacteriana do HE-PP foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, em triplicata. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços. O inóculo foi padronizado de acordo com a escala de McFarland 0,5 e diluído até a concentração bacteriana de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL nos poços. Para preparar as amostras, o HE-PP foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% e diluído em caldo de Brucella suplementado com hemina (5,0 mg/mL) e menadiona (1,0 mg/mL); foi usada uma diluição seriada dupla em concentrações que variaram de 0,195 a 400 µg/mL. Foi realizado o controle de 5% de DMSO e o solvente não interferiu no crescimento bacteriano nessa concentração. Os seguintes controles também foram realizados: inóculo (todas as bactérias usadas no ensaio + o meio de cultura), para observar a viabilidade da bactéria; caldo, para garantir que o meio de cultura seja estéril; e amostra de HE-PP, para garantir que essa solução seja estéril. As microplacas foram incubadas em uma câmara anaeróbica (Don Whitley Scientific, Bradford, Reino Unido) sob condições anaeróbicas (80% de N₂, 10% de CO₂ e 10% de H₂) a 37 °C por 72 h. A resazurina foi usada para revelar o crescimento bacteriano, ou seja, o azul significava ausência de crescimento bacteriano, enquanto o rosa mostrava a presença de bactérias. Como técnica de controle, o metronidazol, de 0,0115 a 5,9 µg/mL, foi usado contra as bactérias de controle *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) e *Bacteroides thetaiotaomicron* (ATCC 29741) (Tabela 5).

2.5. Ensaio antimicobacteriano

Para avaliar a atividade antimicobacteriana, os seguintes isolados clínicos e ATCC foram usados e mantidos a -80°C: *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), *M. kansasii* (ATCC 12478) e *M. avium* (ATCC 25291).

Para avaliar a atividade antimicobacteriana das amostras, a concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada por microdiluição em uma microplaca. A resazurina foi usada para revelar o crescimento bacteriano pelo Resazurin Microtiter Assay (REMA), adaptado de Palomino *et al.* (2002). O experimento foi realizado em triplicata. O HE-PP foi dissolvido em DMSO e diluído em série em caldo Middlebrook 7H9 (Difco, Sparks, MD, EUA) antes da inoculação. As concentrações de HE-PP variaram de 3,90 a 500 µg/mL, enquanto o teor final de DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) no ensaio foi inferior a 0,3%. A isoniazida (Sigma-Aldrich) foi usada como antibiótico de referência em concentrações que variaram de 0,015 a 1,0 µg/mL. O inóculo foi preparado com a introdução de uma série de colônias cultivadas em Ogawa-Kudoh (LaborClin, Pinhais, PR, Brasil) em um tubo contendo contas de vidro com 500 µL de água estéril. Uma alíquota de 200 µL foi transferida para um tubo com 2 mL de caldo 7H9 (Difco), incubado a 37°C por 7 dias e depois comparado com a escala 1 de McFarland. Depois que o inóculo foi padronizado, ele foi diluído com caldo 7H9 (Difco) na proporção de 1:25. Também foram incluídos controles de crescimento que não continham antibióticos e controles de esterilidade sem inoculação. As placas foram incubadas a 37°C por 7 dias. Posteriormente, 30 µL de solução aquosa de resazurina a 0,02% (Sigma-Aldrich) foram adicionados a cada poço. Depois de permanecer em repouso por 18 horas, a MIC visual foi definida como a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento das cepas de micobactérias (Tabela 6).

2.6. Ensaio anti-*Xanthomonas citri*

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri* isolado 12, sensível ao cobre; *X. citri* isolado 1733, tolerante ao cobre e *X. citri* isolado 1647, resistente ao cobre) foi cultivada em Ágar Nutriente (NA) ou Caldo Nutriente (NB) e incubada a 28°C por 72 h. Todas as cepas foram fornecidas pelo Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) em Araraquara, SP, Brasil, pelo pesquisador Dr. Franklin Behlau.

MIC é a menor concentração de HE-PP capaz de inibir o crescimento da bactéria. Ela foi determinada pelo método de microdiluição em caldo em placas de cultura de 96 poços. A metodologia recomendada por Iantas *et al.* (2021), com algumas modificações, foi aplicada. As amostras foram primeiro dissolvidas em DMSO a 5% e depois diluídas em NB para atingir concentrações que variaram de 0,98 a 2.000 µg/mL. Os inóculos foram ajustados para produzir uma concentração final de células de 5×10^5 UFC/mL. A estreptomicina foi usada como controle positivo em concentrações que variaram de 0,0115 a 5,9 µg/mL. As placas foram incubadas em demanda bioquímica de oxigênio (BOD) a 28°C por 72 h. Após a incubação, 30

μL de solução aquosa de resazurina a 0,02%, usada como revelador bacteriano, foram colocados em cada poço. As placas foram incubadas novamente a 28°C por 12 h. Os poços que se tornaram rosa exibiram crescimento bacteriano, enquanto os que permaneceram azuis mostraram que houve inibição. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata (Tabela 7).

2.7. Avaliação da citotoxicidade contra células humanas

A avaliação da citotoxicidade foi realizada de acordo com o protocolo de ensaio colorimétrico de resazurina, conforme descrito por Riss *et al.* (2016). Para isso, diferentes linhas celulares foram utilizadas para avaliar a atividade citotóxica do HE-PP. Elas incluíram fibroblastos de pulmão humano não tumorais (GM07492A), adenocarcinoma cervical humano (HeLa), adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e glioblastoma humano (U-251MG). As concentrações testadas variaram de 0,78 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Foram incluídos poços designados para controles negativos (não tratados), solventes (dimetil sulfóxido 1%; Sigma-Aldrich) e positivos (cloridrato de doxorubicina - Bergamo). Os procedimentos de cultura de células, o projeto experimental e a análise foram conduzidos conforme descrito em Carnizello *et al.* (2016). Uma análise de regressão não linear foi executada usando o programa GraphPad Prism para determinar a concentração da amostra que inibe 50% da viabilidade celular (IC_{50} , meia concentração inibitória máxima). O índice de seletividade foi calculado dividindo o valor de IC_{50} do HE-PP nas células GM07492A pelo valor de IC_{50} determinado para as células cancerígenas.

3. Resultados e Discussão

Os constituintes voláteis do HE-PP foram identificados e quantificados por GC-FID e GC-MS. Os seguintes constituintes principais foram identificados no HE-PP: *E*-geranilgeraniol (44,8%), dehidroabietol (20,8%), *E*-cariofileno (10,2%) e vouacapano (9,3%) (Tabela 4). Hoscheid e Cardoso (2015) relataram que os terpenos lineares, os derivados de geranilgeraniol e os diterpenos tetracíclicos, que têm um esqueleto de vouacapano ou vinhaticano são parcialmente responsáveis pelas atividades farmacológicas do óleo extraído do fruto de *Pterodon*. O isoprenóide acíclico geranilgeraniol (44,8%), que foi identificado em alta concentração no HE-PP, já havia sido identificado em espécies do gênero *Pterodon*, juntamente com outras classes de compostos, como saponinas e sesquiterpenos (Miranda *et al.* 2014; Lemos *et al.* 2021). Lemos *et al.* (2021) também destacaram o sesquiterpeno *E*-cariofileno, que ocupa o terceiro lugar no HE-PP. Além disso, a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* exibida pelas sementes de *P. pubescens* está relacionada ao geranilgeraniol (Menna-Barreto *et al.* 2008). Os

extratos do fruto da *P. pubescens* já demonstraram ser agentes eficientes contra o promastigota e amastigotas de *Leishmania amazonensis* pelo alto teor de geranylgeraniol (Santos *et al.* 2016). Zaniol *et al.* (2020) descreveram a composição química de extratos resultantes de diferentes métodos de extração. Suas descobertas foram semelhantes a este estudo, principalmente as concentrações de *E*-cariofileno e geranylgeraniol. Os diterpenoides vouacapano foram facilmente identificados em plantas que pertencem ao gênero *Pterodon* (Cabral *et al.* 2013; Oliveira *et al.* 2017), fato que explica o vouacapano (9,3%) no HE-PP. Deve-se mencionar que este é o primeiro relato de identificação de dehidroabietol (20,8%) em HE-PP (Tabela 4).

Tabela 4. Composição química do extrato hexânico das sementes de *Pterodon pubescens* (HE-PP)

Compound	RT (min)	% RA	RI exp	RI lit
<i>o</i> -Xylene	5.40	0.3	895	896
Mesitylene	7.52	0.3	997	994
<i>Z</i> -Linalool oxide	9.88	0.1	1063	1067
<i>n</i> -Undecane	10.68	0.2	1099	1100
α -Ylangene	21.48	0.3	1374	1373
β -Elemene	22.15	0.3	1391	1389
<i>E</i>-Caryophyllene	23.20	10.2	1418	1417
Allo-aromadendrene	24.83	0.6	1459	1458
Germacrene D	25.63	0.5	1480	1484
Spathulenol	29.33	2.0	1577	1577
(<i>E, E</i>)-Farnesol	29.33	2.0	1744	1742
Vouacapano	49.27	9.3	2195	2196
<i>E</i>-Geranylgeraniol	52.43	44.8	2201	2201
Dehidroabietol	53.94	20.8	2367	2368
Total			91.0	

TR = Tempo de retenção; I_{Rexp} = Índice de retenção relativo a *n*-alcanos (C8-C20) na coluna Rtx-5MS; I_{Rlit} = Índice de retenção de Kovats (valores encontrados na literatura - Adams 2007; 2001). AR% = Abundância relativa. Números em negrito significam que os constituintes voláteis foram considerados os principais constituintes do extrato hexânico das sementes de *P. pubescens* (HE-PP).

A atividade antibacteriana do HE-PP foi significativa contra várias bactérias orais que causam periodontite, a concentração inibitória mínima (MIC) foi $\leq 50 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 5). Sete cepas bacterianas foram testadas; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* apresentou MIC =

50 µg/mL, enquanto *Prevotella nigrescens* apresentou MIC = 25 µg/mL. Os outros apresentaram os menores valores de MIC, ou seja, 12,5 µg/mL (Tabela 5). Na literatura, as amostras de óleos essenciais e extratos de plantas cujos valores de MIC são inferiores ou iguais a 100 µg/mL apresentam atividade muito forte (Oliveira *et al.* 2022). O mesmo pode ser dito sobre a atividade do HE-PP contra três cepas de *X. citri* (resistente, tolerante e sensível ao cobre), uma vez que MIC = 100 µg/mL (Tabela 6). Outros pesquisadores já haviam demonstrado que as amostras cujos valores de MIC são inferiores ou iguais a 100 µg/mL podem ser consideradas agentes antimicrobianos promissores (Ríos e Recio 2005; Gibbons, 2008). Com relação à atividade antimicobacteriana, também foram encontrados excelentes valores de MIC. O HE-PP exibiu MIC = 125 µg/mL contra *Mycobacterium tuberculosis* e *M. avium*, enquanto o MIC = 500 µg/mL foi exibido contra *M. kansasii* (Tabela 7). Alves *et al.* (2020) relataram que os extratos brutos cujos valores de MIC são inferiores a 100 µg/mL e de 100 a 500 µg/mL apresentam boa atividade antimicrobiana e atividade antibacteriana moderada, respectivamente. Devido à preocupação com a resistência desenvolvida pelo *M. tuberculosis*, o agente etiológico da tuberculose, alguns estudos mostraram que as amostras cujo MIC ≤ 200 µg/mL podem ser consideradas satisfatórias (Alves *et al.* 2020; Cabral *et al.* 2020). O potencial antibacteriano do HE-PP pode ser explicado pelos constituintes, como o *E*-cariofileno e o *E*-geranilgeraniol, cuja atividade antibacteriana foi reconhecida pela literatura (Roque *et al.* 2018; Dickson *et al.* 2023). Por fim, os outros dois diterpenos principais - vouacapane e dehidroabietol - identificados no HE-PP devem ser mencionados (Tabela 4). Os diterpenoides vouacapano e abietano são considerados altamente bioativos (Oliveira *et al.* 2017; Saha *et al.* 2021).

Tabela 5. Concentração inibitória mínima do extrato hexânico das sementes de *P. pubescens* (HE-PP) contra bactérias periodontopatogênicas. Cepas de controle técnico: *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) - Metronidazol: 1,47±0,07 µg/mL e *Bacteroides thetaiotaomicron* (ATCC 29741) - Metronidazol: 1,47±0,07 µg/mL.

Amostra	Resultados (µg/mL)						
	Cepas bacterianas						
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
HE-PP	50±0,07	12,5±0,02	25±0,10	12,5±0,01	12,5±0,13	12,5±0,04	12,5±0,01

HE-PP: Extrato hexânico de sementes de *P. pubescens*. * Os valores de MIC são expressos como µg/mL.

Tabela 6. Atividade anti-*Xanthomonas citri* do extrato hexânico de sementes de *P. pubescens* - HE-PP (os valores de MIC são expressos como µg/mL)

Bactéria	HE-PP	Estreptomicina*
<i>Xanthomonas citri</i> 1647 (resistente ao cobre)	100±0.02	0.0461±0.01
<i>Xanthomonas citri</i> 1733 (tolerante ao cobre)	100±0.01	0.3688±0.15
<i>Xanthomonas citri</i> 12 (sensível ao cobre)	100±0.02	0.0922±0.02

*Controle positivo. HE-PP: Extrato hexânico de sementes de *P. pubescens*.

Tabela 7. Atividade antimicobacteriana do extrato hexânico das sementes de *P. pubescens* - HE-PP (os valores de MIC são expressos como µg/mL)

Bactéria	HE-PP	Rifampicina*
<i>Mycobacterium avium</i>	125±0.15	0.5±0.01
<i>Mycobacterium kansasii</i>	500±0.04	1±0.00
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	125±0.02	0.015±0.17

*Controle positivo. HE-PP: Extrato hexânico de sementes de *P. pubescens*.

A avaliação da citotoxicidade do HE-PP revelou respostas diversas entre diferentes linhas de células humanas (Tabela 8). Notavelmente, o HE-PP apresentou maior citotoxicidade para células HeLa (53,47 µg/mL), sendo significativamente menor do que a observada para células não tumorais (62,84 µg/mL). Os efeitos citotóxicos do HE-PP são provavelmente atribuídos ao conteúdo significativo de *E*-geranilgeraniol, apoiado por estudos anteriores que destacam as propriedades citotóxicas desse constituinte principal (Ohizumi *et al.* 1995, 1997; Masuda *et al.* 1997). O *e*-geranilgeraniol demonstrou a capacidade de induzir a apoptose em vários tipos de células tumorais, incluindo leucemia humana (HL-60), leucemia mieloide multipotencial humana (K562), leucemia linfoblástica (MOLT3) e adenocarcinoma de cólon (COLO320 DM) (Ohizumi *et al.* 1995). Além disso, considerando que o HE-PP engloba vários compostos bioativos, inclusive o *E*-cariofileno (Rufino *et al.* 2015; Langat *et al.* 2022) e o vouacapano (Oliveira *et al.* 2017, 2023), é plausível que os efeitos citotóxicos resultantes possam surgir da combinação desses constituintes.

Tabela 8: Valores de IC₅₀ e Índice de Seletividade (S.I.) obtidos contra diferentes linhagens celulares após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de extrato hexânico de sementes de *P. pubescens* (HE-PP).

Amostra	IC ₅₀ (µg/mL)				
	GM07492A	HeLa	S. I	MCF-7	U-251MG
HE-PP	62.84 ± 1.39	53.47 ± 2.94*	1.17	71.09 ± 3.15	> 100
DXR	18.73 ± 1.81	46.67 ± 5.91	-	71.13 ± 4.36	1042.70 ± 21.00

GM07492A – Fibroblasto Humano; HeLa - Adenocarcinoma Cervical Humano; MCF-7 - Adenocarcinoma de Mama Humano; U-251MG – Glioblastoma Humano; DXR - Cloridrato de Doxorubicina. *Significativamente diferente da linha celular GM07492A. HE-PP. Extrato de hexano de sementes de *P. pubescens*.

4. Conclusões

Este estudo introduziu novas atividades antibacterianas do HE-PP contra diferentes espécies de bactérias patogênicas e fitopatogênicas. A *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* apresentou MIC = 50 µg/mL, enquanto a *Prevotella nigrescens* apresentou MIC = 25 µg/mL. Os outros apresentaram os menores valores de MIC, ou seja, 12,5 µg/mL (*P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *B. fragilis*, *A. naeshundii* e *P. anaerobius*). Além disso, o HE-PP foi ativo contra *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. kansasii*. No campo da ciência agroquímica, o HE-PP apresentou boa atividade contra cepas de *X. citri*. Em suma, este estudo reforçou o potencial biológico promissor da *P. pubescens* contra treze cepas bacterianas sob investigação. Além disso, o extrato apresentou potencial antiproliferativo em células HeLa. O estudo sugere que o *E*-cariofileno, o vouacapano, o *E*-geranilgeraniol e o dehidroabietol podem ser quimicamente responsáveis

pelas excelentes atividades. Entretanto, são necessários mais estudos *in vivo* para determinar com precisão as atividades do HE-PP e para isolar seus metabólitos secundários.

5. Referências

- Adams RP. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation.
- Alves JA, Abrão F, Moraes TS, Damasceno JL, Moraes MFS, Veneziani RCS, Ambrósio SR, Bastos JK, Miranda MLD, Martins CHG. 2020. Investigation of *Copaifera* genus as a new source of antimycobacterial agents. *Future Sci.* 2020:FSO587.
- Batalini C, Stocco LO, da Silva Fernandes RT, Junior JM. 2020. Avaliações fitoquímica, fitotóxica e antifúngica da entrecasca do caule de *Pterodon pubescens* Benth (sucupira branca). *Braz. J. Develop.*, 6(10):77589-77607.
- Cabral FD, Fernandes CC, Ribeiro AB, Squarisi IS, Tavares DC, Candido ACBB, Magalhães LG, Souza JM, Martins CHG, Miranda MLD. 2020. Bioactivities of essential oils from different parts of *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae). *Rodriguésia.* 71:e00902019. doi:10.1590/2175-7860202071050.
- Cabral EC, Severt L, Spindola HM, Coelho MB, Sousa IMO, Queiroz NCA, Foglio MAMA, Eberlin MN, Riveros JM. 2013. *Pterodon pubescens* oil: characterization, certification of origin and quality control via mass spectrometry fingerprinting analysis. *Phytochem Anal.* 24(2):184–192. doi:10.1002/pca.2404.
- Carnizello AP, Barbosa MIF, Martins M, Ferreira NH, Oliveira PF, Magalhães GM, Batista A.A, Tavares DC. 2016. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of a novel carbonyl ruthenium compound, the ct- [RuCl (CO)(dppb)(bipy)]PF₆[dppb=1,4-bis(diphenylphosphine)butane and bipy=2,2'-bipyridine]. *J Inorg Biochem.*, 164:42-48.
- Dickson K, Scott C, White H, Zhou J, Kelly M, Lehmann C. 2023. Antibacterial and analgesic properties of beta-caryophyllene in a murine urinary tract infection model. *Molecules.* 28(10):4144. doi:10.3390/molecules28104144.
- Giarola LR, Coco JC, Sousa IMO, Cefali LC, Ataíde JA, Tavares GD, Rodrigues RAF, Foglio MAMA, Mazzola PG. 2022. *Pterodon pubescens* Benth (sucupira) microencapsulation influence on formulation stability outcome compared to on-encapsulated extract. *J. Drug Deliv Sci Technol.* 67:102875. doi: 10.1016/j.jddst.2021.102875.
- Gibbons S. 2008. Phytochemicals for bacterial resistance – strengths, weakness and opportunities. *Planta Med.* 74(6):594–602. doi:10.1055/s-2008-1074518.

- Godleswska K, Ronga D, Michalak I. 2021. Plant extract – importance in sustainable agriculture. *Ital. J. Agron.* 16:1851.
- Gopalaswamy R, Shanmugam S, Mondal R, Subbian S. 2020. Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections – a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment. *J Biomed Sci.* 27(1):74. doi:10.1186/s12929-020-00667-6.
- Hoscheid J, Cardoso MLC. 2015. Sucupira as a potential plant for arthritis treatment and other diseases. *Arthritis.* 2015:379459–379412. doi:10.1155/2015/379459.
- Iantas J, Savi DC, Schibelbein RS, Noriler SA, Assad BM, Dilarri G, Ferreira H, Rohr J, Thorson JS, Shaaban KA, Glienke C. 2021. Endophytes of Brazilian medicinal plants with activity against phytopathogens. *Front. Microbiol.* 12(1):714750.
- Langat MK, Mayowa Y, Sadgrove N, Danyaal M, Prescott TATAK, Kami T, Schwikkard S, Barker J, Cheek M. 2022. Multi-layered antimicrobial synergism of (*E*)-caryophyllene with minor compounds, tecleanatalensine B and normelicopine, from the leaves of *Vepris gossweileri* (L. Verd.) Mziray. *Nat Prod Res.* 36(10):2447–2457. doi:10.1080/14786419.2021.1899176.
- Lemos JA, Oliveira A, Araujo RS, Townsend DM, Ferreira LAMam, Barros ALB. 2021. Recent progress in micro and nano-encapsulation of bioactive derivatives of the Brazilian genus *Pterodon*. *Biomed Pharmacother.* 143:112137. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112137.
- Llorens E, Vicedo B, López MM, Lapeña L, Graham JH, García-Agustín P. 2015. Induced resistance in sweet orange against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by hexanoic acid. *Crop Prot.* 74:77–84. doi: 10.1016/j.cropro.2015.04.008.
- Masuda Y, Nakaya M, Nakajo S, Nakaya K. 1997. Geranylgeraniol potently induces caspase-3-like activity during apoptosis in human leukemia U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 234(3):641–645. doi:10.1006/bbrc.1997.6690.
- Menna-Barreto RFS, Laranja GATat, Silva MCC, Coelho MGP, Paes MC, Oliveira MM, Castro SL. 2008. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. *Parasitol Res.* 103(1):111–117. doi:10.1007/s00436-008-0937-0.
- Melo PZ, Antunes AMam, Fernandes JG, Targueta CP, Guimarães RA, Boaventura-Novaes CRD, Soares TN. 2022. Development of microsatellite markers in *Pterodon pubescens* and

transferability to *Pterodon emarginatus*, two Brazilian plant species with medicinal potential. *Rodriguésia*. 73:e01112021. doi:10.1590/2175-7860202273091.

Miranda MLD, Garcez FR, Abot AR, Garcez WS. 2014. Sesquiterpenos e outros constituintes das folhas de *Pterodon pubescens* Benth (Leguminosae). *Quim Nova*. 37:473–476.

Ohizumi H, Masuda Y, Nakajo S, Sakai I, Ohsawa S, Nakaya K. 1995. Geranylgeraniol is a potent inducer of apoptosis in tumor cells. *J Biochem*. 117(1):11–13. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124695.

Ohizumi H, Masuda Y, Yoda M, Hashimoto S, Aiuchi T, Nakajo S, Sakai I, Ohsawa S, Nakaya K. 1997. Induction of apoptosis in various tumor cell lines by geranylgeraniol. *Anticancer Res*. 17(2A):1051–1057.

Oliveira LAR, da Silva ACG, Thomaz DV, Brandão F, da Conceição EC, Valadares MC, Bara MTmtF, Silveira D. 2023. The potential of vouacapanes from *Pterodon emarginatus* Vogel Against COVID -19 Cytokine Storm. *Adv Pharm Bull*. 13:150–159.

Oliveira LAR, Oliveira GAR, Borges LL, Bara MTmtF, Silveira D. 2017. Vouacapanes diterpenoids isolated from *Pterodon* and their biological activities. *Braz J Pharmacogn*. 27(5):663–672. doi:10.1016/j.bjp.2017.05.014.

Oliveira TAtaS, Vieira TM, Esperandim VR, Martins CHG, Magalhães LG, Miranda MLD, Crotti AEM. 2022. Antibacterial, antiparasitic, and cytotoxic activities of chemical characterized essential oil of *Chrysopogon zizanioides* roots. *Pharmaceuticals*. 15(8):967. doi:10.3390/ph15080967.

Proestos C. 2020. The benefits of plant extracts for human health. *Foods*. 9(11):1653. doi:10.3390/foods9111653.

Ríos JL, Recio MC. 2005. Medicinal plant and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*. 100(1–2):80–84. doi: 10.1016/j.jep.2005.04.025.

Riss TL, Moravec RA, Niles AL. 2013. Cell Viability Assays. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K. 2013. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; May 1.

Roque FP, Feiria SNB, Hofling JF. 2018. Medicinal properties of *Pterodon pubescens* against microorganism and oral biofilm. A review article. *J Drug Des Res*. 5:1062.

- Rufino ATat, Ribeiro M, Sousa C, Judas F, Salgueiro L, Cavaleiro C, Mendes AF. 2015. Evaluation of the anti-inflammatory, anti-catabolic and pro-anabolic effects of *E-caryophyllene*, myrcene and limonene in a cell model of osteoarthritis. *Eur J Pharmacol.* 750:141–150. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.01.018.
- Saha P, Rahman FI, Hussain F, Rahman SMAma, Rahman MM. 2021. Antimicrobial diterpenes: recent development from natural sources. *Front Pharmacol.* 12:820312. doi:10.3389/fphar.2021.820312.
- Santos ES, Garcia FP, Outuki PMpm, Hoscheid J, Goes PRN, Cardozo-Filho L, Nakamura CV, Cardoso MLC. 2016. Optimization of extraction method and evaluation of antileishmanial activity of oil and nanoemulsions of *Pterodon pubescens* Benth. fruit extracts. *Exp Parasitol.* 170:252–260. doi:10.1016/j.exppara.2016.10.004.
- Sedghi LM, Bacino M, Kapila YL. 2021. Periodontal disease: the good, the bad, and the unknown. *Front Cell Infect Microbiol.* 11:766944. doi:10.3389/fcimb.2021.766944.
- Silva NBS. 2022. Potential *in vitro* anti-periodontopathogenic, anti-Chikungunya activities and *in vivo* toxicity of Brazilian red propolis. *Scientific Reports* 12:21165.
- Souza AO, Pereira PS, Fernandes CC, Andrade G, Pires RH, Candido ACBB, Magalhães LG, Vieira TM, Crotti AEM, Martins CHG, Miranda MLD. 2021. Hexane extract from *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. leaves: chemical composition and its bioactive potential against *Candida* pathogenic species, *Leishmania amazonensis* and *Xylella fastidiosa*. *Nat Prod Res.*, 25:1-6.
- Zaniol F, Calisto JFF, Cozzer G, Ferro DM, Dias JL, Rodrigues LGG, Mazzutti S, Rezende RS, Simões DAda, Ferreira SRS, et al. 2020. Comparative larvicidal effect of *Pterodon* spp. Extracts obtained by different extraction methods. *J Supercrit Fluids.* 166:104993. doi:10.1016/j.supflu.2020.104993.

Capítulo II: *Cochlospermum regium* (Mart. Ex Schrank) Pilg.: perfil fitoquímico e fungitoxicidade em *Bipolaris oryzae* cepa BRM 67786 (Embrapa)

Normas de acordo com a revista HOLOS

RESUMO

A mancha parda (*Bipolaris oryzae*) é uma das doenças que mais afeta a orizicultura no mundo, a disseminação do patógeno ocorre por sementes infectadas por coleóptilos. Quando não controlada a mancha parda pode levar à perda de 90% na produção. Dentro desse contexto, o presente trabalho investiga a composição química de extrato hidrometanólico acidificado das folhas de *Cochlospermum regium* utilizando três técnicas de extração, sendo: maceração, ultrassom e maceração + ultrassom, quantificar os compostos fenólicos através da técnica de Espectroscopia de Ultravioleta visível (UV-vis), identificar os compostos através da técnica de Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS) e determinar a fungitoxicidade dos extratos em *B. oryzae* cepa BRM 67786 (Embrapa). Foram quantificados fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas de cada extrato a fim de verificar qual método tem maior eficácia na extração dos grupos fenólicos. Como resultados da identificação dos compostos, foram identificados 11 compostos: ácido gálico, um ciclitol, um flavonol, dois taninos hidrolisáveis, um depsídeo, dois flavonoides glicosilados, um ácido triterpeno e um carotenoide foram encontrados nos extratos. O ensaio de atividade antifúngica utilizado foi o de difusão em placa, o experimento foi realizado em decaplicata, os extratos foram diluídos em cinco concentrações (100, 300, 500, 700 e 900 $\mu\text{g. mL}^{-1}$); foi avaliado o halo de crescimento micelial após 7 e 14 dias. Todas as atividades visaram a comparação entre os extratos obtidos por três métodos de extração e o quanto o método de extração pode interferir sobre os resultados. Ao combinar as técnicas de extração (maceração + ultrassom) foi possível obter maior rendimento de extrato (61,70%), o extrato obtido pela técnica de ultrassom apresentou ser mais eficiente na extração de fenóis e flavonoides ($615 \pm 0,21$ e $532 \pm 0,06 \mu\text{g. mL}^{-1}$ respectivamente), o extrato obtido pela técnica de maceração demonstrou maior eficiência na extração de proantocianidinas ($269 \pm 1,18 \mu\text{g. mL}^{-1}$). Os extratos das folhas de *C. regium* demonstraram eficiência na inibição do crescimento dos halos miceliais de *B. oryzae*, a concentração de 500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ demonstrou ser a mais eficaz para o controle do fungo após 14 dias de análise.

Palavras-chave: *Helminthosporium*, algodãozinho do cerrado, atividade antifúngica, fitoquímica.

ABSTRACT

Brown spot (*Bipolaris oryzae*) is one of the diseases that most affects rice growing worldwide. The pathogen is spread by seeds infected by coleoptiles. When left unchecked, brown spot can lead to a 90% loss in production. Within this context, the present work investigates the chemical composition of the acidified hydro methanolic extract of *Cochlospermum regium* leaves using three extraction techniques: maceration, ultrasound and maceration + ultrasound, quantifying the phenolic compounds using the Ultraviolet-Visible Spectroscopy (UV-vis) technique, identifying the compounds using the High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) and determine the fungitoxicity of the extracts on *B. oryzae* strain BRM 67786 (Embrapa). Total phenols, flavonoids and proanthocyanidins were quantified from each extract to check which method was most effective in extracting the phenolic groups. As a result of the compound identification, 11 compounds were identified: gallic acid, one cyclitol, one flavonol, two hydrolysable tannins, one depside, two glycosylated flavonoids, one triterpene acid and one carotenoid were found in the extracts. The antifungal activity test used was plate diffusion, the experiment was carried out in decuplicate, the extracts were diluted in five concentrations (100, 300, 500, 700 and 900 $\mu\text{g. mL}^{-1}$); the mycelial growth halo was evaluated after 7 and 14 days. All the activities aimed at to compare the extracts obtained by the three extraction methods and the extent to which the extraction method can affect the results. By combining the extraction techniques (maceration + ultrasound) it was possible to obtain a higher extract yield (61.70%), the extract obtained using the ultrasound technique proved to be more efficient in extracting phenols and flavonoids (615 ± 0.21 and $532 \pm 0.06 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectively), the extract obtained using the maceration technique proved to be more efficient in extracting proanthocyanidins ($269 \pm 1.18 \mu\text{g.mL}^{-1}$). The extracts from the leaves of *C. regium* were effective in inhibiting the growth of mycelial halos of *B. oryzae*, with the concentration of 500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ proving to be the most effective in controlling the fungus after 14 days of analysis.

Keywords: *Helminthosporium*, cerrado cotton, antifungal activity.

1. Introdução

Um dos alimentos presentes na mesa de mais da metade da população mundial é o arroz (*Oryza sativa* L.), principal fonte de carboidrato e responsável economicamente por R\$ 24, 295 bilhões da economia brasileira (Coêlho, 2021; CEPEA, 2023). Com área planta de aproximadamente 10,033 M t na safra de 2022/23 (CONAB, 2023). No entanto, fatores como solo, clima, fotoperíodo e umidade impactam diretamente a produção de arroz ao longo do mundo (Silva Lobo *et al.*, 2023). Ambientes com elevada umidade relativa do ar e altas temperaturas são ideais para a proliferação de doenças, que, por sua vez comprometem os cultivos e colocam em risco toda produção (Sobrinho *et al.*, 2023).

Dentre as doenças do arroz destaca-se a mancha parda, que tem como agente causal o fungo *Bipolaris oryzae* Breda de Haan (Thanh, 2022). Esta doença, provoca lesões necróticas na parte vegetativa e nas panículas, impedindo o enchimento de grãos deixando-os gessados e quebradiços (Dorneles *et al.*, 2019; Sobrinho *et al.*, 2023). Poucos são os produtos que possuem registro para controle da mancha parda gerando resistência e provocando danos ambientais, como a contaminação dos solos, das águas e dos agricultores, além de promover a seleção de cepas mais resistentes dessa doença. (Scheuermann; Nesi, 2021).

Inúmeras alternativas foram testadas; cultivares resistentes (Ashfaq *et al.*, 2021), manejo integrado (Loayza, 2022) e o uso de substâncias naturais para promover o controle do *Bipolaris oryzae*; já foram utilizados extratos de arruda (*Ruta graveolens*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) para controle de *B. oryzae in vivo* (Ferreira; de Fillipi; da Conceição, 2022, Castañeda *et al.*, 2021).

Algumas plantas do Cerrado estão sendo utilizadas como alternativas para substituir produtos defensivos agrícolas pela grande quantidade de flavonoides, fenóis e diterpenos (Giorola *et al.*, 2022). *Cochlospermum regium* Schrank Pilg, uma planta nativa do Cerrado conhecida popularmente como algodãozinho do cerrado, etnomedicinal, ornamental e forrageira amplamente utilizada na medicina popular como agente antibacteriano, analgésico e anti-inflamatório; efeitos estes que podem estar relacionados a presença dos derivados do ácido gálico (Galvão *et al.*, 2023, Nascimento, 2022).

A partir do exposto, este trabalho tem como objetivo identificar os compostos presentes no extrato hidrometanólico acidificado das folhas de *Cochlospermum regium* através da extração por ultrassom, maceração e maceração + ultrassom e determinar a fungitoxicidade em *Bipolaris oryzae in vitro*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material vegetal

As folhas de *Cochlospermum regium* (algodãozinho do cerrado) foram coletadas em julho de 2023, na Unidade I da Universidade Federal Mato Grosso (UFMT), Campus Universitário do Araguaia, Pontal do Araguaia – MT, Brasil, localizada em 15°55'01.5"S 52°16'30.3"W. A identificação taxonômica da planta foi realizada no Herbário da UFMT/CUA – Unidade I, Pontal do Araguaia – MT, com exsicata depositada e cadastrada sob número 10407. Inicialmente o material vegetal foram lavados em água corrente e secos em estufa de circulação forçada de ar a marca Thoth modelo Th-510-480 a 35°C durante sete dias. Após a secagem o material vegetal foi armazenado protegido da luz e calor.

2.2. Preparo dos extratos

As folhas foram trituradas em moinho de rotor tipo ciclone da marca Star modelo FT 51, submetidas ao processo de extração utilizando solução hidrometanólica acidificada a 1,7%. A solução extratora foi preparada utilizando 800 mL de metanol, 183 mL de água destilada e 17 mL de ácido acético glacial.

Os extratos foram obtidos por meio de maceração dinâmica com agitador magnético por 30 min, banho ultrassônico por 32 min e maceração dinâmica 30 min + banho ultrassônico 32 min. Para a preparação dos extratos brutos, foi realizado na proporção de 1 g de material vegetal para cada 20 mL da solução extratora.

O processo de extração por maceração consistiu em colocar o material vegetal juntamente com a solução extratora sob agitação (agitador magnético) por 30 min a temperatura ambiente, após 30 min a solução foi filtrada a fim de separar o material vegetal da solução extratora, o processo foi repetido três vezes. A obtenção do extrato, por meio do banho ultrassônico, foi obtido ao colocar o material vegetal em contato com a solução extratora por 32 min no banho ultrassônico em temperatura ambiente; após 32 minutos a solução foi filtrada a fim de separar o material vegetal da solução extratora. O extrato utilizando banho ultrassônico + maceração consistiu em colocar o material vegetal com a solução extratora sob agitação dinâmica por 30 min e posteriormente levado ao banho ultrassônico por 32 min, o processo de extração foi repetido três vezes.

O solvente foi recuperado em evaporador rotativo com pressão reduzida, para garantir a secagem do extrato; o extrato foi congelado e posteriormente submetido ao processo de liofilização até a obtenção do material seco em forma de pó.

Para identificação dos extratos, foram nomeados conforme método de extração, extrato metanólico obtido por maceração (EMeOHCRM), extrato metanólico obtido por ultrassom (EMeOHCRU) e extrato metanólico obtido por maceração + ultrassom (EMeOHCRM+U).

O cálculo de rendimento dos extratos foi determinado a partir da Equação (1) (Brito; Silva, 2022), com modificações:

$$FR=(ME\div MA) \times 100 \quad (1)$$

em que

FR= Fator de rendimento da extração;

ME= Massa em gramas do extrato;

MA= Massa em gramas da amostra.

2.3. Análises químicas

2.3.1. Determinação de compostos fenólicos por espectroscopia UV-Visível

A determinação dos compostos fenólicos dos extratos vegetais das folhas de *C. regium* foi realizada pelo método espectrofotométrico de acordo com metodologia descrita por Gontijo *et al.*, (2017). O conteúdo fenólico foi determinado utilizando o reagente Folin-Ciocalteu com ácido gálico como padrão, e a absorbância a 760 nm foi medida após 120 min de reação em temperatura ambiente no escuro. Reagente de Folin-Ciocalteu (0,5 mL), Na₂CO₃ aquoso a 15% (1,0 mL), água destilada (7,5 mL) foram adicionados no balão volumétrico, seguido pela adição de 1,0 mL dos extratos vegetais (1,0 mg/mL ressuspenso na solução extratora). Os resultados foram expressos em µg de equivalente de ácido gálico.

Os flavonoides foram quantificados utilizando o método AlCl₃ com catequina como composto padrão, e a absorbância foi medida a 420 nm após 15 min de reação em temperatura ambiente no escuro. Foram usados ácido acético glacial (0,5 mL), AlCl₃.6H₂O em metanol à 8% (1,0 mL) e 2,0 mL dos extratos vegetais (10,0 mg/mL ressuspenso na solução extratora). Os resultados foram expressos em µg de equivalente de catequina.

Os polifenóis (proantocianidinas) foram quantificados utilizando o método de vanilina ácida a 4% com epicatequina como padrão, a absorbância foi medida a 500 nm após 20 min de reação em temperatura ambiente no escuro. Foram usados vanilina ácida a 4% (5 mL) e 1 mL dos extratos vegetais (10,0 mg/mL ressuspensão na solução extratora). Os resultados foram expressos em μg de equivalente de epicatequina.

2.3.2. Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS)

As análises de espectrometria de massas ESI (+) -MS(/MS) foram realizadas no equipamento AB Sciex TripleTOF 5600+, fonte de ionização electrospray (ESI), analisador quadrupolo e tempo de voo (Q-TOF). Para injeção no equipamento, as amostras puras foram diluídas até a concentração de 10^{-4} mol L⁻¹ em metanol/água (1/1). A janela de massa analisada foi de m/z 100 até m/z 1000. Temperatura da fonte de ionização de 450°C e voltagem do campo de 5500 V.

2.4. Fungitoxicidade

2.4.1. Preparo do inóculo

A cepa BRM 67786 isolada, identificada previamente como *Bipolaris oryzae* foi doada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Arroz e Feijão). A cepa foi isolada de folhas de arroz manchado na cultivar BRS 16948, as cepas foram inoculadas em placas de Petri com meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), recomendado para esse patógeno e foi incubado a temperatura entre $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.4.2. Atividade antifúngica

A metodologia utilizada no ensaio de atividade antifúngica foi realizada com a difusão em placa descrito por Bianchini *et al.*, (2022). Os extratos vegetais (1 mg. mL⁻¹) foram ressuspensão na solução extratora, a solução inicial foi diluída nas concentrações de 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, 300 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, 500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, 700 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ e 900 $\mu\text{g. mL}^{-1}$.

Alíquotas de 250 μL de cada solução foram adicionadas nas placas de Petri e espalhadas com alça de Drigalski no meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar), como controle positivo foi utilizado 250 μL da solução hidrometanólica ácida. Discos de 5 mm com cepas do fungo *B. oryzae* foram posicionados no centro das placas, o experimento foi realizado em decaplicata, as placas foram armazenadas em câmara BOD (demanda bioquímica de oxigênio) por 14 dias; o diâmetro de crescimento do halo micelial foi medido após sete e quatorze dias.

A determinação da fungitoxicidade dos extratos foi calculada em termos de porcentagem de inibição do halo de crescimento, utilizando a Equação (2) de inibição do crescimento radial (PICR).

$$PICR\% = \frac{(R1 - R2)}{R2} \cdot 100 \quad (2)$$

em que:

PICR%= percentual de inibição do crescimento radial;

R1= crescimento radial do fungo em direção à placa;

R2= crescimento avaliada em função da placa de controle.

2.5. Estatística

Usou-se no experimento três extratos de *C. regium* (ultrassom, maceração e maceração + ultrassom); uma espécie de fungo (*Bipolaris oryzae*); cinco tratamentos, que consistiram em diferentes concentrações dos extratos hidrometanólico acidificado e dois tratamentos adicionais (controle positivo e negativo). As concentrações foram obtidas a partir da diluição dos extratos na solução extratora, do esquema de diluição com as concentrações de 100, 300, 500, 700 e 900 µg. mL⁻¹, a solução extratora foi considerado o controle positivo e a testemunha (controle negativo) com 10 repetições por tratamento, totalizando 210 unidades experimentais (3*7*10=210). Para a estatística descritiva, os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), com uso Teste Tukey (p<0,05) Teste F e teste de normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk).

3. Resultados e Discussões

O fator de rendimento (FR) dos extratos vegetais foram determinados, conforme a Equação (1), o cálculo do rendimento dos extratos vegetais foi determinado a partir da fórmula a seguir (Brito; Silva,2022), o valor do rendimento dos extratos das folhas de *C. regium* foram dispostos na Tabela 9.

Tabela 9: Valores da massa e fator de rendimento dos extratos hidrometanólico acidificado das folhas de *C. regium* utilizando três técnicas de extração: maceração, ultrassom e maceração + ultrassom.

Amostra	Massa	Fator de Rendimento (%)
EMeOHCRU	10,21	25,55
EMeOHCRM	12,77	31,93

EMeOHCRM+U	24,68	61,70
------------	-------	-------

EMeOHCRM= Extrato metanólico de *Cochlospermum regium* maceração, EMeOHCRU= Extrato metanólico de *Cochlospermum regium* ultrassom e EMeOHCRM+U= Extrato metanólico de *Cochlospermum regium* maceração + ultrassom.

O extrato obtido pela técnica de extração de maceração + ultrassom obteve maior rendimento comparado as outras técnicas de extração individuais (maceração e ultrassom). A técnica de extração por maceração consiste em friccionar o material vegetal no solvente a fim de expor os conteúdos intracelular, a técnica de extração por ultrassom consiste em romper a membrana celular através de cavitação acústica; ao combinar as duas técnicas inicialmente há a fricção e posteriormente o colapso das células vegetais que outrora permanência intactas.

A quantificação dos grupos fenólicos, presente nos extratos hidrometanólico acidificado das folhas de *C. regium* foram realizados pelo método de Folin-Ciocalteu adaptado (Gontijo et al., 2017), foi realizada curva de calibração com padrões de ácido gálico a fim de determinar o coeficiente de determinação ($R^2= 0,9941$) (Figura 4), posteriormente foi quantificado os grupos fenólicos presente em cada extrato das folhas de *C. regium*.

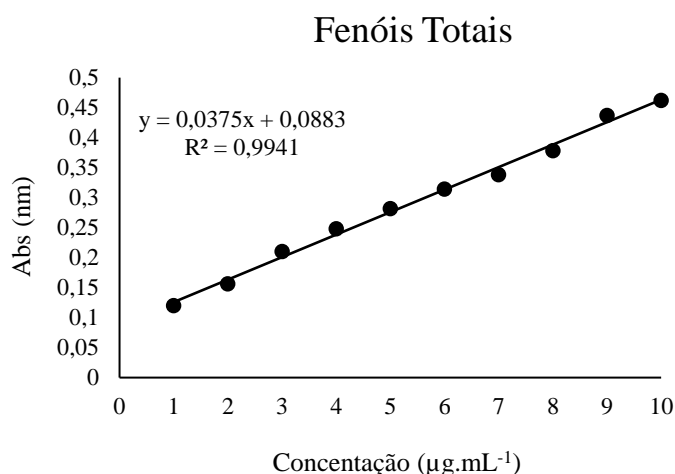


Figura 4: Curva de calibração de padrão de ácido gálico para a determinação do conteúdo fenólico total dos extratos hidrometanólico acidificado das folhas de *C. regium* através de UV-vis em 720 nm.

Os ensaios para a determinação do conteúdo total de flavonoides nos extratos foram calculado o teor a partir da curva de calibração (equação da reta) com coeficiente de determinação ($R^2= 0,9943$), equivalente a catequina (Figura 5).

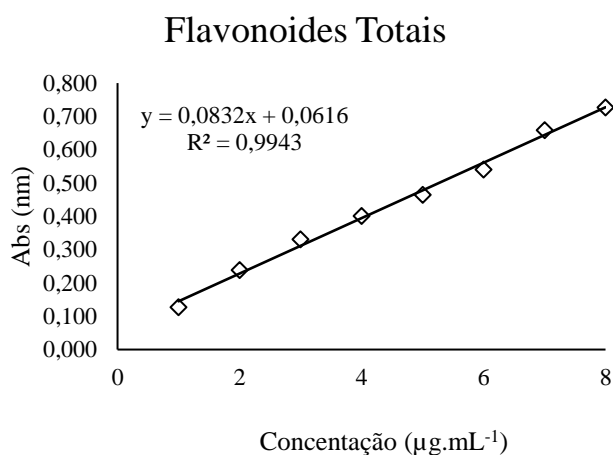


Figura 5: Curva de calibração padrão de catequina para a determinação de flavonoides dos extratos hidrometanólico acidificado das folhas de *C. regium* através de UV-vis em 420 nm.

O conteúdo total de flavonoides foi determinado usando o método de $AlCl_3$, que ao entrar em contato com o flavonoide forma um complexo estável com o grupamento carbonila no C4 e hidroxila no C3 (flavonóis) e C5 em flavonóis e flavonas (El-Sayed *et al.*, 2018).

Os ensaios para a determinação dos polifenóis (proantocianidinas) nos extratos foram realizados pelo método da vanilina ácida, determinando os polifenóis a partir da curva de calibração com coeficiente de determinação ($R^2= 0,9943$), equivalente a catequina conforme demonstrado na Figura 6.

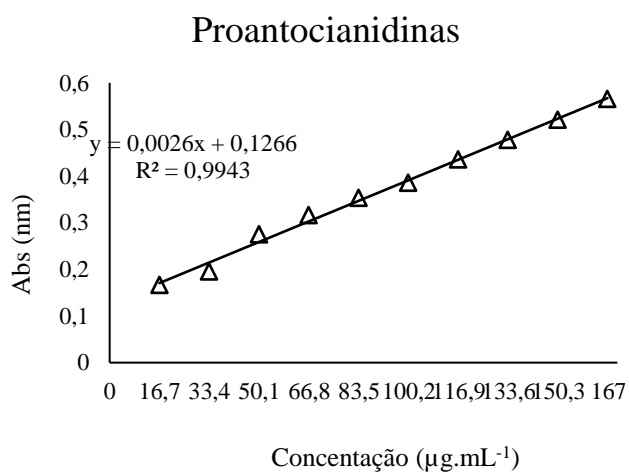


Figura 6: Curva de calibração padrão de epicatequina para a determinação de proantocianidinas dos extratos hidrometanólico acidificado das folhas de *C. regium* através de UV-vis em 500 nm.

Após a calibração das curvas dos padrões, o teor de compostos fenólicos presente em cada extrato foi calculado a partir da curva de calibração (Figuras 4, 5 e 6). Os valores dos compostos fenólicos obtidos por cada método de extração foram expressos na Tabela 10.

Tabela 10: Quantificação de compostos fenólicos totais encontrados nos extratos hidrometanólico acidificados das folhas de *Cochlospermum regium* utilizando espectroscopia de UV-vis, quantificação de fenóis totais $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ equivalente ao ácido gálico/ g de extrato analisado em 760 nm, quantificação de flavonoides $\mu\text{g}/\text{mg}^{-1}$ equivalente a quercetina/g de extrato analisado em 420 nm; quantificação de proantocianidinas, $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ equivalente a epicatequina/ g de extrato analisado em 500 nm.

Amostra	Fenóis Totais ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Flavonóides ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Proantocianidinas ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)
EMeOHCRU	615 \pm 0,21	532 \pm 0,06	110,5 \pm 1,82
EMeOHCRM	544 \pm 0,07	473 \pm 0,22	269,5 \pm 1,18
EMeOHCRM+U	533 \pm 0,29	521 \pm 0,12	251,5 \pm 1,02

O método de extração influencia na quantidade de metabólitos extraídos das folhas de *C. regium*, a técnica de extração utilizando o ultrassom consegue romper a membrana celular do material vegetal através de ondas ultrassônicas fazendo que os metabólitos presentes no citoplasma sejam liberados na solução extratora, extraíndo maior quantidade de fenóis e flavonoides (615 \pm 0,21 e 532 \pm 0,06 respectivamente).

Vieira *et al.*, (2024), em seus estudos corroboram que a técnica de extração por ultrassom proporciona vantagens no aumento na transferência de metabólitos, menor degradação de compostos bioativos comparado a técnicas tradicionais como a maceração. Souza *et al.*, (2021a) empregou diferentes técnicas de extração para a extração de metabólitos secundários, em que a técnica de extração por ultrassom obteve maior rendimento que a técnica de extração por maceração utilizando álcoois como solvente.

A técnica de extração empregada para a obtenção dos extratos está correlacionada com rendimento e a classe dos metabólitos extraídos. A técnica de extração por maceração (dinâmica) obteve maior rendimento que a técnica de extração por ultrassom; a extração por maceração conseguiu extrair mais proantocianidinas, moléculas com alto peso molecular (Dewick, 2009).

Ao combinar a técnica de maceração com ultrassom há diminuição da quantidade dos compostos fenólicos; as ondas ultrassônicas emitidas pelo ultrassom podem ter degradado os compostos fenólicos presente no extrato, fazendo que a quantidade de compostos fenólicos extraídos seja inferior aos fenóis extraídos por maceração.

A técnica de extração por maceração obteve maior rendimento que a técnica de extração por ultrassom indo em desacordo a outros estudos ao comparar essas duas técnicas de extração. Souza *et al.*, (2021a) e Souza *et al.*, (2021b), utilizando materiais vegetais distintos compararam a técnica de extração por maceração e ultrassom utilizando álcoois como solventes, em que o extrato por ultrassom obteve maior rendimento que os extratos por maceração.

A técnica de extração por ultrassom apresentou ser mais eficaz na extração dos compostos fenólicos que a técnica de extração por maceração, a fricção do agitador magnético apresenta menor capacidade de romper a membrana celular do material vegetal que o colapso por pulsos ultrassônicos, conseqüentemente menor quantidade de metabólitos secundários são liberados do citoplasma.

Silva, (2022), em seus estudos extraiu flavonoides a partir de própolis comparando as técnicas de extração de maceração e ultrassom, e verificou que a técnica de extração por maceração obteve valores inferiores a técnica de extração por ultrassom. Souza *et al.*, (2021b) verificaram em seus estudos que a técnica de extração por ultrassom é mais eficiente para a extração de fenóis.

Galvão *et al.*, (2023), em seus estudos realizados, prepararam extrato etanólico das folhas de *C. regium* utilizando a técnica de extração sonicação; através de LC-MS (Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas) identificaram taninos hidrolisáveis, ácido gálico e flavonoides glicosilados.

No total, 11 compostos, ácido gálico, um ciclitol, um flavonol, um depsídeo, dois flavonoides glicosilados, um ácido triterpeno, um carotenoide e um tanino hidrolisável, foram encontrados nos extratos das folhas de algodãozinho do cerrado (*Cochlospermum regium*), através das análises de HRMS. As estruturas químicas dos compostos foram propostas com base na interpretação de seus dados de MS comparando com aqueles disponíveis na literatura (Galvão *et al.*, 2023). Os dados de fragmentações MS² e intensidade relativa das fragmentações estão dispostos na Tabela 11.

Tabela 11: Dados cromatográficos da Espectrometria de Massas de Ultra Eficiência (HRMS) e tentativa de identificação dos principais compostos nos extratos hidrometanólico acidificado das folhas de *Cochlospermum regium*.

Amostra	m/z observada [M + H] ⁺ e/ou [M - H] ⁻ (%)	Massa exata teórica (m/z)	Erro (ppm)	Fragmentos majoritários (m/z) (MS/MS ⁺ e/ou MS/MS ⁻) (%)	Amostra			Tentativa de Identificação	Referência
					EMeOHC RU	EMeOHCR M	EMeO HCRM +U		
Extrato hidrometanólico acidificado de <i>Cochlospermum regium</i>	NEG: 169,0141 [M - H] ⁻ (100%)	NEG: 169,1121	0,098	NEG: 125,0243 [M - H - 43,9898] ⁻ (55%)	POS	POS	POS	Ácido gálico	Galvão <i>et al.</i> , 2023
	NEG: 191,0557 [M - H] ⁻ (100%)	NEG: 191,1592	0,103	NEG: 85,0303 [M - H - 106] ⁻ (7,69%)	POS	POS	POS	Ácido Quínico	Galvão <i>et al.</i> , 2023
	NEG: 301,0004 [M - H] ⁻ (100%)	NEG: 301,2283	0,227	NEG: 283,9964 [M - H - 18] ⁻ (6,15%); 151,0035 [M - H - 149] ⁻ (6,15%)	POS	POS	POS	Morina	Galvão <i>et al.</i> , 2023
	POS: 331,1677 [M + H] ⁺ (100%)	POS: 332,2601	0,211	POS: 331,0815 [M + H - 0,08] ⁺ (3%)	POS	POS	POS	Monogaloil hexose	Galvão <i>et al.</i> , 2023

NEG: 335.0411 [M - H] ⁻ (18%)	NEG: 535.3180	0,201	NEG: 133,0306 [M - H - 152] ⁻ (100%); 124,0171 [M - H 211] ⁻ (15%)	POS	POS	POS	2,3-Di-hidroxi-5- (metoxicarbonil) fenil 3,4,5-tri- hidroxibenzo	
POS:433,1 1281 [M + H] ⁺ (69%)	POS: 433,3849	0,285	POS: 415,1019 [M + H - 18] ⁺ (27%); 367,0813 [M + H - 66] ⁺ (24%); 313,0706 [M + H - 120 - 120 - 18] ⁺ (83%); 283,0601 [M + H - 150] ⁺ (100%); NEG: 367,0813 [M - H 64] ⁻ (24%); 311,0557 [M - H - 120] ⁻ (95%); 283,0611 [M - H - 148] ⁻ (35%)	POS	POS	POS	Apigenina-C- hexose	Galvão <i>et al.</i> , 2023
NEG: 431,0997 [M - H] ⁻ (100%)	NEG: 431,3701	0,270						
POS: 449,1097 [M + H] ⁺ (63%)	POS: 449,3842	0,274	POS: 413,0882 [M + H - 36] ⁺ (27%); 353,0666 [M + H - 96] ⁺ (41%); 329,0665 [M + H - 120] ⁺ (96%); 299,0559 [M + H - 150] ⁺ (100%)	POS	POS	POS	Luteolina-C- hexosídeo	Galvão <i>et al.</i> , 2023
	NEG: 447,3695	0,273						

NEG: 447,0961 [M – H] ⁻ (57%)			NEG: 357,0630 [M – H – 90] ⁻ (57%); 327,0521 [M – H – 120] ⁻ (100%); 297,0411 [M – H – 150] ⁻ (23%)					
NEG: 483,1892 [M – H] ⁻ (5%)	NEG: 483,3570	0,167	NEG: 447,0945 [M – H – 36] ⁻ (66%); 369,0613 [M – H – 114] ⁻ (14%); 357,0615 [M – H – 126] ⁻ (31%); 357,0509 [M – H – 126] ⁻ (100%); 169.0129 [M – H – 314] ⁻ (6%)	POS	POS	POS	Digaloil hexose	Galvão <i>et al.</i> , 2023
POS: 487,0551 [M + H] ⁺ (5%)	NEG: 487,6917	0,636	POS: 449,1017 [M + H – 38] ⁺ (4%); 335,0416 [M + H – 152] ⁺ (34%); 183,0423 [M + H – 304] ⁺ (100%);	POS	POS	POS	Ácido arjunóico	Galvão <i>et al.</i> , 2023
POS: 569,4334 [M + H] ⁺ (100%)	POS: 569,8379	0,445	POS: 569,2399 [M + H] ⁺ (0,1%);	POS	POS	POS	Luteína	Galvão <i>et al.</i> , 2023
		0,620		POS	POS	POS		

NEG: 939,1258 [M – H] ⁻ (46%)	NEG: 939,669	NEG: 787,1100 [M – H – 152] ⁻ (51%); 769,0971 [M – H – 170] ⁻ (88%); 635,0965 [M – H – 304] ⁻ (23%); 617,0837 [M – H – 322] ⁻ (64%); 601,0901 [M – H – 338] ⁻ (20%); 465,0692 [M – H – 474] ⁻ (49%); 447,0595 [M – H – 447] ⁻ (24%); 295,0458 [M – H – 644] ⁻ (20%); 168,0045 [M – H – 771] ⁻ (20%);	1,2,3,4,6- Pentagaloil hexose	Galvão <i>et al.</i> , 2023
---	-----------------	--	-------------------------------------	--------------------------------

Com base nos padrões de fragmentação, os compostos 1 e 2 foram anotados como ácido quínico e ácido gálico respectivamente (Clifford *et al.*, 2007, Sinosaki *et al.*, 2020). A natureza ácida do composto 1 é evidenciada pela eliminação do grupo carbonila (CO₂) m/z 124,0157 através do íon $[M - H]^-$, com as principais fragmentações em m/z 125,0243, 169,0141. O composto 2 apresentou a eliminação de H₂O referente a desidratação do ácido quínico desprotonado com íon m/z 173,0444, e gerou ânion (m/z 127,0392) através das vias de fragmentação de H₂O e CO₂.

Os compostos 4 e 8 foram anotados como Monogaloil hexose e Digaloil hexose, mostram padrões de fragmentação típicos de derivados de galoil-hexose (Chang *et al.*, 2019), o composto 8 apresentando espectro ESI (-) MS² em m/z 169, 0129, que foi interpretado como relacionado à detecção de moléculas de ácido gálico desprotonada.

O composto 5 foi anotado como 2,3-di-hidroxi-5-(metoxicarbonil) fenil 3,4,5-tri-hidroxibenzoato. A proposta para este depsídeo foi corroborada pela ionização dos picos em m/z 168,0064 e 124,0171 (atribuída a perda de ácido gálico do íon $[M-H]^-$). Além disso o composto 5 mostrou perda característica do grupo metil, pela eliminação do radical CH₃* no modo de ionização negativa, tendo fragmentação de 183,0306 do íon $[M-H]^-$.

Os compostos 6 e 7 foram anotados como Luteolina- C -hexosídeo, Apigenina- C -hexose (Swiatek *et al.*, 2021), ocorreram fragmentações na parte glicosídica. Agliconas foi sugerida com base nos dados 6: ($[M-162 \text{ Da}-H]^-$: m/z 285,0408) 7: ($[M-162 \text{ Da}-H]^-$: m/z 269,0450).

O composto 11 foi anotado como 1,2,3,4,6-pentagalloil-hexose mostra fragmentação relacionada a desprotonação de ácido gálico m/z 169,0131, com fragmentações em m/z 769,0971 e 429,0455. O composto 3 foi anotado como Morina, a proposta para esse flavol foi corroborada pela eliminação de H₂O referente a desidratação do fenol com íon m/z 283,9964 (Galvão *et al.*, 2023).

O extrato das folhas de *C. regium* apresenta alto teor de compostos fenólicos, em especial as proantocianidinas; sendo extraídas de forma seletiva pela técnica de extração que envolve a maceração. As proantocianidinas são conhecidas também como taninos condensados, os taninos condensados são formados por unidades monoméricas de flavonóis; os taninos condensados podem serem decompostos em meio ácido originando antocianidinas (Scárdua *et al.*, 2021).

Os extratos hidrometanólico das folhas de *C. regium* apresentaram inibição do fungo *B. oryzae*, apresentando pouca variação ao comparar as concentrações dos tratamentos. Ao analisar as técnicas de extração individualmente, em relação a inibição do fungo, observa-se que não há diferença estatística entre as técnicas de extração por maceração e ultrassom, exceto nos tratamentos de 300 e 700 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ e a técnica de extração por maceração mostrou diferença estatística na inibição, em relação a técnica de extração por ultrassom. Para o extrato de maceração + ultrassom observa-se que o aumento da concentração do extrato influencia na inibição do crescimento micelial nos sete primeiros (Tabela 12).

Tabela 12: Atividade antifúngica *in vitro* dos extratos metanólicos acidificados nos sete primeiros dias.

Amostra	100	300	500	700	900	CN	CP
EMeOHCRU	86,89 ^{aA}	75,99 ^{bA}	87,612 ^{aA}	75,5 ^{bA}	77,83 ^{abA}	39,77 ^D	52,94 ^E
EMeOHCRM	79,77 ^{aA}	81,33 ^{aA}	84,33 ^{aAB}	80,05 ^{aAB}	84,94 ^{aA}	39,77 ^D	52,94 ^E
EMeOHCRM+U	64,11 ^{cB}	65,61 ^{cB}	77,55 ^{abB}	68,22 ^{bcB}	80,22 ^{aA}	39,77 ^D	52,94 ^E

*Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p=0,05$), letras minúsculas são avaliadas por linhas e letras maiúsculas são avaliadas por coluna.

O EMeOHCRM apresentou inibição acima de 79% não havendo diferença estatística entre as concentrações utilizadas; ao analisar as concentrações dos extratos dentro de cada tratamento verifica-se que EMeOHCRM+U nas concentrações de 100 e 300 difere estatisticamente de EMeOHCRM e EMeOHCRU $\mu\text{g. mL}^{-1}$, fato esse que pode estar ligado menor quantidade de fenóis extraídos por essa técnica conforme a Tabela 10.

Ao analisar a persistência dos extratos ao inibir o crescimento micelial do fungo após 14 dias, percebe-se que há redução do efeito de inibição dos extratos sob o fungo. Quando analisado as concentrações não há diferença estatística para o EMeOHCRU; para o EMeOHCRM a concentração de 700 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ diferiu das demais concentrações tendo menor valor de inibição (Tabela 13).

Tabela 13: Atividade antifúngica *in vitro* dos extratos metanólicos acidificados aos quatorze dias.

Amostra	100	300	500	700	900	CN	CP
EMeOHCRU	58,77 ^{aA}	62,66 ^{aA}	68,72 ^{aA}	60,5 ^{aA}	56,22 ^{aA}	3,88 ^C	20,55 ^D
EMeOHCRM	58,77 ^{abA}	50,11 ^{abAB}	65,55 ^{aA}	46,94 ^{bAB}	67,33 ^{aA}	3,88 ^C	20,55 ^D
EMeOHCRM+U	33,16 ^{bB}	41,11 ^{bB}	60,67 ^{aA}	41,5 ^{bB}	62,61 ^{aA}	3,88 ^C	20,55 ^D

*Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p=0,05$), letras minúsculas são avaliadas por linhas e letras maiúsculas são avaliadas por coluna.

Ao comparar os tratamentos (concentrações dos extratos) com as técnicas de extração, o EMeOHCRM teve redução na inibição dos halos de *B. oryzae* aos 14 dias, nos sete primeiros dias o EMeOHCRM não distinguiu estatisticamente dos valores de EMeOHCRU, porém observa-se que há redução do efeito inibitório de EMeOHCRM.

A redução da inibição do EMeOHCRM nos halos miceliais de *B. oryzae* pode ser explicada pois no EMeOHCRM têm maior quantidade de taninos condensados (proantocianidinas), os taninos condensados ao entrar em contato com meio ácido (solução extratora) ocorrem a decomposição do tanino, liberando a unidade monomérica, as antocianidinas (flavonóis) (Scárdua *et al.*, 2021); os flavonóis sofrem redução pela capacidade de captar radicais livres.

Ao analisar as concentrações dos tratamentos, o EMeOHCRM+U nas concentrações de 500 e 900 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ equipara aos valores de inibição dos outros extratos (EMeOHCRM e EMeOHCRU); o efeito de inibição na concentração de 500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ pode ser explicada por que os outros extratos perdem a eficácia ao longo dos dias, equiparando ao valor de EMeOHCRM+U, na concentração de 900 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ pode estar relacionado a maiores concentrações de fenol no extrato.

4. Conclusão

O método de extração influencia diretamente no rendimento dos extratos hidrometanólico das folhas de *Cochlospermum regium*. A combinação das técnicas de extração de ultrassom + maceração obteve o rendimento de 61,70%.

O extrato obtido pela técnica de extração ultrassom mostrou ser mais eficiente para a extração de fenóis e flavonoides, o ultrassom libera um pulso ultrassônico fazendo que rompa a parede celular do material vegetal, dessa forma os metabolitos secundários presentes no material vegetal são liberados e entram em contato com o solvente. Entretanto essa técnica não mostrou ser eficiente para extração de macromoléculas como as proantocianidinas.

Através da técnica de Espectrometria de Massa de alta Resolução (HRMS) foi possível identificar 11 compostos presentes nos extratos das folhas de *C. regium*. Sendo o ácido gálico, apigenina-*C*-hexose, luteolina-*C*-hexosídeo, Digaloil hexose e 1,2,3,4,6-Pentagaloil hexose compostos comumente encontrados em folhas de *C. regium*.

A combinação das técnicas de extração mostrou ser menos eficaz para a extração de fenóis, consequentemente tendo menor valor na inibição micelial do fungo *Bipolaris oryzae*.

O extrato das folhas de *C. regium* mostrou ser eficaz na inibição do halo de crescimento do fungo; levando em consideração as três técnicas de extração recomenda-se a utilização dos extratos na concentração de 500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$.

5. Referência

Agostini-Costa, T. D. S., Lima, A., Lima, M. V. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina *versus* método do butanol ácido. **Química Nova**, v. 26, p. 763-765, 2003.

Ashfaq, B., Arshad, H. M. I., Atiq, M., Yousaf, S., Saleem, K., & Arshad, A. (2021). Biochemical profiling of resistant phenotypes against *bipolaris oryzae* causing brown spot disease in rice. **Frontiers in Agronomy**, 3, 675895.

Castañeda, D. C. B., Pinciroli, M., Bezus, R., & Sisterna, M. (2021). Alternativas de biocontrol antifungico in vitro para el manchado de grano/semilla en arroz Alternativos biocontroles *in vitro* antifúngicos para a desposição de grãos/seedes no arroz. **Brazilian Journal of Development**, 7(6), 55457-55466.

Chang, Z., Zhang, Q., Liang, W., Zhou, K., Jian, P., She, G., Zhang, L. A comprehensive review of the structure elucidation of tannins from terminalia Linn. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA (CEPEA) E CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA AGRICULTURA E PECUÁRIA (CNA). PIB do agronegócio brasileiro de 1996 a 2018. Disponível em: < <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/arroz.aspx> >.

Clifford, M. N., Stoupi, S., Kuhnert, N. Profiling and characterization by LC-MS n of the galloylquinic acids of green tea, tara tannin, and tannic acid. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 8, p. 2797-2807, 2007.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 10, safra 2022/23, n. 12 décimo segundo levantamento, setembro 2023.

da Silva Lobo, V. L., de Filippi, M. C. C., Rosado, A. W. C., & de Ávila Rodrigues, F. **Mancha parda do arroz**.

Dewick, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2009.

Dorneles, K. D. R., Pazdiora, P. C., Marquezin, D., Rebhahn, I. G., Morello, T. N., & Dallagnol, L. J. (2019). Componentes bioquímicos e epidemiológicos associados à resistência do arroz à mancha parda. **Summa Phytopathologica**, 45, 44-49.

- Epifanio, N. M. D. M. Caracterização química e atividade antioxidante do extrato aquoso da salsa crespa (*Petroselinum crispum* var. *crispum*). 2020.
- Ferreira, N., de Filippi, M. C. C., & da Conceição, E. C. (2022). Bioprodutos contendo extratos vegetais padronizados de *Ruta graveolens* L. e *Rosmarinus officinalis* L. no controle da brusone e mancha-parda do arroz.
- Galvão, F., Dos Santos, E., da Silva Dantas, F. G., da Silva Santos, J. I., Sauda, T. D. P. C., Dos Santos, A. C., de Oliveira, K. M. P. (2023). Chemical composition and effects of ethanolic extract and gel of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. Leaves on inflammation, pain, and wounds. **Journal of Ethnopharmacology**, 302, 115881.
- Giarola, L. R., Coco, J. C., de Oliveira Sousa, I. M., Cefali, L. C., Ataíde, J. A., Tavares, G. D., Mazzola, P. G. (2022). *Pterodon pubescens* Benth (sucupira) microencapsulation influence on formulation stability outcome compared to non-encapsulated extract. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 67, 102875.
- Gontijo, D. C., Brandão, G. C., Gontijo, P. C., de Oliveira, A. B., Diaz, M. A. N., Fietto, L. G., & Leite, J. P. V. Identification of phenolic compounds and biologically related activities from *Ocotea odorifera* aqueous extract leaves. **Food Chemistry**, 230, 618-626. 2017.
- Loayza Cubas, Y. L. (2023). Efecto de fungicidas químicos y orgánicos en el control del manchado de grano en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.), Naranjos Alto, 2023.
- Nascimento, V. A. D. (2022). Desenvolvimento e avaliação de filmes biodegradáveis à base de fécula de mandioca incorporado com óleo essencial das folhas do *Cochlospermum regium* no armazenamento de morangos.
- Scárdua, F. P., Couto, L. C., Rodrigues, C. C., Cordeiro, S. A. **Taninos vegetais ou polifenóis**. 2021.
- Scheuermann, K. K., & Nesi, C. N. (2021). Controle químico de brusone e mancha parda na cultura do arroz irrigado. *Summa Phytopathologica*, 47, 168-172.
- Silva, H. R. D. Estudos de diferentes técnicas de extração do extrato de própolis. 2022.
- Sinosaki, N. B., Tonin, A. P., Ribeiro, M. A., Poliseli, C. B., Roberto, S. B., Silveira, R. D., ... & Meurer, E. C. Structural study of phenolic acids by triple quadrupole mass spectrometry with electrospray ionization in negative mode and H/D isotopic exchange. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 2, p. 402-408, 2020.

Sobrinho, C. A., Pereira, J. A., da Silva Lobo, V. L., & Santos, A. R. B. (2023). Incidência de mancha-parda (*Bipolaris oryzae*) em arroz no estado do Piauí.

Souza, M. E. A. O., Candeias, V. M. S., Junior, N. D. M. A., Januário, E. T. F., Lima, D. A., de Oliveira Vilar, S. B., Amorim, T. A. Capacidade Antioxidante do Extrato do pó da amêndoa do caroço da manga por diferentes técnicas de extração. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e12010917760-e12010917760, 2021.a.

Souza, M. E. A. O., da Rocha Gomes, M., Candeias, V. M. S., Junior, N. D. M. A., Januário, E. T. F., Lima, D. A., de Oliveira Vilar, S. B. Determinação da capacidade antioxidante do extrato do pó da casca do abacaxi aplicando diferentes técnicas de extração. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e155101018574-e155101018574, 2021.b

Świątek, Ł., Sieniawska, E., Sinan, K. I., Maciejewska-Turska, M., Boguszevska, A., Polz-Dacewicz, M., Zengin, G. LC-ESI-QTOF-MS/MS Analysis, Cytotoxic, Antiviral, Antioxidant, and Enzyme Inhibitory Properties of Four Extracts of Geranium pyrenaicum Burm. f.: A Good Gift from the Natural Treasure. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 14, p. 7621, 2021.

Thanh, N. Brown Spot Disease Infected More than 2,000 Hectares of Spring Rice in Ha Tinh. 2018. Available online: <https://nongnghiep.vn/benh-dom-nau-tiem-lua-an-hon-2000-ha-lua-xuan-o-ha-tinh-d216544.html> (acesso 12 de dezembro de 2023). (*In Vietnamese*).

Vieira, A. B., dos Santos, C. V., Bandeira, D. M., Pedroso, D., Rosset, J., de Souza, M. M., da Silva Pinto, F. G. Extratos vegetais: uma perspectiva comparativa entre métodos de extração clássicos e modernos. **Microbiologia e Biotecnologia Ambiental in foco**, Volume, p. 17; 2024.

5. Conclusão Geral

Os compostos majoritários encontrados no extrato hexânico dos frutos de *Pterodon pubescens* foram *E*- cariofileno, vouacapano, *E*- geranilgeraniol e dehidroabietol. Nos extratos hidrometanólico das folhas de *Cochlospermum regium* foi possível identificar ácido gálico, apigenina-*C*-hexose, luteolina-*C*-hexosídeo, Digaloil hexose e 1,2,3,4,6-Pentagaloil hexose.

O HE-PP foi ativo contra várias bactérias *in vitro* com valores de MIC variando entre 12,5 µg/mL e 50 µg/mL. A atividade citotóxica do HE-PP foi avaliada em linhas celulares humanas tumorais e não tumorais. HE-PP mostrou citotoxicidade seletiva para adenocarcinoma cervical.

A técnica de extração influencia no rendimento dos extratos e quantidade de compostos extraídos das folhas de *C. regium*, os extratos demonstraram fungitoxicidade, conseguindo inibir o halo de crescimento micelial de *Bipolaris oryzae in vitro* na concentração de 500 µg. mL⁻¹.

Apêndice

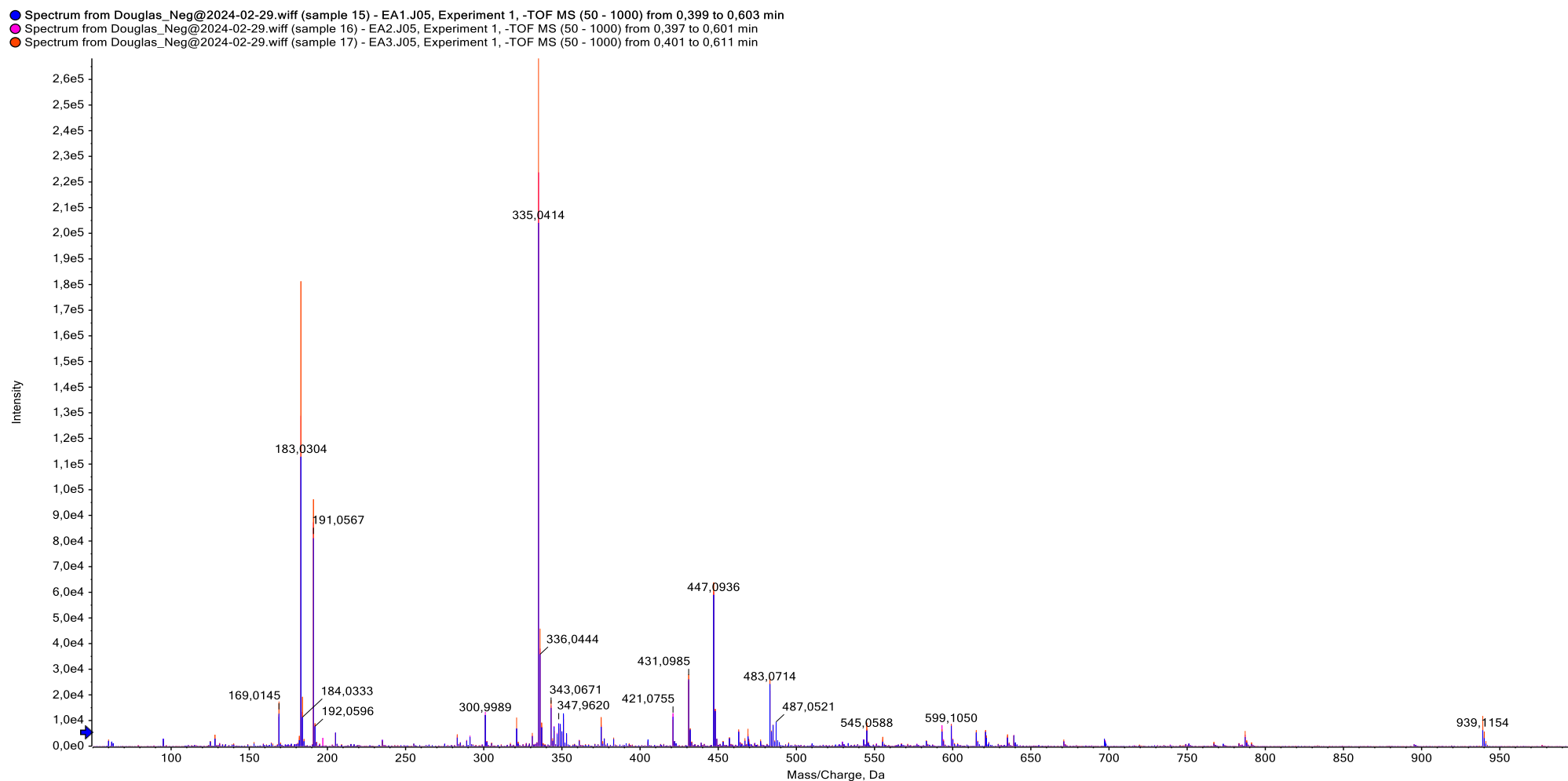


Imagem 1: Cromatograma HRMS $[M - H]^-$ dos principais constituintes no extrato hidrometanólico acidificado das folhas de *Cochlospermum regium* utilizando a técnica de extração por maceração (azul), sobrepostos aos cromatogramas dos extratos hidrometanólico acidificado, utilizando a técnica de extração por ultrassom (vermelho) e a técnica de extração por maceração + ultrassom (rosa).

- Spectrum from Douglas_Neg@2024-02-29.wiff (sample 15) - EA1.J05, Experiment 1, -TOF MS (50 - 1000) from 0,399 to 0,603 min
- Spectrum from Douglas_Neg@2024-02-29.wiff (sample 16) - EA2.J05, Experiment 1, -TOF MS (50 - 1000) from 0,397 to 0,601 min
- Spectrum from Douglas_Neg@2024-02-29.wiff (sample 17) - EA3.J05, Experiment 1, -TOF MS (50 - 1000) from 0,401 to 0,611 min

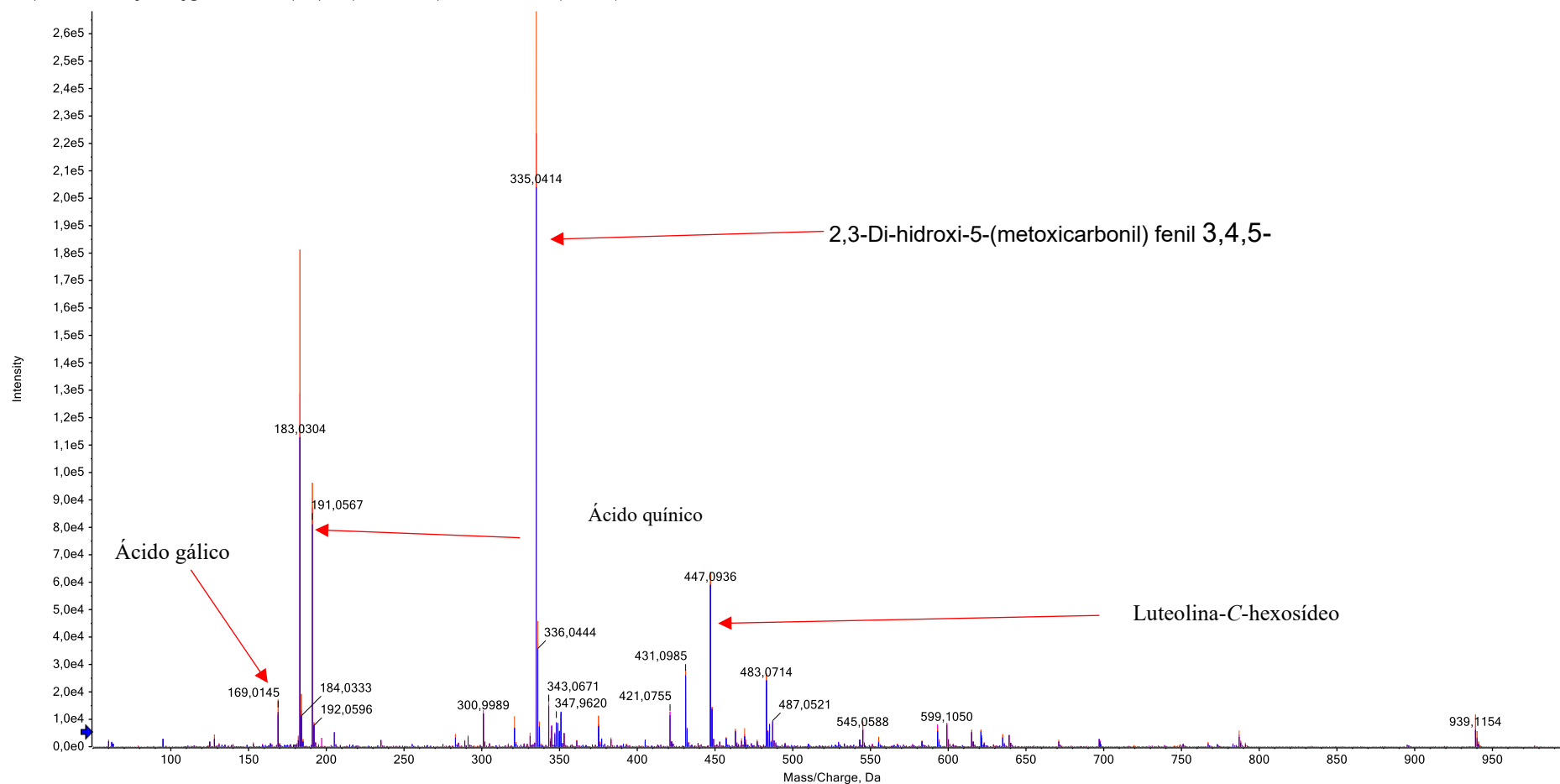


Imagem 2: Tentativa de identificação dos principais picos do cromatograma HRMS $[M - H]^-$ dos principais constituintes no extrato hidrometanólico acidificado das folhas de *Cochlospermum regium*. Sobreposição dos cromatogramas: azul, cromatograma do extrato obtido por maceração; vermelho, cromatograma do extrato obtido por ultrassom e cromatograma em rosa, do extrato obtido por maceração + ultrassom.

Proposta de fragmentação para o pico m/z 449,1089 $[M + H]^+$ identificado como Luteolina-C-hexosídeo.

- Spectrum from Douglas@2024-02-28.wiff (sample 15) - EA1.J05, Experiment 1, +TOF MS (50 - 1000) from 0,373 to 0,556 min
- Spectrum from Douglas@2024-02-28.wiff (sample 16) - EA2.J05, Experiment 1, +TOF MS (50 - 1000) from 0,372 to 0,571 min
- Spectrum from Douglas@2024-02-28.wiff (sample 17) - EA3.J05, Experiment 1, +TOF MS (50 - 1000) from 0,374 to 0,558 min

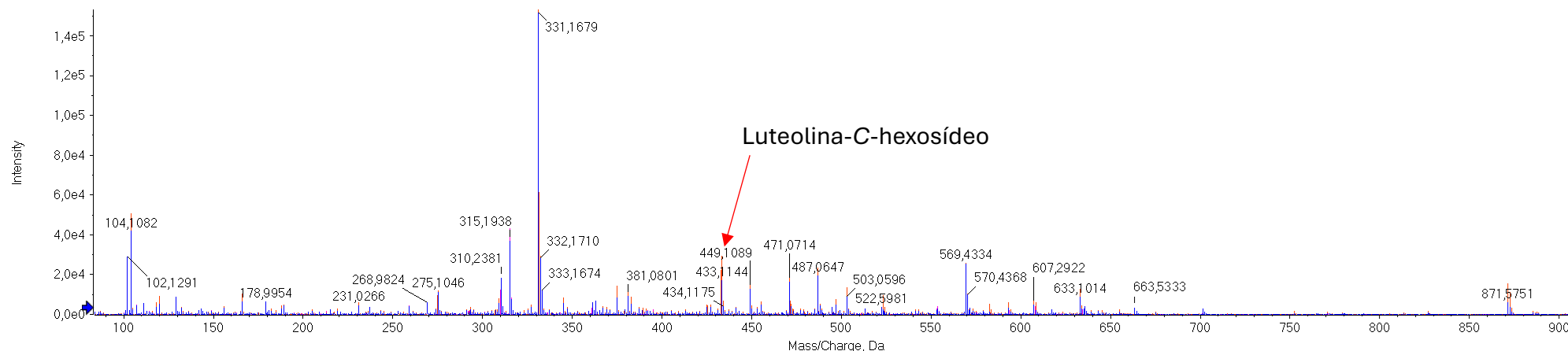


Imagem 3: Cromatograma HRMS $[M + H]^+$ dos principais constituintes no extrato hidrometanólico acidificado das folhas de *Cochlospermum regium*, utilizando a técnica de extração por maceração (azul) sobreposto aos cromatogramas dos extratos hidrometanólico acidificado, utilizando a técnica de extração por ultrassom (vermelho) e a técnica de extração por maceração + ultrassom (rosa), pico m/z 449,1089 $[M + H]^+$ identificado como Luteolina-C-hexosídeo.

Spectrum from Douglas@2024-02-28.wiff (sample 15) - EA1.J05, Experiment 3, +TOF MS² (50 - 1000) from 0,424 min
Precursor: 449,1 Da

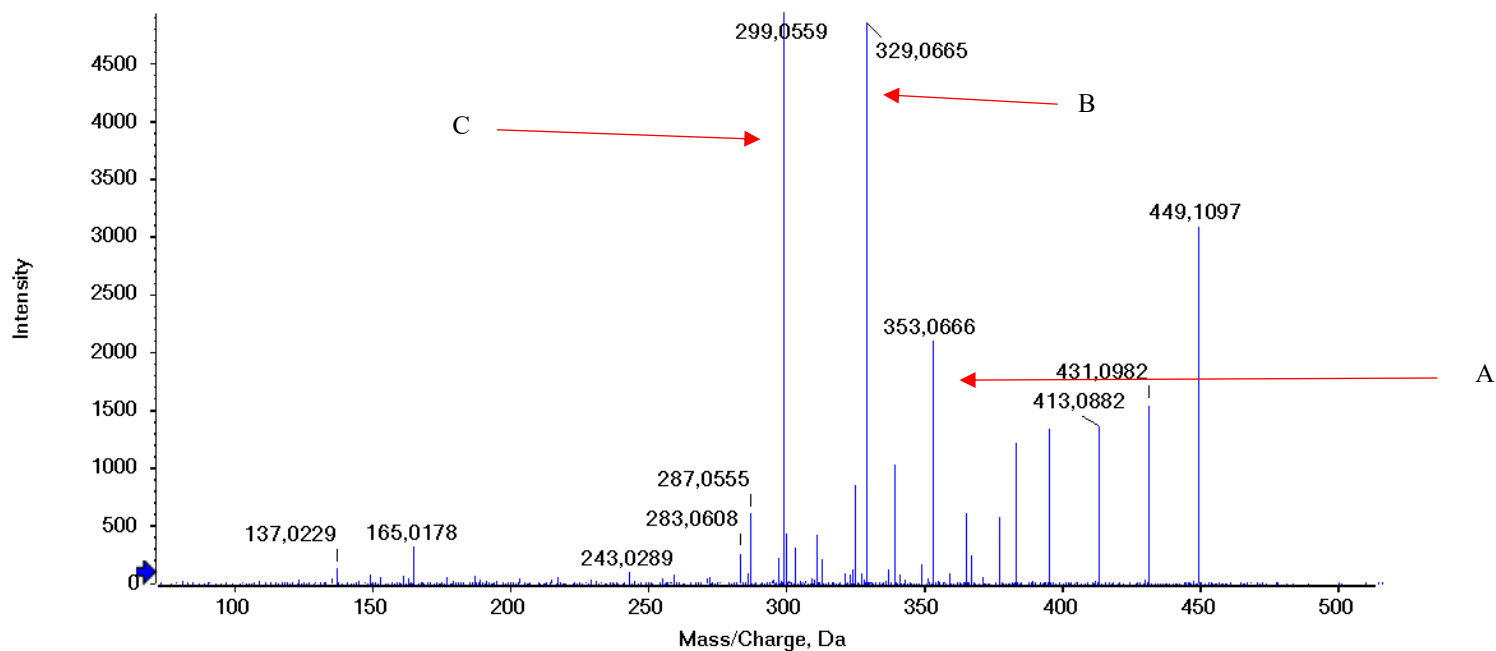


Imagem 4: Proposta para a fragmentação do pico MS² de [M + H] m/z 449,1097 identificado como Luteolina-C-hexosídeo do extrato hidrometanólico acidificado das folhas de *Cochlospermum regium*. Mecanismo de fragmentação proposto para MS²: 353,0666 [M + H - 96]⁺ (41%) (A), 329,0665 [M + H - 120]⁺ (B), (96%) e 299,0559 [M + H - 150]⁺ (100%) (C);

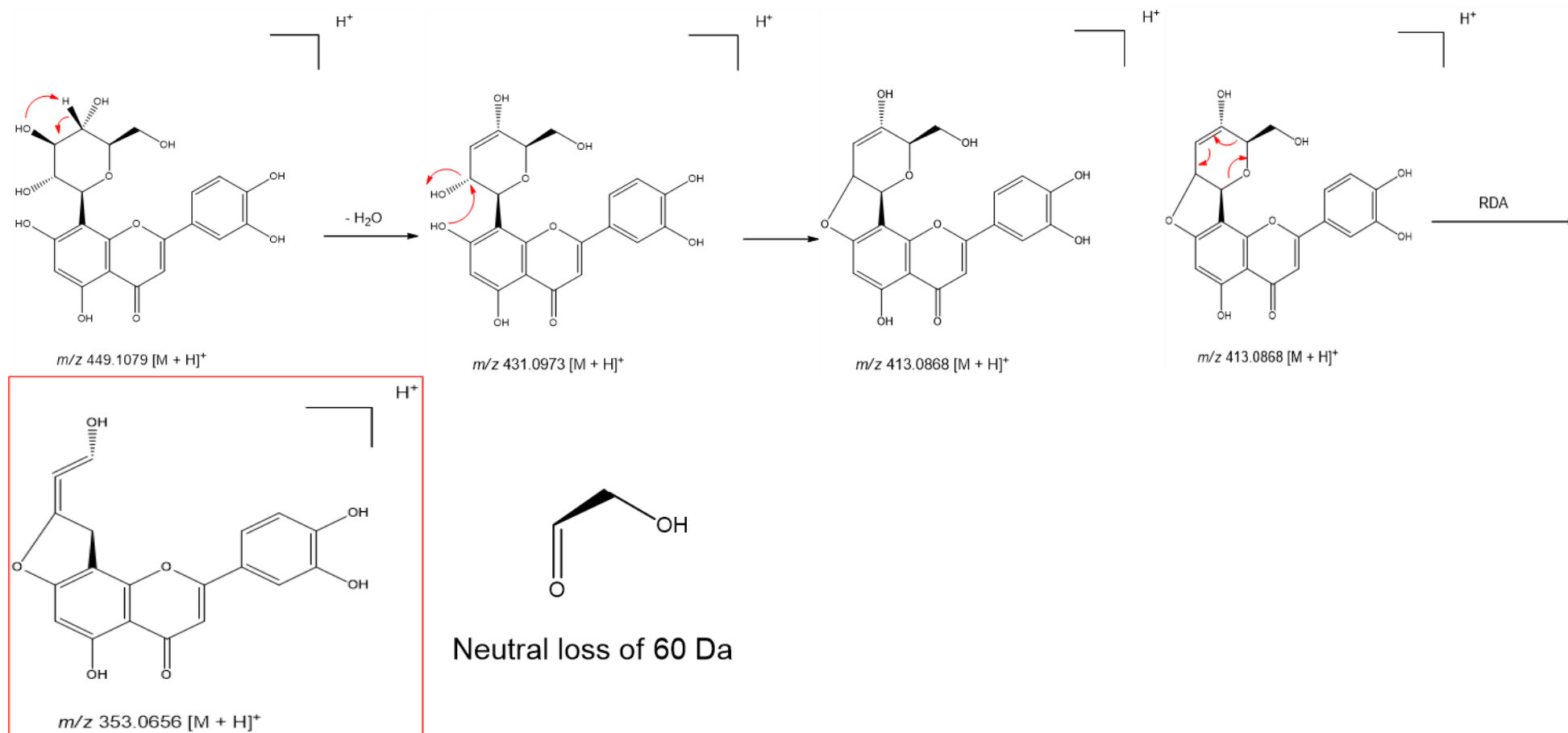


Imagem 5: Proposta de mecanismo de fragmentação proposto para Luteolina-C-hexosídeo MS² 353,0665 [M + H – 96]⁺, na caixa vermelha a molécula após fragmentação.

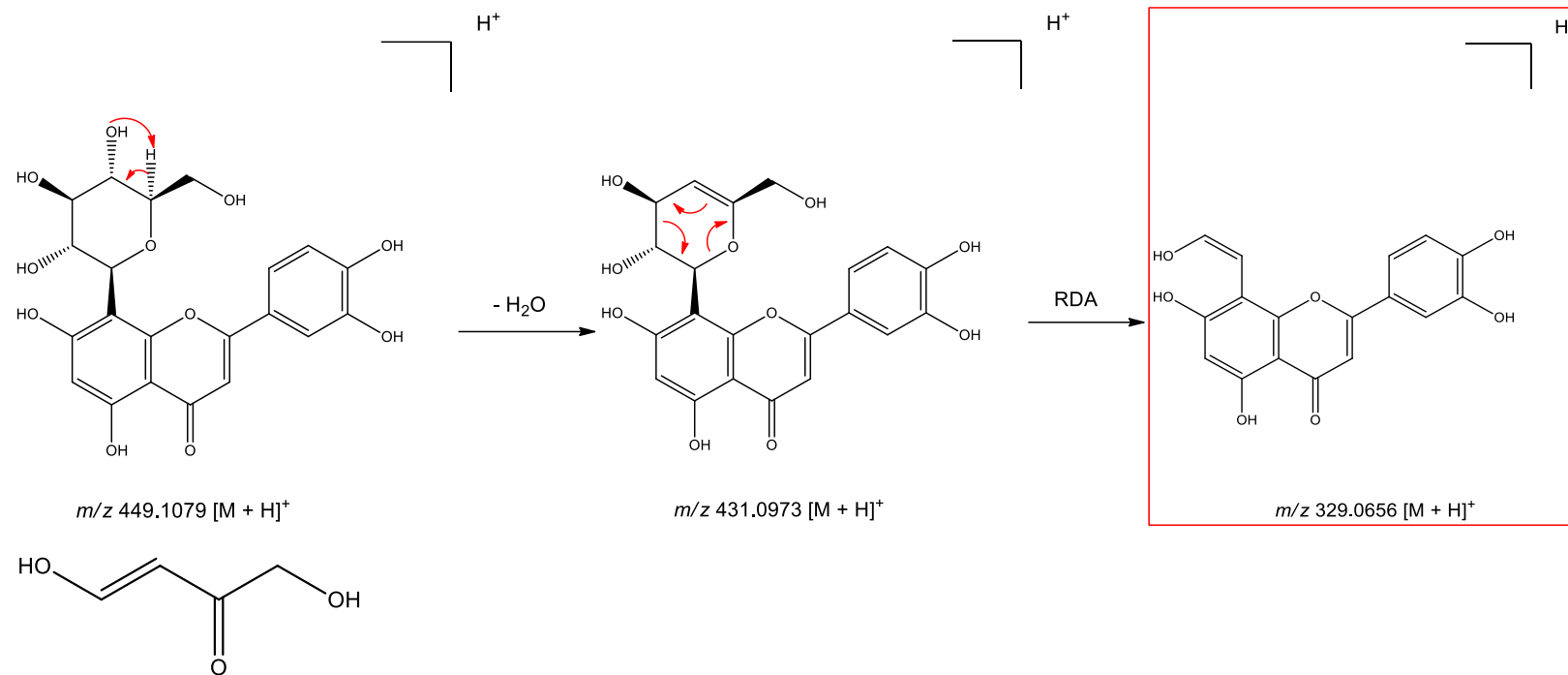


Imagem 6: Proposta de mecanismo de fragmentação proposto para Luteolina-C-hexosídeo MS^2 329,0665 $[M + H - 120]^+$, na caixa vermelha a molécula após fragmentação

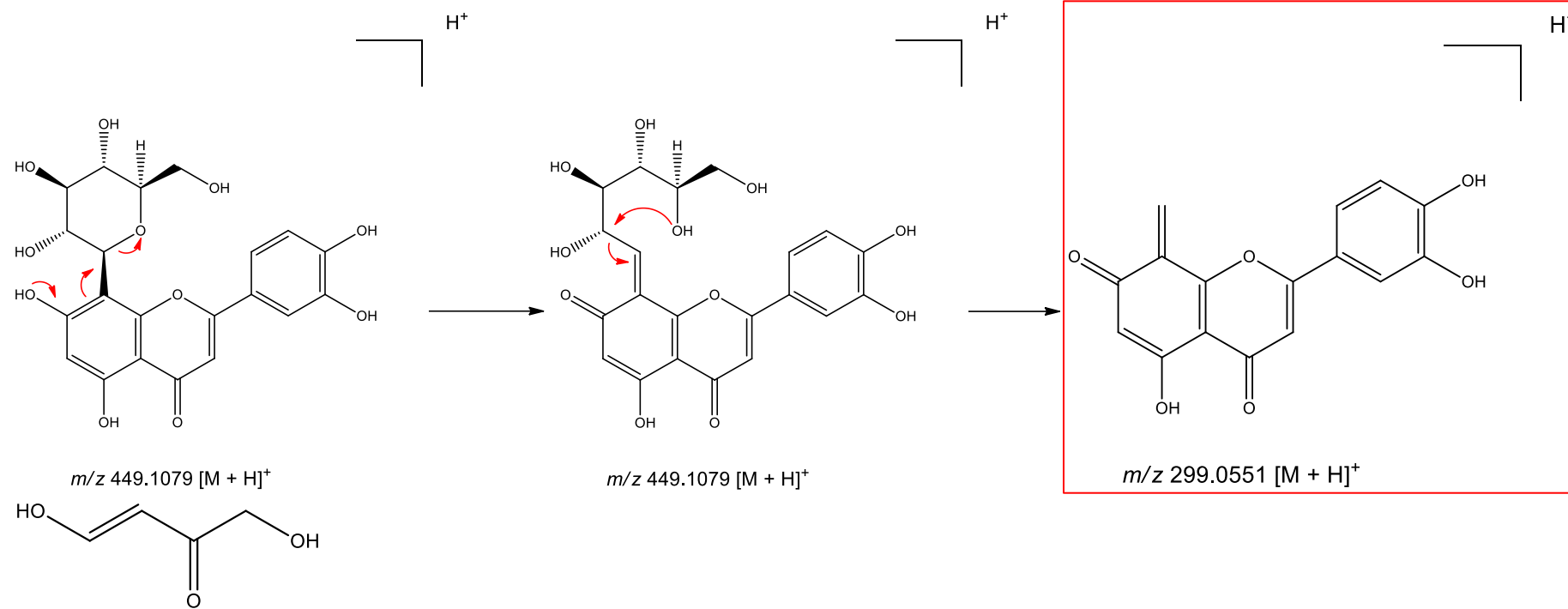


Imagem 7: Proposta de mecanismo de fragmentação proposto para Luteolina-C-hexosídeo MS^2 299,0551 $[M + H - 150]^+$, na caixa vermelha a molécula após fragmentação

Tabela 1: Quantificação dos principais compostos identificados dos extratos hidrometanólico acidificado das folhas de *C. regium*, utilizando as três técnicas de extração analisadas por HRMS (Espectrometria de Massa de Ultra Eficiência).

Técnica de extração	Compostos identificados				
	Gallic Acid	Quinic acid	2,3-Dihydroxy-5- (methoxycarbonyl)phenyl 3,4,5-trihydroxybenzoate	Luteolin- <i>C</i> -hexoside	Digalloylhexose
Ultrassom	9,90x10 ⁴	2,10x10 ⁵	6,90 x10 ⁵	3,30 x10 ⁵	2,70 x10 ⁵
Maceração	9,20x10 ⁴	1,90 x10 ⁵	5,00 x10 ⁴	2,90 x10 ⁵	2,30 x10 ⁵
Maceração + Ultrassom	8,40x10 ⁴	1,90 x10 ⁵	6,70 x10 ⁵	2,90 x10 ⁵	2,20 x10 ⁵

* Valores dos compostos expressos em ppm.

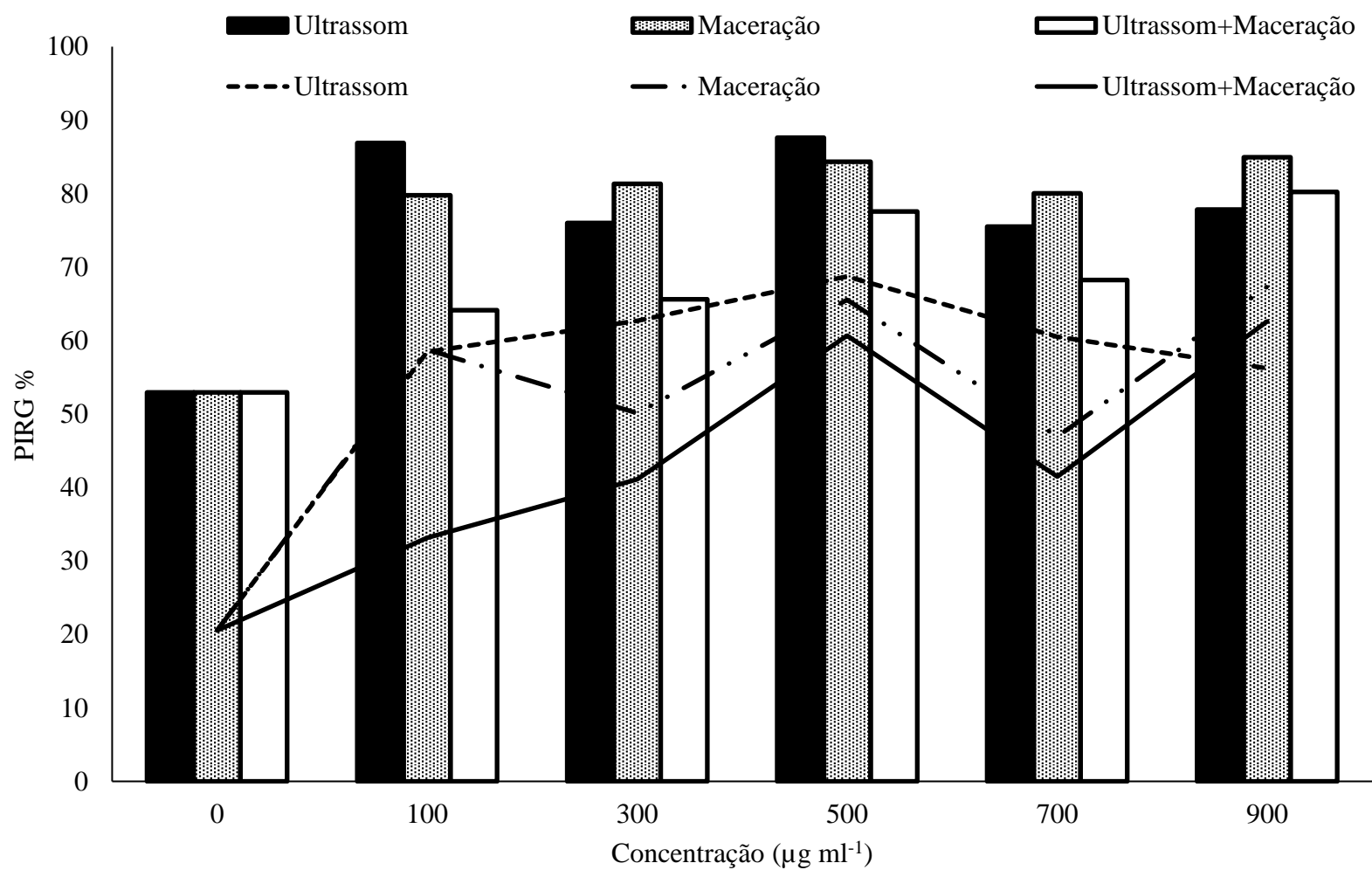


Imagem 8: Percentual de inibição do crescimento de *Bipolaris oryzae* cepa BRM 67786 por extrato hidrometanólico acidificado, utilizando as técnicas de extração: ultrassom, maceração e maceração + ultrassom, nas concentrações de 0 a 900 µg. mL⁻¹.

